

Expression of circulatory microRNA-155 in non-Hodgkin lymphomas and rheumatoid arthritis

Seyed Rasool Mahdavi Anari¹, Babak Kheirkhah^{1,2*}, Kumarss Amini³, Farzin Roozafzai⁴¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran²Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran³Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran⁴Digestive Diseases Research Institute, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 6 Sep 2021

Accepted: 7 Dec 2021

ePublished: 7 May 2022

Keywords:

- Rheumatoid arthritis
- Lymphoma Non-Hodgkin
- MicroRNA-155
- Polymerase chain reaction

Abstract

Background. Micro-ribonucleic acids (miRs) take part in post-transcriptional gene regulation. MiR-155 regulates hematopoiesis, oncogenesis, and immunologic and inflammatory processes. We investigated the expression levels of miR-155 in sera of patients with Burkitt's lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and rheumatoid arthritis.

Methods. In this cross-sectional observation, we used real-time polymerase chain reaction to evaluate expression of miR-155 in sera of 92 Iranian adults who were healthy or had Burkitt's lymphoma, DLBCL, or rheumatoid arthritis. The relative quantification of gene expression was calculated in terms of cycle threshold values (Ct). We conducted Pearson's and Spearman's correlations, Fisher's exact test, and one-way analysis of variance and Games-Howell post-hoc test, with the level of significance at 0.05.

Results. The expression of miR-155 was independent of sex and age in each study group. In comparison with healthy subjects ($-\Delta Ct \pm SD$: -2.29 ± 1.92), miR-155 expression increased in DLBCL (2.49 ± 1.01), and rheumatoid arthritis (2.30 ± 1.34) patients, but did not change in adults with Burkitt's lymphoma (-1.29 ± 2.11).

Conclusion. MiR-155 was significantly elevated in the sera of patients with DLBCL, and rheumatoid arthritis. Further studies with larger sample sizes are needed to assess the diagnostic and therapeutic applications of miR-155 in these patients.

Practical Implications. The expression of miR-155 increases in sera of patients suffering from DLBCL, and rheumatoid arthritis. The expression of miR-155 was independent of sex and age of patients in this study.

How to cite this article: Mahdavi Anari S R, Kheirkhah B, Amini K, Roozafzai F. Expression of circulatory microRNA-155 in non-Hodgkin lymphomas and rheumatoid arthritis. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;44(3):221-231. doi: 10.34172/mj.2022.018. Persian.

Extended Abstract

Background

Cancers and chronic inflammatory diseases impose a considerable burden on individuals and populations. MicroRNA-155 (miR-155) post-

transcriptionally regulates hematopoiesis, oncogenesis, and inflammation. We investigated the expression levels of miR-155 in sera of patients with

*Corresponding author; Email: babakkheirkhah@yahoo.com

Burkitt's lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and rheumatoid arthritis.

Methods

In this cross-sectional observation, we used real-time polymerase chain reaction to evaluate expression of miR-155 in sera of Iranian adults who were healthy or had Burkitt's lymphoma, DLBCL, or rheumatoid arthritis. Of 121 collected whole blood samples, 14 were excluded from the study because the participants were younger than 18 years, had history of other malignancies, underwent treatments for cancer, and/or the specimens were insufficient or inappropriate. We extracted total RNA from buffy coat layer of the blood sample. The concentration of the extracted RNA was determined by optic absorbance at 260 nm. All samples also showed distinct 28s rRNA and 18s rRNA bands in agarose gel (1.2% agarose, and ethidium bromide) electrophoresis, implying the quality and integrity of the eluted RNA. We adapted an original sequence from the literature and designed a stem-loop forward primer for miR-155 gene amplification. Some base-pairs of the original stem were substituted in order to optimize the melting temperature. Nucleotides were also added to the 5' end to make the primer more specific. Real-time polymerase chain reaction was carried out through the following thermocycling conditions: polymerase activation at 95 °C for 15 seconds, followed by 45 cycles of denaturation at 94 °C for 15 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds, and extension at 65 °C for 35 seconds. Melting curve analysis was performed between 55 °C and 95 °C with increments of 0.5 °C every three seconds. U6B small nuclear RNA (RNU6B) gene was used as an endogenous control. The relative quantification of gene expression was calculated in terms of cycle threshold values (Ct) by subtracting the Ct values of RNU6B from the Ct values of miR-155. We conducted Pearson's and Spearman's correlations,

Fisher's exact test, and one-way analysis of variance and Games-Howell post-hoc test, with the level of significance of 0.05.

Results

Of 107 included samples, 15 were inappropriate for processing and analysis. We finally analyzed the data of 92 participants 59 of whom (64.1%) were men. The expression of miR-155 was independent of sex and age in the study groups; the coefficients [95% confidence interval] of Pearson's correlation between age (1-year increments) and miR-155 expression in Burkitt's lymphoma, DLBCL, and rheumatoid arthritis patients were 0.21 [(-0.16)–0.56], 0.35 [(-0.01)–0.71], and -0.18 [(-0.51)–0.16], respectively. The coefficients [95% confidence interval] of Spearman's correlation between female sex and miR-155 expression in Burkitt's lymphoma, DLBCL, and rheumatoid arthritis patients were 0.30 [(-0.04)–0.64], -0.06 [(-0.41)–0.30], and -0.30 [(-0.60)–0.03], respectively. In comparison with healthy participants ($-\Delta\text{Ct}$: -2.29 [\pm standard deviation: 1.92]), miR-155 expression increased ($P<0.001$) in DLBCL (2.49 ± 1.01), and rheumatoid arthritis (2.30 ± 1.34) patients, while it did not change ($P=0.431$) in adults with Burkitt's lymphoma (-1.29 ± 2.11). The expression of miR-155 in DLBCL and rheumatoid arthritis patients was statistically the same ($P=0.930$).

Conclusion

According to our observation, miR-155 expression increased in the sera of patients suffering from DLBCL, or rheumatoid arthritis. The expression was independent of sex and age in this study. Further studies with larger sample sizes are needed to assess the diagnostic and therapeutic applications of miR-155 in these patients.

بیان میکرو RNA-155 در سرم مبتلایان به لنفوم‌های غیرهوجکین و آرتریت روماتوئید

سید رسول مهدوی اناری^۱، بابک خیرخواه^{۱،۲*}، کیومرث امینی^۳، فرزین روزافزای^۴

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران
^۲ گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران
^۳ گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران
^۴ پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵
پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۶
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۲/۱۷

کلیدواژه‌ها:

- آرتریت روماتوئید
- لنفوم غیرهوجکین
- میکرو RNA-155
- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

چکیده

زمینه. میکروRNAها (miRs) در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارند. miR-155 در تنظیم فرآیندهای متعددی مانند خون‌سازی، ایمنی، سرطان‌زایی و التهاب نقش دارد. این مطالعه با هدف بررسی بیان miR-155 در سرم مبتلایان به لنفوم بزرگ (DLBCL) و آرتریت روماتوئید اجرا شده است.

روش کار. در این مطالعه مقطعی، بیان miR-155 در ۹۲ نمونه سرم از افراد سالم و یا مبتلایان به لنفوم بزرگ، DLBCL یا آرتریت روماتوئید از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ارزیابی شد. بیان نسبی ژن در نمونه‌ها از طریق محاسبه اختلاف مقادیر آستانه چرخه (Ct) ژن miR-155 با ژن کنترل داخلی اندازه‌گیری شد. سطح معناداری تمامی ارزیابی‌های آماری، شامل همبستگی پیرسون و اسپیرمن، آزمون دقیق فیشر، آنالیز یک‌طرفه واریانس و آزمون تعقیبی جیمز-هول، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها. بیان miR-155 ارتباطی با سن و جنس افراد نداشت. در مقایسه با افراد سالم (ΔCt : -۲/۲۹ - [انحراف معیار: $\pm 1/92$]) بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL ($2/49$ [$\pm 1/01$]) و آرتریت روماتوئید ($2/30$ [$\pm 1/34$]) افزایش یافت، ولی در مبتلایان به لنفوم بزرگ ($1/29$ - [$\pm 2/11$]) تغییری نشان نداد.

نتیجه‌گیری. بیان miR-155 در بیماران مبتلا به DLBCL و آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد. مطالعات بیشتر، با حجم نمونه بزرگتر، برای ارزیابی کاربردهای تشخیصی و درمانی miR-155 در این بیماران مورد نیاز است.

پیامدهای عملی. بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد. در این مطالعه، بیان miR-155 مستقل از سن و جنس مبتلایان بود.

مقدمه

نظر در میان میکروRNAها متمایز است که بیان آن توسط سیتوکین‌ها و محرک‌های ایمنولوژیک تنظیم می‌شود.^۱ این میکروRNA در فرآیندهای زیستی متعدد شامل خون‌سازی، ایمنی، التهاب، و سرطان‌زایی نقش دارد.^۲ سرطان‌ها و بیماری‌های التهابی مزمن، بار (burden) قابل توجهی به جوامع وارد می‌کنند.^۳ لنفوم‌های غیرهوجکین (NHLs) هفتمین علت بروز سرطان و یازدهمین علت شایع مرگ مرتبط با سرطان در جهان هستند.^۴ حدود ۷-۳ درصد از سرطان‌ها در ایران را شامل می‌شوند و به ترتیب پنجمین و هشتمین سرطان شایع در مردان و زنان ایرانی هستند.^۵ افزایش سریع در میزان بروز NHLs سبب افزایش بار ناشی از

میکروRNAها (miRs) مولکول‌های تک‌رشته‌ای غیرکدکننده ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتیدی هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها پس از رونویسی، از طریق تخریب mRNA یا مهار ترجمه، نقش دارند.^۶ طیف گسترده‌ای از mRNAها هدف یک miR منفرد قرار می‌گیرند و اختلال در بیان miR می‌تواند بر تکثیر، تمایز و بقای سلول اثر بگذارد.^۷ میکروRNAها در مقایسه با سایر مولکول‌های RNA، در سرم پایدارتر بوده و در مقابل تخریب آنزیمی یا شیمیایی مقاوم‌تر هستند.^۸ توالی کدکننده miR-155 در B-cell integration cluster (BIC) روی کروموزوم ۲۱ قرار دارد که به miR-155 بالغ ۲۴ نوکلئوتیدی و دارای عملکرد پردازش می‌شود.^۹ miR-155 از این

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: babakkheirkhah@yahoo.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) CC BY 4.0 منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

پس از جمع‌آوری، ۵ میلی‌لیتر از هر نمونه خون به مدت ۲۰ دقیقه و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی-گراد) سانتریفیوژ شد. سپس لایه بافی‌کوت به کمک پمپ پاستور یک‌بار مصرف (آریان تجهیز، تهران، ایران) جدا و در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری (شرکت اپندورف، هامبورگ، آلمان) الیکوت شده و تا استفاده بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA: برای استخراج توتال RNA، محلول RNX-Plus (سیناژن، تهران، ایران) به مدت یک دقیقه با محتویات میکروتیوب ورتکس و مخلوط شده و ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. برای جداسازی، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب افزوده شد. میکروتیوب یک دقیقه تکان داده شده و سپس ۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی غنی از RNA، به دقت جدا و در میکروتیوب جدیدی الیکوت شد. اتانول ۱۰۰ درصد هم‌حجم به میکروتیوب جدید اضافه شده و به مدت یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا RNA ته‌نشین شود. سپس محتویات میکروتیوب به مدت ۴۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. لایه رویی دور ریخته شد و رسوب ته لوله با افزودن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و ورتکس کردن دوباره معلق شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی دور ریخته شده و رسوب ته لوله به مدت ۱۵ دقیقه در معرض هوای آزاد قرار گرفت تا خشک شود. در نهایت رسوب RNA در ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز معلق شده و تا استفاده بعدی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئین‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر بهترین جذب نوری را دارند. جذب نوری بالا در طول موج ۲۳۰ نانومتر نشان‌دهنده آلودگی با بافرهای استخراج RNA و یا سایر مواد ارگانیک است. بنابراین جهت کنترل کیفی و سنجش خلوص و غلظت RNA استخراج شده، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های یاد شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر ND-1000 UV-VIS (شرکت نانودراپ تکنولوژی، ویلمینگتون، دلاویر، آمریکا) خوانده شده و نسبت جذب نوری در این طول موج‌ها (۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰) محاسبه شد. همچنین الکتروفورز تمامی نمونه‌ها روی ژل آگارز (آگارز ۱/۲ درصد و اتیدیوم

سرطان شده است. لنفوم بورکیت نوعی از NHL با سرعت رشد زیاد است و لنفوم سلول B بزرگ منتشر (DLBCL) شایع‌ترین نوع NHL در بالغین است که حدود ۴۰ درصد از تومورهای لنفوبیدی را شامل می‌شود.^۳ آرتريت روماتوئید یک بیماری التهابی خودایمنی مزمن، با بروز و شیوع افزایش‌یابنده - به‌ویژه در شرق مدیترانه - است که بار بسیاری را به فرد و جمعیت تحمیل می‌کند.^۶

این مطالعه با هدف ارزیابی سطح بیان miR-155 در سرم مبتلایان به سرطان‌های خونی (DLBCL و لنفوم بورکیت) و بیماری‌های التهابی (آرتريت روماتوئید) اجرا شده‌است.

روش کار

این مشاهده مقطعی روی بیان miR-155 در بالغین مبتلا به DLBCL، لنفوم بورکیت یا آرتريت روماتوئید در سال ۱۳۹۹ در تهران اجرا شده است. حجم نمونه حداقلی ۱۰۰ نفر برای سنجش بیان miR-155 با فاصله اطمینان ۹۵ درصد و قدرت ۸۰ درصد، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Sample size} = \left(\left(\frac{Z_{1-\alpha/2}}{d} \right) \times \text{Standard Deviation} \right)^2$$

α : 0.05, $Z_{1-\alpha/2}$: 1.96, d : 0.2, Standard Deviation: 1 (فرصی)

جمع‌آوری نمونه‌های خون: با مرور مدارک پزشکی و گزارش‌های یافته‌های پاتولوژی در بایگانی آزمایشگاه‌های هیستوپاتولوژی شهر تهران، اطلاعات مرتبط با تشخیص بیماری، سابقه درمانی، سن و جنس افراد جمع‌آوری شد. پس از مرور اطلاعات، نمونه‌های خون افرادی که DLBCL، لنفوم بورکیت یا آرتريت روماتوئید آن‌ها توسط هیستوپاتولوژی و سرولوژی تایید شده بود، در این مطالعه ارزیابی شد. همچنین نمونه‌های خون افراد به ظاهر سالم یا مبتلایان به بیماری‌هایی غیر از سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمنی و التهابی در این مطالعه بررسی شدند. شکل ۱ نحوه جمع‌آوری نمونه و مراحل انجام مطالعه را نشان می‌دهد. معیارهای خروج از مطالعه شامل سن کمتر از ۱۸ سال، سابقه ابتلا به سرطان‌های دیگر، سابقه درمان سرطان (شیمی درمانی، رادیوتراپی، ژن‌تراپی) و مقادیر ناکافی نمونه بود.

در نهایت، ۱۰۷ نمونه خون کامل در لوله‌های اتیلن-دیامین-تترااستیک اسید از آزمایشگاه‌های هیستوپاتولوژی سطح شهر تهران جمع‌آوری شدند. اگرچه تمامی آزمایشگاه‌های یادشده از اصول اخلاقی و پروتکل‌های استاندارد پیروی می‌کردند، در صورت وجود ایراد اخلاقی و قانونی، مانند عدم کسب رضایت‌نامه آگاهانه، نمونه از مطالعه خارج می‌شد.

و دو میکروولیتزر dNTP (همگی ساخت شرکت فرمنتاس: ترموفیشر ساینتیفیک، والتام، ماساچوست، آمریکا) به هر میکروتیوب افزوده شد. یک سیکل PCR معکوس (reverse PCR) طبق شرایط دمایی زیر، به ترتیب انجام گرفت: بر اساس دستورالعمل سازنده، برای فعال‌سازی آنزیم و انجام رونویسی معکوس، میکروتیوب‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در ادامه و برای غیرفعال کردن آنزیم ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با مشاهده یک نوار واضح در جایگاه درست طولی (۲۷ نوکلئوتید) مطابق با نشانگر (ladder)، در الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، از کیفیت cDNA اطمینان حاصل شد. سپس میکروتیوب‌ها تا استفاده بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند.

PCR زمان واقعی

PCR زمان واقعی (real-time PCR) با استفاده از کیت SYBR[®] Premix Ex Taq[™] PCR kit (شرکت تاکارا بیو، کوساتسو، شیگا، ژاپن) و با کمک دستگاه Rotor-Gene 6000 HRM Real-Time PCR Machine (کوربت، مورتلیک، استرالیا) انجام شد. پرایمرهای پیشروی miR-155 (5'-GAGGATGTATAATCGTAATTGT-3') و RNU6B به همراه پرایمر معکوس عمومی (هر کدام به حجم ۰/۵ میکروولیتزر و غلظت ۱۰ پیکومولار)، و cDNAهای الگوی miR-155 و RNU6B (هر کدام ۲ میکروولیتزر) به میکروتیوب اضافه شدند. حجم هر میکروتیوب با افزودن آب دیونیزه به ۲۵ میکروولیتزر رسانده شد. پس از قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه برای فعال‌سازی پلیمرز و بر اساس دستورالعمل سازنده، ۴۵ سیکل PCR زمان واقعی طبق شرایط دمایی زیر، به ترتیب انجام گرفت: ۱۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتور کردن، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و ۳۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای طولی‌سازی. هر ۳ ثانیه یک بار، منحنی ذوب در بازه ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد. منحنی ذوب تمامی نمونه‌ها دارای یک نقطه ذوب بیشینه (قله) بود که بیانگر خلوص محصولات PCR است. برای کنترل منفی از نمونه فاقد الگو استفاده شد. از ژن RNU6B به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای کمی‌سازی نسبی بیان ژن miR-155 از محاسبه اختلاف مقادیر آستانه چرخه (Ct) برای ژن‌های miR-155 و کنترل داخلی (RNU6B) استفاده شد.

بروماید) نشان‌دهنده دو باند مشخص 28s rRNA و 18s rRNA بود که بیانگر کیفیت و خلوص RNA استخراج شده است.

طراحی پرایمر

در این مطالعه، برای تکثیر ژن miR-155 از یک پرایمر پیشرو با ساختار ساقه و حلقه استفاده شد. به عنوان یک قانون کلی، توالی و طول این پرایمر باید تا حد امکان با توالی و طول miR-155 یکسان باشد. ساختار اولیه پرایمر miR-155 از متون استخراج شد (3'-TGCTAATCGTGATAGGGG-5')^۸ برای افزایش طول، چند نوکلئوتید به قسمت حلقه اضافه شد. پرایمری با دمای ذوب بالا مقادیر کمتری از محصول نهایی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (polymerase chain reaction) (PCR) تولید می‌کند. از سوی دیگر، دمای ذوب پایین پرایمر سبب غیراختصاصی شدن محصولات PCR می‌شود. از این رو، چند جفت باز در قسمت ساقه نیز تغییر داده شدند تا دمای ذوب از ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد به ۸۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافته و پرایمر برای تولید بیشترین مقادیر محصولات اختصاصی در PCR بهینه شود. همچنین، برای اختصاصی‌تر شدن پرایمر، نوکلئوتیدهایی به انتهای ۵' افزوده شد (5'-GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACAACCCCT-3') برای طراحی پرایمر از نرم‌افزار جین رانر نسخه ۶ (شرکت نرم‌افزاری هستینگز، آماریلو، تگزاس، آمریکا) استفاده شد. برای تکثیر ژن U6B small nuclear RNA (RNU6B) از کیت human RNU6B miScript Primer Assay (کیاژن، هیلدن، آلمان) استفاده شد.

سنتر cDNA

مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ (شرکت نانودراپ تکنولوژی، ویلمینگتون، دلاویر، آمریکا) از میکروتیوب حاوی مخلوط معلق برداشته و در چهار میکروتیوب جدید الیکوت شد. سپس پرایمر معکوس عمومی (5'-GAGCAGGGTCCGAGGT-3')، پرایمر پیشرو RNU6B (5'-CGGTTTAATGCTAATCGTGA-3') و پرایمر پیشرو ساقه و حلقه miR-155 (هر کدام به حجم ۱/۵ میکروولیتزر و غلظت ۱۰ پیکومولار) به هر میکروتیوب اضافه شدند. با افزودن آب بدون نوکلئاز، حجم مخلوط به ۱۳ میکروولیتزر رسانده شد. برای دناتور کردن دورشته‌ای‌های پرایمر، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار داده - شدند تا اتصال پرایمر به RNA الگو تسهیل شود. سپس بافر فرمنتاس 5x، یک میکروولیتزر آنزیم ترانس کریپیتاز معکوس MMLV

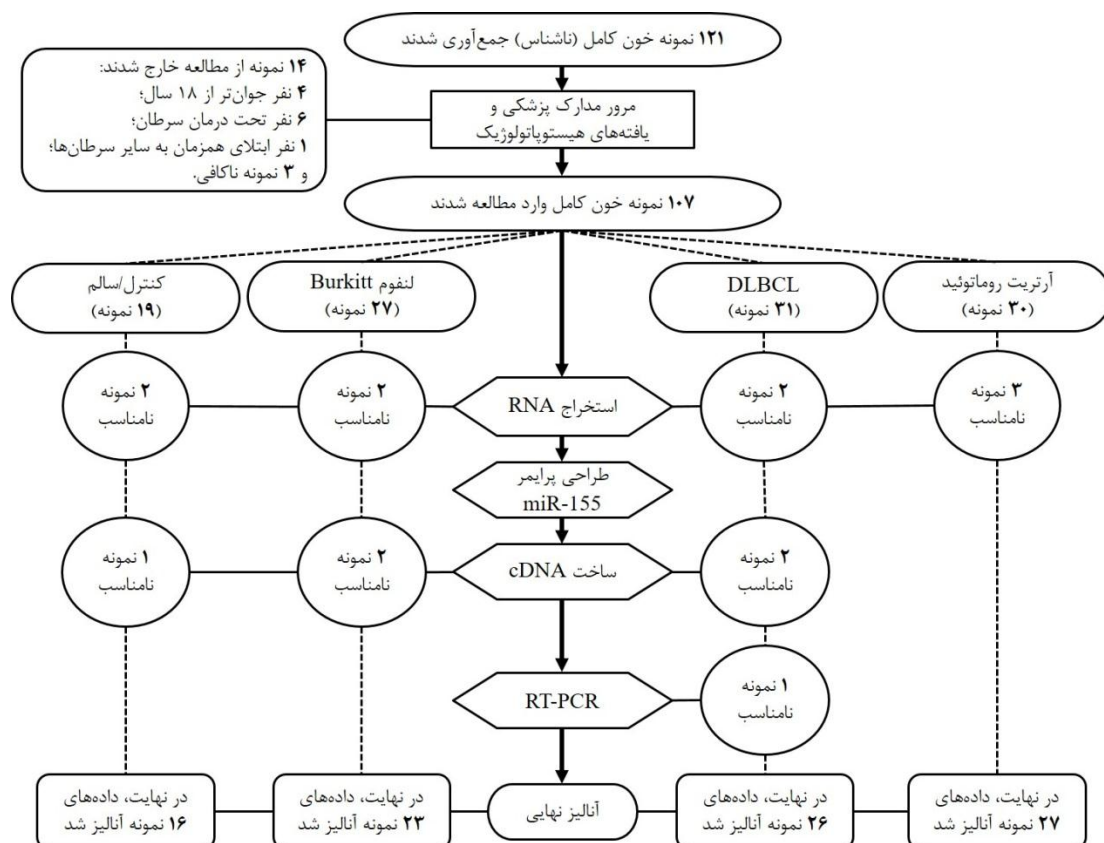
تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های مرتبط با تشخیص بیماری، سن، جنس و بیان miR-155 به کمک آمار توصیفی (توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار) گزارش شدند. برای مقایسه گروه‌های مختلف مطالعه از آزمون کای اسکوئر و آزمون دقیق فیشر، آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی جیمز-هوول استفاده شد. ارتباط بیان miR-155 با سن و جنس، به ترتیب از طریق همبستگی پیرسون و اسپیرمن ارزیابی شد. سطح معنی‌داری تمامی آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی آنالیزها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ (شرکت IBM، آرمونک، نیویورک، آمریکا) انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه از سوی کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جیرفت تایید شده است (شماره ارجاع: IR/JMU.REC.1400.014).

مجریان طرح متعهد به اصول بیابیه هلسینکی بوده و هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند. تمامی اطلاعات هویتی افراد محفوظ است. با توجه به ماهیت مطالعه، آسیبی به جمعیت مورد مطالعه وارد نمی‌شود. در این مطالعه روی اطلاعات کدگذاری شده و نمونه‌های ناشناس کار شده است. تمامی آزمایشگاه‌های ارایه‌دهنده نمونه‌ها و اطلاعات، از اصول اخلاقی پژوهش و پروتکل‌های استاندارد در تهیه و توزیع نمونه‌ها پیروی کرده‌اند. دسترسی مجریان طرح به اطلاعات و نمونه‌ها تنها بر طبق توافق‌نامه انتقال نمونه‌ها امکان‌پذیر بود. اگرچه تمامی آزمایشگاه‌های یاد شده از اصول اخلاقی و پروتکل‌های استاندارد پیروی می‌کردند، در صورت وجود ایراد اخلاقی و قانونی، به عنوان مثال عدم کسب رضایت‌نامه آگاهانه، نمونه از مطالعه خارج می‌شد. در زمان اجرای روش‌های آزمایشگاهی، تمامی نمونه‌ها به-عنوان نمونه‌های بالقوه عفونی در نظر گرفته شده‌اند. تمام مقررات ایمنی آزمایشگاه در این طرح رعایت شده‌اند.



شکل ۱. فلوجارت مراحل اجرای طرح (cDNA: complementary DNA, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, miR-155: microRNA-155, RT-PCR: real-time polymerase chain reaction)

یافته‌ها

۲، بالاترین سطح بیان miR-155 در بیماران DLBCL ($-\Delta Ct$): ۲/۴۹ [فاصله اطمینان ۹۵ درصد: ۲/۹۰- ۲/۰۸] و آرتریت روماتوئید (۲/۳۰ [۱/۷۶-۲/۸۳]) دیده شد. بیان miR-155 در نمونه‌های مبتلایان به لنفوم بورکیت در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم، افزایش یافته بود، هر چند این مشاهده از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=۰/۴۳۱$). در مقایسه با نمونه‌های سالم، بیان miR-155 در نمونه‌های مبتلایان به DLBCL ($P<۰/۰۰۱$) و آرتریت روماتوئید ($P<۰/۰۰۱$) افزایش یافته بود. در مقایسه با مبتلایان به لنفوم بورکیت، بیان miR-155 در مبتلایان به DLBCL ($P<۰/۰۰۱$) و آرتریت روماتوئید ($P<۰/۰۰۱$) افزایش یافته بود. بیان miR-155 در مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتوئید از نظر آماری تفاوتی نداشت ($P=۰/۰۹۳$). جزئیات بیشتر در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

از ۱۰۷ نمونه خون کامل، ۱۵ نمونه برای استخراج RNA، سنتز cDNA و یا انجام PCR مناسب نبودند و اطلاعات آن‌ها وارد آنالیز نهایی نشد. از ۹۲ نمونه مطالعه شده، ۵۹ نمونه (۶۴/۱ درصد) از مردان تهیه شده بود. جدول ۱ یافته‌های دموگرافیک (سن و جنس) را در گروه‌های مطالعه نشان می‌دهد. توزیع جنس بین چهار گروه مطالعه از نظر آماری یکسان بود ($P=۰/۹۱۱$). همبستگی معنی‌داری بین بیان miR-155 و سن یا جنس افراد نمونه‌دهنده وجود نداشت. ضریب همبستگی پیرسون [فاصله اطمینان ۹۵ درصد] بین سن (+۱۰ سال) و بیان miR-155 در نمونه‌های لنفوم بورکیت، DLBCL، و آرتریت روماتوئید، به ترتیب $[-۰/۱۶]-۰/۵۶$ [۰/۲۱]، $[-۰/۱۶]-۰/۷۱$ [۰/۰۱] و $[-۰/۱۶]-۰/۱۸$ [۰/۵۱] بود. ضریب همبستگی اسپیرمن بین جنس (جنس زن) و بیان miR-155 در نمونه‌های لنفوم بورکیت، DLBCL، و آرتریت روماتوئید، به ترتیب $[-۰/۰۴]-۰/۶۴$ [۰/۳۰]، $[-۰/۰۶]-۰/۳۰$ [۰/۴۱] و $[-۰/۰۳]-۰/۳۰$ [۰/۶۰] بود. طبق شکل

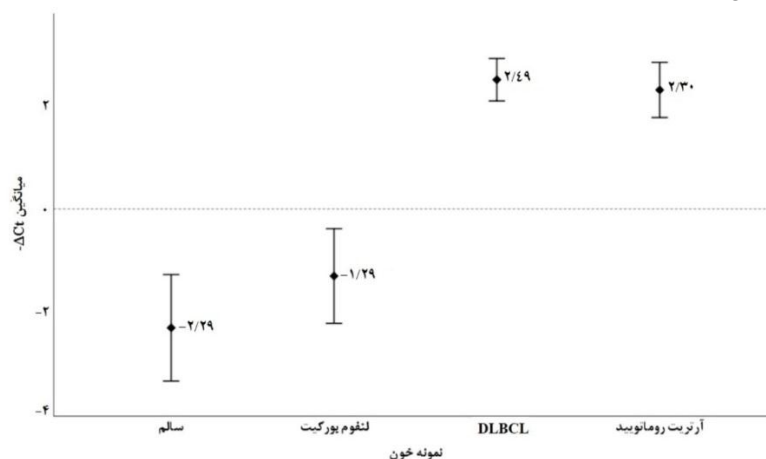
جدول ۱. یافته‌های دموگرافیک و مقادیر آستانه چرخه (Ct) ژن‌های میکروRNA-۱۵۵ و RNU6B در ۹۲ نمونه مورد مطالعه

P	آرتریت روماتوئید (نمونه ۲۷)	DLBCL (نمونه ۲۶)	لنفوم بورکیت (نمونه ۲۳)	سالم (نمونه ۱۶)	
	تعداد (درصد)				
	۱۶ (۵۹/۳)	۱۷ (۶۵/۴)	۱۶ (۶۹/۶)	۱۰ (۶۲/۵)	مرد
	۱۱ (۴۰/۷)	۹ (۳۴/۶)	۷ (۳۰/۴)	۶ (۳۷/۵)	زن
	میانگین (انحراف معیار)				
	۴۸/۳۳ (±۱۶/۱۵)	۶۲/۳۸ (±۸/۸۰)	۵۷/۷۸ (±۹/۱۵)	۵۷/۳۸ (±۱۰/۱۶)	سن (سال)
	۲۲/۹۴ (±۷/۳۷)	۲۲/۹۶ (±۵/۷۸)	۱۹/۰۵ (±۶/۳۲)	۱۸/۵۲ (±۵/۷۷)	Ct _{RNU6B}
	۲۰/۶۴ (±۹/۶)	۲۰/۴۶ (±۵/۵۵)	۲۰/۳۴ (±۶/۸۷)	۲۰/۸۱ (±۶/۶۰)	Ct _{miR-155}

Ct: cycle threshold value, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, miR-155: microRNA-155, RNU6B: U6B small nuclear RNA gene.

* آزمون دقیق فیشر؛ سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.

† آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA)؛ سطح معناداری ۰/۰۵ است.



شکل ۲. بیان نسبی ($-\Delta Ct$) میکروRNA-۱۵۵ در چهار گروه مطالعه. ΔCt از کم کردن مقادیر آستانه چرخه (Ct) کنترل داخلی از مقادیر آستانه چرخه میکروRNA-۱۵۵ در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل شد. اعداد و بازه‌ها، به ترتیب نشان دهنده میانگین $-\Delta Ct$ و فاصله اطمینان ۹۵ درصد میانگین هستند. (Ct: cycle threshold, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma)

جدول ۲. مقایسه بیان نسبی miR-155 در چهار گروه مطالعه، بر اساس میانگین تفاوت ΔCt ؛ ΔCt از کم کردن مقادیر آستانه چرخه (Ct) کنترل داخلی از مقادیر آستانه چرخه miR-155 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل شد.

میانگین تفاوت ΔCt - (فاصله اطمینان ۹۵ درصد) ^{a, *}			
نوع لنفوم	DLBCL	آرتريت روماتويد	سالم
لنفوم بوركيت	۴/۷۹ (۳/۳۳-۶/۲۵)	۴/۵۹ (۳/۰۸-۶/۱۰)	۱/۰۰ (-۰/۷۶-۲/۷۶)
لنفوم بوركيت	۳/۷۹ (۲/۴۷-۵/۱۰)	۳/۵۹ (۲/۲۱-۴/۹۶)	۰/۱۹ (-۰/۶۷-۱/۰۶)
DLBCL			

Ct: cycle threshold value, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma

^a اعداد از کم کردن ΔCt ردیف‌ها از ΔCt ستون‌ها حاصل شده‌اند.

^{*} آنالیز یک‌طرفه واریانس (ANOVA)؛ آزمون تعقیبی جیمز-هول.

بحث

در این مطالعه، بیان نسبی miR-155 در سرم مبتلایان به دو نوع لنفوم غیرهوجکین (DLBCL و لنفوم بوركيت) و یک بیماری خودایمنی التهابی (آرتريت روماتويد) ارزیابی شد. ارزیابی miR-155 در سرم می‌تواند به عنوان یک رویکرد جایگزین برای غربالگری و تشخیص این بیماران، به‌ویژه در مواقعی که استاندارد طلایی، مثلاً هیستوپاتولوژی، در دسترس یا قابل اجرا نباشد، استفاده شود.^۹ این روش در مقایسه با روش‌های تشخیصی تهاجمی، مانند بیوپسی و آسپیراسیون، ارزان‌تر، کم-تهاجمی‌تر و ایمن‌تر است.^۹ مطالعات در دسترس، نتایج متفاوتی راجع به ارتباط بین بیان miR-های گوناگون مانند miR-155 و سن یا جنس افراد ارائه داده‌اند. حجم نمونه، توزیع سنی و جمعیت هدف این مطالعات متفاوت است.^{۱۰} در مطالعه حاضر، ارتباطی بین بیان miR-155 و سن یا جنس افراد مشاهده نشد. بنابراین، در مواقعی که نیاز به بررسی یک جمعیت عمومی (غربالگری) یا پیگیری یک نفر بیمار (سنجش‌های مکرر، پایش وضعیت بیماری، پیگیری پاسخ به درمان) وجود دارد، می‌توان از این رویکرد استفاده کرد. بیان miR-155 در DLBCL: همانند مطالعات قبلی، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL در مطالعه حاضر افزایش یافته بود. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان miR-155 سبب کاهش سرعت آپوپتوز، افزایش تکثیر سلولی و القای مهاجرت و تهاجم سلول‌ها می‌شود.^{۱۱-۱۴} برخی از سازوکارهای پیشنهادی راجع به نقش miR-155 در بروز DLBCL به شرح زیر هستند:

سیتوکین‌های التهابی و محرک‌های ایمنی با فعال‌سازی فاکتور هسته‌ای کاپا (NF- κ B) سبب القای بیان miR-155 می‌شوند.^{۱۴، ۱۵} افزایش بیان miR-155 سبب مهار بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز (pro-apoptotic)، suppressor of cytokine

B-cell lymphoma protein 6، (SOCS3) signaling protein 3 Src homology 2- و (HDAC4) ۴، هیستون‌دآستیلاز (BCL6)، پروتئین‌های چرخه سلولی شده و متعاقب آن بقا و تکثیر لنفوسیت‌های B را افزایش داده و سبب فرار سلول از آپوپتوز می‌شود.^{۱۴-۱۱} همچنین افزایش بیان miR-155 از طریق مهار عامل رونویسی PU.1 و کاهش پروتئین غشایی CD10 منجر به تشدید ویژگی تهاجمی، افزایش متاستاز و بدتر شدن پیش‌آگهی DLBCL می‌شود.^{۱۵}

بیان miR-155 در لنفوم بوركيت بالغین: یافته‌های مطالعه حاضر، نتایج مطالعات پیشین را تایید کرده و نشان داد بیان miR-155 در بالغین مبتلا به لنفوم بوركيت با بیان آن در افراد سالم تفاوتی ندارد.^{۱۶، ۱۷} مطالعات نشان داده‌اند که لنفوسیت‌های B در لنفوم بوركيت توانایی رونویسی و پردازش ژن BIC به miR-155 بالغ و فعال را ندارند.^{۱۶} miR-155 به‌عنوان یک سرکوبگر تومور در لنفوم بوركيت عمل می‌کند. یکی از مولکول‌های هدف miR-155 در لنفوسیت‌های B، activation-induced cytidine deaminase (AID) است که فعالیت آن برای تنوع ژن ایمونوگلوبولین ضروری است. مهار miR-155 سبب افزایش بیان AID و القای جهش جابجایی *Myc-Igh* (t(8;14)) - که نشانه (hallmark) لنفوم بوركيت است - می‌شود. مطالعات روی لنفوسیت‌های B فعال نشان داده‌اند افزایش بیان miR-155 سبب مهار این جهش سرطان‌زا می‌شود.^{۱۸، ۱۹}

بیان miR-155 در آرتريت روماتويد: همانند مطالعات گذشته، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به آرتريت روماتويد در مطالعه حاضر افزایش یافته بود.^{۱۹، ۲۰} مطالعات نشان داده‌اند miR-155 برای نمو لنفوسیت‌ها و ایجاد ایمنی سلولی و هومورال ضروری است و کمبود آن سبب کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌شود.^{۳، ۴} لنفوسیت‌های B در پاسخ به محرک‌های التهابی، بیان miR-155 را افزایش می‌دهند که منجر به تمایز لنفوسیت B و تولید آنتی‌بادی می‌شود.^{۲۱، ۲۲} اختلال در تنظیم فعالیت لنفوسیت‌های T نقشی اساسی در بیماری‌های خودایمنی مانند آرتريت روماتويد ایفا می‌کند.^{۲۳} افزایش بیان miR-155 از طریق افزایش غیرمستقیم سیتوکین‌های التهابی (مانند TNF α و اینترلوکین ۱)، تمایز لنفوسیت‌های T و فعال‌سازی ماکروفاژها و لنفوسیت‌های کمکی (helper T-cell 1 and 17) التهاب مفصلی را تشدید می‌کند.^{۱۲، ۲۴، ۲۵} از سوی دیگر، مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که miR-155 در سازوکار یک بازخورد

قدرانی‌ها

این طرح به عنوان پایان‌نامه دوره دکترای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی نویسنده اول در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان ارائه شده است. نویسندگان از تمامی کارکنان آزمایشگاه و همکاران دانشگاهی که جمع‌آوری نمونه‌ها و اجرای مطالعه را تسهیل کردند، تشکر می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

نویسندگان معیارهای کمیته بین‌المللی سردبیران نشریات پزشکی را رعایت کرده‌اند. سید رسول مهدوی اناری و بابک خیرخواه مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه، کیومرث امینی و فرزین روزافزای مشاوره آماری و روش پژوهش، سید رسول مهدوی اناری نمونه‌گیری و اجرای پژوهش، سید رسول مهدوی اناری و فرزین روزافزای تحلیل داده‌ها، تفسیر نتایج و تهیه پیش‌نویس اولیه مقاله را عهده داشتند. تمامی مولفان متن نهایی مقاله را بازبینی و تایید کرده‌اند.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

دسترس پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

این طرح با شماره IR.JMU.REC.1400.014 از سوی کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جیرفت تایید شده است.

تعارض منافع

مولفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

منفی در مسیر پیام‌رسانی toll-like receptor و اینترلوکین ۱ (TLR/IL-1) دخیل است و بیان سیتوکین‌های التهابی و ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP1, MMP3) و مسیر پیام‌رسانی Janus kinase and signal transducer and activator of transcription (JAK2/STAT3) و اینترلوکین ۶ را در فیبروبلاست‌های سینه‌ویال مهار کرده و منجر به مهار آبخارهای التهابی و کاهش تخریب بافتی ناشی از التهاب مفصل می‌شود.^{۲۰،۱۹} بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که بیان miR-155 در مبتلایان به آرتریت روماتوئید، از یک سو سبب فعال شدن سلول‌های ایمنی و تشدید التهاب شده و از سوی دیگر از سلول‌های مفصلی در برابر آسیب ناشی از التهاب محافظت می‌کند و متعاقب آن سبب مزمن شدن بیماری می‌شود. مطالعات قبلی، نشان‌دهنده ارتباط و همبستگی بین آرتریت روماتوئید و لنفوم بوده‌اند. تنظیم بیان miR-155 می‌تواند نقشی محوری در برقراری ارتباط بین التهاب و بدخیمی داشته باشد.^{۲۷،۲۶،۲۰،۳}

محدودیت‌های طرح: حجم کم نمونه مطالعه شده، محدودیت روش‌های آزمایشگاهی (PCR)، خطای مشاهده‌گر در تعیین تشخیص بیماری، خطای ثبت و بازخوانی اطلاعات، وجود بیماری‌های همراه و سایر عوامل مخدوش‌کننده، نتایج این مطالعه را محدود می‌کنند. با توجه به این که برخی از روش‌های آزمایشگاهی به صورت دستی و بدون استفاده از کیت‌های پیش‌ساخته اجرا شده‌اند، احتمال خطا و از دست رفتن نمونه‌ها افزایش می‌یابد. استفاده از مدارک چاپی و الکترونیک، کالیبره کردن ابزارهای اندازه‌گیری با کنترل‌های منفی و مثبت، هماهنگ‌سازی گروه‌های مطالعه بر اساس سن و جنس، استفاده از کنترل داخلی، و استفاده از روش‌های آماری متناسب با توزیع متغیرها از رویکردهای کاهش محدودیت مطالعه است. اجرای مطالعات آینده‌نگر و مداخله‌های بالینی می‌تواند نتایج معتبرتر و پایاتری در پی داشته‌باشد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج مطالعه حاضر، در مقایسه با افراد سالم، بیان miR-155 در سرم مبتلایان به DLBCL و آرتریت روماتوئید افزایش یافت، ولی تغییر معنی‌داری در سرم بالغین مبتلا به لنفوم بورکیت مشاهده نشد. بررسی‌های مولکولی و کارآزمایی‌های بالینی بیشتری برای ارزیابی کاربردهای تشخیصی و درمانی miR-155 در سرطان خون یا بیماری‌های خودایمنی و التهابی لازم است.

References

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadj anyan. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105
- Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2009 Jun 1;1792(6):497-505. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013
- Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology*. 2015 Jul;145(3):323-33. doi: 10.1111/imm.12468
- Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*. 2017;3(4):524-48. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688
- Moradi-Lakeh M, Forouzanfar MH, Vollset SE, El Bcheraoui C, Daoud F, Afshin A, et al. Burden of musculoskeletal disorders in the Eastern Mediterranean Region, 1990–2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2017 Aug 1;76(8):1365-73. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210146
- Monabati A, Safaei A, Noori S, Mokhtari M, Vahedi A. Subtype distribution of lymphomas in South of Iran, analysis of 1085 cases based on World Health Organization classification. *Annals of hematology*. 2016 Mar;95(4):613-8. doi: 10.1007/s00277-016-2590-5
- Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, et al. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annual review of genetics*. 2015 Nov 23;49:213-42. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092023
- Fernandez-Mercado M, Manterola L, H Lawrie C. MicroRNAs in lymphoma: regulatory role and biomarker potential. *Current Genomics*. 2015 Oct 1;16(5):349-58. doi: 10.2174/1389202916666150707160147
- Meder B, Backes C, Haas J, Leidinger P, Stähler C, Großmann T, Vogel B, Frese K, Giannitsis E, Katus HA, Meese E. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. *Clinical chemistry*. 2014 Sep 1;60(9):1200-8. doi: 10.1373/clinchem.2014.224238
- Li XD, Li XM, Gu JW, Sun XC. MiR-155 regulates lymphoma cell proliferation and apoptosis through targeting SOCS3/JAK-STAT3 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(22):5153-9. doi: 10.26355/eurrev_201711_13832
- O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(17):7113-8. doi: 10.1073/pnas.0902636106
- Sandhu SK, Volinia S, Costinean S, Galasso M, Neinast R, Santhanam R, et al. MiR-155 targets histone deacetylase ϵ (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Emu-miR-155 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(49):20047-52. doi: 10.1073/pnas.1213764109
- Ranganath P. MicroRNA-155 and its role in malignant hematopoiesis. *Biomark Insights* 2015;10:95-102. doi: 10.4137/BMI.S27676
- Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(3):1675-82. doi: 10.1074/jbc.M110.177063
- Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen BJ, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(2):147-53. doi: 10.1002/gcc.20273
- Kluiver J, van den Berg A, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Bouwman E, et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* 2007;26:3769-76. doi: 10.1038/sj.onc.1210147
- Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, Robbani DF, et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 2008;28(5):630-8. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.002
- Migita K, Iwanaga N, Izumi Y, Kawahara C, Kumagai K, Nakamura T, et al. TNF-alpha-induced miR-155

- regulates IL-6 signaling in rheumatoid synovial fibroblasts. *BMC Res Notes* 2017;10(1):403. doi: 10.1186/s13104-017-2715-5
20. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58(4):1001-9. doi: 10.1002/art.23386
21. Su LC, Huang AF, Jia H, Liu Y, Xu WD. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2017;20(11):1631-7. doi: 10.1111/1756-185X.13202
22. Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(4):514-20. doi: 10.1016/j.coph.2009.05.003
23. Lu Li-Fan, Thai To-Ha, Pedro Calado D, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009;30(1):80-91. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.010
24. Huffaker TB, O'Connell RM. MiR-155-SOCS1 as a functional axis: Satisfying the burden of proof. *Immunity* 2015;43(1):3-4. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.020
25. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):111-22. doi: 10.1038/nri2708
26. Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Ekbom A, Backlin C, Granath F, et al. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54(3):692-701. doi: 10.1002/art.21675
27. Nagpal SDS, Singh NP, Mishra P, Singh A. Lymphoma in rheumatoid arthritis - Catastrophic sequela of a common disease. *JAPI*. 2018;66(7):87-9.