

## ارتباط پلی مورفیسم ژن‌های Pre-miR-3131 و Pri-miR-34 b/c و خطر ابتلا به بیماری لنفوم غیر هوچکین

غلامرضا بهاری<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، مهسا پورجنگی<sup>۲</sup> (M.D)، سید مهدی هاشمی<sup>۳\*</sup> (M.D)، معصومه بهاری<sup>۵</sup> (B.Sc)، محسن طاهری<sup>۶</sup> (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات سلامت کودکان و نوجوانان، پژوهشکده سل و بیماری‌های گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳- مرکز تحقیقات ایمنولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۴- گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۵- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۶- مرکز تحقیقات ژنتیک در بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۷

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۳۴۹۷۸۹۰ r\_b\_1333@yahoo.com?

### چکیده

هدف: لنفوم هفتمین بدخیمی شایع در سراسر جهان می‌باشد که به انواع نئوپلاسم‌ها تقسیم‌بندی می‌شود. سه نوع آن یعنی لنفوم هوچکین، لنفوم غیر هوچکین و لنفوم بورکیت بیش‌تر مورد توجه می‌باشند. miRNA ها (microRNAs) تنظیم‌کننده‌های بیان ژن هستند که در فرایندهای فیزیولوژیکی دخیل می‌باشند و در سرطان نقش دارند. در مطالعه حاضر، پلی مورفیسم ژن‌های pri-miR-3131 rs57408770 و pri-miR-34b/c rs4938723 در بیماران مبتلا به لنفوم غیر هوچکین و مقایسه آن‌ها با افراد سالم بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ۳۵۹ نمونه در این مطالعه مورد- شاهدهی بررسی گردید، ۱۷۳ نمونه مربوط به بیماران مبتلا به لنفوم غیر هوچکین و ۱۸۶ نمونه مربوط به افراد سالم بودند. نمونه بیماران از بین بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک سرطان بیمارستان علی‌ابن‌ابی‌طالب (ع) زاهدان انتخاب و وارد مطالعه شدند. DNA ژنوم از نمونه خون محیطی به روش رسوب نمکی استخراج شد. بررسی انواع واریانت‌های ژنوتیپ pri-mir-34b/c و pre-miR-3131 به روش PCR-RFLP انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پلی مورفیسم pri-miR-34b/c rs4938723 خطر لنفوم را در حالت هموزیگوس در مدل هم بارز و مغلوب افزایش می‌دهد. (به ترتیب  $OR=2/70$ ،  $CI\ 95\%=1/4-13/43$ ،  $P=0/025$  و  $OR=2/91$ ،  $CI\ 95\%=1/7-17/42$ ،  $P=0/018$ ). پلی مورفیسم pre-miR-3131 rs57408770 نیز خطر ابتلا به لنفوم در حالت هموزیگوس در مدل هم بارز و مغلوب را افزایش می‌دهد. به ترتیب  $OR=1/94$ ،  $CI\ 95\%=1/3-02/96$ ،  $P=0/044$  و  $OR=2/26$ ،  $CI\ 95\%=1/4-21/25$ ،  $P=0/006$ ).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد بین پلی مورفیسم‌های pri-miR-3131 rs57408770 و pri-miR-34b/c rs4938723 و ابتلا به بیماری لنفوم غیر هوچکین در نمونه مورد بررسی از جامعه ایرانی، ارتباط معنی‌دار وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، pre-miR-3131 rs57408770، pri-miR-34b/c rs4938723، لنفوم غیر هوچکین

### مقدمه

متحدہ تشخیص داده می‌شود [۱]. در سال ۲۰۰۱، سازمان بهداشت جهانی، یک سیستم طبقه‌بندی به روز شده برای لنفوم‌ها را بر اساس طبقه‌بندی لنفوم تجدید نظر شده در آمریکای لاتین معرفی کرد که به گلد استاندارد بین‌المللی تبدیل شد [۳،۴]. این طبقه‌بندی در سال ۲۰۰۸ و بر اساس پایه زیست‌شناختی مجدداً باز بینی شد و به صورت یک چارچوب یکپارچه انواع زیرگروه‌های لنفوم را تقسیم‌بندی نموده است [۳]. به نظر می‌رسد لنفوم غیر هوچکین هشتمین

لنفوم شایع‌ترین بدخیمی هماتولوژیک در کشورهای غربی است [۱]. سازمان بهداشت جهانی لنفوم‌ها را به ۶ گروه اصلی طبقه‌بندی کرده است که هر کدام از آن‌ها نیز دارای زیر گروه‌هایی می‌باشند. رایج‌ترین این گروه‌ها عبارتند از: لنفوم غیر هوچکین (NHL)، لنفوم هوچکین (HL)، و لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)، لنفوم لنفوسیتی کوچک (SLL) [۲]. در مجموع، تعداد ۹۵۵۲۰ مورد جدید هر سال در ایالات

IHH (Indian Hedgehog) که در اینترون ۲ ژن miR-3131 بر روی کروموزوم ۲ قرار دارد، بیان ژن miR-3131 را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات محدودی اثر پلی مورفیسیم‌های حذف/الحاق ۳ جفت نوکلئوتیدی Pre-miR-3131 را در سرطان مطالعه نموده‌اند [۲۴]. بر اساس اطلاعات ما هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با این پلی مورفیسیم (rs57408770) و لنفوم غیر هوچکین صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت مطالعه پلی مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی و حذف/الحاق میکرو آر آن‌ها، ارتباط پلی مورفیسیم Pri-miR-3131 rs4938723 34b/c و حذف / الحاق ۳ جفت نوکلئوتیدی Pre-miR-3131 را با لنفوم غیر هوچکین بر روی جمعیتی از ایرانیان انجام دادیم.

### مواد و روش‌ها

بیماران. مطالعه مورد- شاهدهی حاضر بر روی ۱۷۳ فرد مبتلا به لنفوم غیر هوچکین مراجعه‌کننده به بیمارستان علی‌ابن ایبیطالب (ع) زاهدان که بیماری آن‌ها بر اساس یافته‌های پاتولوژیک و توسط متخصص پاتولوژی و آنکولوژی تایید شده بود و ۱۸۶ نفر افراد سالم که سابقه هیچ‌گونه بیماری سیستمیک و ارتباط فامیلی با بیماران نداشتند انجام شد. بین بیماران و افراد سالم از نظر سن و جنس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. (از بیماران ۹۸ مرد و ۷۵ زن و میانگین سنی  $49/21 \pm 17/42$  و گروه کنترل شامل ۸۹ مرد و ۹۷ زن با میانگین سنی  $41/76 \pm 13/07$  سال بودند) (به ترتیب  $P=0/113$  و  $P=0/652$ ).

از بیماران و افراد سالم رضایت‌نامه آگاهانه اخذ گردید. این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زاهدان (IR.ZAUMS.REC.1396.301) تایید گردید.

تعیین ژنوتیپ‌های pri-miR-34b/c و pre-miR-3131. ژنوتیپ‌های pri-miR-34b/c و pre-miR-3131 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش واکنش زنجیره پلیمرز با آنزیم‌های محدودالایر (PCR-RFLP) انجام شد. به طور خلاصه هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری، حاوی ۱ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱)، ۱۰ میکرولیتر پرمیکس 2X (Genet Bio, Korea) و ۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بودند.

شرایط PCR بدین شرح بود: دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای pri-miR-34b/c ۵۷ درجه سانتی‌گراد و برای pre-miR-3131 ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای

سرطان در بین مردان و یازدهمین سرطان در بین زنان باشد [۵]. بیش‌ترین موارد گزارش شده این سرطان از آمریکای شمالی و اروپا و اقیانوسیه می‌باشد [۶]. در ایران موارد گزارش شده برای لنفوم غیر هوچکین کم‌تر از نقاط دیگر است [۷].

مطالعات اخیر نشان داده است که لنفوم و لوسمی یک زمینه ژنتیکی قوی دارند [۲].

MicroRNAها، RNAهای تک رشته‌ای با طول ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید و غیر کدکننده هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به mRNA هدف و تخریب یا جلوگیری از ترجمه آن تنظیم می‌کنند [۸]. miRNAها تنظیم‌کننده‌های بیان ژن هستند که در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف مانند رشد و تمایز miRNAها و آپوپتوز دخیل می‌باشند و در بیماری‌های انسانی، به خصوص در سرطان نقش کلیدی دارند [۹]. بیوسنتز miRNA با رونویسی RNA پلیمر از II شروع می‌شود. محصول رونویسی اولیه pri-miRNA نامیده می‌شود که یک ساختار ساقه- حلقه دارد. در سر ۵' آن کلاهک و در انتهای ۳' پلی A وجود دارد، سپس در هسته، pri-miRNA توسط مجموعه دروشا به یک ساختار سنجاق سری به نام pre-miRNA تبدیل می‌شود [۱۰].

MicroRNA (miR)ها در پاتوژنز تومورهایی که به عنوان انکوژن یا ژن‌های سرکوب‌کننده تومور نامیده می‌شوند نقش دارند [۱۱-۱۴]. بنابراین، miRs ابزار بسیار خوبی برای تشخیص مولکولی و درمان مولکولی هدفمند در سرطان می‌باشند.

یک دسته از MicroRNAها خانواده miR-34 می‌باشند که شامل سه miRNA، miR-34a، miR-34b و miR-34c است. miR-34c به عنوان سرکوب‌کننده‌های تومور عمل می‌کنند و بیان آن‌ها در انواع مختلف سرطان اغلب از طریق خاموش شدن اپی‌ژنتیک تنظیم می‌شود [۱۵-۱۹]. (down-regulated via epigenetic silencing) همچنین miR-34b و miR-34c در التهاب ناشی از عفونت دخالت دارند و توسط p53 تنظیم می‌شوند. هر چند miR-34 در عملکرد p53 در موش‌ها غیرضروری است [۲۲-۲۰]. miR-34b و miR-34c یک رونویسی اولیه مشترک دارند که به نام pri-miR-34b/c نام‌گذاری شده‌اند [۲۳]. پلی مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی pri-miR-34b/c و ارتباط آن‌ها در انواع سرطان‌ها مطالعه شده است.

یکی دیگر از تغییرات ژنتیکی عمده که در بیماری‌های انسان نقش دارند، حذف و الحاق‌های کوچک در ژن‌های انسان می‌باشند. حذف و یا الحاق ۳ جفت نوکلئوتیدی

میکرولیتر رسانده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا عمل هضم انجام شود. محصول هضم شده جهت تعیین ژنوتیپ بر روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و با نور فرابنفش مشاهده شد (شکل ۱و۲).

ساخت رشته مکمل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً تکمیل ساخت رشته‌ها در همین دما به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR را جهت انجام برش با آنزیم محدودالایتر (۱۰ میکرولیتر) با ۲ میکرولیتر بافر مخصوص هر آنزیم و ۱۰ واحد از آنزیم مربوطه در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته و با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۲۰

جدول ۱. توالی پرایمرها، طول قطعات و آنزیم‌های محدودالایتر برای ژن‌های Pri-miR-34b/c rs4938723 و pre-miR-3131 rs57408770

ژن	پرایمر	آنزیم محدودالایتر	طول قطعات ایجاد شده جفت باز
Pri-miR-34b/c rs4938723	F: 5'-CCTCTGGGAACCTTCTTTGACCTGT-3' R: 5'-CCTGGGCCTTCTAGTCAAATAGTGA-3'	Nmucl	T allele=۲۱۲ C allele=۲۶+۱۸۶
pre-miR-3131 rs57408770	F: 5'-CTGTGCAGCTGACTCTGAGAAGACG-3' R: 5'-TATTGGCTCCTAGGAAGGCTGAGT-3'	AluI	Del allele= ۱۸۶ Ins allele= ۲۰+۱۷۱

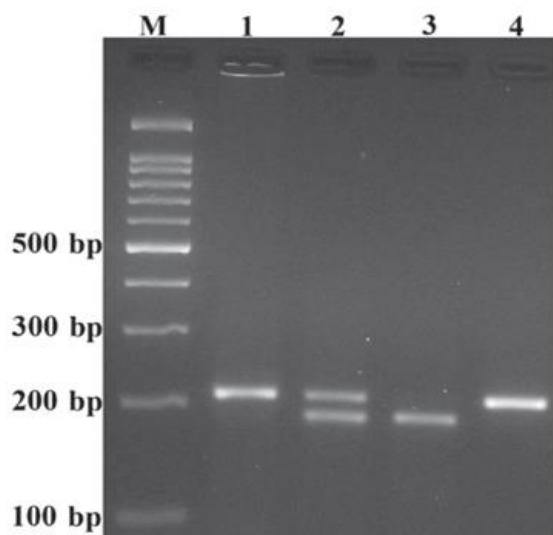
محصول هضم ژن Pri-miR-34b/c rs4938723 برای آلل T باندی برابر ۲۱۲ جفت باز و برای آلل C باندهایی برابر ۱۸۶ و ۲۶ جفت باز را ایجاد نمودند. هم‌چنین محصول هضم ژن Pre-mir3131 rs57408770 برای آلل حذف (Del) باندی معادل ۱۸۸ جفت باز و برای آلل الحاق (Ins) باندهایی برابر ۱۷۱ و ۲۰ جفت باز را به‌وجود آوردند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها. نتایج حاصله وارد نرم‌افزار SPSS-۲۰ شد. برای مقایسه داده‌ها بین دو گروه بیمار و سالم از آزمون X2 و رگرسیون لجستیک استفاده شد. از لحاظ آماری سطح معنی‌دار شدن  $P\text{-value} \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

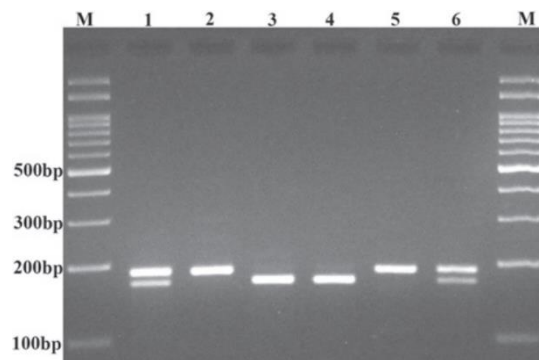
### نتایج

فراوانی ژنوتیپ‌های CC و TT و TC پلی‌مورفیسم ژن Pri-miR-34b/c rs4938723 در گروه بیمار به ترتیب ۱۱/۶ و ۵۱/۴ و ۳۷/۰ درصد و در گروه کنترل به ترتیب ۴/۳ و ۵۱/۶ و ۴۴/۱ درصد مشاهده گردید. در نتیجه فراوانی ژنوتیپ موتانت CC در مدل هم بارز، در گروه بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود و این ژنوتیپ خطر ابتلا به لنفوم غیر هوچکین را ۲/۷۰ برابر افزایش می‌دهد. هم‌چنین این ژنوتیپ در حالت مغلوب نیز خطر ابتلا به لنفوم غیر هوچکین را به‌طور معنی‌داری (۲/۹۱ برابر) افزایش می‌دهد. ژنوتیپ‌های Pri-miR-34b/c rs4938723 در افراد بیمار و سالم از معادله هاردی-وینبرگ تبعیت می‌نمودند (به‌ترتیب  $P=0/064$ ،  $P=0/114$ ).

فراوانی ژنوتیپ مغلوب Ins/Ins. pre-miR-3131 rs57408770 در گروه بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود و این ژنوتیپ خطر ابتلا به لنفوم غیر هوچکین را در



شکل ۱. الگوی الکترو فوری ژنوتیپ‌های پلی مورفیک ژن Pri-miR-34b/c rs4938723 روش PCR-RFLP (ستون ۱ و ۴ : نشان دهنده ژنوتیپ TT ، ستون ۲ : نشان دهنده ژنوتیپ TC و ستون ۳ نشان دهنده ژنوتیپ CC می باشند و M مارکر است).



شکل ۲. الگوی الکترو فوری ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم ژن pre-miR-3131 rs57408770 در مطالعه (ستون‌های ۱ و ۶ نشان دهنده ژنوتیپ حذف/الحاق، ستون‌های ۲ و ۵ نشان دهنده ژنوتیپ حذف/حذف و ستون‌های ۳ و ۴ نشان دهنده ژنوتیپ الحاق/الحاق و ستون M مارکر می باشد.)

حالت هم بارز ۱/۹۴ برابر افزایش می دهد. هم چنین در حالت مغلوب نیز به میزان ۲/۲۶ برابر خطر ابتلا را زیاد می کند. ژنوتیپ های rs57408770 pre-miR-3131 در افراد بیمار از معادله هاردی- وینبرگ تبعیت می نمود ( $P=0/072$ ). فراوانی های ژنوتیپ های rs57408770 pre-miR-3131 و Pri-miR-34b/c rs4938723 در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های ژن های Pre-miR-3131 و Pri-miR-34b/c در بیماران مبتلا به لنفوم غیر هوچکین و افراد سالم

P-value	OR (95%CI)	سالم (درصد) تعداد	بیمار (درصد) تعداد	ژن	
				هم بارز	مغلوب
-	۱	۹۶ (۵۱/۶)	۸۹ (۵۱/۴)	TT	pri-miR-34b/c rs4938723
۰/۴۳۹	۰/۸۴ (۰/۵۴-۱/۳۰)	۸۲ (۴۴/۱)	۶۴ (۳۷/۰)	TC	
۰/۰۲۵	۲/۷۰ (۱/۱۳-۶/۴۳)	۸ (۴/۳)	۲۰ (۱۱/۶)	CC	
-	۱	۹۶ (۵۱/۶)	۸۹ (۵۱/۴)	TT	بارز
۰/۹۴۱	۱/۰۱ (۰/۶۵-۱/۵۶)	۹۰ (۴۸/۴)	۸۴ (۴۸/۶)	TC+CC	
-	۱	۱۷۸ (۹۵/۷)	۱۵۳ (۸۸/۴)	TT + TC	مغلوب
۰/۰۱۸	۲/۹۱ (۱/۱۷-۷/۴۲)	۸ (۴/۳)	۲۰ (۱۱/۶)	CC	
-	۱	۲۷۴ (۷۳/۷)	۲۴۲ (۶۹/۹)	T	آلل
۰/۳۰۶	۱/۲۰ (۰/۸۶-۱/۶۹)	۹۸ (۲۶/۳)	۱۰۴ (۳۰/۱)	C	
-	۱	۶۶ (۳۵/۵)	۶۳ (۳۶/۴)	Del/Del	هم بارز
۰/۲۵۲	۰/۷۶ (۰/۴۸-۱/۲۱)	۱۰۰ (۵۳/۸)	۷۳ (۴۲/۲)	Del/Ins	
۰/۰۴۴	۱/۹۴ (۱/۰۲-۳/۶۹)	۲۰ (۱۰/۷)	۳۷ (۲۱/۴)	Ins/Ins	
-	۱	۶۶ (۳۵/۵)	۶۳ (۳۶/۴)	Del/Del	بارز
۰/۸۵۴	۰/۹۶ (۰/۶۱-۱/۵۱)	۱۲۰ (۶۴/۵)	۱۱۰ (۶۳/۶)	Del/Ins+ Ins/Ins	
-	۱	۱۶۶ (۸۹/۳)	۱۳۶ (۷۸/۶)	Del/Del + Del/Ins	مغلوب
۰/۰۰۶	۲/۲۶ (۱/۲۱-۴/۲۵)	۲۰ (۱۰/۷)	۳۷ (۲۱/۴)	Ins/Ins	
-	۱	۲۳۲ (۶۲/۴)	۱۹۹ (۵۷/۵)	Del	آلل
۰/۱۸۵	۱/۲۲ (۰/۹۰-۱/۶۷)	۱۴۰ (۳۷/۶)	۱۴۷ (۴۲/۵)	Ins	

از بیماران لنفوم ۹۸ مرد و ۷۵ زن و میانگین سنی ۴۹/۱۷±۴۲ سال و گروه کنترل شامل ۸۹ مرد و ۹۷ زن با میانگین سنی ۴۱/۷۶±۱۳/۰۷ سال بودند. اختلاف معنی داری از نظر سن و جنس بین گروه مورد و شاهد مشاهده نشد (به ترتیب  $P=0/113$  و  $P=0/652$ ).

نتایج نشان داد که پلی مورفیسم pri-miR-34b/c rs4938723 خطر ابتلا به بیماری لنفوم غیر هوچکین را در حالت هموزیگوس و مغلوب TT در مقایسه با CC، ( $OR=2/70$ ،  $CI\ 95\%=1/6-13/43$ ،  $P=0/025$ ) در مقایسه با CC، ( $OR=2/91$ ،  $CI\ 95\%=1/7-17/42$ ،  $P=0/018$ ) افزایش می دهد.

هم چنین پلی مورفیسم Pre-mir3131 rs57408770 خطر ابتلا به بیماری لنفوم غیر هوچکین را در حالت هموزیگوس Del/Del در مقایسه با Ins/Ins، ( $P=0/044$ ،  $3-69$ ) در مقایسه با Ins/Ins، ( $OR=1/94$ ،  $CI\ 95\%=1/02-21/25$ ،  $P=0/006$ ) در مقایسه با Ins/Ins، ( $OR=2/26$ ،  $CI\ 95\%=1/4-3$ ) افزایش می دهد. هاشمی و همکاران [۲۵] در مطالعه ای با عنوان بررسی پلی مورفیسم ژن ۳- base pair indel pre-microRNA-3131 در بیماران مبتلا به سرطان

## بحث و نتیجه گیری

به طور کلی ۳۵۹ نمونه در مطالعه ما بررسی شد که ۱۷۳ نفر بیمار مبتلا به لنفوم غیر هوچکین و ۱۸۶ نفر افراد سالم بدون ارتباط با بیماران لنفوم بودند.

بیماران از بین بیماران مراجعه کننده به کلینیک سرطان بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع) دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انتخاب و وارد مطالعه شدند.

گروه شاهد افراد سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیمار همسان سازی شدند. افراد گروه شاهد شرکت کننده در این مطالعه از نظر علائم بالینی و سابقه ی فامیلی لنفوم، مرتبط نبودند و علاوه بر آن با بیماران (گروه مورد) ارتباطی نداشتند و بیماری خودایمنی شناخته شده نداشتند و بومی همان منطقه جغرافیایی بیماران مبتلا به لنفوم نیز بودند (زاهدان، ایران).

مطالعه انجام شده توسط کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تایید شده است. DNA ژنوم از نمونه خون محیطی به روش رسوب نمکی (salting out) استخراج شد. بررسی انواع واریان های ژنوتیپ Pre- و Pri-mir-34b/c و Pre-mir3131 به وسیله متد PCR-RFLP انجام شد.

که این نوع ممکن است با ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی نیز همراه باشد.

محدودیت‌های مطالعه. در اجرای این مطالعه با محدودیت‌هایی رو به رو بودیم. اولاً عدم همکاری بیماران که با پیش‌بینی لازم افراد دیگری با خصوصیات مشابه جایگزین گردیدند. ثانیاً تعداد کم بیماران که در تعمیم نتایج ممکن است ما را دچار مشکل نماید.

مطالعه ما نشان داد که ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم‌های pri-miR-3131 rs57408770 و pre-miR-34b/c rs4938723 در بیماران مبتلا به لنفوم در جمعیت ایرانی وجود دارد. به طوری که این پلی‌مورفیسم‌ها باعث افزایش استعداد ابتلا به لنفوم می‌شوند.

پیشنهادات. مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر این است که ترکیب ژنتیکی بعضی از گروه‌های نژادی ممکن است زمینه مساعد ابتلا به بیماری لنفوم را فراهم کند. هم‌چنین کشف این تغییرات و نقش آن‌ها در مهار و پیشرفت بیماری شاید بتواند راهنمای دانشمندان برای استفاده از درمان‌های کمکی مثل ایمونوتراپی و ژن‌تراپی باشد. برای تایید مطالعه فوق بررسی‌های بیشتر روی جمعیت‌های مختلف و تعداد بیشتر نمونه‌ها لازم به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی ۸۶۲۲ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انجام گرفته است.

### مشارکت و نقش نویسندگان

ایده اولیه و طراحی این مطالعه توسط دکتر غلامرضا بهاری انجام شد. تشخیص و تعیین بیماران لنفوم غیر هوچکین به وسیله دکتر سید مهدی هاشمی انجام گردید. جمع‌آوری نمونه‌های بیمار و افراد سالم و استخراج دی‌ان‌آ و انجام پی‌سی‌آر توسط خانم دکتر مهسا یورجنگی و خانم معصومه بهاری انجام شد. بررسی مقالات و مطالعات آماری توسط دکتر محسن طاهری انجام شد. همه نویسندگان در ویرایش و بازخوانی و بررسی نهایی مشارکت داشته‌اند.

### منابع

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 5-29.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21254>  
<https://doi.org/10.3322/caac.21314>
- [2] Segel GB, Lichtman MA. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 246-261.

پروستات، برای اولین بار دریافتند که انواع ژن - miR-3131 - 3 bp indel ممکن است عامل خطر ابتلا به سرطان پروستات باشد.

Wang و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن pre-miR-3131 rs57408770 و خطر ابتلا به هیپاتوسلولار کارسینوم پرداختند. بیان بیش از حد pre-miR-3131 می‌تواند منجر به کاهش سطح 1 DTHD و XAF 1 mRNA شود. یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن rs57408770 می‌تواند نقش عملکردی در کارسینوم HCC با اتصال به SRP20 داشته باشد [۲۶].

در مطالعه Tong و همکاران نیز نتایج مشابه در بررسی بیماران مبتلا به ALL کودکان نشان داده شده است [۲۷]. در یک مطالعه به روش مورد شاهدهی نیز انواع ژن pri-miR-34b/c rs4938723 منجر به کاهش خطر گلیومادر افراد چینی شده است. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که ال C بیش‌ترین فعالیت رونویسی را در پروموتور miR-34b/c دارد [۲۸]. هم‌چنین ارتباط بین ژن miR-34b/c با بیماری سرطان سینه در یک نمونه از جامعه ایرانی گزارش شده است [۲۹]. چندین مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن miR-34b/c را در انواع سرطان‌های پیشرفته بیان کرده است اما نتایج حاصل از آن‌ها بسیار متناقض بوده است [۳۰-۳۶].

در برخی مطالعات این تغییر پلی‌مورفیسم به صورت معنی‌دار کاهش‌دهنده خطر ابتلا به سرطان‌های مختلف بوده است [۲۶، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۵، ۳۷، ۳۸] و در برخی مطالعات دیگر افزایش‌دهنده خطر ابتلا به سرطان ذکر شده است [۳۰، ۴۰، ۳۶، ۳۹، ۴۱]. در برخی مطالعات نیز ارتباط معنی‌داری حاصل نشده است [۲۹، ۴۲].

در مطالعه Zenz و همکاران، خانواده pri-miR34 یک هدف مشخص به صورت مستقیم برای رونویسی از ژن P53 می‌باشد [۳۱].

هیچ توضیح روشنی در مورد اختلاف نظر در مورد نتایج مربوط به تأثیر واریانت pri-miR 34b/c rs4938723 در انواع مختلف سرطان وجود ندارد. قومیت، ژنتیک و یا عوامل محیطی، و هم‌چنین تعامل ژن با رژیم غذایی، ممکن است در حالت‌های مختلف با هم تعامل داشته باشند تا خطر ابتلا به انواع مختلف سرطان در مناطق مختلف را افزایش داده و یا کاهش دهند.

در مطالعه ما ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های pri-miR 34b/c rs4938723 و Pre-mir3131 و خطر ابتلا به لنفوم وجود داشت. با این حال یافته‌های حاضر نشان می‌دهد

<https://doi.org/10.1002/ijc.26171>

PMid:21547903

[17] Mazar J, Khaitan D, DeBlasio D, Zhong C, Govindarajan SS, Kopanathi S, et al. Epigenetic regulation of microRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma. *PLoS One* 2011; 6: e24922.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024922>

PMid:21949788 PMCid:PMC3176288

[18] Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2066-2073.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgg203>

PMid:20924086

[19] Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4965-4974.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3040>

PMid:21673066

[20] Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 2007; 67: 8433-8438.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1585>

PMid:17823410

[21] Mathé E, Nguyen GH, Funamizu N, He P, Moake M, Croce CM, Hussain SP. Inflammation regulates microRNA expression in cooperation with p53 and nitric oxide. *Int J Cancer* 2012; 131: 760-765.

<https://doi.org/10.1002/ijc.26403>

PMid:22042537 PMCid:PMC3299894

[22] Jain AK, Barton MC. Unmet expectations: miR-34 plays no role in p53-mediated tumor suppression in vivo. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002859.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002859>

PMid:22870065 PMCid:PMC3411369

[23] Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL. MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology* 2010; 51: 1494-1504.

<https://doi.org/10.1002/hep.23401>

PMid:20127796 PMCid:PMC2862129

[24] Wang C, Li L, Yin Z, Zhang Q, Zhao H, Tao R, et al. An indel polymorphism within pre-mir3131 confers risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2017; 38: 168-176.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgw206>

PMid:28034876

[25] Hashemi M, Bahari G, Sattarifarid H, Narouie B. Evaluation of a 3 base pair indel polymorphism within pre microRNA 3131 in patients with prostate cancer using mismatch polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Mol Clin Oncol* 2017; 7: 696-700.

<https://doi.org/10.3892/mco.2017.1369>

PMid:28856004 PMCid:PMC5574207

[26] Wang FJ, Ding Y, Mao YY, Jing FY, Zhang ZY, Jiang LF, et al. Associations between hsa-miR-603 polymorphism, lifestyle-related factors and colorectal cancer risk. *Cancer Biomark* 2014; 14: 225-231.

<https://doi.org/10.3233/CBM-140395>

PMid:24934365

[27] Tong N, Chu H, Wang M, Xue Y, Du M, et al. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism contributes to acute lymphoblastic leukemia susceptibility in Chinese children. *Leuk Lymphoma* 2016; 57: 1436-1441.

<https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1092528>

PMid:26380954

[28] Li J, Liu X, Qiao Y, Qi R, Liu S, Guo J, et al. Association Between Genetic Variant in the Promoter of Pri-miR-34b/c and Risk of Glioma. *Front Oncol* 2018; 8: 1-5.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00413>

PMid:30319976 PMCid:PMC6170877

[29] Sanaei S, Hashemi M, Rezaei M, Hashemi SM, Bahari G, Ghavami S. Evaluation of the pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism and its association with breast

<https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2003.10.005>

PMid:14757442

[3] Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World health organization classification of tumours: pathology and genetics, tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001. ISBN 978-92-832-2411-2.

[4] Swerdlow S, Campo E, Harris N. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008. ISBN. 978-92-832-2431-0.

[5] Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL, Flowers CR. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Exp Rev Anticancer Ther* 2015; 15: 1-14.

<https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1023712>

PMid:25864967 PMCid:PMC4698971

[6] Novelli S, Briones J, Sierra J. Epidemiology of lymphoid malignancies: last decade up-date. *Springerplus* 2013; 2: 70.

<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-70>

PMid:23520573 PMCid:PMC3599205

[7] Fouladserehsht H, Ghorbani M, Hassanipour S, Delam H, Mokhtari A, Mohseni S, et al. The incidence of Non-Hodgkin Lymphoma in Iran: a systematic re-view and meta-analysis. *World Cancer Res J* 2019; 6.

[8] Zhang Q, Pu R, Du Y, Han Y, Su T, Wang H, Cao G. Non-coding RNAs in hepatitis B or C-associated hepatocellular carcinoma: potential diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Cancer Lett* 2012; 321: 1-12.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.011>

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.030>

[9] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 2999-3004.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>

PMid:14973191 PMCid:PMC365734

[10] Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2007; 252: 157-170.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.010>

PMid:17188425

[11] Ni Y, Meng L, Wang L, Dong W, Shen H, Wang G, Liu Q, Du J. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Gene* 2013; 517: 197-204.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.031>

PMid:23276710

[12] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomir-microRNAs with a role in cancer. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 259-269.

<https://doi.org/10.1038/nrc1840>

PMid:16557279

[13] Yang M, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 29: 169-176.

<https://doi.org/10.3892/or.2012.2105>

PMid:23124769

[14] Matsushima K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Machida H, Nakayama T, et al. MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Translat Med* 2011; 9: 30.

<https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-30>

PMid:21426561 PMCid:PMC3076245

[15] Corney DC, Hwang CI, Matoso A, Vogt M, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al. Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1119-1128.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2642>

PMid:20145172 PMCid:PMC2822884

[16] Chen X, Hu H, Guan X, Xiong G, Wang Y, Wang K, et al. CpG island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2012; 130: 1607-1613.

- [36] Yi DH, Wang BG, Zhong XP, Liu H, Liu YF. Pri-miR-34b/c rs4938723 TC heterozygote is associated with increased cancer risks: evidence from published data. *Tumour Biol* 2014; 35: 11967-11975. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2493-9> PMID:25201061
- [37] Pan XM, Sun RF, Li ZH, Guo XM, Qin HJ, Gao LB. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism is associated with a decreased risk of gastric cancer. *Genet Test Mol Biomark* 2015; 19: 198-202. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0287> PMID:25658980
- [38] Lin Z, Chen L, Song M, Shi KQ, Tang KF. Association between a polymorphism in miR-34b/c and susceptibility to cancer-a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 7251-7255. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.17.7251> PMID:25227823
- [39] Chen P, Sun R, Pu Y, Bai P, Yuan F, Liang Y, et al. Pri-mir-34b/C and Tp-53 polymorphisms are associated with the susceptibility of papillary thyroid carcinoma: a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94: e1536. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001536> PMID:26402809 PMID:PMC4635749
- [40] Liu Q, Yang G, Song XL, Wang Z, Shi G. Association between rs4938723 functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c gene and cancer risk. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 526-533. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.10.007> PMID:25475831
- [41] Yuan F, Sun R, Chen P, Liang Y, Ni S, Quan Y, et al. Combined analysis of pri-miR-34b/c rs4938723 and TP53 Arg72Pro with cervical cancer risk. *Tumour Biol* 2016; 37: 6267-6273. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4467-y> PMID:26619844
- [42] Zhu J, Yang L, You W, Cui X, Chen Y, Hu J, et al. Genetic variation in miR-100 rs1834306 is associated with decreased risk for esophageal squamous cell carcinoma in Kazakh patients in northwest China. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 7332-7340.
- cancer risk. *Biomed Rep* 2016; 5: 125-129. <https://doi.org/10.3892/br.2016.690> PMID:27347415 PMID:PMC4906800
- [30] Zhang S, Qian J, Cao Q, Li P, Wang M, Wang J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population. *Mutagenesis* 2014; 29: 149-154. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu001> PMID:24503183
- [31] Xu Y, Liu L, Liu J, Zhang Y, Zhu J, Chen J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 412-417. <https://doi.org/10.1002/ijc.25342> PMID:20309940
- [32] Zhang J, Huang X, Xiao J, Yang Y, Zhou Y, Wang X, et al. Pri-miR-124 rs531564 and pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphisms are associated with decreased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese populations. *PLoS One* 2014; 9: e100055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100055> PMID:24945256 PMID:PMC4063769
- [33] Ji TX, Zhi C, Guo XG, Zhou Q, Wang GQ, Chen B, Ma FF. MiR-34b/c rs4938723 polymorphism significantly decreases the risk of digestive tract cancer: metaanalysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 6099-6104. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.6099> PMID:26320502
- [34] Bensen JT, Tse CK, Nyante SJ, Barnholtz-Sloan JS, Cole SR, Millikan RC. Association of germline microRNA SNPs in pre-miRNA flanking region and breast cancer risk and survival: the Carolina Breast Cancer Study. *Cancer Causes Control* 2013; 24: 1099-1109. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0187-z> PMID:23526039 PMID:PMC3804004
- [35] Son MS, Jang MJ, Jeon YJ, Kim WH, Kwon CI, Ko KH, et al. Promoter polymorphisms of pri-miR-34b/c are associated with hepatocellular carcinoma. *Gene* 2013; 524: 156-160. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.042> PMID:23632240

# Association between Pre-miR-3131 rs57408770 and Pri-miR-34b/c rs4938723 Gene Polymorphisms and the Risk of Non-Hodgkin Lymphoma

Gholamreza Bahari (Ph.D)<sup>\*1,2</sup>, Mahsa Poorjangi (M.D)<sup>2</sup>, Seyed-Mehdi Hashemi (M.D)<sup>3,4</sup>, Masoomeh Bahari (B.Sc)<sup>5</sup>, Mohsen Taheri (Ph.D)<sup>6</sup>

1- Children and Adolescent Health Research Center, Resistant Tuberculosis Institute, Zahedan Zahedan University of Medical Sciences, Iran

2 - Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

3- Clinical Immunology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Iran

4- Dept. of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

5- Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

6- Genetics of Non-Communicable Disease Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Iran

\* Corresponding author. +98 9153497890 r\_b\_1333@yahoo.com

Received: 9 May 2022 ; Accepted: 7 May 2023

**Introduction:** Lymphoma is the seventh most common malignancy worldwide, which is divided into types of neoplasms, of which three types, Hodgkin's lymphoma (HL), Non-Hodgkin's lymphoma (NHL), and Burkitt's lymphoma are the most common. miRNAs are regulators of gene expression that are involved in physiological processes and are involved in cancer. In the present study, the polymorphisms of pre-miR-3131 rs57408770 and Pri-miR-34b/c rs4938723 genes in patients with Non-Hodgkin's lymphoma were compared with healthy controls.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 359 specimens were studied, of which 173 were (NHL) patients and 186 were healthy controls. Patients were selected from the patients referred to the cancer clinic of Ali Ibn Abi Talib Hospital. The DNA genome was extracted from the peripheral blood sample by the salting out method. The variants of Pri-mir-34b/c rs4938723 and pre-miR-3131 rs57408770 genotypes were analyzed by PCR-RFLP method.

**Results:** The results showed that Pri-miR-34b/c rs4938723 homozygous polymorphism increased the risk of (NHL) in codominant and Recessive models. (OR= 2.70, 95% CI =1.13-4.43,  $P=0.025$ , OR=2.91, CI 95% =1.17-7.42,  $P=0.018$  respectively). Pre-miR-3131 rs57408770 polymorphism increased the risk of (NHL) in homozygous states in codominant and recessive models. (OR=2.26, 95% CI=1.21-4.25,  $P=0.006$ , respectively).

**Conclusion:** The results showed a significant relationship between pre-miR-3131 rs57408770 polymorphism, Pri-miR-34b / c rs4938723, and (NHL) disease in the Iranian population.

**Keywords:** Polymorphism, Pre-miR-3131 rs57408770, Pri-miR-34b / c rs4938723, Non-Hodgkin's Lymphoma