

## مطالعه اثر microRNA-125 بر بیان ژن مولکول چسبان اینتگرین بتا ۲ و میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال ایزوله‌شده از آنورت به مونوسیت انسان

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۸ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۱ آنلاین: ۱۳۹۸/۰۳/۳۱

عادلہ پورصالح<sup>\*۱</sup>

محمد نجفی<sup>۱</sup>

فرحناز صادق بیگی<sup>۲</sup>

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

**زمینه و هدف:** پاسخ‌های مرتبط با سیستم ایمنی در سلول‌های عروقی ممکن است شامل افزایش بیان مولکول‌های چسبان، رولینگ و نفوذ لکوسیت باشد. بررسی وقایع سلولی و مولکولی درگیر در فرآیند رولینگ برای درمان یا پیشگیری تنگی عروق به‌ویژه در شریان‌های کرونری مفید است. lamiRNA، RNAهای غیرکدکننده کوچک تک‌رشته‌ای با حدود ۲۳-۱۹ نوکلئوتید می‌باشند. هدف این مطالعه بررسی تاثیر سرکوب microRNA-125 بر چسبندگی سلولی در فرآیند رولینگ به‌منظور کاهش یا مهار تنگی عروق در افراد مستعد بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی که از تیر تا دی ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت، نمونه‌های بافت آنورت از افراد سالمی که به هر دلیل دچار مرگ مغزی شده و مشمول اهدای قلب و سایر نسوج بودند، از بخش جراحی واحد فراهم‌آوری اعضای پیوندی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری تهیه و با رعایت شرایط کاملاً استریل در کوتاه‌ترین زمان ممکن به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی منتقل شد. سلول‌های اندوتلیال از آنورت با استفاده از کلاژناز و مونوسیت‌ها با استفاده از کیت RosetteSep Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) از خون کامل جدا شدند. microRNA-125 با استفاده از نانو ذره Polyethylenimine (PEI) به درون سلول‌های اندوتلیال منتقل شدند. سطح بیان مولکول چسبان اینتگرین بتا ۲ (ITGB2) با روش Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) و میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال-مونوسیت با CytoSelect™ leukocyte-endothelium adhesion assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** براساس نتایج سطح بیان ژن اینتگرین بتا ۲ (ITGB2) و چسبندگی سلول‌های اندوتلیال-مونوسیت تحت درمان با microRNA-125 در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت (به ترتیب  $P=0/008$  و  $P=0/002$ ) که در نتیجه منجر به کاهش یا تعدیل فرآیند رولینگ می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که microRNA-125 میزان بیان مولکول چسبان ITGB2 و چسبندگی سلول‌های اندوتلیال را به‌طور چشمگیری کاهش داد.

**کلمات کلیدی:** مولکول‌های سلول چسبان، سلول‌های اندوتلیال، microRNA-125

### مقدمه

مهاجرت سلول را در سرطان‌های متعدد کاهش می‌دهد.<sup>۱,۲</sup> در سال ۲۰۱۷ توسط Valencia-Morales ژن‌هایی که در هر یک از فرآیندهای مرتبط با آتروما مانند هموستاز لیپیدی، سیگنالینگ شیمیایی، تکثیر Vascular smooth muscle cells (VSMCs)، پاسخ التهابی موضعی و سیگنالینگ گیرنده سلول، دارای همپوشانی بودند، بررسی و تشخیص

microRNA-125 با کاهش بیان و عملکرد (Podocalyxin (PODXL، سیگنالینگ تولید سایتوکین‌های التهابی و مولکول‌های چسبان را کاهش داده و باعث پیشگیری از آترواسکلروز خواهد شد.<sup>۱</sup> microRNA-125a-3p با هدف قرار دادن Fyn (عضو خانواده Src کینازها) تکثیر و

\* نویسنده مسئول: تهران، بلوار دلاوران، تکاوران شمالی، خیابان ۱۳ شرقی، پلاک ۵۳. کدپستی: ۱۶۷۷۴۸۹۴۱

تلفن: ۰۲۱-۷۶۸۷۱۴۸۱

E-mail: adelepoursaleh@yahoo.com

گروه کنترل سلول‌های اندوتلیال به‌تنهایی و بدون انتقال ژن بودند. جهت جداسازی سلول‌های اندوتلیال، سطوح داخلی و بیرونی آنورت با محلول سالین چندین مرتبه شستشو و پاکسازی گردید. سپس دو انتهای آنورت پس از کلامپ، با ۱۰-۵ ml بافر فسفات نمکی حاوی کلاژناز D ۰/۲٪ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Cat # C5138-100MG) پر شد. نمونه‌های بافت به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در یک انکوباتور مرطوب (۳۷ °C، ۵٪ CO<sub>2</sub>) انکوبه شدند. سلول‌های اندوتلیال آزاد شده پس از عملکرد آنزیم گردآوری شدند. مرحله جداسازی جهت افزایش جداسازی سلول‌ها چندین بار تکرار شد. رسوب سلولی با استفاده از سانتریفیوژ (۲۵۰۰ rpm، ۷ دقیقه) تهیه و بلافاصله در محیط کشت اختصاصی EGM-MV (حاوی مکمل رشد سلول‌های اندوتلیال، ECGS/H (۴ میلی‌لیتر در هزار میلی‌لیتر آب)، hEGF-5 (۵۰ ماکروگرم/۵۰۰ میلی‌لیتر)، HC-500 (۵۰۰ ماکروگرم/۵۰۰ میلی‌لیتر)، همراه با ۵٪ سرم جنین گوساله (۰/۰۵ ml FCS-25/میلی‌لیتر)، ۱٪ آنتی‌بیوتیک (۱۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین/میلی‌لیتر، ۱۰۰۰۰ واحد استرپتومایسین/میلی‌لیتر: GIBCO, Lot: 1697549)، و آمفوتریسین B (۰/۲۵ ماکروگرم/میلی‌لیتر)) در پلیت ۱۲ خانه‌ای، برای آنالیز و تکثیر کشت داده شد. سلول‌های اندوتلیال پس از ۷ روز تریپسینه و سانتریفیوژ شدند (۲۵۰۰-۳۰۰۰ rpm، ۶-۵ دقیقه). سلول‌ها دو بار با بافر فسفات نمکی سرد شسته شدند و سلول‌های CD31<sup>+</sup> با استفاده از Attune NxT acoustic focusing cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی صحت عملکرد آنزیم، بخش کوچکی از دیواره بافت آنورت پیش از هیدرولیز آنزیمی و پس از آخرین دور عمل کلاژناز D، در پارافرمالدهید ۱۰٪ به‌مدت ۹۶-۷۲ ساعت، فیکس و پس از آن در پارافین برای تجزیه و تحلیل بافت نگهداری شدند. نمونه‌ها برای ایجاد مقطع عرضی به ضخامت ۱۰-۵ ماکرومتر آماده‌سازی و توسط هماتوکسیلین/ائوزین رنگ‌آمیزی و توسط Inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) جهت بررسی هضم آنزیمی بررسی و تایید شدند. پس از تایید سلول‌های اندوتلیال ایزوله شده، جهت افزایش بیان مولکول‌های چسبان در سطح سلول‌ها، آن‌ها را در معرض لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharides from Escherichia coli 055:B5, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Cat # L6529-1MG) به‌میزان ۱ ماکروگرم/میلی‌لیتر به‌مدت ۶ ساعت قرار دادیم.<sup>۹</sup> انتقال microRNA

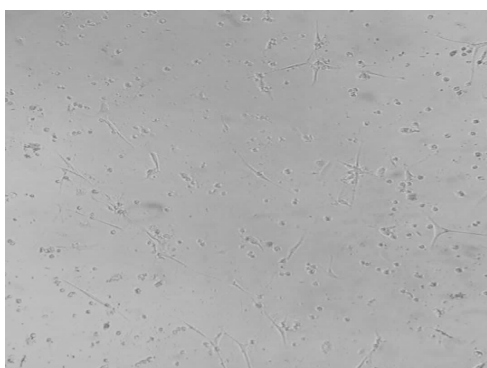
داده شدند. به‌عنوان نمونه ژن‌های VCAM1، C3 و ITGB2 در پاسخ التهابی موضعی دارای همپوشانی و در نتیجه افزایش آسیب‌های ناشی از التهاب می‌باشند.<sup>۴</sup> به‌تازگی براساس مطالعه‌ای که با هدف کشف ژن‌های حیاتی و microRNAهای مرتبط با آترواسکلروز انجام شده است، نقش مهم پروتیین‌های ITGB1، ITGA11، ITGA9 و ITGB2 در پیشرفت پلاک نشان داده شد.<sup>۵</sup> از آنجایی که لکوسیت‌ها از طریق فرآیند رولینگ، توسط اتصال به مولکول‌های چسبان موجود بر سلول‌های اندوتلیال، از میان این سلول‌ها عبور می‌کنند، بنابراین، بیان بیش از حد این مولکول‌ها نقش مهمی در تنگی عروق و راستنوزیس دارد.<sup>۶</sup> مطالعات زیادی گزارش دادند که سطح بیان مولکول‌های چسبان در فرآیند رولینگ به عملکرد microRNAها بستگی دارد.<sup>۸</sup> پژوهش کنونی با هدف ارزیابی اثر microRNA-125 بر سطح بیان ژن مولکول چسبان اینتگرین بتا ۲ (ITGB2) به‌عنوان یکی از مولکول‌های چسبان غشای سلول‌های اندوتلیال عروق که نقش مهمی در فرآیند رولینگ مونوسیت‌ها دارد، انجام شد.

## روش بررسی

پژوهش کنونی به‌صورت مطالعه تجربی بود که بخشی از مراحل آزمایش در گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی ایران و سایر مراحل در مرکز تحقیقات و فناوری دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به‌مدت شش ماه از تیر تا آذر ۱۳۹۶ انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش بافت آنورت اشخاص مرگ مغزی بدون علائم تنگی که با رعایت قوانین پزشکی بخش اهدا، مشمول اهدای قلب و سایر نسوج بودند، تشکیل دادند و از بخش جراحی واحد فراهم‌آوری اعضای پیوندی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، بلافاصله پس از عمل جراحی برداشت بافت و در مرحله نهایی پیش از کلامپ گردآوری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران (IR.IUMS.FMD.REC.1396.29274) تایید شد.

بافت آنورت پس از تهیه در شرایط استریل، در سالین به‌همراه آمفوتریسین B (۰/۲۵ ماکروگرم/میلی‌لیتر) و جنتامایسین (۲X) به آزمایشگاه انتقال داده شد. در این بررسی گروه تست سلول‌های اندوتلیال تحت درمان با microRNA-125 توسط نانو ذره پلی‌اتیلن ایمین (PEI) و

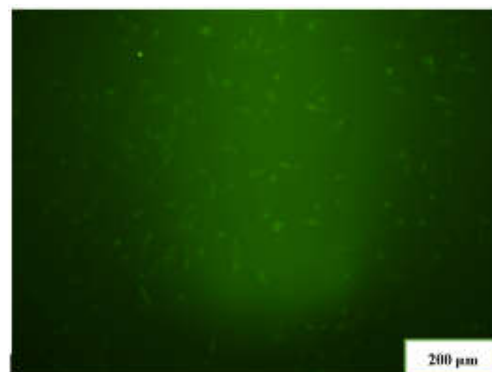
به نمونه خون، لوله فالکون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و به آرامی روی روتاتور قرار داده شد. در این مدت تمام گلبول‌های سفید خون به جز مونوسیت‌ها به آنتی‌بادی‌های تترامر موشی از نوع IgG متصل شدند. سپس به نسبت یک به یک خون کامل را با بافر فسفات نمکی اضافه و به آرامی مخلوط شد. از نمونه بالا به لوله فالکون ۱۵ ml دیگری که حاوی ۴ ml فایکول بود، به آرامی منتقل کردیم. سپس لوله فالکون در دمای °C ۱۸-۲۲ (به مدت ۲۰ دقیقه، ۱۲۰۰g) سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ در لوله فالکون ۴ لایه ایجاد شد که به ترتیب از بالا به پایین شامل پلاسمای زرد رنگ رقیق شده، لایه ابری مانند نازک (شامل مونوسیت‌ها و پلاکت‌های تخلیص شده)، فایکول سفید رنگ در زیر لایه ابری مانند و گلبول‌های قرمز خون و سایر گلبول‌های سفید (به جز مونوسیت‌ها) می‌باشد. پس از برداشت پلاسمای رویی با سمپلر، مونوسیت‌ها و پلاکت‌های موجود در لایه ابری جدا شدند. سپس برای تعیین میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال-مونوسیت، بر اساس کیت CytoSelect™ leukocyte-endothelium adhesion assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA, Cat # CBA-210) سلول‌های اندوتلیال ایزوله شده را پس از تریپسینه کردن، در پلیت ۹۶ تایی مخصوص الایزا که از پیش براساس دستورکار کیت آماده‌سازی شده است، انتقال دادیم. پس از آنکه سلول‌های اندوتلیال بر روی کف چاهک گسترده شدند، تک لایه‌ی اندوتلیال پس از سپری شدن زمان



شکل ۲: نمایی از سلول‌های مونوسیت نشان‌دار و متصل شده به سلول‌های اندوتلیال از طریق مولکول‌ها و پروتئین‌های موجود بر سطح هر دو سلول، در پلیت ۹۶ تایی پوشش داده شده با ژلاتین، پس از سپری شدن زمان انکوباسیون با لیپوپلی ساکارید و کمپلکس microRNA-125-PEI براساس دستورکار کیت سازنده

به وسیله نانوذره PEI (Cat # BCBS2233V) با نسبت ۱۰۰/۱ از PEI (۲۰ mg/ml آب دیونیزه) و microRNA-125 (۱۰۰ پیکومولار) انجام شد. به صورت خلاصه، در ۲ میکروتیوب جداگانه، یکی کنترل و دیگری microRNA-125، به میکروتیوب کنترل به ترتیب PEI و بافر فسفات نمکی و سپس آب دیونیزه را اضافه کردیم و microRNA-125 را به میکروتیوب microRNA-125 اضافه کردیم. نمونه‌ها پس از ترکیب و آماده‌سازی، به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. انتقال کمپلکس microRNA-125-PEI به مدت ۴ ساعت پس از سپری شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها با لیپوپلی ساکارید انجام شد. پس از آن سلول‌ها را با بافر فسفات نمکی شستشو داده و دوباره محیط اضافه شد و برای افزایش اثر microRNA، پلیت حاوی سلول به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در انکوباتور مرطوب (°C ۳۷، ۵٪ CO<sub>2</sub>) انکوبه شد. جهت تایید انتقال microRNA-125 توسط PEI به داخل سلول‌ها، پس از انکوباسیون و شستشوی محیط با بافر فسفات نمکی و پس از افزودن محیط، از چاهک‌های فوق توسط میکروسکوپ فلورسنت عکس تهیه شد که نشان‌دهنده تایید ورود کمپلکس microRNA-125-PEI به داخل سلول می‌باشد (شکل ۱).

جهت بررسی چسبندگی سلول‌های اندوتلیال-مونوسیت، جداسازی سلول‌های مونوسیت لازم است. سلول‌های مونوسیت توسط RosetteSep Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) بر پایه ویژگی ایمنودنسیته خون کامل براساس کیت انجام پذیرفت<sup>۱</sup> که به صورت خلاصه به این شکل بود که پس از افزودن آنتی‌بادی تترامر RosetteSep



شکل ۱: نمایی از سلول‌های اندوتلیال پس از انتقال کمپلکس microRNA-125-PEI با میکروسکوپ فلورسنت

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده توسط Primer-BLAST tool

نام ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	دمای Annealing
Beta-actin	GCAAGCAGGAGTATGACGA	CAAACAAATAAAGCCATGCCAATC	۶۳ °C
ITGB2	CTGTGGAACAACCCCGTGAA	CCACACACTCTCGGCTCTC	۶۷ °C

۳۰ ثانیه، ۶۷ °C برای ژن ITGB2، ۶۳ °C برای بتا-اکتین و تعداد ۴۵ سیکل در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از SPSS software, version 24 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد. سطوح بیان ژن بین گروه‌های تحت درمان با microRNA-125 و کنترل با استفاده از روش Ct محاسبه شد (ژن بتا-اکتین) Ct - (ژن اینتگرین بتا ۲) Ct = Ct (۲-). برای بررسی تفاوت میان متغیرها از Kolmogorov-Smirnov test آنالیز واریانس (ANOVA) و Student's t-test استفاده شد. در تمامی موارد سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

سطح بیان ژن ITGB2 در سلول‌های اندوتلیال ایزوله‌شده از بافت آئورت انسان تحت درمان با microRNA-125 در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت (P=۰/۰۰۸). همچنین نتایج حاصل از چسبندگی سلول‌های اندوتلیال-مونوسیت توسط کیت نشان داد که چسبندگی سلول‌های اندوتلیال پس از تحریک با لیپوپلی‌ساکارید و تداخل با microRNA با مونوسیت‌ها پس از سپری شدن زمان انکوباسیون با microRNA-125 (۳۰ تا ۹۰ دقیقه) در مقایسه با گروه کنترل به‌طور چشمگیری کاهش یافت (P=۰/۰۲).

### بحث

در پژوهش کنونی اثرات microRNA-125 بر روی سطح بیان ژن ITGB2 در سلول‌های اندوتلیال ایزوله‌شده از بافت آئورت انسان بررسی شده است. بر اساس توصیفات بالا، چسبندگی مونوسیت بر سلول‌های اندوتلیال فعال شده با عوامل التهابی مانند لیپوپلی‌ساکارید و به‌دنبال فرآیند رولینگ توسط پروتیین چسبندگی سلولی عضلانی

انکوباسیون با لیپوپلی‌ساکارید، با کمپلکس microRNA-125-PEI تحت درمان قرار گرفت. سپس مونوسیت حاوی LeukoTracker اضافه شد. پس از شستشوی چاهک‌ها و حذف سلول‌های غیرچسبیده، سلول‌هایی که به یکدیگر متصل شدند، فیکس و رنگ‌آمیزی شدند. اندازه‌گیری فلورسانس توسط Spectra Max Gemini XS dual-scanning microplate spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) در طول موج ۴۸۰/۵۲۰ nm انجام شد (شکل ۲).

RNA تام سلول‌های اندوتلیال با استفاده از کیت استخراج AccuPrep® Viral RNA Extraction (Bioneer, Daejeon, Korea, Cat # K-3033) براساس دستورکار شرکت سازنده استخراج گردید. سلول‌های اندوتلیال پس از شستشو با بافر فسفات نمکی سرد، توسط بافر لیزکننده لیز شدند. براساس دستورکار کیت سایر بافرها و در نهایت ۵۰ ماکرولیتر بافر Elution اضافه گردید. در نهایت نمونه RNA استخراج و در دمای ۸۰ °C - نگهداری شد. سنتز cDNA توسط cDNA synthesis kit (Takara Bio, Otsu, Japan, Cat # RR037A) براساس دستورکار شرکت سازنده انجام گردید. نمونه‌های RNA (۶۵ ماکرولیتر) به Master mix اضافه شدند و پس از سپری شدن زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۵ دقیقه، غیرفعال‌سازی آنزیم در دمای ۸۰ °C - به مدت ۵ ثانیه، انجام شد. سنجش سطح بیان ژن توسط StepOne™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام شد. مقادیر ژن با کیت SYBER Green PCR (Takara Bio, Otsu, Japan, Cat # RR820Q) با استفاده از پرایمر (هر کدام ۰/۵ ماکرومولار)، cDNA (۱ ماکرولیتر) و Master mix (۱۰ ماکرولیتر) تعیین شد. پرایمرها توسط NCBI Primer-BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) طراحی شد (جدول ۱).

همچنین ژن بتا-اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. انکوباسیون اولیه نمونه‌ها در ۹۴ °C به مدت ۲ دقیقه، ۹۴ °C به مدت

و می‌تواند در توسعه درمان‌های خاص بر پایه microRNA در آینده هدف مطالعات بیشتر قرار گیرد.<sup>۱۴</sup> از طرفی اندازه‌گیری سطح microRNA-125 در سرم بیماران مستعد گرفتگی عروق، بررسی نقش آن در به تاخیر انداختن یا پیشگیری از وقوع تنگی مجدد در مدل‌های حیوانی، بررسی و اندازه‌گیری سایر ژن‌های درگیر در فرآیند رولینگ و نیز مطالعه اثر مستقیم microRNA-125 روی مناطق 3'UTR و ITGB2 و سایر ژن‌های درگیر در چسبندگی توسط مطالعات کلونینگ، نیز می‌تواند در مطالعات آتی مدنظر قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح پژوهشی دوره ارشد بیوشیمی بالینی خانم عادلہ پورصالح مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران با شماره طرح ۳۰-۲۹۲۷۴:۹۵-۰۳ در سال ۱۳۹۵ تحت عنوان "مطالعه اثر microRNA-125 بر بیان ژن مولکول چسبان اینترگرین بتا ۲ و میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال ایزوله‌شده از آنورت به مونوسیت انسان" می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز تحقیقات و فناوری دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه ایران و همکاری بخش جراحی واحد فرآهم‌آوری اعضای پیوندی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری اجرا شده است.

(Vascular cell adhesion protein) و مولکول چسبندگی بین سلولی (Intercellular adhesion molecule) موجود بر سلول‌های اندوتلیال فعال می‌شود.<sup>۱۱</sup> افزون‌براین، برخی از microRNAهای موجود در گردش، در ارتباط با فرآیند رولینگ، از جمله نشانگرهای بیماری‌های آترواسکلروز پیشنهاد شده‌اند.<sup>۱۲</sup> این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن ITGB2 در سلول‌های اندوتلیال تحت درمان با microRNA-125-PEI کاهش می‌یابد که با اثر کاهنده آن بر سایتوکین‌های التهابی و ژن‌های چسبان توسط این microRNA در مطالعات همخوانی دارد.<sup>۱۳</sup> افزون‌براین، قدرت چسبندگی با مونوسیت در این سلول‌ها کاهش می‌یابد که به احتمال به دلیل کاهش بیان مولکول‌های چسبان در سطح سلول‌های اندوتلیال است. این شواهد نشان‌دهنده نقش ضدالتهابی microRNA-125 در جهت کاهش چسبندگی لکوسیت‌ها بر سلول‌های اندوتلیال دیواره عروقی به واسطه کاهش بیان ژن مولکول چسبان ITGB2 می‌باشد که منجر به کاهش مهاجرت لکوسیت‌ها به اینتیمای می‌شود.<sup>۱</sup> این مطالعه نشان داد microRNA-125 ضمن برخورداری از ظرفیت آلرژیک، به‌عنوان ابزاری جدید و موثر در مهار سیستم رولینگ شناخته شده و نتایج فوق در تعیین ابزارهای مولکولی به‌منظور کنترل فرآیندهای سلولی در افرادی با التهاب مکرر یا تنگی عروق مفید است

## References

- Li X, Yao N, Zhang J, Liu Z. MicroRNA-125b is involved in atherosclerosis obliterans in vitro by targeting podocalyxin. *Mol Med Rep* 2015;12(1):561-8.
- Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, Chuderland D, Shalgi R. MicroRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 13):2867-76.
- Nugent M. MicroRNA function and dysregulation in bone tumors: the evidence to date. *Cancer Manag Res* 2014;6:15-25.
- Valencia-Morales M, Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, et al. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC Med Genomics* 2015;8:7.
- Mao Z, Wu F, Shan Y. Identification of key genes and miRNAs associated with carotid atherosclerosis based on mRNA-seq data. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(13):e9832.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-34.
- Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci* 2012;19(1):79.
- Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008;51(4):527-39.
- Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infect Immun* 1999;67(4):1633-9.
- Hassanpour P, Amirfarhangi A, Hosseini-Fard SR, Yamazari A, Najafi M. Interleukin 6 may be related to indoleamine 2,3-dioxygenase function in M2 macrophages treated with small dense LDL particles. *Gene* 2017;626:442-6.
- Rafiee L, Hajhashemi V, Javanmard SH. Maprotiline inhibits LPS-induced expression of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in human endothelial cells. *Res Pharm Sci* 2016;11(2):138-44.
- He M, Gong Y, Shi J, Pan Z, Zou H, Sun D, et al. Plasma microRNAs as potential noninvasive biomarkers for in-stent restenosis. *PLoS One* 2014;9(11):e112043.
- Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, Aguiar RC. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- $\kappa$ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(20):7865-70.
- Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118(4):703-20.

## The effect of microRNA-125 on the adhesion molecule expression of integrin beta2 and adhesive determination of endothelial cells isolated from human aorta to monocyte

Adeleh Poursaleh M.Sc.<sup>1\*</sup>  
Mohammad Najafi Ph.D.<sup>1</sup>  
Farahnaz Sadegh Beigee M.D.<sup>2</sup>

1- Department of Clinical  
Biochemistry, School of Medicine,  
Iran University of Medical  
Sciences, Tehran, Iran.

2- Masih Daneshvari Hospital,  
Shahid Beheshti University of  
Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding author: No. 53, East  
13th St., North Takavaran, Delavaran  
Blvd., Tehran, Iran.  
Postal code: 1687748941  
Tel: +98 21 76871481  
E-mail: adelepoursaleh@yahoo.com

### Abstract

Received: 29 Nov. 2018 Revised: 06 Dec. 2018 Accepted: 11 Jun. 2019 Available online: 21 Jun. 2019

**Background:** The immune-mediated responses in vascular cells may include the increased expression of endothelial adhesion molecules, leukocyte rolling and in ltration, cellular lipid dysregulation and vascular smooth muscle cells (VSMCs) differentiation. Investigating the cellular and molecular events involved in the rolling process is useful for treatment or prevention of the vessel stenosis especially in coronary arteries. MiRNAs are small and single-stranded noncoding RNAs with about 19-23 nucleotides. In this study, the role of microRNA-125 was predictably selected and experimentally investigated on the changes of expression level of adhesion molecule in endothelial cells isolated from human aorta and on the monocyte cells isolated from whole blood human with endothelial cells adhesion. The aim of this study was to determine the effect of miRNA-125 repression on cell adhesion in leukocyte rolling process to reduce or suppress artery stenosis in susceptible individuals.

**Methods:** This experimental study was performed in Cellular-Molecular Research Center of Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran from July to December 2017. Normal aortic samples were prepared from subjects with brain death in Masih Daneshvari Hospital and under strictly sterile conditions, it was transferred as soon as possible. The endothelial cells were isolated from aorta of subjects with brain death using collagenase. The monocytes were isolated from whole blood. The microRNA-125 was transfected into ECs with use of polyethyleneimine (PEI). The expression level of adhesion molecule and monocyte recruitment were identified by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique and CytoSelect™ leukocyte-endothelium adhesion assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), respectively.

**Results:** The results showed the microRNA-125 suppresses significantly integrin beta 2 (ITGB2) expression level ( $P=0.008$ ). In addition, the monocyte-EC adhesion was shown in the aortic miRNA-treated endothelial cells. The adhesive rate between cells reduced significantly with microRNA-125 as compared with miR-synthetic ( $P=0.02$ ). Thereby, there were the associations between the ITGB2 and miR-125a. Downregulation of ITGB2 may be reduced the adhesion of endothelial cells and moderating the process rolling.

**Conclusion:** This study suggested that the suppression of leukocyte rolling process might be more due to the function of ITGB2. However, the functional effects of this miRNA should be directly investigated on the studied gene.

**Keywords:** cell adhesion molecules, endothelial cells, microRNA-125.