

همراهی واریانت rs531564 در ژن hsa-mir-124-1 و دیابت تیپ ۲ در جمعیت ایرانی

مونا خداپنده^۱، دکتر محمد طهماسب*^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، گروه علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، پردیس تهران، تهران، ایران.

۲- استادیار، دکتری تخصصی ژنتیک، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: میکرو RNAها (MicroRNAs) تنظیم بیان ژن و فرآیندهای زیستی در بافت‌های مختلف را کنترل می‌کنند و نقش مهمی در بیماری‌های مختلف دارند. چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی یا SNPها در ژن‌های miRNAs ها و یا جایگاه‌هایی روی mRNA هدف، در پاتوژنز برخی از بیماری‌ها در انسان همراه است. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم miR-124 G>C rs531564 و استعداد ابتلا به دیابت در جمعیت ایرانی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه مورد-شاهدی روی ۱۷۳ بیمار مبتلا به دیابت تیپ ۲ و ۱۶۲ فرد غیرمبتلا به دیابت تیپ ۲ انجام شد. DNA تخلیص شده از خون به وسیله جفت پرایمرهای مربوطه، تکثیر و سپس تحت هضم آنزیم با BsmAI قرار گرفت. الگوی الکتروفورزی حاصله برای تعیین ژنوتیپ افراد مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های GG، GC و CC برای جایگاه miR-124 rs531564 در گروه مورد به ترتیب ۹۲/۴۸ درصد، ۵/۷۵ درصد و ۱/۷۳ درصد و برای گروه شاهد به ترتیب ۹۶/۲۹ درصد، ۳۰/۷ درصد و صفر درصد تخمین زده شد. بین فراوانی ژنوتیپی دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری یافت نشد. فراوانی آللی بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بین گروه‌های مبتلا به دیابت تیپ ۲ و سالم تفاوتی ژنوتیپی مشاهده نشد؛ ولی آلل C با بیماری دیابت تیپ ۲ در جمعیت ایرانی همراهی داشت.

کلید واژه‌ها: hsa-mir-124a، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، دیابت تیپ ۲

* نویسنده مسؤول: دکتر محمد طهماسب، پست الکترونیکی tahmaseb@khu.ac.ir

نشانی: تهران، خیابان شهیدفتح شماره ۴۳، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، کدپستی ۱۵۷۱۹-۱۴۹۱۱

تلفن و نمابر ۰۲۱-۸۶۰۷۲۷۰۹

وصول مقاله: ۱۳۹۴/۹/۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۳/۲۲، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۳۰

مقدمه

افزایش است. با توجه به پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی، در سال ۲۰۳۰ تعداد بزرگسال مبتلا به دیابت خواهند بود (۳ و ۲). دیابت تیپ ۲ یک بیماری پیچیده است و هنگامی رخ می‌دهد که یا پانکراس، انسولین کافی برای حفظ سطح قندخون در حالت طبیعی تولید نکند و یا وقتی که بدن قادر به استفاده از انسولین نباشد که در این حالت مقاومت به انسولین ایجاد می‌گردد. مقاومت به انسولین عامل موثر مهم در پاتوژنز دیابت تیپ ۲ است (۵ و ۴). دیابت تیپ ۲ همراه با افزایش خطر برخی از بیماری‌ها از جمله اختلالات بینایی، کوری، نارسایی کلیه، بیماری‌های قلبی عروقی و دیگر بیماری‌های مزمن است (۷ و ۶).

میکروRNAها (MicroRNAs) یک مولکول تک‌رشته‌ای از RNA غیر کدکننده به طول ۲۲ الی ۲۵ باز است. عملکرد آن کاهش بیان پروتئین‌های هدف است (۸). میکروRNAها در

دیابت تیپ ۲ (Type 2 Diabetes Mellitus) که قبلاً به عنوان دیابت ملیتوس غیرانسولینی (NIDDM) یا دیابت بزرگسالان شناخته می‌شد؛ یک ناهنجاری متابولیکی است که ویژگی‌های اصلی آن میزان بالای قندخون، مقاومت سلول‌ها به انسولین و میزان کم انسولین در خون است. وجه تمایز دیابت تیپ ۲ که ۹۰ درصد دیابتی را شامل می‌شود؛ نسبت به دیابت تیپ یک که همراه با دیابت دوره بارداری، ۱۰ درصد موارد باقیمانده را شامل می‌شود؛ در آن است که بیماران مبتلا به دیابت تیپ یک به واسطه از بین رفتن سلول‌های جزایر لانگرهانس لوزالمعده کاملاً عاری از انسولین هستند. تشنگی زیاد، تکرر ادرار و گرسنگی مداوم از عوارض شایع دیابت تیپ ۲ است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد چاقی با دیابت در ارتباط است (۱). شیوع دیابت تیپ ۲ همچنان رو به

داده حضور باز G در پلی مورفیسیم rs531564 G/C در Pri-miR-124 تشکیل یک ساختار حلقه مانند در ساختار دوم Pri-miRNA (ضروری در ساخت miR-124) را تغییر می دهد (۲۳). مسلماً تعیین و شناسایی واریانت های ژنتیکی مسبب تغییر در سطح miRN های کلیدی، می تواند ابزاری قدرتمند در پزشکی باشند. با توجه به اهمیت واریانت های مختلف ژن ها در میزان فعالیت آنها؛ این مطالعه به منظور تعیین ارتباط بین پلی مورفیسیم rs531564 G> C miR-124 و استعداد ابتلا به دیابت در جمعیت ایرانی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه مورد - شاهدی روی ۱۷۳ بیمار (۸۷ مرد و ۸۶ زن) مبتلا به دیابت تیپ ۲ و ۱۶۲ فرد (۷۸ مرد و ۸۴ زن) غیرمبتلا به دیابت تیپ ۲ مراجعه کننده به مرکز دیابت دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی طی سال های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد.

گروه مورد و شاهد از نظر سن و جنس همسان بودند. از آزمودنی ها رضایت نامه کتبی آگاهانه شرکت در مطالعه اخذ گردید. ابتلا به دیابت تیپ ۲ با توجه به معیارهای انجمن دیابت آمریکا تشخیص داده شد. معیار انتخاب افراد به عنوان شاهد، سطح تحمل گلوکز طبیعی و سطح قندخون ناشتا کمتر از ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر بود (۲۴).

شاخص های BMI، فشارخون سیستولیک و دیاستولیک، قندخون، کلسترول تام (TC)، تری گلیسیرید (TG)، HDL کلسترول (HDL-C)، LDL کلسترول (LDL-C)، HbA1c و انسولین اندازه گیری شد. ۵ میلی لیتر نمونه خون از گروه مورد و شاهد جمع آوری و به لوله های حاوی اتیلن تتراسدیک اسید (EDTA) منتقل شد.

DNA ژنومی با استفاده از روش «خروج نمکی» یا salting out از گلبول های سفید خون محیطی استخراج شد (۲۵). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب به وسیله اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شدند. برای تکثیر DNA حاوی جایگاه SNP (rs531564) پرایمرهای زیر مورد استفاده قرار گرفت.

F: 5' GGAGGAAGGTGTTGACCCAC
R: 5' AAATGTCCATACAATTAAGGCACGC

واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) در حجم ۲۵μl حاوی ۱۲/۵μl محلول Master Mix ساخت شرکت Ampliqon (محتوی بافر Tris-HCl، 0.4mM dNTP، 0.2% Tween 20، 3mM MgCl₂، pH 8.5، inert red dye و 0.2 unit/μl Ampliqon Taq DNA polymerase and stabilizer)، ۰/۴ μM از هر کدام از پرایمرها و ۱۰۰ng از DNA ژنومی در حجم کل ۲۵μl انجام شد.

PCR با برنامه ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (دنا تراسیون اولیه) و سپس ۳۵ دور با برنامه ۳۰ ثانیه در دمای

فعالیت های مختلف سلولی از جمله تکثیر سلولی و تمایز، تنظیم ژن، پیدایش تومور، آپوپتوز و سوخت و ساز بدن نقش دارند (۱۱-۹). آن دسته از میکروRNA ها که سبب کاهش بیان ژن های سرکوب کننده تومور می شوند؛ نقش انکوژنی داشته و به آنها انکوئمر می گویند (۱۲). در مقابل آنهایی که سبب کاهش بیان انکوژن ها می شوند؛ به عنوان سرکوب کننده سرطان عمل می کنند. مولکول miR-124-1 به واسطه اتصال به ناحیه 3' مولکول mRNA ژن CDK6 که نتیجه آن کاهش فسفوریلاسیون رتینوبلاستوما و کاهش تقسیم سلولی است؛ به عنوان یک سرکوب کننده تومور عمل می کند (۱۳).

مولکول miR-124-1 که در ابتدا به علت بیان بالای آن در مغز و نوروها مورد توجه محققین قرار گرفته بود؛ در سلول های بتا پانکراس نیز دارای بیان قابل ملاحظه ای است (۱۴و۱۵). مطالعات اخیر نشان داده miR-124-1 نقش مهمی در رشد و تکامل سلول های بتای پانکراس ایفا می کند (۱۶). لذا می توان انتظار داشت کاهش بیان و یا کاهش فعالیت miR-124-1 در روند رشد طبیعی سلول های بتای پانکراس سبب اختلال گردد.

فعالیت ژن ها از جمله ژن miR-124-1 ممکن است تحت تاثیر نوعی از پلی مورفیسیم به نام پلی مورفیسیم های تک نوکلئوتیدی (single nucleotide polymorphism: SNP) قرار گیرد. وقوع برخی از SNP ها در بسیاری از ژن ها تشخیص داده شده است. بیماری دیابت تیپ ۲ مانند هر اختلال دیگر که پایه ژنتیکی دارد؛ می تواند از این SNP ها متأثر شود. کنترل ژن هایی مانند miR-124-1 که متابولیسم قندخون را در بدن برعهده دارند؛ به وسیله سیستم های دقیقی کنترل می شوند که اختلال در فعالیت آن ممکن است در نهایت سبب دیابت شود. وقوع SNP در این miRNA ممکن است یکی عوامل اختلال در سیستم تنظیم قندخون و دیابت باشد (۱۷و۱۸). لیست miRNA هایی که در دیابت تیپ ۲ گیرند؛ به طور چشمگیری افزایش یافته است. برای مثال miR-375 که در سلول های جزایر پانکراسی و سلول های بتا دارای بیان بالا است؛ به عنوان یکی از اولین miRNA هایی است که نقش احتمالی آن در دیابت مشخص شده است. در سلول های پانکراسی موش، بیان بالای miR-375 سبب مهار ترشح انسولین می شود (۱۹). در حالی که مهار miR-375، ترشح انسولین را افزایش می دهد (۱۹و۲۰). سایر مطالعات نیز نشان داده است افزایش سطح miR-9 منجر به نقص شدید در آزاد شدن انسولین می شود (۲۱). مولکول miR-124 به مقدار زیاد در سلول های پانکراس بیان شده و به عنوان یک تنظیم کننده ربونوکلئوتیدی قندخون مورد توجه است (۲۲). پلی مورفیسیم هایی که روی ژن های miRNA وجود دارند؛ می تواند بیان ژن های هدف را تحت تاثیر قرار داده و در استعداد پذیری ابتلا به دیابت تیپ ۲ مشارکت داشته باشند. مطالعات بیوانفورماتیک نشان

کای و پیرسون استفاده گردید. میزان نسبت شانس (Odds Ratio: OR) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد به وسیله مقایسه توزیع الل‌ها و ژنوتیپ‌ها بین دو گروه مورد و شاهد محاسبه گردید. نتایج توصیفی متغیرهای پیوسته به صورت میانگین و انحراف معیار (SD) نشان داده شد. انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ و تفاوت در مقادیر متغیرهای هر طبقه به وسیله آزمون مجذور کای یا در صورت لزوم تست دقیق فیشر انجام گردید.

یافته‌ها

ویژگی‌های جمعیت‌شناختی دو گروه مورد و شاهد در جدول یک آمده است. نسبت مرد به زن در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۸۶/۸۷ درصد و ۸۴/۷۸ درصد بود.

بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی، طول محصول PCR با جفت پرایمر مورد استفاده ۴۱۷ جفت باز و قطعات ایجاد شده پس از هضم آنزیمی، ۱۷۲ و ۲۴۵ جفت باز برآورد گردید (شکل یک).

ژنوتایپینگ گروه مورد و شاهد برای SNP rs 531564: تکثیر نمونه ژنومی از افراد مورد و شاهد قطعه‌ای به طول ۴۱۷ جفت باز

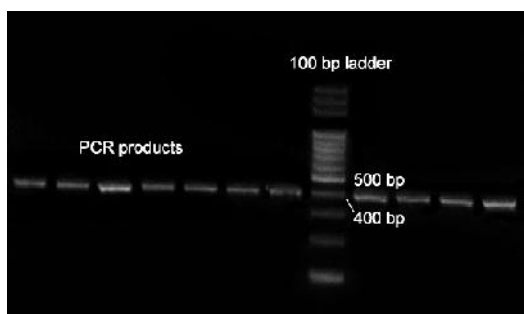
۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال پرایمر به توالی هدف در ژنوم) و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (طویل شدن) و سپس یک دور طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. اندازه محصول PCR به وسیله ژل الکتروفورز ارزیابی شد.

برای تعیین ژنوتایپینگ، محصول PCR تحت هضم آنزیم BsmAI (شرکت فرماتاز) قرار گرفت. برای هضم آنزیمی از ۲U آنزیم BsmAI در محلولی حاوی ۸μl محصول PCR (با غلظت ۰/۲۵μg/μl) و ۲μl بافر در حجم کل ۲۰μl برای مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد و اندازه باندها برای تعیین ژنوتایپینگ مورد بررسی قرار گرفت.

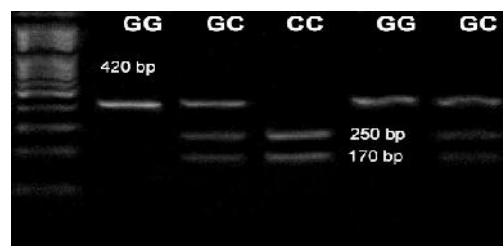
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-8 در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند. فراوانی اللی و ژنوتیپی دو گروه مورد و شاهد برای بررسی حالت تعادل هاردی - واینبرگ مورد تحلیل آماری قرار گرفت. برای این منظور از آزمون مجذور

OLIGO	start	len	tm	gc%	seq
LEFT PRIMER	38	25	60.68	40.00	AAATGTCCATACAATTAAGGCACGC
RIGHT PRIMER	454	20	60.25	60.00	GGAGGAAGGTGTTGACCCAC
PRODUCT SIZE: 417					
1	AGGGCTCTCTCTCCGGTGTTCAGACCGGGACCTTCGATTTTAAATGTCGATACAAATTAAGGCAC				
61	GCGGTGAATGCCAAGAATGGGGCTGGCTGAGCACCGTGGGTGGCCGAGGGCCCGCCAAAGG				
121	AAGGAGCGACCGACCGAGCCAGGCGCCCTCCGCGAGACCTCCGCGCAGCGCCGCGGGCGCG				
181	GAGGGGAGGGGTCTGGAGCTCCCTCCGGCTGCCTGTCCCGCACCGGAGCCCGTGGGGTGG				
241	GGAGGTGTGCAGCCTGTGACAGACAGGGGCTTAGAGAT ^{GCAAAG} GAGACTCAGGGAGAGAA				
301	ACAGAAGCTCGATTCCTTCGACAGAAAGCAGATTCCTTCGAGCACAGATTCGGCTTCCTCCGCGG				
361	AGGGGTTCGGCTTCGAGAGCGCATTCGGGAGTTCCTTCCTTCCTTCGAGATTTTTCCTTCGGGCTC				
421	AGGACTCATTGTATGTGGGTCAACACCTTCCTCC				

شکل ۱: مطالعه بیوانفورماتیکی SNP با شناسه rs531564: توالی تکثیر شده در بین دو پرایمر چپ (>>>) و راست (<<<<) مشخص شده است. قسمتی از توالی زیرخط دار، مشخص کننده ژن miR-124-1 (Gene ID: ۴۰۶۹۰۷) است. قسمتی از توالی زیرخط دار دوتایی، مشخص کننده جایگاه اثر آنزیم محدودالتر BsmAI (با جایگاه شناسایی 5'GTCTC(N)1^ روی یک رشته و 3'CAGAG(N)5^ روی رشته مکمل) است. باز پلی‌مورف، C، در این جایگاه SNP، زیرخط دار شده است. چنانچه به جای باز C باز G در این موقعیت قرار داشته باشد؛ آنزیم توانایی برش این توالی را ندارد.



شکل ۲: محصول PCR ژن miR124-1 به طول ۴۱۷ جفت باز باندهای ۵۰۰ و ۴۰۰ جفت بازی سایز مارکر DNA (100 bp ladder)



شکل ۳: الکتروفورز چند نمونه از نتیجه هضم آنزیمی BsmAI محصول PCR نمونه‌های GG یک باند، نمونه‌های GC سه باند و نمونه‌های CC دو باند ایجاد کرده‌اند.

جدول ۱: مشخصات بالینی افراد مبتلا و غیرمبتلا به دیابت نوع ۲

p-value	میانگین و انحراف معیار		متغیرها
	گروه مورد	گروه شاهد	
۰/۱۰۳۳	۵۳/۰۶±۸/۸۱	۵۳/۰۶±۶/۶۲	سن (سال)
<۰/۰۰۰۱*	۲۹/۲۶±۴/۳۷	۲۷/۵۶±۳/۹۳	نمایه توده بدن (کیلوگرم بر متر مکعب)
۰/۰۲۳*	۱۲۸/۷۶±۱۹/۷۳	۱۲۴/۰۵±۱۷/۹۶	فشارخون سیستولیک (میلی متر جیوه)
۰/۰۱۷*	۷۹/۴۴±۱۵/۳۳	۷۵/۸۸±۱۱/۳۴	فشارخون دیاستولیک (میلی متر جیوه)
<۰/۰۰۰۱*	۱۴۰/۵۱±۳۵/۴۷	۸۶/۴۹±۸/۷۶	گلوکز خون (mg/dL)
<۰/۰۰۰۱*	۷/۶۲±۱/۰۴	۵/۳۶±۰/۳۷	HbA1c (درصد)
<۰/۰۰۰۱*	۸/۳۱±۵/۹۴	۵/۲۳±۲/۳۶	انسولین (پیکومول/لیتر)
۰/۰۹۰	۱۶۸/۳۰±۳۸/۹۲	۱۶۰/۵۰±۴۴/۸۷	کلسترول (mg/dL)
۰/۰۱۱*	۱۵۸/۹۱±۷۶/۳۴	۱۳۸/۳۵±۷۱/۰۸	تری گلیسرید (mg/dL)
۰/۰۳۱*	۴۱/۵۵±۹/۳۶	۴۳/۸۷±۱۰/۲۰	کلسترول HDL (mg/dL)
۰/۷۷۴	۸۸/۳۶±۲۶/۹۳	۸۷/۵۹±۲۱/۵۸	کلسترول LDL (mg/dL)

P<۰/۰۵*

جدول ۲: فراوانی اللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم rs 531564

p-value	گروه شاهد		ژنوتیپ	Allele Freq.
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
۰/۰۴۴*	۳۳۰ (۹۵/۳۷)	۳۱۸ (۹۸/۱۴)	G	Allele Freq.
	۱۶ (۴/۶۲)	۶ (۱/۸۵)	C	
۰/۱۵۸	۱۶۰ (۹۲/۴۸)	۱۵۶ (۹۶/۳۰)	GG	Genotype Freq.
	۱۰ (۵/۷۸)	۶ (۳/۷۰)	GC	
	۳ (۱/۵۵)	۰ (۰)	CC	

P<۰/۰۵*

جدول ۳: ارزیابی ژنوتیپی الگوهای ژنتیکی در افراد مبتلا و غیرمبتلا به دیابت نوع ۲

p-value	نسبت شانس (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)	گروه مورد	گروه شاهد	ژنوتیپ	مدل
۰/۱۶	۱/۰۰	۱۶۰ (۹۲)	۱۵۶ (۹۶)	GG	Codominant
	۰/۶۲ (۱/۷۳-۰/۲۲)	۱۰ (۶)	۶ (۴)	GC	
	۱/۹۰** (۷/۱-۰/۵۱)	۳ (۲)	۰ (۰)	CC	
۰/۱۳	۱/۰۰	۱۶۰ (۹۲)	۱۵۶ (۹۶)	GG	Dominant
	۲/۱۱ (۵/۷۰-۰/۷۶)	۱۳ (۸)	۶ (۴)	CC+GC	
۰/۲۷	۱/۰۰	۳ (۲)	۰ (۰)	CC	Recessive
	۵/۷۲* (۱۱/۰۵-۰/۲۸)	۱۷۰ (۹۸)	۱۶۲ (۱۰۰)	GC+GG	
۰/۳۷	۱/۰۰	۱۶۳ (۹۴)	۱۵۶ (۹۶)	GG+CC	Overdominant
	۰/۶۳ (۱/۷۳-۰/۲۲)	۱۰ (۶)	۶ (۴)	GC	

* در صورت لزوم تست دقیق فیشر مورد استفاده قرار گرفت.

** به علت وجود کمیت صفر در یکی از خانه‌های جدول ۲×۲، از تصحیح Haldane-Anscombe برای محاسبه نسبت شانی (فاصله اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد.

در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارند (P<۰/۰۵)؛ ولی در نمونه‌های بیمار این ژنوتیپ‌ها در تعادل نیستند (P<۰/۰۵). در ضمن با توجه به داده‌های این جدول، توزیع فراوانی اللی در دو گروه بیمار و سالم دارای تفاوت آماری معنی داری است (P<۰/۰۵)؛ ولی فراوانی‌های ژنوتیپی این ویژگی را نشان نمی‌دهد. برای اطمینان بیشتر از نحوه توزیع ال‌ها در بین دو گروه مورد مطالعه، الگوهای وراثتی هم بارزی، غالبیت و مغلوبیت و overdominant نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). در الگوی وراثتی هم بارزی، هریک

تولید نمود (شکل ۲).

هضم آنزیمی نمونه‌های PCR شده با آنزیم BsmAI، الگوهای سه گانه هموزیگوت‌های GG و CC و هتروزیگوت GC را برحسب حضور یا عدم حضور جایگاه پلی مورفیسم نشان داد (شکل ۳). با بررسی الگوی الکتروفورزی هضم آنزیمی محصول PCR شده، ژنوتیپ هر فرد برای این SNP در دو گروه بیمار و شاهد مشخص گردید (جدول ۲). با توجه به جدول ۲، اگرچه فراوانی اللی C و G در گروه شاهد

افراد بیمار بیشتر بود و یک عامل خطر معرفی گردید (۲۶). براساس این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت دو جمعیت ایرانی و ایتالیایی چه از نظر فراوانی اللی و چه از نظر توزیع فراوانی اللی و ژنوتیپی بین دو گروه سالم و بیمار، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند.

فراوانی‌های اللی در این مطالعه با نتایج مطالعه Polina و همکاران (۲۷) در ناحیه‌ای در جنوب برزیل کمابیش مشابه است. به طوری که فراوانی الل C، ۱۲ درصد برای مبتلایان به دیابت تیپ ۲ و ۱۴ درصد در افراد سالم گزارش شد و رابطه‌ای بین بیماری و فراوانی الل‌های C یا G در این SNP مشاهده نگردید (۲۷).

در مطالعه Wang و همکاران (۲۸) در چین اگرچه در مجموع این SNP اثری روی بیماری دیابت تیپ ۲ نداشت؛ اما با تقسیم‌بندی افراد در دو دسته بالا و پایین ۴۵ سال، مشخص شد الل G در افراد زیر ۴۵ سال، نقش محافظتی دارد. همچنین فراوانی الل C در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب ۱۵/۵ درصد و ۱۶/۹ درصد گزارش شد (۲۸). به علت نبود اطلاعات سایر جمعیت‌ها در خصوص این SNP تعیین یک الگوی فراگیر که بتواند چگونگی تغییر الل‌های این SNP را در نقاط مختلف جهان توضیح دهد؛ در حال حاضر امکان‌پذیر نیست.

به نظر می‌رسد از حضور الل C می‌توان تا حدی برای تخمین در خصوص افراد مستعد به بیماری دیابت تیپ ۲ بهره برد. انجام مطالعات آتی با حجم نمونه بیشتر برای تایید یا رد این همراهی حاصله توصیه می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بین گروه‌های مبتلا به دیابت تیپ ۲ و سالم تفاوتی ژنوتیپی وجود ندارد و آلل C از واریانت rs531564 با بیماری دیابت تیپ ۲ در جمعیت ایرانی همراهی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم مونا خدابخنده (شماره ۱۰۳۳۶) برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشگاه خوارزمی بود. این مطالعه با حمایت تجهیزاتی مرکز دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی و دانشگاه خوارزمی انجام شد. بدین‌وسیله از آقایان دکتر میرداوود عمرانی و دکتر حمید قاندری برای فراهم نمودن تجهیزات موردنیاز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Abuyassin B, Laher I. Obesity-linked diabetes in the Arab world: a review. *East Mediterr Health J.* 2015 Sep;21(6):420-39.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004 May; 27(5):1047-53.
3. Chalmers J, Joshi R, Patel A. Advances in reducing the burden of vascular disease in type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Apr; 35(4): 434-7. doi: 10.1111/j.

از سه دسته ژنوتیپی (GG، GC و CC) در دو گروه مورد و شاهد مقایسه شد. در الگوی غالبیت، الل C به عنوان الل غالب (هر دو ژنوتیپ CC و GC دارای یک فنوتیپ) در مقابل فرم مغلوب (GG) مقایسه گردید. در فرم مغلوب، الل C به عنوان الل مغلوب (افراد با ژنوتیپ CC) با دو ژنوتیپ دیگر (GC و GG) مقایسه گردید. در پایان در الگوی توارثی overdominance، فرض بر این است که افراد با ژنوتیپ هتروزیوت نسبت به دو ژنوتیپ دیگر (GC و CC) دارای مزیت انتخابی است.

بحث

در این مطالعه اثر یک SNP روی ژن miR-124-1 که در رشد و نمو سلول‌های بنای جزایر لانگر هانس نقش دارند؛ ارزیابی شد. بدین منظور فراوانی دو الل C و G در گروه‌های مبتلا و غیرمبتلا به دیابت نوع ۲ مطالعه گردید. بررسی تعادل هاردی-واینبرگ برای سه ژنوتیپ GG، GC و CC در دو گروه مورد و شاهد نشان داد که فراوانی ژنوتیپی گروه شاهد در تعادل هاردی-واینبرگ است. الل C به‌طور معنی‌داری در جمعیت بیمار نسبت به جمعیت شاهد بیشتر بود. از طرفی در بین ۱۶۲ فرد شاهد، هیچ فردی با ژنوتیپ CC یافت نشد که احتمال می‌رود نشان‌دهنده الل C به عنوان یک عامل خطر برای بیماری دیابت تیپ ۲ باشد. براین اساس می‌توان انتظار داشت افراد دارای الل C (GC+CC) نسبت به افراد با ژنوتیپ GG (مدل غالب یا Dominant) بیشتر در معرض ابتلا به این بیماری باشند.

در مدل غالب، ۷/۵ درصد افراد حاوی الل C، بیمار هستند. در حالی که این نسبت در افراد سالم ۳/۷ درصد است. علی‌رغم بالا بودن درصد افراد بیمار با ژنوتیپ‌های GC+CC، ارتباط الل C با بیماری با آزمون آماری تایید نشد. نتایج حاصل از بررسی الگوهای توارثی مدل هم‌بارزی، مدل مغلوب و overdominance نشان داد که در هیچ‌یک از این الگوها، تفاوت معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد و شاهد وجود ندارد.

مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه مشابه Ciccacci و همکاران در ایتالیا (۲۶) نشان داد که فراوانی اللی در جمعیت مورد مطالعه در ایران تقریباً عکس نتایج حاصل از جمعیت ایتالیایی است. به‌طوری که فراوانی الل C در نمونه‌های مبتلا و غیرمبتلا به دیابت نوع ۲ به ترتیب ۵ درصد و ۲ درصد بود. در حالی که فراوانی همین الل در دو گروه سالم و بیمار در جمعیت ایتالیایی به ترتیب ۹۵ درصد و ۸۹ درصد گزارش شده است. در پلی‌مورفیسم rs531564 الل G در

1440-1681.2008.04892.x

4. Manrique C, Sowers JR. Insulin resistance and skeletal muscle vasculature: significance, assessment and therapeutic modulators. *Cardiorenal Med.* 2014 Dec; 4(3-4): 244-56. doi: 10.1159/000368423

5. Eleftheriou P, Tseka E, Varaga E, Nasiou M, Sampanis C, Zografou I, et al. Study of the lipidemic profile of diabetic patients. Negative correlation of cholesterol levels of

- diabetestype I patients with serum amylase concentration. *Hell J Nucl Med.* 2014 Jan-Apr; 17 (Suppl 1): 35-9.
6. Hogan P, Dall T, Nikolov P; American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care.* 2003 Mar; 26(3): 917-32.
7. López-Jaramillo P, Velandia-Carrillo C, Gómez-Arbeláez D1, Aldana-Campos M. Is the present cut-point to define type 2 diabetes appropriate in Latin-Americans? *World J Diabetes.* 2014 Dec; 5(6): 747-55. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.747
8. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr; 6(4): 259-69. doi: 10.1038/nrc1840
9. Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, et al. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2011 May; 351(1-2): 197-205. doi: 10.1007/s11010-011-0727-3
10. Johnmids JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008 Feb; 451(7182): 1125-9. doi: 10.1038/nature06607
11. Zheng RL, Jiang YJ, Wang X. Role of microRNAs on therapy resistance in Non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014 Nov; 7(11): 3818-32.
12. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr; 6(4): 259-69. doi: 10.1038/nrc1840
13. Lujambio A, Roper S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Feb; 67(4): 1424-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4218
14. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells.* 2006 Apr; 24(4): 857-64. doi: 10.1634/stemcells.2005-0441
15. Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14; 103(7): 2422-7. doi: 10.1073/pnas.0511041103
16. Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, et al. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem.* 2007 Jul; 282(27): 19575-88. doi: 10.1074/jbc.M611841200
17. Zhao X, Ye Q, Xu K, Cheng J, Gao Y, Li Q, et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence the susceptibility to type 2 diabetes. *J Hum Genet.* 2013 Mar; 58(3): 135-41. doi: 10.1038/jhg.2012.146
18. Gong W, Xiao D, Ming G, Yin J, Zhou H, Liu Z. Type 2 diabetes mellitus-related genetic polymorphisms in microRNAs and microRNA target sites. *J Diabetes.* 2014 Jul; 6(4): 279-89. doi: 10.1111/1753-0407.12143
19. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004 Nov; 432(7014): 226-30. doi: 10.1038/nature03076
20. Li Y, Xu X, Liang Y, Liu S, Xiao H, Li F, et al. miR-375 enhances palmitate-induced lipooptosis in insulin-secreting NIT-1 cells by repressing myotrophin (V1) protein expression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010 Jan; 3(3): 254-64.
21. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem.* 2006 Sep; 281(37): 26932-42. doi: 10.1074/jbc.M601225200
22. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005 May; 37(5): 495-500. doi: 10.1038/ng1536
23. Qi L, Hu Y, Zhan Y, Wang J, Wang BB, Xia HF, et al. A SNP site in pri-miR-124 changes mature miR-124 expression but no contribution to Alzheimer's disease in a Mongolian population. *Neurosci Lett.* 2012 Apr; 515(1): 1-6. doi: 10.1016/j.neulet.2012.02.061
24. Bartoli E, Fra GP, Carnevale Schianca GP. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur J Intern Med.* 2011 Feb; 22(1): 8-12. doi: 10.1016/j.ejim.2010.07.008
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb; 16(3): 1215.
26. Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, Greco C, et al. MicroRNA genetic variations: association with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2013 Dec; 50(6): 867-72. doi: 10.1007/s00592-013-0469-7
27. Polina ER, Sbruzzi RC, Silva MEDC, Canani LH, Crispim D, Santos KGD. Relationship of polymorphisms in microRNAs -124 e -126 with diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2015; 7(Suppl 1): A214. doi: 10.1186/1758-5996-7-S1-A214
28. Wang TT, Chen YJ, Sun LL, Zhang SJ, Zhou ZY, Qiao H. Affection of single-nucleotide polymorphisms in miR-27a, miR-124a, and miR-146a on susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Chinese Han people. *Chin Med J (Engl).* 2015 Feb; 128(4): 533-9. doi: 10.4103/0366-6999.151112

Original Paper

Association of rs531564 SNP in miR-124-1 with type 2 diabetes in Iranian population

Khodabandeh M (B.Sc)¹, Tahmaseb M (Ph.D)^{*2}

¹M.Sc Student in Genetics, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. ²Associate Professor, Ph.D in Genetics, Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Micro RNAs (or miRNAs) control gene regulation and different biological processes in various tissues and therefore play an important role in various diseases. In some cases, either a single nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNAs or in complementary sequences in their target mRNAs play significant role in human diseases. In this study, the relationship between rs531564 G>C in mir-124-1 with the susceptibility to type 2 diabetes in the Iranian population was examined.

Methods: In this case-control study, 173 individuals affected with type 2 diabetes and 162 healthy individuals were selected. Extracted DNA from peripheral blood was amplified by a pair of relevant primers and then digested by BsmAI restriction enzymes. The obtained electrophoretic patterns were used for genotyping.

Results: The genotype frequencies of GG, GC and CC for rs531564 in the patient group were 0.92, 0.06 and 0.02 respectively, 0.96, 0.04 and 0.00 in the controls. Statistical analysis showed no significant difference between the two groups regarding the genotype frequencies, however the allelic frequencies were significantly different between those groups ($P<0.05$).

Conclusion: There was no genotype difference between diabetes and healthy individuals, but the allelic C is related with type 2 diabetes among Iranian population.

Keywords: Has-mir-124-1, Single nucleotide polymorphism, Type 2 diabetes

* **Corresponding Author:** Tahmaseb M (Ph.D), E-mail: tahmaseb@khu.ac.ir

Received 22 Nov 2015

Revised 11 Jun 2016

Accepted 19 Jun 2016