Original Article

Analysis of the Effect of Chronic Morphine Treatment on miRNA Profile and Introduction of the MAPK Pathway as the Target of Differentially Expressed miRNAs

Roohollah Nakhaei Sistani[1], Bahram Mohammad Soltani[2], Majid Sadeghizadeh[3*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 12/Nov/2012, Accepted: 17/Jan/2013

Abstract

Objective: Different signaling pathways have been identified that are involved in the cellular response to opiates. The mitogen-activated protein kinase pathway is one of the most important signaling pathways underlying the neuronal response to opiates. MicroRNAs (miRNAs) are considered to be post-transcriptional regulators of gene expression with paramount significance, which plays key roles in modulating cellular processes such as neuronal plasticity and synaptic consolidation. The purpose of this study is to identify miRNAs that are differentially expressed in response to chronic morphine treatment, and predict those genes that have a possible role in this process. Because the MAPK pathway in involved in morphine dependence and participates in hypersensitivity to pain, determining miRNAs that modulate this pathway could be insightful in morphine dependence treatment and pain control.

Methods: In this study, the BE(2)-C neuroblastoma cell line was chronically treated with morphine sulphate and the changes in expression of 750 miRNAs were analyzed by real time PCR.

Results: Two up- and down- regulated groups of miRNAs were determined to be differentially expressed in response to morphine: i) has-mir-193a-3p, -212, -181c, -362-3p, -639, -646 and ii) has-mir-412, -937, -558, -552, -943, -628-5p, -593, -555, -636, -643, 566, -571, -642, -653, -611, -31, let7-g.

Conclusion: The analysis of differentially expressed miRNAs showed that the MAPK signaling pathway could be regarded as a signaling pathway with utmost significance in chronic morphine response. Due to the role played by MAPK pathway in cellular response to morphine exposure, we can propose that protein phosphorylation has a presumable part in this response.

Keywords: Morphine, MicroRNA, MAP Kinase Signaling System

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 89-98

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

مقاله اصیل

بررسی تأثیر تیمار مزمن مورفین بر پروفایل بیان miRNAها و معرفی مسیر پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن به عنوان هدف miRNAهای تغییر بیان یافته

روح‌الله نخعی‌سیستانی[1]، بهرام محمدسلطانی[2]، مجید صادقی‌زاده[3]*

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۸/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۲۸

چکیده

هدف: تاکنون مسیرهای پیام‌رسانی متعددی شناسایی شده‌است که در پاسخ سلولی نسبت به مواد مخدر از جمله اپیوییدها دخیل است. مسیر پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن از مسیرهای مهمی است که در پاسخ سلول‌های عصبی نسبت به اپیوییدها دخالت دارد. میکروRNAها از جملهٔ تنظیم کنندگان مهم بیان ژن در سطح پسارونویسی می‌باشند که نقش مهمی در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله انعطاف‌پذیری نورونی و تثبیت سیناپسی دارد. هدف از این مطالعه شناسایی miRNAهایی است که در پاسخ به تیمار مزمن مورفین بیان متفاوتی دارند و پیش‌بینی ژن‌هایی که احتمالاً در این فرآیند مؤثر هستند. از آن‌جا که مسیر پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن در وابستگی به مورفین و همچنین بیش‌حساسی به درد دخالت دارد شناسایی miRNAهای تنظیم کنندهٔ این مسیر می‌تواند راه‌کار تازه‌ای برای درمان وابستگی به مورفین و نیز کنترل درد ارایه نماید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ردهٔ سلولی نوروبلاستومایی BE(2)-C تحت تیمار مزمن مورفین قرار گرفت و تغییرات پروفایل بیانی miRNAهای آن در اثر تیمار مورفین بررسی شد. پروفایل بیانی ۷۵۰ miRNA به روش RT-PCR کمّی تعیین شد.

نتایج: در این مطالعه دو دسته miRNAهای has-mir-193a-3p، 212-، 181c-، 362-3p-، 639-، 646- و has-mir-412، 937-، 558-، 552-، 943-، 628-5p-، 593-، 555-،636-، 643-، 566، 571-، 642-، 653-، 611-، 31-، let7-g شناسایی شد که به ترتیب افزایش و کاهش بیان داشتند.

نتیجه‌گیری: بررسی miRNAهای تغییر بیان یافته نشان داد که مسیر پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن می‌تواند به عنوان یکی از مسیرهای پیام‌رسانی در نظر گرفته شود که اهمیت به‌سزایی در پاسخ مزمن به مورفین دارد. با توجه به نقشی که این مسیر در پاسخ به مواجهه با مورفین ایفا می‌نماید، می‌توان گفت که فسفریلاسیون پروتئین نقش شایان توجهی در این پاسخ برعهده دارد.

کلیدواژگان: مورفین، میکروRNA، سیستم پیام‌رسانی پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات:۸۹-۹۸

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

مقدمه

اعتیاد به مواد را می‌توان به عنوان یک نشانگان رفتاری تعریف کرد که مشخصهٔ آن جستجوی خارج از کنترل مواد و عود مکرر استعمال دارو است. این بازگشت ممکن است با وجود تأثیرات سوء مصرف مواد، حتی چندین سال پس از ترک نیز اتفاق بیافتد [۱]. اعتیاد در حقیقت یک ناهنجاری چند عاملی است که حاصل برهم کنش محیط و ژن‌های متعدد است [۲].

آبشارهای پیام‌رسانی درون سلولی مسیر اصلی ارتباط بین غشای پلاسمایی و اجزای مختلف درون سلولی است. فعال شدن پیاپی کینازها سازوکار مشترک بسیاری از این مسیرهای پیام‌رسانی است. یک دسته از این مسیرهای پیام‌رسانی مسیرهایی است که در مجموع آبشار پیام‌رسانی پروتئین کینازی فعال شده توسط میتوژن (Mitogen-Activated Protein Kinases: MAPK) نامیده می‌شود. چهار گروه اصلی در مسیر پیام‌رسانی MAPK وجود دارد که عبارتند از پروتئین کیناز وابسته به پیام خارج سلولی (Extracellular Signal-Regulated Kinases: ERK)، p38 MAPK، کیناز انتهای آمین c-Jun (c-Jun N-terminal kinases: JNK) و پروتئین کیناز ۵ وابسته به پیام خارج سلولی (ERK5) [۳]. این مسیر در تنظیم تکثیر، تمایز، بقا، یادگیری و حافظه دخالت دارد و همچنین نقشی کلیدی در تنظیم بیش‌حساسی نسبت درد ایفا می‌کند [٤]. به نظر می‌رسد که تحمل نسبت به مورفین (Morphine Tolerance) و دردهای آسیب شناختی (Pathologic) از سازوکارهای مولکولی و سلولی مشابهی استفاده می‌کند [۵].

شواهد متنوعی مبنی بر تنظیم پسارونویسی (Posttranscriptional) بیان ژن وابسته به مصرف مواد وجود دارد [٦]. miRNAها مولکول‌های RNAی کوچکی هستند که در تنظیم پسارونویسی بسیاری از mRNAها از طریق مهار ترجمه [۷، ۸] یا هضم mRNA نقش دارد [۹]. هر کدام از miRNAها می‌تواند تعداد بسیاری از ژن‌ها را بشناسد [۱۰] و بخش اعظم ژن‌های انسانی توسط miRNAها کنترل می‌شود [۱۱].

miRNAها از طریق تنظیم بیان ژن‌ها در تنظیم بسیاری از فرآیندها و پاسخ‌های سلولی نظیر تکثیر، تمایز، بقا، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) [۱۲] و اجزای کلیدی انعطاف‌پذیری نورونی (Neuronal Plasticity) و تثبیت سیناپسی (Synaptic Consolidation) [۱۳] دخالت دارد. همچنین مطالعات مختلف نشان دهنده تغییر سطح بیان miRNAها در پاسخ به تیمار مورفین است [١٤، ۱۵].

با توجه به نقش کلیدی miRNAها در تنظیم بیان ژن‌ها در این مطالعه تغییرات پروفایل بیانی آن‌ها در پاسخ به تیمار مزمن مورفین بررسی شد تا از این طریق ژن‌های درگیر در پاسخ سلولی نسبت به مورفین مشخص شود. نتایج این تحقیق نشان داد که miRNAهای تغییر بیان یافته در مسیر پیام‌رسانی MAPK نقش دارد. همچنین این miRNAها ژن‌هایی را در این مسیر هدف قرار می‌دهد که دخالت آن‌ها در اعتیاد در مطالعات قبلی تأیید شده است. به علاوه ژن‌هایی نیز در این مسیر به عنوان هدف miRNAها مشخص شده‌است که تاکنون در این مسیر در مطالعات اعتیاد نشان داده نشده‌است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

ردهٔ سلولی نوروبلاستومایی BE(2)-C (پاساژ بالای ۲۱) از مؤسسهٔ پاستور (ایران، تهران) خریداری شد و در فلاسک کشت با نسبت ۱:۱ از محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و HamsF12 (Gibco، آلمان) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آلمان) و ۱۰۰ واحد / میلی‌لیتر از پنی‌سیلین G (Penicillin G) و ۰/۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر استرپتومایسین سولفات (Streptomycin Sulphate) (Gibco، آلمان) رشد داده شد. سلول‌ها در معرض ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد هوای مرطوب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری یا پلیت‌های ۹٦ چاهکی کشت داده شدند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

بررسی قابلیت بقا و رشد سلولی

برای تعیین غلظتی از مورفین که مهار کنندهٔ فعالیت متابولیکی سلول‌ها است از آزمون رنگ‌سنجی استفاده شد که برای اولین بار توسط موسمان (Mosmann) ارایه شد [۱٦]. بدین منظور سلول‌ها پس از یک دورهٔ همزمان‌سازی در پلیت‌های ۹٦ چاهکی در معرض غلظت‌های مختلف مورفین سولفات به همراه محیط کشت طبیعی رشد داده شدند. سپس به سلول‌ها ۲۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد (وزنی- حجمی) MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide] در بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) اضافه شد. رنگ نامحلول در آب فورمازان (Formazan) توسط DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (چاهک / میکرولیتر ۲۰۰) حل شد و سپس شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) (BioTek، آمریکا) سنجیده شد.

تیمار مورفین

پودر مورفین سولفات بسیار خالص از بخش غذا و داروی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی تهیه شد. این پودر در آب تا غلظت نهایی ۲۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر حل شد. روش تیمار مزمن مورفین به نحوی اتخاذ شد که مشابه الگوی القای اعتیاد در موش باشد [۱۷]. بدین منظور سلول‌ها ابتدا در معرض غلظت ۲ میکرومولار مورفین سولفات رشد داده شدند و پس از هر دو روز ۲ میکرومولار به غلظت مورفین افزوده شد تا در نهایت به غلظت ۱۰ میکرومولار رسید. سلول‌ها به مدت دو هفته در این غلظت نگهداری شدند و سپس استخراج RNA انجام گرفت. از همین ردهٔ سلولی به مدت مشابه سلول در محیط کشت طبیعی به صورت موازی کشت داده شد تا به عنوان کنترل استفاده شود.

استخراج RNA

استخراج RNA توسط کیت miRCURY™ RNA isolation kit-cell & plant (Exiqon، دانمارک) انجام گرفت که استخراج RNAهای کوچک را تضمین می‌کند. روش استخراج برطبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. سلول‌ها در فلاسک توسط بافر لیز تیمار شدند و عصارهٔ سلولی به ستون انتقال داده شد. سلول‌ها توسط DNase I تیمار شدند و سه دفعه توسط بافر شستشو مورد شستشو قرار گرفتند و در نهایت فرو شست انجام گرفت.

سنتز cDNA

این عمل توسط کیت miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon، دانمارک) مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. نمونه‌ها به غلظت ۵ نانوگرم/ میکرولیتر رقیق شد و ۸ میکرولیتر از این محلول با بافر، مخلوط آنزیمی و RNA ی کنترل کیفی (Spike-in) مخلوط شد و در نهایت با آب تیمار شده با دپک (DEPC) به حجم ٤۰ میکرولیتر رسانده شد. در نهایت محلول به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و محصول بلافاصله به روی یخ منتقل شد و سپس تا زمان PCR کمّی (Real Time-PCR) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام PCR کمّی

برای این منظور از قاب Ready-to-Use PCR (Panel) Human panel I+II, V2.R (Exiqon، دانمارک) مطابق دستورالعمل کیت استفاده شد. این قاب بیان ۷۵۰ miRNAی شناخته شدهٔ انسانی را تشخیص می‌دهد و در هر چاهک آغازگر اختصاصی هر miRNA قرار گرفته است. این آغازگرها دارای نوکلئوتیدهای تغییر یافتهٔ LNA (Locked Nucleic Acids) هستند و بنابراین تا حد یک نوکلئوتید اختلاف را بین miRNAها تشخیص می‌دهد. به هر cDNA به میزان ٤ میلی‌لیتراز مخلوط سایبر گرین (SYBR green) اضافه و با آب به حجم ۸ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت به هر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

چاهک ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط واکنش اضافه شد. پلیت‌ها در دستگاه LightCycler480 (Roche، آلمان) با شرایط زیر قرار گرفت: ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی اولیه، ٤٥ چرخه با ۱۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ٦۰ درجه سانتی‌گراد و شیب تغییر دمایی (Ramp) ۱/٦ درجه سانتی‌گراد/ثانیه.

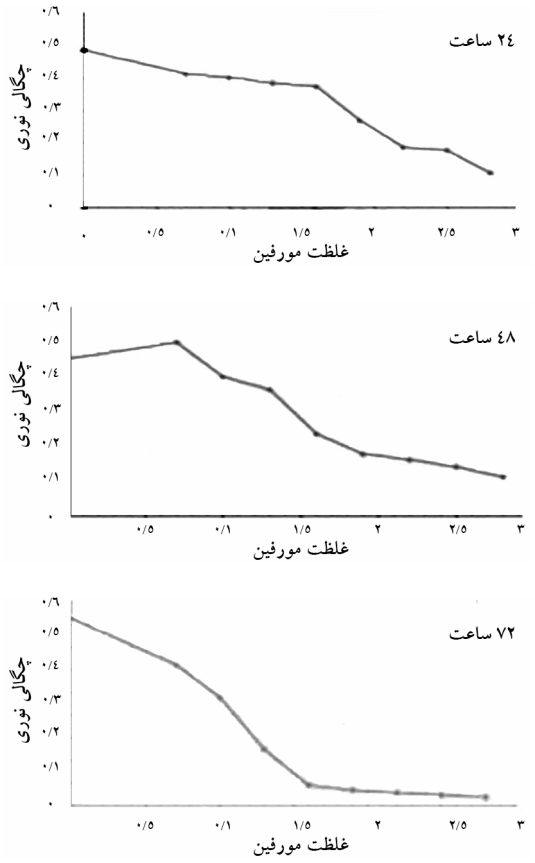
تحلیل داده‌ها

نتایج واکنش PCR کمّی توسط نرم‌افزار GenEx نسخهٔ ۱۰ انجام گرفت. آزمون آماری مورد استفاده آزمون t با سطح معنی‌داری کمتر یا مساوی ۰/۰۵ بود که توسط همان نرم‌افزار انجام پذیرفت. داده‌ها نسبت به has-let-7a متوازن شد. ژن‌های کنترل خود قاب نظیر U6 به این دلیل که از جنس miRNA نیست و طول متفاوتی نسبت به miRNAها دارد کنترل‌های مناسبی نیست. به علاوه؛ آزمایش حاضر نشان داد که اگرچه برای همهٔ نمونه‌ها مقدار RNAی اولیه یکسان در نظر گرفته شد (در کل ۲۰ نانوگرم) و مقدار یکسانی از cDNA نیز استفاده شد. Ct این ژن‌ها در بین نمونه‌های تیمار و شاهد یکسان نیست. به همین دلیل با استفاده از نرم‌افزار Normfinder ژن فوق برای متوازن انتخاب شد. به منظور شناسایی ژن‌های هدف از نرم‌افزار تحت شبکهٔ DIANA استفاده شد که دارای این قابلیت است که اهداف مشترک miRNAها را شناسایی نماید.

نتایج

غلظت مهاری مورفین

از آن‌جا که تأثیر مورفین در فرد با توجه به میزان مصرف متفاوت است لازم بود تا مشخص شود که غلظت مورد استفاده در حد سمیت و کشندگی سلولی نباشد. به همین منظور سلول‌ها در معرض غلظت‌های متفاوت مورفین قرار گرفتند و سپس میزان بقای آن‌ها توسط نمک MTT تعیین شد. نمودارهای ارایه شده میزان بقای سلولی (سلول‌های به لحاظ متابولیکی فعال) را برای زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ بر حسب میزان جذب نور نشان می‌دهد. غلظت IC_{50} برای زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت به ترتیب ۲، ۱/۵و ۱/۱ میلی‌مولار تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱ نمودار MTT غلظت مورفین؛ نمودارها به ترتیب از چپ به راست مربوط به زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت است. محور عمودی مربوط به چگالی نوری و محور افقی غلظت دارو بر حسب میلی‌مولار است.

بررسی نتایج PCR کمّی

برای این بررسی سه فلاسک سلولی برای تیمار و سه فلاسک دیگر که به روش یکسان با تیمار رشد داده شدند و تنها تفاوت آن‌ها عدم استفاده از مورفین بود، برای کنترل استفاده شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA آزمون PCR کمّی انجام گرفت. نتایج PCR مربوط به تمام ۷۵۰

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

miRNAهای بررسی شده توسط نرم‌افزار GenEx تحلیل شد و پس از انجام آزمون آماری T (Unpaired T-Test) miRNAهایی که اختلاف بیان معنی‌داری نشان می‌داد تعیین و به دو دستهٔ کاهش و افزایش بیان یافته تقسیم شد که عبارتند از miRNAهای has-mir-193a-3p، 212-، 181c-، 362-3p-، 639-، 646- و has-mir-412، 937-، 558-، 552-، 943-، 628-5p-، 593-، 555-، 636-، 643-، 566، 571-، 642-، 653، 611-، 31-، let7-g (جدول ۱).

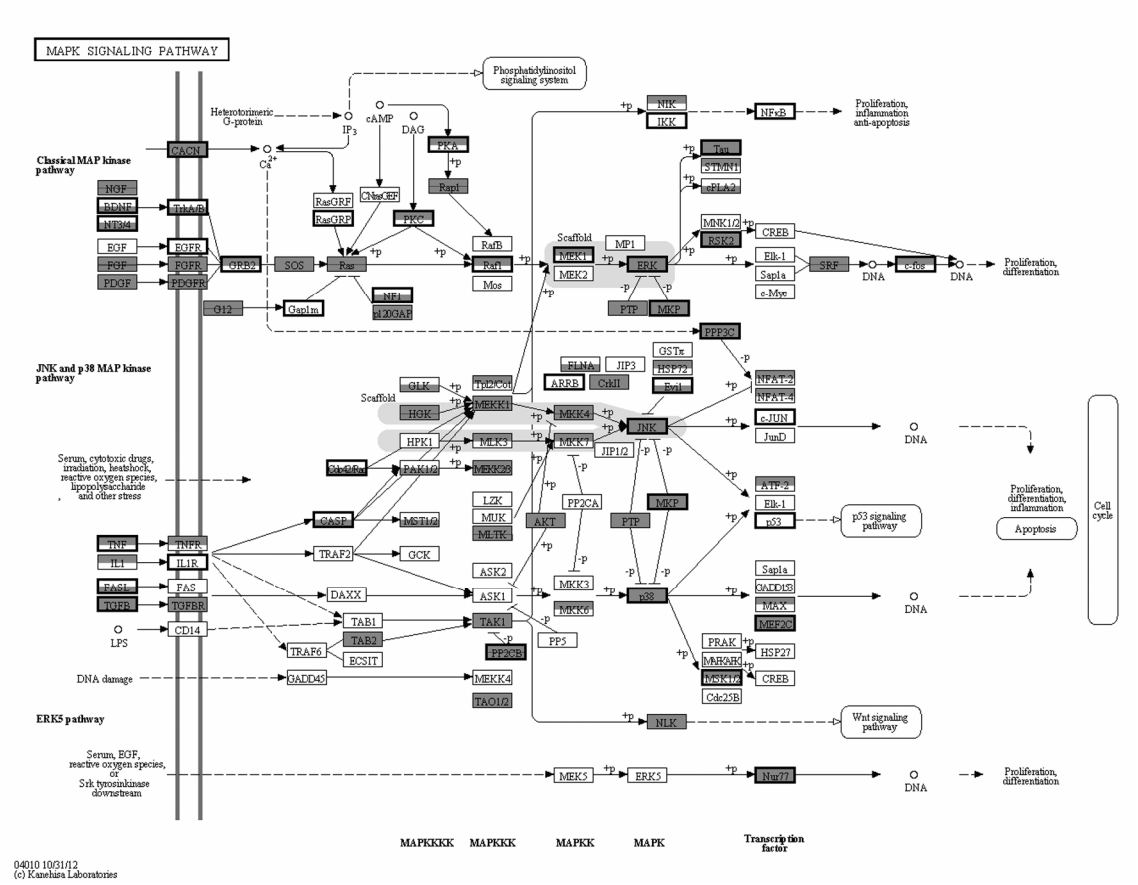
جدول ۱ miRNAهایی که در پاسخ به تیمار مورفین افزایش یا کاهش بیان یافته‌است. از چپ به راست ستون یک miRNA، ستون دو میزان تغییر را بر حسب نسبت تغییرات، ستون سه کاهشی یا افزایشی بودن جهت تغییر و ستون چهارم سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

miRNA	نسبت تغییرات	جهت تغییرات	مقدار P
hsa-miR-646	۱۰۵۳+/-۳۳	افزایش	۰/۰۰٤
hsa-miR-639	۱٤۹+/-۵/٤	افزایش	۰/۰۰۹
hsa-miR-193a-3p	۲۵+/-۰/٤	افزایش	۰/۰۱۸
hsa-miR-362-3p	۱۰+/-۰/۰۵	افزایش	۰/۰۲۹
hsa-miR-212	۳+/-۰/۰۰۱	افزایش	۰/۰۱۵
hsa-miR-181c	۲+/-۰/۰۰٤	افزایش	۰/۰٤۲
hsa-miR-412	٤۷۰+/-۰/٤	کاهش	۰/۰۰٦
hsa-miR-937	٤۳٦+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۰۹
hsa-miR-558	۳۳۰+/-۰/۰۲	کاهش	۰/۰۰۷
hsa-miR-552	۳۲۰+/-۰/۰۱	کاهش	۰/۰۰۷
hsa-miR-943	۱۱۳+/-۰/۱۸٦	کاهش	۰/۰۰۸
hsa-miR-628-5p	۹۵+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۰٦
hsa-miR-593	٤۰+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۰۸
hsa-miR-555	۳۷+/-۰/۰۳۰	کاهش	۰/۰۲۳
hsa-miR-636	۲۲+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۲۱
hsa-miR-643	۲۱+/-۰/۰۲٦	کاهش	۰/۰۲۳
hsa-miR-566	۱۳+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۱۸
hsa-miR-571	۱۲+/-۰/۰۳۰	کاهش	۰/۰۳۳
hsa-miR-642	۸+/-۰/۰۰٦	کاهش	۰/۰٤۰
hsa-miR-653	٦+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۳۳
hsa-miR-611	۵+/-۰/۰۰۳	کاهش	۰/۰۳۹
hsa-let-7g	۳+/-۰/۰۰۱	کاهش	۰/۰۱۵
hsa-miR-31	۲+/-۰/۰۱۰	کاهش	۰/۰۳۸

بررسی بیوانفورماتیکی

هر دو دستهٔ miRNAها به طور جداگانه توسط نرم‌افزار DIANA بررسی شد. این نرم‌افزار این قابلیت را دارد که مجموعه‌ای از miRNAها را به طور همزمان بررسی کند و ژن‌های هدف پیش‌بینی شدهٔ آن‌ها را شناسایی نماید و در نهایت مشخص نماید که این ژن‌ها در کدام مسیر قرار می‌گیرد. نتایج بررسی miRNAهای تغییر بیان یافته نشان داد که ژن‌های مسیر MAPK به طور عمده هدف miRNAهای تغییر بیان یافته قرار می‌گیرد (شکل ۲).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]



شکل ۲ مسیر پیام‌رسانی MAPK. ژن‌هایی که توسط miRNAهای افزایش بیان یافته هدف قرار گرفته‌است قسمت بالای آن‌ها تیره شده است، ژن‌هایی که توسط miRNAهای کاهش بیان یافته هدف قرار گرفته‌است در سمت پایین تیره شده‌است. ژن‌هایی که توسط هر دو دسته هدف قرار گرفته‌است به طور کامل تیره شده‌است و ژن‌هایی که ارتباط آن‌ها با اعتیاد توسط مطالعات قبلی نشان داده است دور آن‌ها پر رنگ شده است.

بحث

پاسخ به مورفین در هر فرد وابسته به میزان مصرف دارو است به طوری‌که مقادیر بالای مصرف می‌تواند منجر به کما و مرگ شود اما مقادیر کمتر آن سبب وابستگی و اعتیاد می‌شود. به همین دلیل ضرورت داشت تا مشخص شود چه غلظتی از مورفین برای سلول می‌تواند سمیت داشته باشد تا از مصرف بیش از اندازهٔ آن برای تیمار سلول‌ها اجتناب شود. بررسی IC_{50} نشان داد که غلظت‌های در سطح میلی‌مولار می‌تواند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ایجاد نماید که بسیار بیشتر از غلظت مورد استفاده برای تیمار سلول‌ها بود. در این مطالعه همچنین شروع تیمار با الگوبرداری از روش القای اعتیاد در موش با غلظت‌های پایین آغاز شد و به تدریج افزایش یافت تا به غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار رسید تا سلول‌ها به تدریج به حضور این ترکیب پاسخ دهند.

مقایسه پروفایل بیانی miRNAها در پاسخ به تیمار مورفین نشان دهنده تغییر بیان گستردهٔ این عوامل تنظیمی در پاسخ به تیمار مورفین بود. تاکنون مطالعات گسترده و فراگیری به منظور تعیین نقش miRNAها در پاسخ به مصرف مواد انجام نگرفته است و مطالعات انجام شده اغلب به بررسی تعداد محدودی miRNA پرداخته‌است [۱۸]. از آن‌جا که miRNAها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها دارد می‌توان انتظار داشت که در تنظیم کردن مسیرهای پیام‌رسانی و متابولیکی در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

پاسخ به تغییرات محیطی نیز نقش داشته باشد. بنابراین در مطالعه حاضر سعی شد تا به جای بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها که به دلیل تعداد بیشتر هزینهٔ بیشتری دارد، از طریق مطالعهٔ بیان miRNAها، ژن‌ها و مسیرهای مولکولی حایز اهمیت شناسایی شود. شناسایی این miRNAها علاوه بر آن‌که می‌تواند به شناسایی ژن‌ها منجر شود، می‌تواند اهداف درمانی جدیدی را نیز فراروی ما قرار دهد؛ چرا که امروزه از miRNAها به منظور اهداف درمانی هم استفاده می‌شود. به منظور تعیین نقش miRNAهای تغییر بیان یافته، آن‌ها به دو دستهٔ افزایش و کاهش بیان یافته تقسیم شدند و هر دسته به طور مستقل توسط نرم‌افزار تحت شبکهٔ DIANA بررسی شد. نتایج بررسی miRNAها نشان داد که ژن‌های هدف هر دو دسته miRNA اغلب در مسیر MAPK قرار می‌گیرد.

مسیر MAPK و زیرگروه‌های آن از جمله مسیرهایی است که مطالعات متعدد بسیاری نشان داده است که در اعتیاد به مواد مخدر از جمله مورفین نقش دارد و از اصلی‌ترین مسیرهایی است که در پاسخ به داروهای مخدر دخالت دارد. تیمار حاد سلول‌های SH-SY5Y توسط مورفین منجر به فسفریلاسیون سریع ERK می‌شود، اما تیمار مزمن همین سلول‌ها با مورفین سطح فسفریلاسیون ERK را می‌کاهد [۱۹، ۲۰]. این مسئله نشان می‌دهد که تیمار حاد و مزمن مورفین تأثیرات متفاوتی در فعالیت ERK دارد. مطالعات درون تنی(in vivo) نیز نشان می‌دهند که فعالیت ERK در هستهٔ اکومبنس (Nucleus Accumbens) پس از تیمار با مورفین افزایش بیان می‌یابد [۲۱]. نتایج بررسی miRNAهای مشخص شده در این مطالعه نشان داد که ۳۱ ژن از این مسیر هدف قرار گرفته‌اند که ارتباط ۱۶ ژن با اعتیاد توسط مطالعات قبلی مشخص شده بود.

مطالعات مختلف نشانگر نقش طناب نخاعی در وابستگی به مورفین است [۲۲]. مسیرهای دیگر پیام‌رسانی MAPK اغلب در سطح طناب نخاعی بررسی شده‌است. برای مثال نشان داده‌اند که پس از سه روز تزریق پیاپی درون مایع مغزی-نخاعی (Intrathecal) مورفین تعداد سلول‌هایی از نخاع که نسبت به p38 فسفریله پاسخ ایمنی می‌دهند رو به افزایش می‌گذارند اما این واکنش در پاسخ به تیمار حاد مورفین اتفاق نمی‌افتد [۲۳].

قطع مصرف مورفین (Withdrawal) در رت باعث افزایش c-Jun در بخش‌هایی از مغز می‌شود [۳]. مطالعات درون تنی و آزمایشگاهی (in vitro) دلالت بر افزایش غلظت JNK فسفریله در نورون‌های گانگلیونی رت در پاسخ به تیمار تکراری مورفین دارد [۲٤]. در مطالعهٔ حاضر نیز براساس بررسی miRNAها بالغ بر ٤١ ژن این مسیر هدف قرار می‌گیرد که از این میان نقش ۱۳ ژن در مطالعات قبلی مشخص شده است.

دربارهٔ نقش مسیر ERK ۵ در پاسخ به مورفین دادهٔ مستقیمی وجود ندارد اما اهمیت این مسیر نیز در برخی پاسخ‌های سلول‌های نورونی نظیر بیش‌حساسی نسبت به درد مشخص شده است [۲۵]. تنها یک ژن از سه ژن این مسیر هدف هر دو دسته از miRNAهای کاندید این مطالعه قرار گرفته است که مطالعات پیشین نیز دخالت آن را در مسیر اعتیاد تأیید می‌نمایند [۲٦].

در مجموع حدود ۷۳ ژن این مسیر توسط miRNAهای کاندید این مطالعه هدف قرار گرفت که نقش ۳۰ ژن آن توسط مطالعات QTL (Quantitative Trait Loci) یا بررسی بیان ژن تأیید شده است [۲٦] و ٤۳ ژن دیگر هنوز به صورت آزمایشگاهی تأیید نشده‌است که مطالعهٔ آن‌ها می‌تواند در شناسایی ویژگی‌های زیستی اعتیاد کمک نماید و برای تأیید آن‌ها باید مطالعات در سطح mRNA و پروتئین انجام گیرد. بررسی حاضر همچنین نشان می‌دهد که می‌توان از تغییرات پروفایل بیانی miRNAها استفاده کرد تا ژن‌ها و مسیرهای درگیر در پاسخ‌ها و فرآیندهای زیستی را تعیین نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل رسالهٔ دکتری رشته ژنتیک مولکولی دانشکده علوم پزشکی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

مدرس انجام شده است. مورفین مورد استفاده توسط بخش غذا و داروی وزات بهداشت فراهم گردید.

منابع

[1] Spanagel R, Heilig M. Addiction and its brain science. Addiction 2005; 100(12): 1813-22.

[2] Agrawal A, Lynskey MT. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. Addiction 2008; 103(7): 1069-81.

[3] Chen Y, Sommer C. The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in morphine tolerance and dependence. Mol Neurobiol 2009; 40(2): 101-7.

[4] Ji RR, Gereau RW 4th, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. Brain Res Rev 2009; 60(1): 135-48.

[5] Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(14): 7731-6.

[6] Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. Br J Pharmacol 2008; 154(2): 327-42.

[7] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes Dev 2004; 18(5): 504-11.

[8] Babashah S, Sadeghizadeh M, Tavirani MR, Farivar S, Soleimani M. Aberrant microRNA expression and its implications in the pathogenesis of leukemias. Cell Oncol (Dordr) 2012; 35(5): 317-34.

[9] Hausser J, Landthaler M, Jaskiewicz L, Gaidatzis D, Zavolan M. Relative contribution of sequence and structure features to the mRNA binding of Argonaute/EIF2C-miRNA complexes and the degradation of miRNA targets. Genome Res 2009; 19(11): 2009-20.

[10] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell 2007; 27(1): 91-105.

[11] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009; 136(2): 215-33.

[12] Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. Curr Opin Genet Dev 2005; 15(5): 563-8.

[13] Dreyer JL. New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity. Genome Med 2010; 2(12): 92.

[14] Rodríguez RE. Morphine and microRNA Activity: Is There a Relation with Addiction? Front Genet 2012; 3: 223.

[15] Dave RS, Khalili K. Morphine treatment of human monocyte-derived macrophages induces differential miRNA and protein expression: impact on inflammation and oxidative stress in the central nervous system. J Cell Biochem 2010; 110(4): 834-45.

[16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.

[17] Talebi M, Mashayekhi M, Rajabi S, Rahmani MR, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A. Effect of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]

chronic morphine treatment on tactile learning in rat. Afr J Pharm Pharmacol 2011; 5(19): 2128-31.

[18] Zheng H, Chu J, Zeng Y, Loh HH, Law PY. Yin Yang 1 phosphorylation contributes to the differential effects of mu-opioid receptor agonists on microRNA-190 expression. J Biol Chem 2010; 285(29): 21994-2002.

[19] Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbański MJ, Przewłocki R. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. Cell Mol Life Sci 2005; 62(19-20): 2369-75.

[20] Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE. Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. Mol Pharmacol 2010; 78(5): 935-42.

[21] Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. Eur J Neurosci 2004; 19(7): 1826-36.

[22] Rohde DS, McKay WR, Abbadie C, Basbaum AI. Contribution of sacral spinal cord neurons to the autonomic and somatic consequences of withdrawal from morphine in the rat. Brain Res 1997; 745(1-2): 83-95.

[23] Cui Y, Chen Y, Zhi JL, Guo RX, Feng JQ, Chen PX. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance. Brain Res 2006; 1069(1): 235-43.

[24] Ma W, Zheng WH, Powell K, Jhamandas K, Quirion R. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. Eur J Neurosci 2001; 14(7): 1091-104.

[25] Obata K, Katsura H, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Noguchi K. Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. J Neurochem 2007; 102(5): 1569-84.

[26] Li CY, Mao X, Wei L. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. PLoS Comput Biol 2008; 4(1): e2.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-07]