

Hyperglycemia- Induced NF- B Activation Increases microRNA-146a Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Salmani Korjan E¹, Kamali K², Katebi M³, Samiei A⁴, Ghadiri Soufi F*⁵

1. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

2. Department of Physiology, Larestan Faculty of Medical Sciences, Larestan, Iran

3. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

4. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

5. Molecular Medicine Research Center, Health institute, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +987633338965, Fax: +987633338965, E-mail: dr.f.g.soufi@gmail.com

Received: Dec 21, 2018 Accepted: Mar 11, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Nuclear Factor kappa B (NF- B), a master switch transcription factor, plays a critical role in the progression and development of hyperglycemia-induced microangiopathy. Hyperglycemia activates NF- B, and subsequently increases pro-inflammatory cytokines such as TNF- , IL-6 and IL-1 leading to development of inflammation. Some new studies have revealed the involvement of microRNA-146a (miR-146a) in the pathogenesis of diabetic complications through an NF- B-dependent negative feedback loop manner. Despite numerous reports indicating changes of plasma miR-146a during hyperglycemia, the origin of this change remains unclear. This study was designed to evaluate the role of NF- B on the miR-146a gene expression level in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) during a hyperglycemic condition.

Methods: HUVECs were cultured in normal glucose (5 mmol/L), and hyperglycemic (25 mmol/L) endothelial cell growth medium in the six well plates for 24 h. JSH-23 (30 μmol/L), as an inhibitor of NF- B translocation to the nucleus, was added to the culture medium, 30 min before induction of hyperglycemia. Quantitative Real Time PCR was performed to measure the expression levels of miR-146a and mRNA NF- B. NF- B activity was measured by Elisa.

Results: Hyperglycemia markedly increased the NF- B activity and mRNA level in HUVECs. The expression of miR-146a significantly increased in hyperglycemic group compared to the normoglycemic group. On the other hand, JSH-23 prevented from miR-146a increment in hyperglycemic group and also it increased the mRNA expression level of NF- B in this group.

Conclusion: This result shows that NF- B increases the gene expression of miRNA-146a in the early phase of hyperglycemia in HUVECs.

Keywords: Nuclear Factor- B; Hyperglycemia; HUVECs; miR-146a

B- NF فعال شده با هایپیر گلیسمی، بیان microRNA-146a را در سلول‌های اندوتلیال عروقی بند ناف انسانی افزایش می‌دهد

الناز سلمانی کرجان^۱، کامیلا کمالی^۲، مجید کاتبی^۳، افشین سمیعی^۴، فرهاد قدیری صوفی^{۵*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران

۳. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۴. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

۵. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۷۶۳۳۳۳۸۹۶۵ فاکس: ۰۷۶۳۳۳۳۸۹۶۵ پست الکترونیک: dr.f.g.soufi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور هسته‌ای کاپای B (NF- B)، به عنوان یک عامل رونویسی اصلی، در پیشرفت و توسعه التهاب عروق ریز ناشی از هایپیر گلیسمی نقش مهمی ایفا می‌کند. هایپیر گلیسمی باعث فعال شدن NF- B و به دنبال آن افزایش سیتوکین‌های پیش برنده التهاب همچون TNF- α ، IL-6 و IL-1 و گسترش التهاب می‌شود. مطالعات جدید نقش microRNA-146a (miR-146a) را در پانوز دیابت، از طریق یک حلقه فیدبک منفی وابسته به NF- B نشان داده‌اند. اگرچه مطالعات بی شماری بیانگر تغییر غلظت پلاسمایی miR-146a طی هایپیر گلیسمی بوده‌اند، اما هنوز سلول‌های منشاء این تغییر مشخص نیستند. بدین منظور این مطالعه تجربی- مداخله‌ای برای ارزیابی نقش NF- B بر میزان بیان ژن miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی بندناف انسان (HUVECs) در شرایط هایپیر گلیسمی طراحی شد.

روش کار: سلول‌های HUVEC در محیط رشد سلول اندوتلیال در شرایط گلوکز طبیعی (۵ میلی مول در لیتر) و شرایط هایپیر گلیسمی (۲۵ میلی مول در لیتر) در پلیت ۶ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. اضافه شدن ۳۰ میکرومول در لیتر JSH-23 به عنوان بازدارنده انتقال NF- B به هسته، ۳۰ دقیقه قبل از ایجاد هایپیر گلیسمی صورت گرفت. جهت اندازه گیری میزان بیان miR-146a و NF- B روش quantitative Real Time PCR استفاده شد. میزان فعالیت NF- B با روش ELISA سنجیده شد.

یافته‌ها: هایپیر گلیسمی میزان فعالیت و میزان بیان mRNA NF- B را در سلول‌های HUVEC به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین میزان بیان miR-146a در گروه هایپیر گلیسمی در مقایسه با گروه کنترل، به طور محسوسی افزایش یافت. از طرف دیگر، JSH-23 باعث جلوگیری از افزایش miR-146a و نیز افزایش بیان mRNA NF- B در سلول‌های هایپیر گلیسمی گردید.

نتیجه‌گیری: این یافته نشان می‌دهد که NF- B بیان ژن miR-146a را در فاز اولیه هایپیر گلیسمی در سلول‌های HUVEC افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور هسته‌ای کاپای B، هایپیر گلیسمی، سلول‌های اندوتلیال عروقی بند ناف انسان، microRNA-146a

مقدمه

دیابت به عنوان یک بیماری التهابی، مجموعه ای از ناهنجاری های متابولیکی است که اولین مشخصه آن هیپر گلیسمی مداوم و پایدار به دلیل عدم تحمل گلوکز در نتیجه کمبود انسولین یا اختلال در عملکرد آن می باشد و باعث اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، لیپید و پروتئین می شود [۲،۱]. بروز دیابت قندی در ارتباط با عوامل مستعد کننده ژنتیکی و فاکتورهای محیطی است که به صورت جهانی در حال افزایش است؛ از این رو انتظار می رود که بروز عوارض دیابتی در حال افزایش باشد [۱]. طبق آمار جهانی تعداد افراد مبتلا به دیابت در سه دهه اخیر، چهار برابر شده است که این روند با افزایش تلفات همراه می باشد و پیش بینی شده است که این بیماری خطرناک تا سال ۲۰۵۰ حدود یک سوم از کل جمعیت جهان را درگیر کند [۴،۳].

هیپر گلیسمی مداوم و پایدار معمولاً باعث میکرو و ماکرو آنژیوپاتی می گردد که به نوبه خود اختلال در عملکرد ارگان های بدن بویژه قلب، چشم ها، سیستم اعصاب محیطی و کلیه ها را به همراه داشته و می تواند در نهایت به کاردیومیوپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی منجر گردد [۵]. اعتقاد بر این است که هیپر گلیسمی مزمن موجب افزایش اکسیداسیون گلوکز و محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون^۱ (AGEs)، فعال شدن پروتئین کیناز^۲ C، مسیر پلیول^۳، هگزوز آمین ها^۴ و در نهایت تولید سیتوکین های پیش التهابی (مانند اینترلوکین^۵ 1-IL، اینترلوکین^۶ 6-IL) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا^۷ (TNF-))

می شود که این مکانیسم ها منجر به فعالیت فاکتور هسته ای کاپای^۸ B (NF- B) در سلول می گردد [۶]. مطالعات متعددی نشان داده اند که NF- B به عنوان یک عامل رونویسی اصلی، در پیشرفت و توسعه میکرو آنژیوپاتی ناشی از هیپر گلیسمی نقش مهمی ایفا می کند [۷-۹]. در این ارتباط نتایج مطالعات گذشته نشان می دهد که مهار NF- B منجر به مهار استرس اکسیداتیو و واسطه های مسیر سیگنالینگ مرگ سلولی می شود [۱۰]. همچنین مشخص شده است که بیان ژن و میزان پروتئین NF- B، TNF و IL-1 و نیز میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی^۹ در پری سایت های شبکیه گاو که در معرض غلظت بالای گلوکز قرار گرفته بودند، افزایش داشته است [۱۱]. NF- B عموماً از هترو دایمر p65/p50 تشکیل شده است که در حالت عادی درون سیتوپلاسم با اتصال به پروتئینی به نام I B به صورت مهار شده است. I B در پاسخ به محرک های التهابی از قبیل TNF، IL1 به واسطه پروتئوزوم تخریب و منجر به آزاد سازی و انتقال NF- B به هسته و تنظیم بیان طیف وسیعی از ژن های دخیل در فرآیند التهاب می شود [۱۲،۱۳].

JSH-23 (۴-متیل-N-۳-فنیل پروپیل) بنزن ۲۰۱ دی آمین) یک ترکیب شیمیایی می باشد که از آن به عنوان مهارگر NF- B فعال شده ناشی از سیتوکین ها و LPS استفاده می شود [۱۴]. ترکیب آروماتیک دی آمین JSH-23 مانع از انتقال هسته ای زیر واحد P65 NF- B به داخل هسته می شود. عملکرد JSH-23 بدون تاثیر در تخریب یا بازیافت I B صورت می گیرد. مطالعات نشان داده اند که JSH-23 از طریق هدف قرار دادن NF- B نه تنها بیان ژنی NF- B، IL-1، IL-6، iNOS و COX-2 القا شده با لیپولی ساکارید را مهار کرده است؛ بلکه آپوپتوز ناشی از آنها را نیز متوقف کرده است [۱۵]. از مصارف دیگر

¹ Advanced Glycation End Products

² Protein Kinase C

³ Polyol Pathway

⁴ Hexosamine Pathway

⁵ Interleukin-1

⁶ Interleukin 6

⁷ Tumor Necrosis Factor Alpha

⁸ Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells

⁹ Apoptosis

بیماری‌های مختلف نظیر بیماری‌های التهابی، سرطان و دیابت می‌شود [۲۴،۲۳،۲۱]. اگرچه مطالعات متعددی به نقش miR-146a در پاتولوژی عوارض ناشی از هیپرگلیسمی و تغییرات غلظت پلاسمایی miR-146a اشاره کرده‌اند ولی هنوز هیچ مطالعه‌ای به بررسی نقش NF- B بر میزان بیان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی طی شرایط هیپرگلیسمی نپرداخته است. با توجه به نقش محوری سلول‌های اندوتلیال عروقی در آسیب‌های عروقی ناشی از هیپرگلیسمی هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر NF- B بر بیان ژن miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی طی شرایط هیپرگلیسمیک می‌باشد. بدین منظور، در شرایط هیپرگلیسمی JSH-23 (مهارکننده NF- B) به محیط کشت سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسانی^۲ (HUVEC) اضافه گردیده و سپس بیان ژن miR-146a در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

کشت سلول

در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای، سلول‌های HUVECs از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها داخل محیط کشت پایه^۳ EBMTM-2 (۵۰۰ میلی لیتر از شرکت Lonza) که با SingleQuotsTM Kit (از شرکت Lonza) حاوی فاکتور رشد فیبروبلاستی انسانی^۴ (۲۲۵pg/ml)، فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال عروقی^۵ (۱۱۰ng/ml)، فاکتور رشد گیرنده‌های شبه انسولینی^۶ (۱۵۰ng/ml)، اسکوربیک اسید (۱μg/ml)، هیدروکورتیزون (۱mg/ml)، فاکتور رشد اپیدرمی انسان^۷ (۱۰ng/ml)

² Human Umbilical Vein Endothelial Cells

³ Endothelial Basal Medium-2

⁴ hFGF: Human Fibroblastic Growth Factor

⁵ VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

⁶ R3-IGF: Receptor –Insulin Growth Factor

⁷ hEGF: Human Epidermal Growth Factor

JSH-23 به منظور بررسی نقش NF- B در سرطان، التهاب و نوروزن استفاده شده است [۱۶]. میکروریبونوکلیک اسیدها^۱ (microRNAs or miRNAs) گروهی از RNAهای درونزاد کوچک تک‌رشته‌ای و غیرقابل کد شدن هستند که در یوکاریوت‌ها دیده می‌شوند و حدود ۱۹ الی ۲۴ نوکلئوتید طول دارند. وظیفه اصلی آن‌ها در تنظیم پس از رونویسی است؛ که با اثر بر RNAهای پیک (mRNA) و مهار ترجمه و یا افزایش تخریب آن‌ها، در تنظیم فرایندهای نسخه‌برداری و سنتز پروتئین‌ها شرکت می‌کنند [۱۷ و ۱۸]. miRNAها در تنظیم تعداد بی‌شماری از فرایندهای زیستی، از جمله تکثیر، تمایز، آپوپتوز، تکوین سلولی، شرکت در دفاع ایمنی، بیماری‌های ویروسی و نیز در بروز انواع سرطان نقش دارند. در نتیجه، به طور بالقوه نقش عمده‌ای در سلامت و بیماری انسان ایفاء می‌کنند [۱۹]. نتایج یک مطالعه جدید نشان داده است که میزان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال شبکیه در شرایط هایپرگلیسمی کاهش یافته است [۲۰]. در حالی که در مطالعه دیگری افزایش سه برابری در میزان بیان miR-146a در مقایسه با گروه کنترل در عصب سیاتیک رت‌های دیابتی مشاهده شده است [۲۱]. همچنین در مطالعه دیگری مشخص شد که میزان بیان ژن miR-146a در کلیه رت‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است [۶].

اعتقاد بر این است که فعال شدن NF-kB، رونویسی از ژن miR-146a را افزایش می‌دهد. miR-146a به نوبه خود از طریق تنظیم کاهش فاکتورهای سیتوپلاسمی به نام‌های TRAF6 و IRAK1 منجر به کاهش فعالیت NF- B می‌شود [۲۲]. گزارشات نشان داده‌اند که حلقه فیدبک منفی miR-146a-NF- B نقش حائز اهمیتی در تنظیم فرایند التهاب بر عهده دارد و اختلال در این حلقه فیدبکی باعث ایجاد

¹ Micro Ribonucleic Acids

محیط کشت اضافه گردید تا به غلظت ۲۵ میلی مولار دست یافته شود (۲۰). جهت ایجاد گروه کنترل اسمولی، ۲۰ میلی مولار D-مانیتول + ۵ میلی مولار D- گلوکز استفاده شد [۲۵].

بررسی میزان بیان ژن های NF- B و miR-146a استخراج RNA و سنتز cDNA

با توجه به اینکه هدف این مطالعه بررسی اثر هیپیر گلیسمی حاد بود، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از ایجاد گروه های ۴ گانه مورد مطالعه، بررسی بیان ژن های NF- B و miR-146a در حضور و در عدم حضور JSH-23 به روش Quantitative Real Time PCR انجام گرفت.

ابتدا سلول های همه گروه ها جهت استخراج RNA طبق راهنمای کیت miRNeasy Mini Kit شرکت سازنده (Qiagen) آماده شدند. بعد از انجام عمل استخراج، جهت کنترل کیفیت RNA استخراج شده، بر روی ژل آگاروز ۱٪ که در شرایط عاری از RNase تهیه شده بود، الکتروفورز (افقی) گردید (شکل ۱).

همچنین برای ارزیابی خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ^۵ استفاده شد و نسبت جذب یا OD نمونه ها در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ اندازه گیری شد و مقدار آن در حدود ۲-۱/۹ به دست آمد که نشان دهنده خلوص بالای RNA مورد نظر بود؛ بنابراین جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سپس مراحل cDNA سازی مطابق راهنمای مندرج در کیت RT kit miScript از شرکت Qiagen، انجام شد. ۱ میکروگرم از total RNA هر گروه برای واکنش سنتز cDNA استفاده شد. نمونه های حاصل از واکنش سنتز cDNA، برای انجام واکنش Real Time - PCR مورد استفاده قرار گرفتند. پروتوکل کار طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت miScript SYBR Green RT- PCR Kit (Qiagen)، برای انجام واکنش استفاده شد. روش

هیپارین (۲۲/۵ mg/ml)، سرم جنین گاوی^۱ (۱۰ میلی لیتر از غلظت ۲٪)، جنتامایسین- آمفوتریسین^۲ (۵۰ μg/ml) غنی سازی شده بود، در داخل فلاسک T75 و داخل انکوباتور در شرایط استاندارد (دمای ۳۷°C، دی اکسید کربن ۵٪، رطوبت ۹۵٪) کشت داده شدند. هر ۴-۳ روز یک بار محیط کشت سلول ها تعویض شدند و زمانی که تراکم آن ها حدودا به ۸۰ درصد رسید، سلول ها پاساژ^۳ داده شدند و به فلاسک های دیگری انتقال یافتند. سلول ها را با محلول شستشوی PBS شستشو داده و با تریپسین جداسازی شدند. بعد از ۵ مرحله پاساژ سلول ها با تراکم ۸۰-۷۰ درصد به منظور گروه بندی، به داخل پلیت های ۶ خانه ای^۴ به تعداد ۳×۱۰^۵ سلول و ۲۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل در هر چاهک منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور در شرایط استاندارد نگهداری شدند [۲۶،۲۵].

تیمار سلول های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسانی

روز بعد محیط کشت همه پلیت ها تعویض و ۲۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید جایگزین شد. گروه ها به صورت Duplicate تقسیم بندی شدند. گروه های مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

۱. کنترل (محیط کشت عادی که خود حاوی غلظت ۵ میلی مولار D- گلوکز بود)
 ۲. اسمولی (محیط کشت عادی حاوی غلظت ۵ میلی مولار D- گلوکز + ۲۰ میلی مولار D- مانیتول)
 ۳. هیپیر گلیسمی (غلظت D- گلوکز محیط کشت از ۵ به ۲۵ میلی مولار رسانده شد)
 ۴. هیپیر گلیسمی + JSH-23 (۳۰ میکرو مولار)
- JSH-23 جهت مهار NF- B (۳۰ میکرو مولار، محلول در DMSO) ۳۰ دقیقه قبل از ایجاد هیپیر گلیسمی، به محیط کشت اضافه گردید [۲۷]. همچنین برای ایجاد گروه هیپیر گلیسمی ۲۰ میلی مولار D- گلوکز به

¹ FBS: Fetal Bovine Serum

² GA-100: Gentamicin , Amphotericin

³ Passage or Subculture

⁴ 6 Wells

⁵ Thermo Scientific

عصاره هسته سلولی جهت ارزیابی غلظت P65 که معیار میزان فعالیت NF- κ B می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت و طبق دستورالعمل کیت ELISA شرکت Cayman chemicals انجام شد. غلظت نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر و بر حسب میزان پروتئین نمونه اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت مقایسه تفاوت موجود بین گروه‌ها در روش Real Time-PCR از آزمون تحلیل کواریانس (ANCOVA) و در روش ELISA از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) یکطرفه استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS-21 استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد و $p < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

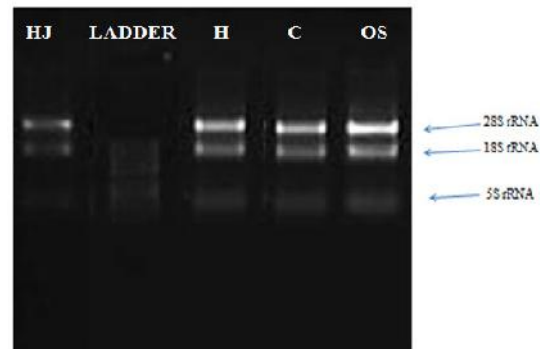
یافته‌ها

اثر هیپرگلیسمی بر میزان فعالیت NF- κ B در سلول‌های HUVEC

هدف از این طرح بررسی اثر NF- κ B بر بیان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی در شرایط هیپرگلیسمی بود. با توجه به این فرض که هیپرگلیسمی منجر به افزایش فعالیت NF- κ B می‌گردد، در این طرح جهت افزایش فعالیت NF- κ B از هیپرگلیسمی استفاده گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان P65 (زیر واحد کاتالیتیک NF- κ B، که به عنوان شاخص فعالیت NF- κ B در نظر گرفته می‌شود) به روش الیزا در شکل ۲ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که میزان فعالیت NF- κ B در گروه هیپرگلیسمی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$). علاوه بر این، میزان فعالیت NF- κ B در گروه اسمولی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است. این یافته نشان می‌دهد که هیپراسمولاریته قادر به افزایش فعالیت NF- κ B نبوده و افزایش فعالیت این

Ct² جهت کمی سازی نسبی بیان ژن‌های NF- κ B و miR-146a استفاده شد.

پرایمر ژن‌های NF- κ B، Actin، miR-146a و U6 از شرکت Exiqon تهیه شدند. واکنش‌های Real Time-PCR مربوط به ژن‌ها برای هر ۴ گروه به صورت Duplicate داخل دستگاه Corbett Rotor-Gene RG-6000 (ساخت استرالیا) انجام شدند. توالی پرایمرها برای ژن NF- κ B (جلو)^۱: CTGATGTGCATCGGCAAG و معکوس^۲: TGCTGGGAAGGTGTAGGG، برای ژن Actin (جلو): CTGGACAAACCTCAGCCCTA و معکوس: CTGATTTGGACAAGCAGCAA، برای ژن miR-146a (CCGAATCTTGCCATACGCAAACCCATGG) و برای ژن U6 (CGCTTCGGCAGCACATATAC) بودند.



شکل ۱. نمونه RNA گروه‌های مطالعه به همراه سایز مارکر بر روی ژل آگاروز. ستون‌های شکل از سمت راست شامل گروه اسمولی (OS)، کنترل (C)، هیپرگلیسمی (H)، سایز مارکر (Ladder) و هیپرگلیسمی + JSH (HJ) می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت NF- κ B به روش ELISA^۳

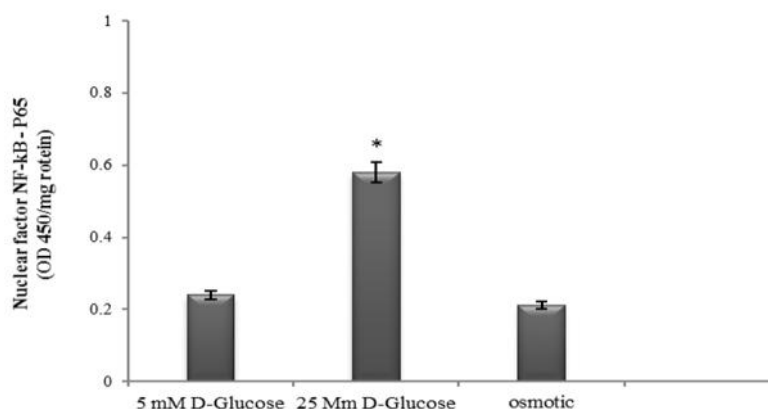
جهت اندازه‌گیری فعالیت NF- κ B، سلول‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه بر اساس دستورالعمل کیت استخراج عصاره هسته سلولی Cayman chemicals هموژنیزه گردید و سوپرناتانت آن حاوی

¹ Forward

² Reverse

³ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

فاکتور نسخه برداری ناشی از هیپرگلیسمی بوده است.

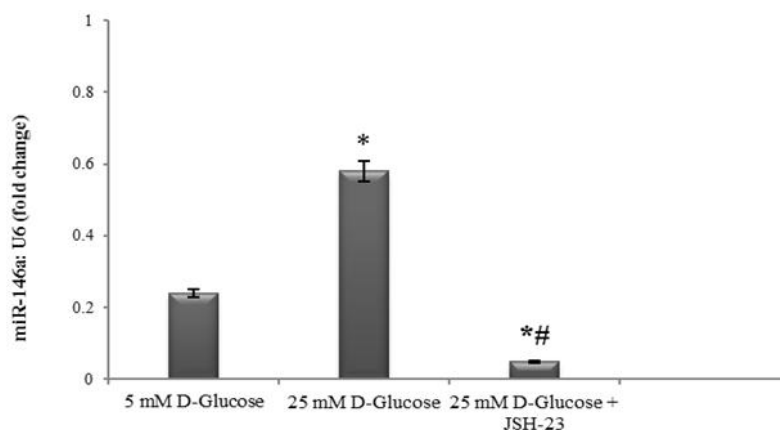


شکل ۲. اثر هیپرگلیسمی و هیپراسمولاریته بر میزان فعالیت NF- B. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ذکر شده است. * بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$) می‌باشد.

هیپرگلیسمی، باعث کاهش چشمگیری در میزان بیان miR-146a در مقایسه با گروه‌های کنترل و هیپرگلیسمی گردید ($p < 0.05$). با توجه به اینکه JSH-23 از انتقال زیر واحد کاتالیتیک NF- B یعنی P65 به درون هسته جلوگیری می‌کند، این یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهند که هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته از طریق افزایش فعالیت NF- B منجر به افزایش بیان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی گردید. در حالی که با مهار فعالیت NF- B، میزان بیان miR-146a کاهش یافت.

اثر NF- B بر بیان ژن miR-146a در سلول‌های HUVEC طی وضعیت هیپرگلیسمی

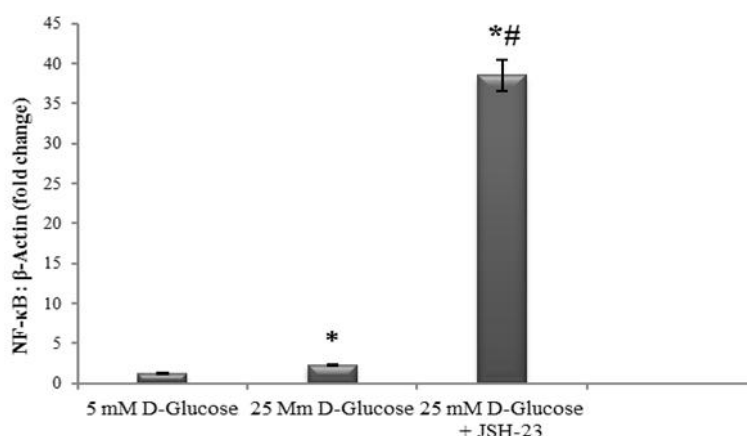
در این مطالعه جهت بررسی چگونگی اثر NF- B در سلول‌های HUVEC، میزان بیان miR-146a در شرایط هیپرگلیسمی در شرایط حضور و عدم حضور JSH-23 به روش Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج این بررسی در شکل ۳ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته منجر به افزایش بیان miR-146a در سلول‌های HUVEC در مقایسه با گروه کنترل گردیده است ($p < 0.05$). در حالی که تیمار JSH-23 نیم ساعت قبل از ایجاد



شکل ۳. اثر NF- B بر بیان ژن miR-146a در شرایط حضور و عدم حضور JSH-23 در سلول‌های HUVEC در شرایط هیپرگلیسمی. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ذکر شده است. * بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$) و # بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه هیپرگلیسمی ($p < 0.05$) می‌باشد.

همچنین این شکل نشان می‌دهد که تیمار JSH-23 نیم ساعت قبل از القای هیپرگلیسمی باعث شده است که پس از ۲۴ ساعت میزان بیان mRNA مربوط به NF- κ B را در مقایسه با گروه هیپرگلیسمی، حدود ۱۵ برابر افزایش دهد. این یافته نشان می‌دهد که احتمالاً زیر واحدهای فعال NF- κ B پس از ورود به هسته منجر به تنظیم کاهشی بیان NF- κ B mRNA می‌گردد. به همین دلیل با مهار ورود این زیر واحدهای کاتالیتیک به درون هسته، میزان mRNA مربوط به NF- κ B افزایش می‌یابد.

اثر JSH-23 بر بیان mRNA مربوط به NF- κ B
مطالعات گذشته نشان داده‌اند که هیپرگلیسمی علاوه بر افزایش فعالیت NF- κ B منجر به افزایش mRNA مربوط به NF- κ B نیز می‌گردد. به همین دلیل در این مطالعه میزان بیان mRNA مربوط به NF- κ B در سلول‌های HUVEC در شرایط هیپرگلیسمی در شرایط حضور و عدم حضور JSH-23 به روش Real time PCR اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته منجر به افزایش ۲/۵ برابری mRNA مربوط به NF- κ B در سلول‌های HUVEC در مقایسه با گروه کنترل گردیده است ($p < 0.05$).



شکل ۴. میزان بیان ژن NF- κ B در شرایط حضور و عدم حضور JSH-23 در سلول‌های HUVEC در شرایط هیپرگلیسمی.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ذکر شده است. * بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$) و # بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه هیپرگلیسمی ($p < 0.05$) می‌باشد.

در مطالعه حاضر هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته باعث افزایش میزان بیان ژنی و فعالیت NF- κ B در سلول‌های HUVEC گردید. از طرفی دیگر میزان بیان miR-146a طی شرایط هیپرگلیسمی در سلول‌های HUVEC افزایش یافت. به علاوه مهار انتقال NF- κ B فعال به هسته توانست موجب کاهش بیان miR-146a در شرایط هیپرگلیسمی در سلول‌های HUVEC شود.

مطالعات نشان داده‌اند که طی شرایط هیپرگلیسمی حاد و مزمن تغییراتی در متابولیسم سلول به وجود

بحث

با توجه به نقش محوری NF- κ B در اختلالات عروقی ناشی از دیابت، هدف از انجام این طرح بررسی اثر NF- κ B بر میزان بیان miR-146a طی شرایط هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته در سلول‌های اندوتلیال عروقی بند ناف انسان بود. بدین منظور جهت تحریک فعالیت NF- κ B، سلول‌های HUVEC در معرض هیپرگلیسمی قرار داده شدند و سپس میزان بیان miR-146a در حضور و عدم حضور JSH-23 اندازه‌گیری گردید.

از تیره نعناعیان^۲) می‌توان استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از مسیر سیگنالینگ NF- B را مهار کرد [۱۰]. در مطالعه دیگری که توسط گروه دیگری از محققین انجام شد نشان دادند که هایپیر گلیسمی حاد (۳۶ ساعته) در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو^۳ (BAECs) موجب افزایش فعالیت NF- B شد [۳۲]. نتایج مطالعه حاضر نیز افزایش بیان ژنی و فعالیت NF- B را نشان می‌دهند که با مطالعات قبلی همسو می‌باشد.

نتایج مطالعات حاکی از آن است که miR های همچون miR-10a, miR-155, miR-146a, miR-92a, miR-181b در التهاب عروقی ناشی از فعال شدن NF- B دخالت دارند [۳۳]. اگرچه در سال‌های اخیر توجه به miR-146a به عنوان یک miRNA مهم تنظیم کننده طی فرایند التهاب افزایش یافته است ولی در زمینه نقش آن در پاتوژنز التهاب‌های بافتی ناشی از دیابت و به ویژه هایپیر گلیسمی مطالعات محدودی انجام شده است. تاکنون مطالعات انجام شده در بافت‌ها و سلول‌های مختلف از بیماران دیابتی و حیوانات آزمایشگاهی گواه نتایج متفاوتی از میزان بیان miR-146a در اثر القای NF- B بوده‌اند. به عنوان مثال؛ مطالعه بر روی کلیه [۶]، عصب سیاتیک رت‌های دیابتی [۲۱]، کلیه بیماران دیابتی [۳۴]، سرم افراد هایپیر گلیسمی و هایپر لیپیدمی [۳۵] و سلول‌های اپیتلیال قرنیه افراد دیابتی [۳۶] افزایش در بیان miR-146a نشان داده‌اند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که میزان بیان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی طی شرایط هایپیر گلیسمی در سلول‌های اندوتلیال عروقی بند ناف انسان افزایش یافته است.

از طرف دیگر برخی مطالعات دیگر در این زمینه نتایج متناقضی گزارش نموده‌اند؛ بطوری که مطالعات انجام شده بر روی هیپوکامپ [۳۷]، شبکیه، قلب، کلیه [۲۵]، آئورت [۳۸]، گانگلیون‌های ریشه پستی (DRG)

می‌آیند که می‌تواند منشاء اختلالات عروقی باشند [۲۸]. واسطه‌هایی همچون ROS, PKC, AGEs تحت تأثیر هایپیر گلیسمی تولید می‌شوند که منجر به فعال شدن NF- B می‌شوند. فعال سازی NF- B نسخه برداری از سیتوکین‌های پیش برنده التهاب همچون TNF و IL-1 و IL-6 را آغاز کرده و موجب ایجاد انسداد عروقی، کاهش موضعی جریان خون و اکسیژن بافتی و در نهایت باعث القای آپوپتوز می‌شود. به علاوه مجموعه این عوامل سبب بروز عوارض دیابتی از قبیل رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و اختلالات عروقی می‌گردند [۲۹]. از طرف دیگر از بین رفتن نقش تعدیل کننده NO در اندوتلیوم می‌تواند یک عامل کلیدی و آغازگر در پیشرفت علائم عروقی ناشی از هایپیر گلیسمی باشد [۲۸]. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش ROS تحت تأثیر هایپیر گلیسمی موجب مهار نیتریک اکساید اندوتلیالی^۱ (eNOS) و کاهش میزان NO شده است [۳۰]. هایپیر گلیسمی همچنین موجب کاهش وازودیلاسیون اولیه در پاسخ به التهاب حاد بوده و سبب کاهش موضعی جریان خون و اکسیژن بافتی شده و در نهایت باعث القای آپوپتوز می‌شود. علاوه بر این هایپیر گلیسمی نفوذپذیری اندوتلیوم و ادم بافتی را افزایش داده که می‌تواند موجب اختلال عملکرد اندام‌ها باشد [۲۸].

در این ارتباط نتایج مطالعه‌ای نشان داد که قرار گرفتن سلول‌های HUVEC در معرض غلظت بالای گلوکز برای مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت منجر به افزایش میزان بیان و پروتئین اتصال دهنده سلولی ICAM1 شد که با افزایش فعالیت NF- B و تولید ROS رابطه مستقیم داشت [۳۱]. همچنین گروهی از محققین نشان دادند که هایپیر گلیسمی حاد موجب افزایش استرس اکسیداتیو و فعالیت NF- B در سلول‌های اندوتلیال عروقی شده است. نتایج آن‌ها نشان داد که با استفاده از عصاره *Clinopodium chinenes* (گیاهی

² Lamiaceae³ Bovine Aortic Endothelial Cell¹ Endothelial Nitric Oxide Synthase

انواع سرطان‌ها و بروز عوارض دیابت می‌شود [۲۱]. در این ارتباط نتایج حاصل از مطالعه‌ای نشان دادند زمانی که سلول‌های ترشح کننده انسولین در معرض سیتوکین‌ها قرار داده شدند میزان بیان miR-146a افزایش داشته است. در حالی که با ایجاد جهش در محل‌های اتصال NF- B در پروموتور ژن miR-146a این اثر از بین رفته است. این یافته نشان می‌دهد که بیان ژنی miR-146a توسط NF- B کنترل می‌شود [۴۴]. این گزارشات با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارند بطوری که میزان بیان miR-146a در شرایط هیپرگلیسمی ۲۴ ساعته افزایش پیدا کرده است در حالی که با استفاده از JSH-23 از طریق مهار فعالیت NF- B میزان بیان آن به طور چشمگیری کاهش داشته است. برآورد این نتایج می‌تواند تاییدکننده این مطلب باشند که miR-146a از طریق NF- B کنترل می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که هایپرگلیسمی حاد (۲۴ ساعته) از طریق افزایش فعالیت NF- B منجر به افزایش بیان miR-146a در سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌گردد. اگرچه هنوز نقش هایپرگلیسمی در زمان طولانی تر و هایپرگلیسمی مزمن در این زمینه مشخص نیست ولی با توجه به نقش سلول‌های اندوتلیال عروقی در عوارض عروقی ناشی از هایپرگلیسمی، نتایج مطالعه حاضر می‌تواند دریچه جدیدی در جهت بررسی مکانیسم‌های احتمالی درگیر در پاتوژنز عوارض عروقی هایپرگلیسمی در بیماری‌هایی نظیر دیابت بازی کند.

محدودیت‌های تحقیق

محدودیت مهم این تحقیق عدم دسترسی به سلول‌های اندوتلیال عروقی افراد دیابتی بود. با توجه به متفاوت بودن شرایط رشد و پاسخدهی سلول‌ها در محیط *in vitro* و *in vivo*، احتمالاً استفاده از

رتهای دیابتی [۳۹]، سلول‌های اندوتلیال میکرووسکولار قلب انسان (HCMEC) [۴۰] و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) بیماران دیابتی [۴۱] میزان بیان miR-146a کاهش یافته است. طبق مطالعات گذشته ثابت شده است که بیان miR-146a القا شده توسط LPS، IL-1 و TNF-، وابسته به NF- B است [۴۲]. در واقع چندین جایگاه اتصال برای NF- B بر روی پروموتور ژن miR-146a وجود دارد که موجب کنترل بیان ژنی miR-146a توسط NF- B می‌گردد [۲۲]. وجود جهش در ناحیه اتصال NF- B در راه‌انداز این ژن سبب توقف بیان ژن miR-146a از طریق NF- B می‌شود. نتایج تحقیقات قبلی ثابت کرده‌اند که فاکتورهای سیتوپلاسمی TRAF6 و IRAK1 به عنوان ژن‌های هدف miR-146a شناخته شده‌اند و miR-146a می‌تواند از طریق اتصال به ناحیه 3'UTR mRNA آن‌ها بیان ژنی آن‌ها را به صورت پس از رونویسی (مهار ترجمه یا تجزیه mRNA آن‌ها) مهار کند. ایجاد جهش در توالی ژنوم این دو مولکول باعث از بین رفتن این عملکرد توسط miR-146a می‌شود [۲۲]. با توجه به یافته‌های مطالعات قبلی، وجود نقصی در TRAF6 و IRAK1 می‌تواند حلقه فیدبک منفی NF- B-miR-146a تضعیف کند و موقعیتی برای فعال شدن پایدار NF- B ایجاد کند و شرایط جدیدی را برای سلولها در برابر اختلالات ناشی از هایپرگلیسمی فراهم کند [۴۳].

اعتقاد بر این است که فعال شدن NF- B رونویسی از ژن miR-146a را افزایش می‌دهد که به نوبه خود موجب تنظیم کاهشی TRAF6 و IRAK1 می‌شود. در نتیجه این عوامل منجر به تنظیم کاهشی فعالیت NF- B می‌شوند [۲۲]. گزارشات نشان داده‌اند که حلقه فیدبک منفی NF- B-miR-146a نقش حائز اهمیتی در مکانیسم التهاب بر عهده دارد و اختلال در این حلقه فیدبکی، باعث تداوم فعالیت NF- B و ایجاد بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های خود ایمنی،

دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان استخراج گردیده و بدین وسیله از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان که حمایت مالی این طرح را به عهده داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سلول‌های اندوتلیال عروقی افراد دیابتی نتایج قابل استنادتری ارائه بدهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی خانم الناز سلمانی با شماره ۲-ف-۹۱ در

References

- 1- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010 Jan;33(Supplement 1):S62-S9.
- 2- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec;414(6865):799-806.
- 3- Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Feb;14(2):88.
- 4- Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr*. 2010 Oct;8(1):29.
- 5- Samra YA, Said HS, Elsherbiny NM, Liou GI, El-Shishtawy MM, Eissa LA. Cepharanthine and Piperine ameliorate diabetic nephropathy in rats: role of NF- B and NLRP3 inflammasome. *Life Sci*. 2016 Jul;157:187-99.
- 6- Alipour MR, Khamaneh AM, Yousefzadeh N, Mohammad-nejad D, Soufi FG. Upregulation of microRNA-146a was not accompanied by downregulation of pro-inflammatory markers in diabetic kidney. *Mol Biol Rep*. 2013 Nov;40(11):6477-83.
- 7- Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jul;1812(7):719-31.
- 8- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF- B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Aug; 21(8):1254-62.
- 9- Patel S, Santani D. Role of NF- B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep*. 2009 Jul-Aug;61(4):595-603.
- 10- Li J, Wu F, Chen K, Liang J, Ma S. Extract of clinopodium chinense inhibits high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Apr;61(4):265-71.
- 11- Yang L-p, Sun H-l, Wu L-m, Guo X-j, Dou H-l, Tso MO, et al. Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol vis sci*. 2009 May;50(5):2319-27.
- 12- Zago M, de Souza AR, Hecht E, Rousseau S, Hamid Q, Eidelman DH, et al. The NF- B family member RelB regulates microRNA miR-146a to suppress cigarette smoke-induced COX-2 protein expression in lung fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2014 Apr;226(2):107-16.
- 13- Zheng X, Zhu S, Chang S, Cao Y, Dong J, Li J, et al. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: Role of NF-kappa B signaling. *Europ J Pharmacol*. 2013 Oct;720(1-3):147-57.
- 14- Kasparkova J, Thibault T, Kostrohova H, Stepankova J, Vojtiskova M, Muchova T, et al. Different affinity of nuclear factor-kappa B proteins to DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer. *FEBS J*. 2014 Mar;281(5):1393-408.
- 15- Shin H-M, Kim M-H, Kim BH, Jung S-H, Kim YS, Park HJ, et al. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- B without affecting I B degradation. *FEBS Lett*. 2004 Jul;571(1):50-4.
- 16- Kumar A, Negi G, Sharma S. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes Obes Metabol*. 2011 Aug;13(8):750-8.

- 17- Ma X, Buscaglia LEB, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF- B signaling. *J Mol Cell Biol.* 2011 Jun;3(3):159-66.
- 18- Bang-Berthelsen CH, Pedersen L, Fløyel T, Hagedorn PH, Gylvin T, Pociot F. Independent component and pathway-based analysis of miRNA-regulated gene expression in a model of type 1 diabetes. *BMC Genomics.* 2011 Feb;12(1):97.
- 19- Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011 Jul;91(3):827-87.
- 20- Ye EA, Steinle JJ. miR-146a attenuates inflammatory pathways mediated by TLR4/NF- B and TNF to protect primary human retinal microvascular endothelial cells grown in high glucose. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3958453.
- 21- Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF- B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem.* 2015 Mar;71(1):51-8.
- 22- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Aug;103(33):12481-6.
- 23- Yuan Y, Anbalagan D, Lee LH, Samy RP, Shanmugam MK, Kumar AP, et al. ANXA1 inhibits miRNA-196a in a negative feedback loop through NF-kB and c-Myc to reduce breast cancer proliferation. *Oncotarget.* 2016 May; 10;7(19):27007.
- 24- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Sep; 4;6(10):a016295.
- 25- Feng B, Chen S, McArthur K, Wu Y, Sen S, Ding Q, et al. miR-146a-mediated extracellular matrix protein production in chronic diabetes complications. *Diabetes.* 2011 Nov;60(11):2975-84.
- 26- Rau C-S, Yang JC-S, Chen Y-C, Wu C-J, Lu T-H, Tzeng S-L, et al. Lipopolysaccharide-induced microRNA-146a targets CARD10 and regulates angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol Sci.* 2014 Aug 1;140(2):315-26.
- 27- Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF- B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett.* 2012 Apr;586(7):1022-6.
- 28- Jafar N, Edriss H, Nugent K. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. *Am J Med Sci.* 2016 Feb;351(2):201-11.
- 29- Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes.* 2003 May;52(5):1256-64.
- 30- Greyling A, Schreuder TH, Landman T, Draijer R, Verheggen RJ, Hopman MT, et al. Elevation in blood flow and shear rate prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in healthy subjects and those with type 2 diabetes. *J Applied Physiol (1985).* 2015 Mar;118(5):579-85.
- 31- Guan Q, Wang X, Gao L, Chen J, Liu Y, Yu C, et al. Hydrogen sulfide suppresses high glucose-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013 Sep;62(3):278-84.
- 32- Song K-H, Park J-H, Jo I, Park J-Y, Seo J, Kim SA, et al. Telmisartan attenuates hyperglycemia-exacerbated VCAM-1 expression and monocytes adhesion in TNF -stimulated endothelial cells by inhibiting IKK expression. *Vascul Pharmacol.* 2016 Mar;78:43-52.
- 33- Cheng HS, Njock M-S, Khyzha N, Dang LT, Fish JE. Noncoding RNAs regulate NF-kappaB signaling to modulate blood vessel inflammation. *Front Genet.* 2014 Des; 10;5:422.
- 34- Huang Y, Liu Y, Li L, Su B, Yang L, Fan W, et al. Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrol.* 2014 Sep 2;15:142.
- 35- Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima AV. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Mol Biol Rep.* 2014 Sep;41(9):5765-73.
- 36- Winkler MA, Dib C, Ljubimov AV, Saghizadeh M. Targeting miR-146a to treat delayed wound healing in human diabetic organ-cultured corneas. *PLoS One.* 2014 Des;9(12):e114692.

- 37- Habibi F, Soufi FG, Ghiasi R, Khamaneh AM, Alipour MR. Alteration in inflammation-related miR-146a expression in NF-KB signaling pathway in diabetic rat hippocampus. *Adv Pharm Bull.* 2016 Mar;6(1):99-103.
- 38- Emadi S, Soufi F, Khamaneh A, Alipour M. MicroRNA-146a expression and its intervention in NF- B signaling pathway in diabetic rat aorta. *Endocr Regul.* 2014 Apr;48(2):103-8.
- 39- Wang L, Chopp M, Szalad A, Zhang Y, Wang X, Zhang R, et al. The role of miR-146a in dorsal root ganglia neurons of experimental diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience.* 2014 Feb;259:155-63.
- 40- Feng B, Chen S, Gordon AD, Chakrabarti S. miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Apr;105:70-76.
- 41- 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. *Molecular and cellular biochemistry. Mol Cell Biochem.* 2011 May;351(1-2):197-205.
- 42- Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol.* 2012 Mar;5(1):13.
- 43- Kamali K, Salmani Korjan E, Eftekhari E, Malekzadeh K, Ghadiri Soufi F. The role of miR-146a on NF- B expression level in human umbilical vein endothelial cells under hyperglycemic condition. *Bratisl Med J.* 2016; 117(7):376-80.
- 44- Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic -cells. *Diabetes.* 2010 Apr;59(4):978-86.