Iranian Journal of Breast Diseases. 2022; 14(4):45-61.

Original Article

Inhibitory Effect of miRNA-145 on PD-L1 Expression in Breast Cancer Cell Line

Hajibabaei S[1], Sotoodehnejadnematalahi F[1], Nafisi N[2], Zeinali S[3], Azizi M[3*]

[1]Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Breast Surgery Department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

Receive: 7/9/2021
Accepted: 30/11/2021

***Corresponding Author:**
mazizi528@gmail.com

Ethics Approval:
Not Applicable

Abstract

Introduction: PD-L1 is one of the most important immune control molecules in breast cancer and plays an important role in suppressing the immune system against tumor cells. Controlling the expression of PD-L1 at mRNA level using miRNA inhibitors could be helpful strategy for cancer treatment. In this study, considering the possible role of miR-145 as a tumor suppression in breast cancer, its involvement in reducing PD-L1 expression in breast cancer cell lines has been investigated.

Methods: First, the targeting of miRNA-145 on 3 'UTR of PD-L1 gene was confirmed using bioinformatics software and then by luciferase dual reporter assay. The expression level of miRNA-145 was measured in breast cancer cell lines compared to normal line. After transfection of miRNA-145 into breast cancer cell lines, qRT-PCR was used to evaluate the effect of miRNA-145 on PD-L1 expression.

Results: we showed that decreased expression of miRNA-145 in breast cancer cell lines was directly related to increased PD-L1 expression ($r = -0.6175$, P value$=0.0457$). In addition, increased expression of miRNA-145 in breast cancer cell lines MDA-MB231, BT549 and MCF7 significantly reduced PD-L1 expression (1.938 ± 0.212, 1.784 ± 0.03 and 0.083 ± 0.02 respectively).

Conclusion: Our findings suggest that miRNA-145, by targeting the PD1/PD-L1 pathway and reducing PD-L1 expression, may be a therapeutic agent to prevent the progression of breast cancer.

Keywords: PD-L1, miRNA-145, Breast Cancer

[Downloaded from ijbd.com on 2022-06-20]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

Introduction

Breast cancer is the uncontrolled growth of abnormal cells that occur in different breast tissues. In recent years, the treatment of BC has made significant progress, leading to the development of targeted therapy [1]. One of the most likely candidates for tumor immune-microenvironment in the incidence of BC is the change of PD-L1 expression. Appearance evidence reports that the miRNA network entirely controls the PD-L1 and PD-1 levels, consequently having a profound regulatory effect on the expression of immune checkpoint-related genes through a complex regulatory mechanism [2]. The main purpose of this study was to reduce the expression of PD-L1 by increasing the expression of miRNA-145 as a tumor suppressor in three breast cancer cell lines.

Materials & Methods

The expression level of PD-L1 and miR-145 were examined in BC cell lines by real time PCR and the targeting effect of miR-145 on PD-L1 was evaluated by luciferase reporter system. In vitro overexpression of miR-145 was used to figure out whether this miR could decrease the PD-L1 expression in mRNA levels in BC cell lines.

Results

miRNA-145 significantly reduces luciferase activity compared to disrupted oligonucleotides (scrambled). Overexpression of miRNA-145 to MDA-MB231, BT549 and MCF7 reduced luciferase activity by 43.5% 61 0.61, 45.4% 0. 0.42 and 46.5% 41 0.41%, respectively (figure 2B, P<0.01).

The expression of miR-145 was significantly downregulated in BC cell lines compared to their control, and its downregulation was negatively correlated with PD- L1 overexpression (r= -0.6175, p value= 0.0457) (figure 3A, B, C). Increased expression of miRNA-145 decreased PD-L1 level in MDA-MB231 to 59 ± 0.537, BT549 to 25.9 0.5 0.541 and in MCF7 to 0.547 ± 9.3%, compared with untransfected cells (figure 3D).

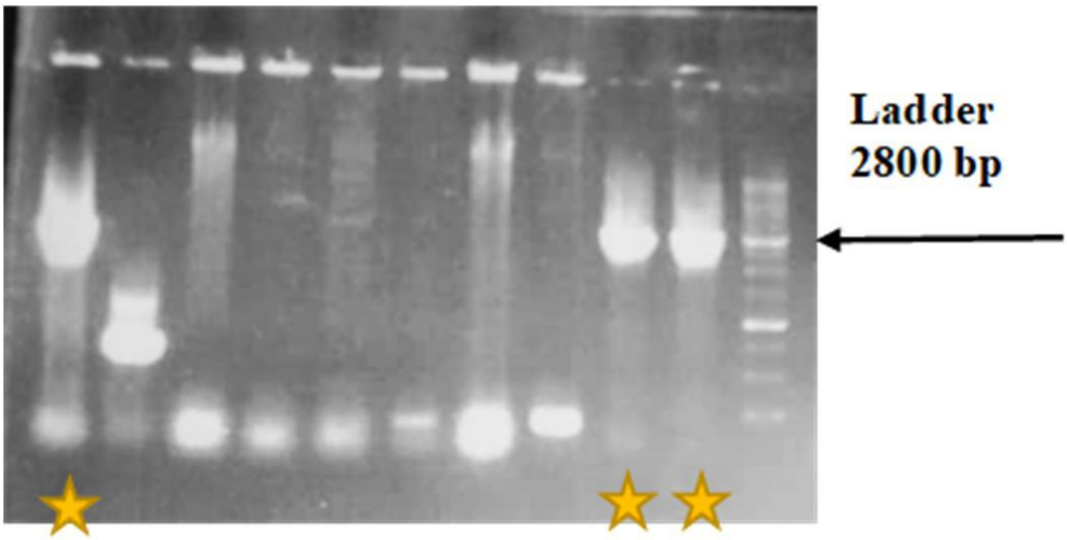


Figure 1: Detection of PD-L1 3'UTR PCR Cloning Product. Row 1 from Right: Ladder, Rows 2, 3, and 10: Positive Colonies Containing 3'UTR (2800bp) Fragment of the PD-L1 Gene Inside the PsiCHECK-2 Vector Grown in Top 10 F 'Bacteria

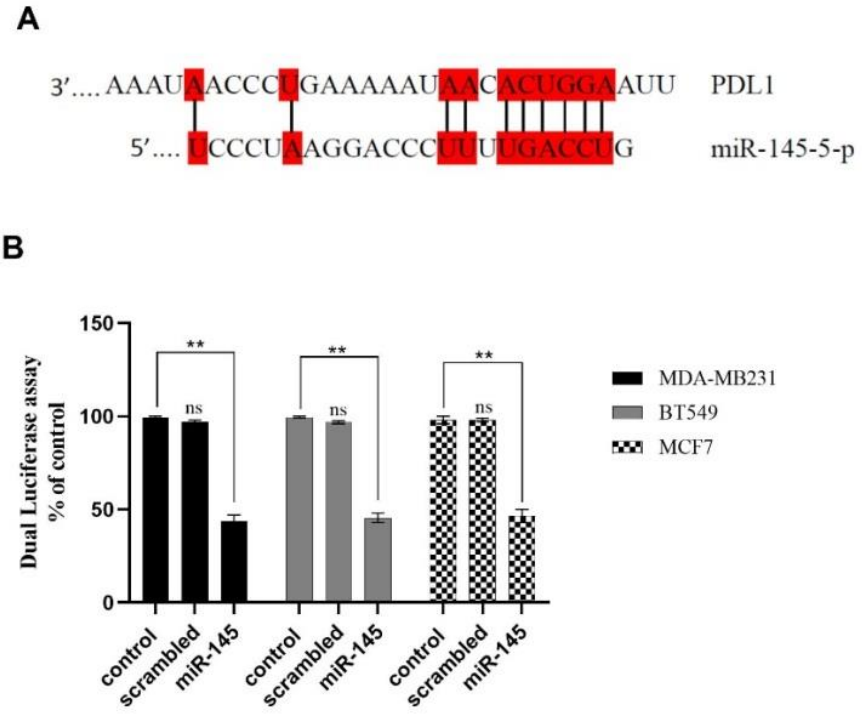


Figure 2: Targeting of PD-L1 by miRNA-145 in Breast Cancer Cells

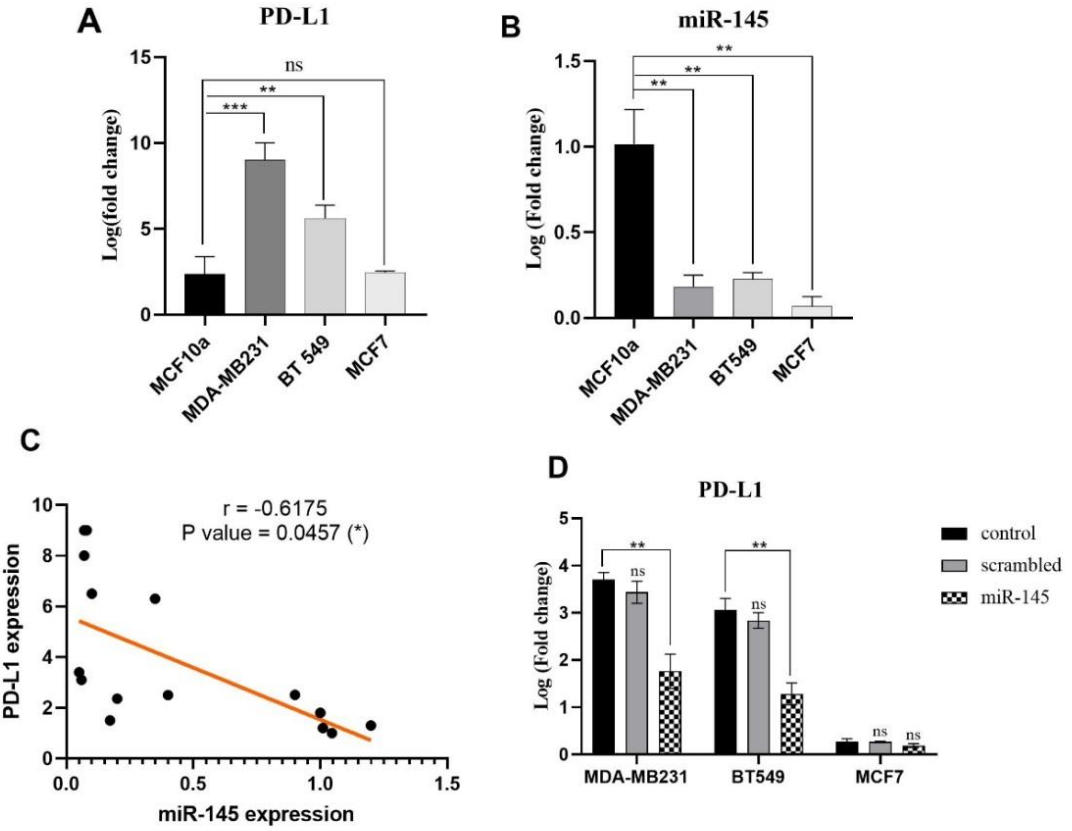


Figure 3: Expression of PD-L1 and miRNA-145 in Breast Cancer Cell Lines

[Downloaded from ijbd.com on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

Figure 1: Detection of 3UTR PCR Product of PD-L1 Gene on Gel

Gene	Sequence of oligonucelotides from 5' to 3' for PCR analysis	Product
PD-L1	Forward: CCGCTCGAGCAGATACACATTTGGAGGAGA Reverse: ATAAGAATGCGGCCGCTGTGCAGGATTCAAAAGCAT	2800 bp
Gene	**Sequence of oligonucelotides from 5' to 3' for real time-PCR analysis**	**Product**
PD-L1	Forward: GTGATCCGCTGCATGATCAG Reverse: GGTAGCCCTCAGCCTGACATG	151 bp
GAPDH	Forward: GAAAGCCTGCCGGTGACTAA Reverse: GCGCCCAATACGACCAAATC	152 bp
miR-145-5p	Forward: GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCC Reverse: AGACTGCACCTGTCCGG	180 bp
Stem loop miR-145-5P	CAATTAGACTACACCTGTCCGGTCCCTGCGTCCTGTAGTCTAATTGAGGGAT	64 bp

Discussion

Breast carcinogenesis is a process involving the dysregulation of tumor suppressor genes and oncogenes [3]. The PD- 1/PD- L1 pathway is important as an immunosuppressant, and it is deregulated in a wide range of human cancers [4], including BC. PD-L1 is involved in tumorigenesis with anti-tumor immunosuppression; obstruction makes it a valuable therapeutic target for a variety of human cancers. Identifying the molecular mechanisms involved in regulating the PD- 1/PD- L1 pathway through breast tumorigenesis could help improve new strategies aimed at the antitumoral immune response against BC. miRs are also important regulators of gene expression and have been deregulated with an increasing number of cancer [5]. It is important to achieve efficient methods to increase the expression of tumor suppressor miRNAs for the treatment and control of cancer or its complications. One of the tumor suppressor miRNAs that has been reduced in many cancers, including ovarian, breast, lung, and colon cancers, is miRNA-145 [6].

In the present study, using bioinformatics analysis, we identified region 3'UTR of the PD- L1 gene as a potential target for miRNA-145, suggesting its possible role in escaping tumor cells from the immune system. Subsequently, we showed that misregulation of miRNA-145 in breast cancer cells was directly related to increased PD-L1 expression, suggesting that miRNA-145 may play a role in post-transcriptional regulation of PD-L1 expression.

In this study, dual luciferase assay confirmed that miRNA-145 could target specific regions of PD-L1 ′3′UTR and significantly reduce its expression ($P < 0.01$). Also, the results of qRT-PCR and a significant decrease in PD-L1 expression after miRNA-145 transfection in the breast cancer metastatic cell line (MDA-MB231, BT549) by 1.938 ± 0.212 and 1.784 ± 0.03, respectively Compared with the non-metastatic cell line (MCF7, 0.083 ± 0.02) of breast cancer, indicates that a significant decrease in miR-145 is involved in an increase in PD-L1 and ultimately breast cancer metastasis. According to this study, increasing miRNA-145 expression in breast cancer cells significantly reduced PD-L1 expression at the mRNA level, reducing the function of miRNA-145 in PD-L1 gene expression in BC.

[Downloaded from ijbdi.com 2022-06-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

Conclusion

Our findings suggest that miRNA-145, by targeting the PD1/PD-L1 pathway and reducing PD-L1 expression, may be a therapeutic agent to prevent the progression of breast cancer.

References

1. Lucy M, Czerniecki BJ. Immunotherapy for breast cancer is finally at the doorstep: immunotherapy in breast cancer. Annals of surgical oncology. 2018; 25(10):2852-7.
2. Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y, et al. The roles of microRNAs in regulating the expression of PD-1/PD-L1 immune checkpoint. 2017; 18(12):2540.
3. Osborne C, Wilson P, Tripathy DJTo. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. 2004; 9(4):361-77.
4. Xu YJ, Zhao JM, Ni XF, Wang W, Hu WW, Wu CP. LncRNA HCG18 suppresses CD8+ T cells to confer resistance to cetuximab in colorectal cancer via miR-20b-5p/PD-L1 axis. Epigenomics. 2021; 13(16):1283-99.
5. Lin RJ, Lin YC, Chen J, Kuo HH, Chen YY, Diccianni MB, London WB, Chang CH, Alice LY. MicroRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. Cancer research. 2010;70(20):7841-50.
6. Cui SY, Wang R, Chen LBJJoc, medicine m. Micro RNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. 2014; 18(10):1913-26.

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-26]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]

[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۱۴۰۰؛ ۱۴(۴): ۴۵-۶۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مهاری miRNA-145 بـر میـزان بیـان PD-L1 در سلول‌های سرطانی پستان

سارا حاجی بابایی[۱]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی[۱]، ناهید نفیسی[۲]، سیروس زینلی[۳]، معصومه عزیزی[۳*]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] بخش جراحی پستان، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۶/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۹

* **نویسنده مسئول:**
mazizi528@gmail.com

چکیده

مقدمه: PD-L1 (Programmed cell death ligand 1) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مولکول‌های کنترل کننده سیستم ایمنی در سرطان پستان به شمار می‌آید و نقش مهمی در سرکوب سیستم ایمنی علیه سلول‌های توموری دارد. کنترل بیان PD-L1 در سطح mRNA با استفاده از miRNAهای مهارکننده این پروتئین از اهمیت خاصی برخوردار است. در این مطالعه، با توجه به نقش احتمالی سرکوب‌کنندگی تومور miRNA-145 در سرطان پستان، مشارکت این miRNA در کاهش بیان PD-L1 در سلول‌های سرطانی پستان بررسی شده است.

روش بررسی: ابتدا هدف‌گیری miRNA-145 بر روی 3'UTR ژن PD-L1 با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک و سپس با روش سنجش دوگانه لوسیفراز تایید شد. میزان بیان miRNA-145 در رده‌های سرطانی پستان نسبت به رده غیرسرطانی پستان اندازه‌گیری شد. پس از ترانسفکشن miRNA-145 به درون رده‌های سلولی سرطان پستان، جهت بررسی اثر miRNA-145 بر میزان بیان PD-L1، روش qRT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک و سنجش لوسیفراز دوگانه، منطقه 3'UTR ژن PD-L1 به عنوان یک هدف برای miRNA-145 شناسایی و تایید شد. متعاقباً، نتایج ما نشان داد که کاهش بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان با افزایش بیان PD-L1 ارتباط مستقیم دارد (P-value=۰/۰۴۵۷, r = -۰/۶۱۷۵).همچنین افزایش بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان MDA-MB231، BT549 و MCF7، بیان PD-L1 را به میزان قابل توجهی (به‌ترتیب ۰/۲۱۲± ۰/۹۸۳، ۰/۰۳± ۰/۷۸۴و ۰/۰۲± ۰/۰۸۳) کاهش داده است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان می‌دهد که miRNA-145 با هدف‌گیری مسیر PD-1/PD-L1 و کاهش بیان PD-L1، ممکن است بتواند به عنوان یک عامل درمانی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان باشد.

واژه‌های کلیدی: PD-L1، miRNA-145، سرطان پستان

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

مقدمه

موتاسیون‌های متعدد درون ژنوم سلول‌های بافت‌های سرطانی یافت می‌شوند، در نتیجه سرطان‌ها جزو بیماری‌های ژنتیکی محسوب می شوند. از طرف دیگر تنها در درصد کمی از خانواده‌ها سرطان از یک نسل به نسل دیگر به صورت جهش تک ژنی منتقل می شود، بیشتر سرطان‌ها تحت تاثیر محیط هستند (۱). بر اساس گزارش GLOBOCAN، سرطان پستان در رتبه دوم سرطان‌های شایع در جهان قرار دارد. این بیماری، شایع‌ترین (۲۴/۲٪) بیماری و نیز با بیشترین مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان (۱۵٪) است. در حالی که میزان مرگ و میر ناشی از سایر سرطان‌ها در مناطق مختلف از جمله آسیا (۴۹/۶٪)، اروپا (۲۲٪)، آفریقا (۱۱/۸٪)، آمریکای لاتین و کارائیب (۸/۴٪)، آمریکای شمالی (۷/۵٪) و اقیانوسیه (۰/۷۷٪) است (۲). سرطان پستان، رشد مهار نشده سلول‌های غیرطبیعی است که در بافت‌های مختلف پستان مانند مجاری انتقال دهنده شیر، بافت تولید کننده شیر و یا در بافت غیر غددی رخ می‌دهد (۳). در سال‌های اخیر، درمان سرطان پستان پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشته است، که منجر به توسعه درمان‌های فردی و هدفمند و افزایش طول عمر شده است. با این حال، هنوز نیاز به گزینه‌های درمانی جدید برای بیماری‌های تهاجمی که فاقد گزینه‌های درمانی هدفمند هستند، وجود دارد. در دهه‌های گذشته، یک درمان جدید که از سیستم ایمنی بدن برای درمان سرطان استفاده می‌کند، به طور فزاینده‌ای رواج پیدا کرده است که به عنوان ایمونوتراپی سرطان شناخته می شود (۴). در این زمینه، تحولات اخیر در ایمونوتراپی این امید را ایجاد کرده است که این نوع درمان ممکن است در سرطان پستان موثر باشد. سرکوب‌کننده‌های محیطی سیستم ایمنی تومور، یکی از شش ویژگی بیولوژیکی متمایز است که باعث رشد و متاستاز تومور می شود. در حال حاضر ایمونوتراپی با مهارکننده‌های ایست بازرسی فعالیت بالینی بی‌سابقه‌ای را در طیف وسیعی از انواع تومورها، به عنوان مثال، ملانوم و سرطان ریه نشان داده است. مولکول‌های کنترل کننده‌ی سیستم ایمنی شامل آنتی‌ژن ۴ سیتوتکسیک مرتبط با لنفوسیت T (CTLA-4)، پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و گیرنده آن (PD-1/PD-L1)، لنفوسیت فعال‌کننده ژن ۳-LAG) 3 و ایمونوگلوبولین موسین -۳ سلول T (TIM-3) هستند که سیگنال‌های منفی را برای مهار پاسخ ایمنی توسط لنفوسیت T ارسال می‌کنند. لیگاند ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده (PD-L1) نوعی گلیکوپروتئین غشایی از خانواده ایمونوگلوبین نوع ۱ بوده که به عنوان گیرنده پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، در رابطه با آپوپتوز، نامگذاری شده است. PD-1، با عنوان کامل پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (Programmed cell death protein 1) که با نام«CD279» هم شناخته می‌شود، یک پروتئین سطحی سلول‌های T است که نقش مهمی در تضعیف دستگاه ایمنی از طریق سرکوب فعالیت‌های التهابی لنفوسیت‌هایT ایفا می‌کند. PD-1 پروتئینی است که لیگاند PD-L1 می‌باشد. تعامل PD-L1با PD-1 در بافت‌های غیرسرطانی برای حفظ هوموستاز سیستم ایمنی بدن و پیشگیری از خودایمنی در طی عفونت یا التهاب حیاتی است. تعامل آن‌ها در میکرو محیط تومور، یک مکانیزم فرار از سیستم ایمنی با خاموش کردن سلول‌های T سیتوتوکسیک برای سلول‌های تومور فراهم می‌کند (۵). PD-L1 بر روی انواع مختلفی از تومورها بیان و موجب پیشبرد رشد تومور می‌شود (۶). در شرایط فیزیولوژیک، mRNA PD-L1 در بافت‌های مختلف بیان می شود، اما پروتئین PD-L1 تنها در چند بافت مانند لوزه‌ها و کسر کوچکی از سلول‌های ماکروفاژها در ریه، کبد و جفت یافت می شود که این نشان‌دهنده تنظیمات پس از رونویسی در mRNA PD-L1 است (۷). بیان PD-L1 در نمونه‌های بافت‌های مختلف مانند سرطان کولون، ملانوم بدخیم، cell lung nonsmall cancer (NCLC)، کارسینوما سلول‌های کلیه و سرطان مری مطالعه شده است. بیان PD-L1 با اندازه بزرگی

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

تومور، بالا بودن درجه سرطان، تکثیر زیاد سلول سرطانی، وضعیت منفی گیرنده استروژن و وضعیت HER2 مثبت رابطه مستقیم (۸) و با میزان بقا درسرطان تخمدان و پستان رابطه معکوس دارد (۹، ۱۰). اگرچه بسیاری از سیتوکین‌ها نقش مهمی در القاء یا حفظ بیان PD-L1 دارند اما آزمایشات *in vitro* و *in vivo* نشان می‌دهد که بیان پروتئین PD-L1 در سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن (APCs)، لنفوسیت‌های T و سلول‌های سرطانی به شدت به وجود اینترفرون گاما (IFN-γ) بستگی دارد. سلول‌های التهابی، به ویژه لنفوسیت‌های فعال، اغلب به عنوان بزرگترین منبع اینترفرون گاما شناخته می‌شوند (۱۱). پیشنهاد شده است که PD-L1 در پاسخ به التهاب و سرکوب پاسخ‌های ایمنی افزایش بیان پیدا می‌کند که این عامل می‌تواند سبب آسیب به بافت‌های غیرضروری شود. سلول‌های توموری از این مکانیسم برای فرار از سیستم ایمنی استفاده می‌کنند (۱۲).

از آنجایی که عملکرد miRNAها در تنظیم فرآیندهای زیستی حیاتی ضروری است به نظر می‌رسد miRNAها با پیش‌آگهی، پیشرفت و علت بروز سرطان در ارتباطند. تجزیه و تحلیل از transcriptome ژنوم انسان نشان می‌دهد که تنها ۱ تا ۲ درصد توالی ژنوم دارای ظرفیت کدگذاری پروتئین است که نشان می‌دهد تعداد زیادی از RNAهای غیرکدگذاری وجود دارد (۱۳). با توجه به نقش مهم microRNAها، بیان آن‌ها در سلول به شدت کنترل شده بوده و هرگونه تغییر در بیان آن‌ها با ایجاد شرایط پاتولوژیکی مختلف از جمله ایجاد سرطان در ارتباط می‌باشد. مطالعات متعدد نشان داده است که در بافت‌های طبیعی بیان miRNA متفاوت از بافت‌های توموری بوده و نیز در بین انواع تومورها متفاوت است. microRNAها در سلول هم به صورت ژن‌های سرکوب‌کننده توموری (Ts-miR) و هم به صورت انکوژن‌ها (OncomiR) فعالیت دارند. microRNAهای انکوژنی سبب کاهش بیان ژن‌های سرکوب‌کننده توموری و یا ژن‌هایی می‌شوند که در تمایز سلولی دخیل هستند؛ از این‌رو، افزایش بیان آن‌ها به شکل‌گیری تومور منجر می‌گردد. اما microRNAهای سرکوب‌کننده توموری، microRNAهایی هستند که سطح بیان انکوژن‌های دخیل در سیکل سلولی و آپوپتوز را کاهش می‌دهند و لذا کاهش آن‌ها سبب بروز تومور می‌گردد (۱۴). microRNAها بیان منظم رسپتورهای ایست و بازرسی ایمنی و لیگاندهای آن‌ها را تنظیم می‌کنند. یک miRNA می‌تواند چندین مولکول ایست و بازرسی را هدف قرار دهد. از سوی دیگر مولکول‌های ایست و بازرسی نیز می‌توانند بیان miRNAها را کنترل کنند (۱۵). miRNAها قادر به تنظیم مکانیسم‌های مولکولی در مسیر سیگنالینگ PD-1/PD-L1 می‌باشند. حتی ممکن است تغییرات کم در بیان microRNAها منجر به تغییرات قابل توجهی در مسیر سیگنالینگ PD-1/PD-L1ایجاد کند. برخی از microRNAها به طور مستقیم 3'UTR را درPD-L1 mRNA هدف قرار می‌دهند و برخی دیگر به طور غیرمستقیم توسط سیگنال مولکول‌هایی مانندPTEN، IFN-γوIFR-1 می‌توانند مسیر سیگنالینگ PD-1/PD-L1 را تنظیم کنند (۱۶). جهش تک نوکلئوتیدی در 3'UTR PD-L1 می‌تواند منجر به بیان بیش از حد PDL-1 شود. این رویداد ناشی از اختلال در جفت‌شدگی صحیح بین3'UTR PD-L1 و miRNA است. به‌عنوان مثال این اختلال در 3'UTR PD-L1 و miRNA-570 منجر به ایجاد سرطان معده با فنوتیپ تهاجمی شده است. تعامل بین miRNAs و 3'UTR PD-L1 وابسته به تغییرات ساختاری 3'UTR PD-L1 است و این نوع جهش یکی از مکانیسم‌هایی است که سلول‌های توموری توسط آن می‌توانند از نظارت ایمنی جلوگیری کنند (۱۷). miRNA-145 بر روی کروموزوم شماره ۵، که یک ناحیه شکننده در ژنوم است، واقع شده است. این microRNA برای اولین بار در موش و پس از مدت کوتاهی در انسان شناسایی شد. با این حال، miRNA-145 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اساسی و مهم در بیان ژن

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

مطرح است (۱۸). S.Y. Cui و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که miRNA-145 می‌تواند در مجموعه‌ای از عملکردهای تومورزا شامل تنظیم تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز، تهاجم و متاستاز شرکت کند. همچنین در سرطان‌هایی از جمله پستان، کولون، کبد، پروستات و تخمدان کاهش miRNA-145 گزارش شده است (۱۹). Yanling Ding و همکارانش در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که سطوح بیان miRNA-145 در بافت سرطان پستان در مقایسه با بافت طبیعی مجاور کاهش یافته است. آن‌ها دریافتند که تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی پستان پس از بیان بیش از حد miRNA-145 کاهش یافته و پس از سرکوب miRNA-145 افزایش یافته است (۲۰).

در این مطالعه هدف ما، با توجه به نقش احتمالی سرکوب‌کنندگی تومور miRNA-145 در سرطان پستان، از طریق تجزیه و تحلیل ارتباط بین بیان miRNA-145 و PD-L1 در توسعه سرطان پستان، مشارکت miRNA-145 در مهار پیشرفت این بیماری پیش‌بینی شده است. ابتدا ما هدف‌گیری miRNA-145 را بر روی 3’UTR ژن PD-L1 با روش لوسیفراز دوگانه تأیید کردیم. نتایج ما نشان داد که بیان miRNA-145 در رده های سلولی سرطان پستان در مقایسه با سلول‌های بافت غیرسرطانی پستان به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. علاوه بر این، بیان PD-L1، به طور قابل توجهی در رده‌های سلولی سرطان پستان افزایش یافته و پس از افزایش بیان miRNA-145 در رده‌های سلولی سرطان پستان، کاهش بیان PD-L1 را نشان دادیم.

هدف اصلی این پژوهش کاهش میزان بیان ژن PD-L1 (با توجه به نقش انکوژنی PD-L1 در پیشرفت تومورزایی سرطان پستان و نیز نقش آن در فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی) از طریق افزایش بیان miRNA-145 به‌عنوان سرکوبگر تومور در سه رده سلولی سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها

پیش‌بینی بیوانفورماتیک

ما الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی از جمله miRanda، PicTar و TargetScan 4.0 را برای شناسایی ژن‌های بالقوه هدف miRNA-145 ادغام کرده‌ایم. طبق تجزیه و تحلیل پیش‌بینی شده، در 3’UTR ژن PD-L1 یک محل اتصال احتمالی miRNA-145 در نظر گرفته شده است. برای تأیید تعامل هدف miRNA-145، 3’UTR ژن PD-L1 را در ژن Renilla luciferase در وکتور psiCHECKTM-2 کلون کردیم. این پلاسمید همزمان با miRNA-145 یا miRNA scrambled (بهم ریخته) با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومولار در سلول‌های MDA-MB231، BT549 و MCF7 ترانسفکت شد.

کشت سلولی

برای انجام این مطالعه از سه رده سلولی سرطان پستان شامل MDA-MB231, BT549 و MCF7 به‌عنوان رده‌هایی با افزایش بیان PD-L1 و رده سلولی MCF10a به‌عنوان کنترل استفاده شد. ابتدا سلول‌های سرطانی پستان رده‌های MDA-MB231, BT549 و MCF7 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (Iranian Biological Resources center, IBRC, Tehran, Iran) و رده سلولی غیرسرطانی پستان MCF10a از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و آن‌ها را در محیط کشت DMEM/F12 (Gibco,USA) غنی شده با ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco,USA) و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین استریل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب حاوی CO_2 ۵٪ در فلاسک‌های 25 ml کشت داده شدند.

نکات اخلاقی کار با رده سلول سرطانی

این پروژه تحت نظارت کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران انجام شده است و همه مراحل اخلاقی در آن رعایت شده است. نکات اخلاقی مربوط به رده سلول‌های انسانی توسط مرکز بانک سلولی انستیتو پاستور از جمله وجود فرم

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

رضایت آگاهانه از فرد بیمار جهت گرفتن نمونه سلولی اولیه، نکات اخلاقی در رابطه با هرگونه دستوری ژنتیکی و تزریق سلول‌ها به حیوان و... کاملا رعایت شده است

ترانسفکت microRNA

miRNA Scrambled (بهم ریخته)، به‌عنوان کنترل، از Ambion (Life Life, AM17102) خریداری شده است. سلول‌ها یک روز قبل از ترانسفکت کشت داده شدند. طبق پروتکل کیت، در یک میکروتیوب استریل وکتور حاوی ژنmimic miRNA-145 (غلظت DNA وکتور حاوی این ژن توسط دستگاه NanoDrop (ThermoScientific, 2000c, USA) اندازه‌گیری گردید)، محلول Hyperfect Transfection Reagent (Qiagen, Germany) اضافه شد و در یک میکروتیوب دیگر scrambled miRNA با غلظت نهایی 100nM به Attraccent Transfection Reagent، به صورت جداگانه، اضافه و سپس به سلول‌ها ترانسفکت شدند. غلظت نهایی miRNA۱۰۰ نانومولار بود. پس از ۶ ساعت، محیط انتقال با یک محیط تازه حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. رده‌های سلولی ترانسفکت شده ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انتقال microRNA جهت بررسی تاثیر بر میزان بیان PD-L1 برداشت شدند.

آزمون سنجش دوگانه لوسیفراز

از روش سنجش دوگانه لوسیفراز برای تأیید تعامل مستقیم بین miRNA-145 و 3'UTR ژن هدف استفاده شد. در انجام این آزمایش، برای تکثیر 3'UTR ژن PD-L1 از پرایمرهای اختصاصی PD-L1 (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های BT549، MDA-MB231 و MCF7، به‌طور جداگانه با وکتور حاوی 3'UTR ژن PD-L1 به میزان یک میگروگرم و miRNA-145(mimic) or scrambled با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومولار به صورت همزمان ترنسفکت شدند. طبق دستورالعمل کیت لوسیفراز (Promega, USA)، فعالیت لوسیفراز ۴۸ ساعت پس از انتقال، میزان نور منتشره توسط دستگاه POLARstar Omega (BMG LABTECH, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real time qRT- PCR

به منظور تغییر بیان ژن PD-L1 توسط ورود miRNA-145 به سلول‌ها، Total RNA از سلول‌ها استخراج شد (توسط کیت استخراج RNA, Germany, Qiagen). غلظت RNA توسط دستگاه NanoDROP اندازه‌گیری شد و با تعیین نسبت جذب در 260 و A280 کیفیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت. سنتز cDNA برای miRNA-145 و U47 (RNA کوچک هسته‌ای) به عنوان کنترل داخلی توسط پرایمرهای stem loop (جدول ۱) انجام شد (توسط کیت Takara, japan). Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان miRNA-145 به وسیله دستگاه Step one plus و master mix biofact و پرایمرهای اختصاصی miRNA-145 و U47 (جدول ۱) انجام شد. همچنین برای بررسی میزان بیان PD-L1 در سلول‌های رده سرطانی و غیرسرطانی پستان نیز از پرایمرهای اختصاصی PD-L1 (جدول ۱) و نیز برای نرمالیزه کردن بیان، از ژن خانه‌دار GAPDH (House Keeping Gene) استفاده شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی بود و میانگین آن‌ها ارائه شد. در پایان تغییر و میزان بیان ژن‌ها از متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد و میزان Fold change گزارش گردید.

آنالیز آماری

از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS V.22 Inc., Chicago, IL) جهت بررسی آماری داده‌ها استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در رده سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی پستان از آزمون آماری t استفاده شد. ارتباط بین میزان بیان PD-L1 و miR-145 با روش ANOVA سنجیده شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار GraphPad prism V.8 استفاده شد.

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده شده جهت انجام PCR و Real Time

Gene	Sequence of Oligonucelotides from 5’ to 3’ for PCR Analysis	Product
PD-L1	Forward: CCGCTCGAGCAGATACACATTTGGAGGAGA Reverse: ATAAGAATGCGGCCGCTGTGCAGGATTCAAAAGCAT	2800 bp
Gene	**Sequence of Oligonucelotides from 5’ to 3’ for Real Time-PCR Analysis**	**Product**
PD-L1	Forward: GTGATCCGCTGCATGATCAG Reverse: GGTAGCCCTCAGCCTGACATG	151 bp
GAPDH	Forward: GAAAGCCTGCCGGTGACTAA Reverse: GCGCCCAATACGACCAAATC	152 bp
miR-145-5p	Forward: GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCC Reverse: AGACTGCACCTGTCCGG	180 bp
Stem loop miR-145-5P	CAATTAGACTACACCTGTCCGGTCCCTGCGTCCTGTAGTCTAATTGAGGGAT	64 bp

یافته‌ها

نتایج حاصل از کلون کردن قطعه 3’UTR ژن PD-L1 در وکتور psi-check2 و توالی‌یابی

توالی محدود به آنزیم‌های محدودکننده Not1/Xho1 در انتهای ’5 پرایمرهای forward و reverse قرار داده شدند. پرایمرها از لحاظ اتصال به نقاط دیگر ژنومیک، در NCBI Blast مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پرایمرها دارای اتصال اختصاصی به توالی مورد نظر هستند. پس از انجام PCR با آنزیم Pfu polymerase (این آنزیم دارای خاصیت باز آرایی یا اگزونوکلئازی از انتهای '۵→'۳ است و قطعه تولید شده توسط این آنزیم دارای خطای همانند سازی کمتری می‌باشد و محصول مناسب‌تری نسبت به آنزیم Taq برای کلون نمودن در وکتور PSICHEK2 تولید می‌کند)، فرآورده بر روی ژل الکتروفورز ران و تائید شد.

پیش‌بینی miRNA-145 به‌عنوان miRNA هدف گیرنده 3’UTR ژن PD-L1 توسط پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیک

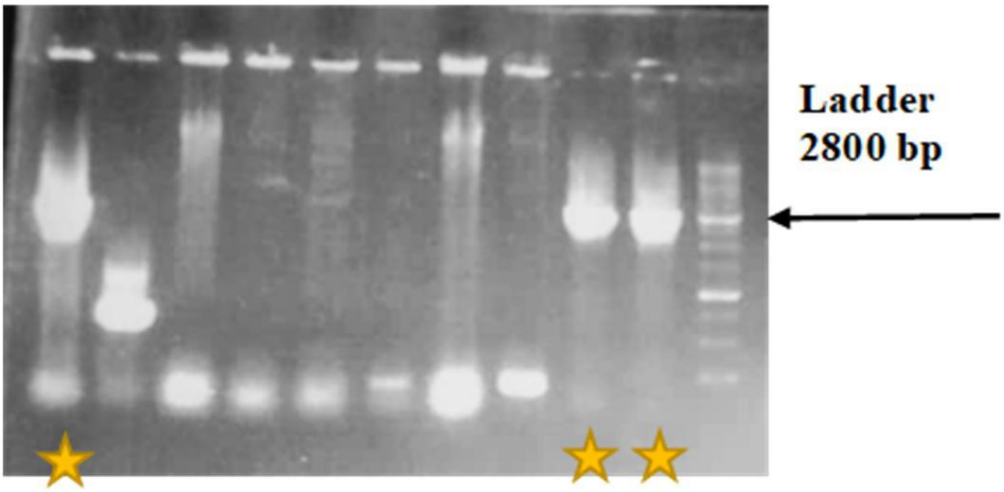
در این مطالعه با استفاده از پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیک پیش‌بینی شده است که احتمالا ژن PD-L1 با miRNA-145 کنترل شود. در شکل شماره A^2، نحوه اتصال 3’UTR در ژن PD-L1 و miRNA-145 و همچنین محل اتصال آن‌ها به صورت گرافیک نمایش داده شده است. لازم به ذکر است که این اطلاعات از پایگاه داده Target scan استخراج گردید. همان‌طور که در شکل B^2 نشان داده شده است، miRNA-145 در مقایسه با الیگونوکلئوتید بهم ریخته، فعالیت لوسیفراز را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. انتقال miRNA-145 به MDA-MB231، BT549 و MCF7، فعالیت لوسیفراز را به‌ترتیب به ۰/۶۱± ۴۳/۵٪، ۰/۴۲± ۴۵/۴٪ و ۰/۴۱± ۴۶/۵٪ درصد کاهش داد.

معرفی miRNA-145 به‌عنوان miRNA سرکوبگر بیان انکوژن PD-L1 در سلول‌های رده سرطان پستان

برای تأیید این فرضیه که بیان بیش از حد miRNA-145 بیان mRNA PD-L1 را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش می‌دهد، miRNA-145 یا اولیگونوکلئوتید بهم ریخته به رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549 و MCF7 ترانسفکت شد. قبل از ترانسفکت، میزان بیان PD-L1 (شکل A^3) بررسی و نیز جهت تایید طول قطعه تکثیر یافته، محصول نهایی Real Time PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ آشکار گردید. همچنین میزان بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان در مقایسه با رده سلولی غیرسرطانی پستان به صورت معناداری کاهش یافته بود، $P < 0.01^{**}$ (شکل B^3).

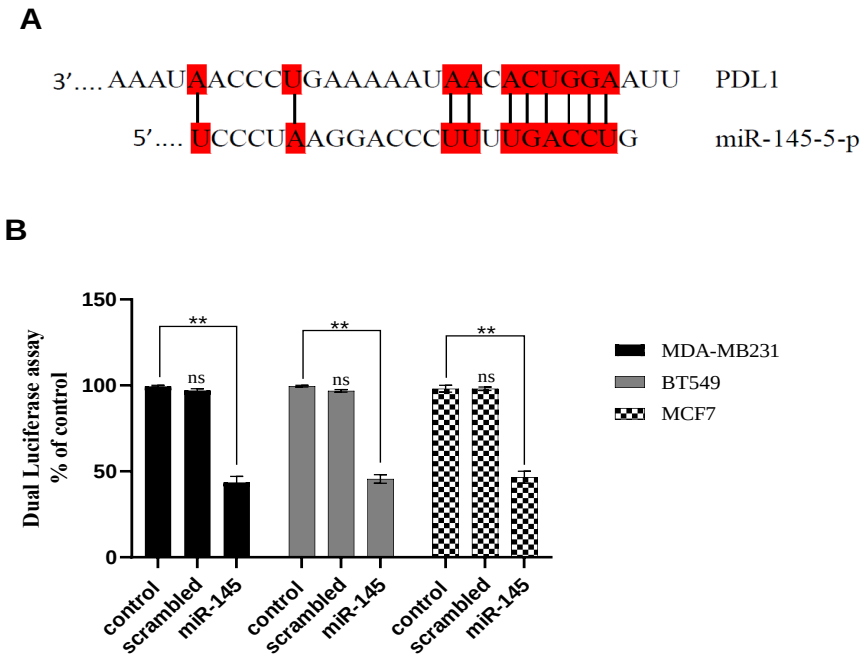
[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

بین کاهش بیان miRNA-145 و افزایش بیان PD-L1 در سلول‌های سرطان پستان رابطه مستقیم وجود دارد (شکل C^3). پس از آن، سطوح mRNA PD-L1 با روش qRT- PCR اندازه‌گیری شد. بیان افزایش یافته miRNA-145 سطح mRNA PD-L1 را در MDA-MB231 به 0.537 ± 59%، BT549 به 0.541 ± 25.9% و در MCF7 به 0.547 ± 9.3%، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن به‌صورت معنی‌دار کاهش داد (شکل D^3). لازم به ذکر است که نتایج ترنسفکشن پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت معنی‌دار نبود.



شکل۱: آشکارسازی فرآورده PCR 3'UTR ژن PD-L1 روی ژل.

ردیف۱: Ladder (1kb)، ردیف ۲،۳ و ۴: کلونی‌های مثبت حاوی قطعه 3'UTR (2800bp) مربوط به ژن PD-L1 در داخل وکتور psi-check2 که در باکتری Top 10 F' رشد کرده‌اند

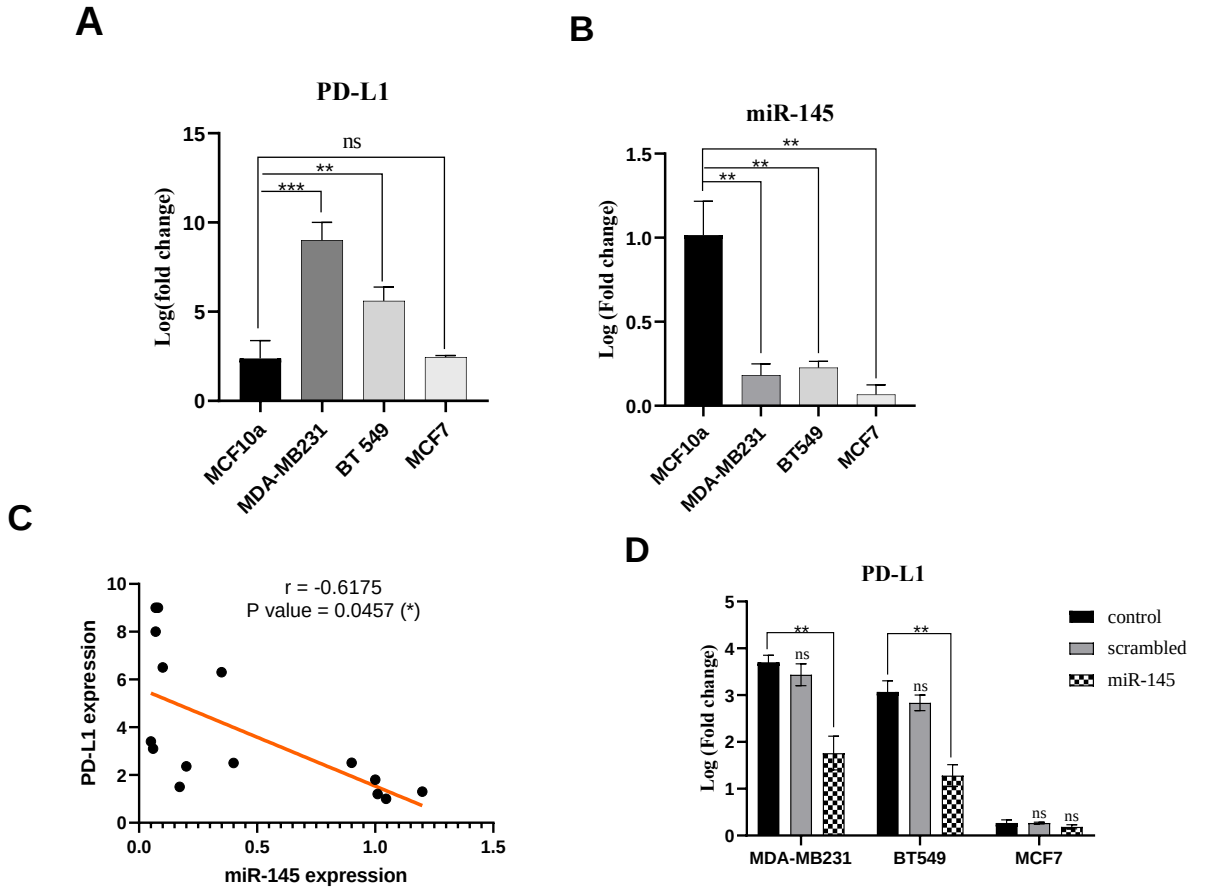


شکل۲: هدف گیری PD-L1 توسط miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان.

A miRNA-145 دارای نقاط اتصال در 3'UTR PD-L1 انسان است. **B** سنجش دوگانه لوسیفراز انجام در سلول‌های رده سرطان پستان با miRNA-145 انجام و کاهش فعالیت نسبی لوسیفراز Renilla مشاهده شد، در حالی که هیچ اثری با miRNA به هم ریخته تشخیص داده نشد.

**p < .01; ns = nonsignificant

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]



شکل ۳: بیان PD-L1 و miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان.

A بررسی بیان PD-L1 در سلول‌های رده سرطان پستان در مقایسه با سلول رده‌ی غیر سرطانی پستان با استفاده از روش qRT-PCR. **B** بررسی بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان در مقایسه با سلول رده غیرسرطانی پستان با استفاده از روش qRT-PCR. **C** ارتباط معنی‌دار بین افزایش بیان PD-L1 با کاهش بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان. **D** افزایش بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان به طور معناداری منجر به کاهش بیان PD-L1 شده است. ***p<.001, **p<.01, *p<.1**

بحث

سرطان‌زایی پستان، فرآیندی است که شامل اختلال در تنظیم ژن‌های سرکوب کننده تومور و آنکوژن‌ها است (۲۱). مسیر PD-1/PD-L1 به عنوان یک سرکوب کننده سیستم ایمنی مهم است و در طیف وسیعی از سرطان‌های انسان از جمله سرطان پستان تنظیم می‌شود و در ایجاد تومور با سرکوب سیستم ایمنی ضد تومور نقش دارد (۲۲، ۲۳). Ghebeh و همکاران (۲۴) از روش ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص بیان پروتئین‌های PD-L1 در ۴۴ مورد از بافت‌های سرطان سینه استفاده کردند و مشخص شد که ۳۴٪ از سلول‌های اپیتلیوم تومور و ۴۱٪ از لنفوسیت‌های نفوذکننده تومور مثبت بودند. در نتیجه انسداد این مسیر، آن را به یک هدف درمانی ارزشمند برای انواع سرطان‌های انسانی، از جمله سرطان پستان تبدیل می‌کند.

ارتباط بین کاهش میزان آپاپتوز و تکثیر سلول T و فرار ایمنی سلول‌های توموری، با افزایش بیان پروتئین‌های PD-L1 بر روی سلول‌های سرطانی، منجر به درک کنترل بیان PD-L1 با استفاده از سلول‌های سرطانی می‌شود. علاوه بر این، پیشرفت‌های قابل توجهی در درمان سرطان با استفاده از آنتی‌بادی‌های هدف PD-1/PD-L1، مانند Pembrolizumab، که مورد

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

تائید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) است، در آزمایشات بالینی اولیه انجام شده است(۲۵) با این حال، برای اکثر بیمارانی که از این شیوه درمانی استفاده می‌کنند، این مهارکننده‌ها بیشتر در ترکیب با سایر درمان‌ها از جمله شیمی‌درمانی تجویز می‌شوند (۲۶). با این وجود، مطالعات زیادی نشان داده است که بسیاری از عوامل شیمی‌درمانی رایج، از جمله Fluorouracil-5 و Paclitaxel، منجر به افزایش بیان PD-L1 می‌شوند. این پدیده، به نوبه خود، واکنش سلول‌های T ضد تومور با واسطه سلول را کاهش داده و منجر به افزایش فرار سیستم ایمنی می‌شود (۲۷). بنابراین، شناسایی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در تنظیم مسیر PD-1/PD-L1 از طریق تومورزایی پستان، می‌تواند به بهبود استراتژی‌های جدید با هدف پاسخ ایمنی ضدتومورال در مقابل سرطان پستان کمک کند.

در سرطان پستان، با توجه به تشخیص و نظارت بر پاسخ بیمار نسبت به درمان، که این امر نیازمند وجود بیومارکرهای تشخیصی مناسب است، می‌توان به طور موثر مدیریت داشت. در این راستا، miRNAها به‌عنوان بیومارکر و نیز یک عامل درونی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۸). در سال‌های اخیر، پژوهش‌های صورت گرفته در رابطه با ارتباط miRNA- سرطان، منجر به کشف پتانسیل درمانی miRANها گردید. بر این اساس می‌توان ادعا نمود که miRANها به عنوان اهداف فارماکولوژیک، نسبت به درمان‌های حال حاضر، اثراتی موثرتر دارند (۲۹). miRNAهای سرکوب‌گر تومور در سرطان پستان همانند سایر سرطان‌ها شامل miRNAهایی هستند که میزان بیان آن‌ها رابطه‌ای معکوس با سرعت و پیشرفت سرطان دارند (۳۰، ۳۱). دستیابی به روش‌های کارآمد برای افزایش بیان این نوع از miRNAهای سرکوب‌گر تومور برای درمان و کنترل سرطان و یا عوارض ناشی از این بیماری، مورد توجه است. یکی از miRNAهای سرکوب‌گر تومور که در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان، پستان، ریه و کولون کاهش بیان داشته است، miRNA-145 است (۱۹). کاهش بیان این miRNA در سرطان ریه منجر به افزایش تکثیر و متاستاز و از طرف دیگر کاهش میزان آپاپتوز شده است. Iio A و همکارانش در سال ۲۰۱۰ این فرضیه را که می‌توان از این miRNA به‌عنوان یک هدف درمانی در سرطان ریه استفاده کرد، مطرح نمودند. در این‌جا روش جدیدی به نام miRNA Replacement therapy مطرح می‌شود که در این روش توسط وکتور حاوی ژن miRNA مورد نظر به سلول سرطانی ترانسفکت می‌شود. بدین ترتیب می‌توان بیان miRNA مورد نظر را در سلول سرطانی به سطح طبیعی بازگرداند و در نهایت miRNA می‌تواند بیان ژن‌های هدف خود را تنظیم کند. طبیعی بودن تومورساپرسورها، پایداری و مقاومت آن‌ها در بافت‌های سالم بدن، کنترل چندین مسیر ایجاد سرطان و تعداد زیادی انکوژن از جمله مزایای این روش است، علاوه بر این، به علت وجود تعداد فراوان این مولکول‌ها در سلول‌های سالم بدن، عوارض جانبی کاهش یافته و از طرفی باعث افزایش حساسیت سلول‌های توموری می‌گردد (۳۲،۳۳).

در راستای تحقیقات ما، Xinsheng Peng و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با مطالعه بر روی نمونه‌های سرطان پروستات، بیان کردند که ارتباط معناداری میان کاهش میزان بیان miRNA-145 و افزایش متاستاز به استخوان در نمونه‌های بیماران مورد مطالعه وجود دارد. این گروه کاهش میزان متاستاز را در سلول‌های رده سرطان پروستات پس از ترانسفکت miRNA-145 به سلول‌ها را گزارش کردند (۳۴). همچنین Yan و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به مطالعه بر روی اثر miRNA-145 بر روی رسپتور erbb3 در سلول‌های سرطان پستان در شرایط *in-vivo* و *in-vitro* پرداختند و در نهایت کاهش میزان تکثیر و تهاجم را در بافت سرطان پستان گزارش کردند (۳۵). علاوه بر این، Jiajia Hu و همکارانش در سال ۲۰۱۲ (۳۶) و Yan Quan و همکارانش در سال ۲۰۱۸ (۳۷) کاهش بیان miRNA-

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

145 را در بافت سرطانی پستان و نیز در سلول‌های رده سرطان پستان گزارش کردند. در مطالعه حاضر، با استفاده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، ما منطقه 3'UTR ژن PD-L1 را به عنوان یک هدف بالقوه برای miRNA-145 شناسایی کردیم، که نقش احتمالی آن را در فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی نشان می‌دهد. متعاقباً، نشان دادیم که تنظیم نادرست miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان با افزایش بیان PD-L1 ارتباط مستقیم دارد (P-value = ۰/۰۴۵۷, r = -۰/۶۱۷۵). که نشان می‌دهد miRNA-145 ممکن است در تنظیمات پس از رونویسی بیان PD-L1 نقش داشته باشد. در این مطالعه سنجش لوسیفراز دوگانه تأیید کرد که miRNA-145 می‌تواند مناطق خاصی از PD-L1 - 3′UTR را هدف قرار دهد و بیان آن را به طور قابل توجهی کاهش دهد (P<0.01). همچنین، نتایج به‌دست آمده از qRT-PCR وکاهش معنادار بیان PD-L1 پس از ترانسفکت miRNA-145 در رده سلول‌های متاستاتیک سرطان پستان (MDA-MB231,BT549) به میزان ۰/۲۱۲± ۱/۹۳۸و ۰/۰۳± ۱/۷۸۴ (به‌ترتیب) در مقایسه با سلول رده غیرمتاستاتیک MCF7 (۰/۰۲±۰/۰۸۳) سرطان پستان، نشان‌دهنده این است که کاهش قابل توجه miR-145 در افزایش میزان PD-L1 و در نهایت متاستاز سرطان پستان دخیل می‌باشد. از طرفی کاهش میزان PD-L1 پس از ترانسفکت miR-145، صحیح بودن ترانسفکت و داشتن عملکرد قابل قبول جهت افزایش بیان ژن تومورساپرسور miRNA-145 می‌باشد. بر اساس این مطالعه افزایش بیان miRNA-145 در سلول‌های رده سرطان پستان، بیان PD-L1 در سطح mRNA را به میزان قابل توجهی کاهش داده است، که می‌تواند عملکرد miRNA-145 را در بیان ژن PD-L1 در سرطان پستان تعدیل کند. در حال حاضر هدف‌گیری PD-L1 با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یک راهکار درمانی تایید شده برای سرطان است. اما از آنجایی که استفاده از آنتی‌بادی اثر مهاری بر میزان بیان PD-L1 ندارد این امکان وجود دارد که با مصرف مداوم آنتی‌بادی پس از مدتی مقاومت دارویی صورت بگیرد. در این صورت یک راهکار مناسب ممکن است استفاده از عواملی باشد که در سطح بیان ژن، میزان PD-L1 را مهار می‌کنند که از این نظر استفاده از miRNA می‌تواند یک راهکار درمانی مناسب باشد. برای بررسی miRNAهای کاندید جهت اهداف درمانی در ارتباط با PD-L1 و آشکارسازی مکانیسم‌های اساسی تنظیم شده توسط این miRNAها، و همچنین برای اطمینان از نقش عملکردی آن‌ها در سرکوب پیشرفت تومور در سرطان پستان، مطالعات بیشتری لازم است. با این کار، استراتژی‌های درمانی مبتنی بر miRNA می‌تواند با درمان‌های متداول، مانند شیمی‌درمانی، درمان غدد درون‌ریز یا درمان هدفمند، با هدف افزایش یا هم‌افزایی اثرات ضد سرطانی با کاهش سمیت و بهبود میزان بقای کلی بیماران مبتلا به سرطان پستان ترکیب شود. همچنین PD-L1 می‌تواند به‌عنوان یک هدف دارویی جدید در انواعی از سرطان پستان که مقاوم به درمان هستند، باشد و از طریق هدف قرار دادن این تارگت، سیستم ایمنی با شدت و قدرت بیشتری از تکثیر بی‌رویه و تهاجم سلول‌های سرطانی ممانعت می‌کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما نشان می‌دهد که میزان بیان miRNA-145 در رده‌های سلولی سرطان پستان شامل MDA-MB231, BT549 در مقایسه با رده سلولی کنترل (MCF10) کاهش یافته است و میزان بیان ژن PD-L1 افزایش بیان یافته است. همچنین سیستم لوسیفرازی نشان داد که mRNA ژن PD-L1 هدف مستقیم miRNA-145 است. از طرفی افزایش بیان miRNA-145 در رده‌های سلولی سرطان پستان منجر به کاهش بیان ژن PD-L می‌گردد. کاهش میزان بیان PD-L1 با استفاده از miRNAهای هدف گیرنده ممکن است بتواند به عنوان یک هدف درمانی و عاملی برای جلوگیری از

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

پیشرفت سرطان پستان باشد. از طرفی با بیان مجدد miRNAهایی که نقش سرکوبگر تومور دارند در سلول‌های سرطانی می‌توان بیان بیش از حد انکوژن‌ها را کنترل کرده و سلول‌های سرطانی را به سمت مرگ و یا پیری سوق داد. البته جهت کاربرد miRNA به‌عنوان عامل درمانی نیاز به تحقیقات بیشتر از جمله آزمایشات in vivo و بررسی‌های high throughput است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[Downloaded from ijbdcom 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]

References

1. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, You J, Hu XQ. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. Oncology reports. 2009 Mar 1;21(3):673-9.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal AJCacjfc. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2018;68(6):394-424.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
4. Yang YJTJoci. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. 2015;125(9):3335-7.
5. Horita H, Law A, Hong S, Middleton KJN. Identifying regulatory posttranslational modifications of PD-L1: a focus on monoubiquitinaton. 2017;19(4):346-53.
6. Xie Q-K, Zhao Y-J, Pan T, Lyu N, Mu L-W, Li S-L, et al. Programmed death ligand 1 as an indicator of pre-existing adaptive immune responses in human hepatocellular carcinoma. 2016;5(7):e1181252.
7. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. 2005;25(21):9543-53.
8. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. 2015;6(7):5449.
9. Emens LA, Braiteh FS, Cassier P, Delord J-P, Eder JP, Fasso M, et al. Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). AACR; 2015.
10. Muenst S, Soysal S, Gao F, Obermann E, Oertli D, Gillanders WJBcr, et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. 2013;139(3):667-76.
11. Gu X, Wang Y, Xiang J, Chen Z, Wang L, Lu L, Qian S. Interferon-γ triggers hepatic stellate cell-mediated immune regulation through MEK/ERK signaling pathway. Clinical and Developmental Immunology. 2013;2013.
12. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczkowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. 2007;110(1):296-304.
13. Collins F, Lander E, Rogers J, Waterston R, Conso IJN. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. 2004;431(7011):931-45.
14. Shenouda SK, Alahari SKJC, reviews m. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? 2009;28(3):369-78.
15. Giza DE, Vasilescu C, Calin GAJEoobt. MicroRNAs and ceRNAs: therapeutic implications of RNA networks. 2014;14(9):1285-93.
16. Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y, et al. The roles of microRNAs in regulating the expression of PD-1/PD-L1 immune checkpoint. 2017;18(12):2540.
17. Wang W, Sun J, Li F, Li R, Gu Y, Liu C, et al. A frequent somatic mutation in CD274 3′-UTR leads to protein over-expression in

gastric cancer by disrupting miR-570 binding. 2012;33(3):480-4.

18. Le Beau MM, Lemons RS, Espinosa R3, Larson RA, Arai N, Rowley JD. Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del (5q). 1989;73(3):647-50.
19. Cui SY, Wang R, Chen LBJJoc, medicine m. Micro RNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. 2014;18(10):1913-26.
20. Ding Y, Zhang C, Zhang J, Zhang N, Li T, Fang J, et al. miR-145 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by directly or indirectly regulating TGF-β1 expression. 2017;50(5):1701-10.
21. Osborne C, Wilson P, Tripathy DJTo. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. 2004;9(4):361-77.
22. Han Y, Liu D, Li LJAjocr. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. 2020;10(3):727.
23. Payandeh Z, Khalili S, Somi MH, Mard-Soltani M, Baghbanzadeh A, Hajiasgharzadeh K, et al. PD-1/PD-L1-dependent immune response in colorectal cancer. 2020;235(7-8):5461-75.
24. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattant A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. 2006;8(3):190-8.
25. Xu S, Tao Z, Hai B, Liang H, Shi Y, Wang T, et al. miR-424 (322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint. 2016;7(1):1-13.
26. Van Der Kraak L, Goel G, Ramanan K, Kaltenmeier C, Zhang L, Normolle DP, et al. 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. 2016;4(1):1-8.
27. Goel G, Ramanan K, Kaltenmeier C, Zhang L, Freeman GJ, Normolle DP, Tang D, Lotze MT. Effect of 5-fluorouracil on membranous PD-L1 expression in colon cancer cells. 2016;34(4):592.
28. Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, Kassem M, Zaher W, Alfayez M, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. 2017;8(9):e3045-e.
29. Cheng Y, Shen PJFio. miR-335 acts as a tumor suppressor and enhances ionizing radiation-induced tumor regression by targeting ROCK1. 2020;10:278.
30. Ardekani AM, Naeini MMJAjomb. The role of microRNAs in human diseases. 2010;2(4):161.
31. MacFarlane L-A, R Murphy PJCg. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. 2010;11(7):537-61.
32. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao YJMc. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. 2010;9(1):1-7.
33. Wang C-J, Zhou Z-G, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and-145 expression in colorectal cancer. 2009;26(1):27-34.
34. Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu Xa, Xiong D, et al. Identification of miRs-143 and-145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. 2011;6(5):e20341.
35. Yan X, Chen X, Liang H, Deng T, Chen W, Zhang S, et al. miR-143 and miR-145 synergistically regulate ERBB3 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. 2014;13(1):1-14.
36. Hu J, Guo H, Li H, Liu Y, Liu J, Chen L, Zhang J, Zhang N. MiR-145 regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by targeting Oct4. 2012;7(9):e45965.
37. Quan Y, Huang X, Quan XJOl. Expression of miRNA-206 and miRNA-145 in breast cancer and correlation with prognosis. 2018;16(5):6638-42.

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.4.5.8]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.4.45]