

بررسی اثر مهارى miRNA-145 بر میزان بیان PD-L1 در

سلول‌های سرطانی پستان

سارا حاجی بابایی^۱، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی^۱، ناهید نفیسی^۲، سیروس زینلی^۳، معصومه عزیز^{۳*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، 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

چکیده

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۹

* نویسنده مسئول:

mazizi528@gmail.com

مقدمه: PD-L1 (Programmed cell death ligand 1) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مولکول‌های کنترل‌کننده 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 لوسیفرز 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 لوسیفرز دوگانه، منطقه 3'UTR 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 (به ترتیب ۰/۲۱۲±۰/۹۸۳، ۰/۰۳±۰/۷۸۴ و 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

مقدمه

موتاسیون‌های متعدد درون ژنوم سلول‌های بافت‌های سرطانی یافت می‌شوند، در نتیجه سرطان‌ها جزو بیماری‌های ژنتیکی محسوب می‌شوند. از طرف دیگر تنها در درصد کمی از خانواده‌ها سرطان از یک نسل به نسل دیگر به صورت جهش تک ژنی منتقل می‌شود، بیشتر سرطان‌ها تحت تاثیر محیط هستند (۱). بر اساس گزارش GLOBOCAN، سرطان پستان در رتبه دوم سرطانی‌های 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 می‌شود (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 می‌شود. 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 (LAG-3/PD-1/PD-L1)، لنفوسیت فعال کننده ژن ۳ (TIM-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 ایمونوگلوبولین 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 برنامه‌ریزی شده 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 لنفوسیت‌های T ایفا می‌کند. PD-1 پروتئینی است که لیگاند PD-L1 می‌باشد. تعامل PD-L1 با 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، PD-L1 mRNA در بافت‌های مختلف بیان می‌شود، اما پروتئین PD-L1 تنها در چند بافت مانند لوزه‌ها و کسر کوچکی از سلول‌های ماکروفاژها در ریه، کبد و جفت یافت می‌شود که این نشان‌دهنده تنظیمات پس از رونویسی در PD-L1 mRNA 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

تومور، بالا بودن درجه سرطان، تکثیر زیاد سلول سرطانی، وضعیت منفی گیرنده استروژن و وضعیت HER2 مثبت رابطه مستقیم (۸) و با میزان بقا در سرطان 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 ($\text{IFN-}\gamma$) 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-L1 ایجاد کند. برخی از microRNAها به طور مستقیم 3'UTR را در PD-L1 mRNA هدف قرار می‌دهند و برخی دیگر به طور غیرمستقیم توسط سیگنال مولکول‌هایی مانند PTEN، $\text{IFN-}\gamma$ و IFR-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 بین 3'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

تومور، بالا بودن درجه سرطان، تکثیر زیاد سلول سرطانی، وضعیت منفی گیرنده استروژن و وضعیت HER2 مثبت رابطه مستقیم (۸) و با میزان بقا در سرطان 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 ($\text{IFN-}\gamma$) 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

مواد و روش‌ها

پیش‌بینی بیوانفورماتیک

ما الگوریتم‌های بیوانفورماتیکى 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 (به هم 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 CO₂ 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

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 رده‌های 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.

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 (Qiagen, Germany, RNA). 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.

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

ترانسفکت microRNA

miRNA Scrambled (به هم 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 ژن miRNA-145 mimic (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 Attraccet Transfection Reagent، به صورت جداگانه، اضافه و سپس به سلول‌ها ترانسفکت شدند. غلظت نهایی miRNA ۱۰۰ 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 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، MCF7 و MDA-MB231، 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 ترانسفکت شدند. طبق دستورالعمل کیت لوسیفراز (Promega, USA)، فعالیت لوسیفراز ۴۸ ساعت پس از انتقال، میزان نور

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

Gene	Sequence of Oligonucleotides from 5' to 3' for PCR Analysis	Product
PD-L1	Forward: CCGCTCGAGCAGATACACATTTGGAGGAGA Reverse: ATAAGAATGCGGCCGCTGTGCAGGATTCAAAGCAT	2800 bp
Gene	Sequence of Oligonucleotides 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	CAATTAGACTACACCTGTCCGGTCCCTGCGTCTGTAGTCTAATTGAGGGAT	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 آرایي یا اگزونوکلئازی از انتهای 5' → 3' 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 تأیید 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 احتمالاً ژن PD-L1 با miRNA-145 کنترل شود. در شکل شماره A²، نحوه اتصال 3'UTR در ژن PD-L1 و miRNA-145 و همچنین محل اتصال آن‌ها به صورت گرافیک نمایش

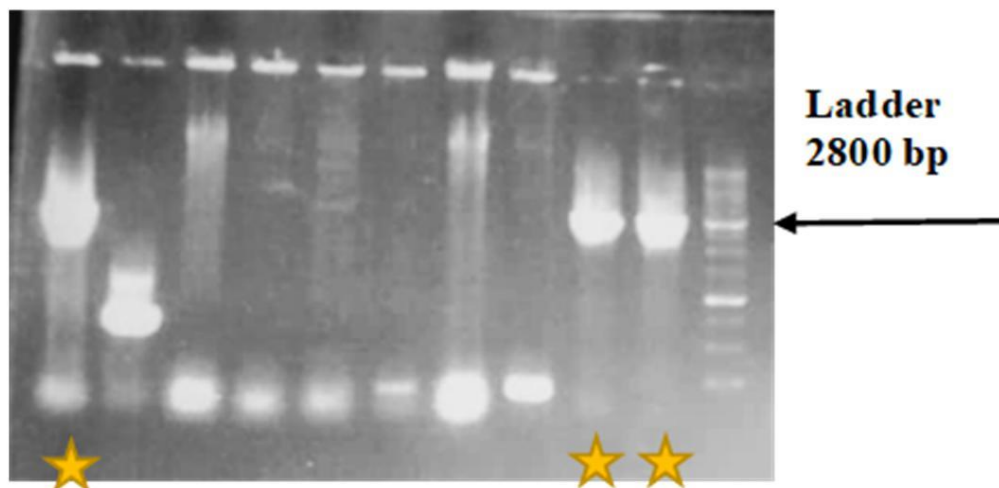
داده شده است. لازم به ذکر است که این اطلاعات از پایگاه داده Target scan استخراج گردید. همان‌طور که در شکل B² نشان داده شده است، miRNA-145 در مقایسه با الیگونوکلئوتید بهم ریخته، فعالیت لوسیفراز را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. انتقال miRNA-145 به MDA-MB231، BT549 و MCF7. فعالیت لوسیفراز را به ترتیب به 0/61 ± 0/43/5، 0/42 ± 0/45/4 و 0/41 ± 0/46/5 درصد کاهش داد.

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

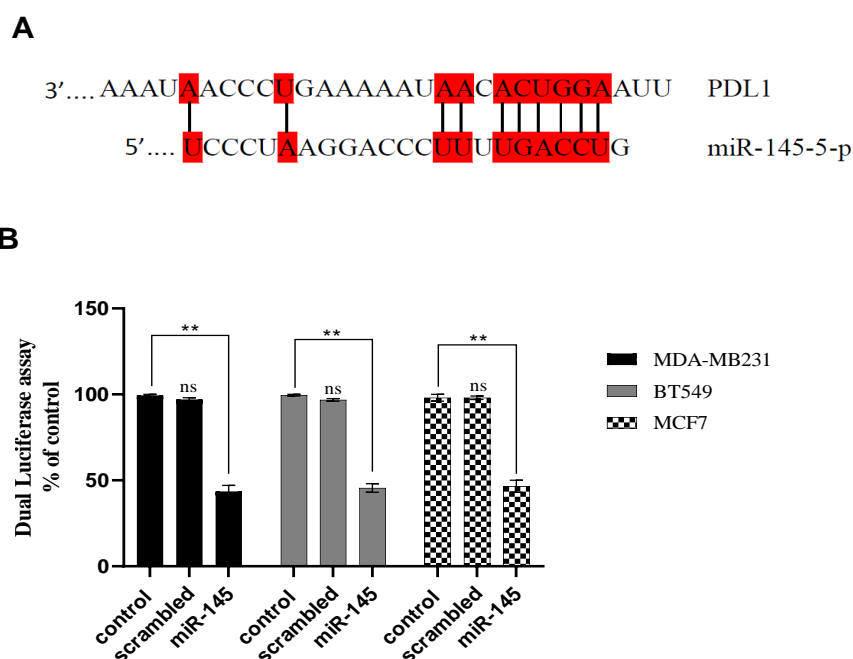
برای تأیید این فرضیه که بیان بیش از حد miRNA-145 بیان PD-L1 mRNA را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش می‌دهد، miRNA-145 یا اولیگونوکلئوتید بهم ریخته به رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549 و MCF7 ترانسفکت شد. قبل از ترانسفکت، میزان بیان PD-L1 (شکل A³) بررسی و نیز جهت تایید طول قطعه تکثیر یافته، محصول نهایی Real Time PCR بر روی ژل آگارز 2٪ 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 B³).

25.9% ± 0.541 و در MCF7 به 9.3% ± 0.547. در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن به صورت معنی‌دار کاهش داد (شکل ۳D). لازم به ذکر است که نتایج ترانسفکشن پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت معنی‌دار نبود.

بین کاهش بیان miRNA-145 و افزایش بیان PD-L1 در سلول‌های سرطان پستان رابطه مستقیم وجود دارد (شکل ۳C). پس از آن، سطوح PD-L1 mRNA با روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. بیان افزایش یافته miRNA-145 سطح PD-L1 mRNA را در MDA-MB231 به 59% ± 0.537 و BT549



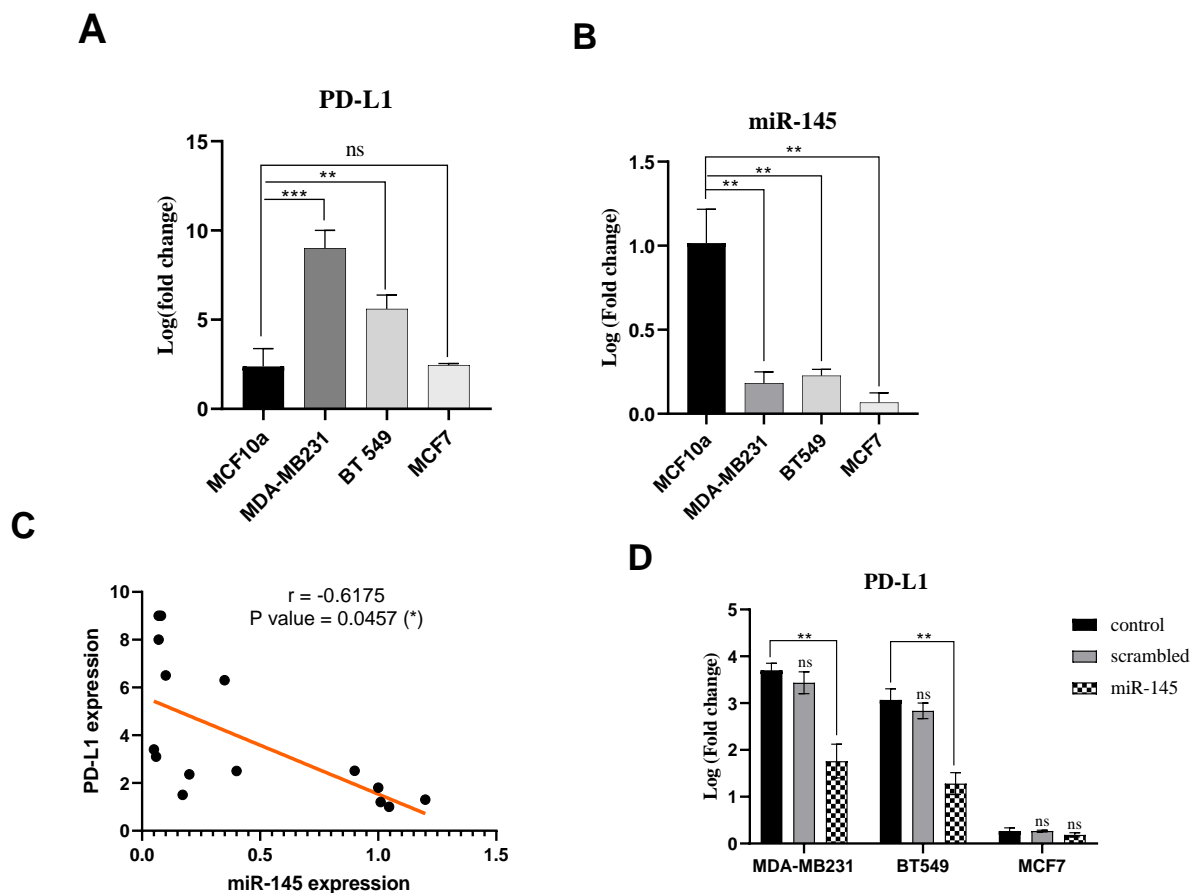
شکل ۱: آشکارسازی فرآورده PCR 3'UTR PD-L1 روی ژل. ردیف ۱: Ladder (1kb)، ردیف ۲، ۳ و ۴: کلونی‌های مثبت حاوی قطعه 3'UTR (2800bp) مربوط به ژن PD-L1 در داخل وکتور psi-check2 که در باکتری Top 10 F² رشد کرده‌اند



شکل ۲: هدف‌گیری 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 لوسیفرز انجام در سلول‌های رده سرطان پستان با miRNA-145 انجام و کاهش فعالیت نسبی لوسیفرز Renilla مشاهده شد، در حالی که هیچ اثری با miRNA به هم ریخته تشخیص داده نشد.

**p < .01; ns = nonsignificant



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 رده 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 به طور معناداری منجر به کاهش بیان PD-L1 شده است. $*p < .1$, $**p < .01$, $***p < .001$.

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 آپتوز 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

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٪

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 آپتوز 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 تومورسایرورها، 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-

تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) است، در آزمایشات بالینی اولیه انجام شده است (۲۵) با این حال، برای اکثر بیماری‌ها 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-L1/1 از طریق تومورزایی پستان، می‌تواند به بهبود استراتژی‌های جدید با هدف پاسخ ایمنی ضد تومورال 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 miRNAها گردید. بر این اساس می‌توان ادعا نمود که miRNAها 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

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 لوسیفراز 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-L1 می‌گردد. کاهش میزان بیان PD-L1 با استفاده از miRNAهای هدف گیرنده ممکن است بتواند به‌عنوان یک هدف درمانی و عاملی برای جلوگیری از

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 miRNA-145 را به‌عنوان یک هدف بالقوه برای PD-L1 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 ($r = -0.6175$, $P\text{-value} = 0.0457$). 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 به‌طور قابل توجهی کاهش دهد ($P < 0.01$). همچنین، نتایج به‌دست آمده از qRT-PCR و کاهش معنادار بیان PD-L1 پس از ترانسفکت miRNA-145 در رده سلول‌های متاستاتیک سرطان پستان (MDA-MB231, BT549) به میزان $1/784 \pm 0/03$ و $1/938 \pm 0/212$ (به ترتیب) در مقایسه با سلول رده غیرمتاستاتیک MCF7 ($0/083 \pm 0/02$) 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 تومورسپرسور 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 تأیید شده برای سرطان است. اما از آنجایی که استفاده از آنتی‌بادی اثر مهارى بر

عامل درمانی نیاز به تحقیقات بیشتر از جمله آزمایشات *in vivo* و بررسی‌های *high throughput* است.

تعارض منافع

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

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

References

- 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.
- 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.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Yang YJTJoci. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. 2015;125(9):3335-7.
- Horita H, Law A, Hong S, Middleton KJN. Identifying regulatory posttranslational modifications of PD-L1: a focus on monoubiquitination. 2017;19(4):346-53.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski 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.
- Collins F, Lander E, Rogers J, Waterston R, Conso IJN. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. 2004;431(7011):931-45.
- Shenouda SK, Alahari SKJC, reviews m. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? 2009;28(3):369-78.
- Giza DE, Vasilescu C, Calin GAJEoobt. MicroRNAs and ceRNAs: therapeutic implications of RNA networks. 2014;14(9):1285-93.
- 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.
- 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- β 1 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 XJOI. Expression of miRNA-206 and miRNA-145 in breast cancer and correlation with prognosis. 2018;16(5):6638-42.