



بررسی اثر مهاري miR-143-3P بر ميزان بيان ژن MUC1 در سلول‌های رده سرطان پستان در مقايسه با رده سلولي نرمال پستان

آتنا يوسفی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ناهید نفیسی: گروه جراحی سینه، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

فتاح ستوده نژاد نعمت الهی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سپروس زینلی: گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

معصومه عزیزی: گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) mazizi528@gmail.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

MUC1
miR-143-3p
سرطان پستان،
PD-L1

زمینه و هدف: هدف، بررسی اثر مهاري miR-143-3p بر بیان MUC1 به عنوان انکوژنی است که بیشترین تأثیر را بر بیان بیش از حد PD-L1 در رده‌های سلولي سرطان پستان دارد. در اینجا، ما نقش miR-143-3p را بر بیان سلولي MUC1 و PD-L1 در رده های سلولي سرطان پستان (BC) ارزیابی کردیم. با توجه به نقش احتمالی miR-143-3p به عنوان سرکوب تومور در سرطان پستان، نقش آن در کاهش بیان MUC1 و PD-L1 در سلول‌های سرطان پستان بررسی شده است.

روش کار: ابزارهای آنالیز بیوانفورماتیک و سنجش لوسیفراز برای ارزیابی اثر miR-143-3p بر بیان MUC1 استفاده شد. بیان MUC1، PD-L1 و miR-143-3p در رده‌های سلولي سرطان پستان با qRT-PCR اندازه گیری شد. اثر miR-143-3p بر MUC1 به عنوان هدف مستقیم و بر میزان PD-L1 مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت اثر افزایشی miR-143-3p به عنوان یک سرکوبگر تومور بر میزان تکثیر سلول‌های سرطانی پستان ارزیابی شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیک و سنجش لوسیفراز دوگانه، ناحیه 3'UTR ژن MUC1 به عنوان هدف miR-143-3p تایید شد. سطح بیان MUC1 و PD-L1 در رده‌های سلولي سرطان پستان بیشتر از سلول‌های طبیعی بود. همچنین، بیان بالای miR-143-3p بیان MUC1 را کاهش داد و کاهش بیان MUC1 باعث کاهش بیان PD-L1 شد و ورود miR-143-3p به درون سلول‌های سرطانی پستان منجر به کاهش رشد و تکثیر این سلول‌ها گردید.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج ما miR-143-3p ممکن است به طور غیر مستقیم بر بیان PD-L1 با تخریب mRNA ژن MUC1، تأثیر بگذارد و در نتیجه منجر به کاهش رشد و تکثیر در سلول‌های سرطان پستان بشود و هدف قرار دادن MUC1 ممکن است یک استراتژی جدید برای درمان سرطان پستان و miR-143-3p به عنوان یک هدف امیدوارکننده برای ایمونوتراپی در بیماران سرطان پستان باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Yousefi A, Sotoodehnejadnematlahi F, Nafissi N, Zeinali S, Azizi M. Investigating the Inhibitory Effect of miR-143-3P on the Level of MUC1 Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines Compared to Normal Breast Cell Lines. Razi J Med Sci. 2023;30(3): 204-218.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

Investigating the Inhibitory Effect of miR-143-3P on the Level of MUC1 Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines Compared to Normal Breast Cell Lines

Atena Yousefi: Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Fattah Sotoodehnejadnematalahi: Department of Biology, School of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Nahid Nafissi: Breast Surgery Department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Sirous Zeinali: Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran

Masoumeh Azizi: Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran (*Corresponding Author) mazizi528@gmail.com

Abstract

Background & Aims: In today's societies, breast cancer has significantly threatened women's health (1). Successful cancer treatment can also destroy tumor germ cells (2, 3). Treatment methods based on immune checkpoint molecules are considered (4). PD-L1 overexpression suppresses the immune response to cancer cells and causes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell (CSC) phenotypes, metastasis and chemical resistance (5). Overexpression of PD-L1 and MUC1 is observed in approximately 90 TNBCs. In this present study, we investigated the inhibitory effect of miR-143-3p on MUC1 expression as an oncogene that has the most impact on PDL-1 overexpression in BC cell lines MCF-7 (less aggressive BC), MDA-MB-231, and BT-549 (metastatic BC model). The suppressive effect of miR-143-3p on the expression of this oncogene as a direct effect and PDL1 level as an indirect result in BC cell lines was investigated. Besides, the effect of miR-143-3p overexpression on BC cell lines proliferation through downregulation of candidate oncogene was investigated.

Methods: First, the targeting of miR-143-3P on MUC1 3'UTR was confirmed by using bioinformatics software and then by dual luciferase assay. The expression level of miR-143-3P and MUC1 were measured in breast cancer lines compared to the normal line. After transfection of miR-143-3P into breast cancer cell lines, MUC1 and PD-L1 expression in mRNA levels were evaluated by using qRT-PCR. The miR-143-3p effects on MUC1 and PD-L1 expression and its impact on cell proliferation was investigated by using MTT assay, (mean \pm SD).

Results: The result of the dual luciferase assay was obtained from cloning the 3'UTR of the MUC1 gene in the psi-check2 vector and sequencing. According to the prediction analysis, the 3'-UTR of MUC1 gene has been considered as a putative miR-143-3p binding site (Target scan database). Transfecting miR-143-3p into MDA-MB-231, BT-549, MCF-7 cells harboring MUC1 3'-UTR decreased the luciferase activity to to 55% \pm 1/73, 57% \pm 1/15, 59% \pm 3/51% respectively, in comparison with the control ($P < 0.01$) (mean \pm SD). The expression of miR-143-3p was significantly downregulated in BC cell lines compared to their control, and its downregulation was negatively correlated with MUC1 overexpression ($r = -0.6419$, $p = 0.0244$). Increased expression of miR-143-3P, decreased the mRNA level of MUC1 in MDA-MB231 to 1/3 \pm 0/7, BT549 to 1/1 \pm 0/45 and in MCF7 to 0/4 \pm 0/21, compared whit untransfected cells.

MiR-143-3p introduction to BC cells downregulates PDL-1 indirectly. Overexpression of miR-143-3P reduces the MUC1 expression, and the reduction of MUC1 expression reduces PD-L1 expression mRNA level in MDA-MB231 to 3/4 \pm 0.45, BT549 to 3/1 \pm 0.56, MCF7 to 0/53 \pm 0.48, compared whit un transfected cells (fig4A). miR-143-3p

Keywords

MUC1,
miR-143-3p,
Breast cancer,
PD-L1

Received: 08/04/2023

Published: 10/06/2023

inhibits BC cellular proliferation. An MTT assay revealed that miR-143-3p overexpression significantly suppressed the proliferation in MCF-7 to $52\% \pm 1.55$, BT549 to $48\% \pm 2.45$ MDA-MB231 to $43\% \pm 3.36$, compared with non-transfected cells 72 h after transfection.

Conclusion: Breast cancer treatment has made significant progress in recent years, and a new treatment called immunotherapy, which uses the body's immune system to treat cancer, has become popular (6). One of the symptoms of breast cancer tumors is the overexpression of MUC1. A high expression level of MUC1 is associated with poor prognosis in cancer patients (7, 8). In an animal model of breast cancer, intravenous injection of MUC1 suppresses the immune system and accelerates the death of tumor-bearing mice. The serum level of MUC1 expression is also associated with suppression of the immune system in patients with metastatic adenocarcinoma treated with active specific immunotherapy (8, 9). As we mentioned earlier, MUC1 can increase the expression of PD-L1 by recruiting MYC and NF- κ B p65 to the PD-L1 promoter in some solid tumors, such as triple negative breast cancer (10). The mechanisms underlying PD-L1 expression in MUC1-positive tumor tissue were investigated, and the potential of targeting PD-L1 to inhibit the progression of MUC1-overexpressing colon cancer in mice. Therefore, the role of MUC1 in tumor immune evasion has been confirmed and can be a basis for using PD-L1 inhibitors in MUC1-positive colon cancer (8). microRNAs can regulate the expression of immune checkpoint receptors and their ligands (11). Changes in the expression of miR-143 often play a role in tumorigenesis (12). In 2020, Y Tokumaru and his colleagues showed by studying breast cancer samples with estrogen receptors that the high expression of microRNA-143 is associated with a favorable tumor immune microenvironment and better survival in breast cancer. They reported that miR-143 is a tumor suppressor microRNA that exhibits anti-tumor function by targeting KRAS signalling pathways in various malignancies. The high expression of miR-143 in cancer cells with a favorable tumor immune microenvironment regulates the positivity of anti-cancer immune cells. The suppression of pre-cancerous immune cells is related and leads to better survival of breast cancer patients (13).

In this study, we demonstrated MUC1 was potential as a novel target of miR-143-3p, therefore, the dual-luciferase reporter assay verified that miR-143-3p directly targeted MUC1 and inhibited this transcription. We found miR-143-3p downregulated in breast cancer cell lines compared to the normal line via qRT-PCR. In the current study, the qRT-PCR results illustrated an inverse relation between MUC1 mRNA expression and miR-143-3p expression in breast cancer cell lines. We investigated indirect targeting of PD-L1 via MUC1 targeting by miR-143-3p, be able to be prevent the cell proliferation in breast cancer cell line. Therefore we recognized, targeting MUC1 may be a novel strategy for BC therapy and prevent the progression of breast cancer and miR-143-3p as a promising candidate for miR restoration therapy in BC patients.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Yousefi A, Sotoodehnejadnematlahi F, Nafissi N, Zeinali S, Azizi M. Investigating the Inhibitory Effect of miR-143-3P on the Level of MUC1 Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines Compared to Normal Breast Cell Lines. *Razi J Med Sci.* 2023;30(3): 204-218.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

مقدمه

در جوامع امروزی سرطان پستان منجر به تهدید قابل توجهی برای سلامت زنان شده است. میزان بروز سرطان پستان در قومیت‌های مختلف متفاوت است و تخمین زده می‌شود که تعداد موارد سرطان پستان تا سال ۲۰۵۰ در سراسر جهان به بیش از سه میلیون نفر برسد (۱، ۲). در کشورهای غربی این بیماری بیشتر در سنین بالای ۵۰ سال دیده می‌شود ولی در کشور ما بیماران جوان‌تر هستند و در بسیاری از موارد به علت عدم آگاهی از علائم بیماری در مراحل پیشرفته‌تری مراجعه می‌کنند. هر چقدر سرطان پستان زودتر تشخیص داده شود، درمان آن آسان‌تر و موفقیت‌آمیزتر است (۳). درمان سرطان پستان شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی و تارگت تراپی است و از آنجایی که بافت تومور هتروژن است و از سلول‌های سالم و سرطانی تشکیل شده، درمان توسط شیمی درمانی می‌تواند منجر به مقاومت به درمان و پیشرفت بیماری شود. سلول‌های بنیادی داخل تومور می‌توانند بعد از شیمی درمانی توانایی خود نوسازی (Self-renewal) و تمایز خود را حفظ کنند و مجدداً شروع به رشد نمایند بنابراین، شیمی درمانی می‌تواند منجر به مقاومت شیمیایی و پیشرفت بیماری شود در واقع وقتی از شیمی درمانی استفاده می‌شود می‌توان مقاومت به دارو و عود سرطان را در مواردی از نمونه‌های تحت درمان قرار گرفته مشاهده کرد. تهاجم و متاستازهای بعد از شیمی درمانی علت اصلی مرگ در حدود نیمی از بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد و از این رو درمانی برای سرطان موفقیت‌آمیز است که بتواند سلول‌های زیای تومور را هم از بین ببرد (۴، ۵). روش‌های درمانی که بر پایه مولکول‌های ایست و بازرسی ایمنی (Immune checkpoint molecule) می‌باشد، یک پیشرفت قابل توجه در درمان بیماران با تومورهای توپر به حساب می‌آید (۶).

PD-L1 با عنوان کامل لیگاند ۱ مرگ برنامه‌ریزی‌شده یا Programmed death- ligand شناخته می‌شود که در انسان توسط ژن CD274 بیان می‌گردد و به PD-1 در سلول‌های T متصل می‌شود و سلول‌های T را مهار می‌کند. PD-1 بر روی لنفوسیت‌ها و PD-L1 بر روی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen- APC)

(presenting cell) لنفوسیت B، لنفوسیت T و سلول‌های اپی‌تلیالی و همچنین بر روی سلول‌های غیر خونی مانند آستروسیت‌ها، سلول‌های جزایر پانکراس، کراتینوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال عروقی و غیره بیان می‌شود (۷). محور PD-1/Programmed cell death (PD-L1) نقش مهمی در سلول‌های سرطانی برای فرار سلول‌های سرطانی از نظارت ایمنی دارد (۸). بیان بیش از حد PD-L1 در تومورهای مختلف انسانی سیستم ایمنی میزبان را در سرطان سرکوب می‌کند و باعث بدخیمی‌های شدید و پیش‌آگهی نامناسب می‌شود (۹، ۱۰)، از این رو PD-L1 به عنوان یک مولکول ایست بازرسی ایمنی نقش مهمی در استراتژی‌های درمان سرطان پستان دارد (۱۰)، بنابراین هدف‌گیری این مسیر با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال یا مولکول‌های کوچک مهارکننده به عنوان یکی از روش‌های کارآمد ایمونوتراپی علیه سرطان مطرح است و همچنین در رده‌ی سلول‌های توموری در انسان مانند سرطان تخمدان و لنفوم بدخیم، افزایش بیان این پروتئین نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی نزدیک با وقوع و رشد تومور می‌باشد (۱۱). در تومورهای توپر همانند تومورهای سرطان پستان افزایش بیان PD-L1 ارتباط مستقیم با عواملی نظیر: سایز بزرگ تومور، گرید بالای سرطان، تکثیر زیاد، وضعیت (Human epidermal growth factor receptor 2) HER2 گیرنده‌های استروژن و مقاومت شیمیایی درمانی و همچنین ارتباط معکوس با بقا دارد (۱۲).

بیان بیش از حد PD-L1 در سلول‌های سرطانی در مراحل مختلف تنظیم بیان ژن، مانند رونویسی ژن، تغییرات پس از رونویسی و ترجمه، و انتقال اگزوزومی رخ می‌دهد، بنابراین افزایش بیان PD-L1 پاسخ سیستم ایمنی به سلول‌های سرطانی را سرکوب می‌کند و باعث ایجاد فنوتیپ (Epithelial-to-mesenchymal transition) EMT و (Cancer stem cell) CSC، متاستاز و مقاومت شیمیایی می‌شود (۱۳).

Mucin1 یک گلیکوپروتئین در سطح سلول‌های مختلف می‌باشد که توسط ژن MUC1 در انسان کد می‌شود که از سلول در مقابل حمله پاتوژن‌های مختلف محافظت می‌کند و تقریباً در ۹۰٪ از (Triple-negative breast cancer) TNBCs بیان PD-L1 و MUC1

سیتوپلاسمی باید دارای موتیف CQC باشد و زمانی که این موتیف جهش پیدا میکند و به AQA تبدیل می‌شود فعالیت MUC1 مختل می‌شود و موجب کاهش بیان PD-L1 می‌شود (۱۴).

microRNA ها گروهی از RNA هایی با طول تقریبی 20-22 نوکلئوتید هستند که بر روی پایداری mRNA ها موثر بوده و وظیفه تنظیم سطح بیان ژن‌های بسیاری را بر عهده دارد (۱۶). این توالی‌ها، پس از گذراندن چند مرحله‌ی پیش‌ساز و به کمک آنزیم‌هایی، به فرم بالغ و فعال تبدیل می‌شوند. سپس هر miR با اتصال به ناحیه ترجمه‌نشده mRNA (3'UTR) های هدف (البته مطالعاتی هم بیانگر وجود این توالی‌های مکمل در نواحی کدکننده UTR 5' و حتی پروموتور می‌باشند) و بر اساس میزان تطابق با توالی مربوطه، منجر به سرکوب بیان محصول ژن هدف می‌شوند. لازم به ذکر است که سازوکارهای متعدد دیگری نیز برای کارکرد miR ها پیشنهاد شده است که برخی حتی شامل افزایش بیان ژنها در اثر اتصال به miR می‌باشد (۱۷).

miR ها در فرآیندهای حیاتی شامل توسعه، تمایز، آپوپتوز و تکثیر دخیل می‌باشند و به عنوان عناصر تشخیصی یا درمانی در سرطان مشخص شده‌اند (۱۷). بسیاری از miR در بروز سرطان ارتباط دارند. miR هایی که افزایش بیان آنها با بروز سرطان در ارتباط اند gonco-miR miR هایی که کاهش بیان آنها در ایجاد سرطان موثر است، Tumor suppressors-miR نامیده می‌شوند (۱۸). در مطالعات اخیر نقش miR های متفاوتی در ارتباط با تنظیم و کنترل بیان PD-L1 در سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است. microRNA ها می‌توانند بیان PD-L1 را به طور مستقیم و غیرمستقیم با هدف قرار دادن 3' UTR PD-L1 و تاثیر بر روی مولکول‌های دخیل در میسرهای سیگنالینگ متفاوت تنظیم کنند سپس می‌توانند نقش مهمی در درمان سرطان پستان ایفا کنند (۱۹). در مطالعات گذشته نقش حیاتی miR-143-3p به عنوان سرکوب کننده تومور و تاثیر گذار در پیشرفت و تومورزایی سرطان‌های متعددی من جمله سرطان روده

مشاهده می‌شود و به پاتوژنز تهاجمی آن کمک می‌کنند. در مطالعات گذشته گزارش شده است که هدف گیری ژنتیکی یا دارویی زیر و حد انکوژنیک MUC (MUC1-C) برای سرکوب بیان PD-L1 در سلول‌های TNBC کافی است (۱۴).

در سرطان‌های مختلف میزان بیان پروتئین MUC1 افزایش پیدا میکند و میزان گلیکوزیله شدن آن کاهش پیدا می‌کند، به همین دلیل یک سطح هیدروفیل در سطح سلول‌های ایجاد می‌شود و از اتصال داروهای شیمی‌درمانی که هیدروفوب هستند جلوگیری میکند و نقش مهمی در تکثیر، تمایز و تهاجم سلول‌های سرطانی دارد و در بدخیمی‌های مختلف مارکر مهمی جهت تشخیص و درمان می‌باشد. افزایش بیان MUC1 باعث افزایش بیان PD-L1 از طریق MYC و NF-kB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer p65 of activated B cells) می‌شود و موجب ایجاد فنوتیپ EMT و stemness و self-renewal در TNBCs می‌شود (۱۴، ۱۵).

بر روی پروموتور PD-L1 در قسمت E-box دو قسمت مجزا جهت اتصال MYC و p65 NF-kB وجود دارد. وقتی بیان PD-L1 افزایش می‌یابد موجب کاهش بیان فاکتورهای CD69, CD8, GZMB (Granzyme B) می‌شود و در نتیجه میزان بقاء کاهش پیدا می‌کند. قسمت C ترمینال ژن MUC1 (MUC1-C) به عنوان انکوپروتئین عمل می‌کند. وقتی MUC1-C افزایش بیان می‌یابد، موجب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ PI3K→(Protein kinase B)AKT و MEK→(Phosphoinositide 3-kinase) ERK (Extracellular signal-regulated kinase) می‌شود و همچنین می‌تواند به صورت مستقیم موجب فعال شدن مسیرهایی نظیر B-catenin→TCF4→MYC, NF-Kb, شود و از همین طریق موجب افزایش بیان PD-L1 می‌شود. قسمت C ترمینال ژن MUC1 دارای سه ساب‌یونیت (اکتا دومین، ترانس دومین و دومین سیتوپلاسمی) می‌باشد که برای هومودایمر شدن MUC1 و ورود آن به هسته حتماً قسمت دومین

سلولی را تقویت کند و از طرف مقابل با مهار بیان N-cadherin, vimentin, Snail and Slug و افزایش بیان E-cadherin و γ -catenin موجب مهار رشد سلولی و همچنین موجب مهار انتقال اپیتلیال مزانشیمی سلولی (EMT) می‌شود (۲۵).

برای بررسی بیشتر نقش miR-143-3P در سرطان‌های مختلف، به مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۱ توسط H. Yang و همکارانش بر روی سلول‌های ESCs (Endometriotic stromal cells) انجام شد می‌پردازیم. در این مطالعه بررسی شد که از نظر عملکردی بیان بیش از حد miR-143-3P از تکثیر و مهاجم ESC جلوگیری می‌کند، در حالی که کاهش بیان miR-143-3P موجب تکثیر و مهاجم ESC می‌شود. علاوه بر این با توجه به یافته‌های به دست آمده در این پژوهش مشخص گردید که بیان بیش از حد miR-143-3P به طور قابل توجهی موجب کاهش سطوح بیان ATG2B (ژن autophagy-related 2B) و در نهایت موجب مهار تکثیر و مهاجم در ESC می‌شود. در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که miR-143-3P پیشرفت (EM) Endometriosis را مهار می‌کند، بنابراین یک هدف جدید برای توسعه عوامل درمانی علیه EM (Endometriosis) را فراهم می‌کند (۲۶).

افزایش بیان PD-L1 نقش مهمی در سرکوب سیستم ایمنی و ایجاد سرطان پستان دارد و miR‌های مهارکننده می‌توانند یکی از روش‌های تنظیم مولکولی نقاط ایست و بازرسی ایمنی نظیر PD-L1 باشد.

جهت انجام این پژوهش بررسی اثر مهار بیان ژن MUC1 بر میزان بیان PD-L1 با استفاده از نقش احتمالی سرکوب‌کنندگی تومور miR-143-3P در سلول‌های سرطان پستان در شرایط in-vitro مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول با استفاده از نرم افزارهای مختلف پیشگویی miR نظیر (Target Scan, miR Walk)، MUC1 به عنوان ژن هدف گیری شده توسط miRNA-143-3P انتخاب شد، سپس با استفاده از نرم افزارهایی نظیر Allel ID و Generunner لوپ و پرایمر برای MUC1 و PD-L1 و miR-143-3P طراحی شد. در ادامه ما هدف‌گیری miR-143-3P را بر

بزرگ و مثانه و پستان مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲-۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Chongsheng Xia و همکارانش انجام شد بیان miR-143 در چهار رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231, SK-BR-3, CAMA-1, MDA-MB-436) و سه رده سلولی طبیعی پستان (CMMT, MB 157) و CL-S1 توسط RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیان miR-143 در تمام رده‌های سلولی سرطان پستان در مقایسه با رده‌های سلولی طبیعی پستان به طور قابل توجهی کاهش یافته است، و مشخص شد که miR-143-3P با مهار و سرکوب بیان MAPK7 (Mitogen-activated protein kinase) موجب مهار تکثیر و مهاجرت و مهاجم سلول‌های سرطان پستان می‌شود و در نهایت نقش مهمی در درمان سرطان پستان می‌تواند ایفا می‌کند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۷ توسط L.L. Zhu و همکارانش انجام شد مشخص شده است که miR-143-3P با مهار و سرکوب ERK5 و MAPK7 می‌تواند نقش مهمی در مهار رشد سلولی سرطان پستان داشته باشد. در مطالعه مذکور ۳۰ بافت سرطان پستانو ۳۰ نمونه بافت نرمال از لحاظ میزان بیان miR-143-3P مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که در بافت‌های سرطانی میزان بیان miR-143-3P به شدت کاهش پیدا کرده و میزان بیان ERK5 و MAPK7 افزایش یافته است، همچنین در این مطالعه بررسی شد که هدف‌گیری ERK5 و MAPK7 توسط miR-143-3P در سلول MCF-7 به طور قابل توجهی موجب مهار رشد و تکثیر سلولی می‌شود (۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۲۲ توسط J. Peng و همکارانش بر روی سلول‌های سرطان کبد انجام شد مشخص گردید که miR-143-3P با تنظیم ژن هدف (Fibroblast growth factor1) FGF1، از تکثیر و مهاجم سلول‌های سرطان کبد جلوگیری می‌کند. در این مطالعه مشخص شده که بیان miR-143-3P در سلول‌های HCC (Hepatocellular carcinoma) بسیار کاهش یافته و از طرفی بیان ژن FGF1 بسیار افزایش یافته است و در نتیجه خاموش کردن ژن FGF1 و بیان افزایش یافته miR-143-3P می‌تواند آپوپتوز

کرایو و یال تهیه شد و سپس در محیط کشت Fetal DMEM/F12 (Gibco, USA) همراه با ۱۰٪ پنی Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) و ۱٪ سیلین/استرپتومایسین استریل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب حاوی CO₂ ۵٪ در فلاسک‌های 25 ml کشت داده شدند. اولیگونوکلوئید بهم ریخته (mimics) miR scrambled به عنوان کنترل از Ambion (Life Technology, AM17102) و miR-143-3p (mimics) از GenePharma Co, Shanghai خریداری شدند. سلول‌ها در پلیت 6 well در هر well تعداد $1/6 \times 10^6$ سلول کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول‌ها هنگامی که جمعیت سلول‌های کشت داده شده و چسبیده به کف هر چاهک به حدود ۸۰٪ رسید، طبق پروتکل کیت، در یک میکروتیوب استریل و کتور حاوی miR-143-3p (mimic) به محلول Hyperfect Transfection Reagent (Qiagen, Germany) اضافه شد و در یک میکروتیوب دیگر اولیگونوکلوئید بهم ریخته (miR scrambled) به Hyperfect Transfection Reagent، به صورت جداگانه، اضافه و سپس به سلول‌ها ترانسفکت شدند و بعد از شش ساعت، محیط تازه حاوی ۱۰٪ FBS بر روی سلول‌ها ریخته شد. رده‌های سلولی ترانسفکت شده ۴۸ ساعت پس از انتقال microRNA جهت بررسی تاثیر miR بر میزان بیان MUC1 برداشت شدند و جهت انجام تست Real time qRT-PCR، RNA آنها استخراج گردید.

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 کاملاً رعایت شده است.

بررسی هدف‌گیری UTR 3' ژنهای مورد نظر با

سنجش لو سیفراز: برای این منظور ابتدا قسمت 3' UTR ژن MUC1 در پایین دست ژن لو سیفراز رنیلا در وکتور psiCHECK-2 کلون گردید. جهت کلون کردن UTR 3' ژن MUC1 درون وکتور از پرایمرهای اختصاصی MUC1، طبق جدول ۱ استفاده شد. پس از کشت سلول‌های MDA-MB231، BT-549 و MCF-7

روی UTR 3' ژن MUC1 با روش لو سیفراز دوگانه تأیید کردیم و پس از سنجش آنها توسط تست لو سیفراز، اندازه‌گیری میزان بیان miR-143-3P و MUC1 PD-L1 را با روش Real Time PCR در رده‌های سلولی متاستازی سرطان پستان دارای PD-L1 شامل MCF-7، MDA-MB-231، BT-549 و رده سلولی MCF-10 به عنوان سلول کنترل مورد بررسی قرار دادیم. نتایج ما نشان داد که بیان miR-143-3P در رده‌های سلولی سرطان پستان در مقایسه با رده‌های سلولی نرمال پستان به میزان قابل توجهی کاهش یافته و بیان ژن MUC1 و PD-L1 افزایش یافته است و پس از افزایش بیان miR-143-3P در رده‌های سلولی سرطان پستان، کاهش بیان MUC1 را نشان دادیم. در مجموع هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر سرکوب‌کنندگی miR-143-3P بر بیان انکوژن MUC1 به عنوان اثر مستقیم و سرکوب سطح بیان PD-L1 به عنوان یک نتیجه غیر مستقیم در سلول‌های سرطان پستان بود. علاوه بر این، اثر بیان بیش از حد miR-143-3P بر مهارت‌کشیر رده‌های سلولی سرطان پستان هم مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

بیوانفورماتیک: در مرحله اول نرم افزارهای پیشگویی miR نظیر TargetScan 4.0، miRwalk، Diana، miRDiP را برای شناسایی ژن‌های بالقوه هدف miR-143-3P مورد استفاده قرار دادیم و مشخص شد که در UTR 3' ژن MUC1 محل اتصال احتمالی miR-143-3P وجود دارد. برای تأیید این یافته، UTR 3' ژن MUC1 را در وکتور psiCHECKTM-2 کلون کردیم. این پلاسمید همزمان با miR-143-3P یا miR scrambled (بهم ریخته) در سلول‌های MDA-MB231، BT-549 و MCF-7 ترانسفکت شد.

کشت سلولی و ترانسفکشن miR: رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی MDA-MB-231 و BT-549 و MCF-7 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (Iranian Biological Resources center, IBRC, Tehran, Iran) و رده‌ی سلولی نرمال پستان MCF-10a (به عنوان کنترل) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت

جدول ۱- پرایمر های PCR مربوط 3'UTR ژن MUC1

Gene	توالی الیگونوکلئوتید ها از سمت 5' به 3' برای آنالیز PCR
MUC1	Forward: CCG CTC GAG TCTCTTACACAAACCCAGCA ACGGGTACAGATGAAAGAT G CGG CCG C Revers: ATA AGA AT

سانترفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور 12000 rpm و در دمای ۴ درجه محیط رویی میکروتیوب ها را خالی نموده و فقط رسوب RNA در ته میکروتیوب ها باقی ماند. جهت خارج شدن اتانول باقی مانده، میکروتیوب ها به مدت ۱ ساعت با درب باز در محیط اتاق قرار داده شد تا اتانول به صورت کامل خارج و خشک شود. پس از خارج شدن کامل اتانول به هر میکروتیوب میزان ۳۰ میکرولیتر محلول Nuclease (EXIQON, Denmark) Free Water اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در نهایت غلظت RNA توسط دستگاه NanoDROD و با تعیین نسبت جذب در ۲۶۰ و A280 اندازه گیری و کیفیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت ساخت cDNA، از کیت Miscript Reverse Transcription (QIAGEN, USA) با پرایمر Oligo dt (QIAGEN, USA) استفاده شد. سنتز cDNA برای miR-143-3P و U6 به عنوان کنترل داخلی توسط پرایمر های stem loop (طبق جدول ۲) انجام شد. Real Time PCR به وسیلهی دستگاه Step one plus و master mix Biofact و پرایمرهای اختصاصی - miR-143-3P (طبق جدول ۲) انجام شد. همچنین برای بررسی میزان بیان MUC1 و PD-L1 در سلول های ردهی سرطانی و سلول های ردهی نرمال پستان نیز از پرایمرهای اختصاصی MUC1 و PD-L1 (طبق جدول ۲) و نیز برای نرمالیزه کردن بیان، از ژن خانه دار GAPDH (House Keeping Gene) استفاده شد. واکنش ها به صورت سه تایی بود و میانگین آنها ارئه گردید. در پایان جهت محاسبه نمودن تغییر و میزان بیان ژن ها از متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد و میزان change گزارش گردید.

سنجش تکثیر سلولی: به منظور بررسی تاثیر miR-143-3p بر روی بیان ژن MUC1 و PD-L1 و در نتیجه تاثیر آن بر تکثیر سلول های ترانسفکت شده،

در پلیت ۹۶ خانه (در هر well تعداد $10^4 \times 10$) و ترانسفکشن همزمان آنها با miR-143-3p (mimics) و کتور psiCHECK-2 حاوی 3' UTR ژن MUC1 و اولیگونوکلئوتید بهم ریخته (miR scrambled) به عنوان کنترل انجام شد و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکت، با استفاده از کیت بررسی لوسیفرز دوگانه (Promega, USA) میزان لوسیفرز در حضور و عدم حضور miR اندازه گیری شد. سیستم های لوسیفرزی دوگانه قادرند بیان دو آنزیم لوسیفرز مجزا را مورد ارزیابی قرار دهند. برای این منظور از دستگاه لومینومتر (Titertek-Berthold Sirius) استفاده شد. کیت بررسی لوسیفرز دوگانه قادر به بررسی همزمان بیان دو لوسیفرز رینلا و فایرفلای است.

استخراج RNA سنتز cDNA و Real time

RT-PCR به منظور بررسی تاثیر miR-143-3p بر روی بیان ژن MUC1 و PD-L1 سلول های ترانسفکت شده در پلیت ۶ خانه (در هر well تعداد $10^6 \times 1/6$ سلول) ۴۸ ساعت پس از ترانسفکت شدن، جهت استخراج Total RNA مورد استفاده قرار گرفتند. از سلول های ترانسفکت نشده هم بعنوان کنترل استفاده شد. در ابتدا به رسوب سلول های کنترل و ترانسفکت شده ۱ میلی لیتر محلول (GeneAll, Republic of Korea) RiboEx اضافه شد. و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، ۰/۵ میلی لیتر محلول Chloroform (Merck, Germany) به هر تیوپ اضافه گردید. سپس جهت جداسازی محتوی سلول از RNA میکروتیوب ها را به مدت ۲۰ دقیقه در دور 12000 rpm در دمای ۴ درجه سانترفیوژ شدند. بدین ترتیب در میکروتیوب ها سه لایه قابل تشخیص ایجاد شد. لایه شفاف بالایی حاوی RNA سلول است که به آرامی به یک میکروتیوب استریل دیگر انتقال داده شد. به میکروتیوب جدید میزان ۱ میلی لیتر محلول ایزوپروپانول (Merck, Germany) اضافه و پس از

جدول ۲- پرایمرهای real-time PCR

Gene	real-time PCR توالی الیگونوکلئوتیدها از سمت 5' به 3' برای آنالیز real-time PCR
MUC1	Forward: AAGTTCAGGCCAGGATCTGTG Revers: AAATGGCACATCACTCACGC
PD-L1	Forward: GTGATCCGCTGCATGATCAG Reverse: GGTAGCCCTCAGCCTGACATG
miRNA-143-3p	Forward: CCAGTGAGATGAAGCACTGTAGCTC Reverse: CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC
Stem loop miRNA143-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGCTA
Stem loop U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATAT GG
U6	Forward: CCAGTGAGATGAAGCACTGTAGCTC Reverse: CAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC
GAPDH	Forward: ACACCCGCTCATCAATCTTT Reverse: AGGTCCACGACTCTGTTGCT

prism V.8 استفاده شد.

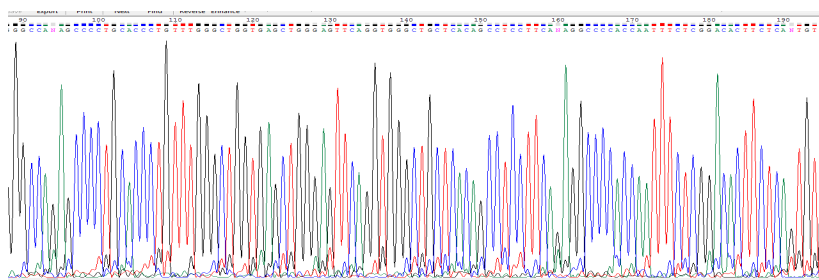
یافته‌ها

نتایج سنجش لو سیفر از دوگانه حاصل از کلون کردن قطعه 3'UTR ژن MUC1 در وکتور psi-check2 و توالی یابی: توالی مربوط به آنزیم‌های محدودکننده Not1/Xho1 در انتهای 5' پرایمرهای forward و reverse ژن MUC1 قرار داده شدند. با توجه به بررسی اتصال پرایمرها به نقاط دیگر ژنومیک، در NCBI Blast، نتایج نشان داد که پرایمرها دارای اتصال اختصاصی به توالی مورد نظر هستند. در مرحله بعد PCR با آنزیم Pfu polymerase (این آنزیم دارای خاصیت باز آرایبی یا اگزونوکلئازی از انتهای 5' → 3' می باشد)، انجام شد و محصول PCR در وکتور psi-check2 کلون شد و جهت سکانس مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

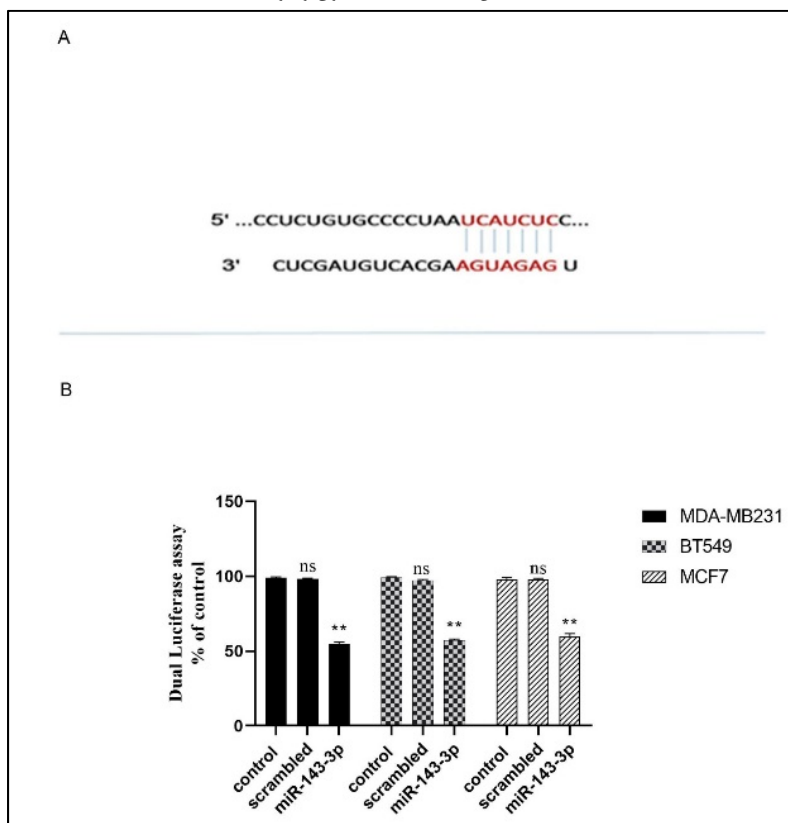
پیش بینی miR-143-3P به عنوان miR هدف گیرنده‌ی 3'UTR ژن MUC1 توسط پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیک: در این مطالعه با استفاده از اطلاعات پایگاه داده Target scan و ابزارهای بیوانفورماتیک پیش بینی شده است که احتمالاً ژن

سنجش تکثیر سلولی با استفاده از 3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Schnelldorf, Germany) انجام شد. سلول‌های MDA-MB-231 و BT-549 در تراکم سلولی 3×10⁴ در هر چاهک یک میکروپلیت 96 چاهی کشت داده شدند و سپس با miR-143-3p و miR scrambled ترانسفکت شدند. سلولها ۷۲ ساعت پس از ترانسفکت با MTT (500µg/ml) انکوبه شدند، ۴ ساعت بعد، مواد رویی دور ریخته شدند و فرمازان نامحلول توسط دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل شد. چگالی نوری در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (طول موج مرجع: ۶۳۰ نانومتر)، و سپس زنده‌مانی سلول نسبت به سلول‌های کنترل درمان نشده تعریف شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار شد و میانگین نتایج محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه (SPSS V.22 Inc., Chicago, IL) استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها و miR-143-3p در رده سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی پستان از آزمون آماری T- Test و ANOVA استفاده شد. برای رسم نمودار از نرم افزار GraphPad



شکل ۱- نتیجه سکانس قطعه MUC1 درون وکتور psi-check2



شکل ۲- نتایج آزمون لوسیفراز در سلول‌های MDA-MB231، BT549، MCF7.

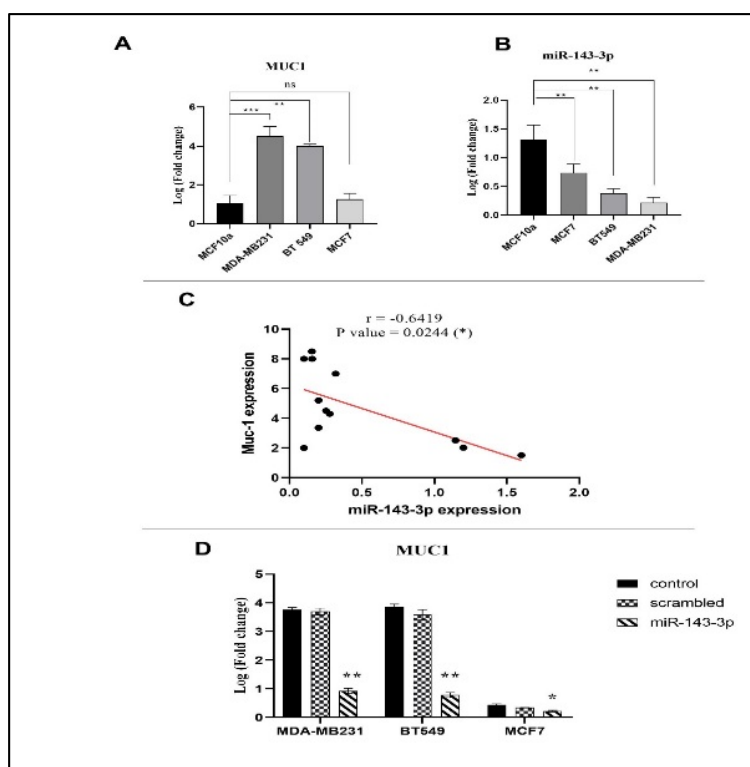
(A) هدف‌گیری 3'UTR ژن muc1 توسط miR-143-3p با نرم افزار TargetScan. (B) شدت لومینسانس رنیلا در سلول‌های MDA-MB231، BT549 و MCF7 پس از ترانسفکشن miR-143-3P، در مقایسه با سلول‌های کنترل کاهش یافته است. ($p < 0.01$)

3P. به MDA-MB-231، BT-549 و MCF-7، فعالیت لوسیفراز را به ترتیب به $55\% \pm 1/73\%$ و $57\% \pm 3/51\%$ درصد کاهش داد، در حالیکه اختلاف معناداری بین گروه کنترل و scrambled مشاهده نشد.

معرفی miR-143-3P به عنوان miR سرکوب‌گر بیان انکوژن MUC1 در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان: برای تأیید این فرضیه که بیان بیش از حد

MUC1 با miR-143-3P کنترل می‌شود. نحوه‌ی اتصال در 3'UTR MUC1 با miR-143-3P و همچنین محل اتصال آنها به صورت گرافیک در شکل 2A نمایش داده شده است. همانطور که در شکل 2B نشان داده شده است، ترانسفکشن miR-143-3p در رده‌های سلولی MDA-MB-231، MCF-7 و BT-549 موجب کاهش قابل توجه فعالیت لوسیفراز در مقایسه با الیگونوکلوئید بهم ریخته شده است. انتقال miR-143-

۲۱۳



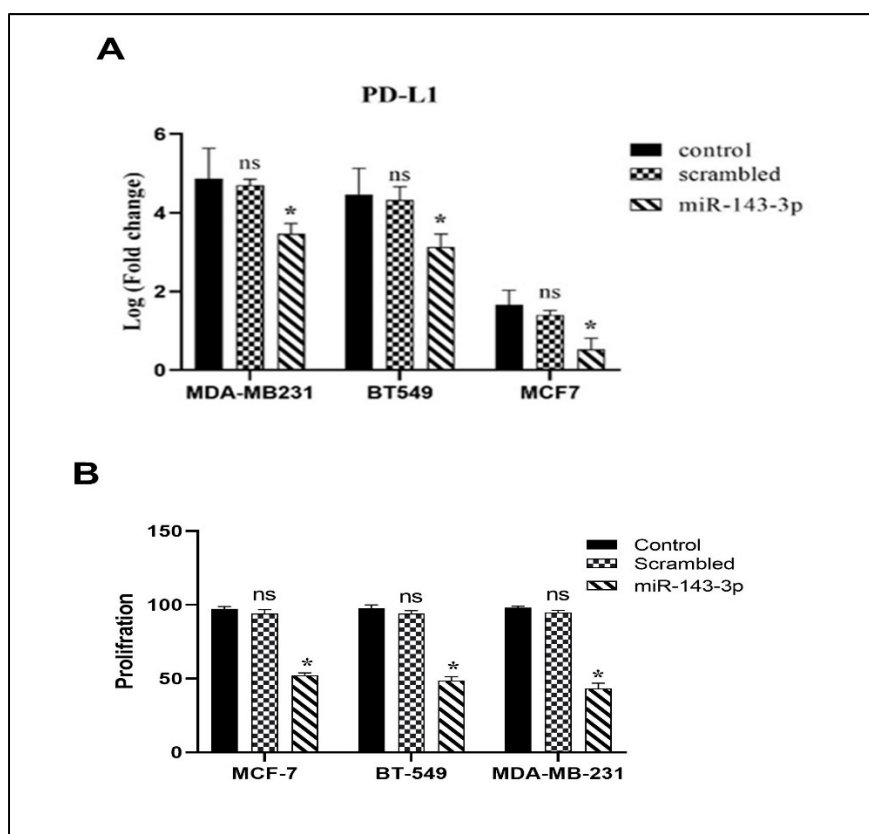
شکل ۳- بررسی بیان MUC1 و miR-143-3P، در سلول‌های رده‌ی سرطانی و نرمال پستان قبل و بعد از ترانسفکت با استفاده از روش Real Time-PCR. (A) بیان MUC1 در سلول‌های رده سرطانی MDA-MB231 و BT549 قبل از ترانسفکت بیشتر از سلول‌های رده‌ی سرطانی MCF7 و رده‌ی نرمال MCF10a است. (B) بیان miR-143-3P مورد مطالعه به عنوان miR سرکوب‌گر تومور در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان نسبت به سلول‌های رده‌ی نرمال پستان کمتر است. (C) بین کاهش بیان miR-143-3P و افزایش بیان MUC1 در سلول‌های سرطان پستان رابطه مستقیم وجود دارد. (D) ورود miR-143-3P میزان بیان ژن هدف MUC1 را در مقایسه با گروه کنترل و Scrambled کاهش داده است. $p < 0.05$ * $p < 0.01$ **

به $1/1 \pm 0/2\Delta$ و در MCF7 به $0/4 \pm 0/14$ ، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش داد (شکل 3D).

تاثیر کاهش بیان MUC1 بر روی بیان PD-L1 و بررسی تکثیر سلولی: برای تأیید این فرضیه که بیان بیش از حد miR-143-3P بیان MUC1 mRNA را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش می‌دهد، و کاهش بیان MUC1 موجب کاهش بیان PD-L1 و در نتیجه موجب مهار تکثیر سلولی میشود، miR-143-3P و اولیگونوکلوئوتید بهم ریخته به رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549، و MCF7 ترانسفکت شد. قبل و بعد از ترانسفکت، میزان بیان PD-L1 مورد بررسی قرار گرفت. در انتها میزان تکثیر سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های ترانسفکت نشده مورد بررسی قرار گرفت. بیان افزایش یافته miR-143-3P

miR-143-3P بیان mRNA MUC1 را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش می‌دهد، miR-143-3P و اولیگونوکلوئوتید بهم ریخته به رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549، و MCF7 ترانسفکت شد. قبل از ترانسفکت، میزان بیان MUC1 (شکل 3A) و miR-143-3P (شکل 3B) در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان در مقایسه با رده‌ی سلولی نرمال پستان بررسی شد.

بین کاهش بیان miR-143-3P و افزایش بیان MUC1 در سلول‌های سرطان پستان رابطه مستقیم وجود دارد (شکل 3C). پس از ترانسفکت، سطوح mRNA MUC1 با روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. بیان افزایش یافته miR-143-3P سطح mRNA MUC1 را در MDA-MB231 به $1/3 \pm 0/30$ ،



شکل ۴- بررسی بیان PD-L1 و تکثیر سلولی، در سلول‌های رده‌ی سرطانی و نرمال پستان بعد از ترانسفکت miR-143-3P با استفاده از روش Real Time-PCR و MTT. (A) ورود miR-143-3P میزان بیان ژن PD-L1 را در مقایسه با گروه کنترل و Scrambled به صورت غیر مستقیم کاهش داده است. (B) ترانسفکت miR-143-3P موجب کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده می‌شود. $p < 0.05^*$.

ایمونوتراپی که از سیستم ایمنی بدن برای درمان سرطان استفاده می‌کند، به طور چشمگیری رواج پیدا کرده است (۲۷). لیگاند ۱ مرگ برنامه ریزی شده (PD-L1) نوعی گلیکوپروتئین غشایی از خانواده ایمونوگلوبین نوع ۱ بوده که به عنوان گیرنده ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، در رابطه با آپوپتوز، نامگذاری شده است و گیرنده آن PD-1، با عنوان کامل پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Programmed cell death protein 1) که با نام CD279 نامگذاری شده است که یک پروتئین سطحی بر روی لنفوسیت T می‌باشد که تعامل آنها در محیط تومور، موجب خاموش کردن سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌شود و شرایط فرار سلول‌های تومور را فراهم می‌کند (۲۸). یکی از نشانه‌های توموری سرطان پستان افزایش

سطح mRNA PD-L1 را در MDA-MB231 به $0/45 \pm$ ، BT549 به $3/4 \pm 0/56$ و در MCF7 به $0/48 \pm$ ، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش داد (شکل 4A). در این آزمون نتیجه گیری شد که ترانسفکت miR-143-3P موجب کاهش تکثیر سلولی در بیان PD-L1 و در نتیجه موجب کاهش تکثیر سلولی در MCF7 به $52 \pm 1/55$ ، BT549 به $2/45 \pm 48$ ، به MDA-MB231 به $3/43 \pm$ در سلول‌های ترانسفکت شده در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده می‌شود. (شکل 4B).

بحث

درمان سرطان پستان در سال‌های اخیر پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشته است، و یک درمان جدید به عنوان

سیگنال دهی MUC1-C از RNA های غیر کدکننده برای ترویج بیان PD-L1 استفاده می کند، که منجر به یک ویژگی سرکوب کننده ایمنی سلول های AML می شود (۳۴).

با توجه به مطالعاتی که بر روی transcriptome ژنوم انسان انجام شده، تنها ۱ تا ۲ درصد توالی ژنوم دارای ظرفیت کدگذاری پروتئین است و تعداد زیادی از RNA های غیر کدکننده جنده های حیاتی فنوتیپ انکوژنیک را از طریق اتصال انتخابی به mRNA های هدف و تنظیم ترجمه پروتئین تنظیم می کنند (۳۴) و همچنین microRNA ها می توانند بیان منظم ر سیتورهای ایست و بازرسی ایمنی و لیگاندهای آنها را تنظیم می کنند و از سوی دیگر مولکول های ایست و بازرسی نیز می توانند بیان microRNA ها را کنترل کنند (۳۶). miR-143 در موقعیت ۳۳ بر روی کروموزوم ۵ در ژنوم انسان قرار دارد (۳۷). تغییرات در بیان miR-143 اغلب در سرطان نقش دارد و در مطالعه ای که توسط Kitade Y و همکارانش انجام شد نشان داده شده که کاهش بیان و miR-145 در نمونه های سرطانی و در مراحل اولیه سرطان می تواند در تومورزایی نقش داشته باشد (۳۸). در مطالعه ای دیگر که توسط AKM Hossian و همکارانش انجام شد نشان می دهد که نسخه اصلاح شده miR-143 (miR-143BP) با فعالیت و مقاومت بیشتر در برابر نوکلئاز، دارای اثر سرکوب کننده تومور بر سلول های سرطان کولورکتال است و miR-143، همراه با miR-506 می تواند در جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی خطوط سلولی و کاهش رک زایی در سرطان موثر باشد (۳۹) و این امر باعث می شود که miR-143 کاندیدای مناسبی برای درمان تومورها باشد (۳۸). Y Tokumaru و همکارانش در سال ۲۰۲۰ با مطالعه بر روی نمونه های سرطان پستان دارای گیرنده ی استروژن نشان دادند که بیان بالای miR-143 با میکرو محیط ایمنی مطلوب تومور و بقای بهتر در سرطان پستان مرتبط است. آنها گزارش کردند که miR-143 یک میکرو RNA سرکوب کننده تومور است که با هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ KRAS در بدخیمی

بیان MUC1 است که گلیکوپروتئینی در غشای سلولهای اپیتلیال پستان میباشد که در هنگام سرطان دچار تغییرات ساختاری گردیده و به خون می ریزد و اندازه گیری آن میتواند راهکار مناسبی برای پیگیری و تعیین عود مجدد سرطان باشد (۲۹، ۳۰). سطح بیان بالای MUC1 با پیش آگهی ضعیف در بیماران سرطانی همراه است (۳۰). MUC1 به عنوان یک آنتی ژن مرتبط با تومور، گلبول های سفید خون را در ریزمحیط تومور جذب می کند که منجر به ترشح سیتوکین های التهابی می شود (۳۱). در مدل حیوانی سرطان پستان، تزریق داخل وریدی MUC1 باعث سرکوب سیستم ایمنی می شود و مرگ موش حامل تومور را تسریع می کند. سطح سرمی بیان MUC1 نیز با سرکوب سیستم ایمنی در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم متاستاتیک تحت درمان با ایمونوتراپی اختصاصی فعال همراه است (۳۰، ۳۲). همانطور که پیش تر هم اشاره کردیم MUC1 می تواند بیان PD-L1 را از طریق جذب MYC و NF-kB p65 به پروموتور PD-L1 در برخی از تومور های توپیر، مانند سرطان پستان سه گانه منفی افزایش دهد (۱۴). عوامل مختلفی بیان PD-L1 را در سلول های تومور و سلول های ارائه دهنده آنتی ژن القا می کنند که شامل سیتوکین های التهابی IFN- γ و IL-17A می شود (۹، ۳۳). در مطالعه دیگر که انجام شد، مکانیسم های زیربنایی بیان PD-L1 در بافت توموری که بیان MUC1 در آنها مثبت بود، مورد بررسی قرار گرفت و پتانسیل هدف قرار دادن PD-L1 برای مهار پیشرفت سرطان روده بزرگ با بیان بیش از حد MUC1 در موش نشان داده شد. درک واضح تر از این فرآیند ممکن است به تعریف نقش MUC1 در ترویج فرار ایمنی تومور و ارائه اطلاعات کلیدی برای حمایت از ایمونوتراپی از طریق هدف قرار دادن مسیر سیگنالینگ PD-L1-PD1 در سرطان روده بزرگ با بیان بالای MUC1 کمک کند. بنابراین، نقش MUC1 در فرار ایمنی تومور تایید شده و میتواند پایه ای برای کاربرد مهار کننده های PD-L1 در سرطان روده بزرگ MUC1 مثبت باشد (۳۰). در مطالعه دیگری MUC1-C را به عنوان تنظیم کننده کلیدی بیان microRNA معرفی میکند و مکانیزم حیاتی را نشان می دهند که توسط آن

که miR-143-3P با هدف گیری، MUC1 و در ادامه مسیر هدفگیری غیر مستقیم PD-L1 ممکن است بتواند به عنوان یک هدف درمانی و عاملی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان باشد، اما همچنان پیشنهاد کاندیداهای احتمالی miR برای درمان موفقیت آمیز سرطان که در ارتباط با MUC1 است و آشکارسازی مکانیسم های تحت تاثیر توسط این miR ها که موجب سرکوب پیشرفت تومور در سرطان پستان میشود نیازمند، مطالعات بیشتری است.

نتیجه گیری

از انجام این مطالعه و یافته های به دست آمده میتوان نتیجه گیری کرد که، روش های درمانی که بر پایه miR می باشد، همراه با درمان های متداول، مانند شیمی درمانی، درمان غدد درون ریز یا درمان هدفمند، میتواند یک پیشرفت قابل توجه در درمان بیمارانی با تومور های توپر به حساب آید و میزان بقای کلی بیماران مبتلا به سرطان پستان را افزایش دهد.

References

1. Tabarestani S, Noori-Dalooi MR. Molecular Genetics, Diagnosis and treatment of breast cancer. J Sabzevar Univ Med Sci. 2010;17(2):74-87.
2. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy?. J Pathol. 2011;223(2):148-62.
3. Gao L, Guo Q, Li X, Yang X, Ni H, Wang T, et al. MiR-873/PD-L1 axis regulates the stemness of breast cancer cells. EBioMedicine. 2019;41:395-407.
4. Patel SP, Kurzrock RJ. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. Mol Cancer Ther. 2015;14(4):847-56.
5. Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T, et al. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. Mol Cancer. 2015;14(1):1-13.
6. Yang YJT. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. J. Clin. Investig. J Clin Invest. 2015;125(9):3335-7.
7. Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D, Dalziel MJB. MUC1 and cancer. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 1999;1455(2-3):301-13.

های مختلف، عملکرد ضد تومور را نشان می دهد و بیان بالای miR-143 در سلول های سرطانی با ریزمحیط ایمنی مطلوب تومور، تنظیم مثبت سلول های ایمنی ضد سرطان و سرکوب سلول های ایمنی پیش سرطانی مرتبط است و موجب بقاء بهتر بیماران سرطان پستان می شود (۴۰). در سال ۲۰۲۰ Y Du و همکارانش با مطالعه بر روی لاین سلولی CAMA-1 نشان دند که miR-143 با سرکوب بیان Jag1 و غیرفعال کردن مسیر سیگنال دهی Rho، متاستاز استخوانی سلول های CAMA-1 را سرکوب میکند و همچنین اثرات ضد متاستاتیک قابل توجهی را بر روی سلول های CAMA-1 دارد و سرانجام پیشنهاد کردند که miR-143 دارای اثر ضد متاستاتیک بازدارنده رشد بر روی سرطان پستان است و بنابراین ممکن است در درمان سرطان پستان مفید باشد (۴۱). در مطالعه حاضر، ما با استفاده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، منطقه 3'UTR MUC1 را به عنوان یک هدف بالقوه برای miR-143-3P مشخص کردیم، و در ادامه، نشان دادیم که تنظیم نادرست miR-143-3P در سلول های ردهی سرطان پستان با افزایش بیان MUC1 ارتباط مستقیم دارد، و در نتیجه miR-143-3P میتواند در تنظیمات پس از رونویسی بیان MUC1 نقش داشته باشد. در این مطالعه با استفاده از سنجش لو سیفراز دوگانه نشان دادیم که miR-143-3P میتواند مناطق خاصی از 3'-MUC1 UTR را هدف قرار دهد و از این طریق بیان این ژن را به طور قابل توجهی تنظیم کند. در ادامه نتایج بدست آمده پس از ترنسفکت با miR-143-3P با استفاده از تکنیک qRT-PCR نشان دهنده کاهش بیان MUC1 در ردهی سلول های پستان در مقایسه با سلول ردهی نرمال پستان میباشد و این عمل نشان دهندهی صحیح بودن روش ترانسفکت و داشتن کارایی قابل قبول جهت افزایش بیان miR-143-3P می باشد، همچنین در این مطالعه نشان دادیم که افزایش بیان miR-143-3P در سلول های رده سرطان پستان، موجب کاهش بیان MUC1 در سطح mRNA میشود، که می تواند عملکرد miR-143-3P را در بیان ژن MUC1 در سرطان پستان تعدیل کند و در آخر یافته های ما نشان میدهد

8. Zhang Y, Dong X, Bai L, Shang X, Zeng YJ. MUC1-induced immunosuppression in colon cancer can be reversed by blocking the PD1/PDL1 signaling pathway. *Oncol Lett.* 2020;20(6):1-.
9. Yang E, Hu X, Xing PXJH, histopathology. Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histol Histopathol.* 2007.
10. Maeda T, Hiraki M, Jin C, Rajabi H, Tagde A, Alam M, et al. MUC1-C induces PD-L1 and immune evasion in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2018;78(1):205-15.
11. Giza DE, Vasilescu C, Calin GAJ. MicroRNAs and ceRNAs: therapeutic implications of RNA networks. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(9):1285-93.
12. Kitade Y, Akao YJ. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: microRNAs, miR-143 and-145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug. *J Pharmacol Sci.* 2010:1010080465.
13. Tokumar Y, Asaoka M, Oshi M, Katsuta E, Yan L, Narayanan S, et al. High expression of microRNA-143 is associated with favorable tumor immune microenvironment and better survival in estrogen receptor positive breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3213.