

## Introduction of miR-200c as an attenuator of PD-L1 expression in breast cancer cell lines

Sara Hajibabaei<sup>1</sup>, Fattah Sotoodehnejadnematalahi<sup>1</sup>, Nahid Nafissi<sup>2</sup>, Sirous Zeinali<sup>3</sup>, Masoumeh Azizi\*<sup>4</sup>

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

4- Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

۵۹

### Abstract

**Aim and Background:** PD-L1, one of the most important immune-regulating molecules in all cancers including breast cancer, suppresses the immune system against tumor cells. MiRNAs control PD-L1 expression as therapeutic tools and targets. This study investigated the role of miR-200c in reducing PD-L1 expression and breast cancer cell proliferation.

**Materials and Methods:** In this study, miR-200c targeting the PD-L1 3'UTR was confirmed by bioinformatics and dual-luciferase assay. PD-L1 expression in breast cancer tissues and cell lines was checked compared to normal tissues and cell lines. qRT-PCR was used to measure PD-L1 expression after miR-200c transfection into breast cancer cell line. The MTT test was used to determine the effect of miR-200c introduction on cell proliferation.

**Results:** The 3'UTR region of the PD-L1 gene was identified as a target for miR-200c using bioinformatics software and a dual luciferase assay. The decrease in miR-200c expression in breast cancer cells is directly related to the increase in PD-L1 expression ( $r = -0.68$ ,  $P$  value = 0.0158). Also, increasing the expression of miR-200c in MDA-MB231, BT549, and MCF7 breast cancer cells decreased the expression of PD-L1 by ( $0.217 \pm 2.3$ ,  $0.021 \pm 2.11$ , and  $0.012 \pm 0.146$ , respectively). The increased expression of miR-200c decreased the proliferation rate in MDA-MB231 by  $0.45 \pm 0.012$ , BT549 by  $0.256 \pm 0.2$ , and in MCF7 by  $0.164 \pm 0.02$ , compared to non-transfected cells. (Mean  $\pm$  SE)

**conclusion:** MiR-200c may be able to prevent breast cancer progression by targeting the PD-1/PD-L1 pathway, reducing PD-L1 expression, and reducing breast cancer cell proliferation.

**Keywords:** PD-L1 (Program death ligand-1), miR-200c, breast cancer, Iau Science.

### Corresponding author:

Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran,

**Email:** mazizi528@gmail.com

## معرفی miR-200c به عنوان کاهنده بیان PD-L1 در رده‌های سلولی سرطان پستان

سارا حاجی بابایی<sup>۱</sup>، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی<sup>۱</sup>، ناهید نفیسی<sup>۲</sup>، سیروس زینلی<sup>۳</sup>، معصومه عزیزی<sup>۳\*</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، جراح متخصص، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. استاد انستیتو پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران

### چکیده:

**سابقه و هدف:** گیرنده ۱ پروتئین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PD-L1)، به عنوان یکی از مهم‌ترین مولکول‌های کنترل‌کننده سیستم ایمنی در انواع سرطان‌ها (از جمله سرطان پستان)، نقش بسزایی در سرکوب سیستم ایمنی علیه سلول‌های توموری ایفا می‌کند. miRNA ها، به عنوان ابزارها و اهداف درمانی امیدوارکننده، نقش مهمی در کنترل بیان PD-L1 دارند. در این مطالعه، با توجه به نقش احتمالی سرکوب‌کنندگی تومور miR-200c در سرطان پستان، مشارکت این miRNA در کاهش بیان PD-L1 و در نهایت کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی پستان بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا هدف‌گیری miR-200c بر روی 3'UTR ژن PD-L1 با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک و سپس با روش سنجش دوگانه لوسیفراز تایید شد. میزان بیان miR-200c و PD-L1 در رده‌های سرطانی پستان نسبت به رده غیرسرطانی پستان اندازه‌گیری شد. پس از ترانسفکشن miR-200c به درون رده‌های سلولی سرطان پستان، جهت بررسی اثر miR-200c بر میزان بیان PD-L1، روش qRT-PCR به صورت کمی مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای بررسی میزان تکثیر سلولی، آزمون MTT انجام گرفت.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر، با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک و سنجش لوسیفراز دوگانه، منطقه 3'UTR ژن PD-L1 به عنوان یک هدف برای miR-200c شناسایی و تایید شد. متعاقباً، نتایج ما نشان داد که کاهش بیان miR-200c در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان با افزایش بیان PD-L1 ارتباط مستقیم دارد (P value = 0.0158, r = -0.68). همچنین افزایش بیان miR-200c در سلول‌های رده سرطان پستان MDA-MB231، BT549 و MCF7، بیان PD-L1 را به میزان (به ترتیب ۲/۳±۰/۲۱۷، ۲/۰±۱۱/۰۲۱ و ۰/۱۴۶±۰/۰۱۲) کاهش داده است. بیان افزایش یافته miR-200c میزان تکثیر را در MDA-MB231 به میزان ۰/۱۲±۰/۴۵، BT549 به میزان ۰/۲±۰/۲۵۶ و در MCF7 به میزان ۰/۲±۰/۱۶۴ در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش داد. (میانگین ± SE)

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های ما نشان می‌دهد که miR-200c با هدف‌گیری مسیر PD-1/PD-L1 و کاهش میزان بیان PD-L1 و نیز کاهش تکثیر سلول‌های رده سرطانی پستان، ممکن است بتواند به عنوان یک عامل درمانی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان باشد.

**واژگان کلیدی:** miR-200c، PD-L1، سرطان پستان، Iau Science

نویسنده مسئول:

انستیتو پاستور ایران، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران

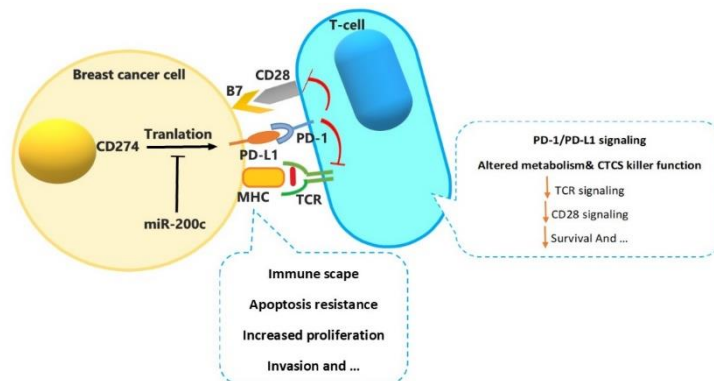
پست الکترونیکی: mazizi528@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵

کند (۴). مسیر لیگاند مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ (PD-L1) /گیرنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (PD-1) نقش مهمی در ایمنوتراپی ایفا می‌کند. PD-L1 با رشد و پیشرفت تومور مرتبط است و در سرطان‌های مختلف مانند ملانوما، سرطان سلول غیرکوچک ریه (NSCLC<sup>۲</sup>)، سرطان سلول‌های کلیوی، سرطان دست و گردن، و سرطان پستان به شدت بیان می‌شود (۱۰-۵). در حال حاضر مطالعات بسیاری در مورد نقش ذاتی PD-L1 در ترویج تومور و شروع سرطان، متاستاز، توسعه و مقاومت در برابر شیمی درمانی یا رادیوتراپی در حال ظهور است (۱۳-۱۱). با این حال، نقش PD-L1 در تنظیم رشد و پیشرفت سرطان پستان و مکانیسم اساسی آن نامشخص است. درمان سرطان فرد محور بر پایه ژنتیک در ۱۰ سال گذشته پیشرفت کرده است (۱۴). بنابراین نیاز فوری به کشف اهداف تشخیصی و درمانی جدید بر پایه مطالعات مولکولی برای بیماران مبتلا به سرطان وجود دارد (۱۵).

سرطان پستان یک نئوپلاسم شایع در سطح جهانی است که امروزه شیوع بالایی در زنان جوان دارد (۱). سرطان پستان سه گانه منفی<sup>۱</sup> TNBC ۱۵ تا ۲۰ درصد از انواع سرطان سینه را شامل می‌شود و به عنوان چالش برانگیزترین نوع فرعی این بیماری برای درمان است. TNBCها با عدم وجود گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) مشخص می‌شوند. علاوه بر این، مرحله پایانی TNBC اغلب با متاستاز به استخوان، کبد و مغز همراه است. اگرچه جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی ممکن است بقای بیماران TNBC را بهبود بخشد، اما اثربخشی محدودی دارند و نیز میزان مرگ و میر بیماران عودکننده همچنان بالا است. بنابراین، یک استراتژی درمانی جدید برای TNBCها مطلوب است. هدف گیری مولکولی و ایمنوتراپی سرطان نتایج امیدوارکننده‌ای را در درمان برخی سرطان‌ها از جمله ملانوما و سرطان ریه نشان داده است (۲). مطالعات بیشتر نشان داده اند که سرکوب سیستم ایمنی ناشی از تومور نه تنها مسئول پیشرفت تومور، بلکه در مهار درمان ضد تومور نیز موثر می‌باشد (۳). یکی از عناصر اصلی فرار سیستم ایمنی، لیگاند مرگ برنامه‌ریزی شده ۱ (PD-L1)، CD274 است که می‌تواند فعال شدن سلول‌های T را مهار



کچیده گرافیکی. طرحی از نقش  
مهارى miR-200c به عنوان  
miRNA سرکوب گر تومور در مهار  
بیان PD-L1 و در نهایت مهار مسیر  
سیگنالینگ PD-1/PD-L1.

<sup>2</sup> Non-small cell lung cancer

<sup>1</sup> Triple-negative breast cancer

سرطان پستان ارتباط مستقیم داشته است (۲۲). اعضای خانواده miR-200 می‌توانند با هدف قرار دادن PD-L1 و ZEB1، سلول‌های CD8+ T را فعال و متاستاز سلول‌های توموری در سرطان ریه را مهار کنند (۲۳). همچنین نشان داده شده است که miR-200c بیان PD-L1 را در کارسینوم کبدی کاهش داده و عملکرد سلول‌های CD8+ T را با واسطه HBV (Hepatitis B Virus) بازیابی کرده است (۲۴). یافته‌های اخیر نشان داده است که بیان بیش از حد PDE7B (Phosphodiesterase 7B) در سلول‌های سرطان پستان منفی دوگانه، که برای تکثیر سلول‌های سرطانی و توسعه تومور با تعدیل غلظت cAMP سلولی حیاتی بوده است، توسط miR-200c کنترل شده است (۲۵). در حالی که امروزه miRNA ها را می‌توان به طور معمول در سطح کل رونوشت مشخص کرد، روشن شدن اهمیت عملکردی miRNA ها در تومورزایی بسیار سودمند می‌باشد. شبکه تحقیقاتی اطلس ژنوم سرطان (TCGA) داده‌های ژنومی جامعی را برای بیش از ۱۱۰۰۰ نمونه تومور که ۳۳ نوع سرطان را نشان می‌دهند، تولید و در دسترس عموم قرار داده است. این منبع شامل داده‌هایی برای نمونه‌های تومور و نمونه‌های طبیعی مجاور آن است و بزرگترین نوع خود در سراسر جهان است (۲۶). استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک به عنوان منابعی برای ذخیره سازی، پردازش و تجزیه و تحلیل داده‌ها به شناسایی و اعتبارسنجی بیومارکرهای تشخیصی کمک زیادی کرده است (۲۷). در این مطالعه هدف ما، با توجه به نقش احتمالی سرکوب‌کنندگی تومور miR-200c در سرطان پستان، از طریق تجزیه و تحلیل ارتباط بین بیان miR-200c و PD-L1 در توسعه سرطان پستان، مشارکت miR-200c در مهار پیشرفت این بیماری پیش‌بینی شده است. ابتدا ما هدف‌گیری miR-200c را بر روی 3'UTR ژن PD-L1 با روش لوسیفراز دوگانه تأیید کردیم. در این مطالعه، به منظور تأیید تغییرات بیانی CD274 mRNA به دست آمده از Cytoscape، نمودارهای پروفایل بیان آنها را با ابزار تحلیل TCGA UALCAN بررسی کردیم. نتایج ما نشان داد که بیان miR-200c در رده‌های سلولی سرطان پستان در مقایسه با سلول‌های رده نرمال 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 miR-200c در رده‌های سلولی سرطان پستان، کاهش بیان PD-L1 را نشان دادیم. به منظور بررسی

اکثر mRNAهای پستانداران را می‌توان توسط microRNA ها (RNAهای کوچک غیر کدکننده، miRNAها) در سطح پس از رونویسی تنظیم کرد که منجر به خاموش شدن یا تخریب رونویسی می‌شود. miRNAها، RNAهای غیرکدکننده درون‌زای ۱۸ تا ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که بر فرآیندهای تومورزایی، از جمله تکثیر سلولی، آپوپتوز، تمایز، متاستاز و مقاومت دارویی تأثیر می‌گذارند. RNAهای کوچک می‌توانند با اتصال به ناحیه 3'UTR mRNA هدف به عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن باشند. miRNAها می‌توانند به عنوان یک نشان زیستی (Biomarker) احتمالی برای سرطان باشند و بر خلاف RNAهای دیگر در شرایط درون تنی (۱۶) و برون تنی (۱۷) پایدار می‌باشند. نشان زیستی‌ها عموماً به یک شاخص قابل سنجش از برخی حالت‌ها و شرایط بیولوژیکی و اطلاعات زیستی اشاره دارند. در حیطه تحقیقات پزشکی، از miRNAها در زمینه سرطان، جهت تشخیص بر مبنای پروفایل بیانی miRNA و طراحی داروهای هدفمند بر مبنای miRNA استفاده می‌شود. عدم تنظیم miRNAs در ارتباط با انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان (۱۸) گزارش شده است. علت اختلال در تنظیم miRNAها در سلول‌های توموری می‌تواند در نتیجه جهش، حذف ژنومی، تغییرات اپی ژنتیکی و یا تغییر در پردازش miRNAها باشد. بیان نادرست miRNA به صورت اولیه و یا سرکوب یک miRNA می‌تواند به صورت موثر در تومورزایی و یا پیشرفت تومور نقش داشته باشد (۱۹). در خانواده miR-200 پنج عضو وجود دارد که شامل: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 و miR-429 می‌باشد (۲۰). بر اساس محل قرارگیری هر کدام از miRNAهای خانواده 200، این microRNAها به دو گروه تقسیم بندی می‌شوند. miR-200a, miR-200b و miR-429 که بر روی کروموزوم 1p36، و miR-200c و miR-141 بر روی کروموزوم ۱۲p۱۳ قرار گرفته‌اند. miR-200c به عنوان یک سرکوب‌کننده تومور قادر به تنظیم مهاجرت سلولی، تکثیر، مقاومت دارویی و اختلالات متابولیسم است (۲۱). در مطالعه Antolín و همکارانش که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با نمونه نرمال انجام شد، میزان بیان miR-141 و miR-200c گردش در خون با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. این گروه نشان دادند که میزان بیان این دو miRNA در بیماران مبتلا به سرطان پستان نقش کنترلی داشته‌اند و میزان بیان آنها با چگونگی پیشرفت

## ترانسفکت microRNA

miRNA Scrambled (بههم‌ریخته)، به عنوان 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-200c (mimic) (غلظت DNA وکتور حاوی این ژن توسط دستگاه NanoDrop (ThermoScientific, Hyperfect (2000c, USA) اندازه‌گیری گردید)، محلول Transfection Reagent (Qiagen, Germany) اضافه شد و در یک میکروتیوب دیگر miRNA scrambled با غلظت نهایی 100nM به Attraccant Transfection Reagent (Qiagen, Germany)، به صورت جداگانه، اضافه و سپس به سلول‌ها ترانسفکت شدند. پس از شش ساعت، محیط انتقال با یک محیط تازه حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. رده‌های سلولی ترانسفکت شده ۴۸ ساعت پس از انتقال microRNA جهت بررسی تاثیر بر میزان بیان PD-L1 برداشت شدند.

## آزمون سنجش دوگانه لوسیفرافز

از روش سنجش دوگانه لوسیفرافز برای تأیید تعامل مستقیم بین miR-200c و 3'UTR ژن هدف استفاده شد. در انجام این آزمایش، برای تکثیر 3'UTR ژن PD-L1 از پرایمرهای اختصاصی PD-L1 (طبق جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های BT549، MDA-MB231 و MCF7، طور جداگانه با وکتور حاوی 3'UTR ژن PD-L1 و miR-200c (mimic) یا scrambled بودند، به صورت همزمان ترانسفکت شدند. طبق دستورالعمل کیت لوسیفرافز (Promega, USA)، فعالیت لوسیفرافز ۴۸ ساعت پس از انتقال، میزان نور منتشره توسط دستگاه POLAR star Omega (BMG LABTECH, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

عملکرد miR-200c، اثر آن بر روی تکثیر سلولی سنجیده شد.

## روش بررسی

### پیش بینی بیوانفورماتیک

ما الگوریتم‌های بیوانفورماتیک از جمله miRanda، PicTar و TargetScan 4.0 را برای شناسایی ژن‌های بالقوه هدف miR-200c ادغام کرده‌ایم. طبق تجزیه و تحلیل پیش بینی شده، در 3'UTR ژن PD-L1 یک محل اتصال احتمالی miR-200c در نظر گرفته شده است. برای تأیید تعامل هدف miR-200c 3'UTR ژن PD-L1 را در ژن Renilla luciferase در وکتور psiCHECKTM-2 کلون کردیم. این پلاسمید همزمان با miR-200c یا miRNA scrambled (بههم‌ریخته) در سلول‌های MDA-MB231، BT549 و MCF7 ترانسفکت شد.

### کشت سلولی

در این مطالعه آزمایشگاهی، سلول‌های سرطانی پستان رده-های MDA-MB231، BT549 و MCF7 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (Iranian Biological Resources center, IBRC, Tehran, Iran) و رده سلولی غیر سرطانی پستان MCF10a (به عنوان کنترل) 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٪ پنی سیلین/استرپتومایسین استریل در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و هوای مرطوب حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> در فلاسک‌های ۲۵ میلی لیتری کشت داده شدند.

### سکانس پرایمرها برای PCR و Real-time PCR

ژن	سکانس الیگونوکلیوتیدها از ۵' به ۳'
PD-L1	Forward: CCGCTCGAGCAGATACACATTTGGAGGAGA Reverse: ATAAGAATGCGGCCGCTGTGCAGGATTCAAAAGCAT
Gene	Sequence of oligonucleotides from 5' to 3' for real time-PCR analysis
PD-L1	Forward: GTGATCCGCTGCATGATCAG Reverse: GGTAGCCCTCAGCCTGACATG
GAPDH	Forward: CTCTCTGCTCCTCCTGTTCG Reverse: ACGACCAAATCCGTTGACTC
miR-200c-3p	Forward: CACGCCTAATACTGCCGGGT Reverse: GTATGCAGAGCAGGGTCC
Stem loop miR-200c-3p	CAATTAGACTACACCTGTCCGGTCCCTGCGTCCTGTAGTCTAATTG <b>TCCATC</b>

جدول ۱. توالی پرایمری مورد استفاده در مطالعه

### آزمون MTT

سنجش تکثیر سلولی با استفاده از 3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Schnellendorf, Germany) انجام شد. به طور خلاصه  $3 \times 10^4$  سلول از سلول‌های BT549، MDA-MB231 و MCF7، در هر چاه یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (Jet Biofil, Guangzhou, China) افزوده شدند. پس از آن سلول‌ها با pre-miR-200c یا کنترل منفی طبق پروتکل ذکر شده قبلی ترانسفکت شدند. پس از ۷۲ ساعت، سلول‌ها با MTT (۵۰۰ میکروگرم / میلی لیتر) انکوبه شدند. ۴ ساعت بعد مواد رویی دور ریخته شد و فرمازان نامحلول توسط دی متیل سولفوکسید حل شد. چگالی نوری در ۵۴۰ نانومتر (طول موج مرجع: ۶۳۰ نانومتر) و سپس سلول اندازه گیری شد. چگالی نوری در ۵۴۰ نانومتر (طول موج مرجع: ۶۳۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد و سپس زنده‌مانی سلول نسبت به سلول‌های کنترل درمان نشده تعریف شد. یعنی زنده ماندن برابر  $100 \times$  (جذب نمونه تیمار شده) / (جذب کنترل)). تمام آزمایشات سه بار تکرار شد و میانگین نتایج محاسبه شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real time qRT- به منظور تغییر بیان ژن PD-L1 توسط ورود miR-200c به سلول‌ها، Total RNA از سلول‌ها استخراج شد (توسط کیت استخراج RNA (Qiagen, Germany, RNA). غلظت RNA توسط دستگاه Nano DROP اندازه‌گیری شد و با تعیین نسبت جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰A کیفیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت. سنتز cDNA برای miR-200c و U47 (RNA کوچک هسته‌ای) به عنوان کنترل داخلی توسط پرایمرهای stem loop (طبق جدول ۱) انجام شد (توسط کیت Takara, Japan) Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان miR-200c به وسیله‌ی دستگاه Step one plus و master mix (طبق جدول ۱) انجام شد. همچنین برای بررسی میزان بیان PD-L1 در سلول‌های رده سرطانی و غیر سرطانی پستان نیز از پرایمرهای اختصاصی PD-L1 (طبق 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 ارئه شد. در پایان تغییر و میزان بیان ژن‌ها از متد  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده شد و میزان Fold change گزارش گردید.

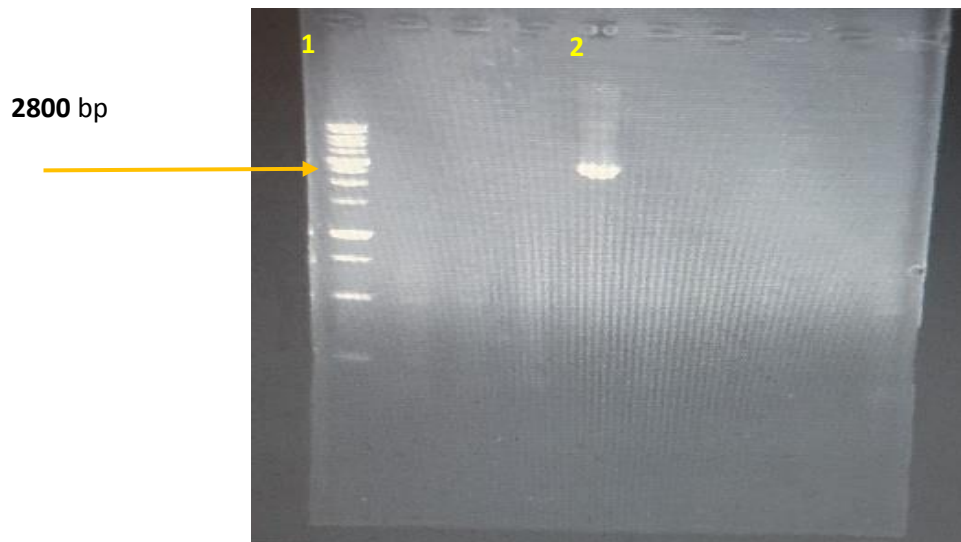
## آنالیز آماری

از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲، Inc. SPSS V.22 (Chicago, IL) جهت بررسی آماری داده‌ها استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در رده سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی پستان از آزمون آماری t استفاده شد. ارتباط بین میزان بیان PD-L1 و miR-200c با روش ANOVA سنجیده شد. برای رسم نمودار از نرم افزار GraphPad prism V.8 استفاده شد.

## نتایج

قطعه 3'UTR ژن PD-L1 در وکتور psi-check2 کلون و توالی یابی شد:

در انتهای 5' پرایمرهای forward و reverse، توالی محدود به آنزیم‌های محدودکننده Not1/Xho1 قرار داده شدند. پرایمرها از لحاظ اتصال به نقاط دیگر ژنومیک، در NCBI Blast مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پرایمرها دارای اتصال اختصاصی به توالی مورد نظر هستند. پس از انجام PCR با آنزیم Pfu polymerase (که دارای خاصیت باز آرایبی یا اگزونوکلئازی از انتهای 5' → 3' می باشد و قطعه ی 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 می کند)، فرآورده بر روی ژل الکتروفورز ران و تائید شد.

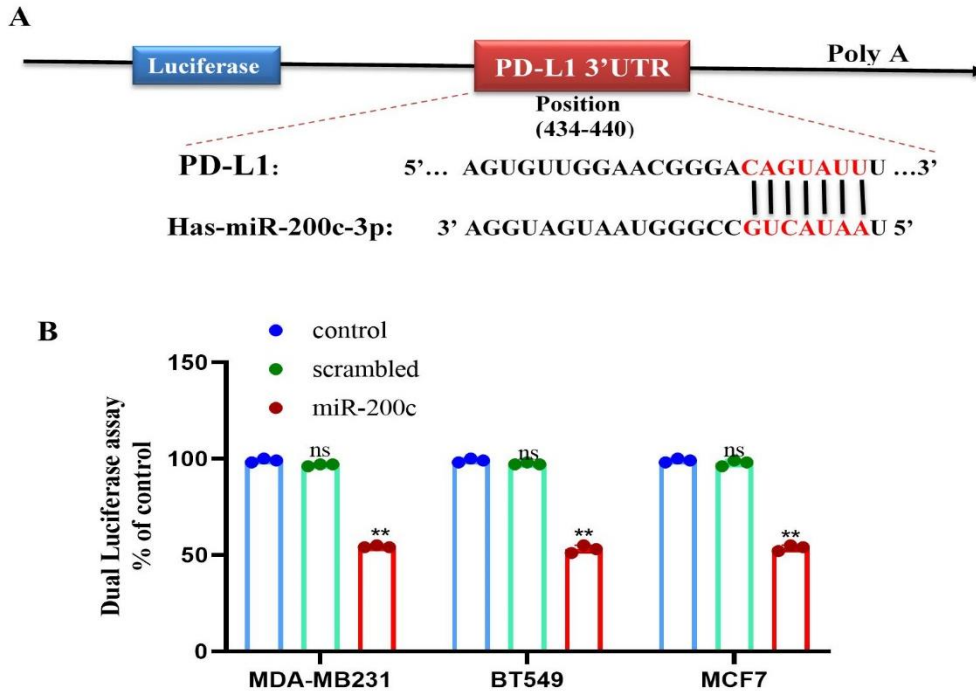


شکل ۱. آشکارسازی فرآورده PCR 3'UTR ژن PD-L1 روی ژل. ردیف ۱: Ladder (1kb)، ردیف ۲: کلونی مثبت حاوی قطعه 3'UTR (2800bp) مربوط به ژن PD-L1 در داخل وکتور psi-check2 که در باکتری Top 10 F' رشد کرده‌اند.

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 2B نشان داده شده است، miR-200c در مقایسه با الیگونوکلئوتید بهم‌ریخته، فعالیت لوسیفرز را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. انتقال miR-200c به MDA-MB231، BT549 و MCF7، فعالیت لوسیفرز را به ترتیب به میزان  $0.24 \pm 0.67\%$ ،  $0.31 \pm 0.66\%$  و  $0.57 \pm 0.46\%$  کاهش داد.

پیش بینی miR-200c به عنوان 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 پیش بینی شده است که احتمالاً ژن PD-L1 با miR-200c کنترل شود. در شکل شماره 2A، نحوه اتصال 3'UTR در ژن PD-L1 و miR-200c و همچنین محل



شکل ۲: هدف گیری PD-L1 توسط miR-200c-3p در سلول های رده ی سرطان پستان.

**A** miR-200c دارای نقاط اتصال در 3'UTR PD-L1 انسان است. **B** سنجش دوگانه لوسیفراز انجام در سلول های رده ی سرطان پستان با miR-200c انجام و کاهش فعالیت نسبی لوسیفراز Renilla مشاهده شد، در حالی که هیچ اثری با miRNA به هم ریخته ریخته تشخیص داده نشد.  $p < .01$ ; ns = nonsignificant

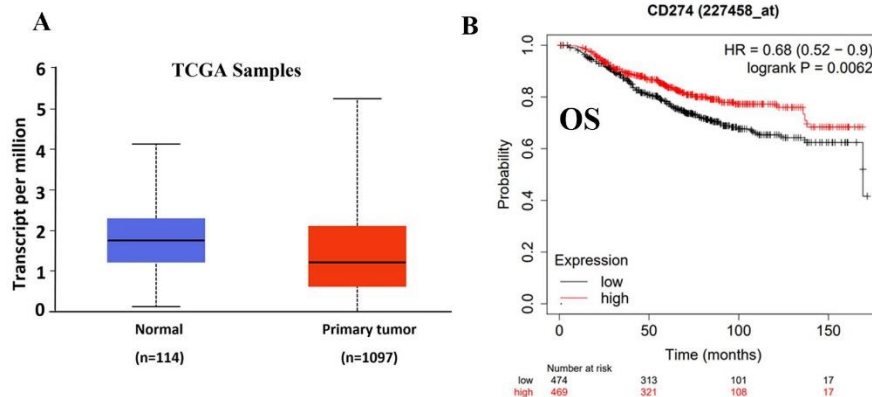
Kaplan-Meier در شکل 3B نمایش داده شده است. بیان mRNA PD-L1 با بقای کلی OS (Overall Survival) در ۱۸۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مرتبط بود (at\_۲۲۷۴۵۸) بقای بیماران با بیان بالای PD-L1، در طی یک پروسه ۱۵۰ ماهه، به طور معناداری کوتاه تر از بیماران با بیان پایین PD-L1 منفی گزارش شده است.

### اعتبارسنجی بیان ژن PD-L1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

نتیجه UALCAN برای پروفایل بیان ژن PD-L1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان تهاجمی، افزایش بیان این ژن را تایید کرد (شکل 3A). همچنین منحنی بقا برای بیماران مبتلا به سرطان پستان بر اساس بیان PD-L1 توسط



مقاله پژوهش



شکل ۳. نمودارهای جعبه بیان ژن و بقای Kaplan-Meier بیماران مبتلا به سرطان پستان با سطوح مختلف بیان .

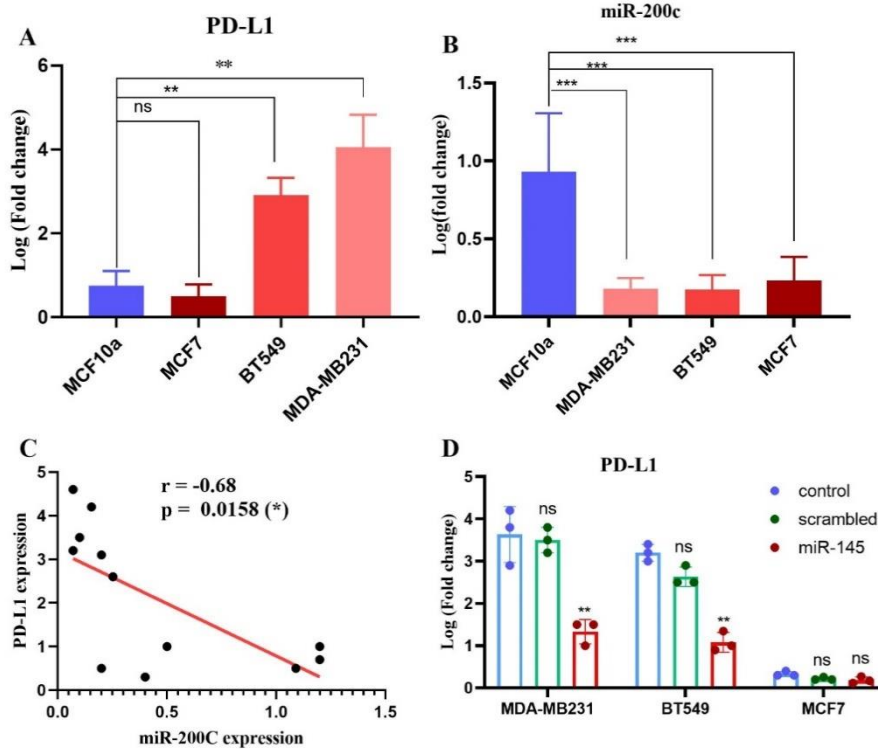
**A PD-L1** جعبه آبی (نوار سمت چپ) نمونه های طبیعی و کادر قرمز (نوار سمت راست) نمونه‌های تومور اولیه را بیماران مبتلا به سرطان پستان (پایگاه داده اطلس ژنوم انسان (TCGA) با استفاده از UALCAN) نشان می‌دهد. **B** منحنی بقای Kaplan-Meier از بیان PD-L1.

پستان در مقایسه با رده سلولی غیر سرطانی پستان به صورت معناداری کاهش یافته بود، (شکل 4B). بین کاهش بیان miR-200c و افزایش بیان PD-L1 در سلول‌های سرطان پستان رابطه مستقیم وجود دارد (شکل 4C). پس از آن، سطوح mRNA PD-L1 با روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. بیان افزایش یافته miR-200c سطح mRNA PD-L1 را در MDA-MB231 به میزان  $0.217 \pm 0.023$ ، در BT549 به میزان  $0.21 \pm 0.11$  و در MCF7 به میزان  $0.12 \pm 0.0146$ ، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش داد (شکل 4D).

**معرفی miR-200c به عنوان miRNA سرکوب‌گر بیان انکوژن PD-L1 در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان**

برای تأیید این فرضیه که بیان بیش از حد miR-200c بیان mRNA PD-L1 را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش می‌دهد، miR-200c یا اولیگونوکلوئید بهم‌ریخته به رده های سلولی MDA-MB231، BT549 و MCF7 ترانسفکت شد. قبل از ترانسفکت، میزان بیان PD-L1 (شکل 4A) بررسی و نیز جهت تایید طول قطعه تکثیر یافته، محصول نهایی Real-time PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ آشکار گردید. همچنین میزان بیان miR-200c در سلول‌های رده سرطان

مقاله پژوهش



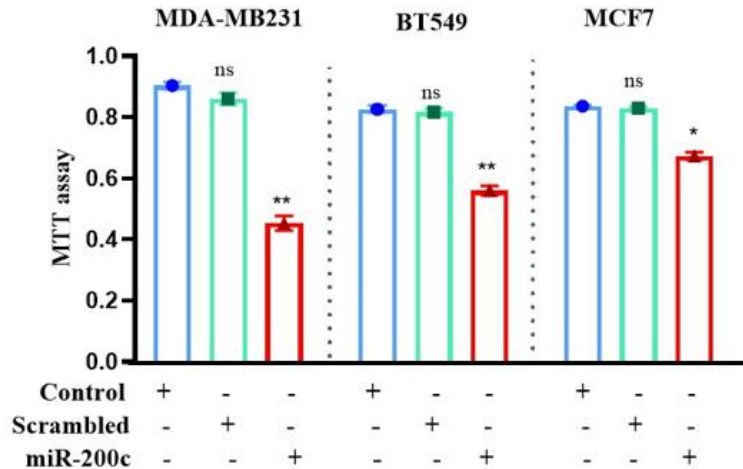
شکل ۴. بیان PD-L1 و miR-200c در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان. A

سلول‌های رده‌ی سرطان پستان به طور معناداری منجر به کاهش بیان PD-L1 شده است.  $p < 0.001$ ،  $p < 0.01$ ،  $p < 0.1$ ، ns نشان دهنده عدم معناداری داده‌ها از نظر آماری است.

**miR-200c از تکثیر سلول‌های رده سرطان پستان جلوگیری کرد**

تکثیر را در MDA-MB231 به میزان  $0.012 \pm 0.45$ ، BT549 به میزان  $0.256 \pm 0.2$  و در MCF7 به میزان  $0.164 \pm 0.02$ ، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت نشده کاهش داد. (میانگین  $\pm$  SE). سطح سلول T فعال شده، حاوی PD-1 است. هر دو سلول‌های ایمونولوژیک و سرطانی پروتئین PD-L1 را در سطح خود بیان می‌کنند. با اتصال به PD-1، PD-L1 از فعال شدن سلول‌های T جلوگیری می‌کند (شکل ۵)

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 miR-200c در سلول‌های رده سرطان پستان در مقایسه با سلول رده‌ی غیر سرطانی پستان با استفاده از روش qRT-PCR. C ارتباط معنی دار بین افزایش بیان PD-L1 با کاهش بیان miR-200c در سلول‌های رده‌ی سرطان پستان. D افزایش بیان miR-200c در رده‌های سلولی سرطانی پستان، ما تأثیر این miR را بر تکثیر سلولی رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549 و MCF7 ارزیابی کردیم. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، ۷۲ ساعت پس از انتقال miR-200c به این رده‌های سلولی، تکثیر این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های غیر ترانسفکت شده کاهش یافته است. بیان افزایش یافته miR-200c میزان



شکل ۵. نتایج حاصل از تست MTT سلول‌های رده سرطانی پستان. پس از ۷۲ ساعت از بیان افزایش یافته miR-200c.  $p < 0.01$ , \*\* ns نشان دهنده عدم معناداری داده‌ها از نظر آماری است.

## بحث

L1 در بافت‌های تومور، به عنوان یک نشانگر، پاسخگویی به درمان‌های ICB را پیش‌بینی می‌کند (۲۸). با این وجود، پاسخگویی به درمان‌ها برای سرطان پستان و سایر انواع سرطان در مراحل پیشرفته برتری نداشته است (۴). مکانیسم‌های مقاومت در برابر درمان‌های ضد PD-1/PD-L1 پیچیده است. مطالعات اخیر نشان داد که فسفوریلاسیون تیروزین و گلیکوزیلاسیون سطحی PD-L1 نقش کلیدی در ارتقای ثبات پروتئین و عملکرد سرکوب‌کننده سیستم ایمنی PD-L1 ایفا می‌کند (۲۹،۳۰). قابل توجه است که PD-L1 گلیکوزیله نیز می‌تواند در برابر تشخیص ایمنوهایستوشیمی محافظت شود و مانع از ارزیابی دقیق وضعیت بیان این ژن در سطح پروتئین، در بافت‌های توموری، می‌شود (۳۱). همچنین، نشان داده شده است که علاوه بر عملکرد سرکوب‌کننده سیستم ایمنی از طریق تعامل با PD-1، PD-L1 درون سلولی که از حمله آنتی‌بادی‌های درمانی در امان است، با شرکت در ترمیم آسیب DNA، مقاومت به شیمی‌درمانی را تقویت می‌کند (۳۲). بنابراین، سرکوب بیان ژن PD-L1 توسط استراتژی‌های مولکولی مانند miRNA‌ها بعد مکرری را ارائه می‌دهد که مزیت منحصر به فردی از ریشه‌کن کردن عملکردهای توموری تنظیم شده توسط محور PD-1/PD-L1 را به ارمغان می‌آورد و می‌تواند به سایر مسیرهای ایست بازرسی ایمنی گسترش یابد. با استناد به استراتژی بیوانفورماتیک می‌توان بینشی را در مورد بررسی شبکه‌های ژن miRNA مربوط به مکانیسم ایست بازرسی ایمنی ارائه

با معرفی پروتئین مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (PD-1) / لیگاند مرگ برنامه‌ریزی شده (PD-L1) که مهارکننده‌های ایست بازرسی ایمنی را هدف قرار می‌دهد، پس از سال‌ها تحقیق، پیشرفت قابل توجهی در درمان سرطان پستان حاصل شده است. محور PD-L1/PD-1 که می‌تواند بین سلول‌های تومور و سلول‌های ایمنی عملکردی تشکیل شود، می‌تواند پاسخ‌های ایمنی ضد تومور را مهار و فرار سیستم ایمنی را ارتقا دهد. آگاهی از عوامل ایجادکننده تنظیم بیان PD-L1، علاوه بر اینترفرون‌ها، به دلیل عملکرد آن در سرکوب سیستم ایمنی بسیار مورد نیاز می‌باشد. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان PD-L1، به عنوان یک انکوژن، در رده‌های سرطانی سلول‌های MDA-MB231 و BT549 در مقایسه با رده‌ی سلولی MCF7 و رده سلولی نرمال پستان MCF10a به شدت افزایش می‌یابد. همچنین با استناد به پایگاه داده‌ی اطلس ژنوم انسان (TCGA)، سطح بیان PD-L1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان نسبت به نمونه نرمال، به طور میانگین، افزایش یافته و نیز میزان بقای بیماران PD-L1 مثبت نسبت به PD-L1 منفی کاهش یافته است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که دامین خارج سلولی PD-1 و PD-L1 متصل به غشاء را به عنوان مهارکننده‌های ایست بازرسی ایمنی (ICB) تشخیص می‌دهند، به طور فزاینده‌ای برای درمان سرطان به کار گرفته شده‌اند. بیان PD-1 و PD-

همکارانش در سال ۲۰۲۱، اثر ژن‌های هدف miR-200c-3p در سلول‌های SKOV3 ترانسفکت شده با miR-200c مورد ارزیابی قرار دادند. این گروه اعلام داشتند که افزایش بیان miR-200c-3p به‌طور همزمان بیان PD-L1، c-Myc و  $\beta$ -کاتنین را کاهش داده و سلول‌های سرطانی تخمدان را حساس کرد. این یافته‌ها بینش جدیدی را در مورد آن که چگونه miR-200c می‌تواند برای کنترل اثرات نامطلوب شیمی درمانی معمولی، درمان هدفمند و پرتودرمانی استفاده شود را ارائه می‌دهد و می‌تواند یک استراتژی درمانی جدید برای درمان سرطان تخمدان اپی تلیال باشد. همین‌طور نشان داده شد که miR-200c به‌طور مستقیم ناحیه 3'UTR مربوط به ژن PD-L1 را مورد هدف قرار داده و بیان آن را تنظیم می‌نماید (۴۱). در مطالعه حاضر، با استفاده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک، ما منطقه 3'UTR ژن PD-L1 را به عنوان یک هدف بالقوه برای miR-200c شناسایی کردیم، که نقش احتمالی آن را در فرار سلول‌های توموری از سیستم ایمنی نشان می‌دهد. متعاقباً سنجش لوسیفراز دوگانه تأیید کرد که miR-200c 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 نشان دادیم که تنظیم نادرست miR-200c در سلول‌های رده سرطان پستان با افزایش بیان PD-L1 ارتباط مستقیم دارد که نشان می‌دهد miR-200c ممکن است در تنظیمات پس از رونویسی بیان PD-L1 نقش داشته باشد. در مطالعه حاضر کاهش میزان PD-L1 پس از ترانسفکت miR-200c، ناشی از صحیح بودن ترانسفکت و داشتن عملکرد قابل قبول جهت افزایش بیان ژن تومورسایپرسور miR-200c در سلول‌های رده سرطان پستان می‌باشد. علاوه بر این، با افزایش بیان miR-200c در سلول‌های رده سرطان پستان تأکید کردیم که miR-200c می‌تواند تکثیر سلول‌های رده سرطان پستان، نسبت به نمونه‌های ترانسفکت نشده و ترانسفکت شده با miR به هم ریخته، با هدف قرار دادن مستقیم PD-L1، به‌طور معناداری کاهش دهد. با توجه به نتایج حاصله و محدودیت‌های این مطالعه پیشنهاد می‌شود که بررسی میزان بیان miR-200c در دیگر رده‌های سلولی سرطان پستان، در مدل حیوانی که توالی‌های پیشساز و بازدارنده miR-200c به آن تزریق شده است، در نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان، مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین با استفاده از تست‌های مکمل ارتباط بیان miR-200c با ژن هادر سطح پروتئومیک

کرد (۳۳). پژوهش‌هایی که طی دهه‌ها سال بر روی miRNA-سرطان انجام شد، منجر به کشف پتانسیل درمانی miRNA گردید که شاهدهی بر این مدعاست که miRNA ها، به عنوان اهداف فارماکولوژیک، دارای اثراتی افزون بر درمان‌های حال حاضر هستند (۳۴). گزارش شده است که سرکوب کننده تومور p53 می‌تواند بیان PD-L1 را با فعال کردن بیان اعضای خانواده miR-34a، miR-34b، miR-34c و miR-34c مهار کند، که به نوبه خود PD-L1 را با اتصال به 3'UTR آن در سرطان ریه سلول غیر کوچک تنظیم می‌کند (۳۵). در مطالعه حاضر که بر روی رده‌های سلولی MDA-MB231، BT549 و MCF7 انجام گرفته است، ابتدا با استفاده از پایگاه‌های داده miRNA و ابزارهای بیوانفورماتیک، ژن PD-L1 به عنوان هدف احتمالی miR-200c در نظر گرفته شد و بیان این miR و ژن هدف (PD-L1) در سه گروه سلول ترانسفکت شده با وکتور پیشساز miR-200c، به هم ریخته و سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل اندازه‌گیری شده است. مطالعات دیگری میزان بیان این miRNA را در رده سلولی MCF7 سنجیده اند، اما هدف آنها یا هدف قرار دادن ژن دیگری بوده است (۳۶) و یا مقایسه ی پروفایل بیانی miR-200c با سایر miRNA ها (۳۷) و یا مقایسه آن با رده‌های مقاوم به دارو (۳۸) بوده است. تفاوت این مطالعات با مطالعه حاضر انتخاب رده‌های سلولی و نوع ژن هدف گیرنده miR-200c می‌باشد. خانواده miR-200 نقش مهمی در ایجاد تومور و هم در سایر تومور و همچنین در پیشرفت تومور، متاستاز، تهاجم و پاسخ به درمان ایفا می‌کنند. miR-200c به عنوان عضوی از خانواده miR-200 تقسیم بندی می‌شود که نقش مهمی در سرکوب تومور ایفا کرده و کاهش بیان آن در افزایش مرگ و میر بیماران مبتلا به سرطان پستان نقش دارد (۴۰، ۳۹). در مطالعه‌ای که Cailu Song و همکارانش در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، نشان داده شد که ترانسفکت سلول‌های رده سرطان پستان توسط miR-200c باعث مهار بیان KRAS شده است.

## نتیجه‌گیری

تکثیر و بقای سلول‌های سرطان پستان را در شرایط آزمایشگاهی و درون بدن سرکوب کرد. همچنین miR-200c با تنظیم منفی KRAS در یک مدل موش زنوگرافت، اثر ضد توموری داشت (۳۶). همچنین Eleni Anastasiadou و

### مقاله پژوهش

نیزموردارزیابی قرار گیرد. یافته‌های ما نشان می‌دهد که miR-200c با هدف‌گیری مسیر PD-1/PD-L1 و کاهش میزان بیان PD-L1 و نیز کاهش تکثیر سلول‌های رده سرطانی پستان، ممکن است بتواند به عنوان یک عامل درمانی برای جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان باشد.

## منابع

1. He Y, Jiang Z, Chen C, Wang X. Classification of triple-negative breast cancers based on Immunogenomic profiling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(1):1-13.
2. Sharma P. Biology and management of patients with triple-negative breast cancer. *The oncologist*. 2016;21(9):1050-62.
3. Liao Y, Chen L, Feng Y, Shen J, Gao Y, Cote G, et al. Targeting programmed cell death ligand 1 by CRISPR/Cas9 in osteosarcoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(18):30276.
4. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3384-91.
5. Gupta HB, Clark CA, Yuan B, Sareddy G, Pandeswara S, Padron AS, et al. Tumor cell-intrinsic PD-L1 promotes tumor-initiating cell generation and functions in melanoma and ovarian cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. 2016;1(1):1-9.
6. Chen L, Xiong Y, Li J, Zheng X, Zhou Q, Turner A, et al. PD-L1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in human esophageal cancer. *Cellular physiology and biochemistry*. 2017;42(6):2267-80.
7. Li Y, Yang X, Wu Y, Zhao K, Ye Z, Zhu J, et al. B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2017;8(42):71725.
8. Dai W, Shen G, Qiu J, Zhao X, Gao Q. Aberrant expression of B7-H3 in gastric adenocarcinoma promotes cancer cell metastasis. *Oncology reports*. 2014;32(5):2086-92.
9. Kraft S, Fernandez-Figueras M-T, Richarz NA, Flaherty KT, Hoang MP. PDL1 expression in desmoplastic melanoma is associated with tumor aggressiveness and progression. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;77(3):534-42.
10. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a Role of the PD-1: PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer research*. 2013;73(6):1733-41.
11. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(49):17174-9.
12. Muenst S, Schaerli A, Gao F, Däster S, Trella E, Drosner R, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2014;146(1):15-24.
13. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical cancer research*. 2007;13(7):2151-7.
14. Chen G, Noor A, Kronenberger P, Teugels E, Umelo IA, De Greve J. Synergistic effect of afatinib with su11274 in non-small cell lung cancer cells resistant to gefitinib or erlotinib. *PloS one*. 2013;8(3):e59708.
15. Brothers JF, Hijazi K, Mascaux C, El-Zein RA, Spitz MR, Spira A. Bridging the clinical gaps: genetic, epigenetic and transcriptomic biomarkers for the early detection of lung cancer in the post-National Lung Screening Trial era. *BMC medicine*. 2013;11(1):1-15.
16. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7073):769-73.
17. Tang F, Hajkova P, Barton SC, Lao K, Surani MA. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic acids research*. 2006;34(2):e9-e.
18. Hajibabaei S, Sotoodehnejadnematalahi F, Nafisi N, Zeinali S, Azizi M. Inhibitory Effect of miRNA-145 on PD-L1 Expression in Breast Cancer Cell Line. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease*. 2022;14(4):45-61.

19. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*. 2006;6(11):857-66.
20. Huang G-L, Sun J, Lu Y, Liu Y, Cao H, Zhang H, et al. MiR-200 family and cancer: From a meta-analysis view. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;70:57-71.
21. Mutlu M, Raza U, Saatci Ö, Eyüpoğlu E, Yurdusev E, Şahin Ö. miR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance. *Journal of Molecular Medicine*. 2016;94(6):629-44.
22. Antolín S, Calvo L, Blanco-Calvo M, Santiago MP, Lorenzo-Patiño MJ, Haz-Conde M, et al. Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer. *BMC cancer*. 2015;15(1):1-15.
23. Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature communications*. 2014;5.۱۲-۱:(۱)
24. Sun C, Lan P, Han Q, Huang M, Zhang Z, Xu G, et al. Oncofetal gene SALL4 reactivation by hepatitis B virus counteracts miR-200c in PD-L1-induced T cell exhaustion. *Nature communications*. 2018;9(1):1-17.
25. Zhang D-D, Li Y, Xu Y, Kim J, Huang S. Phosphodiesterase 7B/microRNA-200c relationship regulates triple-negative breast cancer cell growth. *Oncogene*. 2019;38(7):1106-20.
26. Chu A, Robertson G, Brooks D, Mungall AJ, Birol I, Coope R, et al. Large-scale profiling of microRNAs for the cancer genome atlas. *Nucleic acids research*. 2016;44(1):e3-e.
27. Wang M, Xie T, Fan J. Identification of Hub Genes with Prognostic Values in Lung Cancer by Bioinformatics Analysis. *Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics*. 2019;3(3):131-6.
28. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(22):2108-21.
29. Chan L-C, Li C-W, Xia W, Hsu J-M, Lee H-H, Cha J-H, et al. IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(8):3324-38.
30. Hsu J-M, Li C-W, Lai Y-J, Hung M-C. Posttranslational modifications of PD-L1 and their applications in cancer therapy. *Cancer research*. 2018;78(22):6349-53.
31. Li C-W, Lim S-O, Chung EM, Kim Y-S, Park AH, Yao J, et al. Eradication of triple-negative breast cancer cells by targeting glycosylated PD-L1. *Cancer cell*. 2018;33(2):187-201. e10.
23. Tu X, Qin B, Zhang Y, Zhang C, Kahila M, Nowsheen S, et al. PD-L1 (B7-H1) competes with the RNA exosome to regulate the DNA damage response and can be targeted to sensitize to radiation or chemotherapy. *Molecular cell*. 2019;74(6):1215-26. e4.
33. Smolle MA, Calin HN, Pichler M, Calin GA. Noncoding RNA s and immune checkpoints—clinical implications as cancer therapeutics. *The FEBS journal*. 2017;284(13):1952-66.
34. Soriano A, Jubierre L, Almazán-Moga A, Molist C, Roma J, De Toledo JS, et al. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacological research*. 2013;75:3-14.
35. Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108.(۱)
36. Song C, Liu L-Z, Pei X-Q, Liu X, Yang L, Ye F, et al. miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget*. 2015;6(33):34968.
37. Zhang G, Zhang W, Li B, Stringer-Reasor E, Chu C, Sun L, et al. MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT5B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2017;19(1):1-13.

38. Armada A, Gomes BC, Viveiros M, Rueff J, Rodrigues AS. Regulation of ABCB1 activity by microRNA-200c and microRNA-203a in breast cancer cells: the quest for microRNAs' involvement in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resistance*. 2019;2:897-911.
39. Jo H, Shim K, Jeoung D. Potential of the miR-200 Family as a Target for Developing Anti-Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):5881.
40. Kawaguchi T, Yan L, Qi Q, Peng X, Gabriel EM, Young J, et al. Overexpression of suppressive microRNAs, miR-30a and miR-200c are associated with improved survival of breast cancer patients. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
41. Anastasiadou E, Messina E, Sanavia T, Mundo L, Farinella F, Lazzi S, et al. Mir-200c-3p contrasts pd-11 induction by combinatorial therapies and slows proliferation of epithelial ovarian cancer through downregulation of  $\beta$ -catenin and c-myc. *Cells*. 2021;10.5۱۹:(۳)