

Correlation between resistance to trastuzumab and miR-141 relative expression in the BT-474 human breast cancer cell line

Zohreh Rezaei¹, Dor Mohammad Kordi-Tamandani¹, Ahmadreza Sebzari², Kazem Dastjerdi³

Background and Aim: Resistance to trastuzumab has been a critical barrier to targeted therapy of HER 2-positive (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) breast cancers. MicroRNAs (miRNAs) are known as decisive core regulators of drug resistance that modulate the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and cancer-related immune responses. The present study aimed at examining the expression of miR-141 in trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive BT-474 breast cancer cells.

Materials and Methods: In this experimental study, trastuzumab-resistant BT-474 cells were generated by continuous in-vitro culture of BT-474 cells in the presence of trastuzumab for six months. The relative expression of miR-141 to U6 RNA was then evaluated in trastuzumab-resistant and trastuzumab-sensitive cells using Relative Real-Time PCR. Mann-Whitney test was used to compare the difference between the two groups.

Results: There was a significant difference between the survival rates of resistant BT-474 cells and sensitive cells in the MTT test in the presence of different concentrations of trastuzumab showing that BT-474 breast cancer cells have turned resistant to this drug under long-term culture (P=0.001). Also, the expression of miR-141 in trastuzumab-resistant cells was significantly reduced by four times compared with the BT-474 parent cells (P=0.049).

Conclusion: Down-regulation of miR-141 in trastuzumab-resistant BT-474 cells might be one possible mechanism for resistance against trastuzumab and an indication of the role of this microRNA in controlling the metastasis pathway.

Key Words: Breast cancer, erbB2/HER2, Trastuzumab resistance, miR-141

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24(3): 170-178.

Received: 26 October, 2017

Accepted: 5 November, 2017

¹ Department of Biology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

² Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ **Corresponding Author;** Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand
Email: Dastjerdi1974@hotmail.com

مطالعه ارتباط مقاومت به تراستوزوماب با بیان نسبی میکروآران‌ای ۱۴۱ (miR-141) در سلول‌های انسانی سرطانی پستان BT-474

زهره رضائی^۱، درمحمد کردی تمندانی^۱، احمدرضا سبزاری^۲، کاظم دستجردی^۳

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به تراستوزوماب (هرسپتین)، تبدیل به یک مانع بزرگ برای درمان هدفمند سرطان پستان از نوع HER2 مثبت (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) شده است. میکروآران‌ای‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی مقاومت دارویی شناخته شده‌اند که در تنظیم انتقال از حالت اپی‌تلیالی به حالت مزانشیمی Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) و پاسخ‌های ایمنی مرتبط با سرطان نقش دارند. هدف از این مطالعه، بررسی بیان miR-141 در سلول‌های BT-474 سرطان پستان مقاوم و حساس به تراستوزوماب بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، سلول‌های BT-474 سرطان پستان مقاوم به تراستوزوماب، توسط کشت مداوم شش‌ماهه سلول‌ها در آزمایشگاه در حضور تراستوزوماب ایجاد شدند. بیان miR-141 به‌عنوان میکروآران‌ای کاندید نسبت به U6 RNA با روش Relative Real Time PCR در سلول‌های مقاوم و حساس به تراستوزوماب بررسی گردید. تست من‌ویتنی برای مقایسه بین دو گروه استفاده شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌دار میزان زنده‌ماندن سلول‌های BT-474 مقاوم نسبت به سلول‌های حساس در تست MTT در حضور غلظت‌های متفاوت تراستوزوماب نشان داد که این سلول‌ها تحت کشت طولانی‌مدت با تراستوزوماب، به این دارو مقاوم شدند ($P=0/001$). همچنین میزان بیان miR-141 در سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب در مقایسه با سلول‌های والدی BT-474 با تفاوت بیان چهار برابری، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P=0/049$).

نتیجه‌گیری: کاهش بیان miR-141 در سلول‌های BT-474 مقاوم به تراستوزوماب، می‌تواند یکی از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت به تراستوزوماب و نشانه نقش این میکروآران‌ای در کنترل مسیر متاستاز باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، فاکتور شماره ۲ اپیدرمال انسان، مقاومت به تراستوزوماب، میکروآران‌ای ۱۴۱

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۶؛ ۲۴(۳): ۱۷۰-۱۷۸.

دریافت: ۱۳۹۶/۸/۴ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۴

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

^۳ نویسنده مسؤل؛ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

پست الکترونیک: Dastjerdi1974@hotmail.com

مقدمه

مقاومت به داروهای شایع ضد سرطان، از مشخصه سرطان پستان پیشرفته است که منجر به مرگ و میر با تسهیل پیشرفت بیماری و متاستاز در اکثر بیماران می‌شود (۱). بیان بیش از حد ژن ERBB2 که انکوپروتئین HER2 را کد می‌کند، در ۲۰ تا ۲۵ درصد سرطان‌های پستان رخ می‌دهد و با پاسخ به درمان ضعیف همراه است. تراستوزوماب (هرسپتین)-آنتی‌بادی ضد HER2 انسانی برای درمان سرطان پستان HER2 مثبت، در مراحل اولیه به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده می‌شود (۲). با این وجود میزان پاسخ به درمان با تراستوزوماب در بیماران مبتلا به سرطان پستان HER2 مثبت، کمتر از ۳۵ درصد است. علاوه بر این، اغلب بیماران که در ابتدا به درمان با تراستوزوماب پاسخ مثبت می‌دهند، بعد از یک سال، به درمان با این دارو مقاومت نشان می‌دهند (۳). بنابراین، روشن کردن مکانیسم‌هایی که باعث ایجاد مقاومت به تراستوزوماب می‌شود، نقش مهمی در ایجاد استراتژی‌های جدید برای درمان سرطان پستان، ایفا می‌کند.

مکانیسم‌های متفاوتی برای ایجاد مقاومت در سرطان پستان گزارش شده است، مانند: کاهش بیان HER2 یا میل ترکیبی آنتی‌بادی، افزایش سیگنال‌های پیش‌بقا از طریق رسپتورهای دیگر تیروزین کینازی، سیگنال‌های تغییر یافته داخل سلولی مانند از دست رفتن بیان PTEN، کاهش فعالیت تنظیم‌کننده‌های فعالیت سیکل سلولی p27kip1 یا افزایش فعالیت Akt که منجر به تکثیر بالای سلول‌ها می‌گردد (۴).

میکروآران‌ای‌ها گروهی از RNAهای غیر کدکننده هستند که بیان ژن را با مهار ترجمه یا تجزیه RNAها تنظیم می‌کنند. میکروآران‌ای‌ها نقش مهمی در تعدیل مسیرهای متفاوت دخیل در پیشرفت سرطان دارند. این میکروآران‌ای‌ها می‌توانند به‌عنوان یک پروتوانکوژن و یا سرکوب‌کننده تومور، نقش ایفا کنند. خانواده miR-200 به‌خوبی به‌عنوان مهارکننده تومور با هدف قراردادن ژن‌های متفاوت درگیر در

EMT^۱، متاستاز و آنژیوژنز در بدخیمی‌ها شناخته شده‌اند. EMT، با پیشرفت سرطان و تسهیل مهاجم سلول‌های سرطانی مرتبط است (۵). سیگنال TGF- β به‌عنوان کنترل‌کننده کلیدی EMT، در مهاجم سلول‌های سرطانی و ایجاد مقاومت به درمان‌های متفاوت، از طریق فعال شدن مسیرهای درگیر در تکثیر و زنده‌ماندن مانند سیگنال‌های Ras/MAPK یا PI3K/Akt نقش دارد. تحقیقات گسترده نشان داده است، miR-141 که یکی از اعضای خانواده miR-200 بوده و بر روی کروموزوم 12p13 از جفت باز ۶۹۶۴۰۹۷ تا ۶۹۶۴۱۹۱ قرار دارد، به‌عنوان سرکوب‌کننده تومور در بسیاری از تومورها از جمله: سرطان تخمدان (۶)، هپاتوسلولار کارسینوما (۷)، سرطان سلول‌های کلیوی (۸)، سرطان روده بزرگ (۹) و سرطان پانکراس (۱۰)، کاهش بیان را نشان می‌دهد. گزارش شده است که miR-200a/141 در مهار مهاجرت، مهاجم، تکثیر و مقاومت دارویی در سرطان سر و گردن، سلول‌های غیر-کوچک سرطان ریه، سرطان‌های مربوط به تولیدمثل زنان و سرطان سلول‌های کلیوی نقش دارد؛ با این وجود، در سرطان کلورکتال و تخمدان باعث افزایش تکثیر و مقاومت دارویی می‌گردد (۱۱). همچنین گزارش شده است که miR-141 در سلول‌های سرطان پستان مقاوم به تراستوزوماب در رده سلولی SKBR3، کاهش بیان را نشان می‌دهد (پایگاه داده GEO، شماره دسترسی: GSE47011) (۱۲). در مطالعه حاضر به بررسی بیان miR-141 در سلول‌های سرطان پستان HER2 مثبت BT-474 مقاوم و حساس به تراستوزوماب پرداخته شد.

روش تحقیق

کشت سلولی و ایجاد مقاومت سلول‌ها به تراستوزوماب:

برای انجام این مطالعه ی تجربی، سلول‌های انسانی سرطان پستان HER2 مثبت BT-474، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. سلول‌های BT-474 در

¹ Epithelial mesenchymal transition

دی‌میتل‌سولفوکسید (DMSO) به هر خانه اضافه گردید. کریستال‌های رنگ فورمازان در ۳۰ دقیقه محلول شده و جذب آن‌ها در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر توسط Epoch Microplate Reader خوانده شد.

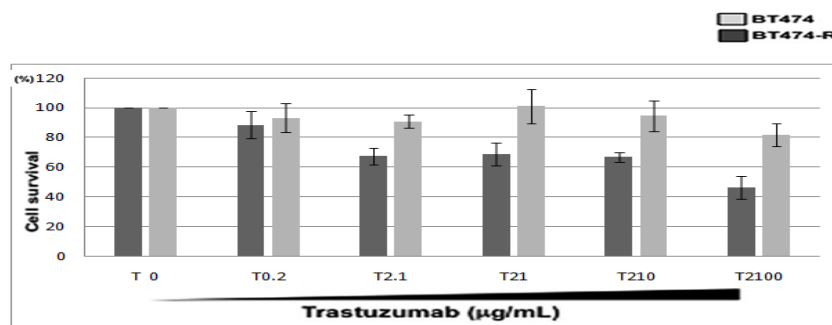
بررسی بیان miR-141 به روش Real-time PCR:

RNA تام سلولی از رده سلولی BT-474 با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen, USA) طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. غلظت RNA توسط دستگاه نانودراپ (Epoch Microplate Reader) تعیین و کیفیت آن به کمک روش ژل الکتروفورزیس ارزیابی گردید. کیفیت RNA استخراج شده از سلول‌های مقاوم و حساس به تراستوزوماب، بر روی ژل الکتروفورزیس ارزیابی شد. غلظت تقریباً برابر باند 28srRNA نسبت به باند 18srRNA و عدم حضور باندهای اضافی بر روی ژل الکتروفورزیس نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده بود. با توجه به غلظت‌های به دست آمده از خوانش نانودراپ در جدول ۲، میزان یک میکروگرم از RNA استخراج شده از سلول‌های حساس و مقاوم به تراستوزوماب، برای واکنش رونوشت‌برداری معکوس و سنتز cDNA با استفاده از miScript Reverse Transcription Kit (کیاژن، آلمان)، طبق پروتکل کیت مورد استفاده قرار گرفت. بررسی بیان ژن miR-141 به روش real time PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (شرکت ماکروژن - کره جنوبی)، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

محیط DMEM-F12 با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت گردیده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۰ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار گرفتند. تمام مواد لازم برای کشت، از شرکت biosera (فرانسه) فراهم گردید. برای به دست آوردن سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب، ابتدا تراستوزوماب/هرسپتین (Roche, Basel, Switzerland) در آب استریل حل شد. سلول‌های مقاوم، با کشت متوالی سلول‌های BT-474 در حضور ۵ μg/mL تراستوزوماب به مدت شش ماه، چنانچه در گذشته گزارش شده است، به دست آمدند. سلول‌هایی که زنده باقی می‌ماندند، به عنوان سلول مقاوم در نظر گرفته شدند (۱۳)؛ به این صورت که تست MTT انجام شد تا مقاوم شدن سلول‌ها پس از تیمار شش ماهه تأیید شود (شکل ۱).

بررسی زنده بودن سلول‌ها:

بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه سلول‌ها به تعداد ده هزار در هر چاهک پلیت سلولی ۹۶ تایی قرار گرفتند. در روز بعد، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت تراستوزوماب (0.21–2100 mg/mL) برای ۷۲ ساعت تیمار شدند. برای هر غلظت، چهار تکرار در نظر گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت سلول‌ها با محلول ۰/۵ mg/mL از MTT در DMEM-F12 تیمار و ۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس محیط، خارج شده و ۲۰۰ μL از



شکل ۱ - حساسیت به تراستوزوماب توسط تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه معنی دار بودن بین میزان زنده ماندن در دو گروه کنترل و مقاوم به تراستوزوماب در غلظت‌های متفاوت این دارو با استفاده از آزمون آماری t-Test انجام گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای Real time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
Hsa_miR-141	5'-TAACACTGTCTGGTAAAGATGGAAAA-3'	5'-GAATCGAGCACCAGTTACGC-3'
U6 RNA	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT-3'	5'-GAATCGAGCACCAGTTACGC-3'

جدول ۲- نتایج حاصل از نانودراپ RNA استخراج شده از سلول‌های مقاوم و حساس

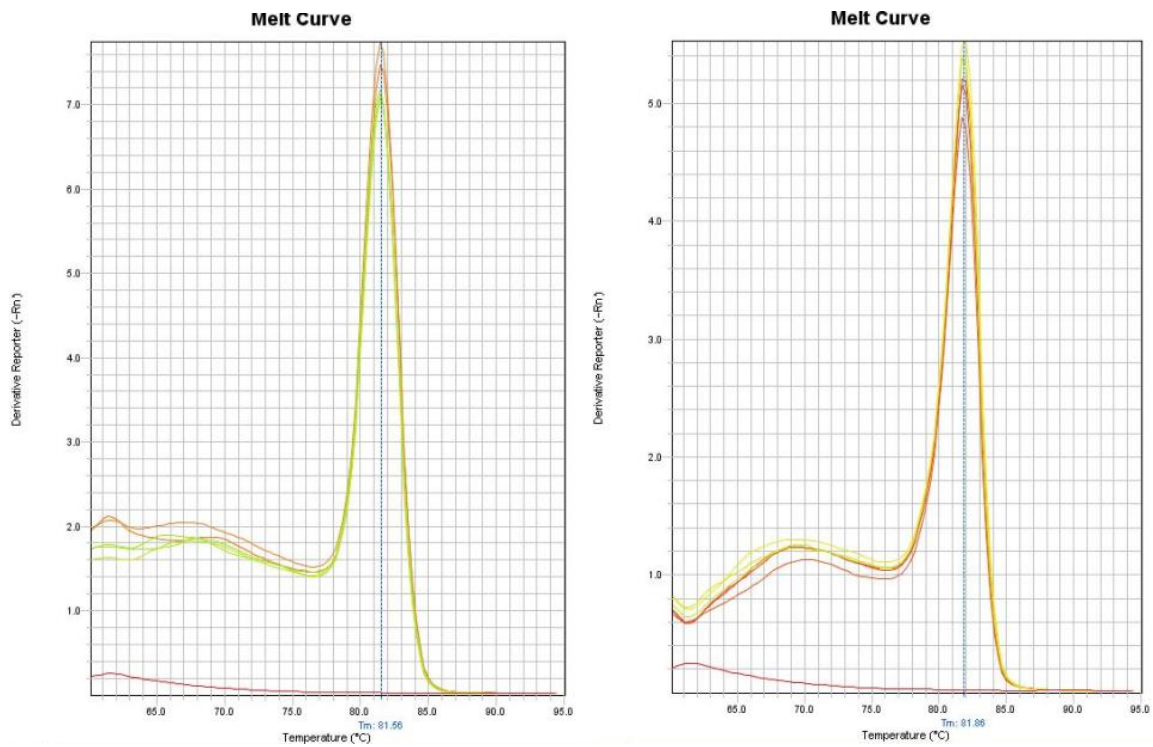
نوع RNA	غلظت	نسبت ۲۶۰/۲۸۰
RNA استخراج شده از سلول‌های مقاوم	ng/μL ۲۲۱/۳۱	۱/۹
RNA استخراج شده از سلول‌های حساس	ng/μL ۳۵۰/۴۹	۱/۹

یافته‌ها

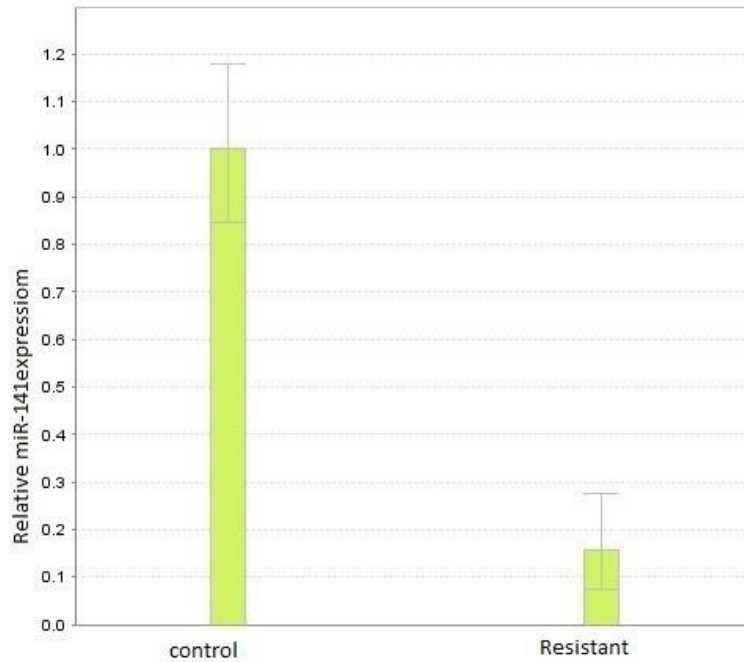
سلول‌های BT-474 سرطان پستان که بیان بیش از حد HER2 را نشان می‌دهند، به مدت ۶ ماه متوالی در حضور ۵ μg/mL تراستوزوماب کشت داده شدند که در نتیجه آن، مقاومت به تراستوزوماب در جمعیت سلول‌های زنده به دست آمد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که توانایی تکثیر و زنده ماندن سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب نسبت به سلول‌های والدی در غلظت‌های متفاوت تراستوزوماب (0.21–2100 mg/mL) به طور قابل توجهی افزایش داشت (P < ۰/۰۱) (شکل ۱). RNA استخراج شده از گروه کنترل و مقاوم با روش ژل الکتروفورزیز بررسی کیفی شد و با نانودراپ اندازه‌گیری گردید (جدول ۲). ارزیابی منحنی ذوب برای miR-141 و کنترل U6 RNA حاکی از ایجاد تک محصول در واکنش Real Time PCR بود که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب برای ارزیابی نتایج است (شکل ۲). بررسی بیان نسبی miR-141 بین دو گروه مقاوم به تراستوزوماب و گروه والدی نشان داد که بیان نسبی miR-141 در سلول‌های مقاوم، ۴ برابر کاهش یافت که این کاهش بیان، معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵) (شکل ۳).

در هر واکنش، ۱۰ μL از مستر سایبرگرین (Thermo fisher, England)، ۱ μL از محصول cDNA، ۰/۵ μL از پرایمرها با غلظت ۶ μM و ۸ μL آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل شامل دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیرشده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه میکروآران‌ای‌های تکثیرشده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. U6 RNA به عنوان کنترل داخلی برای میکروآران‌ای استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR در جدول یک آورده شده است.

یافته‌ها بصورت Mean ± SD ارائه شدند برای انجام مطالعات آماری از SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) استفاده شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و مقاوم با استفاده از آزمون Mann-Whitney بررسی گردید. مقادیر به دست آمده با P < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.



شکل ۲- منحنی ذوب در واکنش CYBR Based Real Time PCR برای miR-141 و U6 RNA به ترتیب از راست به چپ.



شکل ۳- نمودار مقایسه بیان miR-141 بین دو گروه Control و Resistant. بیان miR-141 در گروه مقاوم به تراستوزوماب نسبت به گروه والدی به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش نشان داد.

بحث

میکروآران‌ای‌ها با تنظیم بیان ژن هدف، بسیاری از مسیرها را تحت تنظیم خود قرار می‌دهند و به صورت یک انکوژن یا سرکوب‌گر تومور عمل می‌کنند. بررسی ما در رده سلولی BT-474 حساس و مقاوم به تراستوزوماب، بیان کاهش یافته miR-141 را در رده سلولی مقاوم نشان داد که می‌توان نقش miR-141 را در رده سلولی مقاوم احتمالاً به عنوان یک سرکوب‌کننده تومور در نظر گرفت.

مقاومت به تراستوزوماب و متاستاز نواحی دوردست، منجر به مرگ و میر در بیماران با سرطان پستان HER2 مثبت می‌شود. بسیاری از مکانیسم‌های ملکولی این فنوتیپ، بدخیمی شناخته شده است. با این وجود، مشاهدات کلینیکی نشان می‌دهد تراستوزوماب توانایی مهار متاستاز ارگان‌های مختلف را دارد (۱۴) و از دست رفتن بیان HER2، متاستاز نواحی دور را در بیماران دریافت‌کننده تراستوزوماب تسهیل می‌کند. این فرضیه ارتباط قوی بین مقاومت به تراستوزوماب و متاستاز نواحی دوردست را پیشنهاد می‌کند (۱۵). از آنجایی که بین مقاومت به تراستوزوماب و متاستاز نواحی دوردست ارتباط نزدیکی وجود دارد، کاهش بیان miR-141 در رده سلولی مقاوم می‌تواند در القای EMT نقش ایفا کند.

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در بررسی عملکرد خانواده miR-200 در EMT سرطان انجام شده است. داده‌های مربوط به سرطان سلول‌های کلیوی نشان داد که مسیر سیگنال ErB که نقش مهمی در فرآیند EMT دارد، به طور قابل توجهی توسط miR-141 تنظیم می‌شود (۱۶). مطالعه Tamagawa و همکاران، تأییدکننده نقش miR-141 در تنظیم EMT و مهاجرت در سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن بود (۱۷). مطالعه دیگر توسط Liang و همکاران نشان داد که خانواده miR-200 به ویژه miR-141 و miR-200a، قادر به القای EMT توبول‌های کلیوی از طریق مسیر Smad با هدف‌گذاری ZEB1 و ZEB2 هستند (۱۸). پینگ لی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند

که miR-141 در سلول‌های سرطان پستان، در مقایسه با سلول‌های اطراف، کاهش بیان را نشان دادند. همچنین بیان بالای miR-141، تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطان پستان را در *in vitro* کاهش می‌دهد (۱۹).

miR-141 همچنین در تنظیم رشد سلولی و متاستاز در سرطان ریه، سرطان کبد، سرطان کلورکتال، سرطان معده، سرطان کلیه و سرطان پروستات نقش دارد (۲۰).

میکروآران‌ای‌ها همچنین به عنوان تعدیل‌کننده‌های کلیدی در سرطان و حفظ فنوتیپ‌هایی بدخیم مانند مقاومت دارویی هستند؛ به ویژه، miR-221/222 باعث ایجاد مقاومت دارویی به تاموکسیفن در سرطان پستان با هدف‌گذاری p27Kip1 می‌شود (۲۱). Xia و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند، miR-216a/217 القاکننده EMT است و باعث افزایش مقاومت دارویی در سرطان کبد می‌شود (۲۲). در این ارتباط Gong و همکاران در سال ۲۰۱۱ عنوان کردند، افزایش بیان miR-21، مقاومت دارویی در سرطان پستان تحت درمان تراستوزوماب را میانجی‌گری می‌کند (۲۳). به تازگی شواهد نشان می‌دهد که miR-141 همچنین با مقاومت دارویی در سرطان مرتبط است. Zhang و همکاران گزارش کردند که miR-141 می‌تواند پیشرفت سرطان پروستات را پیش‌بینی کند (۲۴). Imanaka و همکارانش نقش تنظیم‌کننده miR-141 در پیشرفت مقاومت به cisplatin در سرطان سلول‌های سنگفرشی مری را مشخص کردند (۲۵). اگر چه مطالعات متعدد نشان‌دهنده نقش miR-141 در مقاومت دارویی است، با این حال مکانیسم القای این مقاومت هنوز مشخص نیست. کاهش بیان معنی‌دار miR-141 در رده سلولی BT-474 مقاوم به تراستوزوماب در مقایسه با سلول‌های والدی می‌تواند به عنوان مکانیسمی در القای مقاومت به تراستوزوماب در نظر گرفته شود. با این حال، تشخیص هدف‌های این میکروآران‌ای می‌تواند در یافتن مسیر القای مقاومت به تراستوزوماب مورد اهمیت باشد.

نتیجه گیری

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان «بررسی اثر برخی میکروآران‌ای‌ها در هدف قراردادن پروتئین کاندید دخیل در مسیر مقاومت دارویی به Trastuzumab در سرطان HER2+ پستان» در مقطع دکترای تخصصی ژنتیک ملکولی در سال ۱۳۹۶ با کد اخلاق IR.BUMS.rec.1396.252 با حمایت مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان به اجرا در آمده است، بدین وسیله از آن واحد دانشگاهی تقدیر و تشکر به عمل می آید. همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند خانم دکتر طوبی کاظمی، مدیریت محترم آزمایشگاه آقای دکتر محسن خراشادیزاده و کارشناس محترم آزمایشگاه خانم نسرین زندی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

این مطالعه نشان داد که میزان نسبی miR-141 در سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب در مقایسه با سلول‌های والدی به صورت معنی‌دار کاهش قابل توجهی دارد. از آنجایی که سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب فنوتیپ تهاجمی را نشان می‌دهند، انتظار می‌رود کاهش بیان این میکروآران‌ای‌ها با هدف قراردادن ژن‌های دخیل در EMT، نقش مهمی را در متاستاز ایفا کند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، مکانیسم ایجاد مقاومت ناشی از کاهش بیان miR-141 با یافتن ترانسکریپت‌های هدف دخیل در مسیر مقاومت، در سلول‌های مقاوم به تراستوزوماب مورد بررسی قرار گیرد.

منابع:

- 1- Hu G, Chong RA, Yang Q, Wei Y, Blanco MA, Li F, et al. MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer Cell*. 2009; 15(1): 9-20.
- 2- Tripathy D, Slamon DJ, Cobleigh M, et al. Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression. *J Clin Oncol*. 2004;22:1063-70.
- 3- Nishimura R, Okumura Y, Arima N. Trastuzumab monotherapy versus combination therapy for treating recurrent breast cancer: time to progression and survival. *Breast Cancer*; 2008, 15(1): 57-64.
- 4- Garrett JT, Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther*. 2011; 11(9): 793-800.
- 5- Bendoraite A., Knouf E. C., Garg K. S., Parkin R. K., Kroh E. M., O'briant K. C., et al. Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol. Oncol* ۲۰۱۱; 116 117-125.
- 6- Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, Mariani O, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med*. 2011; 17(12): 1627-35.
- 7- Liu Y, Ding Y, Huang J, Wang S, Ni W, Guan J, et al. MiR-141 suppresses the migration and invasion of HCC cells by targeting Tiam1. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88393.
- 8- Chen X, Wang X, Ruan A, Han W, Zhao Y, Lu X, et al. miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EphA2 expression. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(10): 2617-30.
- 9- Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013; 62(9): 1315-26.
- 10- Xu L, Li Q, Xu D, Wang Q, An Y, Du Q, et al. hsa-miR-141 downregulates TM4SF1 to inhibit pancreatic cancer cell invasion and migration. *Int J Oncol*. 2014; 44(2): 459-66.
- 11- Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, et al. MiR-200c suppresses TGF- β signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J Cancer*. 2014; 135(6): 1356-68.

- 12- Ye X-M, Zhu H-Y, Bai W-D, et al. Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer by targeting IGF1R. *BMC Cancer*. 2014;14:134. doi:10.1186/1471-2407-14-134.
- 13- Carr JR, Park HJ, Wang Z, Kiefer MM, Raychaudhuri P. FoxM1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel. *Cancer Res*. 2010; 70(12): 5054-63.
- 14- Hudis CA. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007; 357:39–51.
- 15- Garcia AG, Nedev H, Bijian K, Su J, Alaoui-Jamali MA, Saragovi HU. Reduced in vivo lung metastasis of a breast cancer cell line after treatment with Herceptin mAb conjugated to chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 2013; 32(20): 2527-33.
- 16- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139(5): 871-90.
- 17- Tamagawa S, Beder LB, Hotomi M, Gunduz M, Yata K, Grenman R, et al. Role of miR-200c/mir-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2014; 33(4): 879-86.
- 18- Liang HH, Wei PL, Hung CS, Wu CT, Wang W, Huang MT, et al. MicroRNA-200a/b influenced the therapeutic effects of curcumin in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Tumour Biol*. 2013; 34(5): 3209-18.
- 19- Li P, Xu T, Zhou X, et al. Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is associated with cell migration and invasion: involvement of ANP32E targeting. *Cancer Medicine*. 2017;6(3):662-672. doi:10.1002/cam4.1024.
- 20- Hu M, Xia M, Chen X, Lin Z, Xu Y, Ma Y, Et Al. MicroRNA-141 regulates Smad interacting protein 1 (SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells. *Dig Dis Sci*. 2010; 55(8): 2365-72.
- 21- Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nat Cell Biol*. 2013; 15(6): 546-54.
- 22- Xia H, Ooi LL, Hui KM. MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. *Hepatology*. 2013; 58(2): 629-41.
- 23- Gong C, Yao Y, Wang Y, et al. Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. *J Biol Chem*. 2011;286: 19127–37.
- 24- Zhang HL, Qin XJ, Cao DL, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, et al. An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions. *Asian J Androl*. 2013; 15(20): 231-5.
- 25- Imanaka Y, Tsuchiya S, Sato F, Shimada Y, Shimizu K, Tsujimoto G. MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*. 2011; 56(4): 270-6.