УДК 616-006.699:611.424:577.218

УРОВНИ МИКРОРНК В ТКАНЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

 1 Лыков А.П., 1 Кабаков А.В., 1 Райтер Т.В., 1 Бондаренко Н.А., 1 Повещенко О.В., 1 Казаков О.В., 1 Повещенко А.Ф., 2 Стрункин Д.Н., 1 Колмыков С.К., 3 Чанышев М.Д., 3 Гуляева Л.Ф., 1 Коненков В.И.

¹НИИКЭЛ, Новосибирск; ²НИИФКИ, Новосибирск; ³ФГБУ НИИ МББ СО РАМН, Новосибирск, e-mail: aplykov2@mail.ru

В работе исследованы уровни микроРНК в тканях молочной железы при экспериментальной модели рака молочной железы у крыс линии Wistar. Уровни онкогенной микроРНК (21, 221 и 222) при раке молочной железы увеличены, а уровень опухоль-супрессирующей микроРНК (429) — снижен. Под действием неоадъювантной полихимиотерапии отмечено подавление уровней экспрессии онкогенных микроРНК и увеличение уровней экспрессии опухоль-супрессирующей микроРНК.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК

THE MICRORNA LEVELS IN TISSUES OF THE MAMMARY GLAND AT EXPERIMENTAL MODEL OF THE BREAST CANCER

¹Lykov A.P., ¹Kabakov A.V., ¹Rayter T.V., ¹Bondarenko N.A., ¹Poveschenko O.V., ¹Kazakov O.V., ¹Poveschenko A.F., ²Strunkin D.N., ¹Kolmykov S.C., ³Chanyshev M.D., ³Gulyaeva L.F., ¹Konenkov V.I.

¹Scientific institution of clinical and experimental lymphology, Novosibirsk; ²Scientific institution of clinical immunology, Novosibirsk; ³Research institute for molecular biology and biophysics SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: aplykov2@mail.ru

In work the microRNA levels in tissues of a mammary gland at experimental model of a breast cancer at rats of the Wistar are investigated. The levels of oncogenic microRNA (21, 221, and 222) in tumor tissues are increased, and the level of tumor-suppressive microRNA (429) are decreased. Under the influence of neoadjuvant polychemotherapy suppression of levels of an expression the oncogenic microRNA and increase in levels of expression microRNA tumor-suppressive is noted.

Keywords: breast cancer, microRNA

В патогенезе заболеваний изменениям уровней экспрессия микроРНК отводится существенная роль. В последние годы показано, что микроРНК вовлечены в развитие и прогрессирование опухолей, в основном через модуляцию онкогенных или опухольсупрессирующих механизмов, в том числе и при раке молочной железы. При РМЖ отмечается гетерогенность экспрессии микроРНК, а также выявляются различия по уровням экспрессии между здоровой тканью и карциномой. Более того, уровни микроРНК связаны с прогрессией и метастазированием и являются прогностическим критерием при РМЖ. Так, повышенная экспрессия микроРНК-210 сопряжена с укорочением безрецидивного периода и выживаемостью при РМЖ. Показано, что микроРНК-31, микроРНК-335 и микроРНК-10b вовлечены в процесс обеспечения метастазирования. В доступной литературе мало исследований, посвященных проблеме различий уровней экспрессии микроРНК в образцах опухолей, что необходимо для выработки тактики терапии РМЖ и ее эффективности [5, 7]. Поэтому целью данного исследования стало изучение экспрессии микроРНК в образцах молочной железы в норме и при раке молочной железы.

Материалы и методы исследования

Эксперименты на лабораторных животных проведены в соответствии с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Эксперименты выполнены на 25 неполовозрелых крысах-самках линии Wistar. Животные содержались на стандартной лабораторной диете и имели свободный доступ к воде. У 21 крысы РМЖ индуцировали N-метил-Nнитрозомочевиной (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США), а 4 особи составили группу контроля. Через 6 месяцев у 17 крыс оперативно удалили опухоль молочной железы, а 4 особям не проводилось хирургическое вмешательство до завершения курса неоадъювантной полихимиотерапии (ПХТ) и только после этого была проведена резекция опухоли молочной железы. Курс ПХТ включал 5-фторурацил (Ebewe, Австрия, в дозе 15 мг/кг внутрибрющинно на 1 и 8 день курса терапии), метотрексат (Ebewe, Австрия, в дозе 2,5 мг/кг внутрибрющинно на 1 и 8 день курса терапии) и циклофосфан (ОАО «Биохимия», Саранск в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно однократно 14 дней). Тотальную РНК выделяли из тканей молочной железы с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию по матрице микроРНК с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) согласно инструкции. Для определения количества микроРНК-21, -221, -222 и 429 в тканях молочных желез проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов (ЗАО Вектор-БЕСТ) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения использовали малую РНК U6. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Lq) и верхним (Hq) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни, и принималась при значениях p < 0.05.

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из таблицы, между уровнями экспрессии микроРНК тканями молочных желез в группе интактных животных и в группе с РМЖ выявлены статистически значимые различия. Так, нами не выявлено статистически значимых различий по уровням экспрессии микроРНК-21 между интактными особями и особями с РМЖ.

Уровни экспрессии микроРНК в тканях молочных желез в норме и при раке молочной железы (Me, Lq-Hq)

| Параметры | Интактные | РМЖ | ПХТ |
|--------------|-----------|-----------|------------|
| микроРНК-21 | 0,96 | 1,08 | 0,82 |
| | 0,73–1,31 | 0,73–2,02 | 0,78–2,50 |
| микроРНК-221 | 0,67 | 0,72*,# | 0,13 |
| | 0,33–0,84 | 0,60–2,89 | 0,11–0,15 |
| микроРНК-222 | 0,35 | 1,10*,# | 0,03* |
| | 0,13–0,69 | 0,73–1,54 | 0,02–0,04 |
| микроРНК-429 | 4,59 | 1,40* | 6,96* |
| | 2,33–5,07 | 0,64–2,06 | 2,30–11,65 |

Примечание. * — достоверность различия с интактными животными p < 0.05; # — достоверность различия с ПХТ p < 0.05; РМЖ — рак молочной железы; ПХТ — неоадъювантная полихимиотерапия.

В отношении уровней экспрессии микроРНК-221 тканями молочных желез выявлено статистически значимое увеличение данного показателя в группе крыс с РМЖ. Более того, отмечено статистически значимое снижение уровней экспрессии тканями молочных желез микроРНК-221 в группе особей, получивших предварительно курс ПХТ в сравнении с группой особей, у которых проведена только хирургическая резекция опухоли молочных желез (р < 0,01).

Уровни экспрессии тканями молочных желез микроРНК-222 были статистически значимо выше в группе особей, получивших хирургическое вмешательство по сравнению с уровнями экспрессии данной микроРНК в группе интактных животных и в группе особей. получивших курс ПХТ (р < 0,01).

Также выявлено статистически значимое снижение уровней экспрессии тканями молочных желез микроРНК-429 в группе особей, получивших хирургическое вмешательство по сравнению с уровнями экспрессии данного показателя в группе интактных животных (р < 0,01). В то же время в группе особей, получившь[курс ПХТ, отмечено статистически значимое возрастание уровней экспрессии микроРНК-429 тканями

молочных желез в сравнении с интактными животными (p < 0.01).

Выявлена сопряженность уровней экспрессии тканями молочных желез микроРНК-21 с микроРНК-221 в группе интактных животных (r=-0.90; p<0.05). В группе особей, получивших курс ПХТ, выявлена прямая и сильная взаимосвязь уровней экспрессии тканями молочных желез микроРНК-221 с уровнями экспрессии микроРНК-222 (r=0.86; p<0.01).

Известно, что микроРНК-21 относится к про-онкогенным микроРНК, принимает участие в метаплазии нормальных тканей в опухолевую ткань через регуляцию пролиферации, рост и наделение данных клеток повышенной способностью к инвазии и миграции, в том числе и при РМЖ [3-4]. Более того, при РМЖ часто повышена экспрессия микроРНК-155, микроРНК-210, микроРНК-29с, микроРНКмикроРНК-213, микроРНК-203, микроРНК-29b и микроРНК-93, в то же время уровни экспрессии микроРНК-125b, микроРНК-145, микроРНК-100, микроРНКмикроРНК-125b2, микроРНК-497 и микроРНК-143 подавлена, что приводит к анти-апоптотическому эффекту, усилению пролиферативного потенциала, метастазирования и инвазивности через изменения экспрессии генов в опухолевых клетках [8].

Показано, что микроРНК-221/микроРНК-222 через подавление RAS-RAF-МЕК и эпителиально-мезенхимальный переход вовлечены в механизмы прогрессии агрессивной формы рака молочных желез (базальноклеточный фенотип) [6]. Более того, микроРНК-221/микроРНК-222 опосредуют метастазирование клеток опухоли молочной железы, через возрастание инвазивности и миграционной способности клеток подавляя белок TRPS1, который в свою очередь потенцирует возможность протеина ZEB2, необходимого при эпителиальномезенхимальном переходе. Показано, что повышенная экспрессия клетками опухоли микроРНК-221/микроРНК-222 приводит к подавлению регуляции механизмов супрессии опухоли, а также регулятора клеточного цикла р27 (Кір1) [1].

Показано, что на фоне курсов ПХТ у больных РМЖ отмечается резкое падение уровней экспрессии микроРНК клетками опухоли молочных желез, которое наиболее ярко проявляется при начальных стадиях заболевания и при малых размерах опухоли, в частности для микроРНК-21 [2]. Об эффекте ПХТ на уровни экспрессии микроРНК с супрессорной активностью и онкогенной активностью свидетельствует работа авторов [8], которые показали, что на фоне терапии 5-фторурацилом в комбинации с антиэстрогенами отмечается возрастание уровней экспрессии микроРНК-122, микроРНК-145 и микроРНК-205 (с тивоопухолевым действием) и резкое падение уровней экспрессии клетками опухоли молочной железы микроРНК-296, микроРНК-210, микроРНК-221, кроРНК-21 и микроРНК-10b, проявляющих онкогенный эффект [8].

Заключение

Повышенные уровни экспрессии онкогенных микроРНК в тканях опухоли молочной железы при РМЖ у крыс породы Wistar подавляются под действием неоадъювантной полихимиотерапии, а уровень микроРНК с супрессирующей опухоль активностью возрастает.

Список литературы

- 1. Bandopadhyay M., Banerjee A., Sarkar N. et al. Tumor suppressor micro RNA miR-145 and onco micro RNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by Hepatitis B virus X protein in malignant hepatocytes // BMC Cancer. 2014. Vol. 14. P. 721–723.
- 2. Gezer U., Keskin S., Igci A. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy // Oncology letters. 2014. Vol. 8. P. 845–848.
- 3. Krichevsky A.M., Gabriele G. MiR-21: a small multifaceted RNA $/\!/$ J. Cell Mol. Med. 2009. Vol. 13. P. 39–53.
- 4. Kumarswamy R., Volkmann I., Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease $/\!/$ RNA Biology. Vol. 8. P. 706–713.
- 5. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T. et al. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer //J. Mol. Diagn. 2012. Vol. 4. P. 376–384.
- 6. Shah M.Y., Calin G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // Genome Medicine. 2011. Vol. 3. P. 56–59.
- 7. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D. et al. Relationship between circulating and tissue microRNAs in a murine model of breast cancer // PLoS ONE. 2012. doi:10.1371/journal. pone.0050459.
- 8. Yao Y., Chen S., Zhou X. et al. 5–FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA/MB-453 triple-negative breast cancer cells // Oncology letters. $-2014.-Vol.\ 7.-P.\ 541-547.$

References

- 1. Bandopadhyay M., Banerjee A., Sarkar N. et al. Tumor suppressor micro RNA miR-145 and onco micro RNAs miR-21 and miR-222 expressions are differentially modulated by Hepatitis B virus X protein in malignant hepatocytes // BMC Cancer. 2014. Vol. 14. pp. 721–723.
- 2. Gezer U., Keskin S., Igci A. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy // Oncology letters. 2014. Vol. 8. pp. 845–848.
- 3. Krichevsky A.M., Gabriele G. MiR-21: a small multifaceted RNA $\!\!/\!\!/$ J. Cell Mol. Med. 2009. Vol. 13. pp. 39–53.
- 4. Kumarswamy R., Volkmann I., Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease // RNA Biology. Vol. 8. pp. 706–713.
- 5. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T. et al. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer // J. Mol. Diagn. 2012. Vol. 4. pp. 376–384.
- 6. Shah M.Y., Calin G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer // Genome Medicine. 2011. Vol. 3. pp. 56–59.
- 7. Waters P.S., McDermott A.M., Wall D. et al. Relationship between circulating and tissue microRNAs in a murine model of breast cancer // PLoS ONE. 2012. doi:10.1371/journal.pone. 0050459.
- 8. Yao Y., Chen S., Zhou X. et al. 5–FU and ixabepilone modify the microRNA expression profiles in MDA/MB-453 triple-negative breast cancer cells // Oncology letters. 2014. Vol. 7. pp. 541–547.