

Национальный институт рака, Киев

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ miR-124 И miR-155 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ГРУДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО И ПОСЛЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ



Д. Э. Рыспаева, Н. Н. Храновская,
М. В. Иномистова

Адрес:

Рыспаева Динара Эсенбековна
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Национальный институт рака
E-mail: ryspaeva1@gmail.com

Ключевые слова: рак грудной
железы, неoadьювантная химио-
терапия, микроРНК, miR-124,
miR-155.

В последнее время в многочисленных исследованиях показана важная роль микроРНК в развитии рака, и их предлагают в качестве потенциальных биомаркеров для диагностики и терапии. В данном исследовании мы рассмотрели потенциал онкосупрессорной miR-124 и онкогенной miR-155 у больных раком грудной железы (РГЖ) до и после проведения неoadьювантной химиотерапии (НАХТ). РГЖ характеризовался снижением экспрессии miR-124 и гиперэкспрессией miR-155. Эти нарушения экспрессии микроРНК в основном способствуют к опухолевому росту. Наши результаты показали, что aberrантная экспрессия miR-155 действительно присутствует в РГЖ человека. После проведения НАХТ отмечалось восстановление экспрессии miR-124, что, по-видимому, имеет благоприятный эффект, так как данная микроРНК вызывает сайленсинг генов, отвечающих за опухолевый рост и прогрессию. Сохраняющаяся гиперэкспрессия miR-155 после проведенной НАХТ может свидетельствовать о необходимости тестирования данной микроРНК в динамике лечения для понимания ее роли в развитии хеморезистентности. Для проверки этих маркеров, оценки их надежности в идентификации пациентов с РГЖ и контроля эффективности лечения потребуются дальнейшие исследования.

ВВЕДЕНИЕ

Рак грудной железы (РГЖ) является наиболее частым злокачественным новообразованием среди женщин во всем мире. В последние годы подходы к лечению значительно трансформировались, включая введение химиотерапии (ХТ) перед операцией. Кроме расширения возможностей органосохраняющих операций вследствие уменьшения размеров опухоли и понижения стадии заболевания, использование ХТ в предоперационный период позволяет контролировать реакцию опухоли на проводимое лечение. В настоящее время для мониторинга предоперационной, или неoadьювантной, ХТ (НАХТ) используются в основном инструментальные методы (маммография, сонография, магнитно-резонансная томография), и пока нет доказательных маркеров молекулярного анализа для прогнозирования эффективности ХТ.

В последние годы интенсивно изучается регуляторный потенциал класса микроРНК (miRNA, miR) — малых некодирующих РНК (нуклеотиды длиной 18–24), которые представляют собой новый класс потенциальных биомаркеров для диагностики, мониторинга лечения или прогноза болезни [2, 15]. Исследования показали, что профили экспрессии микроРНК различаются между нормальными и опухолевыми тканями и даже

между разными типами опухолей [20, 21]. В 2005 г. при геномном анализе экспрессии микроРНК был идентифицирован ряд микроРНК (miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-21, miR-155), экспрессированных и стабильно дисрегулированных в ткани РГЖ [9]. Кроме тканеспецифической сопряженности экспрессии микроРНК, установлена их корреляция с клинико-патологическими и прогностическими показателями. Недавно отмечено, что нарушения экспрессии микроРНК играют ключевую роль в эффективности ХТ при РГЖ [3]. В то же время механизмы нарушения экспрессии микроРНК при возникновении и развитии злокачественных опухолей пока еще недостаточно изучены.

Принимая во внимание перспективный диагностический и терапевтический потенциал микроРНК, мы исследовали влияние НАХТ на уровни экспрессии miR-124 и miR-155 в ткани РГЖ с целью выявить клинические корреляции с потенциальным применением в диагностике рака, прогнозе или лечении.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном проспективном исследовании изучены клинико-патологические характеристики, а также собраны образцы опухолевой ткани до и после проведения НАХТ у 11 больных РГЖ, получавших лечение в Национальном институте рака.

Средний возраст пациенток составил 55,2±7,8 года (от 42 до 71 года), преимущественно больные были старше 50 лет. Распределение по стадиям заболевания выявило следующее: у 5 пациенток оказалась стадия IIA, у 4 — IIIA и у 2 — IIIB.

У пациенток со стадией IIA проводили НАХТ в случае мультифокального роста опухоли или выявления поражения регионарных лимфатических узлов при клиническом стадировании заболевания. При III стадии НАХТ показана в общепринятой тактике комплексного лечения вследствие местно-распространенного процесса. Режимы НАХТ включали стандартные схемы — AC (доксорибуцин + циклофосфамид) или FAC (5-фторурацил + доксорибуцин + циклофосфамид). У 4 пациенток в схемы лечения были включены таксаны (доцетаксел или паклитаксел). Так как оптимальное количество курсов НАХТ не установлено, то в нашем исследовании пациентам было проведено в среднем 4 курса.

Люминальный A подтип РГЖ выявлен у 3 пациенток, люминальный B — у 4, трижды негативный фенотип опухоли — у 3, гиперэкспрессия HER2 онкогена — у 1 пациентки. Стадия заболевания при установлении диагноза была взята из истории болезни пациентки и кодировалась в соответствии с критериями Американского объединенного комитета по раку (American Joint Committee on Cancer), фенотип опухоли классифицировался согласно Сент-Галленскому консенсусу [7].

Оценка экспрессии микроРНК проведена в 11 образцах опухолевой ткани РГЖ, помещенных непосредственно после трепан-биопсии или операции в пробирки Eppendorf, которые содержали реагент DNA/RNA Shield для консервации материала. Отдельно в послеоперационном материале у тех же больных были собраны образцы здоровой ткани грудной железы. Весь собранный материал сразу замораживали при температуре -70 °С. Для выделения тотальной РНК и микроРНК использовали набор NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel, Германия) согласно прилагаемой инструкции. Для проведения реакции обратной транскрипции микроРНК использовали набор TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США). Детекцию результатов в режиме реального времени (q-PCR) проводили при помощи амплификатора 7500 Applied Biosystems (Applied Biosystems, США) с использованием смеси реагентов Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, США). Для выявления микроРНК в реакции q-PCR были

применены праймеры TaqMan® MIRNA Assays (mmu-miR-124a, hsa-miR-155), экспрессию микроРНК определяли относительно уровня экспрессии U6B (TaqMan® MicroRNA Control RNU6B).

Статистическую обработку данных проводили в пакете EZR v. 1.35 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan, 2017). При выполнении анализа использованы непараметрические критерии. Критический уровень значимости принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

miR-124. Мы выявили (таблица), что в опухолевой ткани до начала лечения уровень экспрессии онкосупрессорной miR-124 был резко снижен (в среднем в 33 раза) по сравнению со здоровой тканью грудной железы (p<0,001). В нашем исследовании после проведенной НАХТ экспрессия miR-124 в образцах опухолевой ткани повышалась по сравнению с исходным уровнем до лечения (p=0,004), при этом восстанавливаясь до значений, статистически не отличающихся от показателей интактной ткани (см. таблицу).

Нарушения экспрессии онкосупрессорной микроРНК — miR-124 — свидетельствуют о связи с канцерогенезом [13]. Известно, что микроРНК и эпигенетические факторы тесно связаны [4]. Одним из объяснений наблюдаемой нами репрессии miR-124 может быть эпигенетическая дисрегуляция данной микроРНК. Ранее показано, что miR-124 эпигенетически выключается в различных типах рака и играет важную роль в прогрессировании опухоли [12]. Исследователи сообщали, что низкий уровень экспрессии miR-124 был характерен для агрессивных линий РГЖ [13, 14, 16]. Эпигенетическая репрессия miR-124 связывалась с нарушением гиперметилирования сайтов CpG, принимающих существенное участие в инактивации генов-онкосупрессоров [4, 25]. Действительно, транскрипционный сайленсинг (молчание) генов — супрессоров опухолей с помощью гиперметилирования рассматривается как их общий признак [15]. С другой стороны, в настоящее время регуляция экспрессии miR-124 изучена лишь частично.

Возможные механизмы повышения экспрессии miR-124 исследователи связывали с подавлением экспрессии STAT3, Bcl-2 и Cyclin D1, которые ингибируют клеточную инвазию и пролиферацию, индуцируют остановку клеточного цикла в фазе G0/G1 и облегчают апоптоз клетки [24]. Кроме того, гиперэкспрессия miR-124 приводила к подавлению гликолиза с образова-

нием лактата, необходимого опухолевым клеткам для пролиферации [27]. Все эти данные указывают на то, что эпигенетическая репрессия miR-124 в опухолевой ткани до лечения, сменившаяся повышением уровня экспрессии, может иметь значительные последствия для пациентов с РГЖ, демонстрируя антимагнетическую роль данной микроРНК.

miR-155. При исследовании уровня экспрессии другой микроРНК — miR-155 — в опухолевой и здоровой ткани мы выявили ее гиперэкспрессию (увеличение в 18 раз) во всех исследованных биоптатах РГЖ (p<0,001) по сравнению с интактной тканью (см. таблицу).

Известно, что экспрессия микроРНК изменяется в опухоли по сравнению с нормальной тканью, и miR-155 не оказалась исключением. Полученные данные согласуются с сообщениями других исследователей [17]. Избыточная экспрессия miR-155 была представлена как показатель инвазивности опухоли и неблагоприятного прогноза [11, 19]. Наконец, проведенный метаанализ показал высокую чувствительность и диагностическую точность экспрессии miR-155 для раннего выявления РГЖ [23]. Данная микроРНК избыточно экспрессируется при многих опухолях человека, однако механизмы, с помощью которых она функционирует как предполагаемый онкоген, в значительной мере пока неизвестны [8].

Следует отметить, что после проведенной НАХТ в опухолевой ткани выявляли дальнейшее повышение уровня экспрессии miR-155 (в 1,9 раза по сравнению с исходным уровнем до лечения), однако выявленная тенденция оказалась статистически недостоверной (p=0,16), возможно, из-за небольшого количества наблюдений.

Отмечаемое нами дальнейшее повышение экспрессии miR-155 после проведенной НАХТ, с одной стороны, может быть индуцировано активацией сигнальных путей воспаления, которые находятся в синергизме с miR-155 [22]. Сообщалось, что чрезмерная экспрессия miR-155 индуцирует изменения в регуляции цитокинов в линиях клеток РГЖ, потенцируя тем самым онкогенный эффект [10]. С другой стороны, сохраняющаяся гиперэкспрессия данной микроРНК может свидетельствовать о недостаточной эффективности проводимой НАХТ и возможном индуцировании лекарственной устойчивости.

Уже известно, что изменения экспрессии микроРНК играют решающую роль в формировании хеморезистентности к противоопухолевым препаратам [6, 26].

Таблица. Уровни экспрессии микроРНК в опухолевой и интактной ткани

| микроРНК | Трепан-биоптат (до НАХТ) | | Операционный материал (после НАХТ) | | Интактная ткань | | Уровень значимости отличия, p** |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------------------------|
| | медиана | I–III квантили | медиана | I–III квантили | медиана | I–III квантили | |
| miR-124 | 0,0206* | 0,0167–0,0617 | 1,051** | 0,574–2,462 | 0,687 | 0,326–4,713 | 0,004 |
| miR-155 | 12,126* | 4,149–18,256 | 23,439* | 8,000–29,857 | 0,661 | 0,406–0,841 | 0,16 |
| Уровень значимости отличия, p* | <0,001 | | <0,001 | | | | |

*Сравнение с показателями интактной ткани; **сравнение с показателями до проведения лечения.

Другі дослідники раніше повідомляли про зниження гіперекспресії miR-155 після спеціального противоопухольового лікування [5]. В той же час високий рівень експресії даної мікроРНК корелював з поганим відкликом на гормонотерапію, демонструючи, що miR-155 грає визначену роль у відповіді на лікування і може бути неінвазивним біомаркером для стратифікації пацієнтів [1, 18]. Можливо, тестування рівня експресії miR-155 може бути цілком обґрунтованим для ідентифікації пацієнтів з РГЖ, які отримують користь від ХТ. Считаем, що для повного розуміння значення аберантно високої експресії miR-155 при РГЖ необхідні подальші дослідження.

Висновки

У даній роботі ми розглянули потенціал мікроРНК як біомаркерів для діагностики РГЖ та впливу НАХТ на їх експресію. РГЖ характеризувався зниженням рівня експресії онкосупресорної miR-124 та гіперекспресією онкомири miR-155. Ці порушення експресії мікроРНК в основному сприяють опухольовому росту.

Після проведеної НАХТ відновлення експресії miR-124, по-видимому, надає сприятливий ефект, так як дана мікроРНК викликає сайленсінг генів, що відповідає за опухольовий ріст і прогресію. Аберантна експресія miR-155 дійсно присутня в РГЖ людини, як повідомляли і інші дослідники. Після проведеної НАХТ зберігається гіперекспресія miR-155, що свідчить про необхідність тестування даної мікроРНК в динаміці лікування для розуміння її ролі в розвитку хеморезистентності. Для перевірки цих маркерів та оцінки їх надійності в ідентифікації пацієнтів з РГЖ і контролю ефективності лікування проводяться подальші дослідження.

Диференційна експресія miR-124 і miR-155 у пухлинній тканині грудної залози до та після неoad'ювантної хіміотерапії

Д.Е. Рупаєва, Н.М. Храновська, М.В. Іномістова
 Національний інститут раку, Київ

Резюме. Останнім часом у численних дослідженнях доведено важливу роль мікроРНК в розвитку раку, їх пропонують як потенційні біомаркери для діагностики та терапії. Ми розглянули потенціал онкосупресорної miR-124 та онкогенної miR-155 у хворих на рак грудної залози (РГЖ) до та після проведення неoad'ювантної хіміотерапії (НАХТ). РГЖ характеризувався зниженням рівня експресії miR-124 та гіперекспресією miR-155. Ці порушення експресії мікроРНК в основному сприяють пухлинному росту. Наші результати показали, що аберантна експресія miR-155 дійсно присутня в РГЖ людини. Після проведення НАХТ відзначалося відновлення експресії miR-124, що, вочевидь, має сприятливий ефект, оскільки вказана мікроРНК спричиняє сайленсінг генів, що відповідають за пухлинний ріст і прогресію. Гіперекспресія miR-155, яка зберігалася після проведеної НАХТ, може свідчити про необхідність тестування цієї мікроРНК в динаміці лікування для розуміння її ролі в розвитку хеморезистентності. Для перевірки цих маркерів та оцінки їх надійності в ідентифікації пацієнтів з РГЖ і контролю ефективності лікування проводяться подальші дослідження.

Ключові слова: рак грудної залози, неoad'ювантна хіміотерапія, мікроРНК, miR-124, miR-155.

в ідентифікації пацієнтів з РГЖ і контролю ефективності лікування потребують подальші дослідження.

Благодарность

Ми благодарим кандидата біологічних наук, старшого научного співробітника відділу молекулярної імунології Інституту біохімії імені А.В. Палладіна НАН України Володимира Адамовича Галицького за наукові консультації, корисні обговорення і критичні зауваження.

Список использованной литературы

1. Bacci M., Giannoni E., Fearnis A. et al. (2016) miR-155 Drives Metabolic Reprogramming of ER+ Breast Cancer Cells Following Long-Term Estrogen Deprivation and Predicts Clinical Response to Aromatase Inhibitors. *Cancer Res.*, 76(6): 1615–1626.
2. Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. (2015) MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10): 1122–1143.
3. Casey M.C., Sweeney K.J., Brown J.A., Kerin M.J. (2016) Exploring circulating micro-RNA in the neoadjuvant treatment of breast cancer. *Int. J. Cancer*, 139(1): 12–22.
4. Fabbri M., Calin G.A. (2010) Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv. Genet.*, 70: 87–99.
5. Farsinejad S., Rahaie M., Alizadeh A.M. et al. (2016) Expression of the circulating and the tissue microRNAs after surgery, chemotherapy, and radiotherapy in mice mammary tumor. *Tumour Biol.*, 37(10): 14225–14234.
6. Geretto M., Pulliero A., Rosano C. et al. (2017) Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. *Am. J. Cancer Res.*, 7(6): 1350–1371.
7. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S. et al. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann. Oncol.*, 24(9): 2206–2223.
8. Hemmatzadeh M., Mohammadi H., Jadidi-Niaragh F. et al. (2016) The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 78: 129–139.
9. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G. et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65(16): 7065–7070.
10. Jiang S., Zhang H.W., Lu M.H. et al. (2010) MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.*, 70(8): 3119–3127.
11. Kong W., He L., Richards E.J. et al. (2014) Up-regulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis

by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 33(6): 679–689.

12. Li S.L., Gao H.L., Lv X.K. et al. (2017) MicroRNA-124 inhibits cell invasion and epithelial-mesenchymal transition by directly repressing Snail2 in gastric cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 21(15): 3389–3396.
13. Li W., Zang W., Liu P. et al. (2014) MicroRNA-124 inhibits cellular proliferation and invasion by targeting Ets-1 in breast cancer. *Tumour Biol.*, 35(11): 10897–10904.
14. Liang Y.J., Wang Q.Y., Zhou C.X. et al. (2013) MiR-124 targets Slug to regulate epithelial-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Carcinogenesis*, 34(3): 713–722.
15. Lujambio A., Ropero S., Ballestar E. et al. (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.*, 67(4): 1424–1429.
16. Lv X.B., Jiao Y., Qing Y. et al. (2011) miR-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes *in vitro*. *Chin. J. Cancer*, 30(12): 821–830.
17. Mattiske S., Suetani R.J., Neilsen P.M., Callen D.F. (2012) The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 21(8): 1236–1243.
18. Shen R., Wang Y., Wang C.X. et al. (2015) MiRNA-155 mediates TAM resistance by modulating SOCS6-STAT3 signalling pathway in breast cancer. *Am. J. Transl. Res.*, 7(10): 2115–2126.
19. Song C.G., Wu X.Y., Fu F.M. et al. (2012) Correlation of miR-155 on formalin-fixed paraffin embedded tissues with invasiveness and prognosis of breast cancer. *Zhonghua Wei Ke Za Zhi*, 50(11): 1011–1014.
20. Takahashi R.U., Miyazaki H., Ochiya T. (2015) The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 7(2): 598–616.
21. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 110(1): 13–21.
22. Tili E., Michaille J.J., Wernicke D. et al. (2011) Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(12): 4908–4913.
23. Wang F., Hou J., Jin W. et al. (2014) Increased circulating microRNA-155 as a potential biomarker for breast cancer screening: a meta-analysis. *Molecules*, 19(5): 6282–6293.
24. Wu Z., Huang W., Chen B. et al. (2017) Up-regulation of miR-124 inhibits invasion and proliferation of prostate cancer cells through mediating JAK-STAT3 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 21(10): 2338–2345.
25. Yan P.S., Perry M.R., Laux D.E. et al. (2000) CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6(4): 1432–1438.
26. Yu D.D., Lv M.M., Chen W.X. et al. (2015) Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. *Tumour Biol.*, 36(3): 1395–1401.
27. Zhao X., Lu C., Chu W. et al. (2017) MicroRNA-124 suppresses proliferation and glycolysis in non-small cell lung cancer cells by targeting AKT-GLUT1/HK1. *Tumour Biol.*, 39(5): 101042831706215.

Differential expression of miR-124 and miR-155 in tumor tissue of breast before and after neoadjuvant chemotherapy

Д.Е. Рупаєва, Н.М. Храновська, М.В. Іномістова
 National Cancer Institute, Kyiv

Summary. Recently, numerous studies have shown the important role of microRNAs in the development of cancer. They are proposed as potential biomarkers for the cancer diagnosis and therapy. We examined the potential of the tumor suppressor miR-124 and oncogen miR-155 in patients with breast cancer (BC) before and after neoadjuvant chemotherapy (NACT). The BC was characterized by decreasing of miR-124 expression level and by overexpression of miR-155. These expression violations of microRNAs mainly contribute to tumor growth. Our results have shown that the aberrant expression of miR-155 is present in the human BC. After NACT miR-124 expression was restored. This result can be characterized as positive effect, since this microRNA causes silencing of genes which are responsible for tumor growth and progression. The persistent overexpression of miR-155 after NACT may indicate necessity to test this miRNA during the treatment for understanding its role in chemoresistance. Further investigations will be required in order to examine these markers and to assess their reliability in identifying patients with the BC and in monitoring the effectiveness of the treatment.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, microRNA, miR-124, miR-155.