

## ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Веряскина Ю.А.<sup>1</sup>, Титов С.Е.<sup>1,2</sup>, Родионов В.В.<sup>3,4</sup>, Генинг Т.П.<sup>3</sup>, Абакумова Т.В.<sup>3</sup>,  
Кометова В.В.<sup>4</sup>, Торосян М.Х.<sup>4</sup>, Жимулев И.Ф.<sup>1</sup>, Колесников Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт Молекулярной и Клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия, fl-31@mail.ru

<sup>2</sup> ЗАО "Вектор-Бест", Кольцово, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42), e-mail:contact@ulsu.ru

<sup>4</sup> ГУЗ Ульяновский областной клинический онкологический диспансер. 432017, г. Ульяновск

С целью определения различий в экспрессии миРНК в опухолевой ткани различных молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы и смежной условно нормальной ткани молочной железы методом ОТ-ПЦР в реальном времени оценивали уровень экспрессии миРНК-21, 221, 222, 155, 205, 20a, 125b и 200a. Установлено значительное увеличение уровня экспрессии онкогенных миРНК-20a ( $p=0.000141$ ) и миРНК-221( $p=0.037777$ ) в тройном негативном раке в сравнении с люминальным А и люминальным В/HER2/neu-негативными подтипами рака молочной железы. Оценка значимости полученных результатов проведена при помощи ROC анализа. Для миРНК-221 значение AUC = 0.772, для миРНК-20a значение AUC=0.949. Таким образом, миРНК-20a является значимым классификатором для дифференциации наиболее агрессивного рака молочной железы с тройным негативным фенотипом.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК, ROC-анализ.

## EXPRESSION OF MICRORNAS IN MOLECULAR GENETIC BREAST CANCER SUBTYPES

Veryaskina Y.A.<sup>1, 2</sup>, Titov S.E.<sup>1,2</sup>, Rodionov V.V.<sup>3,4</sup>, Gening T.P.<sup>3</sup>, Abakumova T.V.<sup>3</sup>,  
Kometova V.V.<sup>4</sup>, Torosyan M.K.<sup>4</sup>, Zhimulev I.F.<sup>1</sup>, Kolesnikov N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cell Biology, Novosibirsk, 630090, Russia, fl-31@mail.ru

<sup>2</sup> Company "Vector-Best", Koltsovo, Russia

<sup>3</sup> Ulyanovsk State University, 432017, Ulyanovsk, Naum-53@yandex.ru

<sup>4</sup> Ulyanovsk Regional Clinical Oncology Center, 432017, Ulyanovsk

In order to determine differences in expression of miRNA in the tumor tissues of various molecular-genetic subtypes of breast cancer and adjacent conditionally normal breast tissue, we assessed the levels of miRNA-21, 221, 222, 155, 205, 20a, 125b and 200a expression by real time RT-PCR. A significant increase in the levels of expression of the oncogenic miRNA-20a ( $p = 0.000141$ ) and miRNA-221 ( $p = 0.037777$ ) in the triple negative cancer in comparison with the luminal A and luminal B / HER2 / neu-negative breast cancer subtypes was established. Assessment of significance of the results was conducted using ROC analysis. For miRNA-221 AUC value was 0.772, for miRNA-20a AUC was 0.949. Therefore, miRNA-20a is an important qualifier for the differentiation of the most aggressive -triple-negative - breast cancer phenotype.

Keywords: breast cancer, miRNA, ROC-analysis.

Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественное новообразование, развивающееся из клеток эпителия протоков и долек паренхимы молочной железы. В экономически развитых странах РМЖ – наиболее частая форма онкологического заболевания женщин. Самые высокие стандартизованные показатели заболеваемости РМЖ – 32 % всех случаев впервые диагностированных случаев рака у женщин, – зарегистрированы в США. В России в 2006 году распространенность РМЖ среди пациентов со злокачественными опухолями составила 17,8 %. Исследование венозной крови на опухолевые маркеры не является высокоспецифичным, его не используют для первичной диагностики РМЖ. Определение молекулярных опухолевых маркеров имеет прогностическое значение. В конце 90-х годов

прошлого века в группе раков молочной железы были выделены опухоли, в которых не обнаруживаются рецепторы эстрогенов прогестерона и не наблюдается амплификация гена HER-2-neu, – так называемый тройной негативный РМЖ [8]. На сегодня установлено, что примерно в 80 % случаев трижды негативный и базальный РМЖ совпадают. Но трижды негативный РМЖ включает в себя и некоторые особые гистологические типы. Окрашивание на базальные кератины при этом считается недостаточно воспроизводимым для широкого использования. На практике клиницисты сталкиваются с ситуациями, когда люминальные подтипы РМЖ, характеризующиеся наиболее благоприятным течением, ведут себя крайне агрессивно, при этом заболевание быстро прогрессирует и нередко заканчивается летальным исходом. И наоборот, наиболее агрессивный рак с тройным негативным фенотипом может протекать индолентно годами и не требовать адъювантных терапевтических методов лечения. Всё это требует поиска дополнительных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих максимально индивидуализировать лечение больных РМЖ. Открытие молекул-ингибиторов синтеза белков на посттранскрипционном уровне – микроРНК(миРНК) предоставило новые возможности в поиске специфических маркеров новообразований. Показано, что каждый тип опухолей человека обладает уникальным набором экспрессируемых миРНК, и опухоль специфические миРНК в биологических тканях больного стабильны. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось определение различий в экспрессии миРНК в опухолевой ткани инвазивной карциномы молочной железы по сравнению с нормальной тканью, а также анализ варибельной экспрессии миРНК в молекулярно-генетических подтипах РМЖ.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили 35 биоптатов опухолевой ткани и 35 биоптатов смежной условно нормальной ткани, соответственно, полученных в ходе оперативного радикального лечения 35 пациенток с диагнозом рак молочной железы в ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер г. Ульяновска в 2014 году. Хирургическое лечение проводилось без предварительного химиолучевого воздействия. Средний возраст пациенток составил  $50 \pm 5,3$  года. Стадия процесса была подтверждена патоморфологически после выполнения оперативного лечения и определялась согласно международной классификации TNM в 7 редакции от 2010 г. В 11 случаях была диагностирована I стадия заболевания, в 17 случаях – II стадия, в 7 случаях – III стадия. В 26 биоптатах опухолевой ткани молочной железы были выявлены люминальный А и люминальный В/HER2/neu-негативный РМЖ; в 6 случаях был рак с тройным негативным фенотипом; в 1 биоптате был диагностирован люминальный/HER2/neu-позитивный рак и в 2 случаях – HER2/neu-позитивная карцинома. Ввиду малого числа наблюдений в двух последних подтипах в анализ включены пациенты с люминальным А и люминальный

В/HER2/neu-негативным подтипами РМЖ. Для хранения и транспортировки операционного материала использовался раствор для стабилизации РНК RNA later, позволяющий выделять РНК из тканей и клеток без замораживания в жидком азоте. Выделение суммарного пула РНК проводили с помощью набора «Реал Бест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) в соответствии с инструкцией производителя. Обратная транскрипция была проведена при помощи специфичных праймеров к миРНК: миРНК-21, миРНК-221, миРНК-222, миРНК-155, миРНК-205, миРНК-20а, миРНК-125b, миРНК-146b, миРНК-200а. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием готовой реакционной смеси «Реал Бест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Полученную кДНК, в объеме 3 мкл сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Измерение уровней экспрессии миРНК проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) [2]. В качестве референсного гена использовали малую РНК U6. Реакцию ПЦР проводили в объеме 30 мкл с использованием готовой реакционной смеси «Реал Бест Мастер микс» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и раствора прямого и обратного праймеров (5 мкМ) и зонда (2.5 мкМ). Уровень экспрессии миРНК измерен при помощи метода ОТ - ПЦР в реальном времени. Статистическая обработка проводилась с применением непараметрического U-критерия Манна – Уитни в программе Statistica 10.0. Для того чтобы оценить значимость выявленных различий, проведена математическая обработка методом построения ROC – кривой с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21.

**Результаты и обсуждение.** Все миРНК разделены на онкогены и онкосупрессоры в зависимости от их роли в канцерогенезе РМЖ. МиРНК является онкогенной, если ее мишенью является онкосупрессорный ген, и наоборот, миРНК является онкосупрессорной, если её мишенью является онкоген. Стоит отметить, что одна миРНК может выступать как в роли онкогена, так и в роли онкосупрессора в зависимости от гена мишени, а также ткани, в которой она экспрессируется [1]. Проведен анализ экспрессии девяти миРНК: миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20а, -125b, -146b, -200а в опухолевой ткани люминального А и люминального В/HER2/neu-негативного подтипов РМЖ в сравнении с прилежащей морфологически неизменной тканью. Были получены статистически значимые различия уровня экспрессии для семи миРНК: миРНК-21,-221,-222,-155,-205,-125b,-200а. Наиболее значимые различия в опухолевой ткани и в прилежащей морфологически неизменной ткани (более чем в 3 раза) наблюдали для двух онкогенных миРНК: миРНК – 155 и миРНК – 21 и двух онкосупрессорных миРНК: миРНК-205 и миРНК-125b (Табл.1). В ряде исследований было показано, что миРНК-21 является онкогеном и ингибирует опухолевые супрессоры Pcd4 и PTEN [9], а также коррелирует со стадией злокачественного процесса

[3]. Одновременно было показано, что миРНК-155 также является онкогеном и участвует во множестве клеточных процессов, таких как регуляция пролиферации, миграция, вторжение, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и иммунный ответ [11,7]. Wang и соавт. показали, что в культуре клеток РМЖ избыточная экспрессия миРНК-205 ингибирует пролиферацию, усиливает апоптоз, и уменьшается вторжение раковых клеток молочной железы, характеризуя миРНК-205 как онкосупрессор [13]. МиРНК-125b также является онкосупрессором для РМЖ и уменьшает пролиферативную активность клеток [4,14]. Таким образом, миРНК-205 и миРНК-125b играют ключевую роль в прогрессировании и развитии рака молочной железы. Так же стоит обратить внимание на увеличение уровня экспрессии миРНК-200а почти в 2 раза в опухолевых образцах по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью (Табл.1). Семейство миРНК-200 регулирует ЭМП в различных типах рака, а также коррелирует с наличием легочных метастазов [12,6].

**Таблица 1**

Изменение уровня экспрессии миРНК в опухолевой ткани люминального А и люминального В/HER2/неу-негативного подтипов РМЖ по сравнению с прилежащей морфологически неизменной тканью

	миРНК								
	155	21	200a	146b	205	125b	221	222	20a
Различие	<b>3.68</b>	<b>3.66</b>	<b>1.78</b>	1.02	<b>7.84</b>	<b>7.78</b>	<b>1.71</b>	<b>1.56</b>	1.17
Динамика	увеличение				понижение				
<i>P</i>	<b>0.000096</b>	<b>0.000980</b>	<b>0.082627</b>	0.744 125	<b>0.000050</b>	<b>0.000020</b>	<b>0.006062</b>	<b>0.016630</b>	0.2126 82

*Примечания:*  $p < 0.05$  – различия статистически значимы между опухолевой тканью и прилежащей морфологически неизменной тканью.

Проведен анализ экспрессии девяти миРНК: миРНК-21, -221, -222, -155, -205, -20а, -125b, -146b, -200а в опухолевой ткани у пациенток с тройным негативным фенотипом РМЖ (ТНРМЖ) в сравнении с прилежащей морфологически неизменной тканью. Были получены статистически значимые различия уровня экспрессии для трёх миРНК: миРНК-20а, -205, -125b (Табл.2). Во множестве исследований было показано, что миРНК-20а является онкогеном и сверхэкспрессируется при РМЖ [5]. Также мы наблюдали значительное снижение (более чем в 3 раза) уровня экспрессии двух онкосупрессорных миРНК: миРНК-125b и миРНК-205 в опухолевой ткани в сравнении с прилежащей морфологически неизменной тканью. Как было описано выше миРНК-205 и миРНК-125b являются ключевыми участниками канцерогенеза, и их пониженная экспрессия ассоциирована с неблагоприятным прогнозом РМЖ. Кроме того, мы наблюдали тенденцию к увеличению

уровня экспрессии онкогенных миРНК -21 и миРНК-155 в опухолевой ткани тройного негативного РМЖ в сравнении с прилегающей морфологически неизменной тканью.

**Таблица 2**

Изменение уровня экспрессии миРНК в опухолевой ткани ТНРМЖ по сравнению с прилегающей морфологически неизменной тканью

	миРНК								
	155	21	20a	200a	146b	125b	205	222	221
Различие	7.01	3.23	<b>3.16</b>	2.52	1.97	<b>10.45</b>	<b>3.50</b>	1.86	1.12
Динамика	увеличение					понижение			
<i>P</i>	0.111111	0.055555	<b>0.031746</b>	0.095238	0.547619	<b>0.015873</b>	<b>0.007936</b>	0.547619	0.841269

*Примечания:*  $p < 0.05$  – различия статистически значимы между опухолевой тканью и прилегающей морфологически неизменной тканью.

Проведено сравнение значений  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  выбранной группы миРНК между пациентами с люминальными подтипами РМЖ и пациентами с ТНРМЖ (Табл. 3).

**Таблица 3**

Изменение экспрессии миРНК в ТНРМЖ по сравнению с люминальными подтипами РМЖ.

миРНК	Различие	Динамика	<i>P</i>
миРНК - 221	<b>43.03</b>	увеличение	<b>0.0377779</b>
миРНК - 222	11.3	увеличение	0.2246853
миРНК - 20a	<b>6.42</b>	увеличение	<b>0.0001413</b>
миРНК - 200a	2.39	увеличение	0.0965447
миРНК - 155	2.33	увеличение	0.3078420
миРНК - 21	1.99	увеличение	0.3813739
миРНК - 146b	1.63	увеличение	0.1185532
миРНК - 125b	1.89	понижение	0.2641339
миРНК - 205	1.01	понижение	0.8265458

*Примечания:*  $p < 0.05$  – различия статистически значимы между опухолевой тканью и прилегающей морфологически неизменной тканью

Мы установили, что уровень экспрессии онкогенной миРНК-221 в 43 раза выше в ТНРМЖ, чем в люминальном А и люминальном В/HER2/неу-негативном подтипах РМЖ ( $p < 0.05$ ). МиРНК-221 является онкогеном и регулирует два ключевых механизма в развитии опухоли: ингибирует супрессор p27 и способствует переходу ЭМП путем ингибирования E-кадгерина. По всей вероятности, миРНК-221 играет важную роль в ТНРМЖ [10]. Мы также установили, что уровень онкогенной миРНК-20a повышен почти в 7 раз в ТНРМЖ в

сравнении с люминальными подтипами РМЖ ( $p < 0.001$ ). Таким образом, повышенная экспрессия онкогенных миРНК-221 и миРНК-20а является отличительной характеристикой ТНРМЖ и характеризует более агрессивное его течение. ROC-анализ позволил установить, что значение AUC для миРНК-221 равно 0.772, что говорит о высокой значимости данного критерия в понимании различий между тройным негативным и люминальными подтипами РМЖ. Значение AUC для миРНК-20а равно 0.949, что делает его отличным маркером ТНРМЖ.

### **Заключение**

Таким образом, полученные результаты позволили сформировать уникальный профиль экспрессии миРНК для различных молекулярно-генетических подтипов РМЖ. Уровни экспрессии онкогенных миРНК-221 и миРНК-20а повышены в ТНРМЖ в сравнении с люминальным А и люминальным В/HER2/neu-негативным подтипами РМЖ, подтверждая характеристику ТНРМЖ, как наиболее агрессивного подтипа РМЖ. Для оценки значимости полученных различий проведен ROC анализ. Для миРНК-20а значение AUC равно 0.949. Таким образом, миРНК-20а является маркером ТНРМЖ в сравнении с люминальными подтипами РМЖ.

### **Список литературы**

1. Колесников Н.Н. МикроРНК, Эволюция и рак /Н.Н. Колесников, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина и др. // Цитология. – 2013. – Т.55, № 3. – С.159-164.
2. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen, Ridzon D.A., Broomer A.J., et al. // NucleicAcidsRes. – 2005. – Vol. 33(20). – P.179
3. Chen J. MicroRNA-21 in breast cancer: diagnostic and prognostic potential / J. Chen, X.Wang // Clin Transl Oncol. – 2014. – Vol.16(3). – P.225-33.
4. Feliciano A., Castellvi J., Artero-Castro A., et al. miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9. / A. Feliciano, Castellvi J., Artero-Castro A., et al. // PLoS One. – 2013. – Vol.8(10). – P.76247.
5. Kim K. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer / K. Kim, Chadalapaka G., Lee S.O., et al. // Oncogene. – 2012. – Vol.31(8). – P.1034-44.
6. Korpai M., B.J.Ell, F.M.Buffa, et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization / M. Korpai, B.J.Ell, F.M.Buffa, et al. // Nat Med. – 2011. – Vol.17(9). – P.1101-8.
7. Mattiske S. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. / S. Mattiske, R.J.Suetani, P.M.Nielsen, D.F. Callen // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2012. – Vol.21(8). – P.1236-43.

8. Parikh R.R. Prognostic value of triple-negative phenotype at the time of locally recurrent, conservatively treated breast cancer / R.R. Parikh, D.Housman, Q.Yang, D.Toppmeyer, L.D.Wilson, B.G. Haffty // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2008. – Vol.72(4). – P.1056-63
9. Qi L. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma / L. Qi, J.Bart, L.P.Tan, et al. // *BMC Cancer.* – 2009. – Vol.9. – P.163.
10. Rounak Nassirpour miR-221 Promotes Tumorigenesis in Human Triple Negative Breast Cancer Cells / Nassirpour Rounak, P. Mehta Pramod, M. Baxi Sangita, Yin.Min-Jean // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(4). – P.62170.
11. Ryan M. O'Connell. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response / M. O'Connell Ryan, Konstantin D. Taganov, Mark P. Boldin, Genhong Cheng, and David Baltimore. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – Vol.104(5). – P.1604-9.
12. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease / J.P. Thiery, H.Acloque, R.Y.Huang, M.A.Nieto // *Cell.* – 2009. – Vol.139(5). – P.871-90.
13. Wang Z. miRNA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer / Z. Wang, , H.Liao, Z.Deng, P.Yang, N.Du, Y.Zhanng, H.Ren // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – Vol. 441(1). – P.139-43.
14. Zhang Y. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer / Y. Zhang, L.X.Yan, Q.N.Wu, et al. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol.71(10). – P.3552-62.

**Рецензенты:**

Антонеева И.И., д.м.н., заведующая гинекологическим отделением ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, врач высшей квалификационной категории, г. Ульяновск;

Демаков С.А., д.б.н., заведующий лабораторией хромосомной инженерией ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск.