

Гришина К.А.¹, Поспехова Н.И.¹, Хайленко В.А.², Карпукхин А.В.¹

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК С РАННЕЙ СТАДИЕЙ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», 115522, Москва, Россия;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, 115478, Москва, Россия

Серьёзным осложнением рака молочной железы (РМЖ) является метастазирование опухолевых клеток. Инициация данного процесса происходит в близлежащие лимфатические сосуды. На сегодняшний день молекулярные механизмы метастазирования недостаточно изучены и требуются дальнейшие исследования. В этом плане уровень экспрессии микроРНК может дать информацию о механизмах развития метастазирования и быть источником маркеров прогноза метастатического РМЖ. В настоящей работе, по данным литературы, нами были отобраны 4 микроРНК (miR-34a, miR-145, miR-125b и miR-222), потенциально способных быть связанными с метастазированием, для изучения их ассоциации с метастазированием в лимфатические узлы на ранней стадии.

Измерение экспрессии 4 отобранных микроРНК на 40 парных образцах (опухоль-норма) производилось при помощи ПЦР в реальном времени. Были определены частоты пониженной или повышенной экспрессии микроРНК miR-34a, miR-145, miR-125b и miR-222 относительно нормальной ткани. Для более детального изучения связи экспрессии микроРНК с метастазированием в лимфатические узлы были выбраны miR-125b и miR-222. Была найдена ассоциация экспрессии этих 2 микроРНК с началом метастазирования в лимфатические узлы: с одинаковым уровнем достоверности различия ($p=0,01$).

Обе микроРНК (miR-125b и miR-222) участвуют в метастазировании РМЖ, видимо, посредством воздействия на эпителиально-мезенхимальный переход. Они потенциально могут выступать в качестве прогностических биомаркеров для оценки вероятности ранних метастазов в лимфатические узлы при РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; метастазирование; лимфатические узлы; экспрессия; микроРНК; miR-34a; miR-145; miR-125b; miR-222.

Для цитирования: Гришина К.А., Поспехова Н.И., Хайленко В.А., Карпукхин А.В. Ассоциация экспрессии микроРНК с ранней стадией метастазирования рака молочной железы. *Российский онкологический журнал*. 2018; 23 (3–6): 129–133. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2018-23-3-6-129-133>.

Для корреспонденции: Гришина Кристина Александровна, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова». E-mail: grstina@yandex.ru

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Карпукхин А.В., Гришина К.А., Поспехова Н.И.

Сбор и обработка материала – Хайленко В.А., Поспехова Н.И., Гришина К.А.

Статистическая обработка – Карпукхин А.В., Гришина К.А.

Написание текста – Карпукхин А.В., Гришина К.А.

Редактирование – Карпукхин А.В.

Grishina K.A.¹, Pospekhova N.I.¹, Khaylenko V.A.², Karpukhin A.V.¹

ASSOCIATION OF MICRORNA EXPRESSION WITH EARLY STAGE OF BREAST CANCER METASTASIS

¹Research Centre for Medical Genetics (RCMG), 115522, Moscow, Russian Federation;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

A serious complication of breast cancer is metastasis of tumor cells. The initiation of this process takes place in the nearby lymphatic vessels. To date, the molecular mechanisms of metastasis are not well understood and further research is required. In this regard, the level of miRNA expression can provide information both on the mechanisms of metastasis development and also be a source of markers for the prognosis of metastatic breast cancer. In the present work, according to the literature, we selected four microRNAs (miR-34a, miR-145, miR-125b and miR-222), potentially capable of being associated with metastasis, to study their association with metastasis to lymph nodes at an early stage.

The measurement of the expression of four selected miRNAs on 40 paired samples (tumor-norm) was performed using real-time PCR. Frequencies of miR-34a, miR-145, miR-125b, and miR-222 relative to normal tissue were determined for reduced or increased miR-mRNA expression. For a more detailed study of the association of miRNA expression with lymph node metastasis, miR-125b and miR-222 were selected. An association of expression of these two miRNAs was found with the onset of metastasis to the lymph nodes: with the same level of confidence, differences ($p = 0.01$). Both miRNAs (miR-125b and miR-222) are involved in the metastasis of breast cancer, apparently by influencing the epithelial-mesenchymal transition. They can potentially act as prognostic biomarkers to assess the likelihood of early lymph node metastases in breast cancer.

Key words: breast cancer; metastasis; lymph nodes; expression; miR-34a, miR-34a, miR-145, miR-125b, miR-222, marker.

For citation: Grishina K.A., Pospekhova N.I., Khaylenko V.A., Karpukhin A.V. Association of microRNA expression with early stage of breast cancer metastasis. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2018; 23 (3–6): 129–133. (In Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2018-23-3-6-129-133>.

For correspondence: *Kristina A. Grishina*, researcher of the Laboratory of molecular genetics of complex inherited diseases RCMG. E-mail: grstina@yandex.ru

Contribution

Authors: Grishina, Pospekhova, Khaylenko, Karpukhin

Authors participation:

The concept and design of the study – Karpukhin, Grishina, Pospekhova

Collection and processing of material – Khaylenko, Pospekhova, Grishina

Statistical processing – Karpukhin, Grishina

Text Writing – Karpukhin, Grishina

Editing – Karpukhin

Information about authors:

Grishina K. A. <https://orcid.org/0000-0002-0394-7801>

Pospekhova N. I. <https://orcid.org/0000-0001-5255-5065>

Khaylenko V. A. <https://orcid.org/0000-0002-9924-5854>

Karpukhin A. V. <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was performed as part of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia.

Received 21 August 2018
Accepted 04 September 2018

Рак молочной железы (РМЖ) относится к наиболее распространённым типам рака. Каждый год РМЖ диагностируется у 2,1 миллиона женщин. По оценкам, в 2018 г. от РМЖ умерло 627 тыс. женщин – это примерно 15% всех случаев смерти от рака среди женщин. В то время как уровень заболеваемости РМЖ выше среди женщин в более развитых регионах, он увеличивается почти во всех регионах мира [1].

Серьёзным осложнением РМЖ является метастазирование опухолевых клеток в ткани других органов. Инвазивный РМЖ развивается у 240 тыс. женщин и приводит к 40 тыс. смертельных случаев в год в США [2]. Инициация данного процесса происходит в близлежащие лимфатические сосуды, и в основном данный процесс затрагивает подмышечный лимфатический узел. Несмотря на достижения высокого охвата скрининговыми методами, почти у 12% женщин с РМЖ обнаруживают метастазы. Метастазирование наиболее часто приводит к летальному исходу.

В настоящее время существует ряд эффективных методов лечения РМЖ, но метастатический РМЖ редко поддаётся лечению. Хотя хирургическое вмешательство является основным методом лечения, большое значение имеет адъювантная химиотерапия. Этот факт, а также развитие персонализированной медицины приводят к задаче более точного прогнозирования течения заболевания, связанного с этим объёмом хирургического вмешательства, а также выбора средств таргетной терапии у больных РМЖ.

На сегодняшний день молекулярные механизмы метастазирования недостаточно изучены и требуются дальнейшие исследования. В этом плане уровень экспрессии микроРНК может дать информацию как о механизмах развития метастазирования, так и быть источником маркеров прогноза метастатического рака молочной железы. Выявление и изучение микроРНК, тесно связанных с развитием метастатического РМЖ, могут внести существенный вклад в понимание процессов, происходящих при метастазировании опухоли, и персонализацию лечения. Таким эффективным средством диагностики может быть метод, основанный на количественном определении уровня микроРНК.

МикроРНК представляют собой группу небольших молекул, которые эволюционно высококонсервативны и кодируются примерно 1% генома у большинства видов. Это класс некодирующих белков РНК, которые функционируют в качестве регуляторов генов путём деградации их мРНК-мишеней и ингибирования трансляции. Было обнаружено более 2 тыс. микроРНК человека, которые регулируют около 30% всех генов [3].

В настоящей работе по данным литературы нами были отобраны 4 микроРНК (miR-34a, miR-145, miR-125b и miR-222), потенциально способных быть связанными с метастазированием, для изучения их ассоциации с метастазированием в лимфатические узлы на ранней стадии.

Материалы и методы

В данной работе исследовались парные свежемороженые образцы нормальной и опухолевой ткани молочной железы больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследование были включены парные образцы (опухоль-норма) ткани молочной железы 40 больных РМЖ в возрасте 36–83 года, включая 10 больных с ранними метастазами в лимфатические узлы (преимущественно N1). Все образцы охарактеризованы гистологически, иммуногистохимически и классифицированы по TNM, а также указаны баллы по рецепторам эстрогена и прогестерона. Основное их число представлено инфильтративным протоковым РМЖ и 24 больных имеют более 5 баллов по рецептору эстрогена (медиана уровня экспрессии рецепторов эстрогена α в опухолевой строме) по данным иммуногистохимии. В выборке представлены в основном больные с РМЖ люминального типа А и В.

Выделение РНК производили при помощи наборов: miRNeasyMiniKit (QIAGEN, США) – предназначенных для ткани. Все процедуры проводили согласно инструкции к наборам. Наличие и качество РНК проверяли, используя электрофорез в 1,8% агарозном геле. Электрофорез проводили в горизонтальном аппарате для электрофореза SUB CELL 96 BIO-RAD производства США при постоянной силе тока 130 мА в течение 30 мин. Концентрацию водного раствора РНК определяли на спектрофотоме-

тре Nanodrop 1000 (ThermoScientific, США) согласно инструкции к прибору. Обратную транскрипцию проводили, используя набор TagManMicroRNAReverseTranscriptionKit (AppliedBiosystems, США). Уровень экспрессии измеряли с помощью прибора для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)–StepOnePlus (AppliedBiosystems, США). Каждое измерение проводили трижды. ПЦР-РВ осуществляли с использованием наборов для оценки уровня экспрессии микроРНК TaqMan® miRNAAssays hsa-miR-125b-5p, TaqMan® miRNAAssays hsa-miR-222*, TaqMan® miRNA hsa-miR-34a-5p, TaqMan® miRNAAssays hsa-miR-145. Анализ результатов проводили с помощью встроенного программного обеспечения StepOneSoftware, которое позволяет сравнить относительные количества целевой последовательности РНК в опухолевой и нормальной ткани. В качестве контрольной использовали микроРНК₄₈. В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии микроРНК в опухолевой ткани относительно нормальной. Полученный массив данных обрабатывался с использованием пакета стандартных программ Statistica 10.0 и MedCalc. Уровень значимости для выявленных различий принимали равным $<0,05$.

Методом количественной ПЦР-РВ в парных образцах (опухоль–норма) у 40 больных были определены уровни экспрессии 4 микроРНК: miR-34a, miR-145, miR-125b и miR-222. Больные были разбиты на 2 группы по исследуемому признаку, метастазирование в лимфатические узлы. С использованием ROC-анализа были определены пороги, оптимально разделяющие метастазирующие опухоли и без метастазов по уровню экспрессии микроРНК, которые составили: для miR-34a больше 31,6, для miR-125b больше 3,6, для miR-145 больше 2, для miR-222 больше 3. Дальнейшую обработку производили с использованием данных порогов статистическим методом с использованием критерия Фишера. Уровень значимости принимали равным менее 0,05.

Результаты

Были исследованы особенности экспрессии 4 микроРНК (miR-34a, miR-145, miR-125b и miR-222) в парных образцах РМЖ (опухоль–норма) без метастазирования в лимфатические узлы (N0) и на ранних этапах метастазирования в лимфатические узлы (N1). Первоначально были определены частоты пониженной или повышенной экспрессии указанных микроРНК относительно нормальной ткани.

В соответствии с полученными результатами, микроРНК miR-34a экспрессируется примерно в одинаковом числе случаев как пониженно, так и повышено относительно нормы, в то время как miR-145, miR-125b и miR-222 экспрессируются в основном (65–85% случаев) пониженно по отношению к нормальной ткани (рис. 1).

Также были отдельно проанализированы группы метастазирующих опухолей и без метастазов. Так как было заметно обогащение опухолей больных с метастазированием экспрессией рецептора эстрогена более 5 баллов (9 больных из 10), предварительно была проанализирована возможная связь метастазирующих опухолей с эстрогеновым стату-

сом. Было получено, что частоты опухолей с высокими баллами эстрогена и меньше 5 не отличаются в группах с и без метастазирования в лимфатические узлы ($p=0,4$). То есть накопление метастатических опухолей в группе с экспрессией эстрогена является случайным.

При анализе экспрессии микроРНК отдельно по группам, видно, что профиль экспрессии микроРНК в группе без метастазирования в лимфатические узлы похож на профиль экспрессии целой выборке (рис. 1 и 2а).

В то же время профиль экспрессии в группе больных с ранним началом метастазирования в лимфатические узлы демонстрирует, что микроРНК

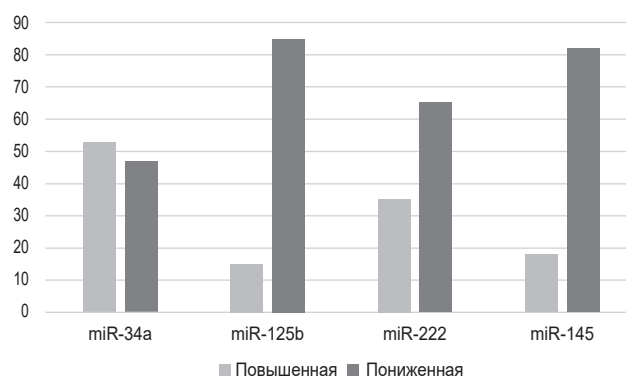


Рис. 1. Частоты экспрессии микроРНК в образцах опухоли РМЖ относительно нормальной ткани

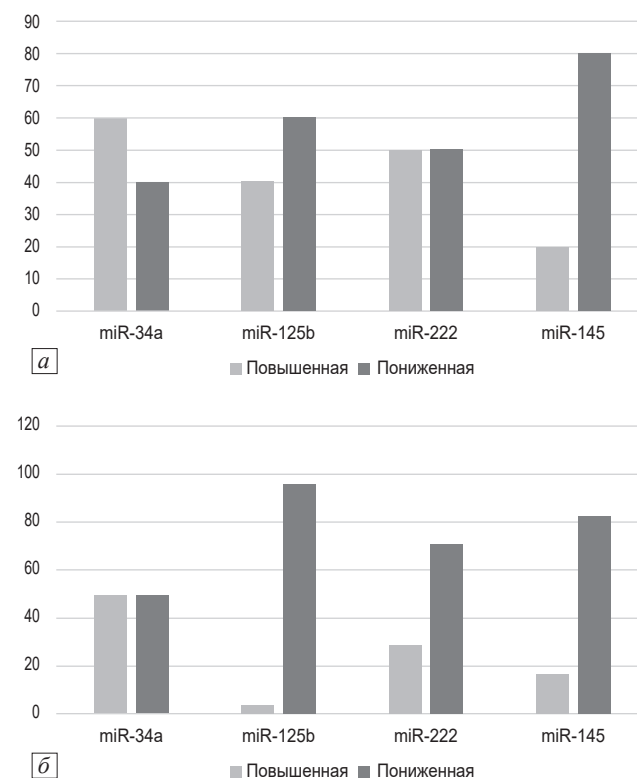


Рис. 2. Частоты повышенной и пониженной экспрессии 4 микроРНК относительно нормы: а) в группе больных без метастазирования в лимфатические узлы, б) в группе больных с ранним началом метастазирования в лимфатические узлы

miR-34a, miR-125b и miR-222 экспрессируются примерно в одинаковом числе случаев как пониженно, так и повышено, а miR-145 экспрессируется в основном пониженно (80% случаев) (рис. 2б). Как видно при анализе указанных профилей экспрессии, наиболее значимые изменения по отношению к неметастазирующим опухолям наблюдаются для микроРНК miR-125b – повышенная экспрессия в группе с метастазированием составила большую долю случаев (40%) по сравнению с группой без метастазов (4%). Подобные отличия наблюдались и в отношении miR-222 – в группе с метастазирующими опухолями заметно больше случаев с повышенной экспрессией. Характеристики экспрессии miR-145 практически не изменились, невелики отличия экспрессии miR-34a (рис. 2 а,б).

Для более детального изучения связи экспрессии микроРНК с метастазированием в лимфатические узлы были выбраны miR-125b и miR-222. С использованием точного критерия Фишера и определенных при ROC анализе пороговых значений экспрессии была найдена ассоциация экспрессии 2 микроРНК (miR-125b и miR-222) с началом метастазирования в лимфатические узлы: с одинаковым уровнем достоверности различия ($p=0,01$). Экспрессия этих микроРНК связана с существенным риском метастазирования РМЖ. Относительный риск (ОР) составил для miR-125b ОР = 6,00, 95%ДИ 1,39 -25,95 и для miR-222 ОР = 2,16, 95%ДИ 1,89 – 3,62.

Обсуждение

Хотя участие микроРНК в метастазировании РМЖ известно, их роль в развитии РМЖ на ранней стадии метастазирования изучена недостаточно. Нами исследована связь экспрессии 4 микроРНК с началом метастазирования в лимфатические узлы (N1).

Экспрессия 3 из изученных микроРНК (miR-145, miR-125b и miR-222) была понижена в основном числе образцов, что согласуется с данными, полученными в других работах [4–6]. МикроРНК miR-34a в нашей выборке была экспрессирована в близком соотношении по числу образцов как повышено, так и понижено относительно нормальной ткани. Имеющиеся в литературе данные неоднозначны – наблюдали как пониженную экспрессию miR-34a при РМЖ [7], так и разнонаправленную экспрессию этой микроРНК в различных образцах РМЖ [8]. Такая ситуация обусловлена, видимо, разным составом выборок РМЖ. Например, при люминальном раке чаще наблюдается повышение экспрессии miR-34a относительно нормы [8].

С ранней стадией метастазирования в лимфатические узлы оказались ассоциированы 2 микроРНК (miR-125b и miR-222). Данные литературы по микроРНК miR-125b противоречивы. Эта микроРНК по-разному экспрессируется в разных типах онкологических заболеваний, однако в опухолях яичника и молочной железы – низко экспрессируется [5]. Полученные нами результаты при нематастическом РМЖ коррелируют с данными литературы. Но при исследовании ассоциации miR-125b с ранним началом метастазирования в лимфатические узлы было выявлено статистически достоверное увеличение числа случаев с повышенной экспрес-

сией при метастазировании. То есть, повышенная экспрессия miR-125b ассоциирована с началом метастазирования в лимфатические узлы. Эти данные указывают в пользу действия этой микроРНК в качестве онкомира. Такое действие может быть связано с её участием в процессах эпителиально-мезенхимального перехода. Эпителиально-мезенхимальный переход – это процесс молекулярного перепрограммирования и фенотипического изменения, которое проявляется переходом эпителиальных клеток, связанных друг с другом полярной связью, что позволяет им быть неподвижными и крепко сцепленными, к подвижным мезенхимальным клеткам, что повышает их инвазивные свойства. Эпителиально-мезенхимальный переход сигнализирует о ранней стадии метастазирования, так как клетки, в которых происходят молекулярные изменения для разрыва соединения «клетка-клетка», способны отделяться от первичного очага опухоли, проникать через базальную мембрану в кровоток и приобретать обратно эпителиальный фенотип с образованием метастаза [9]. Повышенная экспрессия miR-125b способна приводить к изменению фенотипа клеток РМЖ (эпителиально-мезенхимальный переход), действуя через свою прямую мишень – ген-супрессор опухоли *STARD13*, путем реорганизации актинового цитоскелета. MiR-125b оказывает положительное действие на экспрессию *Vimentin* и α -SMA, также участвующих в процессе эпителиально-мезенхимального перехода.

Сообщалось, что микроРНК могут находиться в ломких участках хромосом, в частности, микроРНК miR-125b-1 находится в участке хромосомы 11q23. Возможно, что хромосомные транслокации могут привести к aberrантно высокой экспрессии miR-125b в молочной железе и других типах опухолей. Кроме того, микроРНК miR-125b может вмешиваться в онкогенную передачу сигналов, ингибируя ключевые компоненты сети p53, действуя как онкогенная miRNA, напрямую взаимодействуя с геном-супрессором опухоли p53 [10].

Ещё одна микроРНК – miR-222 – имела существенное различие экспрессии между группами с ранним метастазированием опухолей и без метастазирования. Данная микроРНК также оказывает влияние на эпителиально-мезенхимальный переход посредством гена-мишени *TRPS1* и *ZEB*. Нокдаун гена *TRPS1* приводит к увеличению экспрессии *ZEB2*, что в свою очередь через ген *E-cadherin* приводит к потере контакта «клетка-клетка». Увеличение экспрессии miR-222 способствует усилению миграции клеток и инвазии. Негативная регуляция РНК *E-кадгерина* с помощью miR-221/222 является результатом воздействия miR-221/222 на *TRPS1* и, таким образом, ослабления его ингибирования *ZEB2* [6]. Наша работа демонстрирует увеличение экспрессии онкомира miR-222 при метастазировании. Впервые была показана ассоциация повышенной экспрессии данной микроРНК с начальным этапом метастазирования в лимфатические узлы.

Таким образом, обе микроРНК (miR-125b и miR-222) участвуют в метастазировании РМЖ, видимо, посредством воздействия на эпителиально-мезенхимальный переход. Повышенные экспрессии данных микроРНК в опухолях молочной железы по сравнению с условно-нормальной тканью указыва-

ют на их роль как онкомаркеров в данном типе опухолей. Вследствие их связи с ранним метастазированием РМЖ они потенциально могут выступать в качестве прогностических биомаркеров для оценки вероятности ранних метастазов в лимфатические узлы при РМЖ.

Соблюдение этических стандартов

Данное исследование одобрено комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ им. Н.П. Бочкова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
2. Woods R. W., Camp M., Durr N. J., Harvey S. (Accepted/In press). A Review of Options for Localization of Axillary Lymph Nodes in the Treatment of Invasive Breast Cancer. *AcademicRadiology*. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2018.07.002>
3. Гришина К.А., Хайленко В.А., Хайленко Д.В., Карпухин А.В. Роль микроРНК в развитии РМЖ и их потенциал в качестве биомаркеров этого заболевания. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2018; 15 (3): 40–7. <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2018-14-3-40-47>
4. Hu J., Guo H., Li H., Liu Y., Liu J. et al. Retraction: MiR-145 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells by Targeting Oct4. *PLoS One*. 2013; 8 (5): 10.1371/annotation/aaef10de-ee36-416f-93eb-959dfa3dc92e. <https://doi.org/10.1371/annotation/aaef10de-ee36-416f-93eb-959dfa3dc92e>
5. Feng Tang, Rui Zhang, Yunmian He, Meijuan Zou, Le Guo, Tao Xi. MicroRNA-125b Induces Metastasis by Targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e35435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035435>
6. Chernyy V., Pustyl'nyak V., Kozlov V., Gulyaeva L. Increased expression of miR-155 and miR-222 is associated with lymph node positive status. *Journal of Cancer*. 2018; 9 (1): 135–40. DOI: 10.7150/jca.22181.
7. Xiaoping Rui, Haibin Zhao, Xianqiu Xiao, Li Wang, Lin Mo, Yao Yao. MicroRNA-34a suppresses breast cancer cell proliferation and invasion by targeting Notch1. *Exp. Ther. Med.* 2018; 16 (6): 4387–92. DOI: 10.3892/etm.2018.6744
8. Paola Bonetti, Montserrat Climent, Fabiana Panebianco, Chiara Tordonato, Angela Santoro, Matteo Jacopo Marzi, Pier Giuseppe Pelicci, Andrea Ventura & Francesco Nicassio. Dual role for miR-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer. *Oncogene*. 2019; 38: 360–74. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0445-3>
9. Yilmaz M., Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28: 15. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>
10. Yanwei Luo Xinye Wang Weihong Niu Heran Wang Qiuyuan Wen Songqing Fan Ran Zhao Zheng Li Wei XiongShuping Peng Zhaoyang Zeng Xiaoling Li Guiyuan Li Ming Tan Ming Zhou. Elevated microRNA-125b levels predict a worse prognosis in HER2-positive breast cancer patients. *Oncology letters*. 2016; 867–74. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5482>

Поступила 21.08.2018

Принята к печати 04.09.2018