ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 9, с. 1089–1098

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 575:599.9

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГРУППЫ ГЕНОВ И микроРНК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ПРОГРЕССИЕЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ СТАТУСОМ ОПУХОЛИ

© 2021 г. Е. А. Филиппова[1, *, #], И. В. Пронина[1, #], А. М. Бурденный[1], Т. П. Казубская[2], В. И. Логинов[1], Э. А. Брага[1]

[1]Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

[2]Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

*e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.10.2020 г.
После доработки 04.12.2020 г.
Принята к публикации 14.12.2020 г.

Актуальной задачей онкогеномики является поиск генов, экспрессия которых ассоциирована с показателями, специфично различающими тип рака молочной железы (РМЖ) и прогноз заболевания. Методом ПЦР в реальном времени на выборке из 41 образца РМЖ охарактеризована связь уровней экспрессии мРНК пяти опухоль-ассоциированных генов (*BCL6*, *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2*) и семи потенциально регуляторных микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) с клинико-патологическими параметрами опухолей и иммуногистохимическим статусом. Показано снижение уровня экспрессии *CHL1* и *AXL* и повышение уровня *BCL6* на поздних стадиях РМЖ. Кроме того, III–IV стадии РМЖ ассоциированы с увеличением уровня miR-339-3p, а метастазы в лимфоузлах – со снижением уровня miR-148a-3p. При высоком показателе пролиферации Ki-67 отмечено также увеличение уровня miR-375. Опухоли, не экспрессирующие рецептор прогестерона (PR), проявляют снижение уровня экспрессии *BCL6*, miR-375 и miR-24-2-5p. Снижение уровня экспрессии *BCL6* наблюдали также в РМЖ с отрицательным статусом эстрогенового рецептора (ER–). В образцах РМЖ с отрицательным HER2-статусом отмечено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *TGFB2* и miR-219-5p, а также снижение уровня экспрессии *TGFB2* выявлено при люминальном А РМЖ. Таким образом, определены новые возможные молекулярные показатели прогрессии РМЖ и биомаркеры, которые могут быть полезны при дифференциальной диагностике молекулярного подтипа РМЖ.

Ключевые слова: экспрессия генов, микроРНК, рак молочной железы, прогрессия рака, люминальный тип РМЖ.

DOI: 10.31857/S0016675821090022

Рак молочной железы (**РМЖ**) является наиболее распространенным видом рака у женщин как в развитых, так и в развивающихся странах [1]. Несмотря на значительные успехи в диагностических и терапевтических подходах за последние десятилетия, РМЖ все еще является второй по частоте причиной смерти от рака у женщин [2]. Опухоли молочной железы характеризуются значительной вариабельностью клеточного состава, а также гистологической, экспрессионной, генотипической гетерогенностью [3]. В клетках РМЖ изменена экспрессия многих генов, при этом профиль их экспрессии зависит от патологического фенотипа опухоли [4]. Описание подтипов РМЖ дополняется новыми данными по геномным нарушениям, метилированию ДНК, профилю экспрессии микроРНК и белоккодирующих генов (**БКГ**) [5]. Однако данные транскриптомного и протеомного анализов пока не позволяют выявить специфических маркеров для прогноза и лечения заболевания [6].

Следует отметить, что около 60% всех случаев РМЖ являются гормонозависимыми, из которых 75% случаев являются ER-положительными, а 65% – PR-положительными [7, 8]. В 20–30% всех случаев РМЖ наблюдается сверхэкспрессия HER2 (рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа, ген *ERBB2*), которая связана с неблагоприятным клиническим исходом у пациентов с РМЖ [9]. Выделяют пять основных подтипов РМЖ, а именно: *люминальный А* (ER+, PR±, HER-2 негативный, Ki-67 < 16%); *люминальный Б HER2-отрицательный* (ER+ и/или PR±, HER-2

[#] Авторы внесли равный вклад.

негативный, Ki-67 > 16%); *люминальный Б HER2-положительный* (ER+ и/или PR±, Ki-67 любой, HER-2 позитивный); *HER2-обогащенный* (ER, PR отсутствуют, HER-2 позитивный); *тройной негативный рак* (ER, PR отсутствуют, HER-2 негативный). Следует отметить, что на практике онкологи сталкиваются с ситуациями, когда люминальные подтипы РМЖ, характеризующиеся 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 годами и не требовать серьезных терапевтических методов лечения. Все это требует поиска дополнительных молекулярно-генетических маркеров, позволяющих повысить точность как цитологического, так и гистологического заключений и максимально индивидуализировать лечение больных РМЖ.

На сегодняшний день идентифицированы многочисленные БКГ и гены микроРНК – супрессоры опухолевого роста и онкогены, изменение уровня экспрессии которых ассоциировано с развитием и прогрессией рака, в том числе и РМЖ [10]. МикроРНК, являясь важными регуляторами экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, представляют собой перспективные маркеры многих видов рака, включая РМЖ [11]. Идентифицированы микроРНК, ускоряющие, а в некоторых случаях и замедляющие пролиферацию в клетках при тройном негативном РМЖ, для которого нет специфичного лечения, кроме хирургического, химио- и радиотерапии [12]. В настоящее время микроРНК рассматриваются как перспективные мишени не только для диагностики, но и для лечения этого типа рака [13].

Таким образом, поиск ассоциаций между изменением уровня экспрессии БКГ и генов микроРНК и молекулярными подтипами РМЖ, клинико-патологическими и иммуногистохимическими характеристиками больных РМЖ позволит найти новые маркеры для раннего выявления РМЖ, прогноза возникновения рецидива и вероятного ответа на гормональную и/или химиотерапию.

Цель данного исследования – изучение изменения уровня экспрессии мРНК группы опухоль-ассоциированных белоккодирующих генов и микроРНК с клинико-патоморфологическими параметрами РМЖ и его иммуногистохимическим статусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. Образцы РМЖ собраны и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Исследовали образцы РМЖ у больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Все опухоли молочной железы были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза [14] и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [15]. Использовали образцы опухолей и парные гистологически неизмененной ткани молочной железы, полученные от 41 больной РМЖ; клинико-морфологические данные пациенток приведены в табл. 1.

Образцы тканей хранили при –70°С. Полученные в ходе биопсии или оперативного вмешательства образцы объемом до 5 мм^3 измельчали, с использованием гомогенизатора-диспергатора Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Германия).

Выделение тотальной РНК. Тотальную РНК выделяли с использованием протокола гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [16]. Концентрацию суммарной РНК определяли спектрофотометрически при 260 нм. Качество РНК также оценивали спектрофотометрически с использованием коэффициентов поглощения при 260 против 230 нм и 260 против 280 нм. Сохранность РНК определяли по соотношению интенсивностей полос 28S рРНК и 18S рРНК при электрофорезе в 1%-ном денатурирующем агарозном геле. Перед использованием все образцы РНК обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКазы.

Анализ уровня экспрессии генов. Обратную транскрипцию мРНК БКГ проводили с помощью обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Россия) с добавлением “случайных” гекса- и нанонуклеотидных праймеров. При каждой постановке реакции обратной транскрипции были включены отрицательные контроли, не содержащие РНК.

Количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для мРНК пяти генов *ACSL1*, *AXL*, *BCL6*, *CHL1*, *TGFB2* проводили на кДНК по технологии SYBR Green с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (5×) в соответствии с протоколом производителя (Евроген) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США), последовательности праймеров приведены в табл. 2. В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, был выбран ген “домашнего хозяйства” *B2M* (табл. 2).

При обратной транскрипции зрелых микроРНК из тотальной РНК и при проведении ПЦР-РВ использовали готовые наборы TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя на амплификаторе BioRad CFX96.

Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по ΔΔCt-методу. Изменения уровня микроРНК менее чем

Таблица 1. Клинико-патоморфологическая характеристика больных РМЖ

Клинико-патоморфологический параметр		$N = 41$
Клиническая стадия	I	6
	II	24
	III	11
Степень дифференцировки	G1	3
	G2	33
	G3	3
Размер первичной опухоли	T1	7
	T2	25
	T3	4
	T4	5
Лимфогенное метастазирование	N0	18
	N1–3	23
Иммуногистохимический тип опухоли	Люминальный тип А (ER+; PR+; HER-2 негативный, Ki-67 < 16%)	5
	Люминальный тип Б (негативный) (ER и/или PR+; HER-2 негативный, Ki-67 > 16%)	7
	Люминальный тип Б (позитивный) (ER и/или PR+, Ki67 любой, HER-2 позитивный)	21
	HER-2+ (ER, PR отсутствуют, HER-2 позитивный)	6
	Тройной негативный рак (ER, PR отсутствуют, HER-2 негативный)	2
Статус рецепторов эстрогена	Положительный	29
	Отрицательный	12
Статус рецепторов прогестерона	Положительный	23
	Отрицательный	18
Статус HER2	Положительный	27
	Отрицательный	14
Статус Ki67	Низкий, <16%	11
	Промежуточный, 16–30%	14
	Высокий, >30%	16

в 2 раза ($|\Delta\Delta Ct| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений [17].

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ “IBM SPSS Statistics 22” и она включала определение медианы и интерквартильного размаха. Для оценки достоверности различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни, критерий Краскала–Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0.05$, где p – показатель статистической значимости (достоверности) различий между изучаемыми выборками. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини–Хохберга и оценивали величину FDR (false discovery rate, частота ложного обнаружения).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ уровня экспрессии белоккодирующих генов и микроРНК

Данная работа была направлена на анализ изменения уровня экспрессии мРНК белоккодирующих

Таблица 2. Праймеры, использованные при анализе БКГ методом ПЦР-РВ

Ген	Структура праймеров (5'–3')	$T_{отж}$, °C	Размер продукта, пн	Ссылка
ACSL1	F: ACTGTCTTCCCCGTGGTTCC R: AGGCTGTTGTTTCTGATGATGC	60	152	#
AXL	F: TACCGCGTGCGCAAGTCCTACA R: TGGCAATCTTCATCGTCTTCACAG	60	226	[18]
BCL6	F: CCAGCCACAAGACCGTCCAT R: CTCCGCAGGTTTCGCATTT	60	141	[19]
CHL1	F: GAACTATCCTTGCCAATGCCAATAT R: TTCTGCCAGGACACGACTGC	60	153	[17]
TGFB2	F: TGCAGAACCCAAAAGCCAGAGTG R: TACAAAAGTGCAGCAGGGACAGTG	60	236	#
B2M	F: TGACTTTGTCACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	60	81	[17]

– праймеры подобраны с помощью программы Primer Select из пакета программ Lasergene (htts://www.dnastar.com/).

генов и микроРНК, связанных с фундаментальными биологическими процессами, таким как эпителиально-мезенхимальный переход (ЕМТ) при раке молочной железы. Нами были отобраны пять белоккодирующих генов (*BCL6*, *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2*) и семь микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p и miR-375), предположительно связанных с клеточной адгезией, подвижностью и ЕМТ по данным http://www.genecards.org, http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed. Методом количественной ПЦР в реальном времени были исследованы профили экспрессии этих генов на выборке из 41 парного (опухоль/гистологически нормальная ткань молочной железы) образца РМЖ. Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии БКГ *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2* в опухоли по сравнению с гистологически неизмененной тканью молочной железы ($p < 0.01$, FDR = 0.05). Выявлено значимо частое повышение уровня экспрессии мРНК гена *BCL6* ($p < 0.001$, FDR = 0.05) в опухоли по сравнению с гистологически неизмененной тканью молочной железы (рис. 1*а*), что указывает на проявление про-опухолевых свойств *BCL6* при РМЖ. При анализе уровня экспрессии семи микроРНК (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) показано статистически значимое снижение уровня экспрессии двух микроРНК miR-132-3p и miR-137 ($p = 7.4 \times 10^{-6}$ и $p = 0.049$ соответственно) в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с парной гистологически нормальной тканью, что позволяет предположить опухоль-супрессорную функцию этих микроРНК при РМЖ (рис. 1*б*).

В то же время показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолевых образцах, которое указывает на ее онкогенные свойства при РМЖ. При этом изменение экспрессии miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p было статистически не достоверно.

Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с клинико-патологическими параметрами прогрессии РМЖ

Затем мы проанализировали связь между уровнем экспрессии БКГ и микроРНК и клинико-патологическими характеристиками образцов от больных РМЖ и обнаружили, что уровень экспрессии генов *CHL1*, *AXL* статистически значимо ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) снижался на более поздних стадиях (III–IV против I–II) РМЖ, в то время как уровень экспрессии гена *BCL6*, а также микроРНК miR-339-3p достоверно увеличивался на III–IV стадии по сравнению с I–II стадией РМЖ (рис. 2*а*). Отмечено снижение уровня экспрессии miR-148a-3p при наличии метастазов в лимфатических узлах (N_0M_0 против N_xM_x, $p = 0.02$), а для гена *BCL6* увеличение уровня экспрессии связано с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4, $p < 0.05$) (рис. 2*б*). Таким образом, полученные данные указывают на возможную негативную роль генов *CHL1* и *AXL*, а также miR-148a-3p в сдерживании прогрессии или метастазирования РМЖ, но позитивную роль *BCL6* и miR-339-3p – в прогрессии РМЖ.

Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с иммуногистохимическими показателями образцов РМЖ

Проведен анализ изменения уровня экспрессии БКГ и микроРНК в зависимости от иммуноги-

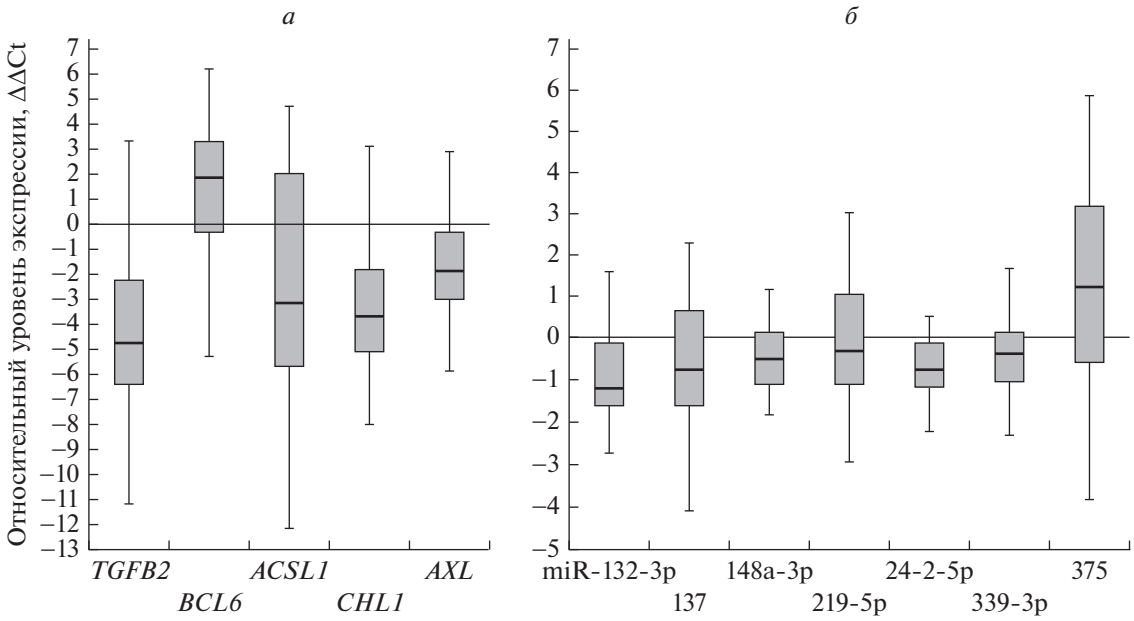

Рис. 1. Профиль экспрессии 5 БКГ (*а*) и 7 микроРНК (*б*) при РМЖ.

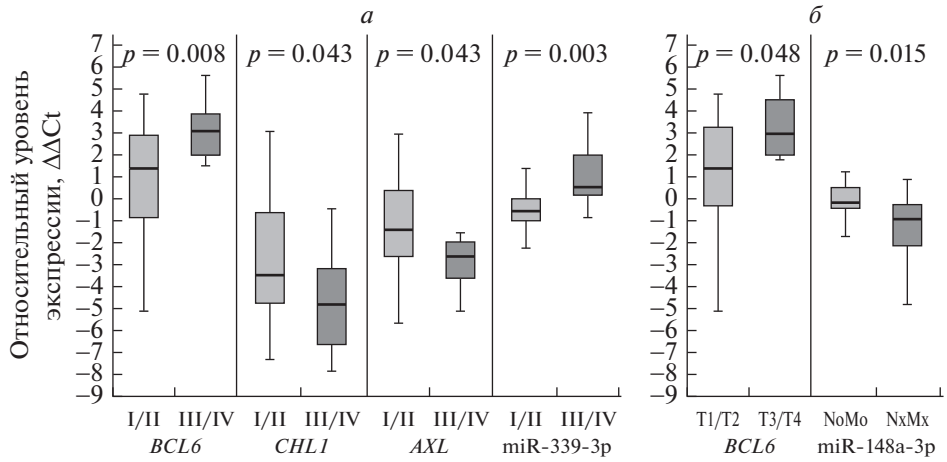

Рис. 2. Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с клинико-патологическими параметрами прогрессии РМЖ: *а* – со стадией онкологического процесса, *б* – с размером опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах.

стохимического статуса опухоли больных РМЖ (экспрессия ER, PR, HER2, Ki-67, рис. 3*а–д*). Показано статистически значимое повышение уровня экспрессии *TGFB2* в люминальном типе Б по сравнению с типом А (рис. 3*а*), что позволяет отнести данный ген к потенциальному биомаркеру при дифференциальной диагностике типа РМЖ. Выявлено снижение уровня экспрессии *BCL6* в опухолях РМЖ с ER-отрицательным статусом по сравнению с ER-положительным (рис. 3*б*). Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *BCL6*, miR-375 и miR-24-2-5p в опухолях молочной железы, не экспрессирующих рецептор прогестерона (PR) (рис. 3*в*).

При сопоставлении уровня экспрессии БКГ и микроРНК с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) было показано, что уровень экспрессии гена *TGFB2* и miR-219 значимо снижался при отсутствии экспрессии HER2 (рис. 3*г*). В то же время отмечалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы при высоком уровне экспрессии антигена Ki-67 (рис. 3*д*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе построены профили экспрессии пяти БКГ и семи микроРНК, показано значимое

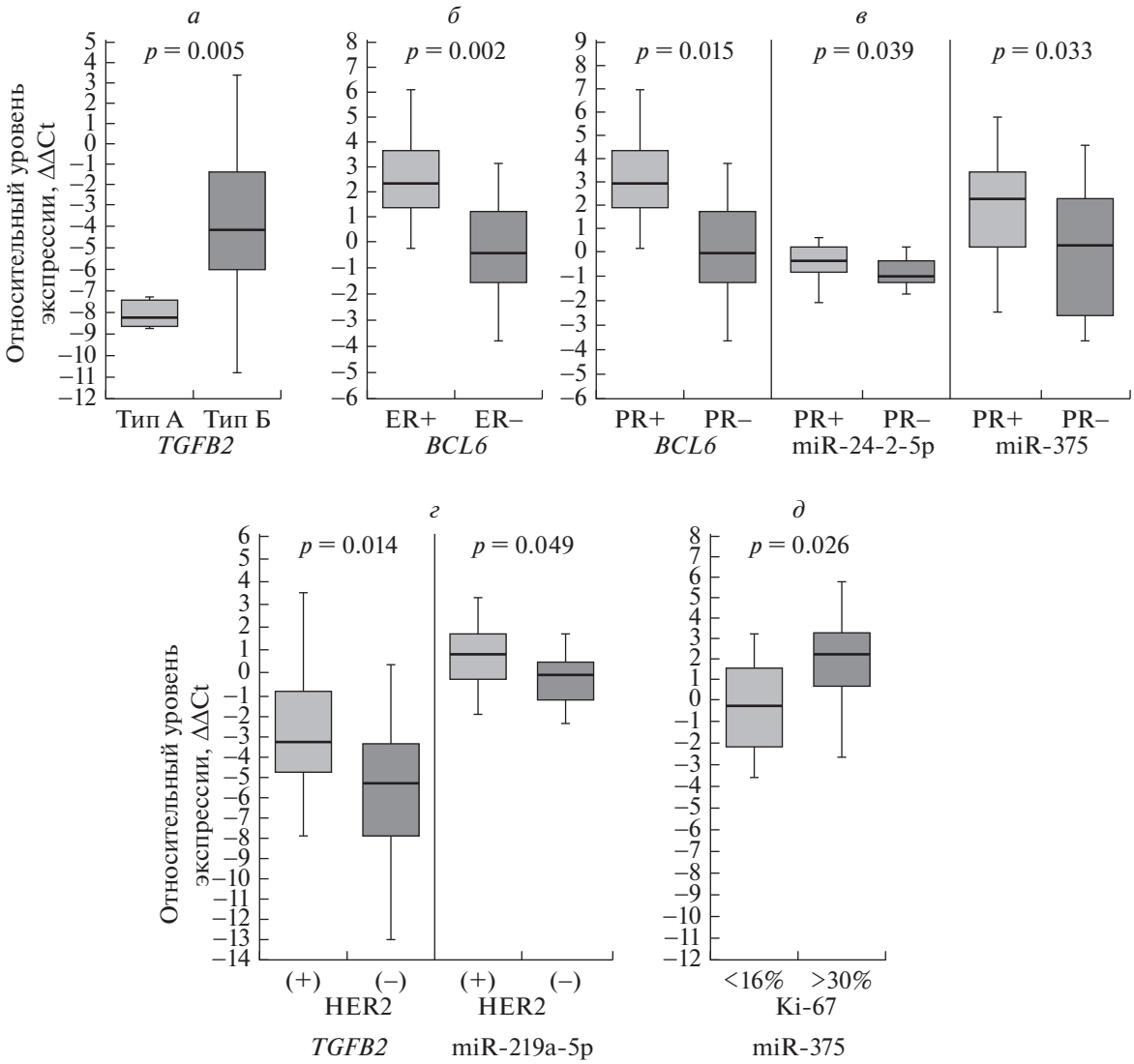

Рис. 3. Связь уровня экспрессии БКГ и микроРНК с иммуногистохимическими показателями образцов РМЖ: *а* – с иммуногистохимическим типом опухоли (люминальный А/люминальный Б), *б* – с экспрессией рецептора эстрогена, *в* – с экспрессией рецептора прогестерона, *г* – с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа, *д* – с индексом пролиферации Ki-67.

снижение уровня экспрессии генов *CHL1*, *AXL*, *ACSL1*, *TGFB2* в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с гистологически неизмененной тканью молочной железы. В то же время отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *BCL6* в опухоли по сравнению с гистологически неизмененной тканью молочной железы. Функция *CHL1* в канцерогенезе недостаточно изучена, и механизм, посредствам которого *CHL1* участвует в развитии опухоли, является важным вопросом в биологии. В работе [20] показано снижение уровня экспрессии *CHL1* в опухолях молочной железы, а также сообщается, что сниженная экспрессия *CHL1* способствует пролиферации и инвазии клеток РМЖ как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, нами впервые показано снижение уровня экспрессии мРНК *CHL1* на более поздних стадиях (III–IV) РМЖ. Противоречивые данные встречаются в зарубежной литературе в отношении уровня экспрессии гена *AXL*. В работах [21, 22] говорится о повышенной экспрессии *AXL* при РМЖ. В настоящей работе выявлено снижение уровня экспрессии гена *AXL* в опухолевых образцах молочной железы. Однако другими авторами показано, что экспрессия мРНК *AXL* значительно повышена в клеточной линии РМЖ MDA-MB-231, но снижена в клеточных линиях РМЖ MCF7 и SK-BR-3 [23], что согласуется с полученными нами данными. Более того, из 343 образцов инвазивной протоковой карциномы низкая экспрессия *AXL* обнаружена в 173 (50.4%) случаях, высокая – в 170 (49.6%). Таким образом, требуются дополнитель-

ные исследования, уточняющие роль и функцию гена *AXL* при РМЖ. При сопоставлении уровня экспрессии с клинико-патологическими характеристиками нами отмечено снижение уровня экспрессии *AXL* при более тяжелой стадии (III) РМЖ. В мировой литературе [21, 24] встречаются указания на корреляцию экспрессии со стадией онкологического процесса, однако говорится о повышенной экспрессии *AXL* на более поздних стадиях. Сообщается также об отсутствии какой-либо связи экспрессии *AXL* с клинико-патологическими характеристиками [23]. Противоречивые данные, полученные нами и другими авторами, требуют дополнительного исследования на большей выборке для понимания роли гена *AXL* в возникновении и развитии РМЖ. В единичных работах [25, 26] говорится о снижении уровня *ACSL1* при РМЖ, в частности при люминальном А типе РМЖ, что подтверждается нашими результатами.

Нами показано статистически значимое снижение уровня экспрессии *TGFB2* в опухоли по сравнению с гистологически нормальной тканью молочной железы. В работе [27] сообщается, что уровень экспрессии мРНК *TGFB2* значительно снижен в более крупных опухолях по сравнению с опухолями молочной железы, имеющих размер T1, а также в опухолях больных с метастазами в лимфатических узлах и с метастазами в другие органы. Однако нами показан более низкий уровень экспрессии мРНК *TGFB2* при люминальном А типе РМЖ по сравнению с люминальным Б типом. Эти результаты показывают, что *TGFB2* экспрессируется на разных уровнях в зависимости от молекулярных подтипов РМЖ и, следовательно, может выступать в качестве потенциального диагностического маркера при дифференциальной диагностике различных подтипов РМЖ в дополнение к уже используемым маркерам. Более того, нами впервые показан более низкий уровень экспрессии *TGFB2* в отсутствие экспрессии HER2, в то время как более высокий уровень экспрессии *TGFB2* наблюдался в присутствии HER2.

Нами показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена *BCL6* в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с неизмененной тканью молочной железы. Как известно, ген *BCL6* играет онкогенную роль в канцерогенезе различных злокачественных новообразований [28]. О повышенной экспрессии *BCL6* при РМЖ также сообщалось ранее [28, 29]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают данные литературы. Нами показано, что уровень мРНК *BCL6* выше на более поздних стадиях РМЖ, что также согласуется с данными других авторов [28]. О связи повышенной экспрессии *BCL6* с размером опухоли и более поздними стадиями сообщалось в работах [29, 30], что также подтверждается нашими результатами. Увеличение уровня экспрессии мРНК *BCL6* при РМЖ связано с плохими прогностическими признаками, такими как поздняя стадия и больший размер опухоли. Таким образом, ингибиторы *BCL6* могут рассматриваться в качестве таргетной терапии РМЖ. Кроме того, нами установлено, что высокая экспрессия *BCL6* в значительной степени коррелировала с ER и PR-статусом опухоли; это указывает на то, что *BCL6* может способствовать усилению экспрессии ER и PR. Однако его точный механизм действия требует дальнейшего изучения. Показано, что высокая экспрессия белка BCL6 связана с неблагоприятным клиническим исходом у ER-позитивных и пременопаузальных пациенток с РМЖ [31]. О связи повышенной экспрессии *BCL6* с положительной экспрессией PR нами сообщается впервые.

Нами показано снижение уровня экспрессии miR-132 и miR-137, а также увеличение уровня экспрессии miR-375 при РМЖ; экспрессия miR-148a-3p, miR-219a-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p оставалась без изменений. Показано, что уровень экспрессии miR-137 был значительно ниже в опухолевых тканях молочной железы по сравнению с таковым в парных смежных нормальных тканях молочной железы [32]. Сниженная экспрессия miR-132-3p и ее функциональная роль в качестве супрессора опухолевого роста показана при различных типах рака, включая РМЖ [33], рак простаты [34], колоректальный рак [35], остеосаркому [36], немелкоклеточный рак легких [37, 38] и гепатоцеллюлярную карциному [39–41]. Однако отмечается повышенная экспрессия miR-132 при глиоме и раке желудка и можно предположить, что miR-132 может служить онкогеном в этих видах рака [42, 43]. Эти сообщения продемонстрировали, что нарушение регуляции экспрессии miR-132 специфично для каждого типа рака, и предполагают, что лежащие в их основе механизмы могут отличаться. Например, микроРНК miR-132 может действовать как супрессор опухолевого роста посредством подавления FOXA1 [44].

Сведения литературы по изменению экспрессии miR-375 в опухолях отличаются неоднозначностью и, по-видимому, специфичны для разных видов рака. Так, например, в одной из работ [45] показано снижение уровня экспрессии miR-375 в клеточных линиях РМЖ MCF-7/ADM и MCF-7/PTX, которое может являться результатом метилирования промоторного CpG-островка гена MIR-375. Напротив, на ER-позитивных клеточных линиях РМЖ отмечена высокая экспрессия miR-375, которая связана с локальным гипометилированием ДНК [46]. В свою очередь, miR-375 в одних работах рассматривается как новый биологический маркер для раннего выявления метастазов [47], в других – как новый прогностический маркер течения РМЖ [48, 49]. Нами показано увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолевых образцах РМЖ по сравнению с нормальной тканью молочной железы. При этом нами об-

наружено снижение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы, не экспрессирующих прогестероновый рецептор (PR). В то же время отмечалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолях молочной железы при высоком уровне экспрессии антигена Ki-67, что усиливает наше предположение об онкогенной роли этой микроРНК при РМЖ. Таким образом, и наши результаты показывают неоднозначность поведения miR-375. Так, в зависимости от клеточного контекста miR-375 проявляет как онкогенные, так и супрессорные черты. Корреляция снижения уровня miR-375 с потерей PR может быть полезна при разработке молекулярной классификации подвидов РМЖ.

Таким образом, полученные данные указывают на возможную роль *BCL6* и miR-339-3p в прогрессии РМЖ и роль *CHL1* и miR-148a-3p в сдерживании прогрессии РМЖ. Кроме того, гены *BCL6* и *TGFB2*, а также микроРНК miR-375, miR-24-2-5p и miR-219 можно отнести к потенциальным биомаркерам при дифференциальной диагностике типа РМЖ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-75-00126); часть исследований, а именно анализ БКГ, – в рамках Государственного задания Минобрнауки РФ.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Global Cancer Observatory (GCO). Available from: URL:https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf Accessed 5 Sep 2020.
2. *Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J. Clin. 2018. V. 68. № 6. P. 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492
3. *Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S.* Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications // Expert Rev. Anticancer Ther. 2012. V. 12. № 8. P. 1021–1032. https://doi.org/10.1586/era.12.85
4. *Meng L., Xu Y., Xu C., Zhang W.* Biomarker discovery to improve prediction of breast cancer survival: Using gene expression profiling, meta-analysis, and tissue validation // Onco Targets Ther. 2016. V. 9. P. 6177–6185. https://doi.org/10.2147/OTT.S113855
5. *Heng Y.J., Lester S.C., Tse G.M. et al.* The molecular basis of breast cancer pathological phenotypes // J. Pathol. 2017. V. 241. № 3. P. 375–391. https://doi.org/10.1002/path.4847
6. *Wang J., Ma Z., Carr S.A. et al.* Proteome profiling outperforms transcriptome profiling for coexpression based gene function prediction // Mol. Cell Proteomics. 2017. V. 16. № 1. P. 121–134. https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060301
7. *Yip C.H., Rhodes A.* Estrogen and progesterone receptors in breast cancer // Future Oncol. 2014. V. 10. № 14. P. 2293–2301. https://doi.org/10.2217/fon.14.110
8. *Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. и др.* Прогностическое значение рецепторного статуса опухоли при раннем раке молочной железы // СТМ. 2012. № 4. С. 48–53.
9. *Figueroa-Magalhães M.C., Jelovac D., Connolly R., Wolff A.C.* Treatment of HER2-positive breast cancer // Breast. 2014. V. 23. № 2. P. 128–136. https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011
10. *Hanahan D.* Rethinking the war on cancer // Lancet. 2014. V. 383. № 9916. P. 558–563. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62226-6
11. *Брага Э.А., Филиппова Е.А., Логинов В.И. и др.* Системы маркеров на основе метилирования генов микроРНК в диагностике рака молочной железы на I–II стадиях // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2019. Т. 168. № 8. С. 238–242.
12. *Gyparaki M.T., Basdra E.K., Papavassiliou A.G.* MicroRNAs as regulatory elements in triple negative breast cancer // Cancer Lett. 2014. V. 354. № 1. P. 1–4. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.036
13. *Tomar D., Yadav A.S., Kumar D. et al.* Non-coding RNAs as potential therapeutic targets in breast cancer // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2020. V. 1863. № 4. e194378. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.04.005
14. *Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch.* International Union against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours., 7th ed. 2009. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. 332 p. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101511218.
15. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. / Eds Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. Lyon: IARC Press, 2014. 316 p.
16. *Пронина И.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др.* Уровень экспрессии гена *RASSF1A* в первичных эпителиальных опухолях разной локализации // Мол. биология. 2012. Т. 46. № 2. С. 260–268. https://doi.org/10.1134/S0026893312010189
17. *Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyy A.M. et al.* DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression // Gene. 2017. V. 604. P. 1–8. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018
18. *Пронина И.В., Филиппова Е.А., Лукина С.С. и др.* Роль микроРНК в регуляции экспрессии генов *AXL, DAPK1, NFIB* при раке молочной железы // Патогенез. 2018. Т. 16. № 4. С. 130–133. https://doi.org/10.25557/2310-0435.2018.04.130-133

19. *Wu Z.S., Wu Q., Wang C.Q. et al.* MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion in vitro and may be a potential biomarker for breast cancer prognosis // BMC Cancer. 2010. V. 10. e542. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-542
20. *He L.H., Ma Q., Shi Y.H. et al.* CHL1 is involved in human breast tumorigenesis and progression // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 438. № 2. P. 433–438. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.093
21. *Li Y., Jia L., Ren D. et al.* Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma // IUBMB Life. 2014. V. 66. № 7. P. 507–518. https://doi.org/10.1002/iub.1285
22. *Jin G., Wang Z., Wang J. et al.* Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer // Oncol. Lett. 2017. V. 13. № 2. P. 621–628. https://doi.org/10.3892/ol.2016.5524
23. *Tanaka K., Tokunaga E., Inoue Y. et al.* Impact of expression of vimentin and Axl in breast cancer // Clin. Breast Cancer. 2016. V. 16. № 6. P. 520–526. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.015
24. *Li Y., Jia L., Liu C. et al.* Axl as a Downstream effector of TGF-β1 via PI3K/Akt-PAK1 signaling pathway promotes tumor invasion and chemoresistance in breast carcinoma // Tumour Biol. 2015. V. 36. № 2. P. 1115–1127. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2677-3
25. *Chen W.C., Wang C.Y., Hung Y.H. et al.* Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer // PLoS One. 2016. V. 11. № 5. e0155660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155660
26. *Yen M.C., Kan J.Y., Hsieh C.J. et al.* Association of long-chain acyl-coenzyme A synthetase 5 expression in human breast cancer by estrogen receptor status and its clinical significance // Oncol. Rep. 2017. V. 37. № 6. P. 3253–3260. https://doi.org/10.3892/or.2017.5610
27. *Hachim M.Y., Hachim I.Y., Dai M. et al.* Differential expression of TGFβ isoforms in breast cancer highlights different roles during breast cancer progression // Tumour Biol. 2018. V. 40. № 1. e1010428317748254. https://doi.org/10.1177/1010428317748254
28. *Badr E., Masoud E., Abdou A.G., Eldien M.S.* BCL6 mRNA expression level in invasive duct carcinoma not otherwise specified // Clin. Diagn. Res. 2016. V. 10. № 12. P. XC01–XC04. https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22796.8985
29. *Wu Q., Liu X., Yan H. et al.* B-cell lymphoma 6 protein stimulates oncogenicity of human breast cancer cells // BMC Cancer. 2014. V. 14. e418. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-418
30. *Ang L., Zheng L., Wang J. et al.* Expression of and correlation between BCL6 and ZEB family members in patients with breast cancer // Exp. Ther. Med. 2017. V. 14. № 5. P. 3985–3992. https://doi.org/10.3892/etm.2017.5101
31. *Sato T., Tran T.H., Peck A.R. et al.* Prolactin suppresses a progestin-induced CK5-positive cell population in luminal breast cancer through inhibition of progestin-driven BCL6 expression // Oncogene. 2014. V. 33. № 17. P. 2215–2224. https://doi.org/10.1038/onc.2013.172
32. *Chen F., Luo N., Hu Y. et al.* MiR-137 suppresses triple-negative breast cancer stemness and tumorigenesis by perturbing BCL11A-DNMT1 interaction // Cell Physiol. Biochem. 2018. V. 47. № 5. P. 2147–2158. https://doi.org/10.1159/000491526
33. *Zhang Z.G., Chen W.X., Wu Y.H. et al.* MiR-132 prohibits proliferation, invasion, migration, and metastasis in breast cancer by targeting HN1 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 454. P. 109–114. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.049
34. *Qu W., Ding S.M., Cao G. et al.* miR-132 mediates a metabolic shift in prostate cancer cells by targeting Glut1 // FEBS Open Biol. 2016. V. 6. P. 735–741. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12086
35. *Zheng Y.B., Luo H.P., Shi Q. et al.* miR-132 inhibits colorectal cancer invasion and metastasis via directly targeting ZEB2 // World J. Gastroenterol. 2014. V. 20. № 21. P. 6515–6522. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6515
36. *Wang J., Xu G., Shen F., Kang Y.* miR-132 targeting cyclin E1 suppresses cell proliferation in osteosarcoma cells // Tumour Biol. 2014. V. 35. P. 4859–4865. https://doi.org/10.1007/s13277-014-1637-2
37. *Li Y., Zu L., Wang Y. et al.* miR-132 inhibits lung cancer cell migration and invasion by targeting SOX4 // J. Thorac Dis. 2015. V. 7. P. 1563–1569. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.09.06
38. *Zhang B., Lu L., Zhang X. et al.* Hsa-miR-132 regulates apoptosis in non-small cell lung cancer independent of acetylcholinesterase // J. Mol. Neurosci. 2014. V. 53. № 3. P. 335–344. https://doi.org/10.1007/s12031-013-0136-z
39. *Lei C.J., Yao C., Li D.K. et al.* Effect of co-transfection of miR-520c-3p and miR-132 on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma Huh7 // Asian Pac. J. Trop. Med. 2016. V. 9. № 9. P. 898–902. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.015
40. *Lei C.J., Li L., Gao X. et al.* Hsa-miR-132 inhibits proliferation of hepatic carcinoma cells by targeting YAP // Cell Biochem. Funct. 2015. V. 33. № 5. P. 326–333. https://doi.org/10.1002/cbf.3119
41. *Wei X., Tan C., Tang C. et al.* Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma // Cell Signal. 2013. V. 25. № 5. P. 1037–1043. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.019
42. *Li W., Zhang J., Chen T. et al.* miR-132 upregulation promotes gastric cancer cell growth through suppression of FoxO1 translation // Tumour Biol. 2016. V. 37. P. 15551–15557. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3924-y
43. *Liu Q., Liao F., Wu H. et al.* Upregulation of miR-132 expression in glioma and its clinical significance // Tumour Biol. 2014. V. 35. P. 12299–12304. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2541-5
44. *Wang D., Ren J., Ren H. et al.* MicroRNA-132 suppresses cell proliferation in human breast cancer by directly targeting FOXA1 // Acta Pharmacol. Sin. 2018.

V. 39. № 1. P. 124–131.
https://doi.org/10.1038/aps.2017.89

45. *Liu S.L., Sui Y.F., Lin M.Z.* MiR-375 is epigenetically downregulated due to promoter methylation and modulates multi-drug resistance in breast cancer cells via targeting YBX1 // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2016. V. 20. № 15. P. 3223–3229.

46. *de Souza Rocha Simonini P., Breiling A., Gupta N. et al.* Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells // Cancer Res. 2010. V. 70. № 22. P. 9175–9184.
https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1318

47. *Madhavan D., Peng C., Wallwiener M. et al.* Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis // Carcinogenesis. 2016. V. 37. № 5. P. 461–470.
https://doi.org/10.1093/carcin/bgw008

48. *Luo D., Wilson J.M., Harvel N. et al.* A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells // J. Transl. Med. 2013. V. 11. e57.
https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-57

49. *Zehentmayr F., Hauser-Kronberger C., Zellinger B. et al.* Hsa-miR-375 is a predictor of local control in early stage breast cancer // Clin. Epigenetics. 2016. V. 8. e28.
https://doi.org/10.1186/s13148-016-0198-1

The Profile of MicroRNA and a Group of Genes Expression in Breast Cancer: Relationship with the Tumor Progression and Immunohistochemical Status

E. A. Filippova[a], *, I. V. Pronina[a], A. M. Burdennyy[a], T. P. Kazubskaya[b], V. I. Loginov[a], and E. A. Braga[a]

[a] *Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

[b] *Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: p.lenyxa@yandex.ru*

A current task of oncogenomics is the finding for genes with expression that let to specify the type of breast cancer (BC) and the prognosis of the disease due to different tumor status. By Real-time PCR analysis on a set of 41 BC samples the relationship between mRNA expression levels of five tumor-associated genes (*BCL6, CHL1, AXL, ACSL1, TGFB2*) and seven potentially regulatory microRNAs (miR-132-3p, miR-137, miR-148a-3p, miR-219-5p, miR-24-2-5p, miR-339-3p, miR-375) with clinical and pathological parameters of tumors and immunohistochemical status was characterized. A decrease of *CHL1* and *AXL* expression level and an increase of *BCL6* expression level revealed on the late stages of breast cancer were shown. In addition, an increase of miR-339-3p expression levels are associated with III–IV stages of breast cancer, and decrease of miR-148a-3p expression levels are associated with lymph node metastases. It was noted that a high rate of Ki-67 proliferation is related to increase of miR-375 expression level. In tumors that do not the progesterone receptor (PR) to be expressed is shown the decreased expression levels of *BCL6*, miR-375, and miR-24-2-5p. A decreased expression level of *BCL6* was also observed in breast cancer with a negative estrogen receptor (ER–) status. In breast cancer samples with a negative HER2-status, a statistically significant decreased the expression level of the *TGFB2* and miR-219-5p genes was noted, as well as a decreased the expression level of *TGFB2* was found in luminal A of BC. Thus, we identified, possibly new molecular indicators of breast cancer progression and biomarkers that can be useful in the differential diagnosis of the molecular subtype of breast cancer.

Keywords: gene expression, microRNA, breast cancer, cancer progression, luminal type of breast cancer.