

УДК 616.006.66; 577.214.5

©Коллектив авторов

## СВЯЗЬ *miR-21* И *miR-155* С РЕГУЛЯЦИЕЙ мРНК 15-HPGD В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

З.Н. Никифорова\*, М.А. Таипов, И.А. Кудрявцев, В.Е. Шевченко

Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина,  
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр.15; тел.: 8(499)323-56-11; эл. почта: zojanik@rambler.ru

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространенная форма злокачественных новообразований, приводящая к высокой смертности у женщин во всем мире. В представленной работе проанализирована экспрессия мРНК 15-гидроксипростагландиндегидрогеназы (15-HPGD), циклооксигеназы-1 (COX-1), циклооксигеназы-2 (COX-2) и микро-РНК (*miR-21*, *miR-155*) в трёх линиях клеток эстрогенпозитивного РМЖ человека (MCF-7, BT-474, ZR-75-1). По итогам трёх независимых опытов уровень мРНК COX-2 и COX-1 был статистически значимо выше в клетках линии ZR-75-1, чем в MCF-7 и BT-474. Уровни мРНК общей-15-HPGD, функциональной-15-HPGD в линии BT-474 были ниже, чем в MCF-7 и ZR-75-1. Синтез 15-HPGD в линии BT-474 подавлен на уровне процессинга ядерной незрелой пре-мРНК. В клетках линий MCF-7, ZR-75-1 и BT-474 экспрессия *miR-21* была высокой. В клеточных линиях РМЖ уровень *miR-155* был значительно меньше, чем *miR-21*. Выявлены корреляционные связи между нарушением регуляции *miR-21*, *miR-155* и мРНК 15-HPGD, COX-1, COX-2. Показано, что *miR-21* и *miR-155* регулируют активность нескольких генов в опухолевой клетке, их действие на отдельные гены было в ряде случаев кумулятивным. Сделан вывод, что микроРНК *miR-21*, *miR-155* подавляют работу гена опухолевого супрессора 15-HPGD и индуцируют потенциальный онкоген COX-2, что способствует озлокачествлению клеток и метастазированию РМЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, циклооксигеназа 1, циклооксигеназа 2, микроРНК, мРНК, 15-гидроксипростагландиндегидрогеназа

DOI 10.18097/PBMC20166203265

### ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространённая форма злокачественных новообразований у женщин. В последнее время в Российской Федерации наблюдается рост заболеваемости РМЖ. При этом около 25% больных впервые обращаются за помощью уже с III стадией или с местно-распространённым заболеванием. Метастатический РМЖ считается наиболее частой причиной смерти женщин 50-59 лет [1]. Важное значение в патогенезе РМЖ принадлежит циклооксигеназе-2 (COX-2) и 15-гидроксипростагландиндегидрогеназе (15-HPGD). COX-2 – один из ключевых ферментов, регулирующих процессы ангиогенеза, апоптоза, роста и метастазирования клеток РМЖ, поэтому увеличение его экспрессии рассматривается как негативный прогностический фактор при РМЖ [2]. 15-HPGD – физиологический антагонист COX-2 и супрессор опухолевого роста, который подавляет способность клеток к метастазированию [3, 4]. Инактивация гена 15-HPGD повышает риск развития РМЖ [5, 6]. Предполагается, что экспрессия 15-HPGD вносит свой вклад в подавление злокачественного фенотипа опухоли. Тем не менее, роль 15-HPGD в нарушении регуляции экспрессии гена COX-2 в клетках РМЖ изучена недостаточно.

МикроРНК могут ингибировать опухолевые гены-супрессоры или разрушать специфические мРНК. Экспрессия *miR-21* и *miR-155* в клетках РМЖ человека значительно выше, чем в нормальных клетках [7].

Экспрессия *miR-21* увеличена и при других видах опухолей, в том числе при раке толстой кишки, лёгких, предстательной железы и желудка [1]. Однако практически отсутствуют данные о роли *miR-21* и *miR-155* в регуляции экспрессии мРНК генов 15-HPGD, COX-2, COX-1 при РМЖ, поэтому мы изучали связь между экспрессией *miR-21* и *miR-155* и регуляцией мРНК генов различных изоформ 15-HPGD, COX-2, COX-1 в клетках РМЖ.

В представленной работе проведён анализ экспрессии генов 15-HPGD, COX-1, COX-2, *miR-21* и *miR-155* в клетках эстрогенпозитивных (ЭП) линий РМЖ человека – MCF-7, BT-474, ZR-75-1. Выявлены корреляционные связи между нарушением регуляции *miR-21*, *miR-155* и мРНК 15-HPGD, COX-1, COX-2.

### МЕТОДИКА

Работа выполнена на культурах клеток ЭП РМЖ человека – MCF-7, ZR-75-1 и BT-474, полученных из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки выращивали в стандартных условиях: 5% CO<sub>2</sub>, 37°C и 100% влажности ("SHEL LAB", США). Клетки ZR75-1 и BT474 растили на питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином ("ПанЭко", Россия); клетки MCF-7 – на среде DMEM с L-глутамином ("ПанЭко"). В состав сред входило 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

мРНК выделяли с использованием набора Perfect Pure RNA Cell and Tissue kit ("SPRIME", Германия).

\* - адресат для переписки

Приготовление образцов и выделение мРНК осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. мРНК выделяли из  $\sim 1 \times 10^6$  клеток. Образцы хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Концентрацию мРНК в пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 ("Thermo Scientific", США) с помощью программы NanoDrop ND-1000. Чистоту РНК определяли по соотношению интенсивностей пиков  $A_{260}/A_{280}$ , которое у очищенной РНК составляет 1,8-2,1.

Реакцию обратной транскрипции проводили в объёме 20 мкл по стандартному протоколу Reverse Transcription Protocol ("Promega", США), согласно рекомендациям производителя. В качестве праймеров использовали разработанные специфические олигонуклеотиды и обратную транскриптазу М-MuLV ("ДНК-синтез", Россия). Реакция проходила при температуре  $42^\circ\text{C}$  в течение 50 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при  $70^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

Экспрессию генов анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием системы iQ5 ("Bio-Rad", США). Праймеры для анализа экспрессии гена 15-HPGD разработаны фирмой "Синтол" (Россия) с использованием Primer Express версии 1.0 ("Applied Biosystems", США) (табл. 1). Использовали зонд, меченный карбоксифлуоресцеином (FAM,  $\lambda_{\text{max}}$  поглощения = 490 нм). ПЦР проводили по стандартному протоколу в объёме 25 мкл. ПЦР-РВ проводили по следующей программе: 1 цикл –  $95^\circ\text{C}$ , 3 мин; 55 циклов –  $95^\circ\text{C}$ , 15 с,  $60^\circ\text{C}$ , 1 мин (измерение флуоресценции). В качестве референсного гена использовали ген  $\beta$ -актина. Из образцов кДНК для каждой клеточной линии делали калибровочный раствор, для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительное количество кДНК в образцах.

#### Анализ экспрессии miR-21 и miR-155

микроРНК выделяли с использованием смеси фенол-хлороформ (1 : 1) и набора mirVana™miRNA Isolation Kit ("Ambion", США) согласно протоколу

к набору. Концентрацию микроРНК в пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 ("Thermo Scientific") с помощью программы NanoDrop ND-1000. Чистоту микроРНК определяли по соотношению интенсивностей пиков  $A_{260}/A_{280}$ , которое составляло 1,8-2,1.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit в комбинации с набором TaqMan MicroRNA Assays ("Applied Biosystems"). Температурный режим: 30 мин –  $16^\circ\text{C}$ , 30 мин –  $42^\circ\text{C}$ , 5 мин –  $85^\circ\text{C}$ . Полученную кДНК хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

ПЦР проводили с помощью наборов: TaqMan MicroRNA Assays MiR21, TaqMan MicroRNA Assays MiR155 ("Applied Biosystems") и набора iQ™ Supermix ("Bio-Rad"). Пробы готовили по стандартному протоколу TaqMan MicroRNA Assays. Объём реакционной смеси составлял 25 мкл. Программа для ПЦР-РВ: 1 цикл –  $95^\circ\text{C}$ , 10 мин; 55 циклов –  $95^\circ\text{C}$ , 15 с;  $60^\circ\text{C}$ , 1 мин – измерение флуоресценции, канал FAM ( $\lambda_{\text{max}}$  поглощения = 490 нм). Все результаты анализировали с использованием программного обеспечения iQ5 Optical System Software, ver 2 ("Bio-Rad").

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили по результатам трёх независимых серий опытов. Данные предоставляли в виде среднего значения трёх измерений со стандартной ошибкой среднего. Дополнительно проводили корреляционный анализ, в котором вычисляли коэффициент детерминации ( $R^2$ ) – квадрат (множественного) коэффициента корреляции, отражающий долю вариации результативного признака и коэффициент корреляции. Все изменения считали статистически значимыми при  $p=0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогрессирование заболевания, то есть приобретение опухолевой клеткой более агрессивных свойств (снижение степени дифференцировки, метастазирование) приводит к увеличению

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров для ПЦР в реальном времени

№	Ген	Нуклеотидная последовательность
1	hn15-HPGD	F: 5'-ATTGTTTGTCCGTCTATTTTCGTGA-3' R: 5'-GCGCTACCTATAGACAAGAGGAGAG-3'
2	tl5-HPGD	F: 5'-GCAACAAGTGAAGAGACACTTTTAGAAA-3' R: 5'-AAATGTCCAGTCTTCCAAAGTGGT-3'
3	fl5-HPGD	F: 5'-TGGAATTTTGGACCCACCAT-3' R: 5'-TCATCTTCAATGAGTGTATCAATCCAT-3'
4	var1 15-HPGD	F: 5'-TCAGCAGCGCCACCAT-3' R: 5'-TCATCTTCAATGAGTGTATCAATCCAT-3'
5	var. 2 15-HPGD	F: 5'-TCATCTTTAGCAGCCACCAT-3' R: 5'-TCATCTTCAATGAGTGTATCAATCCAT-3'
6	$\beta$ -актин	F: 5'-GGCCGCGGTGTACGCCAACACAGTGCTC-3' R: 5'-CCCGGGGCGGTCTACTCTGCTTGCTG-3'
7	PTGS2 (COX-2)	F: 5'-CCTTCCTCCTGTGCCTGATG-3' R: 5'-ACAATCTCATTGTAATCAGGAAGCT-3'
8	COX-1	F: 5'-AACCGTGTGTGTGACTTGCTGAA-3' R: 5'-AGAAAGAGCCCCCTCAGAGCTCAGTG-3'

дисбаланса внутриклеточных сигнальных путей и потере корреляционных связей, что согласуется с теорией о росте нарушений молекулярных взаимосвязей в ходе опухолевой прогрессии [8].

Известно, что COX-2 – один из ключевых ферментов, регулирующих процессы метастазирования, ускоряет пролиферацию, инвазию, ангиогенез и резистентность клеток РМЖ к апоптозу, а также вовлечен в процессы воспаления. Обнаружена прямая связь между экспрессией COX-2 и HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) в клетках протоковой карциномы [9], между мутациями *c-myc*, *ras* и снижением функции p53 [10]. Согласно опубликованным данным, COX-2 и COX-1 слабо детектируются в нормальных тканях молочной железы. Нами проанализированы изменения экспрессии мРНК генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* (*hn15-HPGD*, *fl15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD*, *var2 15-HPGD*), а также *miR-21*, *miR-155* в группе ЭП РМЖ MCF-7, ZR-75-1 и BT-474. Показано, что в клетках MCF-7 *COX-1* экспрессируется на низком уровне (табл. 2), как и в нормальной ткани [11]. Увеличение экспрессии *COX-2* связано с прогрессированием роста опухоли. По итогам трёх независимых опытов количество мРНК белков COX-2 и COX-1 в клетках линии ZR-75-1 было статистически значимо выше, чем в линиях MCF-7 и BT-474 (табл. 2).

Согласно существующим представлениям, фермент 15-HPGD вовлечён в процессы регуляции метастатической активности клеток РМЖ, подавляя ангиогенез и инвазию опухоли путём катаболизма простагландина E<sub>2</sub> (ПГЕ<sub>2</sub>). Внутриклеточные механизмы регуляции генов *COX-1*, *COX-2* и *15-HPGD*, приводящие к изменению их экспрессии в процессе канцерогенеза, до конца не ясны.

Нами определены количественные уровни пре-мРНК 15-HPGD (предшественника зрелой функциональной мРНК), синтезируемой в ядре клетки. Максимальный уровень экспрессии *hn15-HPGD* обнаружен в клетках BT-474 (табл. 2). Уровень функциональной цитоплазматической мРНК *fl15-HPGD*, по которой оценивали активность рибосомного синтеза белка 15-HPGD, наоборот, в клеточной линии BT-474 был ниже, чем в ZR-75-1 и MCF-7 (в 16,7 и 13 раз соответственно).

Однако при высоких концентрациях *hn15-HPGD* экспрессия транскрибируемой (функциональной) мРНК была подавлена, и белок 15-HPGD не синтезировался. Следует отметить, что уровни мРНК *t15-HPGD* в линии BT-474 были ниже, чем в MCF-7 и ZR-75-1. Сделан вывод, что синтез 15-HPGD в линии BT-474 ингибируется на уровне процессинга пре-мРНК, которая в большом количестве накапливается в ядре клетки, однако не превращается в мРНК.

Функциональная мРНК 15-HPGD быстро разрушается в цитоплазме опухолевой клетки, и уровень её снижается. Таким образом, мы предположили, что клетки линии BT-474 обладают значительно меньшей способностью синтезировать *fl15-HPGD*, чем клетки MCF-7 (рисунок). Moore и соавт. [12] обнаружили подавление экспрессии гена *15-HPGD* в опухолевых клетках, связанное с такими эпигенетическими модификациями, как метилирование ДНК и деацетилирование гистонов в промоторной области гена *15-HPGD*. Выявлено нарушение регуляции *15-HPGD* как на уровне синтеза мРНК, так и на уровне работы самого фермента в различных злокачественных опухолях человека [13]. Генетические нарушения *15-HPGD* блокируют образование метаболитов ПГЕ<sub>2</sub>. Вероятно, инактивация гена *15-HPGD* значительно повышает риск развития РМЖ [14].

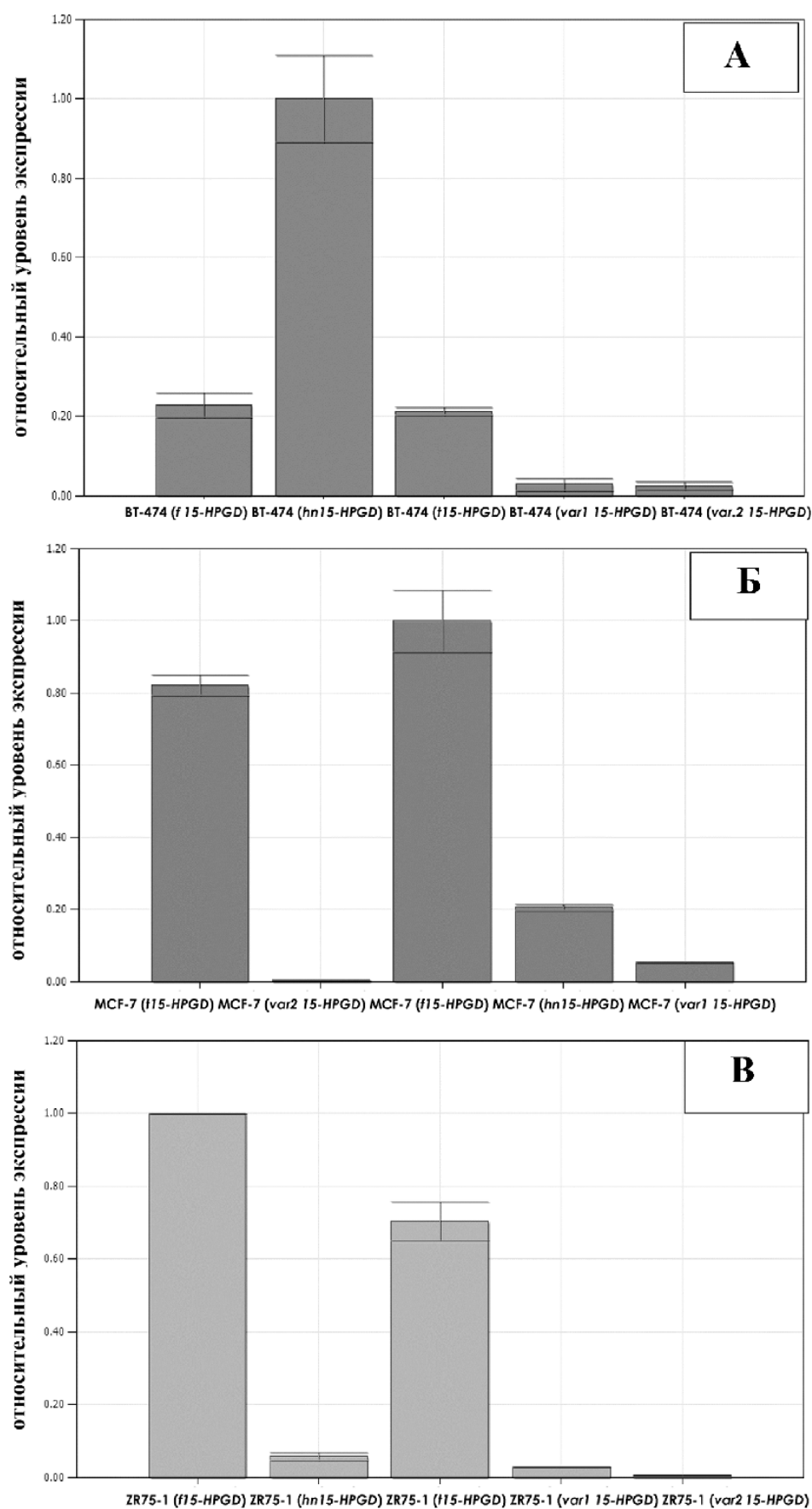
Сравнение результатов определения уровня экспрессии мРНК позволило понять, что в клетках РМЖ нарушены внутриклеточные механизмы регуляции *COX-1*, *COX-2* и *15-HPGD*. Исходя из современных представлений [15, 16], мы предположили, что эти нарушения могут быть связаны с микроРНК. *miR-21* является элементом, необходимым для нормального функционирования клетки. Однако нарушение регуляции этой микроРНК приводит к превращению нормальной клетки в опухолевую, в частности, с участием *PTEN*, *PCCD4*, *Spry1* и др. или путём регуляции белков, подобных Bcl-2, при РМЖ [17].

В клетках линий MCF-7, ZR-75-1 и BT-474 выявлен высокий уровень экспрессии *miR-21*, которая подавляет действие нескольких генов-супрессоров и способствует росту опухолевых клеток, их инвазии и метастазированию [16]. Показано, что экспрессия *miR-21* изменяется в опухолевых клетках [18] и служит регулятором процессов, запускающих эпителиально-мезенхимальный переход в клетках линии MCF-7 [19].

В клеточных линиях РМЖ уровень *miR-155* был значительно ниже уровня *miR-21* (табл. 2). Максимальная экспрессия *miR-21* и *miR-155* выявлена в клеточной линии MCF-7 (табл. 2). *miR-155* регулирует в клетке такие процессы, как апоптоз, дифференцировку, ангиогенез, пролиферацию, эпителиальный и мезенхимальный переход. Экспрессия *miR-155* коррелирует с экспрессией эстрогеновых и прогестероновых рецепторов [20]. Высокие уровни *miR-21* и *miR-155* при РМЖ связаны с прогрессией опухоли, метастазированием в лимфоузлы и неблагоприятным прогнозом для пациента [21], и могут рассматриваться в качестве возможных прогностических маркеров метастазирования.

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* (*hn15-HPGD*, *fl15-HPGD*) и *miR-21*, *miR-155* в трёх линиях клеток

Клеточные линии	<i>COX-2</i> , ×10 <sup>-7</sup> нг/мкл	<i>COX-1</i> , ×10 <sup>-7</sup> нг/мкл	<i>hn15-HPGD</i> , ×10 <sup>-7</sup> нг/мкл	<i>fl15-HPGD</i> , ×10 <sup>-7</sup> нг/мкл	<i>miR-155</i> , ×10 <sup>-7</sup> нг/мкл	<i>miR-21</i> , нг/мкл
<b>MCF-7</b>	4,94±0,21	1,5±0,015	6,92±0,93	25,7±6,1	1,54±0,0416	0,781±0,0062
<b>ZR75-1</b>	26,2±1,41	2,78±0,54	4,03±0,93	32,9±0,5	0,0265±0,00108	0,122±0,0077
<b>BT-474</b>	0,269±0,021	0,32±0,033	221±15	1,97±3,1	0,0539±0,0028	0,342±0,012



**Рисунок.** Относительный уровень экспрессии мРНК *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD*, *var2 15-HPGD* в клетках линий BT-474 (А), MCF-7 (Б), ZR-75-1 (В).

МикроРНК связываются с 3'-нетранслируемыми участками мРНК, что приводит либо к подавлению трансляции, либо к деградации мРНК. Известно, что специфичные мРНК регулируются множеством микроРНК [16]. Так, *miR-101a* регулирует экспрессию гена *COX-2* при раке прямой кишки [21], *miR-199a* – при раке эндометрия, а *miR-21* регулирует *15-HPGD* при колоректальном раке [22]. Корреляционная связь генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* с *miR-21* и *miR-155* при РМЖ в настоящее время мало изучена.

В клеточной линии MCF-7 статистически значимой корреляции между уровнем мРНК *COX-1*, *COX-2*, *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD* и *var2 15-HPGD* и *miR-21* не выявлено (табл. 3). В то же время, изменения экспрессии гена *COX-1* в этих клетках зависели от *miR-155*. Значение

коэффициента детерминации свидетельствовало о том, что в 65% случаев изменение экспрессии *COX-1* приводит к изменению экспрессии других генов в клетках MCF-7 (табл. 4).

Наибольший интерес представляла корреляция между уровнями относительной экспрессии различных форм *15-HPGD* и *miR-155*. Обнаружена значимая обратная корреляция между экспрессией *hn15-HPGD*, *f15-HPGD* и *miR-155* в клетках MCF-7 (табл. 4). Значения коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии гена *f15-HPGD* в MCF-7 в 87% случаев указывали на изменение экспрессии *miR-155*. Несмотря на высокий уровень экспрессии, *miR-21* не влияла на экспрессию изучаемых нами генов в клеточной линии MCF-7 (табл. 3). Не выявлено совместного влияния

Таблица 3. Коэффициенты детерминации ( $R^2$ ) и корреляции ( $r$ ) между мРНК генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* и микроРНК *miR-21*

Клеточные линии	$r$ ( <i>COX-2</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>COX-1</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>hn15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>t15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>f15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>var1 15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$r$ ( <i>var2 15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )
	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
<b>MCF-7</b>	0,1	-0,17	-0,21	0,45	-0,3	-0,21	-0,2
<b>ZR75-1</b>	0,61	-0,0614	-0,0836	-1	-0,61	0,41	0,45
<b>BT-474</b>	0,69	0,71	0,83	0,98	0,84	0,0001	0,96
Клеточные линии	$R^2$ ( <i>COX-2</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>COX-1</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>hn15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>t15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>f15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>var1 15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )	$R^2$ ( <i>var2 15-HPGD</i> / <i>miR-21</i> )
	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
<b>MCF-7</b>	0,01085	0,02881	0,04581	0,2043	0,08775	0,04511	0,04123
<b>ZR75-1</b>	0,3681	0,00377	0,00699	<b>0,9967</b>	0,3661	0,1692	0,2017
<b>BT-474</b>	0,4808	<b>0,5034</b>	<b>0,6879</b>	<b>0,9552</b>	<b>0,6985</b>	0,00001	<b>0,916</b>

Таблица 4. Коэффициенты детерминации ( $R^2$ ) и корреляции ( $r$ ) между мРНК генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* (*hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD*, *var2 15-HPGD*) и *miR-155*

Клеточные линии	$R^2$ ( <i>COX-2</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>COX-1</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>hn15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>t15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>f15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>var1 15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$R^2$ ( <i>var2 15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )
	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
<b>MCF-7</b>	0,1498	0,6537	0,3484	0,1026	0,8784	0,4101	0,3979
<b>ZR75-1</b>	0,4652	0,00139	0,00884	0,9758	0,3543	0,2491	0,2862
<b>BT-474</b>	0,01424	0,00392	0,9166	0,6119	0,01073	0,5997	0,1452
Клеточные линии	$r$ ( <i>COX-2</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>COX-1</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>hn15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>t15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>f15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>var1 15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )	$r$ ( <i>var2 15-HPGD</i> / <i>miR-155</i> )
	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$	$p = 0,05$
<b>MCF-7</b>	0,39	0,81	-0,59	-0,32	-0,94	0,64	0,63
<b>ZR75-1</b>	0,68	0,0375	0,094	-0,99	-0,6	0,5	0,53
<b>BT-474</b>	-0,12	0,0142	0,96	0,78	0,1	0,77	0,38

*miR-21* и *miR-155* на мРНК *COX-1*, *COX-2*, *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD* и *var2 15-HPGD* в клеточной линии MCF-7.

Обнаружено существование положительной корреляции между экспрессией гена *COX-2* и микроРНК *miR-21* и *miR-155* в клеточной линии ZR-75-1, тогда как в этой же линии клеток наблюдали обратную корреляцию между экспрессией *f15-HPGD*, *t15-HPGD* и *miR-21* (табл. 3). Значения коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии генов *t15-HPGD/miR-21* и *t15-HPGD/miR-155* в линии ZR-75-1 превышали 50% и 60%, соответственно (табл. 3, 4), что свидетельствует о групповой взаимосвязи экспрессии этого гена с *miR-21* и *miR-155* при РМЖ. Значимая отрицательная корреляция наблюдалась между *f15-HPGD* и *miR-21*, а также *miR-155* в клетках ZR-75-1. Коэффициент детерминации относительной экспрессии *t15-HPGD/miR-155* в клеточной линии ZR-75-1 превышал 60% (табл. 4). Это свидетельствует о том, что экспрессия генов *COX-2*, *15-HPGD* (*f15-HPGD*, *t15-HPGD*) регулируется как *miR-21*, так и *miR-155*.

Выявлена существенная корреляция между относительными уровнями экспрессии *COX-1*, *COX-2*, *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var2 15-HPGD* в линии BT-474 и уровнем *miR-21*. Значения коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var2 15-HPGD* и *miR-21* превышали 50% в клетках BT-474. Таким образом, *miR-21* влияет на экспрессию генов *COX-1*, *COX-2*, *15-HPGD* (*hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var2 15-HPGD*), ингибируя их экспрессию в линии BT-474. В случае *miR-155* и *f15-HPGD* корреляция была незначительной. Прямая связь между экспрессией *hn15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD* и *miR-155* обнаружена в клетках BT-474 (табл. 4). Значения коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии *hn15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD* и *miR-155* в клетках BT-474 превышали 90%, 60% и 50% соответственно (табл. 4).

Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод о том, что *miR-155* регулирует экспрессию *hn15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var1 15-HPGD*, блокируя работу гена *15-HPGD* на различных этапах, что способствует озлокачествлению клетки. Более того, выявлена корреляция между экспрессией мРНК *hn15-HPGD* и *t15-HPGD* и *miR-155*, а также *miR-21*, что свидетельствует о синергизме действия двух микроРНК на мРНК гена *15-HPGD* в опухолевых клетках BT-474.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые выявлены закономерности в изменении экспрессии мРНК *COX-1*, *COX-2*, *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var2 15-HPGD* и *miR-21* и *miR-155* в клетках РМЖ

человека. Полученные результаты позволяют заключить, что *miR-21* и *miR-155* регулируют активность нескольких генов в опухолевой клетке. Действие этих микроРНК на отдельные гены было в ряде случаев кумулятивным, что имеет важное значение в регуляции активности ПГЕ<sub>2</sub> и *COX-2*, а также *15-HPGD* и способствует озлокачествлению опухолевой клетки. Закономерности, выявленные различных клеточных линиях ЭП протокового РМЖ могут стать ключом к поиску подходов к лечению пациентов в зависимости от экспрессии *COX-1*, *COX-2*, *hn15-HPGD*, *f15-HPGD*, *t15-HPGD*, *var2 15-HPGD* и *miR-21*; *miR-155*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Liu G., Friggeri A., Yang Y., Liu G. (2010) J. Exp. Med., **207**, 1589-1597.
2. Andrieu N.A., Motiño O., Mayoral R. (2012) PLoS ONE, **7**, e50935.
3. Song N.Y., Kim D.H., Kim E.H. (2011) Chem. Res. Toxicol., **24**, 1231-1241.
4. Yan M., Rerko R.M., Platzer P. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 17468-17473.
5. Walker J.D., Sehgal I., Kousoulas K.G. (2011) J. Virol., **85**, 7363-7371.
6. Ensor C.M., Tai H.H. (1995) J. Lipid Mediat. Cell Signal., **12**, 313-319.
7. Yan L.-X., Huang X.-F., Shao Q. (2008) RNA, **14**, 2348-2360.
8. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Cell, **144**, 646-674.
9. Roos M.A., Bock G.H., Vries J. (2007) J. Surg. Res., **140**, 109-114.
10. Yiu G.K., Toker A. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 12210-12217.
11. Singh B., Berry J.A., Shohar B.S., Lucci A. (2006) J. Surgical Res., **131**, 267-275.
12. Moore A.E., Greenhough A., Roberts H.R., Hicks D.J. (2009) Carcinogenesis, **30**(10), 1796-1804.
13. Lehtinen L., Vainio P., Wikman H., Reemts J. et al. (2012) J. Pathol., **226**, 674.
14. Vimalraj S., Miranda J.P., Ramyakrishna B., Selvamurugan N. (2013) Disease Markers, **35**, 369-387.
15. Piva R., Spandidos D.A., Gambari R. (2013) Int. J. Oncol., **43**, 985-994.
16. Tang J., Ahmad A., Sarkar F.H. (2012) Int. J. Mol. Sci., **13**, 13414-13437.
17. Zhu S., Wu H., Wu F. et al. (2008) Cell Res., **18**, 350-359.
18. Han M., Liu M., Wang Y. et al. (2012) Mol. Cell Biochem., **363**, 427-436.
19. Lu Z., Ye Y., Jiao D., Qiao J.I., Cui S., Liu Z. (2012) Onc. Lett., **4**, 1027-1032.
20. Sun Y., Wang M., Lin G., Sun S., Li X., Qi J., Li J. (2012) PLoS ONE, **7**, e47003.
21. Strillaccia A., Griffonia C., Sansone P., Paterinia P. et al. (2009) Exp. Cell Res., **315**, 1439-1447.
22. Dave K. (2012) Oral Presentations University of South Carolina, Abstr., **1**, 25-26.  
<http://www.sc.edu/our/doc2012AbstractBook.pdf>

Поступила: 22. 01. 2014.  
Принята к печати: 13. 04. 2016.

THE CONNECTION OF *miR-21* AND *miR-155* WITH REGULATION OF 15-HPGDH mRNA  
IN HUMAN BREAST CANCER CELLS

Z.N. Nikiforova, M.A. Taipov, I.A. Kudryavcev, V.E. Shevchenko

Blokhin Russian Cancer Research Center,  
24/15 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478 Russia; tel.: (499)323-56-11; e-mail: zojanik@rambler.ru

Breast cancer is the most frequent cancer and the leading cause of cancer-related deaths in women worldwide. We determined the expression of COX2, COX1, 15-HPGDH mRNA and miRNAs (*miR-21*, *miR-155*) in three estrogen positive human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-474, ZR-75-1). According to the results of three independent experiments the amount of COX1 and COX2 mRNA was significantly higher in the ZR-75-1 than in MCF-7 and BT-474 cells. Levels of total 15-HPGDH; functional 15-HPGDH mRNA in BT-474 cell line were lower than in MCF-7 and ZR-75-1 ones. The synthesis of 15-HPGDH enzyme in BT-474 line was blocked at the nuclear immature pre-mRNA processing level. *miR-155* expression level was significantly lower than *miR-21* in breast cancer cell lines. Correlations between the dysregulation of *miR-21*, *miR-155* and 15-HPGDH, COX-1, COX-2 mRNA were identified. Expression of *miR-21* was high in MCF-7, ZR-75-1 and BT-474 cell lines. Our results show that *miR-21* and *miR-155* regulate activity of several genes in cancer cells, their effect on the individual genes was in some cases cumulative. Based on our results, we concluded that *miR-21*, *miR-155* suppress the work of tumor suppressor gene *15-HPGDH* and induce potential oncogene *COX-2* that promotes cell malignancy and metastasis of breast cancer.

**Key words:** breast cancer; cyclo-oxygenase-1 (COX-1), cyclo-oxygenase-2 (COX-2), mRNA, microRNA, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-HPGDH)