

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК, ПОТЕНЦИАЛЬНО РЕГУЛИРУЕМЫХ AhR, В ТКАНЯХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО У КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ПАЦИЕНТОВ

Т.С. Калинина^{1*}, В.В. Конончук^{1,2}, И.С. Валембахов¹, В.О. Пустыльяк^{1,3}, В.В. Козлов⁴, Л.Ф. Гуляева¹

¹Институт молекулярной биологии и биофизики — структурное подразделение федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12; *эл. почта: tsalinina@frcftm.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

⁴Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, 630108 Новосибирск, ул. Плахотного, 2

Курение является фактором риска развития немелкоклеточного рака лёгкого (НМКРЛ), наиболее распространённые подтипы которого — аденокарцинома лёгкого (АКЛ) и плоскоклеточный рак лёгкого (ПКРЛ). Сигаретный дым содержит лиганды арилгидрокарбонового рецептора (AhR), например, бензо(а)пирен (BaP), который через активацию AhR может изменять экспрессию многих (в том числе микроРНК-кодирующих) генов. В настоящем исследовании мы оценили экспрессию некоторых из микроРНК, потенциально регулируемых AhR (miRNA-21, -342, -93, -181a, -146a), а также *CYP1A1* — известного гена-мишени AhR. Исследование выполнено в образцах опухолей лёгких курящих и некурящих пациентов с АКЛ и курящих пациентов с ПКРЛ. У этих же пациентов на расстоянии не менее 5 см от границы опухоли были также отобраны макроскопически нормальные ткани лёгкого. Полученные нами результаты для микроРНК мы сравнили с данными из TCGA (The Cancer Genome Atlas). У 76,7% некурящих пациентов с АКЛ в опухолевых или нормальных тканях лёгких мРНК *CYP1A1* не была обнаружена, тогда как среди курящих пациентов почти в половине случаев (47,5% для ПКРЛ и 42,5% для АКЛ) в опухолевых тканях была зарегистрирована экспрессия *CYP1A1*. Мы подтвердили, что профиль экспрессии AhR-регулируемых микроРНК различен в АКЛ и ПКРЛ и зависит от статуса курения: у всех пациентов с АКЛ экспрессия онкогенных miRNA-21 и miRNA-93 в опухолевых тканях была выше, чем в условно-нормальной ткани лёгких от этих же пациентов, однако у пациентов с ПКРЛ из выборки уровни этих микроРНК в опухолевой и условно-нормальной тканях лёгких достоверно не различались. Результаты наших исследований и данные TCGA указывают на зависимость экспрессии miRNA-181a и miRNA-146a у пациентов с АКЛ от курения — экспрессия этих микроРНК значительно ниже в опухолевых тканях курящих пациентов, что может быть связано с регуляцией их экспрессии AhR и AhRR (репрессор AhR). Полученные результаты подтверждают, что курение оказывает влияние на профиль экспрессии микроРНК, что следует учитывать при поиске новых диагностических и терапевтических мишеней при НМКРЛ.

Ключевые слова: арил-гидрокарбоновый рецептор; бензо(а)пирен; немелкоклеточный рак лёгкого; микроРНК

DOI: 10.18097/PBMC20247001052

ВВЕДЕНИЕ

Арилгидрокарбоновый рецептор (AhR) представляет собой активируемый лигандом транскрипционный фактор, принадлежащий к семейству белков bHLH/PAS, который участвует в контроле многих физиологических процессов [1]. Первоначально AhR был идентифицирован как рецептор, связывающий токсикант окружающей среды 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксин (ТХДД) и структурно родственные токсичные галогенированные ароматические промышленные соединения [2]. Результаты многочисленных исследований показали, что этот рецептор связывает структурно разнообразные лиганды как чужеродной, так и эндогенной природы [3]. Более того, биологический эффект таких взаимодействий зависит от конкретных рецептор-связывающих лигандов [4]. Сигнальные пути, регулируемые AhR, активируются в различных

опухолях, влияя на основные стадии онкогенеза — инициацию, продвижение, прогрессирование и метастазирование [5, 6]. Особый интерес вызывает связь сигнальных путей AhR с канцерогенезом лёгкого ввиду значительного воздействия на человека сигаретного дыма и других загрязнителей окружающей среды, которые являются потенциальными лигандами для AhR [7]. Курение — наиболее важный фактор риска развития немелкоклеточного рака лёгких (НМКРЛ), особенно плоскоклеточного рака (ПКРЛ), для которого около 90-95% случаев связаны с курением табака. Сообщалось о 510 полициклических ароматических углеводородах (ПАУ), содержащихся в сигаретном дыме, из которых 16 были классифицированы МАИР (Международным агентством по исследованию рака) как канцерогенные для человека [8]. Одним из таких канцерогенных соединений является бензо(а)пирен (BaP), который способен активировать AhR. Согласно исследованию,

проведённому с канадскими марками сигарет в 1992 г., содержание ВаР в дыме от одной сигареты может варьировать от 3,36 нг до 28,39 нг [9]. Поэтому можно ожидать, что курение и сопутствующее воздействие на человека ВаР приводит к изменению экспрессии многих генов-мишеней AhR в тканях лёгких.

В настоящее время с помощью полногеномного анализа в ДНК человека выявлены многочисленные сайты связывания AhR. Недавно было выполнено сравнение полногеномных профилей связывания AhR и AhRR (репрессора AhR) в клетках рака молочной железы человека MCF-7, обработанных ТХДД [10]. В результате было выявлено 3915 сайтов связывания для AhR и 2811 сайтов связывания для AhRR, из которых 974 (35%) были общими для обоих факторов. Однако вопрос функциональности выявленных сайтов остаётся проблемой для дальнейших исследований.

Наряду с генами, кодирующими белки, AhR способен регулировать экспрессию микроРНК (miRs, miRNAs) — небольших РНК длиной 18–22 нуклеотида, нарушение регуляции экспрессии которых может способствовать канцерогенезу [11]. Ранее методами *in silico* мы провели поиск элементов АНРЕ (сайтов связывания AhR) в геномах крыс, мышей и человека и обнаружили в геноме человека не менее 154 предполагаемых промоторов микроРНК, содержащих последовательности АНРЕ [12]. При этом роль микроРНК, регулируемых AhR, в НМКРЛ и связь профиля экспрессии таких микроРНК со статусом курения исследованы неполно. Таким образом, наше исследование направлено на определение экспрессии AhR-регулируемых микроРНК в образцах опухолей курящих и некурящих пациентов с НМКРЛ для подтверждения связи профиля их экспрессии с курением и выявления новых потенциальных терапевтических мишеней при раке лёгкого. Мы также провели исследование *in silico* на основе данных TCGA об экспрессии этих микроРНК в злокачественных опухолях лёгкого.

МЕТОДИКА

Образцы тканей

Биоколлекция из 110 пар образцов опухолей и нетрансформированных тканей лёгкого человека была собрана на базе Новосибирского областного онкологического диспансера в 3 онкологическом (торакальном) отделении. Образцы лёгочной ткани были получены в процессе торакоскопической

резекции лёгкого от пациентов мужского пола, не проходивших неоадьювантную химиотерапию. Под нетрансформированной (условно-нормальной) тканью подразумевали визуально неизменённую ткань лёгкого, взятую на расстоянии не менее 5 см от границы опухоли. Такой метод отбора контрольной ткани широко распространён в научных работах и позволяет выявлять гены, изменение профиля экспрессии которых ассоциировано с канцерогенезом [13–15]. Всего было собрано по 40 пар образцов от курящих пациентов с ПКРЛ и АКЛ и 30 пар образцов от никогда не куривших пациентов с АКЛ. Образцы условно-нормальной и опухолевой тканей лёгкого помещали в раствор для стабилизации РНК и хранили при температуре -20°C.

Выделение микроРНК

Экстракцию микроРНК из образцов проводили термоиндуцированным лизисом с изотиоционатом гуанидина по ранее опубликованному протоколу [16].

ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Относительные уровни экспрессии микроРНК измеряли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием “stem-loop” праймеров [17] и коммерческого набора RT-M-MuLV-RH (“БиолабМикс”, Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) (“БиолабМикс”). Для обнаружения продуктов ПЦР применяли систему детекции CFX96™ (“Bio-Rad Laboratories”, США). Малые ядерные РНК U44 и U48 использовали для нормализации данных. Праймеры для проведения обратной транскрипции приведены в таблице 1. Для проведения ПЦР использовали олигонуклеотиды, приведённые в таблице 2.

Каждый образец анализировали в трёх повторах. Кратность изменения каждой микроРНК рассчитывали с использованием метода порогового цикла ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в реальном времени

РНК была выделена с использованием реагента TRIzol™ (“Invitrogen”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Целостность РНК контролировали электрофорезом в агарозном геле. Концентрацию и чистоту определяли спектрофотометрически при длинах волн

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения обратной транскрипции микроРНК

РНК	Последовательность праймеров
U48	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGTCAG-3'
U44	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTCAGTT-3'
miR-21	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATC-3'
miR-342	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGGGTG-3'
miR-181a	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCACCG-3'
miR-146a	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGCCTA-3'
miR-93	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTACCTGC-3'

ЭКСПРЕССИЯ AHR-РЕГУЛИРУЕМЫХ микроРНК В РАКЕ ЛЁГКОГО

Таблица 2. Последовательности праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени для оценки экспрессии микроРНК

микроРНК	Последовательность праймеров	
U44	Прямой	5'-GCCGCTCTTAATTAGCTCT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGTCAGTT-(BHQ1)-3'
U48	Прямой	5'-GAGTGATGATGACCCAGGTA-3'
	Обратный	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACCAGAGCCAACGGTCAG-(BHQ1)-3'
miR-21	Прямой	5'-GCCGCTAGCTTATCAGACT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC-(BHQ1)-3'
miR-342	Прямой	5'-GCCGCTCTCACACAGAAATCG-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACGGGTGC-(BHQ1)-3'
miR-181a	Прямой	5'-GCCGCAACATTCAACGCTGT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACTCACCG-(BHQ1)-3'
miR-146a	Прямой	5'-GCCGTGAGAACTGAATTCCA-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACAGCCTA-(BHQ1)-3'
miR-93	Прямой	5'-GCCGCCAAAGTGCTGTTCGT-3'
	Обратный	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCTACCTGC-(BHQ1)-3'

260 нм и 280 нм с использованием спектрофотометра Agilent-8453 ("Agilent Technologies", США). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора ОТ-М-MuLV-RH ("БиолабМикс") в соответствии с рекомендациями производителя. На одну реакцию брали 1 мкг РНК. Полученную кДНК использовали для определения уровней мРНК *AHR*, *CYP1A1* методом ПЦР в режиме реального времени с использованием реакционной смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2x) ("БиолабМикс") на системе детекции CFX96™ ("Bio-Rad Laboratories"). В качестве нормировочных генов были использованы *18S* и *POLR2A*. Были использованы следующие специфические праймеры:

AHR 5'-GTCGTCTAAGGTGTCTGCTGGA-3',
5'-CGCAAACAAAGCCAACTGAGGTG-3';
CYP1A1 5'-GGTCAAGGAGCACTACAAAACC-3',
5'-TGGACATTGGCGTTCTCAT-3';
POLR2A 5'-GCATGGCAGAGGAGTTTCGGCT-3',
5'-ATTTCCCCGGGATGCGCAATGG-3';
18S 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3',
5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'.

Оптимальная концентрация каждого праймера составляла 300 нМ.

Каждую реакцию ПЦР проводили с использованием 0,3 мкл кДНК в конечном объеме 20 мкл при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов: денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг при 60°C

в течение 20 с, элонгация и обработка данных флуоресценции при 72°C в течение 30 с. Специфичность ПЦР контролировали кривыми плавления. Образцы анализировали в трёх технических повторях. Относительные уровни экспрессии генов оценивали, используя значения порогового цикла (Ct) с учётом эффективности реакции (E) для исследуемого гена и гена нормировки.

Биоинформатический анализ

miRNA-21, miRNA-342, и miRNA-93 были отобраны в соответствии с данными ранее проведённого биоинформатического анализа [12]. Кроме этого, с помощью базы данных Harmonizome [18], в которой содержится информация о результатах ChIP анализов, в исследование были взяты также miRNA-181a и miRNA-146a.

Для анализа содержащейся в базе данных TCGA информации об экспрессии генов *CYP1A1*, *AHR* и AHR-регулируемых микроРНК использовался ресурс UALCAN [19].

Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовали программу STATISTICA v.12. Данные представлены в виде медианных значений. Статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия CYP1A1 и AhR в опухолевых тканях пациентов с НМКРЛ

В первую очередь мы провели сравнительный анализ экспрессии гена-мишени AhR — *CYP1A1* — в опухолевых и условно-нормальных тканях курящих и некурящих пациентов с АКЛ и курящих пациентов с ПКРЛ. Почти в половине случаев (47,5% для ПКРЛ и 42,5% для АКЛ) в опухолевой ткани курящих пациентов была обнаружена мРНК *CYP1A1* (табл. 3). При этом во всех опухолевых образцах тканей от некурящих пациентов с АКЛ экспрессия *CYP1A1* отсутствовала. У 23,3% некурящих пациентов с АКЛ была зарегистрирована экспрессия цитохрома, но только в условно-нормальных тканях. Стоит отметить, что у курящих пациентов с АКЛ в 30% случаев экспрессия *CYP1A1* также была обнаружена только в нормальной ткани.

Далее мы проанализировали, связан ли уровень экспрессии AhR с наличием экспрессии *CYP1A1* в опухолевой ткани пациентов. Значимые результаты были получены для ПКРЛ: экспрессия AhR была выше в опухолевых тканях, в которых была обнаружена экспрессия *CYP1A1* (рисунок).

Экспрессия AhR-регулируемых микроРНК в опухолях пациентов с НМКРЛ

В собранных образцах рака лёгких и условно-нормальных тканях лёгких мы также определили профиль экспрессии некоторых микроРНК, потенциально регулируемых AhR (miRNA-21, -342, -93, -181a и -146a). У пациентов с ПКРЛ уровни экспрессии miRNA-342 и miRNA-181a значительно отличались в опухолевых тканях по сравнению с условно-нормальной — в опухолевой ткани уровни этих микроРНК были снижены примерно в 3 раза (при сравнении медианных значений).

Как и для случаев ПКРЛ, у курящих пациентов с АКЛ уровни miRNA-342 и miRNA-181a в опухолевой ткани были снижены по сравнению с уровнем этих микроРНК в условно-нормальной ткани лёгких. Кроме этого, в опухолевых тканях таких пациентов была увеличена экспрессия miRNA-21 и miRNA-93 (табл. 4). Экспрессия miRNA-21 и miRNA-93 также была увеличена в опухолевых тканях некурящих пациентов с АКЛ, но уровни miRNA-342 и miRNA-181a в опухолевых

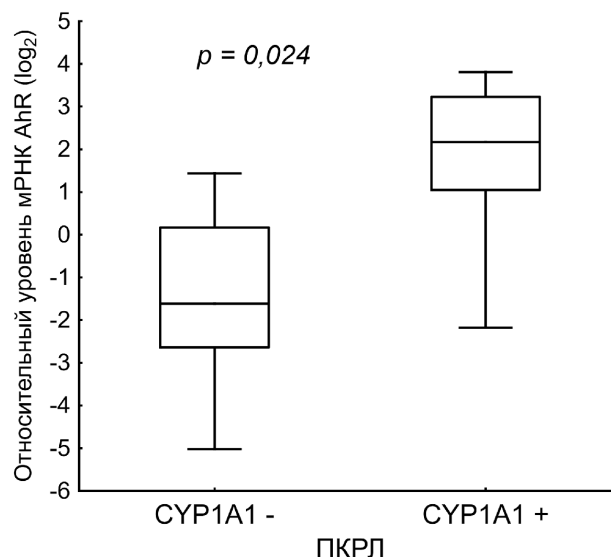


Рисунок. Зависимость уровня мРНК AhR в опухолях пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого от статуса экспрессии *CYP1A1*. Верхний и нижний пределы прямоугольников представляют 75-й и 25-й процентиля. Горизонтальная линия — медиана изменений уровня мРНК AhR в образцах опухолей относительно парной условно-нормальной (прилежащей) ткани от тех же пациентов. Усы представляют диапазон значений. CYP1A1- — экспрессия *CYP1A1* в опухоли отсутствует; CYP1A1+ — экспрессия *CYP1A1* в опухоли регистрируется.

тканях некурящих пациентов не отличались от их уровней в условно-нормальных тканях лёгких этих пациентов (табл. 5).

Мы также проанализировали данные TCGA об уровнях этих микроРНК в тканях НМКРЛ. На выборке образцов из TCGA, как и на нашей выборке, было показано увеличение уровней miRNA-21 и miRNA-93 в АКЛ (n=447) по сравнению с нормальной тканью (n=44) лёгких в 5,6 и 2,8 раз соответственно (табл. 6). Согласно TCGA уровни этих микроРНК также увеличены в ПКРЛ в 2,4 и 2,1 раз соответственно (n=336). В нашей выборке мы наблюдали лишь тенденцию к увеличению уровней этих микроРНК при ПКРЛ.

В TCGA возможно отдельно оценить уровни miRNA-181a-1 и miRNA-181a-2. Последовательности этих микроРНК идентичны, поэтому с помощью ПЦР мы измеряли суммарное количество miRNA-181a, однако только miRNA-181a-1 предсказывается

Таблица 3. Представленность мРНК *CYP1A1* в тканях пациентов с ПКРЛ и АКЛ

Образцы	<i>CYP1A1</i> экспрессия		
	Отсутствие экспрессии в нормальных и опухолевых тканях	Наличие экспрессии*	
		В нормальной ткани	В опухоли
кПКРЛ (%пациентов)	52,5	12,5	47,5
нкАКЛ (%пациентов)	76,7	23,3	0,0
кАКЛ (%пациентов)	27,5	62,5	42,5

Примечание: кПКРЛ — курящие пациенты с ПКРЛ; кАКЛ — курящие пациенты с АКЛ; нкАКЛ — некурящие пациенты с АКЛ. * — экспрессию считали положительной при Ct от 22 до 37.

ЭКСПРЕССИЯ AhR-РЕГУЛИРУЕМЫХ микроРНК В РАКЕ ЛЁГКОГО

Таблица 4. Относительные уровни исследуемых микроРНК в опухолевых образцах курящих пациентов (n=40) с аденокарциномой лёгкого

Относительный уровень микроРНК* и <i>p</i> -значение									
miR-21	<i>p</i>	miR-342	<i>p</i>	miR-93	<i>p</i>	miR-181a	<i>p</i>	miR-146a	<i>p</i>
2,04 (0,17–14,00)	0,042	0,46 (0,05–4,68)	<0,001	1,60 (0,23–7,81)	0,041	0,68 (0,09–5,32)	0,024	1,14 (0,09–33,17)	0,581

Примечание: Здесь и в таблице 5: * – медиана и диапазон изменений уровня микроРНК в образцах опухолей относительно парной условно-нормальной (прилежащей) ткани.

Таблица 5. Относительные уровни исследуемых микроРНК в опухолевых образцах некурящих пациентов (n=30) с аденокарциномой лёгкого

Относительный уровень микроРНК* и <i>p</i> -значение									
miR-21	<i>p</i>	miR-342	<i>p</i>	miR-93	<i>p</i>	miR-181a	<i>p</i>	miR-146a	<i>p</i>
4,06 (1,95–8,38)	<0,001	0,93 (0,12–4,47)	1,000	2,84 (0,33–4,31)	0,049	0,86 (0,40–2,20)	0,650	1,22 (0,28–6,56)	0,290

Таблица 6. Данные об изменении уровней микроРНК в исследуемых клинических образцах немелкоклеточного рака лёгкого и в образцах из TCGA (относительно нормальных тканей)

микроРНК	Изменение уровней микроРНК в образцах немелкоклеточного рака лёгкого по сравнению с нормальной тканью лёгких				
	Заболевание	АКЛ		ПКРЛ	
	Статус курения	Курящие	Некурящие	Курящие	Некурящие
miRNA-21	Наши данные	↑	↑	–	Нет данных
	Данные TCGA	↑	↑	↑	↑
miRNA-342	Наши данные	↓	–	↓	Нет данных
	Данные TCGA	–	–	↑	–
miRNA-181a-1	Наши данные	↓	–	↓	Нет данных
	Данные TCGA	–	–	↓	↓
miRNA-181a-2	Наши данные	↓	–	↓	Нет данных
	Данные TCGA	–	↑	↓	↓
miRNA-93	Наши данные	↑	↑	–	Нет данных
	Данные TCGA	↑	↑	↑	↑
miRNA-146a	Наши данные	–	–	–	Нет данных
	Данные TCGA	–	↑	↑	↑

Примечание: ↑ — достоверное увеличение уровня микроРНК в опухолевой ткани по сравнению с её уровнем в нормальной ткани; ↓ — достоверное снижение уровня микроРНК в опухолевой ткани; – — отсутствие изменений в экспрессии микроРНК.

в качестве AhR-регулируемой. Согласно нашим данным и данным TCGA, экспрессия miRNA-181a снижается в ПКРЛ. В остальном полученные нами данные об уровнях микроРНК в сравнении с их уровнями в нормальных тканях не совпадали с данными TCGA, что может быть обусловлено разным источником нормальных тканей в нашем исследовании и в TCGA.

Анализ связи уровней AhR-регулируемых микроРНК в опухолях НМКРЛ с курением

Курение может приводить к изменению профиля экспрессии микроРНК не только в опухолевой, но и в нормальной ткани лёгких. Поэтому для подтверждения наличия связи профиля экспрессии

микроРНК-мишеней AhR с курением мы сравнили уровни микроРНК, нормированные на уровни РНК референсных генов, в опухолевых тканях курящих и некурящих пациентов из нашей выборки, а также проанализировали аналогичные данные из TCGA.

При сравнении уровней исследуемых микроРНК в АКЛ курящих и никогда не куривших пациентов, мы обнаружили, что в опухолевых тканях курящих пациентов количество miRNA-181a и miRNA-146a в 2,4 раза ниже, чем в опухолевых тканях некурящих пациентов (табл. 7). Согласно TCGA, достоверная связь с курением у пациентов с АКЛ наблюдается для miRNA-181a-1 и miRNA-181a-2, miRNA-146a (количество этих микроРНК ниже в опухолевых тканях курящих), miRNA-93 (количество

Таблица 7. Зависимость уровней исследуемых микроРНК в опухолях пациентов с аденокарциномой лёгкого от курения

микроРНК	Источник данных	Уровень микроРНК в АКЛ курильщиков (относительно уровня микроРНК в АКЛ некурящих)	Уровень микроРНК в ПКРЛ курильщиков (относительно уровня микроРНК в ПКРЛ некурящих)
miRNA-21	Наши данные	0,75	—
	Данные TCGA	0,98	1,25
miRNA-342	Наши данные	1,01	—
	Данные TCGA	1,04	0,87
miRNA-181a-1	Наши данные	0,42*	—
	Данные TCGA	0,87*	1,09
miRNA-181a-2	Наши данные	0,42*	—
	Данные TCGA	0,63*	0,90
miRNA-93	Наши данные	1,12	—
	Данные TCGA	1,22*	1,36
miRNA-146a	Наши данные	0,41*	—
	Данные TCGA	0,67*	0,79

Примечание. Данные представляют собой отношение медианных значений уровней микроРНК в образцах опухолей курящих и некурящих пациентов. Уровни микроРНК в опухолях нормировались на уровни РНК референсных U44 и U48 и не нормировались на уровни микроРНК в нормальных тканях. * – $p < 0,05$.

микроРНК выше в опухолевых тканях курящих). Для ПКРЛ в TCGA также наблюдается тенденция к увеличению уровня miRNA-93 и снижению уровня miRNA-146a в опухолевых тканях курящих (по сравнению с никогда не курившими пациентами), однако эта зависимость не является достоверной.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные экспериментальные и эпидемиологические исследования показали, что воздействие токсинов окружающей среды, таких как ПАУ, во многом способствует возникновению и прогрессированию рака лёгкого. Одним из основных источников ПАУ является курение [20, 21]. Согласно данным МАИР ВаР, входящий в состав сигаретного дыма, относится к канцерогенам I группы [21]. Токсическое действие ВаР может осуществляться по двум основным механизмам: генотоксическому (образование аддуктов с ДНК) и негенотоксическому или эпигенетическому [22, 23]. К эпигенетическим механизмам относится, например, микроРНК-опосредованная регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Несмотря на то, что многие исследования экспрессии микроРНК в злокачественных опухолях, включая рак лёгкого, показали значительные изменения уровней экспрессии как онкогенных, так и опухоль-супрессирующих микроРНК, причины таких изменений зачастую неизвестны. Можно предположить, что такие соединения, как ВаР, могут приводить к изменениям в профиле экспрессии микроРНК через активацию AhR. Ранее нами уже были обнаружены микроРНК, в промоторной области которых содержатся последовательности AHRE — сайтов связывания AhR [12]. В настоящем исследовании мы оценили экспрессию некоторых из этих микроРНК

(miRNA-21, miRNA-342, и miRNA-93) в образцах опухолей лёгких, полученных от курящих и некурящих пациентов с диагнозом ПКРЛ и АКЛ. Кроме того, мы оценили экспрессию miRNA-181a и miRNA-146a, которые являются мишенями AhR согласно ресурсу Harmonizome. Следует отметить, что нам не удалось сформировать группу некурящих пациентов с ПКРЛ, так как такие пациенты были в небольшом количестве, что затрудняет проведение статистического анализа.

В первую очередь для подтверждения активации AhR в тканях лёгких курящих пациентов мы определили экспрессию его “классического” гена-мишени *CYP1A1*. Как правило, конститутивная экспрессия этого гена в лёгких низкая, с чем согласуются наши результаты: у 76,7% некурящих пациентов с АКЛ как в нормальных, так и в опухолевых тканях лёгких экспрессия *CYP1A1* не обнаружена. Однако среди курящих пациентов, особенно пациентов с АКЛ, снижалась доля случаев, когда экспрессия *CYP1A1* в тканях отсутствовала. Примечательно, что среди пациентов с ПКРЛ не было ни одного случая, когда экспрессия *CYP1A1* была бы обнаружена только в нормальной ткани лёгких, в то время как среди курящих пациентов с АКЛ в 30% случаев экспрессия *CYP1A1* была зафиксирована в нормальной ткани и не обнаружена в опухолевой. Кроме этого, только при ПКРЛ высокая экспрессия *AhR* соответствовала положительной экспрессии *CYP1A1* в опухолевых тканях. Эти результаты подтверждают различные механизмы AhR-зависимого патогенеза АКЛ и ПКРЛ.

Среди многочисленных генов-мишеней AhR интерес представляют гены, кодирующие микроРНК. В нашем исследовании мы подтвердили, что профиль экспрессии AhR-регулируемых miRNA-21, -342, -93, -181a и -146a различается в зависимости от типа

опухоли (АКЛ или ПКРЛ) и статуса курения. Так, у курящих пациентов с ПКРЛ и АКЛ экспрессия miRNA-342 и miRNA-181a была ниже в опухолевых, чем в условно-нормальных тканях лёгких от этих же пациентов. Эти результаты не совпали с данными из TCGA, однако статистически значимое снижение экспрессии miRNA-342 и miRNA-181a в образцах опухолевых тканей согласуется с недавно полученными результатами других исследователей, также показавших снижение уровней этих микроРНК в НМКРЛ [24, 25]. В целом, отличия наших данных от данных TCGA могут быть обусловлены различным источником нормальной ткани. Так, в TCGA в качестве нормальной ткани берутся ткани от здоровых людей с неизвестным статусом курения. В нашем исследовании уровни микроРНК в опухолях были нормированы на уровни микроРНК в нормальных тканях лёгких от этих же пациентов.

Для пациентов с АКЛ, как курящих, так и некурящих, мы обнаружили достоверное увеличение экспрессии онкогенных miRNA-21 и miRNA-93 в опухолевых тканях по сравнению с условно-нормальными тканями, что также согласуется с полученными ранее данными [26, 27] и данными TCGA. Мы не обнаружили достоверного увеличения экспрессии этих микроРНК в ПКРЛ, однако наблюдали тенденцию к увеличению их уровней. В выборке образцов из TCGA увеличение уровней miRNA-21 и miRNA-93 в ПКРЛ было достоверно, что может являться следствием большего количества образцов (336 опухолевых образцов и 44 образца нормальной ткани) и другим источником нормальной ткани.

Однако экспрессия исследуемых нами микроРНК может различаться в нормальных тканях лёгких у курящих и некурящих пациентов. Поэтому мы также проанализировали разницу в уровнях исследуемых микроРНК в опухолевых тканях курящих и некурящих пациентов с АКЛ, не используя нормировку на условно-нормальную ткань пациентов. Мы наблюдали снижение количества miRNA-181a и miRNA-146a в опухолях курящих пациентов по сравнению с их количеством в опухолях некурящих. Наблюдаемое нами снижение экспрессии этих микроРНК в образцах от курящих пациентов может быть связано с увеличением количества AhRR — репрессора AhR. Так, согласно данным TCGA экспрессия *AHRR* достоверно выше в опухолевых тканях курящих пациентов с ПКРЛ или АКЛ (по сравнению с некурящими пациентами). Кроме этого, известно, что курение приводит к деметилированию sg05575921 в энхансере гена *AHRR*, которое способствует увеличению его экспрессии [28].

В выборке образцов из TCGA достоверное снижение экспрессии в опухолевых тканях курящих пациентов с АКЛ также было обнаружено для miRNA-181a и miRNA-146a, а уровни miRNA-93 были достоверно выше (по сравнению с никогда не курившими пациентами). У пациентов с ПКРЛ достоверной зависимости экспрессии всех

исследуемых микроРНК от статуса курения в TCGA не было обнаружено, однако выявлена тенденция к увеличению экспрессии miRNA-93 и снижению экспрессии miRNA-146a у курящих пациентов по сравнению с никогда не курившими. Возможно, отсутствие достоверной связи с курением у пациентов с ПКРЛ в выборке TCGA связано с недостаточным количеством образцов ПКРЛ от некурящих пациентов. Так, курящих и никогда не куривших пациентов с АКЛ в TCGA — 104 и 66 соответственно, в то время как курящих и никогда не куривших пациентов с ПКРЛ — 105 и 11.

Полученные нами результаты подтверждают, что курение оказывает влияние на профиль экспрессии микроРНК в том числе в макроскопически нормальной ткани лёгких. Так, у курящих пациентов экспрессия miRNA-342 была ниже в опухолях, чем в нормальных тканях лёгких. Однако при сравнении количества этой микроРНК в опухолях курящих и некурящих пациентов достоверной разницы выявлено не было, что указывает на увеличение экспрессии AhR-регулируемой miRNA-342 в условно-нормальной ткани лёгких курящих пациентов. Также не было выявлено разницы в количестве miRNA-146a в опухолевой и в нормальной тканях лёгких пациентов. Однако было показано, что экспрессия miRNA-146a значительно ниже в опухолевой ткани курящих пациентов чем в опухолевой ткани лёгких никогда не куривших пациентов.

В целом, как минимум для двух AhR-регулируемых микроРНК — miRNA-181a и miRNA-146a — однозначно можно сделать вывод о зависимости их экспрессии в АКЛ от курения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведённых нами исследований, профиль экспрессии микроРНК, потенциально регулируемых AhR, различен в АКЛ и ПКРЛ и зависит от статуса курения. Результаты наших исследований и данные TCGA указывают на зависимость экспрессии miRNA-181a и miRNA-146a от курения — экспрессия этих микроРНК ниже в опухолевых тканях курящих пациентов с АКЛ, что предполагает их регуляцию парой транскрипционных факторов AhR и AhRR. Экспрессия онкогенных miRNA-21 и miRNA-93 в опухолевых тканях была выше, чем в нормальной ткани лёгких у всех пациентов с АКЛ (в нашей выборке и в выборке из TCGA). Дальнейшее исследование регуляции этих микроРНК, их роли и роли регулируемых ими генов в патогенезе НМКРЛ курящих и некурящих пациентов может способствовать развитию новых терапевтических подходов для лечения НМКРЛ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-15-00065.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры были одобрены Биоэтическим комитетом Института молекулярной биологии и биофизики и соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики (протокол № 3 от 14 марта 2017 г.). От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pohjanvirta R. (ed.) (2012) The AH Receptor in Biology and Toxicology. John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, 533 p.
2. Poland A., Glover E., Kende A.S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **251**(16), 4936-4946.
3. Safe S., Jin U.H., Park H., Chapkin R.S., Jayaraman A. (2020) Aryl hydrocarbon receptor (AHR) ligands as selective AHR modulators (SAHRMs). *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(18), 6654. DOI: 10.3390/ijms21186654
4. Safe S., Han H., Goldsby J., Mohankumar K., Chapkin R.S. (2018) Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) ligands as selective Ahr modulators: Genomic studies. *Curr. Opin. Toxicol.*, **11-12**, 10-20. DOI: 10.1016/j.cotox.2018.11.005
5. Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nat. Rev. Cancer*, **14**(12), 801-814. DOI: 10.1038/nrc3846
6. Kolluri S.K., Jin U.H., Safe S. (2017) Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Arch. Toxicol.*, **91**(7), 2497-2513. DOI: 10.1007/s00204-017-1981-2
7. Tsay J.J., Tchou-Wong K.M., Greenberg A.K., Pass H., Rom W.N. (2013) Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res.*, **33**(4), 1247-1256.
8. Li Y., Hecht S.S. (2022) Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem. Toxicol.*, **165**, 113179. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113179
9. Kaiserman M.J., Rickert W.S. (1992) Carcinogens in tobacco smoke: Benzo[a]pyrene from Canadian cigarettes and cigarette tobacco. *Am. J. Public Health*, **82**(7), 1023-1026. DOI: 10.2105/ajph.82.7.1023
10. Yang S.Y., Ahmed S., Satheesh S.V., Matthews J. (2018) Genome-wide mapping and analysis of aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and aryl hydrocarbon receptor repressor (AHR)-binding sites in human breast cancer cells. *Arch. Toxicol.*, **92**(1), 225-240. DOI: 10.1007/s00204-017-2022-x
11. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.*, **9**, 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402
12. Ovchinnikov V.Y., Antonets D.V., Gulyaeva L.F. (2018) The search of CAR, AhR, ESRs binding sites in promoters of intronic and intergenic microRNAs. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **16**(1), 1750029. DOI: 10.1142/S0219720017500299
13. Han R., Guan Y., Tang M., Li M., Zhang B., Fei G., Zhou S., Wang R. (2023) High expression of PSRC1 predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *J. Cancer*, **14**(17), 3321-3334. DOI: 10.7150/jca.88635
14. Shi L., Middleton J., Jeon Y.J., Magee P., Veneziano D., Laganà A., Leong H.S., Sahoo S., Fassan M., Booton R., Shah R., Crosbie P.A.J., Garofalo M. (2018) KRAS induces lung tumorigenesis through microRNAs modulation. *Cell Death Disease*, **9**(2), 219. DOI: 10.1038/s41419-017-0243-9
15. Служев М.И., Зарайский М.И., Семиглазов В.В., Семиглазова Т.Ю., Ткаченко Е.В., Кондратьев С.В., Бриш Н.А., Алексеева Ю.В., Петрик Ю.В., Сидорова А.Н. (2022) Сравнительный анализ профилей экспрессии генов опухолевого контроля и микроРНК в опухолевой и перифокальной ткани у пациентов с колоректальным раком. *Сибирский онкологический журнал*, **21**(2), 55-64. [Sluzhev M.I., Zarskiy M.I., Semiglazov V.V., Semiglazova T.Yu., Tkachenko E.V., Kondratyev S.V., Brish N.A., Alekseeva Yu.V., Petrik I.V., Sidorova A.N. (2022) Comparative analysis of tumor control gene and microRNA expression profiles in tumor and adjacent tissues in patients with colorectal cancer. *Siberian Journal of Oncology*, **21**(2), 55-64.] DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-55-64
16. Kalinina T.S., Kononchuk V.V., Yakovleva A.K., Alekseenok E.Y., Sidorov S.V., Gulyaeva L.F. (2020) Association between lymph node status and expression levels of androgen receptor, miR-185, miR-205, and miR-21 in breast cancer subtypes. *Int. J. Breast Cancer*, **2020**, 3259393. DOI: 10.1155/2020/3259393
17. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **33**(20), e179. DOI: 10.1093/nar/gni178
18. Rouillard A.D., Gundersen G.W., Fernandez N.F., Wang Z., Monteiro C.D., McDermott M.G., Ma'ayan A. (2016) The Harmonizome: A collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)*, **2016**, baw100. DOI: 10.1093/database/baw100
19. Chandrashekar D.S., Karthikeyan S.K., Korla P.K., Patel H., Shovon A.R., Athar M., Netto G.J., Qin Z.S., Kumar S., Manne U., Creighton C.J., Varambally S. (2022) UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*, **25**, 18-27. DOI: 10.1016/j.neo.2022.01.001
20. van Rooij J.G., Veeger M.M., Bodelier-Bade M.M., Scheepers P.T., Jongeneelen F.J. (1994) Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int. Arch. Occup. Environ.*, **66**(1), 55-65. DOI: 10.1007/BF00386580
21. Vu A.T., Taylor K.M., Holman M.R., Ding Y.S., Hearn B., Watson C.H. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the mainstream smoke of popular U.S. cigarettes. *Chem. Res. Toxicol.*, **28**(8), 1616-1626. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00190

22. Stading R., Gastelum G., Chu C., Jiang W., Moorthy B. (2021) Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **76**, 3-16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.07.001.0
23. Das D.N., Ravi N. (2022) Influences of polycyclic aromatic hydrocarbon on the epigenome toxicity and its applicability in human health risk assessment. *Environ. Res.*, **213**, 113677. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113677
24. Chen Z., Ying J., Shang W., Ding D., Guo M., Wang H. (2021) miR-342-3p regulates the proliferation and apoptosis of NSCLC cells by targeting BCL-2. *Technol. Cancer Res. Treat.*, **20**, 15330338211041193. DOI: 10.1177/15330338211041193
25. Simiene J., Dabkeviciene D., Stanciute D., Prokarenkaite R., Jablonskiene V., Askinis R., Normantaite K., Cicenias S., Suziedelis K. (2023) Potential of miR-181a-5p and miR-630 as clinical biomarkers in NSCLC. *BMC Cancer*, **23**(1), 857. DOI: 10.1186/s12885-023-11365-5
26. Bica-Pop C., Cojocneanu-Petric R., Magdo L., Raduly L., Gulei D., Berindan-Neagoe I. (2018) Overview upon miR-21 in lung cancer: Focus on NSCLC. *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**(19), 3539-3551. DOI: 10.1007/s00018-018-2877-x
27. Yang W., Bai J., Liu D., Wang S., Zhao N., Che R., Zhang H. (2018) MiR-93-5p up-regulation is involved in non-small cell lung cancer cells proliferation and migration and poor prognosis. *Gene*, **647**, 13-20. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.024
28. Grieshober L., Graw S., Barnett M.J., Thornquist M.D., Goodman G.E., Chen C., Koestler D.C., Marsit C.J., Doherty J.A. (2020) AHRR methylation in heavy smokers: Associations with smoking, lung cancer risk, and lung cancer mortality. *BMC Cancer*, **20**(1), 905. DOI: 10.1186/s12885-020-07407-x

Поступила в редакцию: 07. 12. 2023.
После доработки: 12. 02. 2024.
Принята к печати: 16. 02. 2024.

EXPRESSION OF AhR-REGULATED miRNAs IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER IN SMOKERS AND NEVER SMOKERS

T.S. Kalinina^{1}, V.V. Kononchuk^{1,2}, I.S. Valembakhov¹, V.O. Pustyl'nyak^{1,3}, V.V. Kozlov¹, L.F. Gulyaeva¹*

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 2/12 Timakova str., Novosibirsk, 630060 Russia; *e-mail: tskalinina@frcftm.ru

²Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 15 Rechkunovskaya str., Novosibirsk, 630055 Russia

³Novosibirsk State University, 1 Pirogova str., Novosibirsk, 630090 Russia

⁴Novosibirsk Regional Oncological Dispensary, 2 Plakhotnogo str., Novosibirsk, 630108 Russia

Smoking is a risk factor for non-small cell lung cancer (NSCLC). The most common subtypes of NSCLC are lung adenocarcinoma (LAC) and squamous cell carcinoma (SCC). The cigarette smoke contains aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands, such as benzo(a)pyrene (BaP). By activating the AhR, BaP can change the expression of many genes, including miRNA-encoding genes. In this study, we have evaluated the expression of few miRNAs potentially regulated by AhR (miR-21, -342, -93, -181a, -146a), as well as *CYP1A1*, a known AhR target gene, in lung tumor samples from smoking (n=40) and non-smoking (n=30) patients with LAC and from smoking patients with SCC (n=40). We have also collected macroscopically normal lung tissue >5 cm from the tumor margin. We compared the obtained data on the miRNA expression in tumors with data from The Cancer Genome Atlas (TCGA). We found that in 76.7% of non-smoking LAC patients, *CYP1A1* mRNA was not detected in tumor and normal lung tissues, while in smoking patients, *CYP1A1* expression was detected in tumors in almost half of the cases (47.5% for SCC and 42.5% for LAC). The expression profile of AhR-regulated miRNAs differed between LAC and SCC and depended on the smoking status. In LAC patients, the expression of oncogenic miRNA-21 and miRNA-93 in tumors was higher than in normal lung tissue from the same patients. However, in SCC patients from our sample, the levels of these miRNAs in tumor and non-transformed lung tissue did not differ significantly. The results of our studies and TCGA data indicate that the expression levels of miRNA-181a and miRNA-146a in LAC are associated with smoking: expression of these miRNAs was significantly lower in tumors of smokers. It is possible that their expression is regulated by AhR and AhRR (AhR repressor), and inhibition of AhR by AhRR leads to a decrease in miRNA expression in tumors of smoking patients. Overall, these results confirm that smoking has an effect on the miRNA expression profile. This should be taken into account when searching for new diagnostic and therapeutic targets for NSCLC.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: aryl hydrocarbon receptor; benzo(a)pyrene; non-small cell lung cancer; microRNA

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 22-15-00065.

Received: 07.12.2023; revised: 12.02.2024; accepted: 16.02.2024.