

miR-21 и miR-155 в регуляции TGF-β1/SMAD-сигнального пути в линии клеток рака молочной железы с различным метастатическим потенциалом

З.Н. Никифорова, И.А. Кудрявцев, В.Е. Шевченко

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»; Россия, 115201, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Зоя Николаевна Никифорова zojanik@rambler.ru

Рак молочной железы (PMЖ) является одной из основных онкопатологий среди женщин. Метастазы – главная причина фатальных исходов при PMЖ. В этой связи особый интерес приобретает изучение молекулярных механизмов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). В механизмы ЭМП вовлечен TGF-β1/SMAD-сигнальный путь, через регуляцию которого можно воздействовать на процессы метастазирования при PMЖ. В данной работе была изучена экспрессия мРНК семейства SMAD, miR-21 и miR-155. Экспрессия miR-21 в опухолевых клетках линий MCF-7, ZR-75-1, BT-474 была увеличена. Уровень экспрессии miR-155 был значительно ниже уровня экспрессии miR-21. В опухолевых клетках PMЖ внутриклеточные механизмы регуляции SMAD2, SMAD4, SMAD7 были нарушены.

Исследована корреляционная связь экспрессии miR-21 и miR-155 с регуляцией SMADs в TGF-β1/SMAD-сигнальном пути в 3 линиях карцином молочной железы человека с различным метастатическим потенциалом (MCF-7, ZR-75-1, BT-474). В клеточной линии MCF-7 значимая обратная корреляция наблюдалась между SMAD4 и miR-155. В клеточной линии BT-474 – между уровнями экспрессии SMAD2, SMAD4, SMAD7 и miR-155, miR-21. В клеточной линии ZR-75-1 была выявлена корреляция экспрессии мРНК SMAD2, SMAD4, SMAD7 как с miR-155, так и с miR-21. Результаты работы свидетельствуют о том, что miR-155 и miR-21 в различной степени влияли на экспрессию SMAD2, SMAD4, SMAD7, блокируя работу этих генов и усиливая прогрессию и степень злокачественности клеток PMЖ человека, а в некоторых случаях их эффект был кумулятивным.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроРНК, miR-21, miR-155, SMAD2, SMAD4, SMAD7, TGF-β1, эпителиально-мезенхимальный переход, TGF-β1/SMAD-сигнальный путь

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-3-15-21

miR-21 and miR-155 in the regulation of TGF-β1/SMAD signaling pathway of the line breast cancer cells with different metastatic potential

Z.N. Nikiforova, I.A. Kudryavtsev, V.E. Shevchenko

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115201, Russia

Breast cancer (BC) is the most common form of cancer, leading to high mortality rates among women worldwide. Metastasis is the main cause of fatal outcomes in BC. In this regard, of particular interest takes the study of molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition (EMT). In the EMT processes involved in TGF-β1/SMAD-signaling pathway through the regulation of which can affect the processes of metastasis in BC.

In this study we have analyzed changes of mRNA expression of the mRNA SMADs, miR-21, and miR-155 of the tumor BC cells with different metastatic potential MCF-7, BT-474, ZR-75-1. High expression of miR-21 was detected in all the tumor cell lines (MCF-7, ZR-75-1 and BT-474). In the BC cell lines, the expression level of miR-155 was significantly lower than that of miR-21. Analysis of mRNA expression has clearly shown impairments of intracellular mechanisms of regulation of SMAD2, SMAD4, SMAD7 in BC.

Investigated the correlation of expression of miR-21 and miR-155 regulation of SMADs in TGF-β1/SMAD signaling pathway in three carcinomas lines of the human breast with different metastatic potential (MCF-7, ZR-75-1, BT-474). A significant inverse correlation was observed between SMAD4 and miR-155 in MCF-7 cells. Inverse correlation between the expression of SMAD2, SMAD4, SMAD7 and miR-155; miR-21 was found in the BT-474 cells.

The results obtained in this study showed that miR-21 and miR-155 regulate activity of several genes SMAD2, SMAD4, SMAD7 in the tumor cell ZR-75-1 and on some genes they exhibited a cumulative effect. It should be noted that the miR-155 and miR-21 in various degrees influenced the expression of SMAD2, SMAD4, SMAD7, blocking the work of these genes and, thereby exacerbating the progression and degree of malignancy of BC cells human; in some cases their effects on individual genes were cumulative.

Key words: breast cancer, microRNA, miR-21, miR-155, SMAD2, SMAD4, SMAD7, TGF-β1, epithelial-mesenchymal transition, TGF-β1/SMAD-signaling pathway

Введение

В России рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место по показателям заболеваемости (20 %) и смертности (17,3 %) среди злокачественных новообразований у женщин в возрасте от 40 до 85 лет [1]. Метастазы – главная причина фатальных исходов при РМЖ. В этой связи особый интерес приобретает изучение молекулярных механизмов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), играющего важную роль при метастазировании солидных опухолей. ЭМП – комплекс изменений в фенотипе клеток, которые приобретают повышенные инвазивные свойства [2]. Отмечена повышенная экспрессия генов ЭМП в базальноподобных опухолях молочной железы, большинстве инвазивных новообразований [3] с наименьшим прогнозом и опухолях с резистентностью к химиотерапии [4].

В ЭМП вовлечены сигнальные пути: TGF- β 1/SMAD, MAPK, Pi3K/Akt/mTOR, PGE2/COX, Notch, Hedgehog, Wnt/ β -catenin. Изучая их роль в регуляции ЭМП, можно воздействовать на процессы метастазирования при РМЖ.

Большой интерес при изучении молекулярных механизмов метастазирования вызывают трансформирующие факторы роста (TGF- α и TGF- β) – важные регуляторы морфологической и инвазивной фазы ЭМП. Известно, что TGF- β 1 активирует сигнальные пути, участвующие в ЭМП, в частности TGF- β 1/SMAD-сигнальный путь [5]. Эпителиальные клетки способны продуцировать собственный эндогенный фактор роста TGF- β 1. Показано, что TGF- β 1 может быть как супрессором опухолевого роста, так и прометастатическим фактором в системе TGF- β 1/SMAD-сигнальной регуляции в ту или иную сторону [6]. Нарушение TGF- β 1/SMAD-сигнальной регуляции происходит через белки семейства SMAD и TGF- β 1, что связано с неопластической трансформацией, метастазированием

и прогрессией опухоли [7]. Однако не ясно, за счет каких механизмов происходят эти нарушения.

Известно, что микроРНК осуществляют регуляцию трансляционной эффективности или скорости деградации мРНК за счет комплементарного связывания с мишенью и поэтому экспрессия мРНК не дает достоверной информации об образовании белка. При высоком уровне экспрессии мРНК синтез его продукта может быть снижен за счет микроРНК [8]. В настоящее время только для небольшого количества микроРНК определены мРНК-мишени. Отмечена регуляция *miR-21* и *miR-155* ЭМП через TGF- β 1/SMAD-сигнальный путь [9, 10]. *miR-21* и *miR-155* сверхэкспрессированы в клетках РМЖ человека [11, 12]. Предполагают, что *miR-21* регулирует способность эпителиальных клеток отвечать на стимуляцию TGF- β 1, воздействуя на туморогенность клеток. Повышение экспрессии *miR-155* было обнаружено при инвазивном РМЖ [13]. Эти данные свидетельствуют о том, что *miR-155* может играть важную роль в TGF- β -индуцированном ЭМП при метастазировании РМЖ. Недостаточно ясна роль *miR-21* и *miR-155* в регуляции TGF- β 1/SMAD-сигнального пути при РМЖ.

В данной работе изучена экспрессия мРНК семейства *SMAD*, *miR-21* и *miR-155*. Исследована корреляционная связь экспрессии *miR-21* и *miR-155* с регуляцией SMADs в TGF- β 1/SMAD-сигнальном пути в 3 линиях карцином молочной железы человека с различным метастатическим потенциалом (MCF-7, ZR-75-1, BT-474).

Материалы и методы

Исследование проводили на культурах клеток РМЖ человека с различным метастатическим потенциалом: MCF-7, ZR-75-1 и BT-474 (табл. 1). Культуры клеток получены в Институте цитологии РАН. В качестве питательной среды для ZR-75-1 и BT-474 ис-

Таблица 1. Характеристика клеточных линий РМЖ [22–25]

Линия клеток	Происхождение	Тип клеток	Фенотипические особенности
MCF-7	Аденокарцинома молочной железы; метастаз плеврального выпота	Эпителиоподобная	ER+/PR+, экспрессия HER-2 (0–1+), Ki-67 – 90 %, люминальный А. Клеточная линия характеризуется очень слабой миграцией и инвазивностью, положительной экспрессией СК8, СК18, СК19, отрицательной экспрессией виментина. Образование TGF- β 1 – 2 пг/мл
ZR-75-1	Протоковая карцинома; асцит	Эпителиоподобная	ER+/PR+, экспрессия HER-2 (2+), Ki-67 – 80 %, люминальный А. Характеризуется низкой инвазивностью, положительной экспрессией СК8, СК18, СК19, отрицательной экспрессией виментина. Образование TGF- β 1 более 100 пг/мл
BT-474	Протоковая карцинома; эпителий протоков молочной железы	Эпителиоподобная	ER+/PR+, экспрессия HER-2 (3+), Ki-67 – 70 %, люминальный В. Характеризуется миграцией и инвазивностью. Клетки опухоли способны давать метастазы в лимфоузлы, легкие. Характеризуется положительной экспрессией СК8, СК18, СК19, экспрессией виментина (+/–)

Примечание. ER – рецепторы эстрогенов, PR – рецепторы прогестерона, СК – цитокератины.

пользовали RPMI-1640 с L-глутамином; для клеток MCF-7 – среду DMEM с L-глутамином. В состав питательных сред входила 10 % эмбриональная телячья сыворотка.

Выделение мРНК проводили с использованием набора Perfect Pure RNA Cell and Tissue kit (5 PRIME, США). Приготовление образцов и выделение мРНК осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Для выделения мРНК использовали $\sim 1 \times 10^6$ клеток. Полученные образцы хранили при температуре -80°C . Концентрацию мРНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США). Анализ чистоты выделенной мРНК проводили по показателю соотношения интенсивностей пиков A_{260}/A_{280} . Для очищенной мРНК это соотношение составляло 1,8–2,1.

Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартному протоколу Reverse Transcription ProtoCol (Promega, США) согласно рекомендациям производителя в объеме 20 мкл. В качестве праймеров использовали разработанные специфические олигонуклеотиды и обратную транскриптазу M-MuLV (ДНК-синтез, Россия). Реакция проходила при температуре 42°C в течение 50 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 70°C в течение 15 мин.

Экспрессию генов анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием системы iQ5 (Bio-Rad, США). Праймеры для анализа экспрессии гена были разработаны фирмой «Синтол» (Россия) с использованием Primer Express версии 1.0 (табл. 2). В качестве флуоресцентного красителя в зонде использовался карбоксифлуоресцеин (λ_{max} поглощения составляло 490 нм). ПЦР проводили по стандартному протоколу в объеме 25 мкл. Программа для проведения ПЦР в реальном времени: 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 *β -actin*. Из полученных образцов комплементарной ДНК для каждой клеточной линии делали калибровочный раствор. Его использовали для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительное количество комплементарной ДНК в образцах.

Анализ экспрессии miR-21 и miR-155. Для выделения микроРНК использовали фенол-хлороформную смесь (1:1) и набор mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, США). Выделение микроРНК осуществляли по стандартному протоколу к набору. Измерения концентрации микроРНК в пробах проводили на спектрофотометре NanoDrop ND-1000. Чистоту выделенной микроРНК измеряли по соотношению 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, США). Температурный режим: 30 мин – 16°C , 30 мин – 42°C , 5 мин – 85°C . Полученную комплементарную ДНК хранили при -20°C .

ПЦР проводилась с помощью наборов: TaqMan MicroRNA Assays MiR21, TaqMan MicroRNA Assays MiR155 (Applied Biosystems, США) и iQ™ Supermix (Bio-Rad, США). Пробы готовили по стандартному протоколу TaqMan MicroRNA Assays. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Программа для проведения ПЦР в реальном времени: 1 цикл: $95^\circ\text{C} - 10$ мин; 55 циклов: $95^\circ\text{C} - 15$ с, $60^\circ\text{C} - 1$ мин, измерение флуоресценции канала карбоксифлуоресцеина (λ_{max} поглощения составляло 490 нм). Все результаты анализировали с использованием программного обеспечения iQ5 Optical System Software, v. 2 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка данных. Эксперименты проводили в 3 независимых сериях опытов. Данные предоставляли в виде среднего значения 3 измерений со стандартной ошибкой среднего. Дополнительно выполняли корреляционный анализ, в котором вычисляли коэффициент детерминации (R^2) – квадрат множественного коэффициента корреляции, отражающий долю вариации результативного признака и коэффициент корреляции. Коэффициент корреляции может принимать значения от 1 до -1 , положительные свидетельствовали о том, что при изменении экспрессии одного из генов экспрессия другого изменяется пропорционально в ту же сторону. Чем больше значение коэффициента, тем выше вероятность такого синхронного изменения. Отрицательные значения коэффициента

Таблица 2. Последовательность использованных праймеров для проведения ПЦР в реальном времени

Название праймера	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
SMAD2	TGTGTA AACCTTACCACTATCAGAGA	AGAGCGGGAAGTTCTGTTAGGAT
SMAD4	AAAACGGCCATCTTCAGCAC	CATTGTGAACAGGCCAGTAATGTC
SMAD7	CGACTCTGCGAACTAGAGTCTCC	ACAGCATCTGGACAGTCTGCA
<i>β-actin</i>	GGCCGCGGTGTACGCCAACACAGTGCTC	CCCGGGGCCGTCATACTCCTGCTTGCTG

говорили о разнонаправленности изменений. Все изменения считали статистически достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее время ЭМП рассматривается как возможный механизм, с помощью которого эпителиальные клетки опухоли приобретают более инвазивный фенотип и формируют метастатические ниши в организме. Молекулярные механизмы ЭМП включают несколько ключевых моментов: подавление экспрессии белков эпителиального фенотипа (E-кадгерина, CK8, 18 и 19); увеличение экспрессии генов, ответственных за мезенхимальный фенотип эпителиоцитов (N-кадгерина, виментина, фибронектина, ZEB-1, ZEB-2, Slug, SNAIL1) [15]; усиление клеточной подвижности вследствие активации сигнальных путей, приводящих к реорганизации цитоскелета. Большой интерес для изучения молекулярных механизмов метастазирования вызывают трансформирующие факторы роста (TGF- α и TGF- β) — основные регуляторы морфологической и инвазивной фазы ЭМП. Нарушение TGF- β 1/SMAD-сигнальной регуляции связано с неопластической трансформацией, метастазированием и прогрессией опухоли [7].

Известно, что TGF- β 1 регулирует уровни экспрессии E-кадгерина, который играет важную роль в ЭМП. Снижение экспрессии E-кадгерина сопровождается прогрессированием опухолевого процесса, появлением метастазов [1, 6]. В семейство белков SMAD входит 8 факторов транскрипции, из них 5 являются рецептор-регулируемыми (R-SMADs): SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD9. TGF- β 1 связывается с рецепторами 1-го и 2-го типов, которые в свою очередь фосфорилируют R-SMADs: SMAD2 и SMAD3 [6], которые затем соединяются с общим SMAD4, и такой комплекс белков транслоцируется в ядро клетки [6], где они регулируют экспрессию специфичных генов через связывание участков промоторов, взаимодействуют с факторами транскрипции.

Известно, что SMAD2 является медиатором клеточного сигнала от TGF- β 1 и поэтому регулирует множество клеточных процессов (клеточная пролиферация, апоптоз, дифференциация клеток) [7]. Тем не менее механизм, с помощью которого SMAD2, SMAD4 и SMAD7 вносят свой вклад в регулирование TGF- β 1/SMAD-сигнального пути при РМЖ, остается в значительной степени неизученным.

В представленной работе была изучена экспрессия мРНК семейства SMAD в 3 хорошо изученных (см. табл. 1) линиях карцином молочной железы человека с различным метастатическим потенциалом (MCF-7, ZR-75-1, BT-474). Исследование экспрессии SMAD2, SMAD4, SMAD7 в клетках РМЖ выявило достоверные различия по содержанию мРНК. В исследуемых ли-

ниях клеток уровень экспрессии SMAD2 был выше, чем SMAD4 (табл. 3). Для линий с более высокой степенью злокачественности BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии SMAD4 не различался, но был ниже, чем в линии MCF-7 (см. табл. 3). Гены SMAD2 и SMAD4 являются негативными регуляторами экспрессии некоторых онкогенов: p38, MAPK, ERK, PI3K, JNK, Rho [6, 8].

Белок SMAD7 необходим для конкурентного ингибирования фосфорилирования R-SMADs через рецепторный комплекс T β RI. SMAD7 связан с регуляцией TGF- β 1/SMAD-сигнального пути и ЭМП в опухолевых клетках [10], регулирует прогрессию, инвазию и метастазирование [5], ассоциирован с негативным прогнозом у больных РМЖ и рассматривается рядом авторов в качестве потенциального маркера [10]. В клетках линий BT-474 и ZR-75-1 уровни экспрессии SMAD7 статистически не различались между собой и были в 1,8 раза выше, чем в клетках MCF-7 (см. табл. 3). Увеличение экспрессии мРНК коррелирует со степенью злокачественности при прогрессии опухолевого роста [14].

В результате сравнения данных по уровню экспрессии мРНК стало ясно, что в опухолевых клетках РМЖ внутриклеточные механизмы регуляции SMAD2, SMAD4, SMAD7 нарушены. Мы предположили, что эти нарушения регулируют микроРНК — miR-21 и miR-155, так как изменения в их функционировании непосредственно связаны с возникновением, прогрессией и метастазированием некоторых злокачественных опухолей. Так, известно, что нарушения в регуляции miR-21 приводят к трансформации нормальной клетки в опухолевую, в частности при РМЖ через PTEN, PCCD4, Spry1 или регуляцию протеинов, таких как Bcl-2, ZEB-1, EGF/HER-2, TGF- β [15, 16].

Анализ экспрессии микроРНК в опухолевых клетках линий MCF-7, ZR-75-1, BT-474 показал высокий уровень экспрессии miR-21 во всех исследуемых линиях. Уровень экспрессии miR-155 был значительно ниже уровня miR-21. Наибольшие уровни экспрессии miR-21 и miR-155 наблюдали в опухолевых клетках линии MCF-7 (см. табл. 3). Результаты ряда исследований показали, что экспрессия miR-21 изменяется в клетках опухоли [17] и является регулятором процессов, запускающих ЭМП в опухолевых клетках линии MCF-7 [18].

Различные процессы в клетке регулирует miR-155: апоптоз, дифференцировку, ангиогенез, пролиферацию, ЭМП. Экспрессия miR-155 коррелирует с экспрессией эстрогеновых и прогестероновых рецепторов [19]. Высокие уровни экспрессии miR-21 и miR-155 при РМЖ связаны с прогрессированием клеточной стадии опухоли, метастазированием в лимфоузлы и неблагоприятным прогнозом для пациента и могут

Таблица 3. Данные по уровню экспрессии *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, *miR-21* и *miR-155* в клеточных линиях РМЖ

Линия клеток	<i>SMAD2</i> × 10 ⁻⁷ , нг/мкл	<i>SMAD4</i> × 10 ⁻⁷ , нг/мкл	<i>SMAD7</i> × 10 ⁻⁷ , нг/мкл	<i>miR-21</i> , нг/мкл	<i>miR-155</i> × 10 ⁻⁷ , нг/мкл
MCF-7	57 ± 0,14	52 ± 2,88	0,093 ± 0,004	0,781 ± 0,0062	1,54 ± 0,0416
ZR-75-1	123 ± 6,37	35,9 ± 4,58	0,17 ± 0,054	0,122 ± 0,0077	0,0265 ± 0,00108
BT-474	89,5 ± 1,31	31,5 ± 2,25	0,15 ± 0,0022	0,342 ± 0,012	0,0539 ± 0,0028

являться кандидатами в прогностические маркеры метастазирования [11, 12].

МикроРНК взаимодействуют с мРНК путем ингибирования трансляции белка через сайты связывания на 3'-UTR или редуцирования экспрессии белка без изменения уровня мРНК. Более того, известно, что специфичные мРНК регулируются множеством микроРНК, обуславливая кумулятивный эффект [15]. Корреляционная связь мРНК *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* с *miR-21* и *miR-155* при РМЖ в настоящее время не изучена.

Следующей задачей настоящего исследования было оценить корреляцию изменений относительной экспрессии мРНК *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* с микроРНК *miR-21* и *miR-155* в образцах клеточных линий РМЖ. Полученные результаты статистической обработки приведены в табл. 4, 5.

Статистически значимая корреляционная связь между *SMAD2*, *SMAD7* и *miR-21* выявлялась в 3 клеточных линиях РМЖ (см. табл. 4), но в случае *SMAD7/miR-21* для менее метастатической клеточной линии MCF-7 наблюдали обратную корреляцию. Анализ показал отсутствие статистически значимой корреляции между показателями экспрессии мРНК *SMAD4* и *miR-21* в клеточной линии MCF-7. Следует особо отметить, что для клеточной линии BT-474 наблюдали обратную корреляцию между уровнями экспрессии *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *miR-21* (см. табл. 4). Коэффициент детерминации свидетельствовал о том, что изменение экспрессии *SMAD2* приводило к значительным изменениям экспрессии *miR-21* в линии клеток ZR-75-1 и BT-474, тогда как в клеточной

линии MCF-7 коэффициент детерминации менялся незначительно (см. табл. 4). Значения коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии *SMAD4/miR-21* для клеточной линии ZR-75-1 и *SMAD7/miR-21* для линий клеток MCF-7, ZR-75-1, BT-474 превышали 50 % (см. табл. 4). Эти данные свидетельствовали о том, что *miR-21* в различной степени регулирует экспрессию *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, блокируя на различных этапах работу этих генов, что способствует озлокачествлению опухолевой клетки. Полученные данные подтверждают важную роль *miR-21* в TGF-β1/SMAD-сигнальном пути и ЭМП, согласуясь с результатами работ, выполненных на других клеточных моделях [20].

Нашли высокую корреляцию между уровнями относительной экспрессии *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *miR-155* в клеточной линии ZR-75-1 (см. табл. 5), что подтверждалось показателями коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии этих генов в клетках ZR-75-1 (см. табл. 5). Более того, в клеточной линии ZR-75-1 была выявлена корреляция экспрессии мРНК *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* как с *miR-155*, так и с *miR-21*, что свидетельствовало в данном случае о синергизме действия 2 микроРНК на один и тот же ген.

Для клеточной линии BT-474, как и в случае с *miR-21*, наблюдали обратную корреляцию между уровнями экспрессии *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *miR-155*. Значения коэффициентов детерминации в линии BT-474 превышали 90 % между уровнями экспрессии *SMAD4/miR-155* и 60 % в случае с экспрессией *SMAD2/miR-155* и *SMAD7/miR-155* (см. табл. 5). Следует отметить, что значения коэф-

Таблица 4. Коэффициенты корреляции и детерминации между *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *miR-21* в протоковых карциномах клеточных линий РМЖ ($p = 0,05$)

Линия клеток	r (<i>SMAD2/miR-21</i>)	r (<i>SMAD4/miR-21</i>)	r (<i>SMAD7/miR-21</i>)	R^2 (<i>SMAD2/miR-21</i>)	R^2 (<i>SMAD7/miR-21</i>)	R^2 (<i>SMAD4/miR-21</i>)
MCF-7	0,56	-0,1	-0,76	0,31	0,57	0,009
ZR-75-1	0,92	0,91	0,99	0,84	0,97	0,83
BT-474	-0,98	-0,65	-0,98	0,96	0,95	0,42

Таблица 5. Коэффициенты детерминации и корреляции между *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *miR-155* в протоковых карциномах клеточных линий РМЖ ($p = 0,05$)

Линия клеток	r (<i>SMAD2</i> / <i>miR-155</i>)	r (<i>SMAD4</i> / <i>miR-155</i>)	r (<i>SMAD7</i> / <i>miR-155</i>)	R^2 (<i>SMAD2</i> / <i>miR-155</i>)	R^2 (<i>SMAD4</i> / <i>miR-155</i>)	R^2 (<i>SMAD7</i> / <i>miR-155</i>)
MCF-7	0,55	-0,98	0,45	0,30	0,96	0,201
ZR-75-1	1	0,87	1	0,99	0,75	0,99
BT-474	-0,77	-1	-0,79	0,6	0,99	0,62

коэффициентов детерминации между уровнями экспрессии *SMAD2*/*miR-21* и *SMAD2*/*miR-155*; *SMAD7*/*miR-21* и *SMAD7*/*miR-155* превышали 60 % в линии BT-474 (см. табл. 4, 5), что свидетельствовало о групповой взаимосвязи экспрессии этих генов с *miR-21* и *miR-155* при РМЖ. В клеточной линии MCF-7 значимая обратная корреляция наблюдалась между *SMAD4* и *miR-155* (см. табл. 5). Значение коэффициента детерминации свидетельствовало о том, что в 96 % случаев изменение экспрессии *miR-155* приводит к изменению экспрессии *SMAD4* в клетках MCF-7 (см. табл. 5). В случае экспрессии *miR-155* и *SMAD7* в клетках MCF-7 корреляция была незначительной. Эти результаты свидетельствовали о том, что *miR-155* в различной степени влияет на экспрессию *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, блокируя на различных этапах работы этих генов в ЭМП. Наши данные согласуются

с данными литературы, где показано влияние *miR-155* на регуляцию гена *SMAD4* в ЭМП на других клеточных линиях и тканях РМЖ [15, 21].

Заключение

В опухолевых клетках РМЖ внутриклеточные механизмы регуляции *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* нарушены. *SMAD2* является негативным регулятором метастатического потенциала опухолевых клеток, а *SMAD7* коррелирует со степенью злокачественности при прогрессии опухолевого роста. Полученные результаты подтверждают участие *miR-21* и *miR-155* в регуляции TGF- β 1/*SMAD*-сигнального пути через регуляцию белков *SMAD*. МикроРНК влияет на прогрессию и степень злокачественности опухоли, что было показано в протоковых карциномах 3 клеточных линий РМЖ с различным метастатическим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

- Greenlee R.T., Murray T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2000;50(1):7–33.
- Zavadil J., Haley J., Kalluri R. et al. Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008;68(23):9574–7.
- Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(18):10869–74.
- Rysman E., Brusselmans K., Scheys K. et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 2010;70(20):8117–26.
- Hugo H., Ackland M.L., Blick T. et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007;213(2):374–83.
- Petersen M., Pardali E., van der Horst G. et al. Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* 2010;29(9):1351–61.
- Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775(1):21–62.
- Tang J., Ahmad A., Sarkar F.H. et al. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):13414–37.
- Sundqvist A., Ten Dijke P., van Dam H. et al. Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: Smad signal integration in epithelial cell plasticity. *Breast Cancer Res* 2012;14(1):204.
- Wu Y., Zhou B.P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40(7):643–50.
- Sun Y., Wang M., Lin G. et al. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One* 2012;7(10):e47003.
- Yan L.X., Huang X.F., Shao Q. et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008;14(11):2348–60.
- Zheng S.R. Clinical significance of miR-155 expression in breast cancer and effects of miR-155 ASO on cell viability and apoptosis. *Oncol Rep* 2012;27(4):1149–55.
- Stolfi C., Marafini I., De Simone et al. The dual role of Smad7 in the control of cancer growth and metastasis. *Int J Mol Sci* 2013;14(12):23774–90.
- Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(5):445–57.
- Chen L., Li Y., Fu Y. et al. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS One* 2013;8(1):e54213.
- Zhu S., Wu H., Wu F. et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008;18(3):350–9.
- Han M., Liu M., Wang Y. et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem* 2012;363(1–2):427–36.
- Lu Z., Ye Y., Jiao D. et al. miR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the

- estrogen receptor and progesterone receptor status. *Oncol Lett* 2012;4(5):1027–32
20. Li Q., Zhang D., Wang Y. et al. MiR-21/Smad7 signaling determines TGF- β 1-induced CAF formation. *Sci Rep* 2013;3:2038.
21. Kong W., Yang H., He L. et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 2008;28:6773–84.
22. Subik K., Lee J.F., Baxter L. et al. The expression patterns of ER, PR, HER-2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl)* 2010;4:35–41.
23. Liang Y., Benakanakere I., Besch-Williford C. et al. Synthetic progestins induce growth and metastasis of BT-474 human breast cancer xenografts in nude mice. *Menopause* 2010;17(5):1040–7.
24. <http://www.lgcstandards-atcc.org/>.
25. Latruch C., Stegerer A., Häring J. et al. Estrogen receptor β agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines. *Steroids* 2013;78(2): 195–202.

Авторы статьи «Протеомные исследования, направленные на поиск маркеров рака молочной железы» (журнал «Опухоли женской репродуктивной системы» № 2 за 2015 г.) М.А. Таипов, З.Н. Никифорова и В.Е. Шевченко и редакция журнала приносят извинения С.Н. Тамкович, В.Е. Войцицкому, П.П. Лактионову, результаты труда которых были заимствованы из ранее опубликованной статьи «Современные методы диагностики рака молочной железы» («Биомедицинская химия» № 4 (60) за 2014 г., с. 141–160).

Статьи М.А. Таипова впредь в журнале «Опухоли женской репродуктивной системы» публиковаться не будут. Просим читателей не использовать материалы статьи М.А. Таипова и соавт. «Протеомные исследования, направленные на поиск маркеров рака молочной железы», а также не ссылаться на нее.