

МикроРНК – МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ПРЕДИКЦИИ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА КИШЕЧНОГО ТИПА

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.18

УДК 616.33–006.6–07

Поступила 27.10.2017 г.

© **В.А. Рубцов**, аспирант кафедры патологической анатомии¹;
Ю.А. Федотова, старший преподаватель кафедры патологической анатомии¹;
М.К. Иванов, к.б.н., зав. лабораторией ПЦР²;
С.Е. Титов, научный сотрудник лаборатории ПЦР²;
Е.Г. Поморгайло, д.б.н., профессор кафедры патологической анатомии¹

¹Омский государственный медицинский университет, Омск, 644099, ул. Ленина, 12;²АО «Вектор-Бест», Новосибирск, 630117, а/я 492

Цель исследования — оценить экспрессию микроРНК, влияющих на ключевые для канцерогенеза сигнальные пути, в тканях слизистой оболочки желудка у пациентов с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом и раком желудка кишечного типа (непосредственно в ткани опухоли и слизистой оболочке желудка с морфологическими признаками хронического гастрита).

Материалы и методы. Объектами исследования были фрагменты слизистой оболочки антрального отдела желудка с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом, из них 10 биоптатов — с минимальными изменениями, 9 биоптатов — с хроническим гастритом, а также образцы операционного материала желудков, резецированных по поводу рака желудка кишечного типа, из них 28 — фрагменты опухоли и 22 — ткань вне опухолевого роста (хронический атрофический гастрит). Количество микроРНК miR-146a, miR-155, miR-21, miR-223, miR-192, miR-200b, miR-221, miR-375 в парафиновых срезах определяли методом полупроводниковой шпильчатой ОТ-ПЦР с детекцией в реальном масштабе времени.

Результаты и обсуждение. Среди исследуемых микроРНК наиболее статистически значимые результаты были выявлены при анализе miR-21 и miR-223. Уровень экспрессии онкогенных miR-21, miR-223 значимо и последовательно повышается в ряду от хронического *H. pylori*-ассоциированного гастрита до аденокарциномы желудка кишечного типа.

Закключение. МикроРНК miR-21 и miR-223 могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для оценки риска развития, ранней диагностики и прогноза рака желудка кишечного типа.

Ключевые слова: микроРНК; miR-21; miR-223; рак желудка кишечного типа; молекулярные маркеры.

Как цитировать: Rubtsov V.A., Fedotova Y.A., Ivanov M.K., Titov S.E., Pomorgailo E.G. MicroRNA as a molecular marker for predicting the risk of intestinal type gastric cancer development. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 151–155, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.18>

English

MicroRNA as a Molecular Marker for Predicting the Risk of Intestinal Type Gastric Cancer Development

V.A. Rubtsov, PhD Student, Department of Pathological Anatomy¹;
Y.A. Fedotova, Senior Teacher, Department of Pathological Anatomy¹;
M.K. Ivanov, PhD, Head of PCR Laboratory²;
S.E. Titov, Researcher, PCR Laboratory²;
E.G. Pomorgailo, DSc, Professor, Department of Pathological Anatomy¹

¹Omsk State Medical University, 12 Lenin St., Omsk, 644099, Russia;²Vector-Best, P.O. Box492, Novosibirsk, 630117, Russia

The aim of the study was to assess expression of microRNAs (miRNAs) influencing the key carcinogenesis pathways in the tissues of gastric mucosa in patients with *H. pylori*-associated chronic gastritis and gastric cancer of intestinal type (directly in the tumor tissue and mucosa of the stomach with morphological signs of chronic gastritis).

Materials and Methods. Objects of investigations were fragments of gastric mucosa of the antral part of the stomach with *H. pylori*-

Для контактов: Рубцов Вячеслав Александрович, e-mail: sl1zig1@rambler.ru

associated chronic gastritis: 10 were bioplates with minimal changes, 9 bioplates with chronic gastritis, and specimens of surgical material taken from the stomachs with gastric cancer of intestinal type: 28 were tumor fragments and 22 the tissue from the sites beyond tumor growth (chronic atrophic gastritis). The number of miRNAs miR-146a, miR-155, miR-21, miR-223, miR-192, miR-200b, miR-221, miR-375 in paraffin sections was determined by a real-time semi-quantitative hairpin RT-PCR assay.

Results. The analysis of miR-21 and miR-223 showed the most statistically significant results among the investigated miRNAs. The expression level of oncogenic miR-21 and miR-223 significantly and successively increases in the range of the examined diseases from *H. pylori*-associated chronic gastritis to intestinal type gastric adenocarcinoma.

Conclusion. MiRNAs miR-21 and miR-223 may be considered as perspective biomarkers for assessing the risk of development, early diagnosis, and prognosis of intestinal type gastric cancer.

Key words: microRNA; miR-21; miR-223; gastric cancer of intestinal type; molecular markers.

Введение

Самая частая форма рака желудка — аденокарцинома кишечного типа — возникает на фоне длительно протекающего воспаления слизистой оболочки желудка, приводящего к атрофическому гастриту, за которым следуют интраэпителиальная неоплазия и инвазивный рак желудка кишечного типа [1, 2]. Частой причиной хронического гастрита является бактерия *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Хронический гастрит и ранние формы опухолевого роста не всегда имеют выраженные клинические проявления, из-за чего зачастую рак желудка выявляется на III–IV стадии, и потому в более чем 75% случаев лечение возможно только в объеме паллиативной операции или химиотерапии [3]. Данный факт обуславливает необходимость разработки методов ранней диагностики и выявления предикторов возникновения рака желудка. Перспективными кандидатами на роль предикторов рака желудка являются микроРНК, представляющие собой некодирующие рибонуклеиновые кислоты, которые состоят в среднем из 22 нуклеотидов. Связываясь с 3'-UTR матричной РНК (мРНК) генов-мишеней по принципу полной или частичной комплементарности, рибонуклеотидные комплексы, включающие микроРНК, разрушают мРНК либо ингибируют ее трансляцию соответственно, за счет чего микроРНК постраскрипционно регулируют генную экспрессию. Благодаря такому механизму микроРНК участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки [4] и апоптоза клеток [5] — процессов, играющих ключевую роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе и онкологических [6, 7]. Аберрантная экспрессия микроРНК показана при многих злокачественных опухолях [8]. Несмотря на активное исследование экспрессии микроРНК при раке желудка, данные об изменении их уровней в тканях слизистой оболочки желудка на ранних этапах канцерогенеза остаются недостаточными, что требует проведения дальнейших исследований.

Цель исследования — оценить экспрессию микроРНК, влияющих на ключевые для канцерогенеза сигнальные пути, в тканях слизистой оболочки желудка у пациентов с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом и раком желудка кишечного типа

(непосредственно в ткани опухоли и слизистой оболочке желудка с морфологическими признаками хронического гастрита).

Материалы и методы

Объектами исследования служили фрагменты слизистой оболочки антрального отдела желудка с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом, из них 10 биоптатов — с минимальными изменениями (1-я группа, контроль), 9 биоптатов — с хроническим гастритом (2-я группа), а также образцы операционного материала желудков, резецированных по поводу рака желудка кишечного типа, среди которых 28 — фрагменты опухоли (4-я группа) и 22 (3-я группа) — ткань вне опухолевого роста (хронический атрофический гастрит).

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено Этическим комитетом Омского государственного медицинского университета. От каждого пациента получено информированное согласие.

Фрагменты исследуемых тканей фиксировали в 10% нейтральном забуференном (pH=7,2–7,4) формалине на протяжении 12–24 ч. Проводку материала, заливку в парафин и приготовление парафиновых срезов выполняли по общепринятой методике. Морфологические изменения слизистой оболочки желудка оценивали по гистологическим препаратам, окрашенным гематоксилином и эозином.

Среди микроРНК были выбраны молекулы, относительно которых в литературе представлены данные, показывающие их роль в канцерогенезе при раке желудка [9]: miR-146a, miR-155, miR-21, miR-223, miR-192, miR-200b, miR-221, miR-375. Их количество в парафиновых срезах определяли методом полупроводниковой шпильной ОТ-ПЦР с детекцией в реальном масштабе времени с использованием специфических праймеров к анализируемым микроРНК. Нормализацию проводили по общепринятой методике — на малую ядерную РНК U6.

В качестве основных характеристик описательной статистики числовых данных был использован U-критерий Манна–Уитни для двух независимых

выборок (основные группы и группа сравнения). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали $p \leq 0,05$.

Результаты

Отмечалось значимое и последовательное повышение экспрессии всех анализируемых микроРНК во всем ряду исследуемых патологий: *H. pylori*-ассоциированный хронический неатрофический гастрит (2-я группа), атрофический гастрит (3-я группа),

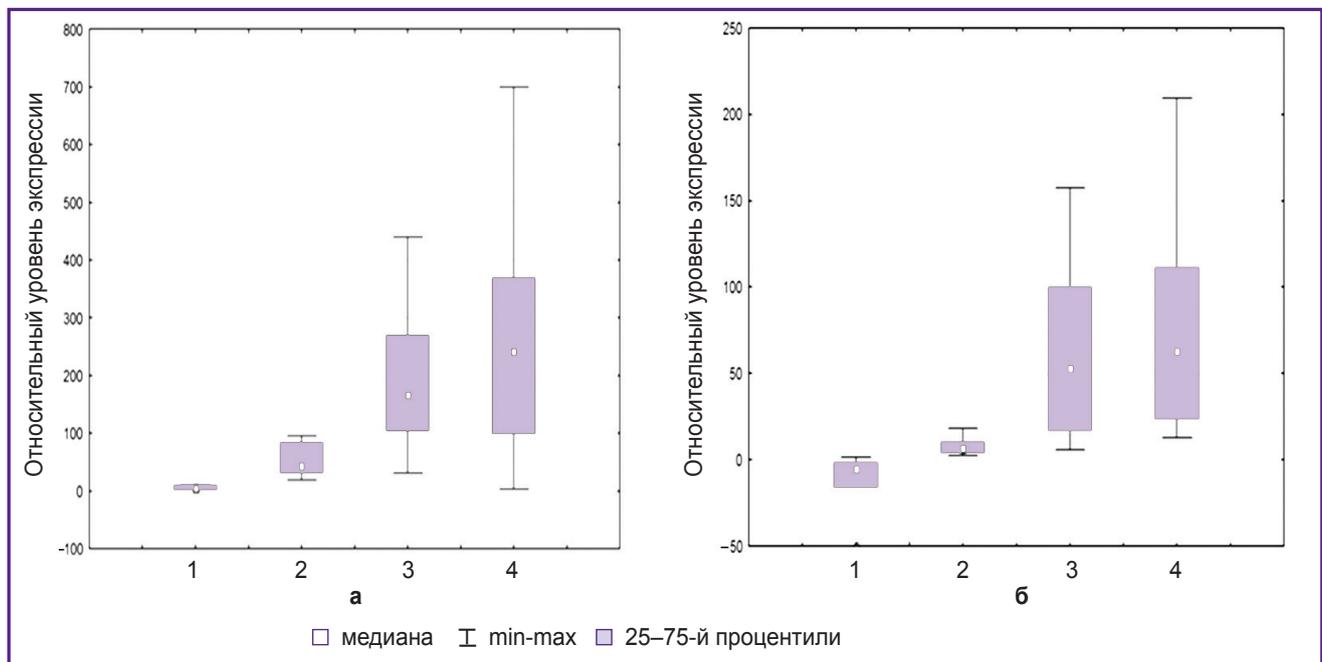
аденокарцинома желудка кишечного типа (4-я группа) по сравнению с контрольной группой биоптатов слизистой оболочки желудков с минимальными изменениями (1-я группа). Исключением явилась онко-супрессивная miR-375, экспрессия которой при раке желудка закономерно снижена (табл. 1).

Среди исследуемых микроРНК наиболее статистически значимые результаты ($p < 0,01$) по всем группам были выявлены при анализе экспрессии miR-21 и miR-223 (см. рисунок).

Таблица 1

Относительные уровни экспрессии микроРНК в исследуемых группах (M±m)

МикроРНК	Группы исследуемых образцов			
	Слизистая оболочка желудка с минимальными изменениями (1-я группа)	<i>H. pylori</i> -ассоциированный хронический гастрит (2-я группа)	Хронический атрофический гастрит вне опухолевого роста (3-я группа)	Рак желудка кишечного типа (4-я группа)
miR-21	5,54±0,93	55,76±9,85	225,69±39,96	378,65±35,41
miR-223	-10,96±5,30	12,40±5,59	84,60±22,43	114,09±38,56
miR-375	1,64±0,58	15,03±2,90	37,58±7,47	13,94±2,53
miR-146a	-15,05±6,28	1,18±0,83	3,82±1,23	3,90±0,85
miR-155	-165,31±31,16	-16,56±4,34	-8,72±2,08	-8,26±1,31
miR-221	-46,88±6,95	-4,02±0,50	0,64±0,72	1,66±1,24
miR-192	1,04±0,58	19,91±5,01	37,70±8,02	38,46±7,53
miR-200b	2,70±0,24	30,36±7,08	40,57±4,76	42,93±8,13



Относительные уровни экспрессии miR-21 (а) и miR-223 (б) в образцах тканей слизистой оболочки желудка: 1 — слизистая оболочка желудка с минимальными изменениями; 2 — *H. pylori*-ассоциированный хронический гастрит; 3 — дистантная зона (вне опухолевого роста) — хронический атрофический гастрит; 4 — рак желудка кишечного типа

Таблица 2

Гены-мишени и биологические эффекты микроРНК miR-21, miR-223, miR-375

МикроРНК	Гены-мишени	Регулируемый биологический процесс
miR-21 (экспрессия при раке желудка повышена)	<i>PTEN, TGFB1, TGFB2, PDCD4</i>	Клеточная пролиферация
	<i>RECK</i>	Инвазия и метастазирование за счет активации металлопротеиназ MMP-2, MMP-9 и MMP14
miR-223 (экспрессия при раке желудка повышена)	<i>EPB41L3, E2F1, FOXO1, NFI-A</i>	Клеточная пролиферация, миграция и инвазия
miR-375 (экспрессия при раке желудка снижена)	<i>14-3-3zeta</i>	Каспазный путь апоптоза
	<i>JAK2, PDK1</i>	Клеточная пролиферация

Обсуждение

Изменение экспрессии микроРНК начинается уже на стадии хронического *H. pylori*-ассоциированного гастрита — эта бактерия, колонизируя слизистую оболочку желудка, как напрямую [10, 11], так и косвенно (за счет хронического воспаления) [12] вызывает нарушения в экспрессии многих микроРНК. Факторы вирулентности *H. pylori*, основными из которых являются *CagA, VacA, IceA, BabA, SabA, DupA* [13], оказывают значительное влияние на важнейшие регуляторные пути жизнедеятельности клеток эпителия слизистой оболочки желудка. *CagA* вызывает повышение продукции белков IL-1β, IL-8 и активации NF-κB, который связан с продукцией провоспалительных цитокинов и апоптозом клеток, нарушает регуляцию сигнальных путей клетки и способствует канцерогенезу [14]. *VacA* ведет к повышению продукции фактора некроза опухолей (TNF-α), IL-1β, оксида азота, активных форм кислорода и активации NF-κB. Факторы вирулентности и провоспалительные цитокины вызывают изменение экспрессии микроРНК [15].

Аберрантная экспрессия микроРНК в свою очередь влияет на экспрессию генов-мишеней белков из ключевых сигнальных путей, играющих большую роль в инициации и прогрессивном развитии рака желудка [16].

Выявленные в нашем исследовании статистически значимо более высокие уровни экспрессии miR-21, miR-223 во фрагментах слизистой оболочки желудка, резецированных по поводу аденокарциномы кишечного типа, и вне опухолевого роста (с гистологической картиной хронического атрофического гастрита) по сравнению с образцами с аналогичной гистологической картиной, но без ассоциации с раком желудка (miR-21: p=0,00046; miR-223: p=0,00119) позволяют рассматривать эти микроРНК в качестве маркеров оценки риска развития рака желудка. В то же время статистически значимых отличий между экспрессией этих микроРНК в парах «аденокарцинома желудка–хронический атрофический гастрит вне опухолевого роста» в слизистой оболочке резецированного желудка не обнаружено.

МикроРНК miR-21, уровень которой значительно повышен в слизистой оболочке желудка при инфек-

ции *H. pylori*, за счет гена-мишени *PTEN* (из сигнального пути PI3K-Akt) активирует пролиферацию [17] и блокирует апоптоз за счет регуляции гена *PDCD4* [5]. Молекулы miR-223 за счет регуляции экспрессии генов *EPB41L3, FBXW7, HCDC4, STMN1* связаны с инвазией и метастазированием [18]. Молекулы miR-375, экспрессия которых снижена в тканях при раке желудка в связи с гиперпродукцией IL-6, IL-8 и TNF-α при хроническом воспалении (за счет мишени — Sp1 и JAK2 из PI3K-Akt-Sp1 и JAK2-STAT3 сигнальных путей соответственно), препятствуют инвазии и метастазированию [19]. Наиболее значимые гены-мишени miR-21, miR-223, miR-375 и биологические эффекты, связанные с их регуляцией при нарушении экспрессии микроРНК, представлены в табл. 2.

Таким образом, уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21 и miR-223 значимо и последовательно повышается в ряду от хронического *H. pylori*-ассоциированного атрофического гастрита до аденокарциномы желудка кишечного типа, что отражает важную роль этих микроРНК в канцерогенезе рака желудка. Данные, полученные при сравнении экспрессии микроРНК в тканях аденокарциномы и дистантной зоны (вне опухолевого роста), с большой долей вероятности следует рассматривать как подтверждение теории опухолевого поля и метакронного рака, с мультифокальной инициацией и последующей спонтанной промоцией и прогрессией в одном из этих участков, при сохранении аберраций, в том числе и паттерна экспрессии микроРНК, в остальных участках.

Заключение

МикроРНК miR-21 и miR-223 могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для оценки риска развития и ранней диагностики рака желудка кишечного типа.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации 115031760046 от 17.03.2015 г.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

Литература/References

1. Мерабишвили В.М. Аналитическая эпидемиология рака желудка. Вопросы онкологии 2013; 59(5): 565–570. Merabishvili V.M. Analytical epidemiology of gastric cancer. *Voprosy onkologii* 2013; 59(5): 565–570.
2. Rugge M., Genta R.M., Graham D.Y., Mario F., Coelho L.G., Kim N., Malfertheiner P., Sugano K., Tsukanov V., Correa P. Chronicles of a cancer foretold: 35 years of gastric cancer risk assessment. *Gut* 2016; 65(5): 721–725, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310846>.
3. Fletcher C.D.M. *Diagnostic histopathology of tumors*. Philadelphia: Elsevier; 2013. 2296 p.
4. Haneklaus M., Gerlic M., O'Neill L.A., Masters S.L. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med* 2013; 274(3): 215–226, <https://doi.org/10.1111/joim.12099>.
5. Zhang Z., Li Z., Gao C., Chen P., Chen J., Liu W., Xiao S., Lu H. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* 2008; 88(12): 1358–1366, <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.94>.
6. Farazi T.A., Hoell J.I., Morozov P., Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 774: 1–20, https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_1.
7. Nikitina E.G., Urazova L.N., Stegny V.N. MicroRNAs and human cancer. *Exp Oncol* 2012; 34(1): 2–8.
8. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259–269, <https://doi.org/10.1038/nrc1840>.
9. Shrestha S., Hsu S.D., Huang W.Y., Huang H.Y., Chen W., Weng S.L., Huang H.D. A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer. *Cancer Med* 2014; 3(4): 878–888, <https://doi.org/10.1002/cam4.246>.
10. Feng Y., Wang L., Zeng J., Shen L., Liang X., Yu H., Liu S., Liu Z., Sun Y., Li W., Chen C., Jia J. FoxM1 is overexpressed in Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis and is negatively regulated by miR-370. *Mol Cancer Res* 2013, 11(8): 834–844, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-13-0007>.
11. Zhu Y., Jiang Q., Lou X., Ji X., Wen Z., Wu J., Tao H., Jiang T., He W., Wang C., Du Q., Zheng S., Mao J., Huang J. MicroRNAs up-regulated by CagA of Helicobacter pylori induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *PLoS One* 2012, 7(4): e35147, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035147>.
12. Liu X., Ru J., Zhang J., Zhu L.H., Liu M., Li X., Tang H. miR-23a targets interferon regulatory factor 1 and modulates cellular proliferation and paclitaxel-induced apoptosis in gastric adenocarcinoma cells. *PLoS One* 2013, 8(6): e64707, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064707>.
13. Cadamuro A.C.T., Rossi A.F.T., Maniezzo N.M., Silva A.E. Helicobacter pylori infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. *World J Gastroenterol* 2014; 20(6): 1424–1437, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1424>.
14. Ding S.Z., Goldberg J.B., Hatakeyama M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol* 2010; 6(5): 851–862, <https://doi.org/10.2217/fon.10.37>.
15. Libânio D., Dinis-Ribeiro M., Pimentel-Nunes P. Helicobacter pylori and microRNAs: relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions. *World J Clin Oncol* 2015; 6(5): 111–132, <https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i5.111>.
16. Wan X., Ding X., Chen S., Song H., Jiang H., Fang Y., Li P., Guo J. The functional sites of miRNAs and lncRNAs in gastric carcinogenesis. *Tumour Biol* 2015; 36(2): 521–532, <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3136-5>.
17. Zhang B.G., Li J.F., Yu B.Q., Zhu Z.G., Liu B.Y., Yan M. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncol Rep* 2012; 27(4): 1019–1026, <https://doi.org/10.3892/or.2012.1645>.
18. Li X., Zhang Y., Zhang H., Liu X., Gong T., Li M., Sun L., Ji G., Shi Y., Han Z., Han S., Nie Y., Chen X., Zhao Q., Ding J., Wu K., Daiming F. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* 2011; 9(7): 824–833, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0529>.
19. Miao L., Liu K., Xie M., Xing Y., Xi T. miR-375 inhibits Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2-STAT3 signaling. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(7): 699–711, <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1550-y>.