

УДК: 616.22-006.6, 577.218

## ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

**Е.Г. Никитина<sup>1,2</sup>, О.В. Черемисина<sup>1</sup>, В.А. Бычков<sup>1</sup>, Д.Е. Кульбакин<sup>1</sup>,  
Е.Л. Чойнзонов<sup>1</sup>, В.Н. Стегний<sup>2</sup>, Н.В. Литвяков<sup>1,2</sup>**

Томский НИИ онкологии, г. Томск<sup>1</sup>

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск<sup>2</sup>

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail:ekatarinanikitina@gmail.com

### Аннотация

Изучен aberrантный паттерн экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221, -494 в опухолевой ткани плоскоклеточной карциномы гортани относительно прилежащей нормальной ткани у 46 пациентов. Установлено, что клинико-морфологические параметры не оказывают влияния на экспрессию анализируемых микроРНК. Показана гиперэкспрессия онкогенных микроРНК-21, -155, -205 и гипоекспрессия онкосупрессорной микроРНК-200а в опухолевой ткани относительно прилежащей неизменной ткани. Представленные результаты позволяют предполагать существенную роль этих микроРНК в канцерогенезе опухолей гортани.

**Ключевые слова:** рак гортани, микроРНК, экспрессия microRNA.

МикроРНК постраскрипционно регулируют генную экспрессию, связываясь с 3'-UTR мРНК генов-мишеней по принципу комплементарности, ингибируя или полностью инактивируя мРНК [3, 31]. Благодаря такому механизму микроРНК участвуют в регуляции многих клеточных процессов, включая развитие, дифференцировку, апоптоз, пролиферацию, ответ на стрессовое воздействие, метаболизм и секрецию инсулина [2].

В опухоли часто наблюдается aberrантная экспрессия микроРНК, которая свидетельствует о важной роли этих молекул в процессе канцерогенеза [12]. Aberrантная экспрессия микроРНК может быть следствием различных причин, таких как делеции, амплификации хромосомных локусов микроРНК, мутации или нарушение регуляции транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию микроРНК. Влияние на микроРНК могут оказывать и эпигенетические механизмы [17, 23]. Экспрессия микроРНК отличается значительной тканевой специфичностью, и aberrантный паттерн экспрессии микроРНК различается в зависимости от тканевого происхождения опухоли. Описание этого aberrантного паттерна важно с точки зрения понимания механизмов канцерогенеза, поиска новых мишеней для таргетной терапии и маркеров для диагностики, прогноза и мониторинга заболевания. Одной из малоизученных локализаций в этом отношении являются плоскоклеточные карциномы гортани, которые по частоте заболеваемости занимают второе место в структуре опухолей головы и шеи

[8]. Среди микроРНК, для которых было проведено исследование aberrантного паттерна экспрессии в опухоли гортани, были выбраны те молекулы, относительно которых в литературе представлены данные, доказывающие их значительную роль в канцерогенезе при других локализациях. Это микроРНК-21, -18а, -200а, -200с, -205, -221, -494. Было показано, что они играют одну из ключевых ролей в регуляции процессов клеточного цикла, апоптоза, роста, инвазии, пролиферации клеток при опухолях репродуктивных органов у женщин (рак молочной железы, рак яичников), глиобластомах и многих других локализациях [9, 19, 20, 24].

**Целью исследования** явилось изучение aberrантного паттерна экспрессии микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221, -494 в опухолевой ткани плоскоклеточной карциномы гортани относительно нормальной прилежащей ткани и связи этого показателя с клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса.

### Материал и методы

В исследование включены 46 больных раком гортани (табл. 1), мужского пола, в возрасте от 45 до 64 лет (в среднем –  $56 \pm 10$  лет), проходивших обследование и лечение в Томском НИИ онкологии. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законами РФ об охране здоровья граждан» (Указ президента РФ 39 от 24.12.93 № 2288), получено разрешение

Таблица 1

## Клинико-морфологические характеристики пациентов

Характеристика		Число больных
TNM	I–II	24 (44 %)
	III–IV	31 (56 %)
Лимфогенное метастазирование	N <sub>0</sub>	43 (78 %)
	N <sub>1-3</sub>	12 (22 %)
Степень дифференцировки	Низкая	6 (13 %)
	Умеренная	32 (70 %)
	Высокая	4 (8,5 %)
	Нет информации	4 (8,5 %)

локального этического комитета Томского НИИ онкологии.

В работе был использован парный операционный/биопсийный материал (опухолевая и прилежащая нормальная ткань) от пациентов с первичным диагнозом плоскоклеточного рака гортани (РГ), не получавших на момент исследования специального лечения. Биопсийный материал из опухолевой и неизменной ткани получали при видеоларингоскопии. Диагноз у всех пациентов был морфологически верифицирован. Биологический материал помещали в пробирки типа Eppendorf с консервирующим раствором RNeasy Lysis Buffer (Sigma, USA), пробирки выдерживали сутки при 4°C и потом хранили при –80°C до выделения РНК. Тотальная фракция РНК из ткани была выделена набором реагентов miRvana™ (Ambion, USA). Количество РНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, USA) (концентрация РНК варьировала от 30 до 800 нг/мкл, A<sub>260/280</sub> = 1,90). Значение RIN (RNA Integrity Number) колебалось от 8,0 до 9,4 (оценивали на приборе TapeStation 2200 Agilent Technologies, USA). Мультиплексная обратная транскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР) проводилась в объеме 20 мкл, в состав которого входили 100–500 нг РНК-матрицы, 0,5 нМ микроРНК-специфичного праймера особой шпильчатой конструкции (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-494-3p) [18], 1 ед. ингибитора РНКаз, 50 ед. MMLV ревертазы («Сибэнзим», Новосибирск), 1х MMLV буфера и 1 мМ каждого dNTP. Протокол реакции: 38 циклов при 16°C в течение 20 сек, при 42°C в течение 20 сек, при 50°C в течение 1 сек, с заключительным этапом прогрева смеси при 85°C в течение 1 мин. При каждой постановке были включены отрицательные контроли, не содержащие РНК и/или несущие в составе геномную ДНК. Все реакции ПЦР в режиме реального времени проведены в триplete согласно протоколу [18]. В качестве гена-рефери выбрана микроРНК-103 [26], калибровка выполнена относительно прилежащей к опухоли нормальной ткани у каждого пациента, уровень экспрессии микроРНК рассчитан согласно методу Pfaffl [27]. В качестве результата использовано логарифмически трансформированное по

основанию  $e$  нормализованное значение уровня экспрессии ( $\ln(\text{fold} + \text{const})$ ).

Корреляционный анализ, а также обработка данных с применением t-критерия Уэлша и Стьюдента проводились в программе Statistica 8.0. Для всех статистических подсчетов применен критерий множественности сравнения Бенджамини – Хохберга (FDR – false discovery rate). Все значения  $p$ , удовлетворяющие условию  $FDR \leq 5\%$ , принимались как статистически значимые.

## Результаты исследования

На первом этапе было изучено возможное влияние на экспрессию микроРНК таких параметров, как стадия распространенности процесса, статус лимфогенного метастазирования и степень дифференцировки опухоли путем сравнительной оценки показателей уровня экспрессии микроРНК в подгруппах. Ввиду малочисленности выборки были объединены пациенты с I–II и III–IV стадиями опухолевого процесса. Сравнение этих групп не выявило значимых различий в уровне экспрессии анализируемых микроРНК. Не обнаружено влияния лимфогенного метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани на экспрессию анализируемых микроРНК (табл. 2). Хотя для микроРНК-200с показано снижение уровня экспрессии у пациентов без метастазирования в сравнении с подгруппой лиц с лимфогенными метастазами, для микроРНК-18а наблюдается тенденция к повышению уровня экспрессии от низкой к высокой степени дифференцировки опухоли. Однако с учетом поправки FDR данные значения  $p$  не являются статистически значимыми (табл. 2). Таким образом, клинико-морфологические параметры не оказывали статистически значимого влияния на экспрессию микроРНК в опухолевой ткани гортани. Это позволило анализировать aberrantный паттерн экспрессии микроРНК в общей группе.

Установлено, что для некоторых микроРНК выявлен aberrantный уровень экспрессии в опухолевой ткани относительно прилежащей нормальной ткани пациентов. Показана статистически значимая гиперэкспрессия микроРНК-21, -155 и -205 ( $p=0,00005$ ,  $p=0,00008$  и  $p=0,00085$  соответственно). Частота встречаемости случаев с гиперэкспрессией по этим микроРНК в 2,3–4,8

Таблица 2

**Уровень экспрессии микроРНК в опухоли относительно прилежащей нормальной ткани пациентов в зависимости от клиничко-морфологических параметров**

Параметры	МикроРНК	-18a	-21	-155	-200a	-200c	-205	-221	-494
Распространенность первичной опухоли	T <sub>1+2</sub>	0,20 ± 0,21	0,64 ± 0,27	0,67 ± 0,33	-1,05 ± 0,30	-0,22 ± 0,19	0,50 ± 0,15	-0,70 ± 0,32	-0,29 ± 0,39
	T <sub>3+4</sub>	0,26 ± 0,15	1,27 ± 0,33	0,84 ± 0,17	-0,69 ± 0,36	-0,01 ± 0,30	0,81 ± 0,39	0,06 ± 0,31	0,09 ± 0,33
	p	0,15	0,66	0,45	0,56	0,46	0,09	0,46	0,83
	FDR	58,3	75,2	119,7	74,2	74,1	74,2	91,3	82,9
Лимфогенное метастазирование	N <sub>0</sub>	0,16 ± 0,14	0,85 ± 0,24	0,72 ± 0,21	-0,82 ± 0,28	<b>-0,35 ± 0,20</b>	0,63 ± 0,25	-0,27 ± 0,24	-0,11 ± 0,32
	N <sub>1+2</sub>	0,26 ± 0,23	1,82 ± 0,57	1,04 ± 0,37	-0,82 ± 0,50	<b>0,87 ± 0,46</b>	0,53 ± 0,49	-0,35 ± 0,76	0,04 ± 0,25
	p	0,696	0,123	0,449	0,993	<b>0,018</b>	0,858	0,923	0,717
	FDR	139,2	49,2	119,8	99,3	<b>14,5</b>	114,5	105,5	114,8
Степень дифференцировки опухоли	Низкая	<b>0,29 ± 0,18</b>	0,87 ± 0,68	0,61 ± 0,39	-0,60 ± 0,51	-0,65 ± 0,62	0,37 ± 0,61	0,15 ± 0,11	-1,14 ± 1,05
	Умеренная	<b>0,31 ± 0,15</b>	0,97 ± 0,27	0,74 ± 0,22	-0,91 ± 0,31	-0,1 ± 0,221	0,69 ± 0,28	-0,40 ± 0,31	0,07 ± 0,28
	Высокая	0,68 ± 0,57	0,34 ± 0,68	0,62 ± 0,70	-0,94 ± 0,70	0,19 ± 0,20	0,47 ± 0,38	-0,38 ± 0,30	-0,06 ± 0,53
	p1	<b>0,01</b>	0,89	0,77	0,6	0,41	0,63	0,1	0,27
	FDR, %	<b>12</b>	89,4	88,5	95,9	82,8	84,6	39,7	72,9
	p2	0,14	0,59	0,99	0,7	0,23	0,9	0,14	0,39
	FDR, %	57,6	94,8	99,2	93,7	61,9	102,5	112,8	77,3
	p3	0,53	0,39	0,87	0,97	0,32	0,64	0,97	0,83
FDR, %	141,8	156,9	115,9	97,3	257	127,7	110,7	132,4	

Примечание: p – уровень значимости рассчитан по t-критерию Уэлша; p1 – «низкий» vs «умеренный», p2 – «низкий» vs «высокий», p3 – «умеренный» vs «высокий»; FDR – поправка Бенджамини–Хохберга (FDR – false discovery rate).

Таблица 3

**Уровень экспрессии микроРНК в опухоли относительно прилежащей нормальной ткани**

МикроРНК	Уровень экспрессии	p	FDR	Число случаев с гиперэкспрессией	Число случаев с гипоекспрессией
-18a (n=45)	0,23 ± 0,83	0,071	11,39	27 (61 %)	18 (39 %)
-21 (n=46)	<b>0,98 ± 1,49</b>	<b>0,00005</b>	<b>0,04</b>	<b>38 (83 %)</b>	<b>8 (17 %)</b>
-155 (n=46)	<b>0,76 ± 1,19</b>	0,00008	0,03	34 (74 %)	12 (26 %)
-200a (n=46)	<b>-0,85 ± 1,61</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,22</b>	<b>14 (30 %)</b>	<b>32 (70 %)</b>
-200c (n=46)	-0,11 ± 1,24	0,569	65,05	21 (45 %)	25 (54 %)
-205 (n=44)	<b>0,66 ± 1,43</b>	<b>0,003</b>	<b>0,75</b>	<b>37 (81 %)</b>	<b>9 (19 %)</b>
-221 (n=43)	-0,31 ± 1,48	0,174	23,24	25 (54 %)	21 (46 %)
-494 (n=43)	-0,08 ± 1,64	0,762	76,21	22 (43 %)	26 (56 %)

Примечание: p – уровень значимости рассчитан по t-критерию Стьюдента (t-for single means); FDR – поправка Бенджамини–Хохберга.

раза выше, чем гипоекспрессии. Кроме повышенной экспрессии, для микроРНК-200a отмечается гипоекспрессия (p=0,0008), и частота случаев с гипоекспрессией микроРНК-200a в 4,3 раза выше, чем частота гиперэкспрессии (табл. 3).

Для микроРНК, как и для многих молекулярных регуляторов клетки и организма в целом, характерно образование сложной системы взаимодействий друг с другом [14, 32]. На основе корреляционного анализа была показана такая сеть взаимодействий для изученных микроРНК (рис. 1). Выявлена положительная корреляция для микроРНК-21 и -155 (r=0,31, p=0,00001), микроРНК-200c и -18a (r=0,38, p=0,001), 200c и -205 (r=0,34, p=0,025), -200a и -221 (r=0,35, p=0,021) (рис. 1), а также наблюдается тенденция к положительной корреляции между микроРНК-21 и -200c (r=0,31, p=0,036), однако значение p не удовлетворяет 5 % поправке FDR.

**Обсуждение**

Полученные нами результаты по гиперэкспрессии микроРНК-21, -155 и -205 в опухоли гортани согласуются с данными литературы. J. Ren et al. [29] и P. Cao et al. [5] выявили гиперэкспрессию микроРНК-21 при раке гортани. Результаты по микроРНК-155 при злокачественных опухолях головы и шеи частично соотносятся с данными литературы, имеются отдельные работы, в которых показаны как гиперэкспрессия [6, 16], так и отсутствие значимых изменений ее экспрессии в опухолевой ткани [5]. В целом данные относительно экспрессии микроРНК-205 при раке гортани противоречивы. P. Cao et al. [5] выявили значимую гиперэкспрессию микроРНК-205, однако L. Tian et al. [30] в исследованиях in vitro (культура Нер-2 клеток) и in vivo (n=30) обнаружили гипоекспрессию этой микроРНК при раке гортани, что авторы

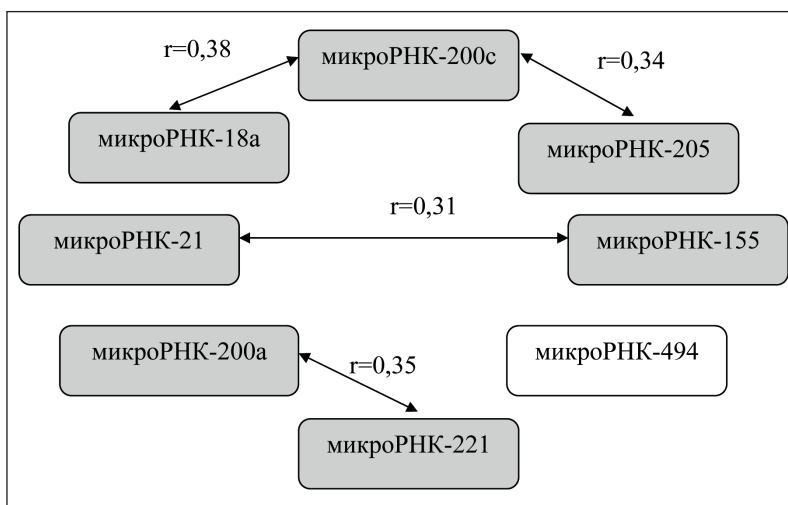


Рис. 1. Корреляционные связи между показателями экспрессии изучаемых микроРНК в опухолевой ткани у больных РГ

объясняют возможными влияниями выбора гистотипов опухоли, ее подтипов, микроокружения и регуляции генов-мишеней. Результаты исследования и данные литературы позволяют предполагать, что микроРНК-21, -155 и -205 играют онкогенную роль при опухолях гортани, и повышение их экспрессии связано с регуляцией различных процессов, задействованных в канцерогенезе.

Онкогенную функцию этих микроРНК подтверждает список генов-мишеней, экспрессию которых регулируют данные микроРНК. В настоящее время для микроРНК-21 валидированы следующие мишени: PDCD4 (programmed cell death protein 4), RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with kazal motifs), maspin (mammary serine protease inhibitor), NFIB (nuclear factor I), TPM1 (Tropomyosin 1), SPRY2 (Sprouty2), PTEN (phosphatase and tensin homologue), Tap63 (transformation-related protein 63), лиганд Fas, Cdc25a (cyclin-dependent kinases 25), HNRPK (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K). Все перечисленные гены-мишени микроРНК-21 принимают непосредственное участие в трансформации клеток [15, 20].

МикроРНК-155 принимает участие в регуляции нескольких ключевых процессов канцерогенеза через ингибирование генов-мишеней, задействованных в TGF- $\beta$ /Smad-индуцированном эпителиально-мезенхимальном переходе, гликолизе, JNK2/STAT3 пути, NF- $\kappa$ B и АКТ путях. Представлены убедительные доказательства того, что мишенями этой микроРНК являются: FOXO3a (Forkhead box O3), C/EBP $\beta$  (CCAAT-enhancer-binding proteins), которая, в свою очередь, активирует экспрессию hexokinase 2, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription), действие которого проявляется через репрессию гена SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), CDC73 (Cell division cycle 73) и ряд других [7].

Относительно микроРНК-205 отмечается ее дуалистическая роль в канцерогенезе. Онкосуп-

прессорную роль микроРНК-205 осуществляет путем подавления пролиферации при ЗНО, репрессируя экспрессию таких генов-мишеней, как ErbB3 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3), E2F1 (Transcription factor E2F1) и гены MAPK- и AR-сигнальных путей, PKC $\epsilon$  (Protein kinase C epsilon type), ZEB1/2, MMP2 и MMP9, VEGF-A (Vascular endothelial growth factor). Имеются сообщения, свидетельствующие и об онкогенной роли микроРНК-205, которая участвует в малигнизации, прогрессии опухоли и развитии устойчивости к противоопухолевой терапии, репрессируя гены PTEN, CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) и CTGF (connective tissue growth factor), SHIP2 (enzyme phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase), DHFR (Dihydrofolate reductase) [28].

Наши результаты относительно гипоекспрессии микроРНК-200а при раке гортани согласуются и дополняют полученные ранее данные других авторов, которые показали онкосупрессорную роль этой микроРНК в канцерогенезе опухолей разных локализаций [13]. Для микроРНК-200а валидированы такие гены-мишени, как: ZEB1 и 2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1 и 2) [25], ERFFI-1 (ERBB receptor feedback inhibitor 1) [1], CTNNB1 (cadherin-associated protein) [22] и ряд других. Эти данные позволили заключить, что микроРНК-200а играет ключевую роль в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа [4, 19].

Результаты корреляционного анализа могут свидетельствовать о наличии связи между этими микроРНК, в основе которой лежит их вовлеченность в процессы внутриклеточной регуляции общих генов-мишеней. Такие гены-мишени найдены для всех связанных пар. МикроРНК-21 и -155 объединяет в первую очередь их взаимодействие с сигнальным белком и активатором транскрипции STAT3 [21]. На микроРНК-18а и -200с оказывает

влияние репрограммирующий фактор с-Мус [10]. МикроРНК-200с и -205 играют определенную роль в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа посредством регуляции экспрессии генов ZEB1 и ZEB2 [13]. Пары микроРНК-221 и 200а могут быть связаны через ген p27Kip1, который играет существенную роль в регуляции перехода от G1 к S-фазе клеточного цикла [11].

### Заключение

Таким образом, установлены гиперэкспрессия онкогенных микроРНК-21, -155, 205 и гипоек-

спрессия онкосупрессорной микроРНК-200а в опухолевой ткани гортани пациентов с первичным диагнозом рака гортани, что согласуется с данными литературы, полученными для этих микроРНК на примере других локализаций. Эти данные позволяют предположить значительную роль микроРНК-21, -155, -200а и -205 в канцерогенезе опухолей гортани, что, вероятно, связано с их участием в регуляции многих генов-мишеней и клеточных процессов, задействованных в малигнизации.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Adam L., Zhong M., Choi W., Qi W., Nicoloso M., Arora A., Calin G., Wang H., Siefker-Radtke A., McConkey D. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy // Clin. Cancer Res. 2009. Vol. 15 (16). P. 5060–5072. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2245.
2. Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. 2004. Vol. 431. (7006). P. 350–355.
3. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // Cell. 2004. Vol. 116 (2). P. 281–297.
4. Bracken C.P., Gregory P.A., Kolesnikoff N., Bert A.G., Wang J., Shannon M.F., Goodall G.J. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition // Cancer Res. 2008. Vol. 68, № 19. P. 7846–7854. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1942.
5. Cao P., Zhou L., Zhang J., Zheng F., Wang H., Ma D., Tian J. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma // Head Neck. 2013. Vol. 35 (5). P. 720–728. doi: 10.1002/hed.23011.
6. Chang S.S., Jiang W.W., Smith I., Poeta L.M., Begum S., Glazer C., Shan S., Westra W., Sidransky D., Califano J.A. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma // Intern. J. Cancer. 2008. Vol. 123 (12). P. 2791–2797. doi: 10.1002/ijc.23831.
7. Chen Z., Ma T., Huang C., Hu T., Li J. The Pivotal Role of microRNA-155 in the Control of Cancer // Journal of Cellular Physiology. 2014. Vol. 229 (5). P. 545–550. doi: 10.1002/jcp.24492.
8. Chu E.A., Kim Y.J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up // Otolaryngol. Clin. North Am. 2008. Vol. 41 (4). P. 673–695. doi: 10.1016/j.otc.2008.01.016.
9. Cochrane D.R., Howe E.N., Spoelstra N.S., Richer J.K. Loss of miR-200c: a marker of aggressiveness and chemoresistance in female reproductive cancers // J. Oncol. 2009. Vol. 2010: 821717. doi: 10.1155/2010/821717.
10. Concepcion C.P., Bonetti C., Ventura A. The miR-17-92 family of microRNA clusters in development and disease // Cancer J. 2012. Vol. 18 (3). P. 262–267. doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b60a.
11. Di Martino M.T., Gullà A., Cantafio M.E.G., Lionetti M., Leone E., Amodio N., Guzzi P.H., Foresta U., Conforti F., Cannataro M. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma // Oncotarget. 2013. Vol. 4 (2). P. 242–255.
12. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer // Nature Rev. Cancer. 2006. Vol. 6 (4). P. 259–269.
13. Feng X., Wang Z., Fillmore R., Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer // Cancer Lett. 2014. Vol. 344 (2). P. 166–173. doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.004.
14. Gurtan A.M., Sharp P.A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks // J. Mol. Biol. 2013. Vol. 425 (19). P. 3582–3600. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.007.
15. Hong L., Han Y., Zhang Y., Zhang H., Zhao Q., Wu K., Fan D. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer // Expert Opin. Ther. Targets. 2013. Vol. 17 (9). P. 1073–1080. doi: 10.1517/14728222.2013.819853.
16. Hui A.B., Lenarduzzi M., Krushel T., Waldron L., Pintilie M., Shi W., Perez-Ordóñez B., Jurisica I., O'Sullivan B., Waldron J. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16 (4). P. 1129–1139. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2166.
17. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // EMBO Mol. Med. 2012. Vol. 4 (3). P. 143–159. doi: 10.1002/emmm.201100209.
18. Iyevleva A.G., Kuligina E.S., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Miki Y., Imyanitov E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas // Breast Cancer Res. Treat. 2012. Vol. 131 (3). P. 1049–1059. doi: 10.1007/s10549-011-1845-z.
19. Korpál M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283 (22). P. 14910–14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
20. Krichevsky A.M., Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA // J. Cell. Mol. Med. 2009. Vol. 13 (1). P. 39–53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
21. Löffler D., Brocke-Heidrich K., Pfeifer G., Stocsits C., Hackermüller J., Kretschmar A.K., Burger R., Gramatzki M., Blumert C., Bauer K., Cvijic H., Ullmann A.K., Stadler P.F., Horn F. Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer // Blood. 2007. Vol. 110 (4). P. 1330–1333.
22. Mongroo P.S., Rustgi A.K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition // Cancer Biol. Ther. 2010. Vol. 10 (3). P. 219–222.
23. Nikitina E., Urazova L., Stegny V. MicroRNAs and human cancer // Exp. Oncol. 2012. Vol. 34 (1). P. 2–8.
24. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // Nature. 2005. Vol. 435 (7043). P. 839–843.
25. Park S.-M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 // Genes Dev. 2008. Vol. 22 (7). P. 894–907. doi: 10.1101/gad.1640608.
26. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues // RNA. 2008. Vol. 14 (5). P. 844–852. doi: 10.1261/rna.939908.
27. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29 (9). P. e45–e45.
28. Qin A.-Y., Zhang X.-W., Liu L., Yu J.-P., Li H., Wang S.-Z.E., Ren X.-B., Cao S. MiR-205 in cancer: An angel or a devil? // Eur. J. Cell Biol. 2013. Vol. 92. (2). P. 54–60.
29. Ren J., Zhu D., Liu M., Sun Y., Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of laryngeal squamous cell carcinoma // Eur. J. Cancer. 2010. Vol. 46 (18). P. 3409–3416. doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.047.
30. Tian L., Zhang J., Ge J., Xiao H., Lu J., Fu S., Liu M., Sun Y. MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma // Med. Oncol. 2014. Vol. 31 (1). P. 785. doi: 10.1007/s12032-013-0785-3.
31. Zamore P.D., Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs // Science. 2005. Vol. 309 (5740). P. 1519–1524.
32. Zhou J.-J., Zheng S., Sun L.-F., Zheng L. MicroRNA regulation network in colorectal cancer metastasis // World J. Biol. Chem. 2014. Vol. 5 (3). P. 301. doi: 10.4331/wjbc.v5.i3.301.

Поступила 10.03.15

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Никитина Екатерина Геннадьевна**, м.н.с. лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии, м.н.с. Национального исследовательского Томского государственного университета. Телефон: 8 (3822) 512957. E-mail: ekatarinanikitina@gmail.com. SPIN-код автора в РИНЦ: 5350-0040

**Черемисина Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, руководитель эндоскопического отделения Томского НИИ онкологии. Телефон: 8 (3822) 418091. E-mail: CheremisinaOV@oncology.tomsk.ru. SPIN-код в РИНЦ: 9579-2691

**Бычков Вячеслав Алексеевич**, кандидат медицинских наук, с.н.с. лаборатории онковирусологии Томского НИИ онкологии. Телефон: 8 (3822) 512957. E-mail: va.bych@gmail.com. SPIN-код автора в РИНЦ: 6174-4896

**Кульбакин Денис Евгеньевич**, кандидат медицинских наук, м.н.с. отделения опухолей головы и шеи Томского НИИ онкологии. Телефон: (3822)418062. E-mail: kulbakin\_d@mail.ru. SPIN-код автора в РИНЦ: 3898-9456

**Чойнзонов Евгений Лхаматцренович**, академик РАН, доктор медицинских наук, директор Томского НИИ онкологии. Телефон: (3822)511039. E-mail: nii@oncology.tomsk.ru. SPIN-код автора в РИНЦ: 2240-8730

**Стегний Владимир Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, руководитель кафедры цитологии и генетики Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета. Телефон: 8 (3822) 529752. E-mail: stegnivy@ref.tsu.ru. SPIN-код автора в РИНЦ: 5588-5450

**Литвяков Николай Васильевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией онковирусологии Томского НИИ онкологии, с.н.с. Национального исследовательского Томского государственного университета. Телефон: (3822) 514607. E-mail: nvlitv72@yandex.ru. SPIN-код автора в РИНЦ: 2546-0181

**Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить**

## EXPRESSION MICRORNA IN LARYNX CANCER

**E.G. Nikitina<sup>1,2</sup>, O.V. Cheremisina<sup>1</sup>, V.A. Bychkov<sup>1</sup>, D.E. Kulbakin<sup>1</sup>,  
E.L. Choinzonov<sup>1</sup>, V.N. Stegniy<sup>2</sup>, N.V. Litviakov<sup>1,2</sup>**

Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk<sup>1</sup>, Tomsk State University, Tomsk<sup>2</sup>  
5, Kooperativny str., Tomsk-634009, Russia, e-mail: ekatarinanikitina@gmail.com<sup>1</sup>

## Abstract

MicroRNA are nonprotein-coding small ribonucleic acids controlling gene expression at post-transcriptional level. MicroRNA technically could control 2/3 of human genome. At the present study abnormal expression of microRNA-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221, -494 in malignant tissue of squamous cell larynx carcinoma of 46 patients were studied. There was no statistically significant correlation between microRNA expression and pathological characteristics. Our data showed that oncogenic microRNA-21, -155, -205 were overexpressed as well as oncosuppression microRNA-200a were underexpressed in larynx cancer compared to adjacent normal epithelium.

**Key words:** larynx cancer, microRNA, expression.

## REFERENCES

1. Adam L., Zhong M., Choi W., Qi W., Nicoloso M., Arora A., Calin G., Wang H., Siefker-Radtke A., McConkey D. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy // *Clin. Cancer Res.* 2009. Vol. 15 (16). P. 5060–5072. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2245.
2. Ambros V. The functions of animal microRNAs // *Nature.* 2004. Vol. 431. (7006). P. 350–355.
3. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* 2004. Vol. 116 (2). P. 281–297.
4. Bracken C.P., Gregory P.A., Kolesnikoff N., Bert A.G., Wang J., Shannon M.F., Goodall G.J. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68. № 19. P. 7846–7854. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1942.
5. Cao P., Zhou L., Zhang J., Zheng F., Wang H., Ma D., Tian J. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma // *Head Neck.* 2013. Vol. 35 (5). P. 720–728. doi: 10.1002/hed.23011.
6. Chang S.S., Jiang W.W., Smith I., Poeta L.M., Begum S., Glazer C., Shan S., Westra W., Sidransky D., Califano J.A. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma // *Intern. J. Cancer.* 2008. Vol. 123 (12). P. 2791–2797. doi: 10.1002/ijc.23831.
7. Chen Z., Ma T., Huang C., Hu T., Li J. The Pivotal Role of microRNA-155 in the Control of Cancer // *Journal of Cellular Physiology.* 2014. Vol. 229 (5). P. 545–550. doi: 10.1002/jcp.24492.
8. Chu E.A., Kim Y.J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up // *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2008. Vol. 41 (4). P. 673–695. doi: 10.1016/j.otc.2008.01.016.
9. Cochrane D.R., Howe E.N., Spoelstra N.S., Richer J.K. Loss of miR-200c: a marker of aggressiveness and chemoresistance in female reproductive cancers // *J. Oncol.* 2009. Vol. 2010: 821717. doi: 10.1155/2010/821717.
10. Concepcion C.P., Bonetti C., Ventura A. The miR-17-92 family of microRNA clusters in development and disease // *Cancer J.* 2012. Vol. 18 (3). P. 262–267. doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b60a.
11. Di Martino M.T., Gullà A., Cantafio M.E.G., Lionetti M., Leone E., Amodio N., Guzzi P.H., Foresta U., Conforti F., Cannataro M. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma // *Oncotarget.* 2013. Vol. 4 (2). P. 242–255.
12. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer // *Nature Rev. Cancer.* 2006. Vol. 6 (4). P. 259–269.
13. Feng X., Wang Z., Fillmore R., Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer // *Cancer Lett.* 2014. Vol. 344 (2). P. 166–173. doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.004.
14. Gurtan A.M., Sharp P.A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks // *J. Mol. Biol.* 2013. Vol. 425 (19). P. 3582–3600. doi: 10.1016/j.jmb.2013.03.007.
15. Hong L., Han Y., Zhang Y., Zhang H., Zhao Q., Wu K., Fan D. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2013. Vol. 17 (9) P. 1073–1080. doi: 10.1517/14728222.2013.819853.

16. Hui A.B., Lenarduzzi M., Krushel T., Waldron L., Pintilie M., Shi W., Perez-Ordóñez B., Jurisica I., O'Sullivan B., Waldron J. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16 (4). P. 1129–1139. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2166.
17. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // *EMBO Mol. Med.* 2012. Vol. 4 (3). P. 143–159. doi: 10.1002/emmm.201100209.
18. Iyevleva A.G., Kuligina E.S., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Miki Y., Imyaninov E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 131 (3). P. 1049–1059. doi: 10.1007/s10549-011-1845-z.
19. Korpál M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283 (22). P. 14910–14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
20. Krichevsky A.M., Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA // *J. Cell. Mol. Med.* 2009. Vol. 13 (1). P. 39–53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
21. Löffler D., Brocke-Heidrich K., Pfeifer G., Stocsits C., Hackermüller J., Kretzschmar A.K., Burger R., Gramatzki M., Blumert C., Bauer K., Cvijic H., Ullmann A.K., Stadler P.F., Horn F. Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer // *Blood.* 2007. Vol. 110 (4). P. 1330–1333.
22. Mongroo P.S., Rustgi A.K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition // *Cancer Biol. Ther.* 2010. Vol. 10 (3). P. 219–222.
23. Nikitina E., Urazova L., Stegny V. MicroRNAs and human cancer // *Exp. Oncol.* 2012. Vol. 34 (1). P. 2–8.
24. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // *Nature.* 2005. Vol. 435 (7043). P. 839–843.
25. Park S.-M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 // *Genes Dev.* 2008. Vol. 22 (7). P. 894–907. doi: 10.1101/gad.1640608.
26. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues // *RNA.* 2008. Vol. 14 (5). P. 844–852. doi: 10.1261/rna.939908.
27. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29 (9). P. e45-e45.
28. Qin A.-Y., Zhang X.-W., Liu L., Yu J.-P., Li H., Wang S.-Z.E., Ren X.-B., Cao S. MiR-205 in cancer: An angel or a devil? // *Eur. J. Cell Biol.* 2013. Vol. 92 (2). P. 54–60.
29. Ren J., Zhu D., Liu M., Sun Y., Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of laryngeal squamous cell carcinoma // *Eur. J. Cancer.* 2010. Vol. 46 (18). P. 3409–3416. doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.047.
30. Tian L., Zhang J., Ge J., Xiao H., Lu J., Fu S., Liu M., Sun Y. MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma // *Med. Oncol.* 2014. Vol. 31 (1). P. 785. doi: 10.1007/s12032-013-0785-3.
31. Zamore P.D., Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs // *Science.* 2005. Vol. 309 (5740). P. 1519–1524.
32. Zhou J.-J., Zheng S., Sun L.-F., Zheng L. MicroRNA regulation network in colorectal cancer metastasis // *World J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 5 (3). P. 301. doi: 10.4331/wjbc.v5.i3.301.

ABOUT THE AUTORS

**Nikitina Ekaterina Gennadievna**, M.S., Junior Researcher of the Laboratory of Oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute; Junior Researcher of Tomsk State University. Phone: +7 3822 51-29-57. E-mail: ekatarinanikitina@gmail.com

**Cheremisina Olga Vladimirovna**, MD., DSc, Professor, Head of the Endoscopy Department of Tomsk Cancer Research Institute. Phone: +7 3822 41-80-91. E-mail: CheremisinaOV@oncology.tomsk.ru

**Bychkov Viacheslav Alekseevich**, MD., PhD., Senior Researcher of the Laboratory of Oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute; Junior Researcher of Tomsk State University. Phone: +7 3822 51-29-57. E-mail: va.bykh@gmail.com

**Kulbakin Denis Evgenievich**, MD., PhD., Junior Researcher of the Head and Neck Department, Tomsk Cancer Research Institute; Phone: +7 3822 41-80-62. E-mail: kulbakin\_d@mail.ru

**Choyzonov Evgeny Lhamatsirenovich**, MD., Academician of RAN, Professor, Director of Tomsk Cancer Research Institute; Phone: +7 3822 51-10-39. E-mail: nii@oncology.tomsk.ru

**Stegny Vladimir Nikolaevich**, MD., DSc, Professor, Head of the Cytology and Genetics Department of Biology Institute of Tomsk State University. Phone: +7 3822 52-97-52. E-mail: stegny@ref.tsu.ru

**Litviakov Nikolay Vasilievich**, MD., DSc, Head of the Laboratory of Oncovirology, Tomsk Cancer Research Institute; Senior Researcher of Tomsk State University. Phone: +7 3822 51-46-07. E-mail: nvlitv72@yandex.ru