

Ф.А. Малахов¹, В.В. Максимов², М.В. Пустовалова¹, А.В. Смирнова¹, З. Нофал¹,
В. Сабуров³, А.Н. Осипов¹, Д.В. Кузьмин¹, С.В. Леонов^{1,4}

ОПУХОЛЬ-СУПРЕССИРУЮЩЕЕ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ miR-16-1-3p И miR-16-2-3p НА РАДИОРЕЗИСТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ A549 НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

¹ Институт биофизики будущего, Долгопрудный

² Отдел молекулярной генетики и микробиологии, Институт медицинских исследований, Израиль–Канада,
Медицинский факультет, Еврейский университет, Иерусалим

³ Медицинский исследовательский центр радиологии им. А.Ф. Цыба Минздрава России, Обнинск

⁴ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Контактное лицо: Маргарита Витальевна Пустовалова, e-mail: pu.margo@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Рак легких является основной причиной смертности во всем мире, при этом на немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) приходится 85 % всех случаев рака легких. Комбинированная химиолучевая терапия является одной из опций в лечении пациентов с неоперабельным НМРЛ. Тем не менее, прогноз НМРЛ остается неудовлетворительным из-за развития радио- и химиорезистентности раковых клеток. Целью данной работы являлось изучение влияния повышенной экспрессии miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на клоногенную выживаемость, миграцию и чувствительность к цисплатину чувствительных и резистентных к облучению клеток НМРЛ.

Материал и методы: В данном исследовании мы использовали однократное облучение протонным пучком клеток НМРЛ линии A549 для получения линии выживших радиорезистентных дочерних клеток, получившей название A549IR. Мы сверхэкспрессировали «лидерную» miR-16 и «пассажирские» miR-16-1-3p и miR-16-2-3p в родительских A549 и радиорезистентных клетках A549IR для выяснения их функциональной роли в НМРЛ. Влияние сверхэкспрессии микроРНК на жизнеспособность клеток оценивали с помощью клоногенного анализа, чувствительность к цисплатину анализировали путем определения общей массы выживших клеток с помощью сульфородамина В, а способность клеток к миграции/инвазии анализировали с помощью камер Бойдена.

Результаты: Сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p значительно снижала клоногенный рост и миграционную активность как A549, так и радиорезистентных A549IR клеток НМРЛ по сравнению с их аналогами, имеющими эндогенные уровни экспрессии соответствующих микроРНК. Кроме того, сверхэкспрессия этих микроРНК существенно повышала чувствительность A549 и A549IR клеток к цитотоксическому воздействию, снижая почти в 3 раза концентрацию цисплатина, необходимую для достижения гибели 50 % клеток.

Заключение: Таким образом, повышение экспрессии «пассажирских» miR-16-1-3p и miR-16-2-3p, а также «лидерной» miR-16 оказывает существенное опухоль-супрессирующее и сенситизирующее к действию цисплатина влияние как на родительские, так и на дочерние, резистентные к облучению клетки линии A549 НМРЛ человека.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, химиолучевая терапия, радиорезистентность, метастазирование, инвазивность, miR-16, miR-16-1, miR-16-2

Для цитирования: Малахов Ф.А., Максимов В.В., Пустовалова М.В., Смирнова А.В., Нофал З., Сабуров В., Осипов А.Н., Кузьмин Д.В., Леонов С.В. Опухоль-супрессирующее и антиметастатическое влияние сверхэкспрессии miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на радиорезистентные клетки A549 немелкоклеточного рака легкого // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 2. С. 27–34. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-27-34

P.A. Malakhov¹, V.V. Maximov², M.V. Pustovalova¹, A.V. Smirnova¹, Z. Nofal¹,
V. Saburov³, A.N. Osipov¹, D.V. Kuzmin¹, S.V. Leonov^{1,4}

MiR-16-1-3p and miR-16-2-3p Overexpression Confers Tumor Suppressive and Antimetastatic Properties in Radioresistant A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells

¹ Institute of Future Biophysics, Dolgoprudny, Russia

² Department of Molecular Genetics and Microbiology, Institute of Medical Research, Israel–Canada,
Faculty of Medicine, Hebrew University, Jerusalem, Israel

³ A.F. Tsyb Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia

⁴ Pushchino Scientific Center for Biological Research Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Russia

Contact person: M.V. Pustovalova, e-mail: pu.margo@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: Lung cancer is the leading cause of death worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for 85 % of all lung cancers. Combined chemoradiotherapy is one of options in the treatment of patients with inoperable NSCLC. However, the prognosis of NSCLC remains unsatisfactory due to the development of radio- and chemo-resistance of cancer cells. This study aimed to investigate how

the overexpression of miR-16, miR-16-1-3p, and miR-16-2-3p influences clonogenic survival, migration, and sensitivity to cisplatin in both radiosensitive and radioresistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells.

Material and methods: This study involved the application of single proton beam irradiation to A549 NSCLC cells, resulting in the emergence of a subline of resilient radioresistant daughter cells, designated as A549IR. To explore the functional role of the miR-16, miR-16-1-3p, and miR-16-2-3p in NSCLC, we overexpressed the “leader” miR-16 as well as the “passenger” miR-16-1-3p and miR-16-2-3p strands in both the parental A549 and their radioresistant variant, A549IR cells. The impact of microRNA overexpression on cell viability was evaluated through a clonogenic assay. Additionally, cisplatin sensitivity was measured by calculating the total mass of surviving cells via the sulforhodamine B method. Furthermore, the capacity for cell migration and invasion was investigated using Boyden chambers.

Results: Overexpressing miR-16, miR-16-1-3p, and miR-16-2-3p significantly reduced the ability of A549 and radioresistant A549IR NSCLC cells to survive, clone, migrate, and invade, compared to cells with normal levels of these microRNAs. Moreover, the stable overexpression of these microRNAs markedly enhanced the sensitivity of A549 and A549IR cells to the cytotoxic effects of cisplatin, allowing for a nearly threefold reduction in the concentration needed to achieve 50 % cell death.

Conclusion: An increase in the expression of “passenger” miR-16-1-3p and miR-16-2-3p, as well as the “leader” miR-16, exhibits a robust tumor-suppressive and cisplatin-sensitizing activities in both the radiation-sensitive parental and the radiation-resistant daughter cells in the human NSCLC A549 lineage.

Keywords: non-small cell lung cancer; chemo-radiotherapy; radioresistance; metastasis; invasiveness; miR-16, miR-16-1; miR-16-2

For citation: Malakhov PA, Maximov VV, Pustovalova MV, Smirnova AV, Nofal Z, Saburov V, Osipov AN, Kuzmin DV, Leonov SV. MiR-16-1-3p and miR-16-2-3p Overexpression Confers Tumor Suppressive and Antimetastatic Properties in Radioresistant A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(2):27–34. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-27-34

Введение

Рак легких является основной причиной смертности от онкологических заболеваний во всем мире, при этом немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 85 % всех диагностированных случаев рака легких [1]. Цисплатин-содержащая химиолучевая терапия является стандартным подходом в лечении больных НМРЛ. Тем не менее, устойчивость к лучевой и химиотерапии остается существенным препятствием для эффективного лечения различных видов рака, включая НМРЛ. Врожденная устойчивость раковых клеток к лучевой и химиотерапии обычно связана с измененными паттернами экспрессии генов, которые способствуют повышению репарации повреждений ДНК, приобретению фенотипа так называемого «стресс-индуцированного преждевременного старения» (СИПС) и эпителиально-мезенхимальному переходу [2]. В этом контексте экспрессия определенных микроРНК – важнейших регуляторов экспрессии генов – может быть изменена, что существенно влияет на реакцию раковых клеток на лучевую и химиотерапию.

МикроРНК (miRs) представляют собой малые молекулы РНК длиной 16–27 нуклеотидов. В первую очередь они контролируют экспрессию белок-кодирующих генов путем подавления и деградации транскриптов мРНК на трансляционном уровне [3]. Гены микроРНК в основном транскрибируются ДНК-зависимой РНК-полимеразой II и иногда ДНК-зависимой РНК-полимеразой III. Первичные транскрипты (при-микроРНК) подвергаются дальнейшей обработке микропроцессорным комплексом с образованием предшественников микроРНК (пре-микроРНК) со структурой шпильки в виде створчатой петли, которые затем экспортируются из ядра [4].

В цитоплазме РНКазы III Dicer расщепляет пре-микроРНК на дуплексы микроРНК. Канонически одна цепь дуплекса микроРНК связывается с белками аргонавта, загруженными в микроРНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (miRISC), и направляет miRISC к целевым мРНК. Эта цепь называется «лидерной» или «направляющей». Другая цепь обычно деградирует и представлена в клетке на гораздо более низком уровне. Эта цепь называется «пассажирской» или «звездочной», обозначается как miR* и обычно привлекает меньше внимания [5].

Многие микроРНК проявляют опухоль-супрессивные характеристики, и нарушение их регуляции может

спровоцировать начало рака [6]. Среди них miR-16 была первой микроРНК, предположительно участвующей в онкогенезе. Делеция кодирующих miR-16 генетических локусов miR-15a/miR-16-1, либо miR-15b/miR-16-2 приводила к развитию лейкоза и лимфомы [7–9]. Эти данные свидетельствуют о том, что miR-16 и/или другие микроРНК, которые кодируются этими генетическими локусами, действительно являются супрессорами опухолей при злокачественных новообразованиях кроветворения. В дополнение к идентичной лидерной цепи miR-16, локусы miR-16-1 и miR-16-2 кодируют две разные «пассажирские» цепи: miR-16-1* (miR-16-1-3p) и miR-16-2* (miR-16-2-3p). Наши недавние исследования показали, что miR-16-1* и miR-16-2*, наряду с miR-16, проявляют значительные опухолевые и антиметастатические свойства в клетках остеосаркомы человека [10]. Это открытие подчеркивает решающую роль, которую «пассажирские» цепи играют в процессе канцерогенеза. Последние данные свидетельствуют о важности miR-16 в подавлении роста и повышении радиочувствительности при НМРЛ [11]. Тем не менее, роль «пассажирских» miR-16-1-3p и miR-16-2-3p в радиорезистентности НМРЛ до сих пор недостаточно изучена.

Данное исследование было направлено на изучение того, как сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p влияет на клоногенную выживаемость, миграцию и восприимчивость к цисплатине как исходных, так и радиорезистентных клеток A549 НМРЛ человека. Наши результаты впервые показывают, что повышенные уровни экспрессии «пассажирских» miR-16-1-3p и miR-16-2-3p, а также «лидерной» miR-16 оказывают мощный опухоль-супрессирующий эффект в этих клетках. Это повышение экспрессии микроРНК также sensibilizes к действию цисплатины как родительские, так и радиационно-устойчивые дочерние клетки в линии A549 НМРЛ человека.

Материал и методы

Клеточные линии и условия их культивирования

Клетки A549 и HEK293T, полученные из American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) культивировались в среде DMEM, обогащенной 10 % инактивированной при нагревании эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), L-глутамином, 100 ЕД/мл пенициллина

и 100 мкг/мл стрептомицина в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂).

Облучение

Для создания радиорезистентной сублинии A549 клетки облучались на российском ускорителе протонов «Прометей» Медицинского радиологического научно-го центра им. А.Ф. Цыба (МРНЦ, Обнинск, Россия). Облучение проводили на середине модифицированного пика Брэгга (МПБ, SOBP, ширина 15 мм) для моделирования клинического состояния, со значениями дозы 6 Гр с размером поля 70 × 83 мм (диапазон энергий 94,40 – 105,30 МэВ, ЛПЭ 5,2 кэВ/мкм). Матрасы с клеточными культурами облучали в вертикальном положении лицом к выходу коллимированного пучка путем подачи отдельных импульсов, чтобы полностью покрыть поверхность флакона. Матрасы размещались на специальном пластиковом оборудовании на опорной глубине в центре поля с помощью лазерного наведения. Глубинные профили дозы и дозиметрическую калибровку проводили на водяном фантоме PTW MP3-P Water tank с использованием плоскопараллельной ионизационной камеры Advanced Markus Chamber Type 34045 (SE 002617) (PTW, Германия). Дозиметрическая система была откалибрована в эталонных условиях [Absorbed dose determination in external beam radiotherapy an international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water technical reports series no. 398. International Atomic Energy Agency Vienna 2000; ISBN:92-0-102200-X].

Получение клеточных линий со сверхэкспрессией микроРНК. Плазмиды

Лентивирусный вектор PLKO.3G был получен в подарок от Кристофа Бенуа и Дианы Матис (Addgene plasmid #14748; <http://n2t.net/addgene:14748>; РРИД: Addgene 14748). Упаковывающие лентивирусы плазмиды pLP1, pVSVG и pLP2 были получены от компании Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, США). Лентивирусные конструкции PLKO.3G-miR-16, PLKO.3G-miR-16-1*, PLKO.3G-miR-16-2* и PLKO.3G-Scr miR с репортерным геном EGFP для сверхэкспрессии miR-16, miR-16-1*, miR-16-2* и Scr miR, соответственно, были получены следующим образом: 1) дуплексы (1) miR-16, (2) miR-16-1*, (3) miR-16-2* и (4) Scr miR были получены путем отжига олигонуклеотидов: (1) hsa-miR-16-F и miR-16-R; (2) hsa-miR-16-1*-F и miR-16-1*-R; (3) hsa-miR-16-2*-F и miR-16-2*-R; и (4) shScrambled-F и shScrambled-R, соответственно (см. табл. 1) 2) затем эти дуплексы клонировали в сайты рестрикции Acc36I и EcoRI PLKO.3G, создав лентивирусные конструк-

ции PLKO.3G-miR-16, PLKO.3G-miR-16-1*, PLKO.3G-miR-16-2* и PLKO.3G-Scr miR, соответственно. Точность полученных лентивирусных конструкций проверяли методами ПЦР с праймерами PLKO-Dir и PLKO-Rev и секвенированием по Сэнгеру праймерами PLKO.1 5' и PLKO-Rev. Последовательность Scr miR взята из статьи [12].

Получение лентивирусов и клеточная трансдукция

Лентивирусы получали путем котрансфекции лентивирусного вектора и упаковывающих лентивирус плазмид pLP1, pLP2 и pVSVG в клетках HEK293T с помощью полиэтиленимина (ПЭИ). Культуральную среду с лентивирусами собирали через 72 ч после трансфекции, фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм и хранили при –80 °C. Клетки линий A549 и A549IR трансдуцировали лентивирусами в лунках 6-луночных планшетов. В дальнейшем EGFP-положительные клетки линий A549 и A549IR сортировали с помощью проточного сортировщика клеток BIO-RAD S3e (BIO-RAD, США). В дальнейших экспериментах использовались только отсортированные EGFP-положительные клетки.

Клоногенный анализ

Клетки высевали в количестве 3×10^5 на лунку 6-луночного планшета за 24 ч до облучения на рентгеновской биологической установке РУСТ-M1 (РУБ РУСТ-M1) при напряжении 200 кВ (0,85 Гр/мин, 2×5 мА, фильтр 1,5 мм Al, ОАО «Росэлектроника», Москва, Россия). После облучения клетки высевали на чашки Петри диаметром 10 см с различной плотностью (100, 500, 1000 и 2000 клеток/лунку для доз 0, 2, 4 и 6 Гр, соответственно). Клетки культивировали до образования колоний в течение 14 дней, а затем фиксировали метанолом в течение 15 мин и окрашивали Гимза красителем в течение 15 мин. Колонии (содержащие не менее 50 клеток) подсчитывали вручную, используя фазово-контрастный микроскоп Zeiss Axiovert (Carl Zeiss, Гёттинген, Германия). Данные зависимости доза–ответ получены на основе средних значений трех независимых экспериментов. Эффективность образования колоний (PE) и фракция выживших клеток (SF) были рассчитаны по формуле:

$$PE = \frac{(\text{число колоний})}{(\text{число клеток, засеянных в лунку})} \times 100 \% \quad (1)$$

$$SF = \frac{(\text{число колоний, образовавшихся после облучения})}{(\text{число засеянных клеток} \times PE)} \quad (2).$$

Таблица 1

Перечень олигонуклеотидов, использованных в работе
List of oligonucleotides used in article

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность
miR-16-F	aCCGGTTAGCAGCAGTAAATAATTGGCGCTCGAGCGCAATATTACGTGCTGCTATTTTGG
miR-16-R	AATTCAAAAATAGCAGCAGTAAATAATTGGCGCTCGAGCGCAATATTACGTGCTGCTAAc
hsa-miR-16-1*-F	accggCCAGTATTAAGTGTGCTGCTGActcgagTCAGCAGCACAGTTAATACTGGTtttg
hsa-miR-16-1*-R	aattcaaaaaCCAGTATTAAGTGTGCTGCTGActcgagTCAGCAGCACAGTTAATACTGGc
hsa-miR-16-2*-F	accggCCAATATTACTGTGCTGCTTTAActcgagTAAAGCAGCACAGTAATATTGGTtttg
hsa-miR-16-2*-R	aattcaaaaaCCAATATTACTGTGCTGCTTTAActcgagTAAAGCAGCACAGTAATATTGGc
shScrambled-F	aCCGGTCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG
shScrambled-R	AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGGCGACTTAACCTTAGGAc
PLKO-Dir	tgtggaaggacgaacacc
PLKO-Rev	ttttccctgcactgtacc
LKO.1 5'	GACTATCATATGCTTACCGT

Анализ миграции с использованием камер Бойдена

Для анализа миграции клеток в условиях физического ограниченного пространства клетки подвергали сывороточному голоданию в течение ночи. На следующий день 0,1 мл клеточной среды без сыворотки, содержащей 104 клеток, добавляли в верхнюю камеру 24-луночных трансвелл-вкладышей, имеющих на дне полупроницаемую мембрану (EDM Millipore, Billerica, MA) с порами 8 мкм. В нижнюю камеру добавляли питательную клеточную среду с добавлением 10 % FBS, которая выполняла роль хемоаттрактанта клеток. Клетки инкубировали в камерах в течение 48 ч при 37 °C и 5 % CO₂. После этого верхние камеры извлекали из лунок планшета, среду аккуратно удаляли. С помощью аппликатора с ватным наконечником все немигрировавшие клетки тщательно удаляли с апикальной стороны мембраны верхней камеры-вставки. Мигрировавшие клетки на базальной стороне мембраны верхней камеры-вставки фиксировали, поместив эти вставки на 10–15 мин в лунки 24-луночного планшета, заполненные 1 мл 70 % метанола. После фиксации верхнюю камеру-вставку помещали в пустую лунку, чтобы дать мембране высохнуть. Затем камеру-вставку помещали в лунку с 0,2 % (масс./об.) раствором красителя кристаллического фиолетового и инкубировали в течение 3–5 мин при комнатной температуре. Окрашенные камеры-вставки отмывали 2 раза с помощью фосфатно-солевого буфера, чтобы смыть с мембран остатки кристаллического фиолетового. Мембраны высушивали, поместив камеры-вставки в пустые лунки. Изображения репрезентативных полей зрения с клетками на базальной стороне мембран камер-вставок получали на микроскопе с 20-кратным объективом, оснащенный видеокамерой (Leica DM2000, Leica Microsystems, Германия). Количество мигрировавших клеток определялось путем подсчета клеток, окрашенных фиолетовым цветом, в каждом из 3 репрезентативных полей зрения на каждую камеру-вставку.

Определение цитотоксического эффекта цисплатина окрашиванием сульфородамино В

Клетки высевали в 96-луночные планшеты из расчета 10 тыс. клеток в 100 мкл среды на лунку и оставляли на 24 ч при 37 °C. Цисплатин (Цисплатин-ЛЕНС, ® ООО «Верофарм», Россия), разведенный в полной питательной среде в различных концентрациях, добавляли через 24 ч. Конечные концентрации цисплатина варьировались от 0,25 мкМ до 80 мкМ. Каждая концентрация использовалась, как минимум, в двух повторях. Цитотоксичность оценивали через 48 ч с помощью окрашивания сульфородамино В. Жизнеспособность клеток оценивали по количеству оставшейся в лунках после инкубации с цисплатином клеточной массы, которая стехиометрически пропорциональна количеству экстрагированного из окрашенных клеток красителя сульфородамина В, измеренного на планшетном многолуночном фотометре CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) с использованием значений поглощения света при длине волны 510 нм. Значения IC₅₀ (концентрация, ингибирующая рост клеток на 50 %) определены с помощью регрессионного анализа кривых доза–ответ (значения, выраженные в процентах от оптической плотности контроля) с помощью алгоритмов программного обеспечения GraphPad Prism 8.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента и двустороннего ANOVA с поправкой Tukey для множественных сравнений, с по-

мощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Результаты представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение, полученных в трех независимых экспериментах. Звездочками обозначены уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Результаты

Получение радиорезистентной сублинии клеток A549IR и клоногенный анализ

Клетки A549 в логарифмической фазе роста облучали пучком протонов в дозе 6 Гр и оставляли на 3 недели для восстановления. Необлученные клетки выращивались одновременно в тех же условиях в качестве контроля. Большинство облученных клеток погибло после облучения. Выжившие после облучения клетки, начавшие клоногенный рост, получили название A549IR.

Для подтверждения радиорезистентности клеток A549IR, переживших облучение протонным пучком, был проведен анализ эффективности образования колоний после однократного рентгеновского облучения этих клеток дозами 2, 4 и 6 Гр (рис. 1). Как показано на рис. 1, при воздействии каждой из однократных доз облучения доля выживших клеток A549IR была значительно выше ($p < 0,0001$), чем у родительских клеток, что свидетельствует о наличии у них радиорезистентного фенотипа.

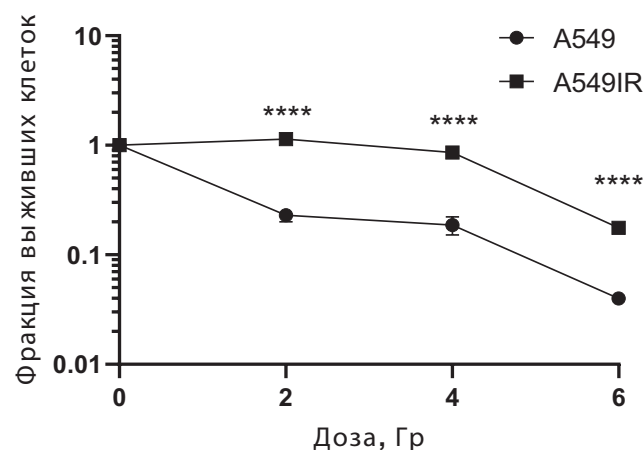


Рис. 1. Фракция родительских A549 и переживших протонное облучение A549IR клеток, выживших после дополнительного однократного рентгеновского облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Величины по оси ординат представляют собой средние значения фракции выживших клеток ± стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов. **** $p < 0,0001$

Fig. 1. Proportion of parental A549 and proton-irradiated A549IR cells that survived additional single X-ray irradiation at doses of 2, 4 and 6 Gy. The values on the y-axis represent the mean values of the proportion of surviving cells ± standard deviation from the results of three independent experiments. **** $p < 0,0001$

Влияние сверхэкспрессии miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p на образование колоний родительскими и радиорезистентными клетками НМРЛ

Для получения линий A549 и A549IR с постоянной сверхэкспрессией одной из четырех выбранных микроРНК клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими соответствующие последовательности микроРНК. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансдуцированные лентивирусом, кодирующим переставленную последовательность человеческой микроРНК (Scr miR). После трансфекции впервые было проанализировано влияние

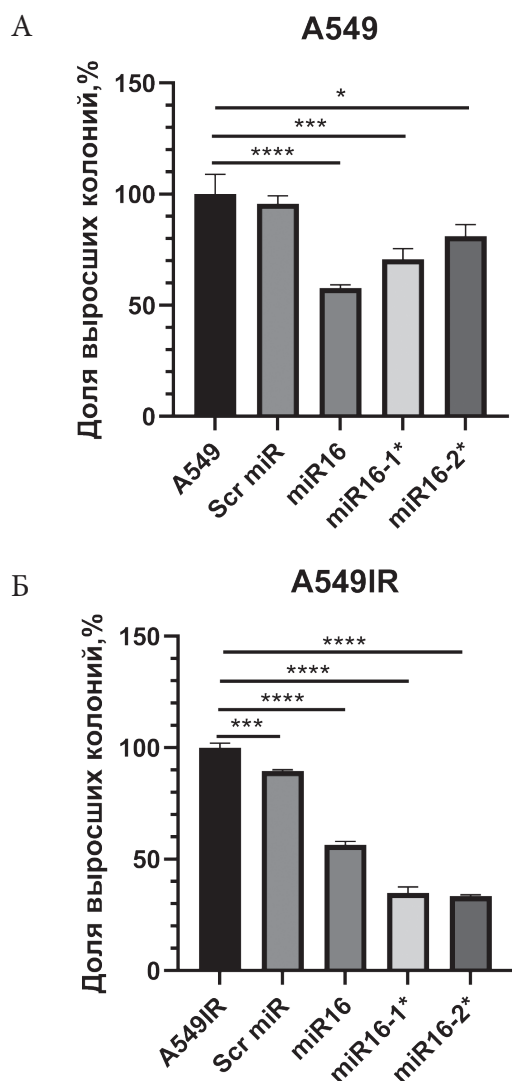


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии miR-16, miR-16-1* (miR-16-1-3p) и miR-16-2* (miR-16-2-3p) человека на эффективность образования колоний клетками НМРЛ. Анализ эффективности образования колоний (представленной по оси ординат) проводили в родительских клетках A549 (А) и радиорезистентных A549IR (Б) в четырех повторях в 10 см чашках Петри для каждого типа клеток. Величины по оси ординат представляют собой средние значения $\pm$ стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов.

* $p < 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,00001$

Fig. 2. Effect of overexpression of human miR-16, miR-16-1* (miR-16-1-3p) and miR-16-2* (miR-16-2-3p) on colony formation efficiency of NSCLC cells. Analysis of colony formation efficiency (represented on the y-axis) was performed in parental A549 (A) and radioresistant A549IR (B) cells in quadruplicate in 10 cm Petri dishes for each cell type.

Values on the y-axis represent means $\pm$ standard deviations from three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.00001$

сверхэкспрессии исследуемых микроРНК на клонированный рост клеток НМРЛ. Результаты анализа свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия любой из этих микроРНК – miR-16, miR-16-1-3p или miR-16-2-3p – резко снижает способность к образованию колоний как в родительских клетках A549, так и в радиорезистентных клетках A549IR (рис. 2а и 2б). Следует отметить, что эффекты сверхэкспрессии miR-16-1-3p, а также miR-16-2-3p на образование колонии клеток A549IR были значительно сильнее, чем на родительские клетки A549 (рис. 2а и 2б). В частности, сверхэкспрессия miR-16-1-3p или miR-16-2-3p снижала способность радиорезистентных клеток образовывать колонии почти на 70 %. Эти данные свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия miR-

16, miR-16-1-3p, а также miR-16-2-3p значительно снижает выживаемость клеток A549, особенно их радиорезистентных потомков.

Сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p снижает миграцию клеток НМРЛ в ограниченном пространстве

Метастатические мигрирующие клетки обладают экстраординарными биофизическими особенностями, в том числе беспрецедентной подвижностью и деформируемостью, что позволяет им маневрировать через пространственные ограничения, налагаемые соседними клетками или внеклеточным матриксом. Поэтому мы провели анализ доли раковых клеток, способных мигрировать в физически ограниченном микропространстве, создаваемом в камерах Бойдена при проведении классического миграционного анализа. В этих камерах инвазивные клетки размером 12–20 мкм могут мигрировать через мембрану с порами размером 8 мкм, следуя при этом вдоль градиента концентрации сыворотки, установленного между верхней и нижней камерами. Количество клеток на внешней стороне камеры Бойдена является показателем их способности к миграции в ограниченном пространстве (рис. 3а). Наши результаты показали, что сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p значительно снижает миграционную активность как родительских, так и радиорезистентных клеток НМРЛ ($p < 0,0001$) (рис. 3б и 3в). Наиболее значимый эффект снижения миграции на 70 % наблюдался при сверхэкспрессии miR-16-2-3p в клетках A549 (рис. 3б), в то время как сверхэкспрессия miR-16-1-3p вызывала тот же эффект и в клетках A549IR (рис. 3в).

Сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p сенситизирует родительские и радиорезистентные клетки A549 к цисплатину

Цисплатин является одним из наиболее широко используемых химиотерапевтических средств для лечения пациентов с НМРЛ. Поэтому мы проанализировали возможное влияние сверхэкспрессии микроРНК на чувствительность родительских и радиорезистентных клеток к цисплатину. Чувствительность к цисплатину оценивали по величине IC50 – концентрации цисплатина, вызывающей гибель 50 % клеток в популяции, подвергшейся воздействию препарата. Мы показали, что сверхэкспрессия любой из этих микроРНК – miR-16, miR-16-1-3p или miR-16-2-3p – резко снижает IC50 как для родительских клеток A549, так и для радиорезистентных A549IR (рис. 4а и 4б, табл. 2). Сверхэкспрессия miR-16, miR-16-1-3p или miR-16-2-3p в клетках A549 снижала концентрацию цисплатина, необходимую для 50 % гибели клеток, в 3, 3,75 и 9,5 раза соответственно (рис. 4а). В то же время, сверхэкспрессия этих же микроРНК в клетках A549IR в равной степени снижала IC50 для цисплатина почти в 3 раза (рис. 4б). В целом, наши результаты свидетельствуют о том, что повышение экспрессии как «лидерной» miR-16, так и «пассажирских» цепей miR-16-1-3p или miR-16-2-3p оказывает сильное сенситизирующее влияние к действию цисплатина на раковые клетки.

Обсуждение

Роль miR-16 в канцерогенезе как супрессора опухолей была ранее подтверждена во многих линиях раковых клеток, животных моделях и клинических образцах, полученных от пациентов с различными злокачественными новообразованиями [13]. Возможные механизмы инактивации miR-16 включают геномные мутации [14], делеции и понижение экспрессии, а также конкурирую-

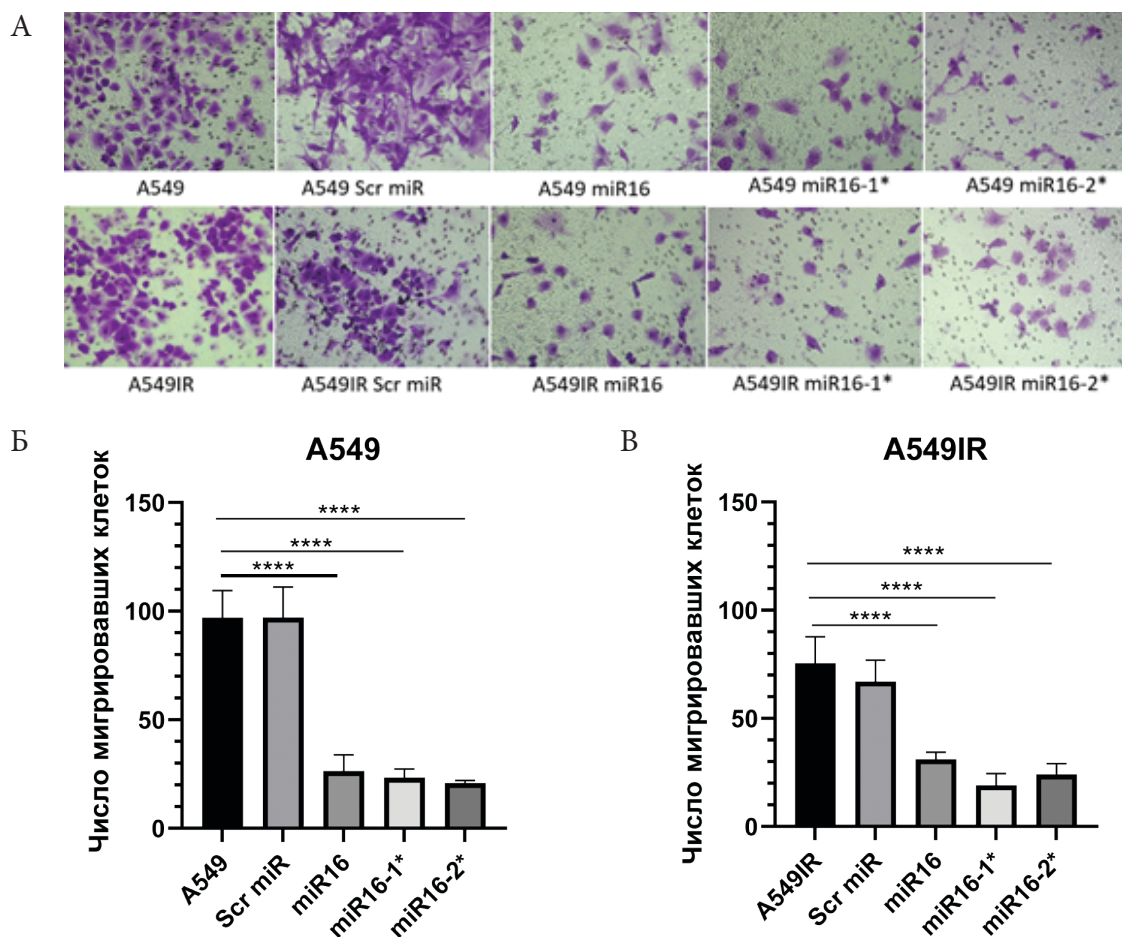


Рис. 3. Способность клеток A549 и A549IR к миграции в ограниченном пространстве вдоль градиента хемоаттрактанта, определенная с помощью камер Бойдена с порами 8 мкм. (А) Репрезентативные изображения мигрировавших клеток на внешней стороне камер Бойдена. Клетки окрашены кристаллическим фиолетовым. (Б) Число мигрировавших клеток по оси ординат представляют собой средние значения $\pm$ стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов. **** $p < 0,0001$

Fig. 3. Migration capacity of A549 and A549IR cells in a confined space along a chemoattractant gradient as determined using Boyden chambers (8 μ m pore size). (A) Representative images of migrated cells on the outside of the Boyden chambers. Cells stained with Giemsa. Scale bar 75 μ m. (B) Y-axis values of migrated cell counts are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. **** $p < 0.0001$

Таблица 2

Значения IC50 для всех типов клеток, экспрессирующих микроРНК
IC50 values for all miRNA-expressing cell types

Клеточная линия	IC50 [M]
A549	0,00002123 (ДИ 95 % от 1,664e-005 до 3,297e-005)
A549 Scr miR	0,00002157 (ДИ 95 % от 1,677e-005 до 3,092e-005)
A549 miR-16	0,000007213 (ДИ 95 % от 2,461e-006 до 0,01297)
A549 miR-16-1-3p	0,000005595 (ДИ 95 % от 1,344e-006 до 9,846e-006)
A549 miR-16-2-3p	0,000002222 (ДИ 95 % от 1,216e-006 до 6,173e-006)
A549IR	0,00002535 (ДИ 95 % от 1,928e-005 до 3,142e-005)
A549IR Scr miR	0,000022 (ДИ 95 % от 1,069e-005 до 0,0005398)
A549IR miR-16	0,000008225 (ДИ 95 % от 6,919e-006 до 9,890e-006)
A549IR miR-16-1-3p	0,000008931 (ДИ 95 % от 3,310e-006 до 0,00001455)
A549IR miR-16-2-3p	0,000008178 (ДИ 95 % от 5,405e-006 до 1,520e-005)

щие эндогенные РНК (кэРНК) – как длинные некодирующие РНК (lncRNA), такие как AGAP2-AS1 и TTN-AS1 [15], так и кольцевые РНК, такие как Circ-CUX1 [16]. Эти кэРНК содержат сайты узнавания miR-16, что приводит к связыванию miR-16 с этими кэРНК и не позво-

ляет miR-16 находить и регулировать экспрессию его мРНК-мишеней.

Восстановление активности miR-16 через его сверхэкспрессию было успешно исследовано в качестве возможного метода лечения рака молочной железы, шейки матки, толстой кишки и легких в ранее проведенных исследованиях [17]. В данном исследовании мы впервые оценили эффект сверхэкспрессии как «лидерной» miR-16, так и «пассажирских» miR-16-1-3p и miR-16-2-3p в радиорезистентных клетках A549 НМРЛ человека. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что сверхэкспрессия этих микроРНК вызывает значительное снижение клоногенного роста, миграции/инвазивности, а также повышение чувствительности к цисплатину как родительских, так и радиорезистентных сублиний клеток A549, что существенно расширяет ранее обнаруженную роль этих микроРНК в радиочувствительности НМРЛ [18]. Активация WEE1 может служить возможным объяснением эффекта сверхэкспрессии, поскольку WEE1 рассматривается как ген-мишень miR-16 в клетках НМРЛ [19]. WEE1 представляет собой тирозинкиназу контрольной точки фазы G2 клеточного цикла, которая проявляет регуляторную функцию в ответ на цисплатин-индуцированное повреждение ДНК. Ингибирование WEE1, в свою очередь, может эффективно аннулировать индуцированный облучением арест кле-

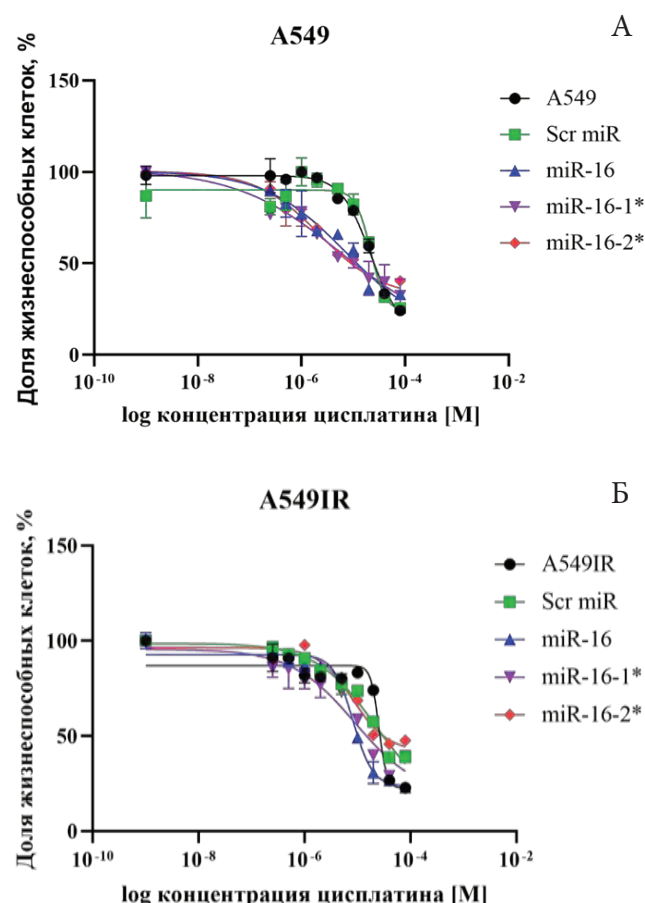


Рис. 4. Анализ чувствительности клеток к цисплатину. Долю жизнеспособных клеток A549 (А) и A549IR (Б) в зависимости от концентрации цисплатина оценивали с помощью теста с сульфородаминем В

Fig. 4. Analysis of cell sensitivity to cisplatin. The proportion of viable A549(A) and A549IR(B) cells as a function of cisplatin concentration was assessed using the sulforhodamine B assay

ток в фазе G2, заставляя клетки с невозстановленными повреждениями перейти в состояние клеточной гибели по механизму митотической катастрофы после облучения. Действительно, активация оси miR-16/WEE1 киназы контрольной точки G2 подавляла жизнеспособность и выживаемость клеток НМРЛ, а также способствовала апоптозу после рентгеновского облучения [18].

Заключение

В данном исследовании мы впервые представили доказательства того, что повышение экспрессии «пасажирских» цепей miR-16-1-3p, а также miR-16-2-3p оказывает опухоль-супрессорное и сенсбилизирующее к химиотерапии действие на радиорезистентные клетки НМРЛ. Более того, их опухоль-супрессорное действие было более сильным, чем действие «лидерной» цепи miR-16. Полученные нами данные существенно дополняют ранее опубликованные данные о роли этих микроРНК в клетках остеосаркомы человека [19]. Идентификация генов-мишеней miR-16-1-3p и miR-16-2-3p является одной из основных задач для наших будущих исследований.

В заключение следует отметить, что согласно последним данным, различные микроРНК могут действовать как радиосенсибилизаторы, так и усилители радиорезистентности, регулируя ответ на повреждение ДНК и сигнальные пути клеточной гибели. Некоторые из них рассматриваются как перспективные терапевтические биомаркеры для прогнозирования радиорезистентности при раке [20]. С клинической точки зрения, наши данные позволяют предположить, что повышение экспрессии miR-16, а также miR-16-1-3p и miR-16-2-3p может стать потенциально эффективным методом подавления опухолевого роста и преодоления резистентности при проведении комбинированной химиолучевой терапии, что призвано существенно повысить эффективность лечения пациентов с неоперабельным НМРЛ. Потенциально, повышение экспрессии miR-16, miR-16-1-3p и miR-16-2-3p, как предполагаемых опухоль-супрессорных микроРНК, может стать терапевтическим показателем эффективности лечения других различных видов рака.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Bray F., Laversanne M., Sung H., et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74:3:229-263. doi:10.3322/caac.21834 PMID: 38572751
- Zhou T., Zhang L.Y., He J.Z., et al. Review: Mechanisms and Perspective Treatment of Radioresistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2023;14:1133899. Published 2023 Feb 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1133899 PMID: 36865554
- Jonas S., Izaurralde E. Towards a Molecular Understanding of MicroRNA-Mediated Gene Silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16:7:421-433. doi:10.1038/nrg3965 PMID: 26077373
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402 PMID: 30123182
- Daugaard I., Hansen T.B. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends Genet.* 2017;33:3:208-219. doi:10.1016/j.tig.2017.01.003 PMID: 28174021
- Peng Y., Croce C.M. The Role of MicroRNAs in Human Cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1:15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4 PMID: 29263891
- Klein U., Lia M., Crespo M., et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17:1:28-40. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.019 PMID: 20060366
- Lovat F., Fassan M., Gasparini P., et al. MiR-15b/16-2 Deletion Promotes B-Cell Malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:37:11636-11641. doi:10.1073/pnas.1514954112 PMID: 26324892
- Lovat F., Fassan M., Sacchi D., et al. Knockout of Both miR-15/16 Loci Induces Acute Myeloid Leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:51:13069-13074. doi:10.1073/pnas.1814980115 PMID: 30478046
- Maximov V.V., Akkawi R., Khawaled S., et al. MiR-16-1-3p and MiR-16-2-3p Possess Strong Tumor Suppressive and Antimetastatic Properties in Osteosarcoma. *Int J Cancer.* 2019;145:11:3052-3063. doi:10.1002/ijc.32368 PMID: 31018244
- Hu H., Chen C., Chen F., Sun N. LINC00152 Knockdown Suppresses Tumorigenesis in Non-Small Cell Lung Cancer Via Sponging MiR-16-5p. *J Thorac Dis.* 2022;14:3:614-624. doi:10.21037/jtd-22-59 PMID: 35399229
- Biton M., Levin A., Slyper M., et al. Epithelial MicroRNAs Regulate Gut Mucosal Immunity Via Epithelium-T Cell Crosstalk. *Nat Immunol.* 2011;12:3:239-246. doi:10.1038/ni.1994 PMID: 21278735
- Chava S., Reynolds C.P., Pathania A.S., et al. MiR-15a-5p, MiR-15b-5p, and MiR-16-5p Inhibit Tumor Progression by Directly Targeting MYCN in Neuroblastoma. *Mol Oncol.* 2020;14:1:180-196. doi:10.1002/1878-0261.12588 PMID: 31637848

14. Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A, et al. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia [Published Correction Appears in N Engl J Med. 2006 Aug 3;355(5):533]. N Engl J Med. 2005;353;17:1793-1801. doi:10.1056/NEJMoa050995 PMID: 16251535
15. Zhou Y., Huang Y., Dai T., et al. LncRNA TTN-AS1 Intensifies Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma by Sponging MiR-16-5p and Upregulation of Cyclin E1. Biomed Pharmacother. 2021;133:111030. doi:10.1016/j.biopha.2020.111030 PMID: 33378944
16. Zhang X., Zhang J., Liu Q., Zhao Y., Zhang W., Yang H. Circ-CUX1 Accelerates the Progression of Neuroblastoma Via MiR-16-5p/DMRT2 Axis. Neurochem Res. 2020;45;12:2840-2855. doi:10.1007/s11064-020-03132-w PMID: 33000435
17. Wang Z., Hu S., Li X., et al. MiR-16-5p Suppresses Breast Cancer Proliferation by Targeting ANLN. BMC Cancer. 2021;21;1:1188. doi:10.1186/s12885-021-08914-1 PMID: 34743685
18. Du R., Jiang F., Yin Y., et al. Knockdown of lncRNA X Inactive Specific Transcript (XIST) Radiosensitizes Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells through Regulation of MiR-16-5p/WEE1 G2 Checkpoint Kinase (WEE1) Axis. Int J Immunopathol Pharmacol. 2021;35:2058738420966087. doi:10.1177/2058738420966087 PMID: 33583218
19. Wang Q., Chen Y., Lu H., et al. Quercetin Radiosensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells through the Regulation of miR-16-5p/WEE1 axis. IUBMB Life. 2020;72;5:1012-1022. doi:10.1002/iub.2242 PMID: 32027086
20. Mohammadi C., Gholamzadeh Khoei S., Fayazi N., Mohammadi Y., Najafi R. MiRNA as Promising Theragnostic Biomarkers for Predicting Radioresistance in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Crit Rev Oncol Hematol. 2021;157:103183. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103183 PMID: 33310279

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (No 23-14-00220).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.12.2024. **Принята к публикации:** 25.01.2025.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was supported by Russian Science Foundation (agreement No 23-14-00220).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.12.2024. **Accepted for publication:** 25.01.2025.