

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60



Диагностическое и прогностическое значение экспрессии длинной некодирующей РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 при раке желудка

Е.А. Ветчинкина¹, А.И. Калинин², Е.Б. Кузнецова^{1,2}, А.Э. Киселева¹, Е.А. Алексева^{1,2},
М.В. Немцова^{1,2}, И.В. Буре¹

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Екатерина Александровна Ветчинкина katevetchinkina@ya.ru

Введение. Рак желудка входит в число наиболее распространенных злокачественных новообразований и занимает одно из лидирующих мест в структуре смертности от онкологических заболеваний во всем мире. Эпигенетические изменения с участием некодирующих РНК (нкРНК), включая микроРНК и длинные нкРНК, вовлечены в его патогенез и прогрессию и могут являться потенциальными диагностическими и прогностическими биомаркерами.

Цель исследования – оценить экспрессию PROX1-AS1 и miR-647 при раке желудка и изучить ее клиническое значение.

Материалы и методы. В исследование включены 62 парных образца опухоли и неопухоловой ткани желудка, а также 5 секционных образцов ткани желудка без патологии. Анализ экспрессии проведен с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Обнаружены достоверные различия экспрессии PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и неопухоловых тканях ($p < 0,001$), полученных от пациентов с раком желудка, относительно секционных тканей желудка без патологии. С помощью коэффициента корреляции Пирсона выявлена отрицательная корреляция между экспрессией PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевых ($p < 0,001$) и неопухоловых ($p < 0,001$) тканях пациентов с раком желудка. Показано, что экспрессия PROX1-AS1 и miR-647 связана с распространенностью первичной опухоли.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить потенциальную прогностическую значимость PROX1-AS1 и miR-647 при раке желудка.

Ключевые слова: некодирующая РНК, длинная некодирующая РНК, микроРНК, рак желудка, эпигенетика, биомаркер

Для цитирования: Ветчинкина Е.А., Калинин А.И., Кузнецова Е.Б. и др. Диагностическое и прогностическое значение экспрессии длинной некодирующей РНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 при раке желудка. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):50–60. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60

Diagnostic and prognostic value of long non-coding RNA PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer

E.A. Vetchinkina¹, A.I. Kalinkin², E.B. Kuznetsova^{1,2}, A.E. Kiseleva¹, E.A. Alekseeva^{1,2}, M.V. Nemtsova^{1,2}, I.V. Bure¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 28 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

²N.P. Bochkov Medical and Genetic Research Center; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Ekaterina Alexandrovna Vetchinkina katevetchinkina@ya.ru

Introduction. Gastric cancer remains one of the most common cancers and has a high mortality rate worldwide. Epigenetic alternations of non-coding RNAs (ncRNAs), including microRNAs and long ncRNAs can contribute to its pathogenesis and progression, and could be potent diagnostic and prognostic biomarkers.

Aim. Estimation of PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer and investigation of its clinical significance.

Materials and methods. Tumor and adjacent normal tissues ($n = 62$), and sectional normal tissue samples ($n = 5$) were included in the study. The expression of the ncRNAs was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction assay.

Results. We have revealed the significant difference in the PROX1-AS1 expression in tumor ($p = 0.002$) and non-tumor tissues ($p < 0.001$) obtained from gastric cancer patients in comparison with sectional gastric tissues without pathology.

Pearson correlation analysis confirmed a negative correlation between PROX1-AS1 and miR-647 in gastric cancer both in tumor ($p < 0,001$) and adjacent normal tissues ($p < 0,001$). Besides, expression of PROX1-AS1 and miR-647 was associated with the size and extent of the primary tumor.

Conclusion. The obtained results allow to suggest a potential prognostic value of PROX1-AS1 and miR-647 in gastric cancer.

Keywords: non-coding RNAs, long noncoding RNA, microRNA, gastric cancer, epigenetics, biomarker

For citation: Vetchinkina E.A., Kalinkin A.I., Kuznetsova E.B. et al. Diagnostic and prognostic value of long non-coding RNA PROX1-AS1 and miR-647 expression in gastric cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):50–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-50-60

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) входит в число наиболее распространенных злокачественных новообразований. Данная патология занимает 5-е место по распространенности среди диагностируемых онкологических заболеваний и 3-е место в структуре смертности от рака во всем мире [1]. Высокая смертность от РЖ обусловлена несвоевременной диагностикой вследствие поздних клинических проявлений, слабой выраженностью и неспецифичностью симптомов, а также недостаточной эффективностью современных методов терапии данной патологии [2].

В настоящее время известно, что к инициации и прогрессированию опухоли могут приводить не только структурные изменения в ДНК, но и эпигенетические факторы [3]. В последние годы показано, что нарушения эпигенетических механизмов, в том числе изменение экспрессии некодирующих РНК (нкРНК), играют значимую роль в канцерогенезе, а также могут служить молекулярными маркерами для ранней диагностики и прогнозирования течения заболевания [4].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) и микроРНК представляют собой функциональные транскрипты, которые регулируют экспрессию генов, связываясь с ними напрямую или воздействуя на другие эпигенетические механизмы, такие как метилирование/деметиличивание ДНК, химические модификации гистоновых белков и ремоделирование хроматина [5, 6]. В результате они участвуют в многочисленных физиологических процессах в норме и при патологии, включая опухолеобразование. Роль днРНК в канцерогенезе определяется их способностью воздействовать на клеточный цикл, блокировать апоптоз, подавлять экспрессию генов-супрессоров и стимулировать онкогены, таким образом способствуя прогрессии опухолей и развитию метастазов [7, 8]. На данный момент участие нкРНК в регуляции генов, ассоциированных с развитием и клиническим течением РЖ, подтверждено рядом работ и продолжает активно изучаться [9–11].

Длинная некодирующая РНК PROX1-AS1 локализуется на хромосоме 1q32.3, транскрибируется с антисмысловой цепи гена *PROX1* и регулирует его экспрессию *in cis*. В нескольких исследованиях было показано, что PROX1-AS1 действует как онкоген, способствуя пролиферации и миграции клеток при РЖ

[12], а также ассоциирован с появлением метастазов и агрессивностью почечноклеточного рака [13].

Изменение экспрессии микроРНК miR-647 было обнаружено во многих опухолях, включая карциному носоглотки [14], гепатоцеллюлярную карциному [15], колоректальный рак [16] и РЖ [17]. Снижение экспрессии miR-647 в сыворотке крови пациентов с РЖ коррелирует с неблагоприятным прогнозом [18].

Возможная взаимосвязь PROX1-AS1 и miR-647 описана в научной литературе [19]. Мы исследовали экспрессию днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с РЖ и в секционных образцах ткани желудка без патологии, а также определили ее связь с клиническими показателями опухолевого роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследовании приняли участие 62 пациента с РЖ (35 мужчин и 27 женщин; средний возраст 62 года (от 36 лет до 81 года)), находившихся на лечении в Клинике факультативной хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Всем больным проведено оперативное лечение. Рак желудка был подтвержден при морфологическом исследовании операционного материала.

Образцы тканей. В исследование включены 62 парных образца опухолевого материала РЖ и морфологически нормальной ткани, а также 5 секционных образцов ткани желудка без патологии. Материал аннотирован с указанием локализации, клинической стадии, гистологического типа по классификации Лорена, наличия/отсутствия перстневидных клеток, метастазов в регионарные лимфатические узлы и отдаленных метастазов, а также стадии по классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM). Свежие образцы замораживали и хранили при температуре -80°C .

Экстракция РНК и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Суммарную РНК, включая микроРНК и днРНК, выделяли из образцов с использованием Trizol (Life Technologies, США) и набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителей с небольшими модификациями. Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на микрообъемном спектрофотометре NanoDrop 2000

(Thermo Fisher Scientific, США). Процесс выделения повторялся для каждого образца до тех пор, пока не было получено достаточное количество РНК для следующих этапов.

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендованным протоколом. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) использовали 300 нг суммарной РНК, выделенной из каждого образца.

Для количественной оценки уровня экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в тканях применяли метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, которую выполняли на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, США) в тройной повторности для каждого транскрипта и контролей с использованием набора MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Ген домашнего хозяйства *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) и малая ядерная РНК RNU6B (RNA, U6 small nuclear 6) были использованы в качестве контролей для PROX1-AS1 и miR-647 соответственно. Последовательности праймеров для анализа экспрессии представлены в табл. 1. Полученные значения C_t были нормализованы относительно контролей и проанализированы с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Таблица 1. Последовательности праймеров

Table 1. Primer sequences

Праймер Primer	Последовательность Sequence
PROX1-AS1_F	5'-CTAGTTAGCAGGGGCAGCAC-3'
PROX1-AS1_R	5'-AACAGAGAGGCGTGGAAGAA-3'
GAPDH_F	5'-CACCCACTCCTCCACCTTTG-3'
GAPDH_R	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
miR-647	5'-TGGCTGCACTCACTTCCTTC-3'
RNU6B	5'-TGC CAAGGATGACACGCAA-3'

Статистический анализ. Статистический анализ был выполнен с использованием платформы Statistical3.1 (StatSoft, США). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Сравнение 2 групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, 3 и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, – с помощью однофакторного дисперсионного анализа, 2 групп по количественному

показателю, распределение которого отличалось от нормального, – с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для сравнения 3 и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, использовали критерий Краскела–Уоллиса.

Направление и тесноту корреляционной связи между 2 количественными показателями оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (при нормальном распределении сопоставляемых показателей). Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с использованием метода линейной регрессии. Для анализа общей выживаемости (ОВ) применяли метод Каплана–Майера. Связь между PROX1-AS1 и miR-647 оценивали с помощью программы RNAhybrid 2.2. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в в опухоли и неопухолевой тканях, полученных от пациентов с раком желудка, и в секционных образцах ткани желудка без патологии. Средний уровень экспрессии PROX1-AS1 в опухоли составил 2,24; в морфологически нормальной ткани пациентов – 2,54; в секционных образцах желудка – 0,06, а средний уровень экспрессии miR-647 – 3,47; 3,64 и 4,16 соответственно.

Обнаружены статистически значимые различия в экспрессии PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и неопухолевых ($p < 0,001$) тканях (рис. 1, а) относительно секционных образцов ткани желудка без патологии (контрольная группа). Для miR-647 результаты оказались статистически незначимыми (рис. 1, б).

Экспрессия днРНК PROX1-AS1 и miR-647 в опухоли и неопухолевой тканях, полученных от пациентов с раком желудка. При исследовании экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в 62 парных образцах опухолевой и прилегающей неопухолевой тканях пациентов с РЖ показано повышение экспрессии PROX1-AS1 в 17 (27 %) и понижение в 32 (52 %) опухолевых образцах. В остальных 13 (21 %) образцах соотношение уровней экспрессии между опухолью и прилегающей неопухолевой тканью находилось в пределах (–1; 1), что говорит об отсутствии значимого изменения экспрессии PROX1-AS1 в этих пробах. Анализ показал, что средний уровень экспрессии PROX1-AS1 в тканях РЖ по сравнению с морфологически нормальными прилежащими тканями статистически не различается ($p = 0,156$) (см. рис. 1, а).

Экспрессия miR-647 была повышена в 25 (40 %) и понижена в 20 (32 %) образцах опухолевой ткани. В 17 (28 %) образцах не выявлено значимого изменения экспрессии. Таким образом, статистически значимого различия среднего уровня экспрессии miR-647 в опухолевых тканях РЖ и прилежащих морфологически нормальных тканях обнаружено не было ($p = 0,692$) (см. рис. 1, б).

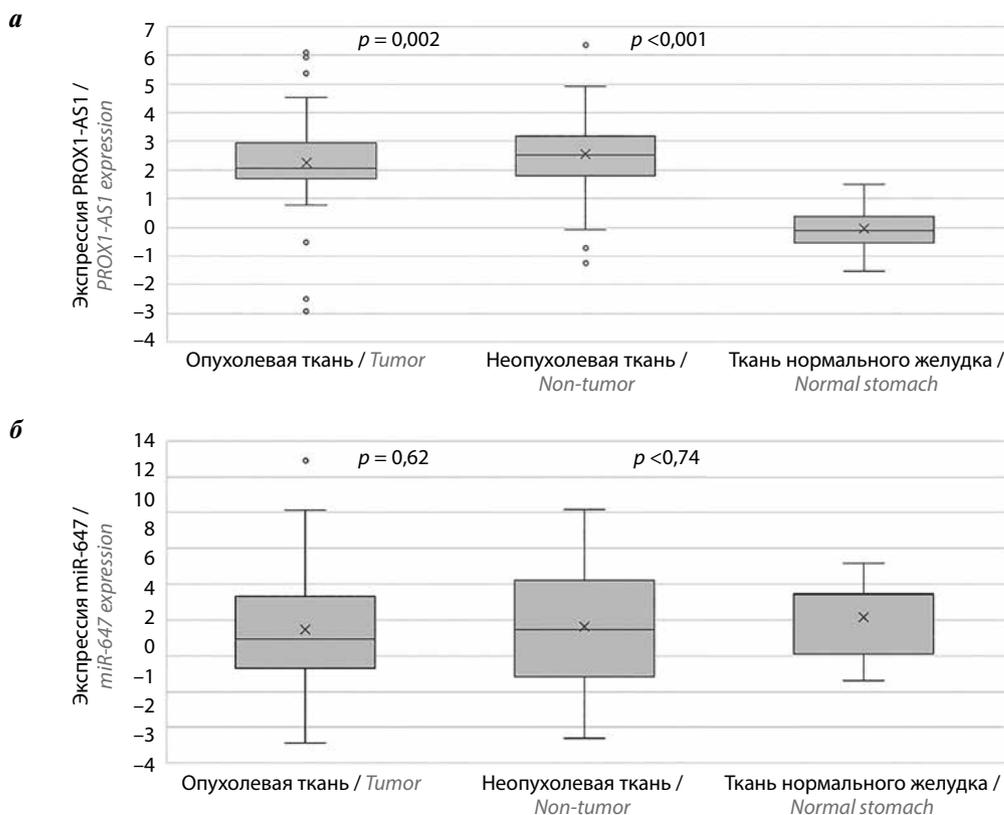


Рис. 1. Уровень экспрессии PROX1-AS1 (а) и miR-647 (б) в опухолевой и прилегающей неопухолевой тканях пациентов с раком желудка относительно секционных образцов ткани желудка без патологии (контрольная группа)
 Fig. 1. The expression level of PROX1-AS1 (a) and miR-647 (б) in tumor and non-tumor adjacent tissues of gastric cancer patients to the stomach tissue of a healthy control group

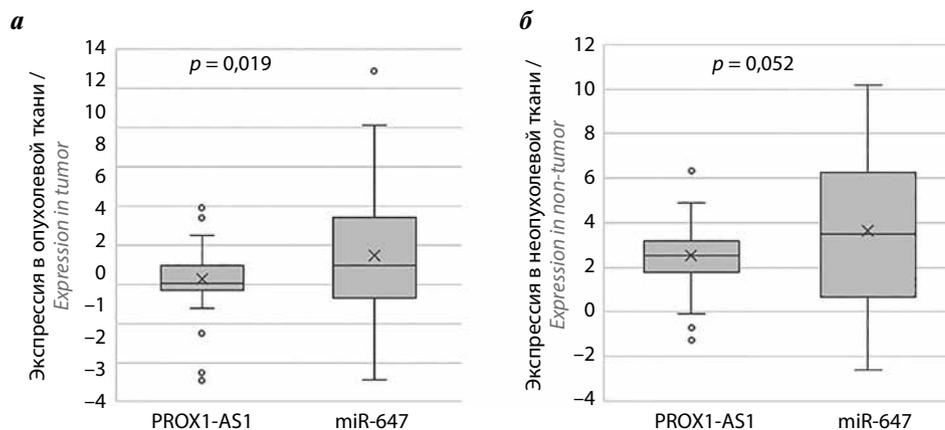


Рис. 2. Уровни экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой (а) и неопухолевой (б) тканях пациентов с раком желудка
 Fig. 2. Expression levels of PROX1-AS1 and miR-647 in tumor tissues (a) and in the non-tumor (б) tissues of gastric cancer patients

Взаимосвязь уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с раком желудка. При сравнении средних уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в тканях пациентов с РЖ обнаружены статистически значимые различия в опухолевой ткани РЖ ($p = 0,019$) (рис. 2, а). Однако при исследовании прилегающей неопухолевой ткани статистически значимые различия в средних уровнях экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 не выявлены ($p = 0,052$) (рис. 2, б).

При сравнении экспрессии по образцам можно проследить общую тенденцию: с возрастанием экспрессии PROX1-AS1 у пациентов отмечается снижение экспрессии miR-647, что также соответствует обратной зависимости (рис. 3).

При проведении корреляционного анализа с использованием коэффициента корреляции Пирсона мы обнаружили заметную отрицательную линейную связь по шкале Чеддока между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухоли $\rho = -0,526$ ($p < 0,001$)

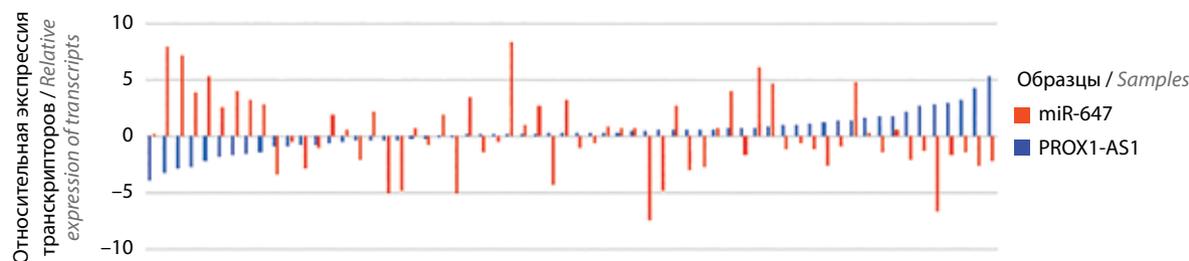


Рис. 3. Корреляция относительной экспрессии miR-647 и PROX1-AS1 у 62 пациентов с раком желудка
Fig. 3. Correlations between the relative expression of miR-647 and PROX1-AS1 in 62 of gastric cancer patients

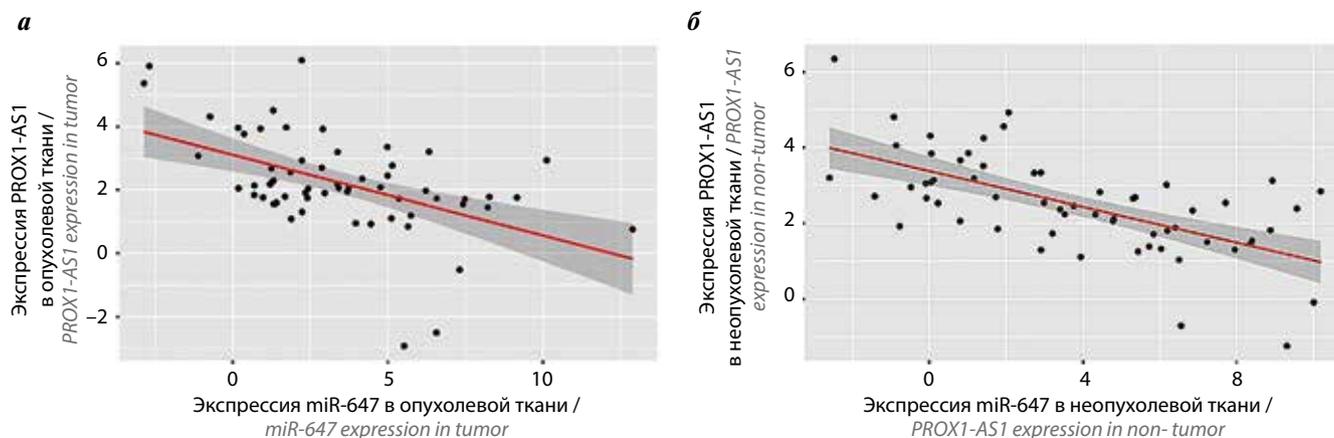


Рис. 4. График регрессионной функции, характеризующий отрицательную зависимость уровня экспрессии PROX1-AS1 от уровня экспрессии miR-647 в опухолевой (а) и прилегающей неопухолевой (б) тканях пациентов с раком желудка
Fig. 4. Linear regression showing the negative correlation between the expression of PROX1-AS1 and miR-647 in tumor (a) and adjacent non-tumor (b) tissue of gastric cancer patients

(рис. 4, а) и прилежащих неопухолевых тканях $\rho = -0,628$ ($p < 0,001$) (рис. 4, б). Полученные данные подтверждают зависимость экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 как в опухолевой, так и в неопухолевой тканях пациентов с РЖ.

Ассоциация экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевой ткани с клинико-патологическими характеристиками пациентов. Для поиска значимых факторов, связанных с клиническим течением РЖ, мы провели анализ ассоциаций между изменением экспрессии miR-647 и PROX1-AS1 и клиническими характеристиками опухолевого роста. При сравнении уровня экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли (Т) были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,014$); в группе Т4 экспрессия PROX1-AS1 была достоверно выше, чем в группе Т1–3 ($p = 0,001$) (рис. 5, а).

При сравнении уровня экспрессии miR-647 в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли также были определены статистически значимые различия ($p = 0,012$); экспрессия в группе Т4 оказалась достоверно ниже, чем в группе Т1–3 ($p = 0,011$) (рис. 5, б).

При сравнении других показателей (пола, 5-летней выживаемости, клинической стадии, гистологического типа опухоли по классификации Лорена, наличия/от-

сутствия перстневидных клеток и отдаленных метастазов) установить статистически значимых различий не удалось. Результаты оценки корреляций представлены в табл. 2. В ходе анализа связи клинических характеристик пациентов с экспрессией PROX1-AS1 и miR-647 в морфологически нормальных тканях значимых ассоциаций выявлено не было.

Ассоциации уровней экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 с выживаемостью пациентов с раком желудка. Для оценки связи между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и ОБ пациентов с РЖ мы использовали метод Каплана–Майера (рис. 6, а). В ходе исследования не было выявлено различий в показателях выживаемости у пациентов с разным уровнем экспрессии транскриптов. На рис. 6 показано, что пациенты с повышенной экспрессией PROX1-AS1 ($T > N$) в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью имеют тенденцию к лучшему прогнозу, чем пациенты с низкой экспрессией PROX1-AS1 ($T < N$) в опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью. Анализ ассоциации уровня экспрессии miR-647 с выживаемостью больных РЖ также не показал статистически значимых результатов (рис. 6, б).

Ассоциации уровней экспрессии PROX1-AS1 с выживаемостью пациентов с раком желудка (по открытым источникам данных). Мы также проанализировали ОБ пациентов с РЖ с помощью метода Каплана–Майера,

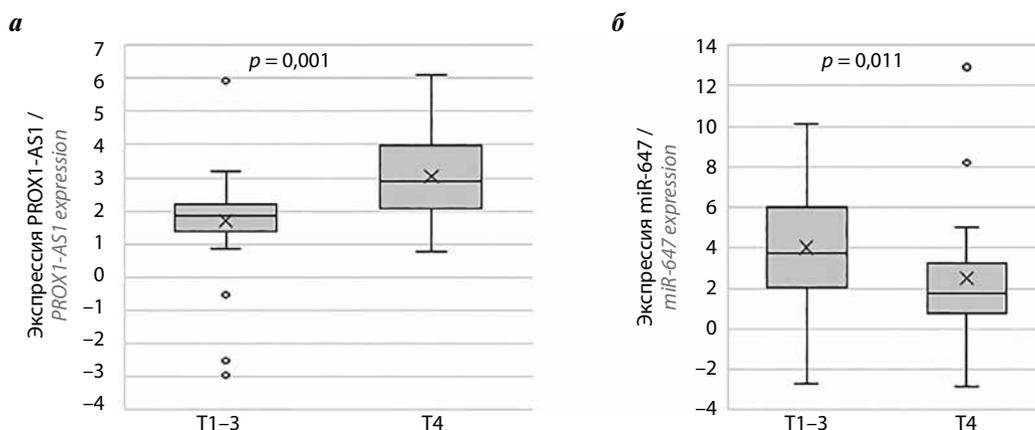


Рис. 5. Экспрессия *PROX1-AS1* (а) и *miR-647* (б) в опухолевой ткани в зависимости от распространенности первичной опухоли у пациентов с раком желудка в группах T1–3 и T4

Fig. 5. Expression of *PROX1-AS1* (a) and *miR-647* (b) in the tumor tissues, depending on the prevalence of the primary tumor in the T1–3 and T4 groups of gastric cancer patients

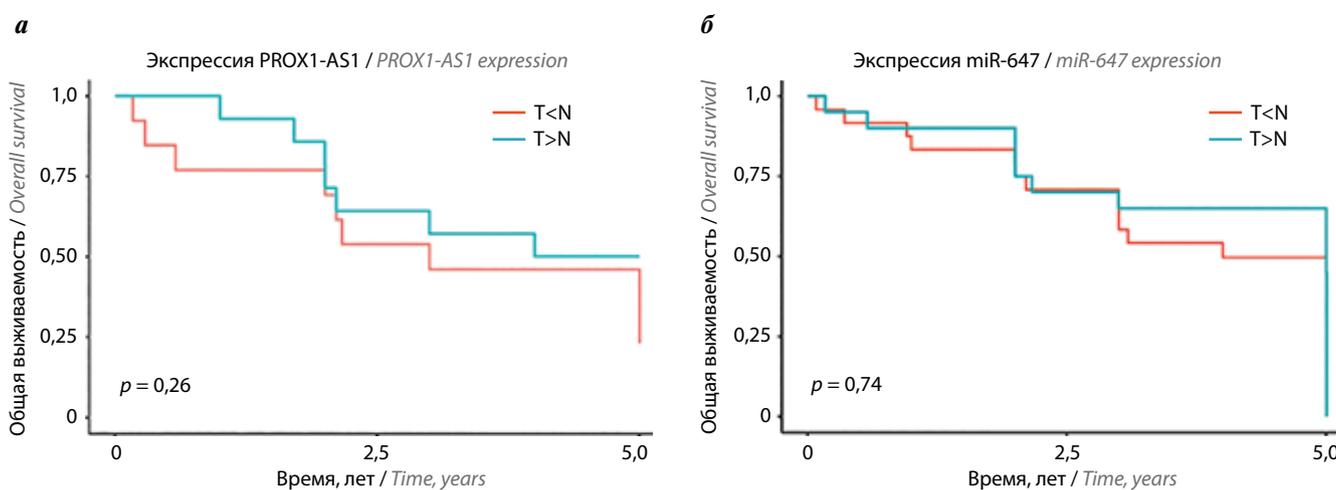


Рис. 6. Кривые Каплана–Мейера, отражающие общую выживаемость пациентов с раком желудка в зависимости от уровня экспрессии *PROX1-AS1* (а) и *miR-647* (б). T – экспрессия в опухолевой ткани, N – экспрессия в неопухолевой ткани

Fig. 6. Kaplan–Meyer overall survival curves of the gastric cancer patients, depending on *PROX1-AS1* (a) and *miR-647* (b) expression. T – expression in tumor, N – expression in non-tumor

используя базы данных LOGpc [20], GEO (gene expression omnibus) [21] и данные под номером GSE57303 [22, 23]. Согласно полученным результатам, пациенты с гиперэкспрессией *PROX1-AS1* в опухоли имеют лучшие показатели выживаемости ($p = 0,002$), чем пациенты с гипоекспрессией и те, у кого не было показано изменения экспрессии *PROX1-AS1* (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время появляется все больше доказательств того, что нкРНК играет большую роль в патогенезе РЖ, а изменение их экспрессии рассматривается как одно из ранних событий онкогенеза. Специфичность и стабильность в биологических жидкостях организма делают нкРНК важными маркерами для неинвазивной диагностики [24]. Для исследования клинического значения нкРНК мы провели количественную оценку уровня экспрессии *PROX1-AS1*

и *miR-647* в опухолевых и прилегающих неопухолевых тканях пациентов с РЖ.

С целью изучения потенциальных молекулярных механизмов, объясняющих роль днРНК *PROX1-AS1* при РЖ, мы оценили ее вклад в развитие ключевых признаков рака с помощью базы данных LncACTdb [25]. Было выявлено, что *PROX1-AS1* участвует в поддержании пролиферативного сигналинга, активации инвазии и метастазирования, блокировании апоптоза, индукции ангиогенеза, а также в уклонении от онко-супрессии (рис. 8).

Предыдущие исследования показали, что *PROX1-AS1* имеет отношение к канцерогенезу и дифференциально экспрессируется во многих типах опухолей. *PROX1-AS1* гиперэкспрессируется и проявляет свою канцерогенную активность при папиллярной карциноме щитовидной железы и почечно-клеточной карциноме [13, 26]. Обнаружено также, что нокдаун *PROX1-AS1*

Таблица 2. Ассоциация экспрессии *PROX1-AS1* и *miR-647* в опухолевой ткани с клинико-патологическими характеристиками пациентов с раком желудка

Table 2. Association of *PROX1-AS1* and *miR-647* expression in gastric cancer tumors with clinical and pathological characteristics of patients

Показатель Parameter	Число пациентов (n = 62) Number of patients (n = 62)	Экспрессия <i>PROX1-AS1</i> <i>PROX1-AS1</i> expression			Экспрессия <i>miR-647</i> <i>miR-647</i> expression		
		Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p	Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p
Пол: Gender:							
мужской male	35	2,32	1,42	0,755	3,50	2,86	0,809
женский female	27	2,14	1,62		3,43	3,27	
Возраст, лет: Age, years:							
<49	9	2,65	1,18	0,436	3,07	3,97	0,562
>50	53	2,17	1,56		3,53	2,87	
T-стадия T-stage:							
T1	13	1,86	0,58	0,014*	3,29	1,82	0,012*
T2	12	1,49	1,41		4,25	2,48	
T3	13	1,73	1,87		4,52	3,47	
T4	24	3,03	1,31		2,53	3,37	
N-стадия: N-stage:							
N0	32	1,83	1,52	0,326	3,73	2,51	0,682
N1	16	2,67	1,40		2,70	3,35	
N2	12	2,91	1,34		3,08	2,84	
N3	2	1,41	0,64		7,66	7,39	
M-стадия: M-stage:							
M0	51	2,13	1,44	0,768	3,73	2,51	0,328
M1	11	2,76	1,73		3,18	3,50	
Стадия: Stage:							
I	19	1,70	1,27	0,246	4,07	2,21	0,566
II	14	1,87	1,66		2,95	2,43	
III	21	2,76	1,14		2,76	2,93	
IV	8	2,80	1,94		4,80	5,13	
Выживаемость: Survival status:							
умер dead	35	2,02	0,86	0,281	3,46	2,51	0,966
жив alive	27	2,41	1,85		3,47	3,39	
Пятилетняя выживаемость Five-year survival rate:							
не достигнута no	29	2,32	1,87	0,693	3,38	2,45	0,832
достигнута yes	33	2,15	0,96		3,54	3,48	
Гистологический тип по классификации Лорена: Histological type according to Loren's classification:							
диффузный diffuse	27	2,39	1,53	0,717	3,41	2,69	0,373
интестинальный intestinal	30	2,19	1,28		3,43	3,53	
недифференцированный not classified	5	1,60	2,25		4,00	2,23	

Показатель Parameter	Число пациентов (n = 62) Number of patients (n = 62)	Экспрессия PROX1-AS1 PROX1-AS1 expression			Экспрессия miR-647 miR-647 expression			
		Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p	Среднее значение Mean	Стандартное отклонение Standard deviation	p	
Наличие перстневидных клеток: Signet ring cells:	да yes	24	2,27	1,61	0,715	3,59	2,78	0,818
	нет no	38	2,23	1,37		3,42	3,22	
Локализация опухоли: Tumor localization:	антральный отдел antral region	15	1,26	1,75	0,335	2,81	2,69	0,564
	кардия cardia	7	2,61	1,35		2,90	2,39	
	культи желудка stomach stump	1	3,20	0		3,69	0,00	
	тело желудка stomach body	39	2,16	0,84		3,07	4,21	

*Статистически значимые различия (p < 0,05).

Примечание. Сравнение 2 групп по количественному показателю выполнялось с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, сравнение 3 и более групп – с помощью непараметрического критерия Краскала–Уоллиса.

*Statistically significant differences (p < 0.05).

Note. The Mann–Whitney non-parametric test was used for comparison of two groups variables, the Kruskal–Wallis non-parametric test was used when comparing three or more groups of variables.

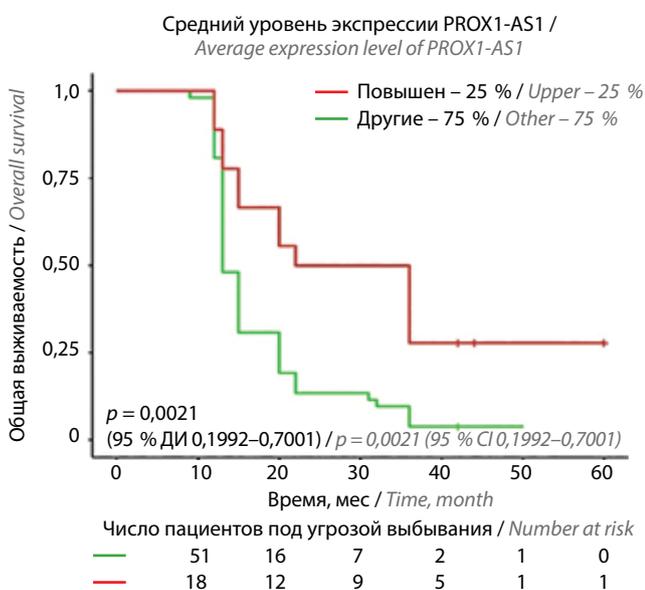


Рис. 7. Кривые Каплана–Майера, отражающие общую выживаемость пациентов с раком желудка в зависимости от уровня экспрессии PROX1-AS1 (на основе анализа данных под номером GSE57303). ДИ – доверительный интервал

Fig. 7. Kaplan–Meyer curves for the overall survival analysis of gastric cancer patients, according to the PROX1-AS1 expression (data from the GSE57303). CI – confidence interval

активирует сигнальные пути, повышая химиочувствительность клеток ретинобластомы [27].



Рис. 8. Вклад PROX1-AS1 в развитие ключевых признаков рака
Fig. 8. Role of PROX1-AS1 in the hallmarks of cancer

В нашем исследовании не удалось выявить достоверной ассоциации между уровнем экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой и неопухолевой тканях пациентов с РЖ (p = 0,156), хотя некоторые авторы ее обнаружили [28]. Однако были определены статистически

значимые различия в экспрессии днРНК PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и прилегающих неопухолевых ($p < 0,001$) тканях относительно секционных образцов ткани желудка без патологии, что позволяет предположить ее потенциальную диагностическую роль при РЖ. Интересно, что различия выявлены не только для опухолевой, но и для прилежащей неопухолевой ткани. Это может быть связано с вовлечением прилегающей ткани в опухолевый процесс и формированием поля канцеризации.

При исследовании связи экспрессии PROX1-AS1 с клиническими характеристиками пациентов мы обнаружили достоверную ассоциацию уровня экспрессии PROX1-AS1 в опухолевой ткани с распространенностью первичной опухоли (Т). Экспрессия PROX1-AS1 в опухолях Т4 была достоверно выше по сравнению с опухолями Т1–3 ($p = 0,001$), что указывает на возможное влияние PROX1-AS1 на прогрессию РЖ. Аналогичные результаты были получены Т. Guo и соавт., которые показали, что активация PROX1-AS1 коррелирует с прогрессирующей патологической стадией РЖ [28]. Однако мы не обнаружили корреляции экспрессии PROX1-AS1 с другими клиническими характеристиками пациентов (полом, возрастом, показателями N и M классификации злокачественных опухолей TNM, клинической стадией, 5-летней выживаемостью, гистологическим типом по классификации Лорена, анатомической локализацией опухоли).

При оценке ОВ с помощью метода Каплана–Мейера не было выявлено достоверных различий выживаемости у пациентов с разным уровнем экспрессии PROX1-AS1 (см. рис. 6). Однако на основе сведений, представленных в открытом источнике данных GEO и базе данных LOGsc, мы показали, что пациенты с гиперэкспрессией PROX1-AS1 в опухоли имеют лучшие показатели выживаемости (см. рис. 7). Отсутствие достоверных различий в показателях выживаемости в нашем исследовании может быть связано с небольшой выборкой, включающей всего 62 пациента с РЖ. Ее увеличение, вероятно, позволит получить статистически значимые результаты.

В ряде исследований miR-647 была описана как супрессорная микроРНК. Повышение ее экспрессии ассоциировано с ингибированием пролиферации, образованием колоний и блокированием инвазии клеток глиомы [29]. При немелкоклеточном раке легкого miR-647 подавляет пролиферацию клеток за счет остановки клеточного цикла и задержки перехода G1/S [30]. Пациенты с раком мочевого пузыря, имеющие высокий уровень экспрессии miR-647, демонстрировали лучшую выживаемость по сравнению с пациентами с низкой экспрессией микроРНК [31]. Однако в других типах опухолей miR-647 может, напротив, способствовать канцерогенезу. Ее гиперэкспрессия при колоректальном раке стимулирует пролиферацию и миграцию клеток [16]. Таким образом, свойства miR-647 могут меняться в зависимости от типа ткани

и опухоли, что требует более тщательного изучения этой микроРНК. В нашем исследовании показано достоверное снижение уровня экспрессии miR-647 в опухолевой ткани РЖ в группе опухолей Т4 по сравнению с группой опухолей Т1–Т3 ($p = 0,012$), что согласуется с данными о корреляции сниженного уровня экспрессии miR-647 при РЖ с большим размером опухоли и наличием метастазирования [32]. Мы не обнаружили достоверной статистической связи экспрессии miR-647 с другими клиническими характеристиками пациентов, хотя в некоторых исследованиях экспрессия miR-647 значительно изменяется при метастазах РЖ в лимфатических узлах [33]. У пациентов с РЖ при агрессивном клиническом течении заболевания и низких показателях выживаемости экспрессия miR-647 в сыворотке была значительно ниже, чем у пациентов с благоприятным прогнозом [18].

В последнее время широко исследуется взаимодействие PROX1-AS1 и различных микроРНК, которые могут регулироваться этой днРНК. Так, например, было показано, что PROX1-AS1 регулирует miR-1305 при раке легких. Нокдаун PROX1-AS1 приводит к гиперэкспрессии miR-1305, в результате миграция и способность к инвазии клеток рака легкого значительно снижаются [34].

Мы обнаружили отрицательную связь между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 как в опухоли, так и в прилежащих морфологически нормальных тканях. Эти данные подтверждают предположение, что PROX1-AS1 связывает miR-647 и играет роль молекулярной губки, способствуя прогрессированию опухоли и повышению ее агрессивности [19]. Мы оценили связь между уровнем экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 через их последовательности с использованием программы RNAhybrid 2.2. Была определена отрицательная энергия Гиббса ($-25,3$ ккал/моль), что может свидетельствовать об обратной взаиморегуляции PROX1-AS1 и miR-647.

Полученные нами данные позволяют прояснить роль PROX1-AS1 и miR-647 в канцерогенезе желудка. Хотя остается много неясного, исследование экспрессии этих нкРНК дает возможность определить их связь с клиническим течением РЖ и рассматривать как потенциальные прогностические маркеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показана обратная корреляция между днРНК PROX1-AS1 и микроРНК miR-647 как в опухолевой ткани, так и в прилежащих неопухолевых тканях пациентов с РЖ. Обнаружены статистически значимые различия экспрессии PROX1-AS1 в этих тканях по сравнению с экспрессией в секционных образцах ткани желудка без патологии, что позволяет предположить ее связь с развитием опухоли. При распространении первичной опухоли уровень экспрессии PROX1-AS1 повышается в тканях РЖ достоверно, в то время как уровень

экспрессии miR-647 заметно снижается. Полученные данные позволяют предположить потенциальную про-

гностическую значимость PROX1-AS1 и miR-647 при РЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J Clin* 2021;71(3): 209–49. DOI: 10.3322/CAAC.21660
- Necula L., Matei L., Dragu D. et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2019;25(17):2029–44. DOI: 10.3748/WJG.V25.I17.2029
- Fattani S., Nikbakhsh N., Taheri H. et al. Prevalence of multiple infections and the risk of gastric adenocarcinoma development at earlier age. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;92(1):62–8. DOI: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2018.04.015
- Zhou Z., Lin Z., Pang X. et al. Epigenetic regulation of long non-coding rnas in gastric cancer. *Oncotarget* 2018;9(27):19443. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.23821
- Shi X., Sun M., Liu H. et al. Long non-coding rnas: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett* 2013;339(2):159–66. DOI: 10.1016/J.CANLET.2013.06.013
- Ling H., Fabbri M., Calin G.A. MicroRNAs and other non-coding rnas as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847–65. DOI: 10.1038/NRD4140
- Rafiee A., Riazi-Rad F., Havaskary M. et al. Long noncoding RNAs: regulation, function and cancer. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2018;34(2):153–80. DOI: 10.1080/02648725.2018.1471566
- Rawlings-Goss R.A., Campbell M.C., Tishkoff S.A. Global population-specific variation in MiRNA associated with cancer risk and clinical biomarkers. *BMC Med Genomics* 2014;7(1):53. DOI: 10.1186/1755-8794-7-53
- Xie S.S., Jin J., Xu X. et al. Emerging roles of non-coding RNAs in gastric cancer: pathogenesis and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2016;22(3):1213–23. DOI: 10.3748/WJG.V22.I3.1213
- Yang F., Bi J., Xue X. et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 2012;279(17):3159–65. DOI: 10.1111/J.1742-4658.2012.08694.X
- Sun M., Xia R., Jin F. et al. Downregulated long noncoding RNA MEG3 Is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumour Biol* 2014;35(2):1065–73. DOI: 10.1007/S13277-013-1142-Z
- Jiang W., Meng K., Yang T. Long non-coding RNA PROX1-AS1 promotes the proliferation and migration in gastric cancer by epigenetically activating FGFR1. *Panminerva Med* 2019. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355614/>
- Rudzinska M., Czarnecka-Chrebelska K.H., Kuznetsova E.B. et al. Long non-coding PROX1-AS1 expression correlates with renal cell carcinoma metastasis and aggressiveness. *Non-Coding RNA* 2021;7(2):25. DOI: 10.3390/NCRNA7020025
- Tu B., Ye L., Cao Q. et al. Identification of a five-MiRNA signature as a novel potential prognostic biomarker in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Hereditas* 2022;159(1):3. DOI: 10.1186/S41065-021-00214-9
- Ye X., Qiu R., He X. et al. MiR-647 Inhibits hepatocellular carcinoma cell progression by targeting protein tyrosine phosphatase receptor type F. *Bioengineered* 2022;13(1):1090–102. DOI: 10.1080/21655979.2021.2017628
- Liu S., Qu D., Li W. et al. MiR-647 and MiR-1914 promote cancer progression equivalently by downregulating nuclear factor IX in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 2017;16(6):8189–99. DOI: 10.3892/MMR.2017.7675/HTML
- Zhang X., Zhang M., Wang G. et al. Tumor promoter role of MiR-647 in gastric cancer via repression of TP73. *Mol Med Rep* 2018;18(4):3744–50. DOI: 10.3892/MMR.2018.9358
- Ma H., Wang P., Li Y. et al. Decreased expression of serum MiR-647 is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(7):2552–8.
- Song X., Bi Y., Guo W. Long noncoding RNA PROX1-AS1 promotes tumor progression and aggressiveness by sponging MiR-647 in gastric cancer. *Minerva Med* 2021;112(3):421–3. DOI: 10.23736/S0026-4806.19.06223-2
- Biomedical Informatics Institute. Available at: <https://bioinfo.henu.edu.cn/DatabaseList.jsp>.
- Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Res* 2013;41(D1):D991–5. DOI: 10.1093/NAR/GKS1193
- Qian Z., Zhu G., Tang L. et al. Whole genome gene copy number profiling of gastric cancer identifies PAK1 and KRAS gene amplification as therapy targets. *Genes Chromosom Cancer* 2014;53(11):883–94. DOI: 10.1002/GCC.22196
- GEO Accession viewer. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE57303>.
- Bure I.V., Nemtsova M.V. Methylation and noncoding RNAs in gastric cancer: everything is connected. *Int J Mol Sci* 2021;22(11):5683. DOI: 10.3390/IJMS22115683
- LncACTdb 3.0: Home. Available at: <http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/LncACTdb/>.
- Shen Y., Xia E., Bhandari A. et al. LncRNA PROX1-AS1 promotes proliferation, invasion, and migration in papillary thyroid carcinoma. *Biosci Rep* 2018;38(5):BSR20180862. DOI: 10.1042/BSR20180862
- Chen Y., Lu B., Liu L. et al. Long non-coding RNA PROX1-AS1 knockdown upregulates microRNA-519d-3p to promote chemosensitivity of retinoblastoma cells via targeting SOX2. *Cell Cycle* 2021;20(20):2149–59. DOI: 10.1080/15384101.2021.1971352
- Guo T., Wang W., Ji Y. et al. LncRNA PROX1-AS1 facilitates gastric cancer progression via miR-877-5p/PD-L1 Axis. *Cancer Manag Res* 2021;13:2669. DOI: 10.2147/CMAR.S275352
- Qin K., Tian G., Chen G. et al. MiR-647 inhibits glioma cell proliferation, colony formation and invasion by regulating HOXA9. *J Gene Med* 2020;22(3):e3153. DOI: 10.1002/JGM.3153
- Zhang Y.S., Chen T., Cai Y.J. et al. MicroRNA-647 promotes the therapeutic effectiveness of argon-helium cryoablation and inhibits cell proliferation through targeting TRAF2 via the NF-KB signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Oncotargets Ther* 2018;11:6777–84. DOI: 10.2147/OTT.S159337
- Du L., Wang X., Yin Y. et al. Identification of a potentially functional circRNA-miRNA-mRNA ceRNA regulatory network in bladder cancer by analysis of microarray data. *Transl Androl Urol* 2021;10(1):24–36. DOI: 10.21037/TAU-20-660
- Cao W., Wei W., Zhan Z. et al. Role of miR-647 in human gastric cancer suppression. *Oncol Rep* 2017;37(3):1401–11. DOI: 10.3892/OR.2017.5383
- Yang B., Jing C., Wang J. et al. Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2014;16(4):374–9. DOI: 10.1007/S12094-013-1081-6
- Zhao Q., Zhang B., Li Z. et al. Effects of incRNA PROX1-AS1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung cancer cells by regulating miR-1305. *J Healthc Eng* 2022;2022:9570900. DOI: 10.1155/2022/9570900

Вклад авторов

Е.А. Ветчинкина: проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста статьи;
А.И. Калинин: биоинформационный анализ, анализ результатов и баз данных;
Е.Б. Кузнецова, Е.А. Алексеева: проведение экспериментов, анализ результатов;
А.Э. Киселева: сбор и анализ клинического материала;
М.В. Немцова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи, редактирование;
И.В. Буре: курирование эксперимента, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

E.A. Vetchinkina: conducting experiments, analyzing the results, article writing;
A.I. Kalinkin: bioinformatic analysis, analysis of results and databases;
E.B. Kuznetsova, E.A. Alekseeva: conducting experiments, analyzing the results;
A.E. Kiseleva: collection and analysis of clinical material;
M.V. Nemtsova: development of research design, article writing, editing;
I.V. Bure: curating the experiment, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Ветчинкина / E.A. Vetchinkina: <https://orcid.org/0000-0001-8069-5540>
А.И. Калинин / A.I. Kalinkin: <https://orcid.org/0000-0001-9215-4581>
Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-5825-0430>
А.Э. Киселева / A.E. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-6930-1261>
Е.А. Алексеева / E.A. Alekseeva: <https://orcid.org/0000-0002-7035-1362>,
М.В. Немцова / M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>
И.В. Буре / I.V. Bure: <https://orcid.org/0000-0003-2043-5848>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10117).

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 20-75-10117).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (протокол № 04-19 от 06.03.2019).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (protocol № 04-19 от 06.03.2019).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 18.08.2022. **Принята к публикации:** 28.10.2022.

Article submitted: 18.08.2022. **Accepted for publication:** 28.10.2022.