

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47



Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии *REDD1* рапамицином в клетках рака молочной железы

Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова¹, Е.С. Лылова¹, Д.В. Демина², К.И. Кирсанов^{1,3}, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, проспект Вернадского, 78;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9

Контакты: Екатерина Андреевна Лесовая lesovenok@yandex.ru

Введение. В комбинированной терапии рака молочной железы в качестве адъюванта для расширения терапевтического интервала основного цитотоксического препарата и снижения побочных эффектов химиотерапии применяют глюкокортикоиды. Однако они вызывают развитие серьезных осложнений и могут способствовать прогрессии опухоли. В последнее десятилетие появились данные о том, что побочные эффекты глюкокортикоидов опосредованы активацией экспрессии гена *REDD1*. На их основе мы разработали новую стратегию химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы, направленную на уменьшение нежелательных явлений при применении данных препаратов. Успешное тестирование комбинаций глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* на моделях опухолей кроветворной системы позволило использовать данную схему в лечении определенных подтипов рака молочной железы.

Цель исследования – оптимизация условий обработки клеток рака молочной железы комбинацией глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* на примере рапамицина.

Материалы и методы. В работе использовались клетки рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231. Антипролиферативную активность определяли путем прямого подсчета клеток, экспрессию *REDD1* – методами вестерн-блоттинга и количественной полимеразной цепной реакции.

Результаты. Было показано, что рапамицин может подавлять базальную и индуцированную глюкокортикоидами экспрессию *REDD1* в клетках рака молочной железы люминального и тройного негативного подтипов. Способность этого препарата подавлять жизнеспособность клеток рака молочной железы была гораздо менее выражена, чем клеток лейкозов и лимфом.

Заключение. Наблюдаемое подавление пролиферации клеток рака молочной железы после их инкубации с рапамицином и дексаметазоном, а также способность рапамицина снижать базальную и индуцированную глюкокортикоидами экспрессию *REDD1* в клетках рака молочной железы обуславливают актуальность исследования влияния комбинаций глюкокортикоидов и ингибиторов экспрессии *REDD1* класса модуляторов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (фосфоинозитид-3-киназа/α-серин-треониновая киназа/мишень рапамицина млекопитающих) на клетки рака молочной железы.

Ключевые слова: *REDD1*, глюкокортикоиды, рецептор глюкокортикоидов, ингибиторы mTOR, рапамицин, сиролимус, рак молочной железы

Для цитирования: Григорьева Д.Д., Жидкова Е.М., Лылова Е.С. и др. Ингибирование глюкокортикоидиндуцированной экспрессии *REDD1* рапамицином в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):42–7. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47.

Inhibition of glucocorticoid-induced *REDD1* expression by rapamycin in breast cancer cells

D.D. Grigorieva¹, E.M. Zhidkova¹, E.S. Lylova¹, D.V. Demina², K.I. Kirsanov^{1,3}, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹,
E.A. Lesovaya^{1,4}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadsky Prospekt, Moscow 119454, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁴I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vysokovoltynaya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Ekaterina Andreevna Lesovaya lesovenok@yandex.ru

Introduction. Glucocorticoids are often used in combination therapy for breast cancer as an adjuvant to increase therapeutic effects of the main cytotoxic drug and to reduce side effects of chemotherapy. However, glucocorticoids can cause serious complications and trigger tumor progression. In the last decade, it was found that side effects from glucocorticoids are mediated by an increase in *REDD1* gene expression. Using this knowledge, we have developed a new chemotherapeutic strategy for blood cancers aimed at reducing adverse events from glucocorticoids. Successful experiments with a combination of glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors on the models of blood tumors allowed us to use this regimen for the treatment of certain subtypes of breast cancer.

Objective: to optimize the algorithm of breast cancer cell treatment with a combination of glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors on the example of rapamycin.

Materials and methods. We used the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. The antiproliferative activity was estimated by direct cell count; *REDD1* expression was measured using western blotting and quantitative polymerase chain reaction.

Results. We found that rapamycin can inhibit both baseline and glucocorticoids induced *REDD1* expression in the cells of luminal and triple negative breast cancer. The drug demonstrated lower ability to inhibit the viability of breast cancer cells than that of leukemia and lymphoma cells.

Conclusion. Inhibited proliferation of breast cancer cells after their incubation with rapamycin and dexamethasone, as well as the ability of rapamycin to reduce basal and glucocorticoid-induced *REDD1* expression in breast cancer cells suggest the importance of studies analyzing the impact of combinations that include glucocorticoids and *REDD1* expression inhibitors from the class of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway modulators (phosphoinositide-3-kinase/ α -serine-threonine kinase/mammalian rapamycin target) on breast cancer cells.

Key words: *REDD1*, glucocorticoids, glucocorticoid receptor, mTOR inhibitors, rapamycin, sirolimus, breast cancer

For citation: Grigorieva D.D., Zhidkova E.M., Lylova E.S. et al. Inhibition of glucocorticoid-induced *REDD1* expression by rapamycin in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1):42–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-42-47.

ВВЕДЕНИЕ

Для расширения терапевтического интервала и снижения побочных эффектов генотоксичных противоопухолевых препаратов в терапии рака молочной железы (РМЖ) применяют глюкокортикоиды (ГК) [1, 2]. Однако высокие дозы и длительные курсы этих препаратов, используемые при разных подтипах РМЖ, могут способствовать прогрессии опухоли [1, 2].

В ряде исследований было показано, что ГК вызывают повышение экспрессии *REDD1* — консервативного индуцируемого стрессом ингибитора mTOR [3]. Биоинформатический скрининг предполагаемых ингибиторов *REDD1* позволил выявить группу препаратов, для которых на моделях опухолей кроветворной системы были показаны подавление базальной и ГК-индуцированной экспрессии *REDD1* на уровне белка и мРНК *in vitro*, а также синергизм противоопухолевого действия при их комбинировании с ГК и подавление ГК-индуцированного остеопороза и атрофии кожного покрова *in vivo* [4, 5].

Связь подавления экспрессии *REDD1* и снижения атрофических эффектов ГК была показана и на других моделях. Это позволяет предположить, что данный эффект является воспроизводимым вне зависимости от органа или ткани, на которые направлено действие ГК [3, 5, 6]. Стоит отметить, что роль *REDD1* в регуляции пролиферации клеток РМЖ изучена мало и данные о ней весьма противоречивы. Так, в ряде

исследований было показано, что повышение экспрессии *REDD1* после использования химиопрепаратов коррелирует со снижением жизнеспособности клеток РМЖ [7, 8]. Однако в других работах продемонстрирована взаимосвязь повышения экспрессии *REDD1* с неблагоприятным прогнозом при тройном негативном РМЖ [9]. В то же время ингибирование *REDD1* в условиях гипоксии приводит к гиперактивации mTOR и пролиферации опухолевых клеток [10].

В качестве ингибитора *REDD1* в данной работе использован рапамицин, зарекомендовавший себя как эффективный ингибитор экспрессии *REDD1* в исследованиях на модельных системах опухолей кроветворной системы [4, 5]. Задачи представленного исследования:

- определить влияние рапамицина на уровень белка *REDD1* с помощью вестерн-блоттинга;
- оценить активность транскрипции *REDD1* с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- определить влияние комбинации ГК и рапамицина на жизнеспособность клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. Клеточные линии РМЖ люминального MCF-7 и тройного негативного подтипа MDA-MB-231 культивировали в стандартной среде в условиях, описанных ранее [11].

Обработка клеток. Клетки рассеивали в 6-луночные планшеты (по 500 тыс. клеток в лунку). После прикрепления клеток к подложке в среду вносили 100 нМ рапамицина (Rapa, LC Labs, США), инкубировали 4, 8 или 24 ч, затем добавляли 100 нМ дексаметазона (Dex, KRKA, Чехия) и инкубировали 24 ч при 37 °C при 5 % CO₂.

Вестерн-блоттинг. Лизис клеток проводили в буфере RIPA с добавлением ингибитора протеиназ (Roche, Швейцария). Уравновешивание концентраций белка осуществляли по методу Бредфорда [12]. Электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле

в Tris-глициновом буфере с 0,1 % додецилсульфата натрия (SDS). Перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли мокрым способом.

Для предотвращения неспецифической сорбции мембрану инкубировали с 5 % раствором сухого молока в Tris-буферном солевом растворе (Tris-buffered saline, TBS), затем гибридизовали с первичными антителами к белку REDD1 (ProteinTech Group, США) или к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (Abcam, Великобритания) 16 ч. Далее проводили гибридизацию со вторичными антителами (Abcam, Великобритания). Количественный анализ осуществляли при

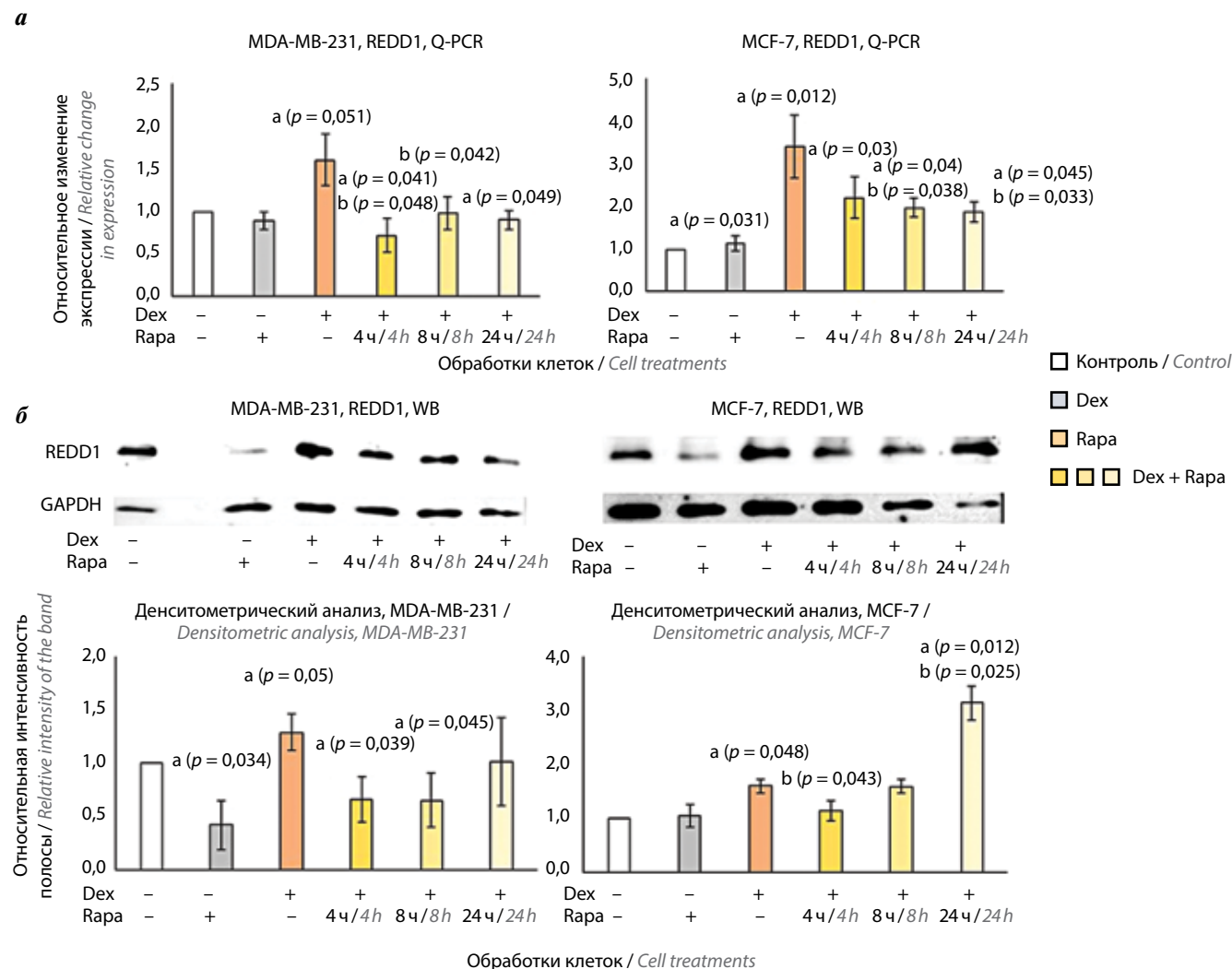


Рис. 1. Влияние рапамицина и дексаметазона на базальный уровень экспрессии REDD1 и предобработки рапамицином на индуцированный глюкокортикоидами уровень экспрессии REDD1 в клетках MCF-7 и MDA-MB-231: а – анализ изменения экспрессии гена REDD1 методом количественной полимеразной цепной реакции с нормализацией по количеству ПЦР-продукта гена RPLP; б – анализ изменения экспрессии белка REDD1 методом вестерн-блоттинга с нормализацией по количеству белка GAPDH. Клетки культивировали в течение 4, 8 или 24 ч в присутствии рапамицина (100 нМ) или растворителя и затем в течение 24 ч с дексаметазоном (100 нМ) или растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ (n = 3). Dex – дексаметазон; Rapa – рапамицин; Q-PCR – количественная полимеразная цепная реакция; WB – вестерн-блоттинг; а – статистически значимое отличие от контроля; б – статистически значимое отличие от образцов, обработанных дексаметазоном

Fig. 1. Effect of rapamycin and dexamethasone on basal REDD1 expression and effect of rapamycin pretreatment on glucocorticoid-induced REDD1 expression in MCF-7 and MDA-MB-231 cells: а – changes in REDD1 gene expression evaluated using quantitative polymerase chain reaction with normalization to the RPLP gene; б – changes in REDD1 protein expression evaluated using western blotting with normalization to the GAPDH protein. Cells were cultured for 4, 8 or 24 hours with rapamycin (100 nM) or solvent, and then for 24 hours with dexamethasone (100 nM) or solvent. Data are presented as $M \pm SD$ (n = 3). Dex – dexamethasone; Rapa – rapamycin; Q-PCR – quantitative polymerase chain reaction; WB – western blotting; а – significant difference compared to controls; б – significant difference compared to samples treated with dexamethasone

помощи набора Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США) путем денситометрического сканирования и обработки изображений в программе ImageJ.

Количественная полимеразная цепная реакция. Суммарную РНК выделяли при помощи реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя. К 2 нг кДНК, полученной при помощи реакции обратной транскрипции («Синтол», Россия), добавляли по 500 нМ смеси праймеров (см. таблицу) и реакционную смесь для количественной ПЦР в присутствии EvaGreen («Синтол», Россия) и проводили амплификацию: 95 °С, 15 с; 72 °С, 30 с; 59,5 °С, 30 с (43 цикла). Относительное изменение экспрессии мРНК *REDD1* вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$ [11]. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPLP0*.

Последовательности праймеров, используемых в работе

Sequences of primers used in the study

Ген Gene	Последовательность Sequence
<i>REDD1</i>	5'-GCCTTTGGCCTCTCGATACA-3' For 5'-GCCTTTGGCCTCTCGATACA-3' Rev
<i>RPLP0</i>	5'-CCTTCTCCTTTGGGCTGGT CATCCA-3' For 5'-CAGACACTGGCAACA TTGCGG ACAC-3' Rev

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены в 3 биологических повторах. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рас-

считывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали Student's t-test для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью количественной ПЦР было показано, что дексаметазон за 24 ч повышает *REDD1* в клеточных линиях MDA-MB-231 и MCF-7 РМЖ в среднем в 1,6 и 3,4 раза соответственно (рис. 1). Для линии MDA-MB-231 индукция *REDD1* была выражена слабее. Рапамицин при 24-часовой инкубации не оказывал влияния на базальный уровень мРНК *REDD1* в клетках РМЖ, однако подавлял экспрессию *REDD1* на уровне белка.

Был исследован цитотоксический эффект рапамицина как индивидуально, так и в сочетании с дексаметазоном (рис. 2). Число жизнеспособных клеток подсчитывали через 24 и 120 ч после обработки. Рапамицин слабо подавлял пролиферацию клеток обеих линий через 24 ч. Однако при обработке в течение 5 сут число жизнеспособных клеток линии MCF-7 составило 38 % от контроля (рис. 2,а), а линии MDA-MB-231 — 59 % (рис. 2,б). В случае обработки клеток MCF-7 рапамицином в сочетании с дексаметазоном в течение 24 ч наблюдали кооперацию цитотоксических эффектов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были определены эффективные концентрации и временные интервалы обработки клеток РМЖ рапамицином для ингибирования базальной и дексаметазон-индуцированной экспрессии *REDD1*

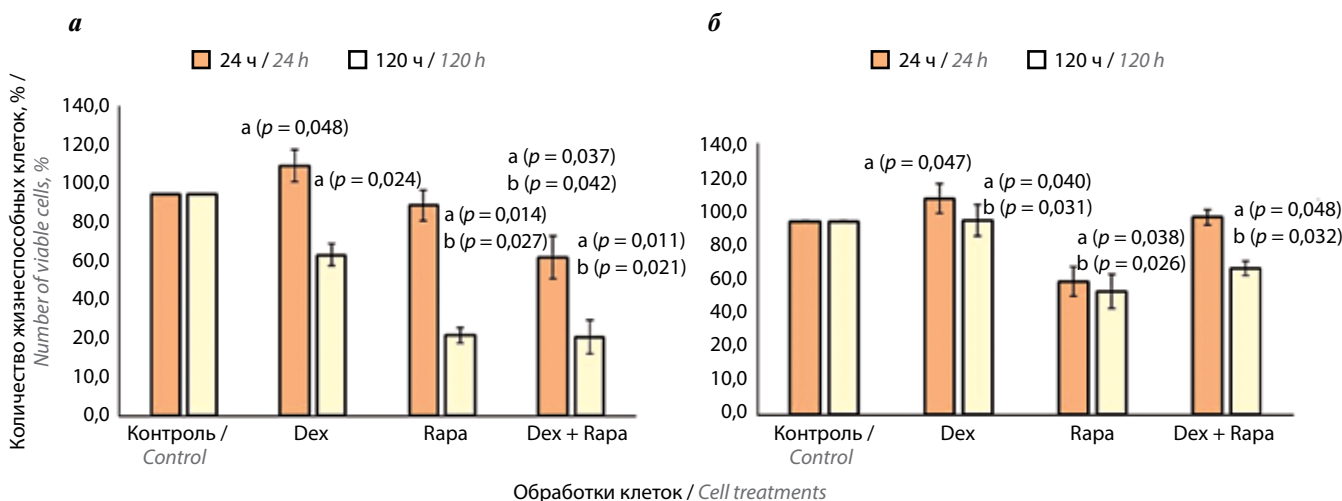


Рис. 2. Антипролиферативный эффект рапамицина при самостоятельном использовании и в комбинации с дексаметазоном на клетки MCF-7 (а) и MDA-MB-231 (б). Клетки культивировали в присутствии растворителя, дексаметазона в концентрации 100 нМ и рапамицина в концентрации 1 мкМ, а также при их комбинации. Подсчет клеток проводили через 24 и 120 ч. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex — дексаметазон; Rapa — рапамицин; а — статистически значимое отличие от контроля; б — статистически значимое отличие от образцов, обработанных дексаметазоном

Fig. 2. Antiproliferative effect of Rapamycin individually and in combination with dexamethasone on MCF-7 and MDA-MB-231 (B). Cells were cultured with the solvent, dexamethasone (100 nM) and rapamycin (1 μ M) and their combination. Cells were counted 24 and 120 h after the treatment. Data are presented as $M \pm SD$ ($n = 3$). Dex — dexamethasone; Rapa — rapamycin; а — a statistically significant difference from the control; б — a statistically significant difference from the samples treated with dexamethasone

на уровне мРНК и белка. Было продемонстрировано, что для предобработки рапамицином клеток РМЖ наиболее оптимален 4-часовой интервал, что согласуется с полученными ранее нами и другими исследователями данными на клетках злокачественных новообразований кроветворной системы и иммортализованных кератиноцитах [4–6]. В отличие от данных, полученных на трансформированных лимфоцитах, Рара и Дех оказывают умеренный антипролиферативный эффект на клетки РМЖ [4, 5]. Связи экспрессии *REDD1* с пролиферативной активностью клеток не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам рапамицин может подавлять базальную и ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках РМЖ люминального и тройного негативного подтипов. Способность данного препарата снижать жизнеспособность клеток РМЖ была гораздо менее выражена, чем клеток лейкозов и лимфом. Однако наблюдаемое подавление пролиферации клеток РМЖ после их инкубации с рапамицином свидетельствует о перспективности исследования применения этого препарата и других ингибиторов *REDD1* в качестве адъювантных препаратов в химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Volden P.A., Conzen S.D. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain Behav Immun* 2013;30:S26–31. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.10.022.
2. Belova L., Delgado B., Kocherginsky M. et al. Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(3):441–7. DOI: 10.1007/s10549-008-0136-9.
3. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K. et al. *REDD1* functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med* 2015;7(1):42–58. DOI: 10.15252/emmm.201404601.
4. Lesovaya E., Agarwal S., Readhead B. et al. Rapamycin modulates glucocorticoid receptor function, blocks atrophogene *REDD1*, and protects skin from steroid atrophy. *J Invest Dermatol* 2018;138(9):1935–44. DOI: 10.1016/j.jid.2018.02.045.
5. Lesovaya E.A., Savinkova A.V., Morozova O.V. et al. A Novel approach to safer glucocorticoid receptor-targeted anti-lymphoma therapy via *REDD1* (regulated in development and DNA damage 1) inhibition. *Mol Cancer Ther* 2020;19(9):1898–908. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1111.
6. Agarwal S., Mirzoeva S., Readhead B. et al. PI3K inhibitors protect against glucocorticoid-induced skin atrophy. *EBioMedicine* 2019;41:526–37. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.01.055.
7. Lan Y.C., Chang C.L., Sung M.T. et al. Zoledronic acid-induced cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress triggered *REDD1*-mTOR pathway in breast cancer cells. *Anticancer Res* 2013;33(9):3807–14.
8. Yun S.M., Woo S.H., Oh S.T. et al. Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of *REDD1* expression in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2016;422:64–73. DOI: 10.1016/j.mce.2015.11.016.
9. Pinto J.A., Rolfo C., Raez L.E. et al. In silico evaluation of DNA damage inducible transcript 4 gene (*DDIT4*) as prognostic biomarker in several malignancies. *Sci Rep* 2017;7:1526. DOI: 10.1038/s41598-017-01207-3.
10. Tirado-Hurtado I., Fajardo W., Pinto J.A. DNA Damage inducible transcript 4 gene: the switch of the metabolism as potential target in cancer. *Front Oncol* 2018;8:106. DOI: 10.3389/fonc.2018.00106.
11. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р. и др. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора *CpdA* на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. *Сибирский онкологический журнал* 2017;16(6):41–6. [Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R. et al. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor *CpdA* on different subtypes of breast cancer cell lines. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian journal of oncology* 2017;16(6):41–6. (In Russ.)]. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

Вклад авторов

Д.Д. Григорьева: проведение экспериментальной работы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание первоначального варианта статьи;
 Е.М. Жидкова: проведение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов;
 Е.С. Лылова: проведение экспериментальной работы, подготовка иллюстративного материала, написание первоначального варианта статьи;
 Д.В. Демина: проведение экспериментальной работы, статистическая обработка данных;
 К.И. Кирсанов: сбор данных, разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 К.А. Белицкий: разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 М.Г. Якубовская: анализ литературных данных, разработка концепции исследования, редактирование статьи;
 Е.А. Лесовая: разработка дизайна и протоколов исследования, редактирование статьи.

Authors' contribution

D.D. Grigorieva: experimental work, statistical data processing, preparation of illustrative material, writing the initial version of the article;
 E.M. Zhidkova: experimental work, analysis and interpretation of the results;
 E.S. Lylova: experimental work, preparation of illustrative material, writing the initial version of the article;