

УДК 577.2:577.29; 57.021

Противоопухолевая активность индол-3-карбинола в клетках рака молочной железы: фенотип – генетический паттерн – обращение ДНК-метилирования

© 2020 А. А. ПОЛОЗНИКОВ^{1,*}, Е. Л. МУЙЖНЕК², С. В. НИКУЛИН³, А. Д. КАПРИН¹, Л. А. АШРАФЯН⁴, Н. И. РОЖКОВА¹, П. Г. ЛАБАЗАНОВА¹, В. И. КИСЕЛЕВ⁴

¹МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, 125284

²ФГБУ РНЦРР Минздрава России, Москва, 117997

³Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 1150884

⁴ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, 117997

*e-mail: andrey.poloznikov@nmicr.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 02.04.2020 г.

Проведено исследование влияния индол-3-карбинола на пролиферацию и миграцию клеток рака молочной железы (РМЖ) MDA-MB-231 и клеток модели здоровой ткани молочной железы MCF-10A. В результате показано, что индол-3-карбинол достоверно снижает пролиферацию и миграцию клеток линии MDA-MB-231 и не оказывает существенного влияния на клетки линии MCF-10A. Инкубация опухолевых клеток линии MDA-MB-231 в присутствии 100 мкМ индол-3-карбинола в течение 48 ч приводила к выраженному снижению экспрессии генов Wnt-каскада: *CCND1* на 28%, *SP1* на 44%, *CDK6* на 47%, – а также гена *EGFR* на 64% и гена *FASN* на 22%. При инкубации в тех же условиях условно здоровых клеток молочной железы линии MCF-10A заметное снижение экспрессии наблюдалось только для двух генов: *EGFR* на 16% и *CDK6* на 9%. Помимо этого, индол-3-карбинол обладает селективной ДНК-деметилюющей активностью в опухолевых клетках молочной железы и обращает процесс аномального метилирования и функциональной блокады противоопухолевого гена *WIFI1*. Полученные данные свидетельствуют о том, что лекарственные препараты, содержащие индол-3-карбинол в качестве активного компонента, могут рассматриваться как потенциальные регуляторы эпигенетических процессов в комплексной терапии РМЖ и других онкологических заболеваний.

Ключевые слова: индол-3-карбинол, рак молочной железы, эпигенетика, Wnt

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-43-55

Рак молочной железы (РМЖ) – одна из самых актуальных проблем современной онкологии. В большинстве экономически развитых стран РМЖ занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения и является одной из главных причин смерти среди женщин среднего возраста (40–55 лет). В настоящее время каждый год во всем мире РМЖ заболевает более 2 млн женщин, почти треть из них ежегодно погибает. Заболеваемость

РМЖ варьирует в разных частях мира, достигая максимума в странах Западной Европы, в Северной Америке и Австралии/Новой Зеландии (максимальные показатели). За последние 10 лет, с 2008 по 2018 гг., прирост заболеваемости РМЖ в мире составил 51%, а прирост смертности – 37% [1].

В России РМЖ также занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости (21,1%) и смертности (16,4%) среди женщин. Ежегодно в нашей стране более 60 тыс. женщин

Список сокращений: ДИМ – 3,3'-дииндолилметан; ИЗК – индол-3-карбинол; РМЖ – рак молочной железы; ЭГКГ – эпигаллокатехин-3-галлат.

с диагнозом РМЖ ставят на диспансерный учет и около 600 тыс. пациенток продолжают наблюдение у врачей-онкологов. Средний стандартизированный показатель заболеваемости РМЖ в России увеличился за 10 лет (2007–2017 гг.) на 22%: с 42,7 до 52,0% на 100 тыс. женщин [1].

Известно не менее 80 факторов, повышающих риск развития РМЖ. Их объединяют в следующие группы: половые, возрастные и конституциональные факторы, генетические факторы, репродуктивные факторы, гормональные и обменные факторы, факторы внешней среды и образа жизни [2]. Недавно в этот перечень была добавлена повышенная маммографическая плотность. Тенденция увеличения заболеваемости РМЖ связана также с расширением масштабов скрининга по данному заболеванию.

Не умаляя значимости всех известных факторов риска РМЖ, с точки зрения патогенетической онкопрофилактики важнейшим из них следует признать наличие доброкачественных и предраковых заболеваний молочной железы, особенно среди женщин, входящих в группы риска по данному заболеванию [2–5]. Накоплено много экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о том, что РМЖ, как и большинству других видов злокачественных опухолей, предшествует предраковое состояние, путь к которому начинается задолго до клинической манифестации онкозаболевания. Данное состояние часто сопровождается определенной симптоматикой и отклоняющимися от нормы объективными диагностическими показателями еще на стадии доброкачественных процессов в молочной железе. Эти патологические изменения в ткани молочной железы возникают на молекулярно-генетическом и клеточном уровне и не могут быть обнаружены с помощью доступных сегодня методов лабораторной и инструментальной диагностики.

Общепризнано, что одними из самых ранних проявлений аномальных молекулярных изменений являются потенциально обратимые эпигенетические модификации, влияющие на уровень экспрессии генов, но не затрагивающие (в отличие от генетических мутаций) первичную структуру ДНК. Самым изученным и наиболее распространенным механизмом эпигенетической регуляции является метилирование ДНК. ДНК-метилирование происходит под действием фермента ДНК-метилтрансферазы (точнее, семейства этих ферментов) по остатку цитозина в строго определенных участках гена – динуклеотидных CpG-островках, значительная часть которых сосредоточена в его регуляторной промоторной области. Именно в зоне промотора гена происходит связыва-

ние транскрипционных комплексов и инициация процесса считывания генетической информации. Метилирование промоторной области приводит к функциональной блокаде гена – «эпигенетическому сайленсингу». При канцерогенезе в результате метилирования промоторов генов, подавляющих процессы патологического клеточного роста и опухолевой прогрессии, наблюдается ингибирование экспрессии кодируемых ими белков и, как следствие, снижается общий уровень противоопухолевой защиты организма.

Доказана глобальная роль аномального ДНК-метилирования в маммарном канцерогенезе [6, 7]. В последние годы появляется все больше доказательств того, что эпигенетические нарушения, протекающие при развитии и прогрессии РМЖ, начинают проявляться задолго до манифестации его клинических признаков – на стадии предрака, а также на стадии доброкачественных заболеваний молочной железы (стадии так называемого «биохимического рака») [8, 9].

В число ассоциированных с онкогенезом генов-мишеней, подвергающихся аномальному промоторному гиперметилированию в эпителии молочной железы [10], входит важнейший опухоль-супрессорный ген *BRCA1* [11–16].

Сравнение профилей ДНК-метилирования в опухолевых клетках и клетках доброкачественных образований молочной железы выявило различия в уровне гиперметилирования более чем 100 генов, участвующих в регуляции ключевых протуморогенных процессов. Это гены-регуляторы клеточного цикла (*CCND2*, *CDKN2A*), репарации ДНК (*BRCA1*), детоксикации (*GSTP1*), апоптоза (*BCL2*, *DAPK*), инвазии и метастазирования (*RASSF1A*, *RARβ*, *TWIST*, *HIN1*), регуляции транскрипции (*HOXA5*), клеточной адгезии (*CDH1*) и гормонально-опосредованных клеточных сигнальных путей (*ERα*, *ERβ*, *THRβ*) [7].

Важно отметить, что морфологически неразличимые нормальные клетки могут иметь различный эпигенетический портрет. Накапливающиеся эпигенетические нарушения формируют аномальный клеточный фенотип и могут являться драйверами опухолеобразования [8, 17]. В ходе сравнительного исследования уровня ДНК-метилирования в морфологически нормальных клетках молочной железы пациенток с РМЖ и здоровых женщин Teschendorff и др. [18] обнаружили в составе ДНК несколько кластеров, содержащих аномальные эпигенетические изменения, которые коррелировали с риском развития РМЖ. Авторы пришли к выводу о том, что эпигенетическое перепрограммирование клеток морфологически нормальной маммарной ткани, прилегающей

к опухоли, приводящее к снижению уровня клеточной дифференцировки, предшествует канцерогенезу молочной железы. Кроме того, в анализе *in silico* было выявлено, что аномальное метилирование происходит преимущественно в генах, контролируемых сигнальным Wnt-каскадом.

Напомним, что в норме Wnt-каскад регулирует процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, выживаемости и миграции, которые являются основополагающими в фазе эмбрионального развития, а также при поддержании тканевого гомеостаза во взрослом организме. При патологии Wnt-каскад играет ключевую роль в реализации пролиферативного потенциала и канцерогенной активности опухолевых стволовых (или опухоль-иницирующих) клеток [19]. Согласно современным представлениям, активация митотической популяции опухолевых стволовых клеток (ОСК), устойчивых к стандартной химио- и радиотерапии, является главной причиной рецидивов онкологических заболеваний и формирования метастазов, а также развития опухолевой резистентности [20]. Доказано, что Wnt-каскад является важнейшим онкогенным сигнальным механизмом, активированным при различных видах рака. Ключевая роль aberrантного Wnt-каскада в канцерогенезе показана для злокачественных опухолей различного происхождения [21–24], в том числе для РМЖ [25], поэтому компоненты этого сигнального каскада рассматриваются как новые перспективные лекарственные мишени в таргетной противоопухолевой терапии [26].

В основе канонического варианта Wnt-сигнального каскада лежит стабилизация эффекторного цитоплазматического белка β -катенина. В отсутствие внешнего сигнала β -катенин связан и фосфорилируется особым мультибелковым комплексом, содержащим опухоль-супрессорный белок APC (Adenomatous Polyposis Coli), проапоптотический белок Axin, а также протеинкиназу GSK3 β и кезинкиназу CK1 α . Связывание Wnt-белков с соответствующими рецепторами приводит к ингибированию киназ GSK3 β и CK1 α и разрушению белкового комплекса (β -катенин-APC-Axin-GSK3 β -CK1 α). В результате нефосфорилированный β -катенин транслоцируется в ядро, где связывается с факторами транскрипции, принадлежащими семейству Tcf/Lef, а также группой белков-кофакторов (CBP, p300, TNIK, Bcl9, Pygopus homolog 1) и в итоге индуцирует экспрессию генов, кодирующих белки c-myc, циклин D, и сурвивин, опосредующих процессы пролиферации, дифференцировки и метастазирования трансформированных клеток [27–29].

На данный момент в базе данных клинических испытаний clinicaltrials.gov имеется информация

о 36 текущих исследованиях, в которых изучается эффективность ингибиторов Wnt-каскада. Разрабатываемые противоопухолевые препараты – ингибиторы Wnt-пути – действуют на различные его компоненты: ингибируют синтез белков Wnt-семейства, препятствуют связыванию с рецепторами и корецепторами белков Wnt или подавляют связывание других белков, участников данного каскада, с их рецепторами. Действие некоторых из изучаемых фармацевтических агентов направлено на блокаду деградирующего мультибелкового комплекса, транслокацию β -катенина в ядро и его связывание с транскрипционными факторами.

Наименее токсичными из ингибиторов Wnt-каскада считаются препараты, ингибирующие синтез Wnt-белков. Они блокируют начальные этапы Wnt-каскада, не затрагивая молекулярные мишени, участвующие в других сигнальных процессах. Таким действием обладает, например, ингибитор белка поркупина – ETC-159, который находится в I фазе клинических испытаний на больных с генерализованными формами опухолей различного происхождения (NCT02521844) [30]. К основным недостаткам таких агентов относится их низкая селективность (поркупин действует на все белки семейства Wnt, в том числе и на те, которые не проявляют онкогенных свойств), а также невозможность терапевтического воздействия на опухолевые клетки, содержащие мутантные гены белков Wnt-каскада.

Другой изучаемый препарат – ингибитор Wnt-каскада – артесунат. Это органическое соединение, обладающее также противомаларийной активностью, предотвращает транслокацию β -катенина в ядро [31]. Препарат находится на II фазе клинических испытаний в рамках неoadьювантной терапии колоректального рака (NCT02633098).

Действие некоторых потенциальных противоопухолевых агентов – ингибиторов Wnt-каскада направлено на стабилизацию белка аксина через ингибирование фермента танкиразы, который в норме обеспечивает его деградацию в протеасомах. Показано, что ингибирование танкиразы сопровождается стабилизацией деградирующего комплекса и деградацией β -катенина. Некоторые такие молекулы в доклинических моделях вызвали остановку развития опухоли [32, 33]. Однако ни один из ингибиторов танкиразы в настоящее время не находится на стадии клинических испытаний из-за их высокой токсичности для желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Их токсический механизм заключается в нарушении пролиферации стволовых клеток кишечника, что приводит к воспалению и некрозу тканей [34].

Новым перспективным классом таргетных противоопухолевых препаратов считают соединения, обладающие эпигенетической активностью. Как мы отмечали выше, аномальные эпигенетические модификации, опосредующие опухолевую трансформацию и малигнизацию, обратимы. Обратимость аномальных эпигенетических модификаций привлекает внимание к ферментам, ее опосредующим, как к лекарственным мишеням при разработке таргетных эпигенетических препаратов. Ключевой мишенью считается фермент ДНК-метилирования – ДНК-метилтрансфераза. Некоторые из ингибиторов ДНК-метилтрансфераз уже одобрены Административным управлением США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) для клинического применения при лечении опухолевых заболеваний – например, 5-аза-2'-дезоксцитидин.

Низкомолекулярные ингибиторы ДНК-метилтрансфераз подразделяются на два класса: нуклеозидные и ненуклеозидные аналоги. К нуклеозидным препаратам относятся 5-азациитидин (FDA), децитабин (FDA), zebularine, SGI-110, CP-4200. Для них характерна высокая токсичность и низкая специфичность. Менее токсичные ненуклеозидные препараты делятся на синтетические и природные. К синтетическим деметилирующим агентам относятся гидралазин, дисульфирам, RG108, прокаин, прокаинамид, IM25, а к самым безопасным природным ингибиторам ДНК-метилирования причисляют эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ), куркумин, генистеин, ресвератрол, эквол, партенолид [35]. Деметилирующая активность выявлена у соединений – производных индола: индол-3-карбинола (ИЗК) и его физиологического метаболита дииндолилметана (ДИМ)

ИЗК и ДИМ известны как вещества с доказанной множественной противоопухолевой активностью [36, 37]. Они нормализуют эстрогенный баланс в организме, подавляют гормонзависимую и гормоннезависимую пролиферацию опухолевых клеток, стимулируют их избирательный апоптоз, ингибируют опухолевый неоангиогенез, воспаление, клеточную миграцию, инвазию и метастазирование. Кроме того, эти вещества ингибируют активность опухолевых стволовых клеток, а также обладают эпигенетической противоопухолевой активностью, в частности способностью обращать аномальное ДНК-метилирование генов противоопухолевой защиты [38]. Эти соединения природного происхождения характеризуются не только высокой избирательной противоопухолевой активностью, но и низкой токсичностью, что делает возможным их долговременное безопасное применение [39–42].

В настоящее время ведется большое число клинических исследований по изучению комбинированного применения эпигенетических модуляторов, в том числе внутриклеточных ингибиторов Wnt-каскада, и стандартных химиопрепаратов при лечении различных опухолевых заболеваний [43].

Цель работы состояла в комплексном изучении противоопухолевой активности индол-3-карбинола в клетках РМЖ в сравнении с неопухолевыми (условно нормальными) эпителиальными клетками молочной железы на клеточном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реагенты

Индол-3-карбинол (Sigma, США).

Клеточные культуры

В работе использованы две культуры клеток молочной железы: MDA-MB-231 и MCF-10A, – полученные из коллекции клеточных культур АТСС. Клетки линии MDA-MB-231 представляют собой эпителиальные клетки аденокарциномы молочной железы, которые были выделены у больных РМЖ из метастазов, локализованных в плевральной полости. Эта клеточная линия наиболее часто используется как экспериментальная модель метастатической формы РМЖ. Клетки линии MCF-10A представляют собой эпителиальные клетки, выделенные из ткани молочной железы у пациенток с фиброзно-кистозной мастопатией. Эта линия клеток широко используется как экспериментальная клеточная модель неопухолевой (условно нормальной) ткани молочной железы.

Культивирование опухолевых и неопухолевых клеток молочной железы

Клетки РМЖ линии MDA-MB-231 культивировали в среде DMEM (1×) (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин. Клетки культуры MCF-10A культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) (ООО НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS, L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе Sanyo (Panasonic, Япония) при 37 °C и 5% CO₂.

Клетки высаживали в 6-луночные культуральные планшеты TPP в количестве 1×10⁶ клеток на лунку для последующего выделения из них ДНК и анализа степени промоторного метилирования гена *WIF1*, а также в объеме 5×10⁵ клеток

на лунку для последующего выделения из них РНК и анализа уровня экспрессии таргетных генов Wnt-каскада. Подсчет клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

Изучение влияния ИЗК на фенотипические и молекулярно-генетические характеристики опухолевых и неопухолевых клеток молочной железы проводили при концентрациях ИЗК 0, 50, 75 и 100 мкМ в трех биологических повторах для каждой концентрации. Клетки инкубировали с ИЗК в течение 48 ч. После этого клетки, предназначенные для выделения РНК, лизировали реагентом QIAzol (QIAGEN, Германия) и хранили до выделения РНК при температуре -70°C . Клетки для выделения ДНК снимали раствором трипсин-ЭДТА 0,25% (ООО НПП «ПанЭко»), дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS; ООО НПП «ПанЭко») и хранили до выделения ДНК при температуре -20°C .

Анализ пролиферативной активности клеток молочной железы

Пролиферативную активность опухолевых и неопухолевых клеток молочной железы в отсутствие и в присутствии ИЗК оценивали с использованием колориметрического МТТ-теста, позволяющего оценить содержание жизнеспособных клеток [44]. Клеточные культуры высаживали в 96-луночный культуральный планшет ТРР в количестве 1×10^4 клеток на лунку (линия MDA-MB-231) и 5×10^3 клеток на лунку (линия MCF-10A). Клетки инкубировали в среде, содержащей ИЗК в концентрации 0, 50, 75 и 100 мкМ, в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Оптическую плотность при длине волны 470 нм измеряли на спектрофотометре VERSA Max Microplate Reader (Molecular Devices, США). Для построения графиков скорости пролиферации для каждой временной точки рассчитывали относительную выживаемость клеток по следующей формуле:

$$V = \frac{A_{\text{ИЗК}} - A_{\text{ПК}}}{A_{\text{ОК}} - A_{\text{ПК}}} \cdot 100\%,$$

где $A_{\text{ИЗК}}$ – среднее значение поглощения для лунок с ИЗК; $A_{\text{ОК}}$ – средние значения поглощения для отрицательного контроля (лунки со средой без добавления ИЗК); $A_{\text{ПК}}$ – средние значения для положительного контроля (лунки с Tween-20).

Анализ миграционной активности клеток молочной железы

На начальном этапе эксперимента в каждую лунку 6-луночного культурального планшета, содержащую 2,5 мл полной питательной среды,

вносили 2×10^5 клеток и инкубировали в течение 24 ч в клеточном инкубаторе при 25°C . Среду меняли на бессывороточную (среда DMEM для клеток MDA-MB-231 и среда DMEM/F12 для клеток MCF-10A), и через 24 ч клетки снимали и переносили по 2×10^4 клеток в 75 мкл бессывороточной питательной среды в мембранные вставки Transwell (Corning, США).

Для анализа миграционной активности клеток использовали 96-луночные культуральные планшеты, содержащие мембранные вставки Transwell с диаметром пор 8 мкм. В лунки вносили по 235 мкл полной питательной среды и сверху помещали мембранные вставки с клетками. Через 72 ч мембранные вставки вынимали и делали микрофотографии лунок планшета с помощью мультифункционального ридера SpectraMax i3 (Molecular Devices). Клетки, прошедшие через мембрану, подсчитывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro 7 (Molecular Devices). Эксперимент проводили в 6 повторах.

Относительную миграционную активность клеток рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{N_{\text{ИЗК}}}{N_{\text{ОК}}},$$

где $N_{\text{ИЗК}}$ – среднее число клеток, прошедших через мембрану, при добавлении различных концентраций ИЗК; $N_{\text{ОК}}$ – среднее число клеток, прошедших через мембрану, в отрицательном контроле (лунки со средой без добавления ИЗК).

Анализ экспрессии генов

Выделение РНК проводили с помощью набора miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) из образцов в QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN), замороженных при -70°C . Качество выделенной РНК проверяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу для набора MMLV RT Kit (ООО «ЕвроГен», Россия) с использованием 500 нг каждого образца на одну реакцию. В качестве термостата использовали DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США). ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием амплификатора DTprime («ДНК-технологии», Россия) и полимеразной смеси GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, США). ПЦР проводили в трех биологических и трех технических повторах. Кривые нормализовали по экспрессии гена β -актина (*ACTB*). Следующие праймеры были подобраны к генам:

CCND1:
 5'CCGATGCCAACCTCCTCAACG3'
 3'CAGGCGGCTCTTTTCACGGG5'

EGFR:

5'CTTGCAGCGATACAGCTCAG3'

3'GTTTGTCTGTGTAAGCTGTCCG5'

CDK6:

5'TGCACAGTGTACGAACAGA3'

3'ACAAAGTCTGAAGAGGCTCCA'

SPI:

5'TTGAAAAAGGAGTTGGTG3'

3'GGGTTGAATGTCTTGGTCTG5'

FASN:

5'ATGCACACTCTGCGATGAAG3'

3'AGAGGACCCGACACTTGTGAC5'

В качестве референсного гена использовали ген *ACTB* (температура отжига 57 °C).

Анализ ПЦР в режиме реального времени проводился с помощью метода delta-delta *Ct*, описанного ранее [45]. Относительный уровень экспрессии вышеперечисленных генов оценивали после 48-часовой инкубации клеток молочной железы в присутствии 100 мкМ ИЗК и без добавления исследуемого препарата.

Для каждого гена рассчитывали среднее арифметическое значение *Ct*. Затем для каждого гена, включая референсный, рассчитывали значение ΔC_t как разность средних арифметических *Ct* для этого гена между сравниваемыми образцами:

$$\Delta C_{t(\text{ИЗК-ОК})} = C_{t\text{ИЗК}} - C_{t\text{ОК}}$$

Далее для каждого гена вычисляли относительную экспрессию по формуле:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{ИЗК-ОК})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{ИЗК-ОК})}},$$

где *R* – экспрессия гена в клетках после инкубации с ИЗК относительно экспрессии гена в клетках без добавления препарата; E_{target} – эффективность праймеров тестируемого гена; E_{ref} – эффективность праймеров референсного гена *ACTB*; $\Delta C_{t\text{ref}}$ – разность средних арифметических *Ct* для референсного гена *ACTB* между сравниваемыми образцами.

Анализ уровня метилирования промотора гена *WIFI*

Ранее показано [46–48], что наибольший уровень метилирования промоторной области гена *WIFI* при различных онкологических заболеваниях наблюдается на участке от -554 до -140 нуклеотида до старт-кодона. Стоит отметить, что при исследовании уровня метилирования ДНК подвергаются бисульфитной конверсии, при которой все остатки цитозина, за исключением находящихся в составе CpG-динуклеотидов, конвертируются в урацил. В связи с этим обычно подбирают прай-

меры, комплементарные последовательностям, не содержащим CpG-динуклеотиды, и позволяющие амплифицировать участок промотора *WIFI* от -407 до -161 нуклеотида [49].

Выделение ДНК из клеток молочной железы проводили с помощью набора innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Германия), конверсию образцов – с помощью набора innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (Analytik Jena AG). Амплификацию конвертированной ДНК проводили на амплификаторе DPrime («ДНК-Технология»), используя метод, описанный нами ранее [49]. Полученные ПЦР-фрагменты разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Для приготовления геля использовали агарозу LE 2 Agarose for nuclear acid gel electrophoresis (ООО «Хеликон», Россия). Электрофорез проводили при напряжении 80 В на приборе PowerPac Basic Power (Bio-Rad). В качестве контроля использовали маркер на 100 bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific). Под ультрафиолетовым светом из геля вырезали полосу с ДНК-фрагментом необходимой длины и выделяли из нее ДНК, для чего использовали набор innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena AG).

Каждый образец, содержащий 16 нг ДНК, упаривали вместе с праймером на концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, Германия) и отдавали в ЦКП «Геном» (Россия) для проведения бисульфитного секвенирования. Первичную обработку данных секвенирования проводили с помощью программы Clone Manager Professional 9.2 (SciEd Software, США). Полученные последовательности для каждого образца сравнивали с известной исходной последовательностью промотора на участке от -407 до -161 нуклеотида. Полученные результаты обрабатывали повторно с помощью алгоритма QUantification tool for Methylation Analysis, размещенного на сайте quma.cdb.riken.jp.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи языка программирования R-3.4.0 и графической оболочки RStudio 1.0.143. Для выявления статистически значимых различий в группах применяли *t*-критерий Стьюдента с пороговым уровнем значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферативная активность клеток молочной железы в отсутствие и в присутствии индол-3-карбинола

Пролиферацию клеток РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клеток молочной железы линии MCF-10A определяли в отсутствие ИЗК и

в присутствии 50, 75 и 100 мкМ при инкубации в течение 4 дней. Кривые, описывающие динамику относительной пролиферации опухолевых и неопухолевых клеток молочной железы, представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, инкубирование неопухолевых (условно нормальных) клеток линии MCF-10A молочной железы с ИЗК в концентрациях вплоть до 100 мкМ не приводило к значимым изменениям клеточной пролиферации, в то время как для клеток РМЖ линии MDA-MB-231 наблюдали выраженное дозозависимое ингибирование пролиферации – при действии ИЗК в концентрации 100 мкМ в течение 4 суток их пролиферация снижалась в 1,6 раза. На основании полученных данных (см. рис. 1) для последующих экспериментов мы выбрали 48-часовой режим инкубации клеток с ИЗК, так как на этом временном интервале различия в скорости пролиферации клеток MDA-MB-231 и MCF-10A были значимыми (см. рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ИЗК обладает избирательным противоопухолевым действием на клетки РМЖ, которое выражается в дозозависимом ингибировании их пролиферации. Важно, что ИЗК в исследованных концентрациях не оказывал значимого влияния на пролиферацию неопухолевых (условно нормальных) клеток молочной железы. Этот факт согласуется с известными данными литературы, согласно которым ИЗК обладает свойством селективно подавлять пролиферацию агрессивных форм опухолей молочной железы [50].

Исследование влияния индол-3-карбинола на миграцию клеток молочной железы

Изучение влияния ИЗК на миграционную активность клеток РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клеток линии MCF-10A выявило избирательное ингибирующее действие этого соединения на миграцию опухолевых клеток (рис. 2). Общеизвестно, что миграционная активность – это один из признаков трансформированных опухолевых клеток, которые приобрели аномальный фенотип и соответствующий ему aberrantный эпигенетический паттерн и получили возможность к активному перемещению и распространению. Такие клетки имеют мезенхимальные характеристики, полученные ими в результате процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Известно, что в ходе ЭМП происходит эпигенетическое перепрограммирование и изменение фенотипа эпителиальных клеток на мезенхимальный, в результате чего вместо генов и белков, характерных для эпителиального клеточного фенотипа (Е-кадгерин, цитокератин, ламинин и др.) начинают активно экспрессироваться гены и белки, свойственные более лабильным мезенхимальным клеткам (виментин, N-кадгерин, фибронектин, β -катенин, синдекан-1 и др.). Трансформируясь в мезенхимальный фенотип, клетки становятся низкодифференцированными, утрачивают клеточную полярность (приобретают эллиптическую форму) и способность прочно контактировать между собой (клеточную адгезию) и с базальной мембраной, вследствие чего приобретают

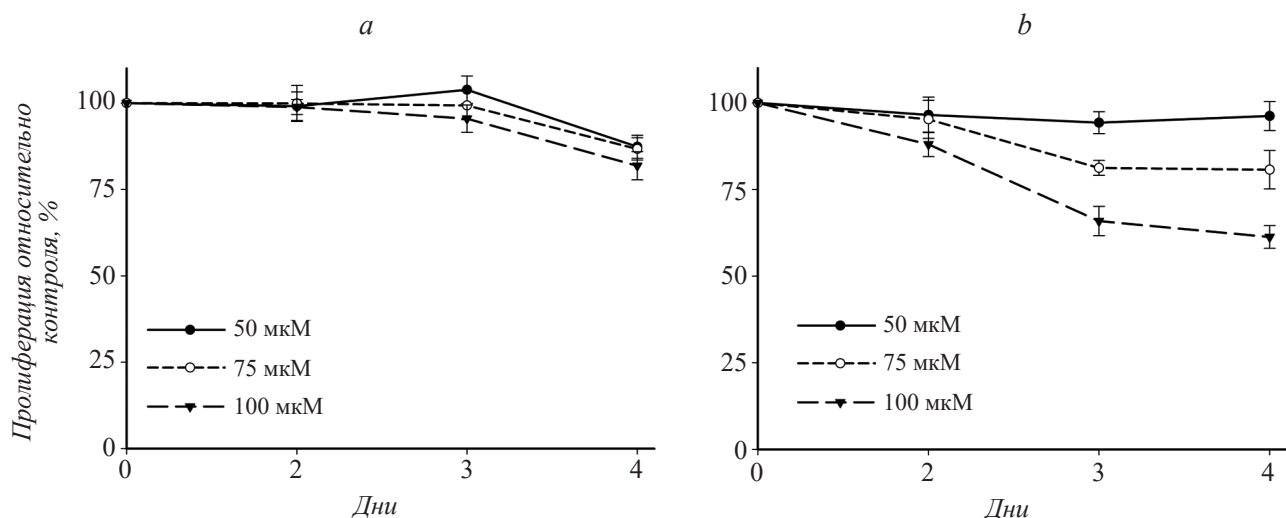


Рис. 1. Относительная пролиферация неопухолевых клеток молочной железы линии MCF-10A (a) и клеток РМЖ линии MDA-MD-231 (b). Инкубация в течение 1–4 сут в среде в присутствии различных концентраций индол-3-карбинола.

Fig. 1. Relative proliferation measured by MTT assay of MCF-10A non-tumor cells (a) and MDA-MD-231 breast cancer cells (b) in the presence of indole-3-carbinol.

подвижность и миграционную активность (способность проникать в окружающие ткани), а также преодолевать барьер эндотелия, поступая в кровеносные или лимфатические сосуды [51].

Процесс ЭМП играет важнейшую роль в норме – в эмбриональном развитии и при заживлении ран, – а также при патологических процессах: фиброзе и опухолевой прогрессии. В канцерогенезе запуск этой программы, способствующей эффективной инвазии и метастазированию в удаленные органы и ткани, дает опухолевым клеткам явные преимущества для выживания и распространения в организме.

Как видно из представленных на рис. 2 данных, ИЗК подавлял миграцию опухолевых клеток молочной железы линии MDA-MB-231 при всех изученных концентрациях. В присутствии максимальной концентрации ИЗК (100 мкМ) отмечалось 20%-ное ингибирование миграционной активности клеток РМЖ. В то же время количество мигрировавших неопухолевых клеток молочной железы линии MCF-10A оставалось практически на исходном уровне.

Полученные данные согласуются с результатами других исследований. В частности, ранее показано, что механизм ингибирующего действия ИЗК на миграцию клеток MDA-MB-231 включает активацию Rho киназы и ассоциирован с повышенной экспрессией гена *BRCAl* и генов белков межклеточных взаимодействий: Е-кадгерина и катенинов [52, 53]. Обусловлено ли подавление миграции клеток РМЖ, наблюдаемое в присутствии ИЗК, его прямым ингибирующим действием или опосредовано через индуцируемое им снижение активности Wnt-каскада, пока окончательно не установлено.

Изучение влияния индол-3-карбинола на уровень экспрессии таргетных генов

В качестве таргетных генов сигнального Wnt-каскада мы выбрали гены *CCND1* [54], *CDK6* [55] и *SPI* [56]. Кроме того, раньше показано, что одним из ключевых регуляторов процессов миграции, инвазии и ЭМП клеток РМЖ является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [57], экспрессия которого снижается под действием ИЗК [58]. Georgopoulos и соавт. [59] установили регуляторную взаимосвязь между каскадом Wnt и сигнальным путем, опосредованным рецептором EGFR. А Hu & Li [60] показали, что EGFR образует комплекс с β -катенином и усиливает инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Другим возможным общим фактором, влияющим на регуляцию сигнальных путей Wnt и EGFR, является нарушение метаболизма жирных кислот. В контексте

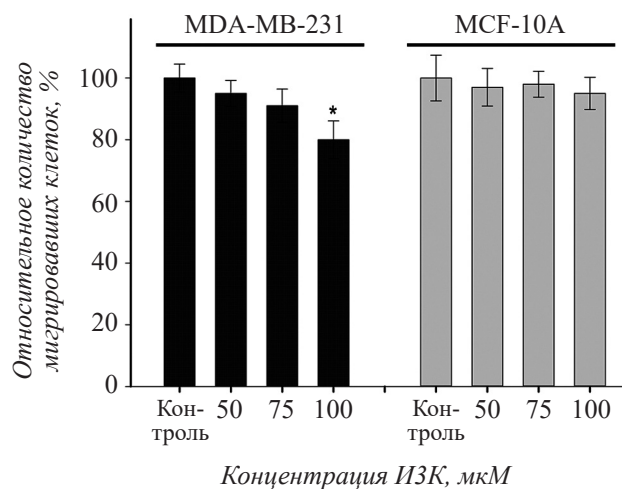


Рис. 2. Относительная миграционная активность клеток РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клеток молочной железы линии MCF-10A при инкубации в течение 48 ч в среде в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций индол-3-карбинола. * $p < 0,05$.

Fig. 2. Relative migration of MDA-MB-231 breast cancer cells and MCF-10A non-tumor breast cells after 48 h incubation in the absence (control) and in the presence of different concentrations of indole-3-carbinol. * $p < 0.05$.

канцерогенеза из липогенных ферментов наиболее хорошо изучена синтаза жирных кислот (FASN) [61]. Повышенная экспрессия этого фермента выявлена в различных видах опухолей, включая рак предстательной железы, печени, яичника, толстой кишки, молочной железы, и ассоциирована со злокачественной трансформацией и плохим прогнозом. Yang и соавт. [62] показали, что повышенная экспрессия FASN обусловлена активацией сигнального пути EGFR. Также известно, что FASN регулирует инвазию и метастазирование клеток колоректального рака, активируя сигнальный путь Wnt [63].

Учитывая вышесказанное, мы проанализировали экспрессию генов *EGFR* и *FASN* для оценки активации опосредуемых ими сигнальных путей Wnt и EGFR, а также противоопухолевого эффекта ИЗК, ингибирующего эти сигнальные каскады.

Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Как видно из представленных данных, ИЗК вызывал снижение экспрессии всех исследованных генов в клетках РМЖ линии MDA-MB-231. Наиболее выраженное снижение экспрессии после инкубации с исследуемым соединением наблюдали в случае *EGFR* – на 64%. В присутствии ИЗК снижалась экспрессия и генов-мишеней Wnt-каскада, и синтазы жирных кислот, что позволяет говорить о мультитаргетном действии ИЗК.

В то же время в неопухолевых клетках MCF-10A относительно исходного уровня значимо снижалась экспрессия только двух генов: *EGFR* и *CDK6*, – причем эти изменения были гораздо менее выражены по сравнению с клетками MDA-MB-231.

Таким образом, нами обнаружены явные различия в воздействии ИЗК на пролиферацию и миграционную активность опухолевых клеток MDA-MB-231 по сравнению с неопухолевыми клетками MCF-10A. Можно предполагать, что это обусловлено селективным действием ИЗК на экспрессию генов-регуляторов протуморогенных процессов в клетках РМЖ.

Анализ уровня метилирования промотора гена *WIF1*

Дополнительным уровнем регуляции, который обеспечивает поддержание низкого уровня β -катенина в клетке, является экспрессия и секреция антагонистов Wnt-каскада, которые могут быть двух видов: белки, связывающие Wnt-лиганды, и белки, связывающие Wnt-рецепторы. Ключевым ингибиторным белком первой группы является фактор WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor-1) [64].

Показано, что в злокачественных опухолях человека различного происхождения WIF-1 находится в неактивном состоянии. И, напротив, экспериментальное восстановление экспрессии WIF-1 в опухолевых клетках приводит к выраженной опухолевой супрессии, уменьшению подвижности опухолевых клеток и снижению их инвазивного и

метастатического потенциала на фоне понижения экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток. Основным механизмом инактивации фактора WIF-1 является промоторное ДНК-метилирование и, как следствие, эпигенетическое выключение кодирующего его гена, которое происходит на ранних этапах онкогенеза [46, 65–68].

В настоящее время ген *WIF1* относится к числу наиболее перспективных генов-маркеров с точки зрения диагностической и прогностической значимости статуса его промоторного метилирования при канцерогенезе.

В 2006 году Ai и соавт. [46] в экспериментах *ex vivo* обнаружили наличие промоторного гиперметилирования гена *WIF1* в клетках РМЖ, которое приводило к снижению уровня его экспрессии и усилению неконтролируемой клеточной пролиферации. В 2009 году Gao и соавт. [42] установили, что флавоноид ЭГКГ эффективно индуцирует деметилирование и реактивацию экспрессии «молчащего» гена *WIF1* в опухолевых клетках рака легкого

Для проверки предположения о том, что наблюдаемые фенотипические изменения, по крайней мере отчасти, вызваны селективным действием ИЗК на активность сигнального Wnt-каскада, мы провели сравнительное исследование уровня метилирования промотора гена *WIF1* в клетках РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клетках молочной железы линии MCF-10A (рис. 4).

В результате сравнительного анализа промоторного метилирования гена *WIF1* в двух указанных клеточных линиях не выявлено деметилирующего эффекта со стороны ИЗК в культуре неопухолевых клеток MCF-10A (рис. 4). Исходный, более низкий по сравнению с опухолевыми клетками, уровень метилирования, равный 66,7%, не изменился после инкубации условно нормальных клеток с ИЗК в концентрации 100 мкМ в течение 48 ч. В опухолевых клетках MDA-MB-231 наблюдали совершенно другой эффект: при исходном метилировании 100% сайтов промоторной области гена *WIF1* после инкубации с ИЗК метилирование обнаружено только в 40,7% сайтов.

Способность ИЗК обращать процесс аномального ДНК-метилирования в опухолевых клетках ранее показана другими авторами. В 2007 году Naeefe и соавт. [69] впервые обнаружили, что в число многочисленных аномально работающих молекулярных мишеней, на модуляцию которых направлена мультитаргетная противоопухолевая активность ИЗК, входит фермент ДНК-метилтрансфераза. В опухолевых клетках поджелудочной железы в присутствии ИЗК снижалась экспрессия всех трех изоформ этого фермента: DNMT1, 3a и 3b.

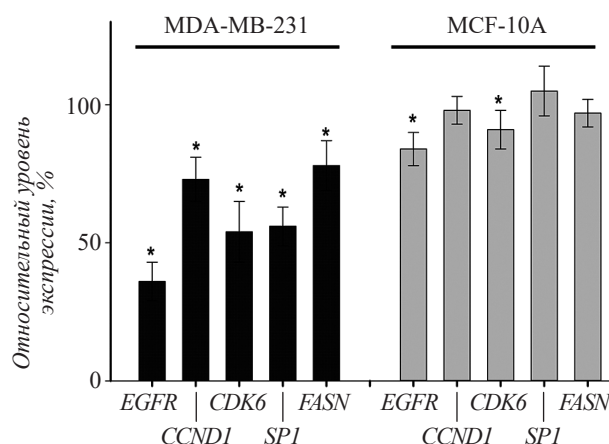


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *CCND1*, *EGFR*, *SPI*, *FASN* и *CDK6* в клетках РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клетках линии MCF-10A после инкубации с ИЗК в концентрации 100 мкМ в течение 48 ч. * $p < 0,05$.

Fig. 3. Relative gene expression of *CCND1*, *EGFR*, *SPI*, *FASN*, and *CDK6* in MDA-MB-231 breast cancer cells and MCF-10A non-tumor cells after 48 h incubation in presence of 100 μ M of indole-3-carbinol. * $p < 0.05$.

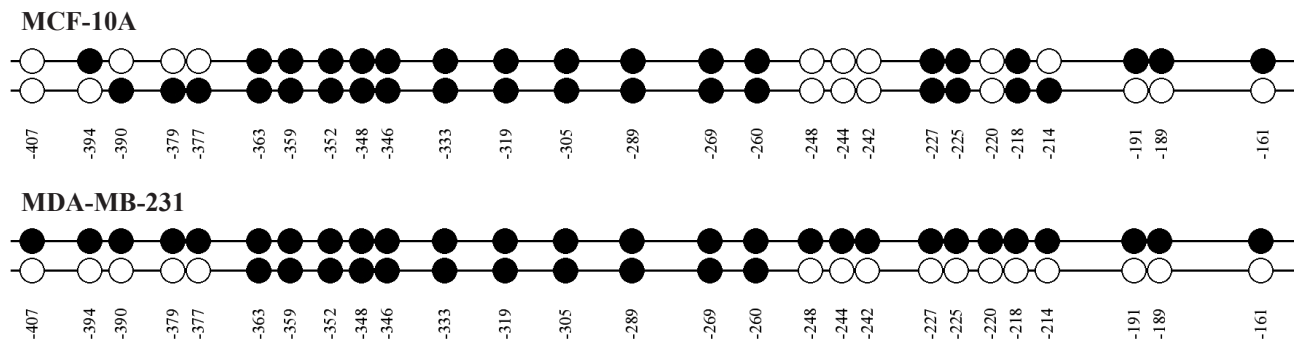


Рис. 4. Сайты метилирования промотора гена *WIF1* в клетках РМЖ линии MDA-MB-231 и неопухолевых клетках линии MCF-10A до и после инкубации в среде, содержащей 100 мкМ ИЗК, в течение 48 ч.

Fig. 4. Methylation sites of the *WIF1* gene promoter in MDA-MB-231 breast cancer cells and MCF-10A non-tumor cells before and after 48 h incubation in the presence of 100 μ M of indole-3-carbinol.

Суммируя полученные нами данные, можно сделать следующие выводы. Обнаруженное селективное противоопухолевое действие ИЗК, выражающееся в подавлении пролиферации и миграционной активности клеток РМЖ, по крайней мере отчасти, обусловлено способностью этого соединения подавлять активность онкогенного сигнального Wnt-каскада. Данный эффект сопровождается снижением экспрессии таргетных для этого каскада генов, опосредующих процессы канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Кроме того, ИЗК проявляет избирательную ДНК-деметирующую активность в клетках РМЖ, в частности, в отношении гена *WIF1* – ингибитора онкогенного пролиферативного Wnt-каскада. Таким образом, избирательное противоопухолевое действие ИЗК на клетки РМЖ выявлено на клеточном, генетическом и эпигенетическом уровнях.

ИЗК в качестве активного компонента входит в состав нескольких фармацевтических средств. На территории Российской Федерации зарегистрирован лекарственный препарат Индинол® Форто (АО «МираксБиоФарма», Россия). Как следует из опубликованных ранее результатов клинического исследования, пролонгированное применение Индинол® Форто может рассматриваться как новый перспективный подход поддерживающей терапии в комбинированном лечении больных с распространенным раком яичников [70]. В результате мультитаргетного действия этого препарата восстанавливается нормальная генетическая программа клетки, происходит активация генов-супрессоров опухолевого роста и торможение процессов опухолевой трансформации и малигнизации тканей молочной железы [71].

Таким образом, препараты, содержащие ИЗК в качестве активного компонента, могут рассматриваться как эффективные лекарственные средства с выраженной онкопрофилактической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии», 2018, 235 с.
- Рожкова Н.И., Каприн А.Д. Доброкачественные заболевания молочной железы. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017, 283 с.
- Расказова Е.А., Рожкова Н.И. (2014) Скрининг для ранней диагностики рака молочной железы. *Исследования и Практика в Медицине*, 2014, 1, 45–51.
- Рожкова Н.И. Лучевая диагностика в маммологии. Руководство для врачей. Москва: СИМК, 2014, 128 с.
- Рожкова Н.И., Каприн А.Д. Профилактика – приоритет клинической маммологии. Москва: СММК, 2015.
- Pasculli B., Barbano R., Parrella P. Epigenetics of breast cancer: biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin. Cancer Biol.*, 2018, 51, 22–35.
- Jovanovic J., Ronneberg J.A., Tost J., Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Mol. Oncol.*, 2010, 4, 242–254.
- Скрябин Н.А., Толмачева Е.Н., Лебедев И.Н., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Динамика аномалий метилирования функциональных групп генов при развитии рака молочной железы. *Молекуляр. биология*, 2013, 47, 302–310.
- Euhus D.M., Bu D., Milchgrub S., Xie X.-J., Bian A., Leitch A.M., Lewis C.M. (2008) DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2008, 17, 1051–1059.
- Lewis C.M., Cler L.R., Bu D.-W., Zöchbauer-Müller S., Milchgrub S., Naftalis E.Z., Leitch A.M., Minna J.D., Euhus D.M. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 1, 166–172.
- Mueller C.R., Roskelley C.D. (2003) Regulation of *BRC1* expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2003, 5, 45–52.

12. Birgisdottir V., Stefansson O.A., Bodvarsdottir S.K., Hilmarsdottir H., Jonasson J.G., Eyfjord J.E. Epigenetic silencing and deletion of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2006, 8, R38.
13. Saelee P., Chaiwerawattana A., Ogawa K., Cho Y.-M., Tiwawech D., Suktangman V. Clinicopathological significance of *BRCA1* promoter hypermethylation in Thai breast cancer patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, 15, 10585–10589.
14. Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes C., E.A. R., Gabrielson E., Schutte M., Baylin S.B., Herman J. Promoter hypermethylation and *BRCA1* inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92, 564–569.
15. Zhang L., Long X. Association of *BRCA1* promoter methylation with sporadic breast cancers: evidence from 40 studies. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 17869.
16. Otani Y., Miyake T., Kagara N., Shimoda M., Naoi Y., Maruyama N., Shimomura A., Shimazu K., Kim S.J., Noguchi S. *BRCA1* promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor for *BRCA1*-methylated breast cancer. *Cancer Sci.*, 2014, 105, 1369–1376.
17. Fleischer T., Tekpli X., Mathelier A., Wang S., Nebdal D., Dhakal H.P., Sahlberg K.K., Schlichting E., Oslo Breast Cancer Research Consortium (OSBREAC), Børresen-Dale A.-L., Borgen E., Naume B., Eskeland R., Frigessi A., Tost J., Hurtado A., Kristensen V.N. DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 1379.
18. Teschendorff A.E., Gao Y., Jones A., Ruebner M., Beckmann M.W., Wachter D.L., Fasching P.A., Widschwendter M. DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 10478.
19. Curtin J.C., Lorenzi M.V. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget.*, 2010, 1, 563–577.
20. Wicha M.S., Liu S., Dontu G. Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift. *Cancer Res.*, 2006, 66, 1883–1890; discussion 1895–1896.
21. Larue L., Luciani F., Kumasaka M., Champeval D., Demirkan N., Bonaventure J., Delmas V. Bypassing melanocyte senescence by β -catenin: a novel way to promote melanoma. *Pathol. Biol.*, 2009, 57, 543–547.
22. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2007, 17, 45–51.
23. Stewart D.J. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, 106, djt356.
24. Sha J., Han Q., Chi C., Zhu Y., Pan J., Dong B., Huang Y., Xia W., Xue W. PRKAR2B promotes prostate cancer metastasis by activating Wnt/ β -catenin and inducing epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell. Biochem.*, 2018, 119(9), 7319–7327.
25. Lamb R., Ablett M.P., Spence K., Landberg G., Sims A.H., Clarke R.B. Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS One*, 2013, 8, e67811.
26. Anastas J.N., Moon R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2013, 13, 11–26.
27. Bilic J., Huang Y.-L., Davidson G., Zimmermann T., Cruciat C.-M., Bienz M., Niehrs C. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 2007, 316, 1619–1622.
28. Davidson G., Wu W., Shen J., Bilic J., Fenger U., Stanek P., Glinka A., Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 2005, 438, 867–872.
29. You L., He B., Xu Z., Uematsu K., Mazieres J., Mikami I., Reguart N., Moody T.W., Kitajewski J., McCormick F., Jablons D.M. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2004, 23, 6170–6174.
30. Madan B., Ke Z., Harmston N., Ho S.Y., Frois A.O., Alam J., Jeyaraj D.A., Pendharkar V., Ghosh K., Virshup I.H., Manoharan V., Ong E.H.Q., Sangthongpitag K., Hill J., Petretto E., Keller T.H., Lee M.A., Matter A., Virshup D.M. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene*, 2016, 35, 2197–2207.
31. Li L.-N., Zhang H.-D., Yuan S.-J., Tian Z.-Y., Wang L., Sun Z.-X. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/ β -catenin pathway. *Int. J. Cancer*, 2007, 121, 1360–1365.
32. Huang S.-M.A., Mishina Y.M., Liu S., Cheung A., Stegmeier F., Michaud G.A., Charlat O., Wiellette E., Zhang Y., Wiessner S., Hild M., Shi X., Wilson C.J., Mickanin C., Myer V., Fazal A., Tomlinson R., Serluca F., Shao W., et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 2009, 461, 614–620.
33. Waaler J., Machon O., Tumova L., Dinh H., Korinek V., Wilson S.R., Paulsen J.E., Pedersen N.M., Eide T.J., Machonova O., Gradl D., Voronkov A., von Kries J.P., Krauss S. A Novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res.*, 2012, 72, 2822–2832.
34. Zhong Y., Katavolos P., Nguyen T., Lau T., Boggs J., Sambrone A., Kan D., Merchant M., Harstad E., Diaz D., Costa M., Schutten M. Tankyrase inhibition causes reversible intestinal toxicity in mice with a therapeutic index < 1. *Toxicol. Pathol.*, 2016, 44, 267–278.
35. Suzuki T., Miyata N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Curr. Med. Chem.*, 2006, 13, 935–958.
36. Maruthanila V.L., Poornima J., Mirunalini S. Attenuation of carcinogenesis and the mechanism underlying by the influence of indole-3-carbinol and its metabolite 3,3'-diindolylmethane: a therapeutic marvel. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2014, 2014, 832161.

37. Bradlow H.L., Zeligs M.A. Diindolylmethane (DIM) spontaneously forms from indole-3-carbinol (I3C) during cell culture experiments. *In Vivo*, 2010, 24(4), 387–391.
38. Pfeifer B.L., Fahrendorf T. Indole-3-carbinol: a glucosinolate derivative from cruciferous vegetables for prevention and complementary treatment of breast cancer. *German Journal for Oncology*, 2015, 47, 20–27.
39. Lyn-Cook B.D., Mohammed S.I., Davis C., Word B., Haefele A., Wang H., Hammons G. Gender differences in gemcitabine (Gemzar) efficacy in cancer cells: effect of indole-3-carbinol. *Anticancer Res.*, 2010, 30, 4907–4914.
40. Aggarwal B.B., Ichikawa H. Molecular targets and anti-cancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*, 2005, 4, 1201–1215.
41. Wong C.P., Hsu A., Buchanan A., Palomera-Sanchez Z., Beaver L.M., Houseman E.A., Williams D.E., Dashwood R.H., Ho E. Effects of sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *PLoS One*, 2014, 9, e86787.
42. Gao Z., Xu Z., Hung M.-S., Lin Y.-C., Wang T., Gong M., Zhi X., Jablon D.M., You L. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res.*, 2009, 29, 2025–2030.
43. Li K., Hu C., Mei C., Ren Z., Vera J., Zhuang Z., Jin J., Tong H. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J. Transl. Med.*, 2014, 12, 167.
44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 1983, 65(1–2), 55–63.
45. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, 2008, 3, 1101–1108.
46. Ai L., Tao Q., Zhong S., Fields C.R., Kim W.-J., Lee M.W., Cui Y., Brown K.D., Robertson K.D. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2006, 27, 1341–1348.
47. Batra S., Shi Y., Kuchenbecker K.M., He B., Reguart N., Mikami I., You L., Xu Z., Lin Y.-C., Clément G., Jablons D.M. Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 342, 1228–1232.
48. Van Der Meide W.F., Snellenberg S., Meijer C.J.L.M., Baalbergen A., Helmerhorst T.J.M., Van Der Sluis W.B., Snijders P.J.F., Steenbergen R.D.M. Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol. Oncol.*, 2011, 123, 116–122.
49. Сухих Г.Т., Ашрафян Л.А., Байрамова Г.Р., Бабкина И.О., Чернова В.Ф., Осипьянц А.И., Королькова А.И., Полозников А.А., Асфарова Г.Р., Муллабаева С.М., Коган Е.А., Муйжнек Е.Л., Друх В.М., Киселев В.И. Метилирование гена *WIF-1* при цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях. *Акушерство и Гинекология*, 2017, 5, 114–123.
50. Tin A.S., Park A.H., Sundar S.N., Firestone G.L. Essential role of the cancer stem/progenitor cell marker nucleostemin for indole-3-carbinol anti-proliferative responsiveness in human breast cancer cells. *BMC Biol.*, 2014, 12, 72.
51. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, 2009, 119, 1420–1428.
52. Meng Q., Qi M., Chen D.Z., Yuan R., Goldberg I.D., Rosen E.M., Auburn K., Fan S. Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2000, 78, 155–165.
53. Brew C.T., Aronchik I., Kosco K., McCammon J., Bjeldanes L.F., Firestone G.L. Indole-3-carbinol inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell motility and induces stress fibers and focal adhesion formation by activation of Rho kinase activity. *Int. J. Cancer.*, 2009, 124, 2294–302.
54. Röhrs S., Kutzner N., Vlad A., Grunwald T., Ziegler S., Müller O. Chronological expression of Wnt target genes *Ccnd1*, *Myc*, *Cdkn1a*, *Tfrc*, *Plf1* and *Ramp3*. *Cell Biol. Int.*, 2009, 33, 501–508.
55. Kawasaki Y., Komiya M., Matsumura K., Negishi L., Suda S., Okuno M., Yokota N., Osada T., Nagashima T., Hiyoshi M., Okada-Hatakeyama M., Kitayama J., Shirahige K., Akiyama T. MYU, a target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates induction of CDK6 to promote cell cycle progression. *Cell Rep.*, 2016, 16, 2554–2564.
56. Mir R., Sharma A., Pradhan S.J., Galande S. Regulation of transcription factor SP1 by the β -catenin destruction complex modulates Wnt response. *Mol. Cell. Biol.*, 2018, 38(22), e00188-18 (online only).
57. Masuda H., Zhang D., Bartholomeusz C., Doihara H., Hortobagyi G.N., Ueno N.T. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012, 136, 331–345.
58. Moiseeva E.P., Heukers R., Manson M.M. EGFR and Src are involved in indole-3-carbinol-induced death and cell cycle arrest of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2007, 28, 435–445.
59. Georgopoulos N.T., Kirkwood L.A., Southgate J. A novel bidirectional positive-feedback loop between Wnt- β -catenin and EGFR-ERK plays a role in context-specific modulation of epithelial tissue regeneration. *J. Cell Sci.*, 2014, 127, 2967–2982.
60. Hu T., Li C. Convergence between Wnt- β -catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol. Cancer*, 2010, 9, 236.
61. Monaco M.E. Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 2017, 8, 29487–29500.

62. Yang Y.-A., Han W.F., Morin P.J., Chrest F.J., Pizer E.S. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp. Cell Res.*, 2002, 279, 80–90.
63. Wang H., Xi Q., Wu G. Fatty acid synthase regulates invasion and metastasis of colorectal cancer via Wnt signaling pathway. *Cancer Med.*, 2016, 5, 1599–1606.
64. Hsieh J.C., Kodjabachian L., Rebbert M.L., Rattner A., Smallwood P.M., Samos C.H., Nusse R., Dawid I.B., Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 1999, 398, 431–436.
65. Yee D.S., Tang Y., Li X., Liu Z., Guo Y., Ghaffar S., McQueen P., Atreya D., Xie J., Simoneau A.R., Hoang B.H., Zi X. The Wnt inhibitory factor 1 restoration in prostate cancer cells was associated with reduced tumor growth, decreased capacity of cell migration and invasion and a reversal of epithelial to mesenchymal transition. *Mol. Cancer.*, 2010, 9, 162.
66. Delmas A.L., Riggs B.M., Pardo C.E., Dyer L.M., Darst R.P., Izumchenko E.G., Monroe M., Hakam A., Kladder M.P., Siegel E.M., Brown K.D. *WIF1* is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix. *Carcinogenesis*, 2011, 32, 1625–1633.
67. Ramachandran I., Thavathiru E., Ramalingam S., Natarajan G., Mills W.K., Benbrook D.M., Zuna R., Lightfoot S., Reis A., Anant S., Queimado L. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Oncogene*, 2012, 31, 2725–2737.
68. Urakami S., Shiina H., Enokida H., Hirata H., Kawamoto K., Kawakami T., Kikuno N., Tanaka Y., Majid S., Nakagawa M., Igawa M., Dahiya R. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 6989–6997.
69. Haefele A., Word B., Yongmei X., Hammons G., Lyn-Cook B.D. Indole-3-carbinol (I3C) modulates expression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b in pancreatic cancer cells: effects of gender and a novel (C→T) polymorphism in the promoter region of DNMT 3b. *Int. J. Canc. Prev.*, 2007, 2, 245–255.
70. Kiselev V.I., Ashrafyan L.A., Muzhnek E.L., Gerfanova E. V., Antonova I.B., Aleshikova O.I., Sarkar F.H. A new promising way of maintenance therapy in advanced ovarian cancer: a comparative clinical study. *BMC Cancer*, 2018, 18, 904.
71. Каприн А.Д., Рожкова Н.И. Мастопатии. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019, 320 с.

Antitumor Activity of Indole-3-carbinol in Breast Cancer Cells: Phenotype, Genetic Pattern, DNA Methylation Inversion

A. A. POLOZNIKOV^{1,*}, E. L. MUYZHNEK², S. V. NIKULIN³, A. D. KAPRIN¹, L. A. ASHRAFYAN⁴, N. I. ROZHKOVA¹, P. G. LABAZANOVA¹, and V. I. KISELEV⁴

¹*P.A. Herten Moscow Oncology Research Center, National Medical Research Radiological Center, Moscow, 125284 Russia*

²*Russian Scientific Center of Roentgenology and Radiology, Moscow, 117997 Russia*

³*Bioclinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia*

⁴*National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: andrey.poloznikov@nmicr.ru*

Received March 12, 2020;

Revised March 26, 2020;

Accepted April 2, 2020

Abstract—The effect of indole-3-carbinol on a number of functions and characteristics of MDA-MB-231 breast cancer cells and MCF-10A healthy breast tissue cells has been studied. It was shown that indole-3-carbinol significantly reduced the proliferation and migration of MDA-MB-231 cells and does not affect these functions in MCF-10A cells. Incubation of MDA-MB-231 tumor cells with indole-3-carbinol (100 μM) for 48 h resulted in a marked decrease in the expression of the Wnt cascade genes, *CCND1* (by 28%), *SPI* (by 44%), *CDK6* (by 47%), as well as *EGFR* (by 64%) and *FASN* (by 22%) genes. Incubation of MCF-10A cell line under the same conditions induced a noticeable decrease in expression of only two genes, *EGFR* (by 16%) and *CDK6* (by 9%). In addition, indole-3-carbinol was also shown to manifest a selective DNA demethylation activity in breast tumor cells and to reverse the process of abnormal methylation and functional blockage of the anti-tumor *WIF1* gene. These data indicate that drugs containing indole-3-carbinol as an active component can be potential regulators of epigenetic processes in the treatment of breast cancer and other tumors.

Key words: indole-3-carbinol, breast cancer, epigenetics, Wnt

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-43-55