

Молекулярные маркеры метастазирования аденокарциномы предстательной железы

И.С. Кунин¹, М.М. Бобоев², О.С. Купенко³, Л.А. Мостович³, С.В. Айдагулова¹, Э.В. Григорьева³

¹ГБОУ ВПО Новосибирский ГМУ Минздрава России;

²Новосибирская областная клиническая больница;

³ФГБУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Контакты: Игорь Семенович Кунин I.S.Kunin@ngs.ru

Поиск молекулярных маркеров метастазирования и прогноза при раке предстательной железы остается актуальной задачей. В данной работе изучена взаимосвязь экспрессии генов гепараназы-1 (HPSE1) и D-глюкуронил C5-эпимеразы (GLCE) с ранним рецидивом заболевания и метастазированием через 2,5–3 года после постановки диагноза. Показано, что отношение уровней экспрессии генов HPSE1/GLCE > 1 может служить прогностическим маркером рецидива заболевания и тенденции опухоли к метастазированию. Полученные данные позволяют предложить использовать этот параметр как молекулярный маркер для диагностики метастатического процесса и оценки прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: аденокарцинома предстательной железы, молекулярные маркеры метастазирования, гепараназа-1, D-глюкуронил C5-эпимераза

Molecular markers for metastatic prostate adenocarcinoma

I.S. Kunin¹, M.M. Boboev², O.S. Kutsenko³, L.A. Mostovich³, S.V. Aidagulova¹, E.V. Grigorieva³

¹Novosibirsk state medical university;

²Novosibirsk regional clinics;

³Institute of molecular biology and biophysics, Siberian Division of RAMS, Novosibirsk

The search of molecular markers of metastasing and prognosis in prostate cancer remains an urgent task. In this study, we investigated the relationship of gene expression heparanase-1 (HPSE1) and D-glucuronil C5-epimerase (GLCE) with early disease relapse and metastasis of a 2,5–3 years after diagnosis. It was shown that the ratio of the expression levels of genes HPSE1/GLCE > 1 may serve as a prognostic relapse marker and trends of the tumour to metastasis. The data obtained suggest to use this option as a molecular marker for the diagnostics of metastatic process and the disease prognosis.

Key words: prostate adenocarcinoma, molecular markers for prostate cancer metastasis, heparanase-1, D-glucuronil C5-epimerase

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний у мужчин. Его основная опасность заключается в длительном бессимптомном течении, в результате чего заболевание часто диагностируется уже на последних стадиях, осложненных метастазированием опухоли в другие органы. Однако даже при своевременной диагностике РПЖ одним из самых актуальных вопросов остается оценка вероятности метастатического процесса и выбор оптимальной стратегии лечения пациента [1, 2]. К сожалению, на сегодняшний день в клинической практике отсутствуют надежные клинические или молекулярные маркеры, определяющие склонность опухоли к метастазированию [3, 4].

Фундаментальные исследования в этой области позволили выявить ряд перспективных генов, экспрессия которых ассоциирована с метастатическим процессом и которые могут быть использованы как потенциальные молекулярные маркеры метастазирования [5]. В основ-

ном это гены, прямо или косвенно связанные с поддержанием нормального клеточного микроокружения и контакта клетки с внеклеточным матриксом [6, 7]. Одним из наиболее перспективных среди них является *гепараназа-1 (HPSE1)*, которая разрушает гепарансульфаты (ГС) клеточной поверхности и усиливает адгезию и миграцию опухолевых клеток [8, 9]. Активация *HPSE1* в опухолях различной этиологии значительно коррелирует со степенью метастатического процесса, что позволило предположить его использование в качестве молекулярного маркера метастазирования [10, 11], в том числе при РПЖ [12]. В настоящее время ведутся работы по созданию антиметастатических препаратов, основанных на ингибировании активности *HPSE1* в опухолевых клетках [13, 14].

Однако в последнее время становится все более очевидным, что для повышения надежности и специфичности прогноза необходимо использование не какого-то единичного маркера, а целой панели молекулярных маркеров [15]. Активность *HPSE1* определяет состав ГС протеогликанов (ГСПГ) клеточной поверх-

ности, но значительный вклад в нее вносит также и активность системы биосинтеза ГС в клетке. Одним из основных ферментов биосинтеза углеводной части ГСПГ является *D-глюкуронил С5-эпимераза (GLCE)*, которая необходима для синтеза функционально зрелых ГСПГ [16]. Подавление экспрессии этого гена приводит к структурным изменениям ГС клеточной поверхности и ассоциируется с повышением экспрессии ряда прометастатических белков [17, 18], что может вносить свой вклад в усиление метастатической активности опухолевых клеток и также использоваться как маркер метастазирования.

В связи с тем, что оба эти гена являются потенциальными маркерами склонности опухоли к метастазированию и вовлечены в один биохимический процесс биосинтеза ГСПГ, **цель нашего исследования** – анализ возможности их совместного использования в качестве молекулярных маркеров метастазирования и прогноза аденокарциномы предстательной железы.

Материалы и методы

Уровень экспрессии генов *HPSE1* и *GLCE* в клеточных линиях и клинических образцах доброкачественной гиперплазии (ДГПЖ) и аденокарциномы предстательной железы определяли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [12, 18].

В работе использовали удаленные при хирургическом вмешательстве опухоли предстательной железы 20 пациентов в возрасте от 49 до 68 лет (7 – с ДГПЖ II стадии, 7 – с РПЖ и 6 – с РПЖ с метастазами). Во всех случаях рака в гистологическом заключении опухоль классифицировалась как ацинарная аденокарцинома предстательной железы. Материал немедленно фиксировали в RNALater (Invitrogen). Для прогностической оценки исследуемых молекулярных маркеров использовали результаты очередного контрольного обследования пациентов через 2,5–3 года после операции. От всех пациентов имеется письменное информированное согласие на участие в исследовании; работа выполнена в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации.

Клеточные линии LNCaP, PC3 и DU145 получены из Каролинского института (Стокгольм, Швеция) и поддерживались в питательной среде RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 Ед пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO₂. Для анализа клетки снимали обработкой 1% трипсин-ЭДТА (Sigma).

Суммарную РНК выделяли из 50–100 мг ткани или 5–10⁶ клеток с использованием реактива TRIZOL (Invitrogen), обратную транскрипцию проводили с 1 мкг выделенной РНК с использованием oligo(dT)-праймеров и M-MLV – обратной транскриптазы (Promega) по рекомендациям производителей. Ампли-

фикацию *HPSE1* и *GLCE* проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) в течение 10 циклов, после чего в реакционную смесь добавляли праймеры для гена *глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH)* и проводили еще 22 цикла амплификации. Были использованы следующие условия: 5 мин при 95 °С, далее 32 цикла по схеме 30 с при 95 °С, 30 с при 59 °С, 60 с при 72 °С, 10 мин при 72 °С.

Для реакции использовали праймеры:

- GAPDH-F – 5'-GGGCGCCTGGTCACCAG-3' и GAPDH-R – 5'-AACATGGGGGCATCAGCAGAG-3' (размер ПЦР-фрагмента 350 п.о.);
- HPSE1-F – 5'-GTAGTGATGCCATGTAACCTGAATC-3' и HPSE1-R – 5'-TTCGATCCCAAGAAGGAATCAAC-3' (размер ПЦР-фрагмента 585 п.о.);
- GLCE-F – 5'-AAGGGAGACGAGAGGGGAACGAA-3' и GLCE-R 5'-GCCACCTTTCTCATCCTGGTTC-3' (размер ПЦР-фрагмента 915 п.о.).

Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 1,8% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0) с последующим окрашиванием бромистым этидием (1 мкг/мл). В качестве стандарта молекулярной массы использовали маркерную ДНК 1 kb (Fermentas). Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы DNA Analyzer (Москва), полуколичественный анализ экспрессии генов – при помощи компьютерной программы Total Lab (Nonlinear Dynamics, Соединенное Королевство); уровень экспрессии генов оценивали в относительных единицах как отношение интенсивности амплифицированного фрагмента гена к интенсивности фрагмента стандартного гена *GAPDH*.

Результаты

На первом этапе исследования уровень экспрессии генов *HPSE1* и *GLCE* был определен в клеточных линиях РПЖ LNCaP, PC3 и DU145, которые характеризуются различной степенью гормонозависимости и метастатической активности (рис. 1). По результатам мультиплексной ОТ-ПЦР, уровень экспрессии *HPSE1* наиболее высок в гормононезависимой метастазирующей клеточной линии DU145, в то время как *GLCE* в этой линии практически не экспрессируется. И наоборот, наименее злокачественная, гормонозависимая, неметастазирующая клеточная линия LNCaP демонстрирует минимальную экспрессию *HPSE1* и максимальную экспрессию *GLCE*.

Эти данные позволили предположить, что именно такое сочетание экспрессии указанных генов (повышение экспрессии *HPSE1* и снижение экспрессии *эпимеразы*) может являться молекулярным маркером агрессивности злокачественного процесса. Для подтверждения этого предположения экспрессия *HPSE1* и *GLCE* была определена в одних и тех же клинических образцах опухолей предстательной железы (рис. 2).

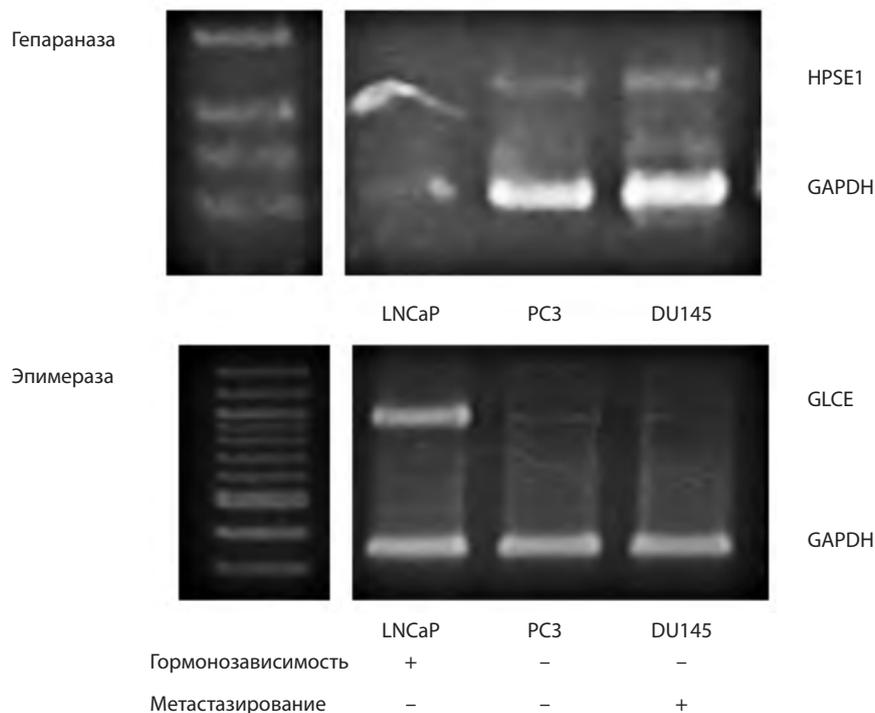


Рис. 1. Экспрессия генов *HPSE1* и *GLCE* в клеточных линиях рака предстательной железы. Мультиплексная ОТ-ПЦР, в качестве стандартного гена использован ген *GAPDH*

Согласно полученным данным ни в одном из образцов ДГПЖ, используемых в качестве контроля, не было выявлено такой комбинации экспрессии исследуемых генов, даже при наличии высокого уровня экспрессии *HPSE1* (№ 16, 19, 20), экспрессия *эпимеразы* в этих образцах была на нормальном уровне, а если и была снижена (№ 44, 45), это не сопровождалось повышенным уровнем экспрессии *HPSE1*. Однако именно такая комбинация экспрессии *HPSE1* и *эпимеразы* была обнаружена при аденокарциноме предстательной железы (№ 2, 5, 21, 46).

Соотношение уровней экспрессии генов *HPSE1* и *GLCE* может быть выражено в виде общего графика, характеризующего каждого пациента по этому параметру (рис. 3).

Было показано, что и все исследованные образцы ДГПЖ, и большинство аденокарцином предстательной железы характеризуются соотношением *HPSE1/GLCE* < 1. Однако среди аденокарцином обнаружены также образцы, в которых повышенная экспрессия *HPSE1* комбинируется со сниженной экспрессией эпимеразы, в результате чего соотношение экспрессии этих генов становится больше 1 (*HPSE1/GLCE* ≥ 1) (№ 2, 5, 21, 46).

Через 2,5–3 года после оперативного лечения аденокарцином рецидив заболевания был отмечен для пациентов № 5 (метастазы, летальный исход), № 21 и 43 (локальные метастазы, рецидив) (см. рис. 3). Двое

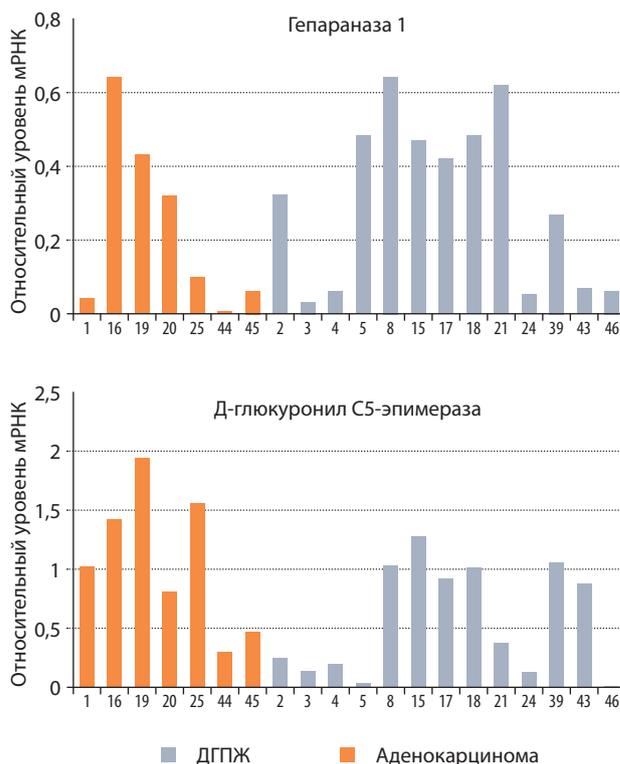


Рис. 2. Экспрессия генов *HPSE1* и *GLCE* в образцах с доброкачественной гиперплазией и аденокарциномой предстательной железы. Мультиплексная ОТ-ПЦР, в качестве стандартного гена использован ген *GAPDH*. Каждая реакция проводилась трижды, приведены средние значения ± SD (программа OriginPro 8.1)

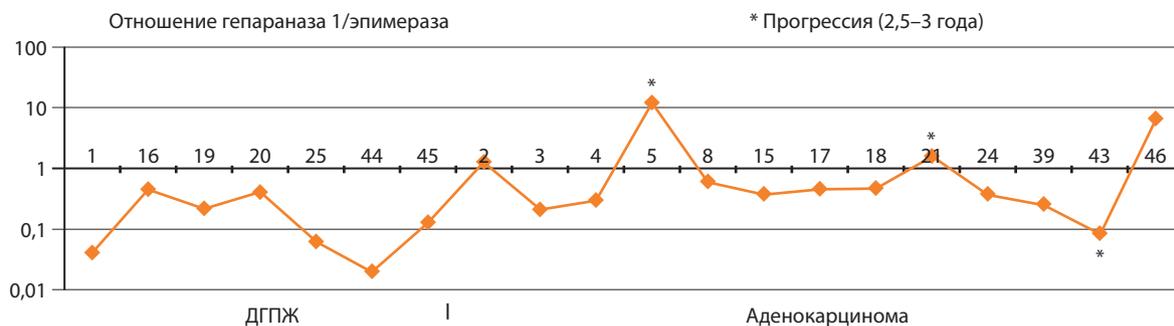


Рис. 3. Соотношение экспрессии генов *HPSE1* и *GLCE* в образцах с доброкачественной гиперплазией и аденокарциномой предстательной железы

других пациентов (№ 2 и 46) не имели рецидива заболевания за этот период времени, однако у них соотношение *HPSE1/GLCE* ≥ 1 , и они могут быть отнесены к группе риска и нуждаются, по-видимому, в более пристальном наблюдении.

Полученные результаты хорошо согласуются с клиническими данными по оценке прогноза течения заболевания у исследованных пациентов. Согласно клиническим показателям (ПСА, сумма баллов по Глиссону — индекс Глиссона, TNM), полученным при первичном обследовании пациентов, хороший прогноз имели 4 пациента (уровень общего ПСА крови в пределах 0,8 — 6,8 нг/мл, индекс Глиссона ≥ 5 , стадия процесса T1–2) и плохой прогноз — 9 пациентов (уровень общего ПСА в крови варьировал от 19 до 33 нг/мл в сочетании с индексом Глиссона от 7 до 9, стадия T3–4).

Все 4 пациента с плохим прогнозом, определенным по предлагаемому молекулярному маркеру (*HPSE1/GLCE* ≥ 1), попали в группу с плохим клиническим прогнозом, что подтверждает возможность использования данного маркера для определения прогноза течения заболевания и выбора оптимальной стратегии лечения пациентов.

Обсуждение

Полученные результаты полностью подтверждают опубликованные данные о важной роли ГСПГ для функционирования нормальной ткани [8]. При злокачественной трансформации количественно-качественный состав ГСПГ нарушен, при этом молекулярные механизмы этого процесса остаются неизвестными [19]. В последние годы появляется все больше свидетельств важной роли системы метаболизма ГС, включающей в себя как их биосинтез, так и деградацию. Среди наиболее характерных изменений отмечены усиление экспрессии *HPSE1* [10, 11] и снижение экспрессии *GLCE* [17, 18], которые были предложены в качестве маркеров прогрессирования, то есть вероятности метастазирования опухоли при РПЖ.

В данной работе нами впервые была исследована экспрессия этих генов в одних и тех же образцах опухолей и показано, что соотношение уровней экспрессии *HPSE1/GLCE* может служить более надежным

молекулярным маркером метастазирования, чем мономер маркер *HPSE1*.

Разделим условно пациентов на группы с высоким (*HPSE1/GLCE* ≥ 1) и низким (*HPSE1/GLCE* < 1) соотношением уровней экспрессии целевых генов. В 1-й группе (*HPSE1/GLCE* ≥ 1) у 2 пациентов (№ 5 и 21) наступил рецидив заболевания, который протекал наиболее быстро и остро у пациента с наиболее высоким соотношением *HPSE1/GLCE* (№ 5, метастазы, летальный исход). В целом точность прогноза составляет 50% от общего числа пациентов в этой группе даже на таком коротком временном промежутке, как 2,5–3 года. Можно предположить, что пациенты № 2 и 46 (исходный уровень ПСА 21 и 12 нг/мл соответственно) находятся в группе риска по возможному рецидиву заболевания и нуждаются в более пристальном контроле течения заболевания, что будет проверено на следующем этапе исследований (через 5 лет после постановки диагноза).

Среди остальных 9 пациентов с низким соотношением этих параметров (*HPSE1/GLCE* < 1) только у 1 пациента было отмечено прогрессирование заболевания (11% от общего числа пациентов в этой группе) (см. рис. 3). Другими словами, вероятность «пропустить» неблагоприятный прогноз составляет около 11%.

В целом наши результаты свидетельствуют о возможности использования соотношения *HPSE1/GLCE* в качестве прогностического маркера при РПЖ и необходимости дальнейших работ в этом направлении с увеличением количества клинических наблюдений.

Выводы

Таким образом, соотношение уровней экспрессии генов *HPSE1* и *GLCE* (*HPSE1/GLCE*) может быть одним из перспективных молекулярных маркеров метастазирования и прогноза течения заболевания при РПЖ, необходимых для оптимизации стратегии и тактики лечения пациентов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 12-04-01657-а.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Madu C.O., Lu Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer* 2010; 1:150–77.
2. Bjartell A., Montironi R., Berney D.M., Egevad L. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. *Acta Oncol* 2011;50 (Suppl 1):76–84.
3. Schröder F.H. Review of diagnostic markers for prostate cancer. *Recent Results. Cancer Res* 2009;181:173–82.
4. Shariat S.F., Scherr D.S., Gupta A. et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Arch Esp Urol* 2011;64(8):681–94.
5. Reed A.B., Parekh D.J. Biomarkers for prostate cancer detection. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010;10(1):103–14.
6. Zhong W.D., Han Z.D., He H.C. et al. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology* 2008;75(3–4):230–6.
7. Szarvas T., Becker M., Vom D.F. et al. Elevated serum matrix metalloproteinase 7 levels predict poor prognosis after radical prostatectomy. *Int J Cancer* 2011;128(6): 1486–92.
8. Edwards I.J. Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2012;9(4):196–206.
9. Levy-Adam F., Ilan N., Vlodavsky I. Tumorigenic and adhesive properties of heparanase. *Semin Cancer Biol* 2010; 20(3):153–60.
10. Parish C.R., Freeman C., Hulett M.D. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471(3):M99–108.
11. Vlodavsky I., Beckhove P., Lerner I. et al. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenviron* 2012; 5(2):115–32.
12. Kutsenko O.S., Kovner A.V., Mostovich L.A. et al. Expression of heparanase-1 in prostate gland tumors. *Bull Exp Biol Med* 2012;152(3):344–7.
13. Miao H.Q., Liu H., Navarro E. et al. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13(18):2101–11.
14. Liu C.J., Lee P.H., Lin D.Y. et al. Heparanase inhibitor PI-88 as adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma after curative resection: a randomized phase II trial for safety and optimal dosage. *J Hepatol* 2009; 50(5):58–68.
15. Martin S.K., Vaughan T.B., Atkinson T. et al. Emerging biomarkers of prostate cancer. *Oncol Rep* 2012;28(2):409–17.
16. Li J.P. Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;93:59–78.
17. Prudnikova T.Y., Mostovich L.A., Domanitskaya N.V. et al. Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 2010;10:27.
18. Grigorieva E.V., Prudnikova T.Y., Domanitskaya N.V. et al. D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* 2011;105(1):74–82.
19. Iozzo R.V., Sanderson R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2011;15(5):1013–31.