

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 571.27

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ мРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ДО И ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ОПУХОЛИ

© 2010 г. Т.В. Белова¹, Д.В. Новиков¹, А.В. Калугин¹, Е.С. Плеханова¹,
Н. Гурам¹, А.В. Алясова², В.В. Новиков¹

¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

² Нижегородская государственная медицинская академия

belih59@list.ru

Поступила в редакцию 04.04.2010

Продемонстрировано изменение спектра мРНК раково-тестикулярных генов в крови больных колоректальным раком в первые 5–7 дней после удаления опухоли. До операции в крови больных чаще детектировалось от 1 до 3 наименований мРНК раково-тестикулярных генов, чаще всего обнаруживалась мРНК XAGE. После операции в крови наблюдалось увеличение количества форм выявляемых мРНК. Чаще обнаруживалась мРНК SSX.

Ключевые слова: раково-тестикулярные гены, колоректальный рак.

Раково-тестикулярные гены в норме экспрессируются в клетках семенников и женских репродуктивных органах. Также их экспрессия часто индуцируется при опухолевой трансформации клеток. Большинство генов, относящихся к этой группе, локализованы на X хромосоме в виде мультигенных семейств [1]. На данный момент известно 70 семейств раково-тестикулярных белков. Функции, которые выполняют эти белки, до конца не ясны, однако было показано их участие в регуляции клеточного цикла, процессах апоптоза, а также в работе транскрипционных комплексов [2]. Ограниченная экспрессия раково-тестикулярных генов позволила использовать их мРНК или сами белки в качестве биомаркеров опухолевого процесса. Продемонстрирована прогностическая роль обнаружения экспрессии раково-тестикулярных генов GAGE и MAGE-C(CT7) в клетках миеломы [3], генов MAGE-A и NY-ESO-I в клетках опухолевого очага больных раком легкого [4] и меланомы [5], гена MAGE-C(CT7) в клетках опухоли молочной железы [6]. Недавно была показана возможность использования мРНК раково-тестикулярного гена SPAG9 для ранней диагностики рака уретры [7]. Также установлено, что мРНК раково-тестикулярных генов с достаточно высокой частотой обнаруживается в периферической крови онкологических больных как на поздних, так и на ранних

стадиях заболевания [8, 9]. При колоректальном раке (КР) также обнаружена экспрессия раково-тестикулярных генов как клетками опухолевого очага, так и метастазирующими клетками, попавшими в периферическую кровь больного [10]. Однако остался неизученным характер экспрессии раково-тестикулярных генов в периферической крови больных КР до и после удаления опухоли. Поэтому целью настоящей работы стало сравнение частоты обнаружения мРНК MAGE-A1-6, MAGE-C, XAGE, NY-ESO, PAGE, GAGE и SSX в периферической крови больных КР до и после операции.

Материалы и методы

Исследовали образцы периферической крови и клеток опухолевых очагов, полученных от 49 больных КР T₁-4N₀-3M₀₋₁, поступивших на лечение в хирургическое отделение больницы им. Семашко в 2008 г. Стадию онкологического процесса определяли в соответствии с Международной классификацией опухолей по системе TNM (ВОЗ, 1990). Больные получали лечение в объеме резекции опухолевого очага. Кровь на исследование брали до операции и через 5–7 дней после операции. В качестве отрицательного контроля использовали образцы периферической крови 25 здоровых волонтеров.

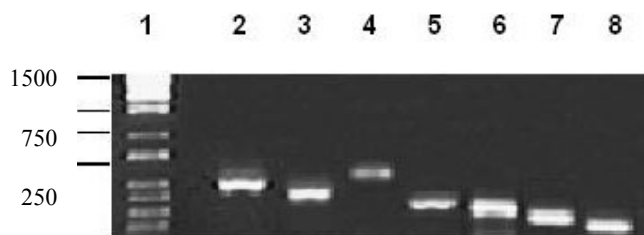


Рис. 1. Электрофореграмма детекции мРНК раково-тестикулярных генов методом ОТ-ПЦР: 1 – маркер размерности ДНК; 2 – κДНК PAGE; 3 – κДНК MAGe-A1-6; 4 – κДНК GAGE; 5 – κДНК XAGE; 6 – κДНК NY-ESO; 7 – κДНК MAGe-C7; 8 – κДНК SSX

Образцы периферической крови и опухолевых очагов собирали в буферный раствор, содержащий 4 М гуанидина, 0.5% тритона X, 25 мМ ацетата натрия, 10% фенола. РНК выделяли из образцов методом фенол-хлороформной экстракции.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием смеси обратных праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV («Promega», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию κДНК исследуемых раково-тестикулярных генов проводили в два раунда полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, специфичных к местам соединения экзонов [9]. На первом этапе проводили 35 циклов множественной ПЦР ($94^{\circ} - 30$, $60^{\circ} - 30$, $72^{\circ} - 45$ секунд) с использованием праймеров, специфичных ко всем исследуемым мРНК. С целью раздельной амплификации представителей каждого семейства исследуемых мРНК раково-тестикулярных генов на втором этапе проводили 25 циклов гнездовой ПЦР ($94^{\circ} - 30$, $60^{\circ} - 30$, $72^{\circ} - 45$ секунд) в присутствии специфических праймеров. Результаты реакции оценивали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромиды этидия.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен пример обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в исследуемых образцах методом ОТ-ПЦР. При анализе экспрессии раково-тестикулярных генов в клетках опухолевого очага больных КР показано, что чаще других выявлялась мРНК SSX и MAGe-A (у 59% и 55% больных). Матричная РНК NY-ESO-I, PAGE, GAGE1-8, XAGE и MAGe-C была обнаружена в 33, 29, 29, 33 и 10% случаев соответственно (таблица). Суммарная частота обнаружения мРНК исследуемых раково-тестикулярных генов в образцах опухолевых очагов составила 85.5%. Следует

отметить, что в каждом из исследуемых образцов была обнаружена мРНК как минимум двух раково-тестикулярных генов, а в 26 образцах обнаруживались мРНК от трех до семи исследуемых раково-тестикулярных генов.

В образцах периферической крови больных КР, взятых до удаления опухоли, наиболее часто обнаруживалась мРНК XAGE (33%) и MAGe-A (29%). Частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов MAGe-C, SSX, PAGE, GAGE1-8 и NY-ESO-I составила 25, 22, 18, 18 и 14% соответственно. Суммарная частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в периферической крови больных КР до операции составила 80%. В большинстве случаев в образцах периферической крови, взятых до операции, выявлялась мРНК только одного из исследуемых раково-тестикулярных генов. Одновременная экспрессия двух-пяти раково-тестикулярных генов была обнаружена в 26 из 49 исследуемых образцов периферической крови больных КР, взятой до хирургического удаления опухоли.

Исследование частоты обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в образцах периферической крови, взятой у тех же больных через 5–7 дней после хирургического вмешательства, показало результаты, сходные с характером экспрессии раково-тестикулярных генов в образцах опухолевого очага. Установлено, что как и в опухолевых очагах, наиболее часто обнаруживались мРНК SSX и MAGe-A (в 35 и 33% случаев). Матричная РНК NY-ESO-I, PAGE, GAGE1-8 и MAGe-C была обнаружена у 13, 31, 31 и 21% больных соответственно. Интересно отметить, что суммарная частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в периферической крови, взятой после хирургического удаления опухоли у тех же больных, была выше, чем в клетках опухолевого очага и составила 90%.

На рис. 2 представлена диаграмма, иллюстрирующая распределение количества исследуемых

Таблица

Частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в исследуемых образцах

Материал для исследования	Количество положительных проб (процентное содержание)					
	GAGE+PAGE	MAGE-A1-6	MAGE-C	XAGE	SSX	NY-ESO
Кровь до операции (n = 49)	9(18)	16 (33)	12 (25)	14 (29)	11 (22)	7 (14)
Клетки опухолевого очага (n = 49)	14(29)	27 (55)	5 (10)	16 (33)	29 (59)	16 (33)
Кровь через 5–7 дней после операции (n = 48)	15 (31)	17 (35)	10 (21)	14 (29)	17 (35)	6 (12.5)

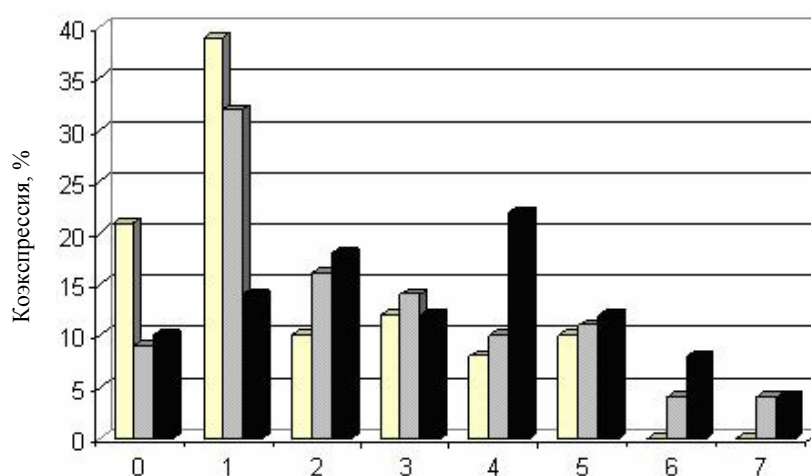


Рис. 2. Кожэкспрессия мРНК раково-тестикулярных генов в крови и клетках опухолевого очага: 0–7 – количество форм мРНК раково-тестикулярных генов, выявленных в одной пробе; белая штриховка – кровь больных колоректальным раком, взятая до операции; серая с черным штриховка – кровь больных колоректальным раком, взятая на 5–7 сутки после операции; черная штриховка – образцы опухолевого очага больных колоректальным раком

двух мРНК раково-тестикулярных генов, выявленных в одном образце. Как видно из рисунка, в образцах опухолевого очага КР чаще обнаруживается от двух до семи наименований мРНК. В образцах периферической крови, взятой до хирургического вмешательства, чаще всего выявлялись образцы, содержащие мРНК только одного из исследуемых генов. После удаления опухоли в образцах периферической крови тех же больных преимущественно детектировалось от двух до четырех наименований мРНК, а в 3 образцах было обнаружено присутствие 7 различных мРНК, что сходно с результатами, полученными для опухолевого очага.

В клетках опухолевого очага максимальная частота обнаружения была показана для мРНК SSX. В образцах периферической крови до операции чаще обнаруживались мРНК гена XAGE,

а после операции, как и в клетках опухолевого очага, наблюдалось повышение частоты обнаружения мРНК SSX. Поскольку выявление мРНК раково-тестикулярных генов в образцах периферической крови онкологических больных может являться показателем циркуляции опухолевых клеток в кровяном русле, можно предположить, что при хирургическом удалении опухоли происходит попадание опухолевых клеток в кровяное русло и за счет этого возрастает количество выявляемых в периферической крови наименований мРНК раково-тестикулярных генов.

Интересно отметить, что индивидуальная встречаемость каждого вида мРНК была выше в опухолевых очагах, чем в периферической крови больных колоректальным раком, причем как до, так и после операции, за исключением мРНК MAGE-C. Матричная РНК MAGE-C гена

чаще выявлялась в крови больных колоректальным раком, чем в клетках опухолевого очага. Причем максимальное число проб, положительных на мРНК MAGE-C, было зафиксировано в крови больных до операции (25%), чем в крови больных после резекции опухоли (21%). Только 10% протестированных образцов опухолевого очага были положительны на MAGE-C мРНК. Возможно данный антиген выполняет особую роль, характерную для опухолевых клеток, циркулирующих в крови больных колоректальным раком.

Таким образом, продемонстрировано изменение спектра мРНК раково-тестикулярных генов в крови больных колоректальным раком в первые 5–7 дней после удаления опухоли. До операции в крови больных чаще детектировалось от 1 до 3 наименований мРНК раково-тестикулярных генов, после операции в крови наблюдалось увеличение количества форм выявляемых мРНК. В клетках опухолевого очага максимальная частота обнаружения была показана для мРНК SSX. В образцах периферической крови до операции чаще обнаруживались мРНК гена XAGE, а после операции, как и в клетках опухолевого очага, наблюдалось повышение частоты обнаружения мРНК SSX. Специфический тип экспрессии был продемонстрирован для мРНК MAGE-C. В отличие от других мРНК, она чаще выявлялась в образцах крови, чем в клетках опухолевых очагов.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и гранта РФФИ № 09-04-97081_р_поволжье_а.

Список литературы

1. Zendman J. W., Ruiters J.D., Van Muijen G.N. Cancer/Testis-Associated Genes: Identification, Expression Profile, and Putative Function // *J. Cellular Physiology*. 2003. V. 194. P. 272–288.
2. Soudeh G.F., Modarressi M.H. Cancer-Testis Antigens: Potential Targets for Cancer // *Immunotherapy*. 2009. V. 12. P. 395–404.
3. Andrade V.C., Vettore A.L., Roberta S.F. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients // *Cancer Immunity*. 2007. V. 8. P. 2–11.
4. Grah J.M., Kanojia D.E., Sushma S.S. Sperm-associated antigen 9 is a biomarker for early cervical carcinoma // *Cancer Immunity*. 2008. V. 3. P. 731–737.
5. Velazques E.F., Jungbluth A.A., Yancovitz M. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM) - correlation with prognostic factors // *Cancer Immunity*. 2008. V. 7. P. 11–13.
6. Kruger S., Ola V.A., Feller A.C. Expression of Cancer-Testis Antigen CT7 (MAGE-C1) in Breast Cancer: An Immunohistochemical Study with Emphasis on Prognostic Utility // *Pathology Oncology Res*. 2007. V. 13. P. 91–96.
7. Gard M., Kanojia D., Salhan S. Sperm-associated antigen 9 is a biomarker for early cervical carcinoma // *Cancer*. 2009. V. 5. P. 23–27.
8. Yokoe T., Tanaka F., Inoue H. Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis // *Cancer Res*. 2008. V. 4. P. 1074–1082.
9. Новиков Д.В., Белова Т.В., Пегов Р.Г. и др. Частота обнаружения мРНК MAGE-A в крови онкологических больных // *Клиническая и лабораторная диагностика*. 2009. № 4. С. 25–27.
10. Ming L., Yuan Y.H., Han Y. Expression Profile of Cancer-Testis Genes in 121 Human Colorectal Cancer Tissue and Adjacent Normal Tissue // *Clinical Cancer Research*. 2005. V. 11. P. 1809–1814.

CANCER-TESTIS GENE mRNA OCCURRENCE IN COLORECTAL CANCER PATIENTS BEFORE AND AFTER TUMOR RESECTION

*T.V. Belova, D.V. Novikov, A.V. Kalugin, E.S. Plechanova,
N. Gouram, A.V. Alyasova, V.V. Novikov*

The change of cancer-testis gene mRNAs spectrum in blood of colorectal cancer patients during 5–7 days after tumor resection has been demonstrated. From 1 to 3 cancer-testis mRNAs were detected in patient blood before the resection, and the detection of XAGE mRNA prevailed. An increase in different forms of cancer-testis mRNAs was found in the blood of the same patients after resection, SSX mRNA being detected more frequently.

Keywords: cancer-testis genes, colorectal cancer (colon cancer).