

УДК 571.2;616-006.6

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ICAM-1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ
БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА**© 2010 г. *Д.И. Князев*¹, *Д.В. Новиков*¹, *Т.А. Сахарнова*², *Н.Б. Преснякова*³,
*О.С. Кузнецова*¹, *Ж.А. Казацкая*¹, *Н.А. Спиридонова*³, *А.В. Алясова*², *В.В. Новиков*^{1,3}¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского² Нижегородская государственная медицинская академия³ Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

Dmitry-kn@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.04.2010

Показано, что повышение сывороточного уровня растворимых молекул ICAM-1 у больных раком толстого кишечника не связано с присутствием в клетках опухолевых очагов матричной РНК, кодирующей растворимую форму ICAM-1, имеющую делецию в трансмембранном регионе. Однако наличие в опухолевых клетках матричной РНК растворимой формы ICAM-1 может быть ассоциировано с пониженным риском возникновения метастазов.

Ключевые слова: ICAM-1, колоректальный рак, клеточная адгезия, созревание мРНК.

Введение

ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) – мембранный гликопротеин молекулярной массой 80–114 кДа, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. ICAM-1 вовлечён в клеточные адгезивные контакты, а также в адгезивные контакты между клеткой и межклеточным матриксом. В норме ICAM-1 экспрессируется клетками иммунной системы – Т-лимфоцитами и моноцитами, а также представлен на поверхности ряда других клеток, включая фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки [1]. Адгезивные контакты, выполняемые с участием ICAM-1, являются необходимым звеном реализации следующих процессов: образование иммунного синапса [2], трансэндотелиальная миграция лейкоцитов и активация Т-клеток, где взаимодействие ICAM-1 со своими лигандами инициирует коактивационный сигнал [3].

Изменения уровня экспрессии молекулы ICAM-1 на мембране клеток наблюдаются при активации иммунной системы, воспалительных и опухолевых процессах. Согласно опубликованным данным, повышенная экспрессия молекул ICAM-1 может как подавлять развитие опухоли, так и способствовать агрессивному опухолевому росту и усилению метастатического потенциала. Показано, что при раке кишечника и меланоме повышенный уровень экспрессии ICAM-1 клетками опухолей ассоциирован с высоко дифференцированными новообразованиями,

а также с высокой восприимчивостью к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами [4, 5]. С другой стороны, при раке лёгкого и раке молочной железы уровень экспрессии молекул ICAM-1 положительно коррелирует с метастатическим потенциалом опухолей [6, 7]. Клетки опухолевого очага могут способствовать усиленной экспрессии ICAM-1 на поверхности эндотелия близлежащих лимфатических сосудов и лимфоузлов, таким образом создавая микросреду, благоприятную для распространения опухоли [8].

Помимо изменений экспрессии на поверхности малигнизированных клеток, наблюдаются изменения сывороточного уровня растворимого ICAM-1 (sICAM-1) [9]. Образование растворимой формы происходит либо за счёт схода с мембраны путём протеолитического расщепления, либо путём альтернативного сплайсинга матричной РНК (мРНК). В последнем случае удаляется участок пре-мРНК, кодирующий часть трансмембранного домена (рис. 1), в результате чего также происходит сдвиг рамки считывания и терминация трансляции [10]. В

1 1720-CCGCAAGGUGACCGUGAAUGUGCUCUCCCC-1750
2 1720-CCGCAAG-----CCCC-1731

Рис. 1. Участок мРНК ICAM-1, кодирующий трансмембранный домен. 1 – полноразмерный вариант мРНК (соответствует мембранной форме), 2 – вариант с делецией 19 нуклеотидных оснований (соответствует растворимой форме). Позиции крайних нуклеотидов указаны относительно всей молекулы мРНК

настоящей работе проведено исследование образцов опухолевых очагов толстого кишечника на наличие мРНК, кодирующих мембранную и растворимую формы ICAM-1; выполнена оценка содержания растворимой формы ICAM-1 в сыворотке крови больных колоректальным раком; проведено сопоставление параметров экспрессии ICAM-1 и особенностей течения заболевания.

Экспериментальная часть

Пациенты. В исследование были включены 49 больных колоректальным раком с хирургически извлечённой первичной опухолью на разных стадиях заболевания. Возраст больных находился в диапазоне от 45 до 84 лет, средний возраст составил 65 лет.

Выделение мРНК. Для выделения использовали часть опухоли объёмом 200 мкл. Процедуру проводили согласно предложенному ранее методу [11] с применением следующих реагентов: 4М гуанидин изотиоционат; кислый водонасыщенный фенол, 3М ацетат натрия с рН 5.2; хлороформ; изопропиловый спирт; 75%-ный этанол.

Праймеры. Для обратной транскрипции использовали праймер R1700, комплементарный участку VII экзона гена ICAM-1, его последовательность – 5'-TGTTCA GTGTGGCACCACCTG-3'. Определение кДНК, соответствующей различным формам мРНК ICAM-1, выполняли с использованием общего прямого праймера F1220 - 5'-GAGCTTCGT GTCCTGTATGG-3'. Обратный праймер для детекции мРНК мембранной формы – R22, его последовательность – 5'-СТСАТАССGGGGGAGAGCA-3', для детекции мРНК растворимой формы – TMR – 5'-СТСАТАССGGGGGCTCGCG-3'.

Обратная транскрипция–полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Реакцию обратной транскрипции проводили в соответствии с предложенным ранее методом [11] с применением обратной транскриптазы M-MuV («*Fermentas*», Латвия), конечная концентрация фермента составляла 4 Ед/мл. Использовали амплификаторы марки *Thermal Cycler 2720* («*Applied Biosystems*», США) или «Терцик» («ДНК-Технологии», Россия).

Детекцию кДНК, соответствующей различным формам мРНК ICAM-1, выполняли с использованием разновидности ПЦР, называемой *hotstart*. Отличие *hotstart* от обычного способа проведения ПЦР состоит в том, что полимеразу вносят в «горячую» смесь, когда возможная неспецифическая гибридизация праймеров друг

с другом и с матрицей не произошла – это позволяет в значительной степени повысить специфичность реакции. Конечная концентрация каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов составила 160 ммоль/мкл, ДНК-полимеразы – 5 Ед/мл. После внесения полимеразы проводили базовую ПЦР в следующем режиме: 94°C – 30 сек, 66°C – 45 сек, 72°C – 60 сек, 50 циклов амплификации [12]. Размеры амплифицированных участков кДНК мембранной и растворимой форм ICAM-1 составили 267 и 258 пар нуклеотидных оснований соответственно (рис. 2). Визуализацию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле с применением бромистого этидия в качестве красителя.

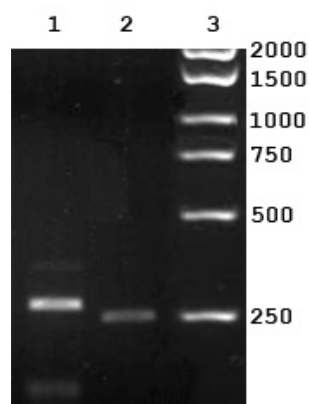


Рис. 2. Анализ результатов ОТ-ПЦР. 1 – кДНК мембранной формы ICAM-1, 2 – кДНК растворимой формы ICAM-1, 3 – маркер размеров молекул. Размеры приведены в парах нуклеотидных оснований

Иммуноферментный анализ. Определение уровня растворимого ICAM-1 в сыворотке крови выполнено двухсайтовым иммуноферментным методом [13] с использованием моноклональных антител ИКО-184, специфичных к ICAM-1 и меченных пероксидазой хрена, а также поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека. Моноклональные антитела ИКО-184 предоставлены Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина.

Результаты и их обсуждение

Встречаемость мРНК мембранной и растворимой форм ICAM-1 в опухолевых очагах больных колоректальным раком составила 83.7% и 28.6% соответственно (рис. 3). Необходимо отметить, что вариант мРНК, кодирующий растворимую форму ICAM-1, встречался только в тех образцах, где была выявлена мРНК мембранной формы. У 15 из 49 больных к мо-

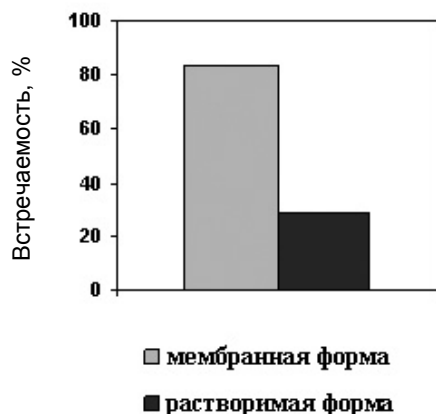


Рис. 3. Встречаемость мРНК ICAM-1 в опухолевых очагах больных колоректальным раком

менту удаления опухоли были зафиксированы регионарные и отдалённые метастазы. При этом наличие мРНК, кодирующей растворимую форму ICAM-1, наблюдалось лишь в 2 случаях из 15 (13.3%). В клетках 34 больных, не имеющих метастазов, мРНК растворимой формы ICAM-1 наблюдалась в 12 случаях, что составило 35.3% от числа больных данной подгруппы. То есть в отсутствие метастазов мРНК ICAM-1 выявлялась в опухолевых клетках в три раза чаще, чем у больных с метастазами. Однако, в связи с малым числом наблюдений, на данном этапе работы мы не можем утверждать, что эти различия статистически значимы. Если предположить, что наличие мРНК растворимой формы ICAM-1 в клетках опухоли ассоциировано с пониженным риском возникновения метастазов, то это может быть обусловлено несколькими причинами. Продукция опухолевыми клетками растворимых молекул ICAM-1 может препятствовать связыванию с лигандами своего мембранного аналога, что ведёт к сниженной адгезии с близлежащими тканями и к «затуханию» сигнальных путей, таких как MAPK/ERK и PI3K/AKT, которые ответственны за пролиферацию, угнетение апоптоза и инвазивный потенциал новообразования [14–16]. Кроме того, нельзя исключить возможности того, что растворимая молекула ICAM-1, являющаяся продуктом мРНК, образующейся путем альтернативного сплайсинга, может выступать как активатор противоопухолевого иммунитета, сигнализируя о локальном патологическом процессе.

В сыворотке больных раком толстого кишечника был определен уровень растворимых молекул ICAM-1, который в среднем в 2.1 раза превышал норму (рис. 4). Полученные данные согласуются с результатами других лабораторий [17, 18]. Сывороточный уровень раствори-

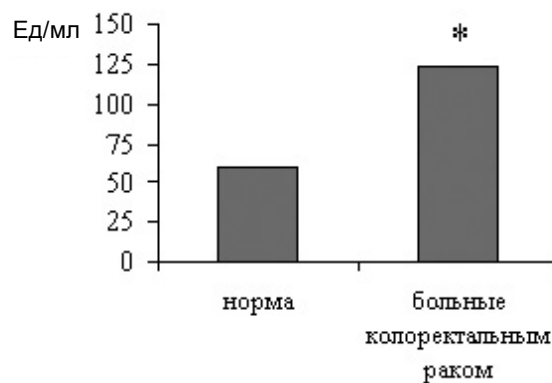


Рис. 4. Сывороточное содержание растворимых молекул ICAM-1. * – статистически значимые отличия в сравнении с нормой

мых молекул ICAM-1 составил у здоровых волонтеров величину, равную 60 ± 10 Ед/мл, у больных раком толстого кишечника он в среднем был равен 124 ± 10 Ед/мл.

У больных с выявленной в опухолевом очаге мРНК ICAM-1 сывороточное содержание растворимых молекул ICAM-1 равнялось 119 ± 61 Ед/мл. Отсутствие соответствующей мРНК сопровождалось статистически недостоверным изменением сывороточного уровня растворимых молекул ICAM-1 в сторону повышения - 150 ± 116 Ед/мл (рис. 5). То есть повышение сывороточного уровня молекул ICAM-1 у больных колоректальным раком по сравнению с нормой не было связано с наличием мРНК ICAM-1 в клетках опухолевых очагов.

В соответствии с литературными данными, увеличение уровня растворимых молекул ICAM-1 в периферической крови может быть результатом их протеолитического слущивания с мембран клеток иммунной системы и эндотелия сосудов в результате активации иммунного ответа и миграции иммунокомпетентных клеток в пораженные регионы [9]. Вопрос о вкладе молекул ICAM-1, образующихся в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК, в общий пул растворимых молекул ICAM-1 остается открытым. Поскольку у больных раком толстого кишечника в отсутствие в опухолевых клетках мРНК ICAM-1 сывороточное содержание суммарной фракции ICAM-1 даже имеет тенденцию к увеличению, можно заключить, что растворимый ICAM-1, образующийся в результате альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках и несущий вследствие этого делецию в трансмембранном домене, не имеет определяющего влияния на общую концентрацию молекул ICAM-1 в периферическом кровотоке. Однако намного более высокая частота встре-

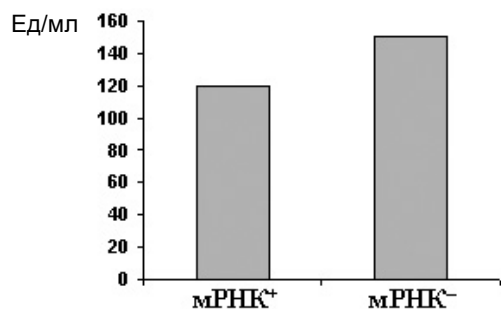


Рис. 5. Сывороточный уровень растворимых молекул ICAM-1 у больных колоректальным раком. мРНК⁺ – наличие мРНК ICAM-1 в опухолевом очаге, мРНК⁻ – отсутствие мРНК ICAM-1 в опухолевом очаге.

чаемости мРНК ICAM-1 в опухолевых клетках больных без метастазов позволяет сделать предположение о значимости этой формы растворимой молекулы ICAM-1 в патогенетических механизмах метастазирования на локальном уровне в опухолевых очагах больных раком толстого кишечника.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Список литературы

1. Luo B., Carman C.V., Springer T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling // *Ann. Rev. Immunol.* 2007. V. 25. P. 619–647.
2. Reichardt P., Dornbach B., Gunzer M. The molecular makeup and function of regulatory and effector synapses // *Immunol. Rev.* 2007. V. 218. P. 165–177.
3. Bezman N., Coretzky G. Compartmentalization of ITAM and integrin signaling by adapter molecules // *Immunol. Rev.* 2007. V. 218. P. 9–28.
4. Wang Q., Li B., Liu B. et al. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009. № 28. P. 139–145.
5. Hamai A., Meslin F., Benhalam H. et al. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 23. P. 9854–9864.
6. Huang W., Chan S., Yang T. et al. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer

cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel α -methylene- γ -butirolactone derivatives // *Carcinogenesis.* 2004. V. 25. № 10. P. 1925–1934.

7. Rosette C., Both R.B., Oeth P. et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells // *Carcinogenesis.* 2005. V. 26. № 5. P. 943–950.

8. Kawai Y., Kaidoh M., Ohhashi T. MDA-MB-231 produces ATP-mediated ICAM-1-dependent facilitation of the attachment of carcinoma cells to human lymphatic endothelial cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. № 295. P. 1123–1132.

9. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 249 с.

10. Wakatsuki T., Kimura K., Kimura F. et al. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues // *Cell Adhes. Commun.* 1995. № 3. P. 283–292.

11. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2222 p.

12. Boehringer Mannheim: *PCR Applications Manual.* Germany: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1995. 194 p.

13. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с.

14. Rahn J.J., Shen Q., Mah B.K. et al. MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1 // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 29386–29390.

15. Robey R.B., Hay N. Is Akt the «Warburg kinase»? - Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis // *Semin. Cancer Biol.* 2009. V. 19. № 1. P. 25–39.

16. Valcarcel M., Arteta B., Jaureguibeitia A. et al. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis // *J. Transl. Med.* 2008. № 6. P. 57–68.

17. Maruo Y., Gochi A., Kaihara A. et al. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer // *Int. J. Cancer.* 2002. V. 100. P. 486–490.

18. Araki T., Miki C., Kusunoki M. Biological implications of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in colorectal cancer patients. // *Scand. J. Gastroenterol.* 2001. V. 26. P. 399–404.

ICAM-1 GENE EXPRESSION IN COLORECTAL CANCER CELLS

D.I. Knyazev, D.V. Novikov, T.A. Sakharnova, N.B. Presnyakova, O.S. Kuznetsova, Zh.A. Kazatskaya, N.A. Spiridonova, A.V. Alyasova, V.V. Novikov

It is shown that an increase in serum levels of soluble ICAM-1 in colorectal cancer patients is not associated with the presence of the alternative form of ICAM-1 mRNA in primary colorectal tumors. The alternative form is characterised by a deletion in the transmembrane region and encodes soluble ICAM-1. The presence of mRNA encoding soluble ICAM-1 in tumor cells, however, may be associated with a reduced risk of metastases.

Keywords: ICAM-1, colorectal cancer, cell adhesion, mRNA processing.