https://doi.org/10.29296/25877305-2019-02-07

Локализованный рак предстательной железы: транскрипторные механизмы раннего рецидивирования

Ф. Бова, кандидат медицинских наук
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России, Ростов-на-Дону
E-mail: alald@inbox.ru

Авторами показано, что при локализованном раке предстательной железы одним из механизмов активации транскрипторного потенциала раковых клеток и раннего рецидивирования заболевания является повышение экспрессии генов HIF1α и NF-κB в ткани железы.

Ключевые слова: онкология, рак предстательной железы, биохимический рецидив, экспрессия генов, транскрипторные факторы.

Для цитирования: Бова Ф. Локализованный рак предстательной железы: транскрипторные механизмы раннего рецидивирования // Врач. – 2019; 30 (2): 41–43. https://doi.org/10.29296/25877305-2019-02-07

Опухолевая клетка посредством изменения экспрессии генов способна контролировать ключевые механизмы роста, размножения и миграции клеток [1]. В результате снижения или повышения экспрессии гена изменяется синтез соответствующего белка или некодирующей РНК [2]. В последнее время выявлено, что индуцированный гипоксией фактор-1α (HIF1α – hypoxia-inducible factor 1 alpha) участвует в активации транскрипционных механизмов, влияющих на интенсивность пролиферации раковых клеток [3], в том числе и при раке предстательной железы (РПЖ) [4], причем повышение экспрессии HIF1α в опухолевых клетках не всегда связано с гипоксией, а может быть обусловлено, в частности, накоплением воспалительных медиаторов [5]. Насколько контроль транскрипторных механизмов в ткани опухоли предстательной железы (ПЖ) связан с изменением уровня экспрессии соответствующих транскрипторных генов, и как эта связь влияет на ранее рецидивирование локализованного РПЖ, остается неясным. В связи с изложенным целью исследования было изучение экспрессии генов, ответственных за зависимый от гипоксии контроль транскрипции опухолевых клеток у больных локализованным РПЖ с биохимическими рецидивами (БР) и без таковых после радикальной простатэктомии (РПЭ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделении онкоурологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Центре урологии, нефрологии и гемодиализа ГБУ Ростовской области «Областная больница №2» в 2015–2018 гг. Исследование было одобрено Локальным независимым этическим комитетом ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России.

У всех пациентов в сыворотке крови исходно и через каждые 3 мес после РПЭ определяли содержание простатоспецифического антигена (ПСА) методом иммуноферментного анализа на фотометре «Multiscan-P2» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Основанием для заключения о БР были превышение концентрации ПСА в крови >0,2 нг/мл в 3 последовательных измерениях, проведенных с интервалом ≥2 нед.

В основную группу вошли 56 пациентов с локализованным РПЖ, у которых в течение 2 лет после РПЭ был выявлен БР; 60 больных локализованным РПЖ без рецидива составили группу сравнения и 55 пациентов, у которых биоптаты ПЖ были взяты в пределах здоровых тканей при удалении доброкачественной гиперплазии ПЖ, – контрольной группу.

Возраст больных РПЖ колебался от 57 до 74 лет (в среднем в основной группе – 66,7±2,1 года, в группе сравнения – 62,4±2,5 года, в контрольной группе – 63,1±2,4 года).

При микроскопическом исследовании фиксированных образцов ткани ПЖ, взятых при операции, отмечали гистологический тип опухоли, степень гистопатологической дифференцировки. У всех больных основной группы и группы сравнения гистологический тип опухоли ПЖ был представлен аденокарциномой.

Фрагменты ткани помещали в пробирку с 350 мкл буфера набора для лизиса клеток и связывания общей РНК RNeasyMiniKit (Qiagen, Германия), включая 1% β-меркаптоэтанол. Экстракцию, выделение и элюирование общей РНК проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen, США) на флюориметре Qubit™ (Invitrogen, США).

Для получения комплементарной ДНК (кДНК) 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции (ОТ) с помощью полимеразной цепной реакции – ПЦР (метод RT-PCR) и набора реагентов с обратной транскриптазой Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Германия) и использованием 10 мкМ p(dN) 8 рэндомных гексамерных праймеров (TIB MOLBIOL, Германия). Перед транскрипцией РНК денатурировали в течение 5 мин при 65°С с последующим охлаждением на льду. Обратная транскриптаза Omniscript была инактивирована при нагреве реакционной смеси в течение 5 мин при 93°С; кДНК хранилась при -20°С до RT-qPCR-

анализа; кДНК разводили в соотношении 1:5 перед использованием в качестве ПЦР-матрицы.

При проведении ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для анализа экспрессии генов *HIF1α* и *NF-κB1* использовали систему ABI Prism (Applied Biosystems, США), включающую готовые праймеры и TaqMan-зонды, меченные флюоресцентным красителем FAM 5'-(6-карбоксифлуоресцеин) с гасителем красителя TAMPA (6-карбокситетраметилродамин) на тимидиновой основе вблизи 3'-конца. Реакционная смесь содержала ПЦР-буфер [200 мМТрис-HCl (pH 8,4), 500 мМKCl], 4,5 мМ$MgCl_2$, 1 мМdNTP, 0,5 U платиновой Taq ДНК-полимеразы (Invitrogen, Германия), 0,2 мкМ каждого праймера, 120 нМ специфического зонда TaqMan и 1 мкМ 6-карбокси-X-родамина (Molecular Probes, Нидерланды); 2 мкл предварительно разбавленной кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в конечном объеме 25 мкл. Условия цикла были следующими: первичная денатурация 94°C – 3 мин; 45 циклов: 94°C – 20 с, отжиг и элонгация праймера при температуре, специфичной для каждого гена, в течение 30 с. Определение экспрессии каждого гена в ПЦР-РВ проводили 3-кратно.

В качестве референсного выступал ген *HPRT1* (Hypoxanthinephosphoribosyltransferase-1) (NM_000194, GenBank). Для гена *HPRT1* использовали готовые праймеры фирмы Roche Applied Science (Германия) системы Light Cycler-h-HPRT 181 1.97 (Housekeeping Gene Set).

Для ПЦР-РВ использовали термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США), специализированное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1). Количественную оценку экспрессии генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [6] как разность значений пороговых циклов реакции (Ct) для исследуемого и референсного генов. Относительный уровень (Expr) определяли как отношение медиан рассчитываемых показателей для каждого гена в основной группе и группе сравнения при РПЖ к аналогичному показателю в контрольной группе, а также между основной группой и группой сравнения (кратность увеличения или уменьшения экспрессии гена одной группы по отношению к другой).

Образцы опухолевой ткани для иммуногистохимического (ИГХ) исследования готовили по стандартной методике. Для выявления белка HIF1α был применен иммунопероксидазный метод (EnVision/HRP, DakoCytomation, Дания); для оценки экспрессии HIF1α подсчитывали количество позитивных клеток на 1000 клеток. Ранжирование числа позитивных опухолевых клеток было следующим: $^{+}$ – в пределах 10–25% позитивных клеток; $^{++}$ – 26–50% клеток; $^{+++}$ – >50%. Кроме того, проводили качественную оценку окрашивания в клетке: цитоплазматическое (ЦТМ), ядерное или смешанный тип окрашивания (ЯД-ЦТМ).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программы Statistica 10 (StatSoft, США). В работе использовали метод описательной статистики, расчет относительных показателей и оценки их доверительной вероятности, анализ взаимосвязи признаков по методу оценки таблиц сопряженности по критерию χ^2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение больных в основной группе в зависимости от клинической стадии РПЖ было следующим: T1c – у 3 (5,3%), T2a – у 5 (8,9%), T2b – у 21 (37,5%), T2c – у 27 (48,2%) из 56 пациентов. Высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤6 баллов по шкале Глисона) встречалась у 6 (10,7%), умеренная (7 баллов) – у 45 (80,4%) и низкая (8–10 баллов) – у 5 (8,9%) больных.

В группе сравнения распределение с учетом стадии РПЖ было следующим: T1c – у 3 (5%), T2a – у 3 (5%), T2b – у 21 (35%) и T2c – у 33 (55%) больных. Высокая степень гистопатологической дифференцировки (≤6 баллов по Глисону) встречалась у 8 (7,1%), умеренная (7 баллов) – у 48 (91,6%), низкая (8–10 баллов) – у 4 (1,3%) больных.

В зависимости от риска рецидива РПЖ больные основной группы и группы сравнения (всего 116 пациентов) после операции были разделены на 4 подгруппы: очень низкого (n=4), низ-

Таблица 1

Выраженность экспрессии HIF1α в ткани опухоли у больных РПЖ в зависимости от раннего рецидивирования

БР	Число больных, n (%)	Уровень экспрессии HIF1α				Тип окрашивания	
		0	1^{+}	2^{++}	3^{+++}	ЦТМ	ЯД-ЦТМ
Нет	60 (100)	2 (3,3)	17 (28,3)	38 (63,4)	3 (5)	28 (46,7)	32 (53,3)
Есть	56 (100)	1 (1,8)	9 (16,1)	35 (62,5)	11 (19,6)	15 (26,8)	41 (73,2)
p (χ^2)	116	p=0,06 (χ^2=7,36)				p=0,043 (χ^2=4,09)	

Таблица 2

Выраженность экспрессии HIF1α в ткани опухоли у больных РПЖ в зависимости от раннего рецидивирования

Риск рецидива РПЖ	Число больных, n (%)	Уровень экспрессии HIF1α				Тип окрашивания	
		0	1^{+}	2^{++}	3^{+++}	ЦТМ	ЯД-ЦТМ
Низкий и очень низкий	14 (100)	3 (21,4)	10 (71,4)	0	1 (7,2)	14 (100)	0
Промежуточный	93 (100)	0	16 (17,2)	71 (76,3)	6 (6,5)	29 (31,2)	64 (68,8)
Высокий	9 (100)	0	0	2 (22,2)	7 (77,8)	0	9 (100)
p (χ^2)	116	p<0,0001 (χ^2=88,7)				p<0,0001 (χ^2=30,5)	

кого (n=10), промежуточного (n=93) и высокого риска (n=9) в соответствии с общепринятой классификацией D'Amico и соавт. [7].

При наличии ранних БР у больных основной группы резко возрастало число клеток с экспрессией фактора HIF1α (p=0,0003), а также с ЯД-ЦТМ (p<0,0001). Сопряжение между этими 2 признаками было статистически значимым. Локализация экспрессии HIF1α в клетке имеет принципиальное значение. При проведении ИГХ-исследования белок HIF1α в нормальных условиях обнаруживается в цитоплазме на очень низком уровне [8]. Во время гипоксии либо при активации фактора другими транскрипционными молекулами HIF1α стабилизируется и перемещается к ядру. При транспортировке в ядро HIF1α играет роль транскрипционного фактора [9].

Выраженность экспрессии HIF1α в опухолевой ткани у больных РПЖ в зависимости от раннего рецидивирования представлена в табл. 1.

Анализ сопряжения между ранним рецидивированием заболевания и выраженностью экспрессии HIF1α в ткани опухоли при локализованном РПЖ позволил установить лишь тенденцию (p=0,06) к повышению числа клеток с сильно выраженной и к снижению – со слабовыраженной экспрессией фактора HIF1α в основной группе по сравнению с группой сравнения. Однако в сравниваемых группах статистически значимым было различие числа клеток опухоли в зависимости от локализации HIF1α в клетке. У больных при раннем рецидивировании РПЖ число клеток с ядерной локализацией HIF1α возрастало (p=0,04) по сравнению с таковым в группе сравнения (соответственно 72,3 и 53,3%).

С повышением риска рецидива РПЖ экспрессия HIF1α в опухолевой ткани и его локализация в ядре достоверно (p<0,0001) возрастали (табл. 2).

В результате исследования в основной группе по сравнению с контрольной было обнаружено статистически значимое повышение экспрессии гена *HIF1α* (в 4,9 раза) и гена *NF-κB1* (в 3,8 раза; p<0,001); в группе сравнения повышение экспрессии генов было выражено в меньшей мере: в 1,8 раза – для *HIF1α* и в 1,9 раза – для ядерного фактора κB *(NF-κB1)* (p<0,05). При сравнительном анализе установлено повышение (p<0,05) экспрессии генов в опухолевых образцах ткани в основной группе по сравнению с группой сравнения как для *HIF1α* (в 2,7 раза), так и *NF-κB1* (в 2 раза).

NF-κB является ключевым фактором транскрипции, контролирующим пролиферацию клеток. Фактор HIF1α при снижении парциального напряжения в тканях может повысить транскрипционный потенциал ядерных τ-факторов κB [10]. Сам NF-κB также активирует HIF1α в условиях нормоксии [5]. Однонаправленное усиление экспрессии факторов HIF1 и NF-κB в клетках РПЖ обусловлено тесной и прямой корреляционной связью между уровнями экспрессии соответствующих генов (коэффициент корреляции 0,71; p<0,001). Следовательно, транскрипторные процессы в опухолевой ткани ПЖ активируются, в том числе вследствие повышения экспрессии гена, отвечающего за синтез HIF1α.

По результатам изложенного сделаны следующие выводы:

- у больных локализованным РПЖ после РПЭ развитие БР ассоциировано с исходным повышением экспрессии генов *HIF1α* и *NF-κB1*, контролирующих транскрипторные процессы в опухоли;
- при раннем рецидивировании у больных локализованным РПЖ в опухолевой ткани число клеток с ядерной локализацией фактора HIF1α выше, чем у пациентов без БР.

* * *

Конфликт интереса по представленной статье отсутствует.

Литературы

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Относительная копийность апоптоз-регулирующих генов как показатель малигнизации тканей желудка // Успехи современного естествознания. – 2015; 3: 40–5 [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S. et al. Copy number variations of apoptosis-regulating gene as indicator of stomach tissue malignancy // Advances in current natural sciences. – 2015; 3: 40–5 (in Russ.)].
2. Zarrei M., MacDonald J., Merico D. et al. A copy number variation map of the human genome // Nature Reviews Genetics. – 2015; 16: 172–83.
3. Iommarini L., Ghelli A., Gasparre G. и др. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression // Biochim Biophys Acta. – 2017; 1858: 582–90.
4. Jung S., Yang W., Kim J. et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells // Carcinogenesis. – 2008; 29: 713–21.
5. Dengler V., Galbraith M., Espinosa J. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2014; 49: 1–15.
6. Livak K., Schmittgen T. Analysis of Relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) // Method. Methods. – 2001; 25 (4): 402–28.
7. D'Amico A., Whittington R., Malkowicz S. et al. Combined modality staging of prostate carcinoma and its utility in predicting pathologic stage and postoperative prostate specific antigen failure // Urology. – 1997; 49 (3A Suppl): 23–30.
8. Kietzmann T., Mennerich D., Dimova E. Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity // Front. Cell Dev. Biol. – 2016; 4: 11.
9. Dery M., Michaud M., Richard D. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2005; 37: 535–40.
10. Benitez D., Hermoso M., Pozo-Guisado E. et al. Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NF-κB – regulation gene expression in prostate cancer cells // Prostate. – 2009; 69: 1045–54.

LOCALIZED PROSTATE CANCER: TRANSCRIPTIONAL MECHANISMS OF EARLY RECURRENCE

***F. Bova**, Candidate of Medical Sciences*
Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don

The author shows that in localized prostate cancer, one of the mechanisms of activation of the transcriptional potential of cancer cells and early recurrence of the disease is to increase the expression of the HIF1α and NF-κB genes in glandular tissue.

***Key words:** oncology, prostate cancer, biochemical recurrence, gene expression, transcriptional factors.*
***For citation:** Bova F. Localized prostate cancer: transcriptional mechanisms of early recurrence // Vrach. – 2019; 30 (2): 41–43. https://doi.org/10.29296/25877305-2019-02-07*