

Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки

В.К. Боженко¹, Л.А. Ашрафян¹, И.Б. Антонова¹, Н.В. Мельникова¹, О.Н. Бурменская²,
Д.Ю. Трофимов², Е.А. Кудинова¹, Л.З. Хунова¹, А.В. Слонов¹, О.П. Близнюков¹

¹ФГУ РНЦПР Минздравсоцразвития России;

²ОАО ДНК-технология, Москва

Контакты: Лилия Заудиновна Хунова khunova@mail.ru

В настоящее время не вызывает сомнений вирусная природа многих онкологических заболеваний женской половой сферы. С учетом этих данных вполне закономерной становится проблема качественной оценки характера цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) и ее нацеленность на прогрессию в инвазивную карциному. В последние годы при исследовании ряда биологических маркеров канцерогенеза появилась возможность проспективного прогнозирования. В статье рассмотрены аспекты значимости молекулярно-биологических маркеров пролиферации и апоптоза в этиопатогенезе онкогинекологических заболеваний. Представлены результаты обследования 16 больных с гистологически подтвержденным плоскоклеточным раком шейки матки, 40 — с диагнозом ЦИН различной степени (ЦИН-1, ЦИН-2, ЦИН-3 — плоскоклеточный рак in situ) и 6 пациенток с морфологически неизменным эпителием шейки матки, у которых в материале соскобов шейки матки была проанализирована экспрессия мРНК генов CCNB1, Ki-67, BAG, BCL-2, ESRI и PRG. Показано, что полученные молекулярно-генетические данные могут являться новыми прогностическими маркерами, отражающими возможные пути развития заболевания, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения биомаркеров в целях профилактики возникновения и снижения заболеваемости злокачественными новообразованиями.

Ключевые слова: рак шейки матки, CCNB1, Ki-67, BAG, BCL-2, ESRI, PRG, вирус папилломы человека

Analysis of the expression of genes involved in proliferation and apoptosis in cervical intraepithelial neoplasias and cancer of the cervix uteri

V.K. Bozhenko¹, L.A. Ashrafyan¹, I.B. Antonova¹, N.V. Melnikova¹, O.N. Burmenskaya²,
D.Yu. Trofimov², E.A. Kudinova¹, L.Z. Khunova¹, A.V. Slonov¹, O.P. Bliznyukov¹

¹Russian X-Ray Radiology Research Center, Ministry of Health and Social Development of Russia;

²OAO DNA-Technology, Moscow

The viral nature of many female genital cancers is now beyond question. By taking into account this fact, the problem of qualitative assessment of the nature of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and its focus on progression to invasive carcinoma becomes quite natural. Studies of a number of biological markers of carcinogenesis have recently provided a possibility for prospective prediction. The paper considers the aspects of importance of the molecular biological markers of proliferation and apoptosis in the etiopathogenesis of genital cancers. It gives the results of examinations of 16 patients with histologically verified squamous cell carcinoma of the cervix uteri, 40 patients diagnosed as having CIN of different grades (CIN-1, CIN-2, CIN-3 — squamous cell carcinoma in situ), and 6 patients with the morphologically unaltered cervical epithelium, whose cervical scrapes were analyzed for the expression of the mRNA genes CCNB1, Ki-67, BAG, BCL-2, ESRI, and PRG. It is shown that the molecular genetic findings may be new prognostic markers that reflect the possible disease developmental pathways, suggesting the need for further investigation of biomarkers in order to prevent malignancies and to reduce their morbidity.

Key words: cancer of the cervix uteri, CCNB1, Ki-67, BAG, BCL-2, ESRI, PRG, human papillomavirus

Введение

Рак шейки матки (РШМ) занимает 1-е место в структуре онкологической заболеваемости женщин в возрасте 15—39 лет в Российской Федерации [1]. Детальный анализ динамики заболеваемости в 1998—2008 гг. показывает его среднегодовые темпы прироста — 1,55% [2].

В настоящее время общепризнан тот факт, что этиологическим агентом развития РШМ являются вирусы папилломы человека (ВПЧ) группы высокого риска заболевания (ВПЧ 16-го и 18-го типа и родственные им) [3]. Только у части инфицированных

женщин как результат персистенции вируса наблюдается развитие цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) и РШМ [4]. Пристального внимания заслуживает изучение факторов, способствующих развитию РШМ у данной группы больных. В современной литературе большую роль играет разработка объективных молекулярно-генетических критериев прогнозирования течения заболеваний шейки матки [5]. Особый интерес вызывает анализ изменений генов пролиферации, апоптоза и дифференцировки в ЦИН и РШМ [6].

Ключевым регулятором апоптоза служит семейство белков BCL-2. Выключение BCL-2 приводит к массивному р53-зависимому апоптозу. В настоящее время большое внимание уделяется оценке экспрессии мРНК BCL-2 в эпителии шейки матки как потенциального маркера значимых этапов в патогенезе ЦИН [7]. Функционально связано с ними семейство BAG (1–6) — группа мультифункциональных генов, взаимодействующих с шаперонами (Hsp70) и ингибирующих их. Одна из функций — связывание с BCL-2, рецепторами стероидных гормонов, за счет чего происходит подавление апоптоза и активирование стероид-опосредованной транскрипции [8]. Универсальным маркером пролиферации считается белок, кодируемый геном *Ki-67*. Он относится к регуляторным белкам и отражает вступление клетки в митоз. По данным литературы, ЦИН характеризуются повышенной экспрессией данного белка [9]. За прохождение клетками М-фазы клеточного цикла отвечает белок, кодируемый геном *CCNB1* (циклин В1). Ряд исследователей обнаружили его гиперэкспрессию при РШМ [10].

Цель исследования: изучение молекулярно-биологических маркеров пролиферации, апоптоза и дифференцировки различных предраковых процессов и РШМ.

Материалы и методы

Исследование основано на данных клинико-морфологического и молекулярно-биологического обследования 16 пациенток с гистологически подтвержденным плоскоклеточным РШМ (средний возраст $41,1 \pm 9,6$ года) и 40 больных с гистологически подтвержденным диагнозом ЦИН различной степени (ЦИН-1, ЦИН-2, ЦИН-3 — плоскоклеточный рак *in situ*; средний возраст $37,5 \pm 10,5$ года), находившихся на лечении в ФГУ РНЦРР в период с 2006 по 2010 г. Контрольную группу составили 6 женщин с морфологически неизменным эпителием шейки матки (средний возраст $38 \pm 12,4$ года).

Проанализирована экспрессия мРНК генов *CCNB1*, *Ki-67*, *BAG*, *BCL-2*, *ESR1*, *PRG* в материале соскобов шейки матки. Для исследований полимеразной цепной реакции (ПЦР) забор материала соскобов цервикального канала и поражений шейки матки выполняли одноразовыми зондами до проведения комплексного обследования и начала лечения заболеваний шейки матки в пробирки со средой для стабилизации РНК. Хранение материала до начала исследования осуществляли при температуре -70°C .

Выделение РНК

Для выделения нуклеиновых кислот применяли наборы ПробанК («ДНК-Технология», Россия). Метод основан на лизисе образцов в 4М-растворе гуанидинтиоцианата, осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом в присутствии соосадителя с последующими

отмывками в промывочных растворах. Объем полученной РНК составил 50 мкл (либо выделение на колонках).

В работе были использованы коммерческие реактивы («ДНК-Технология», Россия). Производитель гарантировал отсутствие амплификации на матрице геномной ДНК исследуемых (*CCNB1*, *Ki-67*, *BAG*, *BCL-2*, *ESR1*, *PRG*) и референсных генов. Это позволило отказаться от дополнительного этапа обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой.

Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для реакции обратной транскрипции применяли специфические олигонуклеотиды. Реакцию осуществляли при температуре 40°C в течение 30 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C на протяжении 5 мин. Для увеличения объемов образцов после обратной транскрипции кДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере.

ПЦР

Амплификацию проводили в режиме реального времени в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл — 80°C 30 с, 94°C 1 мин 30 с; 50 циклов — 94°C 20 с, 64°C 20 с; 10°C — хранение 94°C на приборе ДТ-964. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и референсных генов, были помечены FAM. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен «горячий старт», который обеспечивался использованием парафина. Измерение уровня флуоресценции осуществлялось на каждом цикле при температуре 64°C . Реакция проводилась в 2 повторах для каждой точки.

Нормировку осуществляли по 5 референсным генам: *HPRT1*, *TBP*, *B2M*, *GUSB*, *ABL*. Обработку результатов выполняли с использованием программы Excel на основании данных, полученных с помощью прибора. Применяли метод сравнения индикаторных циклов ($\Delta\Delta\text{Cq}$).

При статистической обработке исследуемых переменных было выявлено, что распределение значений не может быть аппроксимировано нормальной функцией распределения, поэтому для оценки достоверности различия значений в группах использовалась статистика, отличная от критерия Стьюдента. Анализ был выполнен с помощью рангового теста Краскелла–Уоллиса, медианного теста.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ мРНК онкобелка BCL-2 в материале неизменной шейки матки, ЦИН и инвазивного плоскоклеточного РШМ показал снижение его экспрессии в ряду неизменного эпителия шейки матки — ЦИН — плоскоклеточный рак. Так, его экспрессия была достоверно ниже при РШМ по сравне-

нию с таковой при неизменном эпителии ($p = 0,005$), что отражено на рис. 1.

При исследовании пролиферативной активности — экспрессия мРНК гена *Ki-67* — установлено увеличение его значений в ряду неизмененный эпителий шейки матки — ЦИН — плоскоклеточный рак. При этом достоверные различия получены для групп неизмененный эпителий шейки матки — ЦИН и ЦИН — плоскоклеточный рак (рис. 2).

Достоверные различия (достоверность между 0,1 и 0,05) выявлены для групп ЦИН — плоскоклеточный рак.

При сравнительном анализе экспрессии мРНК гена циклина В1 (*CCNB1*) в материале неизменной шейки матки, ЦИН и инвазивного плоскоклеточного РШМ установлено возрастание его экспрессии в ряду неизмененный эпителий шейки матки — ЦИН — инвазивный плоскоклеточный рак (рис. 3). Достоверно увеличивалась его экспрессия в ряду неизмененный эпителий шейки матки — инвазивный плоскоклеточный рак ($p = 0,000333$).

Для экспрессии мРНК рецепторов эстрогена в эпителии шейки матки максимальные значения получены в случае ЦИН (рис. 4). При этом его наименьшие значения характеризовали инвазивный плоскоклеточный рак ($p = 0,005831$). При сравнительном анализе экспрессии мРНК рецепторов прогестерона не достоверных различий между исследуемыми группами не обнаружено.

Сравнительный анализ мРНК онкобелка BAG в материале неизменной шейки матки, ЦИН и инвазивного плоскоклеточного РШМ выявил достоверные различия в экспрессии в группах ЦИН и плоскоклеточного рака ($p = 0,0166$). Данные представлены на рис. 5.

Таким образом, при анализе соотношения пролиферации и апоптоза в неизменном эпителии шейки матки по сравнению с тканью ЦИН и РШМ зарегистрирована наименьшая пролиферативная активность (уро-



Рис. 2. Оценка экспрессии мРНК *Ki-67* при различной патологии шейки матки

вень экспрессии мРНК *Ki-67*), что подтверждает и минимальная экспрессия циклина В1. С другой стороны, установлены максимальные значения апоптопической активности (уровень экспрессии мРНК *BCL-2*).

В сравнении с неизменным эпителием достоверно выше пролиферативная активность (экспрессия мРНК *Ki-67*) в группе ЦИН, что подтверждает и увеличение значений циклина В1. При оценке апоптопической активности внутри данной группы экспрессия онкобелка BAG также была достоверна выше по сравнению с таковой в группе инвазивного плоскоклеточного рака.

Максимальный уровень пролиферативной активности характеризовал группу плоскоклеточного РШМ (уровень экспрессии мРНК *Ki-67* и циклина В1).

При анализе маркеров апоптоза установлено, что минимальным был уровень экспрессии мРНК *BCL-2*,

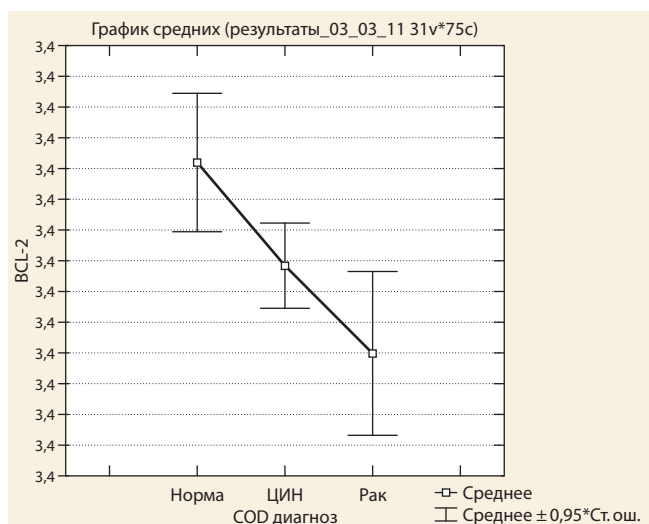


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК онкобелка *BCL-2* при различной патологии шейки матки



Рис. 3. Сравнение уровня экспрессии мРНК *CCNB1* в эпителии шейки матки



Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК рецепторов эстрогена в эпителии шейки матки



Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК онкобелка BAG при различной патологии шейки матки

что косвенно подтверждают минимальные значения экспрессии рецепторов эстрогена и онкобелка BAG.

Выводы

1. Пролиферативная активность эпителия шейки матки возрастает в ряду неизменная ткань — ЦИН — РШМ, что подтверждается увеличением таких маркеров, как *Ki-67* и *CCNB1*.
2. Увеличение пролиферативной активности коррелирует с уменьшением экспрессии антиапоптотичес-

кого гена *BCL-2*, что должно приводить к активации апоптоза в патологических клетках.

3. Важную роль в дифференциальной диагностике предраковых процессов и РШМ играет оценка экспрессии рецепторов стероидных гормонов — оценка экспрессии мРНК рецепторов эстрогена.
4. Таким образом, анализ мРНК экспрессии *BCL-2*, *BAG*, циклина *B1*, *Ki-67* и экспрессия рецепторов эстрогена должны составить дифференциально-диагностическую панель маркеров для оценки ЦИН и РШМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2008 г. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2010.
2. Злокачественные новообразования в России в 2008 году (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2010. <http://www.oncology.ru/service/statistics/morbidity/2008.pdf>
3. Zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49(17):4677–81.
4. Castle P.E., Fetterman B., Poitras N. et al. Variable risk of cervical precancer and cancer after a human papillomavirus-positive test. *Obstet Gynecol* 2011;117(3):650–6.
5. Zielinski D.G., Sniijders P.J., Rozendaal L. et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol* 2001;195(3):300–6.
6. Kjaer S.K., Frederiksen K., Munk C., Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(19):1478–88.
7. Koskimaa H.M., Kurvinen K., Costa S. et al. Molecular markers implicating early malignant events in cervical carcinogenesis. *Cancer Epid Biomarker Prev* 2010;19(8):2003–12.
8. Tang S.C. BAG-1, an anti-apoptotic tumour marker. *IUBMB Life* 2002;53(2):99–105.
9. Saha B., Chaiwun B., Tsao-Wei D.D. et al. Telomerase and markers of cellular proliferation are associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2007;26(3):214–22.
10. Rajkumar T., Sabitha K., Vijayalakshmi N. et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer* 2011;11:80.