

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И КОЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ α И β В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ

Т. А. Богущ¹, О. М. Рябинина¹, М. И. Папулина², Е. А. Богущ¹,
А. Н. Гришанина¹, А. В. Карпукхин³, Б. Е. Полоцкий¹, М. М. Давыдов¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»;

Россия, 119991 Москва, Ломоносовский пр-т, 27, корп. 1;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Татьяна Анатольевна Богущ labmedchem@mail.ru

Цель исследования — количественная оценка уровня экспрессии и коэкспрессии эстрогеновых рецепторов разных типов (ЭРа и ЭРβ) в ткани опухолей большой когорты больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Материалы и методы. Исследованы хирургические образцы НМРЛ (167) иммунофлуоресцентным методом, сопряженным с проточной цитометрией. Оценен уровень экспрессии маркеров, который рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток в процентах по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами).

Результаты. Экспрессия ЭРа и ЭРβ выявлена в 100 % исследованных образцов НМРЛ, при этом отмечена значительная вариабельность показателей и в большинстве случаев — превышение уровня экспрессии ЭРβ в сравнении с ЭРа — в 1,5–2,0 раза и более. В целом по группе медиана показателя для ЭРа составила 19 %, а для ЭРβ — 43 %. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена оказался равным 0,364 ($p < 0,001$), а коэффициент корреляции Пирсона — 0,401 ($p < 0,001$), что указывает на наличие статистически значимой прямой слабой взаимосвязи между показателями уровня экспрессии ЭРβ и ЭРа.

Заключение. ЭРβ могут являться основной мишенью антиэстрогенов и ориентиром для отбора пациентов с НМРЛ для проведения гормональной терапии.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, эстрогеновые рецепторы α и β , проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-111-114

LEVEL OF ESTROGEN RECEPTOR α AND β EXPRESSION AND COEXPRESSION IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE

T.A. Bogush¹, O.M. Ryabinina¹, M.I. Papulina², E.A. Bogush¹, A.N. Grishanina¹,
A.V. Karpukhin³, B.E. Polotsky¹, M.M. Davydov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 bldg., 27 Lomonosovsky pr-t, Moscow 119991, Russia;

³Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115478, Russia

Objectives. Quantitative assessment of the expression and co-expression levels of estrogen receptors of different types (ER α and ER β) in malignant tissues of large cohort of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Materials and methods. Measurement of ER α and ER β expression levels was carried out on 167 malignant tissue samples by immunofluorescence flow cytometric method. Level of the ER α and ER β expression was calculated as a ratio of specifically fluorescent cells (%) compared to the control (incubated with the secondary antibody only).

Results. The expression of ER α and ER β was detected in all the NSCLC samples investigated. High variability in the level of the marker expression was revealed and it was shown 1,5–2,0-fold higher ER β expression in the most tumors than that for ER α . The Spearman rank correlation coefficient of 0,364 ($p < 0,001$) and the Pearson correlation coefficient of 0,401 ($p < 0,001$) indicate statistically significant weak positive correlation between the levels of expression of ER β and ER α .

Conclusion. The level of expression of ER β as a main subtype of ER in NSCLC tissue could prove useful for selecting patients for antiestrogen therapy.

Key words: non-small cell lung cancer, estrogen receptors α and β , flow cytofluorimetry

Введение

Эстрогеновые рецепторы (ЭР) являются важнейшей клеточной мишенью, воздействуя на которую можно не только контролировать процессы канцерогенеза, но и подавлять рост опухолевых клеток. Блестящим подтверждением этого служит результат многолетнего (с начала 1970 годов) применения тамоксифена у больных раком молочной железы с положительным статусом ЭР опухоли. Препарат эффективен в адъювантном (послеоперационном) режиме и позволяет значительно улучшить отдаленные результаты хирургического лечения, снижая риск рецидива заболевания и смертность больных.

В последние годы ЭР, а значит и мишени антиэстрогенов, обнаружены в клетках различных злокачественных новообразований (немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, рака пищевода, колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия и др.) [1–5]. Это дает основания полагать, что антиэстрогеновая гормонотерапия в случае положительного статуса ЭР различных опухолей будет давать результаты, сходные с результатами лечения рака молочной железы. Однако вопрос об антиэстрогеновой терапии других опухолей до сих пор лишь обсуждается в научных публикациях [6].

В клетках человека присутствуют 2 изоформы ЭР: альфа (ЭРа) и бета (ЭРβ). Их соотношение, а также клеточное и тканевое распределение подвержено широкой вариабельности, но в любом случае экспрессия как ЭРа, так и ЭРβ ассоциирована с ответом на антиэстрогеновую терапию. Стимуляция пролиферации клеток НМРЛ под воздействием эстрогенов, так же как и ингибирование пролиферации при воздействии антиэстрогенов, реализуется только в клетках с экспрессией разных типов ЭР. В целом ситуация аналогична раку молочной железы, однако количественные показатели экспрессии и коэкспрессии в ткани НМРЛ ЭР разных типов по-прежнему остаются неизученными. Принимая во внимание, что именно эта молекулярная характеристика опухоли является важнейшим аргументом в обоснованности развития гормональной терапии любого злокачественного новообразования, **целью** настоящего исследования явилась оценка уровня экспрессии ЭРа и ЭРβ в ткани опухолей большой когорты больных НМРЛ. Для получения строго количественных показателей экспрессии маркеров работа проведена иммунофлуоресцентным методом, сопряженным с точной цитометрией.

Материалы и методы

Проведен анализ показателей экспрессии ЭРа и ЭРβ в хирургических биопсийных образцах опухолей 167 больных НМРЛ (139 мужчин и 28 женщины). Использована ранее разработанная и запатентован-

ная методика строго количественной характеристики молекулярных белковых маркеров солидных опухолей [3]. Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии ЭРа использовали первичные кроличьи антитела (клон SP1, Abcam), для ЭРβ — мышинные (клон 14C8, Abcam), а также вторичные козы антитела, конъюгированные с красителем DyLight650 (ab98510 и ab98729 соответственно). Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight650 проводили в канале FL-6. Использовали средний показатель скорости при подсчете анализируемых клеток; число анализируемых событий — 5000. Количество окрашенных клеток рассчитывали в программе FlowJo 10.0 с помощью метода Колмогорова–Смирнова.

Уровень экспрессии ЭРа и ЭРβ рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток в % по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами).

Результаты и обсуждение

При анализе данных о больных НМРЛ, образцы опухолей которых были включены в исследование, выявлены следующие закономерности. Среди прооперированных пациентов женщины составили 17 %, мужчины — 83 %. Возраст мужчин колебался от 35 до 82 лет (средний возраст 61 год), возраст женщин — от 37 до 73 (средний возраст 58 лет).

В общей группе больных обоих полов плоскоклеточный рак диагностирован в 55 % случаев, аденокарцинома — в 42 %. Процент курящих пациентов преобладал над числом пациентов, которые не имели такой привычки, и составил не менее 62 %. Данных о статусе курения 15 % больных не найдено.

Несмотря на сопоставимое число пациентов в группах с разным гистологическим типом опухоли, разница в группах разных полов очевидна: у женщин частота аденокарциномы составила 93 %, частота плоскоклеточного рака — 7 %. У пациентов мужского пола почти в 2 раза чаще, чем аденокарцинома, выявлялся плоскоклеточный рак, частота встречаемости составила 64 % против 31,5 %. Стоит отметить, что не менее 73 % пациентов мужского пола являлись курильщиками, причем многие пациенты имели стаж курения более 20 лет; 90 % женщин не имели такой привычки.

Показатели уровня экспрессии ЭРа и ЭРβ в общей группе пациентов представлены в таблице.

Иммунофлуоресцентный анализ опухолей выявил экспрессию ЭРа и ЭРβ во всех исследованных образцах. Однако, учитывая тот факт, что несмотря

Показатели уровня экспрессии ЭР α и ЭР β в ткани НМРЛ

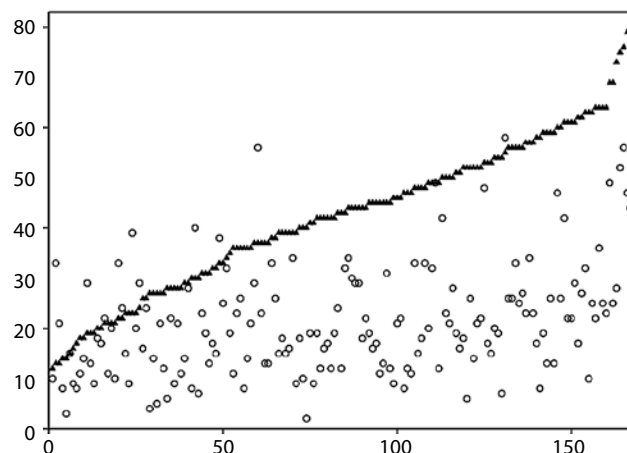
Подтип ЭР	Показатели уровня экспрессии маркеров, %		p^{***}
	Среднее значение (M \pm SD)*	Медиана [Q1; Q3]**	
ЭР α	21,4 \pm 11,2	19,0 [13,0; 27,0]	< 0,001
ЭР β	42,1 \pm 15,3	43,0 [30,0; 53,0]	

*M \pm SD — среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение. ** Me [Q1; Q3] — медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]. *** p — достоверность различий между показателями уровня экспрессии ЭР α и ЭР β , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента

на прецизионность, метод проточной цитофлуориметрии имеет определенную погрешность, образцы опухолевой ткани, в которых уровень экспрессии маркеров был ≤ 10 % окрашенных клеток, мы рассматривали как неэкспрессирующие маркеры. При этом ЭР β -позитивными оказались все исследованные опухоли, а ЭР α -позитивными — большинство (88,4 %). Уровень экспрессии ЭР α в опухолях разных больных варьировал от 11 до 58 % специфически окрашенных клеток, медиана показателя оказалась равной 19 %. Уровень экспрессии ЭР β в образцах колебался от 12 до 80 %, медиана составила 43 %. Средние значения показателей мало отличались от медианы (ЭР α : 21,4 % против 19,0 %, ЭР β : 42,1 % против 43 %). Таким образом, в среднем по группе уровень экспрессии ЭР β в образцах ткани НМРЛ приблизительно в 2 раза превышает уровень экспрессии ЭР α ($p < 0,001$).

На рисунке представлено распределение показателей коэкспрессии ЭР α и ЭР β в исследованной группе пациентов с НМРЛ. Образцы опухолей были ранжированы по возрастанию уровня экспрессии ЭР β — от минимального до максимального значения (на графике обозначены черными треугольниками). Круглые точки показывают значение уровня экспрессии ЭР α в том же образце опухоли. Видно, что в ткани большинства образцов уровень экспрессии ЭР β превышает уровень экспрессии ЭР α . Только в 8 % образцов (в 14 из 167 случаев) экспрессия ЭР α оказалась равной или незначительно превысила экспрессию ЭР β . Распределение точек на данном рисунке согласуется с отношением рассчитанных показателей медианы и среднего значения: в большинстве случаев показатель экспрессии ЭР β в 1,5 раза превысил показатель экспрессии ЭР α , а в 58 % случаев — в 2 раза и более. Видно также, что персонализированные различия были очень значительными и уровень экспрессии ЭР β более чем в 4 раза превышал показатель ЭР α .

На графике также очевидно отсутствие четкой корреляции между экспрессией ЭР β и ЭР α в ткани НМРЛ. Данный факт подтвержден результатом корреляционного анализа. Так как число наблюдений



Распределение показателей экспрессии ЭР α и ЭР β в исследованной группе больных НМРЛ. По оси абсцисс — номера образцов опухолей, которые ранжированы от минимального до максимального значения по уровню экспрессии ЭР β (%). По оси ординат — уровень экспрессии ЭР α и ЭР β (%). Черными треугольниками отмечены показатели уровня экспрессии ЭР β , круглыми точками — ЭР α в ткани опухоли того же больного

оказалось больше 100, в качестве показателей согласованности между значениями экспрессии ЭР β и ЭР α можно использовать как коэффициент корреляции Пирсона, так и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена оказался равным 0,364 ($p < 0,001$), а коэффициент корреляции Пирсона — 0,401 ($p < 0,001$). Эти значения указывают на наличие статистически значимой прямой слабой взаимосвязи между показателями экспрессии ЭР β и ЭР α .

Заключение

Обсуждая полученные результаты, прежде всего необходимо отметить, что это первое исследование НМРЛ, проведенное на большом клиническом материале (проанализировано 167 хирургических образцов НМРЛ), в котором на основании строго количественного показателя охарактеризован уровень экспрессии и коэкспрессии ЭР разных типов — ЭР α и ЭР β . Показано, что ЭР β экспрессируются во всех исследованных образцах НМРЛ, а ЭР α -позитивными является большинство опухолей — 88,4 %. Тот факт, что в ткани НМРЛ в 100 % случаев выявляется экспрессия 1 или 2 мишеней антиэстрогенов, указывает на молекулярную обоснованность сформулированной выше гипотезы о возможной эффективности гормональной терапии у больных НМРЛ.

В связи с этим важно отметить, что уровень экспрессии в ткани НМРЛ ЭР β значительно выше, чем ЭР α . В целом по группе превышение медианы уровня экспрессии ЭР β против ЭР α составило 2,3 раза (43 % против 19 %), а различия между реальными показателями у конкретных больных были еще более значительными. Это свидетельствует о том, что ЭР β

могут являться основной мишенью антиэстрогенов и ориентиром для отбора пациентов с НМРЛ для проведения гормональной терапии.

Принимая во внимание полученные результаты, признавая ЭР патогенетически важным маркером

НМРЛ и допуская, что уровень экспрессии ЭРβ в опухоли $\geq 30\%$ может быть значимым для реализации эффекта антиэстрогенов, считаем, что претендентами на проведение гормональной терапии являются около 90 % больных НМРЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А. и др. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого. Биохимия 2010;75(12): 1633–41. [Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al. Estrogen receptors, antiestrogens and non-small cell lung cancer. Biohimiya = Biochemistry 2010;75(12):1633–41. (In Russ.)].
2. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов α и β в солидных опухолях человека. Вестник Московского университета. Серия 2, Химия 2011;52(4):305–12. [Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immunofluorescence assessment using flow-cytometry the expression of estrogen receptor α and β in a solid human tumor. Vestnik Moskovskogo universitetata. Seriya = Bulletin of Moscow University. Series 2, Chemistry 2011;52(4):305–12. (In Russ.)].
3. Christoforou P., Christopoulos P.F., Koutsilieris M. The role of estrogen receptor β in prostate cancer. Mol Med 2014;20:427–34. PMID: 25032955. DOI: 10.2119/molmed.2014.00105.
4. Dong J., Jiang S.W., Niu Y. et al. Expression of estrogen receptor α and β in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep 2013;30(6):2771–6. PMID: 24101172. DOI: 10.3892/or.2013.2770.
5. Jia M., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2015;29(4):557–68. PMID: 26303083. DOI: 10.1016/j.beem.2015.04.008.
6. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А. и др. Экспрессия эстрогеновых рецепторов в опухолях, отличных от рака молочной железы. Антибиотики и химиотерапия 2009;54(7–8): 41–9. [Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al. The expression of estrogen receptors in tumors other than breast cancer. Antibiotiki i himioterapiya = Antibiotics and chemotherapy 2009;54(7–8):41–9. (In Russ.)].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.