

ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОМ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.Н. Нариманов², О.А. Малехова², Т.А. Богущ², А.В. Карпукхин¹

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Фатима Магомедовна Кипкеева Foty_k@mail.ru

Цель исследования — изучение количественных профилей экспрессии матричной РНК потенциальных генов-мишеней при диссеминированном раке желудка (ДРЖ).

Материалы и методы. Применяли количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени на парных образцах опухоли — норма.

Результаты. Наиболее часто (25–41 % случаев) повышенный уровень матричной РНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β* (трансформирующий фактор роста β), *NRP-1* (нейропилин 1) и генов семейства *VEGF* (фактор роста эндотелия сосудов). Впервые при раке желудка обнаружена корреляция уровней экспрессии 3 генов: *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* и обратная корреляция уровней экспрессии генов *VEGF* и *bFGF* (основной фактор роста фибробластов).

Заключение. Выявленная корреляция экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* обусловлена, видимо, взаимодействием *NRP-1* с продуктами 2 других генов и может быть связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ. Обнаруженная обратная корреляция экспрессии генов *VEGF-A* и *bFGF* может свидетельствовать о стимуляции ангиогенеза в опухоли при сниженной активности пути *VEGF* через активизацию сигнального пути *bFGF*. Полученные результаты следует учитывать при таргетной терапии ДРЖ.

Ключевые слова: диссеминированный рак желудка, экспрессия генов, таргетная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-25-28

EXPRESSION PROFILES OF POTENTIAL TARGET GENES IN DISSEMINATED GASTRIC CANCER

F.M. Kipkeeva¹, T.A. Muzaffarova¹, M.N. Narimanov², O.A. Malekhova², T.A. Bogush², A.V. Karpukhin¹

¹Research Center of Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Objective is the investigation of messenger RNA quantitative expression profiles of potential target genes among disseminated gastric cancer cases.

Materials and methods. Quantitative real-time polymerase chain reaction on paired tumor–normal samples.

Results. The most frequently (25–41 % of cases) an increased level of messenger RNA in the tumor with respect to normal tissue was observed for the genes of *TGF-β* (transforming growth factor β), *NRP-1* (neuropiline 1) and *VEGF* (vascular endothelial growth factor) family genes. For the first time a correlation between the expression levels of the three genes: *NRP-1*, *TGF-β* and *VEGFR-2*, and the inverse correlation of the levels of *VEGF* and *bFGF* gene expression were found.

Conclusion. The revealed correlation between the expression of *TGF-β*, *NRP-1* and *VEGFR-2* genes is apparently due to the interaction of *NRP-1* with the products of two other genes and may be associated with a high metastatic potential of the progressing tumor in disseminated gastric cancer. The observed inverse correlation of the *VEGF-A* and *bFGF* gene expression may indicate the stimulation of angiogenesis in the tumor with reduced activity of the *VEGF* pathway by activating the *bFGF* signaling pathway. The results obtained should be taken into account under targeted therapy.

Key words: disseminated gastric cancer, gene expression, targeted therapy

Рак желудка (РЖ) занимает 4-е место по заболеваемости и 2-е место по смертности среди всех онкологических заболеваний в мире. В настоящее время 5-летняя выживаемость среди пациентов

с РЖ составляет только 20–30 % [1]. Из числа ежегодно диагностированных больных в 85 % случаев сразу или в течение 2–3 лет заболевание переходит в метастатический этап. При диссеминированном

РЖ (ДРЖ) применяют комбинированные схемы химиотерапии, включающие 5-фторурацил, производные платины, таксаны и препараты таргетной терапии [2].

Таргетные препараты назначаются в составе комплексной терапии и с учетом механизма их действия эффективны только в том случае, если экспрессируется мишень, на которую они могут воздействовать. В связи с этим существенна информация о частотах экспрессии потенциальных генов-мишеней таргетной терапии, а также о характеристиках, позволяющих судить о возможной координации их действия.

Материалы и методы

У каждого больного, включенного в исследование, были взяты парные образцы нормальной и опухолевой тканей желудка. Забор материала проводили при биопсии или во время операции пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследование вошли 30 больных ДРЖ в возрасте 29–87 лет до начала терапии. Все образцы охарактеризованы гистологически. Основное число образцов опухолевой ткани представлено аденокарциномой. Всем больным была назначена комбинированная химиотерапия. Препараты таргетной терапии (трастузумаб) были включены в схему лечения 4 пациентам, таксаны – 8.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в парных образцах опухоль – норма изучали уровни экспрессии матричной РНК (мРНК) генов *VEGF* (фактор роста эндотелия сосудов), *VEGFR-1*, *VEGFR-2* (рецепторы фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2), *NRP-1* (нейропиплин 1), *bFGF* (основной фактор роста фибробластов), *FGFR-2* (рецептор факторов роста фибробластов 2), *TGF-β* (трансформирующий ростовой фактор β), *HER-2/neu* (рецептор эпидермального фактора роста 2), *TUBB-3* (β-тубулин 3-го класса), *BRCA-1* (breast cancer 1), *Ki-67* и *PCNA* (ядерный антиген пролиферирующих клеток).

Из каждой пары образцов выделяли суммарную фракцию РНК. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Обратную транскрипцию проводили с применением набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). ПЦР-РВ осуществляли на приборе Step One Plus (Applied Biosystems, США). Каждое измерение выполняли 3-кратно. ПЦР-РВ проводили с помощью наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для анализа полученных результатов применяли встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus. В качестве контроля использовали ген *GAPDH*.

В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии генов в опухолевой ткани относительно нормальной. Повышенным или пониженным считали уровень экспрессии гена в опухоли, отличающийся в 2 раза и более от экспрессии в нормальной ткани. Статистический анализ данных проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Корреляции оценивали по методу Спирмена. Для определения ассоциации молекулярного признака с клиническими характеристиками или сравнения частот 2 молекулярных признаков использовали точный критерий Фишера. Значимыми считали различия между группами или значения коэффициентов корреляции при любом уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чаше повышенный уровень мРНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* (рис. 1). Доля больных в выборке с повышенным уровнем экспрессии *TGF-β* составила 41 %, *NRP-1* и *VEGFR-2* – 32 %. *TGF-β* на поздних стадиях развития опухоли является онкогеном. Он усиливает инвазивный потенциал опухоли и участвует в ангиогенезе. Высокий уровень экспрессии *TGF-β* связан с неблагоприятным прогнозом при гастроинтестинальных раках [3]. *NRP-1* взаимодействует с ключевыми сигнальными путями, которые задействованы в инициации, развитии и метастазировании раковых клеток [4]. Он выступает в качестве многофункционального корцептора, связываясь и модулируя активность различных лигандов, в том числе *TGF-β* [5].

Нами была обнаружена корреляция уровней экспрессии *TGF-β* и *NRP-1* (коэффициент корреляции $R = 0,63$; $p = 0,0017$; рис. 2). Экспрессия обоих этих генов коррелирует также с экспрессией гена *VEGFR-2* ($R = 0,66$; $p = 0,01$ и $R = 0,68$; $p = 0,0012$ соответственно). Продукты генов *VEGFR-2* и *NRP-1* способны взаимодействовать между собой, поскольку *NRP-1* действует как корцептор *VEGF*-рецепторов. Клеточная миграция, направление роста и ветвление

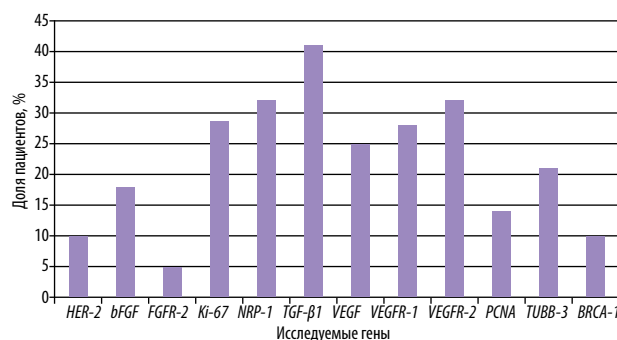


Рис. 1. Доля больных с повышенной экспрессией исследуемых генов в опухоли при ДРЖ

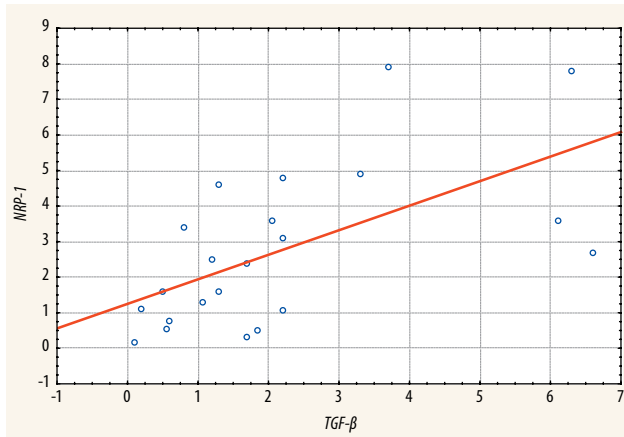


Рис. 2. Корреляция уровней экспрессии генов *NRP-1* и *TGF-β*

кровеносных сосудов опосредуются комплексом *VEGFR-2* и его корецептором *NRP-1* [6].

Видимо, впервые обнаруженная координация экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* обусловлена взаимодействием *NRP-1* с продуктами 2 других генов и связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ. Полученные результаты указывают на актуальность завершения разработки таргетных препаратов для *TGF-β* и *NRP-1*. Их применение для комплексного ингибирования 3 генов (ингибиторы *VEGFR-2* имеются) может привести к наилучшим результатам при лечении ДРЖ.

VEGF-A — ключевой медиатор физиологического и патологического ангиогенеза, одна из основных мишеней антиангиогенной терапии. *VEGF-A* опосредует свои эффекты путем связывания с рецепторами эндотелиальных клеток. Еще одним регулятором ангиогенеза является *bFGF*. Имеются данные о том, что одновременная экспрессия *VEGF* и *bFGF* приводит к активному росту опухоли с высокой плотностью и проходимостью сосудов [7].

В то же время нами впервые на образцах опухолевой ткани больных ДРЖ была обнаружена обратная зависимость экспрессии генов *VEGF-A* и *bFGF* ($R = -0,73$; $p = 0,0046$). Это согласуется с версией о том, что aberrантная экспрессия *bFGF* является компенсаторным механизмом, позволяющим опухоли сохранить ее микроциркуляторный гомеостаз, и рассматривается как потенциальная причина устойчивости к анти-*VEGF*-терапии [8]. В этом случае применение бевацизумаба в качестве антиангиогенной терапии может быть недостаточно, и следует обратить внимание на блокирование других путей, которые поддерживают ангиогенез опухоли.

В исследовании, проводившемся на культуре клеток сосудистого эндотелия рака толстой кишки *in vitro*, было получено, что при повышении уровня экспрессии *VEGF* экспрессия *bFGF* понижалась, и, наоборот,

при подавлении *VEGF* бевацизумабом активировался *bFGF*-сигнальный путь [9]. Возможно, что обнаруженный нами феномен присущ не только ДРЖ.

Ген *FGFR-2* относится к членам семейства рецепторов факторов роста фибробластов. Повышение уровня экспрессии *FGFR-2* связано с пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом для пациентов с ДРЖ [10]. В нашем исследовании частота повышенной экспрессии *FGFR-2* составила 5 %, что согласуется с изученной в других работах частотой его амплификации при РЖ [11]. Тем не менее этот ген рассматривается в качестве мишени для таргетных препаратов, продемонстрировавших выраженный и продолжительный эффект на моделях ксенотрансплантата РЖ с повышенной амплификацией *FGFR-2* [12].

Одной из популярных мишеней является *HER-2*. Включение трастузумаба в схему лечения пациентов с РЖ, у которых наблюдалась гиперэкспрессия *HER-2*, позволило увеличить их общую выживаемость [13]. В нашем исследовании в случаях повышенной экспрессии гена *HER-2* был также отмечен объективный эффект терапии, включающей трастузумаб. Это указывает в пользу возможности использования оценки уровня мРНК гена *HER-2* в качестве предиктивного маркера при ДРЖ.

В настоящее время нет единого мнения относительно влияния уровня экспрессии *TUBB-3* на чувствительность опухолевых клеток к терапии ингибиторами митоза. В нашем исследовании продолжительность жизни больных с повышенным уровнем экспрессии *TUBB-3*, в схему лечения которых были включены таксаны, оказалась выше, чем у пациентов с низким уровнем экспрессии этого гена, и составила 1 год и более ($p = 0,036$). Сравнение кривых выживаемости по *log-rank*-тесту также показало значимые различия ($p = 0,004$).

Примечательно, что повышенный уровень экспрессии гена *BRCA-1* наблюдался только в образцах опухолевой ткани с повышенной экспрессией *TUBB-3*. Это совпадение неслучайно ($p = 0,003$). Как известно, *BRCA-1* функционирует не только как ген репарации повреждений ДНК, но и принимает участие в процессе митоза. В связи с этим следует отметить данные, продемонстрировавшие высокую чувствительность клеточных линий к таксанам при индуцированной экспрессии *BRCA-1* [14]. Можно предположить совместное действие генов *BRCA-1* и *TUBB-3* по увеличению чувствительности ДРЖ к таксанам.

Уровни экспрессии генов *Ki-67* и *PCNA* не продемонстрировали связи с какими-либо клиническими характеристиками на исследованной выборке ДРЖ. Интересно только совпадение случаев повышенной экспрессии гена *PCNA* с повышенной экспрессией *Ki-67*.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Terry M.B., Gaudet M.M., Gammon M.D. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002;12(2):111–27. DOI: 10.1053/srao.30814. PMID: 11979413.
2. Когония Л.М., Корнилова А.Г. Метастатический рак желудка: новое в лекарственной терапии. *Альманах клинической медицины* 2013;29: 65–70. DOI: <http://dx.doi.org/10.18786/2072-0505-2013-29-65-70>.
3. Katz L.H., Likhter M., Jogunoori W. et al. TGF- β signaling in liver and gastrointestinal cancers. *Cancer Lett* 2016;379(2):166–72. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.033. PMID: 27039259.
4. Li L., Jiang X., Zhang Q. et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:16. DOI: 10.1186/s13046-016-0291-5. PMID: 26795388.
5. Prud'homme G.J., Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012;3(9):921–39. DOI: 10.18632/oncotarget.626. PMID: 22948112.
6. Djordjevic S., Driscoll P.C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discovery Today* 2013;18(9–10):447–55. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.11.013. PMID: 23228652.
7. Korc M., Friesel R.E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(5):639–51. PMID: 19508171.
8. Lieu C., Heymach J., Overman M. et al. Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2011;17(19):6130–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0659. PMID: 21953501.
9. Zhao M., Yu Z., Li Z. et al. Expression of angiogenic growth factors VEGF, bFGF and ANG1 in colon cancer after bevacizumab treatment *in vitro*: a potential self-regulating mechanism. *Oncol Rep* 2017;37(1):601–7. DOI: 10.3892/or.2016.5231. PMID: 27840995.
10. Kilgour E., Su X., Zhan P. et al. Prevalence and prognostic significance of FGF receptor 2 (FGFR2) gene amplification in Caucasian and Korean gastric cancer cohorts. *J Clin Oncol* 2012;30(suppl; abstr 4124).
11. Park Y.S., Na Y.S., Ryu M.H. et al. FGFR2 assessment in gastric cancer using quantitative real-time polymerase chain reaction, fluorescent *in situ* hybridization, and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2015;143(6): 865–72. DOI: 10.1309/AJCPNFLSM-WWPP8DR. PMID: 25972329.
12. Xie L., Su X., Zhang L. et al. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res* 2013;19(9):2572–83. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3898. PMID: 23493349.
13. Bang Y.J., Van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X. PMID: 20728210.
14. Mullan P.B., Quinn J.E., Gilmore P.M. et al. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 2001;20(43):6123–31. DOI: 10.1038/sj.onc.1204712. PMID: 11593420.