

МАРКЕРЫ КЛЕТОК БАЗАЛЬНОГО СЛОЯ ЭПИТЕЛИЯ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЯВЛЯЮТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМИ ИНДИКАТОРАМИ ЕЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

© Н. С. Петров,¹ М. А. Воскресенский,² Р. В. Грозов,³ О. В. Коршак,³
А. Ю. Зарицкий,³ Н. А. Верещагина,¹ Б. К. Комяков,² Б. В. Попов^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² Городская многопрофильная больница № 2 Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 194354,

и ³ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341;

* электронный адрес: borisvp478@gmail.com

Формирование локальной или генерализованной формы рака простаты (РП) является следствием возникновения или отсутствия метастазирования, биологическая природа которого связана с эпителиально-мезенхимным переходом (ЭМП). ЭМП представляет собой высококонсервативную обратимую программу и поддерживается специфическими транскрипционными факторами, которые подавляют экспрессию Е-кадгерина и способствуют продукции мезенхимных факторов полярности. Цель настоящей работы заключалась в сравнительной оценке экспрессии функционально различных маркеров в опухолевой ткани предстательной железы (ПЖ) пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) с помощью гистологической характеристики ткани простаты, полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и иммуноблотинга. Результаты работы свидетельствуют о том, что наиболее очевидные изменения в ткани ПЖ при РПЖ связаны с клетками базального слоя, в котором уровень экспрессии маркеров Е-кадгерина и ЦК5 снижается, а АМАСР — повышается. Эти изменения свидетельствуют о том, что клетки базального слоя ПЖ являются мишенями раковой трансформации, но в ходе прогрессии опухоли приобретают фенотип люминальных клеток. Анализ функциональной связи выявленных изменений с ЭМП может быть сделан в будущем на изолированных популяциях раковых стволовых клеток ПЖ.

Ключевые слова: рак предстательной железы, маркеры рака, АМАСР.

Принятые сокращения: ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, МЭП — мезенхимно-эпителиальный переход, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, ПЖ — предстательная железа, ПСА — простато-специфический антиген, РПЖ — рак предстательной железы, РСК — раковые стволовые клетки, СК — стволовые клетки, ЦК5 — цитokerатин 5, ЦК18 — цитokerатин 18, ТФ-ЭМП — транскрипционные факторы, регулирующие ЭМП, AR — андрогенный рецептор.

Рак предстательной железы (РПЖ) является четвертым по частоте раковым заболеванием среди всего населения и вторым среди мужского населения Земли. В 2012 г. было зарегистрировано 1.112 млн новых случаев РПЖ, что составляет 7.9 % от числа всех злокачественных новообразований. Тенденция к увеличению числа заболеваний РПЖ в последние годы значительно возросла, что связано с распространением на мужчин без клинических симптомов заболевания метода скрининга на основе определения специфического для простаты антигена (ПСА). Метастазирование, на которое приходится 90 % смертности от рака, представляет собой наиболее критический фактор высокой смертности при злокачественных заболеваниях различных органов, включая РПЖ (Brabletz et al., 2013). После диагностирования локальной формы заболевания у 99 % пациентов продолжительность жизни составляет более 5 лет, а при распространенной форме болезни 5-летняя продолжительность жизни регистриру-

ется только у 28 % пациентов. Формирование локальной или генерализованной формы РПЖ является следствием возникновения или отсутствия метастазирования. Биологическая природа метастазирования при раковых заболеваниях связана с эпителиально-мезенхимным переходом (ЭМП) клеток первичной опухоли и обратным мезенхимно-эпителиальным переходом (МЭП) при формировании метастазов (Yang, Weinberg, 2008).

ЭМП представляет собой высококонсервативную обратимую клеточную программу, в ходе которой полярные неподвижные эпителиальные клетки теряют полярность и превращаются в подвижные мезенхимные циркулирующие клетки (Thiery et al., 2009). По современным представлениям, возникновение и метастазирование опухоли инициируются небольшой субпопуляцией раковых стволовых клеток (РСК), обладающих, подобно нормальным стволовым клеткам, способностью к самоподдержанию и дифференцировке в разнообразные клеточ-

ные типы, составляющие ткань опухоли (Reya et al., 2001; Pardal et al., 2003; O'Brien et al., 2007). В соответствии с этой моделью, РСК поддерживают основные движущие силы опухоли — прогрессию опухолевых клеток, формирование сосудистой системы, метастазирование и возникновение рецидивов (Wei et al., 2012).

Способность к ЭМП наделяет РСК при различных формах рака метастатическими свойствами. ЭМП регулируется специфическими транскрипционными факторами Snail, Zeb, Twist (ТФ-ЭМП), экспрессия которых носит тканеспецифический характер (Caramel et al., 2013; Tulchinsky et al., 2014). Эти факторы транскрипционно подавляют экспрессию Е-кадгерина и способствуют продукции мезенхимных факторов полярности. Действие ТФ-ЭМП опосредуется сигнальным путем Wnt/ β -катенин (Medici et al., 2008). Несмотря на обилие опубликованных данных о механизме передачи сигналов Wnt/ β -катенин и роли этого сигнального пути в ЭМП, значение отдельных белков, регулирующих уровень сигнальной формы β -катенина в формировании РСК ПЖ только начинает изучаться.

Предстательная железа (ПЖ) является эндокринным репродуктивным органом, функциональная активность которого регулируется половыми гормонами и опосредуется андрогенным рецептором (AR). ПЖ человека состоит из эпителиальных и мезенхимных клеток в соотношении 1 : 2. Эпителиальные клетки ПЖ формируют железы, состоящие в основном из клеток двух типов — базальных и люминальных (Prajapati et al., 2013). Клетки люминального слоя являются дифференцированными и секретируют ПСА, кислую фосфатазу, низкомолекулярные цитоцератинины (ЦК), ЦК8 и ЦК18 и высокий уровень AR (Long et al., 2005). Клетки базального слоя экспрессируют ЦК5, ЦК14, p63 и альфа-метилацил коензим А рацемазу (AMACR), но не AR (Bonkhoff et al., 1993). Стволовые клетки ПЖ располагаются в базальном слое и экспрессируют CD117, CD133 и LGR4 (Azuma et al., 2005). Стромальные клетки ПЖ продуцируют виментин, CD34, CD44, CD90 и CD117 (Prajapati et al., 2013), обладают свойствами мезенхимных стволовых клеток (МСК) и под действием андрогенов дифференцируются в различные типы мезодермальных клеток, например жировые, костные и мышечные (Richard et al., 2002; Lin et al., 2007). При доброкачественной гиперплазии простаты соотношение между стромальными и эпителиальными клетками увеличивается по сравнению с нормой до 5 : 1, т. е. в 2—5 раз (Shapiro et al., 1992). Экспрессия маркеров плюрипотентных стволовых клеток (Oct4, Sox2, Nanog, c-Myc и Klf4) обнаружена при доброкачественной гиперплазии простаты и может играть патогенетическую роль при РПЖ, однако клеточная идентификация этих маркеров и их роль в опухолевой трансформации нуждаются в дальнейшем изучении. При РПЖ происходят разрушение базальной мембраны, потеря клеток базального слоя и относительное увеличение клеток люминального слоя, которые составляют в этом случае более 99 % всех клеток ПЖ (Maitland et al., 2011).

РПЖ часто носит вялотекущий характер, при котором даже в условиях отсутствия лечения жизнь пациента существенно не ограничивается. В других случаях он может протекать агрессивно и быстро приводить к летальному исходу. Современные средства диагностики не дают возможности различить эти формы до формирования метастазов, что диктует необходимость разработки подходов и методов ранней диагностики агрессивных

форм РП. Одним из широко используемых подходов для диагностики РПЖ является оценка экспрессии различных маркеров в пробах ткани ПЖ, сыворотке крови и моче пациентов с подозрением на РПЖ. Современное понимание патогенеза РПЖ позволяет выделить несколько групп связанных между собой функционально различных молекул, определение которых может представлять диагностическую ценность. К таким молекулам относятся следующие: ТФ-ЭМП (Snail1, Twist1 и β -катенин), маркеры стволовых клеток ПЖ (CD117, CD133 и Lgr4), маркеры базального слоя (Е-кадгерин, ЦК5 и AMACR), маркеры люминального слоя (ЦК18); тканеспецифические маркеры (AR и ПСА), маркеры плюрипотентных клеток (Nanog и Sox2) и маркеры мезенхимных клеток (N-кадгерин и виментин).

Цель настоящей работы заключалась в оценке экспрессии функционально различных маркеров в опухолевой ткани ПЖ пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии, сравнительно с окружающей нормальной тканью с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с параллельной гистологической характеристикой ткани ПЖ, окрашенной гематоксилин-эозином. В случае выявления повышения или понижения экспрессии мРНК того или иного маркера в задачу работы входила оценка его продукции с помощью иммуноблоттинга. Сравнительная характеристика экспрессии функционально различных маркеров при РПЖ предоставляла возможность сделать заключение об их функциональной связи и диагностической значимости. Результаты работы свидетельствуют о том, что наиболее очевидные изменения при РПЖ связаны с клетками ее базального слоя. Уровень экспрессии маркеров этого слоя Е-кадгерина и ЦК5 снижается, а AMACR — повышается. Такие изменения свидетельствуют о том, что клетки базального слоя ПЖ являются мишенями раковой трансформации, но в ходе прогрессии опухоли приобретают фенотип люминальных клеток.

Материал и методика

Образцы ткани ПЖ получали от пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ, в урологическом отделении 2-й городской клинической больницы г. Санкт-Петербурга в соответствии с протоколом этического комитета Городской многопрофильной больницы № 2. Пробы, содержащие опухолевый узел или окружающую его нормальную ткань, помещали в пробирки с 5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 50 мг/мл гентамицина. Каждую из двух проб разделяли острыми ножницами на две половины, одну из которых фиксировали в 10 мл 4%-ного параформальдегида в фосфатном буфере (рН 7.4) для последующей гистологической обработки. Вторая проба предназначалась для экстрагирования тотальной РНК и (в некоторых случаях) обшеклеточного белка.

Окраска срезов ткани простаты гематоксилином и эозином. Пробы ткани толщиной до 5 мм фиксировали в нейтральном (рН 7.4) 10%-ном формалине в течение 40—48 ч, в единичных случаях образцы находились в формалине до 2 нед. Нейтральный 10%-ный формалин готовили, растворяя 4 г порошка параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в 100 мл 0.1 М фосфатного буфера, при 60 °С и постоянном помешивании в течение 3—4 ч. Фиксированные образцы в случае необходимости

Праймеры, использованные в ОТ-ПЦР, для амплификации функционально различных маркеров клеток ПЖ

Ген	Прямой праймер (5'—3')	Обратный праймер (5'—3')
<i>β-Актин</i>	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	GGAATCCTTCTGACCCATGC
<i>CK5</i>	AAGCTGCTGGAGGGCGAGGAATG	CGGGAGGAGGAGGTGGTGGAGAC
<i>CK18</i>	TGGTCACCACACAGTCTGCT	CCAAGGCATCACCAAGATTA
<i>Виментин</i>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	GCTTCTGTAGGTGGCAATC
<i>N-кадхерин</i>	ACAGTGGCCACCTACAAAGG	CCGAGATGGGGTTGATAATG
<i>E-кадхерин</i>	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	GTGTATGTGGCAATGCGTTC
<i>TWIST1</i>	CATGTCCGCGTCCCACTAG	TGTCCATTTTCTCCTTCTCTGG
<i>SNAIL1</i>	TCTAGGCCCTGGCTGCTAC	GCCTGGCACTGGTACTTCTT
<i>AMACR</i>	TGGCCACGATATCAACTATTTGG	ACTCAATTTCTGAGTTTCCACAGAA
<i>ПСА</i>	AGCTGTGGCTGACCTGAAAT	GTCCTCACAGCTGCCAC
<i>AR1</i>	AAGACGCTTCTACCAGCTACCAA	TCCCAGAAAGGATCTTGGGCACTT
<i>CD117</i>	GGCATCACGGTGACTTCAAT	GGTTTGGGGAATGCTTCATA
<i>CD133</i>	GGACCCATTGGCATTCTC	CAGGACACAGCATAGAATAATC
<i>LGR4</i>	GGGAAGCTGGATGATTCGTCTTACT	GGGAAGCTGGATGATTCGTCTTACT
<i>SOX2</i>	GAGAGTGTTCGAAAAGGGGG	CGCCCGCATGATTGTTATT
<i>NANOG</i>	AAATTGGTGATGAAGATGTATTCG	GCAAAACAGAGCCAAAAACG

рассекали для получения фрагментов толщиной не более 3 мм, которые промывали под проточной водой в течение 30 мин и подвергали гистологической проводке в аппарате Logos J (Milestone, Италия) по протоколу, рекомендованному производителем оборудования для фрагментов ткани толщиной не более 3 мм: 60%-ный этиловый спирт (ЭТ) — 3 мин при комнатной температуре (КТ); 95%-ный ЭТ — 2 смены по 2 мин при КТ; 95%-ный ЭТ — 25 мин при 65 °С с применением электрического и микроволнового нагрева, раствор, включающий в себя несколько реагентов для гистологической проводки (изопреп) (ЭргоПродакшн, Россия), — 72 мин при 68 °С с применением электрического и микроволнового нагрева; парафин типа 3 (Thermo Scientific, Германия) — 75 мин при 82 °С с применением только электрического нагрева. Далее образцы ткани заливали в парафин типа 9 (парафин тип 9, Thermo Scientific, Германия). С парафиновых блоков с помощью ротационного микротомы HM 340E (Thermo Scientific, Германия) получали срезы толщиной 2.5 мкм, которые монтировали на специальных предметных стеклах Superfrost Plus (Thermo Scientific, Германия). Стекла помещали в термостат на ночь при 37 °С для оптимальной адгезии срезов. Окрашивание срезов проводили в автоматическом режиме на аппарате Leica ST5020 (Leica Microsystems, Германия) по следующему протоколу: ксилол (Вектон, Россия) — 3 смены по 2 мин; изопреп — 3 смены по 2 мин; проточная вода — 1 мин; дистиллированная вода — 1 мин; гематоксилин Карацци (ЭргоПродакшн, Россия) — 5 мин; проточная вода — 5 мин; дистиллированная вода — 1 мин; 1%-ный водный эозин (ЭргоПродакшн, Россия) — 5 с; проточная вода — 2 мин; изопреп — 2 смены по 1 мин; ксилол — 3 смены по 1 мин. Окрашенные срезы заключали под покровные стекла в аппарате для автоматического заключения Leica CV5030 (Leica Microsystems, Германия), используя среду Leica CV Mount (Leica Biosystems, Германия).

Электрофорез и иммуноблотинг. Для получения белковых экстрактов образцы ткани массой 10 мг помещали в пробирки со 100 мкл лизирующего буфера, содержащего 1 % додецилсульфата натрия (SDS), 50 мМ

Трис-НСI (рН 6.8), 100 мМ β-меркаптоэтанола, коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США), обрабатывали ультразвуком с амплитудой 70 % на соникаторе Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processor (США) 6 раз по 10 с, инкубировали 20 мин при 0 °С и центрифугировали 15 мин при 13 000 g и 4 °С, отбирали супернатант. Концентрацию общего белка в экстрактах определяли при помощи набора реагентов Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific, США). Электрофорез белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле, содержащем SDS, в камере Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, США). На дорожку геля наносили 25 мкл экстракта, содержащего 30 мкг общего белка. После электрофореза белки переносили с геля на мембрану PVDF (Millipore, США) и визуализировали с помощью специфических антител и реактива, усиливающего хемиллюминесценцию (ECL) (Sigma, США).

ОТ-ПЦР проводили, как это описано ранее (Жидкова и др., 2013). Для выделения общеклеточной РНК образцы ткани ПЖ массой 10—20 мг помещали в фарфоровую ступку с жидким азотом, измельчали при помощи пестика и выделяли РНК с помощью набора реагентов MagJET RNA (Thermo Scientific, США). Количество РНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм, а ее целостность — при помощи электрофореза в денатурирующем агарозном геле с формальдегидом по наличию полос РНК 28S и 18S. Для синтеза кДНК 0.5 мкг РНК смешивали с 0.5 мкг праймера олиго-дТ18, объем смеси доводили до 12.5 мкл и инкубировали при 65 °С в течение 5 мин, реакцию смесь охлаждали, добавляли к ней 4 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл (200 ед.) обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific, США), 2 мкл смеси dNTP (10 мМ) и 0.5 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific, США), инкубировали 1 ч при 42 °С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. Амплификацию фрагментов различных генов проводили на циклере T100 (BioRad, США) по следующей программе: начальная денатурация — 94 °С, 1 мин (1 цикл); денатурация — 94 °С, 15 с; отжиг — 58 °С, 30 с; элонгация — 72 °С, 30 с (30 циклов для амплификации

гена актина, 35 циклов для остальных генов); элонгация — 72 °C, 10 мин (1 цикл). Для амплификации использовали праймеры (см. таблицу), синтезированные в компании Бигль (Россия). Продукты реакции анализировали путем электрофореза в 1.2%-ном агарозном геле.

Использовали следующие антитела: мышинные моноклональные против β -актина и кроличьи поликлональные против β -катенина (Sigma, США); собственные мышинные моноклональные антитела против изоформы 1A AMACR, распознающие в иммуноблоте белок с мол. массами 42 (в материале человека) и 37 (мышинный) кДа; Fab-фрагмент козлиных и кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена, против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика или мыши (Jackson Immunolabs, США).

Реактивы: Anti-Fade, PVDF, полиакриламид для электрофореза, реактив Брэдфорд (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин, SDS, коктейль ингибиторов протеолиза, NP-40, DAPI, PMSF, параформальдегид, Тритон X-100, Трис (Sigma, США); трипсин, содержащий 1 мМ ЭДТА, набор реактивов для выделения РНК (RNeasy Mini Kit, США); набор реактивов Qiagen OneStep для ОТ-ПЦР (Qiagen, США); ECL (Sigma, США); метиловый спирт, уксусная кислота (Реахим, Россия); нефлуоресцирующее иммерсионное масло (Carl Zeiss, Швейцария).

Результаты

Морфологические изменения ткани ПЖ у пациентов с РП. В работе сделан анализ экспрессии функционально различных маркеров в материале из опухоли и окружающей нормальной ткани, полученном от 4 пациентов 59—72 лет, ПСА в сыворотке крови которых составлял 8.5—10.0 нг/мл. Образцы ткани ПЖ, взятые из опухоли и окружающей ее нормальной ткани в ходе оперативного вмешательства, подвергали гистологическому анализу после фиксации и окраски гематоксилин-эозином. В случае отсутствия характерных для РП морфологических изменений образцы ткани не использовали для оценки экспрессии функционально различных маркеров. При малом увеличении в нормальной ткани ПЖ видны альвеолярно-трубчатые эпителиальные железы различных размеров в продольном и поперечном сечениях, разделенные прослойками соединительной ткани различных размеров (рис. 1, а, I). В опухолевых образцах при малом увеличении обращает на себя внимание гиперплазия железистой ткани, проявляющаяся в значительном увеличении числа мелких и средних желез с небольшими внутренними просветами и узкими прослойками разделяющей их соединительной ткани (рис. 1, а, IV). При большем увеличении в нормальной железистой ткани был виден базальный слой, состоящий из уплощенных клеток с плотными ядрами, которые формировали непрерывную внешнюю окружность железы. Люминальный слой, представленный столбчатыми клетками со светлыми ядрами и четко очерченной столбчатой цитоплазмой отдельных клеток, формирующих эпителиальный пласт внутри просвета железы, располагался сразу над базальным слоем (рис. 1, а, II, III). При этом же увеличении в опухолевой ткани была видна измененная структура желез, базальный слой клеток практически отсутствовал, клетки люминального слоя теряли столбчатую форму, приобретали вакуоли, а их ядра становились гиперхромными (рис. 1, а, V, VI).

Изменения экспрессии РНК функционально различных маркеров при РПЖ. При планировании настоящей работы мы руководствовались идеей о том, что инвазия и метастазирование эпителиальных опухолей различных тканей основаны на ЭМП, ход которого регулируется ТФ-ЭМП. Эти факторы регулируют продукцию ключевых маркеров, определяющих отдельные молекулярные события при прогрессивном росте опухоли. В наших экспериментах экспрессия таких ТФ-ЭМП, как Twist1, Snail1 (рис. 1, б) и уровень β -катенина (рис. 1, в), при РПЖ изменялись разнонаправленно у разных пациентов (рис. 1, б). Экспрессия маркера люминального слоя ЦК18 не изменялась ни у одного из пациентов (рис. 1, б), а наиболее значительные изменения показывали маркеры клеток базального слоя. Из трех использованных нами маркеров экспрессия E-кадгерина и ЦК5 уменьшалась, а AMACR — повышалась во всех представленных случаях (рис. 1, б). Продукция AMACR возрастала у всех пациентов на фоне ее отсутствия или очень низкого уровня в нормальных условиях. В группе мезенхимных маркеров экспрессия N-кадгерина практически не определялась, мРНК виментина выявлялась во всех случаях, но ее уровень изменялся разнонаправленно у разных пациентов. Мы не выявили изменения уровня или направленности продукции маркеров стволовых клеток — CD117, CD133 и LGR4. Маркеры плюрипотентных клеток Nanog и Sox2 выявлялись путем ОТ-ПЦР только у 1 из 4 представленных пациентов, тогда как РНК тканеспецифических маркеров ПЖ (ПСА и AR) выявлялась во всех случаях, но ее уровень в нормальной и опухолевой тканях не различался (рис. 1, б).

Повышение уровня белка AMACR у пациентов с РП прямо соответствует увеличению экспрессии специфической мРНК. С целью выявления соответствия между выявленным повышением уровня мРНК и белка маркера рака простаты AMACR у пациентов с РП мы определили с помощью иммуноблотинга продукцию белка AMACR в тех же образцах ткани, которые служили источником для получения тотальной РНК. Мы обнаружили, что продукция белка AMACR выявлялась у 3 из 4 пациентов с РП, но отсутствовала в нормальной ткани всех пациентов с РП. Стоит отметить, что продукция β -катенина — передатчика в сигнальном пути Wnt/ β -катенин, который продуцируется на высоком уровне в РСК различных тканей, в наших опытах повышалась только у 1 из 4 пациентов, но снижалась в остальных случаях (рис. 1, в).

Обсуждение

Гипотеза о ведущей роли ЭМП в механизмах инвазии и метастазирования (Yang, Weinberg, 2008) создает эффективный подход для выявления диагностических различий между вялотекущими и агрессивными формами РПЖ. В соответствии с этой гипотезой можно ожидать, что инициация ЭМП при РПЖ проявляется в индукции ТФ-ЭМП и связанном изменении уровня соответственно эпителиальных или мезенхимных маркеров (Tam, Weinberg, 2013). Движущей силой при РПЖ являются РСК ПЖ, которые, по современным представлениям, могут происходить из базальных или люминальных клеток (Lee, Shen, 2015), однако доминирующим фенотипом является люминальный, преобладание которого сочетается с потерей экспрессии маркеров базальных клеток (p63 и

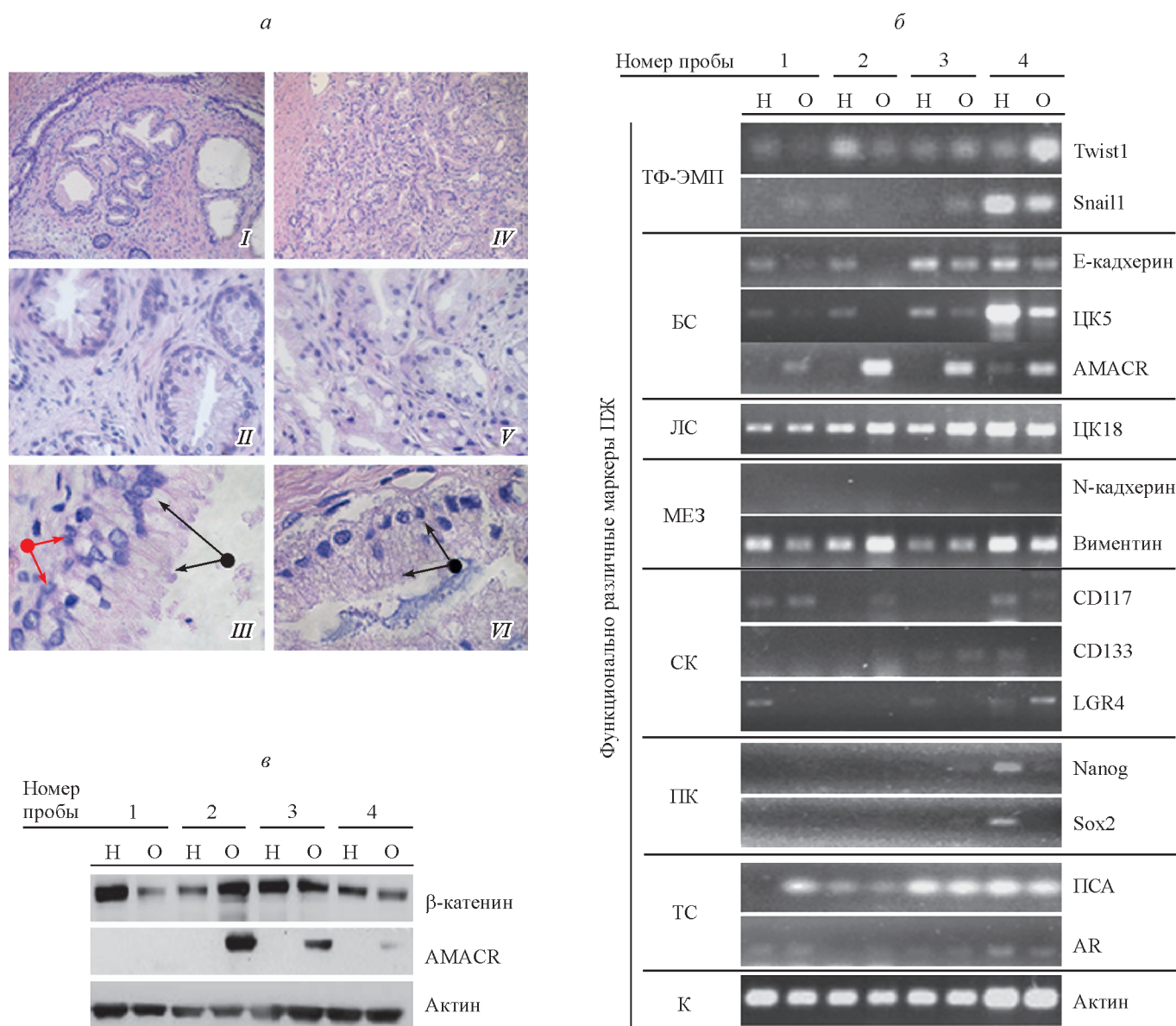


Рис. 1. Гистологическая характеристика участков опухолевой и нормальной тканей ПЖ (а) и экспрессия функционально различных маркеров в опухолевой и нормальной тканях ПЖ у пациентов с РПЖ (б, в).

а — окраска гематоксилин-эозином: I—III — нормальная ткань, IV—VI — опухолевая ткань; красными и черными стрелками показаны соответственно клетки базального и люминального слоев; увел.: об. $10\times$ (I, II), $40\times$ (III, IV) и $100\times$ (V, VI). б — экспрессия маркеров по данным ОТ-ПЦР. в — экспрессия AMACR и β -катенина в ткани ПЖ по данным Вестерн-блот-анализа. б, в: Н, О — нормальная и опухолевая ткани соответственно, ТФ-ЭМП — транскрипционные факторы, регулирующие эпителиально-мезенхимный переход, БС — базальный слой, ЛС — люминальный слой, МЕЗ — мезенхимные клетки, СК — стволовые клетки, ПК — плюрипотентные клетки, ТС — тканеспецифические клетки, К — контроль. Экстракты тканей, содержащие 30 мкг общего белка в объеме 25 мкл, наносили на одну дорожку 8%-ного полиакриламидного геля и подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях; электрофоретически разделенные белки переносили на мембрану PVDF, обрабатывали антителами и визуализировали с помощью реактива ECL.

ЦК5,14), используемой в качестве диагностического критерия РПЖ (Humphrey, 2007).

Доминирование люминального фенотипа в начале изучения РПЖ представлялось очевидным доказательством его происхождения из люминальных клеток (Xin, 2013). Последующие исследования показали, что характерной чертой РПЖ является появление устойчивости к кастрации после проведения антигормональной терапии. Поскольку клетки базального слоя не экспрессируют AR и их рост не зависит от андрогенов, предположили, что они являются источником РСК. В соответствии с этим предположением было установлено, что базальные

клетки могут быть трансформированы путем активации онкогенных сигналов, но в ходе трансформации дифференцируются в клетки с люминальным фенотипом (Min et al., 2010). Последующие работы подтвердили, что базальные клетки являются родоначальными для всех линий клеток ПЖ (Lawson et al., 2007; Leong et al., 2008). Характеристика клеточной линии, являющейся мишенью опухолевой трансформации, имеет практическое значение, поскольку, с одной стороны, она влияет на фенотип раковых клеток, а с другой — определяет агрессивность опухолевого роста. Данные из литературы свидетельствуют о том, что люминальный фенотип раковых клеток соот-

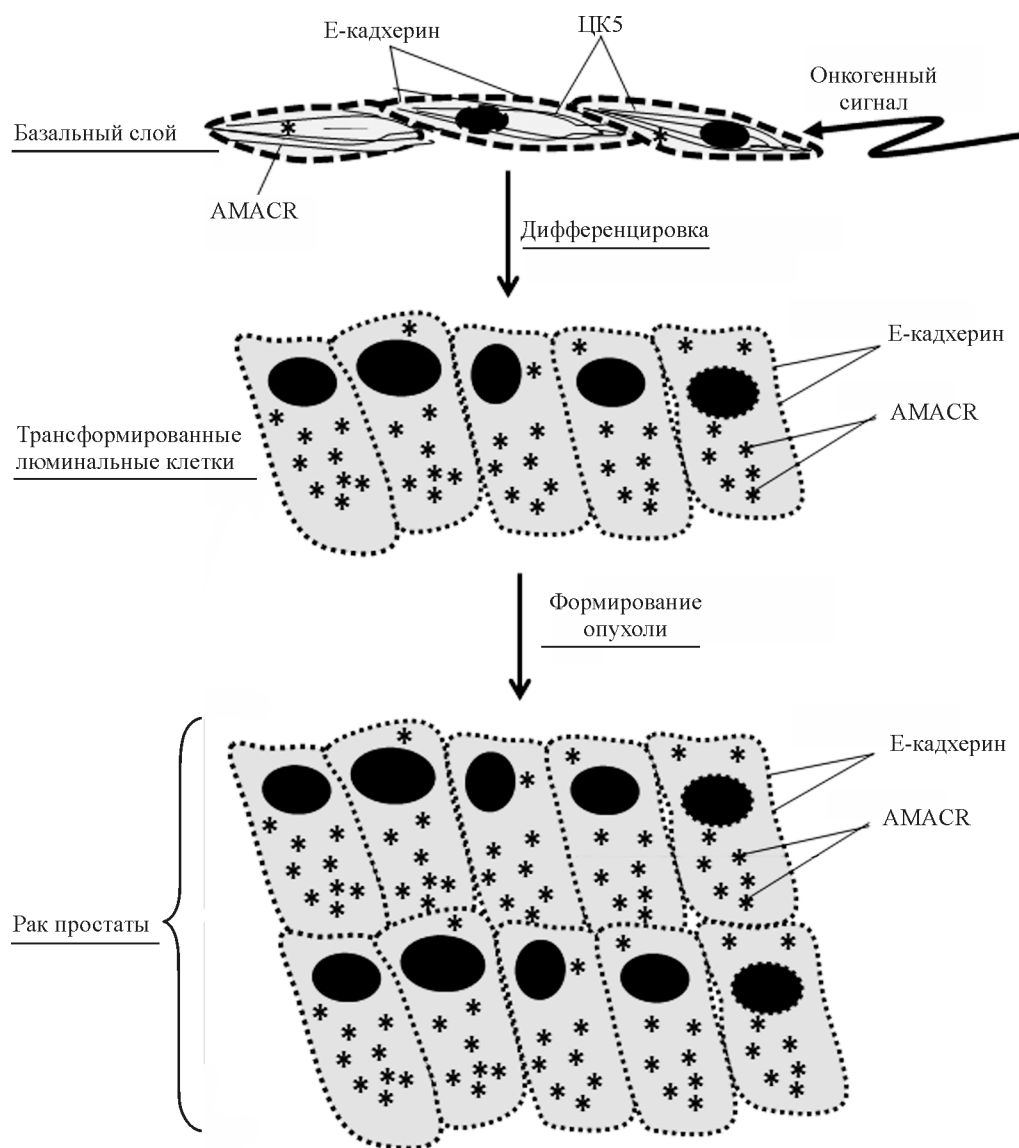


Рис. 2. Схема злокачественной трансформации эпителия при раке простаты.

Онкогенный сигнал вызывает трансформацию клеток базального слоя, которые подвергаются дифференцировке и приобретают люминальный фенотип. В ходе такой дифференцировки происходит уменьшение экспрессии Е-кадгерина и ЦК5, тогда как продукция АМАСР возрастает. Трансформированные люминальные клетки продуцируют по сравнению с базальными клетками меньше Е-кадгерина, но значительно больше АМАСР.

ветствует более агрессивному течению РПЖ (Lee, Shen, 2015).

В настоящей работе предпринята попытка путем определения уровня экспрессии функционально различных маркеров ПЖ в тканевых пробах, полученных от пациентов, оперированных по поводу РПЖ, охарактеризовать их взаимосвязи и сравнить диагностическую значимость. Гистологическая характеристика ткани ПЖ, окрашенной гематоксилин-эозином, выявила гиперплазию трансформированной эпителиальной ткани с деструкцией базального слоя при РПЖ (рис. 1, а), что соответствовало уменьшению экспрессии маркеров базального слоя клеток — Е-кадгерина и ЦК5. Вместе с тем уровень экспрессии другого маркера базального слоя — АМАСР — значительно повышался на фоне его низкой продукции в нормальных условиях (рис. 1, б). Интересно, что продукция маркера люминального слоя ЦК18 оставалась неизменной. Снижение экспрессии эпителиаль-

ных маркеров Е-кадгерина и ЦК5 не приводило к повышению продукции мезенхимных маркеров — N-кадгерина и виментина (рис. 1, б, в). Повышение уровня мРНК белка АМАСР соответствовало индукции его синтеза в опухолевой ткани 3 из 4 пациентов с РПЖ, при том что АМАСР не выявлялся в нормальной ткани (рис. 1, в). Найденное нами повышение продукции мРНК и белка АМАСР, по-видимому, является диагностически наиболее значимым при использовании нефракционированной ткани ПЖ. Интересно, что в тех же условиях мы не выявили одностороннего изменения уровня таких ТФ-ЭМП, как Snail1, Twist1, β-катенин, изменения экспрессии маркеров стволовых клеток CD117, CD133 и LGR4 и тканеспецифических маркеров ПЖ — ПСА и АР, продукция которых выявлялась у большей части пациентов, но не увеличивалась при РПЖ. Экспрессия маркеров плюрипотентных клеток Nanog и Sox2 была обнаружена только у 1 из 4 пациентов.

Полученные нами результаты показывают, что наиболее значительные изменения функциональных маркеров при РПЖ, которые выявляются в нефракционированной ткани ПЖ, происходят с маркерами клеток базального слоя и включают в себя уменьшение экспрессии Е-кадгерина и ЦК5, а также повышение продукции АМАСР. По-видимому, изменение экспрессии этих маркеров возникает в значительной части клеток ПЖ в противоположность CD117, CD133 и LGR4, изменение продукции которых, возможно, происходит в стволовых, но не выявляется в неселектированных клетках. Снижение продукции Е-кадгерина не приводит к повышению уровня N-кадгерина и виментина, регуляция экспрессии которых осуществляется независимо (Gheldof, Verx, 2013). С другой стороны, выявленное нами уменьшение продукции Е-кадгерина, по-видимому, не является критичным для потери клеточной адгезивности и полярности значительной части клеток ПЖ, но может касаться ее отдельных популяций. Низкий уровень экспрессии в ткани ПЖ Sox2 и Nanog, которые вместе с Oct4 формируют сеть плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках, с нашей точки зрения, подтверждает идею о том, что функция самоподдержания в соматических стволовых клетках регулируется другими факторами (Hanna et al., 2010).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при РПЖ наиболее выраженные изменения происходят в базальном слое, который подвергается разрушению, выявляемому при окраске гематоксилин-эозином (рис. 1, а). Разрушение базального слоя связано со снижением экспрессии Е-кадгерина, ЦК5 и повышением продукции АМАСР в нефракционированных тканевых пробах ПЖ. Эти данные дают основание предположить, что клетки базального слоя являются мишенями опухолевой трансформации при РПЖ, что соответствует данным из литературы (Lee, Shen, 2015). Морфологические и функциональные изменения в клетках базального слоя при РПЖ, по-видимому, происходят в соответствии с их дифференцировкой в люминальные клетки, количество которых, судя по экспрессии маркера ЦК18, не уменьшается (рис. 1, б). Схематически трансформация клеток при РПЖ изображена на рис. 2.

Наши результаты показывают, что наиболее информативным маркером РПЖ, выявляемым в нефракционированных тканевых пробах, является АМАСР, который катализирует обратимый переход (2R)-метилацил-CoA и (2S)-метилацил-CoA (Savolainen et al., 2005; Bhaumik et al., 2007), предшествующий β -окислению жирных кислот и синтезу желчных кислот (Lloyd et al., 2008, 2013). В ткани опухолей активирован обмен жирных кислот, что сопряжено с повышением продукции АМАСР, который обеспечивает раковым клеткам уникальные энергетические преимущества для роста в условиях активной пролиферации (Jiang et al., 2003; Baron et al., 2004). Данные из литературы свидетельствуют о том, что усиление экспрессии АМАСР при карциномах печени связано с активирующими мутациями гена β -катенина (CTNNB1), продукт которого регулирует активность генов путем взаимодействия с белками Lef/Tcf (Sekine et al., 2011). Известно, что β -катенин играет важную роль в регуляции самоподдержания нормальных и РСК различных тканей и гиперпродуцируется при раке различных органов (Clevers, Nusse, 2012). Возможно, АМАСР является мишенью β -катенина, вызывающего увеличение его продукции в случае активирующих мутаций. Результаты настоящей работы показывают, что активация экспрессии мРНК и

продукции АМАСР в общей популяции клеток ПЖ при РПЖ не связана с повышением уровня β -катенина (рис. 1, в), которое, возможно, существует в популяции РСК. Перспективным направлением для установления связи функционально различных маркеров ПЖ и роли ЭМП в инвазии и метастазировании является оценка их уровня в селектированной популяции РСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00251), которая обеспечила проведение электрофореза и иммуноблотинга, а также Российского научного фонда (проект 14-50-00068), за счет которого выполнен гистологический анализ ткани предстательной железы и оценена экспрессия функционально различных маркеров при раке предстательной железы с помощью ОТ-ПЦР.

Список литературы

- Жидкова О. В., Петров Н. С., Попов Б. В. 2013. Получение и характеристика маркерных и ростовых свойств мезенхимных стволовых клеток мочевого пузыря. Журн. эволюц. физиол. и биохим. 49 (1) : 67—77. (Zhidkova O. V., Petrov N. S., Popov B. V. 2013. Production and characteristics of the growth and marker properties of mesenchymal stem cells of urinary bladder. J. Evol. Biochem. Fyziol. 49 (1) : 67—77.)
- Azuma M., Hirao A., Takubo K., Hamaguchi I., Kitamura T., Suda T. 2005. A quantitative matrigel assay for assessing repopulating capacity of prostate stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338 : 1164—1170.
- Baron A., Migita T., Tang D., Loda M. 2004. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? J. Cell. Biochem. 91 : 47—53.
- Bhaumik P., Schmitz W., Hassinen A., Hiltunen J. K., Conzelmann E., Wierenga R. K., Lloyd M. D. 2007. The catalysis of the 1,1-proton transfer by alpha-methyl-acyl-CoA racemase is coupled to a movement of the fatty acyl moiety over a hydrophobic, methionine-rich surface. J. Mol. Biol. 367 : 1145—1161.
- Bonkhoff H., Stein U., Remberger K. 1993. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol 423 : 291—294.
- Brabletz T., Lyden D., Steeg P. S., Werb Z. 2013. Roadblocks to translational advances on metastasis research. Nat. Med. 19 : 1104—1109.
- Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., Browne G. J., Richard G., Wierneckx A., Saldanha G., Osborne J., Hutchinson P., Tse G., Lachuer J., Puisieux A., Pringle J. H., Ansieau S., Tulchinsky E. 2013. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. Cancer Cell. 24 : 466—480.
- Clevers H., Nusse R. 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. Cell. 149 : 1192—1205.
- Gheldof A., Bex G. 2013. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 116 : 317—336.
- Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. Cell. 143 : 508—525.
- Humphrey P. A. 2007. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. J. Clin. Pathol. 60 : 35—42.
- Jiang Z., Fanger G. R., Woda B. A., Banner B. F., Algate P., Dresser K., Xu J., Chu P. G. 2003. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. Hum. Pathol. 34 : 792—796.
- Lawson D. A., Xin L., Lukacs R. U., Cheng D., Witte O. N. 2007. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104 : 181—186.

- Lee S. H., Shen M. M. 2015. Cell types of origin for prostate cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 37 : 35—41.
- Leong K. G., Wang B. E., Johnson L., Gao W. Q. 2008. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature*. 456 : 804—808.
- Lin V. K., Wang S. Y., Vazquez D. V., Xu C., Zhang S., Tang L. 2007. Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stem cell like property. *Prostate*. 67 : 1265—1276.
- Lloyd M. D., Darley D. J., Wierzbicki A. S., Threadgill M. D. 2008. Alpha-methylacyl-CoA racemase—an «obscure» metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J.* 275 : 1089—1102.
- Lloyd M. D., Yevglevskis M., Lee G. L., Wood P. J., Threadgill M. D., Woodman T. J. 2013. α -Methylacyl-CoA racemase (AMACR): metabolic enzyme, drug metabolizer and cancer marker P504S. *Prog. Lipid Res.* 52 : 220—230.
- Long R. M., Morrissey C., Fitzpatrick J. M., Watson R. W. 2005. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin. Sci. (London)*. 108 : 1—11.
- Maitland N. J., Frame F. M., Polson E. S., Lewis J. L., Collins A. T. 2011. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? *Horm. Cancer*. 2 : 47—61.
- Medici D., Hay E. D., Olsen B. R. 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol. Biol. Cell*. 19 : 4875—4887.
- Min J., Zaslavsky A., Fedele G., McLaughlin S. K., Reczek E. E., De Raedt T., Guney I., Strohlic D. E., Macconail L. E., Beroukhim R., Bronson R. T., Ryeom S., Hahn W. C., Loda M., Cichowski K., Lawson D. A. 2010. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat. Med.* 16 : 286—294.
- O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., Dick J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 445 : 106—110.
- Pardal R., Clarke M. F., Morrison S. J. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 3 : 895—902.
- Prajapati A., Gupta S., Mistry B., Gupta S. 2013. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. *Biomed. Res. Int.* 2013 : 107954.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414 : 105—111.
- Richard C., Kim G., Koikawa Y., Salm S. N., Tsujimura A., Wilson E. L., Moscatelli D. 2002. Androgens modulate the balance between VEGF and angiopoietin expression in prostate epithelial and smooth muscle cells. *Prostate*. 50 : 83—91.
- Savolainen K., Bhaumik P., Schmitz W., Kotti T. J., Conzelmann E., Wierenga R. K., Hiltunen, J. K. 2005. Alpha-methylacyl-CoA racemase from *Mycobacterium tuberculosis*. Mutational and structural characterization of the active site and the fold. *J. Biol. Chem.* 280 : 12 611—12 620.
- Sekine S., Ogawa R., Ojima H., Kanai Y. 2011. Overexpression of α -methylacyl-CoA racemase is associated with CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinomas. *Histopathology*. 58 : 712—719.
- Shapiro E., Becich M. J., Hartanto V., Lepor H. 1992. The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. *J. Urol.* 147 : 1293—1297.
- Tam W. L., Weinberg R. A. 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* 19 : 1438—1449.
- Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y., Nieto M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139 : 871—890.
- Tulchinsky E., Pringle J. H., Caramel J., Ansieau S. 2014. Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. *Oncotarget*. 5 : 1—2.
- Wei B., Han X. Y., Qi C. L., Zhang S., Zheng Z. H., Huang Y., Chen T. F., Wei H. B. 2012. Coaction of spheroid-derived stem-like cells and endothelial progenitor cells promotes development of colon cancer. *PLoS ONE*. 7 : e39069.
- Xin L. 2013. Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene*. 32 : 3655—3663.
- Yang J., Weinberg R. A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Development*. 14 : 818—829.

Поступила 19 II 2016

MARKERS OF THE PROSTATE BASAL LAYER CELLS ARE EFFECTIVE INDICATORS OF ITS MALIGNANT TRANSFORMATION

N. S. Petrov,¹ M. A. Voskresensky,² R. V. Grosov,³ O. V. Korshak,³ A. Yu. Zaritsky,³
N. A. Vereschagina,¹ B. K. Komyakov,² B. V. Popov^{1, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² 2nd City Hospital, Health Ministry of Russian Federation, St. Petersburg, 194354,

and ³ V. A. Almazov North-Western Federal Medical Research Center Russian Federation, St. Petersburg, 197341;

* e-mail: borisvp478@gmail.com

Development of local or general forms of prostate cancer (PC) depends on formation of metastasis the biological nature of which is based on epithelial mesenchymal transition (EMT). EMT presents highly conservative reversible program that is maintained by specific transcription factors which suppress E-cadherin expression and support production of mesenchymal polarity factors. The goal of this work was to study the functionally distinct markers in malignant prostate tissue of patients with prostate cancer using the histological evaluation, reverse polymerase chain reaction and immunoblotting. Our results showed that mostly evident alterations in prostate tissue of patients with prostate cancer were associated with the cells of basal layer. Expression levels of the markers of this layer: E-cadherin and CK5, were decreased, while that of AMACR — increased. These results support an idea that the basal cells are primarily targeted during transformation and acquired the luminal phenotype in the course of the following differentiation. The functional analysis of these results may be performed in future using selected prostate cancer stem cells.

Key words: prostate cancer, cancer markers, AMACR.