

УДК 577.112

Передереева Е.В.^{1,2}, Клунова С.М.¹, Параконная А.А.², Фрыкин А.Д.¹

¹Московский педагогический государственный университет,

²Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва)

ЭКСПРЕССИЯ ЛЕПТИНА У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

E. Peredereeva^{1,2}, S. Klunova¹, A. Parakonnaya², A. Frykin¹

¹Moscow State Pedagogical University,

²N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, Moscow

EXPRESSION OF LEPTIN IN BREAST CANCER PATIENTS

Аннотация. Проведен анализ содержания гормона лептина (LEP) в сыворотке крови и опухолевой ткани у 58 пациенток репродуктивного возраста с различными клиническими характеристиками рака молочной железы (РМЖ). С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) установлено, что уровень экспрессии LEP у пациенток с быстро растущими опухолями значительно выше, чем при доброкачественных фиброаденомах или у здоровых женщин. С помощью ОТ ПЦР и иммуногистохимического окрашивания срезов выявлена связь между экспрессией LEP/LEPR в злокачественных опухолях молочной железы и при трижды негативном РМЖ. Полученные данные указывают на возможную ассоциацию между повышенным уровнем экспрессии LEP и развитием РМЖ.

Ключевые слова: лептин, рак молочной железы, экспрессия генов LEP/LEPR (лептина и его рецепторов) и белка лептина.

Abstract. Analysis of hormone leptin (LEP) concentrations in blood serum and tumor tissue of 58 patients of reproductive age with different clinical characteristics of breast cancer (BC) has been made. It was found by ELISA, that LEP level in patients with rapid malignant tumor growth is higher than in ones with mammary fibroadenoma or in donor sera. The correlation between LEP and LEPR gene expression was revealed by RT PCR and immunohistochemical tissue staining in malignant mammary tumors and triple negative BC. The data obtained have shown the possible association between high LEP sera level and tumor progression.

Key words: leptin, breast cancer, leptin gene, leptin's receptor gene and protein leptin expression.

Гормон лептин (LEP) представляет собой низкомолекулярный α-белок (16 кДа, 167 аминокислот), который по особенностям своей кристаллической структуры относится к семейству цитокинов. Молекулы LEP циркулируют в крови как в свободной, так и в связанной с другими белками форме. Этот пептидный гормон играет ключевую роль в регуляции процессов метаболизма, функций нейроэндокринной системы, включая гипофиз, гипоталамус, надпочечники, иммунную систему. В последние годы появились экспериментальные данные о роли лептина в индукции и регуляции хронических воспалительных процессов и дегенеративных заболеваний, в том числе аутоиммунных патологии, диабета 2-го типа и рака. Список патологий, связанных с изменением функциональной активности лептин-зависимых сигнальных путей в последнее время заметно расширился [3]. В частности, показано, что LEP активирует транскрипцию гена, кодирующего антиапоптозный белок сурвивин (BIRC-5), а также VEGF, JAK2, LIF, STAT3, cdk-зависимые сигнальные пути. В целом лептин регулирует каскад сигнальных путей, опосредующих жизненный цикл клетки и ее неопластические свойства: способность к неконтролируемому делению, синтез белков – маркеров злокаче-

твенной трансформации и т.д. [2]. Обнаружено, что уровень лептина, инсулина и липидов низкой плотности и триглицеридов в крови пациенток, а также масса тела пациенток, страдающих раком молочной железы (РМЖ), выше, чем у пациенток с доброкачественными опухолями молочной железы и у здоровых женщин сравнимого возраста, а уровень сывороточного лептина пропорционален индексу массы тела как в пре-, так и в постменопаузе [4]. Однако литературные данные о содержании этого гормона в крови пациенток с опухолями молочной железы и другими новообразованиями противоречивы [1, 4].

Целью работы явилась оценка уровня лептина в крови и опухолевой ткани пациенток с РМЖ репродуктивного возраста (средний возраст 36,3±6,4 года) в зависимости от клинических характеристик заболевания.

Материалы и методы

Исследовали 58 образцов периферической крови и 40 лизатов опухолей этих пациенток. Индекс массы тела пациенток определяли по формуле Кетле-Брока:

$$I = \frac{m}{h^2},$$

где m – масса тела (кг), h – рост (м). Согласно рекомендациям ВОЗ, нормальная масса тела соответствует индексу от 18,50 до 24,99. В исследуемой выборке у 28 пациенток с РМЖ (47,9 %) был избыточный вес ($I=25,00 - 29,99$)

, у 6 больных (10,4 %) – ожирение 1 степени ($I=30,00 - 34,99$), у 24 (41,4%) – нормальная масса тела. Все пациентки принадлежали к онкологически неотягощенным семьям, т. е. не имели близких родственников с онкологическими заболеваниями. По гистологии исследованные опухоли соответствовали 2-3 стадии РМЖ. В качестве контроля исследовали 25 доноров сравнимого возраста (38,2±3,4года) и 30 пациенток с фиброаденомой молочной железы (ФА) в возрасте 25,3±4,8 лет. С помощью твердофазного иммуноферментного метода (ИФА/ELISA, DRG Instruments GmbH, Germany) анализировали уровень лептина в плазме крови и лизатах опухоли молочной железы. Также провели ОТ ПЦР с праймерами к генам, кодирующим LEP и длинную изоформу рецептора лептина (LEPR) (табл. 1).

Для постановки ПЦР и ОТ ПЦР на матрице опухолевых ДНК и РНК использовали пары праймеров, подобранные к участкам генов *LEP*, *LEPR1*, *LEPR2* (длинная изоформа рецептора). Для контроля качества ДНК и РНК, а также экспрессии генов использовали ПЦР / ОТ ПЦР с праймерами к гену GAPDH (глутаральдегидфосфатдегидрогеназы).

В реакцию ОТ ПЦР брали по 20 мкг тотальной свежесыводенной РНК. 5 мкл препарата инкубировали с 50 нг рэндом-праймера (RT-PCR kit, Silex, Москва). В течении 2 мин. при 90°C (отжиг) в 10 mM HEPES (N-2-гидроксэтилпиперазин- N'-2-этансульфоновая кислота), pH=7,0, 1mM ЭДТА в объеме 10 мкл., охлаждали смесь во льду и добавляли к

Таблица 1

Структура использованных для ОТ ПЦР праймеров и длина соответствующих продуктов

Ген	Последовательность праймеров	Длина амплификанта
LEP	Pr1 : 5' - ACCCTGTGCGGATTCTTGTGG - 3' Pr2 : 5' - CTCTGTGGAGTAGCCTGAAGC - 3'	415 п.н.
LEPR1	Pr1: 5' - TGTTGTGAATGTCTTGTGCC - 3' Pr2: 5' - TGCTCCAGTCACTCCAGATTCC-3'	395 п.н.
LEPR2	Pr1: 5' - ATAGTTCAGTCACCAAGTGC - 3' Pr2: : 5' - GTCCTGGAGAАСТCTGATGTCC-3'	340 п.н.
GAPDH	Pr1: 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGG-3' Pr2: 5' -TGGAAGATGGTGTATGGGAT	223 п.н.

ней 20 Ед MMLV-RT-polymerase (Silex), инкубируя 90 мин. в объеме 20 мкл при 37°C, ПЦР с указанными праймерами проводили в режиме 25 циклов: 94°C – 30 сек, 56°C – 45 сек, 72°C – 30 сек. с финальной терминацией при 72°C – 5 мин. Реакцию ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Москва). Амплификаты анализировали в 2% -ном агарозном геле.

Для иммуногистохимического окрашивания тканевых срезов использовали моноклональные антитела к лептину (Leptin/Lep human monoclonal antibody, Dako, USA). С помощью программы MatLab 7.0. проанализировали 300 изображений, полученных после иммуногистохимического окрашивания срезов опухолевых тканей, и 200 изображений нормальных тканей. Сравнивали относительные площади окрашенных антителами гранул лептина и оценивали различия между этим показателем в опухоли и нормальной ткани. Морфология опухоли и нормальной ткани была верифицирована в отделении патологической анатомии РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. Средние значения сравнивали с помощью стандартного t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали значения $p < 0,05$ при 95% -ном доверительном интервале (CI).

Результаты и их обсуждение

Имуногистохимический анализ экспрессии LEP и LEPR в опухолевой и прилежащей нормальной ткани молочных желез пациенток с первичным РМЖ выявил 8/10 (80%) опухолей с экспрессией LEP и 6/10 (60%) – с экспрессией LEPR. При этом наблюдалась взаимосвязь между уровнем экспрессии LEP и LEPR ($p=0,006$), а также экспрессии LepR и эстрогеновых рецепторов в опухоли ($p=0,028$). Полученные нами другие данные [5] указывают на возможную функцию лептина как фактора роста и трансформации эпителиальных клеток молочной железы. По-видимому, лептин-зависимые сигнальные пути важны для индукции эстроген-позитивного РМЖ. Анализ уровня экспрессии LEP/LEPR в сыворотке

и лизатах опухолей с помощью ИФА показал, что средние значения гормона в периферической крови у больных РМЖ достоверно выше уровня LEP у здоровых женщин сопоставимого возраста и массы тела, независимо от стадии менструального цикла. Эти показатели в крови у пациенток с ФА, в среднем, значительно ниже ($4,2 \pm 0,3$ нг/мл), чем у больных РМЖ, и сходны со среднепопуляционными значениями для здоровых женщин. Однако в случае сочетания ФА и фиброзно-кистозной болезни они близки к уровню LEP в крови у пациенток со sporadическим РМЖ: $18,1 \pm 0,5$ нг/мл и $17,9 \pm 2,3$ нг/мл соответственно, что более чем в 4 раза превышает аналогичный показатель у здоровых женщин. Следует отметить, что содержание LEP у пациенток с ФА и избыточной массой тела выше, чем у таковых с нормальной массой. Также удалось выявить тенденцию к повышенной экспрессии лептина в опухолях пациенток с трижды негативным РМЖ (опухоли негативны по экспрессии HER2-неу, эстрогеновых и прогестероновых рецепторов). Это открывает возможности для лечения таких больных препаратами, специфически связывающимися с гормоном и в итоге ингибирующими лептиновые рецепторы. Уровень лептина в опухолях пациенток с РМЖ в пременопаузе был достоверно выше, чем в плазме крови. У пациенток с РМЖ содержание лептина в крови было почти в два раза выше, чем у здоровых женщин в пременопаузе (табл. 2).

У 5-ти больных РМЖ, ассоциированным с беременностью, уровень лептина был выше, чем у пациенток со sporadическим РМЖ, и значительно выше, чем у здоровых женщин. Таким образом, значительные превышения уровня лептина в крови и опухолях пациенток с РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами указывают на возможную ассоциацию этого признака с развитием опухоли. Анализ экспрессии гена LEP и LEPR с помощью ОТ ПЦР на матрице РНК из опухолевых клеток молочной железы выявил взаимосвязь между уровнем экспрессии лептина и его рецептора, а также количественные различия между отдельными образцами

Таблица 2

Индекс массы и содержание лептина в плазме крови и лизатах опухоли у пациенток, страдающих sporadическим РМЖ, и здоровых женщин на разных стадиях менструального цикла (данные ИФА)

Характеристика группы	Средние значения содержания лептина (плазма / лизат опухоли), нг/мл	Средние значения индекса массы тела (I)
Здоровые женщины	постменопауза 6,48±0,7 / нет данных	пременопауза у 1 пациентки - избыточный вес, I>25,0
	пременопауза 7,81±0,9 / нет данных	I<25,0
Больные РМЖ	постменопауза 39,2±3,8 / 43,3±4,5	I>25,0 – избыточный вес. Одна пациентка с ожирением II стадии (I=38,0)
	пременопауза 17,9±2,6/ 58,5±4,8	I<25,0. Одна пациентка с избыточным весом (I=29,8)

опухолей, взятыми от разных пациенток. Результаты ОТ ПЦР и ИФА показали взаимосвязь между экспрессией генов *LEPR/LEP* и концентрацией *Lep/LepR* в лизатах исследованных опухолей. Результаты ОТ ПЦР

и ИГХ-окрашивания срезов ткани РМЖ с помощью моноклональных антител к *LEP* показали достоверное усиление уровня экспрессии в опухолях по сравнению с нормальной тканью (рис. 1 и рис. 2).

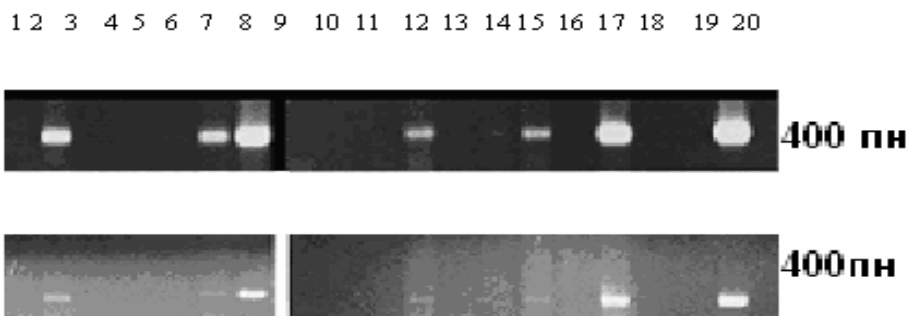


Рис. 1. Результаты ОТ ПЦР с праймерами к генам *LEP* и *LEPR* на матрице опухолевой РНК у некоторых пациенток с РМЖ (дорожки 2; 7; 8; 12; 15; 17; 20). На дорожках 1; 9; 10; 13; 16; 18; 19 – негативный контроль (препараты, обработанные РНКазой).

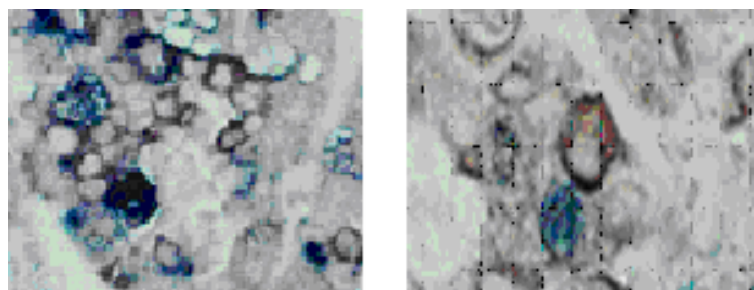


Рис. 2. Срезы опухолевой (протоковый РМЖ, слева) и нормальной (справа) ткани молочной железы, окрашенных иммуногистохимически. Видны количественные различия между количеством гранул, меченных антителами к *LEP*.

В исследованной нами выборке не удалось выявить взаимосвязи между уровнем лептина в сыворотке крови, размером опухолей (данные маммографии и/или УЗИ) и наличием или отсутствием отдаленных метастазов ($P=0,23$, $P=0,68$, соответственно). Для более точной оценки лептина в качестве прогностического маркера требуется анализ больших групп клинически охарактеризованных пациенток разного возраста. Тем не менее, полученные результаты говорят в пользу прогностической значимости экспрессии Lep/LepR в опухолях молочной железы на разных стадиях заболевания.

Выводы

1. Анализ экспрессии LEP/LEPR различными методами позволяет достоверно оценить уровень экспрессии гормона в опухолевой ткани и/или сыворотке крови.

2. С помощью ОТ ПЦР и иммунохимических методов обнаружена корреляция экспрессии LEP и LEPR в быстро растущих опухолях молочной железы, а также повышенный уровень экспрессии LEP/LEPR в крови и опухолях молочной железы у пациенток с трижды негативным РМЖ.

3. Повышенный уровень лептина в крови и в опухолях пациенток с РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами и пациентками с доброкачественными фиброаденомами указывает на возможную ассоциацию этого признака с развитием опухоли.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Girsouard J., Dembinski K., Mayer D., Keller U., Muller B. Targeting AMP-activated protein kinase in adipocytes to modulate obesity-related adipokine production associated with insulin resistance and breast cancer cell proliferation // *Dietol.Metab. Syndr.* 2011. Vol.3. № 1. P. 16-23.
2. Grossmann M.E, Ray A., Nkhata K.J, Malakhov D.A Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes // *Cancer Metast.Rev.* 2010. Sept. P. 125-128.
3. Gupta V., Jafar T., Gupta V. Association of TNF- α promoter gene G-308A polymorphism with metabolic syndrome, insulin resistance, serum TNF- α and leptin levels in Indian adult women // *Cytokine.* 2011. May 24. PMID: 21616679.
4. Hou W.K., Xu Y.X., Yu T. Adipocytokines and breast cancer risk // *Clin.Med.J.* 2007. Vol. 120. № 18. P. 1592-1596.
5. Jarde T., Caldefie-Chezet F., Damez M. et al. Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast cancerinoma // *Oncol.Rep.* 2008. Vol. 19. № 4. P. 905-911.