

ЮЙ ЦАО, Л.А. АТРАМЕНТОВА

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
E-mail: wshkoda23@rambler.ru

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНА *FHIT* ПРИ РАКЕ ПИЩЕВОДА У ЧЕЛОВЕКА



С помощью внутригенных микросателлитов *D3s1540* и *D3s1234* выявлены делеции в области 5-го и 8-го экзонов гена *FHIT* у 17 мужчин и 5 женщин, больных раком пищевода, из китайской провинции Хебэй. У 16 из 22 пациентов в опухолевой ткани имелась гомозиготная делеция в области 5-го или 8-го экзона, причем у шести из них гомозиготные делеции присутствовали в обоих экзонах. Гиперметилирование гена *FHIT* в клетках здоровой ткани пищевода обнаружено только у одного из 22 пациентов. В клетках опухоли ген гиперметилирован у 17 пациентов. Гомозиготность по делеции или гиперметилированию гена *FHIT* выявлены в раковых клетках у всех пациентов.

© ЮЙ ЦАО, Л.А. АТРАМЕНТОВА, 2009

Введение. Ежегодно в мире от рака пищевода умирают 300 тысяч человек. Больше половины из них китайцы. Частота этого заболевания в среднем по планете составляет 5 на 100 тысяч человек. Самая высокая заболеваемость раком пищевода зарегистрирована в Китае: в среднем на 100 тыс. населения приходится 17,38 больных. В провинции Хебэй этот показатель на порядок выше: 133 больных на 100 тыс. населения [1]. В уезде Цийсян, который находится на юге этой провинции, заболеваемость раком пищевода самая высокая в мире – в среднем 244 [2], а в отдельных местах 1004 на 100 тысяч населения [3]. Ведущую роль в этиологии рака пищевода отводят потреблению алкоголя и курению табака, а также особенностям национальной диеты. Тем не менее никакие факторы среды, которые отличали бы условия жизни этой провинции от других регионов Китая, выявлены не были. Это дает основание предполагать, что причина высокой заболеваемости генетическая.

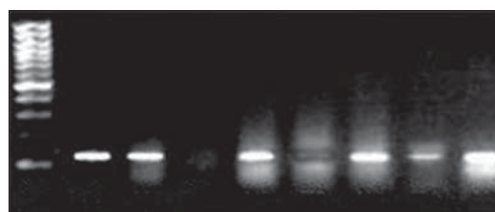
Эпидемиологические, популяционные и семейные исследования свидетельствуют о высокой наследуемости рака пищевода. По данным Li Ruqing et al. [4] наследуемость рака пищевода составляет 72 %. Результаты генетических анализов, проведенные независимо двумя методами – на основе эпидемиологических данных и по результатам семейной истории – дали близкие оценки: 73 и 75 % [5], что предполагает существование в системе генетического контроля главного гена с сильным эффектом [6].

К настоящему времени описаны сотни генов, имеющих отношение к канцерогенезу, среди них ген *FHIT*, открытый в 1996 г. [7]. Ген расположен в локусе 3p14.2, содержит 10 экзонов и включает ломкую область хромосомы 3 *FRA3B* (chromosomal fragile site). Продукт гена – белок FHIT относится к семейству гистициновой триады и представляет собой гидролазу Ap3A. Отсюда происходит название гена *fragile histidine triad* – *FHIT* [7, 8]. Нормальный аллель этого гена играет роль супрессора опухоли, а мутантный предрасполагает к образованию злокачественной опухоли [9, 10]. Наличие ломкого района делает ген чувствительным к действию канцерогенов [11, 12]. В клетках разного вида злокачественных опухолей экспрессия гена *FHIT* снижена. Аномальные варианты гена обусловлены в основном деле-

циями [7, 13]. Выявляется также гиперметилирование гена [14, 15]. Все сказанное свидетельствует о целесообразности исследовать генетические и эпигенетические изменения гена *FHIT* у больных раком пищевода из китайской провинции Хебэй. Это и стало целью настоящей работы.

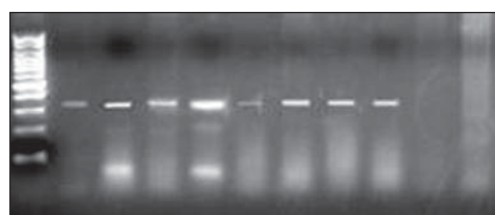
Материалы и методы. Изучены образцы ткани 22 больных раком пищевода (17 мужчин и 5 женщин) в возрасте 50–79 лет. Опухолевые и гомологичные нормальные ткани были получены хирургическим путем. Образцы ткани охлаждали сразу после резекции и сохраняли до анализа при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. ДНК выделяли с помощью протеинкиназы К методом фенол-хлороформной экстракции [16]. Депротеинизированную ДНК хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для определения концентрации ДНК пользовались программой «gel-pro 4.0». Для маркирования гена использовали внутригенные микросателлитные маркеры: *D3s1540*, расположенный рядом с 5-м экзоном, и *D3s1234*, находящийся рядом с 8-м экзоном. Маркеры были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции. Структура прямого праймера для *D3s1234* CCTGTGAGACAAAGCAAGAC, обратного GACATTAGGCACAGGGCTAA, прямой праймер для *D3s1540* AAAGGGGGCTA-GAATGAGAG, обратный TCAAATCAGGCT-TACAAGGC. Метил-специфическую полимеразную цепную реакцию проводили по методу Herman et al. [17]. Затравку для гена *FHIT* создавали в соответствии с рекомендациями [18]. Номер в GeneBank – U76262 и U76263. Статистический анализ проводили с помощью точного метода Фишера [19], проверку гипотез осуществляли на уровне значимости не менее 0,05 для двустороннего критерия. Расчеты выполняли в программе Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. Унаследованная рецессивная мутация гена супрессора опухоли присутствует в гетерозиготном состоянии во всех соматических клетках организма и функционирует как ген наследственной предрасположенности к раку. Если в одной из конституционально гетерозиготных клеток происходит мутация второго аллельного гена, она, утрачивая гетерозиготность, становится гомозиготной и дает начало раковой опухоли. Присутствие полосы на электрофореграм-



М T1 N1 T2 N2 T3 N3 T4 N4

Рис. 1. Электрофореграмма, выявляющая делецию гена *FHIT* с помощью маркера *D3s1234* в области 8-го экзона: М – 100–1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань



М T1 N1 T2 N2 T3 N3 T10 N10 T15 N15

Рис. 2. Электрофореграмма, выявляющая делецию гена *FHIT* с помощью маркера *D3s1540* в области 5-го экзона: М – 100–1500 бп стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань

ме ДНК свидетельствует о том, что в клетке имеется нормальный вариант гена, а отсутствие полосы указывает на наличие гомозиготной делеции (рис. 1 и 2). Упомянутый метод не позволяет различить нормальную гомозиготу (+/+) и гетерозиготу по делеции (+/-), так как в обоих случаях на электрофореграмме присутствует искомая полоска и лишь ее отсутствие указывает на генотип -/- (таблица). Если в клетках здоровой ткани имеется один нормальный аллель (+/-), то генотип -/- клеток раковой ткани этого же пациента следует рассматривать как результат одной мутации (+/-) → (-/-). Если генотип здоровой ткани гомозиготный (+/+), то переход в состояние -/- является результатом двух мутаций в одной клетке. Для группы в 22 человека это событие представляется почти невероятным. Поэтому пациентов, у которых клетки здоровой ткани имели нормальный аллель, а клетки раковой ткани имели генотип -/-, рассматривали как конституциональных гетерозигот (+/-), а генотип (-/-) раковых клеток этих же пациентов определяли как «поте-

ря гетерозиготности» (ПГ). Генотип пациентов, у которых в клетках раковой и гомологичной здоровой ткани выявлен нормальный аллель, обозначен +/- (таблица).

У пяти пациентов клетки здоровой ткани были гомозиготными по делеции в 5-м экзоне. У четырех из них гомозиготными были и клетки опухолевой ткани, а у одного опухолевая ткань имела нормальный аллель. (Мы не исключаем, что этот случай — результат методической ошибки, иначе следует признать наличие обратной мутации — восстановление гетерозиготности.) У 10 пациентов в опухолевой ткани имелась гомозиготная делеция. Эти случаи рассматриваем как потерю гетерозиготности, в результате которой развилась опухоль. У семи пациентов в нормальной и опухолевой ткани выявлен нормальный аллель. Эти пациенты могли быть как нормальными гомозиготами (+/+), так и гетерозиготами (+/-).

Клетки здоровой ткани только одного пациента были гомозиготны по делеции в 8-м

экзоне (у этого же пациента гомозиготной была и раковая ткань), а у остальных 21 в клетках здоровой ткани присутствует нормальный аллель. У 12 пациентов клетки опухоли были гомозиготны по делеции (ПГ), поэтому клетки нормальной ткани считали гетерозиготными. Конституциональный генотип девяти пациентов по этому сайту точно не определен, так как в клетках и здоровой, и опухолевой ткани у них выявлен нормальный аллель.

Всего у 16 из 22 пациентов в опухолевой ткани имелась гомозиготная делеция в области 5-го или 8-го экзона, причем у шести из них гомозиготные делеции присутствовали в обоих экзонах. Статистический анализ показал значимую ($p < 0,01$) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*. Вероятность заболеть раком для конституциональной гетерозиготы составляет 100 % [20], следовательно, вероятность попасть в выборку для гомозиготы и гетерозиготы теоретически одинакова. Приняв эти допущения, по генотипам нормальных

Делеция и метилирование гена *FHIT*

Пациент	5-й экзон (маркер <i>D3s1540</i>)		8-й экзон (маркер <i>D3s1234</i>)		Метилирование	
	Раковая ткань	Здоровая ткань	Раковая ткань	Здоровая ткань	Раковая ткань	Здоровая ткань
1	-/- (ПГ)	+/-	+/	+/	-	-
2	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	-	-
3	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
4	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
5	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
6	-/- (ПГ)	+/-	+/	+/	+	-
7	+/	+/	-/- (ПГ)	+/-	+	-
8	-/-	-/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
9	+/	+/	+/	+/	+	-
10	+/	+/	+/	+/	+	-
11	-/-	-/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
12	+/	+/	-/- (ПГ)	+/-	+	-
13	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	+	-
14	-/-	-/-	+/	+/	+	-
15	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-
16	-/- (ПГ)	+/-	+/	+/	+	-
17	+/-	-/-	+/	+/	+	-
18	+/	+/	-/- (ПГ)	+/-	-	-
19	+/	+/	-/- (ПГ)	+/-	+	-
20	-/- (ПГ)	+/-	-/- (ПГ)	+/-	-	-
21	+/	+/	+/	+/	+	+
22	-/- (ПГ)	+/-	+/	+/	-	-

Примечание. (-/-) — гомозигота по делеции, (+/-) — гетерозигота по делеции, (+/) — второй аллель неизвестен, ПГ — потеря гетерозиготности, (+) — гиперметилирование, (-) — отсутствие гиперметилирования.

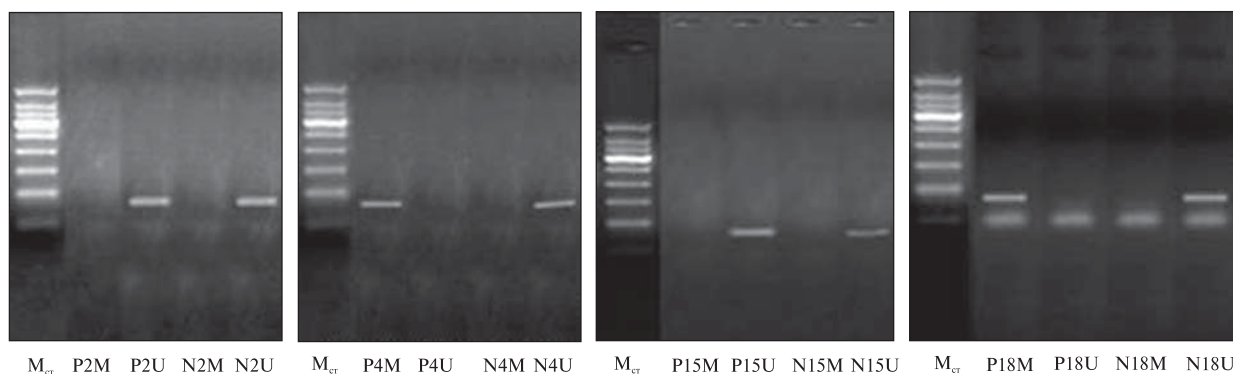


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов метил-специфической полимеразной цепной реакции (М – стандартный маркер, Р – раковая ткань, N – здоровая ткань, М – метилированная затравка, U – неметилированная затравка)

клеток (конституциональному генотипу) сделали ориентировочную оценку аллельных частот гена *FHIT*. Расчет проводили из предположения равновесности популяции по изученному гену $2pq$ (+/-): q^2 (-/-).

Частота мутантного аллеля $q_{(-)} = 2a/(2a + A)$, где A – число гетерозигот, a – число гомозигот по делеции. Частота делеции в 5-м экзоне составляет $q = 0,5$, в 8-м – $q = 0,143$, при учете обеих делеций частота мутантного аллеля $q = 0,42$. Продолжив формальные выкладки, получаем, что в изученном населении 18 % должны быть гомозиготами и 49 % гетерозиготами по этой мутации. В целом носителями мутации в гене *FHIT* могут быть 67 % населения. Насколько эти результаты соответствуют действительному положению дел, можно было бы проверить, если исследовать репрезентативную выборку населения. Если приведенные допущения отражают реальное положение дел, то высокая частота рака пищевода в изученном населении находит объяснение. Эти оценки дают основание сделать предположение, что широкая распространенность рака пищевода в изученном населении, возможно, связана с высокой частотой мутации гена *FHIT*. Авторы отдают себе отчет, что предложенная схема является сильным упрощением, поскольку при указанной частоте мутации больных раком должно быть гораздо больше. Согласовать высокую частоту мутации с относительно низкой при упомянутой популяционной структуре распространенностью заболевания можно, если принять во внимание, что в организме существуют мощные

механизмы защиты от раковых клеток – репарационные системы либо системы, освобождающие организм от злокачественных клеток.

Фенотипическое проявление гена может модифицироваться эпигенетическими факторами. Причиной утраты активности гена может быть эпигенетическое изменение, в частности его гиперметилирование (рис. 3). Гиперметилирование гена *FHIT* в клетках здоровой ткани пищевода обнаружено только у одного (4,6 %) из 22 пациентов (таблица). В клетках опухоли ген гиперметилирован у 17 (77 %, $p < 0,05$) пациентов. Обобщая данные, отмечаем, что гомозиготность по делеции или гиперметилирование гена *FHIT* выявлено в раковых клетках у всех пациентов ($100,0 \pm 4,4$ %). Вследствие делеции или метилирования ген *FHIT* становится неактивным и теряет свойство быть супрессором опухоли [14, 15, 18, 21, 22]. В паре генов один может содержать делецию, а второй быть метилированным, что находится в согласии с гипотезой Knudson [23] о двухударной природе возникновения рака. Делеции и гиперметилирование гена *FHIT* выявляются на ранних стадиях заболевания и потому могут использоваться для ранней диагностики рака. Дальнейшие исследования этого гена помогут приблизиться к пониманию механизмов канцерогенеза и обнаружить мишени для эффективного терапевтического воздействия.

Авторы выражают благодарность директору Института онкологии 4-й клиники Медицинского университета провинции Хейбэй (Китай) Баоэнь Шан (Baopen Shan) за содействие в проведе-

нии исследования и научным сотрудникам Денг-гуень Вен (*Denggun Wen*) и Лиджен Вей (*Lizhen Wei*) за помощь в подборе методик.

Cao Yu, L.A. Atramentova

GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES
OF *FHIT* GENE IN PATIENTS
WITH ESOPHAGEAL CANCER

Deletions in the fifth and the eighth exons of *FHIT* gene were detected using intragenic microsatellites *D3s1540* and *D3s1234* in the patients with esophageal cancer. Samples were provided from 17 males and 5 females, residents of province Hebei, China. Homozygotic deletions in the fifth or eighth exon were detected in 16 patients. Hypermethylation in *FHIT* gene was found in healthy tissue of only one patient while in 17 patients it appeared in the cancerous tissues. Homozygosis of *FHIT* gene that was made by deletion or methylation had been found in all the cancerous tissues of the studied patients.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zou Xiaonong, Lu Fengzhu, Zhang Siwei et al. Characteristics of esophageal cancer mortality in China // *Bul. Chinese Cancer*. – 2002. – **11**, № 8 – P. 446–449.
2. Hou Jun, He Tongyu, Qiao Cuiyun et al. An analysis of esophageal cancer incidence in Cixian county // *Bul. Chinese Cancer*. – 2002. – **11**, № 7 – P. 394–396.
3. Wu Min, Sun Kaixian. *Oncological genetics*. – Beijing: Science, 2004. – 870 p.
4. Li Ruqing, Wang Zengfu, Chen Chunming, et al. Determination of heritability in esophageal carcinoma // *Hereditas* (Beijing). – 1984. – **6**, № 5. – P. 32.
5. Цао Юй, Атраментова Л.А. Сегрегационный и компонентный анализ рака пищевода в провинции Хебэй // *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна*. – 2006. – Вип. 4, № 748. – С. 87–91.
6. Цао Юй, Атраментова Л.А. Генетико-эпидемиологическое исследование рака пищевода в Китае // *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна*. – 2006. – Вип. 3, № 729. – С. 141–146.
7. Ohta M., Inoue H., Cotticelli M.G. et al. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers // *Cell*. – 1996. – **84**, № 4. – P. 587–597.
8. Zimonjic D.B., Druck T., Ohta M., Kastury K., Croce C.M., Popescu N.C., Huebner K. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the *FHIT* gene // *Cancer Res*. – 1997. – **57**, № 6. – P. 1166–1170.
9. Druck T., Hadaczek P., Fu T.B. et al. Structure and expression of the human *FHIT* gene in normal and tumor cells // *Cancer Res*. – 1997. – **75**, № 3. – P. 504–512.
10. Hayashi S., Tanimoto K., Hajiro-nakanisbi K. et al.

Abnormal *FHIT* transcripts in human breast carcinomas: clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases // *Cancer Res*. – 1997. – **57**, № 10. – P. 1981–1985.

11. Sozzi G., Pastotino U., Moiraghi L. et al. Loss of *FHIT* function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions // *Cancer Res*. – 1998. – **58**, № 22. – P. 5032–5037.
12. Huebner K., Hadaczek P., Siplashvili Z. et al. The *FHIT* gene, a multiple tumor suppressor gene encompassing the carcinogen sensitive chromosome fragile site, FBA3B // *Biochim. biophys. acta*. – 1997. – **1332**. – P. 65–70.
13. Huebner K., Croce C.M. FRA3B and other common fragile sites: the weakest links // *Cancer Res*. – 2001. – **61**, № 12. – P. 4827–4836.
14. Tanaka H., Shimada Y., Harada H. et al. Methylation of the 5' CpG island of the *FHIT* gene is closely associated with transcriptional inactivation in esophageal squamous cell carcinomas // *Cancer Res*. – 1998. – **58**, № 15. – P. 3429–3434.
15. Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al. Allele loss and promoter hypermethylation of *VHL*, *RAR*, *beta*, *RASSF1A* and *FHIT* tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res*. – 2003. – **63**, № 13. – P. 3724–3728.
16. Sambrook J., Russell D. Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cell using proteinase K and phenol // *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – P. 542–555.
17. Herman J.G., Graff J.R. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1996. – **93**. – P. 9821–9826.
18. Zochbauer M.S., Fong K.M., Maitra A. et al. 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer // *Cancer Res*. – 2001. – **61**, № 9. – P. 3582–3585.
19. Armitage P., Berry G. *Statistical methods in medical research*. 3rd ed. – London: Blackwell Sci. Publ., 1994. – 620 p.
20. Иванов В.И., Барышникова Н.В., Биляева Дж.С. и др. *Генетика*. – М.: Академкнига, 2006. – 638 с.
21. Yang Q., Nakamura M., Nakamura Y. et al. Two-hit inactivation of *FHIT* by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer // *Clin Cancer Res*. – 2002. – **8**, № 9. – P. 2890–2893.
22. Noguchi T., Takeno S., Kimura Y. et al. *FHIT* expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma // *Int. J. Mol. Med*. – 2003. – **11**, № 4. – P. 441–447.
23. Knudson A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes // *Cancer Res*. – 1985. – **45**, № 4. – P. 1437–1443.

Поступила 26.11.08