

Ekspresja genu podoplaniny w złośliwych nowotworach jajnika

Podoplanin expression in malignant ovarian cancer

Barbara Marzec-Kotarska¹, Józef Kotarski², Marek Cybulski³, Halina Antosz¹,
Janusz Kocki¹, Wiesława Bednarek²

¹Samodzielna Pracownia Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie;

kierownik Pracowni: dr hab. n. med. Janusz Kocki

²Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie;

kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Jan Kotarski

³Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej;

kierownik Katedry: dr hab. n. med. Andrzej Stepulak

Przegląd Menopauzalny 2011; 2: 102–105

Streszczenie

Wstęp: Rak jajnika występuje najczęściej u kobiet po menopauzie. Środowisko hormonalne, w jakim powstaje guz przed menopauzą i po niej, jest różne. Może mieć ono wpływ na podłoże molekularne raka jajnika. Podoplanina jest uznanym markerem limfangiogenezy i zaangażowana jest w progresję i przerzutowanie nowotworów.

Cel: Celem pracy było określenie ekspresji genu podoplaniny na poziomie mRNA w tkance surowiczej oraz śluzowego gruczolakoraka jajnika.

Materiał i metody: U 42 pacjentek z rakiem jajnika określono ekspresję genu podoplaniny na poziomie mRNA metodą Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*).

Wyniki: Ekspresja genu podoplaniny na poziomie mRNA została zaobserwowana we wszystkich badanych guzach jajnika. Była ona istotnie niższa ($p < 0,001$) w grupie pacjentek z rakiem jajnika ($RQ = 4,46$) w porównaniu z grupą kontrolną ($RQ = 13,03$). Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w ekspresji podoplaniny między pacjentkami przed menopauzą i po menopauzie w odniesieniu do stopnia nowotworu ($p = 0,442$) wg skali opracowanej przez Międzynarodową Federację Ginekologów i Położników (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics* – FIGO) czy też dojrzałości guza ($p = 0,593$).

Wnioski: Obniżona ekspresja podoplaniny jest charakterystyczna dla surowiczego i śluzowego raka jajnika.

Słowa kluczowe: podoplanina, rak jajnika.

Summary

Introduction: Ovarian cancer is mostly diagnosed in postmenopausal women. The hormonal microenvironment of ovarian tumour development in pre- and postmenopausal women is different. The environment may influence the molecular basis of ovarian cancer. Podoplanin is a proven marker of lymphangiogenesis and is engaged in tumour progression and metastasis.

Objectives: The aim of our study was to assess podoplanin expression at the mRNA level in ovarian serous and mucinous adenocarcinoma.

Material and methods: mRNA expression of podoplanin was assessed in 42 ovarian cancer patients by means of real-time PCR.

Results: Podoplanin was expressed at the mRNA level in all ovarian cancer patients. It was significantly lower ($p < 0.001$) in cancer tissues ($RQ = 4.46$) than in healthy control ($RQ = 13.03$). No significant differences were found in podoplanin expression either between pre- and postmenopausal women or in relation to FIGO and grading.

Conclusion: Decreased podoplanin expression is characteristic for serous and mucinous ovarian adenocarcinoma.

Key words: podoplanin, ovarian cancer.

Adres do korespondencji:

Barbara Marzec-Kotarska, ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin, tel. +48 81 58 84 08, e-mail: barbara.marzec@umlub.pl

Wstęp

Rak jajnika jest czwartym co do częstości nowotworem występującym u kobiet. Najczęściej jest diagnozowany u kobiet, które przekroczyły 50. r.ż. Według danych statystycznych, ponad połowa pacjentek z rakiem jajnika ma powyżej 63 lat [1]. Menopauza nie jest jednak uznanym czynnikiem predestynującym do nowotworzenia jajnika. Status menopauzalny nie jest związany z przebiegiem klinicznym nowotworu jajnika. W obydwu grupach klasyfikacja histologiczna i cechy nowotworu są takie same. Wiek został jednak uznany za niezależny czynnik predykcyjny związany z przeżywalnością lub odpowiedzią na leczenie [2]. Środowisko hormonalne, w jakim powstaje guz przed menopauzą i po niej, jest różne [3]. Rozwojowi guza towarzyszy powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Badania dotyczące neoangiogenezy układu krwiotwórczego są dobrze udokumentowane, natomiast skąpe są dane dotyczące rozwoju naczyń limfatycznych [4].

Podoplanina, przeźbłonowe białko o ciężarze 38 kDa, ulega ekspresji w śródbłonku naczyń limfatycznych, natomiast jest nieobecne w śródbłonku naczyń krwionośnych [5]. W ostatnich latach jej podwyższoną ekspresję zaobserwowano także w komórkach dendrytycznych [6], a także w fibroblastach ogniska przewlekłego zapalenia płucnej, międzybłoniaku [7] oraz w nowotworach płaskonabłonkowych [8]. Istnieją nieliczne doniesienia na temat roli podoplaniny w raku jajnika. Dumoff i wsp. zaobserwowali jej niską ekspresję w nowotworach narządów płciowych [9], natomiast Schacht i wsp. stwierdzili, iż jest ona szczególnie podwyższona w ziarniszczykach i rozrodczakach [10]. Jej silnie podwyższona ekspresja obserwowana była w jasnokomórkowym raku jajnika [11].

Celem omawianej pracy było określenie ekspresji genu podoplaniny na poziomie mRNA w tkance surowiczego oraz śluzowego gruczolakoraka jajnika.

Materiał i metody

Charakterystyka chorych

Badaniem objęto pacjentki chore na raka jajnika operowane w I Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Badana grupa składała się z 42 pacjentek z surowiczym (26 pacjentek – 69,1%) oraz śluzowym rakiem jajnika (16 pacjentek – 30,9%). Grupę kontrolną stanowiły tkanki jajnika pobrane od 13 kobiet operowanych z innych powodów. W grupie badanej 15 pacjentek było przed menopauzą (35,7%), a 27 po menopauzie (64,3%), w grupie kontrolnej 5 było przed menopauzą (38,4%), a 8 po menopauzie (61,6%). U 20 pacjentek stwierdzono I/II stopień FIGO (*International Federation of Gynaecology and Obstetrics*) (47,6%), a III/IV – u 22 (52,4%). Stopień zróżnicowania G1 wykazano w 7 guzach (16,6%), G2 w 21 (50%) i G3 w 14 (33,4%). Szczegółowe dane kliniczne przedstawiono w tabeli I.

Tab. I. Ekspresja podoplaniny w odniesieniu do klinicznych cech nowotworu

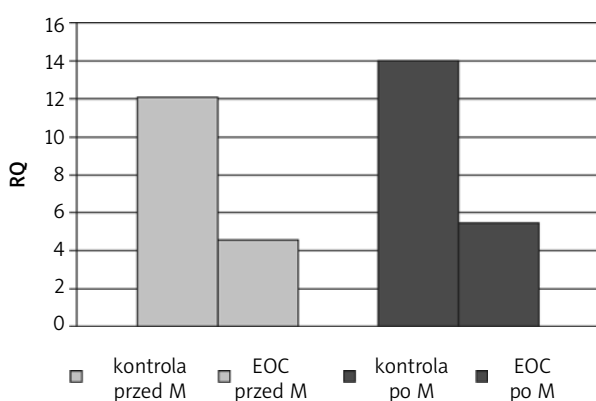
Charakterystyka	Liczebność (%)	p*
typ histologiczny		
surowiczy	26 (69,1)	< 0,001
śluzowy	16 (30,1)	< 0,001
stopień zaawansowania FIGO		
I/II	20 (47,6)	
III/IV	22 (52,4)	0,442
dojrzałość guza		
G1	7 (16,6)	
G2	21 (50)	
G3	14 (33,4)	0,593

Tkanki guza były zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane do momentu izolacji RNA w -80°C . Izolację RNA wykonywano z zastosowaniem kitu AllPrep DNA/RNA Isolation Mini Kit firmy Qiagen. 1 μg całkowitego RNA przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Analizę wykonano z zastosowaniem techniki Real-Time PCR (*polymerase chain reaction*). Poziom ekspresji mRNA genu podoplaniny został określony z użyciem sondy TaqMan (Assay ID Hs00366764_m1) na aparacie ABI Prism 7900 wg protokołu rekomendowanego przez producenta (Applied Biosystems). Ilościową analizę wykonano z zastosowaniem metody RQ (*relative quantification*), w której referencją endogenną stanowił gen *GAPDH*. Badania uzyskały zgodę komisji bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie.

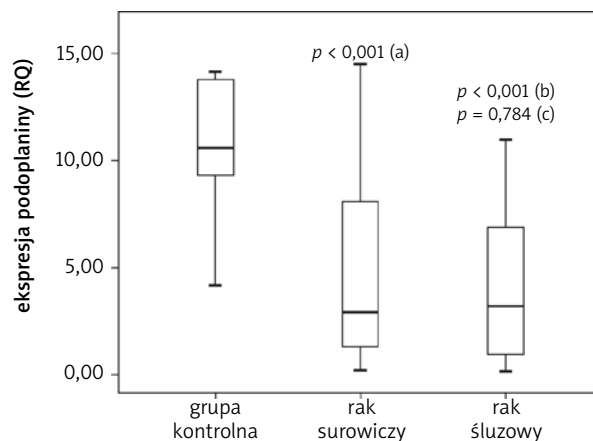
Wyniki

Ekspresja podoplaniny

Ekspresja genu podoplaniny na poziomie mRNA została zaobserwowana we wszystkich badanych guzach jajnika. Była ona istotnie niższa ($p < 0,001$) w grupie pacjentek z rakiem jajnika (RQ = 4,46) w porównaniu z grupą kontrolną (RQ = 13,03) (tab. IIA., ryc. 1.). Rak surowiczy wykazywał wyższą ekspresję podoplaniny (RQ = 5,37) w porównaniu z rakiem śluzowym (RQ = 3,55). Nie była to jednak różnica istotna statystycznie ($p = 0,784$) (ryc. 2.). Nie zaobserwowano różnic w ekspresji badanego genu ze względu na status menopauzalny (ryc. 1., tab. IIB.). Ekspresja podoplaniny, zarówno w grupie kobiet przed menopauzą, jak i po menopauzie (tab. IIB. i IIC.), była równie istotnie niska ($p < 0,001$) w obydwu badanych typach histologicznych guza (przed menopauzą rak surowiczy: RQ kontrola vs grupa badana: 12,07 vs 4,26; rak śluzowy: RQ kontrola vs grupa badana: 12,07 vs 2,82; po menopauzie rak surowiczy: RQ kontrola vs grupa badana: 13,99 vs 6,49; rak śluzowy: RQ kontrola vs grupa badana: 13,99 vs 4,29) (ryc. 1. i 2.). Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w ekspresji podoplaniny w odniesieniu do



Ryc. 1. Relatywna ekspresja podoplaniny na poziomie mRNA w raku jajnika (EOC). Pacjentki przed menopauzą vs pacjentki po menopauzie



Ryc. 2. Relatywna ekspresja genu podoplaniny na poziomie mRNA w dwóch histologicznych typach raka jajnika w grupie pacjentek po menopauzie. (a) – kontrola vs rak surowiczy; (b) – kontrola vs rak śluzowy; (c) – rak surowiczy vs rak śluzowy

stopnia zaawansowania (FIGO) nowotworu ($p = 0,442$) czy też dojrzałości guza ($p = 0,593$) (tab. I).

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując oprogramowanie SPSS ver 14 (test Manna-Whitneya). Za znamienne statystycznie poziomy istotności w omawianych analizach przyjęto $p < 0,05$.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach wykazano ekspresję genu podoplaniny na poziomie mRNA we wszystkich 42 tkankach raka jajnika. Była ona istotnie statystycznie niższa w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$). Uzyskane wyniki mogą sugerować zaangażowanie tego genu w nowotworzenie jajnika. W literaturze dostępne są jedynie nieliczne doniesienia na temat roli podopla-

Tab. II. Ekspresja genu podoplaniny. Kontrola (zdrowy jajnik) vs typ histologiczny surowiczy i śluzowy raka jajnika. A. Dane summaryczne. B. Przed menopauzą. C. Po menopauzie

A.	n	ekspresja podoplaniny w raku jajnika		
		RQ (średnia)	±SD	mediana
kontrola	13	13,03	±10,21	10,52
rak jajnika	42	4,46	±5,78	2,83
rak surowiczy*	26	5,37	±7,29	2,53
rak śluzowy**	16	3,55	±2,68	3,14

* $p < 0,001$, ** $p < 0,001$.

B.	n	ekspresja podoplaniny przed menopauzą		
		RQ (średnia)	±SD	mediana
kontrola	5	12,07	±11,74	10,47
rak surowiczy*	9	4,26	±6,21	2,17
rak śluzowy**	7	2,82	±1,70	3,10

* $p < 0,001$, ** $p < 0,001$.

C.	n	ekspresja podoplaniny po menopauzie		
		RQ	średnia ±SD	mediana
kontrola	13	13,99	±8,69	10,58
rak surowiczy*	26	6,49	±8,38	2,9
rak śluzowy**	16	4,29	±3,67	3,19

* $p < 0,001$, ** $p < 0,001$.

niny w raku jajnika. Silna ekspresja tego genu była obserwowana w rozrodczaku jajnika i w ziarniszczykach, podczas gdy pozostawała niewykrywalna w nabłonkowych nowotworach jajnika [10]. Schacht i wsp. uzyskali wyniki na podstawie badań immunohistochemicznych. Zostały one przeprowadzone na małej grupie chorych (5 przypadków nabłonkowego raka jajnika) [10]. W badaniach na 78 przypadkach raka jajnika Oe i wsp. potwierdzili niską ekspresję podoplaniny na poziomie białka [11]. W raku surowiczym była ona obecna w 36,8%, w endometrioidalnym w 33,3% i w śluzowym w 15% przypadków. Wśród przebadanych przez Oe i wsp. nabłonkowych raków jajnika podwyższoną ekspresję podoplaniny zanotowano w znaczącym odsetku (54%) jedynie w raku jasnokomórkowym. Przedstawione przez nas wyniki dotyczą dwóch podtypów histologicznych guza jajnika (surowiczego i śluzowego). Nie zanotowano między nimi istotnych różnic w ekspresji podoplaniny na poziomie mRNA, choć była ona nieznacznie wyższa w raku surowiczym. Obserwowana przez autorów niniejszej pracy, Oe [11] oraz Schachta i wsp. [10] niska ekspresja podoplaniny może być zatem charakterystyczna dla nabłonkowego raka jajnika. Skorelowanie poziomu jej ekspresji z danymi klinicznymi, takimi jak odpowiedź na chemioterapię, czas przeżycia i obecność przerzutów do węzłów chłonnych, mogłaby wyjaśnić potencjalną funkcję tego genu w nowotworzeniu jajnika.

Dotychczasowe badania nad rolą podoplaniny w karcynogenezie narządów rodnych skorelowały jej niską ekspresję z progresją raka, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, nawrotem choroby i niekorzystną diagnozą, szczególnie w raku endometrium, wysoko zaawansowanym płaskonabłonkowym raku szyjki macicy oraz płaskonabłonkowym raku płuc [9, 12–14]. Niska ekspresja podoplaniny w raku jajnika, uznanego markera limfangiogenezy, może świadczyć, iż do przerzutowania tego nowotworu dochodzi na innej drodze, bez udziału naczyń limfatycznych. Do podobnych wniosków doszli Sundar i wsp., badając rolę genów (m.in. *Lyve-1*) zaangażowanych w limfangiogenezę [15]. Nie zanotowano także różnic w ekspresji podoplaniny w odniesieniu do FIGO, stopnia dojrzałości guza czy też statusu menopauzalnego. Ekspresja podoplaniny nie wydaje się zatem regulowana hormonalnie i jej wpływ na nowotworzenie jajnika może być niezależny od statusu menopauzalnego.

Wnioski

Obniżona ekspresja podoplaniny jest charakterystyczna dla surowiczego i śluzowego raka jajnika.

Praca została sfinansowana z grantu KBN N N407 172434.

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach projektu „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Piśmiennictwo

1. Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006; 20: 207-25.
2. Pectasides D, Fountzilias G, Aravantinos G, et al. Epithelial ovarian carcinoma in younger vs older women: is age an independent prognostic factor? The Hellenic Oncology Cooperative Group experience. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1003-10.
3. Vo C, Carney ME. Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2007; 34: 687-700.
4. Nagahashi M, Ramachandran S, Rashid OM, Takabe K. Lymphangiogenesis: a new player in cancer progression. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4003-12.
5. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res* 2008; 28: 2997-3006.
6. Yu H, Gibson JA, Pinkus GS, Hornick JL. Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 776-82.
7. Müller AM, Franke FE, Müller KM. D2-40: a reliable marker in the diagnosis of pleural mesothelioma. *Pathobiology* 2006; 73: 50-4.
8. Kato Y, Kaneko M, Sata M, et al. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/ podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2005; 26: 195-200.
9. Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, et al. Low podoplanin expression in pre-treatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol* 2006; 19: 708-16.
10. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166: 913-21.
11. Oe S, Hasegawa K, Nagase S, et al. Expression of podoplanin in epithelial ovarian carcinomas and its potential as a marker for clear cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2010; 29: 405-10.
12. Kawamura L, Carvalho FM, Alves BG, et al. Association between intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) and clinicopathologic features in endometrial cancer: a retrospective cohort study. *World J Surg Oncol* 2010; 8: 89.
13. Ito T, Ishii G, Nagai K, et al. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage IB squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer* 2009; 63: 418-24.
14. Suzuki H, Onimaru M, Koga T, et al. High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 111-5.
15. Sundar SS, Zhang H, Brown P, et al. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 1650-7.