

Ocena ekspresji RCAS1 w wybranych stanach chorobowych narządów głowy i szyi

Assessment of RCAS1 expression in selected head and neck diseases

MAGDALENA DUTSCH-WICHEREK ^{1/}, ŁUKASZ WICHEREK ^{2/}, PAWEŁ MAK ^{3/}, JACEK SKŁADZIEŃ ^{1/}

^{1/} Katedra i Klinika Otolaryngologii CMUJ, ul. Śniadeckich 2a, 31-531 Kraków

^{2/} Klinika Ginekologii i Niepłodności CMUJ, ul. M.Kopernika 23, 31-501 Kraków

^{3/} Zakład Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii UJ, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Wprowadzenie. RCAS1 (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) jest białkiem błonowym obecnym na powierzchni komórek nowotworowych, zdolnym do wywołania apoptozy limfocytów cytotoksycznych oraz komórek NK zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Może ono brać udział w powstawaniu choroby nowotworowej.

Cel. Celem pracy było wykazanie obecności i porównanie względnej ilości białka RCAS1 u chorych z nowotworami złośliwymi w porównaniu z innymi stanami patologicznymi głowy i szyi.

Materiał i metody. Zbadano ekspresję RCAS1 w tkankach chorych z różnymi stanami chorobowymi nosa, gardła, uszu, głowy i szyi: w nowotworach łagodnych, złośliwych, przewlekłych stanach zapalnych o różnej etiologii (alergiczne polipy nosa, przewlekłe zapalenie ślinianek, sarkoidoza, przewlekłe zapalenie migdałków podniebiennych) oraz w tkankach zdrowych. Zawartości białka RCAS1 oceniono łącznie w 34 próbkach tkankowych przy użyciu metody Western blot, wykorzystując do detekcji przeciwciała monoklonalne anty-RCAS1 typu IgM.

Wyniki. Obecność RCAS1 ujawniono we wszystkich tkankach nowotworowych, w 66% polipów nosa i w 62,5% przewlekłych stanów zapalnych. Nie znaleziono RCAS1 w tkankach pochodzących ze zdrowej tkanki mięśniowej. Zawartość RCAS1 była statystycznie istotnie większa w tkankach nowotworowych niż w tkankach nienowotworowych.

Wnioski. Wysoka ekspresja RCAS1 w guzach złośliwych sugeruje jego udział w „ucieczce” guza nowotworowego spod nadzoru immunologicznego ustroju. Jego obecność w tkankach nienowotworowych, takich jak przewlekły proces zapalny, może wskazywać również na udział RCAS1 w procesie zapalnym.

Otolaryngologia, 2004, 3(1), 25-28

Słowa kluczowe: guzy głowy i szyi, RCAS1, apoptoza

Skróty: RCAS1 – ang. receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells; PVDF – polifluorek winylidenu; MIB – ang. monoclonal antibody recognizing the proliferation-related antigen Ki-67

Introduction. RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) is a cellular protein found on the surface of cancer cells; it is capable of causing apoptotic death of the cytotoxic lymphocytes and NK cells, both *in vivo* and *in vitro*. RCAS1 may play a role in the process of carcinogenesis.

Aim. The aim of our research was to detect and compare the relative content of RCAS1 protein between cancer patients and those with other head and neck disorders.

Material and methods. Thirty six tissue samples were collected (nasal polyps, chronic sialolithiasis, sarcoidosis, chronic tonsillitis) from head and neck neoplasms, chronic inflammatory diseases and healthy tissues. The quantity of RCAS1 protein in the collected samples was assessed using Western blot method and monoclonal IgM anti-RCAS1 antibody.

Results. RCAS1 was shown to be present in all benign and malignant tumors, 66% nasal polyps and 62.5% chronic inflammatory conditions. Significantly higher amount of RCAS1 protein was revealed in the neoplastic than in the non-neoplastic tissue samples ($p < 0.00001$). The protein was not detected in healthy muscle tissue. The content of RCAS1 protein in malignant tissue samples was significantly higher than in benign tissue samples ($p < 0.0024$).

Conclusion. The high expression of RCAS1 in malignant tumor suggests that it plays an important role in tumor getting out of the systemic immunological control. Its presence in non-tumour samples, such as chronic inflammatory tissues, suggests also a role of RCAS1 protein in the inflammatory processes.

Otolaryngologia, 2004, 3(1), 25-28

Key words: head and neck cancer, RCAS1, apoptotic cell death

Abbreviations: RCAS1 – receptor-binding cancer expressed on SiSo cells; PVDF – polyvinylidene fluoride; MIB-1 – monoclonal antibody recognizing the proliferation-related antigen Ki-67

RCAS1 (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) jest niedawno odkrytym białkiem błonowym typu II. Białko to działa jako ligand receptora obecnego na powierzchni limfocytów T i B oraz na komórkach NK, indukując ich apoptozę poprzez aktywację kas-

pazy 3 [1,2]. Proces ten ułatwia ucieczkę komórek guza spod nadzoru immunologicznego organizmu gospodarza [3].

Po raz pierwszy obecność antygenu hamującego limfocyty została wykazana w hodowli komórkowej raka szyjki macicy przez Sonodę i wsp. w 1996 roku [4]. Obecność

RCAS1 stwierdzono w raku płuc, przełyku, żołądka, pęcherzyka żółciowego, wątroby, trzustki, szyjki macicy, endometrium, piersi, chorobie Hodgkina, w gruczolakach przysadki, chorobie Pageta [3,5-14]. Z ogłoszonych danych wynika, że ekspresja białka RCAS1 koreluje ze złym rokowaniem co do przeżycia pacjentów. Wykazano korelację pomiędzy obecnością RCAS1 a stopniem zróżnicowania nowotworu. Ekspresja RCAS1 była również związana ze stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Czas przeżycia dla grupy pacjentów RCAS1 ujemnych (guz nie wykazywał ekspresji RCAS1) był wyraźnie dłuższy niż dla pacjentów grupy RCAS1 dodatniej (guz posiadał wyraźną ekspresję RCAS1) [6,7].

Dodatkowo, wykazano ekspresję RCAS1 w trofoblaście oraz łożyskach okołoporodowo i uważa się, że białko to bierze udział w tworzeniu tolerancji immunologicznej dla płodu [15,16,17].

Celem pracy było wykazanie obecności i porównanie względnej ilości białka RCAS1 w tkankach chorych z różnymi stanami chorobowymi nosa, gardła, uszu, głowy i szyi, w tym w nowotworach łagodnych, złośliwych, przewlekłych stanach zapalnych oraz zdrowej tkance nabłonkowej i mięśniowej. Ma to znaczenie dla zrozumienia funkcji tego białka, zwłaszcza w patogenezie choroby nowotworowej. Ekspresja białka RCAS1 w stanach patologicznych głowy i szyi nie była dotychczas badana.

PACJENCI I METODY

Do badań zakwalifikowano chorych leczonych w Oddziale Katedry i Kliniki Otolaryngologii CMUJ. Wszyscy uczestnicy wyrazili zgodę na badanie. Tkanki zostały pobrane w trakcie planowych zabiegów operacyjnych, związanych z usunięciem: guza nowotworowego, migdałków podniebiennych w przewlekłym stanie zapalnym, polipów nosa, ślinianki podżuchwowej znajdującej się w przewlekłym stanie zapalnym, ziarniny zapalnej w przebiegu przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Zdrową tkankę mięśniową oraz zdrową błonę śluzową górnych dróg oddechowych uzyskano od chorych operowanych z powodu złośliwego procesu nowotworowego krtani, zakwalifikowanych do zabiegu całkowitego usunięcia krtani, z której następnie pobierano zdrową tkankę z mięśni przedkrtaniowych oraz fragment zdrowej błony śluzowej z marginesu raka. Przeanalizowano 34 próbki tkankowe. Bezpośrednio po pobraniu próbki zostały zamrożone do temperatury minus 40°C.

Pomiar poziomu antygeny RCAS1 w homogenatach tkanek wykonano w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biotechnologii UJ metodą Western blot. Do detekcji wykorzystano kompleks (RCAS1)-(przeciwciała monoklonalne anti-RCAS1 typu IgM) znakowane biotyną – konjugat awidyna-alkaliczna fosfataza) oraz substrat chromogeny. Probki pobranych tkanek homogenizowano w buforze zawierającym koktail inhibitorów

proteinaz Complete (firma Roche, Niemcy), po czym gotowano je w buforze zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS) celem solubilizacji nierozpuszczalnych białek. Po zwirowaniu, w supernatantach oznaczono poziom białka całkowitego z użyciem kwasu bitynchoniowego (BCA). Probki zawierające po 50 µg białka były nakładane na żele poliakrylamidowe SDS-PAGE typu tris-tricyna. Po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego dokonano elektrotransfer mokrego białka na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF), której niespecyficzne miejsca wiążące zablokowano za pomocą albuminy wołowej [18]. Następnie membrana traktowana była roztworem mysich przeciwciał monoklonalnych anti-RCAS1 (Medical and Biological Laboratories, Japonia) w rozcieńczeniu 1:5000 w stosunku objętościowym do buforu. Po czterech cyklach płukania membranę traktowano roztworem przeciwciał anti-mysich-IgM specyficznych w stosunku do łańcucha µ (firma SIGMA, USA), ponownie płukano, po czym traktowano roztworem enzymu detekcyjnego alkalicznej fosfatazy znakowanej awidyną (firma SIGMA, USA). W obu ostatnich przypadkach stosowane były rozcieńczenia 1:5000 w stosunku objętościowym do buforu. Po ostatnim cyklu płukania membranę umieszczono w roztworze substratu Fast Red TR/naftol AS/MX (firma SIGMA, USA) dającego ceglasczerwone prążki w miejscach obecności antygeny RCAS1.

Następnie membrany z uwidocznionymi prążkami RCAS1 skanowano w aparacie Fluor-S MultiImager (firma BioRad, USA) i analizowano z użyciem oprogramowania QuantityOne (firma BioRad, USA). Ilości antygeny RCAS1 proporcjonalne do intensywności barwy określonych prążków wyrażano w jednostkach bezwymiarowych, liczonych względem intensywności arbitralnie wybranego prążka – odnośnika identycznego dla wszystkich oznaczanych próbek. Uzyskane wyniki liczbowe obrazują więc względny poziom antygeny RCAS1 w 50 µg białka.

Do obliczeń statystycznych zastosowano program komputerowy Statistica (StatSoft, Polska). Sprawdzono rozkład badanych wartości stosując test Shapiro-Wilka. W obliczeniach wykorzystano test t-Studenta. Za znamienne statystycznie uznano $p < 0,05$.

Ogółem do badań pobrano 29 próbek tkanek chorobowo zmienionych oraz 5 próbek tkanek zdrowych (tab. I).

WYNIKI

Otrzymane wartości względnej ilości białka RCAS1 w badanych tkankach zawarto w tabeli I. Obecność RCAS1 stwierdzono we wszystkich tkankach nowotworowych, w 66% polipów nosa i w 62,5% przewlekłych stanów zapalnych. Nie znaleziono RCAS1 w zdrowej tkance mięśniowej. Wśród tkanek pochodzących z nowotworów złośliwych najwyższy poziom RCAS1 stwierdzono

Tabela I. Względna ilość białka RCAS1 w badanych próbkach tkankowych

Numer próbki	Rozpoznanie histopatologiczne	Względna zawartość RCAS1 w próbce
1	Adenoma pleomorphum glandulae parotis	0,14785
2	Papilloma planoepitheliale inversum cavi nasi	0,15939
3	Proliferatio papillomatosa at endophytica epithelii et hyperkeratosis auriculae	0,72557
4	Ca mucoepidermale male differentiatum glandulae parotis	1,96682
5	Ca planoepitheliale GI laryngis T2N0	0,15841
6	FPI: Ca planoepitheliale GII T1N2	1,15695
7	Carcinoma planoepitheliale tonsillae palatinae GII T2N0	2,03757
8	Carcinosarcoma maxillae et palati duri	0,38973
9	Carcinoma planoepitheliale keratodes tonsillae palatinae GIII T2N2	2,62017
10	Carcinoma adenoides cysticum glandulae parotis	1,22501
11	Carcinoma planoepitheliale keratodes GII laryngis T3N0	0,82075
12	Neoplasma malignum orbitae –medulloepithelioma	1,62
13	Carcinoma planoepitheliale keratodes GII laryngis T3N0	1,65786
14	Sialoadenitis chronica purulenta glandulae submandibularis	0
15	Sialoadenitis chronica glandulae submandibularis	0,00915
16	Sialoadenitis chronica glandulae submandibularis	0,37692
17	Sialoadenitis chronica glandulae submandibularis	1,13091
18	Sialoadenitis chronica glandulae submandibularis	0
19	Sialoadenitis chronica glandulae submandibularis	0,34118
20	Polypi oedematosi nasi	0,21556
21	Polypi oedematosi nasi	1,77
22	Polypi inflammatorii nasi	0
23	Polypi oedematosi nasi	0,12068
24	Otitis media chronica	0
25	Sarcoidosis orbitae	1,5589
26	Tonsillitis chronica	0,29049
27	Tonsillitis chronica	4,28516
28	Tonsillitis chronica	1,85084
29	Tonsillitis chronica	0,05301
30	Histopatologicznie tkanka zdrowa pobrana z marginesu raka płaskonabłonkowego krtani	0,55371
31	Zdrowa tkanka mięśniowa	0
32	Zdrowa tkanka mięśniowa	0
33	Zdrowa tkanka mięśniowa	0
34	Zdrowa tkanka mięśniowa	0

w raku płaskonabłonkowym migdałka podniebiennego (2,62), następnie raku śluzowo-naskórkowym ślinianki przyusznej, raku płaskonabłonkowym krtani, raku płaskonabłonkowym – przerzucie nowotworowym na szyi pochodzącym z nieznanego ogniska pierwotnego (1,15). W przypadkach przewlekłych stanów zapalnych ślinianek zawartość RCAS1 wahała się pomiędzy 0,34 a 1,13. Wysoką ekspresję RCAS1 stwierdzono w próbce tkanki rozpoznanej jako sarkoidoza (względny poziom 1,55). W tkankach pobranych z alergicznych polipów nosa zawartość RCAS1 wynosiła średnio 0,43, wahając się pomiędzy 0,12 a 1,77. Należy również wspomnieć o tkankach pobranych z migdałków podniebiennych znajdujących się w przewlekłym stanie zapalnym. Tutaj ilość RCAS1 wynosiła od 0,05 do 4,28 (średnio 2,06).

Ilości względne białka RCAS1 w tkankach nowotworowych i nienowotworowych zestawiono w tabeli II. Ekspresja RCAS1 w tkankach nowotworowych jest statystycznie większa niż w tkankach nienowotworowych.

Porównano również zawartość RCAS1 w tkankach pochodzących z nowotworów złośliwych i łagodnych.

Tabela II. Porównanie względnej zawartości RCAS1 w tkankach nowotworowych i nienowotworowych

Rodzaj tkanki	Nowotworowa (n=13)	Nienowotworowa (n=17)	p
Względna zawartość RCAS1 (±SD)	1,297 (±0,813) 0,148 ÷ 2,62	0,175 (±0,297) 0 ÷ 1,131	0,00001

Otrzymane wyniki zaprezentowano w tabeli III, z której wynika, że względna ilość RCAS1 w tkance pochodzącej z nowotworu złośliwego jest znacznie większa niż w nowotworach łagodnych.

Tabela III. Porównanie ilości RCAS1 w nowotworach łagodnych i złośliwych

Rodzaj tkanki	Nowotwór łagodny (n=3)	Nowotwór złośliwy (n=7)	p
Względna zawartość RCAS1 (±SD)	0,344 (±0,33) 0,148 ÷ 0,726	1,755 (±0,506) 1,157 ÷ 2,62	0,0024

DYSKUSJA

Przeprowadzone w niniejszej pracy oznaczenia za pomocą techniki Western blot potwierdziły obecność RCAS1 w tkankach nowotworowych, tak w łagodnych jak i złośliwych. Zawartość RCAS1 w tkankach nowotworowych była statystycznie znacznie wyższa aniżeli w tkankach nienowotworowych. Jednocześnie zaobserwowano wyższą ilość tego białka w nowotworach złośliwych w stosunku do nowotworów łagodnych. To spostrzeżenie potwierdza publikowane wcześniej wyniki dotyczące obecności RCAS1 w różnych nowotworach [7-14]. Badania Nakakubo i wsp. wykazały, że wysoka ekspresja RCAS1 w raku przełyku była istotnie związana z wiekiem oraz zaawansowaniem choroby, i okazała się niezależnym, niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w chorobie nowotworowej [5]. Natomiast Oshikiri i wsp. porównali ekspresję RCAS1 w zapaleniu pęcherzyka żółciowego, gruczolaku oraz raku pęcherzyka żółciowego. Autorzy wykazali, że ekspresja RCAS1 jest związana ze wzrostem inwazyjności nowotworu i zasugerowali, że komórki nowotworu mogą uniknąć odpowiedzi immunologicznej ustroju poprzez przeżycie komórek raka o wysokiej ekspresji RCAS1 w naczyniach żylnych, limfatycznych oraz węzłach chłonnych [7]. Komórki o wysokiej ekspresji mają przewagę nad innymi komórkami tego samego raka tworząc nową linię komórkową odpowiedzialną za pogłębienie inwazji nowotworowej.

Obecność RCAS1 w łagodnych guzach nowotworowych potwierdzono w gruczolakach przysadki, w których znaleziono statystycznie znamienne powiązanie między RCAS1 a MIB-1. Sugeruje to, że ekspresja RCAS1 przy dodatnim MIB-1 może przepowiadać większy potencjał wzrostowy gruczolaków przysadki [12].

Białko RCAS1 zostało również zidentyfikowane w tkankach pochodzących z tkanek w przewlekłym stanie zapalnym, które nie były stanami przedrakowymi, jakkolwiek istotnie niższa niż w tkankach pochodzących z nowotworów. Zawartość RCAS1 była zróżnicowana – najwyższa w przewlekłym zapaleniu migdałków podniebiennych, następnie alergicznych polipach nosa oraz przewlekłym stanie zapalnym ślinianek. Wysoka zawartość białka w zapalnie zmienionej tkance migdałkowej może świadczyć o jego udziale w regulacji limfogenezy. W dotychczasowych doniesieniach obecność RCAS1 wykazano w guzach łagodnych błony śluzowej żołądka, w gruczolakach błony śluzowej żołądka, w chorobie wrzodowej żołądka, jak również w zdrowej błonie śluzowej żołądka i w raku żołądka [6]. Wykazano również obecność RCAS1 w chorobach autoimmunologicznych wątroby [19]. W badaniach tych z zastosowaniem metod immunohistoche-

micznych wykazano różnice w wewnątrzkomórkowej dystrybucji białka w nowotworze złośliwym, chorobie autoimmunologicznej oraz nowotworze łagodnym.

Do tej pory ekspresja białka RCAS1 w schorzeniach narządów głowy i szyi nie była oceniana. Przedstawione w niniejszej pracy badania, oceniające poziom białka RCAS1 w schorzeniach otolaryngologicznych są pionierskie. W pracy wykazano obecność RCAS1 w tkankach w przewlekłych stanach zapalnych oraz łagodnych i złośliwych guzach nowotworowych głowy i szyi oraz różnice w zawartości RCAS1 w badanych tkankach, z najwyższym poziomem tego białka w tkankach pochodzących z narządów limfatycznych (migdałki podniebienne w przewlekłym stanie zapalnym). Wyniki badań sugerują, że RCAS1 bierze udział w regulacji dojrzewania limfocytów. Otrzymane wyniki wymagają dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* 1999; 5: 938-942.
2. Matsushima T, Nakashima M, Oshima K i wsp. Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 313-321.
3. Iwasaki T, Nakashima M, Watanabe T i wsp. Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. *Int J Cancer* 2000; 89: 488-493.
4. Sonoda K, Nakashima M, Kaku T i wsp. A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer* 1996; 77: 1501-1509.
5. Nakakubo Y, Hida Y, Miyamoto M i wsp. The prognostic significance of RCAS1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer Lett* 2002; 177: 101-105.
6. Kubokawa M, Nakashima M, Yao T i wsp. Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 695-700.
7. Oshikiri T, Hida Y, Miyamoto M i wsp. RCAS1 as a tumour progression marker: an independent negative prognostic factor in gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1922-1927.
8. Noguchi K, Enjoji M, Nakamuta M i wsp. Expression of a tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 168: 197-202.
9. Ohshima K, Muta K, Nakashima M i wsp. Expression of human tumor-associated antigen RCAS1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein-Barr virus infection: a potential mechanism of immune evasion. *Int J Cancer* 2001; 93: 91-96.
10. Rousseau J, Tétu B, Caron D i wsp. RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1544-1549.
11. Takahashi H, Iizuka H, Nakashima M i wsp. RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci* 2001; 26: 140-144.
12. Umeoka K, Sanno N, Oyama K i wsp. Immunohistochemical analysis of RCAS1 in human pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2001; 14: 1232-1236.
13. Sonoda K, Kaku T, Hirakawa T i wsp. The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic, and malignant uterine endometrium. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 424-429.
14. Wicherek Ł, Dutsch-Wicherek M, Mak P, Klimek M. Obecność RCAS1 w ciężarnej macicy chorej na raka jajnika. *Gin Prakt* 2003; 72: 8-10.
15. Ohshima K, Nakashima M, Sonoda K i wsp. Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 481-486.
16. Wicherek Ł, Dutsch-Wicherek M, Mak P, Klimek M. Obecność RCAS1/EBAG9 w łożyskach okołoporodowo. *Gin Prakt* 2003; 74: 20-23.
17. Wicherek Ł, Dutsch-Wicherek M, Mak P i wsp. Comparative analysis of RCAS1 level in neoplasms and placenta. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1187-1194.
18. Shagger H, von Jagov G. Tricine-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 kDa to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166: 368-379.
19. Enjoji M, Nakashima M, Nishi H i wsp. The tumor-associated antigen, RCAS1, can be expressed in immune-mediated diseases as well as in carcinomas of biliary tract. *J of Hepatol* 2002; 36: 786-792.