

УДК: 575

**Делеции гена *FHIT* при раке пищевода  
Ю.Цао<sup>1,2</sup>, Л.А.Атраментова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>Институт онкологии, Хебэй (Хебэй, Китай)  
shkoda@kharkov.ukrtel.net

В клетках рака пищевода 22 пациентов-китайцев изучены делеции гена *FHIT* с использованием внутригенных микросателлитов *D3S1540* и *D3S1234*, которые маркируют соответственно 5 и 8 экзоны. В опухолевой ткани гомозиготная делеция в области 5 экзона обнаружена у 14 (63,6%) пациентов, а в области 8 экзона у 13 (59,1%) пациентов. Гомозиготность по делеции гена *FHIT* рассматривается как важный фактор образования рака пищевода.

Ключевые слова: рак пищевода, ген *FHIT*, делеция.

**Введение**

При анализе генетических причин канцерогенеза в последнее время большое внимание уделяют гену *FHIT*. Продукт этого гена – белок FHIT – относится к семейству белков гистидиновой триады (histidine triad, HIT). Такое название белка связано с присутствием в его аминокислотной последовательности трёх молекул гистидина в позициях 94, 96, 98 (Sozzi et al., 1996; Brenner et al., 1999). В различных опухолях отсутствует активность гена *FHIT*, обнаруживаются его изменённые варианты (Ogasawara et al., 1995; Hu et al., 2000; Virgilio et al., 1996; Druck et al., 1997; Hayashi et al., 1997; Luan et al., 1997; Menin et al., 2000; Zou et al., 1997; Li et al., 1998). Считается поэтому, что нормальный аллель гена *FHIT* является супрессором опухоли, а мутантный предрасполагает к канцерогенезу (Knudson, 1985). Ген *FHIT* расположен на хромосоме 3 (локус 3p14.2), содержит 10 экзонов (Ohta et al., 1996) и включает ломкую область хромосомы 3 (chromosomal fragile side) *FRA3B* (Ohta et al., 1996; Zimonjic et al., 1997), откуда и получил название гена *ломкой гистидиновой триады* (*fragile histidine triad gene, FHIT*). Наличие ломкого района делает ген чувствительным к действию канцерогенов (Ohta et al., 1996; Sozzi et al., 1996; Huebner et al., 1997). Известен ряд внутригенных микросателлитных маркёров, которые используются при молекулярно-генетическом анализе гена *FHIT*. В частности, микросателлит *D3S1540* расположен рядом с 5-м экзоном, микросателлит *D3S1234* находится рядом с 8-м экзоном. Первый находится на расстоянии 473 Kb от центromеры, второй на расстоянии 143 Kb от теломеры.

В данной работе предстояло выяснить, имеется ли связь между делециями в гене *FHIT* и раком пищевода у представителей китайского населения.

**Материалы и методы**

Исследование проводилось в Институте онкологии провинции Хебэй (Китай), материал собран в 4-й клинике Медицинского университета. Проведено генеалогическое и молекулярно-генетическое обследование 22 больных раком пищевода (17 мужчин и 5 женщин, табл. 1).

Таблица 1.

**Характеристика пациентов**

№	Возраст в годах	Пол	Курение	Употребление алкоголя	Больные родственники	№	Возраст в годах	Пол	Курение	Употребление алкоголя	Больные родственники
1	71	М	Нет	Нет	Нет	12	56	Ж	Нет	Нет	Нет
2	69	М	Нет	Нет	Нет	13	79	Ж	Нет	Нет	Нет
3	59	М	Да	Нет	Нет	14	66	М	Нет	Нет	Нет
4	64	Ж	Нет	Нет	Нет	15	50	М	Да	Да	Есть
5	61	М	Да	Да	Нет	16	57	М	Нет	Нет	Нет
6	72	М	Да	Нет	Нет	17	53	М	Да	Нет	Нет
7	58	М	Да	Да	Нет	18	59	М	Нет	Нет	Нет
8	63	М	Нет	Нет	Нет	19	53	Ж	Нет	Нет	Нет
9	54	М	Нет	Нет	Нет	20	60	М	Да	Да	Есть
10	57	М	Нет	Нет	Нет	21	71	М	Нет	Нет	Нет
11	71	М	Нет	Нет	Нет	22	58	Ж	нет	Нет	Есть

Примечание. М – мужчина, Ж – женщина.

**Образцы ткани.** Опухолевые и гомологичные нормальные ткани больных раком пищевода были получены хирургическим путём. Образцы ткани сразу после резекции охлаждались и сохранялись до анализа при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Выделение ДНК.** ДНК выделяли с помощью протеинкиназы K методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook, Russel, 2001). Выделенную ДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для определения концентрации ДНК использовали программу «gel-pro 4.0».

**Анализ микросателлитов.** Два динуклеотидных повтора маркёра, локализованных на *D3S1234* и *D3S1540*, были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Структура праймеров, положение микросателлитов и размер продуктов ПЦР представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Положение микросателлита, последовательность праймера и размер продуктов ПЦР

Маркёр	Положение	Размер продукта бр	Верхняя последовательность праймера	Нижняя последовательность праймера
<i>D3s1234</i>	59962225-59962335	99-125	CCTGTGAGACAAAGCAAGAC	GACATTAGGCACAGGGCTAA
<i>D3s1540</i>	59483955-59484281	335	AAAGGGGGCTAGAATGAGAG	TCAAATCAGGCTTACAAGGC

### Результаты и обсуждение

Согласно гипотезе A.G.Knudson (Knudson, 1985), рак возникает вследствие мутации в соматической клетке, в результате чего она становится гомозиготной по дефектному аллелю гена супрессора опухоли ( $-/-$ ). Ген-супрессор (в данном случае *FHIT*) в нормальном состоянии (+) подавляет развитие опухоли, а в мутантном ( $-$ ) способствует развитию рака. Гомозиготной по мутации исходно нормальная клетка может стать вследствие мутации в обоих аллелях гена-супрессора ( $+/+ \rightarrow -/-$ ). Если соматическая клетка гетерозиготна (человек унаследовал мутацию от одного из родителей), то для превращения её в раковую достаточно одной мутации ( $+/- \rightarrow -/-$ ).

Было сделано предположение, что исследованные пациенты являлись гетерозиготными носителями мутации *FHIT*( $+/-$ ). Их нормальные клетки гетерозиготны, а раковые клетки вследствие делеции стали гомозиготными *FHIT*( $-/-$ ). Это явление получило название потеря гетерозиготности (loss of heterozygosity – LOH) (Cavane et al., 1983).

О наличии делеции свидетельствуют результаты сравнения электрофореграмм ДНК опухолевой и нормальной тканей. На электрофореграмме (рис. 1) раковой ткани (образец Т2) отсутствует полоса, в то время как в нормальной ткани того же больного (образец N2) полоса имеется. О наличии делеции в области 8 экзона свидетельствует также пониженная интенсивность окрашивания полосы (образец Т4 по сравнению с нормальной тканью N4).

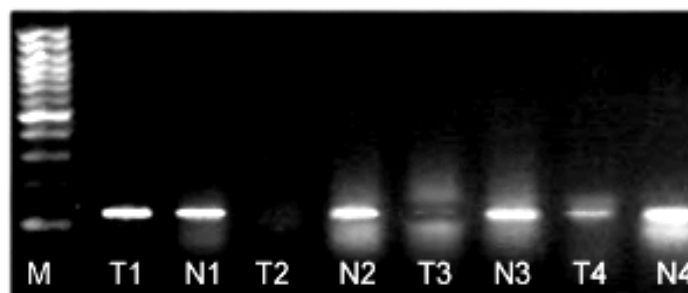


Рис. 1. Электрофореграмма, выявляющая делецию с помощью маркёра *D3s1234* в области 8 экзона (M – 100–1500 бр стандартный молекулярный маркёр, T – раковая ткань, N – нормальная ткань)

На рис. 2 видно, что в образцах 1, 2 и 3 полоса на электрофореграмме ДНК из опухолевой ткани (Т) окрашена слабее, чем на электрофореграмме ДНК из гомологичной здоровой ткани (N). В образце 10 полосы окрашены одинаково интенсивно, следовательно, делеция в раковых клетках отсутствует.

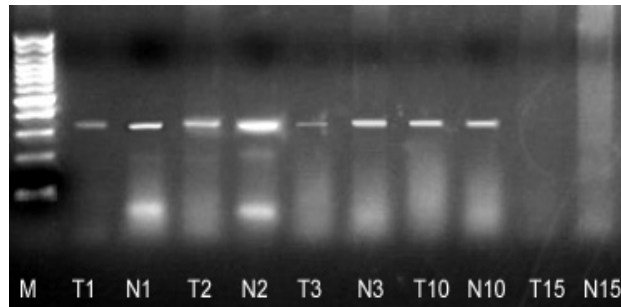


Рис. 2. Электрофореграмма, выявляющая делецию с помощью маркера *D3s1540* в области 5 экзона (М – 100–1500 бр стандартный молекулярный маркер, Т – раковая ткань, N – нормальная ткань)

Установлено (табл. 3), что клетки здоровой ткани пищевода 17 (77,3%) пациентов несут гетерозиготную делецию в 5 экзоне. При этом у 10 из них в гомологичной опухолевой ткани произошла утрата гетерозиготности.

Таблица 3.

Делеции гена в экзонах 5 и 8 гена *FHIT*

Пациент	Возраст	5 экзон (маркер <i>D3s1540</i> )		8 экзон (маркер <i>D3s1234</i> )	
		Раковая ткань	Здоровая ткань	Раковая ткань	Здоровая ткань
1	71	-/- (LOH)	+/-	+/-	+/-
2	69	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
3	59	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
4	64	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
5	61	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
6	72	-/- (LOH)	+/-	+/-	+/-
7	58	+/-	+/-	-/- (LOH)	+/-
8	63	-/-	-/-	-/- (LOH)	+/-
9	54	+/-	+/-	+/-	+/-
10	57	+/-	+/-	+/-	+/-
11	71	-/-	-/-	-/- (LOH)	+/-
12	56	+/-	+/-	-/- (LOH)	+/-
13	79	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
14	66	-/-	-/-	+/-	+/-
15	50	-/-	-/-	-/-	-/-
16	57	-/- (LOH)	+/-	+/-	+/-
17	53	+/-	-/-	+/-	+/-
18	59	+/-	+/-	-/- (LOH)	+/-
19	53	+/-	+/-	-/- (LOH)	+/-
20	60	-/- (LOH)	+/-	-/- (LOH)	+/-
21	71	+/-	+/-	+/-	+/-
22	58	-/- (LOH)	+/-	+/-	+/-

Нормальные и опухолевые клетки четырёх (18,2%) пациентов (№№ 8, 11, 14, 15) были гомозиготными по делеции. У одного пациента (№20) опухолевые клетки были гетерозиготными, а нормальные гомозиготны по делеции экзона.

Клетки здоровой ткани у 21 (95,5%) пациента были гетерозиготны по делеции в 8 экзоне. У одного пациента (№15) в здоровой ткани, как и в опухолевой, имелась гомозиготная делеция этого экзона.

Всего в раковой опухоли 18 (81,8%) пациентов имелась та или иная гомозиготная делеция гена *FHIT*, а у трёх больных в анализируемых участках гена искомые мутации не выявлены. По-видимому, у этих больных мутацией могут быть затронуты другие участки гена, либо природа генетических изменений, вызвавших рак, была иной. С учётом мутации в здоровой ткани (пациент №17) 19 (86,6%) больных имеют мутацию этого супрессорного гена.

Статистический анализ (табл. 4) не выявил связи между наличием делеции в гене *FHIT* и полом больных. Частота делеций не связана с курением и употреблением алкоголя. Статистически

достоверная связь выявлена лишь между наличием делеции в гомозиготном состоянии и раковой опухолью. Прогностически более значимым является делеция 8 экзона. Родственников, больных раком пищевода, имели только три пациента, поэтому пока не представляется возможным делать заключение о связи между изменениями в гене *FHIT* и наследованием предрасположенности к раку.

Высокая частота делеции экзонов 5 и 8, возможно, связана со специфической зоной, которая проходит через ломкий сайт *FRA3B*. Поэтому можно предполагать, что делеция гена, обнаруженная в данной зоне, играет важную роль в возникновении рака пищевода у лиц китайской этнической группы.

Таблица 4.

## Статистический анализ ассоциаций

Маркёр микро-сателлита	Пол		Курение		Употребление алкоголя		Рак пищевода	
	$\chi^2$	$p$	$\chi^2$	$P$	$\chi^2$	$P$	$\chi^2$	$P$
<i>D3s1234</i>	0,20	>0,05	0,02	>0,05	0,51	>0,05	15,09	<0,05
<i>D3s1540</i>	1,26	>0,05	0,05	>0,05	0,74	>0,05	7,50	<0,05

По-видимому, данная мутация не является этноспецифической, поскольку другие авторы обнаружили делеции гена *FHIT* у больных раком пищевода, принадлежащих иным этническим группам (Arlt et al., 2002; Virgilio et al., 1996).

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института онкологии провинции Хебэй профессору Б.Шан и научному сотруднику Л.Вы за методическую помощь.

## Список литературы

- Arlt M.F., Miller D.E., Beer D.G. et al. Molecular characterization of *FRA3B* and comparative common fragile site instability in cancer cells // *Gene Chromosome Cancer*. – 2002. – Vol.33, №1. – P. 82–92.
- Brenner C., Bieganski P., Pace H.C. et al. The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins // *J. Cell Physiol.* – 1999. – Vol.181, №2. – P. 179–187.
- Cavanee W.K., Dryja T.P., Phillips R.A. et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma // *Nature*. – 1983. – Vol.305. – P. 779–784.
- 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. – Vol.57, №3. – P. 504–512.
- Hayashi S., Tanimoto K., Hajiro-nakanishi K. et al. Abnormal *FHIT* transcripts in human breast carcinomas: clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases // *Cancer Res.* – 1997. – Vol.57, №10. – P. 1981–1985.
- Hu N., Roth M.J., Polymeropoulos M. et al. Identification of novel regions of allelic loss from a genome wide scan of esophageal squamous-cell carcinoma in a high-risk Chinese population // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2000. – Vol.27, №3. – P. 217–228.
- Huebner K., Hadaczek P., Siprashvili Z. et al. The *FHIT* gene, a multiple tumor suppressor gene encompassing the carcinogen sensitive chromosome fragile site, *FRA3B* // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1997. – Vol.1332. – P. 65–70.
- Knudson A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes // *Cancer Res.* – 1985. – Vol.45, №4. – P.1437.
- Li W.D., Wang X.Q., Cheng G.Y. et al. Association of fragile histidine triad gene (*FHIT*) with susceptibility to esophageal cancer. A preliminary study // *Chinese Journal of Oncology*. – 1998. – Vol.20, №4. – P. 258–260.
- Luan X., Shi G., Zohouri M. et al. The *FHIT* gene is alternatively spliced in normal and renal cell carcinoma // *Oncogene*. – 1997. – Vol.15, №1. – P. 79–86.
- Menin C., Sanacatterina M., Zamboni A. et al. Anomalous transcripts and allelic deletions of the *FHIT* gene in human esophageal cancer // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2000. – Vol.119, №1. – P. 56–61.
- Ogasawara S., Maesawa C., Tamura G. et al. Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Res.* – 1995. – Vol.55, №4. – P. 891–894.
- 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. – Vol.84, №4. – P. 587–597.
- Sambrook J., Russell D. Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cell using proteinase K and phenol // *Molecular cloning. A laboratory manual third edition*. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – P. 542–555.
- Sozzi G., Veronese M.L., Negrini M. et al. The *FHIT* gene 3p14.2 in lung cancer // *Cell*. – 1996. – Vol.85, №1. – P. 17–26.
- Virgilio L., Shuster M., Gollin S.M. et al. *FHIT* gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas //

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol.93, №18. – P. 9770–9775.

Zimonjic D.B., Druck T., Ohta M. et al. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene // Cancer Res. – 1997. – Vol.57, №6. – P. 166–170.

Zou T.T., Lei J., Shi Y.Q. et al. FHIT gene alterations in esophageal cancer and ulcerative colitis (UC) // Oncogene. – 1997. – Vol.15, №1. – P. 101–105.

### **Делеція гена *FHIT* за умов раку стравоходу Юй Цао, Л.О.Атраментова**

У клітинах раку стравоходу 22 пацієнтів-китайців вивчені делеції гена *FHIT* з використанням внутрішньогенних мікросателітів *D3S1540* і *D3S1234*, які маркують відповідно 5 та 8 екзони. У пухлинній тканині гомозиготна делеція в ділянці 5 екзону винайдена у 14 (63,6%) пацієнтів, а у 8 екзоні у 13 (59,1%). Гомозиготність за делецією гена *FHIT* розглядається як важливий фактор утворення раку стравоходу.

Ключові слова: *рак стравоходу, ген FHIT, делеція.*

### **Deletion of *FHIT* gene in esophageal cancer Yu Cao, L.A.Atramentova**

The deletion of *FHIT* gene in 22 cases of esophageal cancer was evaluated by markers *D3S1540* and *D3S1234* of 5 and 8 exon. In cancer of the tested informative cases, homozygotic deletion in 5 exon was detected in 14 (63,6%) and that in 8 exon – in 13 (59,1%). Homozygotic deletion of *FHIT* gene is supposed to be an important factor of cancerogenesis.

Key words: *esophageal cancer, FHIT gene, deletion.*

---

**Представлено Л.В.Бєляєвою  
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським**