

УДК 577.344

©Коллектив авторов

**ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ (ММП-2)  
И ВНЕКЛЕТОЧНОГО ИНДУКТОРА МАТРИКСНЫХ  
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (EMMPRIN) В ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ  
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*Х. Чандру<sup>1\*</sup>, А. Шарада<sup>1</sup>, С. Манджунас<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Yuvaraja's college, University of Mysore, Mysore  
570005, Karnataka, India; e-mail: chandrubiochemistry@yahoo.com

<sup>2</sup>Department of Studies in Biochemistry, Manasagangotri, University of Mysore,  
Mysore-570006, Karnataka, India

Опухолевые клетки продуцируют матриксные металлопротеиназы (ММП), которые относятся к семейству ферментов, связанных с опухолевой инвазией и метастазированием. Внеклеточный индуктор ММП - EMMPRIN, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов (extracellular matrix metalloproteinases inducer), стимулирует синтез желатиназы-А (ММП-2) в перитонеальных фибробластах. В настоящем исследовании изучали экспрессию ММП-2 и EMMPRIN в процессе развития рака молочной железы. Экспрессия желатиназы-А и EMMPRIN были проанализированы в доброкачественных образцах ткани, а также в злокачественных образцах тканей при раке молочной железы на II и III стадиях заболевания. Были использованы методы зимографии, иммунопреципитации и Вестернблоттинг с моноклональными первичными антителами к EMMPRIN. Полученные данные свидетельствуют об увеличении экспрессии EMMPRIN в тканевых образцах рака молочной железы на поздних стадиях заболевания по сравнению с доброкачественными образцами ткани. Экспрессия активной и латентной форм ММП-2 увеличивалась с прогрессией опухоли от II к III стадии рака молочной железы, в то время как в доброкачественных тканях экспрессии не отмечалось. Экспрессия ММП-2 коррелировала с прогрессией опухоли. Эти данные указывают на то, что EMMPRIN и ММП-2 могут вносить существенный вклад в развитие степени злокачественности при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** EMMPRIN, ММП-2, опухолевая инвазия, рак молочной железы, Вестернблоттинг.

**ВВЕДЕНИЕ.** Опухолевая инвазия – многоступенчатый процесс, включающий деградацию базальной мембраны и компонентов соединительнотканного матрикса матриксными металлопротеиназами (ММП) [1-8]. Один из членов этого семейства, ММП-2, играет важнейшую роль в опухолевой инвазии, благодаря своей способности деградировать коллаген базальной мембраны. Многочисленные исследования показали, что увеличенная экспрессия ММП-2 коррелирует с инвазивными свойствами опухолевых клеток *in vitro* [1, 9] и со злокачественным фенотипом *in vivo* [10-14]. ММП-2 экспрессируется в виде неактивного предшественника – про-ММП, который может активироваться как ферментативным так и неферментативным путями [15].

EMMPRIN был первоначально идентифицирован как фактор на поверхности опухолевых клеток, который индуцирует синтез ММП в фибробластах и

\* - адресат для переписки

эндотелиальных клетках [16-21]. В настоящее время установлено, что увеличение выработки EMMPRIN приводит к стимуляции синтеза ММП-2 и повышает инвазивность опухолевых клеток [22-25], вероятно, вследствие взаимодействия между молекулами EMMPRIN и соседними клетками [25, 26].

В настоящем исследовании изучали экспрессию ММП-2 и EMMPRIN в процессе развития рака молочной железы. Для исследования доброкачественных тканевых образцов, а также образцов ткани II, III стадии рака молочной железы были использованы методы зимографии для желатиназы-А, иммунопреципитация и Вестерн-Блоттинг с моноклональными первичными антителами к EMMPRIN.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** *Источник ткани.* Образцы ткани взяты во время операций (K.R. Hospital, Mysore, India) – доброкачественные опухоли (8 случаев) и злокачественные опухоли молочной железы II стадии (10 случаев) и III стадии (8 случаев), (Классификация согласно Scarf and Bloom - [27, 28]).

*Подготовка ткани.* Взятые образцы ткани были помещены в холодный фосфатный буфер pH 7,4 и хранились в жидком азоте для дальнейшего анализа.

*Выделение и определение общего белка.* Пробы из образцов доброкачественных тканевых, а также образцов тканей II, III стадии рака молочной железы суспендировали в 4-х кратном литическом буфере, содержащем 0,2 М трис-HCl (pH 8,0), 0,2 М NaCl, 4,0 мкМ PMSF и 0,5% тритон X-100 (конечная концентрация равнялась однократной), и гомогенизировали в гомогенизаторе Glass-Teflon (Pyrex, Англия) при температуре 4°C. Лизат центрифугировали 30 минут, 10000 об/мин, в надосадочной жидкости определяли концентрацию белка методом Bradford [29]. Супернатант использовали для исследования.

*Метод зимографии.* Желатиназная активность ММП-2 в экстрактах из образцов доброкачественных и злокачественных тканей была исследована методом зимографии в ПААГ в присутствии желатина [30]. Желатиназа, присутствующая в тканевых образцах, деградирует желатин, сополимеризованный с ПААГ, оставляя четкую полосу после окраски геля. Экстракты из тканевых образцов с содержанием белка 25 мкг суспендировали в четырёхкратном диссоциирующем 0,26 М трис-HCl буфере pH 6,8 (без восстанавливающего агента), содержащем глицерол 10%, SDS 2% и бромфеноловый синий 0,001%, и подвергали электрофорезу в 7,5% SDS-ПААГ, содержащем 0,15% (w/v) желатина в качестве субстрата, при постоянном токе и напряжении 90 В и температуре 4°C. После электрофореза гели инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в 50 мМ трис буфере pH 7,6 содержащем 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и 2,5% тритон X-100. Затем гели дважды отмывали бидистиллированной водой, чтобы удалить тритон X-100 и оставляли на ночь в 50 мМ трис-HCl буфере pH 7,5, содержащем 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,15 М NaCl, при температуре 37°C. Гель окрашивали 0,25% раствором кумасси и затем отмывали осветляющим раствором. Области, подвергшиеся действию желатиназ, выглядели как прозрачные полосы.

*Вестернблоттинг для обнаружения EMMPRIN.* Экстракты из доброкачественных и злокачественных образцов тканей, содержащие 50 мкг белка, кипятили в диссоциирующем буфере (см. выше) 5 мин. Затем образцы центрифугировали 5 минут (10000 об/мин), при температуре 4°C. Супернатант подвергали электрофорезу в 10% SDS-ПААГ [31] и полученные в ПААГ белковые фракции переносили на предварительно активированную PVDF мембрану в специальной установке для Вестернблоттинга при 200 мА (постоянный ток) при комнатной температуре. После переноса мембрану отмывали в течение 5 минут в TTBS (Tris-Tween Buffer Saline), содержащем 0,05 М трис буфер pH 8,0, 0,15 М NaCl и 0,1% твин. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим для подтверждения полного переноса белков. Затем мембрану в течение часа обрабатывали в TTBS буфере pH 8,0, содержащем 5% обезжиренного молока и 2,5% BSA. Мембрану тщательно отмывали в TTBS (3 раза по 10 мин) и инкубировали с антителами anti-EMMPRIN при температуре 4°C в течение ночи.

Затем мембрану отмывали в TTBS буфере (2 раза по 5 минут) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со вторыми антителами конъюгированными с биотином (Goat anti-mouse IgG Biotin), при разведении 1:1500. Далее мембрану снова отмывали в TTBS буфере (2 раза по 10 мин) и инкубировали в течение 45 минут с НРО-9 (Strepta Avidin Peroxidase), при разведении 1:3000. Мембрану тщательно промывали в TTBS буфере (3 раза по 10 мин). Детекцию белков, прореагировавших с антителами, проводили в специальной хемилюминесцентной системе.

**Иммунопреципитация EMMPRIN.** Экстракты из доброкачественных и злокачественных тканей, содержащие 100 мкг белка, инкубировали с 10 мкл Protein-A-CL агарозы в течение 30 минут и центрифугировали в течение 15 минут (5000 об/мин) при температуре 4°C. Надосадочную жидкость инкубировали с 5 мкл моноклональных anti-EMMPRIN антител в течение 4 часов при температуре 4°C, затем к ней добавляли 20 мкл Protein-A-CL-agarose и инкубировали в течение 1 часа, после чего пробы центрифуговали 30 минут (10000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, агарозу трижды промывали в TTBS буфере [32], затем добавляли диссоциирующий буфер (см. выше), и пробы кипятили в течение 5 минут. Электрофорез белков проводили в 10% SDS-ПААГ, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали с помощью Вестернблоттинга.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Ферментная активность MMP-2 в образцах доброкачественных и злокачественных тканей. Экспрессия MMP-2, активные и неактивные формы фермента, были исследованы методом зимографии в образцах доброкачественных и злокачественных тканей молочной железы. На рисунке 1 представлена зимограмма, которая демонстрирует наличие двух форм ММП-2 – 72 кДа (про-ММП-2) и 68 кДа (активная ММП-2). Экспрессия ММП-2 и про-ММП-2 была выше в стадии III, чем в стадии II в образцах злокачественных тканей. Однако экспрессия ММП-2 и про-ММП-2 в доброкачественных тканях не обнаружена. Отмечается гиперэкспрессия ММП-2 по мере прогрессирования опухоли от доброкачественной в злокачественную.

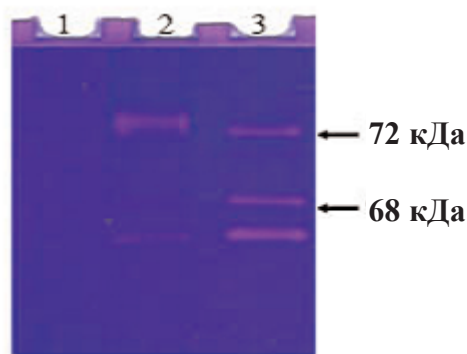
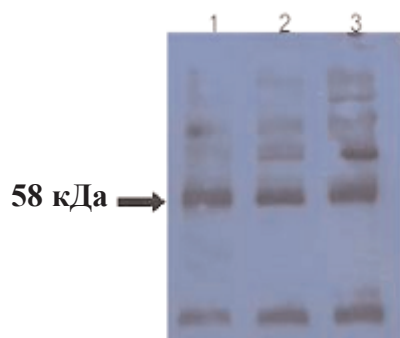


Рисунок 1.

Зимограмма белковых экстрактов образцов доброкачественных и злокачественных тканей молочной железы: полоса 1-образец доброкачественной ткани; полоса 2 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия – II; полоса 3 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия - III.

## ММП-2 ПРИ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

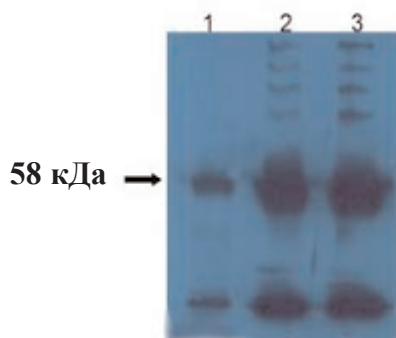
*Вестернблоттинг EMMPRIN.* Экспрессия EMMPRIN была исследована методом Вестернблоттинга в 8 доброкачественных тканевых образцах, 10 образцах II стадии рака молочной железы и 8 образцах III стадии. Пробы содержали 50 мкг белка. Белки были подвергнуты электрофорезу в 10% SDS-ПААГ и перенесены на PVDF мембрану, а затем экспериментально инкубированы с anti-EMMPRIN антителами. В качестве основного компонента были выявлены белки с мол. массой 58 кДа, в то время как другие белки выявились с помощью неспецифических реакций (рис. 2). Обнаружено увеличение экспрессии EMMPRIN в тканевых образцах рака молочной железы II и III стадий по сравнению с доброкачественной тканью.



**Рисунок 2.**

Вестерн-Блоттинг белковых экстрактов из доброкачественных и злокачественных образцов тканей: полоса 1 - образец доброкачественной ткани; полоса 2 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия – II; полоса 3 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия - III.

*Иммунопреципитация EMMPRIN в образцах доброкачественных и злокачественных тканей молочной железы.* Исследование экспрессии EMMPRIN методом иммунопреципитации подтвердило результаты, полученные с помощью Вестернблоттинга и показало увеличение белковой экспрессии EMMPRIN по мере прогрессирования опухоли от доброкачественной в злокачественную (рис. 3).



**Рисунок 3.**

Иммунопреципитация EMMPRIN в доброкачественных и злокачественных образцах тканей: полоса 1 - образец доброкачественной ткани; полоса 2 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия – II; полоса 3 - образец злокачественной ткани, рак молочной железы, стадия - III.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Исследование экспрессии ММП-2 в доброкачественных и злокачественных тканях рака молочной железы II и III стадии показало увеличение экспрессии ММП-2 по мере прогрессирования злокачественной опухоли от II к III стадии, в то время как экспрессия ММП-2 в доброкачественной ткани не была обнаружена. Эти результаты соответствуют предыдущим работам о повышенной активности ММП на поздних стадиях рака [33]. Экспрессия ММП-2 в опухолевых клетках указывает на увеличивающийся риск возникновения метастазов в меланоме [34] и карциноме чешуйчатых клеток языка [35]. Однако в нашем исследовании ММП-2 не экспрессируется в доброкачественных тканях, очевидно, экспрессия ММП-2 ассоциируется с прогрессией опухоли.

При исследовании экспрессии EMMPRIN на белковых экстрактах из доброкачественных и злокачественных тканевых образцов с помощью Вестернблоттинга была установлена повышенная экспрессия EMMPRIN в тканевых образцах рака молочной железы II и III стадий по сравнению с доброкачественной тканью, а в качестве основного компонента были выявлены белки с мол. массой 58 кДа. Для получения дополнительной информации по экспрессии EMMPRIN мы использовали метод иммунопреципитации и обнаружили, что экспрессия белка EMMPRIN увеличивалась по мере прогрессирования опухоли. Наши данные подтверждают предположения о повышенной экспрессии EMMPRIN на поздних стадиях рака молочной железы по сравнению с доброкачественными тканями. Обнаружено, что EMMPRIN экспрессируется на высоком уровне при различных злокачественных заболеваниях человека, включая меланомы, глиомы, лимфомы, рак легкого и почки [16].

Обнаружение повышенной экспрессии EMMPRIN и ММП-2 на II и III стадии рака молочной железы может служить показателем развития карциногенеза. Многочисленные исследования демонстрируют важнейшую роль внеклеточного индуктора матричных металлопротеиназ (EMMPRIN) в регуляции экспрессии нескольких ММП [16]. EMMPRIN участвует во взаимодействиях гетеротипичных клеток, а в опухолевых клетках EMMPRIN стимулирует синтез ММП-1, ММП-2, ММП-3, а также увеличивает экспрессию ММП, связанных с мембраной [17, 20-22, 25, 36]. Поскольку EMMPRIN вызывает повышенную экспрессию ММП, особенно ММП-2, в самих опухолевых клетках, следовательно, он увеличивает их агрессивность [23-25]. В нашем исследовании активность ММП-2, активные и латентные формы фермента не обнаружены в доброкачественных тканях, однако в значительной мере присутствуют в тканевых образцах рака молочной железы II и III стадии, это говорит о корреляции между экспрессией ММП и процессом инвазии опухолевых клеток.

Таким образом, наши данные полностью соответствуют ранее проведенным исследованиям и свидетельствуют о том, что EMMPRIN является важнейшим фактором в опухолевой прогрессии, который участвует в опухолевой инвазии, стимулируя синтез матричных металлопротеиназ.

Мы благодарим профессоров Geetha Avadani, Department of Surgery, Mysore Medical College, Karnataka, India, и Kidwai Institute of Oncology, Bangalore, Karnataka, India, за предоставленные образцы тканей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gilles C., Polette M., Piette J., Birembaut P., Foidart J.M. (1994) *Int. J. Cancer.*, **59**, 661-666.
2. Monsky W.L., Lin C.Y.L., Aoyama A., Kelly T., Kkiyama S.K., Mueller S.C., Chen W.T. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 5702-5710.
3. Taniguchi S., Iwamura T., Kitamura N. (1992) *Clin. Exp. Metastasis.*, **10**, 259-266.
4. Bernhard E.J., Muschel R.J., Hughes E.N. (1990) *Cancer Res.*, **50**, 3872-3877.



5. Bonfil R.D., Reddel R.R., Ura H., Reich R., Fridman R., Harris C.C., Klein-Szanto A.J.P. (1989) J. Natl. Cancer Inst., **81**, 587-594.
6. Nagase H., Woessner J.F. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 21491-21494.
7. Shapiro S.D. (1998) Curr. Opin. Cell Biol., **10**, 602-608.
8. Westermarck J., Kahari V.M. (1999) FASEB J., **13**, 781-792.
9. Ura H., Bonfil R.D., Reich R., Reddel R., Pfeifer A., Harris C.C., Klein-Szanto A.J.P. (1989) Cancer Res., **49**, 4615-4621.
10. Garbisa S., D'Errico A., Grigioni W., Biagini G., Caenazzo C., Fastelli G., Stetler-Stevenson W.G., Liotta L.A. (1990) in: Genetical Mechanisms in Carcinogenesis and Tumor Progression (Harris C.C., ed.) New York, Wiley-Liss. 203-212.
11. Nawrocki B., Polette M., Marchand V., Monteau M., Gillery P., Tournier J.M., Birembaut P. (1997) Int. J. Cancer., **72**, 556-564.
12. Poulson R., Hanby A.M., Pignatelli M., Jeffrey R.E., Longcroft J.M., Rogers I. (1993) J. Clin. Pathol., **46**, 429-436.
13. Polette M., Clavel C., Cockett M., Girod de Bentzmann S., Murphy G. (1993) Invasion Metast., **13**, 31-37.
14. Pyke C., Ralfkiaer Dano K. (1993) Am. J. Pathol., **142**, 359-365.
15. Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 5578-5582.
16. Toole B.P. (2003) Curr. Top. Dev. Biol., **54**, 371-389.
17. Biswas C., Zhang Y., De Castro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., Nabeshima K. (1995) Cancer Res., **55**, 434-439.
18. Ellis S.M., Nabeshima K., Biswas C. (1989) Cancer Res., **49**, 3385-3391.
19. Nabeshima K., Lane W.S., Biswas C. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **285**, 90-96.
20. Guo H., Zucker S., Gordon M.K., Toole B.P., Biswas C. (1997) J. Biol. Chem., **272**: 24-27.
21. Caudroy S., Polette M., Nawrocki-Raby B., Cao J., Toole B.P., Zucker S., Birembaut P. (2002) Clin. Exp. Metastasis, **19**, 697-702.
22. Kanekura T., Chen X., Kanzaki T. (2002) Int. J. Cancer, **99**, 520-528.
23. Zucker S., Hymowitz M., Rollo E.E., Mann R., Conner C.E., Cao J., Foda H.D., Tompkins D.C., Toole B.P. (2001) Am. J. Pathol., **158**, 1921-1928.
24. Yang J.M., Xu Z., Wu Z., Zhu H., Wu X., Hait W.N. (2003) Mol. Cancer Res., **1**, 420-427.
25. Sun J., Hemler M.E. (2001) Cancer Res., **61**, 2276-2281.
26. Erica A., Marieb E.A., Toole B.P. (2004) Cancer Res., **64**, 1229-1232.
27. Bloom H.J.G., Richardson W.W. (1957) Br. J. Cancer, **11**, 350-377.
28. Scarff R.W., Torioni H. (1968) Histological typing of breast tumors (WHO, Geneva).
29. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
30. Longyel E., Gum R., Juarez J., Clayman G., Sato H., Boyd D. (1995) Cancer Res., **55**, 963-967.
31. Laemmli U.K., Molbert E., Showe M., Kellenberger E. (U.K.) (1970) Nature (London). **227**, 680-685.
32. Nyberg P., Sorsa T., Luostarinen J., Heljasvaara R., Salo T. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 22404-22411.
33. Barbara S., Dieter P., Kathrin H., Kerstin S., Stefan R., Elisabeth K., Rafael F., Ursula B., Manfred S., Walther K., Ernst L. (2001) Clin. Cancer Res., **7**, 2396-2404.
34. Vaisanen A., Kallioinen M., Von Dickhoff K. (1999) J. Pathol., **188**, 56-62.
35. Yohsizaki T., Maruyama Y., Sato H. (2001) Int. J. Cancer., **95**, 44-50.
36. Sameshima T., Nabeshima K., Toole B.P., Yokogami K., Okada Y., Goya T., Koono M., Wakisaka S. (2000) Cancer Lett., **157**, 177-184.

Поступила: 21. 02. 2007.

**EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP-2) AND EXTRACELLULAR MATRIX METALLOPROTEINASES INDUCER (EMMPRIN) IN BENIGN AND ADVANCED BREAST CANCER TISSUE SAMPLES**

*H. Chandru<sup>1</sup>, A.C. Sharada<sup>1</sup>, S. Manjunath<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Yuvaraja's college, University of Mysore, Mysore 570005, Karnataka, India; e-mail: chandrubiochemistry@yahoo.com

<sup>2</sup>Department of Studies in Biochemistry, Manasagangotri, University of Mysore, Mysore-570006, Karnataka, India

Tumor cell derived matrix metalloproteinases are a family of enzymes associated with the tumor invasion and metastasis. Extracellular matrix metalloproteinases inducer (EMMPRIN) stimulates synthesis of gelatinase A (MMP-2) in peritoneal fibroblasts. In the present study the role of MMP-2 and EMMPRIN in the progression of breast cancer has been investigated. Gelatinase-A and EMMPRIN were analyzed in benign and stage II and stage III breast cancer tissue samples by gelatin zymography assay, immunoprecipitation analysis and Western blot analysis with a monoclonal primary antibody specific for EMMPRIN. Our results showed overexpression of EMMPRIN in advanced stages of breast cancer tissues compared with benign tumor tissue samples. The expression of MMP-2, the active and latent forms of the enzyme increased with tumor progression from Stage II to Stage III of breast cancer and it was not expressed in benign tissues. The expression MMP-2 correlates with tumor progression. This observation obviously indicates that EMMPRIN and MMP-2 are the major determinants of malignancy in cancers.

**Key words:** EMMPRIN, MMP-2, tumor invasion, breast cancer, Western blot.