

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.3.4*24'142

©Коллектив авторов

МЕМБРАНОСВЯЗАННАЯ МАТРИКСНАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА – МТ1-ММП И РЕГУЛЯТОРЫ ЕЕ АКТИВНОСТИ, КАК ФАКТОРЫ ИНВАЗИИ, ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

*О.С. Тимошенко, Т.А. Гуреева, Е.В. Кузнецкая, Н.И. Соловьева**

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, д.10, эл.почта: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Мембраносвязанная коллагеназа МТ1-ММП относится к матриксным металлопротеиназам (ММП), которые играют ключевую роль в генерализации процессов инвазии и метастазирования, определяющих степень злокачественности опухолей. Целью настоящего исследования являлось выяснение особенностей экспрессии МТ1-ММП и эндогенных регуляторов её активности: активатора - фурина и тканевого ингибитора ТИМП-2, как факторов инвазии при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Исследование проведено на 11 парах образцов карцином, включающих опухоль и прилегающую к опухоли морфологически нормальную ткань. Полученные данные свидетельствуют о том, что основной вклад в деструктивный (инвазивный) потенциал карцином шейки матки, вносит увеличение экспрессии МТ1-ММП, а также увеличение экспрессии фурина и низкая экспрессия ингибитора ТИМП-2. В прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия МТ1-ММП, которая вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного потенциала опухоли.

Ключевые слова: мембраносвязанная матриксная металлопротеиназа МТ1-ММП, тканевый ингибитор ММП - ТИМП-2, активатор ММП - фурин, плоскоклеточная карцинома шейки матки.

ВВЕДЕНИЕ

Матриксным металлопротеиназам (ММП) отводится ключевая роль в развитии процессов инвазии и метастазирования [1, 2]. ММП выполняют как деструктивную, так и важнейшие регуляторные функции, активируя, инактивируя и модифицируя целый ряд биологически-активных молекул [3, 4]. Известно 23 ММП в организме животных и человека [3, 5]. Основные ММП относятся к секретируемым ферментам, а шесть ММП относятся к мембраносвязанным ММП – МТ-ММП [3]. МТ1-ММП обнаружена на поверхности многих клеток и рассматривается, как интерстициальная коллагеназа (ММП-1), связанная с мембраной [6]. Этот фермент специфически запускает гидролиз фибриллярных коллагенов в перичеллюлярном пространстве, что приводит к деструкции матрикса и развитию инвазивного процесса [6]. МТ1-ММП участвует

в активации про-ММП-13 и про-ММП-2, которая наряду с фибриллярными коллагенами гидролизует и коллаген базальных мембран, тем самым МТ1-ММП также обеспечивает развитие процесса инвазии [5, 7].

Активность ММП в организме регулируется специфическими тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП). К семейству ТИМП относится четыре ингибитора – ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4. Они могут ингибировать активность всех членов семейства ММП, однако обладают определенной избирательной специфичностью [4]. В физиологических жидкостях и, прежде всего в крови, основным ингибитором ММП является α 2-макрोगлобулин. Являясь ингибиторами ММП, ТИМПы участвуют в регуляции деградации соединительно тканного матрикса. МТ1-ММП ингибируется эндогенным тканевым ингибитором ТИМП-2, который, кроме того,

* - адресат для переписки

участвует в активации про-ММП-2. ТИМПы обладают “цитокино-подобной” активностью и могут принимать участие в регуляции таких процессов как апоптоз и клеточный рост [4, 7-9]. Активация про-MT1-ММП осуществляется внутриклеточно в аппарате Гольджи с помощью сериновой протеиназы – фурина [10].

Данные по участию MT1-ММП в развитии рака шейки матки на клиническом материале незначительны [11, 12], основные данные по экспрессии этого фермента получены на клеточных линиях [13]. Целью настоящего исследования являлось выяснение особенностей экспрессии MT1-ММП, её эндогенного ингибитора ТИМП-2 и активатора – фурина, как факторов инвазии при плоскоклеточной карциноме шейки матки.

МЕТОДИКА

Клинический материал

Работа проведена на 11 парах образцов карцином, включающих опухоль и прилегающую к опухоли морфологически нормальную ткань. Образцы были получены из банка ОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина и МНИОИ им. П.А. Герцена. Все образцы были классифицированы по TNM клинической классификации опухолей в соответствии с требованиями международного союза по борьбе с раком (UICC). Ткани были гистологически идентифицированы в отделе патоморфологии ОНЦ РАМН и МНИОИ. Образцы были собраны в соответствии с правилами утвержденными Советом института ОНЦ РАМН и МНИОИ. Согласие на использование операционного материала было получено от всех пациентов.

RT-PCR

Одновременное выделение ДНК и РНК проводили гуанидинизотиоцианатным методом [14]. Исследование экспрессии генов проводили методом полуколичественной RT-PCR, нормируя результаты по уровню экспрессии генов домашнего хозяйства GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) и HPRT (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы). В работе были использованы следующие праймеры: MT1-ММП, прямой – 5' CCT TTT ACC AGT GGA TGG AC 3', обратный – 5' CCA GCT CCT TAA TGT GCT TG 3' (444 н.п., 29 циклов, 40 с.); ТИМП-2, прямой праймер – 5' GGT CTC GCT GGA CGT TGG AG 3', обратный – 5' GGA GCC GTC ACT TCT CTT G 3' (304 н.п., 58°C, 27 циклов, 30 с.); GAPDH, прямой праймер – 5' ACC ACA GTC CAT GCC

ATC AC 3', обратный – 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3' (450 н.п., 60°C, 28 циклов, 30 с); HPRT, прямой праймер – 5' CTG GAT TAC ATC AAA GCA CTG 3', обратный – 5' GGA TTA TAC TGC CTG ACC AAG 3' (230 н.п., 60°C, 30 циклов, 30 с). Для подбора специфических праймеров были использованы данные GeneBank Nucleotide Sequence Database. Для оценки структуры праймеров использовали компьютерную программу Oligo 4.1 Primer Analysis Software. Продукты RT-PCR разделяли в 1,5% агарозном геле с бромидом этидия 0,5 мкг/мл [15, 16].

Иммуногистохимическое исследование

Работу проводили на парафиновых срезах толщиной 4 мкм. Использовали моноклональные антитела к MT1-ММП и TIMP-2 фирмы “LabVision” (США) в готовом разведении. Иммуногистохимические реакции проводили в автоматизированном режиме в иммуногистостейнере Avtosteiner (“Dako”, Дания). В качестве детекционной системы использовали систему Envision (“Dako”), в качестве хромогена – диаминобензидин. Затем срезы докрашивали гематоксилином. Микроскопирование проводили на анализаторе изображения Leika Q 550 (Германия). Интенсивность реакции оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3, учитывая выраженность реакции и её локализацию [17, 18].

Определение коллагенолитической активности проводили с использованием меченого флуоресцеинизотиоцианатом коллаген I типа, полученного из кожи крыс. На гидролиз брали по 20 мкл (172 мкг) коллагена, инкубировали в течение 2 ч при температуре 35°C до образования реконструированных фибрилл (плёнок). Реакционная смесь содержала 0,01 М трис-HCl буфера pH 7,6 с добавлением 1 mM CaCl₂ и 0,2 М NaCl и исследуемую пробу: супернатант лизатов тканей (от 100 мкг до 1000 мкг белка). Общий объём пробы 1000 мкл. Инкубацию проводили в течение 18-20 ч при 37°C, флуоресценцию измеряли при длинах волн 490 и 520 нм возбуждения и поглощения соответственно. Активность коллагеназ анализировали в присутствии трипсина и ингибитора ММП – ЭДТА [19].

Определение активности фурина

Для определения активности фурина использовали синтетический субстрат – 7-амино-4-метил-кумариламид пироглутаминил-

L-аргинил-треонил-лизил-L-аргинина (Pyr-Arg-The-Lys-Arg-MCA) [20]. Опытная проба объёмом 500 мкл содержит 5-100 мкл образца (5-10 мкг белка), Pyr-Arg-The-Lys-Arg-MCA (в конечной концентрации 4×10^{-5} М). Гидролиз субстрата проводили в 50 мМ трис-HCl буфере pH 7,0, содержащем 1 мМ CaCl_2 , в течение 30-60 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,0 мл 5 мМ раствора ЭДТА. Флуоресценцию продукта реакции – 7-амино-4-метил-кумариламина (MCA) измеряли на флуориметре при длинах волн 360 нм и 460 нм возбуждения и поглощения соответственно. Активность выражали в пкмольх MCA, освобождённого за 1 мин в расчёте на 1 мг белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование экспрессии мРНК MT1-ММП её ингибитором TIMP-2 проведено на 11 образцах карцином и прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани. В качестве иллюстрации на рисунке 1а приведены 4 пары образцов. Количественная оценка экспрессии коллагеназы MT1-ММП и её ингибитора TIMP-2 с помощью денситометрии показала, что выраженное увеличение экспрессии мРНК MT1-ММП наблюдалось в 64% образцов. В случае ингибитора TIMP-2 в большинстве образцов (90%) наблюдалось снижение экспрессии мРНК, а в некоторых случаях её полное отсутствие (рис. 1б).

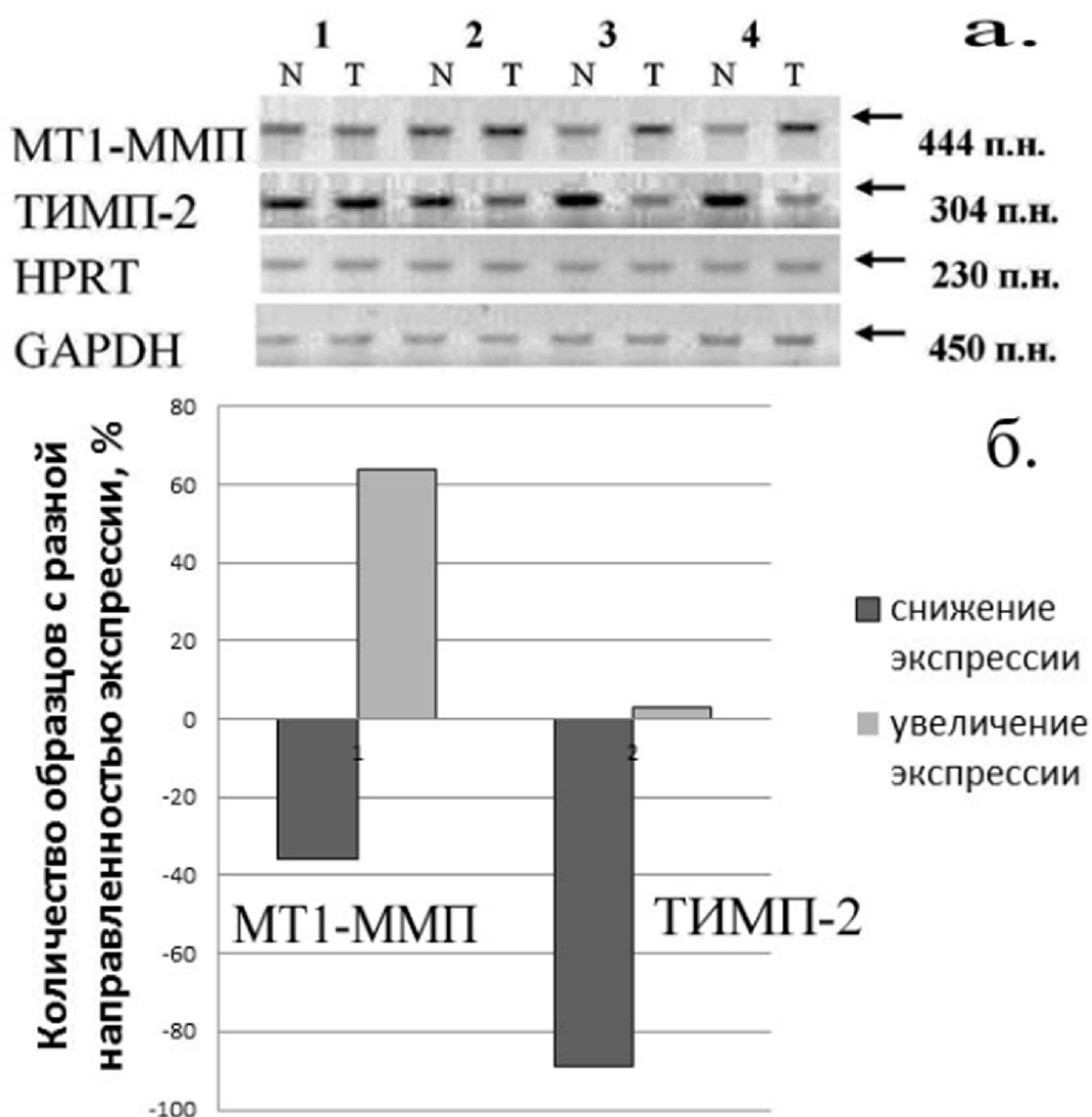


Рисунок 1. Экспрессия мРНК MT1-ММП и TIMP-2 по данным RT-PCR (а) и денситометрии (б) в образцах карцином шейки матки. Количество кДНК, вносимое в реакцию соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH и HPRT для каждого образца.

Исследование экспрессии MT1-ММП и ТИМП-2 методом иммуногистохимии показало, что экспрессия MT1-ММП была ярко выражена (2-3 единицы), в то время как экспрессия ингибитора – ТИМП-2 либо отсутствовала, либо была выражена очень слабо (в пределах одной единицы).

Коллагенолитическую активность определяли в лизатах образцов опухоли и прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани (рис. 2). Коллагенолитическая активность представляет собой сумму активности мембраносвязанной MT1-ММП и секретируемой коллагеназы ММП-1. Полученные данные свидетельствуют о том, что коллагенолитическая активность была обнаружена как в опухоли, так и в прилегающей ткани. В первых трёх парах образцов активность в опухоли превышает активность в нормальной ткани (от 1,3 до 2,7 раз). В образцах 4 и 5 наблюдается обратная картина, активность в нормальной ткани превышала активность в опухоли (в 3 и 1,4 раза). При этом активность в опухоли была достаточно высокой во всех образцах, то есть экспрессия коллагеназ была достаточно выраженной [18].

Активности фурина оценивали по гидролизу специфического синтетического флуорогенного субстрата Puy-Arg-The-Lys-Arg-MCA. Установлено, что активность этого фермента в опухоли превышала активность в морфологически нормальной ткани от 1,5 до 7 раз (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что: 1. при плоскоклеточной карциноме шейки матки происходит существенное увеличение экспрессии матриксной металлопротеиназы MT1-ММП в опухоли; 2. Экспрессия активатора MT1-ММП фурина в опухоли существенно увеличена по сравнению с контролем; 3. Экспрессия тканевого ингибитора ММП – ТИМП-2 находится в основном на низком уровне или отсутствует; 4. Экспрессия MT1-ММП обнаружена и в прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани, что вносит дополнительный вклад в инвазивный потенциал опухоли.

Следовательно, экспрессия как MT1-ММП, так и её регуляторов направлена на увеличение инвазивного потенциала опухоли. Данные важны для понимания роли ММП в развитии многоступенчатого процесса канцерогенеза.

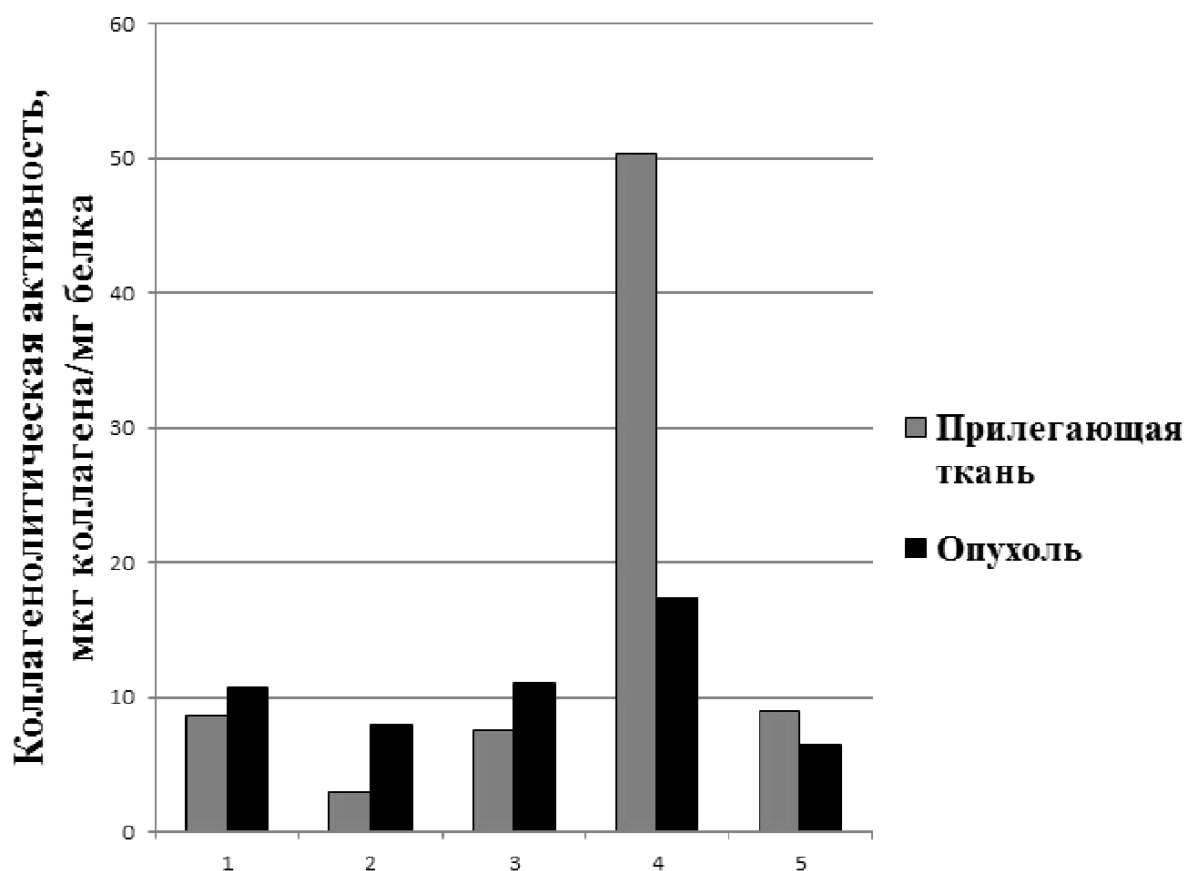


Рисунок 2. Коллагенолитическая активность в образцах карцином шейки матки

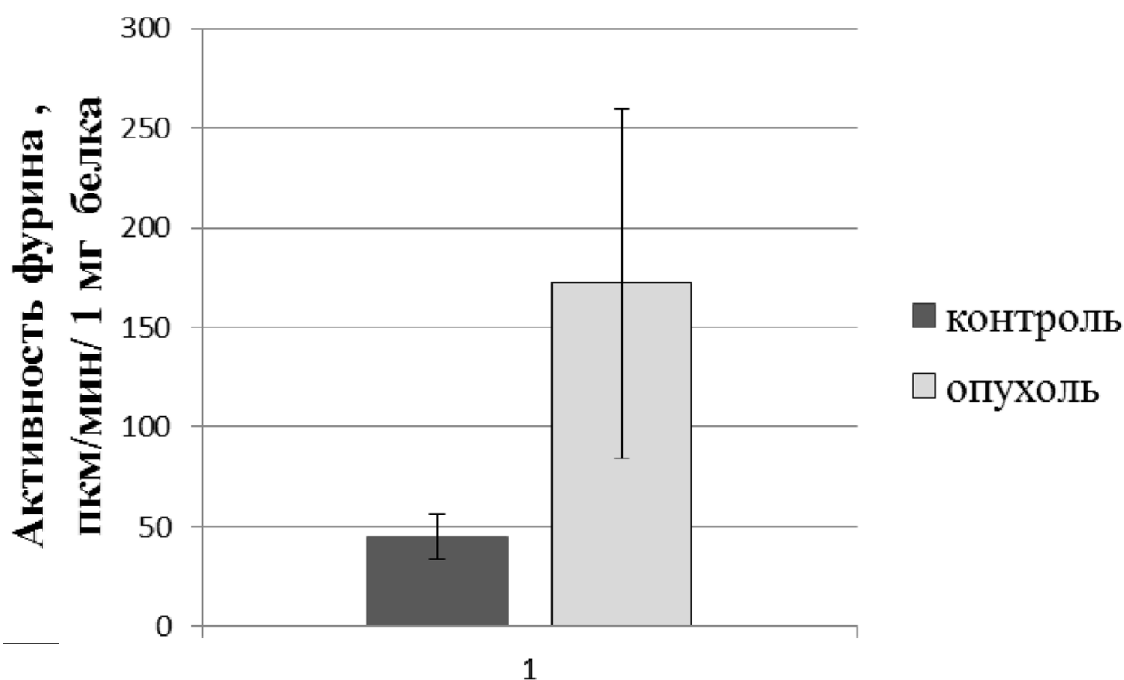


Рисунок 3. Активностъ фурина в образцах карцином шейки матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pitliak M., Vargova V., Mechirova V. (2012) *Oncol.*, **35**, 49-53.
2. Libra M., Scalisi A., Vella N., Clement S., Sorio R. (2009) *Int. J. Oncol.*, **34**, 897-903.
3. Соловьева Н.И. (1998) *Биоорг. химия*, **24**, 245-255.
4. Visse R., Nagase H. (2003) *Circ. Res.*, **92**, 827-839.
5. Ala-Aho R., Kahari V.-M. (2005) *Biochemie*, **87**, 273-286.
6. Poincloux R., Lizárraga F., Chavrier Ph. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 3015-3024.
7. Hadler-Olsen E., Fadnes B., Sylte I., Uhlin-Hansen L., Winberg J.O. (2011) *FEBS J.*, **278**, 28-45.
8. Sampieri C.L., León-Córdoba K., Remes-Troche J.M. (2013) *J. Cancer Res. Ther.*, **9**, 356-363.
9. Gong Y., Chippada-Venkata U.D., Oh W.K. (2014) *Cancers (Basel)*, **6**, 1298-1327.
10. Tellier E., Nègre-Salvayre A., Bocquet B., Itohara S., Hannun Y.A., Salvayre R., Augé N. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 2997-3007.
11. Sheu B.C., Lien H.C., Ho H.N., Lin H.H., Chow S.N., Huang S.C., Hsu S.M. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6537-6542.
12. Zhai Y., Hotary K.B., Nan B., Bosch F.X., Muoz N., Weiss S.J., Cho K.R. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 6543-6550.
13. Smola-Hess S., Pahne J., Mauch C., Zigrino P., Smola H., Pfister H.J. (2005) *J. Gen. Virol.*, **86**, 1291-1296.
14. Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V., Kisseljova N.P., Kisseljov F.L. (1995) *Int. J. Cancer*, **61**, 337-341.
15. Рыжакова О.С., Соловьева Н.И. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 530-540.
16. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Цветкова И.В. (2009) *Биомед. химия*, **55**, 441-450.
17. Dabbs Ed.D.J. (2006) *Diagnostic Immunohistochemistry*, 2 ed., Philadelphia.
18. Рыжакова О.С., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Соловьева Н.И. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 55-64.
19. Рыжакова О.С., Соловьева Н.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 432-438.
20. Tellier E., Nègre-Salvayre A., Bocquet B., Itohara S., Hannun Y.A., Salvayre R., Auge N. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 2997-3007.

Поступила: 15. 07. 2014.

**MEMBRANE TYPE 1 MATRIX METALLOPROTEINASE (MT1-MMP)
AND THE REGULATORS OF ITS ACTIVITY AS INVASIVE FACTORS
IN SQUAMOUS CELL CERVICAL CARCINOMAS**

O.S. Timoshenko, T.A. Gureeva, E.V. Kugaevskaya, N.I. Solovyeva

Institute of Biomedical Chemistry,
10, Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: 8-499-246-50-72;
e-mail: nina.solovyeva@ibmc.msk.ru

Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1MMP) is one of matrix metalloproteinases (MMP), which play a key role in tumor invasion and metastasis. The aim of this study was to elucidate the peculiarities of expression of MT1MMP and endogenous regulators of its activity: the activator – furin and the inhibitor – TIMP-2, as invasive factors of squamous cell cervical carcinomas (SCC). The study was carried out using 11 specimens of SCC and 11 specimens of morphologically normal tissue adjacent to the tumor. It was shown that the increase of MT1-MMP and furin expression and low of TIMP-2 expression makes the main contribution to the destructive (invasive) potential of SCC. Moreover, substantial expression of MT1-MMP was registered in the specimens of morphologically normal adjoining to tumor tissue. This expression was found to make an additional contribution to the destructive potential of the cervical tumor.

Key words: membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1MMP), MMP activator - furin, tissue inhibitor of MMPs - TIMP-2, cervical squamous cell carcinoma.