

S-НИТРОЗОГЛУТАТИОН ПОВЫШАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ПРОТЕИНА ММП-1 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HT1080 ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

¹Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

²Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Короновский Ю.В.¹, Удут В.В.²

Исследовано влияние синтетического антиоксиданта S-нитрозоглутатиона (GSNO) на экспрессию протеина матричной металлопротеиназы-1 (ММП-1) в клетках фибросаркомы человека HT1080 при гипоксической гипоксии. В условиях гипоксической гипоксии GSNO подавлял экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080. При этом гиперэкспрессия супероксиддисмутазы-2 (СОД-2) повышала, а гиперэкспрессия каталазы – снижала экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080.

Ключевые слова: матричные металлопротеиназы, S-нитрозоглутатион, гипоксия, культура клеток.

The effect of the synthetic antioxidant S-nitrosoglutathione (GSNO) on the expression of matrix metalloproteinase-1 protein (MMP-1) in human fibrosarcoma cells HT1080 in hypoxic hypoxia was studied. In hypoxic hypoxia, GSNO suppressed the expression of MMP-1 protein in cells of the HT1080 line. At the same time, hyperexpression of superoxide dismutase 2 (SOD-2) increased, and hyperexpression of catalase reduced the expression of MMP-1 protein in cells of the HT1080 line.

Key words: matrix metalloproteinase, S-nitrosoglutathione, hypoxia, cell culture.

Матричные металлопротеиназы играют ключевую роль в регуляции межклеточных взаимодействий посредством расщепления компонентов внеклеточного матрикса и высвобождения депонированных в матриксе цитокинов [1]. ММП играют ключевую роль в патогенезе различных заболеваний – преждевременных родах [2], инсульте [3] и метастазировании опухолей [4]. Изучение возможностей фармакологической коррекции экспрессии ММП позволит разработать эффективные методы контроля над системой матричных металлопротеиназ при патологических процессах [5].

Ранее показано, что гипоксическая гипоксия стимулирует экспрессию ММП-1 в клетках линии HT1080, при этом СОД-2 повышает, а каталаза снижает экспрессию мРНК и протеина ММП-1 [6]. Также установлено, что синтетический антиоксидант S-нитрозоглутатион (GSNO) подавляет экспрессию мРНК ММП-1 [7].

Цель работы заключалась в оценке влияния синтетического антиоксиданта GSNO на экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080 фибросаркомы человека при гипоксической гипоксии на фоне гиперэкспрессии СОД-2 и каталазы.

Материалы и методы

Культура клеток. В клетки линии HT1080 фибросаркомы (ATCC кат. № CCL-121) с помощью вектора были введены дополнительные копии генов ММП-1, СОД-2 и каталазы, и получены

три модифицированные линии клеток HT1080: HT1080-MMP1 содержали повышенное количество копий генов ММП-1; HT1080-MMP1SOD2 содержали повышенное количество копий генов ММП-1 и СОД-2; HT1080-MMP1SOD2CAT содержали повышенное количество копий генов ММП-1, СОД-2 и каталазы. Каждый эксперимент проводили трехкратно.

Гипоксическая гипоксия. Использовали готовые газовые смеси: нормоксическую (21 об. % кислорода, 5 об. % углекислого газа, 74 об. % азота) и гипоксическую (1 об. % кислорода, 5 об. % углекислого газа, 94 об. % азота).

Синтез S-нитрозоглутатиона (GSNO) осуществляли в день исследования. Смешивали 1 мл 200 мМ-раствора нитрита натрия (кат. № S2252, Sigma-Aldrich, США) с 1 мл 200 мМ-раствора L-цистеина (кат. № W326305, Sigma-Aldrich, США), инкубировали в темноте на льду в течение 10 мин. Добавляли 2 мл 1 М раствора гидроортофосфата калия. В питательную среду добавляли водный раствор GSNO для достижения его концентрации в среде 500 мкмоль/л, инкубировали 1 ч при нормоксических условиях и заменяли среду на среду, не содержащую GSNO.

Эксперимент. Через 24 ч экспозиции клеток в гипоксической газовой смеси оценивали экспрессию протеина ММП-1 вестерн-блотом с использованием кроличьих поликлональных антител (Millipore, кат. № AB8105) и вторичных антител козы (Invitrogen, кат. № A-11069).

Денситометрический анализ результатов вестерн-блота проводили с помощью программы ImageJ версии 1.47a (National Institutes of Health).

Статистический анализ. Статистический анализ выполнялся с использованием статистического пакета программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Различия оценивали по t-критерию Стьюдента. Уровень значимости различий был принят 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При гипоксической гипоксии GSNO в культуральной среде подавлял экспрессию белка ММП-1 в клетках HT1080-MMP1 (рисунок 1). Это свидетельствует о возможном антиоксидантном действии GSNO в сигнальном каскаде регуляции экспрессии ММП-1.

HT1080-MMP1

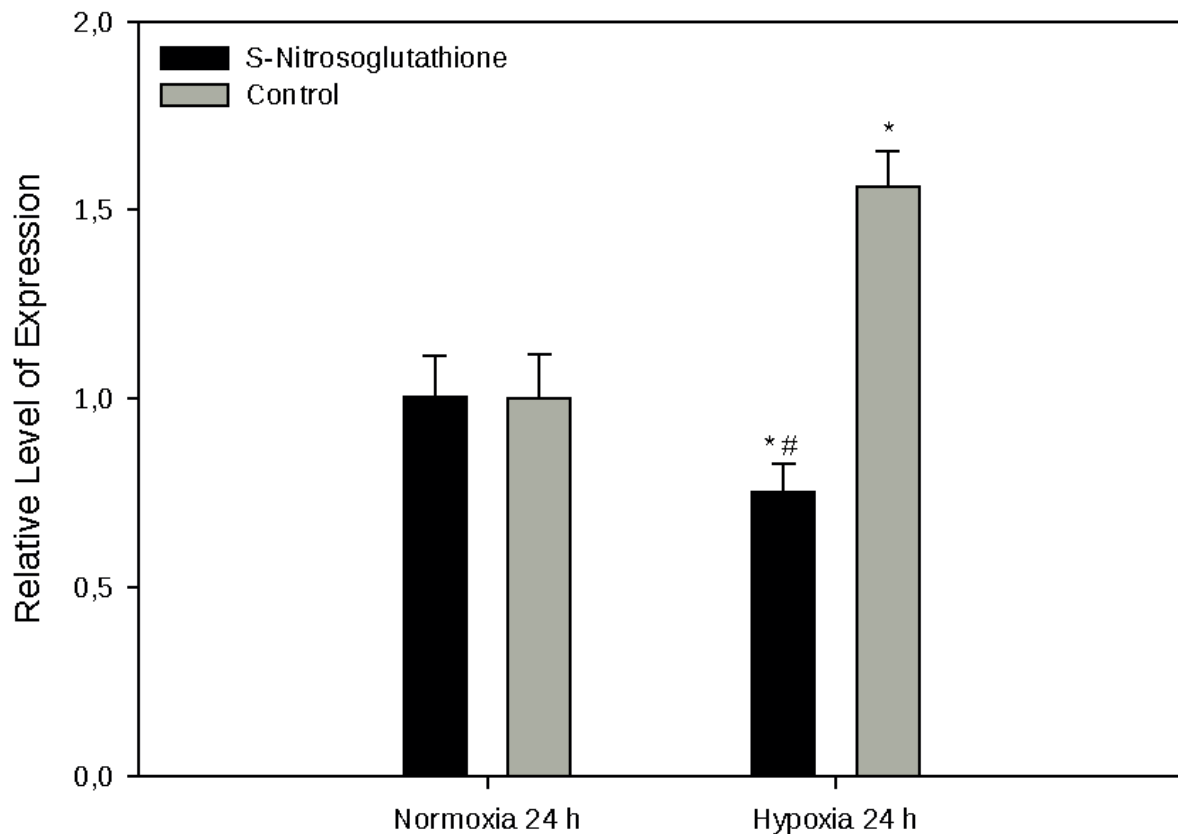


Рисунок 1 – Влияние гипоксической гипоксии и 500 мкМ-раствора S-нитрозоглутатиона (GSNO) на экспрессию белка ММП-1 в культуре клеток HT1080-MMP1.

* $P < 0,001$ – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при нормоксии и гипоксии.

$P < 0,001$ – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при действии S-нитрозоглутатиона в сравнении с контролем.

Гиперэкспрессия митохондриальной формы супероксиддисмутазы (СОД-2) повышала синтез белка ММП-1 в нормоксических условиях, что, по-видимому, было обусловлено повышенной генерацией H_2O_2 [8]. При этом GSNO усиливал экспрессию протеина ММП-1 в нормоксических условиях, но подавлял экс-

прессию протеина ММП-1 при гипоксической гипоксии (рисунок 2). Возможно, это различие было обусловлено не только антиоксидантным действием GSNO, но и свойством этого агента как донора NO, запускающего нитрозативный сигнальный каскад [9].

HT1080-MMP1SOD2

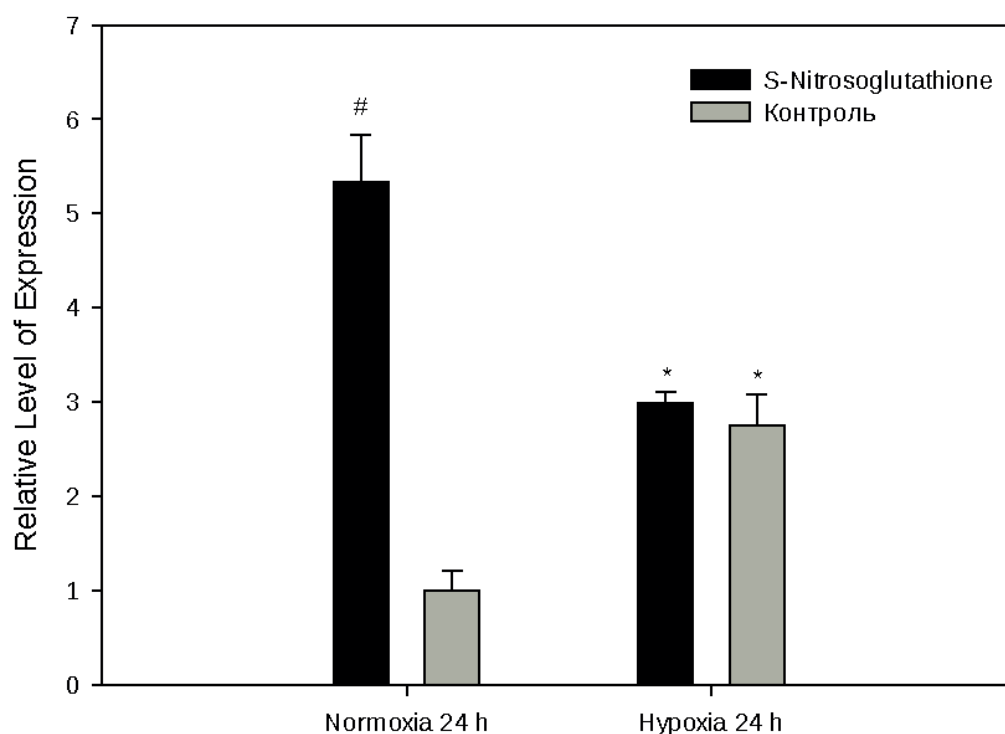


Рисунок 2 – Влияние гипоксии и 500 мкМ-раствора S-нитрозоглутатиона (GSNO) на экспрессию белка ММП-1 в культуре клеток HT1080-MMP1SOD2.

*P<0,001 – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при нормоксии и гипоксии.

#P<0,001 – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при действии S-нитрозоглутатиона в сравнении с контролем.

Гиперэкспрессия каталазы в клетках HT1080 нейтрализовала эффект СОД-2 на экспрессию протеина ММП-1, что, по-видимому, обусловлено расщеплением H_2O_2 [10]. GSNO подавлял экспрессию ММП-1 в условиях гипоксической гипоксии (рисунок 3).

Таким образом, в клетках линии HT1080 GSNO подавляет не только синтез мРНК ММП-1 [7], но и синтез протеина ММП-1. Эффект GSNO на экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080 более выражен при гипоксической гипоксии в сравнении с нормоксией.

Возможным механизмом индукции синтеза ММП-1 является каскад митоген-активируемой киназы (МАРК), включая киназы ERK 1/2 и JNK. При этом JNK фосфорилирует факторы транскрипции семейства Jun (c-Jun, JunD) [11], а ERK 1/2 фосфорилирует факторы транскрипции семейства Jun (c-Jun) и Fos (Fra-1, Fra-2, c-Fos), а также фактор транскрипции семейства Ets (Ets-1) [12]. Димеры Jun-Jun и Jun-Fos транслоцируются в ядро, где усиливают транскрипцию генов. Транскрипция MMP усиливается AP-1 и Ets [13].

Установленную закономерность реакции экспрессии протеина ММП-1 при гипоксиче-

ской гипоксии следует учитывать при изучении фармакологической коррекции экспрессии матриксных металлопротеиназ, в частности, при изучении антиоксидантов и нитрозилирующих агентов.

Заключение

В условиях гипоксической гипоксии GSNO подавлял экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080. При этом гиперэкспрессия супероксиддисмутазы-2 (СОД-2) повышала, а гиперэкспрессия каталазы – снижала экспрессию протеина ММП-1 в клетках линии HT1080.

Финансирование и благодарности

Исследование финансировалось грантом № 15121728 Программы Фулбрайта Бюро по вопросам образования и культуры Госдепартамента США.

Автор выражает благодарность проф. J. A. Melendez и сотрудникам Cell and Molecular Laboratory of College of Nanoscale Science and Engineering (State University of New York at Albany) за помощь в проведении исследования.

HT1080-MMP1SOD2CAT

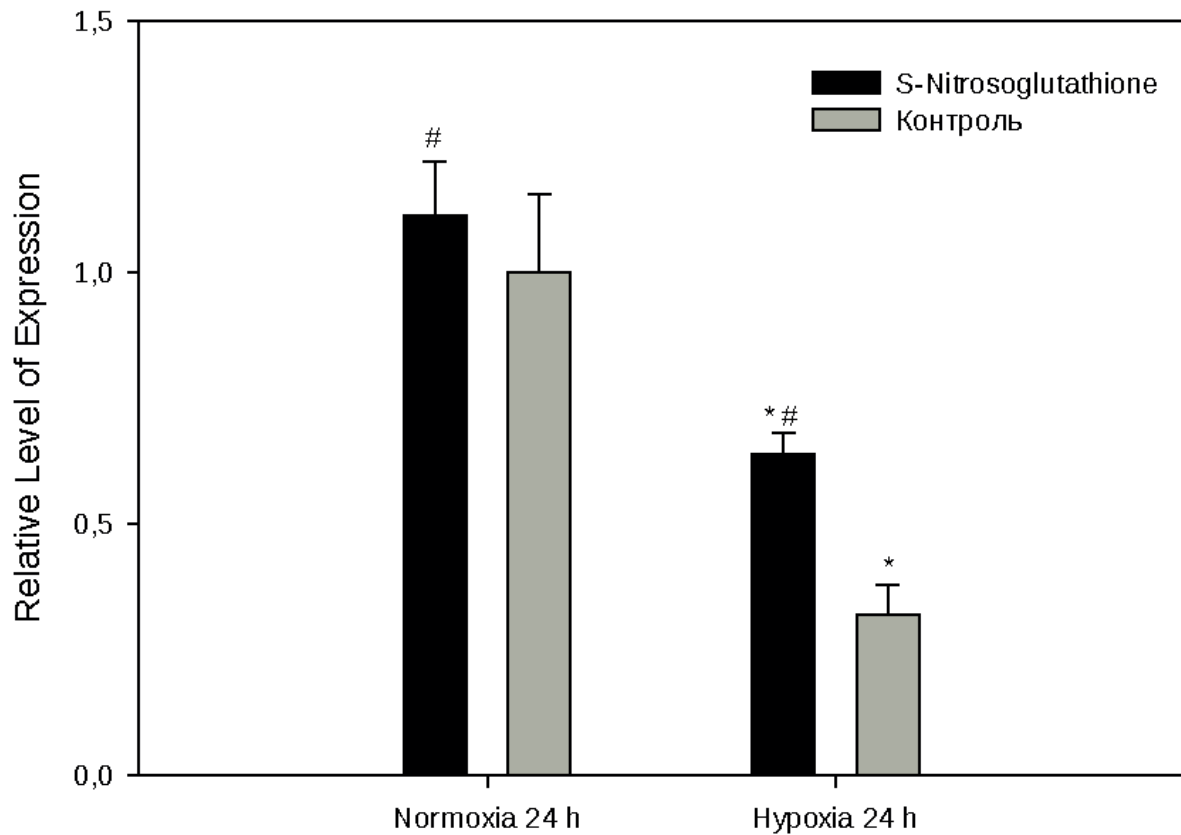


Рисунок 3 – Влияние гипоксической гипоксии и 500 мкМ-раствора S-нитрозоглутатиона на экспрессию белка ММП-1 в культуре клеток HT1080-MMP1SOD2CAT.

*P<0,001 – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при нормоксии и гипоксии.

#P<0,001 – достоверность различий уровня экспрессии протеина ММП-1 при действии S-нитрозоглутатиона в сравнении с контролем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы:

1. Sukhikh GT, Kan NE, Tyutyunnik VL. et al. The role of extracellular inducer of matrix metalloproteinases in premature rupture of membranes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2016; 29(4): 656-659.
2. Frost JA, Geppert TD, Cobb MH. et al. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 3844-3848.
3. Onisto M, Garbisa S, Caenazzo C. et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction phenotyping of metalloproteinases and inhibitors involved in tumor matrix invasion. *Diagn. Mol. Pathol.* 1993;2:74-80.
4. Turner RJ, Sharp FR. Implications of MMP9 for blood brain barrier disruption and hemorrhagic transformation following ischemic stroke. *Front. Cell Neurosci.* 2016;10:56.

5. Candido S, Abrams SL, Steelman LS. et al. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor micro-environment and sensitivity to targeted therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1863(3):438-448. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.08.010
6. Barreto SC, Hopkins CA, Bhowmick M. et al. Extracellular matrix in obesity – cancer interactions. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2015;22(2):63-77.
7. Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K. et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutat. Res.* 2013; 753(1):7-23.
8. Korenovskii YV, El'chaninova SA. Effects of S-nitrosoglutathione on the Expression of MMP-1 mRNA in HT1080 cells during hypoxic hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;160(3):319-321.
9. Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V. et al. H2O2 and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory

ry elements within the ICAM-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 1995;270:18966-18974.

10. Shi M, Yang H, Motley ED. et al. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Hypertens.* 2004;17(5 Pt 1):450-456.

11. Кореновский Ю.В., Ельчанинова С.А. Влияние гипоксии на экспрессию матриксной металлопротеиназы-1 в клетках линии HT1080. *Известия АлтГУ.* 2013;79(3/2):31-33.

12. Hemachandra LP, Shin DH, Dier U. et al. Mitochondrial superoxide dismutase has a pro-tumorigenic role in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Res.* 2015;75(22):4973-4984.

13. Won JS, Annamalai B, Choi S. et al. S-nitrosoglutathione reduces tau hyper-phosphorylation and provides neuroprotection in rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 2015;1624:359-369.

Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Кореновский Юрий Владимирович, заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: timidin@gmail.com

Информация об авторах

Удуд Владимир Васильевич, заместитель директора по научной и лечебной работе Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск.

634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

Тел.: (3822) 418375.

E-mail: pharm@tnimc.ru