

*Ю. В. Кореновский, С. А. Ельчанинова***Влияние гипоксии на экспрессию матричной металлопротеиназы-1 в клетках линии HT1080****Yu. V. Korenovsky, S. A. El'chaninova***Effect of Hypoxia on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Cell Line HT1080**

Исследовано влияние гипоксии на экспрессию мРНК и протеина матричной металлопротеиназы-1 (ММП-1) в клетках фибросаркомы человека HT1080. Гипоксия вызывала повышение экспрессии мРНК и протеина ММП-1. Гиперэкспрессия супероксиддисмутазы-2 (СОД-2) повышала синтез мРНК и протеина ММП-1. Одновременная гиперэкспрессия СОД-2 и каталазы подавляла синтез мРНК и белка ММП-1.

Ключевые слова: гипоксия, культура клеток, ММП-1, супероксиддисмутаза, каталаза.

Effect of hypoxia on the mRNA and protein of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in HT1080 human fibrosarcoma cells has been investigated. Hypoxia caused an increase of mRNA and protein expression of MMP-1. Hyperexpression of superoxide dismutase-2 (SOD-2) increased mRNA and protein of MMP-1 synthesis. Simultaneous overexpression of SOD-2 and catalase suppressed mRNA and protein of MMP-1 synthesis.

Key words: hypoxia, cell culture, MMP-1, superoxide dismutase, catalase.

DOI 10.14258/izvasu(2013)3.2-04

Введение

Матричные металлопротеиназы (ММП), осуществляющие расщепление белковых компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани, вовлечены в патогенез множества патологических процессов, таких как воспаление, рост и метастазирование злокачественных опухолей, ишемическое (гипоксическое) и реперфузионное повреждение тканей [1, с. 5]. Механизмы активации матричных металлопротеиназ, их сопряженность с активными формами кислорода, усиленно генерируемыми при этих процессах, мало изучены. Целью исследования было получение свидетельств влияния гипоксии и антиоксидантных ферментов на экспрессию матричной металлопротеиназы-1 (ММП-1) и в модельной системе в культуре клеток фибросаркомы человека HT1080.

Материалы и методы

В клетки линии HT1080 фибросаркомы с помощью вектора были введены дополнительные копии генов ММП-1, СОД-2 и каталазы и получены три модифицированные линии клеток HT1080: HT15 содержали повышенное количество копий генов ММП-1; CMV содержали повышенное количество копий генов ММП-1 и СОД-2; HT15CAT содержали повышенное количество копий генов ММП-1, СОД-2 и каталазы.

Каждый эксперимент проводили в трех сериях. 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). После четырех и восьми часов экспозиции клеток в гипоксической газовой смеси оценивали экспрессию мРНК ММП-1 с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием набора реагентов фирмы Integrated DNA Technology (США) и амплификатора StepOnePlus System (Applied Biosystems, США).

Контроль экспрессии генов и правильности проведения полимеразной цепной реакции осуществляли по уровню экспрессии гена β-актина человека с использованием набора реагентов фирмы Integrated DNA Technology (США) [2, с. 1033]. 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) [3, с. 176].

* Исследование проведено при содействии гранта государственного фонда США имени сенатора Дж. У. Фулбрайта (грант №15121728). Автор выражает благодарность профессору Х. А. Мелендезу и сотрудникам лаборатории клеточной и молекулярной биологии лаборатории Колледжа нанонаук и инженерии Государственного университета штата Нью-Йорк в г. Олбани за помощь в освоении технологии работы с культурой клеток.

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

Результаты и их обсуждение

Результаты влияния гипоксической газовой смеси на экспрессию мРНК и протеина ММП-1 представлены на рисунках 1 и 2. Гипоксическое воздействие в течение 4, 8 и 24 ч вызывало повышение экспрессии как мРНК, так и протеина ММП-1 в клетках линии HT1080.

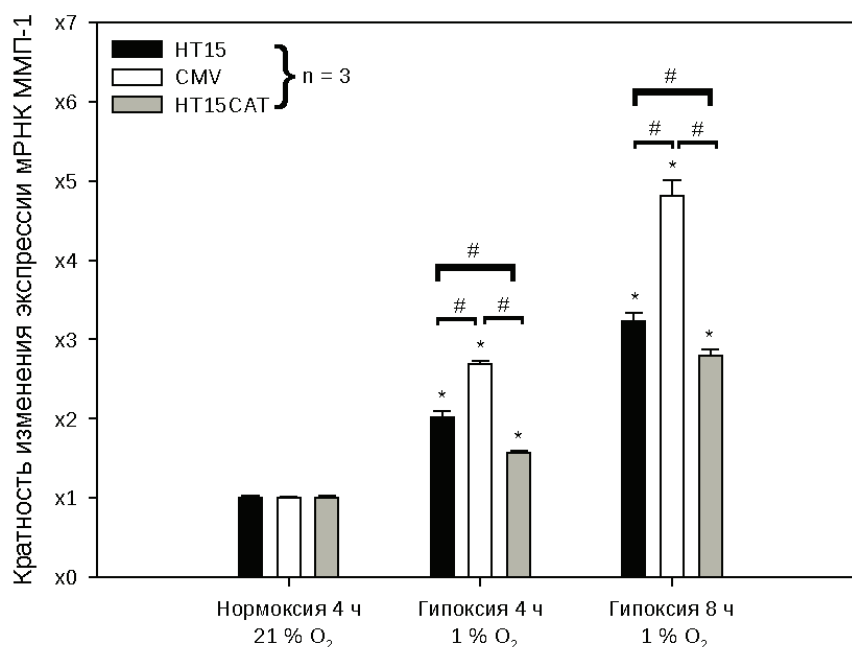


Рис. 1. Влияние гипоксии на экспрессию мРНК ММП-1. * $p < 0,001$ при сравнении с нормоксическим контролем. # $p < 0,001$ при сравнении между указанными квадратными скобками столбцами. Контроль экспрессии осуществляли по мРНК β -актина (не показан)

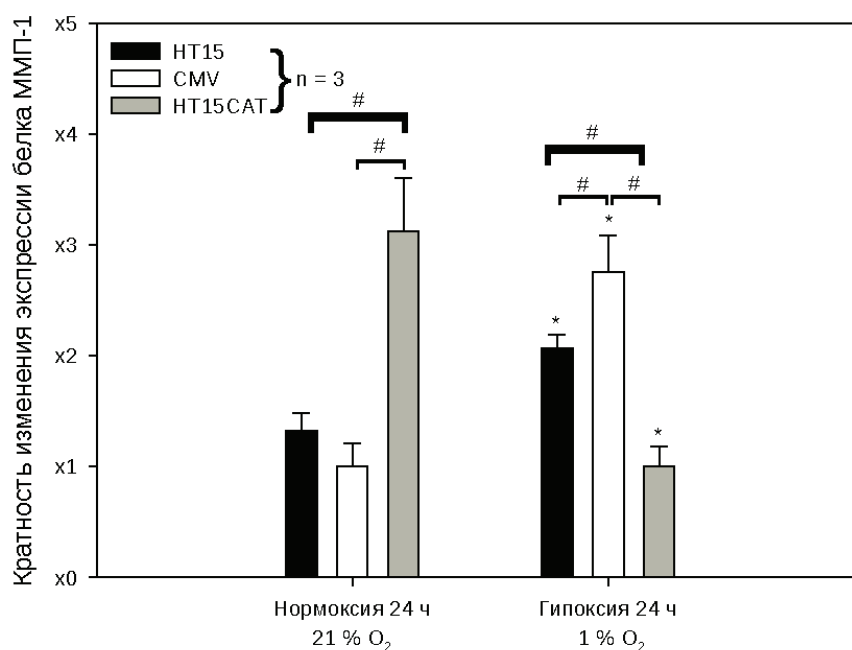


Рис. 2. Влияние гипоксии на экспрессию белка ММП-1. * $p < 0,001$ при сравнении с нормоксическим контролем. # $p < 0,001$ при сравнении между указанными квадратными скобками столбцами

Гиперэкспрессия СОД-2 в клетках (модифицированная линия клеток HT15) усиливала эффект гипоксии на экспрессию как мРНК, так и протеина ММП-1. Поскольку СОД катализирует реакцию дисмутации супероксидного радикала в перекись водорода, можно полагать, что усиление продукции ММП-1 могло быть связано с гиперпродукцией этой сигнальной молекулы и последующей активацией c-Jun N-терминальной киназы, фосфорилирующей транскрипционно активные домены [4, с. 1362].

Эта гипотеза согласуется с ослаблением влияния гипоксии на экспрессию мРНК и протеина ММП-

1 при одновременной гиперэкспрессии в клетках СОД-2 и каталазы (модифицированная линия клеток HT15CAT). Как известно, каталаза разрушает перекись водорода, поэтому ее гиперэкспрессия в клетках могла быть причиной снижения эффектов СОД-2, направленных на повышение экспрессии мРНК и протеина ММП-1 [5, с. 1465].

Таким образом, в клетках фибросаркомы человека HT1080 гипоксия повышала экспрессию мРНК и протеина матричной металлопротеиназы-1. Этот эффект гипоксии может реализоваться через активацию транскрипции перекисью водорода.

Библиографический список

1. Соболева Г.М., Сухих Г.Т. Семейство матричных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль // Акушерство и гинекология. — 2007. — № 1.
2. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia*. — 2001. — Vol. 15, № 7.
3. Rajwa B., McNally H. A., Varadharajan P., Sturgis J., Robinson J.P. AFM/CLSM data visualization and comparison using an open-source toolkit // *Microsc. Res. Tech.* — 2004. — Vol. 64, № 2.
4. Liochev S.I., Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on hydrogen peroxide formation. *Free Radical Biol. Med.* — 2007. — Vol. 42.
5. Clark I.M., Swingler T.E., Sampieri C.L., Edwards D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2008. — Vol. 40, № 6–7.