

Роль TGF- β 1/SMAD-сигнального каскада в регуляции экспрессии циклооксигеназы-2 в клетках молочной железы человека

М.А. Таипов, З.Н. Никифорова, О.М. Павлова, И.А. Кудрявцев, Н.Е. Арноцкая, В.Е. Шевченко
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Марат Азатович Таипов taipoff.m@yandex.ru

Проведен анализ экспрессии генов *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, *COX-2* и уровней белков *SMAD4*, *SMAD7*, фосфорилированной формы *SMAD2* в линиях клеток рака молочной железы (PMЖ) человека MCF-7, BT-474, ZR-75-1. В результате обнаружено, что белки *SMAD2*, *SMAD4* подавляют экспрессию фермента *COX-2* в ER(+)-клетках PMЖ и связаны с их метастатическим потенциалом. Белки *SMAD4* и *SMAD2*, очевидно, супрессируют синтез мРНК белка *COX-2*, а *SMAD7* является их антагонистом и стимулирует образование *COX-2*. Белки *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* можно рассматривать в качестве новых потенциальных мишеней для таргетной терапии PMЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, *COX-2*, сигнальный путь TGF- β 1/SMAD, гены и белки *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, фосфорилированная форма белка *SMAD2*, ингибиторы *COX-2*, *PGE2*, линии опухолевых клеток молочной железы человека MCF-7, BT-474, ZR-75-1, мишени для таргетной терапии

Role of TGF- β 1/SMAD signaling cascade in the regulation of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cells

M.A. Taipov, Z.N. Nikiforova, O.M. Pavlova, I.A. Kudryavtsev, N.Ye. Arnotskaya, V.Ye. Shevchenko
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The expression of the *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7*, and *COX-2* genes and the levels of *Smad4*, phosphorylated *Smad2*, and *Smad7* proteins were analyzed in the human breast cancer (BC) cell lines MCF-7, BT-474, and ZR-75-1. The *SMAD2* and *SMAD4* genes were found to suppress *COX-2* gene expression in the estrogen receptor-positive BC cells and to be linked to their metastatic potential. *Smad4* and *Smad2* apparently suppress *COX-2* mRNA and protein synthesis and *Smad7* is their antagonist and stimulates *COX-2* formation. *Smad2*, *Smad4*, *Smad7* proteins may be regarded as new potential targets for targeted BC therapy.

Key words: breast cancer, cyclooxygenase-2 (*COX-2*), TGF- β 1/SMAD signaling pathway, *SMAD2*, *SMAD4*, and *SMAD7* genes, *Smad4*, *Smad2*, and *Smad7* proteins, phosphorylated *Smad2*, inhibitors of *COX-2*, *PGE2*, human breast cancer cell lines MCF-7, BT-474, and ZR-75-1, targets for targeted therapy

Введение

Рак молочной железы (PMЖ) — наиболее распространенная форма рака у женщин в мире [1, 2]. В настоящее время достигнут значительный прогресс в идентификации генетических нарушений, которые ведут к развитию PMЖ, а также в выяснении роли белков этих генов в патофизиологии опухолевой клетки. Трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1) является одним из важнейших факторов в патогенезе различных онкологических заболеваний человека, в том числе и PMЖ, клетки которого способны продуцировать TGF- β 1. Нарушение TGF- β 1/SMAD-сигнального пути связано с неопластической трансформацией, метастазированием и прогрессированием PMЖ [3]. В ряде исследований обнаружено, что TGF- β 1/SMAD2/4-сигнальный каскад играет важную роль в супрессии роста опухоли путем активации апоптоза в клетках PMЖ, имеющих рецепторы к эстрогену [4]. Эстроген является митогенным фактором для эстроген-позитивных (ER(+)) линий клеток PMЖ человека.

Протеин SMAD4 — это TGF- β 1-сигнальный трансдуктор, он участвует в передаче сигнала от TGF- β 1-рецепторов и одновременно выступает в качестве транскрипционного репрессора эстрогена. Белок SMAD4 активирует апоптоз в ER(+)-клетках линии MCF-7, но не влияет на рост эстроген-независимых ER(-)-клеток культуры MDA-MB-231 [4]. Протеин SMAD4 ингибирует рост ER(+)-опухолей путем индукции апоптоза. Тем не менее, недостаточно известна роль TGF- β 1/SMAD-сигнального пути в регуляции экспрессии гена *COX-2* в клетках PMЖ. В представленной работе определены уровни белков SMAD4, SMAD7, фосфорилированной формы белка SMAD2 и экспрессия генов *SMAD2*, *SMAD4*, *SMAD7* и *COX-2* в опухолевых клетках молочной железы (MЖ) человека ER(+)-линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1 с различным метастатическим потенциалом. На основании анализа полученных данных мы предположили, что белки SMAD2 и SMAD4 являются негативными регуляторами метастатического потенциала ER(+)-опухо-

левых клеток и подавляют экспрессию гена *COX-2*, а *SMAD7* стимулирует процессы опухолевого роста, инвазии, метастазирования РМЖ и является индуктором экспрессии гена *COX-2*.

Материалы и методы

Методика работы с культурой клеток

Изучали ER(+)-линии клеток аденокарциномы (MCF-7, ZR-75-1) и инфильтрирующей (инвазивной) протоковой карциномы (BT-474) МЖ человека из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Культуры опухолевых клеток различались между собой по метастатической активности: линия MCF-7 – клетки с низким потенциалом к метастазированию (НПМ), линии ZR-75-1 и BT-474 – с высоким потенциалом к метастазированию (ВПМ).

Условия культивирования. Все клеточные культуры культивировали при 37 °С и 5 % CO₂. Клетки линии MCF-7 культивировали в среде DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и гентамицином (50 мкг/мл); ZR-75-1 – в RPMI-1640 с 10 % ЭТС, пенициллином (100 ед/мл), стрептомицином (100 мкг/мл); BT-474 – в RPMI-1640 с 10 % ЭТС, пенициллином (100 ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл) и бычьим инсулином (10 мкг/мл).

В работе использовали рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли α (TNF- α) (R&D systems). Влияние TNF- α на продукцию эндогенного TGF- β 1 опухолевыми клетками линии MCF-7 оценивали через 72 ч после начала культивирования (48 ч с 10 % ЭТС + 24 ч без ЭТС), когда клетки контроля в среде с 10 % ЭТС достигали 80 % монослоя на 3-и сутки роста. Во всех случаях TNF- α добавляли в среду через 72 ч после начала культивирования, рабочая концентрация препарата TNF- α составила 10 нг/мл среды.

Получение лизатов клеток. Для анализа уровней протеинов методом ELISA клетки лизировали в 0,5 мл однократного фосфатного буфера с добавлением 5 мкл коктейля ингибиторов протеаз. Образцы лизатов хранили при температуре –80 °С. Концентрации белка в пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) с помощью программы NanoDrop ND-1000 по методу Бредфорда.

Измерение концентрации уровня белков SMAD4, фосфорилированной формы SMAD2, SMAD7, TGF- β 1 методом иммуноферментного анализа (ELISA). В исследовании использовали коммерческие киты ELISA kit SMAD4, ELISA kit SMAD7 (Life Science Ins.), ELISA kit human TGF- β 1 (RnD Systems), SMAD2, SMAD2/Phospho. Концентрацию белков SMAD4, SMAD2/Phospho, SMAD7 анализировали на приборе ELISA Model 680XR Microplate reader (Bio-Rad).

Выделение РНК из клеток. РНК выделяли с помощью коммерческого кита Perfect Pure RNA Cell and

Tissue kit на 50 выделений (5PRIME). Для выделения РНК брали 1×10^6 клеток. Выделенные образцы хранили при температуре –80 °С.

Определение концентрации РНК. Измерения концентрации ДНК и РНК в пробах были проведены на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) с помощью программы NanoDrop ND-1000. Для высокоочищенной РНК соотношение A_{260}/A_{280} составляло 1,8–2,1.

Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Обратную транскрипцию проводили по стандартному протоколу (Promega) с использованием фермента Reverse Transcriptase (Promega). Экспрессию генов изучали с помощью метода RT-PCR с использованием системы iQ5 (Bio-Rad) и «Набора для анализа экспрессии генов методом RT-PCR COX-2, SMAD2, SMAD4, SMAD7» («ДНК-Синтез»).

В реакции амплификации использовали модифицированный олигонуклеотид, который на 5'-конце содержал флуоресцирующую группу (FAM), а на 3'-конце – тушитель флуоресценции BQH1. Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартному протоколу к набору («ДНК-Синтез»). В качестве внутреннего стандарта использовали ген *GAPDH*. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения iQ5 Optical System Software (Bio-Rad). В серии опытов получена хорошая воспроизводимость результатов, ошибка измерения составила ~ 2 %.

Результаты

Уровень экспрессии белка TGF- β 1 в лизатах клеток линии ZR-75-1 составлял 0,747 нг/мл, что в 1,7 раза выше, чем в лизатах культуры MCF-7, в которых концентрация TGF- β 1 была 0,434 нг/мл (рис. 1).

При стимуляции в течение 24 ч TNF- α (10 нг/мл) клеток линии MCF-7 наблюдали увеличение концен-

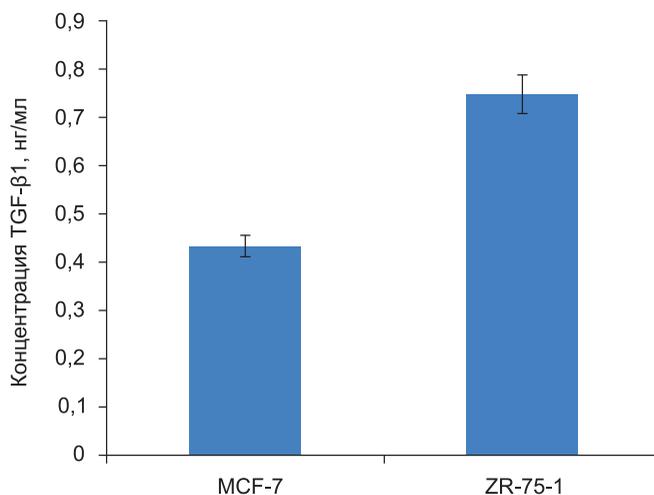


Рис. 1. Концентрация TGF- β 1 в лизатах клеток линий MCF-7 и ZR-75-1

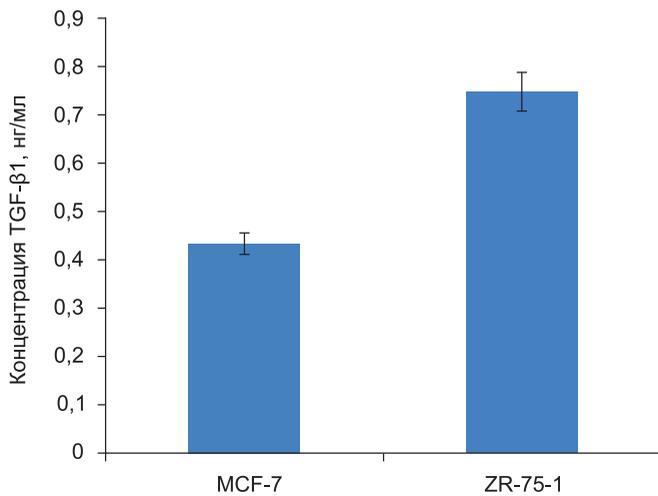


Рис. 2. Уровень белка TGF-β1 в лизатах клеток линии MCF-7, культивированных с TNF-α (10 нг/мл), относительно контроля

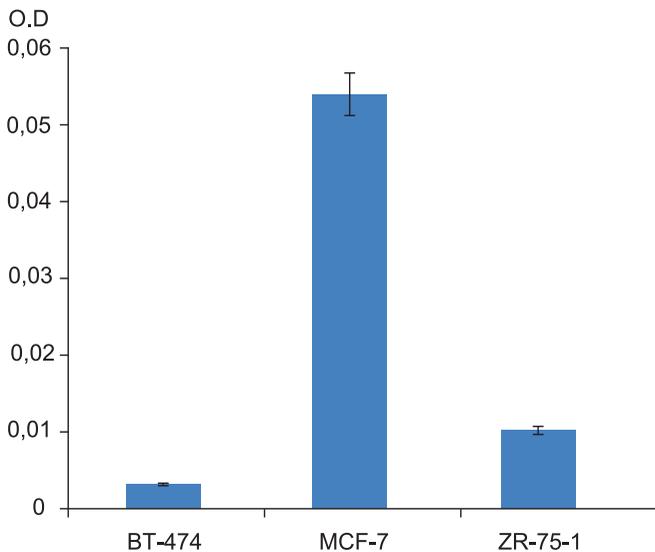


Рис. 3. Оптическая плотность относительно фосфорилированной формы SMAD2 в лизатах клеток линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1

трации TGF-β1 в 1,7 раза в сравнении с контролем, а его уровень достигал 0,729 нг/мл (рис. 2).

Как видно из рис. 3–5, уровни экспрессии белков фосфорилированной формы SMAD2, SMAD4, SMAD7 различались в лизатах линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1. При сравнительной оценке уровень экспрессии фосфорилированной формы белка SMAD2 был в 1,98 и 1,74 раза выше (см. рис. 3) в лизатах клеток MCF-7 по сравнению с BT-474 и ZR-75-1 соответственно.

В лизате клеток линии MCF-7 концентрация протеина SMAD4 составляла 0,459 нг/мл, ZR-75-1 – 0,517 нг/мл, BT-474 – 0,852 нг/мл. Таким образом, концентрация белка SMAD4 в лизатах клеток культур MCF-7 и ZR-75-1 была ниже, чем в BT-474, в 1,85 и 1,7 раза соответственно (см. рис. 4).

Концентрация белка SMAD7 в лизате клеток линии MCF-7 составляла 0,247 нг/мл, ZR-75-1 – 0,285 нг/мл,

BT-474 – 0,733 нг/мл. Следовательно, такая же зависимость, как и для белка SMAD4, наблюдалась и для концентраций протеина SMAD7: в лизатах клеток BT-474 уровень этого белка был выше в 3 и 2,6 раза по сравнению с MCF-7 и ZR-75-1 соответственно (см. рис. 5).

Анализ экспрессии генов SMAD2, SMAD4, SMAD7, COX-2 проводили относительно гена GAPDH, уровень экспрессии которого был принят за 1. Экспрессия генов COX-2 и SMAD7 в клетках линий MCF-7 и ZR-75-1 не обнаружилась данным методом, в отличие от линии BT-474 (рис. 6). На рис. 7 и 8 представлены относительные уровни экспрессии генов SMAD2 и SMAD4. Анализ полученных результатов показал, что в клетках линии BT-474 уровень экспрессии гена SMAD4 был в 12,5 и 3,125 раза выше, чем в клетках линий MCF-7 и ZR-75-1 соответственно. Уровень экспрессии гена SMAD2 в клетках линии MCF-7 был в 5 раз выше, чем в клетках линий BT-474 и ZR-75-1. Сравнительный анализ экспрессии генов SMAD2 и SMAD4 выявил, что экспрессия SMAD2 в клетках линии MCF-7 была в 9,4 раза выше, чем SMAD4 (см. рис. 7), тогда как для BT-474 (см. рис. 6) и ZR-75-1 (см. рис. 8) наблюдалась другая зависимость – уровень экспрессии SMAD4 был в 6,25 и 2 раза соответственно выше, чем SMAD2, что коррелировало с данными, полученными в опытах ELISA.

Обсуждение

Недавние исследования показали, что TGF-β1/SMAD-сигнальный каскад регулирует экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2) в различных типах клеток [5, 6]. С ферментом COX-2 связывают воспаление и неопластическую трансформацию высокодифференцированных клеток МЖ. Повышенная экспрессия COX-2 наблюдается в опухолевой ткани и способствует развитию, росту и метастазированию РМЖ. Ингибиторы COX-2 высокоэффективны при использовании

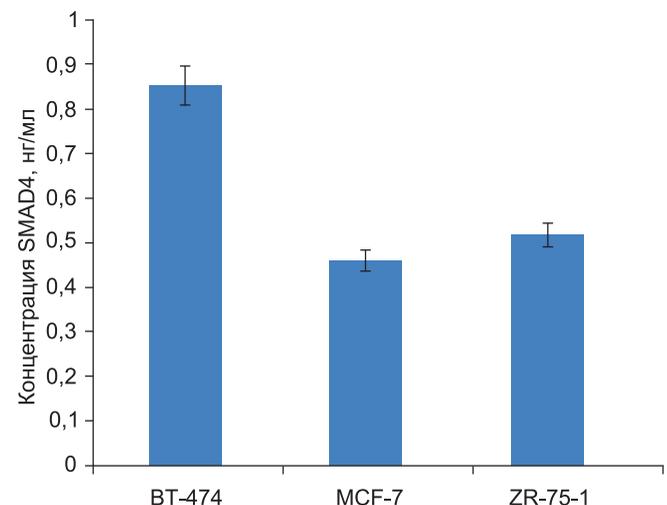


Рис. 4. Концентрация SMAD4 в лизатах клеток линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1

в комбинированной химиотерапии многих опухолей, в частности РМЖ. Существуют различные пути передачи TGF- β 1-сигнала в клетке, один из которых подавляет экспрессию гена *COX-2*, а другой стимулирует. Мы предположили, что подавление экспрессии *COX-2* осуществляется через TGF- β 1/SMAD2/4-сигнальный каскад, а активация *COX-2* — через TGF- β 1/SMAD7. Эти 2 сигнальных пути связаны и взаимно регулируются. Показано, что TGF- β 1 может быть как супрессором опухолевого роста, так и прометастатическим фактором при смещении равновесия в системе TGF- β 1/SMAD-сигнальной регуляции в ту или иную сторону [7, 8]. TGF- β 1 и *COX-2* вовлечены в регуляцию пролиферации клеток и контролируют процессы опухолевого роста, инвазии и метастазирования [9–14].

TGF- β 1 является важным регулятором роста нормальных эпителиальных клеток МЖ человека. Тем не

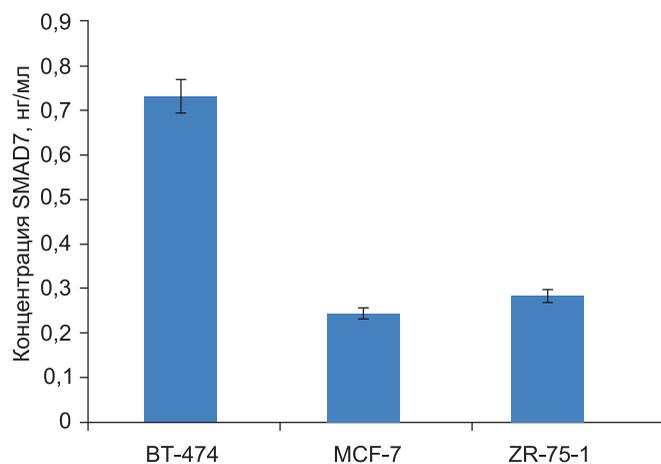


Рис. 5. Концентрация SMAD7 в лизатах клеток линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1

менее, данные о влиянии TGF- β 1 на развитие и прогрессирование РМЖ противоречивы. Рост многих опухолевых линий РМЖ подавляется TGF- β 1 [15, 16] в связи с торможением деления клеток и индукцией апоптоза. Гипотеза о влиянии TGF- β 1 на клетки РМЖ как опухолевого супрессора согласуется с экспериментальными данными, полученными при воздействии TGF- β 1 на дифференцированные опухолевые клетки МЖ человека [17, 18]. Обнаружена способность некоторых опухолевых клеток продуцировать собственный TGF- β 1, что и было показано нами в представленной работе. Уровень эндогенного TGF- β 1 в клетках линии ZR-75-1 был в 1,7 раза выше, чем в клетках линии MCF-7 (см. рис. 1).

По нашим данным, TNF- α увеличивает продукцию эндогенного TGF- β 1 опухолевыми клетками РМЖ линии MCF-7 (см. рис. 2): в стимулированных TNF- α клетках линии MCF-7 уровень эндогенного TGF- β 1 возрос в 1,7 раза в сравнении с контролем.

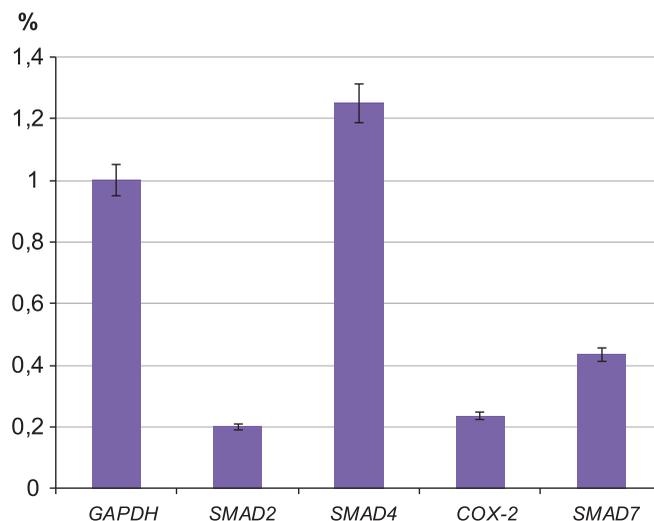


Рис. 6. Анализ уровня экспрессии генов SMAD2, SMAD4, COX-2, SMAD7 в клетках линии BT-474

Таким образом, TNF- α стимулирует образование клетками опухоли эндогенного TGF- β 1 и одновременно является индуктором *COX-2*. В работе показано, что уровень экспрессии TGF- β 1 коррелирует с потенциалом опухолевых клеток МЖ к метастазированию. Гиперэкспрессия эндогенного TGF- β 1 клетками линии ZR-75-1, обладающими повышенной метастатической активностью, подтверждает гипотезу о том, что опухолевые клетки на более поздних стадиях РМЖ могут трансформироваться и приобретать чувствительность к прометастатическому эффекту TGF- β 1 [19, 20].

Следует отметить, что уровни белков SMAD2 и SMAD4 коррелируют с экспрессией мРНК *SMAD2* и *SMAD4* в ER(+)-клетках РМЖ. По данным ряда авторов, гены *SMAD2* и *SMAD4* являются негативными регуляторами экспрессии некоторых онкогенов: *p38*, *MAPK*, *ERK*, *PI3K*, *JNK*, *Rho* и подавляют экспрессию гена *COX-2* [21, 22]. На основании полученных нами результатов можно предположить, что *SMAD4* связан с регуляцией метастатической активности опухолевых клеток, а *SMAD2* является супрессором опухолевого роста.

Белки SMAD являются основными преобразователями сигналов TGF- β 1. TGF- β 1 связывается с гомодимером рецептора TGF- β II типа (TGF- β RII), который активизирует гомодимеры рецептора TGF- β I типа (TGF- β RI). Активированный TGF- β RI фосфорилирует SMAD2 [23, 24], который активирует SMAD4. Эти активные гетерокомплексы находятся в клеточном ядре, где они связываются с ДНК и регулируют экспрессию TGF- β 1-зависимых генов [25]. TGF- β 1-сигнализация изменяется в различных типах опухолей, отсутствие экспрессии TGF- β RII достоверно коррелирует с лучшим прогнозом у ER(-)-больных РМЖ [26], однако очень мало известно о влиянии TGF- β 1-сигнального пути на прогноз при различных типах РМЖ. Делеция или мутация гена *SMAD4* (также известная как DPC4,

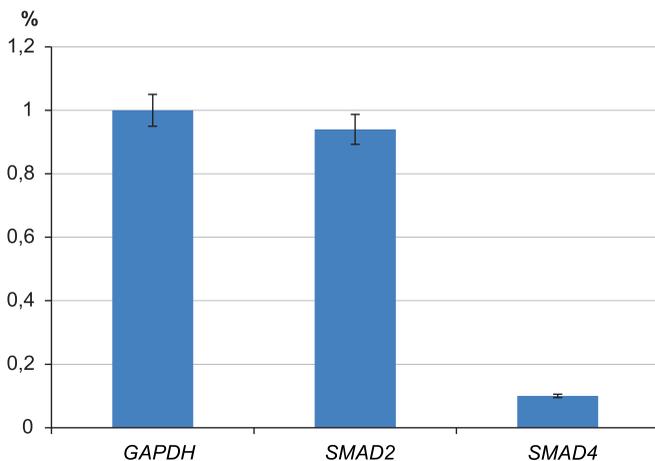


Рис. 7. Анализ уровня экспрессии генов *SMAD2* и *SMAD4* в клетках линии MCF-7

делеция при раке поджелудочной железы (РПЖ) обнаружена в различных типах эпителиальных опухолей, в том числе РПЖ [27, 28], раке пищевода [29], колоректальном раке [30], почечно-клеточном раке [31], а также РМЖ [32–34]. Тем не менее, мало данных о роли *SMAD4* в регуляции экспрессии *COX-2* или его прогностическом значении при РМЖ.

Ряд авторов указывают, что гены *SMAD2*, *SMAD4*, белки *SMAD4*, *SMAD2*, фосфорилированный *SMAD2* являются негативными регуляторами метастатической активности неопластических клеток [35, 36]. Гены *SMAD2* и *SMAD4* экспрессированы в ER(+)-опухолях МЖ человека, что служит благоприятным прогностическим фактором для больных [35]. Из литературных источников известно, что в ER(-)-клетках РМЖ гены *SMAD2* и *SMAD4* неактивны и это является негативным прогностическим фактором при метастазировании РМЖ [36].

Экспериментальные исследования [37] показали высокий уровень активности белка *SMAD4* в ER(+)-клетках и слабую его экспрессию в ER(-)-клетках. Низкий уровень экспрессии *SMAD4* коррелирует с высоким потенциалом опухолевых клеток к метастазированию и инвазивностью ER(-)-линий РМЖ человека. Также в ER(-)-линиях РМЖ обнаружена высокая активность *COX-2* по сравнению с ER(+)-линиями, в которых фермент *COX-2* неактивен [38]. Гены *COX-2* и *SMAD7* гиперэкспрессированы в ER(-)-линиях и неактивны в ER(+)-линиях РМЖ MCF-7, ZR-75-1, BT-474 [39]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами: в ER(+)-клетках линий MCF-7 и ZR-75-1 экспрессия генов *COX-2* и *SMAD7* практически не определялась. Для высокоинвазивной линии BT-474 наблюдалась обратная зависимость — в клетках данной линии уровень экспрессии *SMAD2* был в 5 раз ниже, чем в клетках линии MCF-7, и в отличие от линий MCF-7 и ZR-75-1 определялась экспрессия генов *SMAD7* и *COX-2*.

По данным ряда авторов, гены *SMAD2* и *SMAD4* являются супрессорами гена *COX-2* [40]. В нашем исследо-

вании эти результаты подтвердились (см. рис. 6–8). В линии опухолевых клеток ZR-75-1 экспрессировалась мРНК генов *SMAD2* и *SMAD4* (см. рис. 8), тогда как мРНК *COX-2* и *SMAD7* не определялась. Таким образом, уровень экспрессии мРНК *SMAD2* и *SMAD4* обратно коррелирует с экспрессией мРНК *COX-2*, что доказывает наличие возможной взаимной регуляции генов. Очевидно, что один из механизмов антиметастатической активности генов *SMAD2* и *SMAD4* связан с подавлением ряда прометастатических генов, в том числе и *COX-2*; следствие этого — прекращение выработки PGE_2 , важнейшего регулятора опухолевой инвазии, прогрессии и метастазирования.

Известно, что белки *SMAD2* и *SMAD4*, индуцируемые TGF- β 1, в ряде случаев подавляют метастатическую активность клеток опухоли [41]. Уровень фосфорилированной формы *SMAD2* был максимальным в клетках линии MCF-7 с НПМ в сравнении с клетками линий BT-474 и ZR-75-1 с ВПМ. Белок *SMAD2* и его фосфорилированная форма подавляют выработку фермента *COX-2*. Анализ экспрессии генов *SMAD2* и *SMAD4* показал, что она ярко выражена в ER(+)-культурах MCF-7, ZR-75-1, BT-474, это объясняет отсутствие активности генов *SMAD7* и *COX-2*.

Полученные нами результаты и данные литературы позволяют заключить, что гиперэкспрессия гена *SMAD2* в ER(+)-клетках линии MCF-7 и слабая его активность в ER(-)-клетках (по данным литературы) обратно коррелируют с повышенной метастатической активностью и инвазивностью ER(-)-опухолей и экспрессией *SMAD7* и *COX-2*. Анализ белка *SMAD4* показал, что его экспрессия ярко выражена в ER(+)-клетках линий ZR-75-1 и BT-474 с ВПМ. Таким образом, белок *SMAD4*, возможно, связан с регуляцией опухолевой прогрессии и метастазирования, а нарушение работы и мутации гена *SMAD4* в ряде случаев могут быть связаны с возникновением и развитием РМЖ.

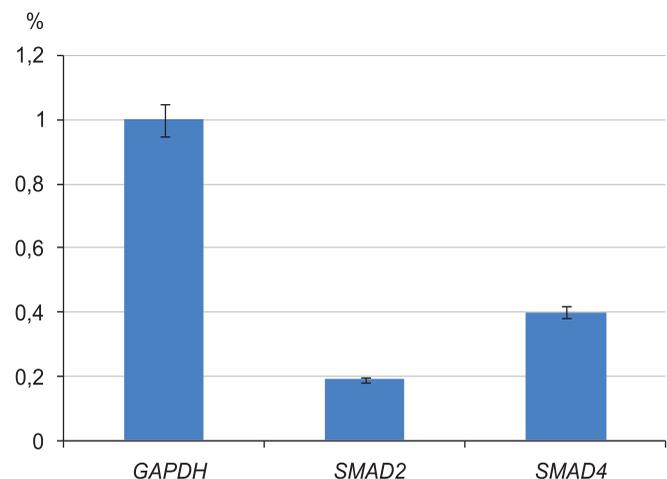


Рис. 8. Анализ уровня экспрессии генов *SMAD2* и *SMAD4* в клетках линии ZR-75-1

По данным литературы, белки SMAD2 и SMAD4 подавляют экспрессию фермента COX-2, что объясняет отсутствие экспрессии этого фермента в исследуемых линиях клеток.

Известно, что в некоторых случаях TGF- β 1/SMAD-сигнальный каскад способен трансформироваться из опухолевого супрессора в индуктор неопластической трансформации, инвазии, прогрессии и метастазирования РМЖ. Протеин SMAD7 связан с регуляцией TGF- β 1-сигнального пути и эпителиально-мезенхимальным переходом опухолевых клеток [42]. Белок SMAD7 – регулятор прогрессии, инвазии и метастазирования РМЖ [43], ассоциированный с негативным прогнозом у больных РМЖ и рассматриваемый рядом авторов в качестве потенциального маркера [44]. Белок SMAD7, тормозящий SMAD-сигнальный путь, выступает в качестве ключевого регулятора формирования обратной связи в механизмах TGF- β 1-сигнального пути. Протеин SMAD7, индуцируемый TGF- β 1-сигналом, является антагонистом и супрессором белков SMAD2 и SMAD4. Белок SMAD7 блокирует апоптоз опухолевых клеток [45], тормозит деятельность протеинов SMAD2 и SMAD4, тем самым индуцируя рост опухоли, ангиогенез и метастазирование в кости РМЖ. Анализ содержания белка SMAD7 в клетках показал его повышенную экспрессию в линии BT-474, обладающей более высоким метастатическим потенциалом в сравнении с низкометастатической линией MCF-7, в которой уровень этого протеина был ниже в 3 раза. Также в клет-

ках линии BT-474, в отличие от MCF-7 и ZR-75-1, определялась экспрессия генов COX-2 и SMAD7. Это подтверждает гипотезу, что SMAD7 стимулирует экспрессию COX-2. Таким образом, белок SMAD7 стимулирует опухолевый рост и метастазирование, индуцирует COX-2, ассоциирован с негативным прогнозом у больных и рассматривается нами в качестве потенциального маркера РМЖ. Протеин SMAD7 в будущем может быть эффективной мишенью для новых целевых препаратов в терапии РМЖ [46].

Заключение

Нарушение регуляции TGF- β 1/SMAD-сигнального пути связано с неопластической трансформацией, метастазированием и прогрессией РМЖ. Обнаружена корреляция уровня эндогенного TGF- β 1 с потенциалом опухолевых клеток к метастазированию. Белки SMAD2 и SMAD4 являются негативными регуляторами экспрессии COX-2 в ER(+)-клетках РМЖ, SMAD7 стимулирует COX-2 и запускает процессы опухолевого роста, инвазии и метастазирования. Фосфорилированная форма белка SMAD2 является супрессором опухолевого роста. Нарушение регуляции генов SMAD2 и SMAD4 связано с развитием РМЖ, и в ряде случаев гиперэкспрессия SMAD4 приводит к индукции метастатической активности опухолевых клеток. Белки SMAD2, SMAD4 и SMAD7 можно рассматривать в качестве новых потенциальных мишеней для таргетной терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cancer Incidence in Five Continents. Vol. IX / M.P. Curado, B. Edwards, H.R. Shin et al. (Eds.). IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC, 2007.
2. Schedin P., Borges V. Breaking down barriers: the importance of the stromal microenvironment in acquiring invasiveness in young women's breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(2):102.
3. Kretzschmar M. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor- β /SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2(2):107–15.
4. Li Q., Wu L., Oelschlagel D.K. et al. Smad4 inhibits tumor growth by inducing apoptosis in estrogen receptor-alpha-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280(29):27022–8.
5. Matsumura T., Suzuki T., Aizawa K. et al. Regulation of transforming growth factor-beta-dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 2009;284(51):35861–71.
6. Okano H., Shinohara H., Miyamoto A. et al. Concomitant overexpression of cyclooxygenase-2 in HER-2-positive on-
7. Smad4-reduced human gastric carcinomas is associated with a poor patient outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6938–45.
8. Mo N., Li Z.Q., Li J., Cao Y.D. Curcumin inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(11):5709–14.
9. Hsu H.Y., Lin T.Y., Hwang P.A. et al. Fucoidan induces changes in the epithelial to mesenchymal transition and decreases metastasis by enhancing ubiquitin-dependent TGF β receptor degradation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2013 [in print].
10. Gomes L.R., Terra L.F., Wailemann R.A. et al. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:26.
11. Baselga J., Rothenberg M.L., Tabernero J. et al. TGF-beta signalling-related markers in cancer patients with bone metastasis. *Biomarkers* 2008;13(2):217–36.
12. Schrey M.P., Patel K.V. Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br J Cancer* 1995;72(6):1412–9.
13. Wang D., DuBois R.N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(2):415–6.
14. Guo J., Meng H., Pei J., Zhu M. Association between the TNF- α -238G>A and TGF- β 1 L10P polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Care (Basel)* 2011;6(2):126–9.
15. Reinholz M.M., An M.W., Johnsen S.A. et al. Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86(1):75–88.
16. Basolo F., Fiore L., Ciardiello F. et al. Response of normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells to transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1): lack of growth-inhibitory effect on cells expressing the simian virus 40 large-T antigen. *Int J Cancer* 1994;56(5):736–42.

16. Zugmaier G., Ennis B.W., Deschauer B. et al. Transforming growth factors type beta 1 and beta 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1989;141(2):353–61.
17. Dai J.L., Bansal R.K., Kern S.E. G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(4):1427–32.
18. Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 1994;19(12):548–53.
19. Gorsch S.M., Memoli V.A., Stukel T.A. et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992;52(24):6949–52.
20. Siegel P.M., Shu W., Cardiff R.D. et al. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(14):8430–5.
21. Stuelten C.H., Buck M.B., Dippon J. et al. Smad4-expression is decreased in breast cancer tissues: a retrospective study. *BMC Cancer* 2006;6:25.
22. Petersen M., Pardali E., van der Horst G. et al. Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* 2010;29(9):1351–61.
23. Kawabata M., Inoue H., Hanyu A. et al. Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *Embo J* 1998;17(14):4056–65.
24. Kloos D.U., Choi C., Wingender E. The TGF-beta-Smad network: introducing bioinformatic tools. *Trends Genet* 2002;18(2):96–103.
25. Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390(6659):465–71.
26. Buck M., Fritz P., Dippon J. et al. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):491–8.
27. Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T. et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271(5247):350–3.
28. Wilentz R.E., Su G.H., Dai J.L. et al. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol* 2000;156(1):37–43.
29. Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A., Argani P. et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000;60(7):2002–6.
30. Natsugoe S., Xiangming C., Matsumoto M. et al. Smad4 and transforming growth factor beta1 Expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2002;8(6):1838–42.
31. Salvoara R., Roth S., Loukola A. et al. Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut* 2002;51(1):56–9.
32. Cardillo M.R., Lazzereschi D., Gandini O. et al. Transforming growth factor-beta pathway in human renal cell carcinoma and surrounding normal-appearing renal parenchyma. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23(2):109–17.
33. Schutte M. DPC4/SMAD4 gene alterations in human cancer, and their functional implications. *Ann Oncol* 1999;10(4):56–9.
34. Schutte M., Hruban R.H., Hedrick L. et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996;56(11):2527–30.
35. Scollen S., Luccarini C., Baynes C. et al. TGF-beta signaling pathway and breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(6):1112–9.
36. Xiong Z., Ding L., Sun J. et al. Synergistic repression of estrogen receptor transcriptional activity by FHL2 and Smad4 in breast cancer cells. *IUBMB Life* 2010;62(9):669–76.
37. Erkinheimo T.L., Lassus H., Finne P. et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression is associated with altered expression of p53 and SMAD4, amplification of HER-2/neu, and poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):538–45.
38. Zhao X., Goswami M., Pokhriyal N. et al. Cyclooxygenase-2 expression during immortalization and breast cancer progression. *Cancer Res* 2008;68(2):467–75.
39. Serra K.P., Sarian L.O., Rodrigues-Peres R.M. et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and p53 in neighboring invasive and in situ components of breast tumors. *Acta Histochem* 2012;114(3):226–31.
40. Singh M., Chaudhry P., Parent S., Asselin E. Ubiquitin-proteasomal degradation of COX-2 in TGF-beta stimulated human endometrial cells is mediated through endoplasmic reticulum mannosidase I. *Endocrinology* 2012;153(1):426–37.
41. Banz-Jansen C., Münchow B., Diedrich K., Finas D. Bridge-1 is expressed in human breast carcinomas: silencing of Bridge-1 decreases Smad2, Smad3 and Smad4 expression in MCF-7 cells, a human breast cancer cell line. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284(6):1543–9.
42. Luo X., Ding Q., Wang M. et al. *In vivo* disruption of TGF-beta signaling by Smad7 in airway epithelium alleviates allergic asthma but aggravates lung carcinogenesis in mouse. *PLoS One* 2010;5(4):e10149.
43. Shen J.L., Yan C.H., Liu Y. et al. Studies of TGF-beta/Smads expression in lung cancer. *Yi Chuan Xue Bao* 2003;30(7):681–6.
44. Reinholz M.M., Nibbe A., Jonart L.M. et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3722–32.
45. Kim S., Han J., Lee S.K. et al. Smad7 acts as a negative regulator of the epidermal growth factor (EGF) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2012;314(2):147–54.
46. Jeon W.K., Hong H.Y., Seo W.C. et al. Smad7 sensitizes A549 lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis through heme oxygenase-1 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;420(2):288–92.