

### Роль COX-2 в регуляции метастатического потенциала опухолевых клеток молочной железы человека

**М.А. Таипов, З.Н. Никифорова, 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](mailto:taipoff.m@yandex.ru)

*Проведен анализ экспрессии COX-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR, эндоглина (CD105), IL-6 в опухолевых клетках молочной железы человека с разным метастатическим потенциалом. Исследовалась роль данных факторов в регуляции метастатического потенциала клеток рака молочной железы, а также роль COX-2 в регуляции процессов метастазирования на клеточном уровне; оценивалась потенциальная способность опухолевых клеток молочной железы человека вырабатывать факторы, стимулирующие рост опухоли, ангиогенез и метастазирование.*

**Ключевые слова:** рак молочной железы, COX-2, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR, эндоглин (CD105), IL-6, ангиогенез, метастазирование, линии опухолевых клеток молочной железы человека MCF-7, BT-474, ZR-75-1, мишени для таргетной терапии

#### Role of COX-2 in the regulation of the metastatic potential of human breast tumor cells

**M.A. Taipov, Z.N. Nikiforova, 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 COX-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR, endoglin (CD105), and IL-6 was analyzed in the human breast tumor cells having a varying metastatic potential. The role of these factors in the regulation of the metastatic potential of breast cancer cells, as well as that of COX-2 in the regulation of metastatic processes at the cellular level were examined. The potential capacity of human breast tumor cells to elaborate factors that stimulate tumor growth, angiogenesis, and metastasis was evaluated.*

**Key words:** breast cancer, COX-2, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR, endoglin (CD105), IL-6, angiogenesis, metastasis, MCF-7, BT-474, and ZR-75-1 human breast tumor cell lines, therapeutic targets

#### Введение

Рак молочной железы (PMЖ) — наиболее распространенная форма рака у женщин в мире [1, 2]. В Российской Федерации и странах СНГ отмечается рост заболеваемости и смертности от PMЖ. Приблизительно у 50 % больных PMЖ даже после современного комплексного лечения на том или ином этапе заболевания возникают отдаленные метастазы. Пик вероятности рецидива заболевания (обычно появление отдаленных метастазов) приходится на 2–3-й годы после операции, но риск метастазирования сохраняется и у больных, благополучно переживших этот период, затем после 5 лет (5–10 лет), также возможно прогрессирование процесса и после 20–30 лет. Терапия метастатического PMЖ (mPMЖ) все еще остается паллиативной с очень низкой вероятностью достижения полной ремиссии и излечения больных. Чаще всего метастазы появляются в костях, мягких тканях, легких (20 %) и плевре (5 %). Метастазы в головном мозге в последние годы стали встречаться чаще, особенно у больных с HER-2-положительным PMЖ. Течение и возможности лечения mPMЖ в первую очередь определяются биологическими особенностями опухоли. Достаточно четко различаются по своим биологическим характеристикам больные с гормоночувствитель-

ными опухолями, положительными по рецепторам эстрогенов (РЭ) или рецепторам прогестерона (РП), пациенты, опухоли которых характеризуются экспрессией белка HER-2 (рецептор 2-го типа эпидермального фактора роста EGFR), и больные с так называемыми трижды негативными опухолями, отрицательными по содержанию РЭ, РП и HER-2. Важнейшими предсказательными факторами при выборе терапии mPMЖ являются содержание РЭ и РП в опухоли, а также наличие или отсутствие белка HER-2. В последние годы в клиническую практику активно внедряются препараты, направленные на подавление активности EGFR, VEGF и их рецепторов. Наиболее известные анти-HER-2-препараты — трастузумаб и лапатиниб — уже применяются в клинической практике [3, 4]. В настоящее время проводятся клинические исследования нового мощного ингибитора рецепторов VEGF (VEGFR) — пазопаниба — при ErbB-2(HER-2)-позитивном PMЖ. Пазопаниб в более ранних исследованиях показал перспективное соотношение эффективности и безопасности, в том числе и в комбинации с лапатинибом [5, 6]. Невысокие цифры содержания РЭ, РП и HER-2 указывают на сомнительную чувствительность опухоли к химиотерапии (ХТ) ингибиторами HER-2, а отсутствие РЭ и РП является призна-

ком нечувствительности опухоли к гормонотерапии, эффективность которой у таких больных не превышает 10 %, причем даже она сомнительна. В ряде работ обнаружена высокая экспрессия COX-2 в РЭ-негативных опухолях и показана корреляция повышенной экспрессии COX-2 с метастазированием и гиперэкспрессией EGFR и VEGF при мРМЖ. Поэтому актуальной задачей является исследование связи COX-2 с сигнальными путями EGF и VEGF в опухолевых клетках в целях поиска новых подходов и мишеней для направленной терапии мРМЖ.

В данной работе исследовалась способность клеток РМЖ вырабатывать прометастатические факторы EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, эндоглин (CD105), IL-6, COX-2. Объектом исследования были экспериментальные модельные системы – культуры опухолевых клеток молочной железы (МЖ) человека с различным потенциалом к метастазированию (ПМ). Показано, что экспрессия EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, CD105 положительно коррелировала с экспрессией COX-2 и потенциалом опухолевых клеток к метастазированию.

## Материалы и методы

**Работа с культурами клеток РМЖ.** В исследовании использовались лизаты и кондиционированные среды, полученные от эстроген-позитивных линий опухолевых клеток аденокарциномы (MCF-7, ZR-75-1) и инфилтстрирующей (инвазивной) протоковой карциномы (BT-474) МЖ человека из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Изучались культуры опухолевых клеток с различным ПМ: линия MCF-7 – с низким ПМ (НПМ), линии ZR-75-1 и BT-474 – с высоким ПМ (ВПМ).

**Условия культивирования.** Все клеточные культуры культивировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. 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) и стрептомицином (100 мкг/мл); BT-474 – в RPMI-1640 с 10 % ЭТС, пенициллином (100 Ед/мл), стрептомицином (100 мкг/мл) и бычьим инсулином (10 мкг/мл).

**Измерение концентрации белков VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, эндоглина (CD105), IL-6 в лизатах клеток методом иммуноферментного анализа (ELISA).** Измерения концентрации белка в пробах были проведены на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) с помощью программы NanoDrop ND-1000 по методу Бредфорда. Во всех опытах выполняли нормализацию по содержанию общего белка – 50 мкг в каждой пробе, все анализы проводили в триплете. Уровни VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, CD105, IL-6 в лизатах и кондиционированных средах исследовали с помощью стандартного протокола для коммерческих наборов

(R&D Systems). Измерение концентрации во всех пробах проводили на приборе Microplate Reader Model 680XR (Bio-Rad) при длине волны 450 нм.

**Измерение концентрации белка EGFR в лизатах клеток РМЖ.** Общую концентрацию белков семейства EGFR в лизатах опухолевых клеток определяли с использованием набора EGFR Total Bead Kit (Novagen®, Merck) на приборе Bio-Plex Luminex (Bio-Rad). Полученные данные анализировали в программе Microsoft Office Excel. Анализ концентрации белка EGFR в лизатах проводили с использованием EGFR Total WideScreen Reagent Kit (Novagen®) и EGFR Total Bead Kit (Novagen®, Merck), следуя инструкции и рекомендациям производителя.

**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<sup>6</sup> 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<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 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 определяли методом 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. 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

Выявлено, что экспрессия мРНК COX-2 в опухолевых клетках с ВПМ линий ZR-75-1 и BT-474 соответственно в 14 и 15 раз выше, чем в клетках с НПМ линии MCF-7 (рис. 1).

Концентрация белка EGFR в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-474 (6963 пкг/мл) и ZR-75-1 (5695 пкг/мл) была выше, чем в лизатах клеток линии MCF-7 (3762 пкг/мл) (рис. 2).

Концентрация белка VEGF также была более высокой в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-

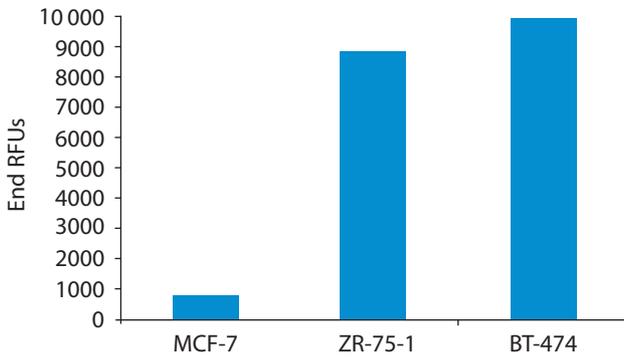


Рис. 1. Экспрессия мРНК COX-2 в клетках РМЖ с разным ПМ

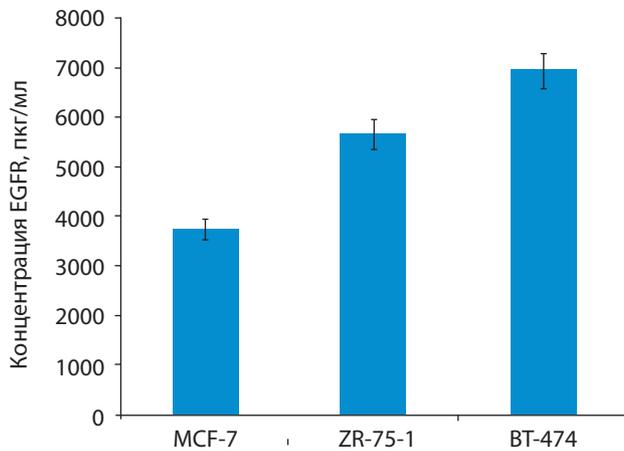


Рис. 2. Концентрация белка EGFR в лизатах клеток РМЖ с разным ПМ

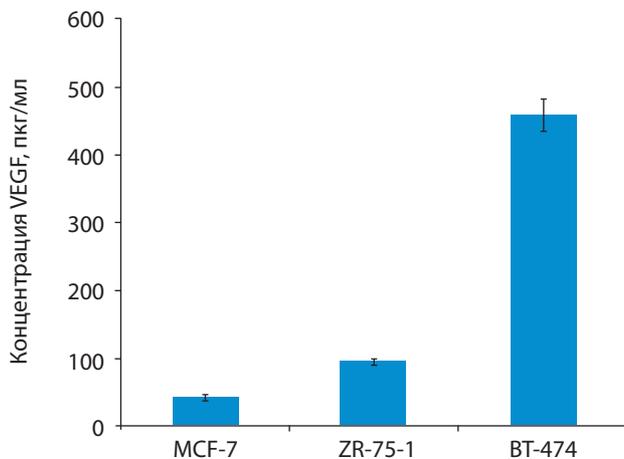


Рис. 3. Концентрация белка VEGF в лизатах клеток РМЖ с разным ПМ

474 (459 пкг/мл) и ZR-75-1 (94 пкг/мл) по сравнению с MCF-7 (43 пкг/мл) (рис. 3).

Наибольшая концентрация белка VEGFR-2 обнаружена в лизатах и кондиционированных средах, полученных из клеток с ВПМ линии ZR-75-1, в сравнении с клетками линии MCF-7, обладающими НПМ (рис. 4). В лизатах клеток линии ZR-75-1 уровень VEGFR-2 составлял 46 пкг/мл, линии MCF-7 – 17 пкг/мл (см. рис. 4).

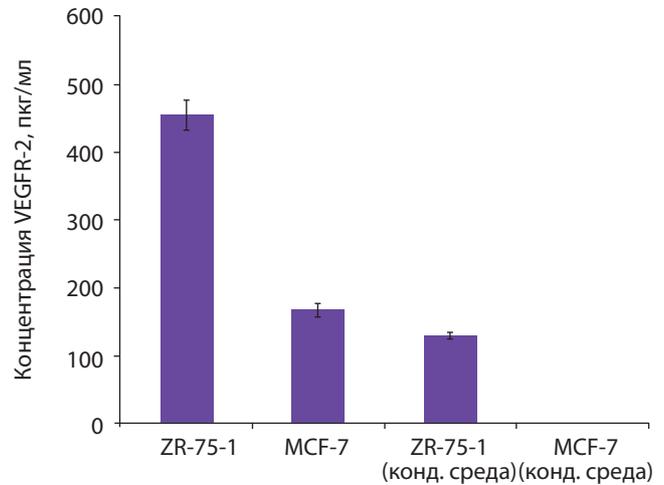


Рис. 4. Концентрация белка VEGFR-2 в лизатах и кондиционированных средах клеток РМЖ с разным ПМ

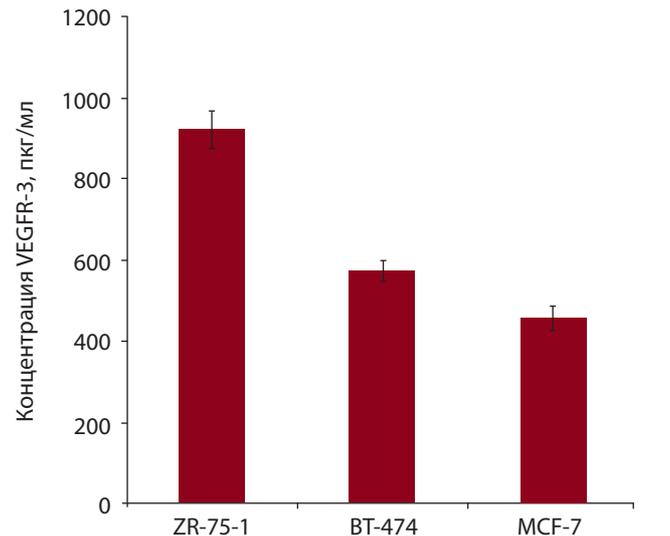


Рис. 5. Концентрация белка VEGFR-3 в лизатах клеток РМЖ с разным ПМ

Концентрация белка VEGFR-3 в лизатах клеток с ВПМ линий ZR-75-1 (919 пкг/мл) и BT-474 (573 пкг/мл) превышала таковую в лизатах клеток с НПМ линии MCF-7 (462 пкг/мл) (рис. 5). В кондиционированной среде, полученной из клеток линии ZR-75-1, концентрация белка VEGFR-3 составляла 1583 пкг/мл, а из клеток линии MCF-7 – 1379 пкг/мл.

Наибольшая концентрация белка CD105 обнаружена в лизатах клеток линии BT-474 (364 пкг/мл) (табл. 1). В кондиционированной среде, полученной из клеток линии ZR-75-1, концентрация CD105 составила 123 пкг/мл, а в кондиционированной среде из клеток линии MCF-7 уровень CD105 не определялся (см. табл. 1).

Выявлено, что концентрация IL-6 в лизатах опухолевых клеток высокометастатических линий BT-474 и ZR-75-1 была более высокой в сравнении с низкометастатической линией MCF-7 (рис. 6). В работе показано, что цитокин TNF-α индуцирует экспрессию

Таблица 1. Экспрессия эндоглина (CD105)

Линия опухолевых клеток	Эндоглин (CD105), пкг/мл
BT-474	364
ZR-75-1	198
MCF-7	173
MCF-7 (кондиционированная среда)	6
ZR75-1 (кондиционированная среда)	123

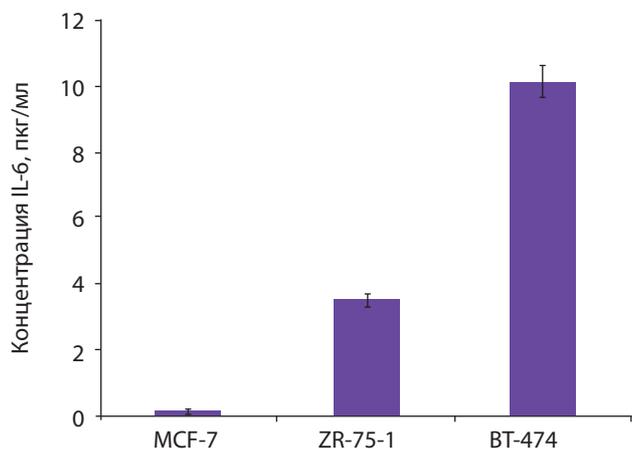


Рис. 6. Уровень IL-6 в лизатах клеток РМЖ с разным метастатическим потенциалом

IL-6 опухолевыми клетками линии MCF-7. Обнаружено, что после воздействия TNF- $\alpha$  экспрессия IL-6 клетками линии MCF-7 в кондиционированной среде увеличилась по сравнению с контролем – с 10,34 до 19,412 пкг/мл.

### Обсуждение

В данной работе применялись экспериментальные модельные системы – линии клеток РМЖ человека, обладающие разным ПМ. На этих линиях изучалась роль гена *COX-2* в регуляции ПМ клеток РМЖ. В работе проанализирована потенциальная возможность опухолевых клеток МЖ вырабатывать различные биологически активные соединения, связанные с метастазированием и ангиогенезом, такие как EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, CD105, IL-6. Показано, что *COX-2*, EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, IL-6 гиперэкспрессированы в клетках РМЖ с ВПМ линий ZR-75-1 и BT-474 по сравнению с клетками линии MCF-7, обладающими НПМ.

Уровни мРНК *COX-2* в опухолевых клетках с ВПМ линий ZR-75-1 и BT-474 в 14 и 15 раз выше, чем в клетках с НПМ линии MCF-7. Уровни экспрессии белков EGFR, VEGF, IL-6 коррелировали с экспрессией гена *COX-2* в клетках РМЖ с разным ПМ. На основании

наших собственных исследований и анализа литературных данных мы пришли к выводу, что гиперэкспрессия гена *COX-2* увеличивает ПМ опухолевых клеток МЖ человека посредством активации ряда прометастатических факторов, таких как EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, IL-6 и др. Проанализировано содержание общей группы белков семейства EGFR в лизатах клеток РМЖ и показано, что более высокая их концентрация наблюдалась в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-474 (6963 пкг/мл) и ZR-75-1 (5695 пкг/мл) в сравнении с клетками с НПМ линии MCF-7 (3762 пкг/мл) (см. рис. 2). Интересно отметить, что в линиях РМЖ с ВПМ уровень экспрессии EGFR был в 1,85 и 1,5 раза выше, чем в линиях с НПМ. В работе показана корреляция экспрессии EGFR с ПМ клеток РМЖ и экспрессией мРНК *COX-2*. Белки семейства EGFR являются онкогенами и часто экспрессируются при РМЖ, а их избыточная экспрессия связана с плохим прогнозом и резистентностью опухолевых клеток к ХТ [7–10].

Семейство EGFR состоит из EGFR/ErB1/HER-1, ErbB2/Neu/HER-2, ErB3/HER-3 и ErB4/HER-4 [11]. Экспрессию этих белков в небольших количествах находят на цитоплазматической мембране клеток эпителиального происхождения. Основными лигандами для EGFR являются EGF и TGF- $\alpha$ . Фосфорилирование рецептора при его связывании с лигандами и активации приводит к запуску различных сигнальных путей, включающих PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases), Src, MAPK (Mitogen-activated protein kinase), STAT, AKT, которые запускают процессы пролиферации, регулируют ПМ опухолевых клеток. При трансформации клеток происходит усиление синтеза этих белков и увеличение количества рецепторов на поверхности клеток (гиперэкспрессия). Кроме того, часто находят изменения в гене *EGFR* (мутации, делеции и перестановки), которые приводят к повышению активности рецептора, что может запускать развитие и прогрессирование опухоли [11, 12]. Экспериментальные исследования выявили, что ген *EGFR* играет важную роль в активации пролиферации опухолевых клеток, стимуляции ангиогенеза, ингибировании апоптоза, метастазирования и резистентности к ХТ и лучевой терапии [13]. Частота гиперэкспрессии HER-2 увеличивается с прогрессированием стадии болезни. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение регуляции сигнального пути EGFR часто ассоциировано с развитием и прогрессированием опухоли. Ингибирование сигнальных путей EGFR может играть значительную роль для выбора тактики эффективной терапии РМЖ [14]. По данным литературы известно, что EGFR управляет несколькими сигнальными путями, в том числе PI3K/AKT и MAPK [3]. Показано, что в доксорубин-резистентной линии MCF-7 (MCF-7/DOX) *COX-2*-экспрессия регулируется посредством PI3K/AKT-

и Ras/Raf/MAPK-сигнальных путей через EGFR-сигнализацию [15]. Эксперименты показали, что в клетках линий MCF-7/DOX и MDA-MB-231 экспрессия *COX-2* снижалась после воздействия ингибиторов EGFR [16]. Ингибитор EGFR – гефитиниб – значительно подавляет EGF-индуцированную экспрессию *COX-2* и существенно снижает ПМ опухолевых клеток МЖ. Эти данные свидетельствуют о том, что *COX-2*-экспрессия регулируется EGFR-сигнальным каскадом [17]. Обнаружено, что  $PGE_2$  активирует EGFR через различные сигнальные пути [18]. Недавние исследования показали, что экспрессия *COX-2* в нескольких линиях раковых клеток регулируется сигнальным путем IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)/PI3K [19]. В дополнение к пути PI3K/АКТ Ras/Raf/MAPK-путь также является преобразователем IGF-1R-сигнализации. Сигнальный путь IGF-1R играет важную роль в клеточной пролиферации, индукции апоптоза, инвазии неопластических клеток в кровеносные сосуды и ангиогенезе в опухоли. Кроме того, IGF-1R индуцирует экспрессию *COX-2* и биосинтез  $PGE_2$  в опухолевых клетках [18].

Показано, что рецепторы  $PGE_2$  – EP1 и EP3 – играют важную роль в *COX-2*-индуцированном процессе метастазирования РМЖ [20] и в процессе регуляции *COX-2* ПМ клеток РМЖ. Селективные препараты, блокирующие рецепторы  $PGE_2$ , снижают ПМ опухолевых клеток МЖ, подавляют экспрессию матриксных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 [19, 20]. В работе на основании данных собственных исследований и результатов анализа литературы показано, что ген *COX-2* регулирует ПМ опухолевых клеток МЖ. Фермент *COX-2* индуцируется EGFR-активированными PI3K/АКТ- или MAPK-сигнальными путями. Ингибиторы *COX-2* и EGFR эффективно снижают ПМ клеток РМЖ. Таким образом, *COX-2*, EGFR, рецепторы EP1 и EP3 являются потенциальными мишенями для таргетной терапии РМЖ.

Сигнальные пути *COX-2* и EGFR взаимно регулируют ПМ опухолевых клеток МЖ [21, 22]. Анализируя уровни экспрессии EGFR и *COX-2* в опухолевых клетках, можно прогнозировать чувствительность данного типа опухоли к различным таргетным анти-EGFR-препаратам [23]. Совместное применение ингибиторов EGFR и *COX-2* является перспективной схемой для ХТ при РМЖ.

Известно, что VEGF является мощным фактором ангиогенеза и стимулирует быстрый рост сосудов опухоли. Исследования продемонстрировали наличие взаимосвязи между экспрессией VEGF и плотностью сосудов. Как предполагается, развитие кровеносных сосудов является многообещающим прогностическим маркером для множества опухолей. Белок VEGF – мощный митоген клеток эндотелия сосудов, при этом он, очевидно, не обладает заметной митогенной ак-

тивностью в отношении других типов клеток; VEGF вызывает миграцию клеток эндотелия, стимулирует их инвазивные и метастатические свойства. Протеин VEGF экспрессируется клетками многих солидных опухолей, в том числе и РМЖ [24]. Повышенная экспрессия этого ростового фактора найдена в карциномах легкого, щитовидной железы, МЖ, желудка, толстого кишечника, почки, мочевого пузыря, предстательной железы [25]. Гиперэкспрессия белка VEGF выявлена в метастазах опухолей МЖ человека [24]. В нашем исследовании наибольшая концентрация VEGF наблюдалась в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-474 (459 пкг/мл) и ZR-75-1 (94 пкг/мл) в сравнении с клетками линии MCF-7, обладающими НПМ (43 пкг/мл) (см. рис. 3). Высокий уровень экспрессии VEGF характерен для инвазивных клеток РМЖ линий BT-474 и ZR-75-1. Реализация биологического эффекта VEGF-A осуществляется через его взаимодействие со своими высокоаффинными рецепторами. В настоящее время известно 2 таких рецептора: VEGFR-1 и VEGFR-2 [25]. Они образуют отдельную группу в суперсемействе рецепторных тирозинкиназ. К этой же группе относится еще один рецептор – VEGFR-3, взаимодействующий с VEGF-C и VEGF-D, но не с VEGF-A [26]. Рецепторы VEGF-A экспрессируются почти исключительно в клетках эндотелия, преимущественно в сосудах, прилегающих к опухоли и проникающих в нее. При этом VEGFR-3 [27] во взрослом организме преимущественно экспрессируется в эндотелии лимфатических сосудов, что дало основание предполагать, что лимфангиогенез, возможно, индуцируется через взаимодействие именно этого рецептора с его лигандами. Рецептор VEGFR-3 регулирует образование новых лимфатических сосудов в опухоли [28]. Долгое время главным медиатором образования новых лимфатических сосудов считался рецептор VEGFR-3, а не VEGFR-2, который опосредует стимуляцию ангиогенеза. Однако теперь установлено, что VEGFR-2 и VEGFR-3 регулируют ангиогенез и лимфангиогенез [29]. В результате связывания специфических лигандов с VEGFR-3 в клетке активируется киназа этого рецептора, что приводит к стимуляции пролиферации и миграции эндотелиальных клеток лимфатических сосудов (ЭКЛС), опосредованной MAP-киназой p42/p44 [30]. При опухолевом лимфангиогенезе отмечается выбрасывание филоподий ЭКЛС в направлении опухолевых клеток, которые продуцируют VEGF-C, таким образом, осуществляется миграция ЭКЛС. Кроме того, в результате активации рецептора VEGFR-3 происходит фосфорилирование и активация киназ Akt и JNK1/2, которые блокируют апоптоз и поддерживают жизнеспособность ЭКЛС [31]. Выживанию клеток, опосредованному VEGFR-3, может также содействовать киназа MKK4. Следует отметить, что

на поверхности ЭКЛС выявляются гетеродимерные комплексы VEGFR-2/VEGFR-3, что в значительной степени затрудняет идентификацию внутриклеточных регуляторных сигналов, инициируемых собственно VEGFR-3. В нашей работе показано, что наибольшая экспрессия белков VEGF и VEGFR-3 наблюдалась в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-474 и ZR-75-1 по сравнению с НПМ-линией MCF-7. Концентрация белка VEGFR-2 в лизатах клеток линии ZR-75-1 составляла 46 пкг/мл; MCF-7 – 17 пкг/мл, что в 2,7 раза ниже (см. рис. 4). Высокая концентрация белка VEGFR-3 обнаружена в лизатах клеток линий ZR-75-1 (919 пкг/мл) и BT-474 (573 пкг/мл); MCF-7 – 462 пкг/мл (см. рис. 5).

Таким образом, белки VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3 можно рассматривать в качестве потенциальных мишеней для направленной терапии РМЖ и маркеров опухолевой ПМ.

В ряде исследований выяснилось, что CD105 – более специфичный и чувствительный маркер развития кровеносных сосудов, чем другие обычно используемые маркеры. Эндоглин (CD105) – гомодимерный гликопротеин массой 180 кДа [32]. Белок CD105 связывается с  $\beta$ 1- и  $\beta$ 3-изоформами TGF- $\beta$ , этот комплекс (CD105–TGF- $\beta$ ) активирует рецепторы I (TGF- $\beta$ R-I) и II (TGF- $\beta$ R-II) типов [33]. Рецептор TGF- $\beta$ R-II является серин/треонинкиназой, которая связывает лиганды и фосфорилирует TGF- $\beta$ R-I, который сам по себе неспособен к этому процессу. TGF- $\beta$ R-I серин/треонинкиназа фосфорилирует Smad2 и инициирует сигнальный каскад TGF- $\beta$  [34]. Эндоглин обладает общей структурной гомологией, в особенности в трансмембранном и цитоплазматическом домене с бетагликаном – еще одним рецептором, который связывает все 3 изоформы TGF- $\beta$ . Эндоглин является важным компонентом рецептора для TGF- $\beta$ 2, так как без него эта изоформа плохо связывается рецептором TGF- $\beta$ R-II [35]. Белок CD105 является маркером ангиогенной активности опухоли. Эндоглин может использоваться в качестве прогностического маркера для диагностики рака предстательной железы, различных форм рака легких, желудка, РМЖ [36]. Белок CD105 является потенциальной мишенью для терапии РМЖ, направленной против роста кровеносных сосудов в опухоли [37, 38]. В нашем исследовании уровни экспрессии белка CD105 в лизатах клеток линии BT-474 составляли 364 пкг/мл, ZR-75-1 – 198 пкг/мл,

а MCF-7 – 173 пкг/мл. В кондиционированной среде, полученной от линии ZR-75-1, концентрация CD105 составила 123 пкг/мл; в кондиционированной среде, полученной от линии MCF-7, уровень CD105 не определялся. Таким образом, белок CD105 является потенциальным маркером опухолевой прогрессии и метастазирования РМЖ и может использоваться в качестве мишени для направленной терапии РМЖ.

В работе анализировалась экспрессия IL-6 в лизатах опухолевых клеток линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1. Наибольшая концентрация IL-6 наблюдалась в лизатах опухолевых клеток с ВПМ линий BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с НПМ-линией MCF-7 (см. рис. 6). По данным литературы известно, что IL-6 регулирует процессы инвазии и метастазирования клеток РМЖ [39, 40], а также играет важную роль в подавлении апоптоза в опухолевых клетках [41]. Цитокин IL-6 продуцируется стромальными клетками, Т-клетками, фибробластами и моноцитами, а также различными типами опухолевых клеток. Некоторые исследования показывают участие IL-6 в регуляции роста опухолевых клеток *in vitro*, но его точная роль в развитии мРМЖ до сих пор не выяснена [42]. Исследование T. Bachelot et al. выявило корреляцию гиперэкспрессии VEGF и IL-6 в эстроген-негативных опухолях с повышенным риском метастазирования РМЖ [43, 44]. В нашем исследовании обнаружено, что гиперэкспрессия IL-6 коррелирует с более высоким риском метастазирования РМЖ. В работе показано, что цитокин TNF- $\alpha$  индуцирует экспрессию IL-6 опухолевыми клетками линии MCF-7: в кондиционированной среде экспрессия IL-6 клетками линии MCF-7 после воздействия TNF- $\alpha$  увеличилась в 2 раза по сравнению с контролем. Обнаружена корреляция повышенной экспрессии IL-6 с гиперэкспрессией гена COX-2 в опухолевых клетках с ВПМ линий BT-474 и ZR-75-1.

### Заключение

В работе показано, что гиперэкспрессия гена COX-2 индуцирует экспрессию ряда прометастатических и ангиогенных факторов, таких как EGFR, VEGF, VEGFR-2, VEGFR-3, эндоглин (CD105), IL-6, в опухолевых клетках ВПМ-линий РМЖ человека. На основании полученных данных могут быть разработаны новые подходы и лекарственные препараты для направленной терапии РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Curado M.P., Edwards B., Shin H.R. et al. Cancer Incidence in Five Continents. Vol. IX. 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. Wang S., Chen C., Meng Y. et al. Effective suppression of breast tumor growth by an anti-EGFR/ErbB2 bispecific antibody. *Cancer Lett* 2012;325(2):214–9.
4. Song Y., Dai F., Zhai D. et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis* 2012;15(3):421–32.
5. Zhao Y.C., Ni X.J., Wang M.H. et al. Tumor-derived VEGF-C, but not VEGF-D, pro-

- motes sentinel lymph node lymphangiogenesis prior to metastasis in breast cancer patients. *Med Oncol* 2012;29(4):2594–600.
6. Bayouh L., Afrit M., Daldoul O. et al. Trastuzumab (herceptin) for the medical treatment of breast cancer. *Tunis Med* 2012;90(1):6–12.
  7. Han S.W., Cha Y., Paquet A. et al. Correlation of HER2, p95HER2 and HER3 expression and treatment outcome of lapatinib plus capecitabine in her2-positive metastatic breast cancer. *PLoS One* 2012;7(7):e39943.
  8. Amiri-Kordestani L., Tan A.R., Swain S.M. Pazopanib for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21(2):217–25.
  9. Perez E.A., Spano J.P. Current and emerging targeted therapies for metastatic breast cancer. *Cancer* 2012;118(12):3014–25.
  10. Dai Y., Hogan S., Schmelz E.M. et al. Selective growth inhibition of human breast cancer cells by graviola fruit extract in vitro and in vivo involving downregulation of EGFR expression. *Nutr Cancer* 2011;63(5):795–801.
  11. Liu Z.B., Hou Y.F., Zhu J. et al. Inhibition of EGFR pathway signaling and the metastatic potential of breast cancer cells by PA-MSHA mediated by type I fimbriae via a mannose-dependent manner. *Oncogene* 2010;29(20):2996–3009.
  12. 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.
  13. Tunca B., Egeli U., Cecener G. et al. CK19, CK20, EGFR and HER2 status of circulating tumor cells in patients with breast cancer. *Tumori* 2012;98(2):243–51.
  14. Runkle K.B., Meyerkord C.L., Desai N.V. et al. Bif-1 suppresses breast cancer cell migration by promoting EGFR endocytic degradation. *Cancer Biol Ther* 2012;13(10):956–66.
  15. Jiang Q., Zhou C., Bi Z., Wan Y. EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2006;22(2):93–102.
  16. Ryan P.D., Goss P.E. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist* 2008;13(1):16–24.
  17. Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79(4):1193–226.
  18. Araki K., Hashimoto K., Ardyanto T.D. Co-expression of Cox-2 and EGFR in stage I human bronchial adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2004;45(2):161–9.
  19. Ceccarelli C., Piazzi G., Paterini P. Concurrent EGFR and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumour spreading. *Ann Oncol* 2005;16(4):74–9.
  20. Kang J.H., Song K.H., Jeong K.C. et al. Involvement of COX-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer* 2011;11:334.
  21. Wang Y.X., Gao J.X., Wang X.Y. et al. Antiproliferative effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor modulated by nimotuzumab in estrogen-dependent breast cancer cells. *Tumour Biol* 2012;33(4):957–66.
  22. Dannenberg A.J., Lippman S.M., Mann J.R. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* 2005;23(2):254–66.
  23. Kalous O., Conklin D., Desai A.J. et al. Dacomitinib (PF-00299804), a irreversible pan-HER inhibitor, inhibits proliferation of HER2-amplified breast cancer cell lines resistant to trastuzumab and lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2012;11(9):1978–87.
  24. Wagner A.D., Thomssen C., Haerting J., Unverzagt S. Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) targeting therapies for endocrine refractory or resistant metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD008941.
  25. Cybulski M., Jarosz B., Nowakowski A. et al. Cyclin I correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012;127(1):217–22.
  26. Raica M., Cimpean A.M., Ceausu R., Ribatti D. Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res* 2011;31(5):1757–64.
  27. Smith N.R., Baker D., James N.H. et al. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res* 2010;16(14):3548–61.
  28. Sarkar S., Mazumdar A., Dash R. et al. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3-K and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2010;9(8):592–603.
  29. Valtola R., Salven P., Heikkilä P. et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999;154(5):1381–90.
  30. Karroum A., Mirshahi P., Faussat A.M. et al. Tubular network formation by adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cells is closely linked to MMP-9 and VEGFR-2/VEGFR-3 over-expressions. *Eur J Pharmacol* 2012;685(1–3):1–7.
  31. Su J.L., Yen C.J., Chen P.S. et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007;96(4):541–5.
  32. Davidson B., Stavnes H.T., Førstund M. et al. CD105 (Endoglin) expression in breast carcinoma effusions is a marker of poor survival. *Breast* 2010;19(6):493–8.
  33. Smith A.L., Iwanaga R., Drasin D.J. et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- $\beta$  signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene* 2012;31(50):5162–71.
  34. 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.
  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. Oxmann D., Held-Feindt J., Stark A.M. et al. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene* 2008;27(25):3567–75.
  37. Lee S.H., Mizutani N., Mizutani M. et al. Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(12):1565–74.
  38. Fonsatti E., Jekunen A.P., Kairemo K.J. et al. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):2037–43.
  39. Shi Z., Yang W.M., Chen L.P. et al. Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135(3):737–47.
  40. Jehn C.F., Flath B., Strux A. et al. Influence of age, performance status, cancer activity, and IL-6 on anxiety and depression in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;136(3):789–94.
  41. Marrogi A.J., Munshi A., Merogi A.J. et al. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74(5):492–501.
  42. Knupfer H., Schmidt R., Stanitz D. et al. CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast* 2004;13(1):28–34.
  43. Ueno T., Toi M., Saji H. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3282–9.
  44. Bachelot T., Ray-Coquard I., Menetrier-Caux C. et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88(11):1721–6.