

Анализ белков, ассоциированных с экспрессией циклооксигеназы-2 и биосинтезом PGE₂ в клетках рака молочной железы с разным метастатическим потенциалом

В.Е. Шевченко, М.А. Таипов, С.В. Ковалев, Н.Е. Арноцкая,
О.М. Павлова, И.А. Кудрявцев, З.Н. Никифорова
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

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

Проведено картирование протеома лизатов линий опухолевых клеток молочной железы MCF-7, BT-474, ZR-75-1, в результате секвенировано 340 белков. Идентифицированы белки, ассоциированные с биосинтезом PGE₂ и регуляцией экспрессии циклооксигеназы-2, и определены их относительные уровни экспрессии. В данной группе особый интерес представляют потенциальные мишени для направленной терапии рака молочной железы: рецепторы простагландинов E₂, D₂, простагландин E-синтаза, 15-гидрокси-простагландиндегидрогеназа и лейкотриен-A₄-гидролаза.

Ключевые слова: рак молочной железы, циклооксигеназа-2, рецепторы простагландинов E₂, D₂, простагландин E-синтаза, 15-гидрокси-простагландиндегидрогеназа, лейкотриен-A₄-гидролаза, линии опухолевых клеток молочной железы человека MCF-7, BT-474, ZR-75-1, протеомика, масс-спектрометрия

Текст

Analysis of proteins associated with the expression of cyclooxygenase-2 and the biosynthesis of PGE₂ in breast cancer cells with different metastatic potential

V.E. Shevchenko, M.A. Taipov, S.V. Kovalev, N.E. Arnotskaya,
O.M. Pavlova, I.A. Kudryavtsev, Z.N. Nikiforova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The proteome of lysates of the breast tumor cell lines MCF-7, BT-474, and ZR-75-1 was mapped, resulting in the sequence of 340 proteins. The proteins associated with the biosynthesis of PGE₂ and with the regulation of cyclooxygenase-2 expression were identified and their relative expression levels were determined. Potential goals for the targeted therapy of breast cancer, such as prostaglandin E₂ and D₂ receptors, prostaglandin E synthase, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and leukotriene-A₄-hydrolase, are of special interest in this group.

Key words: breast cancer; cyclooxygenase-2; prostaglandin E₂ and D₂ receptors; prostaglandin E synthase; 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase; leukotriene-A₄-hydrolase; breast tumor cell lines MCF-7, BT-474, ZR-75-1; proteomics; mass spectrometry

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространенное онкологическое заболевание у женщин [1, 2]. Циклооксигеназа (СОХ) – ключевой фермент в метаболизме арахидоновой кислоты, имеет 2 изоформы: конститутивную циклооксигеназу 1 (СОХ-1) и индуцибельную циклооксигеназу 2 (СОХ-2), с которой связывают воспаление и неопластическую трансформацию высокодифференцированных клеток молочной железы (МЖ). Ярко выраженная экспрессия СОХ-2 наблюдается в опухолевой ткани и способствует развитию, росту и метастазированию РМЖ [3]. При участии СОХ-2 из арахидоновой кислоты образуется простагландин PGE₂ – предшественник других биологически активных простагландинов (PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂α) и тромбоксанов (тромбоксан A₂ (TXA₂) и тромбоксан B₂ (TXB₂)). Простагландин PGE₂ участвует в индукции ангиогенеза, подавляет чувствительность к ингибирующим рост сигналам и апоптозу,

стимулирует неограниченную пролиферацию неопластического клеточного клона. В зависимости от наличия рецепторов к PGE₂ изменяются свойства опухолевых клеток: способность к пролиферации, дифференцировке, инвазивность, выживаемость, ангиогенный потенциал и метастатическая активность. Ингибиторы СОХ-2 высокоэффективны при использовании в комбинированной химиотерапии (ХТ) многих опухолей, в частности РМЖ.

Повышенная активность СОХ-2 в ткани опухоли коррелирует с метастазированием и неблагоприятным прогнозом РМЖ. Поэтому актуальной задачей является изучение путей регуляции экспрессии фермента СОХ-2 в клетках РМЖ с разным метастатическим потенциалом.

В данной работе в лизатах клеток линий РМЖ человека MCF-7, BT-474, ZR-75-1 масс-спектрометрическими методами идентифицированы белки, связан-

ные с регуляцией каскада COX-2 и определены их относительные уровни экспрессии в зависимости от метастатического потенциала. Масс-спектрометрия (МС) широко применяется в биологии и медицине для секвенирования и исследования сложных протеомов [4–13]. В работе секвенировано 340 протеинов, из них 150 присутствуют во всех лизатах опухолевых клеток исследуемых линий. Идентифицированы новые потенциальные мишени для направленной терапии РМЖ, связанные с регуляцией экспрессии COX-2. Выявлены закономерности в изменении уровней белков, ассоциированных с COX-2 сигнальным путем: 15-гидрокси-простагландиндегидрогеназы (15-PGDH), простагландин Е синтазы (PGES), рецепторов простагландинов E₂ и D₂, лейкотриен-A₄-гидролазы (LTA₄G), синтазы жирных кислот (FAS), аннексина A1 (ANXA1), STAT1 в зависимости от метастатического потенциала клеток РМЖ.

Материалы и методы

Методика работы с культурой клеток

В исследовании использовались эстрогенпозитивные линии опухолевых клеток аденокарциномы (MCF-7, ZR-75-1) и инфильтрирующей (инвазивной) протоковой карциномы (BT-474) МЖ человека из коллекции клеточных культур ИИЦ РАН. Опухолевые клетки различались между собой по метастатической активности: низкометастатические (НМ) – MCF-7 и высокометастатические (ВМ) – ZR-75-1 и BT-474. Все культуры росли в одинаковых условиях при 37 °С и 5 % CO₂. MCF-7 культивировали с использованием среды DMEM с 10 % ЭТС и гентамицином (50 мкг/мл). ВМ опухолевые клетки ZR-75-1 и BT-474 в среде RPMI-1640 с 10 % ЭТС (с добавлением бычьего инсулина 10 мкг/мл), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл).

Клетки отмывали 3 раза в 5 мл PBS и лизировали в 0,5 мл PBS с добавлением 5 мкл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma) замораживанием в жидком азоте. Концентрацию белка в пробах измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) с помощью программы NanoDrop ND-1000 по методу Бредфорда.

Масс-спектрометрический анализ

Трипсинолиз лизатов проводили по методике с трифторэтанолом [9]. Для МС-анализа триптических пептидов каждого лизата применялся нанопроточный хроматограф Ultimate 3000 (Dionex), соединенный с источником ионов NanoESI масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). Полученные данные анализировали программным пакетом Thermo Proteome Discoverer 1.0 Build 43 (Thermo Scientific) [8, 12, 13]. Для идентификации белков использовали поисковую программу Mascot Server 2.2.06

(Matrix Science) с базой NCBI nr release 20100121 [9, 12, 13].

Результаты

Картирование протеомов лизатов линий опухолевых клеток MCF-7, BT-474, ZR-75-1

Проведено картирование протеомов лизатов линий опухолевых клеток РМЖ с различным метастатическим потенциалом. В результате идентифицировано в целом 340 различных белков с молекулярным весом от 2000 до 630 000 Да. Из них в лизате линии опухолевых клеток MCF-7 картировано 153 белка с молекулярным весом от 5000 до 630 000 Да [13]. Для BT-474 картировано 225 белков с молекулярным весом от 2000 до 630 000 Да, в том числе: 80 белков с массой до 30 кДа; 125 – от 30 до 100 кДа; 17 – от 100 до 300 кДа; 1 – от 300 до 500 кДа; 2 – > 500 кДа. Для ZR-75-1 идентифицировано 220 белков с молекулярным весом от 2000 до 300 000 Да, в том числе: 79 белков с массой до 30 кДа; 131 – от 30 до 100 кДа; 10 – от 100 до 300 кДа.

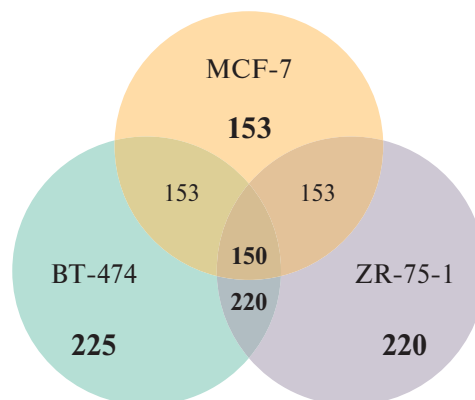


Рис. 1. Сравнительный анализ количества белков, идентифицированных в опухолевых клетках MCF-7, BT-474, ZR-75-1

Сравнительный анализ протеомных карт лизатов опухолевых клеток MCF-7, BT-474, ZR-75-1 (рис. 1) выявил 150 общих белков для всех 3 и 220 для 2 линий опухолевых клеток ZR-75-1 и BT-474.

Клеточная локализация идентифицированных протеинов

Каждый протеин классифицировался в соответствии с его клеточной локализацией на основании информации, доступной в открытых базах данных Swiss-Prot, Gene Ontology (GO) и др. Если один белок находился более чем в одном клеточном компартменте, это также учитывалось. Для линии MCF-7 основная часть идентифицированных протеинов относилась к цитоплазматическим (41 %) и ядерным (19 %), доля внеклеточных и мембранных белков составила 15 % [13].



Рис. 2. Субклеточная локализация белков, идентифицированных в лизате опухолевых клеток линии BT-474



Рис. 3. Субклеточная локализация белков, идентифицированных в лизате опухолевых клеток линии ZR-75-1

Для линии BT-474 основная часть идентифицированных протеинов относилась к цитоплазматическим (39%), ядерным (16%), мембранным (13%), внеклеточным (4%) и белкам митохондриальной мембраны (2%) (рис. 2). Для линии ZR-75-1 основная часть идентифицированных протеинов относилась к цитоплазматическим (34%), мембранным (15%), ядерным (10%), внеклеточным (6%) и белкам митохондриальной мембраны (4%) (рис. 3).

Сравнительный анализ уровней экспрессии белков, ассоциированных с экспрессией COX-2

Проведен сравнительный анализ относительных уровней белков, ассоциированных с COX-2, экспрессия которых возрастает в опухолевых клетках BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7 (рис. 4). Проведен сравнительный анализ относительных уровней протеинов, ассоциированных с COX-2, экспрессия которых

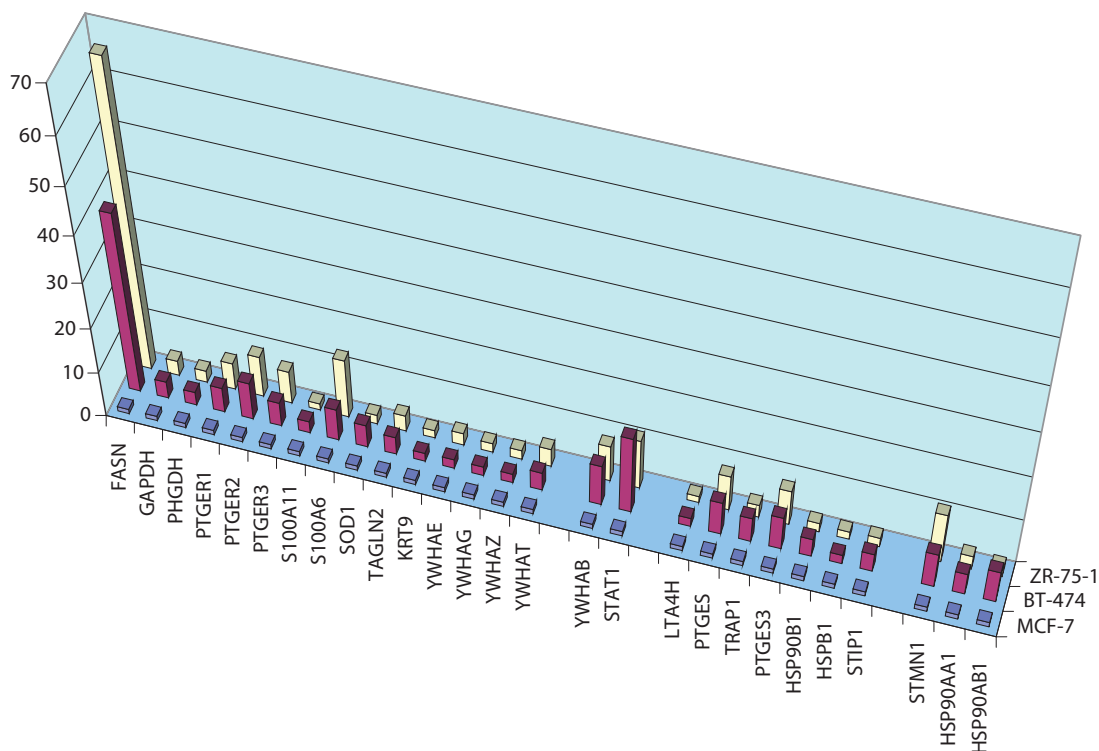


Рис. 4. Анализ белков, ассоциированных с экспрессией COX-2, уровни которых возрастают в опухолевых клетках BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7

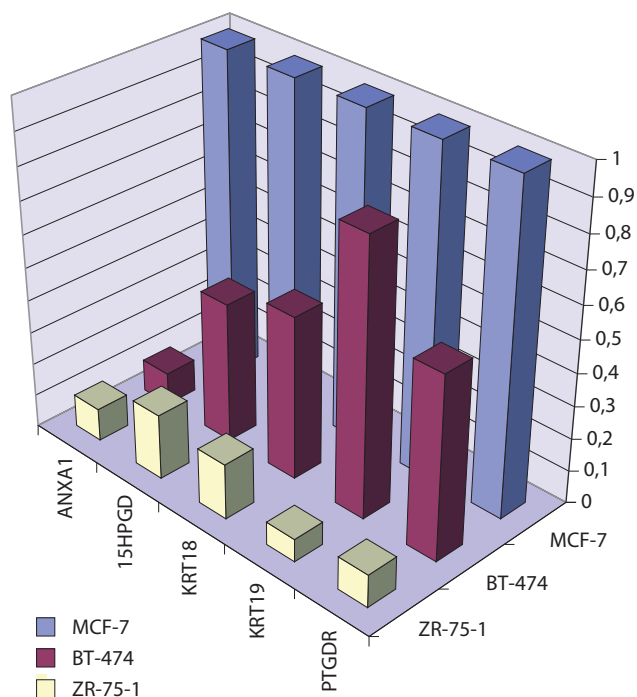


Рис. 5. Анализ белков, ассоциированных с экспрессией COX-2, уровни которых снижены в опухолевых клетках BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7

снижается в клетках линий BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7 (рис. 5).

Обсуждение

В лизатах опухолевых клеток МЖ MCF-7, BT-474, ZR-75-1 было секвенировано 340 белков с молекулярным весом от 5000 до 630 000 Да, из которых 150 белков обнаружены во всех 3 клеточных линиях. В результате из 150 белков часть совпала с обнаруженными ранее, что подтверждает достоверность проведенного исследования [8, 12, 14]. В работе идентифицированы протеины, связанные с биосинтезом PGE₂ и регуляцией каскада COX-2, представлен сравнительный анализ уровней этих белков в лизатах опухолевых клеток линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1 (см. рис. 4, 5). Особый интерес представляют рецепторы простагландинов E₂, D₂, PGES, 15-PGDH, LTA₄G, FAS, STAT1, p23, Hsp90, TRAP1, FASN, данная группа белков связана с регуляцией экспрессии COX-2, каскадом арахидоновой кислоты и метастатической активностью опухолевых клеток. Выявленные в нашей работе белки являются новыми потенциальными мишенями для терапии РМЖ.

Ферментный комплекс fatty acid synthesis (FAS) кодируется геном *FASN*, дифференциально экспрессированным в неопластической ткани МЖ человека. Высокий уровень экспрессии FAS в сочетании с пролиферативным индексом (> 17%) в опухолевых клетках коррелирует с неблагоприятным прогнозом для

РМЖ [15]. Белковый комплекс FAS определяется в плазме крови и является потенциальным биомаркером и мишенью для терапии [16]. Ген *FASN* индуцирует COX-2 каскад арахидоновой кислоты и образование PGE₂ [17]. Мы выявили корреляцию уровня FAS в опухолевых клетках в зависимости от их метастатической активности. Так, в клетках с высоким потенциалом к метастазированию линий BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии FAS был выше в 39 и 66 раз, чем в низкометастатической линии MCF-7. Таким образом, фермент FAS связан с регуляцией каскада COX-2 [18], представлен в базах Plasma Proteome Database, G2SBC и является маркером метастатического потенциала клеток РМЖ. В ряде работ FAS рассматривается в качестве мишени для направленной терапии РМЖ [16].

Ген *STAT1* дифференциально экспрессирован в опухолевой ткани МЖ. Ряд исследователей указывает на роль *JAK-STAT* сигнального пути в индукции и регуляции экспрессии COX-2. Обнаружено, что один из путей регуляции экспрессии COX-2 осуществляется через *JAK1/2-STAT1/3* [19]. В нашей работе мы выявили (табл. 1), что в линиях BT-474 и ZR-75-1, обладающих высоким потенциалом к метастазированию, уровень экспрессии *STAT1* был выше в 17 и 11 раз, чем в низкометастатической линии MCF-7. Белок *STAT1* связан с регуляцией каскада COX-2 и является маркером метастатической активности клеток РМЖ. Протеин *STAT1* представлен в базах Plasma Proteome Database, G2SBC и рассматривается в качестве потенциального маркера РМЖ [20].

Ген *TRAP1* дифференциально экспрессирован в неопластических клетках МЖ, идентифицируется базой G2SBC, как биомаркер РМЖ. Белок *TRAP1* регулирует процессы клеточной дифференцировки и активации апоптоза [21]. Ген *TRAP1* контролирует образование рецепторов к фактору некроза опухоли α (ФНО-α) и связан с регуляцией экспрессии COX-2 [22]. В работе показано, что в клетках с высоким потенциалом к метастазированию линий BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии белка *TRAP1* был более чем в 3 раза выше, чем в клетках низкометастатической линии MCF-7.

Известно, что COX-2 играет ключевую роль в регуляции биосинтеза PGE₂ во взаимодействии с другими факторами, такими как COX-1, 15-PGDH, PGES, PTGES3, ANXA1, Hsp90, Hsp70. Простагландин PGE₂ стимулирует инвазию и миграцию различных типов неопластических клеток, их устойчивость к апоптозу и метастазирование в отдаленные органы и ангиогенез в опухоли.

С метастазированием РМЖ многие исследователи связывают фермент PGES, экспрессия которого повышается в ВМ клетках РМЖ. Белок PGES кодируется геном *PTGES*, экспрессия PGES регулируется эстрогенами, их рецепторами, цитокинами TNF-α

Таблица 1. Белки, ассоциированные с COX-2, экспрессия которых возрастает в лизатах опухолевых клетках BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7

№	Индекс гена	Название белка	MCF-7	BT-474	ZR-75-1
1	ENO1	2-phosphopyruvate-hydratase, α -enolase	1	8,1	2,1
2	FASN	fatty acid synthase	1	39,4	66
3	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	3,7	3,3
4	HSP90B1	heat shock protein 90 kDa β , member 1 precursor	1	4,0	2,0
5	HSPB1	heat shock protein 27	1	2,0	1,7
6	HSP90AA1	heat shock 90 kDa protein 1, α	1	4,7	3
7	HSP90AB1	90 kDa heat shock protein	1	7,0	2,3
8	HSPA8	heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1	1	4,8	5,0
9	HSPA5	heat shock 70 kDa protein 5	1	2,0	2,0
10	KRT9	cytokeratin 9	1	1,8	1,7
11	LTA4H	leukotriene A4 hydrolase	1	2,0	2,0
12	PTGES3	PTGES3 prostaglandin E synthase (cytosolic)	1	7,3	7,8
13	PTGES	prostaglandin E synthase	1	7,3	7,8
14	PHGDH	3-phosphoglycerate dehydrogenase	1	2,9	2,6
15	PTGER1	prostaglandin E ₂ receptor EP1 subtype	1	5,5	5,9
16	PTGER2	prostaglandin E ₂ receptor EP2 subtype	1	8,2	9,0
17	PTGER3	prostaglandin E ₂ receptor EP3 subtype	1	5,3	7,2
18	S100A11	S100 calcium binding protein A11	1	2,6	1,4
19	S100A6	S100 calcium-binding protein A6	1	7,0	13,0
20	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1 isoform α	1	17,0	11,0
21	STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	1	4,0	2,0
22	STMN1	stathmin 1 isoform a	1	7,6	11
23	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	1	5,0	2,0
24	TAGLN2	transgelin 2	1	3,9	3,5
25	TRAP1	tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein TRAP-1	1	5,4	2,8
26	YWHAЕ	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, ϵ polypeptide, 14-3-3 ϵ	1	2,0	2,7
27	YWHAG	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, γ polypeptide, 14-3-3 γ	1	2,0	2,0
28	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, ζ polypeptide, 14-3-3 ζ	1	2,0	2,0
29	YWHAT	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, θ polypeptide	1	4,0	4,0
30	YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, β polypeptide	1	9,0	8,0

и интерлейкином-1 β (ИЛ-1 β). Фермент PGES контролирует синтез PGE₂ [23]. Цитокин ИЛ-1 β стимулирует образование PGE₂ за счет индукции экспрессии COX-2, PGES и подавления активности 15-PGDH. В ряде экспериментов обнаружено, что гипоксия и стресс индуцируют биосинтез PGE₂ путем активации экспрессии генов *PTGES* и *COX-2* [24]. В работе было обнаружено (см. табл. 1), что в ВМ линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии PGES был более чем в 7 раз выше, чем в НМ линии MCF-7.

Простагландин Е синтаза 3 (PTGES3) кодируется геном *PTGES3*. Белок p23, кодируемый этим геном, является шапероном, который необходим для нормального функционирования эстрогеновых, глюкокортикоидных и других гормональных рецепторов. Фермент PTGES3 участвует в биосинтезе простагландинов и метаболизме жирных кислот. Обнаружено, что экспрессия глутатиона в клетке зависит от простагландинов и регулируется ферментами COX-2 и COX-1 опосредованно через биосинтез PGE₂. Белок p23, кодируемый геном *PTGES3*, является кошапероном Hsp90 и регулирует работу рецепторов различных гормонов, активирует каталитическую активность ряда киназ, участвует в канцерогенезе. Белки теплового шока (БТШ) 90 (Hsp90) семейства шаперонов кодируются генами *HSP90*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSP90B1* и функционально связаны с p23 сигнальным путем. Рецепторы стероидных гормонов, находящиеся в цитоплазме, связаны с p23/Hsp90. Лиганд, попадающий в цитоплазму, присоединяется к рецептору и вытесняет шаперон из комплекса. После этого комплекс рецептор—лиганд приобретает способность связываться с ДНК, мигрирует в ядро и осуществляет функцию транскрипционного фактора. Обнаружена роль комплекса Hsp90 в метастазировании РМЖ и развитии резистентности опухолевых клеток к ХТ [25]. Белок p23 взаимосвязан с работой EGFR (EGFR/ErB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, Erb3/HER3, Erb4/HER4) рецепторных комплексов, участвует в индукции экспрессии COX-2 различными провоспалительными факторами, цитокинами и гормонами. N.E. Simpson et al. экспериментально доказали, что клетки линии (MCF-7 + p23) с гиперэкспрессией p23 обладают повышенной инвазивностью в сравнении с обычной линией MCF-7, при этом p23 не влияет на эстроген-зависимый пролиферативный ответ. Доказано, что p23 дифференциально регулирует гены-мишени PMP22, AVCC3, AGR2, Sox3, TM4SF1 и p8 (NUPR1), контролируемые процессы метастазирования и резистентность опухолей к лекарственным препаратам [25]. АТФ-зависимый транспортер AVCC3 связан с устойчивостью к ХТ-препаратам этопозиду и доксорубину в MCF-7 + p23 клетках. Для больных РМЖ стадия опухоли в сочетании с повышенной экспрессией цитоплазматической p23 является неблагоприятным про-

гностическим фактором. Сигнальный путь сPGES/p23 функционально связан с COX-1 и индукцией COX-2 и направлен на увеличение выработки в клетке PGE₂ из экзогенной и эндогенной арахидоновой кислоты. Таким образом, функциональные связи между COX-1 и сPGES/p23 направлены на производство PGE₂, который играет важную роль в поддержании тканевого гомеостаза опухолевых клеток [26]. Фермент PTGES3 дифференциально экспрессирован в клетках РМЖ [27] и идентифицируется базой G2SBC, как потенциальный биомаркер РМЖ. Как видно из табл. 1, в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии PTGES3 был более чем в 7 раз выше, чем в линии MCF-7.

Из группы БТШ, связанных с регуляцией каскада COX-2 и образованием PGE₂, идентифицирован стресс-индуцируемый фосфопротеин 1 (stress-induced-phosphoprotein 1, STIP1), который представляет собой 62,6 кДа белок, известный также как БТШ. Протеин STIP1 действует в качестве адаптера, который направляет HSP90 к HSP70 — мишеням белковых комплексов в цитоплазме, STIP1 модулирует деятельность БТШ, участвует в сплайсинге РНК, транскрипции, сворачивании белков, передаче сигнала и регуляции клеточного цикла. Белок STIP1 идентифицирован, как потенциальный биомаркер рака яичников [28]. Протеин STIP1 является индуктором COX-2, стимулирует образование PGE₂ и активирует пролиферацию опухолевых клеток. Нами установлено, что в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии STIP1 был выше в 4 и 2 раза, чем в линии MCF-7 (см. табл. 1).

Белок Hsp27 (heat shock protein 27), также известный как БТШ β 1 (heat shock protein beta-1, HSPB1), кодируется геном *HSPB1*. Протеин HSPB1 является шапероном из группы малых БТШ. Малые БТШ участвуют в регуляции клеточного цикла и дифференцировки клеток, торможении апоптоза, передаче внутриклеточного сигнала и поддержании стабильной температуры в клетке, формировании адаптивной реакции на стресс. Основная функция HSPB1 — сохранение термотолерантности, цитопротекция, поддержание выживаемости клеток в условиях стресса. Более специализированные функции HSPB1 многообразны и сложны. Он является антиапоптотическим белком и участвует в регуляции апоптотических сигнальных путей. Фосфорилированные формы HSPB1 подавляют Дахх апоптотический белок. Белок HSPB1 повышает активацию NF- κ B пути, который контролирует многие процессы (такие как рост клеток и воспаление), индуцирует экспрессию COX-2 и стимулирует образование PGE₂, оказывает цитопротекторное действие, модулирует образование активных форм кислорода и повышает уровень глутатиона, участвует в процессе дифференцировки клеток и регуляции их роста. Связан с метастазированием и лекарственной резистентностью РМЖ [29], подавляет апоптоз и повышает выжи-

ваемость опухолевых клеток в условиях стресса, тем самым увеличивая их метастатический потенциал. Белок HSPB1 является перспективной мишенью для противоопухолевой таргетной терапии РМЖ.

Простагландин PGE₂ играет важную роль в прогрессии РМЖ, а его уровни контролируются ферментами COX-2 и 15-PGDH [30]. Биологическая активность простагландинов реализуется через их взаимодействие со специфическими, связанными с G-белками, рецепторами клеток-мишеней. Эти рецепторы обозначают как DP, EP, FP, IP и TP для PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂α и тромбксана A₂ соответственно. PGE₂ действует через 4 типа рецепторов: EP₁, EP₂, EP₃ и EP₄. Рецептор EP₁ кодируется геном *PTGER1*, рецептор EP₂ кодируется геном *PTGER2*, EP₃ кодируется геном *PTGER3*. Рецепторы PGE₂ (субтипы EP₁, EP₂, EP₃) связаны с регуляцией метастазирования РМЖ. В нашей работе мы выявили повышенный уровень экспрессии рецепторов EP₁, EP₂, EP₃ в ВМ линиях BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с НМ линией MCF-7. Исходя из этого, можно отнести группу рецепторов PGE₂ к мишеням для таргетной терапии и потенциальным маркерам метастазирования РМЖ [31].

В ряде работ выявлена повышенная экспрессия LTA₄G в клетках РМЖ в сравнении с нормой [32]. Мы обнаружили повышение уровня экспрессии LTA₄G в ВМ линиях BT-474 и ZR-75-1 в 2 раза по сравнению с НМ линией MCF-7. В экспериментах на животных показано, что ингибиторы LTA₄G способны подавлять опухолевую прогрессию [33]. Фермент LTA₄G связан с канцерогенезом [34], взаимодействует с COX-2 и 5-липоксигеназным (5-LOX) путями, стимулирует увеличение выработки в клетке PGE₂ из экзогенной и эндогенной арахидоновой кислоты. LTA₄G также ингибирует апоптоз в эпителиальных опухолях, индуцирует экспрессию COX-2, β-катенина и Vcl-2 [35], усиливает пролиферацию эпителиальных клеток, обладает паракринным пролиферативным эффектом, способствуя делению раковых клеток. Ингибиторы или антагонисты рецепторов LTA₄G могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими препаратами, например, с ингибиторами COX-2 для профилактики и лечения РМЖ [36].

Особый интерес представляют белки семейства 14-3-3β, γ, ζ, δ, которые являются важными регуляторами апоптоза, клеточного цикла и сигнальной трансдукции [37]. Протеин 14-3-3β является важным компонентом сигнальных путей эпидермального фактора роста (ЭФР), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases) и выполняет роль негативного регулятора p53, вовлечен в патогенез РМЖ. Белок 14-3-3β является компонентом Wnt (название произошло от комбинации генов Wg (wingless) и Int) сигнального пути, который играет ключевую роль в развитии РМЖ. Сигнальный путь Wnt/β-катенина инициируется Wnt-лигандами,

что приводит к накоплению цитозольного β-катенина. Накопленный β-катенин перемещается в ядро и активирует транскрипцию генов-мишеней Wnt. Белок 14-3-3β функционирует в ядре, где он взаимодействует с c-Jun, β-катенином и регулирует Wnt-транскрипцию гена-мишени. Изменение экспрессии белка 14-3-3β часто обнаруживается в клетках опухоли. Белок 14-3-3β избыточно экспрессируется при РМЖ, предстательной железы, немелкоклеточном раке легкого, мезотелиоме плевры, что коррелирует с активацией сигнального пути Wnt/β-катенина [38]. Группа протеинов 14-3-3β, θ способна модулировать различные биологические процессы через белок — белковые взаимодействия. Протеины 14-3-3β, ζ, ε, θ взаимодействуют с β-катенином и могут позитивно или негативно регулировать Wnt-сигнальный путь в клетке. Белки 14-3-3β, θ способны индуцировать через Wnt/β-катенин сигнальный путь экспрессию COX-2, тем самым активизируя биосинтез PGE₂ в клетке. Как видно из табл. 1, в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии 14-3-3β в 8 и 9 раз, а уровень 14-3-3θ более чем в 4 раза был выше, чем в линии MCF-7.

Обнаружено что нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и селективные ингибиторы COX-2 способны индуцировать апоптоз раковых клеток через несколько сигнальных путей. Существует доказательство того, что они вызывают апоптоз за счет ингибирования биосинтеза простагландина (PGI₂), который подавляет апоптоз путем активации белков и генов мишеней. Белок 14-3-3ε является анти-апоптотическим белком, так как индуцирует биосинтез PGI₂ в неопластических клетках. Ингибиторы COX-2 подавляют экспрессию белка 14-3-3ε. Снижение экспрессии 14-3-3ε приводит к индуцированному апоптозу и повышает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам [39]. В нашей работе мы показали, что в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии 14-3-3ε был более чем в 2 раза выше, чем в линии MCF-7.

Протеин 14-3-3ζ регулирует механизмы клеточной адгезии, блокирует апоптоз [40] неопластических клеток и связан с регуляцией эпителиально-мезенхимального перехода [41]. Обнаружено, что уровень экспрессии этого белка возрастает при РМЖ [42]. Гиперэкспрессия 14-3-3ζ связана с высоким риском рецидива рака у оперированных больных РМЖ. Протеин 14-3-3ζ является важным узлом в сети митогенных сигналов и способствует росту злокачественной опухоли МЖ [43]. Выявлено, что в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии 14-3-3ζ был более чем в 2 раза выше, чем в линии MCF-7.

Протеин 14-3-3γ участвует в регуляции клеточного цикла и механизмов активации апоптоза [44] и является негативным регулятором p53. Экспериментально доказано, что уровень экспрессии белка 14-3-3γ досто-

Таблица 2. Белки, ассоциированные с COX-2, экспрессия которых снижена в опухолевых клетках BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с MCF-7

№	Индекс гена	Название белка	MCF-7	BT-474	ZR-75-1
1	ANXA1	ANXA1 annexin A1	1	0,1	0,1
2	HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD ⁺]	1	0,4	0,2
3	KRT19	keratin 19	1	0,8	0,1
4	KRT18	cytokeratin 18	1	0,5	0,2
5	PTGDR	prostaglandin D ₂ receptor	1	0,6	0,1

верно возрастает при РМЖ [45]. Этот протеин является онкогеном и регулирует активацию MAPK и PI3K сигнальных путей, играющих важную роль в 14-3-3γ опосредованной индукции опухолевых клеток [46]. Таким образом, протеин 14-3-3γ можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для будущей терапии рака. Из табл. 1 видно, что в линиях BT-474 и ZR-75-1 уровень экспрессии 14-3-3γ был более чем в 2 раза выше, чем в линии MCF-7.

В работе обнаружено снижение уровня экспрессии ряда белков в клетках с высоким потенциалом к метастазированию линий BT-474 и ZR-75-1 в сравнении с НМ линией MCF-7 (табл. 2), из этой группы идентифицированы протеины, регулирующие экспрессию COX-2, биосинтез и катаболизм PGE₂: PGDR2, ANXA1, 15-PGDH.

Рецептор простагландина D₂ (PGDR2) увеличивает активность аденилатциклазы, является негативным регулятором метастатической активности клеток РМЖ. В свою очередь, снижение уровня PGD₂ в неопластических клетках приводит к прогрессии опухолевого процесса, активации ангиогенеза и сопровождается аномальным ростом сосудов. Дефицит PGD₂ усиливает проницаемость сосудов для различных ростовых факторов, COX-2 и PGE₂, а повышение уровня PGD₂ тормозит метастатическую активность и ангиогенный потенциал опухоли. PGD₂ действует через PGDR2 он ингибирует TGF-β1 индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток [47]. Простагландины PGD₂ и PGDR2 являются негативными регуляторами метастазирования и опухолевой прогрессии и могут служить мишенями для направленной терапии РМЖ [48].

Фермент 15-PGDH является антагонистом COX-2, супрессором опухолевого роста и может модулировать эстрогензависимый сигнальный путь. Низкая экспрессия фермента 15-PGDH сопровождается повышением уровня COX-2, активацией ЭМП и усилением инвазивных свойств опухоли [49]. Обнаружена четкая корреляция низкой активности 15-PGDH с неблагоприятным прогнозом РМЖ [50]. Фермент 15-PGDH также влияет на чувствительность опухолевых клеток

к химиотерапевтическим препаратам. N. Wakimoto et al. [51] показали, что ингибиторы 15-PGDH вызывают ослабление противоопухолевого антипролиферативного эффекта НПВП. Противоопухолевый эффект индукторов 15-PGDH в эксперименте возрастал при одновременном их применении с препаратом авастин, ингибитором ангиогенеза. Химиотерапевтическая активность, вызываемая целекоксибом, зависит от 15-PGDH. Обнаружено, что снижение уровня экспрессии 15-PGDH придает устойчивость опухолевым клеткам к селективным ингибиторам COX-2. Фермент 15-PGDH известен как эндогенный COX-2 антагонист. Пониженная экспрессия 15-PGDH наблюдалась в различных тканях РМЖ и одновременно сопровождалась гиперэкспрессией COX-2 [52]. Экспрессия 15-PGDH обратно коррелирует с активностью COX-2 и метастазированием РМЖ в лимфатические узлы. Известно, что ИЛ-1β, TNF-α, форболовый эфир, индукторы COX-2, значительно подавляют экспрессию 15-PGDH. Интерлейкин-10 (ИЛ-10) стимулирует биосинтез 15-PGDH и является антагонистом ИЛ-1β и TNF-α. Таким образом, существует реципрокное взаимодействие между COX-2 и 15-PGDH. Предполагается, что индукторы COX-2 могут снижать экспрессию 15-PGDH, а концентрация фермента COX-2 регулирует величину этого эффекта. Z. Liu et al. [53] обнаружили, что при подавлении гена COX-2 (51,72%), как следствие, увеличивалась экспрессия фермента 15-PGDH (128,57%). В эксперименте, когда ИЛ-1β индуцировал образование COX-2 в клетках, но при этом блокировался ген COX-2, уровень экспрессии 15-PGDH спонтанно возрастал. В этом же исследовании обнаружено, что подавление экспрессии 15-PGDH увеличивает биосинтез COX-2 в опухолевых клетках после индукции их ИЛ-1β, но не влияет на образование COX-1. Фермент 15-PGDH является перспективным прогностическим маркером и новой мишенью для направленной терапии РМЖ [53].

Протеин аннексин А1 (также известный как липокортин) кодируется геном ANXA1, который индуцируется глюкокортикоидами и участвует в реализации противовоспалительного эффекта этих препаратов.

Ген *ANXA1* дифференциально-экспрессирован в клетках РМЖ и является регулятором ЭМП индуцированного TGF- β . Аннексин А1 связан с регуляцией прогрессии, инвазии и метастазирования опухолевых клеток РМЖ [54]. Аннексин А1 ингибирует образование фосфолипазы A_2 . Фосфолипаза A_2 необходима для биосинтеза мощных медиаторов воспаления PGs и лейкотриенов, таким образом аннексин А1 обладает потенциальной противовоспалительной активностью. Ген *ANXA1* ингибирует деятельность ряда воспалительных ферментов синтазы окиси азота (iNOS) и COX-2 [55, 56]. Ингибирование экспрессии iNOS вызвано индукцией выработки ИЛ-10 в макрофагах. Ген *ANXA1* оказывает тормозящее действие на нейтрофилы и моноциты миграции при воспалении. Таким образом, *ANXA1* – регулятор противовоспалительной сигнализации и является антагонистом COX-2. Белок аннексин А1 индуцирует действие НПВП и других противовоспалительных средств, подавляет NF- κ B сигнальный путь и блокирует пролиферацию раковых клеток, индуцируя апоптоз. Протеин аннексин А1 подавляет

активацию NF- κ B сигнального пути, связываясь с p65-субъединицей. Белок аннексин А1 является перспективным прогностическим маркером и новой мишенью для направленной терапии РМЖ.

Заключение

В данной работе картирован протеом лизатов опухолевых клеток МЖ линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1, выявлены белки, ассоциированные с каскадом COX-2, биосинтезом и катаболизмом PGE₂. Проведен сравнительный анализ уровней экспрессии протеинов данной группы в клетках линий MCF-7, BT-474, ZR-75-1. Обнаружена связь ряда выявленных белков с метастазированием РМЖ.

Среди идентифицированных белков практический интерес представляют: ферментный комплекс FAS, группа рецепторов простагландинов E₂, D₂, PGES, 15-PGDH, LTA₄G, STAT1, Hsp90, p23, STIP1, Hsp27, ANXA1, TRAP1, 14-3-3 β , ζ , ϵ , θ , которые могут рассматриваться в качестве потенциальных молекулярных мишеней для направленной терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

- Parkin D.M., Ferlay J., Curado M.P. et al. Fifty years of cancer incidence: C15 I-IX. *Int J Cancer* 2010;127(12):2918–27.
- Schedin P., Borges V. Breaking down barriers: the importance of the stromal microenvironment in acquiring invasiveness in young women's breast cancer. *Breast Cancer Research* 2009;11(2):102.
- Cebola I., Peinado M.A. Epigenetic deregulation of the COX pathway in cancer. *Prog Lipid Res* 2012;51(4):301–13.
- Шевченко В.Е. Современные масс-спектрометрические методы в ранней диагностике рака. Масс-спектрометрия 2004;1(2):103–26.
- Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Трифонова О.П. и др. Профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака легкого. Масс-спектрометрия 2007;4(4):245–54.
- Ryattitskiy M.A., Arnotskaya N.E., Akhmedov B.B. et al. Identification of differential signs of squamous cell lung carcinoma by means of the mass spectrometry profiling of blood plasma. *J Analyt Chem* 2011;66(14):1369–75.
- Kang U.B., Ahn Y., Lee J.W. et al. Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker. *BMC Cancer* 2010;10:114.
- Sarvaiya H.A., Yoon J.H., Lazar I.M. et al. Proteome profile of the MCF7 cancer cell line: a mass spectrometric evaluation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20(20):3039–55.
- Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Юрченко В.А. и др. Картирование протеома плазмы крови человека в норме и при светлоклеточном раке почки. Онкоурология 2011;3:65–69.
- Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Таипов М.А. и др. Масс-спектрометрическое профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака молочной железы. Вестн РОНЦ 2011;22(3):27–33.
- Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Zaridze D.G. et al. Detection of lung cancer using plasma protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 2010;16(4):539–49.
- Шевченко В.Е., Макаров Д.Е., Ковалев С.В. и др. Идентификация протеомных маркеров метастазирования рака яичников. ОЖРС 2011;4:76–83.
- Шевченко В.Е., Таипов М.А., Ковалев С.В. и др. Картирование протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7 для идентификации потенциальных маркеров рака молочной железы. ОЖРС 2012;2:4–11.
- Kuk C., Kulasingam V., Diamandis E.P. et al. Mining the ovarian cancer ascites proteome for potential ovarian cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(4):661–9.
- Alo P.L., Trombetta G. et al. Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. *Tumori* 1999;85:35–40.
- Jin Q., Yuan L.X., Boulbes D. et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2010;12(6):96.
- Ishimura N., Amano Y., Sanchez-Siles A.A. et al. Fatty acid synthase expression in Barrett's esophagus: implications for carcinogenesis. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(8):665–72.
- Ogino S., Brahmandam M., Cantor M. et al. Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component. *Modern Pathology* 2006;19:59–68.
- Xuan Y.T., Guo Y., Zhu Y. et al. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35(5):525–37.
- Doppler W., Marth C., Daxenbichler G. et al. Expression of STAT1 target genes and interferon gamma in human mammary carcinoma tissue. *Breast Cancer Research* 2005;7(2):4–5.
- Amoroso M.R., Matassa D.S., Laudiero G. et al. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins. *Cell Death & Differentiation* 2012;19:592–604.
- Houliston R.A., Keogh R.J., Sugden D. et al. Protease-activated receptors upregulate

- cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2002; 88(2):321-8.
23. Frasier J., Weaver A.E., Pradhan M. et al. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17 beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149(12):6272-9.
24. Lee J.J., Natsuizaka M., Ohashi S. et al. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. *Carcinogenesis* 2010;31(3):427-34.
25. Simpson N.E., Lambert W.M., Watkins R. et al. High Levels of Hsp90 Cochaperone p23 Promote Tumor Progression and Poor Prognosis in Breast Cancer by Increasing Lymph Node Metastases and Drug Resistance. *Cancer Research* 2010;70(21):8446-56.
26. Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N. et al. Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;275:32775-82.
27. Wood L.D., Parsons D.W., Jones S. et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108-13.
28. Wang T.H., Chao A., Tsai C.L. et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a Secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. *Mol cell proteomics* 2010;9(9):1873-84.
29. Kang S.H., Kang K.W., Kim K.H. et al. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer* 2008;8:286.
30. Wolf I., O'Kelly J., Rubinek T. et al. 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Is a Tumor Suppressor of Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2006;66:7818.
31. Timoshenko A.V., Xu G., Chakrabarti S. et al. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2003;289(2):265-74.
32. Lai T.C., Chou H.C., Chen Y.W. et al. Secretomic and proteomic analysis of potential breast cancer markers by two-dimensional differential gel Electrophoresis. *J Proteome Res* 2010;9(3):1302-22.
33. Chen X., Wang S., Wu N. et al. Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4(3):267-83.
34. Sun Z., Sood S., Li N. et al. Involvement of the 5-lipoxygenase/leukotriene A4 hydrolase pathway in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch, and inhibition of carcinogenesis by its inhibitors. *Carcinogen* 2006;27(9):1902-8.
35. Ohd J.F., Wikstrom K., Sjolander A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2000;119:1007-18.
36. Laronga C., Yang H.Y., Neal C., Lee M.H. Association of the Cyclin-dependent Kinases and 14-3-3 Sigma Negatively Regulates Cell Cycle Progression. *J Biological Chem* 2000; 275:23106-12.
37. O'Regan R.M., Gajdos C., Dardes R.C. et al. Effects of raloxifene after tamoxifen on breast and endometrial tumor growth in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(4):274-83.
38. Chen H., Liu L., Ma B. Protein kinase A-mediated 14-3-3 Association Impedes Human Dapper1 to Promote Dishevelled Degradation. *J Biol Chem* 2011;286: 14870-80.
39. Wu K.K., Liou J.Y. Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis Via PPARdelta -> 14-3-3epsilon pathway. *Methods Mol Biol* 2009;512:295-307.
40. Niemantsverdriet M., Wagner K., Visser M. et al. Cellular functions of 14-3-3 dzeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character. *Oncogene* 2008;27:1315-9.
41. Lu J., Guo H., Treekitkammongkol W. et al. 14-3-3zeta Cooperates with ErbB2 to promote ductal carcinoma in situ progression to invasive breast cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 2009;16(3):195-207.
42. Danes C.G., Wyszomierski S.L., Lu J. et al. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling. *Cancer Res* 2008;68(6):1760-7.
43. Neal C.L., Xu J., Li P. et al. Overexpression of 14-3-3 dzeta in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene* 2012;31:897-906.
44. Qi W., Liu X., Chen W. Overexpression of 14-3-3gamma causes polyploidization in H322 lung cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 2007;46(10):847-56.
45. Jin Y.H., Kim Y.J., Kim D.W. et al. Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:690-5.
46. Radhakrishnan V.M., Martinez J.D. 14-3-3gamma induces oncogenic transformation by stimulating MAP kinase and PI3K signaling. *PLoS One* 2010;5(7):11433.
47. Zhang A., Dong Z., Yang T. Prostaglandin D2 inhibits TGF-beta 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:1332-42.
48. Murata T., Lin M.I., Aritake K. et al. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis *in vivo*. *PNAS* 2008;105(50):20009-14.
49. Wolf I., O'Kelly J., Rubinek T. et al. 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase Is a Tumor Suppressor of Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2006;66:7818-23.
50. Lehtinen L., Vainio P., Wikman H. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *J Pathol* 2012;226(4): 674-86.
51. Wakimoto N., Wolf I., Yin D. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress glioma via 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Cancer Res* 2008; 68(17):6978-86.
52. Roberts H.R., Smartt H.J., Greenhough A. et al. Colon tumour cells increase PGE(2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the micro environmental stress of glucose deprivation. *Carcinogenesis* 2011; 32(11):1741-7.
53. Liu Z., Wang X., Lu Y. et al. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008;29(6): 1219-27.
54. Na H.K., Park J.M., Lee H.G. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2011;82(10):1352-60.
55. Yom C.K., Han W., Kim S.W. et al. Clinical Significance of Annexin A1 Expression in Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2011;14(4):262-8.
56. Parente L., Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 2004;53(4):125-32.