

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ

© И. В. Воронкина, К. М. Кирпичникова, Л. В. Смагина, И. А. Гамалей¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ *электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Сравнивали влияние двух антиоксидантов — N-ацетилцистеина (NAC) и альфа-липоевой кислоты (ALA) — на активность двух представителей матриксных металлопротеиназ (ММП) — желатиназ ММП-2 и ММП-9, секретируемых нормальными (ЗТЗ) и трансформированными (ЗТЗ-SV40) фибробластами мышца. С помощью зимографии показали, что нормальные клетки ЗТЗ характеризуются большей активностью ММП-2, а трансформированные клетки ЗТЗ-SV40 — большей активностью ММП-9. Действие NAC в течение 2—6 ч полностью выключает активность ММП-2 и ММП-9 в обоих клеточных типах, причем эффект мало зависит от концентрации NAC (1—10 мМ). Действие ALA (1.2 мМ) не столь драматично. Активность ММП-2 в присутствии ALA уменьшалась у обоих клеточных типов, активность ММП-9 уменьшалась у клеток ЗТЗ, а у клеток ЗТЗ-SV40 несколько увеличивалась. Активность ММП, связанных с мембраной и находящихся в самой клетке, при этих же воздействиях не менялась. Вызванные антиоксидантом изменения активности ММП могут быть основой для следующих изменений в сигнальных путях клетки и в ее функциях.

Ключевые слова: трансформированные фибробласты, матриксные металлопротеиназы, антиоксиданты, N-ацетилцистеин, альфа-липоевая кислота.

Принятые сокращения: ММП — матриксные металлопротеиназы, ALA — альфа-липоевая кислота, GSH — восстановленный глутатион, NAC — N-ацетилцистеин.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) — матрикс-разрушающие ферменты, способные гидролизовать почти все компоненты внеклеточного матрикса, встречающиеся в соединительных тканях. Спектр и активность ММП зависят от клетки и ее типа и могут принципиально меняться в процессе клеточной трансформации (см. обзоры: Mott, Werb, 2004; Клишо и др., 2005). Опухолевая трансформация и инвазия характеризуются увеличенной экспрессией или активностью различных классов ММП (Westermark, Kähäri, 1999; Schnaeker et al., 2004). ММП образуются из неактивных предшественников, которые превращаются в активные протеиназы и секретируются клеткой во внеклеточную среду под воздействием различных клеточных и внеклеточных факторов (Björklund, Koivunen, 2005). Благодаря высокой редокс-чувствительности ММП могут менять свою активность при действии оксидантов и антиоксидантов (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990; Lai et al., 2006; Pei et al., 2006).

В предыдущих работах мы показали, что прямое действие антиоксидантов N-ацетилцистеина (NAC) и восстановленного глутатиона (GSH) приводит к морфологическим и функциональным изменениям трансформированных фибробластов, которые выражаются в частичной реверсии их фенотипа (Гамалей и др., 2003; Филатова и др., 2006, 2008; Gamaley et al., 2006). Оба антиоксиданта являются источником сульфгидрильных групп и сдвигают окислительно-восстановительный баланс клетки в сторону

антиоксидантов, главным образом GSH — основного восстанавливающего компонента клетки (Spolarics, Wu, 1997; Gamaley et al., 2006). NAC может вызывать в клетках многочисленные изменения, опосредованные разными механизмами (см. обзор: Zaffarullah et al., 2003). Анализируя изменения, которые вызывал NAC у клеток ЗТЗ-SV40 в наших экспериментах, мы пришли к выводу о том, что NAC изменяет не только редокс-баланс и активность ряда сигнальных белков в клетке, но активирует (или инактивирует) определенные молекулы прямо на поверхности клетки и(или) во внеклеточном матриксе, что в свою очередь вызывает перестройки и изменения ее функциональной активности (Филатова и др., 2006, 2008; Gamaley et al., 2006). Так, возникающая после действия NAC устойчивость фибробластов ЗТЗ-SV40 к действию естественных киллеров сохраняется дольше, если не пересевать клетки, т. е. не нарушать структуру внеклеточного матрикса, испытывавшего вместе с клетками действие NAC (Филатова и др., 2006). Это дает основание для поиска прямой мишени действия NAC среди редокс-чувствительных молекул на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе. К таким молекулам относятся, в частности, ММП (Weiss et al., 2003).

В настоящей работе сравнивали влияние двух антиоксидантов — NAC и альфа-липоевой кислоты (ALA) — на активность двух представителей семейства ММП — желатиназ ММП-2 и ММП-9, секретируемых нормальными и трансформированными фибробластами мышца.

Материал и методика

Клетки. Объектом исследования служили эмбриональные мышечные фибробласты линии Valb/3T3 (клетки 3T3) и такие же фибробласты, трансформированные вирусом SV40 (клетки 3T3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров (Биолот, Россия) до образования монослоя. Маточный раствор антиоксиданта NAC или ALA (Sigma, США) добавляли в среду культивирования клеток до необходимой концентрации на 2—6 ч. NAC использовали в концентрациях от 0.2 до 10 мМ, ALA — 1.2 мМ.

Оценка протеолитической активности. Присутствие ММП-2 и ММП-9 определяли методом зимографии по описанному методу (Oliver et al., 1999) в собственной модификации (Воронкина и др., 2002). Пробы кондиционированной среды отделяли от клеток центрифугированием и смешивали с буфером по Лэммли (Laemmli, 1970), после чего проводили электрофорез. Гель (10 % акриламида) содержал 0.5 г/мл желатина. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976). При зимографии для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, в качестве маркера использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080 (Oliver et al., 1999). Для проведения количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1. Результаты денситометрии представляли в виде гистограмм.

Активности ММП, связанных с мембранами и находящихся в клетках, определяли в клеточных лизатах. Для этого клетки снимали с подложки, промывали буферным раствором PBS, гомогенизировали в течение 2 мин в стеклянном гомогенизаторе в ледяном буферном растворе (100 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, pH 7.6, 0.01 % BRIJ-35), содержащем смесь ингибиторов протеаз (Sigma, США), после чего центрифугировали 10 мин при 5000 g. Супернатант немедленно использовали для приготовления проб для зимографии.

Результаты

На рис. 1, а, б показаны примеры зимограмм среды, кондиционированной клетками 3T3 и 3T3-SV40 в нормальных условиях и при действии NAC. Рис. 2 и 3 (гистограммы, построенные по данным зимографии) показывают изменение активности ММП-2 и ММП-9 у нетрансформированных (3T3) и трансформированных (3T3-SV40) клеток при действии антиоксидантов. Видно, что и для одних, и для других клеток характерна активность обеих желатиназ. Сравнение клеток по активности ММП-2 и ММП-9 (рис. 2, 3) показывает, что нормальные клетки 3T3 характеризуются большей активностью ММП-2, а трансформированные клетки 3T3-SV40 — большей активностью ММП-9. Действие NAC в течение 2—6 ч полностью выключает активность ММП-2 и ММП-9 в обоих клеточных типах (рис. 2, а; 3, а). Подавление активности ММП прослеживается и при уменьшении концентрации NAC до 1 мМ (не показано), т. е. эффект очень мало зависит от концентрации NAC в диапазоне от 1 до 10 мМ и от времени его действия в пределах 2—6 ч.

Рис. 2, б и 3, б демонстрируют изменение активности тех же ММП при аналогичном действии другого антиоксиданта — ALA — в концентрации 1.2 мМ. Видно, что ALA, так же как и NAC, подавляет активность ММП, хотя не столь драматично. Необходимо заметить, что увеличение концентрации ALA вызывает гибель клеток. Активность ММП-2 в присутствии ALA резко уменьшается у обоих клеточных типов (у клеток 3T3-SV40 в меньшей степени, чем у клеток 3T3), а вот активность ММП-9 уменьшается у клеток 3T3, а у клеток 3T3-SV40 даже несколько увеличивается.

Для того чтобы понять, влияют ли антиоксиданты на ММП в самих клетках, мы провели зимографию лизатов клеток, обработанных 10 мМ NAC или 1.2 мМ ALA в тех же условиях. Зимограммы при 4-часовом действии агентов представлены на рис. 4. Такие же результаты получаются и при 2- и 6-часовом действии агентов. Видно, что в лизатах обоих клеточных типов присутствует только полоса, соответствующая ММП-2, интенсивность которой не изменяется при обработке клеток NAC или ALA. Это означает, что действие антиокси-

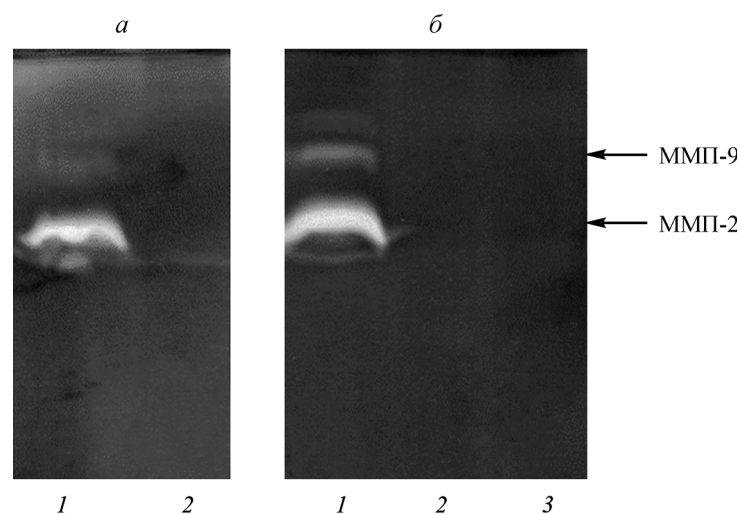


Рис. 1. Зимограммы кондиционированной среды нетрансформированных клеток 3T3 (а) и трансформированных клеток 3T3-SV40 (б) в контроле и при обработке их N-ацетилцистеином (NAC).

Дорожки: 1 — контроль; 2, 3 — 10 мМ NAC в течение 2 и 6 ч соответственно.

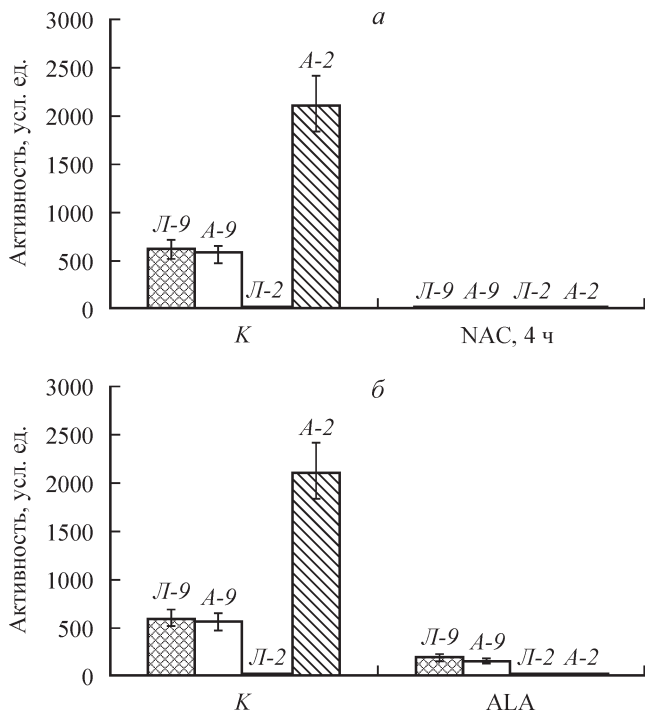


Рис. 2. Изменение активности матричных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 в кондиционированной среде нетрансформированных клеток 3Т3 при обработке их 10 мМ NAC (а) и 1.2 мМ альфа-липовоей кислоты (ALA, б).

К — контроль; Л-2, Л-9 — латентная (пропептидная) форма ММП-2 и ММП-9 соответственно; А-2, А-9 — активная форма ММП-2 и ММП-9 соответственно. Построено по данным зимографии.

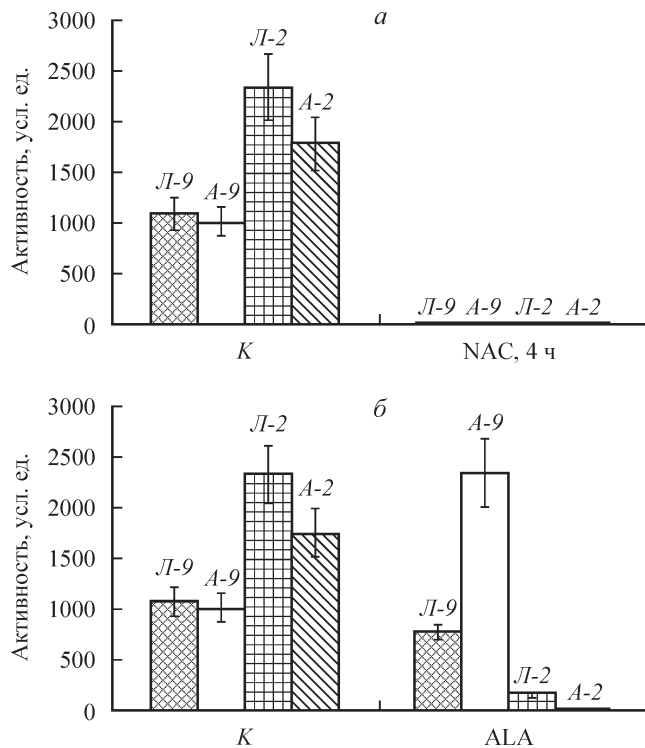


Рис. 3. Изменение активности матричных металлопротеиназ ММП-2 и ММП-9 в кондиционированной среде трансформированных клеток 3Т3-SV40 при обработке их 10 мМ NAC (а) и 1.2 мМ ALA (б).

Обозначения те же, что и на рис. 2.

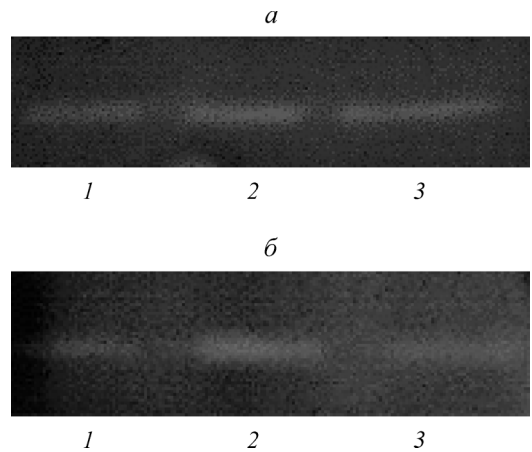


Рис. 4. Зимограмма лизата клеток 3Т3 (а) и 3Т3-SV40 (б) при 4-часовой обработке их 10 мМ NAC или 1.2 мМ ALA.

Дорожки: 1 — контроль, 2 — 10 мМ NAC в течение 4 ч, 3 — 1.2 мМ ALA в течение 4 ч.

дантов (ингибированию) подвергаются лишь те ММП, которые секретируются клеткой в среду культивирования.

Обсуждение

ММП секретируются в неактивной (латентной) форме, которая является результатом образования внутримолекулярного комплекса между SH-группой единственного цистеинового остатка (Cys73) в пропептидном домене и атомом цинка в каталитическом домене. Основой активации ММП является диссоциация комплекса и освобождение (модификация) аминокислотного остатка Cys73 из латентной формы фермента. Этот механизм активации, получивший название «цистеинового включателя» («cysteine switch»), является общим для всех ММП (Spingman et al., 1990; Björklund, Koivunen, 2005; Pei et al., 2006). ММП могут активироваться при действии трипсина, поверхностно-активных веществ (додецилсульфата натрия), дисульфидных соединений (например, окисленного GSH), оксидантов и др.

Полученные нами данные о влиянии NAC на активность ММП вполне согласуются с рядом уже известных данных о способности небелковых SH-содержащих соединений ингибировать ММП. При этом большая часть данных литературы относится, с одной стороны, к NAC, а с другой — к ММП-2 и ММП-9. Именно эти две ММП исследуются чаще всего. Обнаруженная нами активность ММП-9, большая у трансформированных клеток 3Т3-SV40, чем у нетрансформированных 3Т3, подтверждается данными об усиленной экспрессии именно ММП-9 в процессе клеточной трансформации (Клишо и др., 2005). Что касается инактивации ММП-2 и ММП-9 при действии NAC, то мы не получили принципиального различия между ними ни для клеток 3Т3, ни для клеток 3Т3-SV40 в отличие от некоторых авторов, имевших дело с другими клетками (Pei et al., 2006). Более того, практически нет различия в степени инактивации обеих ММП при действии NAC в диапазоне концентраций 1—10 мМ. Отметим, что в других работах по изучению изменения активности ММП NAC используют в больших концентрациях (10—20 мМ).

Список литературы

Сравнительное изучение секреции и активности ММП-2 и ММП-9 в трех внутриутробных оболочках плода человека показало, что секреция этих ММП зависит от типа ткани (оболочки) и ее состояния (Goldman et al., 2003; Weiss et al., 2003). Однако действие NAC (10—20 мМ) ингибировало и ММП-2, и ММП-9 (как и в наших экспериментах) независимо от происхождения ткани (Weiss et al., 2003). Интересно, что эти авторы показали прямое ингибирующее действие NAC (на 50—95 % в зависимости от концентрации) на ММП-2 и ММП-9 при зимографии на желатине (Weiss et al., 2003). Другие авторы при детальном исследовании активации рекомбинантной про-ММП-9 человека в присутствии NAC или GSH пришли к выводу о том, что эти антиоксиданты ингибируют активность ММП-9 за счет S-тиолирования пропептидного цистеинового остатка и образования комплекса с Zn^{2+} каталитического сайта фермента (Pei et al., 2006). Причем в этой работе ММП-9 инактивировалась при действии NAC или GSH значительно больше, чем ММП-2. Показано, что образующийся при метаболизме крестоцветных овощей у человека конъюгат NAC и аллиллизотионина ингибировал экспрессию ММП-2 и ММП-9, адгезию и инвазию клеток гепатомы SK-Hep1 человека (Hwang, Lee, 2006). NAC подавлял активность ММП-9 и в опухолевых клетках T24 мочевого пузыря человека (Kawakami et al., 2001).

Относительно других антиоксидантов есть данные о том, что растительный антиоксидант (salvianolic acid) ингибирует вызванную фактором некроза опухолей экспрессию ММП-2 в гладкомышечных клетках аорты человека, и интересно, что это ингибирование зависит от генерации активных форм кислорода NADPH-оксидазой (Zhang, Wang, 2006). Полученные нами данные по действию ALA свидетельствуют о том, что этот антиоксидант тоже ингибирует активность ММП, но ингибирование зависит от клеточного типа.

Увеличение активности ММП-9 только у клеток 3T3-SV40 при действии ALA может объясняться тем, что трансформированные клетки 3T3-SV40 более чувствительны к действию антиоксидантов, чем клетки 3T3 (Гамалей и др., 2003), и тем, что ALA обладает иным, нежели NAC или GSH, механизмом действия. Естественный антиоксидант ALA, называемый метаболическим, в отличие от NAC не имеет восстановленных SH-групп, но быстро приобретает их, попадая в клетку. Увеличивая внутриклеточный пул антиоксиданта, ALA действует как восстановленный антиоксидант (дигидролипоевая кислота) только внутри клетки (Packer et al., 1995; Sen, Packer, 2000; Moini et al., 2002). Здесь уместно отметить работу, в которой показана активация ММП в результате GSH-зависимого S-глутатиолирования при действии пероксинитрита (Okamoto et al., 2001).

Таким образом, антиоксиданты NAC и ALA, обладая специфичностью действия, способны ингибировать ММП-2 и ММП-9, секретлируемые фибробластами 3T3 и 3T3-SV40. Изменение активности ММП в присутствии антиоксидантов может быть основой для следующих изменений в сигнальных путях клетки и в ее функциях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48586) и частичной поддержке проекта «Ведущие научные школы» (НШ-774.2008.4).

Воронкина И. В., Харисов А. М., Блинова М. И., Парамонов Б. А., Потокин И. Л., Пинаев Г. П. 2002. Исследование протеолитической активности раневых экссудатов на модели воздушного пузыря у мышей. Цитология. 44 (3) : 270—276.

Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3T3 и 3T3-SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.

Клишо Е. В., Кондакова И. В., Чойнзонов Е. Л., Васильева О. С. 2005. Прогностическая значимость протеаз у больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Бюл. СО РАМН. 2 (116) : 82—91.

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3T3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3T3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—267.

Björklund M., Koivunen E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. Biochim. biophys. acta. 1755 : 37—69.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.

Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik Y., Polozov Yu., Khahtlina 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biol. Int. 30 : 319—325.

Goldman S., Weiss A., Eyali V., Shalev E. 2003. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. Mol. Hum. Reprod. 9 : 367—373.

Hwang E.-S., Lee H. J. 2006. Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells. Exp. Biol. Med. 231 : 421—430.

Kawakami S., Kageyama Y., Fujii Y., Kihara K., Oshima H. 2001. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on invasion and MMP-9 production of T24 human bladder cancer cells. Anticancer Res. 21 : 213—219.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—683.

Lai C. F., Seshadri V., Huang K., Shao J. S., Cai J., Vattikuti R., Schumacher A., Loewy A. P., Denhardt D. T., Rittling S. R., Towler D. A. 2006. An osteopontin-NADPH oxidase signaling cascade promotes pro-matrix metalloproteinase 9 activation in aortic mesenchymal cells. Circ. Res. 98 : 1479—1489.

Moini H., Packer L., Saris N. E. 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxiol. Appl. Pharmacol. 182 : 84—90.

Mott J. D., Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Cur. Opin. Cell Biol. 16 : 558—564.

Okamoto T., Akaike T., Sawa T., Miyamoto Y., van der Vliet A., Maeda H. 2001. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. J. Biol. Chem. 276 : 29 596—29 602.

Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press. 61—76.

Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Rad. Biol. Med. 19 : 227—250.

Pei P., Horan M. P., Hille R., Hemann C. F., Schwendeman S. P., Mallery S. R. 2006. Reduced nonprotein thiols inhibit activation and function of MMP-9: implications for chemoprevention. Free Rad. Biol. Med. 41 : 1315—1324.

Schnaeker E.-M., Ossig R., Ludwig T., Dreier R., Oberleithner H., Wilhelmi M., Schneider S. W. 2004. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 64 : 8924—8931.

Sen C. K., Packer L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Amer. J. Clin. Nutr.* 72 (Suppl. 2) : 653S—669S.

Spingman E. B., Angleton E. L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H. E. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a «systeine switch» mechanism for activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87 : 364—368.

Spolarics Z., Wu J. X. 1997. Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupfer cells. *Amer. J. Physiol.* 273 : G1304—G1311.

Van Wart H. E., Birkedal-Hansen H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87 : 5578—5582.

Weiss A., Goldman S., Ben Shlomo I., Eyal V., Leibovitz S., Shalev E. 2003. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 inhibition by N-acetylcysteine in the human term decidua and fetal membranes. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 189 : 1758—1763.

Westermarck J., Kähäri V. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13 : 781—792.

Zafarullah M., Li W. Q., Sylvester J., Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *CMLS Cell Mol. Life Sci.* 60 : 6—20.

Zhang H. S., Wang S. Q. 2006. Salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* inhibits tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced MMP-2 upregulation in human aortic smooth muscle cells via suppression of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *J. Mol. Cell Cardiol.* 41 : 138—148.

Поступила 6 V 2008

CHANGES IN MATRIX METALLOPROTEINASES ACTIVITIES IN NORMAL AND TRANSFORMED MOUSE FIBROBLASTS UNDER EFFECT OF ANTIOXIDANTS

I. V. Voronkina, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, I. A. Gamaley¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

The effect of two antioxidants on the activities of matrix metalloproteinases (MMP) secreted by normal (3T3) and transformed (3T3-SV40) mouse fibroblasts was examined. We compared the effect of N-acetylcysteine (NAC) and alpha-lipoic acid (ALA) on two gelatinases, MMP-2 and MMP-9. Gel zymography demonstrated that activity of MMP-2 was higher in normal 3T3 cells, and MMP-9 activity was higher in transformed 3T3-SV40 cells. NAC action for 2—6 hours completely inhibited MMP-2 and MMP-9 activity in both cell lines. The inhibitory effect almost did not depend on NAC concentration at the range of 1—10 mM. ALA (1.2 mM) affected the cells not so dramatically. ALA decreased the MMP-2 activity in both cellular types. As to MMP-9 activity, it decreased in 3T3 cells and slightly increased in 3T3-SV40 cells in the presence of ALA. The activity of membrane bound and intracellular MMP was not changed under the same conditions. In conclusion, an altered activity of MMP in the presence of an antioxidant may influence the intracellular signalling and cell functions.

Key words: transformed fibroblasts, matrix metalloproteinases, N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid.