

## Інгібуючий вплив еупатиліну на пухлинну інвазію ракових клітин шлунка людини MKN-1

*Пён Бэ Пак, Джин Сон Юн, Ин Шиль Ким, Джиён Чой, Ён Ун Вон, Чон Хе Чой и Ён Юл Ли*

*Отримано: 21 Серпня 2012 / Прийнято: 6 Грудня 2012 / Опубліковано онлайн: 8 Січень 2013*

*# Міжнародне товариство онкології та біомаркерів (ISOBM) 2013*

*Б. Б. Парк: Дж. ів. Юн: Е.С. Кім: Дж.Дж.Сімпсон. Цой:*

*Дж.sh. Відповідальний: Дж. Цой: Ю. Ю. Лі*

*Кафедра внутрішньої медицини, Медичний коледж Університету Хань Ян, Сеул, Південна Корея*

*Кафедра гематології / онкології, кафедра внутрішньої медицини, Університетська лікарня Хань Ян , 17 Хаенг Данг-донг, Сун Донг-ку,*

*Сеул 133-792, Южная Корея e-mail: leeyu@hanyang. змінного струму. Кр*

### Резюме

Екстракти рослини *Artemisia asiatica* Nakai (Asteraceae) використовуються в традиційній східній медицині для лікування запалення. Еупатилін (5,7-дигідрокси-3', 4', 6-триметоксифлавонон) є одним з фармакологічно активних компонентів, що містяться в *A. Asiatica*, і було показано, що він має протипухлинну дію при деяких злоякісних новоутвореннях, включаючи рак шлунка. Однак його антиметастатичний ефект при раку шлунка практично невідомий. У цьому дослідженні було вивчено антиметастатичну дію eupatilinu на клітинну лінію раку шлунка людини MKN-1. Еупатилін пригнічував ріст MKN-1 у дозо- та часозалежний спосіб та індукував апоптоз при підвищенні активності каспази-3. ІФА продемонстрував, що вивільнення прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6 та ІЛ-8) значно знижувалося eupatilinom. І p-AKT, і p-ERK (p44/42) були знижені  $\beta$ . У системі транскрипції репортера активність фактора транскрипції, NF- $\kappa$ B, знижувалася eupatilinom, а експресія p65 придушувалася при обробці клітин MKN-1 eupatilinom. Більш того, зимографічне дослідження показало, що це зниження інвазивного потенціалу було результатом зниження колагенолітичної (желатинолітичної) активності IV типу. Експресія металопротеїназів (ММП-2 і ММП-9) також знижувалася в клітинах MKN-1, оброблених eupatilinom. У тесті на інвазію *in vitro* eupatilін інгібував MKN-1 шляхом проникнення в знижені бар'єри базальної мембрани. Ці результати свідчать про те, що eupatilін пригнічує проліферацію ракових клітин шлунка MKN-1 шляхом активації каспази-3 і метастатичний потенціал ракових клітин шлунка шляхом придушення активності NF- $\kappa$ B з подальшим зниженням експресії, опосередкованої прозапальними цитокінами MMR.

**Ключові слова:** Гальмування росту. Рак шлунка. Еупатилін. Метастазування. Інвазія

### Вступ

Дві характерні риси визначають рак. Нерегульований ріст клітин і тканинна інвазія/метастазування. На метастазування значною мірою впливають зміни експресії генів і фактори мікрооточення. Для повного метастазування пухлини клітини вторгаються в навколишні тканини, а судинні або лімфатичні судини утворюють метастатичні колонії у віддалених місцях після того, як компоненти позаклітинного матриксу (ECM) руйнуються. Клітини змінюють свою адгезійну взаємодію між клітиною-клітиною і клітиною-матрицею для інвазії.

Рак шлунка зазвичай показує велику локальну інвазію пухлини і раннє поширення на місця метастазування, особливо на регіонарні лімфатичні вузли [1]. Клітини метастазування раку шлунка в основному залежать від міграції через позаклітинні бар'єри до вторинних ділянок [2, 3]. Зокрема,

інвазія базальної мембрани проходить через ряд дискретних ступенів.

Злоякісні пухлини мають здатність руйнувати міжклітинний матрикс шляхом контрольованого протеолізу. Одним з важливих компонентів системи протеолізу, що бере участь у цьому процесі, є активатор плазміногену типу урокінази (uPA). Серин-протеаза uPA перетворює профермент плазміногену в плазмін, який здатний руйнувати позаклітинний матрикс прямо або опосередковано через активацію матричних металопротеїназ (ММП). uPA та його специфічна рецепторна система (uPAR) активуються при інвазивному раку. Було виявлено, що різні прозапальні цитокіни, включаючи TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  та IL-6, стимулюють uPA. Підвищення рівня прозапальних цитокінів серед мікроорганізмів погіршує здатність клітин агрегувати та досягнення ущільнення. Дислокація (міжклітинна дисоціація), викликана прозапальними цитокінами, була пов'язана з невпорядкованою експресією E-cadherin / $\beta$ -catenin в місцях міжклітинного контакту. Стимуляція, опосередкована прозапальними цитокінами, активує кілька внутрішньоклітинних сигнальних молекул, таких як  $\beta$ -катенін і його партнер T-клітинний фактор (Tcf) -4 [4, 5]. Було показано, що  $\beta$ -Катенін відіграє подвійну роль як основний структурний компонент міжклітинних з'єднань, а також активатор транскрипції. Крім того,  $\beta$ -катенін бере участь в онкогенезі шляхом трансактивації фактора транскрипції лімфоїдного фактора-підсилювача /T-клітинного фактора (Lef / Tcf). Деякі гени, експресія яких посилюється за рахунок сигналізації  $\beta$ -катенін / Tcf, - це c-jun, c-myc, фібронектин, циклін D1, ММП та uPA [6, 7]. МСП відіграють ключову роль у міграції нормальних і злоякісних клітин через базальну мембрану і регулюються різними прозапальними цитокінами [8–10]. При раку шлунка інфекція *Helicobacter pylori* впливає на індукцію прозапальних цитокінів через внутрішньоклітинні сигнали [11–13]. Ці цитокіни, такі як фактор некрозу пухлини  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкін-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерлейкін-8 (IL-8) взагалі вважаються секретними епітеліальні клітини шлунка і інфільтруючі клітини, такі як макрофаги і лімфоцити [14–16], а їх вироблення в пухлинних ділянках підвищує активацію NF- $\kappa$ B в клітинах карциноми, що підвищує інвазивність клітин карциноми за рахунок збільшення експресії молекул, пов'язаних з інвазією типу ММП [9, 17, 18]. В даний час багато дослідників зосереджені на виявленні інгібіторів прозапальної інвазивності цитокін-опосередкованої карциноми з різних природних продуктів. Наприклад, 2', 8'-біапигенін з *Selaginella tamariscina* модулює експресію iNOS і ЦОГ-2 в Сирому 264,7 макрофагів, стимульованих ліпополісахаридом. Він блокує трансактивацію генів iNOS і COX-2 шляхом інактивації NF- $\kappa$ B, запобігаючи ядерній транслокації p65 [19]. DA-6034 (7-карбоксиметилокси-3', 4', 5-триметоксифлавонон) - синтетичний флавоноїд з протизапальною активністю [20]. Апігенін, фармакологічна властивість фракції, виділеної з екстракту метанолу *Matricaria chamomilla*, як інгібітор активації NF- $\kappa$ B, знижує експресію NF- $\kappa$ B-залежного репортера гена і регулює NF- $\kappa$ B гени [21]. Антиметастатичні ефекти можуть бути пов'язані не тільки з порушенням проліферації клітин, але і з подальшим пригніченням експресії набору прометастатичних генів, таких як прозапальні цитокіни, молекули адгезії клітин і ММП. Останнім часом кілька досліджень повідомили, що 5,7-дигідрокси-3'4'6-триметоксифлавонон (еупатілін) ефективно гальмує ріст пухлинних клітин [22–24].

З'ясовано вплив еупатиліну на ріст пухлини, мало відомо про його можливий вплив на пластичність пухлинних клітин, що стало ключовим параметром пухлинної інвазії та метастазування. Вплив еупатиліну на інвазію пухлини може бути функціонально пов'язане з сигнальним каскадом, що призводить до інвазії пухлини. Це дослідження демонструє, що еупатилін ефективно пригнічує ріст клітин MKN-1, активуючи каспазу-3 та вивільняючи прозапальні цитокіни, які впливають на активацію NF-κB та експресію MMP. Крім того, аналіз інвазії *in vitro* показав, що еупатилін інгібував інвазію клітин MKN-1 людини за рахунок зниження експресії матричних металопротеїназ (ММП-2 і 9). Ці результати свідчать про те, що еупатилін можна використовувати як хіміопрофілактичний засіб і антиметастатик при раку шлунка людини.

## Матеріали і методи

### Культура клітин і хімічні речовини

Клітинна лінія карциноми шлунка людини, MKN-1 і AGS, була отримана з Американської колекції культур типу (ATCC), а SNU-484, SNU-601, SNU-638 були отримані з Korea Cell Line Bank і збережені в середовищі rpmi-1640 з добавками. з 10% термоінактивованою сироваткою плода великої рогатої худоби, пеніциліном (100 ОД/мл) та стрептоміцином (100 мкг/мл; Gibco-BRL, Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Всі клітини карциноми шлунка були культивовані в сильно зволоженій атмосфері 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. Еупатилін поставлявся компанією Dong-A Pharmaceutical Co. TOB (Йонг-Ін, Корея) і розпущений в DMSO. Хімічний інгібітор активатора NF-κB (похідне 6-амінохіназоліну) був придбаний у Calbiochem Corp. (Сан-Дієго, Каліфорнія), Іл-1β був придбаний у R&D Systems (Міннеаполіс, Міннесота).

### Життєздатність клітин

Пригнічення росту еупатиліну MKN-1 досліджували за допомогою набору для підрахунку клітин-8 (DOJINDO Laboratories, Японія). Коротко в кожну лунку 96-лункової культуральної пластини культури тканин висівали 1 × 10<sup>4</sup> клітини. Через 24 години середовище замінили на середовище, що містить різні концентрації еупатиліну, а через 72 години інкубації додали 10 мкл розчину набору для підрахунку клітин і інкубували протягом 4 годин в CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Поглинання свердловин вимірювали за допомогою зчитувача мікропластин (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Франція) на 540 нм. Середні значення і стандартні відхилення обчислюються за результатами трьох незалежних експериментів. Для визначення виживаності нормувалися значення абсорбції в порівнянні з контрольними. Кожен тест проводився в трьох примірниках.

### Активність каспази-3

Апоптотичний вплив еупатиліну на клітини MKN-1 досліджувався за допомогою системи аналізу CaspACE (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) згідно з інструкцією виробника. Коротко 1 × 10<sup>6</sup> клітин інкубували в колбі культури тканин з / без еупатиліну і з/ без біотину-зВКД-фмк (інгібітор). Після інкубації протягом потрібного часу клітини MKN-1 промивали крижаним фосфатно-сольовим буфером, а потім ресуспендували в буфері лізису клітин. Після лізису цілі клітинні лізати використовували в наступні досліді. Вміст білка в клітинних екстрактах визначали за допомогою аналізів BSA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

### Зимографія ПЛР в режимі реального часу

Загальна РНК була приготовлена з клітин МКН-1, оброблених еупатиліном в різних концентраціях за допомогою міні-наборів RNeasy (Qiagen). Один мікрограм загальної РНК пройшов зворотну транскрипцію за допомогою синтез-набору iScript™ cDNA (Bio-Rad Laboratories, США), а плр-ампліфікація в реальному часі була проведена за допомогою попереднього виробництва розробив набори експресії генів на вимогу для гена MMP-2. (Ідентифікатор аналізу Hs00192708\_m1, номер доступу до банку генів NM\_005099, прикладні біосистеми) та ген MMP-9 (ідентифікатор аналізу HS00199841\_m1, номер доступу до банку генів NM\_007038, Прикладна біосистема) та реагенти контролю TaqMan® 18S (Прикладні біосистеми) 18 с рРНК (ідентифікатор аналізу Hs9999901\_s1, реєстраційний номер банку генів X 03205) в у поєднанні з Універсальним ПЛР Майстер Міксом TaqMan®. Всі реакції проводилися в трьох примірниках з використанням 20 мкл зразка, що містить 50 нг кДНК. Використовуваний протокол реакції передбачав нагрівання протягом 2 хвилин при 50 °С і 10 хвилин при 95 °С з подальшим 40 циклами посилення (15 с при 95 °С і 1 хв при 60 °С). Аналіз проводився за допомогою програмного забезпечення ABI PRISM 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems, Foster City, Каліфорнія). Здійснювалося з використанням стандартних кривих, отриманих за допомогою послідовних розведень осередків МКН-1. Стандартні криві були побудовані, припускаючи лінійну залежність між числом першого циклу, в якому флуоресцентний сигнал значно збільшився (значення Ct), і логарифм вихідного значення. Контрольні зразки включалися в кожну аналітичну таблетку для перевірки узгодженості між таблетками. Кількісна ЗТ-ПЛР проводилася тричі для кожного набору праймерів проби, а для кількісної оцінки використовувалося середнє значення трьох експериментів.

### C-1000 000 000 0

Всього РНК були виділені за допомогою реактиву TRI (Center for Molecular Research, Inc. Цинциннаті, штат Огайо, США), і cDNA був синтезований з 1 мкг загальної РНК за допомогою зворотної транскриптази ImProm-II (Promega Corporation, Медісон, Вісконсин, США) за допомогою випадкових гексамерів. У ПЛР-реакції використовувалися такі праймери: датчик ІЛ-6, GTAGCCGCCCCAC] ACAGA; Антисенс ІЛ-6, GCCATCTTTGGAAGGT TCAGG; G A PDH s ense, A CTG ATTT G G TC GTATTGGGCG; antisense, CTCCTGGAAGATGGTGATGG. Реакцію ампліфікації проводили в об'ємах 20 мкл при 95 °С протягом 5 хвилин, 28 циклів при 95 °С протягом 30 секунд, 54 °С протягом 45 секунд, 72 °С протягом 30 секунд і, нарешті, 10 хвилин при 72 °С. 3. Для оцінки ефективності синтезу кДНК з кожної диференційованої клітини в якості внутрішнього контролю застосовувався GAPDH. Препарати ПЛР були розділені на 1,2% агарозного гелю Seakem і проаналізовані після броміду етидію.

## Аналіз вестерн-блотів

Культуровані клітини стимулювалися з або без інгібітора NF-κB та еупатиліну. Потім ці оброблені клітини промивали один раз крижаним фосфатно-сольовим буфером і лізисували в буфері лізису [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM FMSF, 5 мг/мл лейпептину і 5 мг/мл апротиніну]. Рівні кількості протеїнового лізату були розділені електрофорезом в 10% SDS, поліакриламідному гелі, і переведені в мембрани полівінілідендифторидів (Millipore, Bedford, MA). Потім мембрани блокувалися в трис-буферному фізіологічному розчині, що містить 0,05% Твін 20 і 5% сухого знежиреного молока, протягом 1 години при кімнатній температурі і інкубований з відповідним первинним антитілом протягом 2 годин. Імунореактивні білки були виявлені за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) і реагент з посиленою хемілюмінесценцією (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). У цьому дослідженні були використані наступні антитіла: анти-I-κB, антифосфо-I-κB-α, anti-NF-κB p65 (F-6), анти- NF-κB p 50, антикаспаза-3, анти-Бакс, анти-Mcl-1 і анти-β-актин (Санта-Крус, Каліфорнія, США). Людський антифосфо-ЕРК, Анти-Тотальний ЕРК людини, Анти-фосфо-ГСК-3 людини β, Людський анти-Тотальний ГСК-3 β, Людина антифосфо-АКТ, людський анти-тотальний АКТ і людський анти-β-катенін і людський антиупарт були придбані в Cell signaling Technology, Інк. (Денверс, Массачусетс).

## ІФА

Клітини MKN-1 (5 × 10<sup>4</sup> клітини/свердловина) в шестимісячних пластинах інкубували при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> в об / хв, що містить 10% FBS. Через 24 години клітини промивали і інкубували протягом 24 год в середовищі без сироватки крові з/без еупатиліну (50 мкМ). За допомогою кількісного ІФА (R) визначали кондиційне культуральне середовище, центрифугували та визначали концентрації ФНП-α, ІЛ-1β, ІЛ-6 та ІЛ-8 за допомогою кількісного ІФА (R) & D systems, Міннеаполіс, Міннесота) згідно з інструкцією виробника. .

## Трансфекція та репортерський аналіз

Для вивчення впливу еупатиліну на активацію прозапальної цитокін-індукованої активації NF-κB в клітинах MKN-1 був проведений тимчасовий трансфекційний аналіз з використанням плазміди NF-κB-Luc (System biosciences, Mountain Вид, ЦА). Коротко клітини MKN-1 були тимчасово трансфектовані за допомогою реактиву LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) з 1,6 мкг плазміди NF-κB-Luc протягом 6 годин у середовищі реагент для трансфекції. Через 6 годин додавали RPMI-1640, що містить 10% фетальної бичачої сироватки. Через 24 години трансфектовані клітини MKN-1 попередньо обробляли або 50 мкМ еупатиліном, або 2 мкМ 6-аміно-амінохвазоліном. Після додаткової інкубації протягом 12 годин проводили заміну безсировочне середовища культури, а потім лікують прозапальними цитокінами (2 нг/мл ІЛ-1β) протягом 5 годин. Клітини були оброблені для отримання загального клітинного лізату для аналізу гена репортера люциферази та аналізу β-галактозидази (Promega) відповідно до протоколу виробника. Активність люциферази нормалізувалася в β-галактозидазі активності для контроль ефективності трансфекції.

## Матрі-гель-аналіз

Тести на інвазію проводилися в клітинах Бойдена відповідно до рекомендацій виробника (BD bioscience. США). Коротше кажучи, нижні відсіки камери були заповнені RPMI1640, а потім між верхнім і нижнім відсіками камери була розміщена мембрана фільтра з полікарбонату IV типу з колагеновим покриттям (25 мкг/мембрана). Клітини MKN-1 (1 × 10<sup>5</sup> клітин / 200 мкл RPMI-1640) потім висівали у верхні камери за наявності або відсутності еупатиліну, ІЛ-1β і

Інгібітор NF-κB, відповідно. Камбери інкубували при 37°C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> протягом 48 годин. Після інкубації протягом 48 годин фільтри були видалені, а клітини, які мігрували в нижні поверхні полікарбонатних фільтрів фіксували метанолом і фарбували кристалічним фіолетовим кольором. Забарвлені осередки підраховували під мікроскопом, а результати інгібування виражали як кількість осередків MKN-1 в польових умовах.

### Статистичний аналіз

Всі експерименти повторювалися в трьох примірниках, а результати виражаються у вигляді середнього ± стандартного відхилення. Статистичні оцінки проводилися з використанням критерію Стьюдента. Зірочка (\*) вказує на статистично значуще значення для необробленого контролю і  $P < 0,05$ .

## Результати

### Придушення росту клітинних ліній раку шлунка еупатиліном

Вплив пригнічення росту еупатиліну на набір клітинних ліній раку шлунка людини (MKN-1, AGS, CNU-484, CNU-601 і CNU-638) був протестований за допомогою набору аналізу проліферації KCK-8. Лікування клітин еупатиліном протягом 3 днів призводило до дозозалежного пригнічення росту, а кількість інгібування росту варіювалася між різними клітинними лініями з IC<sub>50</sub> в діапазоні від  $5 \times 10^{-5}$  до  $1 \times 10^{-4}$  M (рис. 1a). Еупатилін (200 мкл) індукував апоптоз в клітинах MKN-1 в поєднанні з підвищеною активністю каспази-3. [ 1 (b), апрегуляція проапоптотичної молекули, Вах, і зниження регуляції антиапоптотичних молекул, proforma caspase 3, і Mcl-1 як функція часу (рис. 1c). Ці результати свідчать про те, що еупатилін пригнічує ріст MKN-1 шляхом активації каспази-3.

### Еупатилін пригнічує фосфорилування АКТ і ERK в клітині MKN-1

Для вивчення того, який шлях бере участь в апоптозі, індукованому еупатиліном, були досліджені закономірності p-AKT і p-ERK в клітинах MKN-1, вирощених при різних концентраціях еупатиліну. П'ятдесят мікромольових еупатиліну ефективно знижували p-AKT і p-ERK. (Рис. 2). Було висловлено припущення, що апоптоз, індукований еупатиліном, регулюється активацією як шляху PI3K/AKT, так і шляху MAPK.

### Еупатилін пригнічує активацію NF-κB прозапальними цитокінами в ракових клітинах шлунка людини MKN-1

Активація NF-κB через цитокін-опосередковану клітинну сигналізацію виявлена при злоякісних пухлинах. Прозапальні цитокіни стимулюють активність NF-κB, а його активація викликає їх секрецію. Виділені цитокіни можуть впливати на проліферацію пухлинних клітин автокринним способом. Для дослідження він може Чи знижував еупатилін вироблення прозапальних цитокінів в пухлинних клітинах, продукцію прозапальних цитокінів вимірювали в попередньо оброблених клітинах MKN-1.

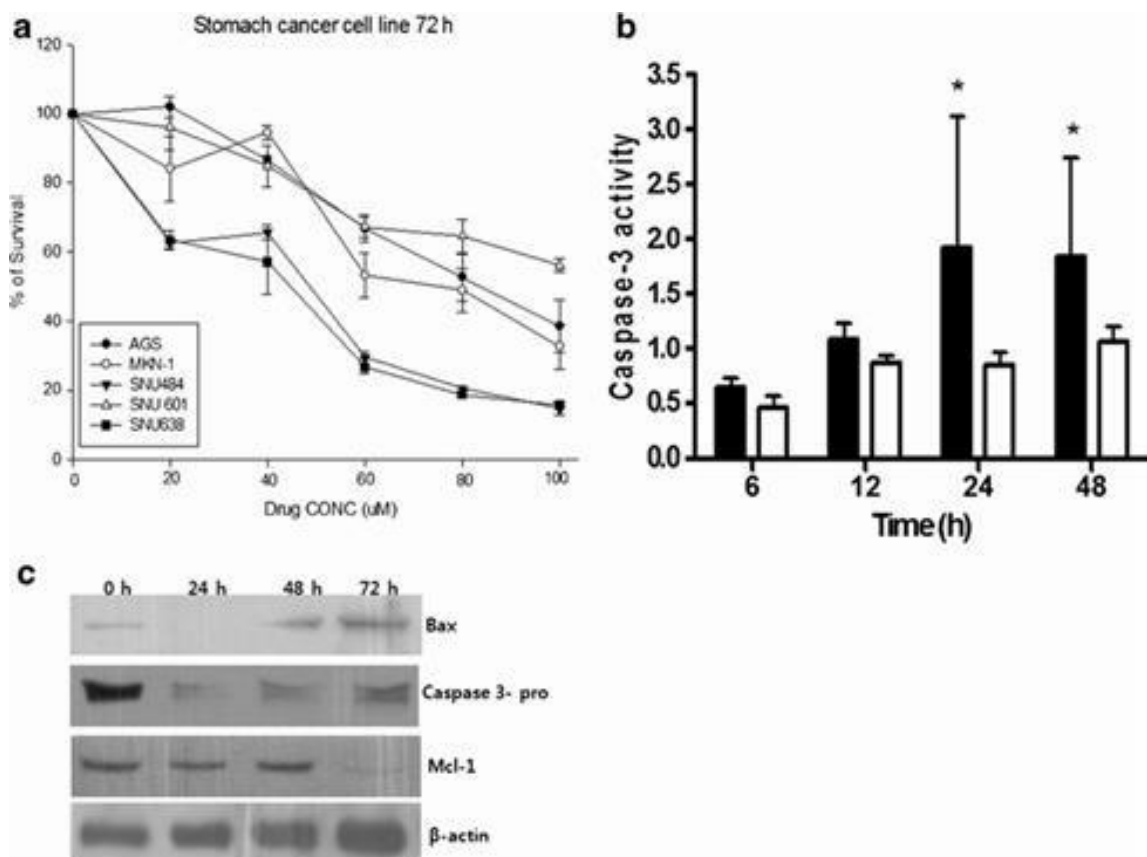


Рис. 1. Вплив еупатиліну на клітинну лінію раку шлунка людини MKN1. Цитотоксичність еупатиліну проти клітинних ліній раку шлунка людини. Інгибування проліферації клітин еупатиліном було проаналізовано за допомогою набору аналізу проліферації CCK-8, як описано в матеріалах і методах. Клітини ( $1 \times 10^3$ ) були засіяні в кожна свердловина з 96-лункових мікротитрових плит. Через 24 години середовище замінили на середовище, що містить різні дози еупатиліну (від 20 до 100 мкМ). Через 72 години інкубації оптичну щільність визначали за допомогою зчитувача мікрокультури (Vecton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Франція) на 540 нм. Значення абсорбції нормувалися в порівнянні зі значеннями сирих контролів для визначення виживаності. Кожен аналіз проводився в трьох примірниках. **b** Вплив еупатиліну на активність каспази-3. Клітини MKN-1 ( $2 \times 10^4$ /лунка), що ростуть в культуральних пластинах, обробляли 200 мкМ еупатиліном і біотином-зВКД-фмк відповідно. Лізат цільних клітин збирали на 6, 12, 24 і 48 годин. Рівні активності каспази-3 в клітинах вимірювали за допомогою пробірної системи CaspACE (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) відповідно до інструкції виробника. Тверда смуга вказує на активність каспази-3 з еупатиліном 200 мкМ. Відкрита смуга вказує на активність каспази-3 з інгібітором каспази-3. Зірочка вказує на статистично значущу різницю ( $P < 0,05$ ). **c** Індукція апоптозу в клітинах MKN-1 з еупатиліном. Клітини MKN-1 обробляли 100 мкМ і збирали цільноклітинні лізати через 24, 48 і 72 години. Експресія Bax, caspase-3 і Mcl-1 визначалася західним блотингом з 50 мкМ еупатиліну і 2 мкМ б-амінохіназоліну відповідно в протязом 24 годин з використанням ІФА та ЗТ-ПЛР.

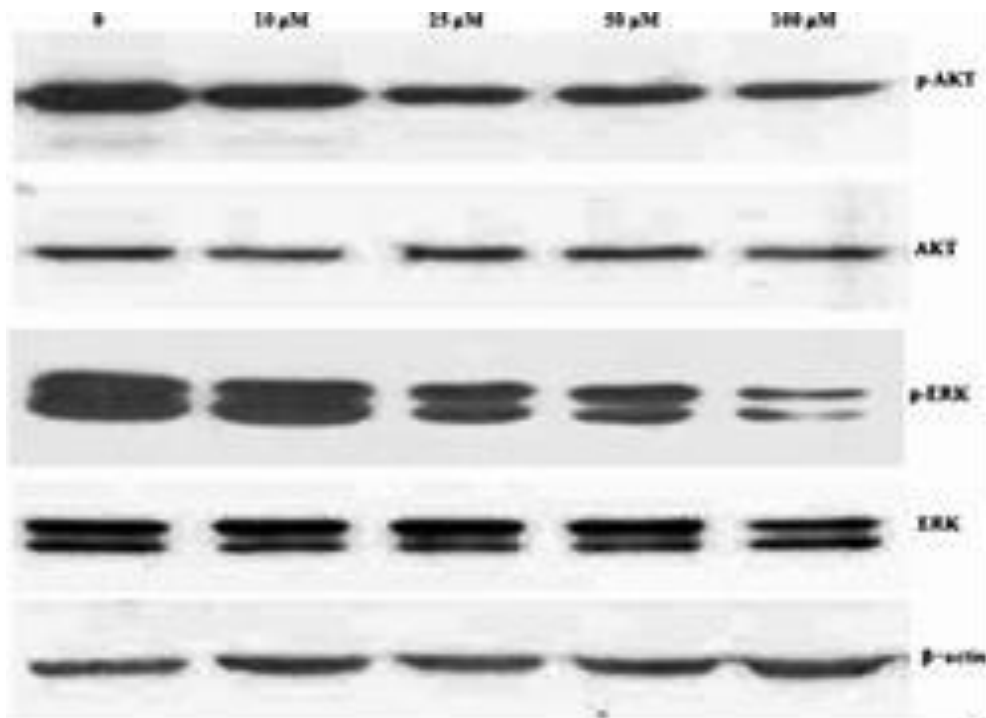


Рис. 2 Для вивчення регуляції фосфорилування ЕРК і фосфорилування АКТ еупатиліном. Для вивчення регуляції фосфорилування АКТ і фосфорилування ЕРК еупатиліном, після обробки клітин МKN-1 з різними концентраціями еупатиліну (10, 25, 50 і 100 мкМ) проводилося дослідження фосфорилування АКТ і фосфорилування ЕРК. 1 контроль, 2 лікування еупатиліном 10 мкМ, 3 лікування 25 мкМ еупатиліном, 4 лікування 50 мкМ еупатиліном, 5 лікування 100 мкМ еупатиліном.

Виміряно кількість цитокінів у кондиційному середовищі. Рівні редукції ІЛ-1  $\beta$  та ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6 та ІЛ-8 у кондиційному середовищі оброблених еупатиліном клітин МKN-1 зменшилися більш ніж наполовину при 50 мкМ (рис. 3). що зниження секреції цитокінів під дією еупатиліну було дуже схоже на зниження секреції цитокінів під дією 6-амінохіназоліну (інгібітора активатора NF- $\kappa$ B). Ці результати свідчать про те, що еупатилін діє як інгібітор цитокінін-опосередкованої активації NF- $\kappa$ B в пухлинних клітинах і може регулювати активність NF- $\kappa$ B за допомогою прозапальних цитокінів у клітинах МKN-1. Для подальшого дослідження ролі еупатиліну в клітинах МKN-1 як інгібітора активації NF- $\kappa$ B активація NF- $\kappa$ B була досліджена за допомогою репортерського аналізу та західного блоттингу. У репортерському аналізі зниження активності люциферази більш ніж на 50% було виявлено в клітинах МKN-1, які отримували або еупатилін, або 6-амінохіназолін. Їх зниження було статистично значущим ( $P < 0.05$ ). Крім того, додаткове західне промокання показало, що р65 і р50 (субодиниця NF- $\kappa$ B) були пригнічені в МKN1, обробленому еупатиліном, в залежності від час від часу, в той час як р-ІКБ- $\alpha$  (інгібуюча молекула NF- $\kappa$ B) з часом регулюється.

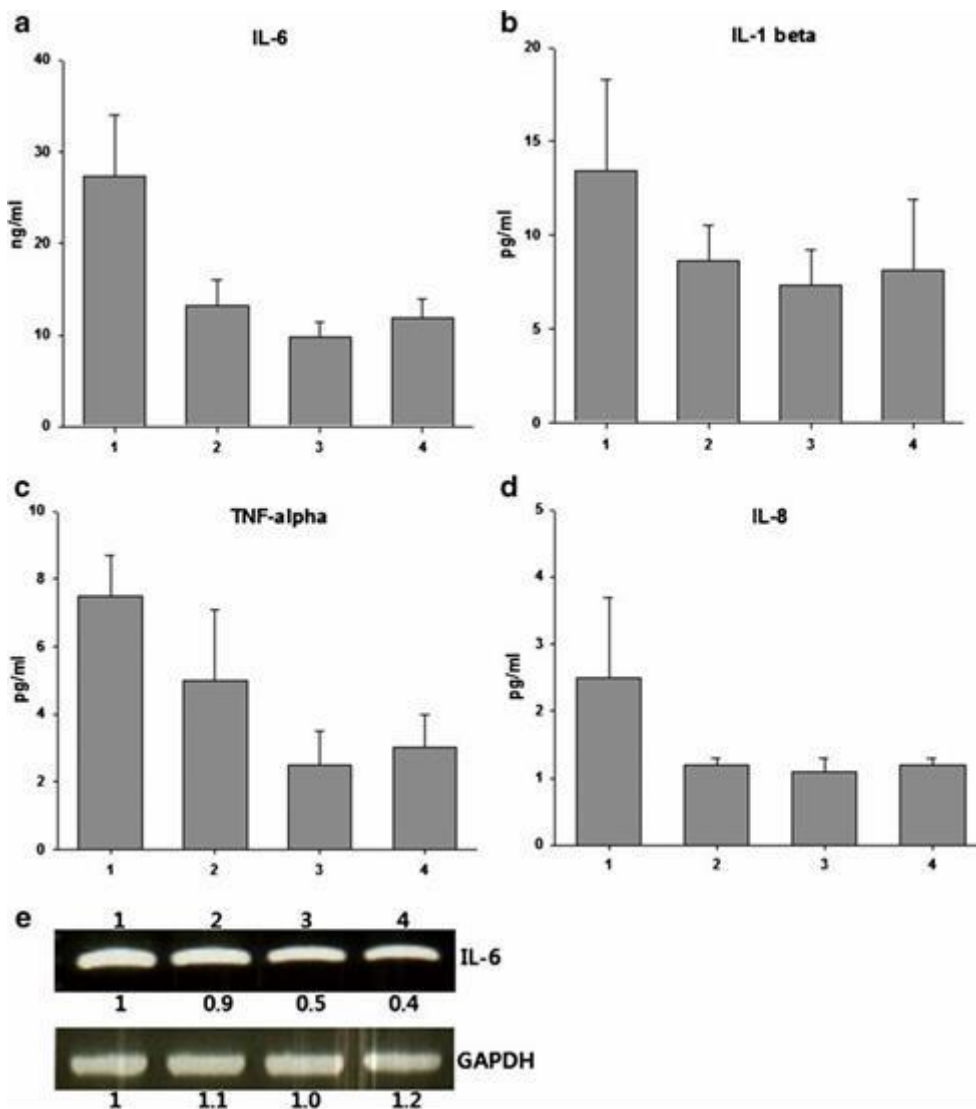
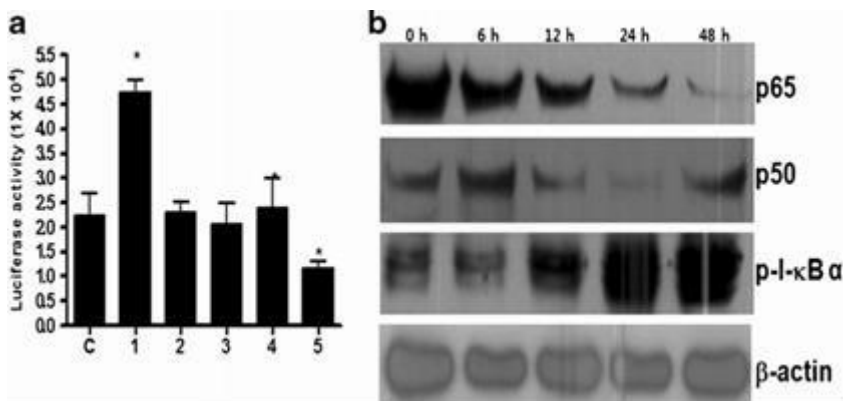


Рис. 3 Пригнічення секреції прозапальних цитокінів еупатиліном. Щоб перевірити, чи еупатилін пригнічує секрецію прозапальних цитокінів, ІФА виміряв кількість ІЛ-6, В ІЛ-1 $\beta$ , с TNF- $\alpha$  та d ІЛ-8 у супернатанті. Клітини ( $1 \times 10^3$ ) висівали в кожну лунку шестимісячної таблетки. Через 24 години було замінено безсирову культуральну середу, що містить 50 мкМ еупатиліну або 2 мкМ амінохіназоліну. Супернатанти збирали після додаткової інкубації протягом 72 годин, а потім вимірювали кількість ІЛ-6, ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$  та ІЛ-8 за допомогою ІФА. Показані дані є середніми значеннями  $\pm$  стандартним відхиленням трьох незалежних експериментів. Зірочка вказує на статистично значущу різницю ( $P < 0,05$ ). експресія е Іл-6 в клітинах МКН-1 з 50 мкМ еупатиліну і 2 мкМ б-амінохіназоліну за допомогою ЗТ-ПЛР. Кожен трек означає 1 контроль, 2 лікування 50 мкМ еупатиліном, 3 лікування б-амінохіназолін 2 мкМ, 4 комбіноване лікування 50 мкМ еупатиліном і 2 мкМ б-амінокіназоліном.



(Рис. 4б). Разом узяті, ці результати свідчать про те, що еупатилін може інгібувати ріст клітин МKN 1 через сигнальний шлях NF-κB.

### Еупатилін знижує експресію інтегрину αvβ3, β-катеніну і uPAR, що призводить до активації NF-κB.

Пухлинна інвазія регулюється за допомогою активації клітинної сигналізації, опосередкованої uPA/uPAR. Рівні експресії uPAR, інтегрину та β-катеніну відіграють вирішальну роль у деградації ЕКМ металопротеїназами. У цьому дослідженні еупатилін придушив експресію інтегрину αvβ3 і β-катеніну, що вказує на те, що 50 мкМ еупатиліну ефективно пригнічували експресію інтегрину αvβ3 і β-катеніну (рис. 5). Крім того, експресія p-ГСК-3 β підвищена при лікуванні еупатиліном. Однак зміни експресії uPAR не відбулося. Оскільки регуляція ГСК-3 β-катеніну β тісно пов'язана з активацією NF-κB, індукція β-катеніну через шлях АКТ може брати участь у секреції прозапальних цитокінів, таких як ФНП-α, ІЛ-1β та ІЛ-6.

### Еупатилін зменшує інвазію пухлини in vitro за рахунок желатинолітичної активності

Наведені вище результати показали, що еупатилін пригнічує вироблення ІЛ-1β, ФНП-α, ІЛ-6 і ІЛ-8 из клеток МKN-1.

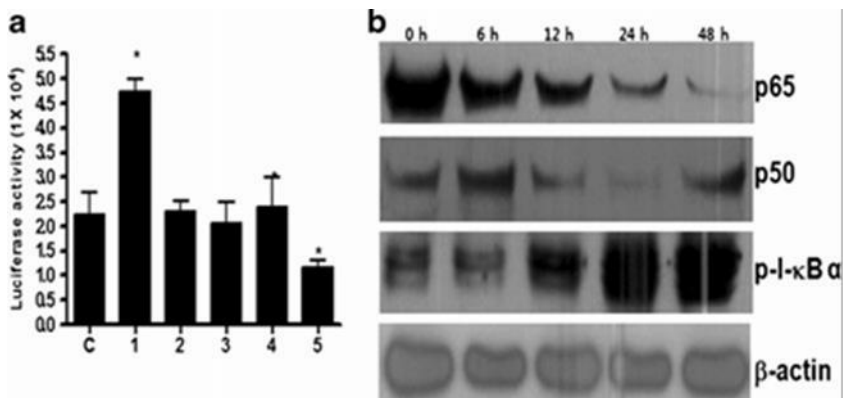


Рис. 4 Інгібування NF-κB-залежної транскрипції еупатиліном. Еупатилін інгібує NF-κB-залежну транскрипцію. МKN-1 трансфектували векторами люциферази NF-κB. Через 24 години клітини обробляли еупатиліном (попередня обробка 12 годин) та/або 2 нг/мл ІЛ-1β протягом додаткових 5 годин. Годин. Стопці являють собою множинну зміну відносної люмінесценції для трьох зразків (необроблена вибірка 01); Стрижні SD. \* P < 0.05. Кожна доріжка означає контроль C, 1 2 нг/мл лікування ІЛ-1β, 2 50 мкМ еупатиліну, 3 2 мкМ 6-амінохіназоліну 4 Лікування 2 нг/мл ІЛ-1 β в клітинах МKN-1, попередньо оброблених еупатиліном 50 мкМ, 5 2 нг/мл лікування ІЛ-1β в клітинах МKN-1, попередньо оброблених 2 мкМ 6-амінохіназолін. Б. Виявлення субодиниць NF-κB в клітинах МKN-1, оброблених 100 мкМ еупатиліну в зазначені моменти часу, і його лікування також гальмували активацію

NF-κB через стимули ІЛ-1 β в клітинах МKN-1. Ці ефекти еупатиліну можуть опосередковано впливати на експресію металопротеїнази, яка є ключовим білком проти інвазії пухлини. На підставі цього була досліджена желатинолітична активність, експресія ММП-2 і ММП-9. У клітинах МKN-1 була виявлена активність функціональної деградації, ідентична тій, що викликана ММП-9 (92 кДа) і ММП-2 (72 кДа). Культуральні супернатанти з клітин МKN-1, попередньо оброблених еупатиліном 250 мкМ або 2 мкМ 6-амінокіназоліном, продукують частково зруйновані ділянки подразниками ІЛ-1 β, що свідчить про те, що еупатилін пригнічував активність желатинази (рис. 6). Для підтвердження супресії ММП-2 і ММП-9 еупатиліном була проведена кількісна ПЛР, і було встановлено, що ці вирази придушуються або при лікуванні еупатиліном, або 6-амінокіназоліном.

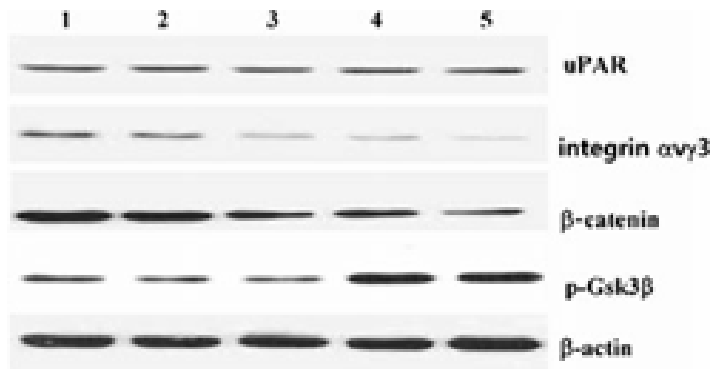
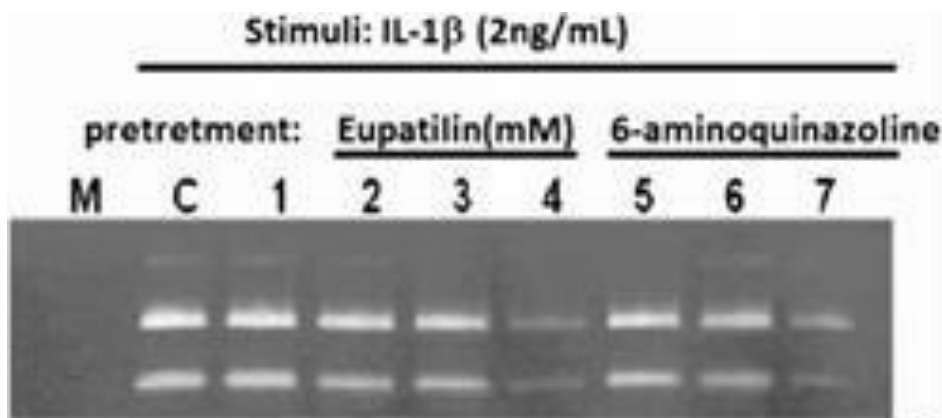
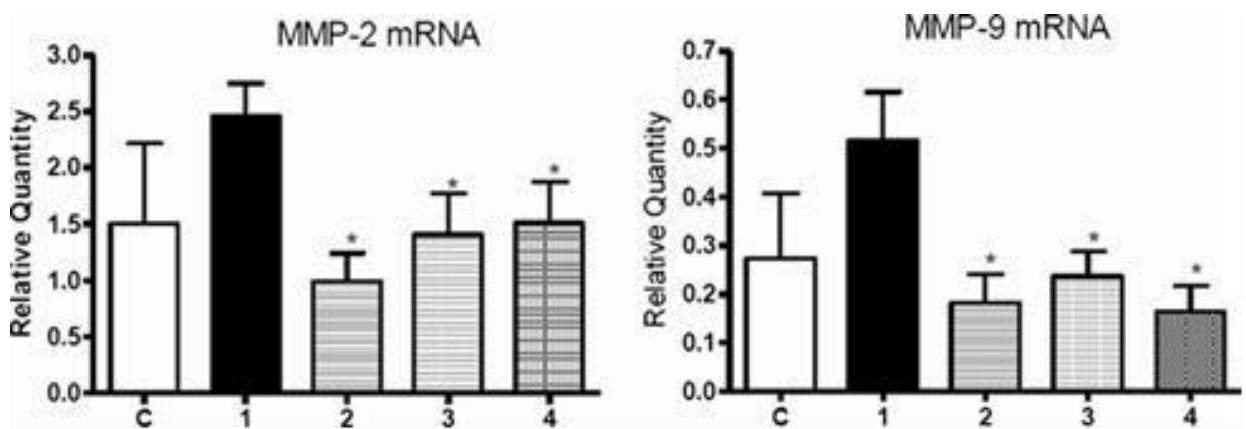


Рис. 5 Еупатилін знижує експресію інтегрину αvβ3, β-катеніну і uPAR, що призводить до активації NF-κB. Оскільки шлях uPA/uPAR тісно пов'язаний з прогресуванням інвазії пухлини через деградацію ЕКМ металопротеїназами, регуляція експресії інтегрину αvβ3, β-катеніну, p-GSK-3 β та uPAR з еупатиліном може відігравати вирішальну роль при прогресуванні пухлинної інвазії. Для вивчення регуляції інтегрину αvβ3, β-катеніну і uPAR з еупатиліном, після лікування клітин МKN-1 з різною концентрацією еупатиліну (10, 25, 50 і 100 мкМ протягом 24 годин), були досліджені рівні експресії інтегрину αvβ3, β-катенін, p-ГСК-3 β і uPAR. 1 контроль, 2 лікування 10 мкМ еупатиліну, 3 лікування 25 мкМ еупатиліну, 4 лікування 50 мкМ еупатиліну, 5 обробка 100 мкМ клітин еупатиліну МKN-1 порівняно з контролем (рис. 7). Система, яка використовується для кількісної оцінки інвазії пухлини *in vitro*, була налаштована так, як описано в матеріалах і методиках. Кількість інвазивних клітин МKN-1 подвоїлася в клітинах МKN-1, обробляють 2 нг/мл ІЛ-1β. Еупатилін додавали у верхні камери при кінцевих концентраціях 50 мкМ або 50 мкМ еупатиліну плюс 2 нг/мл ІЛ-1β, демонструючи цю інвазію МKN-1 був помітно зменшений вдвічі при 50 мкМ еупатиліну або 50 мкМ еупатиліну. плюс 2 нг/мл іл-1β. Також зниження інвазії спостерігалось при 2 мкМ 6-амінокіназоліну (інгібітора NF-κB) плюс 2 нг / мл ІЛ-1β (рис. 8). Придушення пухлинної інвазії *in vitro* за допомогою еупатиліну.



Малюнок 6. Зимографічний аналіз желатинолітичних ферментів, що виділяються клітинами карциноми шлунка людини МKN-1. Після раку шлунка людини МKN 1 клітини шлунка попередньо лікуються різними концентраціями еупатиліну і 6-амінохіназоліну відповідно протягом 24 годин, попередньо оброблені клітини МKN-1 інкубується в культуральному середовищі без сироватки крові, що містить 2 нг/мл ІЛ-1 $\beta$  протягом 12 годин. Через 12 годин інкубації культуральні супернатанти піддавали зимографії на желатинсодержащих гелях. Після електрофорезу білки на гелях ренатурували, а потім інкубували при 37° С . Протягом 72 годин в реакційній суміші з 5 мМ СаCl<sub>2</sub>. Маркер М, контрольний С, лікування 1 2 нг/мл ІЛ-1 $\beta$ , 2 обробка 2 нг/мл іл-1 $\beta$  в попередньо оброблених клітинах МKN1 50 мкМ еупатіліном, 3 лікування 2 нг/ мл ІЛ-1 $\beta$  в попередньо оброблених клітинах МKN1 еупатіліном 100 мкМ, 4 обробки по 2 нг/ мл ІЛ-1 $\beta$  в попередньо оброблених клітинах МKN1 250 мкМ з еупатіліном 5, лікування 2 нг/мл ІЛ-1 $\beta$  в попередньо оброблених МKN1 2 нМ 6-амінохіназолінових клітинах, 6 2 Лікування ІЛ-1 $\beta$  в нг/мл попередньо обробленого МKN1 50 нМ 6-амінохіназоліну 7 клітин, обробка 2 нг/мл ІЛ-1 $\beta$  в попередньо оброблений МKN1 клітина 2 мкМ 6-амінохіназоліну.



Малюнок 7. Вплив еупатиліну на опосередковану ІЛ-1 $\beta$  експресію ММП-2 і ММП-9 мРНК в ракових клітинах шлунка людини МKN-1. Після того, як клітини раку шлунка людини МKN-1 були попередньо оброблені 50 мкМ еупатиліном і 2 мкМ 6-амінохіназоліном відповідно протягом 24 годин, попередньо оброблені клітини МKN 1 інкубували в культуральному середовищі без сироватки, що містить 2 нг/мл ІЛ-1  $\beta$  протягом 12 годин. У 12-годинній інкубації загальна РНК була виділена з клітин раку шлунка людини МKN1. Відносні рівні експресії мРНК визначалися за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі . Значення, що представляють рівні експресії мРНК ММП-2 і ММП-9, були вперше нормалізовані до 18S рРНК, і потім висловлювався щодо контролю. Планки похибок представляють стандартне відхилення. \* P менше 0,05 в порівнянні з лікуванням ІЛ-1. Контроль С, 1 лікування ІЛ-1 2 нг/мл, 2 лікування 50 мкМ еупатіліном, 3 обробки 2 нг/мл ІЛ-1 у попередньо оброблених клітинах МKN-1 2 мкМ 6-амінохіназолін, 4 2 нг/мл ІЛ-1 лікування попередньо оброблених клітин МKN-1 50 мкМ з еупатіліном було дуже схоже на лікування інгібіторами NF- $\kappa$ B. Ці результати свідчать про те, що інгібування інвазії пухлини *in vitro* еупатіліном може бути пов'язане зі зниженням активності желатинази та експресією ММП, опосередкованою NF- $\kappa$ B.

### Обговорення

Оскільки зазвичай спостерігається велика локальна пухлинна інвазія і ранні метастази при раку шлунка, запобігання метастазування пухлини є важливим аспектом терапевтичної терапії у пацієнтів з раком шлунка. Було показано, що інвазія пухлини відіграє певну роль.

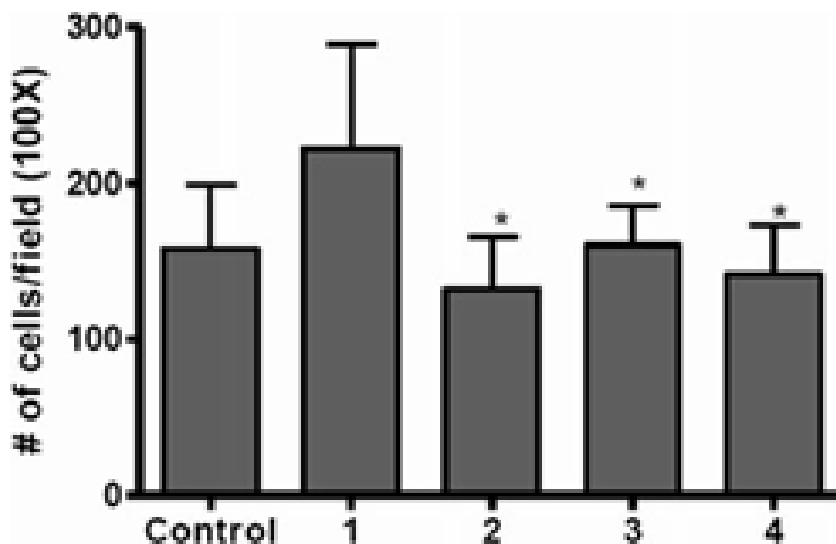


Рис. 8 Знижена інвазія клітин раку шлунка MKN-1 еупатиліном (матричний гель-аналіз). Еупатилін впливає на інвазію колагенового матриксу. Мембрани фільтрів з полікарбонату з покриттям колагену IV типу (25 мкг/мембрана) розміщені між відсіками камер. Клітини раку шлунка MKN1 (1 × 10<sup>5</sup> клітин // У верхні камери висівали 500 мкл РПМІ-1640), попередньо оброблених 50 мкМ еупатиліном або 2 мкМ амінохіназоліном. А в кожен камеру додавали 2 нг /мл β ІЛ-1 і далі інкубували при 37° С в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> протягом 48 годин. Нижні поверхні фільтрів потім фарбували кристалічним фіолетовим: контроль С, обробка 1 2 нг/ мл ІЛ -1β, 2 лікування еупатиліном 50 мкМ, 3 обробки по 2 нг / мл ІЛ - 1β в попередньо оброблених МKN-1 2 мкМ клітинах 6 -амінохіназоліну, 4 Лікування 2 нг / мл ІЛ-1 β в попередньо оброблених клітинах МKN-1 еупатиліном 50 мкМ. \* P <1,5 в порівнянні з лікуванням ІЛ-1β, відіграє значну роль у виробництві віддалених метастазів [1, 3]. Прозапальні цитокіни виробляються самими пухлинами і стромальними клітинами, які існують в сусідніх ракових тканинах. Вони можуть виступати в якості ендogenous промотора пухлини. Прототип прозапального цитокіну вважається молекулярним зв'язком між запаленням і раком. Він також індукує експресію /вироблення інших цитокінів, ангіогенних факторів, ММП та uPA, сприяючи посиленню росту та виживання пухлинних клітин. Таким чином, прозапальні цитокіни, такі як TNF-α, IL-1β та IL-6, підсилюють інвазивну здатність клітин раку шлунка людини (MKN-1) шляхом активації адгезійних молекул і рецепторів, включаючи рецептор урокінази. Крім того, прозапальні цитокіни, такі як TNF-α, IL-1β та IL-6, можуть підвищувати експресію та секрецію uPA в різних нормальних клітинах, такі як поверхневі епітеліальні клітини яєчників людини [25] і людини кератиноцити людини (HaCaT) [26]. УПА перетворює неактивний плазміноген у плазмін і тому відіграє важливу роль у ініціюванні каскаду протеолітичних стадій, що беруть участь у деградації ЕКМ. Надмірна експресія uPA була виявлена при раку шлунка, а високий рівень uPA при пухлинах пов'язаний зі швидким прогресуванням захворювання і поганим прогнозом. Пухлинна інвазія опосередковується прозапальною продукцією АФК, ангіогенних факторів росту та їх рецепторів і протеолітичних ферментів. Накопичення внутрішньоклітинної АФК прозапальними цитокінами передують індукції експресії UPA. Як підтверджуючі докази, тільки екзогенна АФК індукувала експресію uPA і промоторну активність.

Метастазування вимагає протеолітичної деградації компонентів позаклітинного матриксу для полегшення інвазії злоякісних клітин через базальну мембрану, а потім через сполучну тканину [27]. УПА опосередковує передачу позаклітинного сигналу, мабуть, через асоціацію з різними типами інтегринів і з компонентом ЕОМ [28, 29]. У канцерогенезі бере участь неправильна активація β-катенінової сигналізації медіаторами запалення [30], і

аномально підвищений рівень  $\beta$ -катеніну пов'язаний з поганим прогнозом при раку молочної залози [31]. Крім того, накопичені дані досліджень як *in vitro*, так і *in vivo* дозволяють припустити участь в онкогенезі кон- $\beta$ -катенін-опосередкованої сигналізації [7]. Ядерна локалізація  $\beta$ -катеніну і подальше утворення  $\beta$ -катеніну-Tcf/LEF транскрипційного комплексу викликають посилену транскрипцію *uPAR* [6, 32]. Досліджено зв'язок між експресією *uPA*, одного з генів-мішеней  $\beta$ -катеніну, та інвазією в клітини MKN-1, стимульовані прозапальними цитокінами. Це дослідження показує, що прозапальні цитокіни, такі як TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6, опосередковують інвазію клітин, активуючи сигналізацію  $\beta$ -катеніну та згодом збільшується експресія *uPA*. Всупереч висновкам цього дослідження, недавнє дослідження Моро та ін. показав, що опосередкована cI $\beta$  супресія  $\beta$ -катеніну підвищує експресію *uPA*, *uPAR* і інгібітора активатора плазміногену-1 (PAI-1) в клітинах раку молочної залози залоз (MCF-7 і MDA-MB-231), а також у клітин раку товстої кишки (SW-480), завдяки чому збільшується їх інвазивний потенціал [33]. У цьому ж дослідженні лікування клітин, трансфектованих cI $\beta$   $\beta$ -катеніном, 6-амінохіназоліном, ядерним фактором-каппа В (NF- $\kappa$ B) інгібітором, значно знижений підвищена експресія *uPAR* і інвазія ракових клітин. Більш того, придушення  $\beta$ -катеніну 6-амінохіназоліном пригнічує накопичення NF- $\kappa$ B в ядрі. На підставі цих даних автори висунули гіпотезу, що  $\beta$ -катенін пригнічує систему *uPA* / *uPAR* у взаємодії з NF- $\kappa$ B [33].  $\beta$ -катенін-опосередкована сигналізація, основний вузол запальної сигнальної мережі, є критичною молекулярною мішенню протизапальних речовин з хіміопрофілактиком або хіміотерапевтичним потенціалом [7]. У цьому дослідженні було виявлено, що еупатилін пригнічує ріст клітин MKN-1 шляхом активації каспази-3.

Еупатилін дійсно знижував вивільнення прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , IL-6 та IL-8) з ракових клітин шлунка MKN-1. Повідомляється про кілька досліджень, що експресія цих цитокінів, як відомо, корелює з метастатичним потенціалом карцином людини [34, 35]. Прозапальні цитокіни, такі як IL-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$  та IL-8, активуються під час хронічної інфекції *H. pylori* [36] і грають найважливішу роль при запаленні слизової оболонки шлунка. Виробництво аутокринних прозапальних цитокінів може впливати на біологію пухлинних клітин через сигнальний каскад, опосередкований NF- $\kappa$ B. Ці зв'язки говорять про те, що зниження рівнів IL-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , IL-6 і IL-8 може вивільнитися з клітин MKN-1, запобігаючи їх автокрин. прометастатична дія. Прозапальні цитокіни сильно корелюють з активацією NF- $\kappa$ B в різних ракових клітинах. Білок NF- $\kappa$ B відіграє вирішальну роль у трансформації клітин, або забезпечуючи постійні позитивні подразники росту, такі як ті, що опосередковані цитокінами, або пригнічуючи шляхи апоптозу. [6]. Крім того, було виявлено, що нуклеус-транслюкований білок NF- $\kappa$ B надмірно експресується в злоякісних ракових клітинах [18, 22]. Зокрема, субодинаця p65 NF- $\kappa$ B містить комплекси, які зв'язуються з високою спорідненістю до 5'-GGGpNpPyPyCC-3' консенсусних послідовностей ДНК (p65 / p50). або 5'-GGGpNpPyPyCC-3' (p65 / c-Rel), і ці прив'язки призводять до транскрипційної активації [30]. У цьому дослідженні було виявлено, що eupatilin значно знижує активацію NF- $\kappa$ B в системі транскрипційного репортера. Вплив eupatilin на активацію NF- $\kappa$ B був дуже схожим на вплив 6-амінохіназоліну (інгібітора активатора NF- $\kappa$ B). Крім того, eupatilin знижував експресію p65. Хоча немає прямих доказів того, що eupatilin інгібує активацію NF- $\kappa$ B шляхом EMSA, припускається, що eupatilin може опосередковано пригнічувати активацію NF- $\kappa$ B прозапальними цитокінами. Прозапальні цитокіни стимулюють активацію NF- $\kappa$ B, а їх активація викликає експресію MMP. На підставі цих припущень були проведені подальші дослідження, щоб з'ясувати, чи контролює eupatilin експресію MMP-2 і 9 і інвазію пухлини. Як показали тести на інвазію пухлини *in vitro*, eupatilin ефективно знижував кількість клітин MKN-1, які проникли через колагеновий матрикс, і це інгібування було дозозалежним. Більше того, активність

желатиназа була пригнічена, а експресія ММП-2 і ММП-9 також була пригнічена в оброблених еупатіліном клітинах МKN-1, і вони були ефективно пригнічені в попередньо оброблених клітинах ІЛ-1 β МKN-1. Ці спостереження переконливо свідчать про те, що еупатилін може пригнічувати інвазію пухлини шляхом регулювання транскрипції гелатинази, включаючи супресію ММП-2 та ММП-9. Крім того, коли клітини МKN-1 оброблялися еупатіліном, регулювався сигнальний шлях Wnt, пов'язаний з інвазією пухлини. В-катенін секвеструється у внутрішньоклітинному адгезивному комплексі з цитоплазматичним доменом Е-кадгерину, α-катеніну, γ-катеніну та p120cas.

Втрата адгезії клітин призводить до збільшення вільного цитозольного β-катеніну, який зв'язується з продуктом гена APC і швидко фосфорилується β GSK-3. Фосфорильована β-катенін згодом розщеплюється по убіквітин-протеосомному шляху. Отже, блокування активності β GSK3 призводить до накопичення β-катеніну, який переміщається до ядра. В ядрі вільний нефосфорильований β-катенін може зв'язуватися з членами сімейства факторів транскрипції фактора лімфоїдного підсилювача/Т-клітинного фактора (Lev/Tcf). Це дослідження показало, що експресія інтегрину і β-катеніну пригнічується еупатіліном, що вказує на те, що індукція GSK-3β еупатіліном фосфорилатів і руйнує β-катенін. Система активації плазмінотичних відіграє ключову роль у деградації базальної мембрани та позаклітинного матриксу під час ремоделювання тканин та інвазії пухлини, а uPA представляє серин протеаза, яка каталізує перетворення плазмінотичного в плазміну; активний фермент, який розщеплює різні білки позаклітинного матриксу і активує ММП і фактори росту. ММП не тільки руйнує фізичний бар'єр позаклітинного матриксу, але і модулює фактори росту і цитокіни, що зберігаються в позаклітинному матриксі, що також може сприяти неопластична прогресія.

Хоча були виявлені різні антиінвазивні та антиметастатичні сполуки, деякі з цих сполук зменшують міграцію пухлинних клітин, і вважається, що більшість протиракових препаратів, що використовуються в даний час. час для хіміотерапії, надають саме крайню гальмівну дію при метастазуванні пухлини. Таким чином, профілактична дія еупатиліну проти пухлин представляє інтерес, оскільки еупатилін можна віднести до регуляції інвазії пухлинних клітин. Це дослідження демонструє, що в ракових клітинах шлунка МKN-1 еупатилін пригнічує: (1) ріст, (2) вивільнення прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-1β, IL-6 і Іл-8), (3) активація NF-κB, (4) експресія ММП-2 і 9 і (5) інвазія in vitro. Ці результати свідчать про те, що інгібування інвазії пухлинних клітин еупатіліном може зменшити тенденцію до метастазування через ріст пухлини, інвазію та метастазування.

**Дякую.** Робота підтримується Дослідницьким фондом університету Ханьян (HY-2010-N).

**Конфлікт інтересів:** немає

#### **Список літератури :**

1. Маехара Ю, Какеджі Ю, Ода С, Баба Н, Сугімачі К. Закономірності росту пухлини і біологічні особливості ранньої карциноми шлунка. Онкологія. 2001;61:102–12.
2. Шварц Г.К. Інвазія та метастази при раку шлунка: моделі in vitro та in vivo з клінічними кореляціями. Сьомін Онкол. 1996;23:316–24.
3. Тахара Е. Молекулярні аспекти інвазії і метастазування раку шлунка. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie. 2000;84:43–9.

4. Inumaru J, Nagano O, Takahashi E, Ishimoto T, Nakamura S, Suzuki Y та ін. Молекулярні механізми, що регулюють дисоціацію клітинно-клітинного з'єднання епітеліальних клітин окислювальним стресом . Гени клітин. 2009;14:703–16.
5. Сатох Дж, Курода Ю. Експресія бета-катеніну в лініях нейронних клітин людини після впливу цитокінів та факторів росту. Невропатології. 2000;20:113–23.
6. Niendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Haynl A, Dimmler A. Бета-катенін ап-регулює експресію активатора плазміногену уроки-назе в колоректальних пухлинах людини. Рак Рес. 2004;64:1209–14.
7. Кунду Дж.К., Цой К.А., Сурх Ю.Я. бета-катенін-опосередкована сигналізація: нова молекулярна мішень для хіміопрофілактики протизапальними речовинами. Біохім Біофіз Акта. 2006;1765:14–24.
8. Цинь Х, Мюлінгер JD, Уеллс А, Віндзор LJ, Sun Y, Benveniste EN. Транскрипційне придушення експресії генів матричної металопротеїнази-2 в клітинах астрогліоми людини за допомогою TNF-альфа та IFN-гамма. J Immunol. 1998;161:6664–73.
9. Шеллман Ю.Г., Макела М, Норріс Д.А. Індукція секретованої активності матричної металопротеїнази-9 в клітинах меланоми людини екстрацелюлар матричними білками і цитокінами. Меланома Res. 2006;16:207–11.
10. Яно С, Нокіхара Н, Ямамото А. Багатофункціональний інтерлейкін-1бета сприяє метастазуванню клітин раку легенів людини у SCID-мишей шляхом посиленої експресії молекул, пов'язаних з адгезією, інвазією та ангиогенезом. Рак Sci. 2003;94:244–52.
11. Чжан ХУ, Чан ВАЙ, Вітні Б.М. Зміни інтерлейкіну експресування корелюють з інфекцією *Helicobacter pylori* та метастазами в лімфатичних вузлах при карциномі шлунка. Diagn Mol Pathol. 2003;11:135–9.
12. Шунь КТ, Лінь JT, Хуан СП, Лінь МТ, Ву МС. Експресія інгібіторного фактора міграції макрофагів пов'язана з посиленням ангиогенезом і запущеною стадією при карциномах шлунка. Світ J Гастроентерол. 2005;11:3767–71.
13. Уемура Н, Окамото С, Ямамото С. Інфекція хелікобактер пілорі і розвиток раку шлунка. N Engl J Med. 2001;345:784–9.
14. Йонемура У, Сакураї С, Ямамото Х. Експресія генів REG пов'язана з інфільтраційним зростанням карциноми шлунка. Рак. 2003;98:1394–400.
15. Ек М, Шмауссер Б, Шеллер К. Хемокини CXCL10/ IP-10/ MIG при гастриті *Helicobacter pylori*. Клін Експ Імунол. 2000;122:192–9.
16. Гриц І, Куестер Д, В'ет М. Експресія інгібіторів секреторної лейкоцитарної протеази при різних типах гастриту : специфічна роль інфекції *Helicobacter pylori*. Eur J Гастроентерол Гепатол. 2006;18:277–82.
17. Лі Х.А., Пак КС, Кім МК. Невелика сполука, яка пригнічує фактор некрозу пухлини- альфа-індуковану матричну металопротеїназу-9 уперегулацію. Біохімія Біофіз Рес Комун. 2005;336:716–22.
18. Хагеман Т, Вілсон Дж, Кульбе Х. Макрофаги індукують інвазивність епітеліальних ракових клітин через NF-каппа В та JNK. J Імунол. 2005;175:1197–205.
19. Woo ER, Pokharel YR, Yang JW, Lee SY, Kang KW. Інгібування активації ядерного фактора-каппаВ шляхом 2',8"-біапігеніну. Біол Фарм Булл. 2006;29:976–80.
20. Лі Дж.С., Кім Х.С., Хам КБ. Інгібуючий ефект 7- карбоксиметилокси-3',4',5-триметоксифлавонолу

(DA- 6034) на helicobacter pylori-індуковану активацію NF-каппа В та експресію іNOS у клітинах AGS.  
Ann N Y Acad Sci. 2007;1095:527–35.

21. Шукла С, Гупта С. Пригнічення фактора конститутивного та пухлинного некрозу альфа-індукованого ядерного фактора (NF)-каппаВ ас-тивації та індукції апоптозу апігеніном у клітинах карциноми передміхурової залози людини PC-3: кореляція з регуляцією NF-каппаВ-чутливих генів. *Клін Рак Рес.* 2004;10:3169–78.
  22. Кім Д.Х., На ХК, О ТАЙ, Шін СІ, Сур ЮДж. Еупатілін пригнічує проліферацію рас-трансформованих клітин епітелію молочної залози людини (MCF- 10A-ras). *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2005;24:251–9.
  23. Кім МДж, Кім Д.Х., На ХК, О ТАЙ, Шин САЙ, Сур ЮДж. Еупатілін, фармакологічно активний флавіон, отриманий з рослин Артемізії, індукує апоптоз у клітинах раку шлунка людини (AGS). *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2005;24:261–9.
  24. Кім Д.Х., На ХК, О ТАЙ, Кім СБ, Сур ЮДж. Еупатілін, фар-макологічно активний флавіон, отриманий з рослин артемізії, інду-цес-клітинний цикл в трансформованих рас-трансформованих клітинах епітелію молочної залози людини. *Біохім Фармакол.* 2004;68:1081–7.
  25. Ян В.Л., Годвін АК, Сюй ХХ. Фактор некрозу пухлини-альфа-індукована матрична продукція протеолітичного ферменту та ремоделювання базальних мем-бранів епітеліальними клітинами поверхні яєчників людини: мо-лекулярна основа, що зв'язує овуляцію та ризик раку. *Рак Рес.* 2004;64:1534–40.
  26. Bechtel MJ, Reinartz J, Rox JM, Inndorf S, Schaefer VM, Kramer MD. Регуляція клітинно-поверхнево-асоційованого плазміногену актива-ції в культивованих кератиноцитах інтерлейкін-1 бета та фактором некрозу пухлини-альфа. *Exp Cell Res.* 1996;223:395–404.
- Пухлина Біол. (2013) 34:875–885 885
27. Foda HD, Цукер С. Матричні металопротеїнази при раковій інвазії, метастазуванні та ангиогенезі. *Препарат Дісов сьогодні.* 2001;6:478–82.
  28. Осовський Л., Агірре-Гісо Я.А. Партнерство рецепторів урокінази та інтегрину: координація сигналізації для адгезії, міграції та росту клітин. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:613–20.
  29. Вей Ю, Лукашев М, Саймон Д.І., Бодари С.К., Розенберг С, Дойл М.В. Регуляція функції інтегрину рецептором урокінази. *Наука.* 1996;273:1551–5.
  30. Мей Дж.М., Борхерт Г.Л., Дональд СП, Пханг Дж.М. Матрична металопротейназа(и) опосередкована(и) NO-індукована дисоціація бета-катеніну з мембранно-зв'язаного E-кадгерину та утворення ядерного комплексу бета-катеніну/ЛЕФ-1. *Канцерогенез.* 2002;23:2119–22.
  31. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y. Бета- катенін, новий прогностичний маркер раку молочної залози: його роль у експресії цикліну D1 та прогресуванні раку. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4262–6.
  32. Маупас-Швальм Ф, Робінет С, Ауж Н, Тьєрс JC, Гарсія V, Камбус JP. Активація {beta}-катеніну/Т-клітинного специфічного фактора т-клітин /фактора-підсилювача лімфоїдів-1 шляхом плазмін-оген-активаторами в клітинах карциноми ECV304. *Рак Рес.* 2005;65:526–32.
  33. Моро М, Моура С, Доске С. бета-Катенін і NF-каппаБ співпрацюють для регулювання системи uPA/uPAR в ракових клітинах. *Int J Рак.* 2011;128:1280–92.
  34. Діанна CD, Чжун С, Банда D, Френк ГО, Джеффри СВ, Кіт Б, Ульріх С, Картер VW. Експресія домінантно-негативного інгібітора мутантів- kВ $\alpha$  ядерного фактора-к В при плоскоклітинному раку голови та шії людини гальмує виживання, прозапальну експресію цитокінів і ріст пухлини in vivo. *Рак Рес.* 1999;59:3468–74.

35. Сетхі Г, Ань КС, Пандей МК, Аггарвал ВВ. Целастрол, новий тритерпен, потенціює TNF-індукований апоптоз і пригнічує інвазію пухлинних клітин шляхом інгібування NF-каппаВ-регульованих генних продуктів і TAK1-опосередкованої активації NF-каппаВ. *Кров* 2007;109:2727–2735.
36. Крабтрі Є.Є. Імунні та запальні реакції на інфекцію *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;215:3–10.