

**Е.Н. Пивоварова, С.И. Ильницкая, В.Ф. Кобзев,
Т.И. Меркулова, В.И. Каледин**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НИТРОЗОЭТИЛМОЧЕВИНЫ НА ГЛЮКОКОРТИКОИДНУЮ ИНДУКЦИЮ ТИРОЗИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

В отличие от диэтилнитрозамина и других гепатоканцерогенов нитрозоэтилмочевина (НЭМ) не снижает ДНК-связывающую активность фактора транскрипции HNF3 γ в ядерных экстрактах клеток печени мышей, чувствительной к ее гепатоканцерогенному действию линии ICR и не влияет на глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы печени. В то же время, как показано в работе, НЭМ значительно увеличивает связывание ядерных белков печени мышей линии ICR с ДНК-олигонуклеотидом, имитирующим сайт связывания AP-1, и не влияет подобным образом на AP-1 ДНК-связывающую активность ядерных белков печени мышей линии C57BL/6, нечувствительных к индукции опухолей печени. Высказано предположение, что канцерогенное действие НЭМ обусловлено ее влиянием на транскрипционные факторы, участвующие в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, и реализуется в тех органах и на тех стадиях развития, т.е. там и тогда, где и когда уровень экспрессии этих факторов является морфогенетически значимым.

Ключевые слова: нитрозоэтилмочевина, гепатоканцерогенез, факторы транскрипции

Многие соединения, канцерогенные для печени мышей и крыс, вызывают у них нарушение глюкокортикоидной индукции органоспецифического фермента печени тирозинаминотрансферазы (ТАТ) [1]. Этот эффект канцерогенов не обусловлен их токсическим действием и имеет место только у животных тех видов и инбредных линий, у которых они вызывают развитие опухолей печени [1, 2]. При изучении данного феномена в нашей лаборатории было показано, что гепатоканцерогенные аминоазокрасители видо- и линейноспецифично снижают в клетках печени ДНК-связывающую активность факторов транскрипции HNF3, участвующих в индукции глюкокортикоидами экспрессии гена ТАТ и в поддержании дифференцированного статуса гепатоцитов [2, 3]. Тем самым был установлен эпигенетический механизм антиглюкокортикоидного и предположительно гепатоканцерогенного действия данных канцерогенов. В настоящей работе мы изучили в этом отношении нитрозоэтилмочевину (НЭМ) — соединение, вызывающее у мышей наряду с опухолями печени опухоли почек, легких, молочных желез, желудка, лимфоидных и других органов, причем с неодинаковой частотой при введении животным разного возраста. Так, если опухоли печени, почек и яичников с наибольшей

частотой индуцируются при введении НЭМ в неонатальном периоде, то опухоли молочных желез и желудка — во взрослом [4]. Являясь слабым канцерогеном для печени нормальных взрослых мышей, НЭМ значительно более активно индуцирует у них опухоли печени после частичной гепатэктомии [5]. Просматривается закономерность, что канцерогенный потенциал НЭМ реализуется в тех органах, в которых в момент ее действия идет интенсивная клеточная пролиферация и/или дифференцировка. Исходя из сказанного, мы изучили влияние НЭМ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ и ДНК-связывающую активность HNF3 и некоторых других факторов транскрипции, участвующих в контроле клеточного деления, в печени подсосных мышей двух линий, различающихся по чувствительности к гепатоканцерогенному действию этого соединения.

Материалы и методы

В работе использованы контрастные по чувствительности к гепатоканцерогенному действию нитрозосоединений линии мышей: чувствительная ICR и резистентная C57Bl/6 [2, 6]. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР

от 12.08.1977 г. № 755). Маточные животные были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН и содержались группами по 3 самки и 1 самцу при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище (комбикорм ПК 120-1, «Лабораторснаб», Москва). Родившимся мышатам на 12-15 день жизни вводили внутривенно 0,8%-ный раствор НЭМ, любезно предоставленной нам А.В. Холодарем (Институт цитологии и генетики СО РАН), в 10% полиэтиленгликоле-1500 из расчета 0,01 мл на 1 г массы тела (80 мкг/г). Контрольным мышатам вводили соответствующий объем растворителя. В качестве положительного контроля использовали диэтилнитрозамин (ДЭНА), который вводили в 0,5% водном растворе аналогично. Через 18-19 часов животных индуцировали внутрибрюшинным введением дексаметазон-фосфата в дозе 4 мкг/г, а через 5 часов их умерщвляли декапитацией и в растворимой фракции печени определяли активность ТАТ как описано в [2]. Полученные результаты обрабатывали статистически и достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Для изучения влияния на ДНК-связывающую активность факторов транскрипции НЭМ вводили в той же дозе за сутки до забоя животных. Экстракты ядер клеток печени получали по методу, описанному в [2, 3]. Полученные экстракты аликвотами по 50 мкл замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Размороженные образцы повторно не использовали. Помимо HNF3, для исследования были выбраны транскрипционный фактор NFkB, участвующий в контроле клеточного деления во многих тканях, и AP-1, являющийся сайтом связывания белковых продуктов вирусных онкогенов *v-jun* и *v-fos* и их клеточных гомологов, а также принимающий участие в тканеспецифической регуляции экспрессии генов в клетках печени фактор транскрипции GATA. Олигонуклеотиды, соответствующие обеим цепям указанных факторов транскрипции [7], синтезировали на автоматическом синтезаторе АСМ-102И (Биоссет, Новосибирск) Н-фосфонатным методом и очищали с помощью гель-электрофореза. После отжига олигонуклеотиды метили с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I в присутствии $[32\text{P}]\text{dATP}$.

Связывание белков ядерных экстрактов с мечеными олигонуклеотидами изучали методом торможения в геле как описано в [2,3] с некоторыми модификациями. Реакционная смесь (10 мкл) содержала: 5 мМ Hepes, pH 7,6; 80 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0; 1 мМ дитиотреитол; 10%-ный глицерин; 3 нг меченого олигонуклеотида; 4 мкг белка ядерного экстракта, прединкубированного

Таблица

Влияние ДЭНА и НЭМ на глюкокортикоидную индукцию ТАТ в печени подсосных самцов мышей линий ICR и C57BL/6

Группы	Число мышей	Активность фермента, единиц/г
Линия C57BL/6		
1. Контроль (только индукция)	4	$63,7 \pm 4,3$ (1,00)
2. ДЭНА + индукция	5	$41,1 \pm 3,9$ * (0,65)
3. НЭМ + индукция	5	$62,7 \pm 3,4$ (0,98)
Линия ICR		
1. Контроль (только индукция)	3	$91,3 \pm 2,7$ (1,00)
2. ДЭНА + индукция	3	$40,1 \pm 5,0$ * (0,44)
3. НЭМ + индукция	3	$89,0 \pm 3,1$ (0,99)

Примечание: # Мкмоль *n*-гидроксифенилтиурата на 100 мг растворимого белка печени в 1 час; в скобках — по отношению к контролю. * $p < 0,001$ по сравнению с контролем. Базальная активность ТАТ у мышей C57BL/6 и ICR составляла соответственно $22,7 \pm 2,6$ и $23,7 \pm 4,1$ единиц. В таблице представлены результаты типичного эксперимента.

с 0,6 мкг ДНК спермы лосося в течение 15 мин при 0°C для предотвращения связывания зонда с ядерными белками, имеющими высокое сродство к любой ДНК. Смесь инкубировали 15 мин при 20°C , после чего подвергали электрофорезу при 4°C в 5% полиакриламидном геле.

Результаты

Как видно в таблице, под влиянием ДЭНА уровень индукции ТАТ дексаметазоном у чувствительных к гепатоканцерогенному действию нитрозосоединений мышей линии ICR снизился более чем наполовину (на 56%), а у резистентных мышей C57BL/6 — на треть (35%). Это хорошо согласуется с результатами, полученными ранее на других чувствительных и резистентных к индукции опухолей печени линиях мышей [1, 2]. Такое коррелирующее с канцерогенным антиглюкокортикоидное действие гепатоканцерогенов реализуется, как было показано, через влияние на ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора HNF3 γ в клетках печени тех и других животных [2, 3]. Однако НЭМ, как свидетельствуют результаты настоящего исследования, не оказывает какого-либо влияния ни на индукцию ТАТ у мышей обеих линий (Таблица), ни на ДНК-связывающую активность данного фактора транскрипции в ядерных экстрактах клеток их печени (Рис. 1). Следовательно, механизм ее действия, по-видимому, отличен от такового других гепатоканцерогенов.

Канцерогенное действие нитрозосоединений связывают с их способностью взаимодействовать с ДНК и вызывать мутации, инактивирующие антионкогены или активирующие протоонкогены [8, 9]. Действительно, *in vivo* НЭМ подвергается быстрой ($T_{1/2}$ порядка 8 мин [5]) гетеролитической декомпозиции с образованием этильного катиона, способного алкилировать ДНК и вызывать

мутации [10]. Однако этот процесс осуществляется неферментативно, а следовательно, во всех тканях одинаково. Поэтому тканевая специфичность канцерогенного действия НЭМ не может определяться на уровне ее — отсутствующей в данном случае — метаболической активации. Между тем действие этого канцерогена в известной степени тканеспецифично: у мышей линии СЗН НЭМ с высокой частотой индуцирует опухоли печени и с низкой — тимусные лейкозы, а у мышей С57BL, наоборот, с высокой частотой — лейкозы и с низкой — опухоли печени [11, 12]. Полагали, что механизмом, обеспечивающим такую специфичность, является неодинаковая активность в разных тканях ферментных систем, осуществляющих репарацию повреждений ДНК [8]. Однако Y. Shimada и соавторы [12], специально изучавшие этот вопрос на мышах линий СЗН и СС57BL, не обнаружили межлинейных различий ни по уровню экспрессии, ни по структуре гена O^6 -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы — основного фермента, репарирующего промутацонные повреждения ДНК нитрозосоединениями. W. Lijinsky и соавт. [13] также не наблюдали усиления гепатоканцерогенного эффекта НЭМ (как и нитрозометилмочевины) при подавлении активности O^6 -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы специфическим ингибитором этого фермента бензилгуанином.

Таким образом, объяснить имеющиеся генетические, половые, возрастные и тканевые различия в чувствительности животных к канцерогенному

действию НЭМ в рамках представлений о генотоксическом механизме ее действия, с нашей точки зрения, представляется затруднительным. Логичнее предположить, что специфичность ее действия обусловлена влиянием на факторы транскрипции [14], участвующие в органотипической регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки, как это показано для гепатоканцерогенных аминоазокрасителей, видоспецифично снижающих ДНК-связывающую активность HNF3 β в печени крыс и HNF γ — в печени мышей [3]. Многие факторы транскрипции органоспецифичны, а время и уровень их экспрессии зависят от возраста и пола животных [15]. Более того, они не только отражают статус каждой конкретной ткани, но в значительной степени и определяют его. Так, на «нокаутных» и трансгенных животных показано, что нарушение нормальной функции тех или иных факторов транскрипции может приводить к самым неожиданным отклонениям в развитии вплоть до полной его остановки и гибели животного [15].

Методом торможения в геле в настоящей работе мы не обнаружили заметной разницы в ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов GATA и NF-kB в печени подопытных и контрольных мышей обеих линий (данные не приведены). Мы обнаружили, однако, что у чувствительных к действию НЭМ мышей линии ICR под влиянием этого соединения существенно (по результатам денситометрии электрофореграмм в $3,6 \pm 0,4$ раза) увеличивается связывание

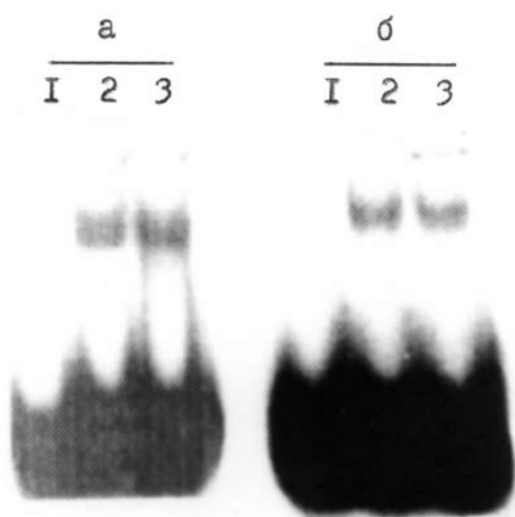


Рис. 1. Влияние НЭМ на HNF3 ДНК-связывающую активность ядерных белков печени подсосных самцов мышей линий ICR (а) и С57BL/6 (б).

1 — меченый олигонуклеотид, имитирующий сайт связывания HNF3 (зонд); 2 — задержка HNF3-зонда при инкубации с экстрактами ядер клеток печени контрольных мышей; 3 — то же при инкубации с ядерными экстрактами печени мышей, получавших НЭМ

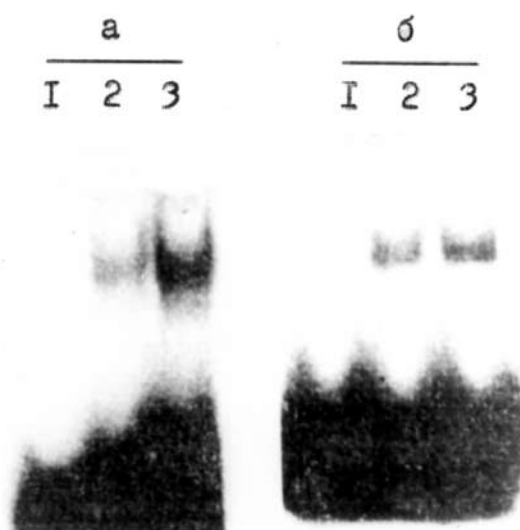


Рис. 2. Влияние НЭМ на AP-1 ДНК-связывающую активность ядерных белков печени подсосных самцов мышей линий ICR (а) и С57BL/6 (б).

1 — меченый олигонуклеотид, имитирующий сайт связывания AP-1 (зонд); 2 — задержка AP-1-зонда при инкубации с экстрактами ядер клеток печени контрольных мышей; 3 — то же при инкубации с ядерными экстрактами печени мышей, получавших НЭМ.

белков ядерного экстракта печени с ДНК-олигонуклеотидом, имитирующим сайт связывания AP-1, тогда как у резистентных мышей линии C57Bl/6 достоверного увеличения такого связывания не отмечено (Рис. 2). С сайтом связывания AP-1 с разной степенью специфичности взаимодействуют гомо- и гетеродимеры белков Jun, Jun B, Fos, Fras и др. [15], поэтому первичная мишень, на которую направлено действие НЭМ в наших экспериментах, пока остается неизвестной. Для того, чтобы идентифицировать ее, необходимо продолжить исследования с использованием имеющихся в настоящее время специфических антител к указанным выше и некоторым другим клеточным белкам. Необходимо также выяснить, изменяется ли под влиянием НЭМ ДНК-связывающая активность факторов транскрипции — и каких именно — в других органах, чувствительных к ее канцерогенному действию. В настоящее время мы предпринимаем попытки продвинуться в этом направлении.

STUDY OF INFLUENCE OF ETHYLNITROSOUREA ON GLUCOCORTICOID INDUCTION OF TYROSINE AMINOTRANSFERASE AND DNA-BINDING ACTIVITY OF SOME TRANSCRIPTION FACTORS IN MICE LIVER

E.N. Pivovarova, S.I. Iljnitckaya, V.F. Kobzev, T.I. Merkulova, V.I. Kaledin

In contrast to diethylnitrosamine and other hepatocarcinogens, ethylnitrosourea (ENU) does not decrease the DNA-binding activity of transcription factor HNF3 γ in nuclear extracts from hepatic cells of ICR mice sensitive to its hepatocarcinogenic action and does not affect glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase in the liver. However, as our data show, ENU strongly elevates binding of liver nuclear proteins of ICR mice with DNA-oligonucleotide mimicking the AP-1 binding site but does not exert similar effect on the AP-1 DNA-binding capacities of liver nuclear proteins of C57BL/6 mice resistant to liver tumor induction. The suggestion is made that the carcinogenic action of ENU is caused by its influence on the transcription factors participating in cellular proliferation and differentiation and takes place in that organs and developmental stages, i. e. there and then, where and when the levels of expression of these factors are morphogenetically significant.

Литература

1 Каледин В.И. Влияние гепатоканцерогенных соединений на гормональную индукцию тирозинаминотрансферазы в печени чувствительных и резистентных животных / В.И. Каледин, Н.П. Захарова // Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных

/ Под ред. Е.В. Грунтенко. — Новосибирск, 1984. — С. 146-85.

2. Влияние гепатоканцерогена орто-аминоазотолуола на индукцию тирозинаминотрансферазы глюкокортикоидами в печени мышей / К.Ю. Кропачев, В.И. Каледин, О.А. Тимофеева и др. // Молекуляр. биол. — 2001. — Т. 35. — № 3. — С. 462-469.

3. Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver / T.I. Merkulova, K.Y. Kropachev, O.A. Timofeeva et al. // Molecular Carcinogenesis. — 2005. — Vol. 44. — P. 223-232.

4. Development of broad spectrum of tumors by ethylnitrosourea in mice and the modifying role of age, sex, and strain / Vesselinovitch S.D., Rao K.V.N., Mihailovich N. et al. // Cancer Res. — 1974. — Vol. 34. — P. 2530-2538.

5. Modifying role of partial hepatectomy and gonadectomy in ethylnitrosourea-induced hepatocarcinogenesis / S.D. Vesselinovitch, L. Itze, N. Mihailovich, KVN Rao // Cancer Res. — 1980. — Vol. 40. — P. 1538-1542.

6. Kemp C.J. Genetic variation in liver tumor susceptibility, plasma testosterone levels, and androgen receptor binding in six inbred strains of mice / C.J. Kemp, N.R. Drinkwater // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 5044-5047.

7. Santa Cruz Biotechnology, inc. Research antibodies catalog. — 2006.

8. Repair of O⁶-alkylguanine during DNA synthesis in murine bone marrow hematopoietic precursors / S.L. Gerson, J.E. Trey, K. Miller, E. Benjamin // Cancer Res. — 1987. — Vol. 47. — P. 89-95.

9. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma / Zuo C., Ai L., Ratliff P. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2004. — Vol. 13. — P. 967-975.

10. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography / D.T. Beranek, C.C. Weis, D.H. Swenson // Carcinogenesis. — 1980. — Vol. 1. — P. 595-606.

11. Poole T.M. Strain dependent effects of sex hormones on hepatocarcinogenesis in mice / T.M. Poole, N.R. Drinkwater // Carcinogenesis. — 1996. — Vol. 17. — P. 191-196.

12. Genetic susceptibility to thymic lymphomas and K-ras gene mutation in mice after exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea / Y. Shimada, M. Nishimura, S. Kakinuma et al. // Int. J. Radiat. Biol. — 2003. — Vol. 79. — P. 423-430.

13. Effects of inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea / W. Lijinsky, A.E. Pegg, M.R. Anver, R.C. Moschel. // Jap. Cancer Rev. — 1994. — Vol. 85. — P. 226-230.

14. За нарушение глюкокортикоидной индукции тирозинаминотрансферазы в печени ответственны активированные метаболиты гепатоканцерогенов / В.И. Каледин, Л.Ф. Гуляева, С.И. Ильницкая и др. // Доклады РАН. — 1997. — Т. 357. — С. 126-129.

15. Latchman D.S. Eukariotic transcription factors / D.S. Latchman. — Amsterdam, Boston, etc.: Academic press, 2004. — 260 p.