

Л.Е. Панин, Р.А. Князев, Д.В. Суменкова, Р.С. Гуца, Л.М. Поляков

РОЛЬ АПОЛИПОПРОТЕИНА Е В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

На культуре гепатоцитов крыс показано, что комплекс аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом увеличивал скорость биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, определяемую по включению радиоактивной метки. Аполипопротеин Е (апоЕ) ингибировал эффект комплекса аполипопротеин А-I-тетрагидрокортизол. В отсутствие комплекса аполипопротеин А-I-тетрагидрокортизол в среде инкубации гепатоцитов апоЕ не оказывал эффекта на биосинтез белка и РНК, но снижал скорость включения ^3H -тимидина в ДНК в 1,6 раза по сравнению с контролем. АпоЕ-содержащие липопротеины очень низкой плотности обладали более выраженным ингибирующим эффектом и снижали данный показатель в 3,2 раза. Таким образом, апоЕ принимает участие в подавлении эффектов комплекса аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом и может являться одним из ингибиторов пролиферации.

Ключевые слова: аполипопротеины А-I и Е, тетрагидрокортизол, биосинтез белка и нуклеиновых кислот

Известно, что липопротеины и их белковые компоненты участвуют в регуляции многих метаболических процессов [1]. Имеются сообщения о регуляции аполипопротеинами генетического аппарата клетки. Так, аполипопротеин А-I (апоА-I) и его синтетический пептид стимулировали экспрессию плацентарного лактогена в культуре трофобластов человека [2]. В серии работ Института биохимии СО РАМН было показано, что глюкокортикоиды и липопротеины высокой плотности оказывают кооперативный эффект на экспрессию генов и усиливают биосинтез белка и РНК в гепатоцитах крыс. При этом регуляция экспрессии генов осуществляется по новому биохимическому пути, отличному от механизма индукции стероидными гормонами. В основе этого явления лежит образование биологически активного комплекса аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом (апоА-I-ТГК) с участием резидентных макрофагов печени [3]. Было показано, что комплекс апоА-I-ТГК усиливает биосинтез белка и ДНК в культуре гепатоцитов крыс [4]. Комплекс апоА-I-ТГК специфически взаимодействует с депротенинированными участками ДНК, при этом апоА-I выполняет роль целевого переносчика гормона, а восстановленная форма гормона способствует разрыву водородных связей между парами азотистых оснований ДНК, что приводит к ее локальному плавлению и последующему образованию комплексов с ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Вероятным сайтом связывания комплекса

апоА-I-ТГК с ДНК является последовательность типа (GCC) $_n$ [5].

Другим регуляторным белком является аполипопротеин Е (апоЕ). АпоЕ известен как ингибитор пролиферации некоторых типов клеток, включая опухолевые [6]. В последнее время показано, что апоЕ повышает экспрессию мРНК перлекана, основного протеогликана в семействе гепарансульфатов, который и опосредует антипролиферативный эффект апоЕ в культуре крысиных и человеческих гладкомышечных клеток аорты [7]. По данным Хоу и соавторов, апоЕ ингибировал стимулированную сывороткой пролиферацию эмбриональных фибробластов крыс, предотвращая при этом активацию протеинкиназы, при этом в бессывороточной среде апоЕ увеличивал рост клеток, продлевая G_1 -фазу клеточного цикла [8]. АпоЕ усиливал также рост первичных нейронов через сигнальную функцию так называемого ЛПНП-подобного рецептора (LRP, lipoprotein receptor-related protein), активацию протеинкиназы с участием Ca^{2+} -зависимого механизма и последующую активацию факторов транскрипции [9]. Отмечена способность апоЕ ингибировать сосудистую гиперплазию при воспалении, вызванном денудацией эпителия сонных артерий у мышей [10]. Результаты исследования эффекта апоЕ на дифференцировку клеток человеческой аденокарциномы HT29 и распределение β -катенина позволяют предположить, что апоЕ участвует в сохранении межклеточных взаимодействий, ингибируя рост опухолевых клеток [11].

В дополнение к этому показано, что апоЕ снижает экспрессию генов канонического, или зависимого от β -катенина Wnt-сигнального пути [12], конститутивная активация которого играет важную роль в канцерогенезе [13].

В настоящей работе показан ингибирующий эффект аполипопротеина Е на биосинтез белка и нуклеиновых кислот в условиях стимуляции этих процессов комплексом аполипопротеин А-I с тетрагидрокортизолом в культуре гепатоцитов крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на изолированных гепатоцитах крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г № 755). Гепатоциты выделяли методом рециркуляторной ферментативной перфузии с использованием 0,03% раствора коллагеназы (активность > 125 ед/мг, «ICN Biomedicals, Inc», США) [14] и отделяли от непаренхимных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Чистоту клеточных фракций определяли с помощью световой микроскопии. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения трипанового синего («Serva», Германия), составляла не менее 90%. Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), pH 7,4, содержащей 20 мМ HEPES («ICN Biomedicals, Inc», США), 10% эмбриональную сыворотку коров («Serva», Германия), 2 мМ L-глутамин («Вектор», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозу, 10 нМ инсулин («Serva», Германия). Инкубацию проводили в CO₂ — инкубаторе («Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха, при температуре 37 °C, используя 6-луночные планшеты («Orange Scientific», США), покрытые коллагеном («Serva», Германия). Плотность клеток в первичной монослойной культуре составляла 800 кл/мм².

Выделение липопротеинов плазмы крови проводили методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ [15] на центрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия). Полученные липопротеины диализовали 24 ч против 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и 0,3 мМ ЭДТА-Na₂ при 4 °C. Делипидирование фракций липопротеинов проводили охлажденной смесью этанол-ацетон (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром.

Аполипопротеины А-I (апоА-I) и Е (апоЕ) выделяли из суммарных белков липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности методом

гель-фильтрации (колонка: 1,6 × 100 см, Сефароза CL-6B («Amersham Biosciences», Швеция), элюент: 0,01 М трис-HCl буфер, pH 8,6, содержащий 6 М мочевины, 0,01% азид натрия, 1мМ фенилметансульфонилфторид). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе (2151 LKB, Швеция). Анализ чистоты аполипопротеинов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия («Serva», Германия) [16]. В качестве маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов (фосфоорилаза — 94 кДа, альбумин — 67 кДа, овальбумин — 43 кДа, карбоангидраза — 30 кДа и лактальбумин — 14,4 кДа). Белковые полосы визуализировали 0,1% Кумасси G-250 в смеси метанола и 10% уксусной кислоты (1:1).

Обессоливание аполипопротеинов проводили с помощью гель-фильтрации (колонка: 40 × 0,8 см, Сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), элюент: 0,05 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl).

Комплекс аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом (апоА-I-ТГК) получали, выдерживая их смесь в молярном соотношении 1:2 в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, в течение 5 мин при комнатной температуре. Комплекс апоА-I-ТГК добавляли к культуре гепатоцитов через 21 ч после инкубации с апоЕ. Концентрация апоА-I в среде инкубации составляла 60 мкг/мл, апоЕ — 10 мкг/мл, ТГК — 5 × 10⁻⁶ М.

Скорость биосинтеза белка, ДНК и РНК в культуре гепатоцитов определяли по включению радиоактивной метки («Amersham», Англия) в количестве 2 мКи/мл среды, используя соответственно ¹⁴C-лейцин, добавляемый за 3 ч, ³H-тимидин — за 21 ч и ³H-уридин — за 1 ч до окончания инкубации. Реакцию останавливали добавлением 0,2н раствора NaOH.

Для измерения радиоактивности содержимое лунки переносили на целлюлозные фильтры («Whatman 3 MM», Англия), которые последовательно промывали от несвязавшейся метки раствором 10% трихлоруксусной кислоты и смесью этанол-эфир (1:1). Фильтры для измерения радиоактивности белка предварительно обрабатывали 0,1 М раствором лейцина в 10% трихлоруксусной кислоте. Радиоактивность образцов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике («Mark-III», США) и выражали в имп/мин на 1 мг белка. Количественное определение белка проводили по методу Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [17].

Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости p < 0,05.

Результаты исследования

Изолированный электрофоретически чистый аполипопротеин А-I (Рис. 1) в концентрации 60 мкг на мл среды инкубации не оказывал существенного влияния на биосинтез белка, определяемый по включению ^{14}C -лейцина, в культуре гепатоцитов крыс. Тетрагидрокортизол (5×10^{-6} М) также не влиял на скорость включения ^{14}C -лейцина в белок (Рис. 2). Однако при добавлении комплекса аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом (апоА-I-ТГК) скорость биосинтеза белка увеличивалась в 1,8 раза (Рис. 2), при этом скорость включения ^3H -уридина в РНК увеличивалась почти в 2 раза (Рис. 3), а скорость биосинтеза ДНК (по включению ^3H -тимидина) — в 1,5 раза (Рис. 4). Полученные нами данные подтверждают показанный ранее в Институте биохимии СО РАМН стимулирующий эффект комплекса аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом на биосинтетические процессы в клетке [3, 4].

В работе Пепе и Куртис [18] было показано, что аполипопротеин Е (апоЕ) и апоЕ-содержащие липопротеины могут подавлять клеточный иммунитет, оказывая антипролиферативное действие на митогенстимулированные лимфоциты. При этом иммуносупрессорная активность проявлялась через 18 ч и достигала максимума через 24 ч инкубации клеток с апоЕ. В наших экспериментах добавление изолированного электрофоретически чистого апоЕ (Рис. 5) в среду инкубации гепатоцитов за 21 ч до воздействия комплекса приводило к снижению биосинтеза белка и РНК в клетках до уровня контрольных величин (Рис. 2, 3).

Скорость биосинтеза ДНК в этом случае снижалась в 2,5 раза по сравнению с комплексом апоА-I-ТГК и в 1,7 раза — по сравнению с контролем (Рис. 4). Следует отметить, что добавление апоЕ в составе липопротеинов очень низкой плотности усиливало ингибирующее действие изолированного белка. В этом случае скорость биосинтеза ДНК снижалась в 4,7 раза по сравнению с

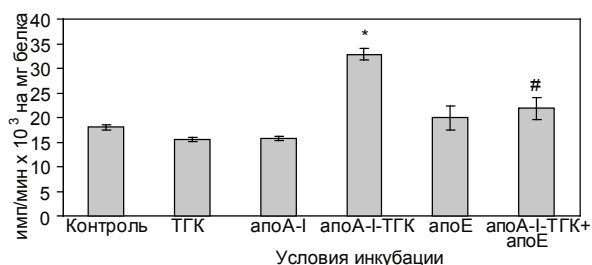


Рис. 2. Изменение скорости биосинтеза белка в гепатоцитах крыс.

* — достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$); # — достоверное различие по сравнению с комплексом апоА-I-ТГК ($p < 0,05$)

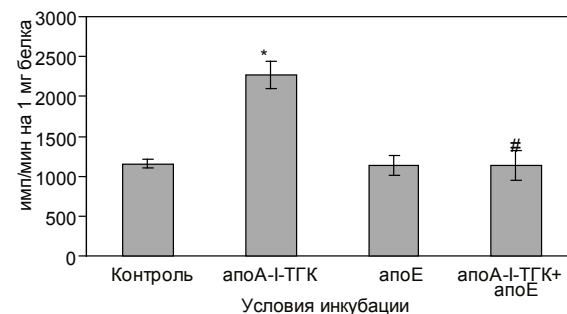


Рис. 3. Изменение скорости биосинтеза РНК в гепатоцитах крыс.

* — достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$); # — достоверное различие по сравнению с комплексом апоА-I-ТГК ($p < 0,05$)

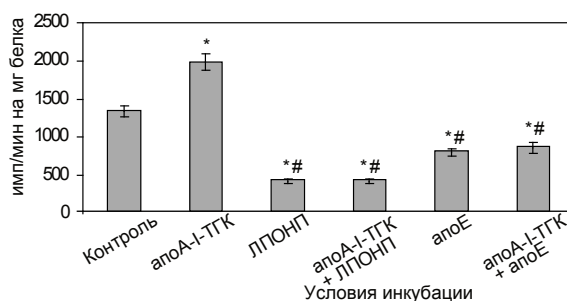


Рис. 4. Изменение скорости биосинтеза ДНК в гепатоцитах крыс.

* — достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$); # — достоверное различие по сравнению с комплексом апоА-I-ТГК ($p < 0,05$)

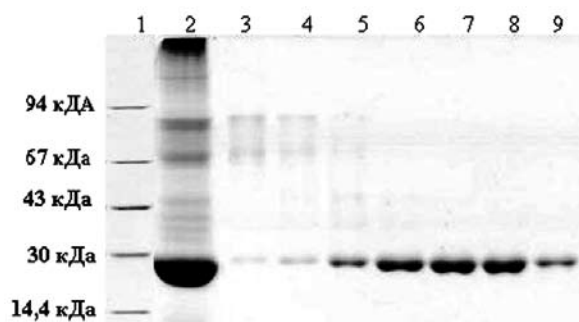


Рис. 1. Электрофореграмма хроматографической очистки аполипопротеина А-I.

1 — низкомолекулярные белки-стандарты;
2 — суммарные белки ЛПВП;
3-9 — стадии очистки апоА-I.

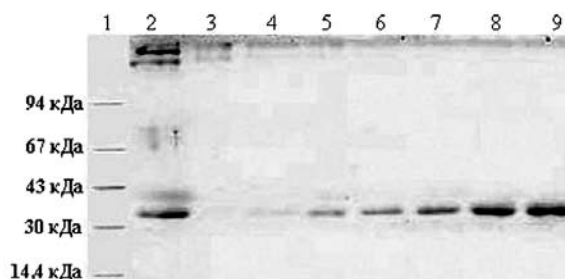


Рис. 5. Электрофореграмма хроматографической очистки аполипопротеина Е

1 — низкомолекулярные белки-стандарты;
2 — суммарные белки ЛПНП и ЛПОНП;
3-9 — стадии очистки апоЕ.

комплексом апоА-I-ТГК и в 3 раза — по сравнению с контролем. Отмеченный эффект, возможно, связан с изменениями молекулярной дисперсии белка под влиянием фосфолипидов и согласуется с данными литературы [18].

АпоЕ в отсутствии комплекса апоА-I-ТГК в среде инкубации гепатоцитов не оказывал эффекта на биосинтез белка и РНК, но снижал скорость включения меченого тимидина в ДНК в 1,6 раза по сравнению с контролем. АпоЕ-содержащие липопротеины очень низкой плотности обладали более выраженным ингибирующим эффектом и снижали данный показатель в 3,2 раза. Поскольку по скорости включения ³H-тимидина в ДНК судят об изменении митогенной активности клеток, можно утверждать, что апоЕ является ингибитором пролиферации.

Таким образом, аполипопротеин Е может принимать участие в подавлении эффектов комплекса аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом и являться одним из регуляторов активности ядерного аппарата клетки.

ROLE OF APOLIPOPROTEINE E IN REGULATION OF PROTEIN AND NUCLEIC ACIDS BIOSYNTHESIS IN RAT HEPATOCTES CULTURE

L.E. Panin, R.A. Knyazev, D.V. Sumenkova, R.S. Gushcha, L.M. Polyakov

Using hepatocytes culture it was shown that the complex of apolipoprotein A-I with tetrahydrocortisol increased the rate of protein and the nucleonic acids biosynthesis determined by incorporation of a radioactive precursors. Apolipoprotein E (apoE) reduced the effect of a complex apolipoprotein A-I-tetrahydrocortisol. In absence of a complex apolipoprotein A-I-tetrahydrocortisol in the culture medium apoE did not render effect on protein and RNA biosynthesis but reduced the rate of incorporation ³H-thymidine into DNA in 1,6 times in comparison with the control. Very low density lipoproteins containing apoE possessed more expressed effect and reduced the rate of DNA synthesis in 3,2 times. Thus, apoE takes part in suppression of effects of a complex apolipoprotein A-I-tetrahydrocortisol and can be one of the inhibitors of proliferation.

Литература

1. Поляков, Л.М. Липопротеиновая регуляция метаболических процессов (обзор) / Л.М. Поляков, Л.Е. Панин // Успехи современной биологии. — 2000. — Т. 120. — № 3. — С. 265-272.
2. Apolipoprotein A-I stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells / S. Handwerger, S. Myers, R. Richards et al. // J. Endocrinol. — 1995. — Vol. 136. — № 12. — С. 5555-5560.
3. Панин, Л.Е. Явление стимуляции резидентными макрофагами биосинтеза белка в паренхимных клет-

ках органов и тканей / Л.Е.Панин // Бюл. СО РАМН. — 1998. — № 3. — С. 11-23.

4. Панин, Л.Е. Роль аполипопротеина А-I в активации биосинтеза белка и ДНК в гепатоцитах под влиянием стероидных гормонов / Л.Е.Панин, О.М. Хоценко, И.Ф. Усынин // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. — 2001. — Т. 131. — № 1. — С. 63-65.

5. Взаимодействие комплекса тетрагидрокортизол-аполипопротеин А-I с эукариотической ДНК и одноцепочечными олигонуклеотидами / Л.Е. Панин, Ф.В. Тузиков, Н.А. Тузикова и др. // Мол. биол. — 2002. — Т. 36. — № 1. — С. 96-102.

6. Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation / T. Vogel, N. H. Guo, R. Guy et al. // J. Cell. Biochem. — 1994. — Vol. 54. — № 3. — P. 299-305.

7. Perlecan mediates the antiproliferative effect of apolipoprotein E on smooth muscle cells. An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cells growth? / L. Paka, I.J. Goldberg, J.C. Obunike et al. // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274. — № 51. — P. 36403-36408.

8. Apolipoprotein E inhibits serum-stimulated cell proliferation and enhances serum-independent cell proliferation / Y.Y. Ho, R.J. Deckelbaum, Y. Chen et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — № 46. — P. 43455-43462.

9. Qui, Z. Apolipoprotein E receptors mediate neurite outgrowth through activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in primary neurons / Z. Qui, B.T. Hyman, G.W. Rebeck // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — № 33. — P. 34948-34956.

10. Moore, Z.W. Apolipoprotein E inhibition of vascular hyperplasia and neointima formation requires inducible nitric oxide synthase / Z.W. Moore, Hui D.Y. // J. Lipid Res. — 2005. — Vol. 46. — № 10. — P. 2083-2090.

11. Apolipoprotein E and colon cancer. Expression in normal and malignant human intestine and effect on cultured human colonic adenocarcinoma cells / M. Niemi, T. Hakkinen, T.J. Karttunen et al. // Eur. J. Intern. Med. — 2002. — Vol. 13. — № 1. — P. 37-43.

12. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells / A. Caruso, M. Motolese, L. Iacovelli et al. // J. Neurochem. — 2006. — Vol. 98. — № 2. — P. 364-371.

13. Taipale, J. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer / J. Taipale, P.A. Beachy // Nature. — 2001. — Vol. 411. — № 6835. — P. 349-354.

14. Seglen, P. Preparation of isolated rat liver cells / P. Seglen // Meth. Cell Biol. — 1976. — Vol. 13. — P. 29-83.

15. Hatch, F.T. Practical method for plasma lipoprotein analysis / F.T. Hatch, R.S. Less // Adv. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2-68.

16. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.

17. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

18. Pepe, M.G. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In / M.G. Pepe, L.K. Curtiss // J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — № 10. — P. 3716-3723.