

Т.Г. Рукша

ЛИГАНД ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ PK11195 МОДУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КОЖИ

ГОУ ВПО Красноярская ГМА

Проведено исследование уровня экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов (ПБР) и маркера клеточной пролиферации PCNA в клетках кожи при воздействии ультрафиолетового излучения и при инкубации с лигандом периферических бензодиазепиновых рецепторов PK11195. Обнаружено модулирующее действие лиганда на исследуемые показатели.

Ключевые слова: клеточная пролиферация, периферический бензодиазепиновый рецептор, злокачественные новообразования кожи

Злокачественные новообразования кожи — одна из самых распространенных онкологических патологий, рост заболеваемости ими отмечается в течение последних 10 лет [1]. Неопластическая трансформация клеток кожи происходит в соответствии с общей концепцией многостадийности развития опухолевого процесса. Нарушения клеточной пролиферации и прогрессивный рост малигнизированных клеток, индуцированный нарушениями регуляции про- и онкогенов, являются одними из ключевых событий в развитии опухолевого заболевания [2]. Поэтому изучение регуляции клеточной пролиферации необходимо для понимания процессов развития и прогрессии онкологических заболеваний, а также для оптимизации методов их терапии.

В 1977 году были обнаружены сайты связывания диазепама в периферических тканях, которые в дальнейшем были названы периферическими бензодиазепиновыми рецепторами (ПБР) для отличия от бензодиазепиновых рецепторов центрального типа [3]. Было обнаружено, что периферические бензодиазепиновые рецепторы участвуют в транспорте холестерина через мембрану митохондрий, что является ключевым моментом в синтезе из холестерина предшественника всех стероидных гормонов [4]. Помимо этого, были выявлены убедительные доказательства участия периферических бензодиазепиновых рецепторов в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза [5, 6]. Повышенные уровни экспрессии рецептора были обнаружены в клетках рака молочной железы, толстого кишечника и предстательной железы [7]. Установлено, что синтетический лиганд периферических бензодиазепиновых рецеп-

торов PK11195 способен модулировать уровень клеточной пролиферации [8].

Существуют немногочисленные данные об экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов в коже [9, 10]. Однако выявлено, что лиганды периферических бензодиазепиновых рецепторов обладают способностью снижать в клетках кожи развитие патологических реакций, индуцированных ультрафиолетовым облучением [11]. Целью данного исследования было изучение эффекта PK11195 на клеточную пролиферацию в клетках нормальной кожи и в опухолевых клетках кожи при воздействии ультрафиолетового облучения.

Методика

Нормальные кератиноциты (клеточная линия NHEK, Clonetics) культивировались в среде KGM-2 (Clonetics) с добавлением эпинефрина, эпидермального фактора роста, инсулина, трансферрина, гентамицина, амфотерицина В, гидрокортизона и бычьего питуитарного экстракта. Нормальные меланоциты (HEM, Cascade biologics) культивировались в Medium 254 (Cascade biologics), содержащей бычий питуитарный экстракт, фетальную бычью сыворотку, бычий инсулин, бычий трансферрин, основной фактор роста фибробластов, гидрокортизон, гепарин и ацетат форболмиристора. Клетки плоскоклеточного рака кожи (клеточная линия A431, ATCC) и клетки злокачественной меланомы кожи (SK-MEL-2, ATCC) культивировались в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Cellgro, Mediatech Inc.), содержащей 10% раствор фетальной бычьей сыворотки, глютамин, пируват натрия и глюкозу. Все клеточные культуры инкубировались при 37 °C с 5% содержанием CO₂.

При достижении 70-80% плотности клетки подвергались трипсинизации и пересевались в чашки Петри. Через 24 часа в клетки добавлялся РК11195 (Sigma) в концентрациях 0,1 нМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ. Далее клетки подвергались воздействию ультрафиолетового света с помощью источника ультрафиолетового света с пиком длины волны в диапазоне 302 нм (модель UVM-57 (San Gabriel) с фильтром Kodacel (Eastman Kodak Co.)). Время облучения составляло 120 секунд, что соответствовало дозе 480 Дж/м².

Через 24 часа производились трипсинизация и лизис клеток. Иммуноблоттинг выполнялся по стандартной методике с антителами к периферическим бензодиазепиновым рецепторам [12] в разведении 1:2000, к PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток), (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Инкубация со вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена в разведении 1:5000 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) осуществлялась в течение 1 часа. Визуализация производилась с помощью ECL (Amersham Biosciences). Для подтверждения идентичного содержания белка в каждом образце при проведении электрофореза в дальнейшем мембраны реинкубировались с антителами к GAPDH (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа) (1:10000, Trevigen Inc.). Показатели экспрессии ПБР и PCNA для каждого образца определялись

с помощью программы Kodak 1D 3.6 как отношение интенсивности свечения банды, соответствующего ПБР или PCNA, к банде, соответствующему GAPDH.

Статистическая обработка результатов определялась с помощью критерия Уилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

В нормальных кератиноцитах ультрафиолетовое облучение в дозе 480 Дж/м² вызывало достоверное снижение уровня экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и уровня PCNA по сравнению с контролем (Рис. 1, таблица 1). При инкубации клеток с РК11195 в сочетании с воздействием ультрафиолетового облучения уровень экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов оставался достоверно ниже контроля вне зависимости от концентрации лиганда. При инкубации кератиноцитов с РК11195 в концентрациях 0,1 нМ и 1 нМ и воздействии ультрафиолетового облучения происходило достоверное снижение уровня PCNA, в концентрации 100 нМ отмечалось увеличение уровня экспрессии маркера клеточной пролиферации. Не было обнаружено достоверной корреляции между уровнями периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA при воздействии различных доз РК11195 с ультрафиолетовым облучением на нормальные кератиноциты.

Таблица 1

Уровни экспрессии ПБР и PCNA в нормальных кератиноцитах после инкубации с РК11195 и ультрафиолетового облучения

	Контроль	УФ	0,1нМ РК111195 +УФ	1нМ РК111195 +УФ	10нМ РК111195 +УФ	100нМ РК111195 +УФ
ПБР	1,16	0,35*	0,53*	0,6*	0,47*	0,9*
PCNA	0,02	0,01*	0,007*	0,004*	0,02	0,06*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$

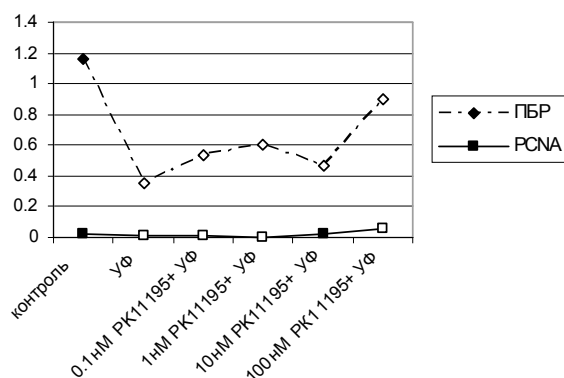


Рис. 1. Уровни экспрессии ПБР и PCNA в нормальных кератиноцитах

Примечание: точками с белым фоном отмечены значения, достоверно различные по сравнению со значением в контроле по данному показателю ($P < 0,05$)

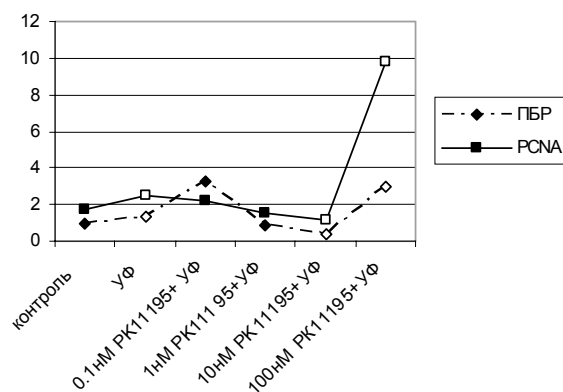


Рис. 2. Уровни экспрессии ПБР и PCNA в клетках плоскоклеточного рака

Примечание: точками с белым фоном отмечены значения, достоверно различные по сравнению со значением в контроле по данному показателю ($P < 0,05$)

Таблица 2

**Уровни экспрессии ПБР и PCNA в клетках плоскоклеточного рака кожи
после инкубации с РК11195 и ультрафиолетового облучения**

	Контроль	УФ	0,1нМ РК111195 +УФ	1нМ РК111195 +УФ	10нМ РК111195 +УФ	100нМ РК111195 +УФ
ПБР	0,93	1,34*	3,3	0,88	0,34*	3,01*
PCNA	1,74	2,54*	2,2	1,56	1,14*	9,84*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$

Таблица 3

**Уровни экспрессии ПБР и PCNA в нормальных меланоцитах
после инкубации с РК11195 и ультрафиолетового облучения**

	Контроль	УФ	0,1нМ РК111195 +УФ	1нМ РК111195 +УФ	10нМ РК111195 +УФ	100нМ РК111195 +УФ
ПБР	0,74	0,41*	0,68	0,9	1,2*	1,1*
PCNA	0,08	0,02*	0,06	0,09	1,06*	0*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$

Таблица 4

**Уровни экспрессии ПБР и PCNA в клетках меланомы
после инкубации с РК11195 и ультрафиолетового облучения**

	Контроль	УФ	0,1нМ РК111195 +УФ	1нМ РК111195 +УФ	10нМ РК111195 +УФ	100нМ РК111195 +УФ
ПБР	0,3	0,04*	0,8*	0,7*	1,71*	0,17*
PCNA	0,57	0,37*	1,21*	0,84*	1,9*	0,4*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю, $P < 0,05$

В клетках плоскоклеточного рака облучение ультрафиолетовым излучением в дозе 480 Дж/м² приводило к повышению экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA (Рис. 2, таблица 2). Инкубация с РК11195 в концентрации 10 нМ при воздействии ультрафиолетового излучения приводила к снижению экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA, при повышении концентрации лиганда до 100 нМ отмечалось повышение

экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA по сравнению с контролем. Была обнаружена положительная корреляционная связь между уровнями экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA в клетках плоскоклеточного рака при воздействии РК11195 в присутствии ультрафиолетового излучения ($r=0,83$, $\alpha=0,1$).

В нормальных меланоцитах ультрафиолетовое излучение без воздействия лигандом

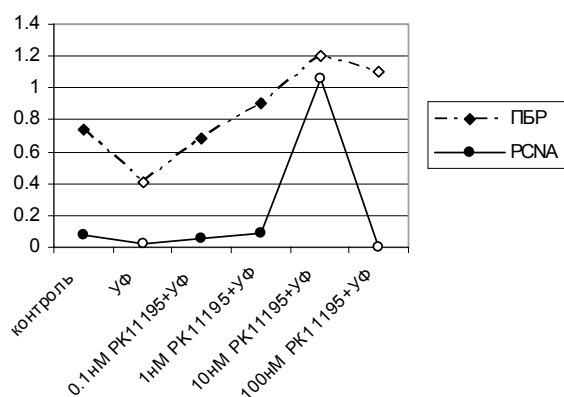


Рис. 3. Уровни экспрессии ПБР и PCNA в нормальных меланоцитах

Примечание: точками с белым фоном отмечены значения, достоверно различные по сравнению со значением в контроле по данному показателю ($P < 0,05$)

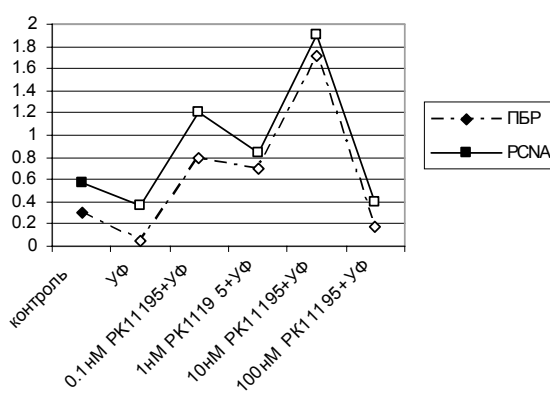


Рис. 4. Уровни экспрессии ПБР и PCNA в клетках меланомы кожи

Примечание: точками с белым фоном отмечены значения, достоверно различные по сравнению со значением в контроле по данному показателю ($P < 0,05$)

PK11195 вызывало снижение уровня периферических бензодиазепиновых рецепторов, а также экспрессии PCNA в клетках (Рис. 3, таблица 3). Инкубация с лигандом в сочетании с ультрафиолетовым облучением в концентрациях 10 нМ и 100 нМ приводила к повышению экспрессии ПБР. Происходило повышение экспрессии PCNA при инкубации с PK11195 в концентрации 10 нМ и резкое снижение уровня PCNA при действии лиганда в концентрации 100 нМ. Отмечалась слабая корреляционная связь между экспрессией периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA при воздействии PK11195 и ультрафиолетового излучения ($r=0,43$, $\alpha=0,5$).

В клетках меланомы кожи ультрафиолетовое излучение вызывало достоверное снижение уровней экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA (Рис. 4, таблица 4). Уровень периферических бензодиазепиновых рецепторов при ультрафиолетовом облучении и инкубации с PK11195 в концентрациях 0,1 нМ, 1 нМ и 10 нМ был достоверно выше, чем в контроле. При данных концентрациях лиганда также отмечалось достоверное увеличение уровней PCNA. При концентрации лиганда 100 нМ происходило достоверное снижение экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA. Была выявлена положительная корреляционная связь в клетках меланомы между уровнями периферических бензодиазепиновых рецепторов и PCNA ($r=0,94$, $\alpha=0,02$) при инкубации с PK11195 в сочетании с воздействием ультрафиолетового излучения.

Заключение

Проведенные исследования выявили, что при воздействии ультрафиолетового излучения в дозе 480 Дж/м² происходит достоверное однонаправленное изменение уровней экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов и маркера клеточной пролиферации PCNA в нормальных и злокачественных клетках кожи. Известно, что ультрафиолетовое излучение обладает способностью вызывать полимеризацию рецептора, что сопровождается изменением его функциональной активности [13]. Таким образом, являясь фоточувствительным белком и обладая способностью принимать участие в регуляции клеточной пролиферации, периферический бензодиазепиновый рецептор вероятно, участвует в коже в реакциях, индуцированных ультрафиолетовым излучением, и может регулировать интенсивность клеточной пролиферации при воздействии ультрафиолетового излучения.

Известно, что лиганд периферических бензодиазепиновых рецепторов PK11195 обладает

бифазным эффектом на пролиферацию клеток: в низких концентрациях снижает интенсивность клеточной пролиферации, в высоких дозах — повышает [8]. В клетках кожи при ультрафиолетовом излучении эффект PK11195 также носит бифазный характер и характеризуется достоверными изменениями уровней клеточной пролиферации и экспрессии периферических бензодиазепиновых рецепторов. Несмотря на различия концентраций PK11195, которые приводят к изменению уровней клеточной пролиферации в тестируемых типах клеток кожи, сохраняется однонаправленный эффект лиганда на экспрессию периферических бензодиазепиновых рецепторов и интенсивность клеточной пролиферации в нормальных меланоцитах, клетках плоскоклеточного рака и меланомы кожи.

Выявленные данные, а также наличие корреляции между интенсивностью клеточной пролиферации и экспрессией ПБР указывают на присутствие функционально активного рецептора как в нормальных, так и в злокачественных клетках кожи. Различия в эффекте тестируемых концентраций лиганда на исследуемые показатели между типами клеток кожи могут быть объяснены различной чувствительностью кератиноцитов и меланоцитов кожи к ультрафиолетовому облучению, особенностями функционирования рецептора в данных типах клеток. Остается неизвестным, меняется ли функциональная активность периферического бензодиазепинового рецептора в опухолевых клетках кожи и играет ли патогенетическую роль рецептор в опухолевой трансформации клеток кожи, которая, как известно, индуцируется ультрафиолетовым излучением и характеризуется увеличением пролиферации клеток.

Дальнейшее изучение влияния периферических бензодиазепиновых рецепторов и их лигандов на клеточную пролиферацию в клетках кожи является перспективным для формирования новых подходов к диагностике и терапии дерматологических заболеваний, ассоциированных с нарушениями процесса клеточной пролиферации.

Исследование выполнено при поддержке гранта Boehringer Ingelheim Founds для биомедицинских исследований и гранта Красноярского краевого фонда науки для молодых ученых

PBR LIGAND PK11195 MODULATES CELL PROLIFERATION IN SKIN CELLS

T.G. Ruksha

Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and PCNA levels were estimated in skin cells in the presence of specific PBR ligand PK11195 under ultraviolet exposure. PK11195 showed modulatory effect on PBR and PCNA levels.

Литература

1. Заболеваемость населения России злокачественными новообразованиями в 2000 г. / В.В. Старинский, Г.В. Петрова, В.Т. Чиссов и др. // Рос. онкол. ж. — 2002. — №3. — С. 39-44.
2. Гарькавцева Р.Ф. Молекулярно-генетические аспекты злокачественных новообразований / Р.Ф. Гарькавцева, И.Ф. Гарькавцев // Вестн. РАМН. — 1999. — №2. — С. 38-44.
3. Braestrup, C. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [³H]diazepam binding / C. Braestrup, R.F. Squires // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 74. — P. 3805-3809.
4. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis / V. Papadopoulos, H. Amri, N. Boujrad, et al. // Steroids. — 1997. — Vol. 62. — P. 21-28.
5. Relation of cell proliferation to expression of peripheral benzodiazepine receptors in human breast cancer cell lines / A. Beinlich, R. Strohmeier, M. Kaufmann, et al. // Biochem. Pharmacol. — 2000. — Vol. 60. — P. 397-402.
6. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells / K. Maaser, M. Hopfner, A. Jansen, et al. // Br. J. Cancer. — 2001. — Vol. 85. — P. 1771-1780.
7. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression / Z. Han, R.S. Slack, W. Li, et al. // J. Recept. Signal. Transduct. Res. — 2003. — Vol. 23. — P. 225-238.
8. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol / M. Hardwick, D. Fertikh, M. Culty, et al. // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 831-842.
9. The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin: the relationship with epidermal differentiation / P.E. Stoeber, P. Carayon, G. Penarier, et al. // Br. J. Dermatol. — 1998. — Vol. 140. — P. 1010-1016.
10. Апоптоз кератиноцитов и экспрессия периферических бензодиазепиновых рецепторов при псориазе / Т.Г. Рукша, В. И. Прохоренков, А.Б. Салмина и др. // Вестн. дерматол. венерол. — 2004. — №5. — С. 4-6.
11. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis / P.E. Stoeber, P. Carayon, P. Casellas, et al. // Cell Death Differ. — 2001. — Vol. 8. — P. 747-753.
12. Peripheral-type benzodiazepine receptor — mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria / T. Hauet, Z.-X. Yao, H.S. Bose, et al. // Mol. Endocrinol. — 2005. — Vol. 19. — P. 540-554.
13. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding / F. Delavoie, H. Li, M. Hardwick, et al. // Biochemistry. — 2003. — Vol. 42. — P. 4506-4519.