

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Дина Валерьевна СУМЕНКОВА, Роман Александрович КНЯЗЕВ, Лев Михайлович ПОЛЯКОВ,
Лев Евгеньевич ПАНИН

НИИ биохимии СО РАМН

630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе показано участие макрофагов в регуляции скорости биосинтеза белка в опухолевых клетках под влиянием липопротеинов высокой плотности и стероидных гормонов (кортизола и прогестерона). Липопротеины высокой плотности и стероидные гормоны увеличивали скорость биосинтеза белка в культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха, содержащей опухоль-ассоциированные макрофаги, по сравнению с культурой опухолевых клеток без макрофагов. Механизм данного явления связан, на наш взгляд, с образованием в макрофагах биологически активных комплексов аполипопротеина А-I с восстановленными формами стероидных гормонов. Аполипопротеин Е ингибировал стимулирующий эффект липопротеинов высокой плотности и стероидных гормонов.

Ключевые слова: липопротеины, стероидные гормоны, макрофаги, биосинтез белка, асцитная карцинома Эрлиха.

В НИИ биохимии СО РАМН было открыто явление стимуляции резидентными макрофагами биосинтеза белка в паренхимных клетках органов и тканей в процессе регенерации [1]. В основе механизма этого явления лежит образование биологически активного комплекса «аполипопротеин А-I — тетрагидрокортизол» («апо А-I — ТГК») при участии макрофагов. Показано, что макрофаги кооперативно захватывают липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и кортизол [2]. ЛПВП при участии лизосомальных гидролаз дезинтегрируются с освобождением аполипопротеина А-I, а кортизол подвергается действию внутриклеточных редуктаз с образованием восстановленной формы — тетрагидрокортизола. Полученные продукты формируют биологически активный комплекс, который, попадая в соматические клетки, взаимодействует с ДНК и усиливает экспрессию генов [3]. Так, на культуре гепатоцитов крыс было показано, что комплекс «апо А-I — ТГК» увеличивает скорость биосинтеза белка и нуклеиновых кислот [4, 5]. При этом для активации экспрессии генов необходима именно восстановленная Δ_4 -3-кетогруппа кольца А стероидных гормонов. Такая группа входит в состав многих других стероидов, например, прегненолона. И подобные комплексы апо А-I с восстановленными формами стероидных гормонов могут образовываться в макрофагах при участии ЛПВП. Оказалось, что комплекс апо А-I с прегненолоном также обладает высокой биологической активностью и усиливает скорость

биосинтеза белка в гепатоцитах [6]. Такой комплекс, вероятно, может образовываться в макрофагах из прогестерона и ЛПВП. Предполагается, что описанный механизм участия макрофагов в регуляции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот играет важную роль в процессах регенерации, пролиферации и может реализовываться в системе «макрофаг — опухолевая клетка». Целью настоящей работы явилось изучение роли липопротеинов плазмы крови и стероидных гормонов в регуляции биосинтеза белка в опухолевых клетках при участии макрофагов.

Материал и методы

Исследования проводили на культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха, выделенной из мышечной линии СВА массой 15–20 г в лог-фазе опухолевого роста (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). 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 № 755). Свежевыделенные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), pH 7,4, содержащей 20 mM HEPES («ICN Biomedicals, Inc», США), 2 mM L-глутамин («Вектор», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 mM глюкозы. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения трипанового синего («Serva», Германия), составляла не менее 95 %. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе

Суменкова Д.В. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии,
e-mail: dinasumenkova@mail.ru

Князев Р.А. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии, e-mail: knyazev@soramn.ru

Поляков Л.М. — д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, e-mail: plm@soramn.ru

Панин Л.Е. — академик РАМН, директор НИИ биохимии СО РАМН, e-mail: ibch@soramn.ru

(«Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 95 % воздуха, при температуре 37 °С, используя 6-луночные планшеты («Orange Scientific», США). Плотность клеток составляла 1,5 тыс./мм². Для получения культуры клеток асцитной карциномы, свободной от макрофагов, исходную суспензию клеток инкубировали 30 мин, а после адгезии макрофагов содержимое лунки переносили в другой планшет. Макрофаги здоровых мышей выделяли из перитонеального «лаважа» и инкубировали описанным способом.

Липопротеины выделяли из плазмы крови человека методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ [7] на центрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия). Полученные липопротеины обессоливали методом гель-фильтрации (колонка: 20 × 0,8 см, Сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), элюент: 0,05 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl).

Липопротеины очень низкой плотности делипидировали охлажденной смесью этанол – ацетон (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром и из суммарных белков выделяли аполипопротеин Е (апо Е) методом гель-фильтрации (колонка: 100×1,6 см, Сефароза CL-6B («Amersham Biosciences», Швеция), элюент: 0,01 М трис-HCl буфер, pH 8,6, содержащий 6 М мочевины, 0,01 % азида натрия, 1 мМ фенилметансульфонил фторида). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе («2151 LKB», Швеция). Анализ чистоты апо Е проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия («Serva», Германия) [8]. В качестве

маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов. Белковые полосы визуализировали 0,1%-ным Кумасси G-250 в смеси метанола и 10%-ной уксусной кислоты (1:1). Обессоливание апо Е проводили методом гель-фильтрации, используя в качестве носителя Сефадекс G-25.

Для анализа спектра внутриклеточных белков макрофагов клетки лизировали раствором, содержащим 10 мМ фосфорнокислого натрия, pH 7,2, 85 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 0,5 % дезоксихолата натрия и 1 % Тритона X-100.

Иммуноэлектроблоттинг проводили «полусухим» методом с использованием нитроцеллюлозных мембран («Schleicher & Schuell», ФРГ) с диаметром пор 0,45 мкм. Специфические антитела против апо Е получали описанным нами ранее методом [9]. Данные иммуноэлектроблоттинга обрабатывали с помощью компьютерной программы «TotalLab» (Biosystematics, New Horizons in gel imaging and analysis).

Скорость биосинтеза белка в культуре клеток асцитной карциномы определяли по включению ¹⁴С-лейцина («Amersham», Англия). Метку добавляли в количестве 2 мКи/мл среды за 3 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%-ной трихлоруксусной кислоты и смесью этанол – эфир (1:1). Фильтры для измерения радиоактивности белка предварительно обрабатывали 0,1 М раствором

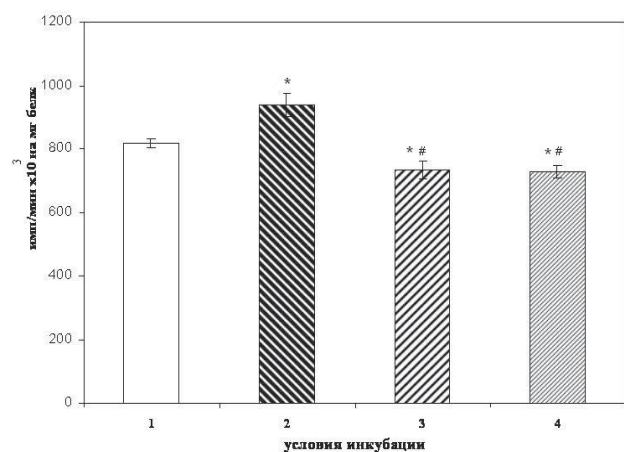


Рис. 1. Скорость биосинтеза белка в клетках асцитной карциномы Эрлиха под влиянием ЛПВП и кортизола. 1 – клетки карциномы, 2 – клетки карциномы + ЛПВП + кортизол, 3 – клетки карциномы + апо Е + ЛПВП + кортизол, 4 – клетки карциномы без макрофагов + ЛПВП + кортизол; * – достоверное различие с группой 1 ($p < 0,05$), # – достоверное различие с группой 2 ($p < 0,05$).

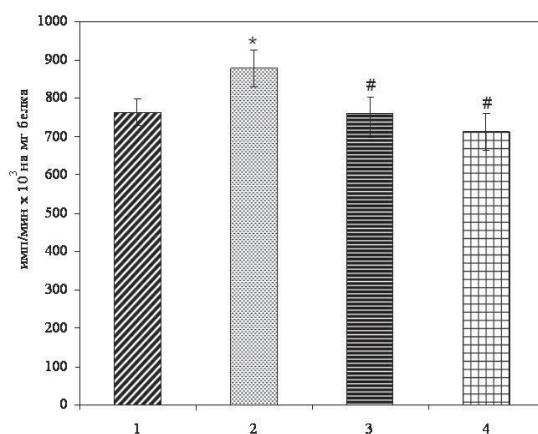


Рис. 2. Скорость биосинтеза белка в клетках асцитной карциномы Эрлиха под влиянием ЛПВП и прогестерона. 1 – клетки карциномы, 2 – клетки карциномы + ЛПВП + прогестерон, 3 – клетки карциномы + апо Е + ЛПВП + прогестерон, 4 – клетки карциномы без макрофагов + ЛПВП + прогестерон; * – достоверное различие с группой 1 ($p < 0,05$), # – достоверное различие с группой 2 ($p < 0,05$).

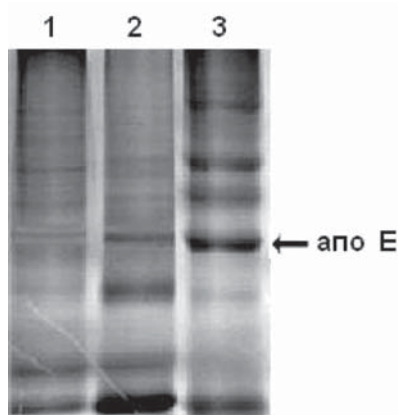


Рис. 3. Электрофореграмма внутриклеточных белков перитонеальных макрофагов мышей.
1 – опухоль-ассоциированные макрофаги,
2 – макрофаги здоровых мышей, 3 – белки ЛПОНП.

лейцина в 10%-ной 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 методике Варбурга и Кристиана [10].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты

Для доказательства роли липопротеинов плазмы крови и стероидных гормонов в регуляции биосинтеза белка в опухолевых клетках и участия макрофагов в этом процессе клетки асцитной карциномы Эрлиха, содержащей 40 % опухоль-ассоциированных макрофагов, инкубировали с ЛПВП и стероидными гормонами – кортизолом и прогестероном. ЛПВП добавляли в среду инкубации в количестве 1 мг белка на 1 мл среды, стероидные гормоны – в концентрации 1×10^{-6} М. Присутствие ЛПВП и кортизола в среде инкубации клеток асцитной карциномы, среди которых были и макрофаги, приводило к увеличению скорости биосинтеза белка в опухолевых клетках по сравнению с контролем на 15 %, а по сравнению с культурой клеток карциномы, свободной от макрофагов, на 29 % (рис. 1). Добавление ЛПВП и прогестерона сопровождалось повышением скорости биосинтеза белка в опухолевых клетках на 15 % по сравнению с контролем и на 23 % по сравнению с культурой клеток карциномы без макрофагов (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли макрофагов в регуляции биосинтеза белка в опухолевых клетках при участии ЛПВП и стероидных гормонов. Роль макрофагов заключается в восстановлении

Δ_4 -3-кетогруппы кольца А стероидного гормона в результате действия 5α - и 5β -редуктаз, метаболической деградации белкового компонента ЛПВП и образовании биологически активного комплекса «апо А-I – стероид», непосредственно влияющего на скорость биосинтеза белка. Мы полагаем, что при добавлении кортизола образуется комплекс «апо А-I – ТКК», а при добавлении прогестерона – комплекс «апо А-I – прегненолон».

Одним из факторов, участвующих в регуляции биосинтеза белка, может быть аполипопротеин Е, содержание которого составляет 10–25 % от общего секретируемого макрофагами белка [11]. Однако в спектре внутриклеточных белков опухоль-ассоциированных макрофагов количество апо Е меньше, чем в макрофагах здоровых мышей (рис. 3). Иммуноэлектроблоттинг и денситометрический анализ показали снижение содержания апо Е в дегликозилированной форме (банд 2), что может свидетельствовать о нарушении посттрансляционной модификации данного белка в опухоль-ассоциированных макрофагах (рис. 4).

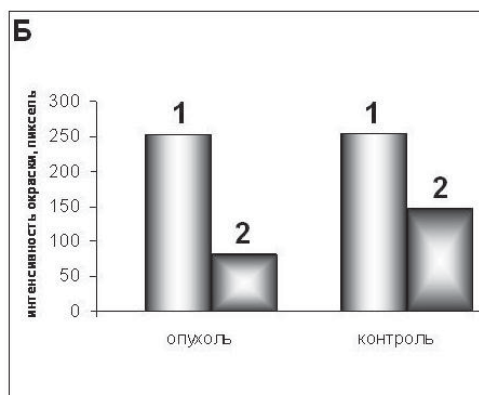
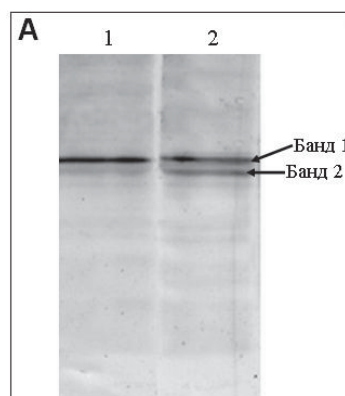


Рис. 4. Анализ внутриклеточного содержания аполипопротеина Е в перитонеальных макрофагах мышей. А – данные иммуноэлектроблоттинга с использованием специфических апо Е-антител: 1 – опухоль-ассоциированные макрофаги, 2 – макрофаги здоровых мышей, банд 1 – гликозилированная форма апо Е, банд 2 – дегликозилированная форма апо Е; Б – денситометрия бандов апо Е-иммунореактивности: 1 – банд 1, 2 – банд 2.

Учитывая данный факт, а также известную способность апо Е оказывать антипролиферативный эффект [12], мы поставили задачу изучить влияние экзогенного апо Е на скорость биосинтеза белка в опухолевых клетках. Добавление хроматографически очищенного апо Е в концентрации 10 мкг/мл среды к клеткам асцитной карциномы приводило к снижению скорости биосинтеза белка (рис. 1, 2). Следовательно, апо Е подавлял эффект комплексов «апо А-I – ТКК» и «апо А-I – прегненолон», образующихся в макрофагах. Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными об ингибирующем влиянии апо Е на биосинтез белка в культуре гепатоцитов здоровых крыс [5].

Выводы

Липопротеины высокой плотности и стероидные гормоны увеличивают скорость биосинтеза белка в опухолевых клетках при участии макрофагов, что обусловлено образованием биологически активных комплексов «апо А-I – восстановленная форма стероидного гормона».

В спектре внутриклеточных белков опухолеассоциированных макрофагов снижено содержание аполипопротеина Е.

Аполипопротеин Е ингибирует стимулирующий эффект липопротеинов и стероидных гормонов.

Список литературы

1. Панин Л.Е. Явление стимуляции резидентными макрофагами биосинтеза белка в паренхимных клетках органов и тканей // Бюл. СО РАМН. 1998. (3). 11–23.
2. Русских Г.С., Суменкова Д.В., Поляков Л.М., Зуева Т.В. Роль макрофагов в поглощении и метаболической деградации белкового компонента липопротеинов высокой плотности // Бюл. СО РАМН. 2007. (5). 45–48.
3. Russkikh G.S., Sumenkova D.V., Polyakov L.M., Zueva T.V. Role of macrophages in absorption and metabolic degradation of protein component of high density lipoproteins // Bul. SO RAMN. 2007. (5). 45–48.
4. Панин Л.Е., Хощенко О.М., Усынин И.Ф. Роль аполипопротеина А-I в активации биосинтеза белка и ДНК в гепатоцитах под влиянием стероидных гормонов // Бюл. exper. биол. и мед. 2001. 131. (1). 63–65.
5. Panin L.E., Khoshchenko O.M., Usynin I.F. Role of apolipoprotein A-I in steroid-induced activation of DNA and protein synthesis in hepatocytes // Bul. exper. biol. med. 2001. 131. (1). 50–52.
6. Панин Л.Е., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Взаимодействие аполипопротеинов А-I и Е в регуляции биосинтеза ДНК, РНК и белка в культуре гепатоцитов крыс // Бюл. exper. биол. и мед. 2007. 144. (12). 629–631.
7. Panin L.E., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Polyakov L.M. The interaction of apolipoprotein A-I and E in the regulation of DNA, RNA and protein biosynthesis in cultured rat hepatocytes // Bul. exper. biol. med. 2007. 144. (6). 780–782.
8. Панин Л.Е., Князев Р.А., Суменкова Д.В., Поляков Л.М. Влияние комплексов аполипопротеина А-I с тетрагидрокортизолом и прегненолоном на биосинтез белка в культуре гепатоцитов крыс // Бюл. exper. биол. и мед. 2007. 144. (9). 264–266.
9. Panin L.E., Knyazev R.A., Sumenkova D.V., Polyakov L.M. Effect of complexes of apolipoprotein A-I with tetrahydrocortisol and pregnenolone on protein biosynthesis in rat hepatocytes culture // Bul. exper. biol. med. 2007. 144. (3). 291–293.
10. Hatch F.T., Less R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid Res. 1968. 6. 2–68.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // U.K. Laemmli // Nature. 1970. 227. 680–685.
12. Панин Л.Е., Русских Г.С., Поляков Л.М. Обнаружение иммунореактивности к аполипопротеинам А-I, В и Е в ядрах клеток тканей крыс // Биохимия. 2000. 65. (12). 1684–1689.
13. Panin L.E., Russkikh G.S., Polyakov L.M. Detection of apolipoprotein A-I, D and E immunoreactivity in the nuclei of various rat tissue cells // Biochemistry (Mosc). 2000. 65. (12). 1419–1423.
14. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. 464 с.
15. Dason R., Eliot D., Eliot U., Jons K. Handbook of biochemist. M., 1991. 464 p.
16. Werb Z., Chin J.R., Takemura R. et al. The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages // Ciba Found Symp. 1986. 118. 155.
17. Paka L., Goldberg I.J., Obunike J.C. et al. Perlecan mediates the antiproliferative effect of apolipoprotein E on smooth muscle cells. An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cells growth? // J. Biol. Chem. 1999. 274. (51). 36403–36408.

EFFECT OF LIPOPROTEINS AND STEROID HORMONES ON THE RATE OF PROTEIN BIOSYNTHESIS IN EHRlich CARCINOMA CELLS

Dina Valerievna SUMENKOVA, Roman Alexandrovitch KNYAZEY, Lev Mikhailovitch POLYAKOV,
Lev Evgenevitch PANIN

Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2

The role of macrophages in regulation of protein biosynthesis in tumoral cells under influence high density lipoproteins and steroid hormones (cortisole and progesterone) was shown in the work. High density lipoproteins and steroid hormones increased the rate of protein biosynthesis in culture of Ehrlich carcinoma cells, containing tumor-associated macrophages, in comparison with culture of tumoral cells without macrophages. The mechanism of the phenomenon is connected, in our opinion, with formation in macrophages of biologically active complexes «apolipoprotein A-I – reduced forms of steroid hormones». Apolipoprotein E suppressed stimulating effect lipoproteins and steroid hormones.

Key words: lipoproteins, steroid hormones, macrophages, biosynthesis of protein, Ehrlich carcinoma.

Sumenkova D.V. – candidate of biological sciences, senior scientific researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: dinasumenkova@mail.ru

Knyazev R.A. – candidate of biological sciences, senior scientific researcher of laboratory of medical biotechnology, e-mail: knyazev@soramn.ru

Polyakov L.M. – doctor of medical sciences, professor, deputy director on scientific work, e-mail: plm@soramn.ru

Panin L.E. – academician of the RAMS, director Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS, e-mail: ibch@soramn.ru