

ВЛИЯНИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В КОМПЛЕКСЕ С ЭСТРОНОМ НА БИОСИНТЕЗ ДНК В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

Трифонов Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М.

«НИИ биохимии», Новосибирск, ул. Тимакова 2, тел 8 (383) 332-56-58,

Nataliya.V.T@yandex.ru

Резюме: В работе показано, что аполипопротеин А-I (апоА-I) образует комплекс с женским половым гормоном – эстроном. Рассчитана константа связывания (K_s) апоА-I с гормоном. На культуре гепатоцитов крыс показано, что комплекс апоА-I – эстрон усиливает пролиферацию гепатоцитов крыс по отношению к гормону без переносчика. Предполагается, что полученный эффект реализуется посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Ключевые слова: гепатоциты, липопротеины, аполипопротеин А-I (апоА-I), эстрон, биосинтез ДНК.

INFLUENCE APOLIPOPROTEIN A-I IN COMPLEX WITH ESTRONE ON DNA BIOSYNTHESIS IN RAT HEPATOCYT CULTURE

Trifonova N.V., Knyazev R.A., Polyakov L.M.

«Institute of Biochemistry», Novosibirsk

Abstract: The paper shows that apolipoprotein AI (apoA-I) forms a complex with a female sex hormone - estrone. Calculated binding constant for complexes apoA-I-hormone. In the culture of rat hepatocytes demonstrated that complex apoA-I-estrone enhances the proliferation of rat hepatocytes against the simple hormone without a carrier. It is assumed that the resulting effect is realized by means of receptor-mediated endocytosis.

Key words: hepatocytes, lipoproteins, apolipoprotein A-I (apoA-I), estrone, DNA biosynthesis.

Введение: Многие ткани организма являются мишенями для половых гормонов. Эстрогены оказывают прямое воздействие на воспроизводство и развитие вторичных половых признаков, пролиферацию хрящей, синтез и кальцификацию костной матрицы,

морфогенез костей. Показано, что эстрогены влияют на сердечно-сосудистую систему и ее функции [1, 2].

В организме эстрогены транспортируются с глобулином, связывающим половые гормоны (ГСПГ) [3]. Биологическая активация эстрогенов происходит преимущественно посредством связывания с внутриклеточными рецепторами [4]. Ранее, в работах НИИ биохимии было показано, что стероидные гормоны способны образовывать устойчивые комплексы с липопротеинами плазмы крови. Наиболее высокое сродство к стероидам обнаружено для липопротеинов высокой плотности. Эти результаты позволяют сделать предположение о способности стероидных гормонов проникать в клетку в составе липопротеиновых комплексов [5, 6].

Целью данного исследования явилось изучение способности апоА-I образовывать комплекс с эстроном и оценить влияние апоА-I в комплексе с гормоном на биосинтез ДНК в культуре гепатоцитов крыс.

Материалы и методы исследования: Для эксперимента использовали крыс-самцов линии Wistar, 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)

Первичные гепатоциты изолировали с помощью 2-х стадийной ферментативной перфузии печени, как описано в работе Papeleu P. et al. [7].

Липопротеины выделяли из плазмы крови методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворах КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ [8] на центрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия). Полученную фракцию липопротеинов высокой плотности (ЛПВП, $1,063 < d < 1,21$ г/мл) делипидировали охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром. Для выделения апоА-I суммарные белки ЛПВП наносили на колонку (1,6 x 100 см) с Сефарозой 6B-CL "Pharmacia" (Швеция) и элюировали 0,01 М Трис-HCl буфером, рН 8,6, содержащим 6 М мочевины, 0,01% азид натрия и 1 мМ фенилметансульфонилфторид. Проверку чистоты апоА-I осуществляли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [9] (рис.1).

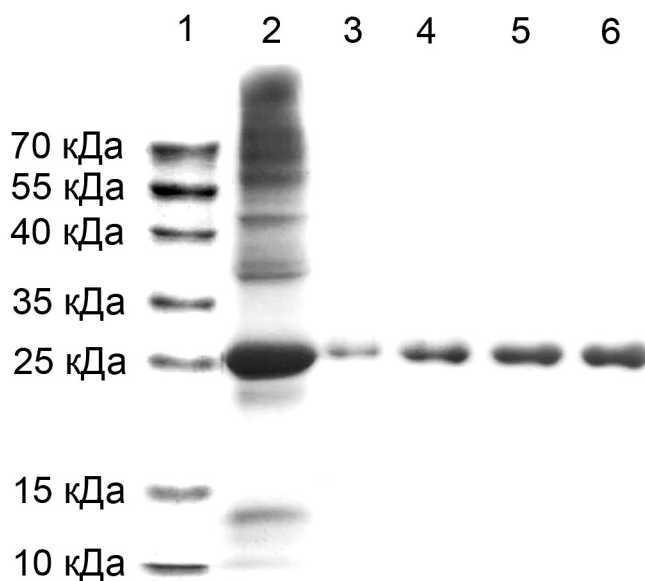


Рис. 1. Электрофореграмма хроматографической очистки апоА-I

- 1 – низкомолекулярные белки-стандарты;
- 2 – суммарные белки ЛПВП;
- 3-6 – стадии очистки апоА-I.

Методом тушения триптофановой флуоресценции оценивали взаимодействие апоА-I с эстроном на спектрофлуориметре MPF-4 «Хитачи» (Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 450 нм [10]. В работе использовали раствор эстрона (Serva, ФРГ) ($5,5 \times 10^{-3}$ М) в 96% этаноле. Титрование проводили добавлением аликвот стероидного гормона (1мкл) к 2 мл раствора апоА-I. Концентрация этанола в конечном объеме не превышала 0,5%. Расчет константы и число мест связывания осуществляли по методу Атгала и Лата [11].

Скорость биосинтеза ДНК в культуре гепатоцитов определяли по включению радиоактивной метки («Amersham», Англия) в количестве 2 μ Ки/мл среды, используя ^{3} Н-тимидин – за 21 ч. Реакцию останавливали добавлением 0,2н раствора NaOH. Радиоактивность образцов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике («Mark-III», США) и выражали в имп/мин на 1 мг белка [12]. Количественное определение белка проводили по методу Варбурга и Кристиана, как описано в работе Suzuki T. [13].

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

Результаты. Методом тушения триптофановой флуоресценции показано взаимодействие апоА-I с эстроном. Снижение флуоресценции составило 38%. На основании кривых тушения флуоресценции рассчитана константа ассоциации при

взаимодействии апоА-I с эстроном, которая составила $0,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Полученные данные говорят об образовании достаточно стабильного комплекса апоА-I-эстрон.

На культуре гепатоцитов крыс показано, что комплекс апоА-I-эстрон при добавлении в среду инкубации увеличивает скорость биосинтеза ДНК, определяемую по включению ^3H -тимидина, в 4,4 раза по отношению к контрольной группе (рис. 2).

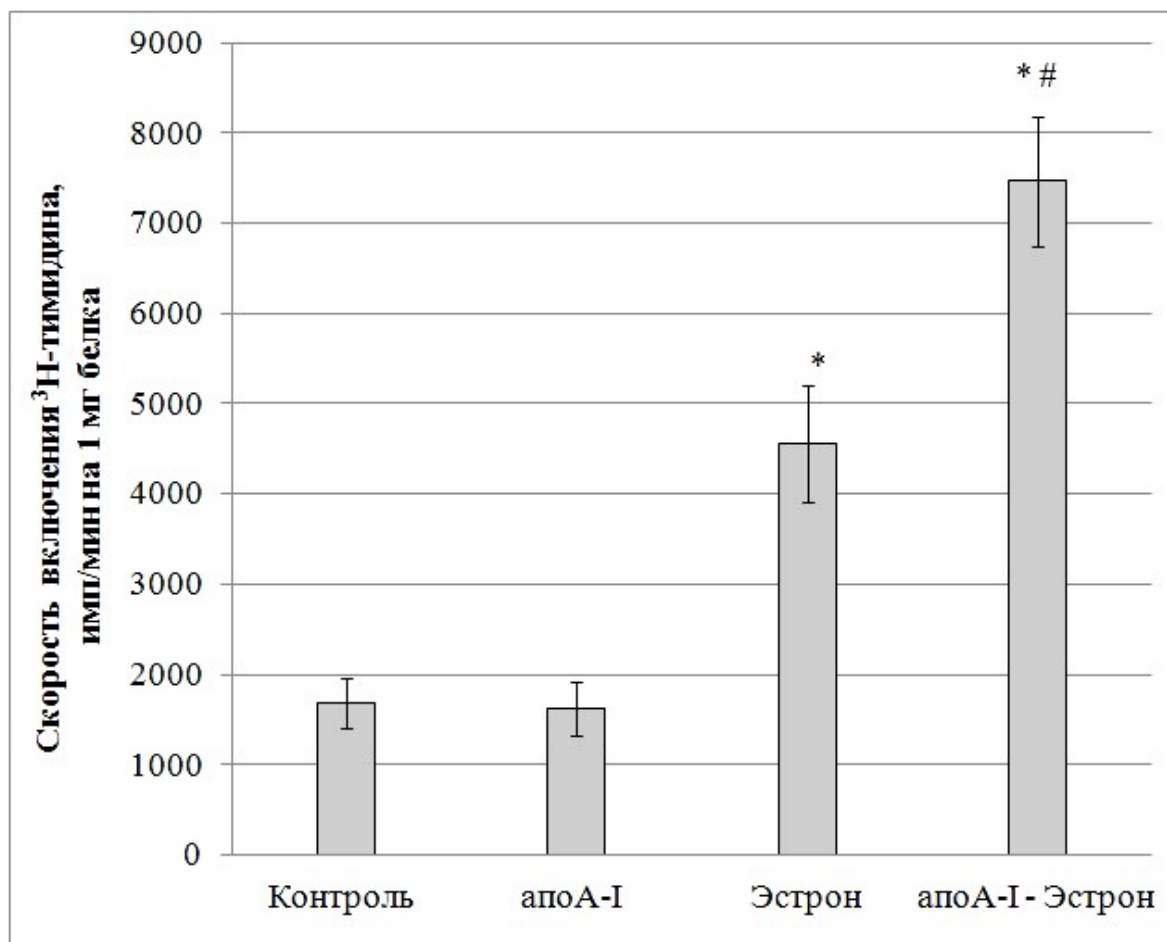


Рис.2. Изменение скорости биосинтеза ДНК в гепатоцитах крыс под влиянием комплекс апоА-I-эстрон.

* - достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,001$)

- достоверное различие по сравнению с эстроном ($p < 0,05$)

В группе, где присутствовал только эстрон, также наблюдалось увеличение скорости биосинтеза ДНК в 1,6 раза по сравнению с контролем. Добавление «чистого» апоА-I оставляло скорость биосинтеза ДНК на уровне контрольных значений. Отличие эффектов в группе эстрон и апоА-I-эстрон можно объяснить тем, что на поверхности гепатоцитов присутствуют рецепторы к апоА-I, таким образом, комплекс апоА-I с эстроном попадает в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что, в свою очередь, является более эффективным в реализации биологического эффекта эстрогена. Ранее было показано, что апоА-I образует комплексы с другим женским половым

гормоном эстриолом и эффективно влияет на пролиферацию гепатоцитов крыс [14]. Таким образом, можно сделать вывод, что данный механизм регуляции является универсальным и может играть важную роль в процессах внутриклеточной регенерации и пролиферации.

Литература

1. Federman D.D. The biology of human sex differences // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – Т. 354. – №. 14. – С. 1507-1514
2. Westerlind K.C. The role of estrogen metabolism in aging // *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. – 2003. – Т. 3. – №. 4. – С. 370-373.
3. Hammes A., Andreassen T.K., Spoelgen R., Raila J., Hubner N., Schulz H., Metzger J., Schweigert F.J., Lippa P.V., Nykjaer A., Willnow T.E. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids // *Cell*. – 2005. – Т. 122. – №. 5. – С. 751-762.
4. Moriarty K., Kim K. H., Bender J. R. Estrogen receptor-mediated rapid signaling // *Endocrinology*. – 2006. – Т. 147. – №. 12. – С. 5557-5563.
5. Панин Л.Е. Транспортные формы стероидных гормонов в крови, их связь с развитием некоторых физиологических и патологических процессов // *Бюллетень сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. – 2012. – Т. 32. – № 1. – С. 31-37.
6. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. Анализ взаимодействия липопротеинов и стероидных гормонов // *Биомедицинская химия*. – 2011. – Т. 57. – №3. – С. 308-313
7. Papeleu P., Vanhaecke T., Henkens T., Elaut G., Vinken M., Snykers S., Rogiers V. Isolation of Rat Hepatocytes // *Methods in Molecular Biology, Cytochrome P450 Protocols: Second Edition*, 2006, vol. 320, P. 229-237
8. Yuana Y., Levels J., Grootemaat A., Sturk A., Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2014–Vol.3 – P.1–5.
9. Brace R.J., Sorrenson B, Sviridov D., McCormick S.P.A. A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma // *Journal of Lipid Research* – 2010 – V.51 – P.3370 – 3376.
10. Baharuddin A., Amir Hassan A., Othman R., Xu Y., Huang M., Ario Tejo B., Yusof R., Abdul Rahman N., Othman, S. Dengue Envelope Domain III-Peptide Binding Analysis

- via Tryptophan Fluorescence Quenching Assay // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2014. – Т. 62. – №. 10. – С. 947-955.
11. Attallah N. A., Lata G. F. Steroid-protein interactions studied by fluorescence quenching // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure. – 1968. – Т. 168. – №. 2. – С. 321-333.
 12. Ganta C., Chiyo D., Ayuzawa R., Rachakatla R., Pyle M., Andrews G., Weiss M., Tamura M., Troyer D. Rat Umbilical Cord Stem Cells Completely Abolish Rat Mammary Carcinomas with No Evidence of Metastasis or Recurrence 100 Days Post-Tumor Cell Inoculation // Cancer Research – 2009 – V.69 – I.5 – P. – 1815 – 1820.
 13. Suzuki T. Isolation of Synapse Subdomains by Subcellular Fractionation Using Sucrose Density Gradient Centrifugation // Neuroproteomics, Neuromethods – 2011 – Vol. 57 – P. 47-61.
 14. Knyazev R.A., Tverdokhle N.V., Polyakov L.M., Panin L.E. Effect of Apoprotein A-I-Estriol Complex on DNA Biosynthesis in Rat Hepatocytes // Material of the VI International Research and Practice Conference. Munich, Germany-2013 – P. 41-44.