

ВЛИЯНИЕ КОРТИЗОЛА В КОМПЛЕКСЕ С ЛИПОПРОТЕИНАМИ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ НА РАЗВИТИЕ ГЕПАТОМЫ HA-1 И КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Л.Е. Панин, Ж.И. Белоногова, Р.А. Князев, И.О. Чешенко

ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, г. Новосибирск
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2, e-mail: knjazev_roman@mail.ru

Исследования проводились на клетках асцитной HA-1 гепатомы и асцитной карциномы Эрлиха. После пассажа клеток на мышах выделяли смешанную культуру клеток, содержащую опухоль-ассоциированные макрофаги. Показано, что в сокультуре комплекс ЛПОНП–кортизол значительно подавлял пролиферативную активность опухолевых клеток. Полученная константа связывания кортизола с ЛПОНП указывает на то, что в комплексообразовании принимает участие белковый компонент липопротеинов. Предполагается, что в образовании такого комплекса важную роль играют опухоль-ассоциированные макрофаги. Обнаружено, что механизм подавления роста опухолевых клеток связан с апоптозом.

Ключевые слова: опухолевые клетки, липопротеины, кортизол, опухоль-ассоциированные макрофаги, биосинтез нуклеиновых кислот.

INFLUENCE OF CORTISOL AND VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEINES ON THE DEVELOPMENT OF HA-1 HEPATOMA AND EHRLICH'S CARCINOMA

L.E. Panin, Zh.I. Belonogova, R.A. Knyazev, I.O. Cheshenko
*Research Institute of Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk
2, Timakova Street, 630117-Novosibirsk, Russia, e-mail: knjazev_roman@mail.ru*

Studies were conducted using ascitic HA-1 hepatomas and ascitic Ehrlich's carcinoma cells. After passage of cells in mice, cell culture containing tumor-associated macrophages was studied. It was shown that the very low-density lipoprotein (VLDL)-cortisol complex significantly inhibited proliferative activity of tumor cells. The obtained constant of cortisol binding to VLDL indicated that the protein component of lipoproteins participated in the complex formation. Tumor-associated macrophages were suggested to play an important role in the formation of this complex. It was found that inhibition of tumor cell growth was related to apoptosis.

Key words: tumor cells, lipoproteins, cortisol, tumor-associated macrophages, biosynthesis of nucleic acid.

Применять липопротеины крови для лечения опухолевых заболеваний предложено давно [6, 12]. Обычно их используют как транспортную форму различных цитостатиков: рубомицина, актиномицина Д, циклофосфана и других препаратов. Чаще всего для этого берут липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Они обладают достаточно высоким аффинитетом по отношению к цитостатикам. Так, константа диссоциации (Кд) для тамоксифена составляет $2,3 \times 10^{-8}$ М [14]. Используется также способ ковалентной пришивки препарата к белковому компоненту ЛПНП [10]. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) для доставки в опухолевые клетки цитостатиков применяются редко. Существуют единичные работы по их доставке в клетки карциномы [5] и гепатомы [7]. Наблюдается разная степень связывания цитостатиков с липопротеинами крови. Так, циклоспорин G в плазме крови

преимущественно связывается с ЛПВП (50–60 %) и в меньшей степени с ЛПНП (20–30 %) и ЛПОНП (10 %) [13].

Нам не встречались работы, в которых липопротеины плазмы крови использовались с целью запуска апоптоза опухолевых клеток. В этом отношении интерес представляет работа, в которой применялись липосомы, содержащие сфингомиелин и церамид, для стимуляции апоптоза в клетках гепатоцеллюлярной гепатомы крыс [1]. Показано, что оба соединения подавляют пролиферацию и усиливают апоптоз раковых клеток. Индукторами апоптоза являются не только сфингомиелин, фосфатидилсерин, церамид, но и стероидные гормоны (глюкокортикоиды) [4].

В данном исследовании мы для стимуляции апоптоза опухолевых клеток использовали липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП)

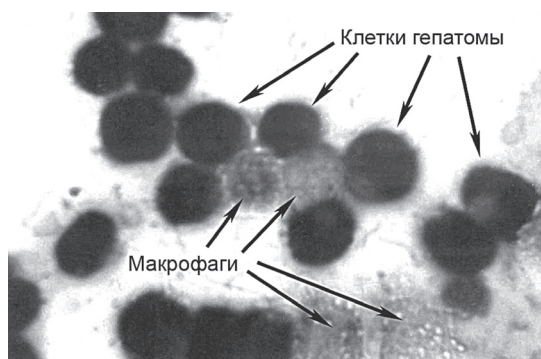


Рис. 1. Микрофото. Клетки асцитной НА-1 гепатомы с опухоль-ассоциированными макрофагами. Окраска по Романовскому-Гимза, $\times 400$

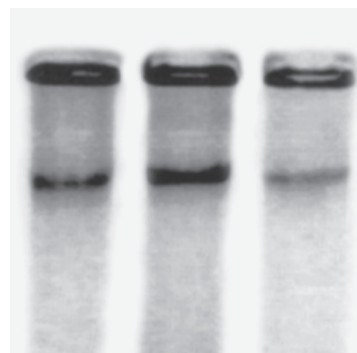


Рис. 2. Электрофорез ДНК в агарозном геле.
Примечание: 1 – контроль; 2 – ЛПОНП; 3 – ЛПОНП–кортизол

в комплексе с кортизолом. Это было обусловлено тем, что, во-первых, ЛПОНП достаточно богаты сфингомиелином [2] и, во-вторых, они активно связывают кортизол и кортикостерон. Константы связывания равны $(5 \pm 0,1) \times 10^6 \text{M}^{-1}$ и $(8 \pm 0,1) \times 10^6 \text{M}^{-1}$ соответственно [11].

Цель исследования – оценить кооперативный характер действия кортизола и липопротеинов очень низкой плотности в механизме запуска апоптоза опухолевых клеток.

Материал и методы

Исследования проводились на культурах клеток асцитной гепатомы НА-1, полученной в результате индукции мышей самцов линии A/Sn о-аминоазотолуолом (Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск). В экспериментах использовали клетки, выделенные на 10-е сут после перевивания их в брюшную полость мышей той же линии из расчёта 1 млн клеток на особь. Также в работе использовали мышей линии ICR с асцитной карциномой Эрлиха (Институт цитологии и генетики СО РАН). Клетки перитонеального экссудата получали на 10-е сут после пассажа опухоли для последующего культивирования. Свежевыделенные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином, содержащую 20 мМ HEPES/NaOH (pH 7,4), 2 мМ L-глутатиона, 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозы, 10 нМ инсулина. Клетки наносили на 6-луночные планшеты («Orange Scientific», Бельгия), покрытые коллагеном первого типа. Инкубацию проводили при 37°C в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % воздуха при влажности 85 %. Конечная плотность клеток 5×10^6 на мм^2 . Продолжительность инкубации

24 ч. Пролиферативную активность клеток оценивали по скорости включения ^3H -тимидина в ДНК. Последний добавляли в среду инкубации в дозе 2 мКи/мл за 2 ч до окончания эксперимента. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счётчике «Mark-III» (США) и выражали в имп/мин на 1 мг белка. Содержание белка в образцах определяли по Лоури [8]. Кортизол добавляли в среду инкубации в конечной концентрации 10^{-6}M , ЛПОНП – 200 мкг/мл. Содержание ДНК в образцах определяли полуколичественно с помощью электрофореза в агарозном геле. Апоптоз опухолевых клеток оценивали с помощью электронной микроскопии. Для этого образцы фиксировали в 2,5 % растворе глutarового альдегида в течение 1 ч, затем – в 0,1М ФСБ, содержащем 1 % OsO_4 . Образцы обезвоживали в спиртовых растворах с повышающейся концентрацией и заливали в аралдит. Срезы просматривали в электронном микроскопе YEM 100B (Япония).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, USA, www.statsoft.com), достоверность значений определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Клетки асцитной гепатомы с опухоль-ассоциированными макрофагами (рис. 1) в организме мышей активно делятся, так что продолжительность жизни животных не превышает 2–3 нед. Ранее нами было показано, что пролиферативная активность клеток НА-1 гепатомы зависит от макрофагов. При стимуляции последних комплексом ЛПВП–кортизол отмечалось резкое усиление в сокультуре биосинтеза как ДНК, так и белка [3].

В данном исследовании мы оценивали влияние комплекса ЛПОНП-кортизол на скорость биосинтеза ДНК в сокультуре. Оказалось, что кортизол и ЛПОНП независимо друг от друга несколько тормозили скорость биосинтеза ДНК (разница с контролем недостоверна). Добавление к сокультуре комплекса ЛПОНП-кортизол вдвое снижало скорость биосинтеза ДНК (табл. 1). Принимая во внимание, что обмен липопротеинов связан в первую очередь с макрофагами, следует допустить, что именно последние запускают механизм подавления опухолевого роста.

Дальнейшие исследования мы проводили на культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха в присутствии опухоль-ассоциированных макрофагов. Проллиферативную активность клеток также оценивали по скорости включения ^3H -тимидина в ДНК. Показано, что кортизол и ЛПОНП независимо друг от друга несколько снижали скорость биосинтеза ДНК (разница с контролем недостоверна). Комплекс ЛПОНП-кортизол снижал скорость биосинтеза в 1,7 раза (табл. 2). Полученные результаты аналогичны вышеуказанным. Эти результаты подтверждены данными электрофоретического анализа ДНК в образцах клеток асцитной карциномы Эрлиха (рис. 2). Значительное снижение содержания ДНК в образцах указывает на гибель клеток асцитной карциномы.

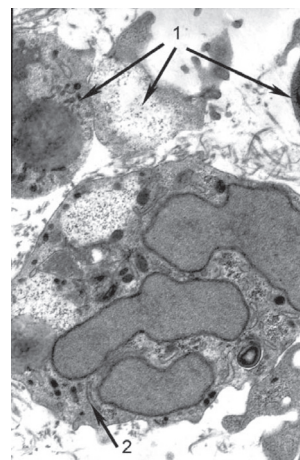


Рис. 3. Электронная микроскопия клеток асцитной карциномы Эрлиха. Действие комплекса ЛПОНП-кортизол.

Примечание: 1 – погибающая клетка;
2 – клетка в состоянии апоптоза, $\times 8000$

Электронно-микроскопический анализ изменения структуры клеток выявил потерю микроворсин, секвестрацию цитоплазмы в среду инкубации и фрагментацию ядер (рис. 3). Обнаруженные признаки позволяют отнести механизм гибели опухолевых клеток под влиянием комплекса ЛПОНП-кортизол к апоптозу. Отсутствие выраженного эффекта подавления пролиферативной активности опухолевых клеток под влиянием

Таблица 1

Изменение скорости биосинтеза ДНК в сокультуре клеток НА-1 гепатомы под влиянием комплекса ЛПОНП-кортизол

Условия инкубации	Имп/мин/мг белка $M \pm m$, $n=6$
Контроль	14233 ± 1802
ЛПОНП	9647 ± 1613
Кортизол	9903 ± 2644
ЛПОНП-кортизол	$6909 \pm 565^*$

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

Таблица 2

Изменение скорости биосинтеза ДНК в сокультуре клеток асцитной карциномы Эрлиха под влиянием комплекса ЛПОНП-кортизол

Условия инкубации	Имп/мин/мг белка $M \pm m$, $n=6$
Контроль	7805 ± 447
ЛПОНП	5002 ± 298
Кортизол	5939 ± 236
ЛПОНП-кортизол	$4176 \pm 376^*$

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

ЛПОНП или кортизола говорит о том, что мы имеем дело с кооперативным механизмом действия обоих компонентов комплекса. Полученная величина константы связывания гормона с ЛПОНП указывает на то, что в комплексообразовании принимает участие белковый компонент последних. Однако какой белок ЛПОНП принимает в этом участие – пока нами не установлено.

Заключение

Описан новый механизм подавления роста опухолевых клеток НА-1 гепатомы и карциномы Эрлиха, обусловленный кооперативным эффектом действия кортизола и ЛПОНП. Результаты электронной микроскопии позволяют утверждать, что данный механизм связан с апоптозом клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заварзин В.А., Зайнагетдинов Р.З., Какурина Г.В. и др. Роль сфингомилина и церамида в регуляции процессов пролиферации и апоптоза клеток гепатоцеллюлярной карциномы // Сибирский онкологический журнал. 2006. № 3 (20). С. 41–45.
2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб.: Питер Ком, 1999. 512 с.
3. Панин Л.Е., Хоценко О.М., Поляков Л.М. Влияние стероидных гормонов в комплексе с аполипопротеином А-I на биосинтез ДНК и белка в клетках асцитной гепатомы НА-1 // Вопросы онкологии. 2007. Т. 53, № 5. С. 562–565.
4. Суханова Г.А., Акбашева О.Е. Апоптоз. Томск: Изд. ТПУ, 2006. 171 с.
5. Kader A., Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little effect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells // J. Control Release. 2002. Vol. 80 (1–3). P. 29–44.
6. Lindholm A., Henricsson S., Gang P. The free fraction of cyclosporine in plasma: clinical findings with a new method // Transplant Proc. 1988. Vol. 20. P. 377–381.
7. Lou B., Liao X.L., Wu M.P. et al. High-density lipoprotein as a potential for delivery of a lipophilic antitumoral drug into hepatoma cells // World J. Gastroenterol. 2005. Vol. 11 (7). P. 954–959.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
9. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. The methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir, 1984. 480 p.
10. Masquelier M., Vitols S., Pålsson M. et al. Low density lipoprotein as a carrier of cytostatics in cancer chemotherapy: study of stability of drug-carrier complexes in blood // J. Drug Target. 2000. Vol. 8 (3). P. 155–164.
11. Panin L.E., Kunitsyn V.G., Polyakov L.M. Structural changes in blood plasma lipoproteins in the physiological temperature range and their interaction with steroid hormones // Protein Structure / Ed. L.M. Haggerty. USA: Nova Science Publ., Inc. 2011. P. 123–153.
12. Sharma A., Lawrence S.J. Lipoprotein – cyclodextrin interaction // Clin. Chim. Acta. 1991. Vol. 199. P. 129–138.
13. Yatscoff R.W., Honcharik N., Lukowski M. et al. Distribution of cyclosporin G (NVa2 cyclosporin) in blood and plasma // J. Clin Chem. 1993. Vol. 39 (2). P. 213–217.
14. Winnerer R.C., Juthries S.C., Clark J.H. Characterization of a triphenylethylene-antiestrogen binding site on rat serum low density lipoprotein // Endocrinology. 1983. Vol. 112. P. 1823–1827.

Поступила 14.02.13