

МЕЖЛИНЕЙНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ CYP2B1 И ЭКСПРЕССИИ ЕГО ГЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИНДУКЦИИ ФЕНОБАРБИТАЛОМ И ТРИФЕНИЛДИОКСАНОМ.

Е.И. ШВАРЦ*, Л.Ф. ГУЛЯЕВА, В.В. ЛЯХОВИЧ

Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН,
ул. Тимакова 2; 630117 Новосибирск, факс: (3832)32-31-47; электронная почта:
IMPEB@CYBER.MA.NSC.RU

Выявлены межлинейные вариации 7-пентоксирезорифин-О-деалкилазной и 16 β -андростендион гидроксилазной активностей, специфичных для цитохрома P450 2B1, в печени крыс линий Спрэг-Доули, Брэтелборо, Вистар, обработанных фенобарбиталом и трифенилдиоксаном. Для данных линий обнаружены различия в уровне накопления соответствующей мРНК, что свидетельствует о различиях в экспрессии гена CYP2B1. При проведении сравнительного анализа ферментативной активности и количества мРНК CYP2B1 выявлена положительная корреляция между этими параметрами. Таким образом, различная транскрипционная активность гена CYP2B1 во время индукции фенобарбиталом и трифенилдиоксаном может быть одной из причин межлинейных различий в ферментативной активности цитохрома P450 2B1 в печени крыс.

Ключевые слова: цитохром P4502B, фенобарбитал, трифенилдиоксан, экспрессия генов, Спрэг-Доули, Брателборо, Вистар, крысы.

Чужеродные соединения - ксенобиотики (КС)*, попадая в организм, вызывают усиление экспрессии генов многих цитохромов P450 (CYP) [1]. Индуцированные CYP участвуют в метаболизме КС, вызывая образование либо высокоактивных метаболитов, либо водорастворимых соединений, которые могут выводиться из организма.

Генетический полиморфизм CYP, как было показано в последнее время, является важным фактором, определяющим способность организма к метаболизму лекарств, ядов, канцерогенов и других КС, что фенотипически проявляется в значительной разнице ферментативной активности CYP среди индивидуумов. Вариации в активности показаны для многих семейств этого гемопротеина. Известно, что для CYP2D6 и CYP1A1 такие различия связаны с существованием мутантных аллельных вариантов генов этих ферментов [2, 3]. С другой стороны, изменение в активности CYP1A1, выявленное для клеточных линий карциномы молочной железы человека, связано с различиями в регуляции транскрипции этого гена [4]. Накапливается все больше данных о том, что чувствительность к возникновению рака связана с генетически обусловленными различиями в эффективности детоксикации потенциальных канцерогенов [5].

Известно, что ферменты подсемейства CYP2B осуществляют детоксикацию многих КС [6]. В то же время, эти же CYP могут активировать некоторые опасные токсины, такие как афлатоксин В1 с последующим образованием генотоксичных канцерогенных аддуктов с ДНК и белками [7]. Интенсивность этих процессов связана с индивидуальными особенностями ферментативной активности CYP2B.

Принятые сокращения: КС-ксенобиотики, CYP-цитохром P450: СД- Спрэг-Доули; БЛ - Брэтелборо; В - Вистар; ФБ - фенобарбитал; ТФД - 1,3,5-трифенилдиоксан; Ар- Арохлор 1254; ПРОД- 7-пентоксирезорифин; 16 β -АД - 16 β -андростендионгидроксилаза

Подсемейство CYP2B крыс представлено по крайней мере девятью генами, включая псевдогены [8]. Известно, что такие соединения, как ФБ, ТФД, Ар активируют транскрипцию двух генов подсемейства CYP2B - CYP2B1 и CYP2B2 [9]. Эти гены имеют высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей (до 97%) [10], но их регуляция осуществляется по-разному. При отсутствии индукторов, ген 2B1 транскрипционно неактивен, тогда как 2B2 экспрессируется в печени крыс конститутивно, хотя базальный уровень мРНК CYP2B2 достаточно низок. Во время индукции количество мРНК, считываемой с гена 2B1 в 5 раз превышает таковое для 2B2 [6]. Есть данные и о межлинейных различиях в активности CYP2B1, причиной которых может быть мутация, обнаруженная в структурной области гена [11].

В данной работе исследовались межлинейные различия в ферментативной активности CYP2B1 при использовании индукторов ФБ и ТФД и предпринята попытка исследовать причины таких различий.

МЕТОДИКА. Животные. В работе были использованы крысы-самцы Спрэг-Дули, Брэтлборо, Вистар весом 180-200 г, полученные из вивария ИЦиГ СО РАН. Индукцию микросомальных монооксигеназ осуществляли внутрибрюшинным введением животным ФБ в 0,9% растворе NaCl дозой 80 мг кг в течение 3 дней, ТФД - однократной инъекцией в растительном масле дозой 10 мг кг (на 3 дня). Животных забивали через 18 часов после последнего введения (ФБ), или через 72 часа после введения. Контролем служили животные, получавшие 0,9% раствор NaCl или растительное масло, соответственно.

Микросомальную фракцию печени получали общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Содержание белка в микросомах определяли методом Лоури [12], содержание CYP измеряли по методу Омура и Сато [13]. Активность ПРОД измерена методом Бурке и Майера [14]. Скорость гидроксирования АД в 16 β -положении определяли как описано Вудом [15], используя в качестве внутреннего стандарта кортикостерон. Метаболиты андростендиона анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано ранее [15].

Суммарную РНК из печени крыс выделяли через 18 ч (для ФБ) и 72 ч (для ТФД) после введения индуктора согласно методу, описанному ранее [16]. Содержание РНК в пробе определяли спектрофотометрически, чистоту препаратов оценивали по отношению D_{260} / D_{280} и D_{260} / D_{230} и электрофоретически в 10%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7М мочевины.

В качестве зондов использовали: 1. кДНК β -актинового гена, клонированного в плазмиде pUC18 (клон $\beta A1$). 2. олигонуклеотиды, синтезированные в НПО "Вектор".

"b" - 5'-GGTTGGTAGCCGGTGTGA-3', комплементарный к мРНК CYP2B1;

"e" - 5'-GGATGGTGGCCTGTGAGA-3', комплементарный к мРНК CYP2B2.

Выбор нуклеотидной последовательности олигонуклеотидов "b" и "e" осуществлялся, как описано ранее [17].

Радиоактивное мечение олигонуклеотидов проводили с помощью набора для мечения ("Fermentas", Литва), как описано Маниатисом со авторами [18]. Для очистки продукта реакции от несвязавшегося меченого нуклеотида, использовали хроматографию на сефадексе G-50.

Для стандартизации результатов гибридизации использовали дот-гибридизацию суммарной мРНК с клоном $\beta A1$, так как количество мРНК гена β -актина не зависит от индукции различными КС [19].

Дот-гибридизацию проводили как рекомендовано в руководстве Маниатиса и др. [18]. Фильтры после дот-гибридизации отмывали дважды по 30 мин при 65° в 2xSSC, содержащем 0,1% SDS.

На рис. 1 приведены результаты дот-гибридизации суммарной мРНК из печени крыс линии В с меченым α -[32 P] клоном $\beta A1$. Как видно, интенсивность сигнала гибридизации зависит только от количества мРНК в пробе и не зависит от

используемых индукторов. Для других линий крыс наблюдается аналогичная картина (данные не приведены).

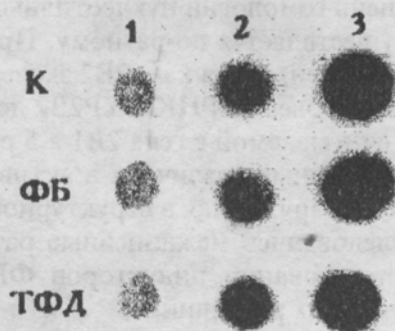


Рисунок 1.

Дот-гибридизация мРНК из печени крыс исследуемых линий с ^{32}P -меченным клоном βA1 : 1 - 200 нг мРНК; 2 - 1000 нг мРНК; 3 - 2000 нг мРНК; К - препараты РНК из печени контрольных животных, ФБ - препараты РНК из печени крыс, обработанных ФБ, ТФД - препараты РНК из печени крыс, обработанных ТФД. Представлены данные одного из трех экспериментов.

Гибридизацию с мечеными специфичными олигонуклеотидами с последующей защитой от S_1 нуклеазы проводили согласно методу, описанному в работе Омечински [17]. Конечный продукт реакции анализировали в 20% полиакриламидном геле при напряжении 1-8 В/см.

Результаты гибридизации обрабатывали на спектрофотометре Hitachi-557, снабженном X-Y самописцем модели Hitachi-057, сканированием рентгеновской пленки на приспособленном для этого устройстве. Каждый эксперимент повторяли 2-3 раза.

Количество мРНК в образце (A) рассчитывали по формуле: $A = K \times N_2/N_1$, где N_2 - площадь пика на денситограмме для определяемого образца [см^2], N_1 - площадь пика на денситограмме для стандартного количества олигонуклеотида "b" или "e" [см^2], K - произвольный коэффициент нормировки. Для того, чтобы A принимало целочисленные значения, с учетом того, что $N_1 \gg N_2$, значение K принимали равным 100. Использование этой формулы позволяет сравнивать численные значения, полученные при денситометрии разных радиоавтографов. Так как, N_2 - зависит от количества специфической мРНК в пробе и от времени экспозиции, а N_1 зависит только от времени экспозиции (количество олигонуклеотидов "b" или "e" было всегда стандартным), то отношение N_2 к N_1 дает величину, не зависящую от времени экспозиции.

Данные в таблицах и на рисунках представлены как среднее \pm стандартная ошибка трех-пяти опытов. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для исследования межлинейных различий в ферментативной активности CYP2B1 были выбраны три линии крыс: СД, БЛ и В. В качестве индукторов были выбраны ФБ - классический индуктор 2В подсемейства [10] и менее изученный ТФД, применение которого в качестве индуктора CYP2B было показано относительно недавно [20]. Несмотря на разное химическое строение и различные дозо-зависимые эффекты, оба индуктора вызывают существенное увеличение ферментативной активности CYP2B1, которая оценивалась по скорости окисления специфичных субстратов: 16 β -гидроксилирования андростендиона и О-деалкилирования 7-пентоксирезорруфина [21, 14]. В таблице 1 представлены данные о содержании общего количества CYP, определенного спектрально, а также результаты определения активностей CYP2B1 в

печени крыс линий СД, БЛ и В, получавших ФБ и ТФД. Введение животным этих индукторов сопровождается увеличением как общего количества СУР, так и ПРОД и 16β-АД активностей, которые различались в исследуемых линиях. В печени крыс В, индуцированных ФБ, активность ПРОД в 2,5 раза ниже, чем у линий СД и БЛ, где она была практически одинакова и составляла 822 и 744 пкмоль резоруфина/мин/мг белка соответственно. Различия в уровнях индуцируемой ПРОД активности также наблюдались при индукции крыс ТФД. Максимальное значение этой величины было зарегистрировано у крыс БЛ: 525 пкмоль резоруфина/мин/мг белка, а у В и СД крыс она составляла - 205 и 120 пкмоль резоруфина/мин/мг белка - соответственно. У крыс В и СД, обработанных ФБ или ТФД, уровень активности 16β-АД не различался, а у крыс СД она была почти в 2 раза ниже при индукции ФБ и в 3-4 раза ниже при воздействии ТФД. Таким образом, мы зарегистрировали количественные межлинейные различия в ферментативной активности СУР2В1 в печени крыс. Исходя из результатов, полученных при исследовании генетического полиморфизма других СУР [2, 11], можно предположить, что причиной таких различий могут быть либо мутация в структурной области соответствующего гена, либо разница в экспрессии гена СУР2В1. Методом полимеразной цепной реакции с последующей обработкой продуктов амплификации эндонуклеазами рестрикции (*Hin*b I-, *Tag*I-, *Hpa*II-, *Bsu*RI, *Alu* I-, *Msp*I-) была исследована структурная область соответствующего гена с 5 по 9 экзон у исследуемых линий крыс. Рестрикционный анализ не выявил каких-либо различий в этих областях (данные не приведены), что отрицает существование каких-либо замен в нуклеотидных последовательностях в рамках выбранных эндонуклеаз рестрикции и участка гена. Другой возможной причиной описываемого явления может быть неодинаковая экспрессия гена СУР2В1 под действием различных индукторов. Мы оценили уровни содержания мРНК для СУР2В1 в печени крыс исследуемых линий в те же временные интервалы после введения индукторов, в которые измерялась соответствующая ферментативная активность. Были взяты специфические синтетические олигонуклеотиды, способные различать мРНК СУР2В1 (олигонуклеотид "b") и СУР2В2 (олигонуклеотид "c").

Таблица 1. Содержание СУР и монооксигеназные активности микросом в печени крыс СД, БЛ и В, получавших ФБ и ТФД.

Индуктор	Линия крыс	Содержание Р450 ¹ нмоль х мг ⁻¹ белка	ПРОД ² пкмоль/мин на 1 мг белка	16β-АД ³ нмоль/мин на 1 мг белка
—	СД	0,6±0,2	<0,1	0,33±0,03
	БЛ	0,6±0,2	9±0,6	0,18±0,05
	В	0,6±0,1	11±1	0,26±0,04
ФБ	СД	1,6±0,2	822±3	3,04±0,12
	БЛ	2,7±0,4	744±10	7,22±0,18
	В	2,5±0,4	348±7	5,58±0,3
ТФД	СД	0,6±0,2	120±1	1,73±0,07
	БЛ	1±0,2	525±4	6,36±0,12
	В	1,5±0,3	205±41	6,60±0,08

1 - n (количество крыс) - 5-7; 2 - для ПРОД $p < 0,05$; 3 - для 16β-АД $p < 0,01$; по сравнению с соответствующим контролем (без индуктора)

Известно, что в печени контрольных крыс ген СУР2В2 экспрессируется конститутивно, а СУР2В1 транскрипционно неактивен [10]. Как видно из рис. 2 (А), при инкубации мРНК из печени контрольных животных с олигонуклеотидом "b" "с" последующей обработкой *S*₁ нуклеазой отсутствует сигнал гибридизации, в то время как при использовании олигонуклеотида "с" такой сигнал наблюдается. Это согласуется с литературными данными и свидетельствует о достаточной специфичности данного метода для оценки уровней мРНК СУР2В1.

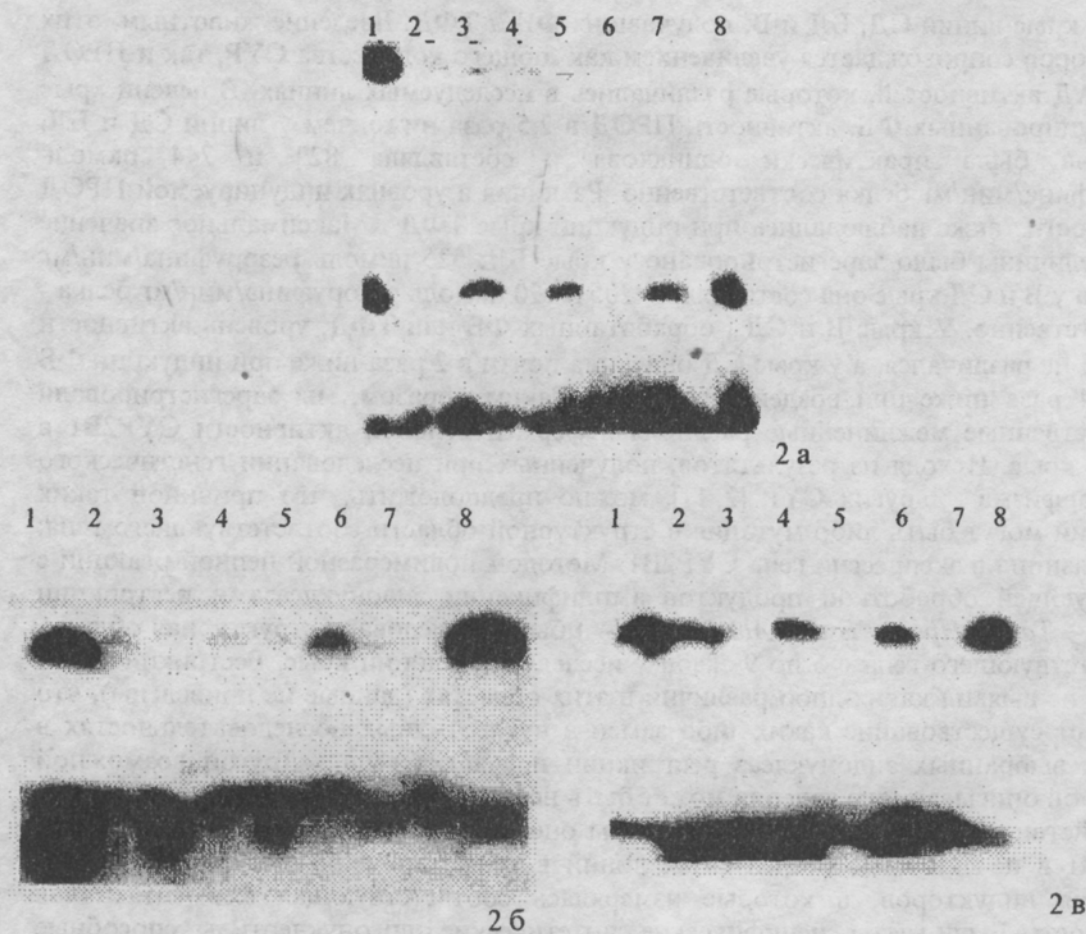


Рисунок 2.

Гибридизации мРНК из печени крыс исследуемых линий с ^{32}P -меченным клоном "b" или "e":
 а) - контрольные животные: 1- зонд "b", 2 - препараты РНК из печени крыс линии В + зонд "b", 3 - В + "e", 4- СД + "b", 5 - СД + "e", 6 - БЛ + "b", 7 - БЛ + "e", 8 - зонд "e".

Представлены данные одного из трех экспериментов.

б) Индукция ФБ: 1- зонд "b", 2 - препараты РНК из печени крыс линии БЛ + зонд "b", 3 - БЛ + "e", 4- В + "b", 5 - В + "e", 6 - СД + "b", 7 - СД + "e", 8 - зонд "e".

Представлены данные одного из трех экспериментов.

в) Индукция ДФД: 1- зонд "b", 2 - препараты РНК из печени крыс линии СД + зонд "b", 3 - СД + "e", 4- В + "b", 5 - В + "e", 6 - БЛ + "b", 7 - БЛ + "e", 8 - зонд "e".

Представлены данные одного из трех экспериментов.

На рис. 2 (б,в) представлены результаты гибридизации суммарной РНК, выделенной из крыс трех линий, индуцированных ФБ и ДФД, с мечеными α - ^{32}P олигонуклеотидами "b" и "e". Радиоавтографы гибридизации были денситометрированы, количество мРНК было рассчитано по формуле, описанной в разделе "Материалы и методы". В таблице 2 приведены результаты определения содержания мРНК CYP2B1 и CYP2B2. В ответ на введение индукторов происходит увеличение количества мРНК CYP2B1 и CYP2B2 у крыс всех исследуемых линий по сравнению с контролем. При индукции ФБ наибольшее количество мРНК CYP2B1 зарегистрировано для линии СД, наименьшее - для В. У животных, обработанных ДФД, наибольшее значение мРНК CYP2B1 наблюдается в препаратах из печени крыс БЛ, а минимальное значение - у линий В. При сравнении данных таблиц 1 и 2 видно, что во время индукции ДФД наиболее высокий уровень мРНК CYP2B1 наблюдается у крыс БЛ, что соответствует высоким как ПРОД, так и 16β -АД активностям. При индукции ФБ положительная корреляция наблюдается только между уровнем мРНК CYP2B1 и ПРОД активностью. Так, у крыс линии В

наблюдается наименьшая активность ПРОД и наименьший уровень мРНК CYP2B1, и наоборот, у СД крыс зарегистрировано наибольшее содержание мРНК CYP2B1 и высокая активность фермента. В случае 16 β -АД активности такой корреляции не наблюдается.

Таблица 2. Содержание мРНК CYP2B1 и CYP2B2 в печени крыс линий СД, БЛ, В, обработанных ФБ и ТФД (выражено в условных единицах). К - контрольные животные, получавшие 0,9% раствор NaCl или растительное масло.

	Вистар			Спрэг-Дуули			Брэтелборо		
	К	ФБ	ТФД*	К	ФБ	ТФД	К	ФБ	ТФД
мРНК CYP2B1	<1	250 \pm 10	400 \pm 8	<1	480 \pm 7	425 \pm 10	<1	295 \pm 6	450 \pm 4
мРНК CYP2B2	15 \pm 1	45 \pm 10	20 \pm 10	12 \pm 4	45 \pm 2	25 \pm 3	11 \pm 4	40 \pm 10	23 \pm 4

Таким образом, при сравнении активности CYP2B1 и уровня его мРНК в печени крыс линий СД, БЛ и В, обработанных ФБ и ТФД, в большинстве случаев наблюдается положительная корреляция между этими параметрами. Тогда вариации в активности CYP2B среди исследуемых линий крыс с большой степенью вероятности можно объяснить изменением в экспрессии его гена. Так как ФБ и ТФД активируют транскрипцию обоих генов, регуляция которых осуществляется по-разному, то изменения, произошедшие в регуляции транскрипции гена CYP2B1 могут не затрагивать ген CYP2B2, экспрессия которого не зависела от линии животного (таблица 2).

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о существовании межлинейных различий в ферментативной активности CYP2B1 при использовании индукторов ФБ типа. Выявлено, что одной из причин таких различий может быть изменение в регуляции экспрессии соответствующего гена, что проявляется, как нами было показано, в разном уровне накопления мРНК CYP2B1.

Частичное финансирование работы осуществлялось Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ), грант № 96-04-50209.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsallus I.C., Goto O., Okuda K., Nebert D. W. (1993) DNA Cell Biol., 12, 1-51.
2. Alexandrie A., Sundberg M., Seidegard S., Tornling G., Rannug A. (1994) Carcinogenesis. 15, 1785-1790.
3. Kawajiri K. (1990) FEBS Lett., 263, 131-133.
4. Thomsen J., Nissen L., Staay S., Hines R., Autrup H. (1990) J. Biochem., 197, 577-582.
5. Sivaraman L., Leathan M.P., Yee J., Wilkens L.R., Lau A.F., Marchand L.L. (1995) Cancer Res., 54, 3692-3695.
6. Aoyama T., Yamano S., Guzelian F.S., Gelboin H.V., Gonzales F.J. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87. 4790-4793.
7. Ramersaud A., Walz F.G. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 6542-6546.
8. Waxman D.J., Azaroff L. (1992) J. Biochem. 281, 577-592.
9. Kim S.G., Philpot R.M., Novak R.F. (1991) J. Pharmacol. Exp. Therapy. 259, 470-477.
10. Gonzalez F. (1989) Pharmacological. 40, 243-288.

11. Hashimoto T., Matsumoto T., Nishizawa M., Kawafats S., Morohashi K., Handa S., Omura T. (1988) *Biochem.*, **103**, 487-492.
12. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
13. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2379-2385.
14. Burke M., Mayer R., Kouri R. (1977) *Cancer Res.* **37**, 460-464.
15. Wood A., Ryan D., Thomas P., Levin B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8839-8847.
16. Chromczynski P., Sachi N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
17. Omiecinski C.J., Walz F.G., Vlasuk G.P. (1986) *Nucl. Acid Res.* **14**, 1525-1539.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) Молекулярное клонирование. М.: Мир, С. 192-193.
19. Hahn C.N., Hansen A.J., May B.K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17031-17039.
20. Чистяков В.В., Поспелова Л.Н. (1987) *Биохимия*. **52**, 496-499.
21. Friedberg T., Grassow M.A., Oesch F. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 167-173.

Поступила 3.09. 1998 г.

THE INTERSTRAIN DIFFERENCES IN THE ENZYMATIC ACTIVITY OF CYP2B1 И EXPRESSION OF ITS GENE IN RAT LIVER DURING INDUCTION WITH PHENOBARBITAL AND TRIPHENYLDIOXANE

E. I. SCHWARTZ, L. F. GULYAEVA, V.V.LYAKHOVICH

Institute of Molecular Pathology and Ecological Biochemistry, Siberian Branch RAMS, ul.
Timakova, 2, Novosibirsk, 630117; fax: (3832)32-31-47;
E-mail: IMPEB@CYBER.MA.NSC. RU

The interstrain differences in hepatic 7-pentoxoresorufin-O-dealkylase and 16 β -androstendione hydroxylase activities specific for cytochrome P450 2B1 have been found in Sprague-Dawley, Brattleboro and Wistar rats treated with with phenobarbital, triphenyldioxane. Similar differences were found in the accumulation of corresponding mRNAs suggesting differences in expression of cytochrome P450 gene. Analysis of the enzymatic activity and mRNA level revealed positive correlation between these parameters. Thus, differences in transcriptional activity of CYP2B1 gene during induction by phenobarbital and triphenyldioxane may be one of reasons for interstrain differences between enzymatic activities of rat liver cytochrome P4502B1.

Key words: cytochrome P4502B, phenobarbital, triphenyldioxane, gene expression, Sprague-Dawley, Brattleboro, and Wistar rats