

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577. 142. 1
©Коллектив авторов

УРОВЕНЬ мРНК И АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОВ P450 1A В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL ПРИ ИНДУКЦИИ РАЗЛИЧНЫМИ КСЕНОБИОТИКАМИ.

*О. Н. Михайлова^{1,2}, М. Л. Филипенко², О. А. Тимофеева²,
В. И. Каледин¹, Л. Ф. Гуляева¹, В. В. Ляхович¹*

¹Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, 630117 Новосибирск,
ул. Тимакова, 2; тел.: (3832)335889; факс:(3832)323147;
эл.почта: Pharmacogenomics@ngs.ru

²Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

³Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

Исследовали индукцию цитохромов P450 Cyp1a1 и Cyp1a2 в печени мышей-самцов линии C57BL после введения им *o*-аминоазотолуола (ОАТ), бензо[а]пирена (БП) и антрахинона (АХ). Уровень мРНК Cyp1a1, определенный с помощью количественной конкурентной ПЦР, увеличивался более чем на три порядка после введения ОАТ и БП и не изменялся в случае АХ. Уровень мРНК Cyp1a2 увеличивался в 8,5, 18,7 и 1,9 раз после введения ОАТ, БП и АХ соответственно. Наряду с этим были измерены 7-этоксирезорифин-О-деэтилазная (ЭРОД) и 7-метоксирезорифин-О-деметиلاзная (МРОД) активности cyp1a в печени. Для Cyp1a1 увеличение уровня мРНК коррелировало с увеличением ЭРОД активности, что может свидетельствовать в пользу транскрипционного механизма индукции этого фермента. В случае Cyp1a2, несмотря на незначительное увеличение уровня мРНК в ответ на введение индуктора, в печени исследуемых животных регистрировалась достаточно высокая МРОД активность, что может свидетельствовать в пользу посттранскрипционной регуляции синтеза Cyp1a2. При индукции АХ уровень мРНК Cyp1a1 не изменялся, а ЭРОД-активность увеличивалась почти в 20 раз, что позволяет предположить недостаточную специфичность этого субстрата для Cyp1a1. Таким образом, на основании полученных данных можно считать, что измерение уровня мРНК является наиболее адекватной оценкой индуцибельности Cyp1a1 и Cyp1a2, чем определение ферментативной активности.

Ключевые слова: цитохромы P450 1a, экспрессия, индукция, *o*-аминоазотолуол, бензо[а]пирен, 1,4-дигидроксиантрахинон

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы P450 подсемейства 1A (CYP1A1 и CYP1A2) метаболизируют многие канцерогены с образованием активных метаболитов, способных связываться с нуклеофильными сайтами макромолекул клетки, что может приводить к различным токсическим процессам, в том числе канцерогенезу [1-4]. Канцерогенные соединения, особенно относящиеся к полициклическим

ЭФФЕКТ КСЕНОБИОТИКОВ НА мРНК И АКТИВНОСТЬ СУР Р450

ароматическим углеводородам (ПАУ), вызывают индукцию этих СУР, что сопровождается многократным увеличением как уровня их мРНК, так и ферментативных активностей [5]. Токсический эффект попавшего в живой организм канцерогена определяется количеством образующегося активного метаболита, этого канцерогена и эффективностью его детоксификации. Конечный результат напрямую зависит от уровня индуцируемой формы цитохрома Р450, активирующей канцероген. К числу таких соединений относится и ОАТ, который, как и многие другие аминоазобензолы, активируется цитохромами Р450_{1А} в реакции N-гидроксилирования. Причем, преимущественный вклад в этот процесс вносит СУР_{1А2} [1,2,6]. Было показано, что многократная обработка мышей этим канцерогеном вызывает опухоли печени у одних линий мышей, в том числе и у линии С57ВL, и не оказывает эффекта на другие [7,8]. Можно ожидать, что канцерогенный эффект ОАТ связан с индуцибельностью Суp1a1 и Суp1a2, количество которых при введении этого соединения оказывается различным. В связи с этим представляется весьма актуальным оценить содержание форм цитохрома Р450 в печени мышей. В экспериментах, выполненных с использованием микросомальных фракций печени крыс и человека и изолированных ферментов, показано, что с достаточно высокой степенью специфичности СУР_{1А1} окисляет ЭР, а СУР_{1А2} - МР [9]. Однако в последнее время специфичность этих субстратов ставится под сомнение. Например, у нокаутных по гену Суp1a2 мышей в печени не обнаружено конститутивной МРОД активности, однако при индукции 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*п*-диоксином (ТХДД) эта активность весьма существенна [10]. Кроме того, рекомбинантные цитохромы Р450 данного подсемейства проявляли перекрестную специфичность в метаболизме упомянутых субстратов [11]. Все это указывает на то, что к настоящему времени не существует адекватного метода оценки индуцибельности Суp1a1 и 1a2 в печени мышей.

Целью настоящей работы было определить выраженность индукции Суp1a1 и Суp1a2 в печени мышей линии С57ВL, индуцированных ОАТ. Для этого было определено содержание мРНК для этих СУР с помощью метода конкурентной ОТ-ПЦР. Для сравнения индуцирующего эффекта исследуемого канцерогена на монооксигеназы печени мышей был взят эталонный индуктор - БП, действие которого хорошо изучено, и селективный индуктор Суp1a2 - АХ. Наряду с этим были определены ЭРОД и МРОД активности, индуцируемые в печени мышей под действием указанных выше ксенобиотиков.

МЕТОДИКА. Животные. В эксперименте использовали мышей-самцов линии С57ВL, чувствительной к индукции опухолей ОАТ [8]. Животные были получены из питомника вивария института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Индукцию микросомальных ферментов осуществляли однократным введением ОАТ ("Sigma", США) в дозе 225 мг/кг веса, БП ("Serva", США) в дозе 100 мг/кг веса, и ежедневным введением АХ "Sigma" - по 100мг/кг веса в течение трех дней.

Выделение мРНК и получение кДНК. РНК выделяли из печени мышей на четвертые сутки после введения индуктора (в случае АХ - на четвертые сутки после первого введения), как описано в [12]. Для удаления примесей геномной ДНК 5 мкг суммарной РНК инкубировали с 5 Ед ДНКазы I в буфере, содержащем 40 mM трис-HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM KCl и 15-20 ед. RNAsin в течение 30 мин при 37°C. Реакционную смесь экстрагировали фенол-хлороформом, РНК осаждали тремя объемами этанола. кДНК получали из 1 мкг суммарной РНК реакцией обратной транскрипции с использованием dT₁₈ праймера и 200 ед. акт. MoMLV РНК-зависимой ДНК-полимеразы в 30 мкл буфера, содержащем 20 mM трис-HCl (pH 8,3), 2 mM MnCl₂, 5 mM DTT, 100 mM KCl, 100 mM dNTP и 15-20 ед. RNAsin в течение одного часа при 37°C.

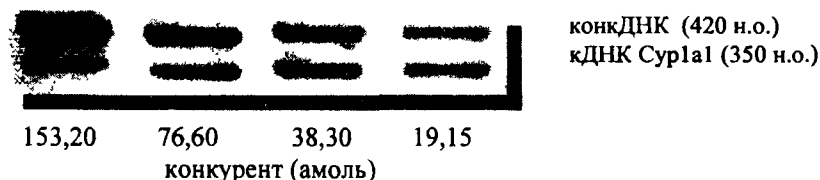
Конкурентная ПЦР. Конкурентные стандарты (конкДНК) для определения количеств кДНК Суp1a1 и Суp1a2, а также рибосомного белка L30 были получены

амплификацией геномной ДНК фага Т7 со специфичными праймерами (табл.1) в следующих режимах: 95° - 3 мин, 37° - 2 мин, 72° - 1 мин и затем 37 циклов либо при 94° - 1 мин, 63° - 0,5 мин, 72° - 1 мин для *суп 1a1* и *1a2* либо при 94° - 1 мин, 55° - 0,5 мин; 72° - 1 мин для L30. Продукты амплификации разделяли в 6% полиакриламидном геле (ПААГ) методом электрофореза. Из всего спектра фрагментов выбирали те, которые амплифицировались с двух праймеров и отличались по размеру от фрагментов, амплифицирующихся с кДНК. Такие фрагменты вырезали из геля, элюировали и реамплифицировали в специфичных условиях в течение 25 циклов; затем выделяли элюцией из 6% полиакриламидного геля, после чего для полученных конкДНК определяли концентрации и готовили несколько разведений, как описано в [13]. Аликвоты таких растворов использовали для конкурентной ПЦР.

Для определения количества мРНК *суп 1a1* и *1a2* в образцах суммарной РНК полученную кДНК амплифицировали одновременно с известным количеством конкурентной ДНК с одной пары праймеров в одной пробирке. Реакционная смесь содержала стандартный буфер, 1,0 мкл кДНК, 1,0 мкл конкДНК, 1,0 ед. акт Таq-полимеразы. Условия конкурентной ПЦР для *суп 1a1* и *1a2* были следующими: 1-й цикл: 95°С - 3,0 мин, 55°С - 0,5 мин, 72°С - 1,0 мин; 28 циклов: 94°С - 1,0 мин, 55°С - 0,5 мин, 72°С - 1,0 мин.

Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 6% ПААГ (рис.1а). Гель фотографировали, сканировали и оценивали с помощью программы Scion Image. Полученные количественные данные, обрабатывали с помощью программ Excel и Статистика. Вычисляли логарифм отношения количества продуктов амплификации кДНК и конкДНК и строили график линейной

а)



б)

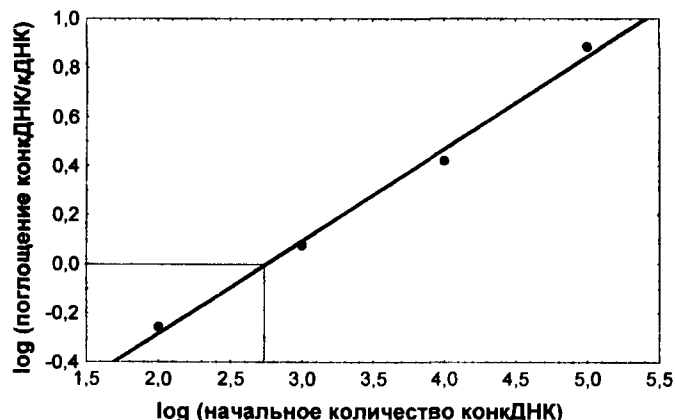


Рисунок 1.

Количество мРНК *Суп 1a1* в печени мышей C57BL при индукции ОАТ, оцененное с помощью конкурентной ПЦР: а) агарозный гель-электрофорез продуктов конкурентной ПЦР; б) график зависимости логарифма отношения поглощения конкДНК к кДНК от логарифма начального количества конкДНК. Количество мРНК *Суп 1a1* на 1мкг суммарной РНК в печени мышей C57BL при индукции ОАТ соответствует 35,34 амоль используемой конкДНК (после того, как учли различия в количестве RPL30 это составило 47,59 амоль).

ЭФФЕКТ КСЕНОБИОТИКОВ НА мРНК И АКТИВНОСТЬ СУР P450

Таблица 1. Праймеры для ПЦР

Ген	Последовательности нуклеотидов праймеров	Температура отжига (°C)	Размер продуктов ПЦР	
			кДНК	Конк.
Cyp1a1	прямой, CAGAAGCTTAACTCTTCCCTGGATGCC	63	350	420
	обратный, GCACTGCAGGGTGGTTACCAGGTACATG	63		
Cyp1a2	прямой, CAGAAGCTTCAAGCACAGCGAGAACTAC	63	470	300
	обратный, CAAGGATCCGGGTCTTGTCTGATGGCCGA	63		
RPL30	прямой, ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC	58	360	470
	обратный, GTTACTTCTCACCAGTCTG	58		

зависимости полученного логарифма от логарифма концентрации конкурентной ДНК, чтобы определить точку, в которой логарифм соотношения кДНК/конкДНК равен нулю, т.е. точку эквивалентности (рис.16).

Для учета различий в количестве кДНК Cyp1a1 и Cyp1a2 в индивидуальных образцах проводили нормализацию по уровню кДНК рибосомного белка RP L30. Количественное определение кДНК RP также проводили методом конкурентной ПЦР. Поскольку мы оценивали не абсолютные, а относительные различия в количестве мРНК цитохромов P450 в контроле и при индукции, это позволило не учитывать различия в эффективности амплификации конкДНК и кДНК в разных реакциях, кроме того, такой подход обеспечивает достаточно высокую точность измерения и хорошую воспроизводимость.

Определение активности Cyp1a. Микросомальную фракцию печени получали общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Активность цитохрома P450 1a1 и 1a2 в микросомах печени определяли на 4-ые сутки после введения ОАТ. В качестве субстратов были использованы ЭР и МР, как это описано ранее [14]. Общее количество P450 определяли спектрально методом Omura и Sato [15], концентрацию белка в микросомальной фракции - методом Lowry [16]. Статистическую обработку проводили с использованием программы СТАТГРАФ. В каждый эксперимент было взято по 4 мыши.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В таблице 2 представлены результаты определения относительного количества уровня мРНК исследуемых цитохромов P450. Видно, что мРНК Cyp1a1 в печени intactных мышей исследуемой линии C57BL не регистрируется. Конститутивный уровень экспрессии Cyp1a2 достаточно высок, что вполне согласуется с результатами Kimura с соавторами [17]. С результатами измерения уровня мРНК коррелируют данные по ферментативной активности: в печени intactных мышей регистрируется крайне низкая ЭРОД активность, тогда как МРОД выше этой активности почти в 8 раз.

Таблица 2. Уровень мРНК Cyp 1a1 и Cyp 1a2

Состояние	Уровень мРНК Cyp1A1 *	Уровень мРНК Cyp1A2
Контроль	< 0,01**	1,82 ± 0,06
ОАТ	47,59 ± 1,98 (>4800)***	15,43 ± 0,54 (8,48 ± 0,35)
БП	38,93 ± 2,37 (>3900)	34,05 ± 1,16 (18,72 ± 0,77)
АХ	< 0,01	3,51 ± 0,20 (1,93 ± 0,11)

Примечание: Приведены средние значения данных, полученные для групп животных из 4-х особей (± стандартное отклонение): * относительные единицы соответствуют амоль используемого компетитора; ** воспроизводимость амплификации значительно снижается, когда количество ДНК, взятой в ПЦР (конк ДНК или кДНК) меньше, чем 0,01 амоль [13]; *** степень индукции

Следует отметить, что в экспериментах, проведенных на крысах, показано, что ЭР метаболизируется преимущественно CYP1A1, тогда как МР - субстрат для CYP1A2 [9]. Введение животным как ОАТ, так и БП, сопровождается заметным увеличением уровня мРНК Cyp1a1 и Cyp1a2, и, соответственно, ЭРОД и МРОД активностей. Уровень мРНК Cyp1a1 при индукции оценить достаточно трудно вследствие её низкого содержания в контроле. По приблизительным оценкам, степень индукции составляла более чем 10 000 раз. Тем не менее, видна разница в уровне мРНК Cyp1a1 после индукции исследуемыми химическими соединениями. В печени ОАТ-индуцированных мышей уровень мРНК Cyp1a1 превышал всего лишь на 20% таковой после введения БП. Уровень мРНК Cyp1a2 увеличивался в 8,5 раз при индукции ОАТ и в 18,7 раз - при индукции БП. Использование в качестве индуктора АХ позволило селективно измерить индукцию Cyp1a2, уровень мРНК которого увеличивался почти в 2 раза при отсутствии эффекта для Cyp1a1.

Количественные различия были выявлены и на уровне ферментативных активностей. Так, ЭРОД активность (окисление 7-этоксирезорифина) увеличивалась в 131, 129 и 20 раз, и МРОД активность увеличивалась в 29, 36 и 11 раз после введения ОАТ, БП и АХ соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что при отсутствии мРНК для Cyp1a1 в печени АХ-индуцированных мышей регистрируется заметная ЭРОД активность, что может говорить о неспецифичности данного субстрата для мышей. Недавно появились сообщения о том, что Cyp1a1 и Cyp1a2 недостаточно специфично окисляют используемые субстраты, которые традиционно считались специфичными для CYP1A [10]. В тоже время, мы считаем, что наиболее адекватной оценкой индуцибельности Cyp1a может служить измерение уровня мРНК, позволившее выявить существенные количественные различия в экспрессии Cyp1a у мышей линии C57BL. Полученные данные также показали, что исследуемые формы CYP, возможно, индуцируются по разным механизмам. Так, для Cyp1a1 увеличение уровня мРНК коррелирует с увеличением ЭРОД активности, что может подтверждать транскрипционный механизм индукции этого фермента [18,19]. В случае Cyp1a2, несмотря на незначительное увеличение количества мРНК в ответ на введение ОАТ, в печени исследуемых животных в метаболизме МР регистрируется достаточно высокая активность этой формы цитохромов P450. Этот факт можно объяснить с нескольких позиций. С одной стороны, схожие результаты получены на нокаутных мышах. Делается предположение, что в метаболизме этого субстрата могут быть вовлечены другие формы цитохрома P450 [10]. С другой стороны, есть данные о существовании посттранскрипционных механизмов регуляции экспрессии гена этого цитохрома P450 [19,20]. Вопрос о том, какому из этих объяснений отдать предпочтение, является предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kimura T., Kodama M., Nagata C., Kamataki T., Kato R. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3375-3377.
2. Degawa M., Kamarawa C., Hashimoto Y. (1982) *Carcinogenesis*, **3**, 1113-1117.
3. Lewine W.G. (1991) *Drug Metab. Rev.*, **8**, 253-309.
4. Parke D.V., Ioannides C., Lewis D. (1991) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**, 537-549.
5. Nebert D.W. (1989) *Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 137-152.
6. Yamasaki H., Degawa M., Funae Y., Imaoka S., Imai Y., Guengerich F.P., Shimada T. (1991) *Carcinogenesis*, **12**, 133-139.
7. Каледин В.И., Серова И.А., Семенова Л.А. (1990) *Экспер. Онкол.*, **12**, 28-30.
8. Каледин В.И. (1976) *Вопросы теоретической и прикладной генетики*, 119-122.

ЭФФЕКТ КСЕНОБИОТИКОВ НА мРНК И АКТИВНОСТЬ СУР Р450

9. *M.D. Burke, S. Thompson, R.J. Weaver, C.R. Wolf, and Mayer R.T.* (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 923-936.
10. *Humm J.T., Ross D.G., Richardson V.M., Diliberto J.J., Birnbaum, L.S.* (1998) *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1657-1660.
11. *Tsyrllov I.B., Goldfarb I.S., Gelboin H.V.* (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 259-266.
12. *Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M.* (1993) *Biotechniques*, **15**, 24-26.
13. *Gilliland G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H.F.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2725-2729.
14. *Burke M.D., and Mayer R.T.* (1974) *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 583-588.
15. *Omura T., and Sato R.* (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2385.
16. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
17. *Kimura S., Gonzalez F.J., Nebert D.W.* (1986) *Mol. Cell Biol.*, **6**, 1471-1477.
18. *Fujii-Kuriyama Y., Sogawa K., Imataka H., Yasumoto R., Kikuchi Y., Fujisawa-Sehara A.* (1990) *Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund.*, **21**, 165-175.
19. *Gonzalez F.J.* (1988) *Pharmacol. Rev.*, **40**, 243-288.
20. *Pasco D.S., Boyun K.W., Merchant S.V., Chalberg S.C., Fagan J.B.* (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8671-8677.

Поступила 27. 06. 00.

THE mRNA LEVEL AND THE ACTIVITY OF THE CYTOCHROME P450 1A IN LIVER OF C57BL MICE DURING INDUCTION WITH DIFFERENT XENOBIOTICS.

*O. N. Mikhailova^{1,2}, M. L. Fillpenko², O. A. Timofeeva²,
V. I. Kaledin³, L. F. Gulyaeva¹, V. V. Lyakhovich¹*

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Timakov St., 2, Novosibirsk, 630117

tel: (3832)-335889, fax: (3832)-323147, e.mail: Mikhailova Olga@mail.ru

²Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentiev Ave., 8, Novosibirsk, 630090

³Institut of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentiev Ave., 10, Novosibirsk, 630090

The rate of hepatic cytochrome P450 Cyp1a1 and Cyp1a2 induction was investigated in C57BL male mice during induction with *o*-aminoazotoluene (OAT), benzo[a]pyrene (BP) and 1,4-dihydroxyanthraquinone (AQ). The Cyp1a1 mRNA level determined by quantitative RT-competitive PCR increased more than three orders of magnitude during induction with OAT and BP compared with untreated animals and remained unchanged during induction with AQ. The Cyp1a2 mRNA level was only 8.5, 18.7 and 1.9 times higher during induction with OAT, BP and AQ respectively than in untreated mice. At the same time 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and 7-Methoxyresorufin-O-demethylase (MROD) activities of Cyp1a were also investigated in liver. The increase of Cyp1a1 mRNA level correlated with the increase of EROD activity. This suggests involvement of the transcriptional mechanism of the inducibility of this enzyme. In the case of Cyp1a2 there was insignificant increase of its mRNA level but high catalytic activity registered in liver in response to injection of the inducer of MR metabolism. This can imply the posttranscriptional mechanism of Cyp1a2 regulation. During induction with AQ the Cyp1a1 mRNA level remained unchanged, but the EROD activity increased almost 20-fold. The latter suggests insufficient specificity of this substrate for Cyp1a1. Thus, on the basis of the data obtained, the mRNA level can be considered as more accurate estimation of Cyp1a1 and Cyp1a2 inducibility, than the determination of the enzyme activity.

Key words: cytochrome P450 1a, expression, induction, *o*-aminoazotoluene, benzo[a]pyrene, 1,4-dihydroxyanthraquinone