

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.006.04; 612.018.2

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ PPAR, LXR И RXR В ПЕЧЕНИ И ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В КРОВИ У ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И РЕЗИСТЕНТНЫХ К ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗУ ЛИНИЙ МЫШЕЙ

*Е.Н. Пивоварова¹, Н.В. Багинская¹, М.Л. Перепечаева²,
С.И. Ильницкая¹, М.И. Душкин^{3*}*

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск

²Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, 630117 Новосибирск

³Институт терапии СО РАН, 630089 Новосибирск, ул. Б. Богаткова; 175/1;
факс: (383)334-8373; эл. почта: midushkin@soramn.ru

Ранее было показано, что самцы мышей линии DD/He в отличие от самцов мышей линии CC57BR/Mv характеризуются низкой частотой развития спонтанных опухолей печени и высокой частотой возникновения опухолей печени, индуцированных введением *орто*-аминоазотолуола (ОАТ). Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию уровня мРНК рецепторов активации пролиферации пероксисом (PPAR), X-рецепторов печени (LXR) и ретиноидных X рецепторов (RXR) в печени; концентрации кортикостерона, инсулина, глюкозы и липидов в крови у самцов мышей линий DD/He, и CC57BR/Mv. Используя метод мультиплексной ОТ-ПЦР, было обнаружено, что в печени мышей линии DD содержание мРНК PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α и RXR- β было существенно ниже, чем у мышей линии CC57BR. Достоверных различий относительного содержания мРНК LXR- α и LXR- β у животных этих двух линий найдено не было. У мышей линии DD наблюдалось сниженное более чем в 3 раза содержание кортикостерона в крови, участвующего в регуляции PPAR и RXR. Концентрация инсулина и глюкозы в сыворотке крови у мышей линии DD была также достоверно снижена. Исследование влияния экзогенного инсулина на уровень глюкозы в крови выявило повышенную чувствительность рецепторов к инсулину у мышей линии DD в сравнении с линией CC57BR. У мышей линии DD наблюдалось повышенное содержание общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности в крови, в то время как содержание триглицеридов у животных обеих линий достоверно не различалось. Как известно, глюкокортикоиды, PPAR и RXR играют критическую роль в транскрипционной регуляции воспалительного ответа. Поэтому полученные данные о сниженном уровне кортикостерона в крови и сниженном содержании мРНК PPAR и RXR в печени у мышей линии DD позволяют предположить, что чувствительность этой линии мышей к развитию ОАТ-индуцированных гепатокарцином может быть связана с повышенной воспалительной реакцией на канцероген.

Ключевые слова: гепатоканцерогенез, PPAR, LXR, RXR, кортикостерон, межлинейные различия.

Принятые сокращения: PPAR – рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом, LXR – X-рецептор печени, RXR – ретиноидный X-рецептор, ОАТ- ортоаминоазотолуол, HNF3 – печеночный ядерный фактор 3, ЛВП – липопротеины высокой плотности.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время все большую актуальность приобретает изучение генетических и эпигенетических механизмов развития гепатоцеллюлярной карциномы, одной из наиболее распространенных форм рака в мире [1]. Экспериментальной моделью изучения механизмов гепатоканцерогенеза являются инбредные линии мышей, различающиеся по предрасположенности к развитию спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами опухолей печени. Ранее было установлено, что чувствительность к индукции опухолей печени *орто*-аминоазотолуолом (ОАТ) наследуется независимо от предрасположенности мышей к развитию спонтанных опухолей печени [2]. Одной из возможных причин низкой чувствительности определенных линий мышей к канцерогенному действию ОАТ могла бы быть высокая скорость метаболизма и выведения данного канцерогена у этих животных. Однако экспериментальная проверка не подтвердила это предположение. Так, было показано отсутствие связи между предрасположенностью к гепатоканцерогенному действию ОАТ, с одной стороны, и активностью и индуцибельностью изоформ цитохрома P450, метаболизирующих аминоазокрасители, а также ферментов второй фазы метаболизма ксенобиотиков, с другой [3].

Открытие ядерных X рецепторов, названных впоследствии гормональными, позволило приступить к исследованию их роли в канцерогенезе. К суперсемейству ядерных гормональных рецепторов, в частности, относятся рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом α и γ (PPAR- α и PPAR- γ), X рецепторы печени α и β (LXR- α и LXR- β) и ретиноидные X рецепторы α и β (RXR- α и RXR- β), которые функционируют как лиганд-активируемые транскрипционные факторы. Связываясь со специфическими лигандами, PPAR и LXR транслоцируются в ядро, где образуют гетеродимеры с RXR. В дальнейшем данные гетеродимеры связываются с соответствующими сайтами регуляторных участков ДНК и модулируют транскрипцию генов-мишеней [4]. PPAR, LXR и RXR осуществляют регуляцию экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма липидов, глюкозы, холестерина, желчных кислот, факторов, вовлеченных в развитие воспалительного ответа, дифференцировку и пролиферацию клеток [4]. В последние годы стало известно, что PPAR, LXR и RXR принимают участие в регуляции процессов канцерогенеза, а их лиганды могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на развитие опухолей [5-7]. Известно, что экспрессия этих транскрипционных факторов находится под контролем глюкокортикоидов [8, 9]. Ранее было обнаружено, что ОАТ вызывает нарушение глюкокортикоидной регуляции некоторых ферментов печени и снижение ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора HNF-3 в клетках печени только у чувствительных к гепатоканцерогенному действию ОАТ линий мышей [10, 11]. Однако в литературе отсутствуют данные о возможной связи между уровнем экспрессии ядерных рецепторов PPAR, LXR и RXR, уровнем глюкокортикоидов, а также изменениями липидного и углеводного метаболизма и частотой возникновения спонтанных и индуцированных опухолей печени.

В данной работе нами было проведено сравнительное исследование уровня мРНК изоформ PPAR- α и γ , LXR- α и β и RXR- α и β в ткани печени, а также концентрации глюкокортикоидов, глюкозы, липидов и инсулина в крови у самцов мышей линий DD/He и CC57BR/Mv, контрастных по предрасположенности к развитию опухолей печени [2].

МЕТОДИКА.

Реактивы. Акриламид, тригидроксиметиламинометан – фирмы “Sigma Chemicals” (США); N,N'-метилен бисакриламид, TEMED – “Serva”(США); 2-меркаптоэтанол – “Ferak Berlin” (Германия); $MgCl_2$ – “Janssen Chimica” (Бельгия); ЭДТА – “Merck” (Германия); RNA secure reagent – “Ambion” (США); обратная транскриптаза M-MuLV, РНК-азин, ДНКазы RQ1 – “Promega” (США); маркер

размеров фрагментов ДНК – “Сибэнзим” (Россия); Taq-полимераза, dNTP, олигонуклеотиды PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , RXR- β , rpl30 и random гексануклеотид – “Медиген” (Россия), инсулин (Sigma); набор для выделения РНК – “Вектор-Бест” (Россия), набора реактивов НОВОГЛЮК производства “Вектор-Бест” (Россия), набора реактивов рио-ИНС-ПГ-¹²⁵I (Беларусь), наборы реактивов №В-8049, В 8042, В-8024 – “Вектор-Бест” (Россия). Остальные реактивы были отечественного производства марки хч, чда или осч.

Животные. В работе использованы мыши-самцы инбредных линий DD/He (DD) и CC57BR/Mv (CC57BR) возрастом 4-5 месяцев разводки Института цитологии и генетики СО РАН. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с международными правилами European Communities Council Directive (86/609/EEC). Мыши содержались группами по 6-8 особей в клетке в естественных условиях освещения и получали комбикорм ПК 120-1 (“Лабораторснаб”, Москва) и воду *ad libitum*.

Определение относительного содержания мРНК PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α и RXR- β методом полуколичественной ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли с помощью набора для выделения РНК фирмы “Вектор-Бест” в соответствии с инструкцией производителя. Полученный осадок РНК растворяли в 1мМ цитратном буфере, содержащем 1× RNA secure reagent, и хранили при –20°C до использования. ДНКазную обработку проводили в конечном объеме 20 мкл в реакционной смеси, содержащей 5 мкг суммарной клеточной РНК, 1 е.а. RQ1 RNase-Free DNase, 1× буфер для RQ1 RNase-Free DNase, 20 е.а. РНКазина. Пробы инкубировали при 37°C 15 мин, затем реакцию останавливали. Реакцию обратной транскрипции проводили в конечном объеме 25 мкл, в реакционной смеси, содержащей 400 нг суммарной клеточной РНК, 50 мМ трис-НСl pH 8,3, 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 1 мМ dNTP, 25 е.а. РНКазина, 80 е.а. M-MLV обратной транскриптазы, 0,4 мкг random праймера. Пробы инкубировали при 37°C 120 мин. Для оценки качества суммарную клеточную РНК анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Для оценки относительного содержания мРНК PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , и RXR- β использовали метод мультиплексной ПЦР со специфическими парами праймеров к последовательностям генов PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , RXR- β , а также rpl30, который выступал в качестве внутреннего стандарта. Последовательности праймеров, рассчитанные программой Vector NTI, представлены в таблице 1. ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл в следующих условиях: 1× ПЦР буфер (150 мМ трис-НСl, pH 8,3, 50мМ KCl, 0,25 мМ dNTP), 2 е.а. Taq – полимеразы, 2 мкл кДНК, 3,5 мМ MgCl₂, 0,5 мкМ каждого праймера. Первый цикл денатурации кДНК проводили при 94°C 2 мин. Пробы амплифицировали в следующих условиях: денатурация при 94°C 1 мин; отжиг при 55-56°C 30 сек; элонгация при 72°C 1 мин. Последний цикл представлял собой 4 мин при 72°C. Оптимальное количество циклов в экспоненциальной фазе реакции было следующим: для пары PPAR- α и rpl30 - 26; для пары PPAR- γ и rpl30 - 26 и 30 соответственно; для пары LXR- α и rpl30 – 26; для пары LXR- β и rpl30 – 30 и 24 соответственно; для пары RXR- α и rpl30 – 28 и 26 соответственно; для пары RXR- β и rpl30 – 34 и 28 соответственно. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 6% акриламидном геле в 1× TBE буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и сканировали в УФ-свете с помощью видеосистемы “DNA Analyzer” (“Литех”, Россия). Денситометрию проводили с помощью программы “Total Lab”. Уровень мРНК PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , RXR- β рассчитывали путём отношения оптической плотности продукта ОТ-ПЦР, полученного с использованием специфических праймеров к последовательностям генов PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , RXR- β и оптической плотности продукта, полученного с использованием специфических праймеров к гену rpl30.

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых в мультиплексной ПЦР.

Ген	Последовательность праймера (прямой и обратный)
<i>PPARα</i>	5'-AATTTGCTGTGGAGATCGGC-3' 5'-GGAAGAGGAAGGTGTCATCTGG-3'
<i>PPARγ</i>	5'-CGAAGAACCATCCGATTGAAG-3' 5'-CCAAACCTGATGGCATTGTG-3'
<i>LXRα</i>	5'-AGGCAACACTTGCATCCTCAG-3' 3'-GCTTTTGTGGACGAAGCTCTG-3'
<i>LXRβ</i>	5'-CATCGTGGCATCTTAGAGCCA-3' 5'-AGCCTTTCAGCCTTCACA-3'
<i>RXRα</i>	5'-CCAAGAGGATCCCACACTTTTC-3' 5'-GTTAGCACCCCTGTCAAAGATGG-3'
<i>RXRβ</i>	5'-AGCCCTCAGATCAACTCCACA-3' 5'-TCACGACACGAGTAGGTCAGGT-3'
<i>gpi30</i>	5'-ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC-3'; 5'-GTTTACTTCTCACCAGTCTG-3.

Определение чувствительности к инсулину. Инсулин в дозе 0,5 Ед на 100 г массы тела вводили мышам внутривенно в 10 часов утра. Животных забивали через 10, 20, 30, 45 и 85 мин после введения инсулина и определяли содержание глюкозы в крови мышей глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов НОВОГЛЮК производства “Вектор-Бест” (Россия).

Получение сыворотки крови и определение концентрации гормонов. Животных забивали декапитацией в 10 часов утра, забирали кровь в 1,5 мл пробирки, сыворотку крови получали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин и замораживали при -20°C. Кортикостерон определяли методом конкурентного белкового связывания [12], инсулин определяли радиоиммунным методом с помощью набора реактивов рино-ИНС-ПГ-¹²⁵I (Беларусь).

Определение концентрации липидов в сыворотке крови. Концентрацию триглицеридов, общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛВП) определяли ферментативными методами с помощью наборов реактивов №В-8049, В 8042 и В-8024 соответственно, “Вектор-Бест” (Россия).

Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Стьюдента и подтверждали U-тестом Манна-Уитни при помощи программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее было показано, что мыши линии DD характеризуются низкой частотой развития спонтанных опухолей печени и высокой частотой (до 100%) возникновения опухолей печени, индуцированных длительным введением ОАТ [2]. Напротив, мыши линии CC57BR отличаются высокой (до 30%) частотой развития спонтанных гепатом, но резистентны к действию данного канцерогена [2]. Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют, что у этих двух линий мышей наблюдаются существенные различия, как в уровне кортикостерона и инсулина в крови, так и в экспрессии мРНК транскрипционных факторов печени PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α , LXR- β , RXR- α , RXR- β . В физиологических условиях изоформы ядерных рецепторов LXR- α и - β , RXR- α и - β в и особенно PPAR- α достаточно высоко экспрессируются в печени мышей, в то время как PPAR- γ в меньшей степени представлен в печени, но высоко экспрессируется в жировой ткани. Относительное

содержание мРНК PPAR- α у мышей линии DD было ниже в 1,4 раза (рис. 1А), а содержание PPAR- γ (рис. 1Б) в 8,3 раза ниже по сравнению с линией CC57BR. У мышей линии DD содержание мРНК RXR- α (рис. 2А) и мРНК RXR- β (рис. 2Б) было достоверно ниже по сравнению с линией CC57BR в 2,6 и в 1,3 раза соответственно. В то же время не наблюдалось существенных различий содержания мРНК LXR- α (рис. 3А) и LXR- β (рис. 3Б) в печени мышей этих двух линий.

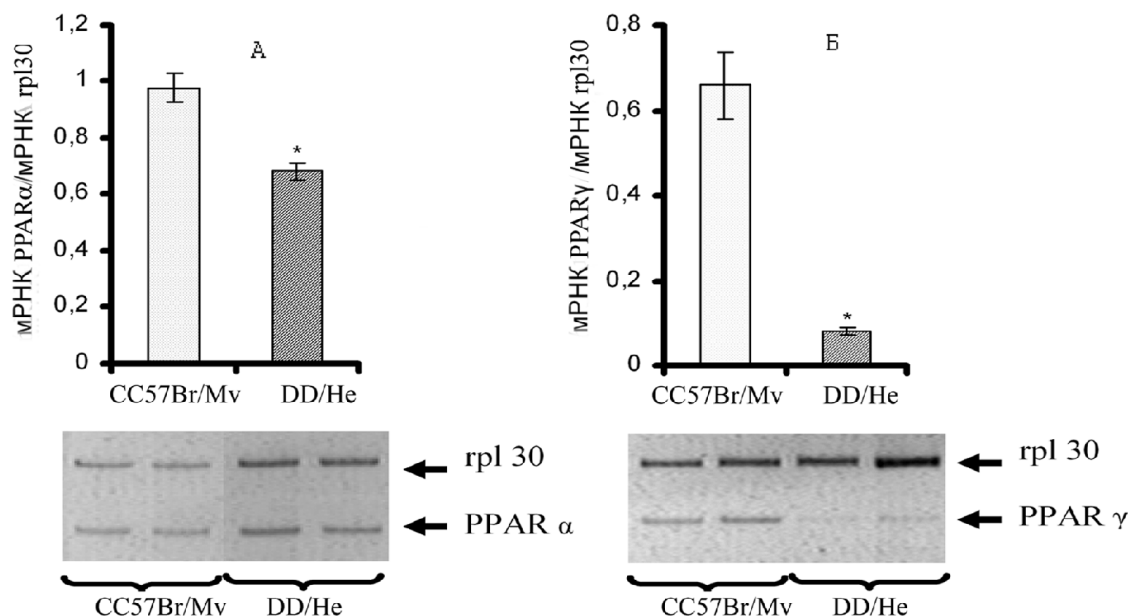


Рисунок 1.

Относительное содержание мРНК PPAR- α (А) и PPAR- γ (Б), нормированное по мРНК rpl30, в печени мышей линий CC57BR/Mv (светлые столбцы) и DD/He (тёмные столбцы).

* - достоверное отличие между линиями мышей ($p \leq 0,01$), количество животных в каждой группе = 10.

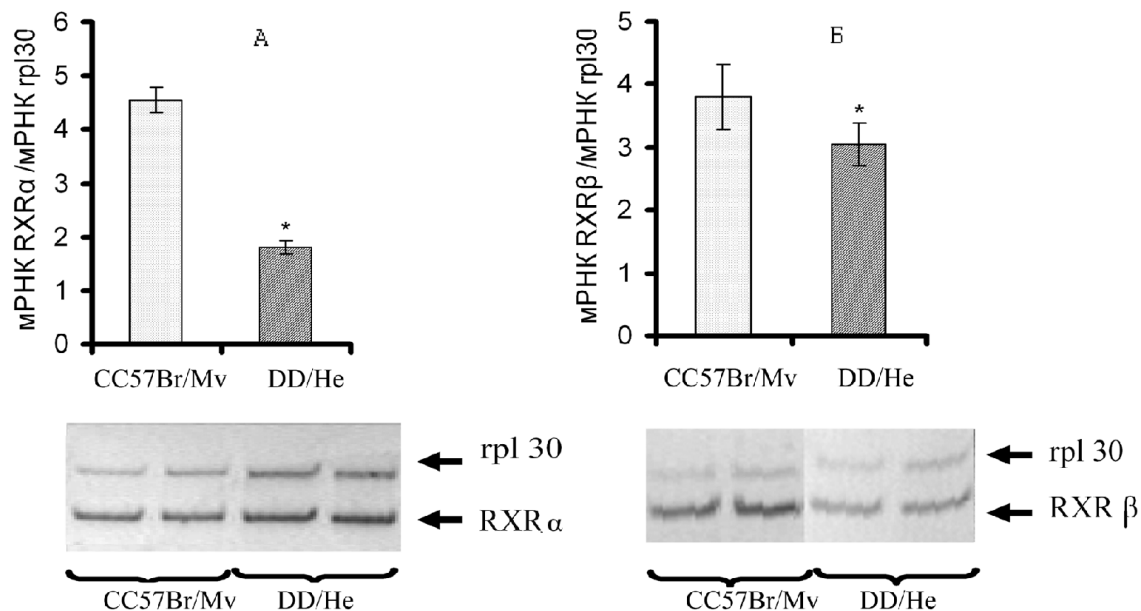


Рисунок 2.

Относительное содержание мРНК RXR- α (А) и RXR- β (Б), нормированное по мРНК rpl30, в печени мышей линий CC57BR/Mv (светлые столбцы) и DD/He (тёмные столбцы).

* - достоверное отличие между линиями мышей ($p \leq 0,05$), количество животных в каждой группе = 10.

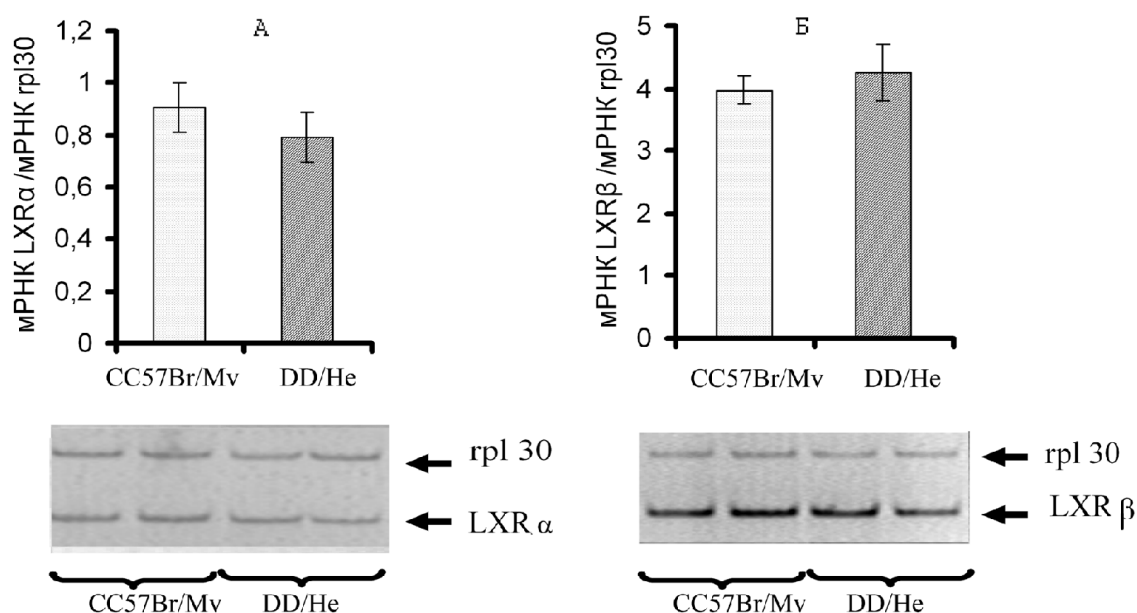


Рисунок 3.

Относительное содержание мРНК LXR-α (А) и LXR-β (Б), нормированное по мРНК rpl30, в печени мышей линий CC57BR/Mv (светлые столбцы) и DD/He (тёмные столбцы). Количество животных в каждой группе = 10.

Результаты исследований межлинейных различий концентраций кортикостерона и инсулина в крови представлены в таблице 2. По сравнению с мышами линии CC57BR у мышей линии DD наблюдалось более чем в 3 раза сниженное содержание кортикостерона в сыворотке крови. Концентрация инсулина в сыворотке крови у мышей линии DD также была достоверно снижена более чем в 2 раза. Полученные данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют также о существенных различиях в концентрации липидов и глюкозы, наблюдаемых в крови мышей линий DD и CC57BR. У мышей линии DD было обнаружено повышенное в полтора раза содержание общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛВП) в крови по сравнению с мышами линии CC57BR, в то время как содержание триглицеридов достоверно не различалось. У мышей линии DD наблюдался также сниженный на 40% по сравнению с мышами линии CC57BR базовый уровень глюкозы. При внутрибрюшинном введении инсулина животным были обнаружены резкие количественные различия в динамике снижения концентрации глюкозы в крови у мышей изучаемых линий (табл. 4). Через 30 и 85 мин после введения инсулина уровень глюкозы в крови мышей линии DD снижался в 2,5 и 4,1 раза по сравнению с базовым, в то время как снижение уровня глюкозы у мышей линии CC57BR в эти временные интервалы было значительно менее выраженным (в 1,63 и 1,5 раза соответственно). Полученные данные свидетельствуют о повышенной чувствительности рецепторов к инсулину у мышей линии DD.

Таблица 2. Концентрация кортикостерона и инсулина в крови у мышей линий DD/He и CC57BR/Mv.

Гормональные показатели	Линии мышей	
	DD/He	CC57BR/Mv
Инсулин (пмоль/л)	43,3 ± 4,4 (8)*	99,3 ± 9,6 (7)
Кортикостерон (мкг%)	2,0 ± 1,0 (14)*	6,9 ± 1,8 (10)

Примечание: * - достоверность различий между линиями мышей ($p \leq 0,01$). В скобках указано количество животных. Здесь и далее данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней.

Таблица 3. Содержание липидов и глюкозы в крови у мышей линий DD/He и CC57BR/Mv.

Биохимические показатели	Линии мышей	
	DD/He	CC57BR/Mv
Глюкоза (ммоль/л)	4,6 ± 0,2 (8)*	7,7 ± 0,2 (7)
Общий холестерин (ммоль/л)	2,96 ± 0,06 (8)*	1,90 ± 0,1 (7)
ЛВП холестерин (ммоль/л)	2,72 ± 0,11 (8)*	1,63 ± 0,12 (7)
Триглицериды (ммоль/л)	1,63 ± 0,08 (8)	1,45 ± 0,08 (7)

Примечание: * - достоверность различий между линиями мышей ($p \leq 0,001$). В скобках указано количество животных.

Таблица 4. Изменение уровня глюкозы в плазме крови у мышей линий DD/He и CC57BR/Mv после однократного введения инсулина в дозе 0,5 ед/100 г массы тела.

Линии мышей	Время после введения инсулина (мин)					
	Без введения	10	20	30	45	85
DD/He	7,4±0,4	5,6±0,9	3,2±0,6***	3,2±0,4***	1,9±0,6***	1,8±0,6***
CC57BR/Mv	10,4±0,4	7,5±1,4*	6,9±0,4***	6,4±0,4***	5,1±0,3***	7,0±0,8**

Примечание: * - достоверное отличие от интактных животных (без введения) ($p \leq 0,05$); ** - достоверное отличие от интактных животных (без введения) ($p \leq 0,01$); *** - достоверное отличие от интактных животных (без введения) ($p \leq 0,001$).

Известно, что экспрессия изоформ PPAR и RXR в печени в значительной степени зависит от уровня глюкокортикоидов [8, 9]. Поэтому сниженный уровень кортикостерона у мышей линии DD по сравнению с линией CC57BR может быть вероятной причиной снижения уровня экспрессии мРНК как PPAR, так и RXR. Так как PPAR- α и PPAR- γ играют важную роль в транскрипционной регуляции липидного и углеводного обмена в тканях, то их недостаточность у мышей линии DD может приводить к значительным сдвигам в содержании липидов и глюкозы в крови животных. Повышенный уровень холестерина ЛВП в крови у мышей линии DD в сравнении с линией CC57BR, вероятно, обусловлен сниженным уровнем экспрессии PPAR- γ . Однако сниженный уровень глюкозы и сходный уровень триглицеридов в крови у мышей линии DD в сравнении с линией CC57BR нельзя объяснить дефицитом PPAR- α и PPAR- γ , так как из литературных источников известно, что недостаточная функция PPAR- α приводит к развитию гипертриглицеридемии [13], а доминантные негативные мутации PPAR- γ проявляют признаки инсулиновой резистентности и повышенного уровня глюкозы [14]. С большей степенью вероятности можно объяснить гипогликемию и сниженный уровень инсулина в крови у мышей линии DD глюкокортикоидной недостаточностью. Так, подобные изменения содержания глюкозы и инсулина наблюдаются при дефиците глюкокортикоидов у мышей, нокаутированных по кортикотропин-релизинг фактору [15]. Низкий уровень кортикостерона и инсулина у мышей линии DD также, вероятно, является причиной их более высокой

чувствительности к инсулину, введение которого вызывает более резкое и длительное снижение уровня глюкозы в сыворотке крови в сравнении с мышами линии CC57BR.

Специфичность глюкокортикоидной регуляции различных генов осуществляется, главным образом, за счёт взаимодействия глюкокортикоидного рецептора с другими транскрипционными факторами, сайты связывания которых находятся вблизи сайтов связывания глюкокортикоидного рецептора на ДНК внутри регуляторных районов этих генов. В предыдущих работах было показано, что под действием ОАТ происходит нарушение глюкокортикоидной регуляции специфического для печени фермента тирозинаминотрансферазы [10] и ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора HNF3 [11] только у линий мышей, предрасположенных к его гепатоканцерогенному действию. Настоящее исследование выявило снижение экспрессии PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α и RXR- β в печени мышей линии DD, чувствительной к химическому гепатоканцерогенезу, которое могло быть следствием пониженной у них функции гипоталамо-гипофизарной системы.

Литературные данные свидетельствуют о вовлечении ядерных рецепторов PPAR- α , PPAR- γ и RXR в канцерогенез [16, 17]. Исследования тканей карциномы шейки матки [18], опухоли молочной железы [19] и рака простаты [20] человека свидетельствуют о снижении уровня экспрессии мРНК PPAR- γ в опухолевых клетках, которое рассматривается как маркер негативного прогноза. Обнаружено, что у линии мышей с ArcMin/+ с повышенным образованием полипов в кишечнике дефицит PPAR- γ приводит к развитию опухолей кишечника [21]. В то же время, как показано на моделях развития карцином печени человека [4] и крыс [22], активация PPAR- γ синтетическими агонистами приводит к подавлению роста и развитию апоптоза опухолевых клеток. Более того, обобщение данных о совместном применении агонистов PPAR- γ и RXR свидетельствует об их синергическом ингибирующем действии на опухолевый рост [13]. Что касается участия PPAR- α в онкогенезе, известно, что агонисты этого транскрипционного фактора у грызунов вызывают развитие гепатокарцином, однако не оказывают влияния на развитие опухолей печени у человека [17].

Полученные нами данные позволяют сформулировать гипотезу, основанную на следующих предпосылках. Хорошо известно, что глюкокортикоидный рецептор, PPAR и RXR играют центральную роль в транскрипционной регуляции воспалительного ответа [7]. Поэтому сниженный уровень содержания глюкокортикоидов и экспрессии PPAR- α , PPAR- γ и RXR- α у мышей линии DD создаёт условия для повышенного ответа клеток печени на воспалительные стимулы, к которым можно отнести канцероген ОАТ. В конечном итоге это может приводить к индукции образования опухолей печени. Это предположение согласуется с полученными ранее результатами гистологических исследований срезов печени мышей, получавших канцероген ОАТ [2], которые демонстрируют образование многочисленных воспалительных инфильтратов в печени на ранних стадиях гепатоканцерогенеза у мышей линии DD, но не у мышей линии CC57BR. Эту гипотезу также поддерживают данные других авторов, полученные на PPAR- α -null-мышях, которые в сравнении с мышами дикого генотипа проявляли повышенную чувствительность к индукции гепатоканцерогенеза агонистом PPAR- α диэтилгексилфталатом [23]. Дефицит PPAR- α у этих мышей провоцировал повышенную индукцию воспалительных реакций и свободных радикалов кислорода. Эти изменения ассоциировались с образованием 8-гидроксигуанозина и экспрессией протоонкогенов, что ассоциировалось с более высокой частотой образования опухолей. По-видимому, низкое содержание мРНК PPAR- α в совокупности с низким уровнем глюкокортикоидов у мышей линии DD при длительном введении канцерогена ОАТ создает условия для развития хронического воспаления в ткани печени и включает механизмы образования воспаления-ассоциированных опухолей [24], для развития которых критическим является активация NF- κ B.

Известно, что воспаление в зоне развития опухоли может как индуцировать, так и ингибировать опухолевый рост. Литературные данные свидетельствуют о том, что у PPAR- α дефицитных мышей на пересадку опухолевых клеток спонтанно возникает воспалительный ответ, который супрессирует ангиогенез и развитие опухоли путем избыточной продукции эндогенного ингибитора ангиогенеза тромбоспондина-1 [25]. При этом нейтрализация тромбоспондина-1 восстанавливает опухолевый рост у PPAR- α дефицитных мышей. Учитывая эти данные, устойчивость мышей линии DD к развитию спонтанных опухолей печени также можно объяснить низким уровнем экспрессии PPAR- α в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, настоящая работа позволила выявить значительные различия в экспрессии ядерных факторов PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α и RXR- β в печени, содержании кортикостерона, инсулина, глюкозы и холестерина в крови у мышей линий DD и CC57BR и сформулировать гипотезу об их возможной роли в предрасположенности к спонтанному и индуцированному гепатоканцерогенезу. Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Мыши линии DD в сравнении с мышами линии CC57BR характеризуются сниженным уровнем мРНК PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α и RXR- β в печени. Не обнаружено существенных различий содержания мРНК LXR- α (рис. 3А) и LXR- β (рис. 3Б) в печени мышей этих двух линий.
2. У мышей линии DD обнаружен сниженный в более чем 3 раза уровень кортикостерона и инсулина, повышенный уровень ЛВП и сниженный уровень глюкозы в крови и повышенная чувствительность к введению инсулина в сравнении с мышами линии CC57BR.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 07-04-00864.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазаревич Н.Л. (2004) Успехи биологической химии, **44**, 365-418.
2. Каледин В.И., Серова И.А., Семёнова Л.А. (1990) Эксперим. онкология, **12**(4), 28-30.
3. Каледин В.И., Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Макарова С.И., Морозкова Т.С., Рихтер В.А. (1999) Эксперим. онкология, **21**(1), 18-23.
4. Душкин М.И., Кудинова Е.Н., Шварц Я.Ш. (2007) Цитокины и воспаление, **6**, 12-18.
5. Toyoda M., Takagi H., Horiguchi N., Kakizaki S., Sato K., Takayama H., Mori M. (2002) Gut, **50**, 563-567.
6. Gonzalez F.J., Shah Y.M. (2008) Toxicology, **246**, 2-8.
7. Gong H., Guo P., Zhai Y., Zhou J., Uppal H., Jarzynka M.J., Song W.C., Cheng S.Y., Xie W. (2007) Mol. Endocrinol., **21**, 1781-1790.
8. Cuzzocrea S., Bruscoli S., Mazzon E., Crisafulli C., Donato V., Di Paola R., Velardi E., Esposito E., Nocentini G., Riccardi C. (2008) Mol. Pharmacol., **7**, 323-337.
9. García-Bueno B., Madrigal J.L., Pérez-Nievas B.G., Leza J.C. (2008) Endocrinology, **149**, 1969-1978.
10. Меркулова Т.И., Каледин В.И., Кропачев К.Ю., Кобзев В.Ф., Васильев Г.В. (1998) Докл. РАН., **361**, 700-703.
11. Kropachev K.Y., Kaledin V.I., Kobzev V.F., Plisov S.Y., Levashova Z.B., Merkulova T.I. (2001) Mol. Carcinog., **31**, 10-15.
12. Tinnikov A.A. (1993) Jpn. J. Physiol., **43**, 247-251.
13. van Raalte D.H., Li M., Pritchard P.H., Wasan K.M. (2004) Pharm. Res., **9**, 1531-1538.
14. Barroso I., Gurnell M., Crowle, V.E., Agostini M., Schwabe J.W., Soos M.A., Maslen G.L., Williams T.D., Lewis H. (1999) Nature, **402**, 880-883.

15. Jacobson L., Ansari T., Potts J., McGuinness O.P. (2006) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, E15-E22.
16. Shimizu M., Moriwaki H. (2008) *PPAR Res.*, 181047.
17. Tachibana K., Yamasaki D., Ishimoto K., Doi T. (2008) *PPAR Res.*, 102737.
18. Hase T., Yoshimura R., Mitsuhashi M., Segawa Y., Kawahito Y., Wada S., Nakatani T., Sano H. (2002) *Urology*, **60**, 542-547.
19. Badawi A.F., Badr M.Z. (2003) *Int. J. Cancer*, **103**, 84-90.
20. Jung T.I., Baek W.K., Suh S.I., Jang B.C., Song D.K., Bae J.H., Kwon K.Y., Bae J.H., Cha S.D., Bae I., Cho C.H. (2005) *Gynecol. Oncol.*, **97**, 365-373.
21. McAlpine C.A., Barak Y., Matise I., Cormier R.T. (2006) *Int. J. Cancer*, **119**, 2339-2346.
22. Borbath I., Leclercq I., Moulin P., Sempoux C., Horsmans Y. (2007) *Eur. J. Cancer*, **43**, 1755-1763.
23. Ito Y., Yamanoshita O., Asaeda N., Tagawa Y., Lee C.H., Aoyama T., Ichihara G., Furuhashi K., Kamijima M., Gonzalez F.J., Nakajima T. (2007) *J. Occup. Health*, **49**, 172-182.
24. Balkwill F., Coussens L.M. (2004) *Nature*, **431**, 405-406.
25. Kaipainen A., Kieran M.W., Huang S., Butterfield C., Bielenberg D., Mostoslavsky G., Mulligan R., Folkman J., Panigrahy D. (2007) *PLoS ONE*, **2**(2), e260.

Поступила: 02. 09. 2008.

LIVER NUCLEAR HORMONE RECEPTOR PPAR, LXR AND RXR EXPRESSION AND BLOOD LIPID AND GLUCOSE LEVELS IN SUSCEPTIBLE AND RESISTENT TO HEPATOCARCINOGENESIS STRAIN OF MICE

E.N. Pivovarova¹, N.V. Baginskaya¹, M.L. Perepechaeva², S.I. Ilnitskaya¹, M.I. Dushkin³

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090, prosp. Lavrentyeva, 10, Russia

²Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk 6301179, ul. Acad. Timakova, 2, Russia

³Institute of Internal Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk 630089, ul. B. Bogatkova, 175/1, Russia; fax: (383)334-837; e-mail: midushkin@soramn.ru

Earlier it was shown that male mice of the DD/He strain were highly susceptible to *ortho*-aminoasotoluene (OAT) induced hepatocarcinogenesis, and resistant to spontaneous liver tumor development as compared to the CC57BR/Mv strain. In the present work we have made a comparative investigation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), liver X-receptor (LXR) and retinoic X-receptor (RXR) mRNA levels in liver as well as concentrations of corticosterone, glucose, lipids and insulin in blood of male DD/He and CC57BR/Mv mice. Using the multiplex RT-PCR method it was found that PPAR- α , PPAR- γ , RXR- α and RXR- β mRNA content was essentially decreased in the liver of DD mice as compared to mice of the CC57BR strain. No significant interstrain differences of LXR- α and LXR- β mRNA content were found. In DD micetere was more then the 3-fold decrease of blood content of corticosterone, which is involved in PPAR and RXR regulation. DD mice demonstrated a significant decrease in blood serum glucose and insulin concentrations as well as higher reactivity to insulin as compared with CC57BR mice. Elevated blood total cholesterol and cholesterol HDL level were found in DD mice whereas triglyceride content was basically the same in both mouse strains. It is known that glucocorticoids, PPAR and RXR play crucial role in transcription regulation of inflammation response. Therefore our data allow to suggest that decreased corticosterone level in blood, PPAR and RXR mRNA content in liver of the DD strain may lead to induction of inflammation by OAT exposure, resulting in a high incidence of tumorigenesis in this strain.

Key words: hepatocarcinogenesis, PPAR, LXR, RXR, corticosterone, interstrain differences.