

ПОВЫШЕННАЯ ЗАВИСИМАЯ ОТ ПОЛА ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПРОЛАКТИНА ПРИ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ H27 КРЫС

Т.Ю.Остроухова*, О.А.Курашева*, А.А.Розенкранц*,**, О.В.Смирнова*

**Лаборатория эндокринологии (зав. — проф. А.Н.Смирнов) и кафедра биофизики (зав. — проф. А.Б.Рубин) биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова;*

***Лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта (зав. — проф. А.С.Соболев) Института биологии гена РАН*

Иммуногистохимически выявлена повышенная экспрессия рецепторов пролактина в центральных и периферических клетках внутрипеченочного трансплантата гепатомы H27 крыс без изменения компартиментализации по сравнению с гепатоцитами интактных животных. На примере гонадоэктомированных животных выявлена “классическая” для нормальных клеток печени гормональная регуляция экспрессии рецепторов пролактина в обоих типах опухолевых клеток — позитивнозависимая от эстрогенов и негативнозависимая от андрогенов.

Ключевые слова: рецептор пролактина, гепатома H27, гепатоциты, половые гормоны, крыса

Пролактин — гормон передней доли гипофиза, участвует в регуляции широкого спектра функций в организме человека и животных, в том числе в клетках печени. Действует пролактин через рецепторы пролактина (РПрл), передающие свой сигнал в клетках по разным путям, основным из которых является JAK-STAT. Гепатоциты животных [2,5,10] и человека [6] характеризуются высоким уровнем РПрл и преобладают у женских особей. Пролактин участвует в регуляции пролиферативных процессов в печени.

Целью работы было изучение изменения экспрессии и компартиментализации РПрл во внутрипеченочных трансплантатах гепатомы H27 и ткани печени животных-реципиентов разных полов и ее зависимости от уровня половых гормонов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали белых беспородных интактных или гонадоэктомированных половозрелых крыс

Адрес для корреспонденции: ostroukhova-t@rambler.ru. Остроухова Т.Ю.

(180-240 г) по 4-12 животных в каждой группе. Контрольными группами служили животные без трансплантации опухоли. Гепатома H27 представляет собой клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы крысы. Штамм гепатомы H27 получали в Банке опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н.Блохина и поддерживали подкожной трансплантацией в область бедра один раз в 12-14 дней. Получали взвесь опухолевых клеток подкожного трансплантата и разводили до 40% суспензии модифицированным раствором Хенкса (“Sigma”). Внутрипеченочную трансплантацию проводили наркотизированным крысам пункцией центральной доли печени 0.1 мл приготовленной суспензии опухолевых клеток. Место пункции заклеивали клеем для тканей МК-7М. Через 25-30 дней печень с опухолью изолировали. Исследовали ткань опухоли и ткань из лопасти печени, не затронутой опухолью (нативной). Кусочки тканей фиксировали в 4% растворе параформальдегида (“Sigma”), заключали в парапласт (“Sigma”) и готовили срезы толщиной 3 мкм. Для гистологического анализа проводили окрашивание гематоксилином.

Локализацию РПрл в образцах определяли непрямой иммунопероксидазным методом с применением моноклональных антител U₁ ("Sigma") к РПрл крыс. В каждом образце ткани животного исследовали по два опытных (в присутствии антител к РПрл) и два контрольных (без антител к РПрл) среза, анализируя по 100 опухолевых клеток в ткани опухоли, по 50 клеток в перипортальных и периферических зонах печени. Интенсивность экспрессии РПрл в гепатоцитах перипортальных и периферических зон была во всех случаях сопоставимой, поэтому эти данные объединяли. Иммунопозитивное окрашивание на РПрл анализировали в целом по клетке, а также в ядре и цитоплазме. Интенсивность экспрессии РПрл определяли путем полуколичественного анализа изображений участков срезов, полученных на микроскопе "AxioPlan" ("Zeiss") с помощью камеры "KAF 400" ("Photometrics") с охлаждаемой ПЗС-матрицей, с помощью компьютерной программы обработки изображений "PMIS 2.1", по разнице между уровнями градаций серого в опытных и контрольных срезах, пропорциональной относительной концентрации меченого со-

единения [11]. Ввиду того, что большая часть данных не подчинялась нормальному распределению, полученные результаты выражали в относительных единицах как медиана, верхняя и нижняя квартили [2].

Статистический анализ данных проводили с помощью программы "Statistica 6.0". Для определения достоверности различий использовали непараметрический критерий Крускала—Уоллиса и медианный тест. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При гистологическом исследовании внутрипеченочной опухоли H27 у самцов и самок крыс на 25–30-й дни после перевивки была выявлена гепатома с двумя типами опухолевых клеток: "центральной" и "периферической". Центральные опухолевые клетки обычно располагались диффузно и бесструктурно в виде разных по размеру очагов и часто были окружены периферическими клетками (рис. 1, а). Они были небольшого размера, часто округлой формы, с большим круг-

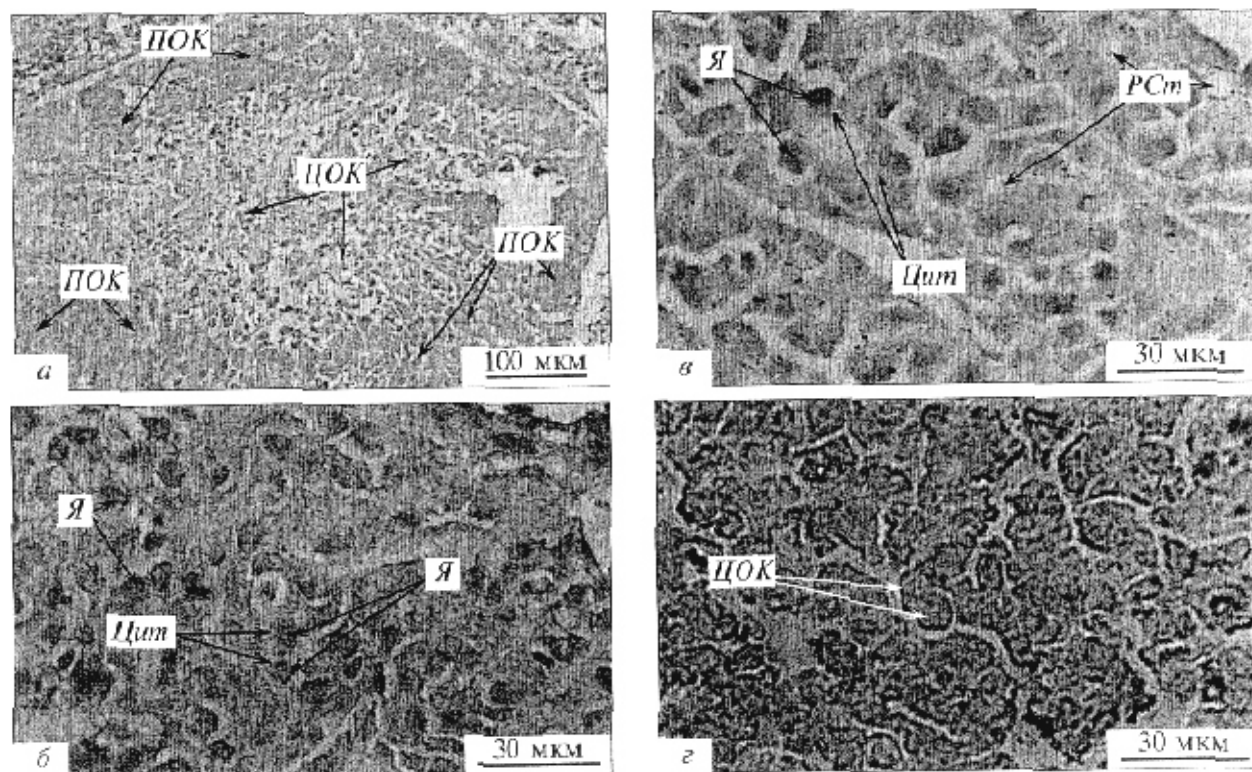


Рис. 1. Особенности гистологии и экспрессии РПрл во внутрипеченочном трансплантате гепатоцеллюлярной карциномы H27 крысы.

а — внутрипеченочный трансплантат H27 самца; б — опухолевые клетки центральной части опухоли самца крысы; в — опухолевые клетки периферической части опухоли самца крысы; г — иммунопероксидазная идентификация рецепторов пролактина в центральных опухолевых клетках самки крысы. а-в — окраска гематоксилином. ЦОК — центральная опухолевая клетка, ПОК — периферическая опухолевая клетка, Цит — цитоплазма, Я — ядра, РСг — розеточная структура.

лым или овальным ядром, которое занимало в основном весь объем клетки (рис. 1, б). Таким образом, ядерно-цитоплазматическое соотношение у этих клеток было значительно увеличено по сравнению с нормальными гепатоцитами. Периферические опухолевые клетки (рис. 1, в) часто формировали розеточные структуры, а по размеру были немного больше центральных опухолевых клеток, но меньше, чем нормальные гепатоциты. Ядерно-цитоплазматическое соотношение у них было незначительно увеличено по сравнению с гепатоцитами интактных животных. Периферические опухолевые клетки в редких случаях формировали перипортальные и перичентральные зоны печеночной дольки.

В опухолевых клетках обоих типов РПрл-позитивная окраска выявлялась в ядре, цитоплазме и клеточной мембране (рис. 1, г). Не было обнаружено достоверных различий в экспрессии РПрл между цитоплазмой и ядрами опухолевых клеток обоих типов у самцов и самок. В дальнейшем нами оценивалась экспрессия РПрл в опухолевых клетках и гепатоцитах разных групп животных по целой клетке.

В центральных опухолевых клетках экспрессия РПрл была сильно увеличена по сравнению с нормальными гепатоцитами у животных обоих полов (в 1.7 раз у самцов и в 3.3 раза у самок; таблица). В периферических опухолевых клетках иммунопозитивное окрашивание на РПрл было также увеличено, но в меньшей степени (в 1.3 раза у самцов и 1.4 раза у самок). Таким образом, центральные очаги опухоли, вероятно, являются более чувствительными к сигналам пролактина, чем периферические, особенно у самок.

Регуляция экспрессии РПрл в печени нормальных животных подчиняется регулирующим действиям половых стероидов: позитивному действию эстрогенов, и негативному — андрогенов

[10]. Гормональная регуляция уровня экспрессии РПрл в опухолевых клетках внутрипеченочного трансплантата Н27 оказалась похожей. Кастрация самцов вызывала в 1.6 раза достоверное усиление иммунопозитивного окрашивания на РПрл в центральных и в периферических опухолевых клетках (рис. 2). Удаление яичников у самок вызывало значительное снижение экспрессии РПрл в центральных (в 2.1 раза) и периферических (в 1.7 раза) опухолевых клетках.

Ткань из лопасти печени, не затронутой опухолью (нативная), сохранила нормальную структуру печеночной дольки у самцов и у самок крыс. В гепатоцитах нативной ткани распределение РПрл было таким же, как в гепатоцитах нормальных животных [2].

Развитие опухоли не отразилось на экспрессии РПрл в нативной лопасти печени у самок, но в этом случае в 1.5 раза снизилась экспрессия РПрл в аналогичной лопасти у самцов (таблица). Этот факт, возможно, отражает более сильное токсическое влияние опухоли на гепатоциты самцов, чем самок.

Таким образом, была выявлена “классическая” для нормальных клеток печени гормональная регуляция экспрессии РПрл в клетках гепатомы Н27 при внутрипеченочной трансплантации: позитивнозависимая от эстрогенов, и негативнозависимая от андрогенов. Следовательно, РПрл могут служить терапевтической мишенью для полозависимой терапии опухолей печени.

Клетки опухоли Н27 при внутрипеченочной трансплантации характеризуются повышенной экспрессией РПрл по сравнению с гепатоцитами интактных животных и клетками других пролактинчувствительных органов [5]. Наши исследования показали, что эти изменения, по-видимому, зависят от клеточного происхождения опухоли. Ранее нами было выявлено не только существен-

Интенсивность РПрл-позитивного окрашивания (в отн. ед.) разных типов клеток при внутрипеченочной трансплантации гепатомы Н27 самцам и самкам крыс

Группа животных	Гепатоциты	Опухолевые клетки	
		центральные	периферические
Самцы	интактные	—	—
	с трансплантатом	103.5** (69; 138)	82.5** (55; 111)
Самки	интактные	—	—
	с трансплантатом	268.5** (227; 336)	112** (68; 184.5)

Примечание. Указана медиана, в скобках — нижняя и верхняя квартиль. *В качестве гепатоцитов нативной ткани у животных с трансплантатом рассматривали гепатоциты лопасти печени, не затронутой опухолевым процессом. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с гепатоцитами интактных животных.

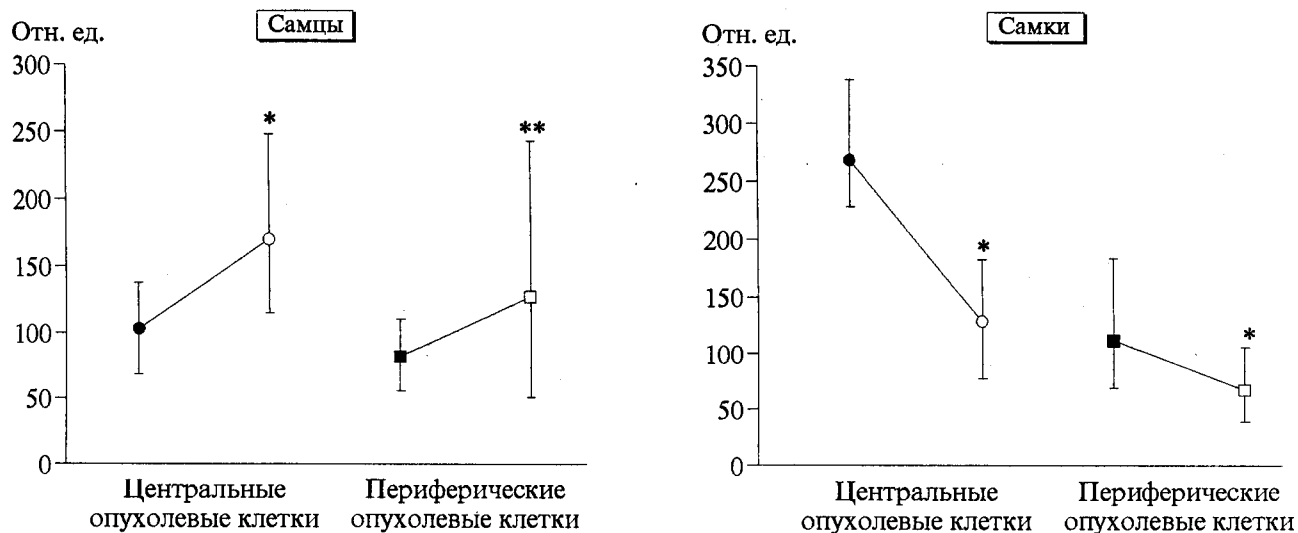


Рис. 2. Интенсивность экспрессии РПрл в клетках гепатоцеллюлярной карциномы Н27 у животных с интактными гонадами (темный маркер) и у гонадоэктомированных животных (светлый маркер). Результаты представлены как медиана, нижняя и верхняя квартили.

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ по сравнению с соответствующим типом клеток животного с интактными гонадами.

ное увеличение экспрессии РПрл в клетках холангиоцеллюлярного слизистого рака крыс РС-1 при внутрипеченочной трансплантации, но и их значительная аккумуляция в ядрах этих клеток [2]. Было высказано предположение о реализации в данном типе опухоли прямого пролиферативного действия пролактина на ядра этих клеток [2,3]. Подобное действие показано для клеток Nb2-лимфомы [9]: в этом случае оно было опосредовано образованием внутриядерного комплекса пролактин/циклофиллин В, индуцирующего Stat5-зависимую экспрессию генов. В случае гепатомы Н27, очевидно, прямой ядерный путь действия пролактина не играет главной роли, т.к. экспрессия РПрл в ядре и цитоплазме опухолевых клеток одинакова. Возможно, что в клетках гепатомы Н27 РПрл способны, также как и в нормальных гепатоцитах, запускать основной JAK-STAT каскад [5], обладающий пролиферативным действием, а за счет усиленной экспрессии РПрл в опухолевых клетках этот эффект может быть гипертрофирован. Для клеток молочной железы мышей был показан альтернативный сигнальный путь: пролактин способен непосредственно влиять на поддержание постоянного уровня ядерного транскрипционного фактора NF1-C2, активирующего ген опухолевой супрессии p53 [7]. Таким образом, можно предположить, что онкогенное или антионкогенное действие пролактина зависит от тонкого баланса пролиферативных или антипролиферативных внутриклеточных сигнальных путей, запускаемых этим

гормоном. Кроме того, необходимо помнить, что РПрл имеют две основные изоформы: длинную, которая запускает JAK-STAT каскад, и короткую, являющуюся негативным регулятором сигналов длинной изоформы [4,8]. Для понимания роли пролактина в гепатоканцерогенезе необходимо учитывать не только уровень РПрл, но и соотношение изоформ РПрл. Однако важность вклада РПрл в патогенез некоторых типов опухолей печени не оставляет никаких сомнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зенкова Т., Куликов А., Богорад Р. и др. // Бюл. экспер. биол. 2003. Т. 135, № 6. С. 664-668.
2. Остроухова Т., Куликов А., Розенкранц А., Смирнова О. // Там же. 2006. Т. 141, № 3. С. 341-344.
3. Смирнова О. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16, № 2. С. 199-211.
4. Смирнова О., Богорад Р. // Биохимия. 2004. Т. 69, № 4. С. 437-450.
5. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M. et al. // Endocr. Rev. 1998. Vol. 19. P. 225-268.
6. Garcia-Caballero T., Mertani H.M., Lambert A. et al. // Endocrine. 2000. Vol. 12. P. 265-271.
7. Johansson E., Kannius-Janson M., Gritli-Linde A. et al. // Mol. Endocrinol. 2005. Vol. 19, N 4. P. 992-1003.
8. Perrot-Appianat M., Gualillo O., Pezet A. et al. // Ibid. 1997. Vol. 11, N 8. P. 1020-1032.
9. Rucyzyн M.A., Clevenger C.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, N 10. P. 6790-6795.
10. Smirnova O., Petrashchuk O., Kelly P. // Mol. Cell. Endocrinol. 1994. Vol. 105. P. 77-81.
11. Smolen A. // Methods Neurosci. 1990. N 3. P. 208-229.

Получено 14.07.06