

АКТИВАЦИЯ КОНСТИТУТИВНОГО РЕЦЕПТОРА АНДРОСТАНОВ И ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ *ОРТО*-АМИНОАЗОТОЛУОЛА

М.А. Сметанина^{1,2}, М.Ю. Пахарукова¹, Т.И. Меркулова¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: maria.smetanina@gmail.com;

² Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

Промышленный аминозокраситель *орто*-аминозотолуол (ОАТ) широко известен как канцероген для грызунов и считается потенциальным канцерогеном для человека. Механизм действия этого соединения остается неясным. Изучена вовлеченность конститутивного рецептора андростанов (CAR) в реализацию эффектов ОАТ. С использованием mCAR-репортерной системы показано, что в клетках гепатобластомы человека (HepG2) транскрипционная активность этого рецептора увеличивалась под действием ОАТ и что этот эффект является специфическим, так как другой азокраситель, 3'-метил-4-диметил-аминозобензол (3'-MeДАБ), не активировал mCAR. С использованием мышей дикого типа (*car*^{+/+}) и CAR-нокаутных (*car*^{-/-}) мышей линии C57BL/6 было установлено CAR-зависимое увеличение экспрессии в печени под действием ОАТ следующих генов: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Мус*. Методом иммуногистохимии на срезах печени мышей выявлено, что ОАТ увеличивает пролиферацию гепатоцитов CAR-зависимым образом. Исследования показывают, что mCAR является ксеносенсором для ОАТ и по крайней мере часть эффектов этого соединения реализуется через этот ядерный рецептор.

Ключевые слова: *Орто*-аминозотолуол (ОАТ), аминозокрасители, конститутивный рецептор андростанов (CAR), гены-мишени, пролиферация гепатоцитов.

Введение

Орто-аминозотолуол (ОАТ) используется в промышленности для окрашивания масел, жиров и восков (National Toxicology Program, 2002), в производстве других красителей, а также в фармацевтике (Hazardous Substances ..., 2001). ОАТ может попадать в окружающую среду со сточными водами и при вентиляционных выбросах в процессе его производства и использования. За последние несколько десятилетий получено большое количество данных о канцерогенной активности ряда аминозокрасителей. В частности, ОАТ известен как мышинный канцероген (Каледин и др., 1978; Каледин и др., 1985). Кроме того, ОАТ был оценен Международным агентством по изучению рака (IARC) как возможный канцероген (класса 2B) для человека (International ..., 1975).

Поскольку азокрасители обладают выраженной видовой и линейной специфичностью канцерогенного действия (Каледин и др., 1990), они являются удобной моделью для изучения механизмов предрасположенности к развитию опухолей. Так, ОАТ с высокой частотой индуцирует опухоли печени у ряда линий мышей, таких, как SWA, SWR, DBA/2, A/He, DD, и слабо действует на крыс и мышей других линий (AKR и CC57Br) (Каледин, Захарова, 1984; Каледин и др., 1990). А его структурный аналог – гепатоканцерогенный для крыс 3'-метил-4-диметиламинозобензол (3'-MeДАБ) – почти не вызывает опухоли у мышей (Merkulova *et al.*, 2005). Механизмы гепатоканцерогенного действия этих соединений все еще остаются неясными. Известно, что при попадании в организм они активируют систему биотрансформации в печени, а именно: ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков (цитохромы

P450), II фазы (такие, как УДФ-глюкуронозилтрансферазы и сульфотрансферазы) и транспортеры ксенобиотиков (Mikhailova *et al.*, 2005). Экспрессия печеночных ферментов биотрансформации и транспортеров регулируется ксенобиотик-чувствительными транскрипционными факторами: Ah рецептором (Aryl-hydrocarbon receptor, Ah-R), X рецептором прегнанов (Pregnane X Receptor, PXR), конститутивным рецептором андростанов (Constitutive Androstane Receptor, CAR) и др. (Pascussi *et al.*, 2008).

Ранее нами была показана видоспецифическая активация CAR под действием ОАТ у мышей и под действием 3'-МеДАБ – у крыс (Пахарукова и др., 2007). CAR (NR1H3) является членом суперсемейства ядерных рецепторов гормонов и известен как «ксеносенсор» (Choi *et al.*, 1997). Активность CAR может модулироваться широким кругом структурно различных веществ (Chang, Waxman, 2006), воздействие которых на данный рецептор может отличаться между видами (Moore *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2002). Наши исследования показали также, что ОАТ и 3'-МеДАБ способны конкурировать с известным лигандом CAR – андростенолом за связывание с белками цитозоля клеток печени мышей и крыс соответственно (Пахарукова и др., 2007).

В связи с полученными результатами большой интерес представляет изучение влияния ОАТ и 3'-МеДАБ на трансактиваторные свойства CAR и экспрессию его генов-мишеней у мышей и крыс. В данной работе мы изучили влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на активность CAR мыши (mCAR) в его репортерной системе, их влияние на экспрессию ряда генов-мишеней CAR в печени мышей дикого типа (*car*^{+/+}) и CAR-нокаутных мышей (*car*^{-/-}), а также исследовали пролиферацию гепатоцитов через длительные сроки после введения ОАТ этим животным.

Материалы и методы

Реагенты

Использовали *Орто*-аминоазотолуол (ОАТ) и 1,4-бис-[2-(3,5-дихлоропиридилокси)]бензол (ТСРОВОР) фирмы Sigma-Aldrich Inc. (США); 3'-Метил-4-диметиламиноазобензол – фирмы ABCR GmbH & Co. KG (Германия); 5 α -Андростан-3 α -ол – фирмы Steraloids Inc. (США).

Трансактивационный анализ

Плазмида, экспрессирующая CAR мыши (pCMX-mCAR) (Forman *et al.*, 1998), контрольная плазмида pCMX и репортерная плазмида LXRE-TK-Luc (Tzamelis *et al.*, 2000) были любезно предоставлены доктором Дэвидом Муром (David D. Moore, Baylor College of Medicine, Хьюстон, США). Плазмида pCMX- β -галактозидаза синтезирована в Promega (США). Трансактивационный анализ проводили согласно протоколу (Hernandez *et al.*, 2007). Клетки гепатобластомы человека (HepG2) (American Type Culture Collection, Rockville MD) культивировали в атмосфере 5 %-го углекислого газа при 37 °C в культуральной среде DMEM, дополненной 10 %-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и 1 %-й смесью пенициллин/стрептомицин (50 ед./мл). Клетки высевали в 24-луночные планшеты (около 100000 на лунку) за 24 ч до трансфекции. 200 нг pCMX-mCAR либо pCMX трансфицировали в клетки вместе с 200 нг LXRE-TK-Luc и 100 нг pCMX- β -галактозидазы, используя липофектамин («lipofectamine plus» reagent, GIBCO BRL). Спустя 12 ч клетки промывали D-PBS (GIBCO®/Invitrogen) и добавляли культуральную среду, содержащую ОАТ или 3'-МеДАБ в концентрациях от 0,5 до 200 мкМ или 500 нМ ТСРОВОР в комбинации с 10 мкМ андростенолом (обратным агонистом CAR, подавляющим конститутивную активность рецептора и увеличивающим чувствительность анализа (Forman *et al.*, 1998)). Все вещества растворяли в ДМСО, конечная концентрация которого в среде составляла 0,1 %. В контроле в среду вносили ДМСО до концентрации 0,1 %. После инкубации в течение 12 ч клетки лизировали и определяли активность огненной люциферазы и β -галактозидазы при помощи Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, США) согласно инструкциям производителя на люминометре (MLX Microliter® Plate Luminometer, «DYNEX Technologies», США). Активность люциферазы нормализовали на активность β -галактозидазы.

Животные

В работе были использованы мыши-самцы дикого типа (*car*^{+/+}) линии C57BL/6 и CAR-но-

каутные мыши (*car^{-/-}*) той же линии. Мышей разводили в виварии для трансгенных животных Бэйлор колледжа медицины (Baylor College of Medicine, Хьюстон, США) в свободной от патогенов среде при 12-часовом темновом/световом цикле при свободном доступе к воде и пище. Все эксперименты проводили согласно протоколу об использовании и охране животных данного Института.

Для анализа экспрессии генов 8–10-недельным CAR-нокаутным мышам и мышам дикого типа внутрибрюшинно вводили ОАТ или 3'-МеДАБ (225 мг на 1 кг массы тела). Контрольным животным вводили растворитель (кукурузное масло). ТСРОВОР (3 мг на 1 кг массы тела) был использован в качестве положительного и отрицательного контроля для мышей дикого типа и CAR-нокаутных мышей соответственно. Животных умерщвляли цервикальной дислокацией спустя 3 ч (в случае выделения РНК) или 6 ч (в случае выделения белков) после введения исследуемых веществ. Печень изымали, разрезали на несколько кусков и хранили при -80°C до использования.

Для изучения пролиферации гепатоцитов 13-дневным CAR-нокаутным мышатам, а также мышатам дикого типа внутрибрюшинно вводили ОАТ (225 мг на 1 кг массы тела) или кукурузное масло в качестве контроля. Через 7 месяцев после обработки мышам за 2 ч до забоя вводили раствор бромодезоксиуридина (BrdU, 50 мг на 1 кг массы тела). После забоя мышей и их печени взвешивали. Печеночный индекс вычисляли как отношение массы печени к массе тела мыши. Срезы свежей печени использовали для иммуногистохимического анализа.

ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли с помощью набора TRIzol (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Целостность РНК подтверждали визуализацией интактных 18S и 28S рРНК при УФ излучении. Концентрацию РНК в каждом образце измеряли при длине волны 260 нм. Синтез кДНК проводили при помощи набора SuperScriptTM III RT (Invitrogen, США). Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием машины ABI

PRISM 7700 Sequence Detection SystemTM (Applied Biosystems Inc., США) и наборов SYBR Green либо Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Праймеры (и пробы) подбирали с помощью программы Primer Express версии 3.0 (Applied Biosystems, США), синтез олигонуклеотидов осуществлен в Sigma-Genosys (США). Последовательности праймеров доступны по востребованию. Значение экспрессии изучаемого гена для каждого образца (представленного трипликатом) было нормализовано на соответствующее ему значение экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. За основу для расчетов был взят метод стандартных кривых (Bookout *et al.*, 2006).

Вестерн-блот анализ

Замороженные кусочки печени разрушали ультразвуком в охлажденном на льду лизирующем буфере (25 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ ортованадат натрия, 10 мМ пиродифосфат натрия, 100 мМ фторид натрия, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ ЭГТА, и 1 мМ фенил-метил-сульфонил фторид). Аликвоты белков (по 30 мкг) фракционировали в ступенчатом ПААГ (NuPAGE[®] Novex[®] 10 % Bis-Tris Mini Gel, Invitrogen, США) и переносили на мембрану Hybond-P PVDF Transfer Membrane (Amersham Biosciences, США) при помощи прибора iBlotTM Dry-Blotting System (Invitrogen, США). Мембрану инкубировали с первичными кроличьими антителами к Сур2b10 и мышинными антителами к с-Мус в разведении 1 : 450 и 1 : 500 соответственно в буфере TBS-T (20 мМ трис-НСl, рН = 7,6, 137 мМ NaCl, 0,1 % – 0,5 % Tween20). Кроличьи антитела к β -актину использовали в качестве контроля нанесения. После инкубации мембраны отмывали и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разбавлении 1 : 5000 в буфере TBS-T. Снова повторяли отмывку и визуализовали с использованием реагентов набора SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США) на проявочной машине Kodak X-OMAT 2000 processor (Kodak Inc., США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы LabWorks image analysis software (UVP laboratory products, США).

Иммуногистохимический анализ

В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела к бромдезоксипуридину (BrdU) (Dako North America Inc., США). В качестве вторичных антител были использованы биотинилированные лошадиные антитела к IgG (H+L) мыши (Vector Laboratories Inc., США). Залитые парафином срезы печени (толщиной 5 мкм) депарафинизировали и дегидратировали. Для окрашивания BrdU-положительных гепатоцитов использовали Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., США), следуя инструкциям производителя. Иммуногистохимическое окрашивание визуализировали при 20× увеличении светового микроскопа Nikon Eclipse E400, оборудованного цветной видеокамерой Sony ExWaveHAD 3CCD. Индекс включения бромдезоксипуридина выражает соотношение BrdU-положительных ядер к 100 ядрам.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в пакете программ Microsoft Office Excel 2003 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

ОАТ специфически усиливает трансактиваторную способность mCAR

Для того чтобы установить, активирует ли ОАТ mCAR *in vitro*, клетки HepG2 котрансфицировали плазмидой, экспрессирующей полноразмерный CAR мыши (mCAR) и CAR-репортерной плазмидой, экспрессирующей ген люциферазы под контролем CAR-чувствительного элемента. Как показано на рис. 1, а, ОАТ активировал mCAR уже при концентрации 0,5 мкМ. С возрастанием концентрации ОАТ активность mCAR постепенно увеличивалась. При концентрации 200 мкМ наблюдалась максимальная активность рецептора. В качестве положительного контроля был использован известный агонист и лиганд CAR – ТСРОВОР в дозе 500 нМ. Для достижения эффекта, аналогичного эффекту ТСРОВОР, потребовалась концентрация ОАТ в 200 раз большая (рис. 1, а).

При этой концентрации транскрипционная активность mCAR увеличивалась в 4,4 раза по сравнению с контролем (рис. 1, а, б). Однако структурный аналог ОАТ, но неканцерогенный для мышей 3'-МеДАБ не активировал mCAR ни при 100, ни при 200 мкМ (рис. 1, б). Таким образом, наши эксперименты демонстрируют, что ОАТ является специфичным активатором mCAR, хотя и менее сильным, чем ТСРОВОР.

ОАТ влияет на уровень мРНК ряда генов-мишеней CAR в печени мышей

Известно, что CAR регулирует многие гены метаболизма ксенобиотиков, а также ряда генов пролиферации и апоптоза. Методом ПЦР в реальном времени мы оценили изменение экспрессии под воздействием ОАТ следующих генов: I фазы метаболизма ксенобиотиков

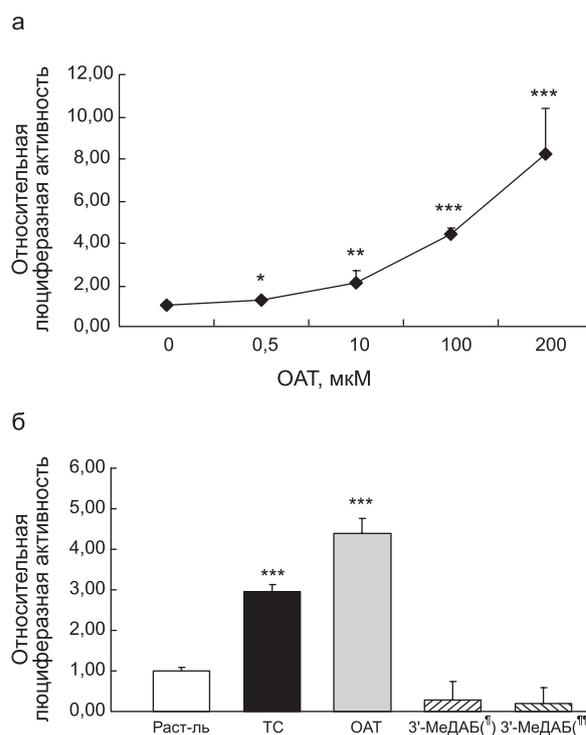


Рис. 1. ОАТ активирует mCAR в клетках HepG2.

а – дозозависимая активация mCAR под действием ОАТ; б – эффекты ОАТ (100 мкМ), ТСРОВОР (ТС, 0,5 мкМ) и 3'-МеДАБ (100⁽¹⁾ или 200⁽²⁾ мкМ) на трансактивацию mCAR. Приведены результаты одного из трех независимых экспериментов, в каждом из которых $n = 4$ для группы клеток, обрабатываемых исследуемым веществом. Данные, помеченные звездочками, указывают на достоверную разницу по сравнению с контролем (растворителем) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, согласно t-критерию Стьюдента).

(*Cyp2b10*, *Cyp2c29* и *Cyp3a11*); II фазы метаболизма ксенобиотиков (*Ugt1a1* и *NADPH CYP450 oxidoreductase*); транспорта ксенобиотиков (*Mrp2* и *Mrp4*); регуляции апоптоза (*Mdm2*), клеточного цикла (*Cyclin D1*) и пролиферации (*c-Myc*). Все эти гены являются генами-мишенями CAR (Honkakoski *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Smirlis *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002; Maglich *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002; Ledda-Columbano *et al.*, 2003; Assem *et al.*, 2004; Columbano *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2006; Urquhart *et al.*, 2007; Blanco-Bose *et al.*, 2008;

Buckley, Klaassen, 2009; Ross *et al.*, 2009). Для 7 из 10 изученных нами генов была показана CAR-зависимая индукция под действием ОАТ. Радикальное повышение экспрессии под влиянием ОАТ было зарегистрировано для гена *Cyp2b10* – в 42,3 раза (рис. 2, а). 3'-МеДАБ повышал уровень мРНК этого гена лишь в 3,8 раза. На CAR-нокаутных мышах действия ОАТ на экспрессию мРНК *Cyp2b10* не наблюдалось (рис. 2, б), а 3'-МеДАБ повышал ее экспрессию почти в 7 раз. Следовательно, ОАТ повышает экспрессию мРНК *Cyp2b10* через CAR, а действие 3'-МеДАБ на экспрессию этого гена

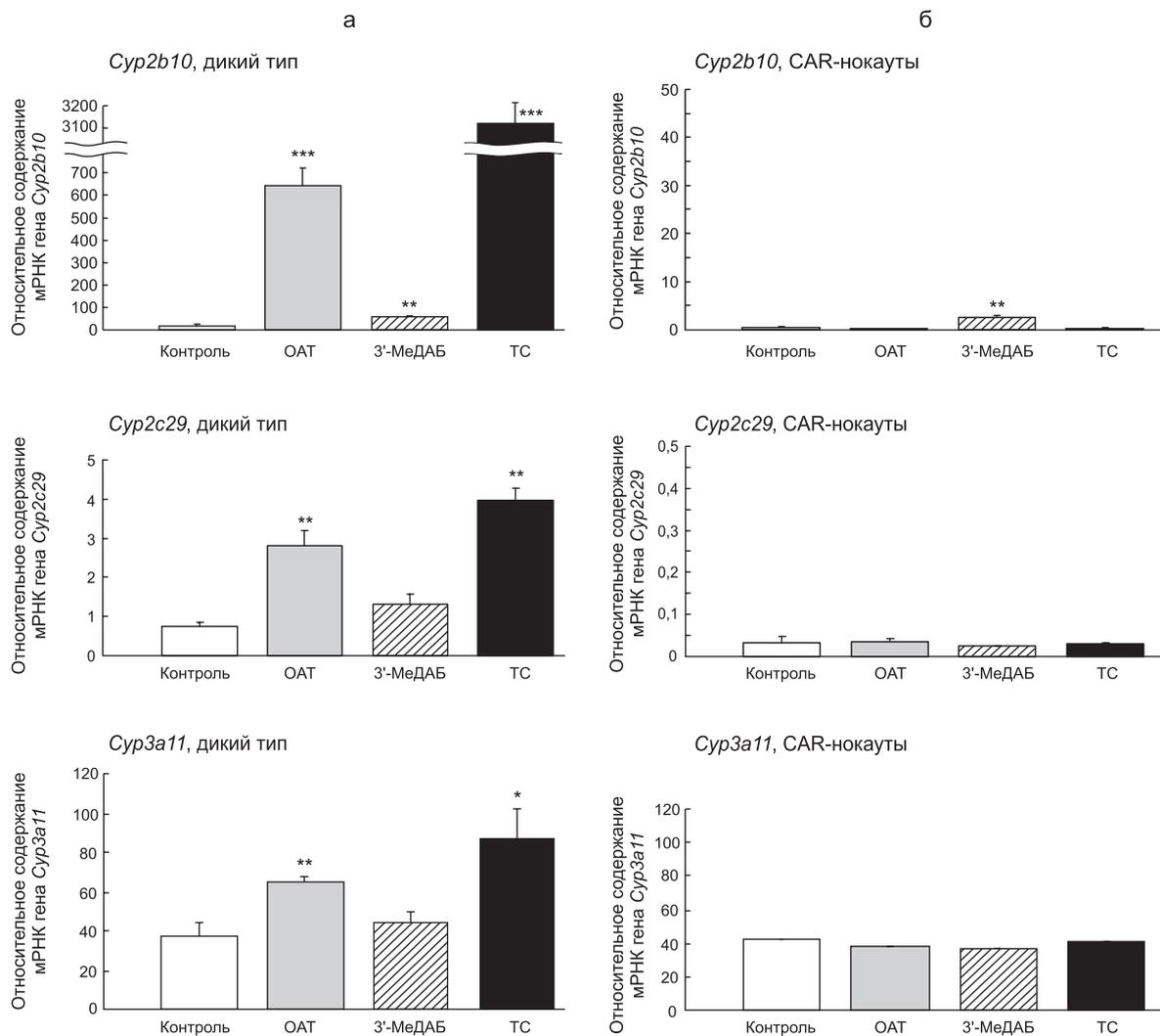


Рис. 2. Влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на уровень мРНК генов *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11* в печени мышей дикого типа (а) и CAR-нокаутных мышей (б).

Здесь и на рис. 3: измерения уровней мРНК соответствующих генов проводили методом ПЦР в реальном времени. В качестве внутреннего контроля взят ген домашнего хозяйства GAPDH. Столбцы на диаграммах соответствуют средним значениям по группе из 3 животных \pm CO, образец от каждого животного представлен в трех повторах. * $p < 0,05$, ** $p < ,01$, *** $p < 0,001$.

осуществляется CAR-независимым образом. Для ряда генов уровень мРНК после введения ОАТ мышам дикого типа возрастал существенно меньше: *Cyp2c29* (4,3 раза), *Cyp3a11* (1,75 раза), *Ugt1a1* (1,42 раза), *Mrp4* (1,68 раза) и *Mrp2* (2,22 раза), *c-Myc* (1,62 раза) (рис. 2, 3, а). На CAR-нокаутных мышах индукции этих генов в ответ на ОАТ не было обнаружено (рис. 2, 3, б). В отличие от ОАТ 3'-МеДАБ не влиял на экс-

прессию всех этих генов. Остальные гены (*NADPH CYP450 oxidoreductase*, *Mdm2* и *Cyclin D1*) не отреагировали на воздействие ни ОАТ, ни 3'-МеДАБ (данные не приведены).

Таким образом, наши данные демонстрируют, что индукция транскрипции *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Myc* под воздействием ОАТ осуществляется через CAR.

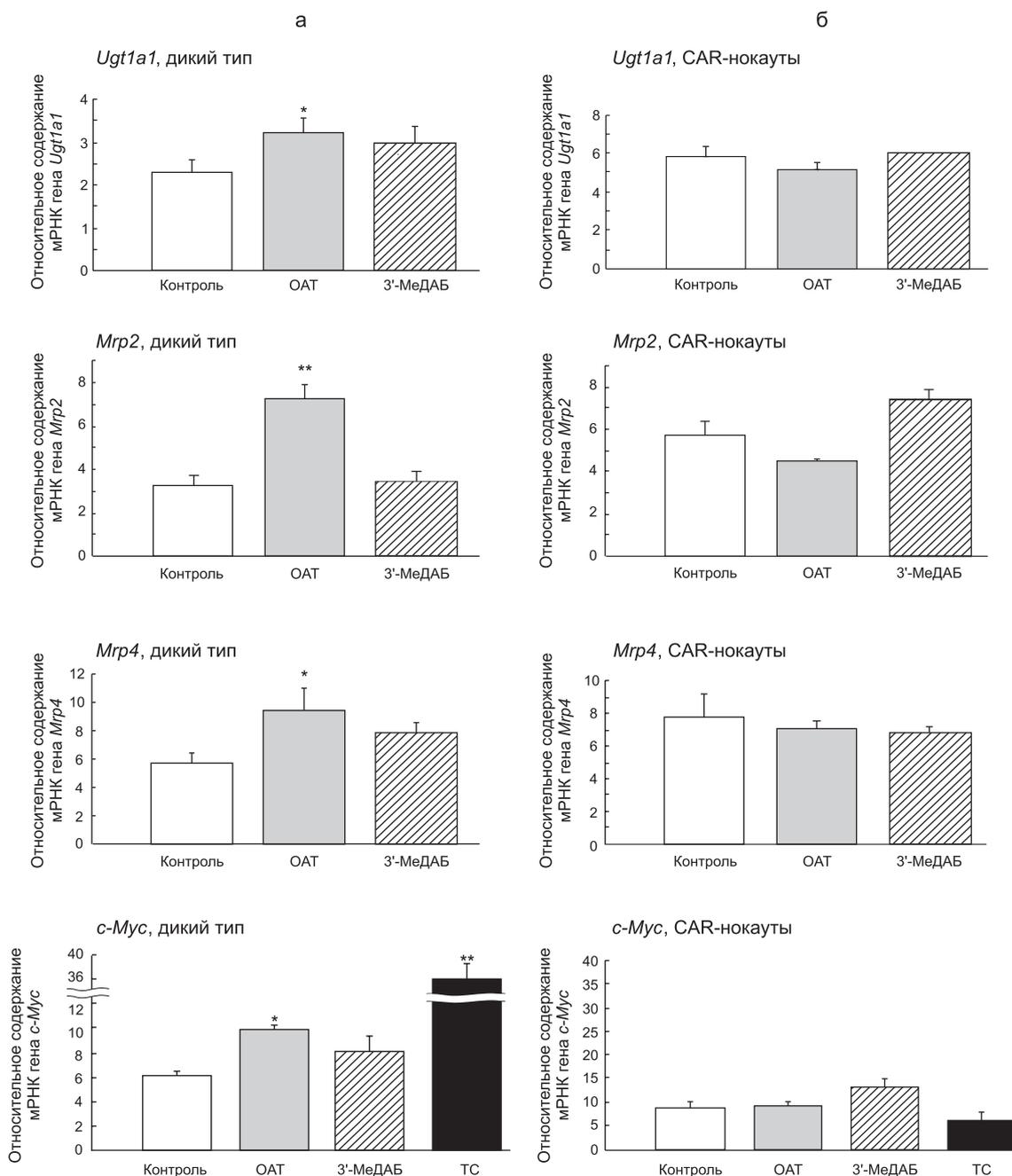


Рис. 3. Влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на уровень мРНК генов *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Myc* в печени мышей дикого типа (а) и CAR-нокаутных мышей (б).

ОАТ влияет на уровень белков *Cyp2b10* и *c-Myc* в печени мышей *CAR*-зависимым образом

Для генов *Cyp2b10* (как общеизвестного биомаркера активации *CAR*) и *c-Myc* (как потенциального звена в пролиферативных эффектах ОАТ, опосредуемых *CAR*) было проведено исследование изменения содержания их белковых продуктов в ответ на ОАТ в печени мышей дикого типа и *CAR*-нокаутных мышей. На рис. 4 представлены результаты Вестерн-блот анализа белков лизатов клеток печени контрольных и обработанных ОАТ животных. Из рис. 4, а видно, что уровень белков *Cyp2b10* и *c-Myc* в печени мышей дикого типа под действием ОАТ значительно увеличивался по сравнению с контролем (в 18 и 3 раза соответственно, согласно данным денситометрии). Таким образом, уровень индукции *Cyp2b10* и *c-Myc* под влиянием ОАТ согласуется с уровнем индукции соответствующих транскриптов (рис. 2, а и 3, а). В печени *CAR*-нокаутных мышей (рис. 4, б) под действием ОАТ не было обнаружено никаких изменений в содержании белков *Cyp2b10* и *c-Myc*, как и в случае содержания мРНК этих генов (рис. 2, б и 3, б). Полученные данные демонстрируют, что индукция *Cyp2b10* и *c-Myc* под влиянием ОАТ как на уровне мРНК, так и на уровне белка, является *CAR*-зависимой.

CAR вовлечен в пролиферацию гепатоцитов, индуцированную ОАТ

Пролиферация клеток является необходимым процессом в развитии химически индуцированных опухолей. Хорошо известным регуляторным

белком, задействованным в процессе пролиферации, является онкопротеин *c-Myc* (Dose, Gounari, 2009). Мы показали *CAR*-зависимое увеличение уровней мРНК и белка *c-Myc* в печени в ответ на гепатоканцерогенный для мышей ОАТ. Это дает возможность предполагать, что *CAR* может быть вовлечен в ОАТ-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Поэтому мы исследовали влияние ОАТ на пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа по сравнению с *CAR*-нокаутными мышами. Результаты, представленные на рис. 5, демонстрируют, что у мышей дикого типа ОАТ увеличивает количество гепатоцитов, вошедших в S-фазу, почти в 7 раз. У *CAR*-нокаутных мышей под воздействием ОАТ изменений в пролиферативном статусе гепатоцитов не наблюдали. Включение BrdU в клетки печени *CAR*-нокаутных мышей, обработанных ОАТ, было сравнимо с таковым у необработанных мышей дикого типа. Таким образом, мы показали, что однократное введение ОАТ индуцирует пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа, но не у *CAR*-нокаутных мышей, и, следовательно, конститутивный рецептор андростанов ответствен за этот процесс. Также мы наблюдали достоверное, хотя и небольшое, увеличение печеночного индекса (отношение массы печени к массе тела) под действием ОАТ у мышей дикого типа в сравнении с *CAR*-нокаутными мышами. Кроме того, была получена одна опухоль у мыши дикого типа, у *CAR* нокаутных мышей опухолей не обнаружено.

Обсуждение

До недавнего времени работы, посвященные изучению механизмов действия азокрасителей,

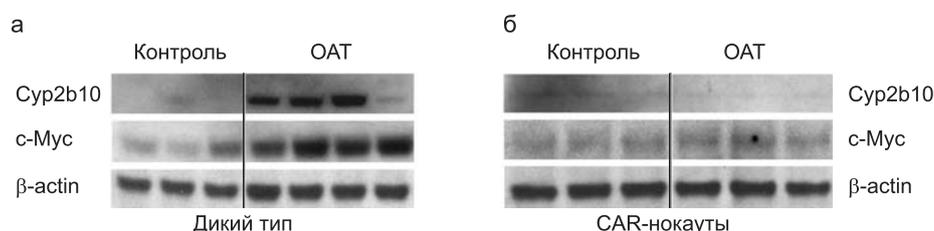


Рис. 4. Влияние ОАТ на уровень белков *Cyp2b10* и *c-Myc* в печени мышей дикого типа (а) и *CAR*-нокаутных мышей (б).

ОАТ вводили животным внутрибрюшинно за 6 ч до забоя. Вестерн-блот анализ белков лизатов клеток печени выполнен с помощью антител к *Cyp2b10*, *c-Myc* и β -актину. Каждая дорожка соответствует образцу из печени одной мыши.



Показатели	Дикий тип		CAR-нокауты	
	кукурузное масло	ОАТ	кукурузное масло	ОАТ
Печеночный индекс	0,0461 ± 0,0028 (3)	0,0476 ± 0,0032 (9)	0,0390 ± 0,0010 (3)	0,0441 ± 0,0027 (9)*
BrdU+ клетки, %	2,3428 ± 1,3831 (3)	16,0105 ± 8,4626 (9)#	1,5588 ± 0,3401 (3)	1,9628 ± 0,4743 (9)**

Рис. 5. Разница в пролиферации гепатоцитов между мышами дикого типа и CAR-нокаутными мышами в ответ на ОАТ.

Включение BrdU оценено методом иммуногистохимического анализа срезов печени мышей. Печеночные индексы (отношение массы печени к массе тела) и BrdU-положительные клетки (%) измерены у 9 или 3 животных (числа указаны в скобках) на группу ± СО. Статистический анализ выполнен с помощью t-критерия Стьюдента (CAR-нокауты в сравнении с диким типом после введения одинакового раствора: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ОАТ против кукурузного масла: # $p < 0,05$).

были сфокусированы на активации Ah-рецептора (AhR) этими соединениями (Beischlag *et al.*, 2008). Като и др. (Kato *et al.*, 2002) показали, что более половины из 35 изученных ими азокрасителей активировали AhR. Также было показано, что несколько азокрасителей конкурировали с [3H]тетрахлородибензо-*p*-диоксин (ТХДД) за связывание с AhR, причем наиболее эффективными в этом отношении оказались ОАТ и 3-метокси-4-аминоазобензол (Cheung *et al.*, 1994). Другие рецепторы ксенобиотиков, которые также могли бы быть потенциальными ксеносенсорами аминокрасителей, до последнего времени оставались вне поля зрения исследователей. Недавно в нашей лаборатории было показано, что ОАТ увеличивал ДНК-связывающую активность CAR и конкурировал с природным лигандом mCAR андростенолом за

связывание с белками цитозоля клеток печени мышей (Пахарукова и др., 2007). Мы предполагаем, что ОАТ может быть либо лигандом mCAR, либо непрямым агонистом, действуя на этот рецептор опосредованно.

Известно, что активность mCAR может быть модулирована широким кругом структурно различных веществ (Chang, Waxman, 2006). Среди таких веществ есть агонисты, которые могут быть как лигандами этого рецептора (ТСРОВОР (Tzamelis *et al.*, 2000), – меклизин (Huang *et al.*, 2004), клотримазол (Moore *et al.*, 2000; Makinen *et al.*, 2003)), так и непрямыми активаторами (фенобарбитал (Honkakoski *et al.*, 1998; Kawamoto *et al.*, 1999), ацетаминофен (Zhang *et al.*, 2002), фенитоин (Jackson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), билирубин (Huang *et al.*, 2003); нонилфенол (Hernandez *et al.*, 2007) и др.). Среди веществ,

которые изменяют активность CAR, существуют также антагонисты. Два андростановых метаболита, 5 α -андрост-16-ен-3 α -ол (андростенон) и 5 α -андростан-3 α -ол (андростанол), были идентифицированы как лиганды CAR, которые подавляют его конститутивную активность (Fogman *et al.*, 1998). Подобным образом прогестерон и тестостерон подавляют конститутивную активность CAR, но при гораздо больших концентрациях (Swales, Negishi, 2004).

Выявление новых веществ, способных влиять на активность CAR и изменять экспрессию его специфических генов-мишеней, позволит лучше понять природу ответа на действие ксенобиотиков. До нас роль CAR как ксеносенсора в опосредовании эффектов ОАТ никто не изучал. Наши предыдущие исследования указывают на возможную вовлеченность CAR в механизм действия этого соединения. Данная работа демонстрирует, что конститутивный рецептор андростанов действительно участвует в реализации эффектов ОАТ. Во-первых, эксперименты по трансфекции CAR показали, что его транскрипционная активность увеличивается под действием ОАТ специфическим образом, так как другой азокраситель, 3'-MeДАБ, не активировал mCAR. Во-вторых, наши результаты показали, что ОАТ индуцирует экспрессию ряда генов-мишеней CAR: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Мус*. Мы показали индукцию экспрессии этих генов в ответ на ОАТ у мышей дикого типа, но не у CAR-нокаутных мышей. Однако ряд выбранных нами генов-мишеней CAR (такие, как *NADPH CYP450 oxidoreductase*, *Mdm2* и *Cyclin D1*) не отреагировали на воздействие ОАТ либо их индукция была CAR-независимая. Этот феномен может быть связан с тем, что конформация mCAR после взаимодействия с конкретным соединением становится таковой, что данный рецептор является транскрипционным фактором лишь для определенного спектра генов. Похожие различия в ответе генов-мишеней CAR на разные индукторы этого рецептора наблюдали и другие ученые. Например, ТСРОВОР строго индуцирует экспрессию как *Cyp2b10*, так и *Cyp3a11*, а хлорпромазин – только первого (Wei *et al.*, 2002). Подобным образом фенобарбитал индуцирует экспрессию *Cyp2f2*, тогда как ТСРОВОР – нет (Braeuning *et al.*, 2009).

Помимо детоксификации, ядерный рецептор CAR участвует в регуляции многих других процессов в клетках: гомеостазе стероидных и тиреоидных гормонов (Goodwin, Moore, 2004; Masi *et al.*, 2009), гомеостазе желчных кислот (Lu *et al.*, 2000; Pascussi *et al.*, 2008), метаболизме билирубина и биосинтезе гема (Masi *et al.*, 2009), энергетическом метаболизме (влияя на метаболизм жирных кислот, липидов и глюкозы) (Wada *et al.*, 2009), сигнальной трансдукции (Swales, Negishi, 2004), и др. Показана его связь с процессами пролиферации и апоптоза в печени (Ledda-Columbano *et al.*, 2003; Beilke *et al.*, 2009), а также участие в процессах промоции химически индуцированных опухолей печени (Yamamoto *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2009).

Опухолообразующее действие гепатоканцерогенного ОАТ может быть также связано с активацией CAR в печени мышей. Поэтому можно предполагать, что потенциально важным интермедиатором в этом процессе может быть ген-мишень CAR – *c-Мус*. Белковый продукт этого гена является транскрипционным фактором, который регулирует различные процессы в клетках: клеточный рост и пролиферацию, прогрессию клеточного цикла, транскрипцию, дифференцировку, апоптоз и подвижность клеток (Vita, Henriksson, 2006). Одной из ключевых биологических функций *c-Мус* является его способность промотировать прогрессию клеточного цикла (переход из фазы G₁ в S) посредством активации и репрессии генов (Pelengaris, Khan, 2003). Было показано, что сверхэкспрессия *c-Мус* в печени промотирует пролиферацию гепатоцитов, что в конечном итоге может привести к раку печени (Beer *et al.*, 2004; Blanco-Bose *et al.*, 2008). Мы показали, что ОАТ увеличивает экспрессию *c-Мус* CAR-зависимым образом. Кроме того, методом иммуногистохимии на срезах печени мышей мы показали, что ОАТ увеличивает пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа, в то время как у CAR-нокаутных мышей достоверного увеличения пролиферации под влиянием этого вещества не наблюдали. Поскольку данные по увеличению экспрессии *c-Мус* пролиферации гепатоцитов в ответ на ОАТ согласуются, это дает основание предполагать, что *c-Мус* вовлечен в ОАТ-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Таким образом, наши исследова-

ния помогают глубже понять механизм действия ОАТ и получить более полное представление о роли mCAR в этом механизме.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Фулбрайт (№ 15073775). Выражаем благодарность доктору Дэвиду Муру (David D. Moore) из Бэйлор колледжа медицины (Baylor College of Medicine, Хьюстон, США) за предоставленные ресурсы и помощь в работе.

Литература

- Каледин В.И., Алексеева Г.В., Волкова А.И. Канцерогенность орто-аминоазотолуола для кишечника мышей // Бюлл. эксперим. биол. медицины. 1978. Т. 86. Вып. 10. С. 476–477.
- Каледин В.И., Захарова Н.П. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных / Под ред. Е.В. Груntenко. Новосибирск: ИЦиГ, 1984. С. 146–185.
- Каледин В.И., Серова И.А., Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А. Соотношение частот спонтанных и индуцированных орто-аминоазотолуолом опухолей у мышей // Эксперим. онкология. 1985. Т. 7. Вып. 6. С. 23–26.
- Каледин В.И., Серова И.А., Семенова Л.А. Различная предрасположенность к развитию спонтанных и индуцированных опухолей печени у мышей различных линий и их гибридов // Эксперим. онкология. 1990. Т. 12. С. 28–30.
- Пахарукова М.Ю., Сметанина М.А., Каледин В.И. и др. Активация конститутивного рецептора андростанов (CAR) под действием гепатоканцерогенных азокрасителей в печени мышей и крыс // Бюлл. эксперим. биол. медицины. 2007. Т. 144. Вып. 3. С. 338–341.
- Assem M., Schuetz E.G., Leggas M. *et al.* Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 21. P. 22250–22257.
- Beer S., Zetterberg A., Ihrie R.A. *et al.* Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 11. P. e332.
- Beilke L.D., Aleksunes L.M., Olson E.R. *et al.* Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice // *Toxicol. Lett.* 2009. V. 188. № 1. P. 38–44.
- Beischlag T.V., Morales J.L., Hollingshead B.D., Perdew G.H. The Aryl Hydrocarbon Receptor complex and the control of gene expression // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exptl.* 2008. V. 18. № 3. P. 207–250.
- Blanco-Bose W.E., Murphy M.J., Ehninger A. *et al.* C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia // *Hepatology.* 2008. V. 48. № 4. P. 1302–1311.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J. Highthroughput real-time quantitative reverse transcription PCR // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006. C. 15. U. 15.8.
- Braeuning A., Sanna R., Huelsken J., Schwarz M. Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of *Cttnb1* // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 5. P. 1138–1145.
- Buckley D.B., Klaassen C.D. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 4. P. 847–856.
- Chang T.K., Waxman D.J. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) // *Drug. Metab. Rev.* 2006. V. 38. № 1/2. P. 51–73.
- Cheung Y.L., Puddicombe S.M., Gray T.J., Ioannides C. Mutagenicity and CYP1A induction by azobenzenes correlates with their carcinogenicity // *Carcinogenesis.* 1994. V. 15. № 6. P. 1257–1263.
- Choi H., Chung M., Tzamelis I. *et al.* Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 38. P. 23565–23571.
- Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Pibiri M. *et al.* Gadd45beta is induced through a CAR-dependent, TNF-independent pathway in murine liver hyperplasia // *Hepatology.* 2005. V. 42. № 5. P. 1118–1126.
- Costa R.H., Kalinichenko V.V., Tan Y., Wang I.C. The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation // *Hepatology.* 2005. V. 42. № 5. P. 1004–1008.
- Dose M., Gounari F. The My(c)stery of iNKT cell ontogeny // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 19. P. 3082–3085.
- Forman B.M., Tzamelis I., Choi H.S. *et al.* Androstanemetabolites bind to and deactivate the nuclear receptor-CAR // *Nature.* 1998. V. 395. № 6702. P. 612–615.
- Goodwin B., Moore L.B., Stoltz C.M. *et al.* Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor // *Mol. Pharmacol.* 2001. V. 60. № 3. P. 427–431.
- Goodwin B., Moore J.T. CAR: detailing new models // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. V. 25. № 8. P. 437–441.
- Hazardous Substances Data Base. National Library of Medicine. 2001. available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.

- Hernandez J.P., Chapman L.M., Kretschmer X.C., Baldwin W.S. Gender-specific induction of cytochrome P450s in nonylphenol-treated FVB/NJ mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006. V. 216. № 2. P. 186–196.
- Hernandez J.P., Huang W., Chapman L.M. *et al.* The environmental estrogen, nonylphenol, activates the Constitutive Androstane Receptor // *Toxicol. Sci.* 2007. V. 98. № 2. P. 416–426.
- Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T., Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. № 10. P. 5652–5658.
- Huang W., Zhang J., Chua S. *et al.* Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 4156–4161.
- Huang W., Zhang J., Washington M. *et al.* Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor // *Mol. Endocrinol.* 2005. V. 19. № 6. P. 1646–1653.
- Huang W., Zhang J., Wei P. *et al.* Meclizine is an agonist ligand for mouse Constitutive Androstane Receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR // *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. № 10. P. 2402–2408.
- International Agency for Research on Cancer. Some Aromatic Azo Compounds // *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Lyon, France, 1975.* V. 8. P. 357.
- Jackson J.P., Ferguson S.S., Moore R. *et al.* The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29 // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 6. P. 1397–1404.
- Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T. *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor and constitutive androstane receptor // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 2908–2915.
- Kato T.A., Matsuda T., Matsui S. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor by methyl yellow and related congeners: structure-activity relationships in halogenated derivatives // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. V. 25. № 4. P. 466–471.
- Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I. *et al.* Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. № 9. P. 6318–6322.
- Ledda-Columbano G.M., Pibiri M., Concas D. *et al.* Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP // *Carcinogenesis.* 2003. V. 24. № 6. P. 1059–1065.
- Lu T.T., Makishima M., Repa J.J. *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. № 3. P. 507–515.
- Maglich J.M., Stoltz C.M., Goodwin B. *et al.* Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 62. P. 638–646.
- Makinen J., Reinisalo M., Niemi K. *et al.* Dual action of estrogens on the mouse constitutive androstane receptor // *Biochem. J.* 2003. V. 376. Pt 2. P. 465–472.
- Masi A., Marinis E., Ascenzi P., Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: molecular, functional, and biomedical aspects // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 5. P. 297–343.
- Merkulova T.I., Kropachev K.Y., Timofeeva O.A. *et al.* Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver // *Mol. Carcinog.* 2005. V. 44. № 4. P. 223–232.
- Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P. *et al.* o-Aminoazotoluene does induce the enzymes of its own mutagenic activation in mouse liver // *Toxicology.* 2005. V. 211. № 1/2. P. 132–138.
- Moore L.B., Maglich J.M., McKee D.D. *et al.* Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors // *Mol. Endocrinol.* 2002. V. 16. № 5. P. 977–986.
- Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A. *et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 15122–15127.
- National toxicology program. o-Aminoazotoluene // 11th Rep. on Carcinogenesis. 2002. V. 10. № 12. P. 3.
- Pascussi J., Gerbal-Chaloin S., Duret C. *et al.* The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 48. P. 1–32.
- Pelengaris S., Khan M. The many faces of c-MYC // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 416. № 2. P. 129–136.
- Ross P.K., Woods C.G., Bradford B.U. *et al.* Time-course comparison of xenobiotic activators of CAR and PPAR α in mouse liver // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 235. № 2. P. 199–207.
- Smirlis D., Muangmoonchai R., Edwards M. *et al.* Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 16. P. 12822–12826.
- Swales K., Negishi M. CAR, driving into the future // *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. № 7. P. 1589–1598.
- Tzamelis I., Pissios P., Schuetz E.G., Moore D.D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 9. P. 2951–2958.
- Urquhart B.L., Tirona R.G., Kim R.B. Nuclear receptors and the regulation of drug-Metabolizing enzymes

- and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs // *J. Clin. Pharmacol.* 2007. V. 47. № 5. P. 566–578.
- Vita M., Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2006. V. 16. № 4. P. 318–330.
- Wada T., Gao J., Xie W. PXR and CAR in energy metabolism // *Trends Endocrinol. Metab.* 2009. V. 20. № 6. P. 273–279.
- Wang H., Faucette S., Moore R. *et al.* Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 28. P. 29295–29301.
- Wei P., Zhang J., Dowhan D.H. *et al.* Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response // *Pharmacogenomics J.* 2002. V. 2. № 2. P. 117–126.
- Xie W., Barwick J.L., Simon C.M. *et al.* Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 3014–3023.
- Yamamoto Y., Moore R., Goldsworthy T.L. *et al.* The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 20. P. 7197–7200.
- Zhang J., Huang W., Chua S. *et al.* Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR // *Science.* 2002. V. 298. № 5592. P. 422–424.

ORTHO-AMINOAZOTOLUENE ACTIVATES THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR AND INCREASES THE EXPRESSION OF ITS TARGET GENES IN THE MOUSE LIVER

M.A. Smetanina^{1,2}, M.Y. Pakharukova¹, T.I. Merkulova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: maria.smetanina@gmail.com;

² Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

Summary

The industrial azo dye *ortho*-aminoazotoluene (OAT) is well known as a rodent carcinogen and as a putative human carcinogen. The pathway of its action still remains unclear. We examined the role of the Constitutive Androstane Receptor (CAR) in the mediation of OAT effects. Using the mCAR reporter system in HepG2 cells, we showed that OAT increased the transcriptional activity of this receptor. That effect was specific because another azo dye 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-MeDAB) did not activate mCAR. Experiments with wild-type (*car*^{+/+}) and CAR-null (*car*^{-/-}) C57BL/6 mice showed CAR-dependent induction of hepatic mRNA expression of the following CAR target genes in response to OAT: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* and *c-Myc*. Immunohistochemical analysis of liver sections of wild-type and CAR-null C57BL/6 mice demonstrated that OAT induced hepatocyte proliferation in a CAR-dependent manner. It follows from our results that mCAR is OAT xenosensor and at least part of the effects of this compound are mediated by this nuclear receptor.

Key words: *o*-aminoazotoluene (OAT), azo dyes, constitutive androstane receptor (CAR), target genes, hepatocyte proliferation.