

УДК 577. 2:616-006

ВПЛИВ САЛІЦИЛАТУ І ДИОКСИХОЛАТУ НАТРІЮ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ HSP70 І HSP90 У КУЛЬТУРІ КЛІТИН РАКУ ШЛУНКА ЛЮДИНИ

Мандрик С.Я., Сидорик Л.Л., Погрібний П.В., Остапченко Л.І.

На сьогоднішній день недостатньо вивчена участь білків теплового шоку у захисті слизової оболонки шлунка, зокрема, при дії нестероїдних протизапальних препаратів (ацетилсаліцилової кислоти, індометацину), жовчі, а, також, за умов розвитку різноманітних патологій органів шлунково-кишкового тракту. На клітинах раку шлунка досліджено експресію білків теплового шоку Hsp70 і Hsp90 за умов дії саліцилату і диоксихолату. Встановлено, що на 2-, 7- і 18-ту години рівень експресії Hsp70 в клітинах AGS підвищувався, тоді як рівень експресії Hsp90 залишався в межах контрольних значень. Показано індукуючий вплив саліцилату і диоксихолату натрію на експресію білка Hsp70.

Ключові слова: саліцилати, диоксихолат натрію, білки теплового шоку, рак шлунку.

ВСТУП

Молекулярні шаперони Hsp70 і Hsp90 відіграють в клітинах важливу роль, беручи безпосередню участь у процесах фолдингу новосинтезованих білків. Окрім процесів фолдингу, дані білки задіяні у багатьох інших процесах у клітині. Так, білок Hsp70 забезпечує транспорт молекул новосинтезованих білків в окремі компартменти клітини, зокрема, в мітохондрії, бере участь у регуляції процесів апоптозу, відіграє важливу роль у деградації клітинних білків денатурованих під впливом різноманітних стресових факторів [1 - 3]. Щодо білка Hsp90, то, згідно з літературними даними, він є шапероном рецепторів стероїдних гормонів. Окрім цього, роль білка Hsp90 у процесах сигнальної трансдукції клітини підтверджується його участю у фолдингу ряду кіназ. Білки Hsp70 і Hsp90, як і всі білки теплового шоку, належать до білків, рівень експресії, яких зростає в умовах стресу спричиненого різноманітними факторами як зовнішнього, так і внутрішнього середовища організму [1]. Відомо, що Hsp70 і Hsp90, беруть участь у захисті слизової оболонки шлунка від дії оксидантів, нестероїдних протизапальних засобів, етанолу. Проте, до кінця роль цих білків у підтриманні цілісності слизової оболонки шлунка і кишковика не з'ясована [4 - 6].

Метою нашої роботи було дослідити вплив саліцилату натрію і диоксихолату натрію на експресію білків Hsp70 і Hsp90 в клітинах раку шлунка людини.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

В дослідях використали лінію ракових клітин шлунка людини AGS (отриману з банку клітин Інституту експериментальної патології, радіобіології і онкології НАН України). Клітини вирощували при 37°C у середовищі DMEM (Sigma-Aldrich), що містило 10 % сироватки великої рогатої худоби (Gibco BRL, Великобританія), в атмосфері 5 % CO₂. Для культивування використовували пластикові флакони

(Nunc, Данія). При дослідженні впливу саліцилату натрію і диоксихолату натрію на рівні експресії Hsp70 і Hsp90, клітини AGS вирощували до 100 % моношару, за добу до дії стресу змінювали середовище на свіже, в якому здійснювали вплив стресу на клітини.

Препарат Hsp90, очищеного з мозку бика, люб'язно надано проф. Я. Кузницьким (Інтернаціональний інститут молекулярної і клітинної біології, Варшава, Польща). Поліклональні антитіла проти DnaK (прокаріотичний аналог еукаріотичного Hsp70) люб'язно надано проф. Н. Пфаннером (Університет м. Фрайбурга, Германія). Поліклональні анти-Hsp90 антитіла одержано, як описано в роботі [7].

Для приготування лізатів клітин використовували буфер, який містив 20 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100 і інгібітори протеаз. Зразки гомогенізували в буфері та центрифугували протягом 25 хв при 1300g при температурі +4°C. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд проводили згідно з методикою описаною раніше з деякими модифікаціями [8].

Електрофорез отриманих лізатів клітин проводили у градієнті концентрації ПААГ (7-22%) в денатуруючих умовах по Laemmli [9]. Форез проводили в тріс-гліциновому буфері (pH 9,2-9,5) при напрузі 10-20 В/см [9].

Імуноблотинг отриманих проб проводили за описаним методом [10]. Для електропереносу білків використовували мембрани нітроцелюлози (Hybond™-с super, Велика Британія). Електроперенос здійснювали в камері для електропереносу (B 2157, Sigma, США), у спеціальному середовищі, яке містило 25 мМ Tris, 192 мМ гліцину і 20 % метанолу, за умов 30 V 12-14 годин з використанням джерела постійного струму ПЕФ-3 (СРСР).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У проблемі з'ясування причин і механізмів розвитку певних типів хронічного гастриту людини важливу роль відіграють експериментальні моделі, а також результати досліджень, які проводяться на культурах клітин шлункового, чи кишкового походження. Слід зазначити, що, відповідно до нової класифікації хронічних гастритів ("Сіднейська система"), поряд з відносно поширеними НР-залежним і аутоімунним гастритами, виділяють також рефлюкс-гастрит [11]. До рефлюкс-гастриту був віднесений і хронічний гастрит (ХГ), який виникає на ґрунті прийому нестероїдних протизапальних засобів, зокрема, ацетилсаліцилової кислоти і її похідних [11, 12, 13]. Роль білків теплового шоку в умовах розвитку рефлюкс-гастриту, як і інших форм ХГ, залишається до кінця нез'ясованою. Раніше нами було показано, що під час розвитку експериментального хронічного атрофічного гастриту (ХАГ) у шурів, експресія білків Hsp70 і Hsp90 в паріетальних клітинах підвищується вже на 1-ший тиждень розвитку патології.

Дослідження експресії білка Hsp70 у клітинах AGS за дії СЦ (в концентраціях 10^{-3} , 10^{-5} і 10^{-7} М) і ДОХ (в концентраціях 10^{-5} , 10^{-7} і 10^{-9} М), показало, що рівень експресії Hsp70 підвищувався приблизно у 1,5-2 рази порівняно з контролем при дії СЦ (рис. 1). Збільшення рівнів експресії Hsp70 в клітинах під впливом СЦ в вищепказаних концентраціях не залежало від часу після дії стресу на клітини. Таким чином, як видно з Рис. 1, а, рівень експресії Hsp70 за дії СЦ зростає протягом перших двох годин після дії стресу і залишається стабільно високим до 18-тої години інкубації клітин з СЦ.

**ВПЛИВ САЛІЦИЛАТУ І ДІОКСИХОЛАТУ НАТРІЮ НА РІВЕНЬ
ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ HSP70 І HSP90 У КУЛЬТУРІ КЛІТИН**

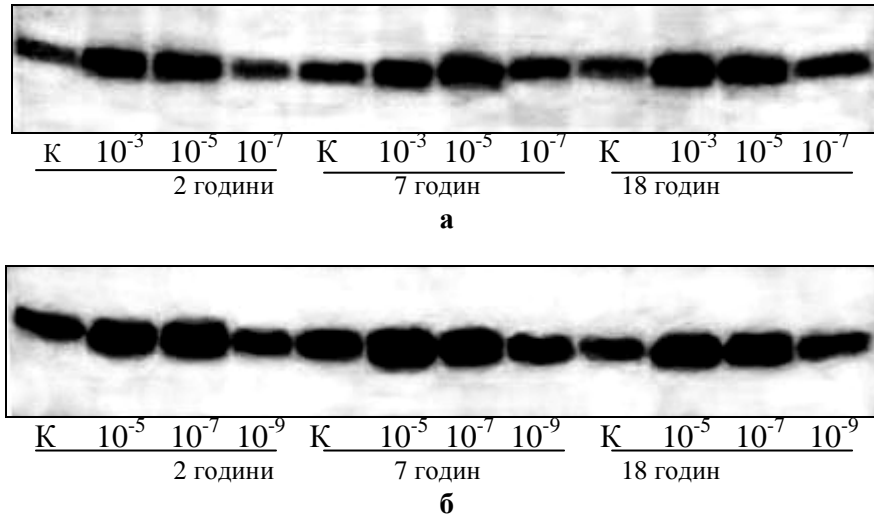


Рис. 1. Експресія Hsp70 в клітинах AGS за умов дії стресових чинників: (а) – саліцилату натрію і (б) диоксихолату натрію.

Схожа часова і концентраційна залежність рівнів експресії Hsp70 в клітинах AGS спостерігалась і при дії ДОХ (рис. 1, б). Рівень експресії Hsp70 підвищувався на 2-, 7- і 18-ту години стресу спричиненого впливом ДОХ в концентраціях 10^{-5} і 10^{-7} М. ДОХ в концентрації 10^{-9} М, як і СЦ в концентрації 10^{-7} М, не змінювали рівень експресії Hsp70 в порівнянні з контролем (рис. 1).

З літературних джерел відомо, що тривале вживання нестероїдних протизапальних засобів викликає появу ерозій і геморагій слизової оболонки шлунка. Прийом протягом року ацетилсаліцилової кислоти, її похідних, зокрема, індометацину, ібупрофену та інших лікувальних засобів у середніх терапевтичних дозах супроводжується закономірною появою ерозивно-геморагічних змін слизової оболонки шлунка у 85 % хворих [11]. Відомо, що саліцилова кислота може безпосередньо пошкоджувати клітини слизової оболонки шлунка. Дія диоксихолату дещо схожа на дію жовчних кислот [12]. Таким чином, результати по підвищенню експресії Hsp70 за умов дії СЦ та ДОХ в ракових клітинах AGS можуть вказувати на участь даного білка у захисті клітин слизової оболонки шлунка в умовах розвитку рефлюкс-гастриту.

У клітинах еукаріот є два основних білка теплового шоку з молекулярною масою близько 70 кДа – це конститутивний білок Hsp73 (Hsc70) і індукцйбельний Hsp72 (Hsp70). Численними дослідженнями як на тваринах, так і на культурах клітин шлунка і кишковика, показано, що обидва білки відіграють важливу роль у захисті слизової оболонки шлунково-кишкового тракту від дії несприятливих факторів [1, 4, 5, 6]. Зокрема, рівні експресії Hsp73 і Hsp72 в клітинах слизової оболонки шлунка, які росли в культурі, підвищувались у відповідь на дію оксидантів (пероксиду водню, діаміду), етанолу, а, також, при підвищенні температури живильного середовища до 43° С. Відомо, що в індукції транскрипції генів, які кодують білки Hsp72 і Hsp73, в стресових умовах бере участь транскрипційний фактор HSF1. Згідно з даними літератури, активація HSF1 в

клітинах слизової оболонки шлунка в умовах підвищення температури живильного середовища до 43° С відбувається вже через 15 хвилин і досягає максимальних значень на 30-ту хвилину від початку дії стресу. Натомість, рівень мРНК індукібельного білка Hsp72, за даних стресових умов, зростає на 30-ту хвилину і досягає максимальних значень в кінці першої години від початку стресу. Проте, вже на 2-гу годину рівень мРНК Hsp72 різко знижувався і на 4-ту годину майже не ідентифікувався, як і в контрольних клітинах [4]. Нами було показано, що рівень експресії Hsp70 в клітинах AGS після стресу СЦ і ДОХ зростає на 2-гу годину, що узгоджується з літературними даними (рис. 1). Високий рівень експресії Hsp70 після дії СЦ і ДОХ в концентраціях 10⁻³, 10⁻⁵ і 10⁻⁵, 10⁻⁷ М, відповідно, зберігався впродовж 18 годин від початку стресу. Беручи до уваги літературні дані по динаміці рівня мРНК Hsp70, можемо припустити, що основна кількість білка Hsp70 в умовах дії стресорних факторів (СЦ і ДОХ) в клітинах слизової оболонки шлунка синтезується протягом перших двох годин від початку стресу. Проте, очевидно, це потребує подальших досліджень.

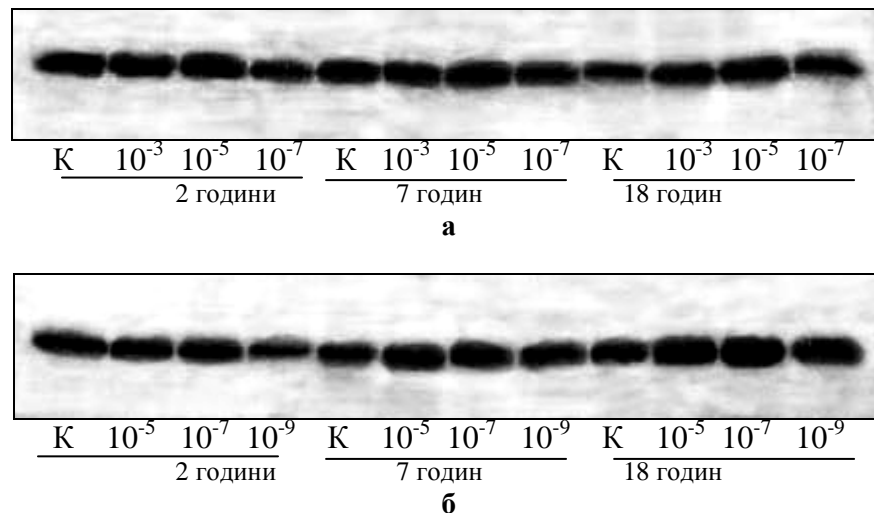


Рис. 2. Експресія Hsp90 в клітинах AGS за умов дії стресових чинників: (а) - саліцилату натрію і (б) - диоксихолату натрію.

Сьогодні практично не з'ясованою є роль білка Hsp90 у захисті клітин слизової оболонки шлунка і кишковика в розвитку хронічного гастриту й інших захворювань шлунково-кишкового тракту досліджена набагато гірше ніж роль білка Hsp70. Відомо, як і для Hsp70, що рівень експресії Hsp90 в клітинах слизової оболонки шлунка зростає у відповідь на підвищення температури живильного середовища (для культури клітин), а, також, на дію ряду речовин, зокрема, етанолу, пероксиду водню, діаміду та інших [1, 4-6].

Нами було досліджено рівень експресії Hsp90 в клітинах AGS за умов стресу спричиненого дією СЦ і ДОХ (рис. 2). Показано, що даний показник не змінювався. Отримані результати дозволяють припустити, що шаперон Hsp90 може відігравати менш значиму роль у захисті ракових клітин шлунка від дії саліцилату і диоксихолату, ніж Hsp70.

ВПЛИВ САЛЦИЛАТУ І ДИОКСИХОЛАТУ НАТРІЮ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ HSP70 І HSP90 У КУЛЬТУРІ КЛІТИН

ВИСНОВКИ

Таким чином, нами було показано, що рівні експресії Hsp70 у клітинах раку шлунка підвищується при дії салцилату в концентраціях 10^{-3} і 10^{-5} М і диоксихолату в концентраціях 10^{-5} і 10^{-7} М. Збільшення рівня експресії Hsp70 спостерігалось на 2-, 7- і 18-ту години від початку стресу. На відміну від Hsp70, рівень експресії Hsp90 не змінювався в умовах стресу спричиненого дією салцилату і диоксихолату. Отримані експериментальні дані дозволяють припустити, що білок Hsp70 задіяний у захисті клітин AGS від дії досліджуваних стресорних факторів.

Список літератури

1. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding // Phys. Rev.- 1999.- Vol. 79, №2.- P. 425-449.
2. Oksala N.K.J., Oksala A., Paavonen T., Alhava E., Paimela H. Heat shock preconditioning modulates proliferation and apoptosis after superficial injury in isolated guinea pig gastric mucosa via an eicosanoid and protein synthesis-dependent mechanism // APMIS.- 2003.- Vol. 111. - P.497-506.
3. Eggers D.K., Welch W.J., Hansen W.J. Complexes between nascent polypeptides and their molecular chaperones in the cytosol of mammalian cells // Moll. Biol. Cell. - 1997.- Vol. 8. - P. 1559-1573/
4. Rokutan K. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection // J. Gastroenterol. Hepatol.- 2000.- Vol. 15.- P.12-19.
5. Tsukimi Y., Nakai H., Itoh S., Amage K., Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats // J. Physiol. Pharmacol. - 2001.- Vol. 52, №3.- P. 391-406.
6. Tsukimi Y., Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing // Biol. Pharm. Bull. - 2001.- Vol. 24, №1. - P.1-9.
7. Капустян Л.Н., Киямова Р.Г., Гришкова В.С., Терентьев А.Г., Филоненко В.В., Сидорик Л.Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // Биополимеры и клетка. - 2006. - Т.2, №22. - С. 117-120.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // Anal. Biochem. - 1976.- Vol. 86. - P. 193-200.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // Nature.- 1970.- 227, №52. - P.680-685.
10. Avrames S., Termynck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // Mol. Immunol.- 1993.- Vol. 30.- P. 119-127.
11. Григор'єв П.Я., Стародуб Є.М., Яковенко Е.П., Гаврилюк М.Є., Шостак С.Є. Хвороби органів травлення (Діагностика і лікування) // Тернопіль, "Укрмедкнига"- 2000. – 220 с.
12. Wang L.-J., Chen S.-J., Chen Z., Cai J.-t., Si J.-M. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and regulating mechanism of protein expression in rats// J. Zhejiang Univ. SCIENCE B- 2006.- № 7(8).- P. 634-640.
13. Fox J.G., Wang T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer // J. Clin. Inv.- 2007.- Vol. 117, №1.- P. 60-69.
14. Ciocca D.R., Calderwood S.K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications // Cell Stress Chaperones.- 2005.- № 10(2).- P. 816-103.

Мандрык С.Я., Сидорик Л.Л., Погребной П.В., Остапченко Л.И. Влияние салицилата и диоксихолата на урони экспрессии белков HSP70 и HSP90 в культуре клеток рака желудка человека // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. - 2007. - Серия «Биология, химия». – Т. 20 (59), № 1. – P. 157-162.

До сих пор очень мало известно о роли белков теплового шока в защите слизистой оболочки желудка, особенно, в условиях действия нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетилсалициловой кислоты, индометацина), желчи, а также, в условиях развития различных заболеваний желудочно-кишечного тракта. В данной работе мы использовали клетки рака желудка человека как модель для изучения уровней экспрессии белков Hsp70 и Hsp90 в условиях действия салицилата и диоксихолата. Уровень экспрессии

Hsp70 в клетках AGS повышался на 2-, 7- и 18-тый час стресса. В отличие от Hsp70, уровень экспрессии белка Hsp90 в данных стрессовых условиях не менялся. Таким образом, показано индуцирующее влияние салицилата и диоксихолата на экспрессию белка Hsp70.

Ключевые слова: салицилаты, диоксихолат натрия, белки теплового шока, рак желудка.

Mandryk S., Sidorik L., Pogrebnoy P., Ostapchenko L. Influence of salicylate and deoxyholate on HSP70 and HSP90 expression level in human gastric cancer cell cultures // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series "Biology, chemistry". – 2007. – Vol. 20 (59), № 1. – P. 157-162.

It is still little known about precise role of Hsp in gastric mucosa, especially upon action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (acetylsalicylate, indomethacin), bile, as well as during different stomach disorders. In our work human gastric cancer cells were used in order to elucidate Hsp70 Hsp90 expression levels upon salicylate and deoxyholate influence. It was observed increasing in Hsp70 expression in cells which were stressed by salicylate and deoxyholate on 2-, 7- and 18-th hours of stress. However, there were no changes in Hsp90 expression patterns upon these stress conditions. So, it is obviously that salicylate and deoxyholate induce Hsp70 expression.

Keywords: salicylate, deoxyholate, heat shock proteins, gastric cancer.