



УДК 577.161.2.011:547.96

ЭФФЕКТ ХОЛЕСТЕРИНА НА СЕКРЕЦИЮ АПОЛИПОПРОТЕИНА В И СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТКАМИ ГЕПАТОМЫ HepG2*

И. В. Фуки, С. Н. Преображенский, А. Ю. Мишарин,
Н. Г. Бушмакина, Г. Б. Меньщиков, В. С. Репин

Введение. В человеческом организме печень играет ключевую роль в биосинтезе липопротеинов. Показано, что апобелок V_{100} (апоВ), основной аполипопротеин липопротеинов очень низкой (ЛОНП) и низкой плотности (ЛНП), синтезируется паренхиматозными клетками печени [1, 2]. Поскольку он может играть важную роль в метаболизме холестерина [3] и развитии атеросклероза [4], чрезвычайно важно понять механизмы, регулирующие его биосинтез.

Ранее нами было показано, что холестерин, добавленный в первичную культуру гепатоцитов человека, может стимулировать секрецию апоВ [5]. В представленной работе на клетках гепатомы человека *HepG2* исследована возможность регуляции секреции апоВ другими веществами, влияющими на содержание внутриклеточного холестерина, и взаимосвязь между изменениями скорости секреции апоВ и активностью ЛНП-рецепторов.

Материалы и методы. Большинство реактивов получено от фирмы «Sigma» (США). ^{125}I -Na производства ВО «Изотоп» (Моск. отд-ние). Для культивирования клеток применяли среды и сыворотки фирмы «Flow Laboratories» (Англия) и культуральную посуду Nunc (Дания).

ЛНП выделяли из свежей плазмы здоровых доноров последовательным ультрацентрифугированием [6]. Чистоту и гомогенность выделенных ЛНП проверяли с помощью аналитического центрифугирования и электрофореза в полиакриламидном геле [7]. Концентрацию липопротеинов оценивали по методу Лоури [8]. ЛНП, меченные ^{125}I , получали по [9].

Поликлональные моноспецифические антитела козы к человеческим ЛНП и конъюгат этих антител с пероксидазой хрена получали, как описано ранее [6]. Комплексы, состоящие из аполипопротеина А1 и димиристонлфосфатидилхолина (апоА1/Фл), готовили по методике [10].

Клетки гепатомы *HepG2* культивировали, как в работе [11]. Для проведения эксперимента клетки обрабатывали трипсином (0,05 %) и пересаживали в 24-ячеечный мультивелл. После достижения монослоя (4—5-й день после посадки) клетки отмывали два раза фосфатным буферным раствором (ФБ) и добавляли в ячейки мультивелла по 450 мкл среды ЕМЕМ с 1,0 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), свободного от жирных кислот (среда А). В этот раствор вносили добавки, эффект которых изучали. В конце 16-часовой инкубации среду собирали для определения скорости секреции апоВ иммуноферментным методом [5] (в специальном эксперименте было показано, что скорость секреции апоВ клетками гепатомы остается постоянной не менее 25 ч). В каждую ячейку с клетками вносили по 250 мкл среды А с 10 мкг/мл ^{125}I -ЛНП в присутствии 20-кратного избытка немеченых ЛНП или без него. После ча-

* Представлена членом редколлегии О. В. Рохлиным.

совой инкубации при 37 °С клетки охлаждали, отмывали от несвязавшихся липопротеидов и растворяли в 1 н. NaOH. По радиоактивности лизата оценивали количество ЛНП, связавшихся с клетками; рецептор-зависимое связывание ЛНП определяли по разности между связыванием ¹²⁵I-ЛНП в среде без избытка немеченых липопротеинов и в присутствии 20-кратного избытка. Аликвоту лизата брали для определения клеточного белка методом Лоури [8].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены результаты эксперимента по влиянию холестерина на секрецию apoB и связывание ¹²⁵I-ЛНП. Возрастание содержания холестерина в среде вызывает зависимое от концентрации увеличение секреции apoB и параллельное

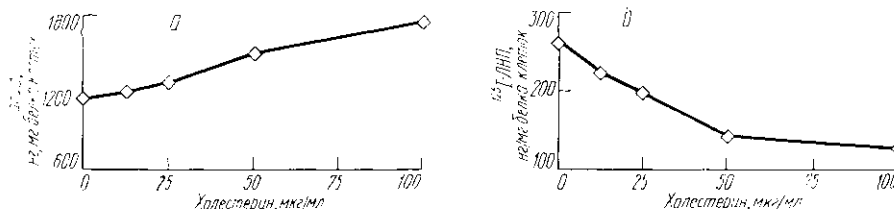


Рис. 1. Эффект различных концентраций холестерина на секрецию apoB (а) и связывание ¹²⁵I-ЛНП (б) клетками HepG2. Холестерин добавляли растворенным в этаноле. Концентрация этанола в среде не превышала 1 %. В качестве контроля использовали среду с аналогичной концентрацией этанола

Fig. 1. Effect of different cholesterol concentrations on apoB secretion (a) and ¹²⁵I-LDL binding (b) by HepG2 cells. Cholesterol was added to the medium dissolved in ethanol. The concentration of ethanol in the medium did not exceed 1 %. The corresponding amount of ethanol was added to the control cells

снижение активности ЛНП-рецепторов. Максимальная исследованная концентрация холестерина (100 мкг/мл) увеличивала секрецию apoB в 1,5 раза и снижала связывание меченых ЛНП с клетками на 53 % по сравнению с контролем.

Чтобы выяснить, не оказывает ли внутриклеточный холестерин такого же влияния на скорость секреции apoB, как и изменения содержания холестерина в среде, клетки гепатомы инкубировали с олеиновой кислотой и комплексами apoA1/Фл — веществами, способными изменять внутриклеточный пул холестерина [12, 13]. Данные, представленные в табл. 1, показывают, что 16-часовая инкубация клеток HepG2 в присутствии 1,12 мМ олеиновой кислоты приводит к увеличению содержания холестерина в клетках на 33 %, а аналогичная инкубация с

Таблица 1

Эффект добавления в среду холестерина, олеиновой кислоты и искусственных комплексов apoA1/Фл на общее содержание холестерина в клетках HepG2 ($M \pm m$, $n=4$)

Effect of cholesterol, oleic acid and apoA1/DMPC complexes on cholesterol content of HepG2 cells ($M \pm m$, $n=4$)

| Добавки в среде | Общий холестерин, нмоль/мг белка клеток |
|--------------------------------|---|
| Без добавок | 70,8±3,2 |
| Холестерин (100 мкг/мл) | 122,8±4,7 |
| Олеиновая кислота (1,12 мМ) | 94,0±2,8 |
| Комплекс apoA1/Фл (250 мкг/мл) | 45,9±1,7 |

Примечание. Клетки HepG2 помещали в чашки Петри (60 мм) и культивировали пять дней в 3 мл среды с 15 % фетальной сыворотки теленка. После этого клетки отмывали и среду заменяли на свежую среду А, содержащую указанные количества холестерина, олеиновой кислоты или комплексов apoA1/Фл. Через 16 ч клетки отмывали три раза ФБ и собирали в 500 мкл дистиллированной воды. Разрушенные замораживанием — оттаиванием клетки ресуспендировали через иглу для подкожных инъекций. Количество холестерина в клеточном лизате определяли с помощью монотеста фирмы «Gilford».

комплексами апоА1/ФЛ (250 мкг/мл) снижает содержание холестерина в клетках на 35 %.

Олеиновая кислота оказывала на секрецию апоВ и активность ЛНП-рецепторов эффекты, аналогичные таковым холестерину. При концентрации 1,12 мМ она стимулировала выход апоВ в среду на 46 % и снижала связывание ^{125}I -ЛНП на 42 % по сравнению с контролем (рис. 2). При одновременном внесении в среду олеиновой кислоты и

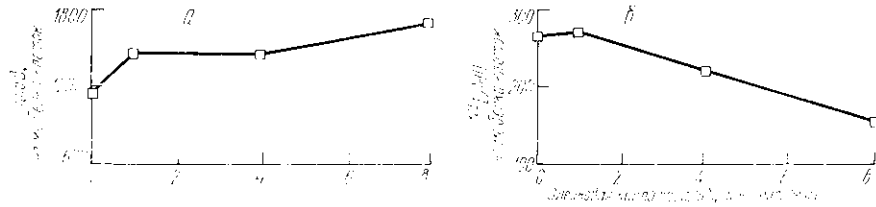


Рис. 2. Эффект олеиновой кислоты на секрецию апоВ (а) и связывание ^{125}I -ЛНП (б) клетками *HepG2*

Fig. 2. Effect of oleic acid on apoB secretion (a) and ^{125}I -LDL binding (b) by *HepG2* cells

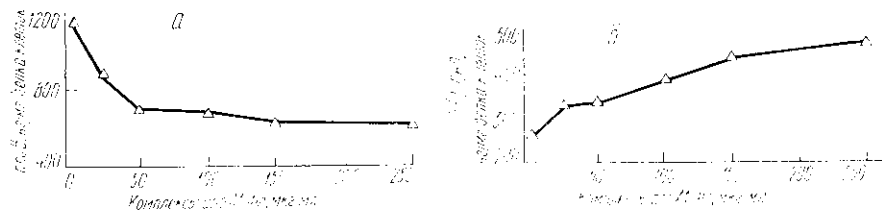


Рис. 3. Эффект различных концентраций искусственных комплексов апоА1/ФЛ на секрецию апоВ (а) и рецепторное связывание ^{125}I -ЛНП (б) клетками *HepG2*

Fig. 3. Effect of complexes apoA1/DMPC on apoB secretion (a) and ^{125}I -LDL binding (b) by *HepG2* cells

холестерина они оказывали аддитивный эффект на скорость секреции аполипопротеина В и активность ЛНП-рецепторов (табл. 2).

Инкубация клеток *HepG2* с искусственными комплексами апоА1/ФЛ приводила к противоположным эффектам: в зависимости от дозы комплекс вызывал снижение секреции апоВ и увеличение активности ЛНП-рецепторов. В концентрации 250 мкг/мл комплексы ингибировали выход апоВ в среду в 2,1 раза и повышали связывание ЛНП на 69 % (рис. 3).

Чтобы оценить возможную взаимосвязь между регуляцией секреции апоВ и связыванием ^{125}I -ЛНП, мы суммировали результаты экс-

Таблица 2

Эффект холестерина и олеиновой кислоты на секрецию апоВ и связывание

^{125}I -ЛНП клетками *HepG2* ($M \pm m$, $n=3$)

Effect of cholesterol and oleic acid on apoB secretion and ^{125}I -LDL binding by *HepG2* cells ($M \pm m$, $n=3$)

| Добавки в среде | Секреция апоВ | Связывание ЛНП |
|---|---------------|----------------|
| | нг/мг белка | клеток |
| Без добавок | 1157,6±37,3 | 266,1±6,1 |
| Холестерин (100 мкг/мл) | 1748,0±133,5 | 124,6±4,5 |
| Олеиновая кислота (1,12 мМ) | 1650,4±32,3 | 154,5±7,4 |
| Холестерин (100 мкг/мл) + олеиновая кислота (1,12 мМ) | 1962,2±147,2 | 110,9±5,0 |

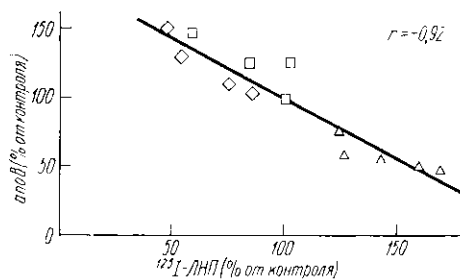
Примечание. Клетки инкубировали 16 ч в среде А с указанными добавками, после чего концентрацию апоВ и связывание ^{125}I -ЛНП определяли, как указано в «Материалах и методах».

периментов, представленных на рис. 1—3. Обнаружена очень высокая ($r = -0,92$) и статистически достоверная ($P < 0,001$) отрицательная корреляция между этими величинами (рис. 4).

В данной работе мы показали, что холестерин может стимулировать секрецию apoB клетками *HepG2*. Ранее описан аналогичный эффект холестерина на секрецию apoB первичной культурой паренхиматозных клеток печени человека [5]. Эффект холестерина на секрецию apoB достаточно умеренный (в семи независимых экспериментах выход apoB в среду в присутствии 100 мкг/мл холестерина увеличивался

Рис. 4. Отрицательная корреляция между секретией apoB и связыванием ^{125}I -ЛНП клетками *HepG2*. Результаты, показанные на этом рисунке, представляют собой сумму данных рис. 1—3

Fig. 4. Negative correlation between ^{125}I -LDL binding and apoB secretion by *HepG2* cells. The data are summarized from Fig. 1-3



в среднем на 60%), но следует заметить, что концентрация этого apoB в плазме крови человека различается примерно в тех же пределах [14] (за исключением случаев с тяжелой формой нарушения метаболизма липопротеинов).

Было также обнаружено, что олеиновая кислота и искусственные комплексы apoA1/Фл, изменяющие содержание холестерина внутри клеток, могут также влиять на секрецию apoB и активность ЛНП-рецепторов. Полученные результаты позволяют предположить, что именно внутриклеточный холестерин способен регулировать оба эти параметра.

CHOLESTEROL EFFECT ON APOLIPOPROTEIN B SECRETION AND BINDING OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS BY HEPATOMA HEPG2 CELLS

I. V. Fuki, S. N. Preobrazhensky, A. Yu. Misharin, N. G. Bushmakina, G. B. Menshchikov, V. S. Repin

Research Institute of Experimental Cardiology, National Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The effect of cholesterol, oleic acid and recombinant complexes containing apolipoprotein A1/dimyristoylphosphatidylcholine (apoA1/DMPC) on apolipoprotein B (apoB) secretion and uptake of ^{125}I -labeled low-density lipoproteins (LDL) by cultured human hepatoma *HepG2* cells was studied. Addition of different concentrations of exogenous cholesterol (as ethanol solution) to the cells increased apoB secretion and inhibited ^{125}I -labelled LDL uptake in a dose-dependent manner. Similar effects were found when the cells were incubated with different concentrations of oleic acid, which enhanced the intracellular cholesterol content. The presence of complexes apoA1/DMPC in the culture medium, which decreased the cellular pool of cholesterol, resulted in the opposite effects: apoB secretion was inhibited, while the LDL-receptor activity was stimulated. Significant negative correlation ($r = -0.92$, $p < 0.001$) was found between apoB secretion and LDL uptake. The obtained data suggest that cholesterol can induce cooperated changes in apoB secretion and LDL-receptor activity.

1. *Apolipoprotein synthesis in humans: liver synthesizes only apolipoprotein B-100* / S. B. Edge, J. M. Hoeg, P. D. Schneider, H. B. Brewer // *Metabolism*.— 1985.— 34, N 8.— P. 726—730.

2. *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function* / R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall, K. N. Weisgraber // *J. Lipid Res.*—1984.—25, N 12.—P. 1277—1294.
3. *Goldstein J. L., Brown M. S.* The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis // *Annu. Rev. Biochem.*—1977.—46.—P. 897—930.
4. *Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol level in human plasma low density lipoproteins)* / A. Sniderman, S. Shapiro, D. Marpole et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 1.—P. 604—608.
5. *Cholesterol can stimulate secretion of apolipoprotein B by cultured human hepatocytes* / V. A. Kosykh, S. N. Preobrazhensky, I. V. Fuki et al. // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—836, N 3.—P. 385—389.
6. *Enzyme-linked immunoreceptor assay of low-density-lipoprotein receptor* / S. N. Preobrazhensky, V. O. Ivanov, I. V. Fuki et al. // *Anal. Biochem.*—1985.—149, N 1.—P. 269—274.
7. *Stephens R. E.* High resolution preparative SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Fluorescent visualization and electrophoretic elution-concentration of protein bands // *Ibid.*—1975.—65, N 1.—P. 369—379.
8. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
9. *Bilheimer D. W., Eisenberg S., Levy R. I.* Metabolism of very low density lipoproteins: preliminary *in vitro* and *in vivo* observations // *Biochim. et biophys. acta.*—1972.—260, N 2.—P. 212—221.
10. *Recombinant models of lipoproteins. Apolipoprotein A-1 [phosphatidylcholine]cholesterol complexes formed in 2-chloroethanol-water mixture* / J. V. Antonov, N. V. Medvedeva, A. Yu. Misharin et al. // *Ibid.*—1985.—835, N 1.—P. 50—57.
11. *Enzyme immunoassay of the receptors for modified low density lipoprotein* / S. N. Preobrazhensky, V. P. Tsibulsky, I. V. Fuki et al. // *Anal. Biochem.*—1986.—154, N 2.—P. 382—387.
12. *Ellsworth J. L., Erickson S. K., Cooper A. D.* Very low and low density lipoprotein synthesis and secretion by human hepatoma cell line *Hep-G2*: effects of free fatty acid // *J. Lipid Res.*—1986.—27, N 8.—P. 858—874.
13. *Artificial HDL as an anti-atherosclerotic drug* / A. N. Orechov, A. Yu. Misharin, V. V. Tertov et al. // *Lancet.*—1984.—2, N 8412.—P. 1149—1150.
14. *Lutabo-Bosa A. J., Adolphson J. L., Albers J. J.* Evaluation of the measurement of B protein of plasma low density lipoprotein by radial immunodiffusion // *J. Lipid Res.*—1985.—26, N 8.—P. 995—1002.

Ин-т эксперим. кардиологии
 Всесоюз. кардиол. науч. центра АМН СССР, Москва

Получено 07.09.87