

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТЕРОИДОГЕНЕЗОМ, В КЛЕТКАХ КОЖИ

© Т. Г. Рукша

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения и социального развития РФ;
электронный адрес: tatyana_ruksha@mail.ru*

Периферический бензодиазепиновый рецептор (ПБР, TsPO) — белок наружной митохондриальной мембраны, который принимает участие в регуляции синтеза стероидных гормонов, клеточной пролиферации, апоптоза. В данной работе проведено иммуноцитохимическое исследование с целью визуализации периферического бензодиазепинового рецептора и фермента цитохрома P450_{SCC} в клетках кожи: нормальных кератиноцитах, нормальных меланоцитах, клетках злокачественной меланомы и плоскоклеточного рака кожи. Исследован уровень эндогенного лиганда ПБР — ингибитора связывания диазепама. Показано однонаправленное изменение уровня исследуемых белков в опухолевых клетках. Обсуждается роль белков, участвующих в синтезе стероидных гормонов в коже, в функционировании нормальной кожи и в развитии кожных заболеваний.

Ключевые слова: злокачественные новообразования кожи, клеточная пролиферация, периферический бензодиазепиновый рецептор, стероидогенез, цитохром P450_{SCC}.

Принятые сокращения: АКТГ — адренокортикотропный гормон, ПБР — периферический бензодиазепиновый рецептор, УФИ — ультрафиолетовое излучение, цАМФ — циклический аденозинмонофосфат, ДВИ — ингибитор связывания диазепама.

Периферический бензодиазепиновый рецептор (ПБР, TsPO) является белком наружной митохондриальной мембраны, который регулирует транспорт холестерина из внутриклеточных депо через наружную митохондриальную мембрану на внутреннюю мембрану митохондрий, где под влиянием фермента цитохрома P450_{SCC} (20.22 десмолазы) происходят отщепление боковой цепи холестерина и образование прегненолона, который является предшественником большинства стероидных гормонов (Kueger, Papadopoulos, 1992). Помимо этого, существуют многочисленные экспериментальные данные, указывающие на участие ПБР в регуляции процессов клеточной пролиферации и апоптоза (Hardwick et al., 1999; Decaudin et al., 2002).

Впервые ПБР, преимущественно локализованный в области шиповатого и зернистого слоев эпидермиса, а также в эндотелиальных клетках дермы, в фибробластах и волосяных фолликулах в нормальной коже, был идентифицирован в 1999 г. (Stoebner et al., 1999). Выраженное присутствие рецептора в коже предполагает его определенные функции, однако роль ПБР остается неясной. В экспериментах на животных (у мышей линии Mrl/Lpr, у которых отмечается патология кожи, сходная с дискоидной красной волчанкой) было обнаружено, что лиганды ПБР обладают способностью препятствовать развитию акантоза, гиперкератоза и формированию дермальных инфилтратов (Vgibes, 2003). Кроме того, в клетках, трансфицированных ПБР, отмечали повышенную устойчивость к апоптозу и замедление активации каспазы-3 после действия ультрафиолетового излучения (УФИ) (Stoebner

et al., 2001). Эти наблюдения позволили предположить, что ПБР может обладать действием, защищающим кожу от активных форм кислорода при УФИ.

Было обнаружено повышение экспрессии ПБР на стадии прогрессирования в эпидермисе больных псориазом и снижение на стадии регресса (Рукша и др., 2004). При исследовании биопсийного материала больных с новообразованиями кожи было выявлено изменение характера и снижение интенсивности экспрессии ПБР (Рукша и др., 2007).

Поскольку одной из наиболее изученных функций ПБР является регуляция синтеза стероидных гормонов в стероидпродуцирующих тканях, стоит предположить, что в коже ПБР может также участвовать в метаболизме стероидных гормонов. Известно, что в клетках кожи экспрессируются рецепторы к различным гормонам (Slominski, Wortzman, 2000). Помимо этого, кожа обладает способностью самостоятельно синтезировать некоторые гормоны, в том числе стероидные (Slominski et al., 2004).

В настоящей работе визуализировали и определяли уровень экспрессии ПБР и цитохрома P450_{SCC} в нормальных и опухолевых клетках кожи, а также исследовали уровень внутриклеточного лиганда ПБР — ингибитора связывания диазепама.

Материал и методика

Нормальные кератиноциты (клеточная линия NHEK, Clonetics) культивировали в среде KGM-2 (Clonetics) с добавлением эпинефрина, эпидермального фактора

роста, инсулина, трансферрина, гентамицина, амфотерицина В, гидрокортизона и бычьего питуитарного экстракта.

Нормальные меланоциты (HEM, Cascade biologics) культивировали в среде 254 (Cascade biologics), содержащей бычий питуитарный экстракт, эмбриональную бычью сыворотку, бычий инсулин, бычий трансферрин, основной фактор роста фибробластов, гидрокортизон, гепарин и ацетат форболмиристора.

Клетки плоскоклеточного рака кожи (клеточная линия A431, ATCC) и клетки злокачественной меланомы кожи (SK-MEL-2, ATCC) культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Cellgro, Mediatech Inc., США), обогащенной 10 % эмбриональной бычьей сывороткой, глютамином, пируватом натрия и глюкозой. Все клеточные культуры инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

При достижении плотности 70—80 % клетки пересевали на стекла Super Cell Culture Slides (Fisher Scientific, Pittsburg, PA), после чего культивировали в течение 24 ч. В дальнейшем среду удаляли, клетки фиксировали в 10%-ном формалине в течение 10 мин, затем инкубировали в течение 3 ч с антителами к ПБР в разведении 1 : 200 (любезно предоставленными проф. В. Пападопулосом, Georgetown University, Washington, США) или к цитохрому P450_{SCC} в разведении 1 : 300 (любезно предоставленными проф. В. Миллером, University of California San Francisco, США). После промывки в фосфатно-солевом буфере клетки инкубировали со вторичными антителами, меченными FITC (для антител к ПБР) и Texas Red (для антител к цитохрому P450_{SCC}) (Zymed Laboratories,

Инс., США). Оценивали число положительно окрашенных на ПБР клеток (ПБР-клетки) на 100 клеток.

Иммуноблоттинг выполняли по стандартной методике (Li et al., 2001), используя антитела к ингибитору связывания диазепама (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. Инкубацию со вторыми антителами (1 : 5000), мечеными пероксидазой хрена (Transduction Laboratories, Lexington, KY, США), проводили в течение 1 ч. Визуализацию осуществляли с помощью ECL (Amersham Biosciences, США). Для статистической обработки результатов использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

ПБР определялся во всех типах исследуемых клеток с равномерной локализацией, преимущественно перинуклеарной (рис. 1). В нормальных кератиноцитах и меланоцитах уровень экспрессии ПБР был приблизительно одинаковым и составлял соответственно 77 и 82 ПБР⁺-клеток на 100 клеток (см. таблицу). В опухолевых клетках уровень ПБР был снижен: в клетках плоскоклеточного рака он составлял 5.4 ПБР⁺-клетки на 100, в клетках меланомы — 6.0.

Фермент цитохром P450_{SCC}, перинуклеарно локализованный, выявлен во всех 4 исследуемых клеточных культурах (рис. 2). Число нормальных кератиноцитов, в которых определялся исследуемый фермент, составило 68 на 100 клеток, в нормальных меланоцитах — 89. Уровень цитохрома P450_{SCC} был снижен в клетках плоскоклеточного рака и меланомы: 8.0 и 6.5 соответственно. Методом

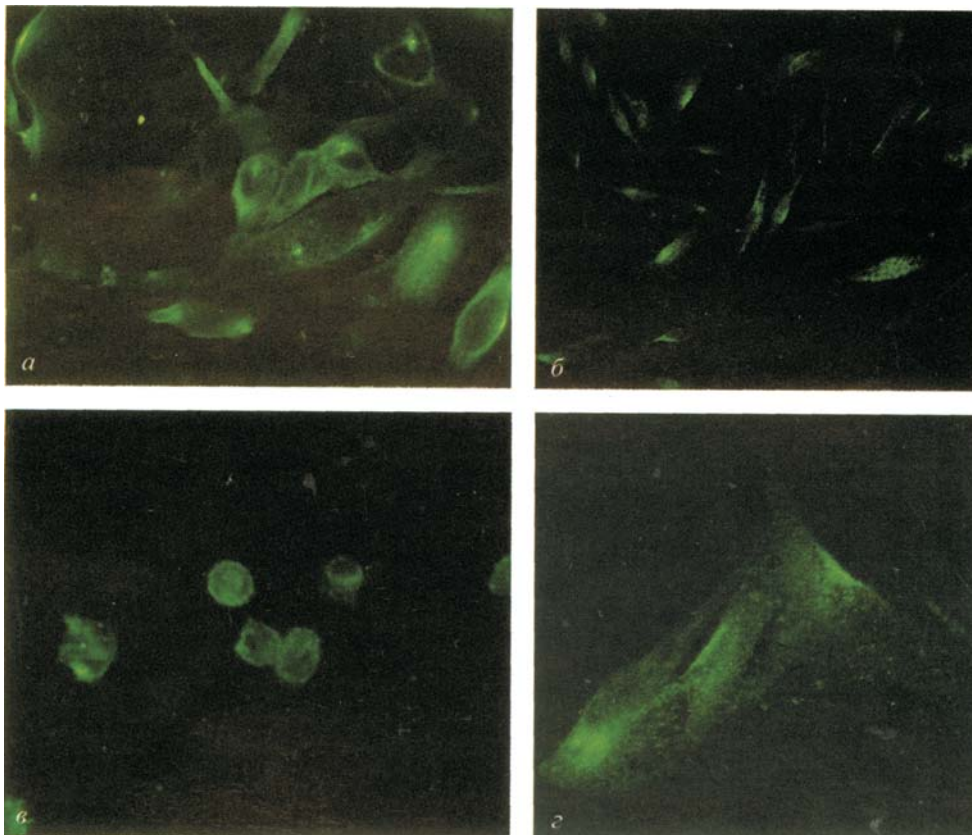


Рис. 1. Экспрессия ПБР в нормальных и опухолевых клетках кожи.

a — нормальные кератиноциты, *б* — нормальные меланоциты, *в* — клетки плоскоклеточного рака кожи, *г* — клетки меланомы кожи. Об. 40×.

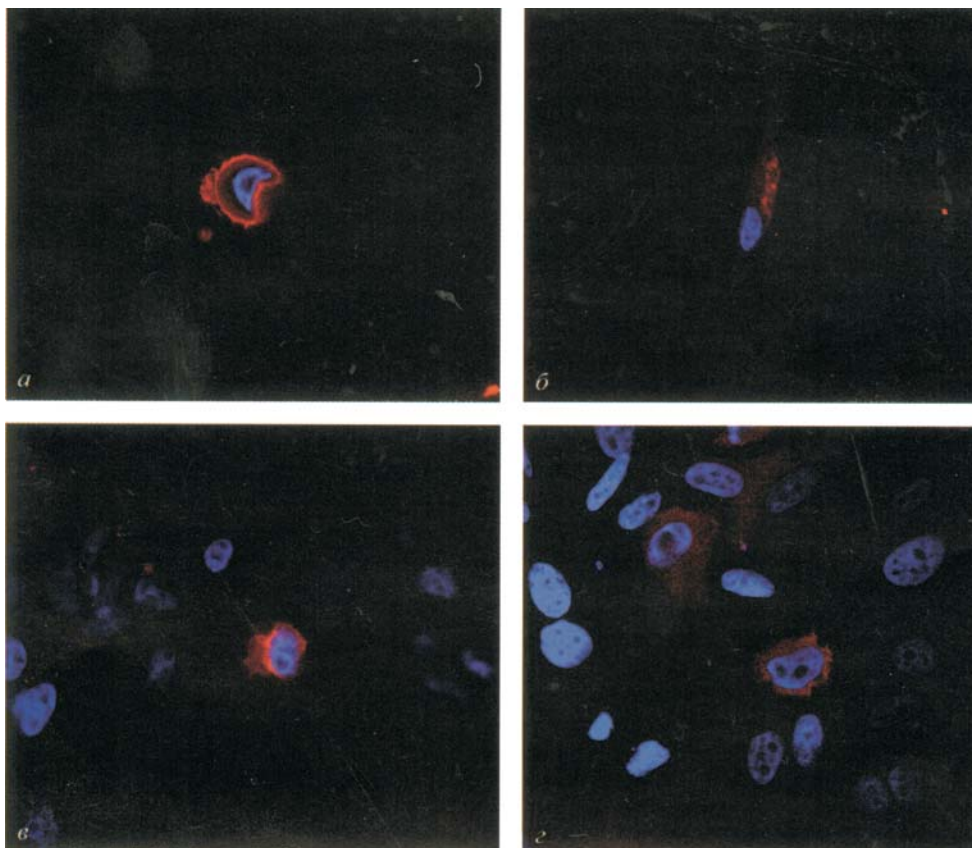


Рис. 2. Экспрессия цитохрома P450_{SCC} в нормальных и опухолевых клетках кожи.

а — нормальные кератиноциты, *б* — нормальные меланоциты, *в* — клетки плоскоклеточного рака кожи, *з* — клетки меланомы кожи. Красный цвет — цитохром P450_{SCC}, синий — ядра клеток. Об. 40×.

иммуноблотинга было обнаружено, что уровень ингибитора связывания диазепама достоверно снижен в клетках плоскоклеточного рака и меланомы (рис. 3).

Выявленное снижение уровня экспрессии ПБР в культурах клеток плоскоклеточного рака и злокачественной меланомы кожи соответствует полученным нами ранее результатам, в которых отмечалось уменьшение ПБР⁺-клеток в биоптатах кожи больных меланомой кожи и плоскоклеточным раком (Рукша и др., 2007). Известно, что большинство злокачественных новообразований

характеризуется повышением экспрессии ПБР, которое некоторые авторы объясняют способностью ПБР индуцировать транспорт холестерина через мембрану не только митохондрий, но и ядра, что в свою очередь является необходимым для обеспечения пластических процессов быстро пролиферирующих клеток (Hardwick et al., 1999). Остается непонятным снижение уровня ПБР в клетках опухолей кожи.

Функционирование ПБР в коже подтверждает присутствие эндогенного лиганда ПБР — ингибитора связы-

Экспрессия цитохрома ПБР и цитохрома P450_{SCC} в клетках кожи

Клеточная линия	Число ПБР-клеток на 100 клеток	Число цитохром P450 _{SCC} ⁺ -клеток на 100 клеток
NHEK (нормальные кератиноциты)	77 ± 7	69 ± 26
HEM (нормальные меланоциты)	82 ± 10	89 ± 4
A431 (плоскоклеточный рак кожи)	5 ± 3 ^а	8 ± 3 ^а
SK-MEL-2 (меланома кожи)	6 ± 1 ^б	7 ± 2 ^б

Примечание. ^а Достоверно по сравнению с нормальными кератиноцитами ($\alpha = 0.05$). ^б Достоверно по сравнению с нормальными меланоцитами ($\alpha = 0.05$).

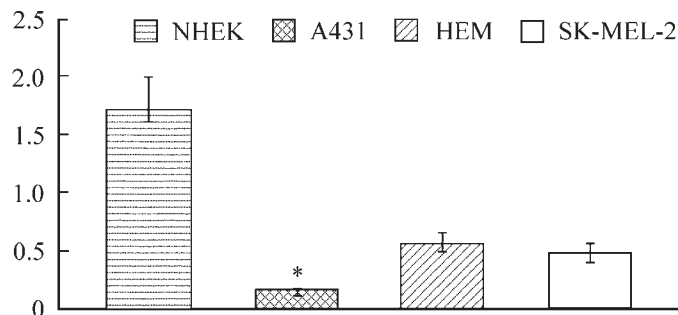


Рис. 3. Уровни ингибитора связывания диазепама в нормальных кератиноцитах (NHEK), клетках плоскоклеточного рака кожи (A431), нормальных меланоцитах (HEM), клетках меланомы кожи (SK-MEL-2).

По вертикали: DBI/G3PDH, отн. ед.; звездочкой отмечена достоверная разница по отношению к нормальным кератиноцитам ($\alpha = 0.01$).

вания диазепама в нормальных и опухолевых клетках кожи. Необходимо отметить, что функциональная роль ингибитора связывания диазепама в коже неизвестна. Вместе с тем снижение уровня ингибитора связывания диазепама в опухолевых клетках кожи согласуется с изменениями уровня экспрессии рецептора в этих клетках и косвенно может служить указанием на снижение функциональной активности ПБР.

Проведенное исследование выявило наличие фермента цитохрома P450_{SCC} во всех тестируемых типах клеток кожи, что свидетельствует о возможности локального синтеза стероидных гормонов. Синтезируемые в клетках кожи стероидные гормоны могут осуществлять свои функции посредством аутокринных (паракринных) регуляторных механизмов. Обнаруженное снижение уровня цитохрома P450_{SCC} в клетках плоскоклеточного рака и меланомы, в которых также отмечалось снижение уровня экспрессии ПБР, является свидетельством снижения интенсивности ПБР-опосредованного стероидогенеза в опухолевых клетках кожи.

Уровень стероидогенеза в коже, как и в надпочечниках, находится под воздействием аденокортикотропного гормона (АКТГ) (Slominski, Wortsman, 2000). Многочисленные экспериментальные данные указывают на присутствие АКТГ, а также других гормонов семейства производных проопиомеланокортина в коже (Slominski et al., 1996, 1998; Ancans et al., 1999). АКТГ определяется в кератиноцитах, клетках Лангерганса, меланоцитах и клетках меланомы (Nagahama et al., 1998; Slominski, Wortsman, 2000). В нормальной коже, в клетках меланомы и базально-клеточной карциномы экспрессируется рецептор АКТГ (Slominski et al., 1996; Wakamatsu et al., 1997). В свою очередь индукция АКТГ происходит при воздействии кортикотропин-релизинг-гормона. Помимо этого, синтез кортизола в меланоцитах активировал прогестерон (Slominski et al., 2005). Интересно, что при проведении хомякам с меланомой кожи билатеральной адреналэктомии регистрировали замедление роста опухоли, а после гипопизэктомии отмечали значительное снижение интенсивности клеточной пролиферации в опухоли (Stanberry, Das Gupta, 1982).

Естественно, что функционирование компонентов эндокринной системы кожи является регулируемым и динамичным и должно изменяться при воздействиях различных стимулов, в том числе поступающих из окружающей среды. В первую очередь это касается воздействия УФ. Оно вызывает увеличение синтеза кортикотропин-релизинг-гормона, стимулирует экспрессию генов гормонов семейства производных проопиомеланокортина (АКТГ, α -меланоцитостимулирующего гормона, β -липотропина и β -эндорфина) в нормальных и малигнизированных кератиноцитах и меланоцитах (Luger et al., 1998; Chakraborty et al., 1999; Scholzen et al., 1999; Gantz et al., 2003). УФ модулирует экспрессию рецепторов меланоцитостимулирующего гормона в нормальных и малигнизированных кератиноцитах и меланоцитах, что сопряжено со стимуляцией меланогенеза в меланоцитах (Slominski, Wortsman, 2000).

С другой стороны, доказано, что УФ является одним из главных факторов, индуцирующих развитие злокачественных новообразований кожи. ПБР является фоточувствительным белком, изменения структуры которого зарегистрированы после воздействия УФ (Рукша, 2008). Таким образом, вероятно, что в клетках кожи может происходить ПБР-опосредованное изменение функцио-

нирования механизмов, регулирующих интенсивность пролиферации клеток, что сопряжено с изменением интенсивности стероидогенеза в коже. Данные события являются одним из этапов злокачественной трансформации клеток кожи.

Список литературы

- Рукша Т. Г. 2008. Изменение структуры периферического бензодиазепинового рецептора в клетках меланомы кожи после воздействия ультрафиолетовым излучением. Рос. онкол. журн. 6 : 22—24.
- Рукша Т. Г., Прохоренков В. И., Салмина А. Б., Труфанова Л. В., Таксанова Е. И., Петрова Л. Л. 2004. Апоптоз кератиноцитов и экспрессия периферических бензодиазепиновых рецепторов при псориазе. Вестн. дерматол. венерол. 5 : 4—6.
- Рукша Т. Г., Салмина А. Б., Соколов В. Д., Максимова Т. В., Анисимов Ю. А. 2007. Экспрессия периферического бензодиазепинового рецептора, PCNA, каспазы-3 в клетках меланомы и плоскоклеточного рака кожи. Бюл. экспер. биол. мед. 144 (7): 87—89.
- Ancans J., Thody A. J., Wood J. M., Beazley W. D., Schallreuter K. U. 1999. Human epidermal proopiomelanocortin (POMC) cDNA variant is identical to mouse. POMC. 112 : 516—517.
- Black S. M., Szklarz G. D., Harikrishna J. A., Lin D., Wolf C. R., Miller W. L. 1993. Regulation of proteins in the cholesterol side-chain cleavage system in JEG-3 and Y-1 cells. Endocrinology. 132 : 539—545.
- Bribes E., Galiegue S., Bourrie B., Casselas P. 2003. Involvement of the peripheral benzodiazepine receptor in the development of cutaneous pathology in Mrl/Lpr mice. Immunol. Lett. 85 : 13—18.
- Chakraborty A. K., Funasaka Y., Slominski A., Bolognia J., Sodi S., Ichihashi M., Pawelek J. M. 1999. UV light and MSH receptors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 885 : 41—46.
- Decaudin D., Castedo M., Nemati F., Beurdeley A., De Pinieux G., Caron A., Pouillart P., Wijdenes J., Rouillard D., Kroemer G., Poupon M.-F. 2002. Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res. 62 : 1388—1393.
- Gantz I., Fong T. M. 2003. The melanocortin system. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 284 : E468—E474.
- Hardwick M., Fertikh D., Culty M., Li H., Vidic B., Papadopoulos V. 1999. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer. Cancer Res. 59 : 831—842.
- Krueger K. E., Papadopoulos V. 1992. Mitochondrial benzodiazepine receptors and the regulation of steroid biosynthesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 : 211—237.
- Li H., Yao Z., Degenhardt B., Teper G., Papadopoulos V. 2001. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. PNAS. 98 : 1267—1272.
- Luger T., Scholzen T., Brzoska T., Becher E., Slominski A., Paus R. 1998. Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by α -melanocyte-stimulating hormone. Ann. N. Y. Acad. Sci. 840 : 381—394.
- Morgan J., Oseroff A. R., Cheney R. T. 2004. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor is decreased in skin cancers in comparison with normal skin. Br. J. Dermatol. 151 : 846—856.
- Nagahama M., Funasaka Y., Fernandez-Frez M. L., Ohashi A., Chakraborty A. K., Ueda M., Ichihashi M. 1998. Immunoreactivity of α -melanocyte-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and β -endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi. Br. J. Dermatol. 138 : 981—985.
- Scholzen T. E., Brzoska T., Kalden D.-H., O'Reilly F., Armstrong C. A., Luger T. A., Ansel J. C. 1999. Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormone in the skin: mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation. J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 4 : 55—59.

Slominski A. 1998. Identification of β -endorphin, α -MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma and squamous cell carcinoma cells by RP-HPLC. *Exp. Dermatol.* 7 : 213—216.

Slominski A., Ermak G., Mihm M. 1996. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 2746—2749.

Slominski A., Wortsman J. 2000. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.* 21 : 457—487.

Slominski A., Zbytek B., Szczesniowski A., Semak I., Kaminski J., Sweatman T., Wortsman J. 2005. CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 : E701—E706.

Slominski A., Zjawiony J., Wortsman J., Semak I., Stewart J., Pisarchik A., Sweatman T., Marcos J., Dunbar C., Tuckey R. C. 2004. A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450_{sc} system in mammalian skin. *Eur. J. Biochem.* 271 : 4178—4188.

Stanberry L. R., Das Gupta C. W. 1982. Beattie biological behavior of MM1 hamster melanoma. *Cancer Res.* 42 : 2238—2241.

Stoebner P. E., Carayon P., Casellas P., Portier M., Lavabre-Bertrand T., Cuq P., Cano J. P., Meynadier J., Meunier L. 2001. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 8 : 747—753.

Stoebner P. E., Carayon P., Penarier G., Frechin N., Barneon G., Casellas P., Cano J. P., Meynadier J., Meunier L. et al. 1999. The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin: the relationship with epidermal cell differentiation. *Br. J. Dermatol.* 140: 1010—1016.

Wakamatsu K. A., Graham A., Cook D., Thody A. J. 1997. Characterization of ACTH peptides in human skin and their activation of melanocortin-1 receptor. *Pigment. Cell Res.* 10 : 288—297.

Поступила 23 XII 2008

STEROIDOGENESIS-RELATED PROTEINS EXPRESSION IN SKIN CELLS

T. G. Ruksha

Krasnoyarsk State Medical University;
e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

Peripheral benzodiazepine receptor (PBR, TsPO) is an outer mitochondrial membrane protein which is implicated in steroid biosynthesis regulation, apoptosis and cell proliferation. Immunocytochemical assay revealed decreased levels of PBR, its endogenous ligand DBI and cytochrome P450_{sc} in malignant skin cells in comparison to normal keratinocytes and melanocytes. These data indicate diminished steroidogenesis in skin cancer.

Key words: peripheral benzodiazepine receptor, cytochrome P450_{sc}, steroidogenesis, cell proliferation, skin cancer.