

УДК 577.218

<https://doi.org/10.17816/MAJ16437>

ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Некрасова¹, К.В. Данько², В.С. Шавва¹, Э.Б. Дижэ¹, Г.Н. Олейникова¹, С.В. Орлов^{1,2}¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Некрасова Е.В., Данько К.В., Шавва В.С., и др. Действие инсулина на экспрессию гена аполипопротеина А-I в макрофагах человека // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 1. – С. 65–74. <https://doi.org/10.17816/MAJ16437>

Поступила: 14.01.2020

Одобрена: 20.02.2020

Принята: 02.03.2020

Цель исследования — изучить влияние инсулина на уровень экспрессии гена аполипопротеина А-I (*apoA-I*) в макрофагах человека и выявить основные сигнальные каскады, ответственные за инсулин-опосредованную регуляцию.

Материалы и методы. Работа выполнена на макрофагах, дифференцированных из линии острой моноцитарной лейкемии ТНР-1, и на макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека. Анализ экспрессии гена *apoA-I* на уровне РНК проведен методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, на уровне белка — методом проточной цитофлуорометрии. Для выявления сигнальных каскадов, ответственных за инсулин-опосредованную регуляцию гена *apoA-I* в макрофагах, использован ингибиторный анализ.

Результаты. Инсулин индуцирует транскрипцию гена *apoA-I* в макрофагах человека, но приводит к снижению уровня аполипопротеина А-I, связанного с наружной поверхностью мембраны. За индукцию транскрипции *apoA-I* в ответ на стимуляцию макрофагов инсулином отвечает сигнальный каскад PI3K — АКТ и факторы транскрипции NF-κB и LXRs.

Заключение. С учетом полученных ранее данных можно предположить, что стимуляция макрофагов инсулином повышает уровень мРНК аполипопротеина А-I и таким образом увеличивает амплитуду противовоспалительного ответа, заключающегося в резком возрастании уровня поверхностного аполипопротеина А-I в макрофагах при действии на них провоспалительных стимулов (фактора некроза опухоли альфа, липополисахаридов).

Ключевые слова: аполипопротеин А-I; инсулин; макрофаги человека; NF-κB; LXR; АКТ; PI3K.

EFFECT OF THE INSULIN ON THE APOLIPOPROTEIN A-I GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES

E.V. Nekrasova¹, K.V. Danko², V.S. Shavva¹, E.B. Dizhe¹, G.N. Oleinikova¹, S.V. Orlov^{1,2}¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Nekrasova EV, Danko KV, Shavva VS, et al. Effect of the insulin on the apolipoprotein A-I gene expression in human macrophages. *Medical Academic Journal*. 2020;20(1):65-74. <https://doi.org/10.17816/MAJ16437>

Received: January 14, 2020

Revised: February 20, 2020

Accepted: March 2, 2020

The aim of the article — to study the effect of insulin on apolipoprotein A-I gene expression level in human macrophages and to reveal the main signal cascades which take part in the insulin-mediated regulation of apolipoprotein A-I gene.

Materials and methods. The experiments were carried out on the macrophages differentiated from acute monocytic leukemia cell line THP-1 and on the macrophages differentiated from the monocytes isolated from peripheral human blood. The analysis of *apoA-I* gene expression was performed by RealTime RT-PCR (on the mRNA level)

Список сокращений

ЛПВП — липопротеины высокой плотности; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; ЛПС — липополисахариды; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЦР в реальном времени (англ. RealTime PCR) — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; ABCA1 — АТФ-связанный касетный транспортер подсемейства А1; apoA-I — аполипопротеин А-I; BSA — бычий сывороточный альбумин; FCS — телячья эмбриональная сыворотка; PBS — натрий-фосфатный буфер; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; TNFα — фактор некроза опухоли альфа.

and by flow cytofluorometry. To study the signalling cascades which take part in the insulin-mediated regulation of *apoA-I* gene the inhibitory analysis was used.

Results. Insulin induces the human *apoA-I* gene transcription in macrophages, but decreases the level of the ApoA-I protein which binds to outer cytoplasmic membrane of macrophages. The insulin-mediated transcription of *apoA-I* gene depends on PI3K-AKT signal cascade and transcription factors NF- κ B and LXRs.

Conclusions. Taking into account our previous data it is plausible to conclude that the elevation of ApoA-I mRNA in human macrophages after insulin treatment leads to an increase of the amplitude of macrophages anti-inflammatory response, which consists in a sharp rise in the level of surface ApoA-I in macrophages under the some proinflammatory stimuli (TNF α , LPS).

Keywords: apolipoprotein A-I; insulin; human macrophages; NF- κ B; LXR; AKT; PI3K.

Введение

Циркуляция липидов в плазме крови млекопитающих — важнейший процесс, обеспечивающий жизнедеятельность организма. Нарушения липидного обмена у человека (дислипидотеинемии) приводят к развитию ряда серьезных заболеваний, включая атеросклероз. При этом снижение уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), принимающих участие в обратном транспорте холестерина из периферических тканей в печень, в плазме крови является одним из факторов риска развития атеросклероза [1]. Помимо участия в обратном транспорте холестерина, аполипопротеин А-I (ApoA-I) функционирует в качестве кофактора лецитинхолестеринацилтрансферазы [2], проявляет антиоксидантные свойства [3], а также способен ограничивать воспалительные реакции. В частности, показана способность ApoA-I блокировать активацию макрофагов Т-лимфоцитами и ограничивать продукцию фактора некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкина 1 бета [4, 5]. ApoA-I угнетает и другой провоспалительный фактор — С-реактивный белок [6]. С другой стороны, ApoA-I служит негативным показателем острой фазы воспалительного ответа — при развитии воспаления экспрессия гена *apoA-I* в печени и тонкой кишке резко снижается [7–9], а циркулирующий в плазме крови белок ApoA-I вытесняется из ЛПВП сывороточным амилоидом и разрушается сывороточными протеазами [4]. Установлено, что главными транспортерами холестерина к местам синтеза стероидных гормонов в стероидогенных тканях и органах млекопитающих (включая человека) являются ЛПВП, а белок, контролирующий этот процесс, — ApoA-I [10]. Основной белковый компонент ЛПВП млекопитающих — ApoA-I (более 70 % общего содержания белка ЛПВП у человека) [11]. У человека ApoA-I в основном синтезируется в печени и тонкой кишке [12]. В предыдущих исследованиях мы показали экспрессию гена *apoA-I* человека на уровне мРНК и белка в клетках моноцитарно-макрофагального

ряда [13–15]. Дифференцировка моноцитов в макрофаги приводит к разделению единой по уровню ApoA-I популяции моноцитов на ApoA-I-бедные и ApoA-I-богатые макрофаги [13, 14]. Уровень эндогенного ApoA-I коррелирует с уровнем АТФ-связанного кассетного транспортера подсемейства A1 (ABCA1). Более того, эндогенный ApoA-I способен стабилизировать ABCA1 [13]. В отличие от гепатоцитов, в которых секреция ApoA-I приводит к формированию ЛПВП в плазме крови, в макрофагах секретируемый ApoA-I связан с внешней поверхностью цитоплазматической мембраны (поверхностный ApoA-I макрофагов). Это в значительной степени обусловлено взаимодействием ApoA-I с кассетным транспортером ABCA1 [13]. Подавление синтеза ApoA-I в макрофагах человека способствует усилению их провоспалительной активности, в частности, повышается базовая продукция провоспалительного цитокина TNF α , рецептора липополисахаридов (ЛПС) — толл-подобного рецептора 4 (TLR4) (может также взаимодействовать с модифицированными липопротеинами низкой плотности — ЛПНП), а также повышается уровень воспалительного ответа на ЛПС [13]. В свою очередь, уровень экспрессии *apoA-I* в моноцитах и макрофагах повышается (как на уровне мРНК, так и на уровне белка) при стимуляции макрофагов TNF α [14] или в условиях гипоксии [15]. Полученные данные позволяют рассматривать эндогенный ApoA-I как важный модулятор функционального состояния макрофагов.

Регуляция экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека носит зеркальный характер относительно регуляции в основных местах синтеза данного белка — гепатоцитах и энтероцитах тонкой кишки. В частности, стимуляция клеток провоспалительным цитокином TNF α приводит к подавлению активности гена *apoA-I* в клетках HepG2 (модель гепатоцитов) и клетках Caco-2 (модель энтероцитов) [7–9], но активирует экспрессию гена *apoA-I* в моноцитах и макрофагах человека [13, 14]. Более того, факторы транскрипции LXR α и LXR β , являющиеся лиганд-зависи-

мыми репрессорами гена *apoA-I* в гепатоцитах [8, 16], в моноцитах и макрофагах активируют ген *apoA-I* [14]. Причинами подобной зеркальной регуляции могут быть белок-белковые взаимодействия между ядерными рецепторами LXR α и факторами транскрипции FOXO1 и FOXA2 (специфичен для гепатоцитов и эритроцитов, отсутствует в моноцитах и макрофагах) [17, 18].

Инсулин играет центральную роль в поддержании гомеостаза углеводов и липидов в организме [19]. Нарушения инсулинового сигналинга приводят к развитию сахарного диабета 2-го типа и вносят существенный вклад в развитие метаболического синдрома [20–22]. Роль инсулина в воспалительном процессе довольно противоречива. С одной стороны, известно, что инсулин блокирует ряд провоспалительных сигнальных путей и подавляет экспрессию провоспалительных генов [23–25]. С другой стороны, инсулин может проявлять провоспалительные свойства. Так, например, инсулин усиливает секрецию TNF α и IL-6 в макрофагах, дифференцированных из клеток ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека), индуцированных с помощью ЛПС [26]. Инсулин усиливает захват макрофагами модифицированных ЛПНП через индукцию экспрессии одного из сквенджер-рецепторов (CD36) и ограничивает отток холестерина из макрофагов на ЛПВП, снижая уровень ABCA1 в макрофагах [27]. В гепатоцитах инсулин подавляет синтез ApoA-I через факторы транскрипции FOXO1 и LXR α [17]. Ничего не известно о возможной регуляции экспрессии гена *apoA-I* инсулином в макрофагах человека.

Цель данной работы заключалась в изучении действия инсулина на экспрессию гена *apoA-I* в макрофагах человека и выявлении основных сигнальных каскадов, принимающих участие в такой регуляции.

Материалы и методы

Реактивы для работы были получены от зарубежных (Sigma-Aldrich, ThermoFisher, R&D Systems) и российских производителей. Агонист LXR α (TO901317), ингибиторы сигнальных путей (ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) LY2940023, ингибитор NF- κ B QNZ) и инсулин были получены от фирмы Sigma-Aldrich. Моноклональные мышинные антитела к ApoA-I человека приобретены у компании Bio-Rad (кат. номер 0650-0050). В качестве вторых антител использовали ослиные антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные DyLight-649 (Abcam, кат. номер ab6669-1).

Клеточные культуры и макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека

В работе использовали линию клеток ТНР-1, полученную из банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (FCS) (HyClone), в атмосфере 5 % CO $_2$ при 37 °С. Дифференцировку моноцитов ТНР-1 в макрофаги проводили, инкубируя моноциты с форбол-12-миристан-13-ацетатом (англ. phorbol 12-myristate 13-acetate — PMA) (50 нг/мл) по протоколу, описанному ранее [28].

Консервированную донорскую кровь, непригодную для переливания, закупали на станции переливания крови (Московский пр., 104), перевозили в здание отдела биохимии Института экспериментальной медицины в охлажденном виде. Доноры подписывали информированное добровольное согласие. Для получения первичных макрофагов выделяли мононуклеары из крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола, как описано в [29]. Для этого в 50-миллилитровые пробирки наливали 15 мл фикола и сверху наслаивали 35 мл крови, центрифугировали 30 мин (2000 об/мин (1500 g), 18 °С). Затем отбирали слой, содержащий мононуклеарные клетки, и дважды отмывали раствором Хенкса. Осадок ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10 % FCS, разливали по лункам планшетов и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO $_2$ в течение 2 ч для адгезии моноцитов. После этого моноциты отмывали от не прикрепившихся к субстрату клеток (лимфоциты) в растворе Хенкса, к отмывым моноцитам добавляли свежую культуральную среду RPMI-1640, содержащую 10 % FCS, и дифференцировали моноциты в макрофаги при 37 °С в атмосфере 5 % CO $_2$ в течение 5 сут.

Выделение РНК, реакции обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Выделение РНК, постановка реакций обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (англ. RealTime PCR) описаны ранее [8]. Тотальную РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента RNA STAT-60 (Tel-Test) в соответствии с инструкциями изготовителя. Остатки геномной ДНК удаляли обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз (Roche Applied Science) в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением натриевой соли

этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) до конечной концентрации 2 мМ с последующей инактивацией ДНКазы I прогреванием при 70 °С в течение 15 мин. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy 2 (BioTek). Отношение оптических плотностей при длинах волн 260 и 280 нм было выше 2, и отношение оптических плотностей при 260 и 230 нм было выше 1,7. Отсутствие деградации РНК проверяли электрофорезом в 1 % агарозном геле по сохранению целостности рибосомных РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции брали равное количество РНК для всех точек. Реакцию обратной транскрипции (с 1 мкг тотальной РНК) проводили с помощью праймеров oligo-dT и специфических 3'-праймеров к гену *apoA-I* и реактивов компании Promega.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени осуществляли по технологии Taqman или по интеркаляции SYBRGreen с применением амплификатора CFX-96 производства компании Bio-Rad. Компоненты реакционной смеси были приобретены у компании Синтол (Москва, Россия). Праймеры и флуоресцентные пробы для *apoA-I* и референсных генов, кодирующих 60S кислый рибосомальный белок P0 (RPLP0), циклофилин А и β-актин, были описаны ранее [8, 13, 17, 30]. Относительный уровень мРНК гена *apoA-I* оценивали совместно с детекцией референсных генов в той же реакции (мультиплексная ПЦР). Нормализацию результатов выполняли по геометрическому среднему из трех референсных генов, как описано ранее [31]. Число циклов ПЦР для каждого гена, при котором уровень флуоресценции превышал в 10 раз значения стандартного отклонения флуктуаций в фоновой флуоресценции, определяли с помощью CFX-96 RealTime PCR System and automated software (Bio-Rad). Относительные значения уровня мРНК *apoA-I* (в процентах относительно контрольного образца) вычисляли по формуле

$$2^{(Ct(\text{control}) - Ct(\text{опыт}))} \cdot 100.$$

Проточная цитофлуориметрия

Макрофаги фиксировали в 4 % формальдегиде в течение 10 мин при 22 °С, отмывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере (PBS) с 0,1 М глицина и инкубировали 40 мин при 22 °С с блокирующим буфером (PBS, 1 % бычий сывороточный альбумин (BSA), 3 % FCS, неспецифические человеческие иммуноглобулины G (1 мкг/мл) и 0,02 % Tween-20). Клетки ТНР-1 обрабатывали мышинными моноклональными антителами против человеческого

ApoA-I (Bio-Rad, кат. номер 0650-0050), разведение 1/250 (PBS, 1 % BSA и 0,02 % Tween-20), в течение 2 ч при 22 °С, отмывали 3 раза в PBS и инкубировали со вторыми ослиными поликлональными антителами против мышинных белков иммуноглобулинов G, конъюгированных с красителем DyLight 649 (Abcam, кат. номер ab6669-1), разведение 1/1000 (PBS, 1 % BSA и 0,02 % Tween-20), в течение часа при 22 °С. Затем клетки отмывали 3 раза в PBS и фиксировали в PBS с 1 % формальдегидом для проточной цитофлуориметрии. Клетки ТНР-1, обработанные вторичными антителами, но не инкубированные с антителами против ApoA-I, использовали в качестве контроля специфичности иммуноокраски (изотип-контроль). Проточная цитофлуориметрия и клеточный сортинг были проведены с применением Epics Altra flow cytometer (Beckman Coulter, США) и программы FCSalyzer (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

Статистический анализ

Результаты представляли как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли путем проверки по критерию Стьюдента (non-paired *t*-test) и Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все статистические анализы выполняли в программе Statistica 5.0 (StatSoft, Inc., США).

Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях мы показали дозозависимое действие инсулина на активность гена *apoA-I* в гепатоцитах [17]. При концентрации 0,7 нМ экспрессия *apoA-I* усиливалась через 24 ч, через 48 ч эффект исчезал. Добавление к гепатоцитам инсулина в концентрации 100 нМ не оказывало эффекта на уровень мРНК *apoA-I* через 24 ч инкубации, но приводило к подавлению экспрессии гена через 48 ч инкубации. Возможное влияние инсулина на синтез *apoA-I* в макрофагах человека оценивали методом ПЦР в реальном времени, используя две концентрации инсулина — 0,7 и 100 нМ. Первая концентрация соответствует физиологическому уровню инсулина в крови после приема пищи. Инсулин в концентрации 100 нМ применяют в экспериментах *in vitro* стандартно. В качестве положительного контроля использовали TNFα (20 нг/мл), который стимулирует экспрессию гена *apoA-I* в макрофагах человека [14]. Во всех точках время инкубации клеток (либо макрофагов, дифференцированных из моноцитов перифе-

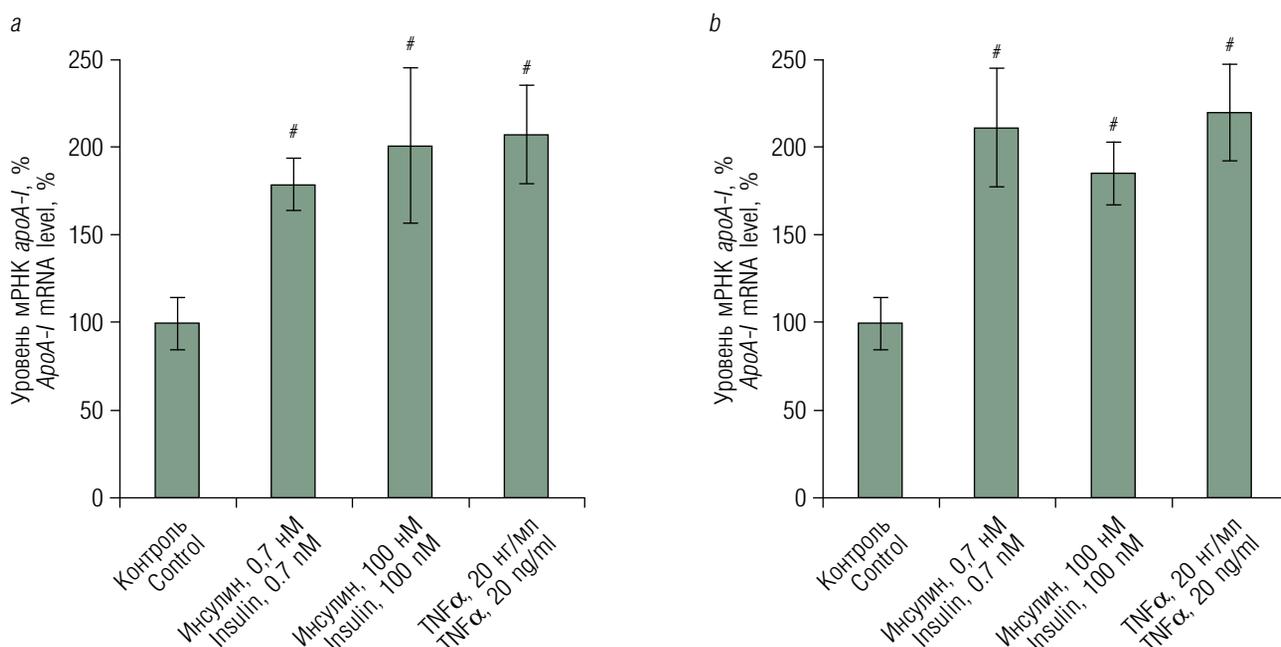


Рис. 1. Повышение уровня матричной РНК *apoA-I* в макрофагах под действием инсулина. Макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека в течение 5 сут (а), макрофаги ТНР-1 (б). Указан относительный уровень экспрессии мРНК *apoA-I*, где за 100 % принят уровень мРНК в нестимулированных макрофагах. На диаграммах представлены средние значения \pm ошибка среднего. $^{\#}p < 0,01$ (*t*-критерий)

Fig. 1. The elevation of *ApoA-I* mRNA level in human macrophages after insulin treatment. The macrophages differentiated for 5 days from human monocytes isolated from peripheral blood (a), THP-1 macrophages (b). The diagrams show the relative *apoA-I* gene expression level (100% in the unstimulated macrophages). The diagrams show the mean values \pm the standard error of mean. $^{\#}p < 0.01$ (*t*-test)

рической крови человека в течение 5 суток, либо макрофагов ТНР-1) с инсулином составляло 24 ч. Усредненные результаты четырех экспериментов представлены на рис. 1.

Обе концентрации инсулина приводили к существенной стимуляции экспрессии гена *apoA-I* как в макрофагах, дифференцированных из клеток ТНР-1, так и в макрофагах, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека. Уровень стимуляции оказался сопоставим с уровнем стимуляции при действии TNF α . Синтез белка ApoA-I контролируется не только через транскрипцию, но и на посттранскрипционном уровне. Кроме того, для этого гена характерна разнонаправленная регуляция на уровне мРНК и белка. Так, например, стимуляция клеток гепатомы человека НерG2 грамоксеном (индуктор оксидативного стресса) приводила к одновременной индукции транскрипции гена *apoA-I* и ускорению деградации мРНК *apoA-I* [32]. В наших исследованиях было установлено, что инкубация клеток НерG2 с инсулином (100 нМ) в течение 24 ч не вызывает заметных изменений в уровне мРНК *apoA-I*, но существенно повышает количество внутриклеточного белка ApoA-1 [17]. В отличие от гепатоцитов и энтероцитов, где подавляющая часть всего ApoA-I секретирует-

ся в составе насцентных ЛПВП, в макрофагах в норме полноценной секреции не происходит. Вместо этого ApoA-I остается в мембраносвязанном состоянии, образуя комплекс с ABCA1 и/или с рафтами цитоплазматической мембраны [13]. Более того, предварительные результаты позволяют утверждать, что функциональное значение в макрофагах имеет именно мембраносвязанная форма ApoA-I, так как существуют сильные корреляции между количеством мембраносвязанного ApoA-I и функциональной активностью макрофагов (воспалительная активность, захват модифицированных ЛПНП, миграционная активность) (Некрасова и др., неопубликованные данные). Действие инсулина на уровень поверхностного белка ApoA-I проверяли методом проточной цитофлуориметрии. Макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека в течение 5 сут, инкубировали с инсулином в концентрации 100 нМ в течение 24 ч, затем окрашивали антителами к ApoA-I (см. «Материалы и методы»). Результаты представлены на рис. 2. Установлено, что обработка первичных макрофагов инсулином (100 нМ, 24 ч) приводит к снижению содержания поверхностного ApoA-I, несмотря на то что в тех же условиях эксперимента наблюдается повышение уровня

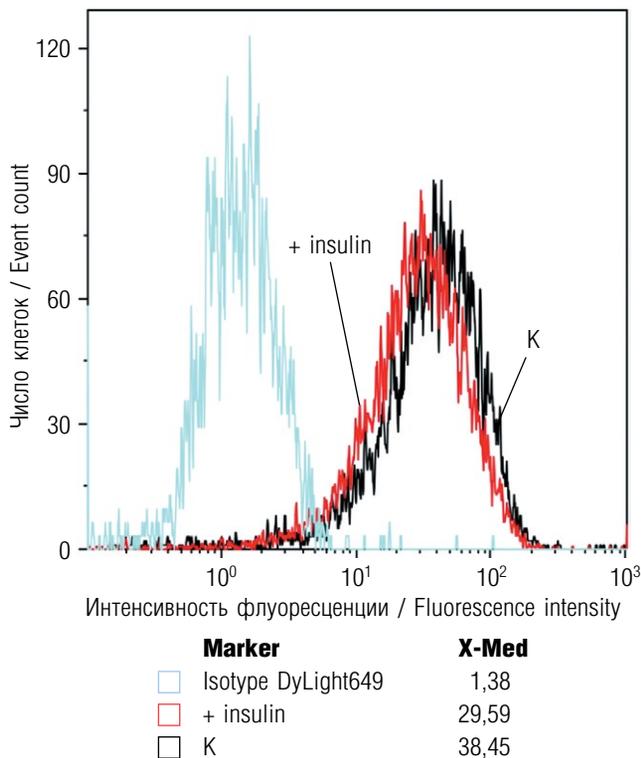


Рис. 2. Уменьшение уровня поверхностного белка ApoA-I в макрофагах под действием инсулина. К — контрольные, не обработанные инсулином макрофаги; + insulin — макрофаги, инкубированные с инсулином; X-Med — медиана интенсивности флуоресценции

Fig. 2. The ApoA-I surface level on human macrophages decreases by insulin treatment. K — control macrophages without treatment with insulin; + insulin — macrophages, treated by insulin; X-Med — median fluorescence intensity

мРНК этого гена. Полученные результаты еще раз подтверждают сложный и многоуровневый характер регуляции экспрессии гена *apoA-I*, не исчерпывающийся регуляцией инициации

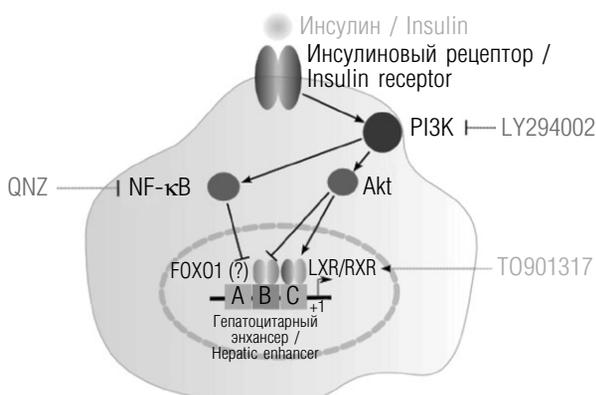


Рис. 3. Схема сигнальных каскадов, инициируемых инсулином: QNZ — ингибитор NF-κB; LY294002 — ингибитор PI3K; TO901317 — агонист LXRα

Fig. 3. The scheme of signal cascades initiated by insulin: QNZ — the inhibitor of NF-κB; LY294002 — the inhibitor of PI3K; TO901317 — the agonist of nuclear receptors LXRα and LXRβ

транскрипции. Для детального анализа этих механизмов регуляции необходимы дополнительные исследования.

Инсулин, взаимодействуя со своим мембранным тирозинкиназным рецептором, инициирует ряд сигнальных каскадов (рис. 3). Для выяснения возможного участия данных каскадов в инсулин-зависимой активации гена *apoA-I* в макрофагах человека мы применили ингибиторный анализ. Макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека в течение 5 сут, обрабатывали ингибитором NF-κB QNZ с концентрацией 10 нМ, агонистом LXR TO901317 с концентрацией 5 мкМ, ингибитором PI3K LY2940023 с концентрацией 10 мкМ в течение часа. Затем к клеткам добавляли инсулин 100 нМ, инкубировали 24 ч. Потом из клеток выделяли РНК и измеряли уровень экспрессии *apoA-I*, используя метод ПЦР в реальном времени. Усредненные результаты четырех экспериментов представлены на рис. 4.

Установлено, что блокирование любого из протестированных сигнальных путей — фактора транскрипции NF-κB, PI3K или активация факторов транскрипции LXRs — приводит к отмене стимулирующего эффекта инсулина на уровень мРНК *apoA-I*. Следовательно, индукция транскрипции *apoA-I* в присутствии инсулина зависит от совместного действия минимум двух сигнальных каскадов, завершающихся на факторах транскрипции NF-κB и LXRs. Кроме того, нельзя исключать возможное участие в этом процессе фактора транскрипции FOXO1, который способен образовывать комплекс с LXRβ. Более того, инсулин-индуцированное удаление такого комплекса с промотора гена *apoA-I* в гепатоцитах объясняет репрессорное действие инсулина (100 нМ) на активность данного гена [17]. Роль FOXO1 в инсулин-опосредованной стимуляции экспрессии гена *apoA-I* в макрофагах человека еще предстоит изучить. Исходя из результатов наших предыдущих работ и литературных данных, в гепатоцитах инсулин может регулировать экспрессию *apoA-I* через фосфатидилинозитол-3-киназу, протеинкиназы B и C и фактор транскрипции Sp1 [17, 33]. Вместе с тем протеинкиназа B в макрофагах фосфорилирует IκB-киназу и активирует фактор транскрипции NF-κB. Обработка макрофагов ингибитором NF-κB не только отменяет эффект инсулина, но и снимает стимулирующее действие TNFα [14]. Более того, в гепатоцитах фактор транскрипции NF-κB играет ключевую роль в подавлении активности гена *apoA-I* под действием ЛПС [34] или TNFα [8]. Интересно, что промотор гена *apoA-I* не содержит сай-

тов связывания для фактора транскрипции NF-κB [34]. По-видимому, основным механизмом действия NF-κB является трансрепрессия со стороны ядерных рецепторов, вовлеченных в регуляцию активности гена *aroA-I*. Фактор транскрипции NF-κB способен образовывать комплексы с такими ядерными рецепторами, как HNF4α, PPARα, причем образование таких комплексов ведет к взаимной инактивации обоих факторов транскрипции [34, 35]. Зеркальный характер регуляции гена *aroA-I* в гепатоцитах и макрофагах обуславливает обратный характер действия NF-κB в макрофагах по сравнению с гепатоцитами: если в гепатоцитах NF-κB принимает участие в передаче репрессивных сигналов на промотор *aroA-I* (от ЛПС [34], TNFα [8, 9]), то в макрофагах те же воздействия (ЛПС, TNFα) ведут к активации экспрессии *aroA-I*. При этом ядерный рецептор PPARα, через который действует NF-κB при передаче сигнала от ЛПС и TNFα, в гепатоцитах выступает в качестве активатора *aroA-I* [8, 9, 34], тогда как в макрофагах — в качестве репрессора *aroA-I* [14].

Остается открытым вопрос о функциональной роли инсулина в регуляции гена *aroA-I*. Можно ли считать незначимой индукцию транскрипции гена *aroA-I* в макрофагах, если параллельно уровень поверхностного AroA-I не растет, а снижается? Мы отвечаем на данный вопрос отрицательно. В предыдущих исследованиях при анализе уровня мРНК *aroA-I* в AroA-I-бедных и в AroA-I-богатых макрофагах было установлено, что количество мРНК *aroA-I* больше в AroA-I-бедных макрофагах [13]. Более того, именно AroA-I-бедные макрофаги сохраняли способность синтезировать AroA-I в ответ на такие воспалительные стимулы, как TNFα, тогда как AroA-I-богатые макрофаги утрачивали эту способность [13]. Следовательно, можно предположить, что действие инсулина усиливает будущий противовоспалительный ответ макрофагов, заключающийся в резком повышении уровня поверхностного AroA-I в качестве реакции на провоспалительные стимулы. Дальнейшие исследования, как ожидается, позволят окончательно прояснить данный вопрос.

Таким образом, в данной работе впервые показана регуляция гена *aroA-I* инсулином в макрофагах человека. Установлено, что в индукции транскрипции гена *aroA-I* под действием инсулина ключевую роль играет сигнальный каскад PI3K – АКТ и факторы транскрипции NF-κB и LXRα. Повышение уровня мРНК *aroA-I* в присутствии инсулина сопровождается снижением уровня поверхностного AroA-I.

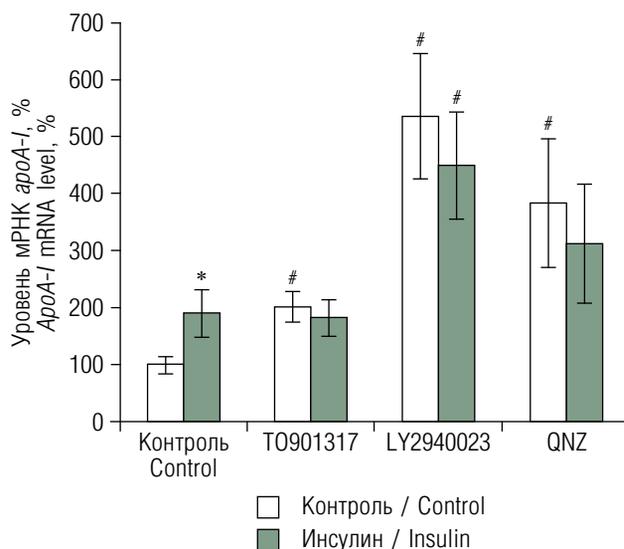


Рис. 4. Влияние инсулина на уровень мРНК *aroA-I*: роль ядерных рецепторов LXRα, PI3K и фактора транскрипции NF-κB. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *aroA-I*, где за 100 % принят уровень мРНК в нестимулированных макрофагах. На диаграмме представлены средние значения уровня мРНК *aroA-I* ± ошибка среднего. Критерий Стьюдента — * $p < 0,05$. Критерий Даннета — # $p < 0,01$. Столбцы белого цвета отображают интенсивность транскрипции в контрольных клетках, столбцы черного цвета — интенсивность транскрипции в клетках, обработанных инсулином

Fig. 4. The influence of insulin on *AroA-I* mRNA level: the role of nuclear receptors LXRα, PI3K and transcription factor NF-κB. The diagram shows the relative *aroA-I* gene expression level (100% in the unstimulated macrophages). The diagram shows the mean values ± the standard error of mean. * $p < 0,05$ (t -test); # $p < 0,01$ (Dunnet's test). White columns correspond to the unstimulated cells; black columns correspond to the cells treated by insulin

Выводы

1. Инсулин индуцирует транскрипцию гена *AroA-I* в макрофагах человека.
2. Несмотря на повышение количества мРНК *aroA-I* в стимулированных инсулином макрофагах, уровень поверхностного AroA-I в таких клетках снижен.
3. Активация транскрипции гена *aroA-I* под действием инсулина зависит от сигнального каскада PI3K – АКТ и от факторов транскрипции NF-κB и LXRα.

Дополнительная информация

Соблюдение этических норм. Все международные, национальные и/или институциональные принципы работы с донорской кровью были соблюдены.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1317-1542. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2012>.
- Никифорова А.А., Хейфиц Г.М., Алкснис Е.Г., и др. Акцепция холестерина из мембран эритроцитов подфракцией ЛПВП2b и роль лецитин-холестерин-ацилтрансферазы в этом процессе // Биохимия. — 1988. — Т. 53. — № 7-12. — С. 1334–1338. [Nikiforova AA, Kheifits GM, Alksnis EG, Parfenova NS, Klimov AN. Aktseptsiya kholesterina iz membran eritrotsitov podfraksiesy LPVP2b i rol' letsitin-kholesterin-atsiltransferazy v etom protsesse. *Biokhimiia.* 1988;53(7-12):1334-1338. (In Russ.)]
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation.* 2001;104(20):2498-2502. <https://doi.org/10.1161/hc4501.098468>.
- Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood.* 2001;97(8):2381-2389. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2381>.
- Burger D, Dayer J-M. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev.* 2002;1(1-2):111-117. [https://doi.org/10.1016/s1568-9972\(01\)00018-0](https://doi.org/10.1016/s1568-9972(01)00018-0).
- Wadham C, Albanese N, Roberts J, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation.* 2004;109(17):2116-2122. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127419.45975.26>.
- Haas MJ, Horani M, Mreyoud A, et al. Suppression of apolipoprotein AI gene expression in HepG2 cells by TNF alpha and IL-1beta. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1623(2-3):120-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2003.08.004>.
- Mogilenko DA, Dizhe EB, Shavva VS, et al. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry.* 2009;48(50):11950-11960. <https://doi.org/10.1021/bi9015742>.
- Orlov SV, Mogilenko DA, Shavva VS, et al. Effect of TNFalpha on activities of different promoters of human apolipoprotein A-I gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(2):224-230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.064>.
- Connelly MA, Williams DL. SR-BI and HDL cholesteryl ester metabolism. *Endocr Res.* 2004;30(4):697-703. <https://doi.org/10.1081/erc-200043979>.
- Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005;96(12):1221-1232. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c>.
- Higuchi K, Law SW, Hoeg JM, et al. Tissue-specific expression of apolipoprotein A-I (apoA-I) is regulated by the 5'-flanking region of the human apoA-I gene. *J Biol Chem.* 1988;263(34):18530-18536.
- Mogilenko DA, Orlov SV, Trulioff AS, et al. Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J.* 2012;26(5):2019-2030. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193946>.
- Shavva VS, Mogilenko DA, Nekrasova EV, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF-kappaB, and nuclear receptors PPARalpha and LXRs. *Mol Cell Biochem.* 2018;448(1-2):211-223. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3327-7>.
- Богомолова А.М., Шавва В.С., Никитин А.А., и др. Гипоксия как фактор регуляции экспрессии генов *apoA-1*, *ABCA1* и компонента комплемента *C3* в макрофагах человека // Биохимия. — 2019. — Т. 84. — № 5. — С. 692–703. [Bogomolova AM, Shavva VS, Nikitin AA, et al. Hypoxia as a factor involved in the regulation of the *apoA-1*, *ABCA1*, and complement *C3* gene expression in human macrophages. *Biokhimiia.* 2019;84(5):692-703. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0320972519050075>.
- Huuskonen J, Vishnu M, Chau P, et al. Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells. *Biochemistry.* 2006;45(50):15068-15074. <https://doi.org/10.1021/bi061378y>.
- Shavva VS, Bogomolova AM, Nikitin AA, et al. Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXRbeta transcription factors. *J Cell Biochem.* 2017;118(2):382-396. <https://doi.org/10.1002/jcb.25651>.
- Shavva VS, Bogomolova AM, Nikitin AA, et al. FOXO1 and LXRAalpha downregulate the apolipoprotein A-I gene expression during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22(1):123-134. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0749-6>.
- Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>.
- Bansilal S, Farkouh ME, Fuster V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2007;99(4A):6B-14B. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.11.002>.
- Fuentes L, Roszer T, Ricote M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:219583. <https://doi.org/10.1155/2010/219583>.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-246. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>.
- Fan W, Morinaga H, Kim JJ, et al. FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *EMBO J.* 2010;29(24):4223-4236. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.268>.
- Miao H, Zhang Y, Lu Z, et al. FOXO1 involvement in insulin resistance-related pro-inflammatory cytokine production in hepatocytes. *Inflamm Res.* 2012;61(4):349-358. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0417-3>.
- Su D, Coudriet GM, Hyun Kim D, et al. FoxO1 links insulin resistance to proinflammatory cytokine IL-1beta production

- in macrophages. *Diabetes*. 2009;58(11):2624-2633. <https://doi.org/10.2337/db09-0232>.
26. Iida KT, Shimano H, Kawakami Y, et al. Insulin up-regulates tumor necrosis factor- α production in macrophages through an extracellular-regulated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(35):32531-32537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009894200>.
 27. Park YM, S RK, J AM, Silverstein RL. Insulin promotes macrophage foam cell formation: potential implications in diabetes-related atherosclerosis. *Lab Invest*. 2012;92(8):1171-1180. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.74>.
 28. Tedla N, Glaros EN, Brunk UT, et al. Heterogeneous expression of apolipoprotein-E by human macrophages. *Immunology*. 2004;113(3):338-347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01972.x>.
 29. Bennett S, Breit SN. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J Leukoc Biol*. 1994;56(3):236-240. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.3.236>.
 30. Shavva VS, Mogilenko DA, Bogomolova AM, et al. PPAR γ represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNF α -mediated ApoA-I downregulation in HepG2 Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117(9):2010-2022. <https://doi.org/10.1002/jcb.25498>.
 31. Mogilenko DA, Kudriavtsev IV, Shavva VS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α -mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells. *J Biol Chem*. 2013;288(3):1726-1738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437525>.
 32. Cuthbert C, Wang Z, Zhang X, Tam SP. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by gramoxone. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14954-14960. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14954>.
 33. Haas MJ, Horani MH, Wong NC, Mooradian AD. Induction of the apolipoprotein AI promoter by Sp1 is repressed by saturated fatty acids. *Metabolism*. 2004;53(10):1342-1348. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.05.011>.
 34. Morishima A, Ohkubo N, Maeda N, et al. NF κ B regulates plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein cholesterol through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem*. 2003;278(40):38188-38193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306336200>.
 35. Nikolaidou-Neokosmidou V, Zannis VI, Kardassis D. Inhibition of hepatocyte nuclear factor 4 transcriptional activity by the nuclear factor κ B pathway. *Biochem J*. 2006;398(3):439-450. <https://doi.org/10.1042/BJ20060169>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Екатерина Викторовна Некрасова — научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена отдела биохимии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: nekrasova@iem.sp.ru.

Катерина Владимировна Данько — студент кафедры биохимии биологического факультета, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: danko@iem.sp.ru.

Владимир Станиславович Шавва — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена отдела биохимии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. SPIN-код: 5428-6800. E-mail: shavva@iem.sp.ru.

Ekaterina V. Nekrasova — scientist, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: nekrasova@iem.sp.ru.

Katerina V. Danko — student, Department of Biochemistry, Biological faculty, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: danko@iem.sp.ru.

Vladimir S. Shavva — PhD, senior scientist, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg. SPIN-code: 5428-6800. E-mail: shavva@iem.sp.ru.

Элла Борисовна Дижэ — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена отдела биохимии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. SPIN-код: 1625-0496. E-mail: dizhe@iem.sp.ru.

Галина Николаевна Олейникова — лаборант-исследователь лаборатории регуляции липидного обмена отдела биохимии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: galina@iem.sp.ru.

Сергей Владимирович Орлов — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена отдела биохимии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3134-1989>. SPIN-код: 1690-8110. E-mail: serge@iem.sp.ru.

Ella B. Dizhe — PhD, leading scientist, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg. SPIN-code: 1625-096. E-mail: dizhe@iem.sp.ru.

Galina N. Oleinikova — technical assistant, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg. E-mail: galina@iem.sp.ru.

Sergey V. Orlov — PhD, senior scientist, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg. <https://orcid.org/0000-0002-3134-1989>. SPIN-code: 1690-8110. E-mail: serge@iem.sp.ru.

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

Сергей Владимирович Орлов / Sergey V. Orlov
E-mail: serge@iem.sp.ru