

УДК 576.54

ВЛИЯНИЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ НА БЕЛОК ТРАНСПОРТЕР ABCG2 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ Caco-2

© 2023 г. А. А. Слепнев^а, Ю. В. Абаленихина^{а, *}, Н. М. Попова^а,
А. В. Шулькин^а, Е. Н. Якушева^а

^аРязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 06.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

ABCG2-белок (BCRP, белок резистентности рака молочной железы) — эффлюксный трансмембранный белок, принимающий участие в транспорте эндо- и экзогенных веществ, а также развитии резистентности опухолей к химиотерапии. В рамках настоящей работы оценивалось влияние половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Caco-2, а также роль орфанных рецепторов (фарназоид X рецептора (FXR), конститутивного андростанового рецептора (CAR), прегнан X рецептора (PXR), печеночного X рецептора подтипа альфа (LXRα)) в данном процессе. Количество ABCG2 оценивали методом вестерн-блот. Гормоны использовали в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и длительностью экспозиции 24 ч. Все гормоны во всех концентрациях вызывали повышение количества ABCG2. Ингибирование PXR и FXR препятствовало повышению уровня ABCG2 под действием прогестерона. Подавление CAR и PXR частично уменьшало экспрессию ABCG2, вызванную эстрадиолом по сравнению с изолированным воздействием эстрогена, но все равно уровень транспортера превышал показатели контроля. Ингибирование PXR и FXR снижало индуцирующее действие тестостерона, тем не менее уровень транспортера превышал показатели контроля. Таким образом, в ходе исследования было показано, что все половые гормоны во всех концентрациях повышали количество ABCG2, причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона — FXR и PXR.

Ключевые слова: ABCG2, белок резистентности рака молочной железы, орфанные рецепторы, клеточная линия Caco-2

DOI: 10.31857/S0233475523050109, **EDN:** NXXQGR

ВВЕДЕНИЕ

ABCG2-белок (BCRP, белок резистентности рака молочной железы) — мембранный транспортер массой 75 кДа, который впервые был идентифицирован в линии клеток рака молочной железы человека (MCF-7/AdrVp). Данные клетки характеризовались АТР-зависимым механизмом, который уменьшал внутриклеточное накопление и токсичность химиотерапевтического препарата митоксантрона [1].

В настоящее время установлено, что ABCG2 является членом суперсемейства ABC-транспортеров человека (подсемейство G) и использует гидролиз АТР для активного транспорта субстратов против их электрохимического градиента из клеток во внеклеточное пространство, биологические жидкости и полости органов. Функциональная единица ABC-транспортеров характеризуется двумя нуклеотид-связывающими домена-

ми (NBD) и двумя трансмембранными доменами (TMD), которые вместе образуют полость транслокации субстрата.

В отличие от многих других членов суперсемейства ABC-транспортеров, ген *ABCG2* кодирует половину белковой молекулы ABCG2 с одной цитоплазматической областью NBD, за которой следует одна область TMD, состоящая из шести α-спиралей, необходимых для распознавания и транспорта субстрата. Недавний анализ кристаллической структуры показал, что ABCG2 существует как в димерном, так и в тетрамерном состоянии, состоящем из двух димеров [2, 3].

ABCG2 обладает широкой субстратной специфичностью и способен транспортировать структурно и химически несвязанные вещества эндогенной и экзогенной природы, например, митоксантрон, метотрексат, доксорубин, топотекан, а также порфирины, желчные кислоты и эстроны [4].

ABCG2 экспрессируется в гепатоцитах, энтероцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров в мозге, тестикулах, плаценте, а также в опухолевых клетках, где он выполняет важнейшую защитную роль, ограничивая клеточное и тканевое накопление ксенобиотиков [5, 6]. Кроме того, ABCG2 принимает участие в выведении мочевой кислоты в проксимальных канальцах почек, и снижение его активности, например, в результате полиморфизмов в гене, кодирующем транспортер, может predispose к развитию подагры [7].

Механизмы регуляции ABCG2 активно изучаются в настоящее время. Учитывая высокую экспрессию ABCG2 в опухолевых клетках, чувствительных к женским половым гормонам, а также в синцитиотрофобластах плаценты в ряде исследований было показано влияние половых гормонов на данный белок-транспортер.

Обработка ER-позитивных клеток (ER — рецептор эстрогена) рака молочной железы человека T47D:A18 10 нМ 17 β -эстрадиолом в течение 24 ч индуцировала увеличение мРНК ABCG2 в 3 раза. Более того, мутации и делеции эстроген-респонсивного элемента в промоторе ABCG2 соответственно ослабляли и отменяли эту индукцию, предполагая прямую регуляторную роль эстрогена [8]. Однако клеточная линия T47D (протокол-овая карцинома молочной железы), трансфицированная конструкцией люциферазы промотора ABCG2, показала, что обработка 17 β -эстрадиолом (0.1–10000 нМ) в течение 24 ч не влияла на активность люциферазы. Авторы предположили, что отсутствие промоторной активности может быть связано с низким эндогенным уровнем ER α в этих клетках. Трансфекция клеточной линии T47D конструкцией с ER α приводила к значительной индукции активности люциферазы после обработки 17 β -эстрадиолом [9].

Эстрадиол в концентрации 100 нМ при воздействии в течение 12 и 48 ч повышал экспрессию мРНК ABCG2 (12 ч) и уровень белка (48 ч) в 1.5 раза по сравнению с контрольными носителями в первичных трофобластах, выделенных из доношенных плацент человека [10].

Инкубация клеточной линии хориокарциномы человека BeWo с прогестероном (1–10 мкМ) в течение 72 ч индуцировала экспрессию мРНК и белка ABCG2 до 2 раз [11]. Кроме того, прогестерон уменьшал внутриклеточное накопление классического субстрата ABCG2 митоксантрона, что согласуется с повышенной активностью транспортера [12].

В исследовании Yasuda и соавт. трансфицировали клеточную линию T47D плазмидой с промотором ABCG2 и люциферазой. После воздействия ряда концентраций прогестерона (1 нМ–10 мкМ) в течение 24 ч было продемонстрировано

~2.6-кратное повышение активности люциферазы. Активацию люциферазы можно было инвертировать при добавлении 100 нМ мифепристона (RU-486) — стероидного гормона, сходного по структуре с природным прогестероном [9]. Интересно, что после обработки прогестероном (0.0001 нМ–10 мкМ) в течение более длительного периода времени (48 ч) экспрессия и активность ABCG2 значительно снижались как в клеточных линиях T47D, так и в MCF-7 [13, 14].

Таким образом, в данных исследованиях были получены противоречивые результаты. При этом работы были выполнены преимущественно на опухолевых клетках-мишенях для женских половых гормонов. В то же время, учитывая локализацию ABCG2 не только в опухолевых клетках и клетках репродуктивной системы, но и в органах, участвующих в фармакокинетике лекарственных веществ (например, кишечнике, печени), актуальным является изучение влияния половых гормонов на ABCG2 и в клетках данных органов. Влияние тестостерона на данный белок-транспортер в доступной литературе обнаружено не было.

Учитывая низкую экспрессию рецепторов половых гормонов в кишечнике, можно предположить, что прогестерон, эстрадиол и тестостерон будут оказывать свои эффекты через другие рецепторы. С этих позиций обращают на себя внимание орфанные рецепторы, являющиеся членами суперсемейства ядерных рецепторов. Свое название они получили из-за того, что в отличие от классических ядерных рецепторов для них не были известны эндогенные лиганды [15]. На данный момент считается, что лигандом печеночного X рецептора подтипа альфа (LXR α) являются окистеролы, конститутивного андростанового рецептора (CAR) — андростан, прегнан X рецептора (PXR) — прегненолон 16 α -карбонитрил, фарназод X рецептора (FXR) — желчные кислоты [16–18].

Доказана важная роль LXR α в регуляции метаболизма липидов и холестерина, CAR и PXR — внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного баланса, FXR в регуляции синтеза желчных кислот. Кроме того, все эти рецепторы (LXR α , CAR, PXR, FXR) могут принимать участие в регуляции ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохромов P450), а также белков-транспортеров [19].

В ряде исследований было показано, что половые гормоны могут влиять на LXR α [20], CAR [21], PXR [22], FXR [23, 24].

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение воздействия половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Caco-2, а также оценка роли орфанных рецепторов (фарназод X рецептора, конститутивного андростанового рецептора, прегнан X рецептора,

печеночного X рецептора подтипа альфа) в данном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, Германия), с добавлением L-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich) соответственно.

Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие ABCG2 [25].

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. Прогестерон (Sigma-Aldrich, США), эстрадиол (Sigma-Aldrich), тестостерон (Sigma-Aldrich), добавляли к монослою клеток в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 ч. Клетки контрольной группы инкубировали в течение 24 ч в питательной среде с добавлением этанола (растворитель тестируемых веществ) в конечной концентрации 0.01%.

Для оценки роли орфанных рецепторов (LXR α , CAR, PXR, FXR) совместно с половыми гормонами в концентрации 10 мкМ к клеткам добавляли ингибитор LXR α 3-(3,4-Диметоксифенил)-N-[4-(трифлуорометил)фенил]-2-пропенамид (TFCA, 30 мкМ, Sigma-Aldrich) [26], ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA1, 10 мкМ, Tocris, Великобритания) [27], ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ, Sigma-Aldrich) [28], ингибитор FXR тауро- β -холевую кислоту в концентрации 200 мкМ (β -ТА, Sigma Aldrich) [29]. Ингибиторы добавляли за 30 мин до внесения гормонов.

После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с поверхности лунок раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich), трижды промывали раствором фосфатного буфера (Bio-Rad, США) и лизировали в буфере RIPA (Sigma-Aldrich) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ гидрохлорида 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил-фторида (AEBSF), 0.3 мкМ аprotинин, 130 мкМ бестатин, 1мМ EDTA, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64), 1 мкМ лейпептин (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин

при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000g (CM-50, Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических исследований.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорд (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [30].

Определение относительного количества ABCG2 в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. 20 мкг белков супернатанта подвергали электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad) в буферной системе Laemmli (BioRad). Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β -меркаптоэтанол (Bio-Rad) в соотношении 1 : 2, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели пропускали при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, Bio-Rad) с использованием Mini Trans-Blot (Bio-Rad) в течение 10 мин при 20 В и 1.3 А. Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (Bio-Rad), содержащим 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре. Детекцию белков ABCG2 проводили с использованием первичных кроличьих антител (ABCG2 antibody, CSB-PA001081-GA01HU, Cusabio, США) в концентрации 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker (Bio-Rad) в течение ночи при +4°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных антител козы (Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США) в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (Bio-Rad). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad).

Молекулярная масса ABCG2 была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, Bio-Rad).

Содержание ABCG2 оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышиные моноклональные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (Invitrogen), разведение 1 : 1000, вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH — Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen), разведение 1 : 4000.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ GraphPad Prism Version 9.5.0. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической зна-

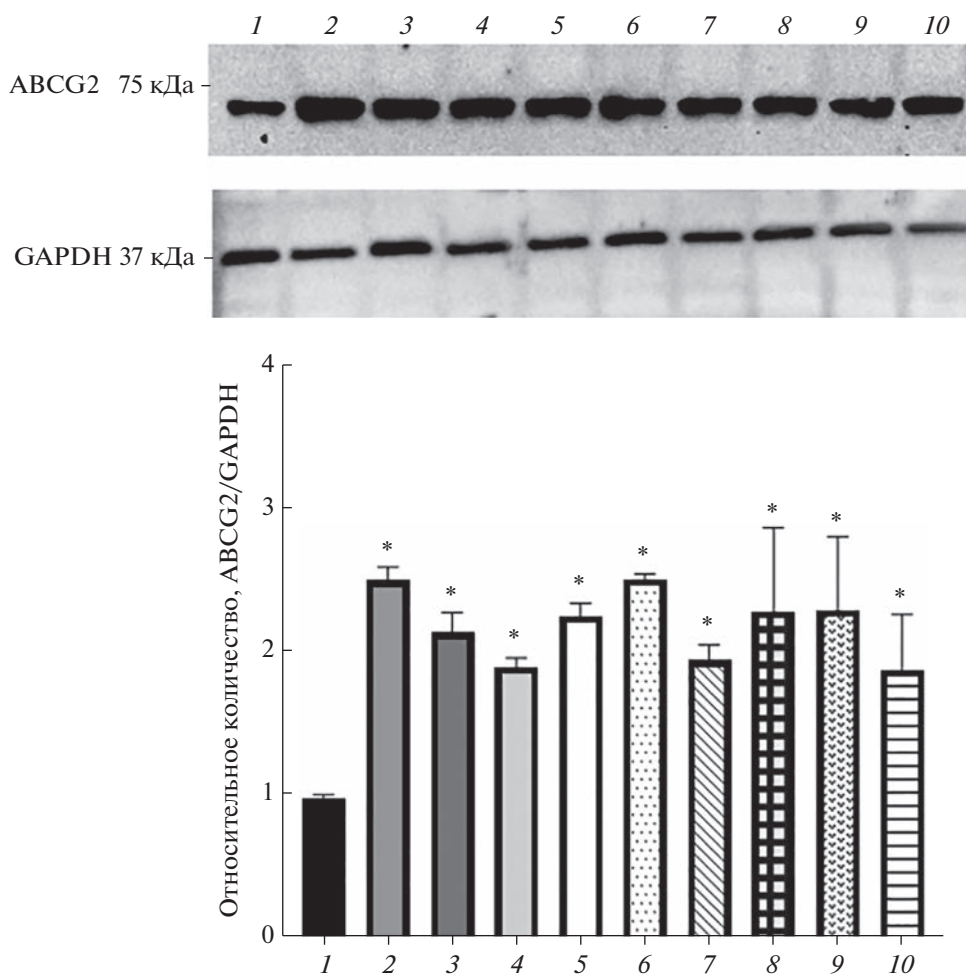


Рис. 1. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле и при воздействии прогестерона, эстрадиола и тестостерона: 1 – контроль, 2, 3, 4 – прогестерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно; 5, 6, 7 – эстрадиол в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно; 8, 9, 10 – тестостерон в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ соответственно. * $p < 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа: $F = 7.27$, $p < 0.0001$.

чимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние половых гормонов на относительное количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2. Инкубирование клеток линии Сасо-2 с прогестероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ приводило к повышению уровня белка ABCG2 на 151.4, 114.9 и 90.3% соответственно ($p < 0.0001$ для каждой серии) относительно контрольного значения, принятого за 1 (рис. 1 (1, 2, 3, 4)).

Воздействие эстрадиола в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ в течение 24 ч увеличивало относительное количество ABCG2 на 126.2, 152.0 и 95.7% ($p < 0.0001$ для каждой серии) соответственно по сравнению с контролем (рис. 1 (1, 5, 6, 7)).

При инкубации клеток с тестостероном в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ также отмечалось увеличение относительного количества ABCG2 на 129.5, 130.2 и 88.5% соответственно ($p < 0.01$ для каждой серии) относительно контрольных значений (рис. 1 (1, 8, 9, 10)).

Таким образом, в ходе исследования установлено, что все половые гормоны (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) повышают количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием прогестерона. Прогестерон в концентрации 10 мкМ вызывал повышение относительного количества ABCG2 на 118.3% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 2 (б)). Ингибитор PXR кетоконазол и ингибитор FXR тауро-β-холевая кислота препятствовали повышению ABCG2 под действием прогестерона, его относительное количество достоверно не отличалось от показателей контроля и снижалось на 51.5

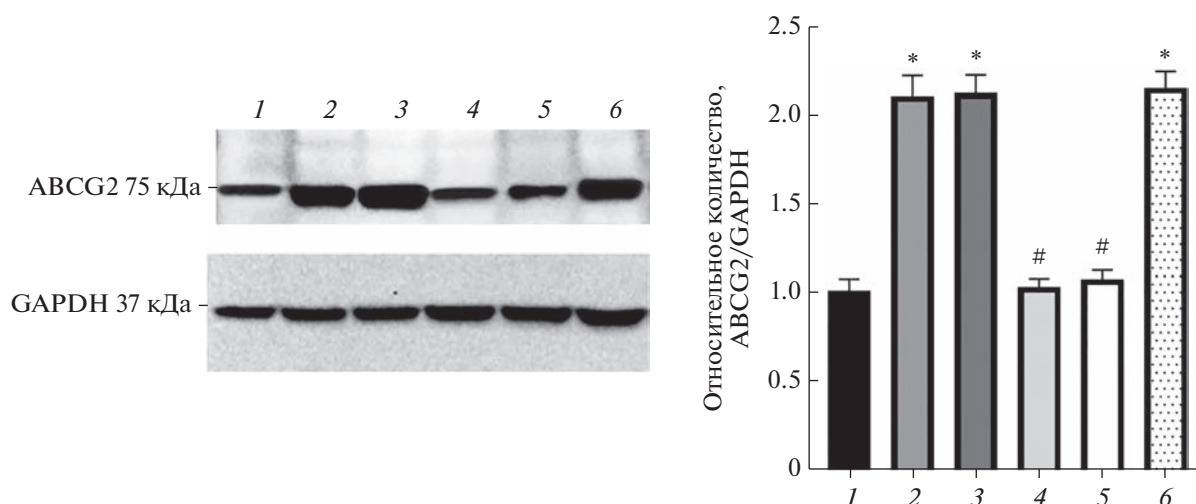


Рис. 2. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии прогестерона в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибиторами LXRα – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетоканазола (4), тауро-β-холевой кислоты (5). * $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 153$, $p < 0.0001$.

и 50.1% соответственно относительно изолированного воздействия гормона (рис. 2 (1, 4, 5)).

Ингибитор LXRα TFCA и ингибитор CAR CINPA1 достоверного эффекта на индуцирующее действие прогестерона (10 мкМ) не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 113.5% ($p < 0.0001$) и 115.4% ($p < 0.0001$) и достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 2 (1, 2, 3)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием прогестерона принимают участие FXR и PXR.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием эстрадиола. Эстрадиол в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество ABCG2 на 156.2% ($p < 0.0001$) по сравнению с контролем (рис. 3 (6)).

Ингибитор CAR CINPA1 и ингибитор PXR кетоканазол вызывали снижение количества ABCG2 в клетках линии Сасо-2 при воздействии эстрадиола в концентрации 10 мкМ на 21.1% ($p = 0.0002$) и 22.3% ($p < 0.001$) соответственно по сравнению с изолированным применением эстрогена, но все равно уровень транспортера превышал показатели контроля на 102.1 и 99.1% соответственно ($p < 0.0001$) (рис. 3 (1, 3, 4)).

Ингибитор LXRα TFCA и ингибитор FXR тауро-β-холевая кислота достоверного эффекта на индуцирующее действие эстрадиола (10 мкМ) не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 137.4 и 166.3% соответственно ($p < 0.0001$ для обеих групп), достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 3 (1, 2, 5)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола принимают участие CAR и PXR.

Роль орфанных ядерных рецепторов в индукции ABCG2 под действием тестостерона. Тестостерон в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество ABCG2 на 135.6% ($p < 0.0002$) по сравнению с контролем (рис. 4 (6)).

Ингибитор PXR кетоканазол и ингибитор FXR тауро-β-холевая кислота снижали индуцирующее действие тестостерона, количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2 снижались на 30.6% ($p = 0.02$) и 18.1% ($p = 0.05$) соответственно по сравнению с изолированным применением тестостерона, тем не менее уровень транспортера превышал показатели контроля на 63.4% ($p = 0.05$) и 93.0% ($p = 0.01$) относительно контроля (рис. 4 (1, 4, 5)).

Ингибитор LXRα TFCA и ингибитор CAR CINPA1 достоверного эффекта на индуцирующее действие тестостерона не оказали, относительное количество ABCG2 превышало показатели контроля на 134.1% ($p = 0.0002$) и 97.9% ($p = 0.004$) и достоверно от изолированного применения гормона не отличалось (рис. 4 (1, 2, 3)).

Таким образом, в регуляции ABCG2 под действием тестостерона принимают участие FXR и PXR.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования оценивалось воздействие половых гормонов прогестерона, эстрадиола и тестостерона на относительное количество ABCG2 в клетках линии Сасо-2, являю-

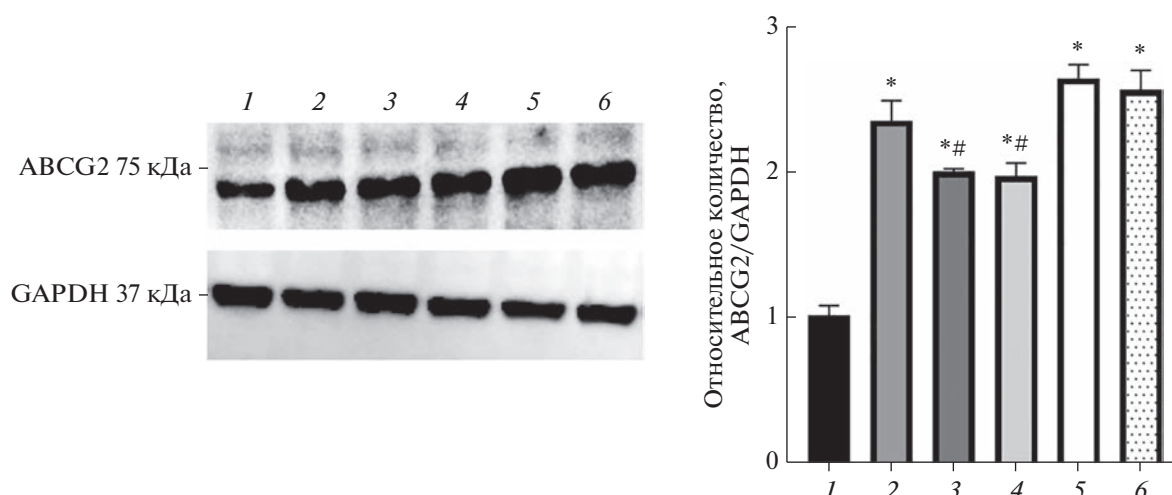


Рис. 3. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии эстрадиола в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибиторами LXRα – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетокеназола (4), FXR – тауро-β-холевой кислотой (5). * $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p < 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 110, p < 0.0001$.

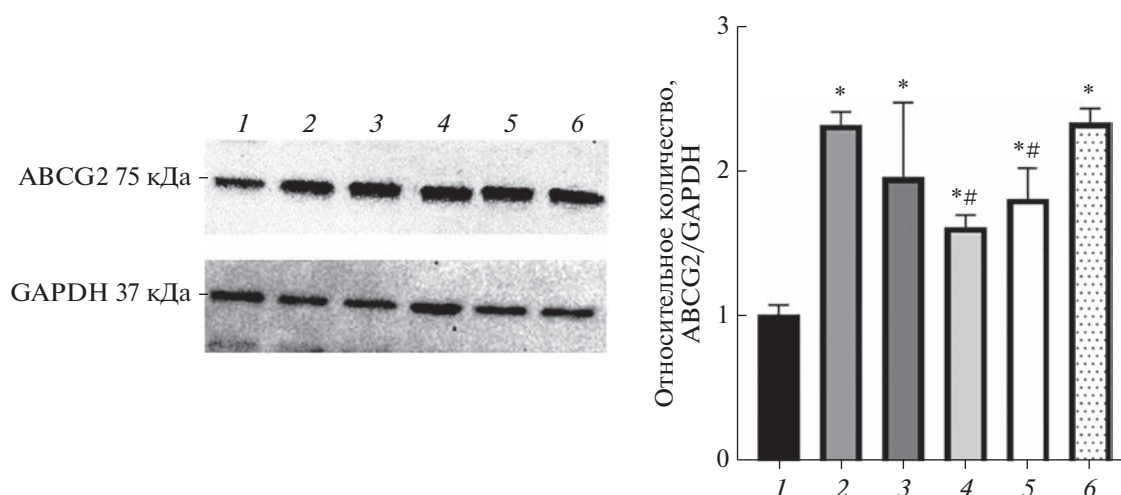


Рис. 4. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ лизатов клеток линии Сасо-2 с использованием антител к ABCG2 в контроле (1) и при воздействии тестостерона в концентрации 10 мкМ изолированно (6) и в сочетании с ингибиторами LXRα – TFCA (2), CAR – CINPA1 (3), PXR – кетокеназола (4), FXR – тауро-β-холевой кислотой (5). * $p < 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля, # $p \leq 0.05$ – статистически значимые отличия от показателей изолированного применения прогестерона. Результаты дисперсионного анализа: $F = 13, p < 0.0002$.

шейся моделью тонкокишечного эпителия, а также роль орфанных рецепторов (LXRα, CAR, PXR, FXR) в механизмах регуляции белка-транспортера в данных экспериментальных условиях.

В ходе настоящего исследования было установлено, что все изученные половые гормоны (прогестерон, эстрадиол и тестостерон) повышают относительное количество ABCG2 в клетках Сасо-2.

Выделяют следующие механизмы регуляции ABCG2: изменение активности синтезированной

го белка, изменение экспрессии гена, кодирующего ABCG2, полиморфизм в гене ABCG2, посттрансляционная модификация молекулы транспортера, амплификация гена, деметилирование ДНК, влияние микроРНК, модификация гистонов [31].

При этом основная роль отводится изменению экспрессии гена ABCG2 под действием транскрипционных факторов, поэтому именно этот механизм и был изучен в данном исследовании.

В качестве изучаемых факторов транскрипции были выбраны орфанные рецепторы LXR α , CAR, PXR, FXR, поскольку они являются основными регуляторами ферментов биотрансформации и белков-транспортёров, а также взаимодействуют с половыми гормонами. Для оценки роли орфанных рецепторов в механизме влияния половых гормонов на относительное количество ABCG2 были применены их специфические ингибиторы.

Для инактивации LXR α использовали N-(4-трифторметилфенил)-3,4-диметоксикиннамин (TFCA). Считается, что TFCA ингибирует активацию лиганд-связывающего домена LXR α за счет водородной связи с Arg305 в области H5 этого домена [26]. CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1) использовали в качестве ингибитора CAR. Он блокирует лиганд-связывающий домен CAR, а также подавляет его взаимодействие с коактиваторами [27].

Ингибирование PXR осуществляли с помощью кетоконазола. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с AF-2, областью лиганд-связывающего домена PXR, и таким образом подавляет его активацию [32].

Тауро- β -холевая кислота использовалась в качестве ингибитора FXR. Предполагается, что она взаимодействует с лиганд-связывающим карманом FXR и препятствует реализации его активности [29].

В ходе настоящего исследования было показано, что в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а под действием тестостерона и прогестерона — FXR и PXR.

При этом ингибирование орфанных рецепторов при действии эстрадиола и тестостерона не предотвращало полностью индуцирующее действие гормонов, количество ABCG2 превышало показатели контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что видимо в регуляции ABCG2 под действием эстрадиола и тестостерона принимают участие и другие сигнальные пути.

В клетках линии Сасо-2 описана экспрессия эстрогеновых рецепторов (преимущественно подтип бета) [33] и тестостероновых рецепторов [34], поэтому логично предположить, что действие данных гормонов будет реализовываться через соответствующие рецепторы.

В промоторе гена ABCG2 обнаружено эстроген-респонсивный элемент (регион в промоторе — 243—115) [8], а также гестаген-респонсивный элемент (регион в промоторе — 243—115) [12]. В то же время в клетках линии Сасо-2 выявлен крайне низкий уровень прогестероновых рецепторов [35].

Наше исследование показало, что в регуляции ABCG2 под действием всех половых гормонов принимал участие FXR. Полученные результаты согласуются с данными литературы о роли этого рецептора в регуляции белка транспортера. Так,

например, в исследовании на клетках рака ободочной кишки было показано, что цисплатин-индуцированная химиорезистентность, опосредованная ABCG2, развивается с участием FXR [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследовании на клетках линии Сасо-2 было установлено, что половые гормоны вызывают повышение количества белка-транспортера ABCG2, причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона — FXR и PXR.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **95** (26), 15665—15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
2. Khunweeraphong N., Stockner T., Kuchler K. 2017. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Sci. Rep.* **7** (1), 13767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>
3. Rosenberg M.F., Bikadi Z., Chan J., Liu X., Ni Z., Cai X., Ford R.C., Mao Q. 2010. The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone. *Structure*. **18** (4), 482—493. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.017>
4. Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M.F., Mao Q. 2010. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Cur. Drug Metabolism*. **11** (7), 603—617. <https://doi.org/10.2174/138920010792927325>
5. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61** (8), 3458—3464.
6. Natarajan K., Xie Y., Baer M.R., Ross D.D. 2012. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem. Pharm.* **83** (8), 1084—1103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.002>
7. Stiburkova B., Pavelcova K., Zavada J., Petru L., Simek P., Cepek P., Pavlikova M., Matsuo H., Merri-man T.R., Pavelka K. 2017. Functional non-synony-

- mous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (Oxford)*. **56** (11), 1982–1992.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex295>
8. Ee P.L., Kamalakaran S., Tonetti D., He X., Ross D.D., Beck W.T. 2004. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.* **64** (4), 1247–1251.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3583>
 9. Yasuda S., Kobayashi M., Itagaki S., Hirano T., Iseki K. 2009. Response of the ABCG2 promoter in T47D cells and BeWo cells to sex hormone treatment. *Mol. Biol. Rep.* **36** (7), 1889–1896.
<https://doi.org/10.1007/s11033-008-9395-0>
 10. Evseenko D.A., Paxton J.W., Keelan J.A. 2007. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab. Dispos.* **35** (4), 595–601.
<https://doi.org/10.1124/dmd.106.011478>
 11. Wang H., Zhou L., Gupta A., Vethanayagam R.R., Zhang Y., Unadkat J.D., Mao Q. 2006. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* **290** (5), 798–807.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00397.2005>
 12. Wang H., Lee E.W., Zhou L., Leung P.C., Ross D.D., Unadkat J.D., Mao Q. 2008. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Mol. Pharm.* **73** (3), 845–854.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.041087>
 13. Wu X., Zhang X., Sun L., Zhang H., Li L., Wang X., Li W., Su P., Hu J., Gao P., Zhou G. 2013. Progesterone negatively regulates BCRP in progesterone receptor-positive human breast cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* **32** (2), 344–354.
<https://doi.org/10.1159/000354442>
 14. Wu X., Zhang X., Zhang H., Su P., Li W., Li L., Wang Y., Liu W., Gao P., Zhou G. 2012. Progesterone receptor downregulates breast cancer resistance protein expression via binding to the progesterone response element in breast cancer. *Cancer Sci.* **103** (5), 959–967.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02245.x>
 15. Mazaira G.I., Zgajnar N.R., Lotufo C.M., Daner-Becerra C., Sivils J.C., Soto O.B., Cox M.B., Galigniana M.D. 2018. The nuclear receptor field: A historical overview and future challenges. *Nucl. Receptor Res.* **5**, 101320.
<https://doi.org/10.11131/2018/101320>
 16. Shi Y. 2007. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov. Today*. **12** (11–12), 440–445.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.04.006>
 17. Serviddio G., Bellanti F., Vendemiale G. 2014. Oxyterols in the orchestra of liver cell metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **1**, S6.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.838>
 18. Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. 2022. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism. *Mol. Cell Endocrinol.* **548**, 111618.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111618>
 19. Krasowski M.D., Ni A., Hagey L.R., Ekins S. 2011. Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Mol. Cell Endocrinol.* **334** (1–2), 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.016>
 20. Jin B., Wang W., Bai W., Zhang J., Wang K., Qin L. 2017. The effects of estradiol valerate and remifemin on liver lipid metabolism. *Acta Histochem.* **119** (6), 610–619.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.06.004>
 21. Kawamoto T., Kakizak S., Yoshinari K., Negishi M. 2000. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse CYP2B10 gene. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1897–1905.
<https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0547>
 22. Blumberg B., Sabbagh W., Juguilon H., Bolado J., van Meter C.M., Ong E.S., Evans R.M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* **12** (20), 3195–3205.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3195>
 23. Milona A., Owen B.M., Cobbold J.F., Willemssen E.C., Cox I.J., Boudjelal M., Cairns W., Schoonjans K., Taylor-Robinson S.D., Klomp L.W., Parker M.G., White R., van Mil S.W., Williamson C. 2010. Raised hepatic bile acid concentrations during pregnancy in mice are associated with reduced farnesoid X receptor function. *Hepatology*. **52** (4), 1341–1349.
<https://doi.org/10.1002/hep.23849>
 24. Wang S., Lai K., Moy F.J., Bhat A., Hartman H.B., Evans M.J. 2006. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology*. **147** (9), 4025–4033.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>
 25. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac. Res.* **7** (9), 902–910.
<https://doi.org/10.1023/A:1015937605100>
 26. Sim W.C., Kim D.G., Lee K.J., Choi Y.J., Choi Y.J., Shin K.J., Jun D.W., Park S.J., Park H.J., Kim J., Oh W.K., Lee B.H. 2015. Cinnamamides, novel liver X receptor antagonists that inhibit ligand-induced lipogenesis and fatty liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **355** (3), 362–369.
<https://doi.org/10.1124/jpet.115.226738>
 27. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. 2015. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* **87** (5), 878–889.
<https://doi.org/10.1124/mol.115.097782>
 28. Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D. 2010. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells. *Pharmacol. Res.* **62** (5), 426–431.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.07.001>
 29. Sayin S.I., Wahlström A., Felin J., Jäntti S., Marschall H.U., Bamberg K., Angelin B., Hyötyläinen T.,

- Orešič M., Bäckhed F. 2013. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* **17** (2), 225–235.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>
30. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7** (72), 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
31. Nakanishi T., Ross D.D. 2012. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin. J. Cancer.* **31** (2), 73–99.
<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320>
32. Wang H., Huang H., Li H., Teotico D.G., Sinz M., Baker S.D., Staudinger J., Kalpana G., Redinbo M.R., Mani S. 2007. Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs. *Clin. Cancer Res.* **13** (8), 2488–2495.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1592>
33. Campbell-Thompson M., Lynch I.J., Bhardwaj B. 2001. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* **61** (2), 632–640.
34. Gu S., Papadopoulou N., Gehring E.M., Nasir O., Dimas K., Bhavsar S.K., Föller M., Alevizopoulos K., Lang F., Stournaras C. 2009. Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses *in vitro* and reduce drastically tumor incidence *in vivo*. *Mol. Cancer.* **8**, 114.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-114>
35. Mahbub A.A. 2022. Therapeutic strategies and potential actions of female sex steroid hormones and their receptors in colon cancer based on preclinical studies. *Life (Basel).* **12** (4), 605.
<https://doi.org/10.3390/life12040605>
36. Herraez E., Gonzalez-Sanchez E., Vaquero J., Romero M.R., Serrano M.A., Marin J.J., Briz O. 2012. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Mol. Pharm.* **9** (9), 2565–2576.
<https://doi.org/10.1021/mp300178a>

Influence of Sex Hormones on the ABCG2 Transport Protein in Caco-2 Cells

A. A. Slepnev¹, Yu. V. Abalenikhina¹ *, N. M. Popova¹, A. V. Shchulkin¹, E. N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of Russia, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Protein ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein) is an efflux transmembrane protein involved in the transport of endo- and exogenous substances, as well as in the development of tumor resistance to chemotherapy. In this work, the influence of sex hormones progesterone, estradiol, and testosterone on the relative amount of ABCG2 in Caco-2 cells was studied, as well as the role of orphan receptors (farnazoid X receptor (FXR), constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR), hepatic X receptor subtype alpha (LXRα)) in this process. The amount of ABCG2 was assessed by Western blot. Hormones were used at concentrations of 1, 10, and 100 μM, exposure time was 24 h. All hormones at all concentrations caused an increase in the amount of ABCG2. Inhibition of PXR and FXR prevented the increase in ABCG2 under the action of progesterone. Suppression of CAR and PXR reduced ABCG2 levels with estradiol compared with estrogen exposure alone, but still the transporter level was higher than in controls. Inhibition of PXR and FXR reduced the effect of testosterone; however, the level of the transporter exceeded the control values. Thus, our study showed that all sex hormones at all concentrations used increased the amount of ABCG2, that CAR and PXR are involved in the implementation of the action of estradiol, and that FXR and PXR are involved in the implementation of the effects of testosterone and progesterone.

Keywords: ABCG2, breast cancer resistance protein, orphan receptors, cell line Caco-2