БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 10, с. 1473 – 1480

УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ БЕНЗО(А)ПИРЕНА НА ЭКСПРЕССИЮ микроРНК-483-3р В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ И ПЕЧЕНИ КРЫС*

© 2019 С.В. Филиппов[1,2], А.А. Ярушкин[1,3], Т.С. Калинина[1], В.Ю. Овчинников[2], Р.А. Князев[4], Л.Ф. Гуляева[1,3]**

[1] *Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, 630117 Новосибирск, Россия; электронная почта: filippov@bionet.nsc.ru*

[2] *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия*

[3] *Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия*

[4] *Научно-исследовательский институт биохимии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, 630117 Новосибирск, Россия*

Поступила в редакцию 21.05.2019
После доработки 21.06.2019
Принята к публикации 21.06.2019

В основе эпигенетического механизма действия бензо(а)пирена (БП) может лежать AhR-опосредованная транскрипция его генов-мишеней, в том числе, микроРНК, имеющих в своем промоторе диоксин-чувствительный элемент (DRE). Исследовали действие БП на экспрессию онкогенной микроРНК-483-3р, её гена-хозяина *IGF2* и гена-мишени *IGF1* в культуре гепатоцитов и печени самок крыс Вистар. Для оценки активации AhR использовали селективный ингибитор AhR (CH-223191) и определяли экспрессию *CYP1A1*, его гена-мишени. Было выявлено отсутствие координированной экспрессии гена-хозяина *IGF2* и микроРНК-483-3р, что, возможно, связано с наличием в нем сайта связывания с ERα, негативным регулятором его экспрессии. Полученные результаты подтверждают AhR-опосредованный путь регуляции экспрессии микроРНК-483-3р, *IGF1* и *IGF2* под действием БП, что представляет интерес для понимания эпигенетического механизма его канцерогенного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бензо(а)пирен, AhR, ERα, DRE, индукция, микроРНК, гены-мишени.

DOI: 10.1134/S0320972519100099

Бензо(а)пирен (БП) является известным и активно изучаемым канцерогеном окружающей среды, образующимся при неполном сгорании углеводородов. Помимо того, что БП может выступать в роли генотоксического канцерогена, образуя аддукты с ДНК с последующим накоплением мутаций, он может также активировать арилгидрокарбоновый рецептор (AhR) – транскрипционный фактор из семейства спираль–петля–спираль – PER/ARNT/SIM (bHLH–PAS) [1]. Активированный AhR взаимодействует со специфическими сайтами связывания на ДНК (диоксин-чувствительными элементами (DRE) [2]) и запускает транскрипцию генов-мишеней, кодирующих такие белки как, например, цитохромы *P450* первого семейства CYP1A/1B, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, и многие другие, в том числе белок PTPN6, регулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток [3, 4]. Активированный лигандом AhR также проявляет анти-эстрогенную активность за счет снижения эстрадиол-опосредованной передачи сигналов эстрогенового рецептора альфа (ERα), гены-мишени которого регулируют разнообразные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и многие другие [5].

Мишенями AhR и ERα могут также являться гены, содержащие в своих интронах микроРНК – малые некодирующие РНК, участвующие в посттранскрипционной регуляции

Принятые сокращения: БП – бензо(а)пирен; AhR – арилгидрокарбоновый рецептор; DRE – диоксин чувствительный элемент; ERα – эстрогеновый рецептор альфа.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM19-145, 05.08.2019.

** Адресат для корреспонденции.

экспрессии генов у человека и животных [6]. Поэтому ранее методом *in silico* выполнен поиск таких генов [7]. Среди выявленных генов ген *IGF2* представлял особый интерес, так как в его промоторе оказались сайты связывания обоих рецепторов и у крыс, и у человека. Повышенный уровень экспрессии *IGF2* связан с риском развития различных видов рака, включая колоректальный, молочной железы, предстательной железы и рак легких [8]. В интроне 2 гена *IGF2* закодирован предшественник микроРНК-483, который в результате процессинга разрезается на две копии микроРНК-483-3p и микроРНК-483-5p. Было показано, что обе копии этой микроРНК могут проявлять онкогенные свойства, но, несмотря на свое сходство, они экспрессируются по-разному и играют различные роли при различных типах рака [9]. Например, исследователи установили, что у микроРНК-483-3p происходит сверхэкспрессия при раке предстательной железы [10], раке молочной железы [11] и др. В свою очередь, повышенная экспрессия микроРНК-483-5p наблюдается при раке ротовой полости [12], раке пищевода [13] и др.

Однако вопрос, почему меняется уровень экспрессии микроРНК-483 при злокачественной трансформации, остается открытым. Регуляция экспрессии микроРНК может осуществляться по разным механизмам [14], среди которых может быть воздействие ксенобиотиками. Поэтому целью настоящей работы является проверка гипотезы, может ли экспрессия микроРНК-483-3p изменяться под действием БП через активацию AhR с последующей активацией экспрессии гена-хозяина *IGF2* и гена-мишени самой микроРНК – *IGF1*. В качестве объекта исследования были выбраны первичная культура гепатоцитов и печень самок крыс Вистар, подвергнутых воздействию БП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. Использовали изолированные гепатоциты самки крысы линии Вистар массой 180 г, взятой из питомника Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН (Новосибирск, Россия). Содержание, питание, уход за животным и выведение его из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МВиССО СССР от 13.11.84 № 742). Гепатоциты выделяли методом рециркуляторной ферментативной перфузии с использованием 0,03%-ного раствора коллагеназы («ICN Biomedicals», США) [15] и отделяли от непаренхимных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения трипанового синего («Serva», Германия), составляла не менее 90%. Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), pH 7,4, содержащей 20 мМ HEPES («ICN Biomedicals»), 10%-ную эмбриональную сыворотку коров («Serva», Германия), 2 мМ L-глутамин («Вектор», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозу, 10 нМ инсулин («Serva»). Инкубацию проводили в CO_2-инкубаторе («Cole-Parmer», США) в атмосфере, содержащей 5%-ную CO_2 и 95% воздуха, при температуре 37 °C, используя 6-луночные планшеты («Orange Scientific», США), покрытые коллагеном. Плотность клеток в первичной монослойной культуре составляла 800 кл/мм^2.

Первичную культуру гепатоцитов инкубировали с 5 мкМ БП («Sigma-Aldrich», США) и 10 мкМ селективного ингибитора AhR – CH-223191 («Sigma-Aldrich») в течение 24 ч. Вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («Sigma-Aldrich»), затем раствор разбавляли с использованием культуральной среды, конечная концентрация ДМСО составляла 0,1% (v/v). Клетки, обработанные ДМСО, использовали в качестве контроля.

Животные. В работе использовали 16 самок крыс Вистар массой 150–180 г, взятые из питомника Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН (Новосибирск, Россия). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МВиССО СССР от 13.11.84 № 742). Крысам проводили интраперитонеальную инъекцию БП (75 мг/кг) («Sigma-Aldrich») в растительном масле (0,5 мл на каждую особь), контрольным крысам вводили по 0,5 мл масла. Животных разделили на 4 группы по 4 особи в каждой группе: инкубация с БП в течение 24 ч, 48 ч, 72 ч и контрольная группа, не получавшая БП. По истечении инкубационного периода животных усыпляли путем декапитации, изымали печень и проводили выделение тотальной РНК.

Выделение РНК. Образцы печени гомогенизировали в 1 мл Trizol Reagent («Invitrogen», США), затем добавляли 0,2 мл хлороформа и отбирали водную фазу. РНК осаждали 0,5 мл изопропилового спирта, дважды промывали 75%-ным этанолом и растворяли в воде, свободной от нуклеаз. Концентрацию и чистоту РНК определяли при длине волны 260/280 нм с использованием спектрофотометра NanoPhotometer P 360

Таблица 1. Последовательность праймеров для ОТ-ПЦР мРНК в режиме реального времени

Ген	Последовательность праймеров	
ACTB	прямой	5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
	обратный	5'-GATGCCGTGCTCGATGGGGT-3'
HPRT1	прямой	5'-CTTCCTCCTCAGACCGCTT-3'
	обратный	5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC-3'
MRPL46	прямой	5'-TGGAGCTCGGGAAACAGAAGC-3'
	обратный	5'-GCATTCCCTAGGAACTTGGCT-3'
CYP1A1	прямой	5'-CTTCACACTTATCGCTAATGG-3'
	обратный	5'-TTGGGTCTGAGGCTATGG-3'
IGF2	прямой	5'-CAAATTCGACACCTGGAGACA-3'
	обратный	5'-TTGCTGGACATCTCCGAAGAG-3'
IGF1	прямой	5'-CGCTTCAGTTTGTCTGTTCG-3'
	обратный	5'-GCAGCACTCTTCCACGATG-3'

Таблица 2. Последовательность праймеров для ОТ-ПЦР микроРНК в режиме реального времени

микроРНК	Последовательность праймеров	
U6 (малая РНК)	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-3'
	прямой	5'-GCCGCATACAGAGAAGATTA-3'
	зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATA CGACGGCCATGC-(BHQ1)-3'
U48 (малая РНК)	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCACCCTCCGAGG TATTCCCACTCCTACGACACGGTCAG-3'
	прямой	5'-CCCTGAGTGTCTTCGCT-3'
	зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATA CCAGACGCTCAG-(BHQ1)-3'
микроРНК-483-3	ОТ	5'-GTCGTATCCAGTGCACCCTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACACAAGACG-3'
	прямой	5'-GCCGCCACTCCTCCCCTGC-3'
	зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATA CGACACAAGACG-(BHQ1)-3'

(«Implen», Германия). Выделенную РНК визуализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном (m/V) агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в качестве интеркалирующего красителя при напряжении 100 В в течение 30 мин. Изображения визуализировали системой V3 Western Workflow для блоттинга и визуализации мини-гелей («Bio-Rad Laboratories», США). Выделенную РНК хранили при – 70 °С.

ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию по матрице выделенной тотальной РНК с использованием набора ОТ M-MuLV–RH («Biolabmix», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Для определения уровня экспрессии генов *CYP1A1*, *IGF1* и *IGF2* проводили ПЦР в реальном времени с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) («Biolabmix») в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве генов сравнения использовали *ACTB*, *HPRT1*, *MRPL46*. Последовательность праймеров представлена в табл. 1. Оптимальная концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составила 300 нМ. Амплификацию проводили на CFX96™ Touch («Bio-Rad Laboratories») с использованием следующих условий: 95 °С (5 мин), затем 40 циклов 95 °С (15 с), 60 °С (20 с), 72 °С (30 с). Реакции выполняли в трех повторах.

ОТ-ПЦР микроРНК-483-3p в режиме реального времени. Проведена обратная транскрипция тотальной РНК (40 нг) с использованием обратной транскриптазы M-MuLV–RH («Biolabmix», Россия) и специального *stem-loop* прайме-

ра (табл. 2), который был специфичен для соответствующей последовательности зрелой микроРНК-483-3p, полученной из mirbase.org. ПЦР проводили (общий объем 30 мкл) с применением технологии TaqMan (краситель R6G, тушитель BHQ1) и набора БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) («Biolabmix») в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве генов сравнения использовали малые ядерные РНК U6 и U48. Последовательность праймеров представлена в табл. 2. Амплификацию проводили на CFX96™ Touch («Bio-Rad Laboratories») с использованием следующих условий: 94 °C (5 мин), затем 40 циклов 94 °C (15 с), 61 °C (20 с), 72 °C (30 с). Реакцию выполняли в трех повторах.

Биоинформатический анализ генома крысы. Для предсказания сайтов связывания транскрипционных факторов AhR и ER в предполагаемом собственном промоторе микроРНК-483-3p, область 10 000 нт от начала последовательности микроРНК-предшественника (согласно miRBase v21) была извлечена из генома крысы (Rnor_6.0). В данной области был выполнен поиск сайтов связывания ER (разрешена одна мутация) и AhR (разрешено 4 мутации) с использованием программы fqgrep.

Ресурсы microRNA.org, targetcan.org и mirDB.org были использованы для прогнозирования мишеней микроРНК.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью MS Office. Результаты представлены в виде M ± SD, где M – среднее, SD – стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий между выборками использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние БП и CH-223191 на экспрессию генов *CYP1A1*, *IGF1*, *IGF2* и микроРНК-483-3p в первичной культуре гепатоцитов крысы. Чтобы проверить, может ли происходить изменение экспрессии генов *IGF1*, *IGF2* и микроРНК-483-3p под действием БП, был измерен их относительный уровень с помощью метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени в первичной культуре гепатоцитов крысы, обработанных БП и селективным ингибитором AhR CH-223191. Для оценки активации AhR также был измерен относительный уровень экспрессии гена *CYP1A1* (рис. 1).

Относительный уровень экспрессии гена *CYP1A1* увеличивался в 4,5 раза под действием БП, в то время как под действием ингибитора AhR наблюдалось снижение уровня мРНК в 4 раза по сравнению с контролем. Относительный уровень микроРНК-483-3p достоверно увеличивался под действием БП в 1,6 раз, в то время как под действием ингибитора AhR уровень этой микроРНК понижался в три раза по сравнению с контролем. Относительный уровень экспрессии гена *IGF2* под действием БП значительно снижался (в пять раз), а при обработке клеток ингибитором AhR увеличивался в 1,7 раз по сравнению с контролем. Относительный уровень экспрессии гена-мишени микроРНК-483-3p – *IGF1* снижался под действием БП в два раза, и увеличивался в 2,5 раза при ингибировании AhR.

Влияние БП на экспрессию генов *CYP1A1*, *IGF1*, *IGF2* и микроРНК-483-3p в печени крыс. Для проверки наблюдаемых нами изменений на организм в целом проведен эксперимент *in vivo*. Был определен относительный уровень экспрессии генов *CYP1A1*, *IGF1* и *IGF2*, а также микроРНК-483-3p в печени крыс, получавших БП (рис. 2).

Результаты показали, что относительный уровень экспрессии гена *CYP1A1* значительно увеличивался под воздействием БП в 46 и 49 раз по прошествии 24 ч и 48 ч соответственно. Через 72 ч после введения БП происходило увеличение относительного уровня экспрессии в 18 раз. Относительный уровень микроРНК-483-3p увеличивался в 3,7 раз через 24 ч после введения БП, но в последующем понижался до исходного значения (через 48 ч и 72 ч). Уровень мРНК *IGF2* снижался под действием БП в 2–5 раз по сравнению с контролем. Как и в случае с экспериментом *in vitro* относительный уровень экспрессии гена *IGF1* понизился по сравнению с контролем в 2–2,4 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование эпигенетических механизмов химически индуцированного канцерогенеза является в настоящее время одной из актуальных проблем современной науки. Особый интерес представляют микроРНК, регулирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Исследования последних лет показали, что многие канцерогены могут менять их экспрессию, что сопровождается изменениями в экспрессии их генов-мишеней [16]. Среди таких канцерогенов выделяется БП, генотоксичный механизм действия которого изучен достаточно неплохо. Показано, что он окисляется, главным образом в печени, цитохромами *P450* CYP1A1 и CYP1A2, причем некоторые его метаболиты, особенно электрофильные эпоксиды,

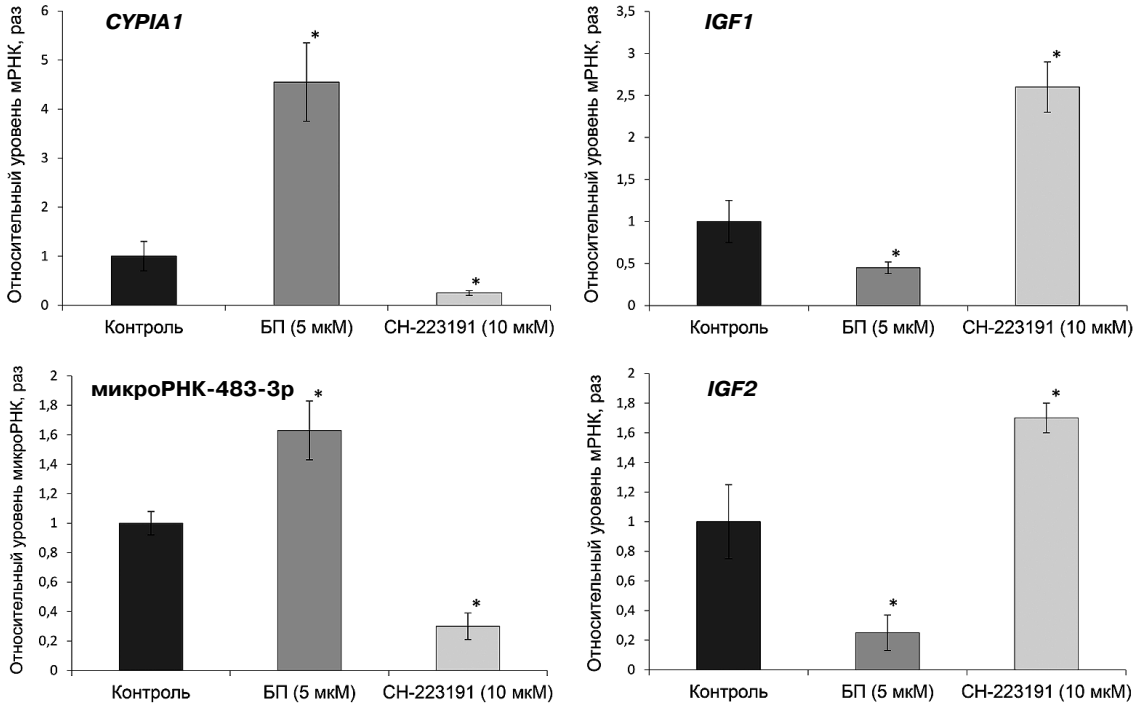

Рис. 1. Относительный уровень мРНК *CYP1A1, IGF1, IGF2* и микроРНК-483-3р в первичной культуре гепатоцитов крысы Вистар, инкубированной с БП (5 мкМ) и ингибитором AhR – СН-223191 (10 мкМ) в течение 24 ч (* – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента)

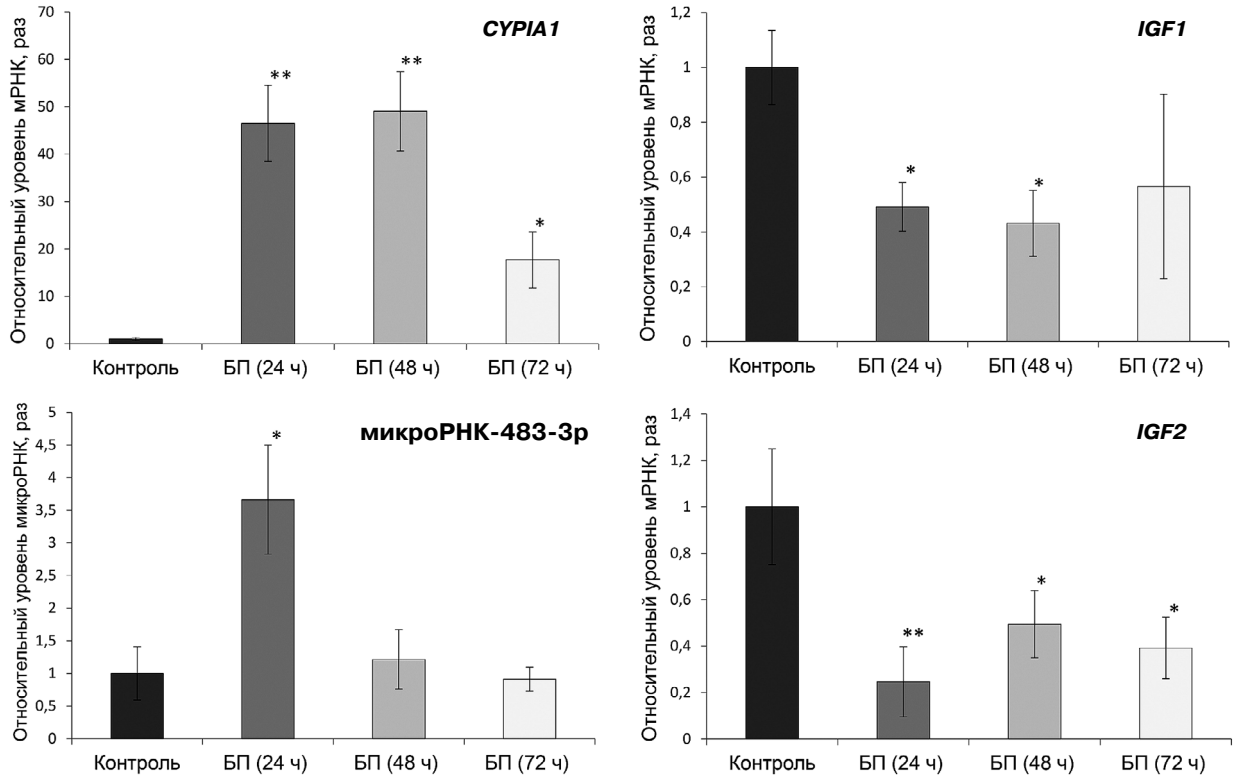

Рис. 2. Относительный уровень мРНК *CYP1A1, IGF1, IGF2* и микроРНК-483-3р в печени крыс Вистар после введения БП (75 мг/кг), инкубация в течение 24, 48 и 72 ч (* – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента); (** –достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента)

способны связываться с ДНК и образовывать аддукты [1]. Показаны также «горячие точки» мутаций, индуцированных БП [1]. Оказалось, что этот канцероген может также вызывать изменения в экспрессии микроРНК [17], т.е. проявлять свойства негенотоксического канцерогена. Однако точный механизм его действия в этом случае не установлен. Было предположено, что БП может менять экспрессию микроРНК через активацию AhR с последующей активацией транскрипции генов, имеющих в своем составе микроРНК или активировать транскрипцию межгенных микроРНК напрямую, взаимодействуя с DRE в их промоторах. Биоинформатический анализ генома крыс выявил 119 микроРНК, способных экспрессироваться в результате активации AhR [7]. Для экспериментального подтверждения нами была выбрана микроРНК-483-3p, которая, с одной стороны, является ортологом для человека и крысы и экспрессируется на достаточно высоком уровне в печени, с другой стороны, показаны ее онкогенные свойства в гепатоканцерогенезе [18, 19].

Результаты показали, что как в первичной культуре гепатоцитов, так и в печени крыс БП вызывал значительное усиление экспрессии «классических» генов-мишеней AhR, причем в культуре индуцирующий эффект был заметно ниже (рис. 1, рис. 2). Этот факт может быть связан с метаболическими особенностями клеточных культур, ответ которых на индукторы монооксигеназ зависит от многих факторов [20].

Одновременное введение ингибитора AhR приводило к значительному снижению экспрессии гена *CYP1A1* по сравнению с контролем, что подтверждает активацию AhR и участие в регуляции его экспрессии.

Вопреки ожиданиям экспрессия другого гена-мишени AhR – *IGF2* не возрастала под действием БП, а, напротив, достоверно снижалась почти в 5 раз в первичной культуре гепатоцитов (рис. 1) и в 2–5 раз в печени крыс (рис. 2). Экспрессия микроРНК-483-3p, напротив, увеличивалась в 1,7 раз (рис. 1) и 3,7 раз (рис. 2) соответственно, что сопровождалось снижением экспрессии ее гена-мишени *IGF1* в два раза (рис. 1, рис. 2). Следует заметить, что такие изменения наблюдались как в культуре, так и в печени животных, подвергавшихся воздействию БП.

Согласно полученным ранее данным ген-хозяин микроРНК-483-3p – *IGF2* – в промоторе имеет не только сайт связывания с AhR, но и мотивы для связывания с ERα и ERβ [7]. Известно, что активированный лигандом AhR негативно регулирует активность ERα [5]. Более того, описано, что в случае нахождения сразу двух сайтов ERE и DRE в промоторе одного гена, последний может проявлять свойства ингибиторного домена (iDRE), и комплекс AhR/ARNT, связываясь с ним, стериохимически мешает ERα связываться с ERE [21]. В работе Salisbury et al. было показано, что активация AhR под воздействием тетрахлордибензо-*n*-диоксина приводит к снижению экспрессии гена *IGF2* [22], это соответствует полученным нами данным в этой работе. Можно предположить, что это снижение обусловлено и тем, что DRE в промоторе *IGF2* проявляет свойства iDRE, и тем, что активация AhR приводит к снижению активности ERα. В конечном итоге эти два события приводят к понижению экспрессии гена *IGF2* под действием БП, и, напротив, к повышению под действием ингибитора AhR – CH-223191.

Однако уровень экспрессии микроРНК-483-3p, закодированной в интроне *IGF2*, увеличивался в печени самок крыс спустя 24 ч после введения БП и в гепатоцитах крысы, обработанных БП в течение 24 ч. При этом под действием ингибитора AhR экспрессия микроРНК в гепатоцитах снижалась. Чтобы понять причину таких изменений, мы выполнили поиск сайтов связывания AhR и ERs в предполагаемом собственном промоторе этой микроРНК и выявили сайт DRE. Таким образом, можно предположить, что активация AhR под действием БП приводила к повышению уровня микроРНК-483-3p независимо от *IGF2*. Однако спустя 48 и 72 ч после введения БП уровень микроРНК не различался в печени контрольных и обработанных крыс. Возможно, это связано с продолжающейся сниженной экспрессией гена-хозяина микроРНК либо со снижением уровня ER под действием БП, поскольку в ряде экспериментов было показано, что ER выполняет функцию корегулятора AhR и активация ERα необходима для поддержания экспрессии как самого AhR, так и его генов-мишеней [23, 24].

Для оценки влияния изменения уровня микроРНК-483-3p на экспрессию её генов-мишеней также был оценён уровень мРНК гена *IGF1*. Данный ген кодирует белок из семейства инсулиноподобных факторов роста, производимый в основном клетками печени. Низкие уровни этого белка в сыворотке ассоциированы с различными заболеваниями печени, в том числе неалкогольной жировой болезнью [25]. В нашем эксперименте уровень экспрессии *IGF1* оказался снижен в гепатоцитах крысы под действием БП и увеличен под действием ингибитора AhR, что соответствовало изменениям в уровне микроРНК-483-3p. В печени крыс, обработанных БП, уровень мРНК *IGF1* также снижался, но через 72 ч после введения БП уровни мРНК гена не различались в печени контрольных и обрабо-

танных крыс, что может быть связано с тем, что и изменений в уровне микроРНК-483-3p у этих крыс не было.

Таким образом, мы показали, что введение БП приводит к снижению экспрессии гена *IGF2*, в промоторе которого содержатся сайты связывания AhR и ERs. При этом экспрессия онкогенной микроРНК-483-3p, закодированной в интроне *IGF2*, оказалась независимой от данного гена, и, по всей видимости, активация ее транскрипции может происходить с собственного промотора, содержащего сайт DRE. Можно заключить, что нарушение экспрессии *IGF2*, микроРНК-483-3p и ее генов-мишеней, в частности *IGF1*, является одним из механизмов токсического действия БП.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 15-15-30012).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Agency for Research on Cancer (2012) Chemical agents and related occupations, *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Humans*, **100 F**.
2. Pieterse, B., Felzel, E., Winter, R., Van Der Burg, B., and Brouwer, A. (2013) PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures, *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 11651–11659, doi: 10.1021/es403810w.
3. Yao, E.F., and Denison, M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer, *Biochemistry*, **31**, 5060–5067, doi: 10.1021/bi00136a019.
4. Phadnis-Moghe, A.S., Li, J., Crawford, R.B., and Kaminski, N.E. (2016) SHP-1 is directly activated by the aryl hydrocarbon receptor and regulates BCL-6 in the presence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **310**, 41–50, doi: 10.1016/j.taap.2016.08.014.
5. Göttel, M., Corre, L.L., Dumont, C., Schrenk, D., and Chagnon, M.C. (2014) Estrogen receptor α and aryl hydrocarbon receptor cross-talk in a transfected hepatoma cell line (HepG2) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicol. Rep.*, **1**, 1029–1036, doi: 10.1016/j.toxrep.2014.09.016.
6. Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs, *Nature*, **431**, 350–355, doi: 10.1038/nature02871.
7. Ovchinnikov, V.Y., Antonets, D.V., and Gulyaeva, L.F. (2018) The search of CAR, AhR, ESRs binding sites in promoters of intronic and intergenic microRNAs, *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **16**, 1750029, doi: 10.1142/S0219720017500299.
8. Livingstone, C. (2013) IGF2 and cancer, *Endocr. Relat. Cancer*, **20**, 321–339, doi: 10.1530/ERC-13-0231.
9. Zhou, W., Yang, W., Ma, J., Zhang, H., Li, Z., Zhang, L., Liu, J., Han, Z., Wang, H., and Hong, L. (2018) Role of miR-483 in digestive tract cancers: from basic research to clinical value, *J. Cancer*, **9**, 407–414, doi: 10.7150/jca.21394.
10. Korzeniewski, N., Tosev, G., Pahernik, S., Hadaschik, B., Hohenfellner, M., and Duensing, S. (2015) Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer, *Urol. Oncol.*, **33**, 17–22, doi: 10.1016/j.urolonc.2014.09.015.
11. Zhang, M., Liu, D., Li, W., Wu, X., Gao, C., and Li, X. (2016) Identification of featured biomarkers in breast cancer with microRNA microarray, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **294**, 1047–1053, doi: 10.1007/s00404-016-4141-7.
12. Xu, H., Yang, Y., Zhao, H., Yang, X., Luo, Y., Ren, Y., Liu, W., and Li, N. (2016) Serum miR-483-5p: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma, *Tumor Biol.*, **37**, 447–453, doi: 10.1007/s13277-015-3514-z.
13. Wu, C., Wang, C., Guan, X., Liu, Y., Li, D., Zhou, X., Zhang, Y., Chen, X., Wang, J., Zen, K., Zhang, C.Y., and Zhang, C. (2014) Diagnostic and prognostic implications of a serum miRNA panel in oesophageal squamous cell carcinoma, *PLoS One*, **9**, e92292, doi: 10.1371/journal.pone.0092292.
14. Gulyaeva, L.F., and Kushlinskiy, N.E. (2016) Regulatory mechanisms of microRNA expression, *J. Transl. Med.*, **14**, 143–153, doi: 10.1186/s12967-016-0893-x.
15. Seglen, P. (1976) Preparation of isolated rat liver cells, *Meth. Cell Biol.*, **13**, 29–83, doi: 10.1016/S0091-679X(08)61797-5.
16. Pogribny, I.P., Beland, F.A., and Rusyn, I. (2016) The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **312**, 3–10, doi: 10.1016/j.taap.2015.11.013.
17. Gulyaeva, L.F., Chanyshev, M.D., Kolmykov, S.K., Ushakov, D.S., and Nechkin, S.S. (2016) The effect of xenobiotics on microRNA expression in the rat liver, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomed. Chem.*, **10**, 258–263, doi: 10.1134/S1990750816030033.
18. Lupini, L., Pepe, F., Ferracin, M., Braconi, C., Callegari, E., Pagotto, S., Spizzo, R., Zagatti, B., Lanuti, P., Fornari, F., Ghasemi, R., Mariani-Costantini, R., Bolondi, L., Gramantieri, L., Calin, G.A., Sabbioni, S., Visone, R., Veronese, A., and Negrini, M. (2016) Over-expression of the miR-483-3p overcomes the miR-145/TP53 pro-apoptotic loop in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, **7**, 31361–31371, doi: 10.18632/oncotarget.8913.
19. Vasuri, F., Fittipaldi, S., De Pace, V., Gramantieri, L., Bertuzzo, V., Cescon, M., Pinna, A.D., Fiorentino, M., D'Errico, A., and Ravaioli, M. (2018) Tissue miRNA 483-3p expression predicts tumor recurrence after surgical resection in histologically advanced hepatocellular carcinomas, *Oncotarget*, **9**, 17895–17905, doi: 10.18632/oncotarget.24860.
20. Lnenickova, K., Skalova, L., Stuchlikova, L., Szotakova, B., and Matouskova, P. (2018) Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels, *Acta Pharm.*, **68**, 75–85, doi: 10.2478/acph-2018-0005.
21. Matthews, J., and Gustafsson, J.A. (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways, *Nucl. Recept. Signal.*, **4**, e016, doi: 10.1621/nrs.04016.

22. Salisbury, T.B., Morris, G.Z., Tomblin, J.K., Chaudhry, A.R., Cook, C.R., and Santanam, N. (2013) Aryl hydrocarbon receptor ligands inhibit IGF-II and adipokine stimulated breast cancer cell proliferation, *ISRN Endocrinol.*, 104850, doi: 10.1155/2013/104850.
23. Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., and Gustafsson, J.A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor α to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5317–5328, doi: 10.1128/MCB.25.13.5317-5328.2005.
24. Spink, D.C., Katz, B.H., Hussain, M.M., Pentecost, B.T., Cao, Z., and Spink, B.C. (2003) Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells, *Carcinogenesis*, **24**, 1941–1950, doi: 10.1093/carcin/bgg162.
25. Adamek, A., and Kasprzak, A. (2018) Insulin-like growth factor (IGF) system in liver diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1308, doi: 10.3390/ijms19051308.

EFFECT Of BENZO(A)PYRENE ON THE EXPRESSION OF miR-483-3p IN HEPATOCYTE PRIMARY CULTURE AND RAT LIVER

S. V. Filippov[1,2]*, A. A. Yarushkin[1,3], T. S. Kalinina[1], V. Y. Ovchinnikov[2], R. A. Knyazev[4], and L. F. Gulyaeva[1,3]

[1] *Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia; E-mail: filippov@bionet.nsc.ru*

[2] *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetic, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia*

[3] *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

[4] *Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia*

Received May 21, 2019
Revised June 21, 2019
Accepted June 21, 2019

Here, we suggested that the epigenetic mechanism of benzo(a)pyrene (BP) action might be based on the aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated transcription of the target genes, including miRNAs, that have the dioxin response element (DRE) in their promoters. The effect of BP on the expression of the oncogenic miR-483-3p, its host gene *IGF2*, and target gene *IGF1* in primary hepatocytes and in the liver of Wistar female rats was investigated. The activation of AhR was confirmed using selective AhR inhibitor CH-223191 and by evaluating expression of the target *CYP1A1* gene. The lack of coordination between the expression of miR-483-3p and its host gene *IGF2* was revealed, which may be due to the presence of the binding site for the estrogen receptor alpha (ERα), which is a negative expression regulator. Our results confirm the existence of the AhR-mediated pathway in the regulation of expression of miR-483-3p, *IGF1*, and *IGF2* under BP exposure, which is of considerable interest for understanding the epigenetic mechanisms of the carcinogenic effect of BP.

Keywords: benzo(a)pyrene, AhR, ERα, DRE, induction, microRNA, target genes