БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 12, с. 1886 – 1894

УДК 577.214

ИДЕНТИФИКАЦИЯ E2F8 В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРА ТРАНСКРИПЦИИ ФЕРМЕНТОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕРВИЧНЫХ ГЕПАТОЦИТАХ МЫШИ

© 2019 И. Чэнь[1#], Д. Юй[1#], Л. Ван[1]*, Ш. Ду[1]*

Emergency and Clinical Care Medicine Center, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China; E-mail: wanglingui77@aliyun.com, dushouzhi80@163.com

Поступила в редакцию 29.04.2019
После доработки 02.07.2019
Принята к публикации 17.07.2019

Нарушение регуляции процесса глюконеогенеза в клетках печени является основным фактором патогенеза сахарного диабета 2-го типа (T2DM). Известно, что глюконеогенез в клетках печени строго регулируется на уровне транскрипции. Целью настоящей работы была оценка роли транскрипционного фактора E2F8 в метаболизме глюкозы. Обнаружено, что уровни экспрессии E2F8 повышаются в клетках печени мышей линии db/db и мышей, страдающих от ожирения (DIO) в результате потребления обогащенной жирами пищи (HFD). Опосредованная аденовирусом повышенная экспрессия E2F8 в первичных гепатоцитах мыши вызывала экспрессию генов глюконеогенеза, включая PGC-1α, PEPCK и G6Pase, и увеличивала синтез глюкозы в клетках. Также показано, что повышенная экспрессия E2F8 вызывает нарушение чувствительности клеток к действию инсулина *in vitro*. Кроме того, нокдаун E2F8 приводил к повышению чувствительности первичных гепатоцитов к действию инсулина. Полученные результаты указывают на то, что E2F8 участвует в процессе глюконеогенеза и имеет отношение к возникновению устойчивости клеток к действию инсулина. Это может представлять новую стратегию лечения и профилактики возникновения сахарного диабета 2-го типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диабет 2-го типа, глюконеогенез, E2F8, инсулиновая резистентность.

DOI: 10.1134/S0320972519120121

Поддержание гомеостаза глюкозы зависит от поглощения глюкозы жировой тканью и катаболизма гликогена в клетках печени [1]. У млекопитающих печень играет важную роль в поддержании гомеостаза во время продолжительного голодания, в основном, через координацию метаболизма углеводов и липидов. Во время потребления пищи в печени происходит запасание глюкозы в виде гликогена, при голодании происходит высвобождение глюкозы в результате гликогенолиза и глюконеогенеза [2]. Около 90% эндогенной глюкозы синтезируется в печени [3, 4]. В то же время необычная активация в печени глюконеогенеза первично ответственна за повышенный уровень синтеза глюкозы в печени (HGP) при голодании у индивидов с сахарным диабетом 2-го типа (T2DM) [5, 6]. При базовых физиологических условиях у индивидов с T2DM увеличивается синтез глюкозы в печени, но в то же время ингибируется инсулин-зависимая функция ослабленного процесса HGP [1, 7]. Уровень глюконеогенеза в клетках печени контролируется ключевыми ферментами, такими как пируваткарбоксилаза (PC), фосфоенолпируваткарбоксикиназа (PEPCK), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (FBP1), глюкозо-6-фосфатаза (G6Pase) [8, 9]. Уровни экспрессии ключевых ферментов глюконеогенеза регулируются на уровне транскрипции гормон-опосредованными сигналами [1, 10]. PGC-1α способствует экспрессии генов глюконеогенеза путем взаимодействия с некоторыми факторами транскрипции, включая HNF4α, FOXO1, рецептор глюкокортикоидов (GR) и CREB [11], такими как PEPCK и G6Pase [12].

E2F8 является членом семейства факторов транскрипции E2F. Члены этого семейства вовлечены во многие физиологические процессы, включая прогрессирование клеточного цикла,

Принятые сокращения: DEX – дексаметазон; DIO – ожирение, вызванное пищей; FBP1 – фруктозо-1,6-бисфосфатаза; FOXO1 – белок O1 бокса forkhead; FSK – форсколин; G6Pase – глюкозо-6-фосфатаза; GSK3β – киназа гликогенсинтазы 3-β; GR – глюкокортикоидов; HFD – пища, обогащенная жирами; HNF4α – печеночный ядерный фактор 4α; HGP – продукция глюкозы в печени; PC – пируваткарбоксилаза; PEPCK – фосфоенолпируваткарбоксикиназа; PGC-1α – коактиватор 1α рецептора γ активированного пролифератором пероксисом; T2DM – сахарный диабет 2-го типа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

репарацию поврежденной ДНК, апоптоз и дифференцировку клеток [13, 14]. В настоящее время уже идентифицировано восемь членов этого семейства. Показано, что ДНК-связывающий домен фактора транскрипции E2F является очень консервативным. На основе способности активировать или ингибировать ген-мишень члены этого семейства подразделяют на две группы. Показано, что белки E2F1, E2F2 и E2F3 являются активаторами транскрипции, а факторы транскрипции E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 и E2F8 первично функционируют в репрессорных комплексах [15]. Показана роль E2F8 при различных формах рака [16, 17]. Недавно в одной работе было обнаружено, что E2F8 необходим для роста опухолевых клеток простаты и аномально экспрессируется при метастазировании рака простаты [18]. В предыдущей работе было показано, что E2F8 играет важную роль при репарации поврежденной ДНК [19]. В то же время функция E2F8 в регуляции метаболизма до сих пор не изучена.

В настоящей работе была исследована метаболическая функция E2F8 в первичных гепатоцитах. Получены результаты, которые свидетельствуют о том, что E2F8 усиливает процесс синтеза глюкозы в клетках печени. Согласно нашим данным, во время голодания здоровых мышей, а также у мышей с диабетом или мышей с DIO (вызванным длительным принятием жирной пищи ожирением) в печени повышаются уровни экспрессии E2F8 в сравнении с контрольными группами. Было показано, что *in vitro* E2F8 способен повышать уровни экспрессии генов глюконеогенеза. Повышенная экспрессия E2F8 способствует синтезу глюкозы в первичных гепатоцитах с повышенной экспрессией генов глюконеогенеза, в то время как нокдаун гена *E2F8* в клетках печени смягчает уровень гипергликемии, снижая синтез глюкозы в печени за счет уменьшения экспрессии генов глюконеогенеза. Эти результаты позволяют предположить, что E2F8 критически регулирует гомеостаз глюкозы в печени, контролируя программу глюконеогенеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты с лабораторными животными. Восьмимесячные самцы мышей линий db/db, db/m и C57BL/6J были получены от Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Company (Китай); животных содержали в световом режиме: 12 ч на свету и 12 ч в темноте. Модель мышей DIO получали путем кормления особей линии C57BL/6J в возрасте 5 недель либо стандартным пищевым рационом, либо обогащенной жирами пищей (HFD) (45% жиров; Research Diets, NB, США) в течение 12 недель без свободного доступа к воде.

Выделение и культивирование первичных гепатоцитов мыши. Первичные гепатоциты получали от 8-недельных самцов мышей линии C57BL/ 6J, как было описано ранее [20]. Мышей подвергали анестезии и их печень перфузировали с 0,5 мг/мл коллагеназы II типа («Sigma-Aldrich», США) через нижнюю полую вену. Для проведения дальнейших экспериментов гепатоциты культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10%-ную фетальную бычью сыворотку (FBS), 100 ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина.

Конструирование аденовирусов, экспрессирующих E2F8 и E2F8 shRNA. Полноцепочечные кДНК для E2F8 мыши с прикрепленным Flag были получены с помощью ПЦР с использованием кДНК печени и проверены секвенированием ДНК. Полноцепочечная кДНК E2F8 была использована для получения рекомбинантных E2F8-аденовирусов с помощью набора pAdEasy («Invitrogen», США). Рекомбинантные аденовирусы амплифицировали в клетках HEK-293A. Последовательность коротких шпильчатых РНК (shRNA), специфичных против E2F8 мыши, была следующей: 5′-TGTTTGCACGAACACTTAT-3′ (Ad-shE2F8). shRNA против взбитой (scrambled) (Ad-shScram) получали, как описано ранее [21].

Методы определения продукции глюкозы в клетках печени (HGP). Для определения концентрации глюкозы в образцах первичные гепатоциты мыши культивировали в 6-ячеечных планшетах. Клетки инфицировали GFP (green fluorescent protein) или E2F8-аденовирусами. Через 24 ч клетки трижды промывали PBS и инкубировали в 2 мл/ячейка буфера HGP, содержащего 1 ммоль/л дексаметазона (DEX), 2 ммоль/л пирувата, 10 ммоль/л лактата и 10 ммоль/л форсколина (FSK). Через 3 ч собирали культуральную среду. Для определения концентрации глюкозы в культуральной среде с помощью наборов для определения глюкозы («Applygen Technologies», США) отбирали по 0,5 мл среды. Клетки собирали, лизировали и определяли концентрацию общего белка («Bio-Rad», США), чтобы уточнить количество клеток.

Вестерн-блоттинг. Клетки промывали фосфатным буфером (PBS), собирали, лизировали буфером для лизиса (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 10%-ный глицерин и 2%-ный SDS) и дополненный ингибитором протеаз фирмы «Roche». Затем измеряли концентрацию белка с помощью соответствующего набора с реагентом BCA («Pierce»). Белки разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS и затем их переносили на поливинилиден-

фторидную мембрану (PVDF membrane) («GE Healthcare») для проведения Вестерн-блоттинга. Мембрану блокировали 5%-ным обезжиренным сухим молоком в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи при 4 °C со следующими первыми антителами, специфичными к E2F8 («Abclonal»), PGC-1α («Millipore»), инсулиновый рецептор (Thr1160) («Boster Biological Technology»), Akt, p-Akt (Ser-473), GSK-3β, p-GSK-3β (Ser-9) («Cell Signaling Technology»), Flag («Sigma-Aldrich») и ГАФДГ (GAPDH, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа) («Abcam»).

Экстракция общей РНК и ПЦР в реальном времени. Препарат общей РНК получали из печени первичных гепатоцитов мышей с помощью реагента TRIzol («Invitrogen»). Первоначально проводили синтез кДНК с использованием набора Roche Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit («Roche») в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad CFX96 system с использованием SYBR Green PCR Master Mix согласно инструкциям производителя. В качестве внутреннего контроля использовали уровни мРНК β-актина. Использовали следующую последовательность праймеров:
E2F8 – прямой: 5′-GAGAAATCCCAGCCGAGTC-3′,
обратный: 5′-CATAAATCCGCCGACGTT-3′;
PGC-1α – прямой: 5′-TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT-3′,
обратный: 5′-GGAGGACTCTCGTAGCTCGAA-3′;
PEPCK – прямой: 5′-GAGGCCTCCCAACATTCAT-3′,
обратный: 5′-CGCTGAGCGCCTTGCCGGA-3′;
G6Pase – прямой: 5′-GTCAAGCAGTGTGCCCAAGTTA-3′,
обратный: 5′-TGTGCCTTGCCCCTGTTTTATATG-3′;
β-актин – прямой: 5′-AAATCGTGCGTGACATCAAA-3′,
обратный: 5′- AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3′.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные данные представлены в виде среднего значения ± SEM. Для проведения сравнения между двумя группами использовали двухвыборочный непарный критерий Стьюдента. Значение * $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уровень E2F8 в печени мышей линии db/db и мышей с ожирением, вызванным обогащенной жирами пищей, повышается и регулируется их пищевым статусом. Чтобы определить физиологическую функцию E2F8 в метаболизме глюкозы и жиров в печени, были проведены измерения уровня экспрессии E2F8 в печени мышей линии db/db с развившимся диабетом и у мышей DIO с ожирением, вызванным обогащенным жирами пищевым рационом. Показано, что уровни экспрессии мРНК и белка E2F8 в значительной степени повышались в печени мышей линии db/db по сравнению с мышами линии db/m (рис. 1, *a*). Сходные результаты были получены в отношении мышей DIO в сравнении с нормальными мышами, потреблявшими обычную еду (рис. 1, *b*). Кроме того, обнаружено, что E2F8 может регулироваться в печени мыши в ответ на прием пищи. Показано, что уровень экспрессии E2F8 возрастает в условиях голодания. При этом уровень экспрессии E2F8 возвращался в норму после возобновления питания (рис. 1, *c*). Картина экспрессии E2F8 соответствовала картине экспрессии ключевых ферментов глюконеогенеза, включая PGC-1α, PEPCK и G6Pase [22, 23]. Эти результаты подразумевают возможное участие E2F8 в глюконеогенезе, происходящем в клетках печени.

Печеночный E2F8 улучшает течение процесса глюконеогенеза и синтеза глюкозы в первичных гепатоцитах мыши. Чтобы определить регулирует ли E2F8 метаболизм глюкозы в первичных гепатоцитах, первоначально был создан экспрессируемый аденовирусом E2F8 с прикрепленным тэгом Flag (Ad-E2F8). Далее первичные гепатоциты мыши инфицировали аденовирусом, экспрессирующим E2F8 или GFP (контроль). Инфицирование E2F8-аденовирусом может эффективно повышать экспрессию белка E2F8 в первичных гепатоцитах (рис. 2, *b*). Полученные нами результаты подтвердили, что повышенная экспрессия E2F8 вызвает значительное повышение уровня экспрессии мРНК важных генов глюконеогенеза, включая PGC-1α, PEPCK и G6Pase в первичных гепатоцитах в сравнении с контрольной группой, обработанной Ad-GFP. В то же время повышенная экспрессия E2F8 приводила к повышению уровня белка PGC-1α (рис. 2, *a*–*c*). В соответствии с этими результатами также было показано, что повышенная экспрессия E2F8 способствует синтезу глюкозы в первичных гепатоцитах (рис. 2, *d*).

Аденовирус-опосредованный нокдаун E2F8 приводил к ингибированию синтеза глюкозы в первичных гепатоцитах мыши. Чтобы далее уточнить роль E2F8 в глюконеогенезе в печени, первичные гепатоциты были трансфицированы вирусами Ad-shScram или Ad-shE2F8. С помощью методов количественной ПЦР и Вестерн-блоттинга показано, что эти аденовирусы эффек-

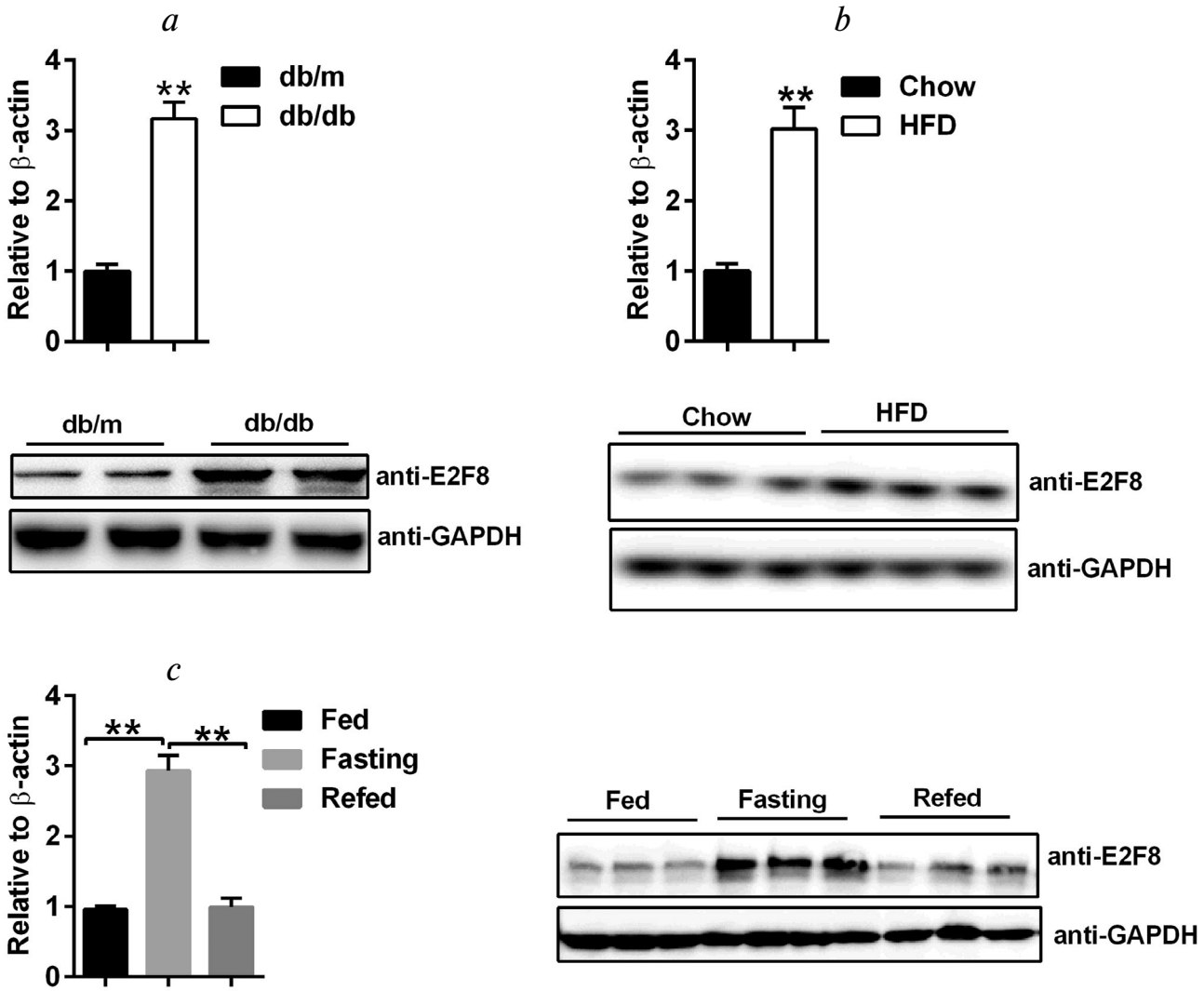

Рис. 1. Регуляция экспрессии E2F8 нарушается в печени мышей с диабетом и ожирением и регулируется пищевым статусом. *a* – Результаты количественной ПЦР (вверху) и Вестерн-блоттинга (внизу) экспрессии E2F8 в печени мышей линии db/db (n = 4/группа); *b* – результаты количественной ПЦР (вверху) и Вестерн-блоттинга (внизу) экспрессии E2F8 в печени ожиревших (DIO) мышей в результате потребления обогащенного жирами пищевого рациона (n = 4/группа); *c* – результаты количественной ПЦР (слева) и Вестерн-блоттинга (справа) экспрессии E2F8 в печени восьминедельных самцов мышей линии C57BL/6J в условиях кормления *ad libitum*, 24 ч голодания и условиях 24 ч голодания/12 ч откармливания (n = 4/группа). Результаты представлены в виде среднего значения ± SEM; ** $p < 0{,}01$

тивно ингибируют экспрессию E2F8 на уровне мРНК и белка (рис. 3, *a* и *b*). Как ожидалось, нами было обнаружено, что снижение уровня экспрессии E2F8 оказывало значительное влияние на транскрипцию ключевых генов глюконеогенеза. Уровни экспрессии генов глюконеогенеза, таких как PGC-1α, PEPCK и G6Pase, в Ad-shE2F8-инфицированных первичных гепатоцитах в отсутствии или в присутствии DEX и FSK снижались (рис. 3, *a* и *b*). В соответствии с тем, что снижение экспрессии E2F8 приводит к ингибированию программы глюконеогенеза в гепатоцитах, нокдаун эндогенного E2F8 с помощью Ad-shE2F8 вызывал значительное снижение продукции глюкозы в первичных гепатоцитах (рис. 3, *c*). На основании этих результатов можно предположить, что E2F8 регулирует экспрессию генов глюконеогенеза и процесс синтеза глюкозы в клетке в автономном режиме.

Повышение экспрессии печеночного E2F8 понижает инсулин-зависимый сигналинг в первичных гепатоцитах мыши. В связи с тем, что повышение уровня глюкозы в печени часто было ассоциировано с повышением чувствительности клеток печени к действию инсулина [24], нами была изучена возможность того, что повышенная экспрессия E2F8 способствует возникнове-

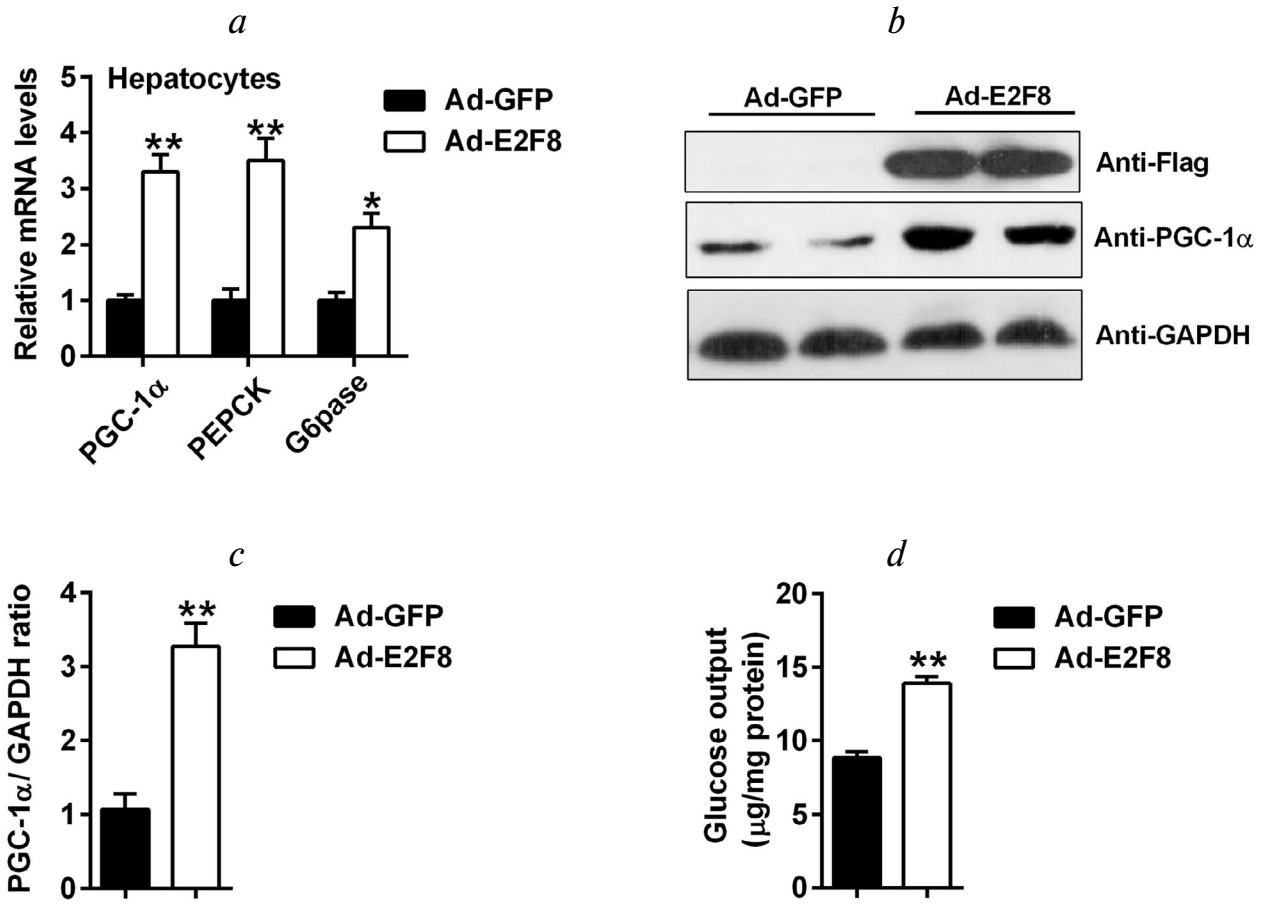

Рис. 2. E2F8 способствует экспрессии генов глюконеогенеза и синтезу глюкозы в первичных гепатоцитах. *a* – Уровни экспрессии мРНК для PGC-1α, PEPCK и G6Pase в первичных гепатоцитах мышей, инфицированных аденовирусами Ad-GFP или Ad-E2F8, определенные с помощью метода количественной ПЦР; *b* – уровни фузионного белка E2F8-Flag и PGC-1α в первичных гепатоцитах мышей, инфицированных аденовирусами Ad-GFP или Ad-E2F8, определенные с помощью метода вестерн-блоттинга; *c* – уровни экспрессии белка PGC-α были рассчитаны после нормализации относительно ГАФДГ (GAPDH); *d* – результаты измерений продукции глюкозы первичными гепатоцитами мыши, инфицированными указанным аденовирусом. Результаты представлены в виде среднего значения ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

нию инсулинорезистентности в первичных гепатоцитах. Мы проводили вестерн-блоттинг экстрактов печени после инфицирования аденовирусом Ad-E2F8 с или без инсулина. Уровни фосфорилирования инсулинового рецептора по остатку треонина Thr1160 и белка Akt по остатку серина Ser473 понижались после повышения экспрессии E2F8 (рис. 4, *a* и *b*). Уровни фосфорилирования киназы гликогенсинтазы 3-β по остатку серина Ser9 (GSK3β) также снижались (рис. 4, *a* и *b*). Однако результаты Вестерн-блоттинга показали, что нокдаун E2F8 приводит к увеличению стимулируемого инсулином фосфорилирования инсулинового рецептора, Akt и GSK3β (рис. 4, *c* и *d*). Эти результаты предполагают, что экспрессия E2F8 в значительной степени коррелирует с инсулиновой резистентностью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глюконеогенез является основным источником глюкозы, и этот процесс жизненно необходим для выживания млекопитающих. Печень является основным местом, где протекает этот процесс [25]. Скорость потока глюконеогенеза контролируется активностью ключевых ферментов глюконеогенеза: PEPCK, FBP1 и G6Pase [26]. В то же время нарушение регуляции глюконеогенеза является одним из основных факторов возникновения некоторых метаболических заболеваний, таких как сахарный диабет 2-го типа. Молекулярные механизмы, лежащие в основе возникновения сахарного диабета 2-го типа, пока недостаточно выяснены. Пониженный синтез глюкозы в клетках печени может смягчить симптомы гипер-

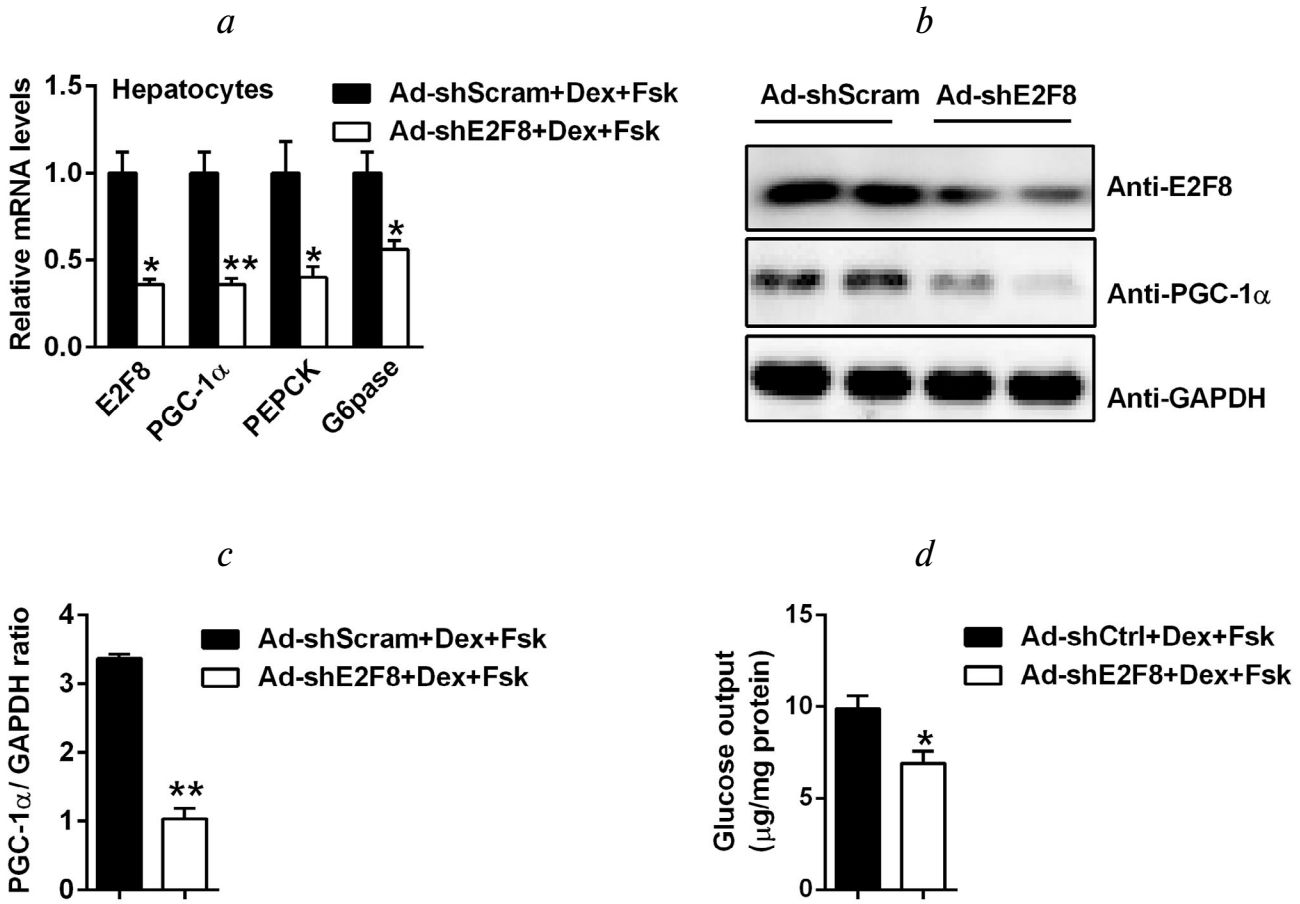

Рис. 3. Нокдаун E2F8 вызывает ингибирование глюконеогенеза в первичных гепатоцитах. *a* – Оценка с помощью метода количественной ПЦР уровня экспрессии мРНК для E2F8, PGC-1α, PEPCK и G6Pase в первичных гепатоцитах из животных, инфицированных Ad-shScram или Ad-shE2F8 с DEX и FSK; *b* – результаты Вестерн-блоттинга, показывающие уровни белков E2F8 и PGC-1α в первичных гепатоцитах мышей, инфицированных аденовирусом Ad-shScram или Ad-shE2F8 с DEX и FSK; *c* – уровни экспрессии белка PGC-α были рассчитаны после нормализации с использованием GAPDH; *d* – анализ выхода глюкозы в первичных гепатоцитах, обработанных как описано на рис. *a*. Результаты представлены в виде среднего значения ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

гликемии, т.е. снизить уровень глюкозы в крови [27].

В настоящей работе было показано, что уровни экспрессии E2F8 регулируются голоданием и пищевым статусом. В частности, уровень экспрессии E2F8 в печени был значительно повышен в состоянии голодания, и уровень глюконеогенеза в печени также был повышен. Поэтому мы предположили, что E2F8 может быть вовлечен в процессы метаболизма глюкозы в клетках печени. Как и другие члены семейства белков E2F, E2F8 принимает участие в регуляции различных физиологических функций вместе с E2F7 в качестве фактора транскрипции [28, 29]. Например, фактор роста эндотелиальных клеток сосудов A (VEGFA), являющийся ключевым фактором процесса ангиогенеза, может быть активирован E2F7/8 [30]. Как и ожидалось, полученные данные свидетельствуют о том, что индуцированное аденовирусом повышение экспрессии E2F8 может вызвать повышение уровня экспрессии ключевых генов глюконеогенеза, включая PEPCK и G6Pase. В соответствии с этим наблюдением повышение уровня экспрессии E2F8 также приводило к повышению способности первичных гепатоцитов мыши увеличивать производство глюкозы. Напротив, нокдаун E2F8 существенно ингибировал экспрессию генов глюконеогенеза и продукцию глюкозы в первичных гепатоцитах мыши в присутствии FSK и DEX. E2F8 может действовать как активатор и как репрессор в зависимости от типа ткани и вида мутации [31]. До сих пор неясно является ли E2F8 репрессором транскрипции или же ее активатором [18, 32]. Нами впервые представлены доказательства того, что в ус-

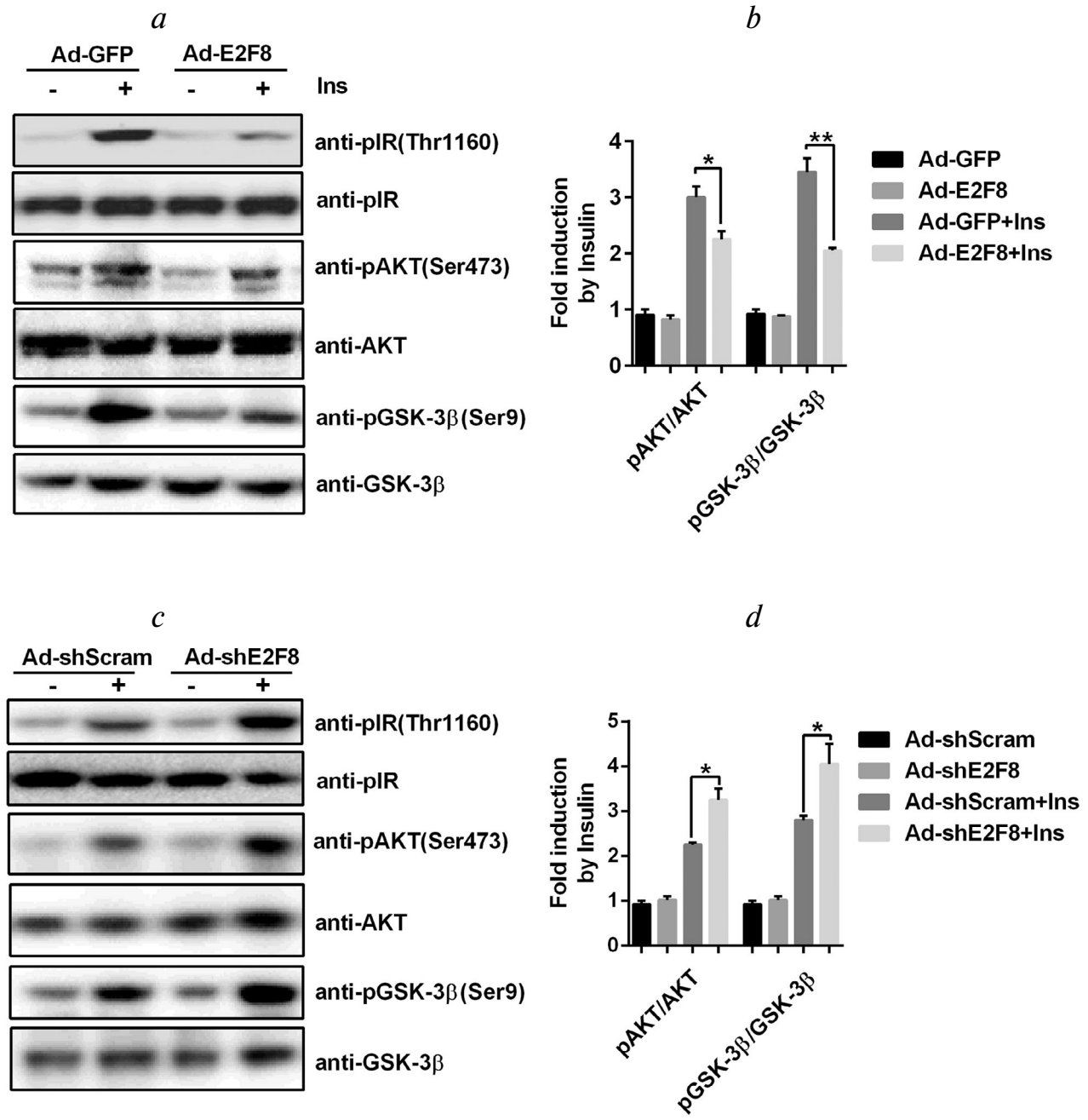

Рис. 4. Повышенная экспрессия E2F8 нарушает чувствительность к инсулину первичных гепатоцитов. *a* – Вестерн-блоттинг фосфорилированных в результате индукции инсулином IR, AKT и GSK-3β в первичных гепатоцитах мышей, инфицированных Ad-GFP или Ad-E2F8 в течение 24 ч и затем обработанных 100 нмоль инсулина (Ins) в течение 5 мин; *b* – денситометрия фосфорилированных белков AKT и GSK-3β на рис. *a*; *c* – Вестерн-блоттинг фосфорилированных в результате индукции инсулином IR, AKT и GSK-3β в первичных гепатоцитах мышей, инфицированных Ad-shScram или Ad-shE2F8 в течение 48 ч и затем обработанных 100 нмоль инсулина (Ins) в течение 5 мин; *d* – картина денситометрии фосфорилированных AKT и GSK-3β на рис. *a*. Результаты представлены в виде среднего значения ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

ловиях *in vitro* повышение экспрессии E2F8 приводит к улучшению экспрессии генов глюконеогенеза в первичных гепатоцитах, и затем в печени происходит усиление образования глюкозы. Необходимо провести дальнейшие исследования, чтобы выяснить каким образом E2F8 усиливает экспрессию генов глюконеогенеза: прямо или опосредованно.

Печеночная инсулинорезистентность представляет собой основной фактор риска развития сахарного диабета 2-го типа и метаболического синдрома [1]. Инсулин повышает поглощение

глюкозы в мышцах и жировой ткани и ингибирует образование глюкозы и ее использование в клетках печени [33]. В настоящей работе было подтверждено, что в первичных гепатоцитах после их обработки Ad-E2F8 происходит нарушение чувствительности к действию инсулина, и этот феномен может быть связан с повышением уровня глюконеогенеза в клетках печени. Отсюда можно предположить, что повышенная экспрессия E2F8 вносит вклад в развитие инсулинрезистентности клеток печени, которая наблюдается у мышей db/db и мышей HFD.

Таким образом, полученные результаты показали, что E2F8 повышает уровни экспрессии генов глюконеогенеза и синтеза глюкозы *in vitro*; также были получены подтверждения того, что повышенная экспрессия E2F8 приводит к индукции инсулиновой резистентности в первичных гепатоцитах. Для дальнейшего изучения влияния E2F8 на процесс глюконеогенеза и резистентность к инсулину *in vivo* необходимо получить линию мышей со специфически нокаутированным в клетках печени фактором транскрипции E2F8.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта (20170540252) от Фонда естественных наук провинции Ляонин (Liaoning Provincial Natural Science Foundation).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты с лабораторными животными были выполнены с одобрения Комитета по изучению животных Института лабораторных животных Даляньского медицинского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petersen, M.C., Vatner, D.F., and Shulman, G.I. (2017) Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 572–587.
2. Lin, H.V., and Accili, D. (2011) Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease, *Cell. Metab.*, **14**, 9–19.
3. Ekberg, K., Landau, B.R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., and Wahren, J. (1999) Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting, *Diabetes*, **48**, 292–298.
4. Moore, M.C., Coate, K.C., Winnick, J.J., An, Z., and Cherrington, A.D. (2012) Regulation of hepatic glucose uptake and storage *in vivo*, *Adv. Nutr.*, **3**, 286–294.
5. Chen, X., Iqbal, N., and Boden, G. (1999) The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects, *J. Clin. Invest.*, **103**, 365–372.
6. Landau, B.R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K., and Kalhan, S.C. (1996) Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state, *J. Clin. Invest.*, **98**, 378–385.
7. Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014) The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, **510**, 84–91.
8. He, L., Sabet, A., Djedjos, S., Miller, R., Sun, X., Hussain, M.A., Radovick, S., and Wondisford, F.E. (2009) Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein, *Cell*, **137**, 635–646.
9. Wu, C., Khan, S.A., Peng, L.J., Li, H., Carmella, S.G., and Lange, A.J. (2006) Perturbation of glucose flux in the liver by decreasing F26P2 levels causes hepatic insulin resistance and hyperglycemia, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291**, 536–543.
10. Pilkis, S.J., and Granner, D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu. Rev. Physiol.*, **54**, 885–909.
11. Canto, C., and Auwerx, J. (2010) Clking on PGC-1alpha to inhibit gluconeogenesis, *Cell Metab.*, **11**, 6–7.
12. Liang, H., and Ward, W.F. (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism, *Adv. Physiol. Educ.*, **30**, 145–151.
13. Polager, S., and Ginsberg, D. (2008) E2F – at the crossroads of life and death, *Trends Cell. Biol.*, **18**, 528–535.
14. Aquinta, P.J., and Lees, J.A. (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **19**, 649–657.
15. DeGregori, J., and Johnson, D.G. (2006) Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis, *Curr. Mol. Med.*, **6**, 739–748.
16. Deng, Q., Wang, Q., Zong, W.Y., Zheng, D.L., Wen, Y.X., Wang, K.S., Teng, X.M., Zhang, X., Huang, J., and Han, Z.G. (2010) E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma *via* regulating cell proliferation, *Cancer Res.*, **70**, 782–791.
17. Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., and Leone, G. (2005) Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation, *J. Biol. Chem.*, **280**, 18211–18220.
18. Lee, S., Park, Y.R., Kim, S.H., Park, E.J., Kang, M.J., So, I., Chun, J.N., and Jeon, J.H. (2016) Geraniol suppresses prostate cancer growth through down-regulation of E2F8, *Cancer Med.*, **5**, 2899–2908.
19. Zalmas, L.P., Zhao, X., Graham, A.L., Fisher, R., Reilly, C., Coutts, A.S., and La Thangue, N.B. (2008) DNA-damage response control of E2F7 and E2F8, *EMBO Rep.*, **9**, 252–259.
20. Luo, P., Wang, P.X., Li, Z.Z., Zhang, X.J., Jiang, X., Gong, J., Qin, J.J., Guo, J., Zhu, X., Yang, S., and Li, H. (2016) Hepatic oncostatin M receptor beta regulates obesity-induced steatosis and insulin resistance, *Am. J. Pathol.*, **186**, 1278–1292.
21. Shen, L., Cui, A., Xue, Y., Cui, Y., Dong, X., Gao, Y., Yang, H., Fang, F., and Chang, Y. (2014) Hepatic differentiated embryo-chondrocyte-expressed gene 1 (Dec1) inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (Srebp-1c) expression and alleviates fatty liver phenotype, *J. Biol. Chem.*, **289**, 23332–23342.
22. Xue, Y., Shen, L., Cui, Y., Zhang, H., Chen, Q., Cui, A., Fang, F., and Chang, Y. (2013) Tff3, as a novel peptide, regulates hepatic glucose metabolism, *PLoS One*, **8**, e75240.

23. Luo, A., Yan, H., Liang, J., Du, C., Zhao, X., Sun, L., and Chen, Y. (2017) MicroRNA-21 regulates hepatic glucose metabolism by targeting FOXO1, *Gene*, **627**, 194–201.
24. Neschen, S., Morino, K., Hammond, L.E., Zhang, D., Liu, Z.X., Romanelli, A.J., Cline, G.W., Pongratz, R.L., Zhang, X.M., Choi, C.S., Coleman, R.A., and Shulman, G.I. (2005) Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice, *Cell. Metab.*, **2**, 55–65.
25. Cahill, G.F., Jr. (2006) Fuel metabolism in starvation, *Annu. Rev. Nutr.*, **26**, 1–22.
26. Granner, D., and Pilkis, S. (1990) The genes of hepatic glucose metabolism, *J. Biol. Chem.*, **265**, 10173–10176.
27. Bjorntorp, P., and Rosmond, R. (1999) Visceral obesity and diabetes, *Drugs*, **58**, 13–18, discussion 75–82.
28. Lammens, T., Li, J., Leone, G., and De Veylder, L. (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family, *Trends Cell Biol.*, **19**, 111–118.
29. Li, J., Ran, C., Li, E., Gordon, F., Comstock, G., Siddiqui, H., Cleghorn, W., Chen, H.Z., Kornacker, K., Liu, C.G., Pandit, S.K., Khanizadeh, M., Weinstein, M., Leone, G., and de Bruin, A. (2008) Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development, *Dev. Cell*, **14**, 62–75.
30. Weijts, B.G., Bakker, W.J., Cornelissen, P.W., Liang, K.H., Schaftenaar, F.H., Westendorp, B., de Wolf, C.A., Paciejewska, M., Scheele, C.L., Kent, L., Leone, G., Schulte-Merker, S., and de Bruin, A. (2012) E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1, *EMBO J.*, **31**, 3871–3884.
31. Thurlings, I., Martinez-Lopez, L.M., Westendorp, B., Zijp, M., Kuiper, R., Tooten, P., Kent, L.N., Leone, G., Vos, H.J., Burgering, B., and de Bruin, A. (2017) Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer, *Oncogene*, **36**, 829–839.
32. Park, S.A., Platt, J., Lee, J.W., Lopez-Giraldez, F., Herbst, R.S., and Koo, J.S. (2015) E2F8 as a novel therapeutic target for lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**.
33. O-Sullivan, I., Zhang, W., Wasserman, D.H., Liew, C.W., Liu, J., Paik, J., DePinho, R.A., Stolz, D.B., Kahn, C.R., Schwartz, M.W., and Unterman, T.G. (2015) FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization, *Nat. Commun.*, **6**, 7079.

IDENTIFICATION OF E2F8 AS A TRANSCRIPTIONAL REGULATOR OF GLUCONEOGENESIS IN PRIMARY MOUSE HEPATOCYTES

Y. Chen[1#], D. Yu[1#], L. Wang[1]*, and S. Du[1]*

Emergency and Clinical Care Medicine Center, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China; E-mail: wanglingui77@aliyun.com, dushouzhi80@163.com

Received April 29, 2019
Revised July 2, 2019
Accepted July 17, 2019

Dysregulation of hepatic gluconeogenesis is a major factor in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2DM). As known, hepatic gluconeogenesis is heavily regulated at the transcription/expression level. The aim of this study was to evaluate the role of E2F8 transcription factor in the glucose metabolism using primary mouse hepatocytes. Here we found that hepatic E2F8 expression levels were increased in db/db and high-fat-diet (HFD)-induced obese (DIO) mice. Adenovirus-mediated overexpression of E2F8 in hepatocytes increased the expression of gluconeogenic genes, including PGC-1α, PEPCK and G6Pase, with subsequent increase in glucose synthesis. Overexpression of E2F8 impaired insulin sensitivity of hepatocytes *in vitro* as well. On the contrary, a knockdown of E2F8 expression increased insulin sensitivity in primary hepatocytes. In summary, these findings indicate that E2F8 is involved in a gluconeogenesis and insulin resistance mechanisms and may represent a novel treatment strategy to prevent T2DM.

Keywords: type 2 diabetes, gluconeogenesis, E2F8, insulin resistance