Эсийн программчилсан үхэлд транскрипцийн факторуудын үүрэг

Ж.Өлзийсайхан[1,2,3], С.Цогтсайхан[1], Т.Ёокочи[3], Ц.Гандолгор[1], Л.Энхсайхан[1], Н.Мөнхтүвшин[4], Б.Мөнхбат[4,5], Ц.Билэгтсайхан[3,4,6,7,8]

[1]Дархлаа Судлалын Тэнхим, БАС, АШУҮИС
[2]Улсын Гуравдугаар Төв Эмнэлэг
[3]Бичил Амь-Дархлаа Судлалын Тэнхим, Айчи АУС
[4]Эрдэм Шинжилгээний Төв Лаборатори, АУХ
[5]Эрдмийн Сургалтын Тэнхим, Эрдмийн Сургууль, АШУҮИС
[6]Цөм Лаборатори, Шинжлэх УхаанТехнологийн Газар, АШУҮИС
[7]Биохимийн Тэнхим, БАС, АШУҮИС
[8]Улсын Хоёрдугаар Төв Эмнэлэг
Цахим хаяг: jamulzii2015@gmail.com

Түлхүүр үг:
Вальпроатын хүчил
Липополисахарид
Эсийн программчилсан үхэл
p53
p65

Товч утга: Хулганы RAW 264.7 макрофаг эсийн системд вальпроатийн хүчлээр үүсгэгдэх эсийн программчилсан үхэлд липополисахаридийн нөлөөг тодорхойлсон судалгаа хараахан хийгдээгүй байгаа нь энэхүү судалгааг явуулах үндэслэл боллоо. RAW 264.7 макрофаг эсийн өсгөврийг ашиглан эсийн амьдрах чадварыг MTT аргачлалаар, эсийн программчилсан үхлийг TUNEL аргачлалаар, уургийн экспрессийг иммуноблотинг шинжилгээгээр тус тус тодорхойлсон. Липополисахарид нь апоптозын үеийн уургуудыг (caspase 3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)) дарангуйлснаар вальпроатийн хүчлээр үүсгэгдэх эсийн үхлээс хамгаалж байсан. Энэхүү липополисахаридийн хамгаалах идэвхи нь вальпроатийн хүчлээр өдөөгдөх p53 уургийг идэвхгүйжүүлсэнтэй холбоотой байсан. Түүнчлэн липополисахарид нь апоптозыг өдөөгч уургуудыг (Bax) дарангуйлж, харин апоптозоос хамгаалагч уургуудыг (Bcl-2) идэвхжүүлсэн. Транскрипцийн факторуудын (p53, NF-κB) химийн ингибиторуудыг ашигласан баталгаажуулах шинжилгээнд липополисахаридийн хамгаалах идэвхи давтагдсан. Толл лайк рецепторын бусад лигандууд (Pam3CSK4, poly I:C, CpG DNA) нь липополисахаридийн адил хамгаалах идэвхтэй тодорхойлогдсон. Эдгээр үр дүнгээс үндэслэн липополисахарид нь транскрипцийн факторуудын (NF-κB, p53) харилцан үйлчлэлээр вальпроатийн хүчлээр үүсгэгдэх эсийн программчилсан үхлээс хамгаалж байна.

Үндэслэл: Хавдарын эсрэг эмчилгээний гол зарчим нь хавдарын эсийг программчилсан үхэлд (апоптозд) оруулж устгах явдал юм. Апоптозын дохио дамжуулах механизмийг амжилттай удирдсанаар хавдарын эмчилгээний үр дүнг нэмэгдүүлэх, нөгөөтэйгүүр эрүүл эсийг апоптозоос хамгаалах бололцоог бидэнд олгож байна. Сүүлийн жилүүдэд хавдарын эсрэг олон бүлэг эмүүдийг туршиж байгаагийн дотор гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторууд (Histone Deacetylase inhibitor, HDACi) ихээхэн анхаарал татаж байгаа юм. Гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторууд нь хавдар дарангуйлагч p53 уургийг ацетилжуулж, фосфоржуулж идэвхжүүлэхийн зэрэгцээ эс дэхь хуримтлалыг нэмэгдүүлж митохондрын мембраны гэмтлийг үүсгэдэг (Hacker et al. 2011; Chen et al. 2011; Kawano et al. 2010; Condorelli et al. 2008). Идэвхжсэн p53 уураг нь митохондрын гадна мембраны нэвчих чадварыг нэмэгдүүлж, митохондрын мембран хоорондын завсрын зайнаас цитохром С эсгэгийн ялгаралтыг ихэсгэж, улмаар каспэйс уургийг идэвхжүүлдэг (Shen et al. 2001). Митохондрын апоптоз нь дарангуйлагч (Bcl-2, Bcl-Xi) болон идэвхжүүлэгч (Bax, Bak) уургуудын харьцаагаар зохицуулагддаг (Green et al. 2009; Zilfou et al. 2009). Энэ бүхнээс харахад гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторууд нь p53 уургийн нийлэгжилтийг ихэсгэснээр митохондрын гэмтлийг үүсгэж эсийг апоптозд оруулдаг байна (Hacker et al. 2011; Chen et al. 2011; Kawano et al. 2010; Condorelli et al. 2008).

Өвөрмөц бус дархлааны хариу урвал нь Тол Лайк Рецептороор, ТЛР (TLR, Toll-like receptor) дамжин өрнөдөг. Одоогоор 10 гаруй бүлэг рецепторууд

тодорхойлогдоод байна. ТЛР-үүд өөрсдийн лигандтай холбогдсоноор бөөмийн фактор каппа Б (nuclear factor (NF)-κB), митогенээр идэвхжих киназа уургууд (mitogen-avtivated protein kinases, MAPKs) зэрэг транскрипцийн факторуудыг идэвхжүүлдэг (Kawai et al. 2010). NF-κB, Erk1/2 MAPK идэвхижсэнээр эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлдэг (Prasad et al. 2010; Henson et al. 2006) бол C-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPKs уургууд идэвхижсэнээр апоптозын процессийг дэмждэг (Peter et al. 2003). Гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторуудаар үүсгэгдэх апоптозын механизмд ТЛР-ээр өдөөгдөх транскрипцийн факторуудын нөлөөг тодорхойлсон судалгаа байхгүй байгаа нь энэхүү ажлыг эхлүүлэх үндэслэл боллоо.

Зорилго: Апоптозын дохио дамжуулах механизмд өвөрмөц бус дархлааны хариу урвалаар сэдээгдэх транскрипцийн факторын нөлөөг тодорхойлох

Зорилт:

1. RAW 264.7 макрофаг эсэд гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибитороор үүсгэгдэх апоптозын дохио дамжуулах механизмийг тодорхойлох
2. Апоптозын дохио дамжуулах механизмд Толл Лайк Рецепторoор (ТЛР) өдөөгдөх транскрипцийн факторын нөлөөг тодорхойлох
3. Апоптозын болон өвөрмөц дархлалын хариу урвалын харилцан үйлчлэлийн механизмыг ингибитор уургийн тусламжтай баталгаажуулах

Хэрэглэгдэхүүн, арга аргачлал:

Эсийн өсгөвөр: Хулганы макрофаг RAW 264.7 эсийг идэвхгүйжүүлсэн 5%-н тугалын хээлийн ийлдэс (FBS), антибиотикийн холимог (penicillin G, streptomycin, amphotericin B) агуулсан эсийн орчинд (MEM, RPMI 1640 medium) орчинд 5% CO2-ийн чийгшилтэй 37˚C хэмд өсгөвөрлөсөн.

Эсийн амьдрах чадвар тодорхойлох шинжилгээ: RAW 264.7 эсийг 96 нүхтэй эсийн тавганд нүх тус бүрт 2*10^4 эс байхаар тооцож 12 цагийн турш өсгөвөрлөсөн. Эсэд гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторууд, ТЛР-ийн лигандууд хийж 24 цагийн турш байлгана. Эсийн амьдрах чадварыг 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium (MTT) бодисын будагдалтаар тодорхойлсон. MTT нь эсийн НАД/НАДФ хамааралт редуктаза ферментийн үйлчлэлээр формазан гэх нил ягаан өнгийн “уусдаггүй” бодисыг үүсгэдэг. Энэ өнгөт урвал дээр үндэслэн эсийн митохондрын редуктаза ферментийн хэмжээгээр тухайн эсийн амьд эсэхийг тодорхойлдог.

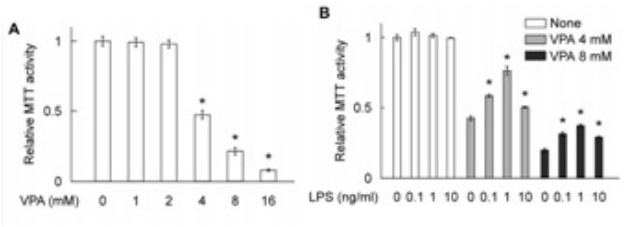
Апоптоз илрүүлэх шинжилгээ: RAW 264.7 эсийг 12 цагийн турш 60 мм-ийн эсийн өсгөврийн тавганд 5*10^5 эс/мл байхаар тооцож хийлээ. Эсэд гистон уургийг ацетилгүйжүүлэгч эсгэгийн ингибиторууд, ТЛР-ийн лигандууд хийж 24 цагийн турш байлгасан. Эсээ 1%-ийн параформальдегидийн уусмалд 15 минутийн турш, дараа нь 70%-ийн этанолд 12 цагийн турш бэхжүүлсэн. Бэхжүүлсэн эсээ TUNEL аргачлалын дагуу будна. Будагдсан эсээ угаагч буферээр угаана, улмаар гэмтсэн ДНХ-г тэмдэглэх уусмалаар 37˚C-д 1 цагийн турш будлаа. Ингэж байлгасны дараа эсийн суспензээ центрифугдээд 1 мл зайлагч буферээр угааж, 100 мкл 5-бром-2'-деоксиуридуин 5'-трифосфат эсрэг биеийн уусмал нэмж суспенз үүсгэж (1:20 of fluorescent anti-BrdUTP antibody diluted in rinse buffer) харанхуйд 1 цаг байлгана (BrdUTP, 5-bromo-2'-deoxyuridini 5'-triphosphate). Будагдсан эсүүдийг FACS анализаторт флюросценцийн идэвхижлээр нь шинжилж тодорхойллоо.

Уургийн экпрессийг тодорхойлох иммуноблотинг шинжилгээ: RAW 264.7 эсээс уургийг хайлуулагч уусмалын тусламжтай ялган авсан. Хайлуулагч уусмалын найрлаганд 1% SDS, 5 млМ EDTA, 10 млМ меркаптоэтанол, 15 нэгж/мл фосфотаз болон протеаз ингибитор тус тус агуулна. Уургийн концентрацийг тодорхойлж, ижил хэмжээний уургуудыг гель электрофорезоор гүйлгэж хүндийн жингээр нь ялгасан. Гель дээрх уургуудыг цахилгаан хүчдэлийн тусламжтайгаар цаасан мембран дээр шилжүүлж, мембраныг холбогдох анхдагч эсрэгбиеээр будсан. Холбогдсон дархан бүрдэлийг туяарагч бодис бүхий хоёрдогч эсрэгбиеээр илрүүлэх бөгөөд туяарагч бодисын эрчимээр нь дархан бүрдэл дэх бай уургийн экспрессийг тодорхойллоо.

Статистик боловсруулалт: Туршилтын утгуудын стандарт хазайлтаар илэрхийлж, хамгийн багадаа 3 туршилтын үр дүнг төлөөлүүлэх утга болгон авсан. Туршилтын болон хяналтын бүлгүүдийн хоорондын статистикийн үнэн магадтай ялгааг Стюдентийн T тестээр тодорхойлсон. $p<0.01$ утгыг статистикийн үнэн магадтай ялгаатай гэж тооцлоо.

Үр дүн:

Альпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн программчилсан үхлээс липополисахаридын хамгаалсан дүн: RAW 264.7 макрофаг эсэд вальпроатын хүчлийн (ВХ–ийн) эс хордуулах нөлөөг MTT шинжилгээгээр судалж шинжилсэн. RAW 264.7 эсэд 24 цагийн турш өөр өөр концентрацитай ВХ-ээр үйлчлэхэд 1 ммоль, 2 ммоль тунгаар ВХ–ийг хийхэд эс хордуулах үйлчлэл үзүүлэхгүй байгаа хэдий ч 4 ммоль тунгаар үйлчилхэд MTT-ийн идэвхи 52% хүртэл буурсан (Зураг 1А). ВХ–ийн шалтгаант эсийн үхэлд ЛПС–ийн нөлөөллийг дараагаар нь судалсан. Үүнд: эхлээд 1 цагийн турш ЛПС–ийг 0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 10 нг/мл тунгаар тус тус үйлчилж улмаар ВХ-ийг 4 ммоль, 8 ммоль тунгаар үйлчилж 24 цагийн турш байлгахад ВХ–ээр өдөөгдсөн эсийн үхлээс гарцаагүй хамгаалж байсан. Зураг 1В-ээс харахад 4 ммоль ВХ-ээр үйлчилсэн тохиолдолд эсийн үхлээс хамгийн хүчтэй хамгаалж байгаа ЛПС-ийн тун нь 1 нг/мл байна (Зураг 1В). ВХ-ийн эс хордуулах өндөр тун болох 8 ммольд ч ЛПС нь мөн хамгаалж байна. ЛПС дангаараа эсийн амьдрах чадварт нөлөө үзүүлээгүй.



Зураг 1. Вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн үхлээс липополисахаридийн хамгаалсан дүн

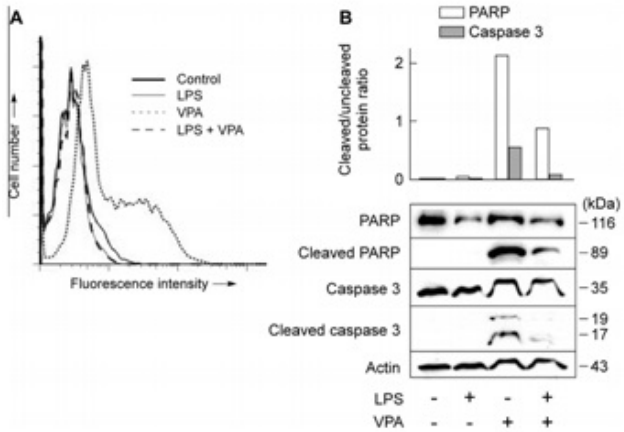
(A) RAW 264.7 эсийг BX-ийн хэд хэдэн тунгаар 24 цагийн турш үйлчилсэн.

(B) RAW 264.7 эсийг ЛПС-ээр 1 цаг үйлчилсний дараагаар BX-ийн 4 ммоль болон 8 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. Эсийн амьдрах чадварыг MTT шинжилгээгээр үнэлсэн.

Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. A, * $p < 0.01$ хяналтын бүлэгтэй харьцуулсан. B, * $p < 0.01$ BX дангаар үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулсан.

Вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхлээс липополисахарид хамгаалсан дүн: BX-ийн шалтгаант эсийн үхлээс ЛПС хамгаалах үйлчлэл байна уу, BX үнэхээр эс хордуулах нөлөө үзүүлж байгаа эсэхийг өөр шинжилгээний аргуудаар шинжилж харуулав. BX-ээр үйлчилсэн RAW 264.7 эсийг 24 цаг байлгасны дараа ЛПС-р үйлчлэхгүйгээр мөн үйлчилсэний дараа TUNEL аргаар будаж ДНХ-ийн хэсгийг илрүүлсэн. BX-ээр нөлөөлсөн эсүүд урсгал эс тоолуурын аппаратанд TUNEL-эерэг эсүүд будагдаж тэмдэглэгдэнэ. Өөрөөр хэлбэл ЛПС-ийг хийхээс өмнө BX-ээр үйлчилсэн эсүүд нь TUNEL-эерэгээр будагдаж байгаа нь BX-ээр нөлөөлсөн эсийн үхлээс ЛПС хамгаалдаг болохыг илэрхийлж байна (Зураг 2A).

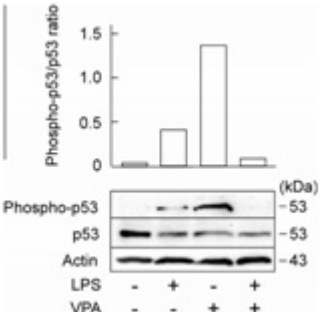
Зураг 2B-д иммунноблотинг шинжилгээний аргаар ЛПС-ийг хийхээс өмнө BX–ийн нөлөөллөөс болж caspase-3, PARP уургийн идэвхижлийг тодорхойлж байгаа ба BX-ийн шалтгаант эсийн үхлийг ЛПС нь дарангуйлж байгааг баталж харуулж байна. Эсэд BX-ээр үйлчлээд 24 цагийн турш байлгасны дараа ЛПС-ийг хийгээд мөн хийлгүйгээр тодорхойлсон иммунноблотинг анализаар шинжлэхэд PARP болон caspase-3 уургийн задарсан хэсгүүд тодорхойлогдож, ЛПС нь дарангуйлж буйг нотолж байна.



Зураг 2. Вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн программчилсан үхлийг липополисахарид дарангуйлсан дүн

RAW 264.7 эсийг эхлээд ЛПС-ийн 1 нг/мл тунгаар 1 цагийн турш үйлчилж улмаар BX-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. (A) Эсийн программчилсан үхэлд орсон эсийг TUNEL шинжилгээгээр тодорхойлсон. (B) Задарсан caspase-3 (cCasp-3) болон poly(ADP-ribose) polymerase (cPARP), нийт caspase-3 (pro-casp-3) болон poly(ADP-ribose) polymerase (pro-PARP) уургийн экспрессийг иммуноблотингийн аргаар тодорхойлсон. Дотоод хяналтаар актиныг тодорхойлсон. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв.

p53 уургаар идэвхижсэн вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхлийг липополисахарид дарангуйлсан дүн: BX нь митохондрид апоптозыг өдөөгч уураг болох p53 уургийг фосфоржуулж, ацетилжуулсанаар эсийн үхлийг нөхцөлдүүлдэг (Häcker et al., 2011; Kawano et al., 2010; Condorelli et al., 2008). BX-ээр нөхцөлдсөн p53 уургийн фосфоржсон хэлбэрт ЛПС-ийн нөлөөллийг иммунноблотинг шинжилгээгээр шинжилсэн. Ингэхэд p53 уургийн фосфоржилтийг BX илэрхий ихэсгэсэн. BX-ээр өдөөгдөх p53 уургийн фосфоржилтийг ЛПС хийсний дараа бараг л бүрэн дарангуйлсан (Зураг 3). ЛПС дангаараа p53 уургийн фосфоржилтийг бага зэрэг нэмэгдүүлсэн.

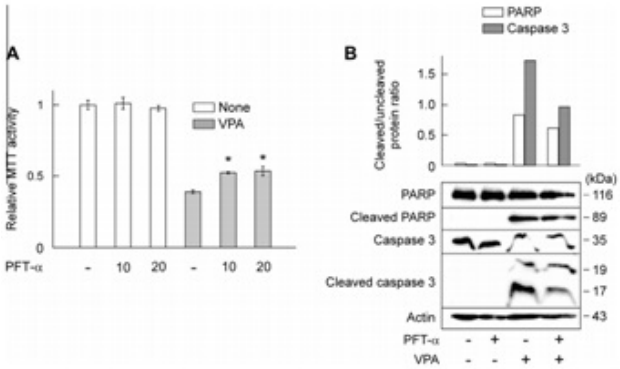


Зураг 3. Липополисахарид нь вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн программчилсан үхлийг дарангуйлахдаа p53 уургийн фосфоржилтыг бууруулсан дүн

RAW 264.7 эсийг эхлээд ЛПС-ийн 1 нг/мл тунгаар 1 цаг үйлчилсний дараагаар BX-ийн 4 ммоль тунгаар үйлчилсэн. Фосфоржсон p53 болон нийт p53 уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Дотоод хяналт болгон актиныг тодорхойлсон. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлсэн. Уургийн толбоны нягтралыг имэйж Ж программ ашиглан тодорхойлсон. *$p < 0.01$ дан BX-ээр үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулсан.

Вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхлээс p53 уургийг дарангуйлж урьдчилан сэргийлсэн үр дүн BX-ийн шалтгаант эсийн үхлээс p53 уургийн идэвхижлийг дарангуйлсанаар ЛПС нь эсийн үхлээс хамгаалж байгааг тодорхойлсон. MTT шинжилгээгээр BX-ийн шалтгаант эсийн үхэлд p53-г дарангуйлагчийн үр дүнг шалгаж үзсэн. RAW 264.7 эсэд PFT-α-г 10, 20 мкмоль тунгаар үйлчилж 1 цаг байлгасны дараа BX-ийг 4 ммоль тунгаар үйлчилж 24 цагийн турш байлгана. Зураг 4A-д BX-ээр үйлчилсэн эсийн үхлийг PFT-α хийснээр эсийг үхлээс хамгаалж

байгаа нь MTT-н идэвхижлийн бууралтаар харагдаж байна (14%-р хамгаалж байна). Цаашлаад BX-ээр нөхцөлдсөн caspase-3, PARP уургуудын идэвхижлийг p53 дарангуйлсан нөлөө байгааг тодорхойлсон. Зураг 4B-д иммунноблотинг анализаар BX-ээр нөхцөлдсөн caspase-3, PARP уургуудын идэвхижлийг PFT-α мэдэгдэхүйц бууруулж байгааг илрүүлсэн ба BX-ийн шалтгаант эсийн үхлээс ЛПС хамгаалах үйл ажиллагаанд p53 уургийн бууралт чухал болохыг харуулж байна.

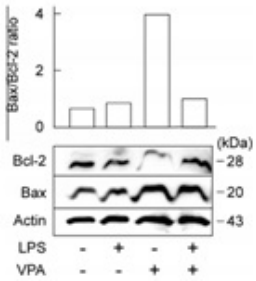


Зураг 4. Вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн программчилсан үхэлд p53 уургийн ингибиторын нөлөөг тодорхойлсон дүн

(A) RAW 264.7 эсийг 10 болон 20 мкмоль PFT-α–аар 1 цаг үйлчилж улмаар BX-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. Эсийн үхлийг MTT шинжилгээгээр тодорхойлсон. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. *p < 0.01 BX-ийн дангаар үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулсан.

(B) RAW 264.7 эсийг 10 мкмоль PFT-α–аар 1 цаг үйлчилж улмаар BX-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. Caspase 3 болон PARP уургийн экспрессийг иммуноблотигийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Задарсан болон нийт уургийн харьцааг имэйж Ж программ ашиглан тоон утгаар илэрхийлэв.

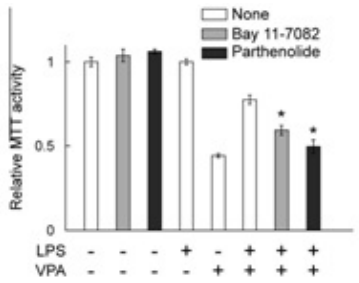
Вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхлээс липополисахарид хамгаалахад BcL-2, Bax уургуудын оролцоог тодорхойлсон дүн: BX нь митохондрид p53 уургийг маш түргэн идэвхижүүлдэг (Häcker et al., 2011; Condorelli et al., 2008). Митохондрид BcL-2-н бүлэг уургууд болох апоптозийг өдөөгч болон хориглогч уургуудын үйл ажиллагааны зохицуулгад p53 уураг оролцдог. Ингэж үйлчилсэнээр митохондрын мембраны зохицуулга алдагдаж цитохром-С эсгэгийн ялгаралтыг ихэсгэж улмаар энэ нь caspase хамааралт уургийг идэвхижүүлж эсийг үхэлд хүргэнэ (Green and Kroemer, 2009; Zilfou and Lowe, 2009). Bax/BcL-2-ийн харьцаа эсийн үхлийн зохицуулгын гол хүчин зүйлийн илэрхийлэл болдог (Mackey et al., 1998) бөгөөд зураг 5-д BX-ээр нөхцөлдсөн Bax, BcL-2-ийн илрэлд ЛПС-ийн нөлөөлөл ямар байгааг иммунноблотинг аргаар шалгасан. Эсэд ЛПС-ийг хийлгүйгээр BX-ийг хийж 24 цагийн турш байлгана. 4 ммоль тунгаар хийсэн BX нь Bax уургийн идэвхжлийг нэмэгдүүлсэн, харин BcL-2 уургийн экспрессийг бууруулсан. Bax/BcL-2-н харьцаа BX-ийн нөлөөгөөр мэдэгдэхүйц ихэссэн. BX-ээр нөхцөлдсөн Bax/BcL-2-н харьцааны өсөлт нь ЛПС-ээр дарангуйлагдаж байсан (Зураг 5). Нэмж хэлэхэд Bax, Bcl-2-н илрэлд ЛПС дангаараа нөлөөлөхгүй байсан.



Зураг 5. Липополисахарид нь вальпроатын хүчлээр өдөөгдэх эсийн програмчилсан үхлээс хамгаалахдаа p53 хамааралт замыг дарангуйлсан дүн

RAW 264.7 эсийг ЛПС-ийн 1 нг/мл тунгаар 1 цаг үйлчилж улмаар BX-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. Bax болон Bcl-2 уургийн экспрессийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Дотоод хяналт болгон актины экспрессийг тодорхойлов. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. Bax болон Bcl-2 уургын нягтыг Имэйж Ж программ ашиглан тодорхойлж тоон утгаар илэрхийлэв. *p < 0.01 vs. BX дангаар үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулав.

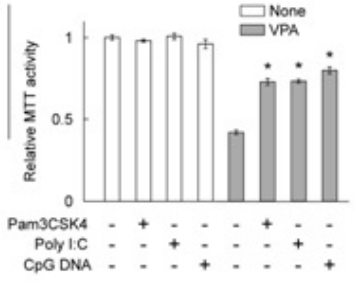
Вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхлийг NF-kB идэвхижсэнээр, липополисахарид нь эсийн үхлээс хамгаалсан дүн: Bax-н бүлэг уургуудын нэг BcL-Xl нэмэгдсэнээр p53-н үйл ажиллагаа алдагдаж NF-kB идэвхижсэнээр эсийн амьдрах чадварыг нэмэгдүүлдэг (Schneider and Kramer, 2011). Өөрөөр хэлбэл BcL-Xl буурч p53 уураг шинээр үүсэх нь NF-kB-г бууруулж энэ нь эс үхэх нөхцөл болдог (Lee et al., 2008). ЛПС нь NF-kB-г идэвхижүүлдэг (Yamamoto and Takeda, 2010) бөгөөд зураг 6-д харагдаж байгаагаар BX-ийн шалтгаант эсийн үхлээс ЛПС хамгаалах үйлдэл нь NF-kB-н нөлөө байгааг тодорхойлсон. Эсэд Bay11-7082-г 5 мкмоль тунгаар, parthenolide-г 5 мкмоль тунгаар хийгээд ЛПС-ийг хийж 1 цагийн турш, дараа нь BX-ийг хийж 24 цагийн турш байлгахад эдгээр нөлөө NF-kB-г дарангуйлсан эсэхийг тодорхойлсон. Ингэж үзэхэд MTT шинжилгээгээр BX гарцаагүй бууруулж (50%-р бууруулсан) байна, харин ЛПС нь MTT-ийн идэвхийг сайжруулж 33%-р хамгаалж байна. Иймд BX-ийн шалтгаант эсийн үхлээс ЛПС нь NF-kB–ийн ингибиторийг дарангуйлж эс хамгаалах үйлдэл үзүүлж байна (Зураг 6). Parthenolide нь 27%-р бууруулж, Bay11-7082 нь 19%-р бууруулах нөлөөг тус тус үзүүлсэн ба parthenolide нь Bay11-7082-с арай илүү хамгаалах үйлдэлтэй байна.



Зураг 6. Вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн программчилсан үхлээс липополисахаридийн хамгаалахад NF-κB-ийн идэвхжилийг тодорхойлсон дүн

RAW 264.7 эсийг эхлээд NF-κB-ийн ингибитор болох Bay 11-7082 (5 мкмоль) болон Parthenolide (5 мкмоль)-ээр 1 цаг үйлчилж улмаар ЛПС-ийн 1 нг/мл тунгаар 1 цаг үйлчилж эцэст нь ВХ-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цаг үйлчилсэн. Эсийн амьдрах чадварыг МТТ шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. * p < 0.01 ВХ дангаар үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулсан.

Вальпроатын хүчлийн шалтгаант эсийн үхэлд TTP-ийн (TLR-н) лигандуудын нөлөөг тодорхойлсон дүн: ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхэлд TTP4-ийн лиганд, ЛПС-с гадна бусад TTP-ийн лигандуудын үйлчлэлийг судалсан. TTP2, 3, 4, 9-ийн лигандууд болох Pam3C-SK4, polyI:C, ЛПС, CpGDNA-д нь тус тусынхаа рецепторуудтайгаа холбогдож эсийн дотор өөр өөрийн замаар дохио дамжуулдаг. Эсэд 10мкг/мл-ээр Pam3C-SK4, 10 мкг/мл-ээр polyI:C, 10 мкмоль тунгаар CpGD-NA-г тус тус хийж, дараа нь 4 мкмоль ВХ-ийг хийж 24 цагийн турш үйлчилсэн. Ингэж үзэхэд TTP-ийн аль ч лигандыг хийхээс өмнө ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхлээс болж МТТ-ийн идэвхи 57%–р буурсан харагдаж байна. TTP-ийн аль ч лиганд дангаараа МТТ-ийн идэвхид нөлөөлөөгүй. Харин Pam 3CSK4 31%-р, poly-I:C 31%-р, CpG DNA 37%-р тус тус ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхлээс хамгаалах үйлчлэл үзүүлж байсан (Зураг 7).



Зураг 7. Вальпроатын хүчлээр өдөөгдөх эсийн программчилсан үхлээс липополисахаридийн хамгаалах урвалд NF-κB-ийн идэвхжилийг тодорхойлсон дүн

RAW 264.7 эсийг TLR-ийн лигандууд болох 10 мкг/мл Pam3CSK4, 10 мкг/мл PolyI:C, 10 мкмоль CpG DNA-ээр тус бүр 1 цаг үйлчилж улмаар ВХ-ийн 4 ммоль тунгаар 24 цагийн турш үйлчилсэн. Эсийн амьдрах чадварыг МТТ шинжилгээгээр үнэлсэн. Туршилтыг хамгийн багадаа 3 удаа давтаж төлөөлүүлэх үр дүнг үзүүлэв. *p < 0.01 нь ЛПС + ВХ бүлэгтэй харьцуулсан. Хэлцэмж: Бидний энэхүү судалгаагаар RAW 264.7 эсийг ВХ-ийн шалтгаант үхлээс ЛПС хамгаалж байгааг тодорхойлсон. Энэ нь p53 уургийн идэвхижлийг дарангуйлж NF-kB уургийг идэвхжүүлсэнээр эсийг апоптозоос хамгаалж байна. ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхэлд нөлөөлөх ВХ–ийн идэвхитэй тунг урьд хийгдсэн эсийн судалгаанд тодорхойлсон байна (Dragunow et al., 2006). Энэхүү судалгаагаар ВХ–ийн шалтгаант апоптоз нь p53 уургийн идэвхижлээр нөхцөлдөх митохондрын гэмтлээс болж үүсдэг болох нь нотлогдож байна. Бид судалгаагаараа ВХ–ийн шалтгаант апоптозийг ЛПС дарангуйлж байгааг тодорхойлохыг тэргүүн зорилгоо болгосон бөгөөд цаашлаад ЛПС нь p53 болон NF-kB –г эсийн дотор үүсэхээс сэргийлдэг.

ЛПС нь ВХ-ээр нөхцөлдсөн p53 уургийн идэвхижлийг дарангуйлдаг. p53 уургийн идэвхижил нь митохондрын мембраны үйл ажиллагааг алдагдуулдаг ба митохондрын мембраны нэвчимхий чанарыг ихэсгэнэ. Ингэснээр caspase-3 болон PARP–н цитохром руу чөлөөлөгдөлтийг ихэсгэнэ. Иймхүү p53 уургийн идэвхижил нь митохондрын гэмтэлд хүргэж эсийг үхэлд хүргэж байна.

RAW 264.7 эсийн ВХ-ээр нөхцөлдсөн эсийн үхлээс ЛПС сэргийлнэ. Үнэн хэрэгтээ caspase-3 болон PARP уургуудийн идэвхижлийг дарангуйлж байгаа нь TUNEL шинжилгээгээр ВХ хийсний дараа үхсэн эсүүдийн илрэлээр харагдаж байна. ВХ-ээр нөхцөлдсөн p53 уургийн идэвхижлийг дарангуйлагч ЛПС нь ВХ–ийн шалтгаант эсийн үхлээс хамгаалж байгаа нь чухал юм. ВХ-ээр нөхцөлдсөн эсийн TTP4-ийн лиганд ЛПС нь NF-kB–г хүчтэй идэвхижүүлэгч бөгөөд энэ нь эсийн мөхлөөс сэргийлж эсийн амьдрах чадварыг сайжруулдаг. NF-kB идэвхижсэнээр ВХ–ийн шалтгаант апоптозоос сэргийлдэг.

TTP-ууд болох TTP2, 3, 9 лигандууд MyD88 хамааралт болон хамааралт бус замаар дохио өгч NF-kB –г мөн л идэвхижүүлж тэдгээр нь эсийн үхлээс сэргийлэх үүргийг гүйцэтгэдэг (Dey et al., 2008). Иймхүү TTP–ийн лиганд болох ЛПС нь ВХ–ээр нөхцөлдсөн апоптозоос NF-kB–г идэвхижүүлсэнээр сэргийлдэг.

NF-kB ба p53 уургийн хоорондын хамаарлыг дурдах хэрэгтэй. Үүнд: NF-kB нь p53 уургийг дарангуйлна. Учир нь NF-kB нь Mdm2 E3–ийн транскрипцийг нөхцөлдүүлдэг ба p53 уургийн нийлэгжилтийг дарангуйлж эсийн амьдрах чадварыг сайжруулдаг. (Tergaonkar et al., 2002). Нөгөө талаас NF-kB–н транскрипцийг p53 уураг дарангуйлдаг (Komarova et al., 2005). Ингэхээр p53 болон NF-kB хоёр нь харилцан бие биенээ хянаж байдаг чухал уургууд юм. Иймхүү p53, NF-kB–ийн хоорондын нарийн харилцан нөлөөлөл нь ВХ–ийн шалтгаант апоптозоос хамгаалах механизмийн гол үндэс юм.

Bax/Bcl-2-ийн харьцаа нь митохондрын апоптозийн зохицуулгын гол хүчин зүйл юм. Митохондрын гадна мембраны нэвчимхий чанарыг апоптозийг хориглогч уураг болох Bcl-2–ийн бүлэг уураг Bcl-2, Bcl-Xl уургууд нь дарангуйлдаг ба апаптозийг өдөөгч уураг болох бүлэг уургууд Bax, Bak нь эсийн мөхлийг нөхцөлдүүлдэг (Green and Kroemer,

2009; Zilfou and Lowe, 2009). Бидний судалгаагаар ВХ–ийн өндөр тунгаар үүсгэгдэх апоптозоос ЛПС хамгаалж байгаа хэдий ч ЛПС дангаараа эсийн амьдрах чадварт, түүнчлэн Bax, Bcl-2-н илрэлд нөлөөлөхгүй байна.

ВХ нь p53 уургийг идэвхижүүлсэнээр Bax/Bcl-2-н харьцаа өөрчлөгдөж митохондрын мембраны гэмтэлийг нөхцөлдүүлдэг. Bax, Bcl-2 бүлэг уургийн харьцаа алдагдсанаас шалтгаалж митохондрын гэмтэл болох ба үүнээс болж цитохром-С чөлөөлөгдөлтийг нэмэгдүүлж улмаар caspase-3 уургийг идэвхижүүлнэ. Bax/Bcl-2 уургийн харьцаа ихэссэнээс болсон митохондрын гэмтлийг ЛПС дарангуйлна. Энэхүү судалгаагаар p53 уургийг дарангуйлж, NF-kB-г идэвхижүүлсэнээр ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхлээс сэргийлнэ гэдэг нь нотлогдож байна. Түүнээс гадна ТТР-ийн лиганд болох ЛПС нь ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхлийг дарангуйлж байна. Түүнчлэн ТТР–ийн лигандууд нь NF-kB ба p53 уургийн зохицуулгад нөлөөлсөнөөр ВХ–ийн шалтгаант эсийн үхлээс хамгаалж ТТР эерэг эсийн байдалд хүргэж байна. Ингэж ВХ–ийн шалтгаант эсийн үхлээс ЛПС–ийг нөлөөлүүлж эсийн үхлийг дарангуйлж байгаа нь ВХ–ийн гаж нөлөөнөөс урьдчилан сэргийлэх боломж олгож байна.

RAW 264.7 эсэд ВХ-ийг 4 мкмоль тунгаар үйлчлэхэд эс хордуулах нөлөө үзүүлж байна. In vitro орчинд ВХ-ийг ижил тунгаар хавдрын эсийн эс хордуулах тун нь 0,1-7 мкмоль-ийн хооронд хэлбэлзэж байгаа нь тогтоогдсон. Уналт таталтын үед цусны плазмд ВХ-ийн тун 0,5-1 мкмоль байхад эмчилгээний тун болдог. ВХ-ийн *in vivo* орчинд хулганы модель ашиглан хүний өндгөвчний карцинома эсийн эсрэг хавдрын эсрэг идэвхитэй тун нь 10 мг/хулгана байсан ба энэ нь энэ судалгаанд хэрэглэсэн ВХ-ийн концентрацитай адилтгаж болохоор байна (Gerstner et al. 2008, Marks et al. 2009).

Энэ нь in vivo орчинд хулганы RAW 264,7 эсийг ашигласан судалгаанд ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхэлд ЛПС-ийн урьдчилан сэргийлэх үйлчлэлийг ойлгомжтой болгох нь сонирхолтой юм. Эцэст нь дүгнэхэд RAW 264,7 эсийн ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхэлд p53 уургийн идэвхижлийн улмаас нөхцөлдсөн митохондрын гэмтэл нь эсийн үхэлд хүргэж байна. Харин ЛПС нь апоптозийг хориглогч уураг NF-kB-г идэвхижүүлж, апоптозийг өдөөгч p53 уургийн идэвхижлийг дарангуйлснаар ВХ-ийн шалтгаант эсийн үхлээс хамгаалж байна гэсэн дүгнэлтэнд хүрч болох юм.

Дүгнэлт: RAW 264.7 макрофаг эсийн өсгөврийг ашиглан эсийн амьдрах чадварыг MTT аргачлалаар, эсийн программчилсан үхлийг TUNEL аргачлалаар, уургийн экспрессийг иммуноблотинг шинжилгээгээр тус тус тодорхойлоход липополисахарид нь апоптозын үеийн уургуудыг (caspase 3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)) дарангуйлснаар вальпроатийн хүчлээр үүсгэгдэх эсийн үхлээс хамгаалж байсан. Энэхүү липополисахаридийн хамгаалах идэвхи нь вальпроатийн хүчлээр өдөөгдөх p53 уургийг идэвхгүйжүүлсэнтэй холбоотой байсан. Түүнчлэн липополисахарид нь апоптозыг өдөөгч уургуудыг (Bax) дарангуйлж, харин апоптозоос хамгаалагч уургуудыг (Bcl-2) идэвхжүүлсэн. Транскрипцийн факторуудын (p53, NF-κB) химийн ингибиторуудыг ашигласан баталгаажуулах шинжилгээнд липополисахаридийн хамгаалах идэвхи давтагдсан. Толл лайк рецепторын бусад лигандууд (Pam3CSK4, poly I:C, CpG DNA) нь липополисахаридийн адил хамгаалах идэвхтэй тодорхойлогдсон. Эдгээр үр дүнгээс үндэслэн липополисахарид нь транскрипцийн факторуудын (NF-κB, p53) харилцан үйлчлэлээр вальпроатийн хүчлээр үүсгэгдэх эсийн программчилсан үхлээс хамгаалж байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг хийхэд гүн туслалцаа үзүүлсэн АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын Сургуулийн Дархлаа Судлалын Тэнхим, Эрдмийн Сургууль, Япон улсын Айчи Анагаах Ухааны Сургуулийн Бичил Амь-Дархлаа Судлалын Тэнхим, Эрдэм Шинжилгээний Төв Лаборатори, Шинжлэх Ухаан Технологийн Газрын Цөм Лаборатори, Улсын Хоёрдугаар Төв Эмнэлэг болон Улсын Гуравдугаар Төв Эмнэлгийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Chen, X., Wong, J.Y., Wong, P., Radany, E.H., 2011. Low-dose valproic acid enhances radiosensitivity of prostate cancer through acetylated p53-dependent modulation of mitochondrial membrane potential and apoptosis. Mol. Cancer. Res. 9, 448-461.*
2. *Condorelli, F., Gnemmi, I., Vallario, A., Genazzani, A.A., Canonico, P.L., 2008. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. Br. J. Pharmacol. 153, 657-668.*
3. *Dey, A., Tergaonkar, V., Lane, D.P., 2008. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. Nat. Rev. Drug. Discov. 7, 1031-1040.*
4. *Dragunow, M., Greenwood, J.M., Cameron, R.E., Narayan, P.J., O'Carroll, S.J., Pearson, A.G., Gibbons, H.M., 2006. Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells. Neuroscience. 140, 1149-1156.*
5. *Gerstner, T., Bell, N., König, S., 2008. Oral valproic acid for epilepsy-long-term experience in therapy and side effects. Expert. Opin. Pharmacother. 9(2), 285-292.*
6. *Green, D.R., Kroemer, G., 2009. Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. Nature. 458, 1127-1130.*
7. *Häcker, S., Karl, S., Mader, I., Cristofanon, S., Schweitzer, T., Krauss, J., Rutkowski, S., Debatin, K.M., Fulda, S., 2011. Histone deacetylase inhibitors prime medulloblastoma cells for chemotherapy-induced apoptosis by enhancing p53-dependent Bax activation. Oncogene. 30, 2275-2281.*
8. *Henson, E.S., Gibson, S.B., 2006. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. Cell. Signal. 18, 2089-2097.*
9. *Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. 11, 373-384.*
10. *Kawano, T., Akiyama, M., Agawa-Ohta, M., Mikami-Terao, Y., Iwase, S., Yanagisawa, T., Ida, H., Agata, N., Yamada, H., 2010. Histone deacetylase inhibitors valproic acid and depsipeptide sensitize retinoblastoma cells to radiotherapy by increasing H2AX phosphorylation and p53 acetylation-phosphorylation. Int. J. Oncol. 37, 787-795.*
11. *Komarova, E.A., Krivokrysenko, V., Wang, K., Neznanov, N., Chernov, M.V., Komarov, P.G., Brennan, M.L., Golovkina, T.V., Rokhlin, O.W., Kuprash, D.V., Nedospasov, S.A., Hazen, S.L., Feinstein, E., Gudkov, A.V., 2005. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. FASEB J. 19, 1030-1032.*
12. *Lee, T.L., Yeh, J., Friedman, J., Yan, B., Yang, X., Yeh, N.T., Van Waes, C., Chen, Z., 2008. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous*

cell carcinomas. Int. J. Cancer. 122, 1987-1998.
13. *Mackey, T.J., Borkowski, A., Amin, P., Jacobs, S.C., Kyprianou, N., 1998. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. Urology. 52, 1085-1090.*
14. *Marks, P.A., Xu, W.S., 2009. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. J. Cell. Biochem. 107, 600-608.*
15. *Peter, A.T., Dhanasekaran, N., 2003. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signaling modules. Reprod. Domest. Anim. 38, 209-213.*
16. *Prasad, S., Ravindran, J., Aggarwal, B.B., 2010. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. Mol. Cell. Biochem. 336, 25-37.*
17. *Schneider, G., Krämer, O.H., 2011. NFκB/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target. Biochim. Biophys. Acta. 1815, 90-103.*
18. *Smith, K.T., Workman, J.L., 2009. Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 41, 21-25.*
19. *Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G., Verma, I., 2002. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. Cancer. Cell. 1, 493-503.*
20. *Yamamoto, M., Takeda, K., 2010. Current views of toll-like receptor signaling pathways. Gastroenterol. Res. Pract. 2010, 240365.*
21. *Zilfou, J.T., Lowe, S.W., 2009. Tumor suppressive functions of p53. Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol. 1, a001883.*

The key role of transcription factors on the innate immunity reaction

J.Ulziisaikhan[1,2,3], S.Tsogtsaikhan[1], T.Yokochi[3], Ts.Gandolgor[1], L.Enkhsaikhan[1], N.Munkhtuvshin[4], B.Munkhbat[4,5], Ts.Bilegtsaikhan[3,4,6,7,8]

[1]Department of Immunology, School of Biomedical Sciences, MNUMS
[2]Third State Central Hospital
[3]Department of Microbiology and Immunology, Aichi Medical University School of Medicine
[4]Central Scientific Research Laboratory, Institute of Medical Sciences
[5]Department of Graduate Studies, Graduate School, MNUMS
[6]Core Laboratory, Science and Technology Center, MNUMS
[7]Department of Biochemistry, School of Biomedical Sciences, MNUMS
[8]Second State Central Hospital
E-mail: jamulzii2015@gmail.com

Introduction: The effect of lipopolysaccharide (LPS) on valproic acid (VPA)-induced cell death was examined by using mouse RAW 264.7 macrophage cells. LPS inhibited the activation of caspase 3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and prevented VPA-induced apoptosis. LPS inhibited VPA-induced p53 activation and pifithrin-α as a p53 inhibitor as well as LPS prevented VPA-induced apoptosis. LPS abolished the increase of Bax/Bcl-2 ratio, which is a critical indicator of p53-mediated mitochondrial damage, in response to VPA. The nuclear factor (NF)-κB inhibitors, Bay 11-7082 and parthenolide, abolished the preventive action of LPS on VPA-induced apoptosis. A series of toll-like receptor (TLR) ligands, Pam3CSK4, poly I:C, and CpG DNA as well as LPS prevented VPA-induced apoptosis. Taken together, LPS was suggested to prevent VPA-induced apoptosis via activation of anti-apoptotic NF-κB and inhibition of pro-apoptotic p53 activation.

Keywords: Valproic acid, Lipopolysaccharide, apoptosis, p53, p65