

УДК 577.352.4

ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ ССК, ANP И ANG II ИНДУЦИРУЮТ КОЛЕБАНИЯ ЦИТОЗОЛЬНОГО КАЛЬЦИЯ В АДИПОЦИТАХ БЕЛОГО ЖИРА

¹Туровский Е.А., ¹Туровская М.В., ¹Толмачева А.В., ¹Долгачева Л.П.,
¹Зинченко В.П., ²Дынник В.В.

¹Учреждение Российской академии наук «Институт биофизики клетки» РАН,
Пушино, e-mail: turovsky.84@mail.ru;

²Учреждение Российской академии наук «Институт теоретической
и экспериментальной биофизики» РАН, Пушино

В экспериментах на культивируемых адипоцитах мышей (9 дней *in vitro*) с использованием флуоресцентной микроскопии показано, что пептидные гормоны: предсердный натрийуретический пептид (ANP), холецистокинин (ССК) и ангиотензин II (AngII) вызывают периодические высокоамплитудные Ca^{2+} -колебания. Колебания, индуцированные ANP, подавлялись конкурентным ингибитором ADP-рибозилциклазы (CD38) – никотиномидом. Колебательные режимы, инициированные холецистокинином, подавлялись ингибиторами фосфолипазы C и протеинкиназы G, но не подавлялись ингибиторами NO-синтазы. Низкие концентрации (1–50 нМ) ангиотензина II вызывали Ca^{2+} -колебания в части адипоцитов, тогда как более высокие концентрации AngII (0,1–0,5 мкМ) вызывали транзитное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Преинкубирование адипоцитов с ингибитором фосфатидил-инозитол-3-киназы – вортоманнином приводило к уменьшению амплитуды Ca^{2+} -ответа, а ингибирование протеинкиназы G с помощью KT5823 снижало скорости увеличения и откатки $[Ca^{2+}]_i$.

Ключевые слова: Ca^{2+} -колебания, адипоциты, предсердный натрийуретический пептид, холецистокинин, ангиотензин II

THE PEPTIDE HORMONES CCK, ANP AND ANG II INDUCED OSCILLATIONS OF CYTOSOLIC CALCIUM IN ADIPOCYTES OF WHITE FAT

¹Turovsky E.A., ¹Turovskaya M.V., ¹Tolmacheva A.V., ¹Dolgacheva L.P.,
¹Zinchenko V.P., ²Dynnik V.V.

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: turovsky.84@mail.ru;

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

In experiments on mouse white adipocytes (9 DIV *in vitro*) using fluorescent microscopy and imaging analysis systems it was shown that a peptide hormones cholecystokinin (CCK), Atrial natriuretic peptide (ANP) and angiotensin II (Ang II) induced periodical high-amplitude Ca^{2+} -oscillations. ANP induced Ca^{2+} -oscillations were suppressed by competitive antagonist of ADP-ribosylcyclase (CD38) – nicotinamide. CCK induced oscillatory regimes were suppressed by antagonists of phospholipase C and protein kinase G but were not inhibited with using antagonist of NO-synthase. AngII at low concentration (1–50 nM) initiated Ca^{2+} -oscillations in some of adipocytes. Ca^{2+} -oscillations were lost with using higher concentration (0,1–0,5 мкМ) of AngII and only transitory Ca^{2+} -responses were recorded. The amplitude of transitory Ca^{2+} -responses were decreased after pre-incubation of adipocytes with wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor), and inhibition of the protein kinase G with KT5823 evoked reduction of the rates of $[Ca^{2+}]_i$ increasing and recovery.

Keywords: Ca^{2+} -oscillations, adipocytes, atrial natriuretic peptide, cholecystokinin, angiotensin II

Предсердный натрийуретический пептид (ANP) преимущественно продуцируется предсердными кардиомиоцитами и регулирует липолиз в жировой ткани [9], усиливает высвобождение адипоцитами свободных жирных кислот. Стимуляция мобилизации липидов у человека при физических нагрузках происходит за счет увеличения уровня ANP в плазме. Понижение уровня циркулирующих натрийуретических пептидов отмечается при развитии инсулиновой резистентности и диабета 2-го типа [4]. Рецептор к натрийуретическому пептиду относится к группе рецепторов, содержащих гуанилатциклазу, активация которого приводит к повышению внутриклеточного уровня cGMP, фосфорилированию гормон-чувствительной липазы и перилипина А протеинкиназой G (PKG).

ССК – гормон и нейропептид, продуцируемый кишечником, который регулирует чувство сытости и выделение панкреатических гормонов. Рецептор к холецистокинину сопряжен с G-белком, PLC, PI3K и Ca^{2+} -системой сигнализации. Помимо классического пути передачи сигнала, обусловленного G-белком, ССК-рецептор сопряжен с рядом путей, характерных для тирозинкиназных рецепторов: MAP киназный путь, включая ERK, JNK и p38-MAPK; PI3K путь; и PLC-гамма путь [10].

Ренин-ангиотензиновая система представляет собой объединение ферментов и гормонов, регулирующих артериальное давление, электролитный и водный баланс [8]. Известно, что предшественник ангиотензина II ангиотензиноген синтезируется и секретируется адипоцитами. Показано,

что AngII регулирует липогенез в адипоцитах, взаимодействуя с AngII рецепторами 2-го типа (AT2R) [6]. Нокаут по рецептору препятствует ожирению. Как и инсулин, AngII действует через рецепторы с тиразинкиназной активностью и запускает сигнальный каскад с участием фосфоинозитид-3-киназы. Также показано, что в адипоцитах мыши AngII инициирует секрецию простагличина, который вызывает процессы пролиферации и дифференцировки жировых клеток [2], увеличивает экспрессию гена лептина и его секрецию [5].

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали первичную культуру белых адипоцитов мыши на 9 день культивирования (9 DIV), полученную из мезенхимальной фракции стволовых клеток эпидидимального жирового депо в соответствии с общепринятой методикой [11]. Измерение динамики цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе мотORIZED микроскопа Axiovert 200M с высокоскоростной черно-белой CCD-камерой AxioCam HSm. Источником света служила ртутная лампа HBO 100. Возбуждение флуоресценции Fura-2 проводили при двух длинах волн (340 и 387 нм) с использованием запирающих светофильтров BP 340/30 и BP 387/15.

Результаты исследования и их обсуждение

Предсердный натрийуретический пептид в широком диапазоне концентраций (3 нМ – 10 мкМ) вызывал в культивируемых белых адипоцитах периодические Ca^{2+} -колебания двух типов (рисунок, а), отличающихся не только амплитудой и периодом, но и наличием лаг-фазы в части клеток, предшествующей началу колебаний (рисунок, а, кривая 1). Колебания, индуцированные данным пептидом, подавлялись конкурентным ингибитором фермента рибозилциклазы (CD38) – никотинамидом (NAM) (рисунок, а), а также ингибиторами протеинкиназы G и рианодинного рецептора (не показано). К появлению двух типов колебаний приводила также аппликация негидролиземого аналога цГМФ и активатора PKG – 8-Bromo-cGMP (рисунок, б). Таким образом, можно предположить, что в генерации колебаний под действием ANP происходит активация сигнального каскада, включающего ряд внутриклеточных ферментов: $sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow CD38 \rightarrow cADPR$, что вызывает мобилизацию $[Ca^{2+}]_i$ через рианодинный рецептор. Известно, что ANP в использованных нами концентрациях стимулирует липолиз в адипоцитах за счет увеличения уровня cGMP, активации cGMP-зависимой протеинкиназы (PKG), фосфорилирующей гормон-чувствитель-

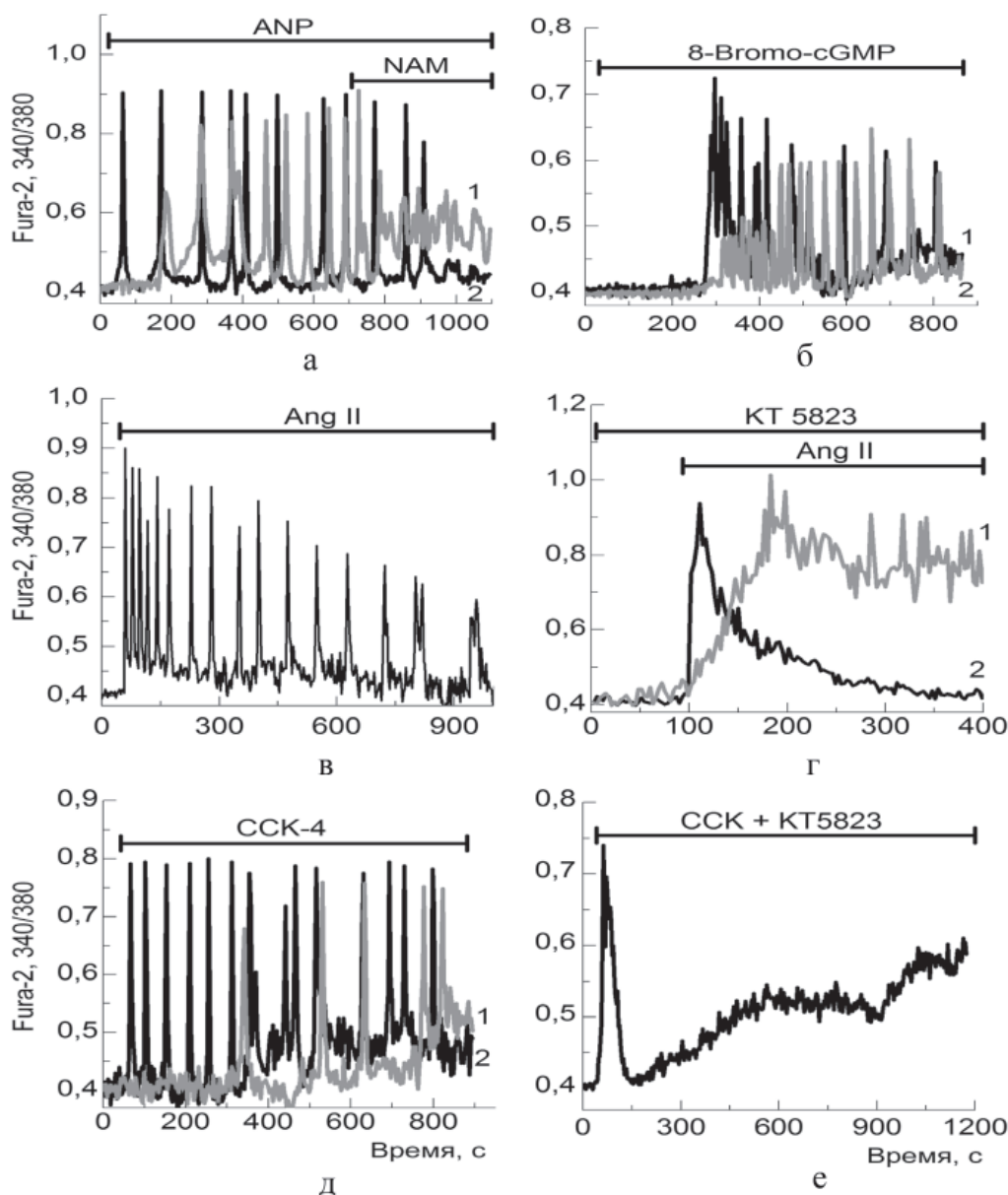
ную липазу и перилипипин [7]. Значение колебаний цитозольного кальция в процессе липолиза остается невыясненным, однако в ряде работ показана их ведущая роль в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток [3]. Экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что ANP вызывает выход адипонектина и адипокина, способных вызывать увеличение чувствительности к инсулину [1]. По-видимому, Ca^{2+} -сигнальная система, управляемая ANP, участвует в процессах секреции адипонектина и адипокина.

Добавление AngII в диапазоне концентраций 1–50 нМ инициировало кальциевые колебания в 5–10% адипоцитов (рисунок, в), тогда как в большинстве клеток наблюдалось либо медленное увеличение Ca^{2+} в цитозоле, либо транзитное его повышение. Более высокие концентрации AngII (0,1–0,5 мкМ) вызывали транзитное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (рисунок, г – кривая 2), а периодических режимов не наблюдалось. Колебательные ответы не возникали после опустошения эндоплазматического ретикулума тапсигаргином, однако медленные Ca^{2+} -сигналы сохранялись в этих условиях и исчезали в бескальциевой среде, что указывает на активацию депонуправляемых Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны. Ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы – вортманнин, и протеинкиназы G-KT5823 оказывали влияния на Ca^{2+} -ответы под действием AngII. Вортманнин понижал амплитуду $[Ca^{2+}]_i$ сигнала, а ингибитор PKG снижал скорости увеличения и от качки $[Ca^{2+}]_i$ (рисунок, г – кривая 1) за счет неполного ингибирования каналов мобилизации кальция из эндоплазматического ретикулума и Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны.

Добавление холецистокинина (ССК) в диапазоне концентраций 10–100 нМ также инициировало в дифференцированных клетках белого жира колебательные режимы $[Ca^{2+}]_i$ (рисунок, д). Ингибиторы фосфолипазы C и IP_3 -рецептора подавляли Ca^{2+} -колебания, инициированные ССК, однако к такому же эффекту приводило и ингибирование протеинкиназы G (рисунок, е). В данном случае в генерации колебаний возможно участие двух петель положительной обратной связи – короткая: $(Ca^{2+} \rightarrow IP_3\text{-рецептор} \rightarrow Ca^{2+})$ и длинная: $(Ca^{2+} \rightarrow PLC \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_3\text{-рецептор} \rightarrow Ca^{2+})$. В виду того, что нами ранее было показано функционирование в адипоцитах $PI3$ -киназного сигнального каскада с участием: $eNOS \rightarrow sGC \rightarrow PKG \rightarrow CD38 \rightarrow RyR \rightarrow Ca^{2+}$, направленного на мобилизацию Ca^{2+} через рианодинный рецептор [11], и поскольку

ку ССК-рецепторы активируют и этот путь, в определенных условиях возможно тандемное включение автоколебательного механизма Ca^{2+} -зависимого выброса Ca^{2+} через канал рианодинового рецептора. Колебания подавлялись в присутствии ингибитора

(5 мкМ КТ5823) одной из ключевых молекул (РКГ) приведенного выше сигнального пути, и в этом случае пептид ССК вызывал лишь импульсное повышение Ca^{2+} , которое устранялось в присутствии ингибиторов фосфолипазы С и IP_3 -рецептора.



Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в дифференцированных белых адипоцитах под действием пептидных гормонов. Эффекты ингибиторов ключевых ферментов cGMP-сигнального каскада: а – аппликация предсердного натрийуретического пептида (ANP) в концентрации 1 мкМ (кривая 1) и 100 нМ (кривая 2) вызывает появление колебаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которые подавляются 1 мМ конкурентного ингибитора рибозилциклазы – никотинамидом (NAM); б – активатор протеинкиназы G (аналог циклического ГМФ) в концентрации 100 нМ; в – аппликация 50 нМ ангиотензина II (Ang II); г – аппликация 100 нМ ангиотензина II вызывает транзитное увеличение Ca^{2+} в цитозоле адипоцитов (кривая 2 – контроль), а ингибирование протеинкиназы G при предварительном инкубировании клеток с 5 мкМ КТ5823 (кривая 1) значительно уменьшает скорости входа и откачки $[\text{Ca}^{2+}]_i$; д – аппликация холецистокинина (ССК) в концентрации 10 нМ (кривая 1) и 100 нМ (кривая 2) вызывает появление колебаний $[\text{Ca}^{2+}]_i$; е – преинкубирование клеток с ингибитором протеинкиназы G – КТ5823 препятствует генерации колебаний на добавление ССК

Заключение

Таким образом, пептидные гормоны ангиотензин II, холецистокинин и предсердный натрийуретический пептид, взаимодействуя с рецепторами адипоцитов белого жира, могут вызывать колебания концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и оказывать модулирующее действие на физиологические сигналы. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что все исследованные пептиды активируют Ca^{2+} -систему сигнализации в белых адипоцитах и при этом могут быть задействованы различные внутриклеточные пути передачи сигналов. Каждый из исследованных пептидных гормонов имеет собственный рецептор и разветвленный сигнальный каскад, но в клетках белого жира активация любого из рецепторов исследованных пептидов может приводить в определенных условиях к появлению периодических режимов нескольких типов. Полученные данные носят приоритетный характер, поскольку периодические и затухающие Ca^{2+} -колебания, стохастические процессы и распространение Ca^{2+} -волн наблюдались неоднократно в экспериментах на клетках других типов, а в адипоцитах ранее были зарегистрированы только импульсные Ca^{2+} -ответы. Следует отметить, что основные известные изменения в системе передачи сигналов при инсулиновой резистентности и диабете 2-го типа прежде всего происходят в Ca^{2+} -системе сигнализации. Дальнейшие исследования связи наблюдаемых режимов активации Ca^{2+} -системы сигнализации с регуляцией липидного обмена позволят понять причины развития диабета 2-го типа при ожирении.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Президиума РАН (программа № 7, проект № 01201258223); Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК16.512.11.2092, проект № 01201179771); ФНМ (проект № 01201256033); РФФИ (проект № 10-04-01306).

Список литературы

1. Birkenfeld A.L., Boschmann M., Engeli S., Moro C., Arfat A.M., Luft F.C., Jordan J. Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – P. 43238.
2. Darimont C., Vassaux G., Ailhaud G., Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin II // Endocrinol. – 1994. – Vol. 135. – P. 2030–2036.
3. Jilka R.L., O'Brien C.A., Ali A.A., Roberson P.K., Weinstein R.S., Manolagas S.C. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts // Bone. – 2009. – Vol. 44. – P. 275–286.
4. Khan A.M., Cheng S., Magnusson M., Larson M.G., Newton-Cheh C., McCabe E.L., Coviello A.D., Florez J.C., Fox C.S., Levy D., Robins S.J., Arora P., Bhasin S., Lam C.S., Vasan R.S., Melander O., Wang T.J. Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol. 96. – P. 3242–3249.
5. Kim S., Whelan J., Claycombe K., Reath D.B., Moustaid-Moussa N. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism // J. Nutr. – 2002. – Vol. 132. – P. 1135–1140.
6. Kotani K., Sakane N., Saiga K., Tsuzaki K., Sano Y., Mu H., Kurozawa Y. The angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and body mass index in healthy Japanese women // Ann. Clin. Biochem. – 2007. – Vol. 44. – P. 83–85.
7. Lafontan M., Moro C., Berlan M., Crampes F., Sengenès C., Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP // Trends. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 19. – P. 130–137.
8. Schling P., Mallow H., Trindl A., Löffler G. Evidence for a local reninangiotensin system in primary cultured human preadipocytes // Int. J. Obes. – 1999. – Vol. 23. – P. 336–341.
9. Sengenès C., Berlan M., De Glisezinski I., Lafontan M., Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes // FASEB J. – 2000. – Vol. 14. – P. 1345–1351.
10. Smeets R.L., Fouraux M.A., van Emst-de Vries S.E., De Pont J.J., Willems P.H. Protein kinase C-mediated inhibition of transmembrane signalling through CCK(A) and CCK(B) receptors // Br. J. Pharmacol. – 1998. – Vol. 123. – P. 1189–1197.
11. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+} -signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+} -signals // Biochemistry (Moscow). – 2012. – Vol. 6. – P. 35–44.

References

1. Birkenfeld A.L., Boschmann M., Engeli S., Moro C., Arfat A.M., Luft F.C., Jordan J. Atrial natriuretic peptide and adiponectin interactions in man // PLoS One. 2012. Vol. 7. pp. 43238.
2. Darimont C., Vassaux G., Ailhaud G., Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin II // Endocrinol. 1994. Vol. 135. pp. 2030–2036.
3. Jilka R.L., O'Brien C.A., Ali A.A., Roberson P.K., Weinstein R.S., Manolagas S.C. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts // Bone. 2009. Vol. 44. pp. 275–286.
4. Khan A.M., Cheng S., Magnusson M., Larson M.G., Newton-Cheh C., McCabe E.L., Coviello A.D., Florez J.C., Fox C.S., Levy D., Robins S.J., Arora P., Bhasin S., Lam C.S., Vasan R.S., Melander O., Wang T.J. Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011. Vol. 96. pp. 3242–3249.
5. Kim S., Whelan J., Claycombe K., Reath D.B., Moustaid-Moussa N. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism // J. Nutr. 2002. Vol. 132. pp. 1135–1140.
6. Kotani K., Sakane N., Saiga K., Tsuzaki K., Sano Y., Mu H., Kurozawa Y. The angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and body mass index in healthy Japanese women // Ann. Clin. Biochem. 2007. Vol. 44. pp. 83–85.
7. Lafontan M., Moro C., Berlan M., Crampes F., Sengenès C., Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP // Trends. Endocrinol. Metab. 2008. Vol. 19. pp. 130–137.
8. Schling P., Mallow H., Trindl A., Löffler G. Evidence for a local reninangiotensin system in primary cultured human preadipocytes // Int. J. Obes. 1999. Vol. 23. pp. 336–341.
9. Sengenès C., Berlan M., De Glisezinski I., Lafontan M., Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes // FASEB J. 2000. Vol. 14. pp. 1345–1351.
10. Smeets R.L., Fouraux M.A., van Emst-de Vries S.E., De Pont J.J., Willems P.H. Protein kinase C-mediated inhibition of transmembrane signalling through CCK(A) and CCK(B) receptors // Br. J. Pharmacol. 1998. Vol. 123. pp. 1189–1197.
11. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+} -signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+} -signals // Biochemistry (Moscow). 2012. Vol. 6. pp. 35–44.

Рецензенты:

Новоселов В.И., д.б.н., профессор лаборатории механизмов рецепции, Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), г. Пущино;
Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., лаборатория регуляции внутриклеточных процессов, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.
Работа поступила в редакцию 11.07.2013.