

**ĐÁNH GIÁ SỰ BIỂU HIỆN CỦA CYP11Bs TRONG DÒNG TẾ BÀO HCT116****Nguyễn Huy Hoàng<sup>1,2</sup>, Rita Bernhardt<sup>2</sup>**<sup>(1)</sup>Viện Công nghệ sinh học, nhhoang@ibt.ac.vn<sup>(2)</sup>Đại học Tổng hợp Saarland, CHLB Đức

**TÓM TẮT:** CYP11B1 và CYP11B2 là 2 enzyme tham gia lần lượt vào sự tổng hợp cortisol và aldosterone. CYP11B1 tham gia quá trình chuyển hóa 11-deoxycortisol tới cortisol còn CYP11B2 tham gia vào quá trình chuyển hóa 11-deoxycorticosterone tới aldosterone trong quá trình tổng hợp steroid ở người. Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng các phương pháp nuôi cấy 2 dòng tế bào động vật (COS-1 và HCT116), biến nạp vector pSVL, pSVL+11B1, pSVL+11B2 vào tế bào động vật và biểu hiện đồng thời với bAdx / hAdx trong 2 dòng tế bào này. Steroid được tách chiết bằng chloroform và được phân tách bằng sắc ký lớp mỏng trên bản kính silica. Kết quả chúng tôi đã đánh giá được mức độ biểu hiện của CYP11Bs trong dòng tế bào người HCT116. Ảnh hưởng của chuỗi truyền điện tử bAdx tốt hơn chuỗi truyền điện tử hAdx trong hệ thống biểu hiện tế bào HCT116. Chính vì vậy, tế bào HCT116 có thể được sử dụng cho nghiên cứu chuyển hóa steroid bởi hai isozyme CYP11Bs.

*Từ khóa:* Adrenodoxin bò (bAdx), Adrenodoxin người (hAdx), CYP11B1, CYP11B2, tế bào COS-1, tế bào HCT116.

**MỞ ĐẦU**

Ở người, 2 isozyme 11 $\beta$ -hydroxylase đáp ứng với sự tổng hợp cortisol và aldosterone lần lượt là CYP11B1 (được đặt tên như 11 $\beta$ -hydroxylase, P450c11, P450XIB1) và CYP11B2 (sinh tổng hợp aldosterone hay gọi tên là P450aldo, P450c18, P450cmo và P450XIB2). Hai isozyme này thuộc nhóm enzyme cytochrome P450 và nằm trong màng ty thể. Mỗi enzyme được tổng hợp bởi 503 amino acid, khi chuyển lên màng ty thể loại bỏ peptide tín hiệu còn lại 479 amino acid [1]. Hai enzyme CYP11B1 và CYP11B2 có 93% trình tự protein giống nhau [2]. Mặc dù protein CYP11B1 và CYP11B2 có độ tương đồng cao nhưng trọng lượng phân tử của chúng lại khác nhau, lần lượt là 51 kDa và 49 kDa khi chạy trên điện di SDS-PAGE [3, 4].

Isozyme CYP11B1 hydroxy hóa tại vị trí 11 $\beta$  của 11-deoxycortisol để tạo thành cortisol [3], đồng thời nó cũng chuyển hóa 11-deoxycorticosterone tới corticosterone hoặc 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone nhưng quá trình hydroxy hóa tại vị trí 18 của corticosterone là rất thấp. CYP11B1 không thể chuyển hóa corticosterone đến aldosterone. Ngược lại, CYP11B2 có hoạt tính 11 $\beta$ -hydroxylase yếu hơn CYP11B1 nhưng nó lại có thể hydroxyl hóa ở vị trí C-18 và sau đó tiếp tục 18-hydroxy corticosterone tới aldosterone. CYP11B2 có thể

chuyển hóa 11-deoxycortisol đến 18-oxocortisol. Phản ứng này không có ý nghĩa ở *in vivo* vì nó không biểu hiện trong vùng *fasciculata*, nhưng nó lại đóng vai trò quan trọng ở các bệnh nhân có hội chứng glucocorticoid áp chế tăng aldosterone.

Giống như các P450 khác, CYP11B1 và CYP11B2 cần oxy phân tử từ sự khử điện tử của NADPH. Điện tử sẽ được truyền từ NADPH qua Adrenodoxin reductase và Adrenodoxin để chuyển tới P450s, lúc này các P450s mới có khả năng xúc tác để khởi động quá trình chuyển hóa cơ chất thành các sản phẩm tương ứng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá sự biểu hiện của 2 protein CYP11B1 và CYP11B2 trong dòng tế bào người HCT116 và so sánh với dòng tế bào khi COS-1 có sử dụng chuỗi truyền điện tử Adrenodoxin (Adx).

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****Nguyên liệu**

*Dòng tế bào:* Tế bào COS-1 là dòng tế bào có nguồn gốc từ vỏ thượng thận của khỉ mặt xanh châu Phi, dòng tế bào này phù hợp cho biến nạp các vector có sự biểu hiện của kháng nguyên SV40 T [5].

Tế bào HCT116 là tế bào bắt nguồn từ tế bào ung thư biểu mô ruột. Các tế bào này dương

tính với keratin khi nhuộm miễn dịch peroxidase.

**Vector:** Vector pSVL được thiết kế để biểu hiện trong tế bào eukaryote. pSVL+CYP11B2 là vector được thiết kế có chứa cDNA của gen mã hóa tổng hợp aldosterone bởi tác giả Kawamoto et al. (1992) [6] với một điểm đột biến ở vị trí 249, nơi mà Ser được thay thế bằng Arg [2]. pSVL+CYP11B1 là cấu trúc vector có chứa cDNA của gen mã hóa 11 $\beta$ -hydroxylase người. Vector bAdx4 là cấu trúc vector mang cDNA của gen adrenodoxin bò dưới sự điều khiển của CMV [7]. Vector hAdx là cấu trúc vector mang cDNA của gen adrenodoxin người dưới sự điều khiển của CMV.

**Hóa chất:** Môi trường nuôi cấy tế bào gồm: pyruvate, glutamine, fetal bovine serum và kháng sinh của hãng Sigma. 11-deoxycortisol (RSS), cortisol (F), 11-deoxycorticosterone (DOC), corticosterone (B), 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B), aldosterone (Aldo), [ $^{14}$ C] 11-deoxycorticosterone và [ $^3$ H] 11-hydroxycortisol của hãng DuPont NEN (Boston, Hoa Kỳ). Các dụng cụ dùng cho sắc ký lớp mỏng và một số hóa chất thông dụng được mua từ hãng Merck. Các hoá chất thông dụng được sử dụng là sản phẩm của hãng New England Biolabs, Merck/BHD Chemicals (Đức), Sigma (Hoa Kỳ)....

### Phương pháp

#### Nuôi cấy tế bào

Đông tế bào COS-1 được nuôi cấy ở 37°C và 6% CO<sub>2</sub> trong môi trường DMEM có bổ sung 5% huyết thanh bò (fetal bovine serum), 0,1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 1 mM pyruvate và 4 mM L-glutamine. Đông tế bào HCT116 cũng được nuôi trong đĩa ở 37°C và 6% CO<sub>2</sub> trong môi trường McCoy's có bổ sung 5% huyết thanh bò, 0,1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin.

#### Biến nạp vào tế bào động vật

Các tế bào được nuôi cấy tới mật độ khoảng  $2 \times 10^5$  tế bào/ đĩa từ 18-24 h, sau đó tế bào này được biến nạp với 1  $\mu$ g vector pSVL+CYP11B1/ pSVL+CYP11B2 và 1  $\mu$ g vector biểu hiện adrenodoxin bò bằng Kit Effectene Transfection Reagent (Qiagen). Sau 6

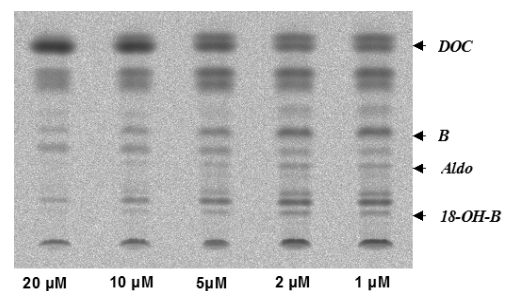
giờ biến nạp, các tế bào được ủ tiếp ở 37°C, 72 giờ trong 4 ml môi trường có bổ sung 11-deoxycortisol và [ $^3$ H]-11-deoxycortisol hoặc môi trường có bổ sung 11-deoxycorticosterone và [ $^{14}$ C]-11-deoxycorticosterone.

#### Tách chiết steroid

Steroid được tách chiết 2 lần từ dịch nổi của tế bào (800  $\mu$ l) với chloroform và các sản phẩm steroid được phân tích bằng sắc ký lớp mỏng theo Nguyen et al. (2008) [8]. Các steroid được phân tách trên bản kính silica và so sánh với các steroid chuẩn. Hàm lượng steroid được phân tích sau 3 ngày phơi nhiễm trên máy phân tích hình ảnh (BAS-2500, Fuji Photo Film Co., Ltd) và số liệu được phân tích trên phần mềm TINA 20.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

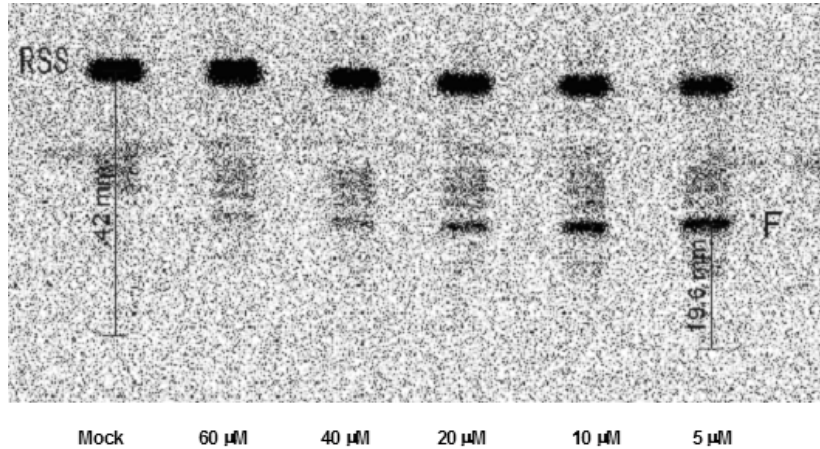
Các tế bào HCT116 đã biến nạp với vector pSVL+CYP11B2 được ủ với cơ chất DOC ở các nồng độ khác nhau (20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M và 1  $\mu$ M). Sản phẩm chuyển hóa steroid từ DOC tới B, 18-OH-B và Aldo được so sánh với các steroid chuẩn. Kết quả trên hình 1 cho thấy, khi sử dụng cơ chất giảm dần từ 20  $\mu$ M đến 1  $\mu$ M thì sự chuyển hóa cơ chất lại tăng dần và đạt mức độ chuyển hóa tối ưu tại 2  $\mu$ M trong thời gian nuôi tế bào là 72 giờ. Kết quả này cho thấy sự tương tác giữa cơ chất DOC ở 2  $\mu$ M với enzyme CYP11B2 là phù hợp cho dòng tế bào HCT116.



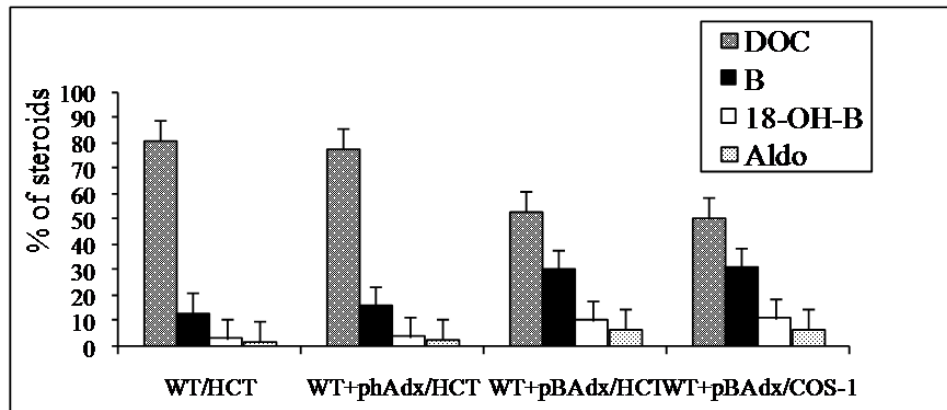
**Hình 1.** Sắc ký lớp mỏng steroid được tách từ tế bào HCT116 với các nồng độ DOC khác nhau. Các tế bào biến nạp sau đó được ủ với các cơ chất DOC (20 M, 10 M, 5 M, 2 M, 1 M) và 5 nCi [ $^{14}$ C]-11-deoxycorticosterone. Vị trí các steroid được đánh dấu như sau: DOC, 11-deoxycorticosterone; B, corticosterone; 18-OH-B, 18-hydroxycorticosterone; Aldo, aldosterone.

Ngoài ra, các tế bào HCT116 đã biến nạp với vector pSVL+CYP11B1 được ủ với cơ chất 11 $\beta$ -deoxycortisol (RSS) ở các nồng độ khác nhau 60  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M và 5  $\mu$ M. Kết quả điện di sắc ký lớp mỏng trên hình 2 cho thấy nồng độ cơ chất giảm dần từ 60  $\mu$ M tới 5

$\mu$ M tỷ lệ nghịch với sự chuyển hóa cơ chất tăng lên và đạt tại nồng độ 5  $\mu$ M. Kết quả này cho thấy sự tương tác của enzyme CYP11B1 với 5  $\mu$ M cơ chất 11 $\beta$ -deoxycortisol là phù hợp với thời gian nuôi cấy tế bào sau 72 giờ.



Hình 2. Sắc ký lớp mỏng steroid bởi tế bào HCT116 với các nồng độ 11 $\beta$ -deoxycortisol khác nhau. Các tế bào biến nạp sau đó được ủ với các cơ chất 11 $\beta$ -deoxycortisol khác nhau: 60  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M và 0.6  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-RSS. Vị trí các steroid được đánh dấu như sau: RSS. 11 $\beta$ -deoxycortisol; F. Cortisol.



Hình 3. Hoạt tính enzyme của quá trình sinh tổng hợp aldosterone khi biểu hiện đồng thời với bovine adrenodoxin trong dòng tế bào HCT116 và tế bào COS-1. Các thành phần steroid chuyển hóa DOC được phân tích trên sắc ký lớp mỏng. Các thí nghiệm được tiến hành độc lập với giá trị trung bình  $\pm$  SEM. Lượng cơ chất, chất trung gian B, 18-OH-B và sản phẩm cuối cùng Aldo được biểu thị thành % hoạt tính được xem như hoạt tính tổng số enzyme (100%).

Để tối ưu hóa quá trình truyền điện tử trong hệ enzyme CYP11B2, vector pSVL+CYP11B2 biến nạp cùng với vector bovine adrenodoxin

(bAdx) hoặc vector human adrenodoxin (hAdx) vào tế bào HCT116. Kết quả trên hình 3 cho thấy, tỷ lệ phần trăm sản phẩm steroid được

tách từ tế bào biến nạp với pSVL+CYP11B2 (WT) và phAdx đã tăng 1,2 lần đối với corticosterone (B), tăng 1,3 lần đối với 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) nhưng tăng không có ý nghĩa với aldosterone (Aldo) so với WT biểu hiện riêng rẽ không cùng với phAdx. Khi thay thế phAdx bằng pbAdx thì sản phẩm steroid tăng lên 2,9 lần đối với B, 2,8 lần đối với 18-OH-B và 3,1 lần đối với Aldo so với WT biểu hiện đơn lẻ không cùng với Adx. Điều này chứng tỏ, quá trình chuyển điện tử từ bAdx đến CYP11B2 tốt hơn quá trình chuyển điện tử từ hAdx đến CYP11B2. Vì vậy, sự biểu hiện đồng thời của bAdx đã được chứng minh là làm tăng hoạt tính của CYP11B2 người trong hệ thống tế bào HCT116, các kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu sự biểu hiện đồng thời với bAdx trong dòng tế bào COS-1 [9, 10].

Ngoài ra, chúng tôi cũng so sánh hoạt tính enzyme CYP11B2 trong tế bào HCT116 và COS-1 khi biểu hiện đồng thời với bAdx. Các đặc tính của enzyme CYP11B2 thường được nghiên cứu trong tế bào khi COS-1 hoặc tế bào COS-7 [11, 12]. Mặc dù dòng tế bào COS rất phổ biến nhưng chưa chắc đã phải là dòng tế bào tối ưu cho biểu hiện các enzyme CYP11B người. Ở đây có thể sự biểu hiện enzyme CYP11B người trên dòng tế bào người HCT116 sẽ có hiệu quả hơn so với sự biểu hiện trên dòng tế bào khi COS. Chính vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn sử dụng tế bào người HCT116 với ưu thế là tế bào mọc nhanh và dễ thao tác để so sánh với dòng tế bào khi COS-1. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phần trăm sản phẩm steroid trong tế bào HCT116 giống với tỷ lệ phần trăm sản phẩm steroid trong tế bào COS-1 (hình 3). Điều này có nghĩa là các thành phần sản phẩm không phụ thuộc vào dòng tế bào sử dụng. Vì vậy, cả 2 dòng tế bào đều có thể ứng dụng cho các nghiên cứu về ảnh hưởng của các đột biến trong các gen hydroxylase steroid ở người.

#### KẾT LUẬN

CYP11B1 được biểu hiện trong tế bào HCT116 với cơ chất RSS tối ưu ở 5  $\mu$ M và CYP11B2 biểu hiện trong tế bào HCT116 với cơ chất DOC tối ưu ở 2  $\mu$ M. Sự biểu hiện của CYP11Bs trong tế bào HCT116 khi sử dụng chuỗi truyền điện tử bAdx tốt hơn khi sử dụng

chuỗi truyền điện tử hAdx. Không có sự khác biệt khi biểu hiện CYP11Bs giữa dòng tế bào HCT116 với dòng tế bào COS-1.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yanagibashi K., Haniu M., Shively J. E., Shen W. H., Hall P., 1986. The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 beta-, 18- hydroxylation, and aldehyde synthesis, *J. Biol. Chem.*, 261(8): 3556-62.
2. Mornet E., Dupont J., Vitek A., White P. C., 1989. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J. Biol. Chem.*, 264(35): 20961-7.
3. Curnow K. M., Tusie-Luna M. T., Pascoe L., Natarajan R., Gu J. L., Nadler J. L., White P. C., 1991. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.*, 5(10): 1513-22.
4. Ogishima T., Shibata H., Shimada H., Mitani F., Suzuki H., Saruta T., Ishimura Y., 1991. Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism, *J. Biol. Chem.*, 266(17): 10731-4.
5. Gluzman Y., 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1): 175-182.
6. Kawamoto T., Mitsuchi Y., Toda K., Yokoyama Y., Miyahara K., Miura S., Ohnishi T., Ichikawa Y., Nakao K., Imura H., 1992. Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(4): 1458-1462.
7. Okamura T., Kagimoto M., Simpson E. R., Waterman M. R., 1987. Multiple species of bovine adrenodoxin mRNA. Occurrence of two different mitochondrial precursor sequences associated with the same mature sequence. *J. Biol. Chem.*, 262(21): 10335-10338.

8. Nguyen H. H., Hannemann F., Hartmann M. F., Wudy S. A., Bernhardt R., 2008. Aldosterone synthase deficiency caused by a homozygous L451F mutation in the CYP11B2 gene. *Mol. Genet. Metab.*, 93(4): 458-67.
9. Bottner B., Denner K., Bernhardt R., 1998. Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones, *Eur. J. Biochem.*, 252(3): 458-466.
10. Cao P. R., Bernhardt R., 1999. Interaction of CYP11B1 (cytochrome P-45011 beta) with CYP11A1 (cytochrome P-450scc) in COS-1 cells. *Eur. J. Biochem.*, 262(3): 720-726.
11. Dunlop F. M., Crock P. A., Montalto J., Funder J. W., Curnow K. M., 2003. A compound heterozygote case of type II aldosterone synthase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(6): 2518-2526.
12. Nomoto S., Massa G., Mitani F., Ishimura Y., Miyahara K., Toda K., Nagano I., Yamashiro T., Ogoshi S., Fukata J., Onishi S., Hashimoto K., Doi Y., Imura H., Shizuta Y., 1997. CMO I deficiency caused by a point mutation in exon 8 of the human CYP11B2 gene encoding steroid 18-hydroxylase (P450C18). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234(2): 382-385.

## EVALUATION OF CYP11Bs EXPRESSION IN HCT116 CELLS

**Nguyen Huy Hoang<sup>1,2</sup>, Rita Bernhardt<sup>2</sup>**

<sup>(1)</sup>Institute of Biotechnology, VAST

<sup>(2)</sup>Saarland University, Germany

### SUMMARY

CYP11B1 and CYP11B2 are enzymes respectively responsible for cortisol and aldosterone biosynthesis. In human steroid biosynthesis, CYP11B1 converts 11-deoxycortisol to cortisol and CYP11B2 converts 11-deoxycorticosterone to aldosterone. In this study, we utilized methods cell culture (COS-1 and HCT116), transfection of vector pSVL, pSVL+11B1, pSVL+11B2 and coexpression of bAdx/hAdx into 2 cell culture. Steroids were extracted by using chloroform and separated on high performance thin layer chromatography (HPTLC) on silica plate. Results showed evaluation of CYP11Bs in HCT116 cells. The effect of electron transport protein of bovin adrenodoxin was better than electron transport protein of human adrenodoxin in HCT116 cells. Therefore, HCT116 cell could be used to study the metabolism of steroids by 2 isozyme CYP11Bs.

*Keywords:* Bovin Adrenodoxin (bAdx); COS-1 cell; CYP11B1; CYP11B2; HCT116 cell; Human Adrenodoxin (hAdx).

*Ngày nhận bài:* 21-6-2012