

## КЛЕТКИ ПОДЧЕЛЮСТНОЙ СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

© И. Г. Гвазава, А. В. Васильев, О. В. Балан, В. В. Терских

*Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;  
электронный адрес: inessagvazava@hotmail.ru*

Получена культура клеток подчелюстной железы мыши, сохраняющая свой фенотип к 20-му пассажу. Анализ гетерогенной культуры свидетельствует о наличии нескольких морфологических типов клеток: мелких плотно упакованных клеток кубовидной, полигональной формы и крупных клеток округлой формы. Культивируемые в течение нескольких недель эпителиальные клетки подчелюстной железы способны формировать тубулярные структуры. Показано, что изучаемая нами культура glanduloцитов (клеток железистого эпителия) представлена клетками K19(+) и NGF(+). Важно отметить также, что как иммуноцитохимически, так и при помощи ПЦР-анализа в исследуемой клеточной популяции выявлена экспрессия генов, кодирующих белки инсулина и проинсулина.

**Ключевые слова:** подчелюстная слюнная железа, популяция glanduloцитов в культуре, проинсулин, инсулин.

Тканевая инженерия, клеточно-замещающие технологии и клеточные трансплантации, применяемые для восстановления тканевых дефектов, являются одним из самых перспективных и развивающихся направлений в современной медицине. В качестве замещающего материала наиболее оптимальным считается использование стволовых и прогениторных клеток, которые способны дифференцироваться в клетки различных типов тканей. Так, согласно некоторым данным, приведенным в литературе, мультипотентные стволовые клетки костного мозга не только проявляют потенции к трансдифференцировке, но и обладают способностью к восстановлению других негемопоэтических органов, включая слюнные железы (Lombaert et al., 2006). Во избежание возможных иммунных конфликтов в клеточной терапии для восстановления различных типов тканей наиболее адекватным является использование тканеспецифичных аутологичных стволовых клеток (Lombaert et al., 2008). На сегодняшний день во всем мире проводятся исследования, связанные с поиском новых способов получения, культивирования и наращивания донорского клеточного материала *in vitro*, изучением механизмов дифференцировки и способов создания специфических тканевых трансплантатов для их дальнейшего использования в медицине.

Исследованию слюнных желез млекопитающих посвящено немало работ (Carson et al., 1982; Бродский, Нечаева, 1988; Погодина и др., 1989; Гвазава и др., 1991; Burford-Mason et al., 1993; Gresik, 1994; Takahashi et al., 2000, 2004; Controneo et al., 2008, и др.). Известно, что слюнные железы млекопитающих принимают участие в обменных процессах, выполняя экзокринную и эндокринную функции в организме (Бабаева, Шубникова, 1979). В них синтезируется и накапливается большое количество различных белков, в том числе инсулиноподобный белок (Шубникова и др., 1980; Shubnikova et al., 1984; Gresik et

al., 1996). Известно, что подчелюстные железы взрослых животных состоят из клеток пяти отделов: ацинусов, вставочных, гранулярных, исчерченных и экскреторных протоков. Регенерация железы при ее повреждении происходит за счет предполагаемых стволовых клеток, которые находятся в протоковой части (Takahashi et al., 2000, 2004).

Показано, что стволовые клетки тканей энтодермального происхождения (овальные клетки печени, прогениторные клетки эпителия поджелудочной железы и клетки — предшественники слюнных желез) имеют сходство в молекулярных маркерах и тканевой локализации (Hisatomi et al., 2004). Особый интерес вызывают результаты исследований, проведенных на культуре клеток слюнных желез, поскольку они существенны для современных методов клеточной инженерии (Sugito et al., 2004; Joraku et al., 2005). Однако данных о методах культивирования клеток подчелюстной железы недостаточно.

Цель настоящей работы заключается в разработке модели культивирования клеток подчелюстной железы мыши и изучении популяции этих клеток *in vitro*.

### Материал и методика

Материалом для исследования служила культура клеток, полученная из протоков подчелюстных желез инbredных мышей линии C57Bl/6 (самцы, 8—12 нед).

Получение и культивирование клеток подчелюстной железы. Подчелюстные железы отделяли от соединительнотканной капсулы и промывали в растворе Хэнкса с добавлением гентамицина (0.16 мкг/мл). Ткань измельчали с помощью глазных ножниц и подвергали ферментативной обработке коллагеназой IV (0.4 мг/мл; Sigma, США). Гомогенизированную

**Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР-анализа**

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера	Размер ПЦР-фрагмента, н. п.
<i>Инсулин 1</i>	5' atggcctgtggatgcgctt 3' 5' tagttgcagtagttctccagct 3'	249
<i>Инсулин 2</i>	5' atggcctgtggatccgctt 3' 5' tagttgcagtagttctccagct 3'	331
<i>HPRT</i>	5' gcttggtgaaaggacctct 3' 5' cacaggactagaacacctgc 3'	209

ткань промывали холодным раствором Хэнкса и затем кратковременным центрифугированием (30 с 400 g) 3 раза отмывали клетки средой с антибиотиками. Осадок с клетками ресуспендировали в среде F12 (90 %; NuClone, Великобритания) с добавлением сыворотки плодов коровы (10 %; Биолот, Россия), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США) и пропускали через нейлоновый фильтр. Суспензию клеток в концентрации 300 тыс./мл высевали в культуральный флакон, предварительно сорбированный коллагеном 1-го типа. Клетки культивировали в смеси сред ДМЕМ/F12 (1 : 1) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, эпидермального фактора роста (10 нг/мл; Sigma, США), инсулина (5 мкг/мл; Sigma, США), трансферрина (5 мкг/мл; Sigma, США), селенита (5 мкг/мл; Sigma, США) (ITS), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. В первый раз среду меняли частично через 5 сут, а затем через каждые 3 сут. При достижении конfluence монослоя клетки пассировали с использованием раствора трипсина—версена (1 : 2; Биолот, Россия).

Иммуногистохимический анализ. Для иммуногистохимического исследования монослойную культуру клеток фиксировали 4%-ным параформальдегидом (PFA) при комнатной температуре в течение 20 мин. После фиксации клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и пермеабилizировали в 0.5%-ном растворе Triton X-100 в течение 30 мин. Для уменьшения неспецифического связывания антител клетки инкубировали в блокирующем растворе, содержащем сыворотку животных, из которых были получены вторые антитела. Инкубацию с первыми антителами проводили в течение 18 ч при 4 °C. После промывки клеток в PBS наносили вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом (FITS, Alexa, Molecular Probes, США) на 1 ч при комнатной температуре. В работе использовали антитела против цитокератина 19, фактора роста нервов (NGF) и высокоспецифичные антитела к проинсулину и инсулину (Novus Biologicals, Inc; R&D Systems, Inc). Данные антитела не вступают в перекрестную реакцию с NGF. Возможность неспецифических реакций была также исключена в контрольных опытах с этими антителами. Для выявления в клетках F-актина использовали фаллоидин, меченный флуоресцентным красителем. Препараты просматривали и фотографировали с помощью конфокального микроскопа Leica DM RXA2 с программным обеспечением Leica LCS и (или) флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA, оснащенного набором светофильтров и фотокамерой Olympus DP70.

ПЦР-анализ экспрессии гена. Выделение тотальной РНК (тРНК) из клеток подчелюстной железы мыши проводили с помощью TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma, США)

по протоколу фирмы-производителя. Из тРНК выделяли мРНК, используя магнитные частицы (Силекс, Россия). Синтез первой цепи кДНК проводили на мРНК с помощью фермента M-MLV обратной транскриптазы, гексануклеотидов и праймера олиго-д(Т)18 (Силекс, Россия). При конструировании праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) анализировали данные о структуре исследуемого гена, используя базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI BLAST, GeneBank, США) и компьютерную программу DNASTar. ПЦР со специфическими праймерами проводили на матрице кДНК с использованием ColoredTag-полимераза (Силекс, Россия) на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия). Структуры праймеров, а также условия амплификации представлены в таблице. Уровень экспрессии гена оценивали по интенсивности свечения полос, полученных при электрофоретическом разделении ПЦР-продуктов в 1.5%-ном агарозном геле с бромистым этидием.

## Результаты и обсуждение

Изолированные клетки подчелюстной железы, находясь в суспензии, образуют агрегаты, вокруг которых плавают одиночные клетки. Ранее было отмечено (Lombaert et al., 2008), что эти скопления или, как их называют, салисферы содержат клетки, которые экспрессируют маркеры стволовых клеток Sca-1, c-Kit и Musashi-1. Кроме того, эти клетки обладают большой потенцией и способны дифференцироваться в протоковые клетки слюнных желез и муцин- или амилазапродуцирующие ацинарные клетки. Подобные скопления описаны в культуре кератиноцитов человека как «мелкие агрегаты» (Воротеляк и др., 2005). По нашим наблюдениям, через 5—7 дней эти скопления начинают прикрепляться к субстрату, обеспечивая жизнеспособность субстратзависимых клеток железистого эпителия (гландулоцитов). Прикрепившиеся клетки начинают расти и делиться, образуя пласты эпителиальных клеток. Образование пластов, так называемых кластеров, в культуре отражает тенденцию к структурной организации (Терских и др., 2003). В изучаемой нами клеточной культуре наряду с плотно упакованными клетками кубовидной или полигональной формы в центре пласта, по периферии видны хорошо распластанные вытянутые клетки с отростками. С помощью этих отростков клетки близлежащих кластеров объединяются и образуют конfluence-слой через 3 нед после культивирования. Одиночные клетки, присутствующие в первые дни культивирования, либо входят в состав агрегатов, либо погибают. Согласно нашим данным, культура клеток подчелюстной слюнной железы состоит из большого количества гетерогенных клеток: очень мелких, которые могут быть стволовыми, и крупных, соответствующих по размерам дифференцированным элементам. В своих работах Воротеляк с соавторами (2006) описывали подобные элементы для популяции кератиноцитов человека. Культивируемые клетки подчелюстной железы мыши в монослое плотно прикреплены к субстрату, обладают высокой адгезией и выраженной жизнеспособностью. Они легко переносят изменение состава среды, в которой растут, и могут обходиться без сыворотки и добавок среды (ITS). При наблюдении за ростом монослойной культуры после 2-го и 3-го пассажей в некоторых участках обнаруживаются скопления клеток в виде колоска. Впоследствии из них



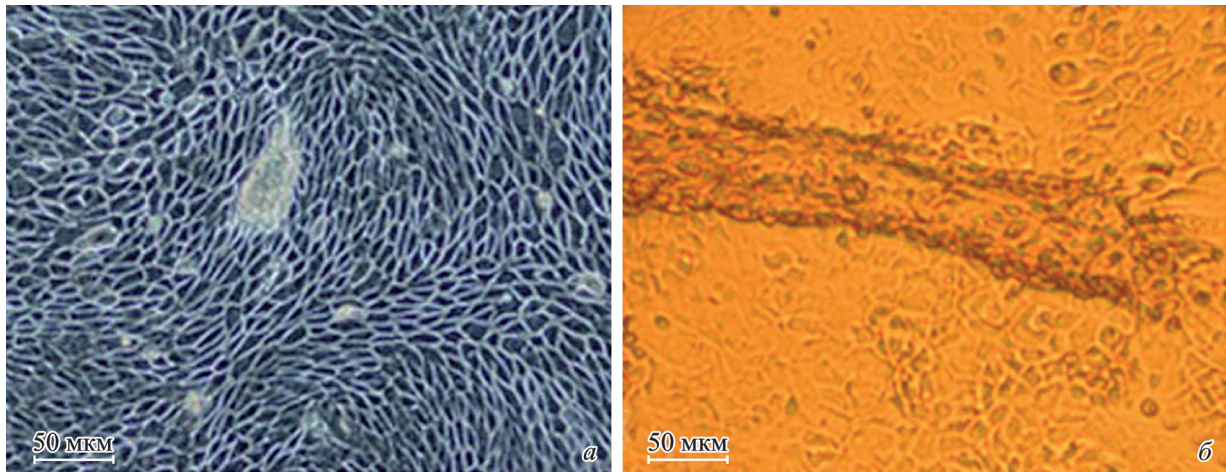


Рис. 1. Культура клеток подчелюстной слюнной железы мыши.  
*a* — конфлюэнтный монослой, *б* — формирование тубулярных структур.

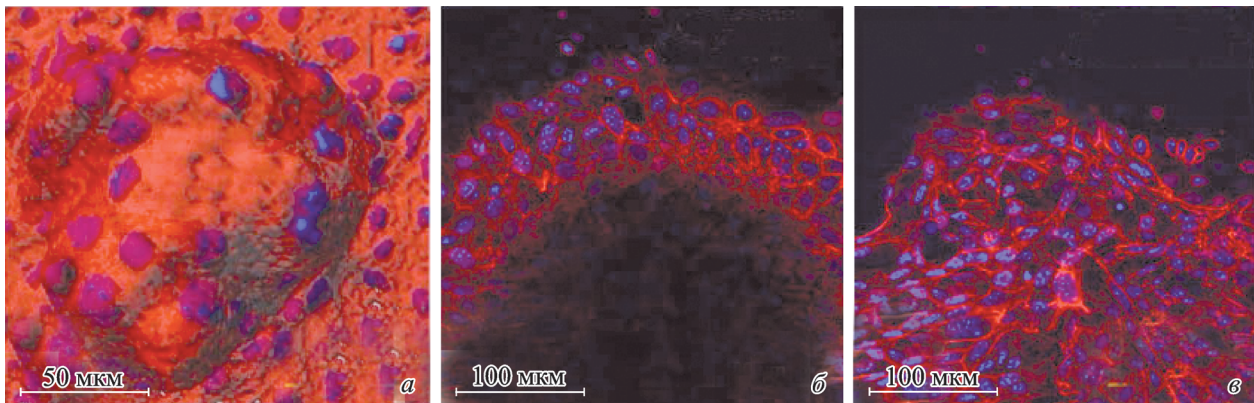


Рис. 2. Конфокальная микроскопия культуры клеток, окрашенных антителами против фаллоидина (красное свечение).  
*a* — трехмерное изображение полого образования в монослое клеток (стрелка), *б* — основание полого образования, *в* — апикальная часть полости. Ядра окрашены Hoechst 33342 (синее свечение).

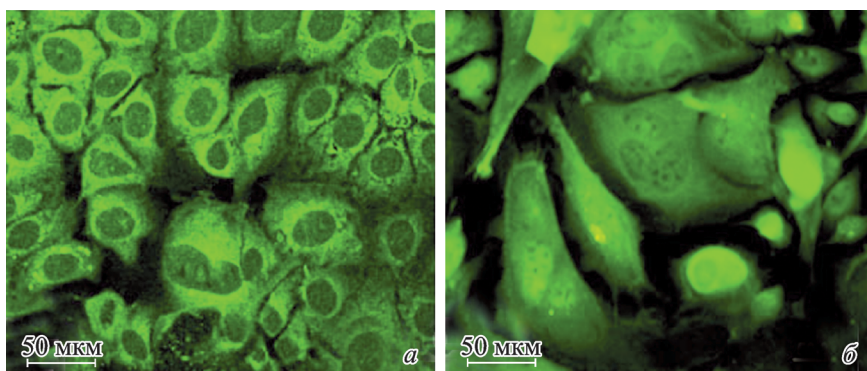


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами против Keratin19 (*a*) и фактора роста нервов — NGF (*б*) клеток, выделенных из подчелюстной слюнной железы мыши.

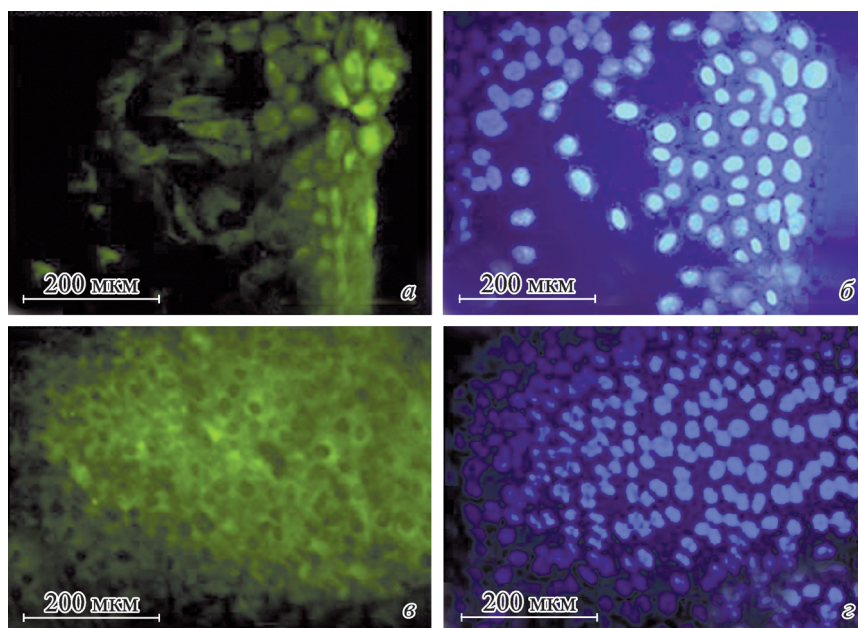


Рис. 4. Иммуноцитохимическое выявление проинсулина (а) и инсулина (в) в культуре клеток подчелюстной слюнной железы мыши.

Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (б, з).

формируются тубулярные структуры (рис. 1). Следует отметить, что образование так называемых трубочек происходит без влияния мезенхимных клеток (клетки растут не на фидерном слое). Такие псевдожелезистые структуры описаны для органной культуры подчелюстной железы мыши (Wigley, Franks, 1976). Согласно нашим данным, полученным при сканировании на конфокальном микроскопе, подобные структуры представляют собой полые образования (рис. 2).

Ранее было показано (Wigley, Franks, 1976), что полученная при органном культивировании эпителиальная первичная культура живет 6 мес и не претерпевает пасси-

рования, поскольку вторичная культура быстро зарастает мезенхимными клетками. Мы получили культуру клеток, которая, несмотря на высокую адгезию, хорошо пересеивается и сохраняет свой фенотип к 20-му пассажу (далее исследования не проводили). Иммуноцитохимическое окрашивание культуры клеток на маркеры эпителиальных протоковых клеток K18 и K19 (рис. 3) свидетельствует о том, что изучаемая культура клеток представляет собой эпителий протоков слюнной железы. Показано, что дифференцирующиеся K19-положительные клетки соответствуют эндокринным предшественникам, имеющим протоковое происхождение (Blyszczuk et al., 2004; Naujok et al., 2008). А также, учитывая данные (Черных и др., 2007) о кератине 19 как маркере стволовых клеток эпидермального происхождения, можно предположить, что полученная нами клеточная популяция также обладает потенциалом к дифференцировке. Однако этот вопрос остается не до конца изученным и требует дальнейших исследований. Известно, что слюнные железы млекопитающих продуцируют большое количество биологически активных веществ (Gresik et al., 1996; Egea et al., 2000). Так, у мышей по сравнению с другими млекопитающими содержание фактора роста нервов в клетках подчелюстной железы в тысячи раз превышает его локализацию в других тканях (Carson et al., 1982). Эти данные хорошо согласуются с интенсивным окрашиванием полученной нами культуры клеток подчелюстной железы на антитела против фактора роста нервов (рис. 4).

Вопрос о внепанкреатической выработке инсулина или родственного ему вещества дискутируется довольно давно. Хотя радиоиммуноаналитическим (РИА) методом инсулин обнаружен во многих органах и тканях млекопитающих (Rosenzweig et al., 1980), иммуноцитохимически он выявляется далеко не во всех из них (Шубникова и др., 1980). Присутствие и синтез этого гормона установлены помимо подчелюстной железы лишь в клетках исчерченных протоков слюнных околоушных желез крысы и человека (Murakami et al., 1982; Smith, Patel, 1984). Наличие

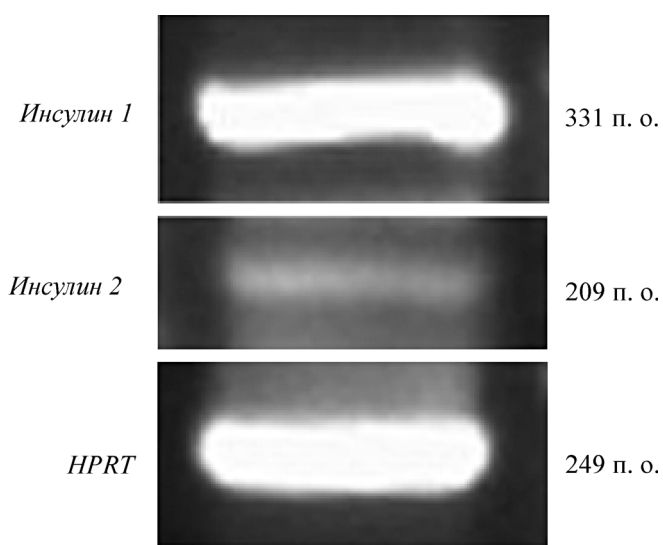


Рис. 5. ПЦР-анализ экспрессии генов, кодирующих инсулин 1 и инсулин 2 в культуре клеток подчелюстной слюнной железы мыши.

кДНК отнормированы по *HPRT* (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase).



инсулина доказано в некоторых отделах головного мозга, однако вопрос о его синтезе в нервных клетках окончательно не решен (Шубникова, Погодина, 2000). В своей работе мы провели исследование экспрессии инсулина и наличия соответствующего белка в культуре клеток подчелюстной железы мыши. Данные по иммуноцитохимическому окрашиванию изучаемой нами культуры клеток представлены на рис. 4. С использованием специфичных антител показано наличие белков инсулина и его предшественника проинсулина в культивируемых glanduloцитах. Результаты иммуноцитохимии были подтверждены методом ПЦР-анализа. В культуре клеток подчелюстной слюнной железы были обнаружены транскрипты инсулина I и инсулина II, однако уровень экспрессии гена, кодирующего инсулин I, был выше (рис. 5). Таким образом, можно предположить, что культивируемые *in vitro* клетки подчелюстной железы способны синтезировать и накапливать инсулин.

В настоящее время много внимания сосредоточено на поиске нового источника инсулинпродуцирующих клеток. Поиск включает в себя изучение потенциала как эмбриональных, так и взрослых стволовых клеток и их трансдифференциацию в сторону синтеза инсулина (Weir et al., 2004). За последние 30 лет уровень заболеваемости сахарным диабетом достиг эпидемических показателей, и число больных постоянно увеличивается. Ежегодно большое количество онкологических больных с локализацией опухоли в области головы и шеи в результате облучения получают синдром гипосаливации слюнных желез (Vissinc et al., 2003). Все вышесказанное свидетельствует о своевременности и актуальности данной работы.

Итак, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что культивирование *in vitro* клеток подчелюстной железы возможно. Дальнейшее изучение потенциала этих клеток открывает новые перспективы в стратегии производства инсулинпродуцирующих клеток для  $\beta$ -клеточной заместительной терапии при лечении диабета, а также для использования их в современных методах тканевой инженерии.

### Список литературы

- Бабаева А. Г., Шубникова Е. А. 1979. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: МГУ. 190 с.
- Бродский В. Я., Нечаева Н. В. 1988. Ритм синтеза белка. М.: Наука. 240 с.
- Воротеляк Е. А., Чермных Э. С., Васильев А. В., Терских В. В. 2005. Организация популяции кератиноцитов в культуре *in vitro*. Изв. РАН. Сер. биол. 6 : 645—649.
- Воротеляк Е. А., Чермных Э. С., Васильев А. В., Терских В. В. 2006. Экспрессия кератина 19 в культуре эпидермальных кератиноцитов человека. Докл. РАН. 408 (6) : 835—837.
- Гвазава И. Г., Шубникова Е. А., Погодина Л. С. 1991. Колебательные изменения в клетках поднижнечелюстных желез мышей в течение секреторного цикла. Арх. анат., гистол. и эмбриол. 101 (7) : 74—80.
- Погодина Л. С., Шубникова Е. А., Буларгина Т. В. 1989. Иммунофлуоресцентный и иммуноферментный анализ инсулиноподобного белка подчелюстных желез мышей с помощью моноклональных антител к инсулину. Пробл. эндокринологии. 35 (3) : 74—78.
- Терских В. В., Васильев А. В., Воротеляк Е. А. 2003. Структурно-функциональные единицы эпидермиса. Изв. РАН. Сер. биол. 6 : 645—649.
- Чермных Э. С., Воротеляк Е. А., Ткаченко С. Б., Васильев А. В., Терских В. В. 2007. Пролиферация К19 эпидермальных кератиноцитов человека *in vitro*. Докл. РАН. 416 : 555—557.
- Шубникова Е. А., Погодина Л. С. 2000. Компенсаторная функция слюнных желез при диабете и возможность ее стимуляции изопротеринолом. Онтогенез. 31 (6) : 476—480.
- Шубникова Е. А., Суворова Г. Н., Волкова Е. Ф. 1980. К вопросу о наличии инсулиноподобного белка в нижнечелюстных слюнных железах человека и сельскохозяйственных животных. Арх. анат., гистол. и эмбриол. 78 (7) : 64—69.
- Blyszczuk P., Asbrand C., Rozzo A., Kania G., St-Onge L., Rupnik M., Wobus A. M. 2004. Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. Int. J. Develop. Biol. 48 : 1095—1104.
- Burford-Mason A. P., Cummins M. M., Brown D. H., MacKay A. J., Dardick I. 1993. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. J. Oral Pathol. Med. 22 : 440—446.
- Carson K. A., Sar M., Hanker J. S. 1982. Immunocytochemical demonstration of nerve growth factor and histofluorescence of catecholaminergic nerves in the salivary glands of diabetic mice. Histochem. J. 14 : 35—48.
- Controneo E., Proctor G. B., Paterson K. L., Carpenter G. H. 2008. Early markers of regeneration following ductal ligation in the rat submandibular gland. Cell Tissue Res. 332 : 227—235.
- Egea J. C., Hirtz C., Gross R., Lajoix A. D., Traskawka E., Ribes G., Periere D. D. 2000. Preproinsulin I and II vRNA expression in adult submandibular glands. Eur. J. Oral Sci. 108 : 292—296.
- Gresik E. W. 1994. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. Microsc. Res. Tech. 27 : 1—24.
- Gresik E. W., Hosoi K., Kurihara K., Maruyama S., Ueha T. 1996. The rodent granular convoluted tubule cell — an update. Eur. J. Morphol. 43 : 221—224.
- Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. 2004. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology. 39 : 667—675.
- Joraku A., Sullivan C. A., Yoo J. J., Atala A. 2005. Tissue engineering of functional salivary gland tissue. The Laryngoscope. 115 : 244—248.
- Lombaert I. M., Brunsting J. F., Wierenga P. K., Faber H., Stokman M. A., Kok T., Visser W. H., Kampinga H. H., Haan G., Coppes R. P. 2008. Rescue of salivary gland function after stem cells transplantation in irradiated glands. PLoS ONE. 3 : 1—13.
- Lombaert I. M., Wierenga P. K., Kok T., Kampinga H. H., Haan G. 2006. Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. Clin. Cancer Res. 12 : 1804—1812.
- Murakami K., Taniguchi H., Baba S. 1982. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. Diabetologia. 22 : 358—362.
- Naujok O., Francini F., Jorns A., Lenzen S. 2008. An efficient experimental strategy for mouse embryonic stem cell differentiation and separation of cytochrome-19-positive population of insulin-producing cells. Cell Prolif. 41 : 607—624.
- Rozenzweig J. L., Havrankova J., Lesniak M., Brownstein M., Roth J. 1980. Insulin in ubiquitous in extrapancreatic tissue of rats and humans. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77 : 572—576.
- Shubnikova E. A., Volkova E. F., Printseva O. Yu. 1984. Submandibular glands as organs of synthesis and accumulation of insulin-like protein. Acta Histochem. 74 : 157—171.
- Smith P. H., Patel D. G. 1984. Immunocytochemical studies of the insulin-like material in the parotid glands of rats. Diabetes. 33 : 661—668.
- Sugito T., Kagami H., Hata K., Nishiguchi H., Ueda M. 2004. Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. Cell Transplant. 13 : 691—699.
- Takahashi S., Nakamura S., Suzuki R., Islam N., Domon T., Yamamoto T., Wakita M. 2000. Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland. Tissue Cell. 32 : 457—463.

Takahashi S., Shinzato K., Nakamura S., Domon T., Yamamoto T., Wakita M. 2004. Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. *J. Oral Pathol. Med.* 33 : 23—29.

Vissinc A., Burlage F. R., Spijkervet F. K. 2003. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14 : 213—225.

Weir G. C., Haagensohn A., Bonner-Weir S. 2004. Insulin-producing cells derived from embryonic stem cells: a potential treatment for diabetes. In: *Handbook of stem cells.* 723—729.

Wigley C. B., Franks L. M. 1976. Salivary epithelial cells in primary culture: characterization of their growth and functional properties. *J. Cell Sci.* 20 : 149—165.

Поступила 19 IV 2010

#### STUDY OF CELL CULTURE OF MOUSE SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND *IN VITRO*

I. G. Gvazava, A. V. Vasiliev, O. V. Balan, V. V. Terskikh

N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow;  
e-mail: inessagvazava@hotmail.ru

Cell culture keeping its phenotype till the 20th passage was obtained from mouse submandibular salivary glands. The analysis of the heterogeneous culture showed that there were some morphological types of cells: densely packed small cells that had cuboidal or polygonal form and also large round cells. Epithelial cells of submandibular gland cultured during several weeks were able to form tubular structures. It was shown that glandulocyte culture was presented by K19-positive and NGF-positive cells. It is important to note that expression of genes coding proinsulin and insulin was detected by immunocytochemical staining and by PCR as well.

**Key words:** submandibular salivary glands, mouse, population of glandulocytes in culture, proinsulin, insulin.