

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ФУНКЦИИ КЛЕТОК, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЕВОЙ ПРОМОЦИЕЙ И ПРОГРЕССИЕЙ

© *И. И. Колдин*,^{1,2} *Е. М. Трещалина*,² *Ю. Ю. Шаровская*,³
Т. К. Дубовая,¹ *В. А. Кобляков*²

¹ *Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова,*

² *Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва,*

и ³ *Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского*

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

электронный адрес: kobliakov@rambler.ru

Для изучения роли клеточного микроокружения в опухолевой промоции и прогрессии трансформированные клетки эмбриональных фибробластов крысы (клон CL-1) перевивали трансгенным, иммунодефицитным мышам и клетки образовавшейся опухоли переводили в культуру (клетки CL-1-1). Клетки до и после перевивки сравнивали по морфологии, скорости роста и проницаемости межклеточных щелевых контактов. Показано, что клетки CL-1-1 имели измененную морфологию, росли быстрее, чем клетки CL-1, и у них отсутствовало контактное торможение. В фазе G₁ клеточного цикла клеток CL-1 было значительно больше, чем клеток CL-1-1, а в фазах G₂ и M больше было клеток CL-1-1. Проницаемость щелевых контактов в клетках CL-1 и CL-1-1 примерно одинакова. Делается вывод о способности клеточного микроокружения стимулировать опухолевую промоцию и прогрессию при перевивке трансформированных клеток иммунодефицитным животным.

Ключевые слова: опухолевая промоция, опухолевая прогрессия, пролиферация, межклеточные щелевые контакты.

Образование опухоли является комплексным, многоступенчатым процессом, в котором выделяют три стадии — инициацию, промоцию и опухолевую прогрессию (Rakitsky et al., 2000; Vock, Kohle, 2005). На стадии инициации происходят необратимые наследуемые изменения генетического аппарата клетки. На стадии промоции не происходит структурных изменений в молекуле ДНК. В результате эпигенетических воздействий факторов окружающей среды (промотирующих агентов) происходит «освобождение» иницированных клеток от регуляторного воздействия нормальных клеток. Это выражается в стимуляции пролиферации иницированных клеток, нарушении межклеточных взаимодействий, которые приводят к увеличению количества клеток и образованию опухолевого конгломерата, способного к самоподдерживающему существованию. Опухолевая промоция сопровождается опухолевой прогрессией, которая характеризуется множественными фенотипическими изменениями, связанными с изменениями в их микроокружении благодаря росту клеток опухоли.

Многочисленные исследования показали, что микроокружение является одним из важных факторов процесса развития и прогрессии опухоли (Schedin, Elias, 2004; Hu, Polyak, 2008; Molognoni et al., 2011). Микроокружение может вызывать эпигенетические эффекты, влияя на межклеточные взаимодействия или через факторы, депонированные в микроокружении (Abbott et al., 2008). Молекулярный состав опухолевого микроокружения *in vivo*

устанавливается совместно как клетками опухоли, так и постоянно присутствующими и инфильтрирующими неопухолевыми клетками (Witz, 2009). К ним относятся клетки стромы (соединительной ткани), клетки системы иммунитета, а также кровеносные и лимфатические сосуды, экстрацеллюлярный матрикс (Бережная, 2009; Calorini, Bianchini, 2010). Показано, что изменение микроокружения в культуре клеток вызывает изменения в поведении клеток, но эти эффекты, как правило, исчезают при переводе клеток в стандартные условия (Sultatos, Vesell, 1980; Kobliakov et al., 1993; Ahn et al., 2001). В условиях *in vivo* изменения, вызванные воздействием микроокружения, могут быть закрепленными, связанными с опухолевой прогрессией. У нормальных животных это может быть обусловлено клеточным отбором, связанным с функционированием иммунной системы, а у иммунодефицитных — исключительно воздействием микроокружения.

Целью данной работы было сравнение морфологии, скорости роста и функционирования межклеточных щелевых контактов (МЩК) в трансформированных эмбриональных фибробластах до и после перевивки их иммунодефицитным мышам. Эмбриональные трансформированные клетки крысы (клон CL-1) перевивали трансгенным иммунодефицитным мышам и клетки образовавшейся опухоли снова переводили в культуру (клетки CL-1-1). Было показано, что клетки CL-1-1 растут значительно быстрее, чем клетки CL-1, у них отсутствует контактное торможение, а количество клеток, находящихся в состоя-

нии покоя (фаза G₁ клеточного цикла), значительно меньше, чем в клетках CL-1. Различными исследователями показано, что ускорение роста клеток, как правило, сопровождается падением уровня МЦК (Koffler et al., 2000; Zhang et al., 2003). Поэтому для того чтобы выяснить, сохраняется ли это правило и на использованной нами модели, мы исследовали уровень МЦК в клетках CL-1 и CL-1-1. Оказалось, что в обоих типах клеток уровень межклеточного перетекания люцифера желтого, характеризующий активность МЦК, одинаков. Перечисленные изменения в поведении клеток характеризуют их как более «продвинутые» по пути развития злокачественности по сравнению с исходной клеточной культурой. Таким образом, можно заключить, что микроокружение является фактором, стимулирующим опухолевую прогрессию, вызывая изменения в фенотипе клеток. Эти изменения сохраняются и после отмены воздействия.

Материал и методика

В работе использовали трансформированный бензо/а/пиреном клон клеток CL-1, полученный из эмбриональных фибробластов крысы и любезно предоставленный нам д-ром Н. П. Щербаком, за что авторы выражают ему огромную благодарность. Клетки CL-1-1 получали путем перевивки трансформированного клона CL-1 бестимусной мыши. Для получения опухоли суспензию клеток CL-1 (5 млн кл./мл) вводили в подмышечную область мыши. Через 4 нед сформировавшуюся опухоль стерильно удаляли, измельчали, помещали в охлажденную смесь растворов трипсина и Версена (1 : 1), выдерживали 24 ч при 4 °С, промывали раствором Хенкса и добавляли в среду (смесь DMEM и RPMI, 1 : 1), содержащую 10 % эмбриональной сыворотки (Flow, Австрия) и 100 мкг/мл гентамицина, и высевали во флаконы Корреля. Через 24 ч среду меняли для удаления неприкрепившихся клеток.

Далее прикрепившиеся клетки культивировали в стандартной среде, используемой для обоих типов клеток: смеси сред DMEM и RPMI (1 : 1), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки высаживали по 40 тыс. на 1 чашку Петри (6 см) и исследовали через 3 и 5 сут. Клетки снимали с поверхности чашек, обрабатывая их поочередно растворами Версена и трипсина. Далее клетки суспендировали в 1 мл буферного раствора PBS и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования супернатант удаляли и к осадку клеток добавляли 0.4 мл водного буфера, содержащего 0.1 % цитрата натрия, 0.3 % NP40, 100 мкг/мл РНКазы А и 50 мкг/мл иодида пропидия. Затем смесь тщательно суспендировали и перемешивали на вортексе при максимальных оборотах. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (США) в программе BD FACS Diva. Обработку данных прибора проводили при помощи программы WinMDI (версия 2.9). Скорость пролиферации клеток оценивали с помощью кривых роста. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева через каждые 24 ч в течение 5 сут.

Для определения морфологии клеток их окрашивали непосредственно в чашках Петри (6 см). Для этого клетки фиксировали в 2 мл красителя-фиксатора Май-Грюнвальда в течение 20 мин в закрытой чашке. Далее клетки промывали дистиллированной водой и окрашивали в 2 мл раствора азур-эозина по Романовскому в течение 20 мин. После окрашивания препараты промывали дистиллированной водой и высушивали. Окрашенные препараты исследовали и фотографировали на микроскопе Nikon Eclipse TS 100 (Япония) с фотонасадкой при увеличении объектива 40×. Микрофотографии выполняли при помощи программы NIS — Elements F 3.0.

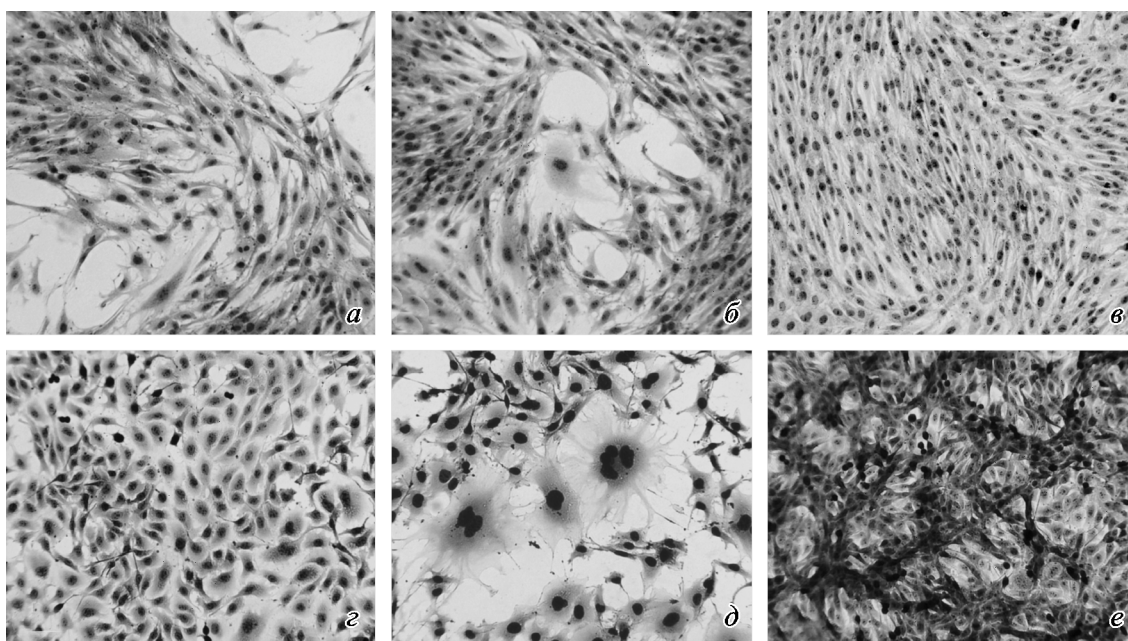


Рис. 1. Микрофотографии фиксированных и окрашенных клеток CL-1 (а–в) и CL-1-1 (г–е).

а, г — общий вид культуры; б, д — полиплоидные клетки; в — монослойный участок культуры CL-1; е — многослойный участок культуры CL-1-1 (клетки имеют более интенсивную окраску). Окраску азур-эозином по Романовскому.

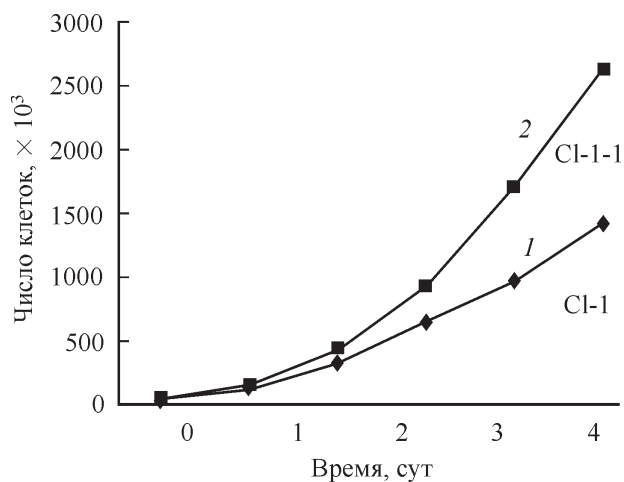


Рис. 2. Кривые скорости роста клеток CL-1 (кривая 1) и CL-1-1 (кривая 2).

Проницаемость МЦК клеток определяли, как описано ранее (Sharovskaja et al., 1988). В одну из клеток монослоя инъецировали флуоресцентный краситель люциферовый желтый СН (Sigma, США) и далее регистрировали его распространение в соседние клетки. Использовали флуоресцентный микроскоп AxioLab («Zeiss», Германия) с фазово-контрастной оптикой и водно-иммер-

сионным объективом 40× и видеокамеру CCTV (Panasonic, Япония), подключенную к компьютеру. Количество окрашенных клеток подсчитывали через 2 мин после инъекции красителя.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены микрофотографии клеточных культур эмбриональных трансформированных фибробластов крысы до перевивки бестимусным мышам (CL-1) и культуры тех же клеток после перевивки их бестимусным мышам с последующим переводом клеток образовавшейся опухоли в культуру (CL-1-1), окрашенных азур-эозином по Романовскому. На микрофотографиях видно, что клетки трансформированного клона CL-1 имеют типичную фибробластоподобную морфологию, тогда как клетки CL-1-1 имеют более расплывчатый вид, характерный для эпителиальноподобных клеток (рис. 1 а, в). В обеих культурах выявлены полиплоидные клетки, чаще наблюдаемые в культуре CL-1-1 и имеющие в большинстве случаев слившиеся ядра (рис. 1, б, д). В отличие от культуры CL-1 в клетках культуры CL-1-1 при полном монослое отсутствует контактное торможение, и, как видно на рис. 1, е, клетки начинают наползать друг на друга, чего не наблюдается в культуре CL-1 (рис. 1, г).

Изменение морфологии клеток после роста в животном сопровождается и функциональными изменениями.

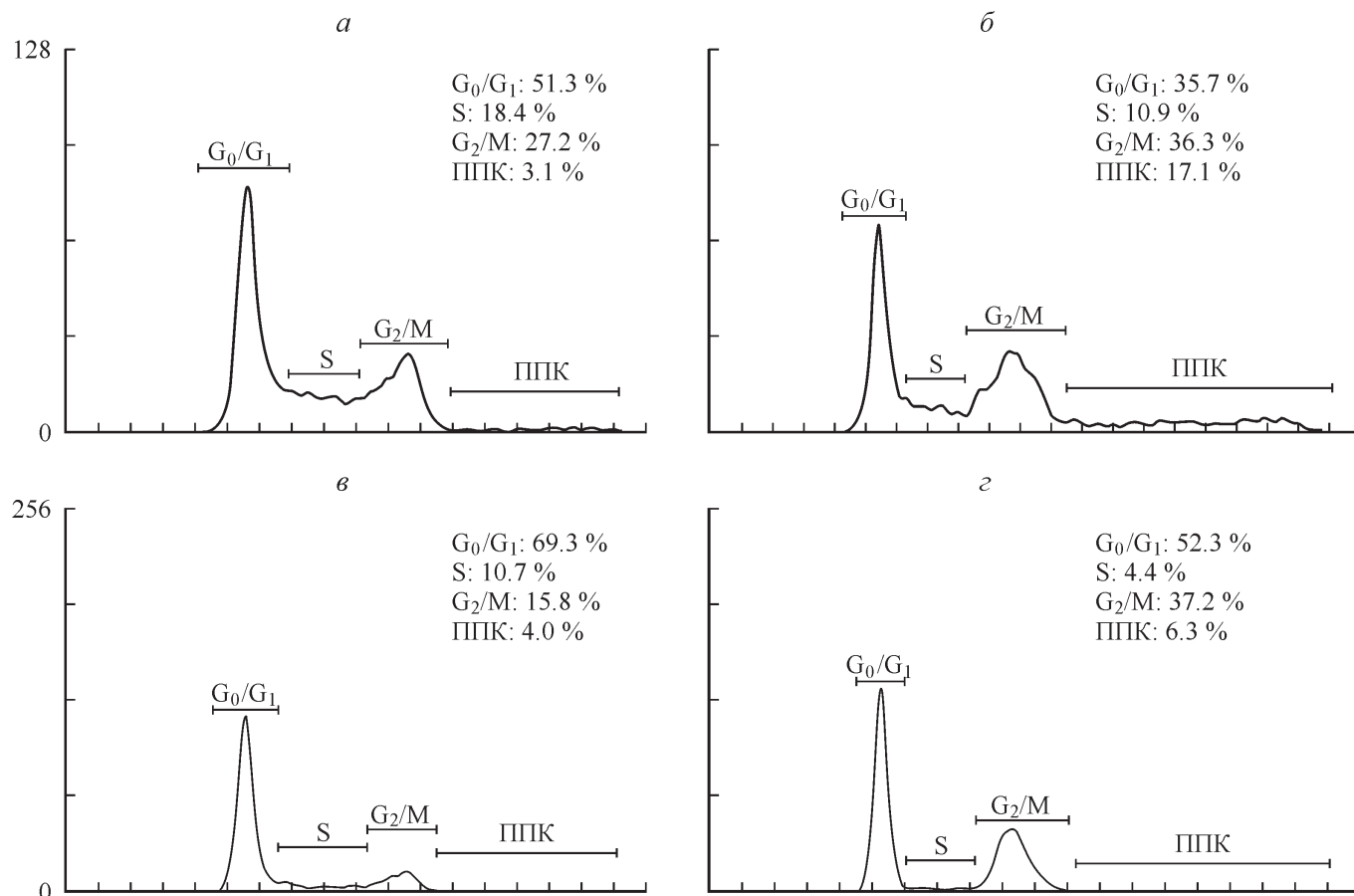


Рис. 3. Распределение клеток CL-1 (а, в) и CL-1-1 (б, г) по фазам клеточного цикла.

По вертикали — число клеток; по горизонтали — количество ДНК, усл. ед. а, б — на 3-и, в, г — на 5-е сут культивирования. ППК — полиплоидные клетки.

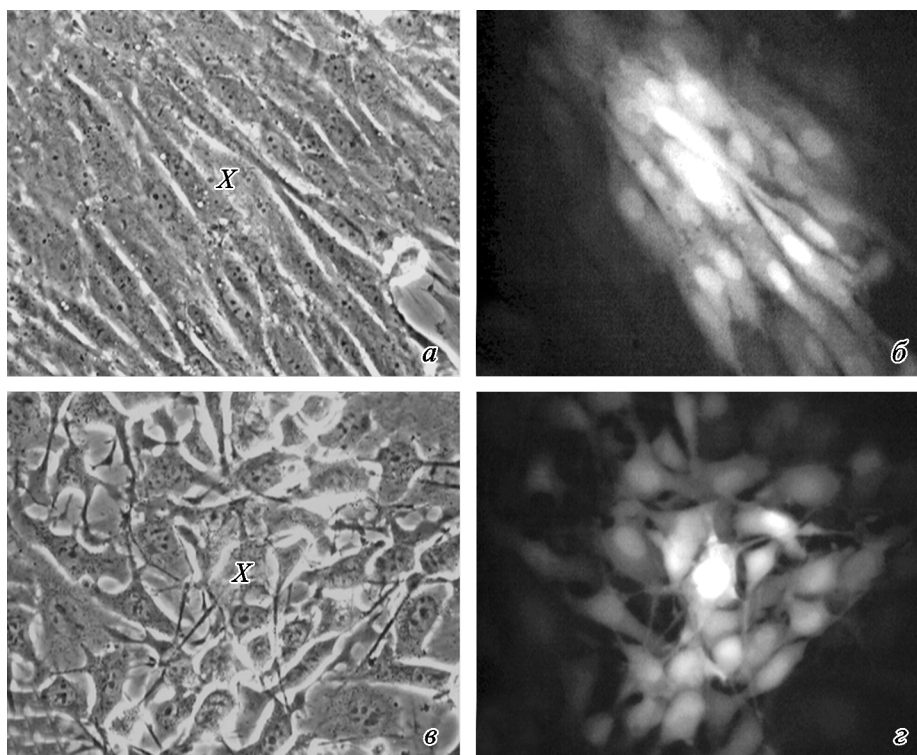


Рис. 4. Распространение люциферового желтого от места инъекции в соседние клетки через межклеточные щелевые контакты. *а, в* — клетки CL-1 и CL-1-1 соответственно, фазовый контраст; *б, г* — то же в флуоресцентном свете. Знаком X указана клетка, в которую введен краситель.

Как видно на рис. 2, клетки CL-1-1 растут значительно быстрее, чем исходная культура CL-1. Через 5 сут культивирования клеток CL-1-1 примерно в 2 раза больше, чем клеток CL-1.

На рис. 3 представлены данные распределения клеток по фазам клеточного цикла, из которых следует, что и через 3, и через 5 сут культивирования клеток CL-1, находящихся в покое (фазы G_0/G_1), значительно больше, чем клеток CL-1-1, также их больше и в синтетической фазе клеточного цикла (S). В то же время в предмитотической и митотической фазах (G_2/M) значительно больше клеток CL-1-1, чем клеток CL-1. Важно отметить, что через 5 сут культивирования в культуре CL-1 монослой только сформировался (рис. 1, *в*), в то время как в клетках CL-1-1 он сформировался раньше (на 4-е сут) и на 5-е сут уже образуются многослойные участки культуры (рис. 1, *е*). Однако на 5-е сут культивирования скорость роста клеток культуры CL-1-1 продолжает быть выше, чем в клетках CL-1, и покоящихся клеток CL-1-1 значительно меньше, чем клеток CL-1 (52.3 против 69.3 % в G_1/G_0).

Как было сказано ранее, в обеих культурах присутствуют полиплоидные клетки, и их более всего в культуре CL-1-1 на 3-е сут культивирования (рис. 3, *б*). Уменьшение же числа полиплоидных клеток на 5-е сут (рис. 3, *г*), возможно, обусловлено тем, что к этому времени клетки CL-1-1 полностью покрывают поверхность чашки и появляются клетки, растущие поверх монослоя и не образующие полиплоидных структур.

На рис. 4 показано перетекание люциферового желтого из инъецированной клетки в соседние. Видно, что и в клетках CL-1, и в клетках CL-1-1 краситель распространяется достаточно интенсивно и окрашивается большое количество рядом лежащих клеток. Это свидетельствует

о высокой проницаемости МЖК. Среднее число окрашенных клеток в клонах CL-1 и CL-1-1 составляет соответственно 39 ± 4 и 37 ± 5 , что свидетельствует о том, что «проводка» клеток через иммунодефицитных мышей не влияет на функционирование МЖК.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что перевивка трансформированных клеток иммунодефицитным животным приводит к наследуемым изменениям в морфологии и пролиферативной активности этих клеток. Изменение функций клеток при изменении микроокружения может быть как наследуемым, так и нет и сохраняться только при существовании в новом окружении. Так, показано, что клетки гепатомы экспрессируют изоформы цитохрома P450 только при перевивке опухоли в печень, а при перевивке под кожу экспрессия фермента отсутствует (Kobliakov et al., 1993; Sultatos, Vessel, 1980). При перевивке клеток гепатомы под кожу скорость роста выше, чем при перевивке в печень, при обратной перевивке (растущую подкожно опухоль — в печень или растущую в печени опухоль — подкожно) изменяется соответственно и скорость роста опухоли (Kobliakov et al., 2001). Опухоль почки, перевитая в почку, была более чувствительна к цитостатическому действию дезоксирибуцина, чем перевитая подкожно (Ahn et al., 2001). Видимо, это связано с различной экспрессией белка Р-гликопротеина, зависящего от клеточного микроокружения (Fidler et al., 1994). В то же время в некоторых случаях показано, что изменение микроокружения приводит к закрепленным изменениям в функционировании клеток. Так, предопухолевые эпителиальные клетки молочной железы при перевивке бестимусным мышам совместно с фибробластами человека, находящимися в состоянии кризиса, необратимо теряют дифференцировочные ха-

рактеристики и приобретают инвазивные свойства (Parrinello et al., 2005). Возможно и обратное воздействие микроокружения, вызывающее дифференцировку опухолевых клеток. Классическим примером публикации на эту тему является исследование, в котором показана дифференцировка клеток тератомы мыши, введенных в бластоцисту животного (Mintz, Illmensee 1975).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00282-а).

Список литературы

- Бережная Н. М. 2009. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении пухоли. I. Клетки и цитокины — участники воспаления. Онкология. 11 : 6—17.
- Abbott D. E., Bailey C. M., Postovit L. M., Seftor E. A., Margaryan N., Seftor R. E., Hendrix M. J. 2008. The epigenetic influence of tumor and embryonic microenvironments: how different are they? *Cancer Microenviron.* 1:13—21.
- Ahn K. S., Jung Y. S., Kim J., Lee H., Yoon S. S. 2001. Behavior of murine renal carcinoma cells grown in ectopic or orthotopic sites in syngeneic mice. *Tumour Biol.* 22:146—153.
- Bock K. W., Kohle C. 2005. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 69 : 1403—1408.
- Calorini L., Bianchini F. 2010. Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. *Cell Commun. Signal.* 7 : 8—24.
- Fidler I. J., Wilmanns C., Staroselsky A., Radinsky R., Dong Z., Fan D. 1994. Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev.* 13 : 209—222.
- Hu M., Polyak K. 2008. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 18 : 27—34.
- Kobliakov V., Kulikova L., Kolyada A., Chemeris G., Turusov V. 1993. Regulation of CYP1A induction in hepatoma 27 depending on the site of transplantation. *Xenobiotica.* 23 : 703—708.
- Kobliakov V. A., Somova O. G., Kondalenko V. F., Ostashkina N. M., Kandyba A. G., Dubovaya T. K., Dyatlovitskaya E. V. 2001. Differences in lipid composition and proliferative activity of rat hepatoma 27 depending on the target organ. *Biochemistry (Mosc.)*. 66 : 603—607.
- Koffler L., Roshong S., Kyu Park I., Cesen-Cummings K., Thompson D. C., Dwyer-Nield L. D., Rice P., Mamay C., Malkinson A. M., Ruch R. J. 2000. Growth inhibition in G₁ and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 79 : 347—354.
- Mintz B., Illmensee K. 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72 : 3585—3589.
- Molognoni F., Cruz A. T., Meliso F. M., Morais A. S., Souza C. F., Xander P., Bischof J. M., Costa F. F., Soares M. B., Liang G., Jones P. A., Jasiulionis M. G. 2011. Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. *Epigenetics.* 6 : 450—464.
- Parrinello S., Coppe J., Krtofica A., Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* 118 : 485—496.
- Rakitsky V., Turusov V., Koblyakov V. 2000. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* 20 : 229—240.
- Schedin P., Elias A. 2004. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 6 : 93—101.
- Sharovskaja Yu. Yu., Chailakhjan L. M., Margolis L. B., 1988. Induction of intercellular communications in epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 175 : 404—408.
- Sultatos L. G., Vesell E. S. 1980. Enhanced drug-metabolizing capacity within liver adjacent to human and rat liver tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77 : 600—603.
- Witz I. P. 2009. The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron.* 2. Suppl. 1 : 9—17.
- Zhang Y. W., Nakayama K., Nakayama K. I., Morita I. 2003. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res.* 63 : 1623—1630.

Поступила 6 XII 2012

EFFECT OF CELL MICROENVIRONMENT ON CELL FUNCTIONS ASSOCIATED WITH TUMOUR PROMOTION AND PROGRESSION

I. I. Koldin,^{1,2} E. M. Trechalina,² Yu. Yu. Sharovskaya,³ T. K. Dubovaya,¹ V. A. Kobliakov²

¹ N. I. Pyrogov Russian State Medical University, ² N. N. Blochin Russian Cancer Research Centre RAMS, Moscow, and ³ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Moscow State University; e-mail: kobliakov@rambler.ru

To study the tumour-promotion activity of cell environment the transformed embryonic rat fibroblasts (clone CL-1-1) were transfected to immunodeficient mice then the cells of the formed tumour were cultivated (clone CL-1-1). The cells before and after transplantation were compared by morphology, proliferation activity and gap junction intracellular communications. The clone CL-1 cells proliferated much faster than clone CL-1 cells. The CL-1-1 cells had changed morphology structure and unlike CL-1 the contract inhibition was absent in CL-1-1. The number of CL-1 cells in phase G₁ was significantly greater than that of CL-1-1 cells, while the number of CL-1-1 cells in G₂/M phases was much more the number of CL-1 cells. The activity of gap junction intercellular communications in both cell types was near the same. It was concluded that cell microenvironment act as a tumour-promoter and tumour progression factor in the case of cell transplantation to immunodeficient mice.

Key words: tumour promotion, tumour progression, proliferation, gap junction intercellular communications.