

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО МЕТАСТАТИЧЕСКОМУ ПОТЕНЦИАЛУ

© А. П. Давыдов-Синицын,<sup>1</sup> \* О. В. Баженова,<sup>2</sup> М. А. Лисковых,<sup>1</sup> С. В. Пономарцев,<sup>1</sup>  
Л. Л. Чечик,<sup>1</sup> А. Н. Томилин,<sup>1</sup> Е. Н. Толкунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>С.-Петербургский государственный университет;

\*электронный адрес: ads707@ya.ru

В настоящей работе предпринята попытка сравнить раковые клетки одного происхождения, различающиеся по экспрессии белка СЕА — клинического маркера метастазирующих раков, предположительно одного из ключевых факторов метастазирования. Рассмотрены морфология колоний клеток *in vitro*, экспрессия белков-маркеров эпителиальных тканей, способность клеток к опухолеобразованию и метастазированию *in vivo*, а также произведена оценка их стволового компонента при помощи суицидальной конструкции, чувствительной к белку-маркеру эмбриональных стволовых клеток.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, туморогенность, Oct4.

Принятые сокращения: ОТ-ПЦР — обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция, СЕА — carcinoembryonic antigen (раковый эмбриональный антиген), PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Колоректальный рак в структуре смертности от онкологических заболеваний занимает одну из ведущих позиций в мире. Наиболее распространенным методом противоопухолевого лечения является хирургическое удаление первичной опухоли с последующей системной химиотерапией. При этом особое значение приобретают своевременное обнаружение и предотвращение развития вторичных опухолей — метастазов, рост которых сводит на нет хирургическое лечение. Для контроля за появлением метастазов в настоящее время используются специфические биомаркеры, в первую очередь белки плазмы крови. Общепринятым клиническим маркером злокачественных опухолей является СЕА — карциноэмбриональный антиген, или раковый эмбриональный антиген (Tan et al., 2009). В норме синтез СЕА характерен для эмбриональной стадии развития человека. У взрослых он экспрессируется на крайне низком уровне в тканях желудочно-кишечного тракта, но при развитии злокачественных опухолей его экспрессия существенно повышена (в 70 % случаев рака человека). Уровень СЕА в сыворотке крови пациентов, страдающих от рака, может увеличиться до 1000 нг/мл при стандарте в норме менее 5 нг/мл (Huerta, 2008).

Что касается рака толстого кишечника человека, то общепринятым считается, что уровень сверхэкспрессии СЕА определяет миграцию опухолевых клеток, инвазию и формирование дистантных метастазов и может служить мерой злокачественности (Blumenthal et al., 2005b). Высокий уровень его экспрессии найден у 80—90 % колоректальных опухолей человека, более чем в 50 % раков груди и легких и в 15 % желудочно-кишечных и панкреа-

тических карцином, а также во многих других эпителиальных раках (Berinstein, 2002). Этим объясняется признание СЕА адекватной мишенью для активной и пассивной иммунотерапии. На использовании СЕА основан ряд преclinical и клинических анализов с использованием антител для направленной терапии (Blumenthal et al., 2005a; Perez et al., 2006; Uchino et al., 2008).

Чаще всего при колоректальном раке метастазы обнаруживаются в печени — у 40 % пациентов (Ballantyne, Quin, 1993; Fusai, Davidson, 2003; O'Reilly, Poston, 2006) и легких — 10 % (Rotollo et al., 2007; Fiorentino et al., 2010). Несмотря на хирургическое удаление, опухоль часто возникает повторно в зоне толстого кишечника, печени, легких, а также яичников, костной ткани или мозга (Goya et al., 1989).

Растворимая форма СЕА связывается с его рецептором (SEAR), членом семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP), этим взаимодействием обеспечивая потенциал для передачи прометастатических сигналов к неопластическим клеткам (Bajenova et al., 2003; Laguigne et al., 2005). Во многих типах раков человека СЕА специфически экспрессируется как поверхностный гликопротеин, вовлеченный в регуляцию многих биологических элементов опухолеобразования, включая изменение адгезии, метастазирование, супрессию механизмов клеточного иммунитета и ингибирование апоптоза (Eidelman et al., 1993; Ordonez et al., 2000; Screamon et al., 2000; Soeth et al., 2001; Taheri et al., 2003; Duxbury et al., 2004). Например, СЕА увеличивает способность слабометастазирующих клеток колоректального рака колонизировать печень и приводить к образованию мета-

стазов в легких (Hostetter et al., 1990; Thomas et al., 1995; Blumenthal et al., 2005b). Экспрессия СЕА коррелирует с устойчивостью к цитотоксической терапии (Soeth et al., 2001) и аноксису (Screaton et al., 1997; Samara et al., 2007). Доказано ингибирующее влияние СЕА на клеточную дифференцировку (Eidelman et al., 1993; Screaton et al., 1997; Taheri et al., 2003) и аноксис (Samara et al., 2007; Camacho-Leal, Stanners, 2008). Показано, что СЕА усиливает колонизацию как печени, так и селезенки при введении раковых клеток, трансфицированных экспрессирующей СЕА плазмидой, в селезенку иммунодефицитным мышам (Li et al., 2010). Однако молекулярный механизм, благодаря которому СЕА усиливает опухолевое метастазирование, продолжает оставаться малоопытным.

Поскольку надежные опухолевые маркеры с высокой чувствительностью очень важны для диагностики и мониторинга пациентов с колоректальным раком, в качестве потенциальных маркеров предлагаются все новые белки. Предложенный недавно новый опухолевый маркер Colon cancer specific antigen-2 (CCSA-2) по сравнению с уже принятым в клинической практике СЕА оказался менее чувствительным и специфичным (Кнучиальски, Луккиензук, 2012). Также недавно было предложено использовать адгезионную молекулу эпителиальных клеток ЕpCAM и СА19-9 (карбогидратный антиген) и показано, что специфичность их весьма схожа с СЕА. По сравнению с этими маркерами рецептор эпидермального ростового фактора (EGFR) имеет более низкие чувствительность и специфичность (Mourtzikou et al., 2012).

Предприняты попытки проанализировать экспрессию СЕА на биопсийном материале иммуногистохимическими методами параллельно с Е-кадгерином и  $\beta$ -катенином (Rao et al., 2012). Эти исследователи использовали анализ экспрессии Е-кадгерина и  $\beta$ -катенина для идентификации неопластических узелков (гланд) в зоне метастазов, поскольку эти два белка считаются маркерами колоректального рака. Их данные показывают, что Е-кадгерин и  $\beta$ -катенин связаны с клеточными мембранами в клетках, формирующих неопластические узлы и в легких, и в печени, что схоже с распределением в первичных опухолях и согласуется с ролью этих белков в межклеточной адгезии. Важно отметить, что значительная часть неопластических узелков в легких содержит  $\beta$ -катенин в клеточных ядрах, тогда как уровень Е-кадгерина в клетке низкий. Отсутствие Е-кадгерина и  $\beta$ -катенина при клеточных мембранах у значительной доли неопластических узлов в легком может свидетельствовать о том, что легочное микроокружение вызывает активацию Wnt-сигнального пути, а также открепление опухолевых клеток от неопластических узлов (Rao et al., 2012).

Е-Кадгерин является важным белком кишечного эпителия, играющим ключевую роль в межклеточной адгезии и поддержании архитектуры крипт. Уменьшение экспрессии Е-кадгерина провоцирует открепление раковых клеток от опухоли, усиливая метастазирование (Liotta, 1984). В нормальных тканях толстого кишечника этот белок локализуется преимущественно в клеточных мембранах клеток крипты, при аденокарциноме — в мембранах неопластических узлов, при метастазах в печень Е-кадгерин также локализуется в мембранах. До 70 % неопластических узлов в легких также характеризуются мембранной локализацией Е-кадгерина, схожей с кишечником и

печенью. Однако оставшиеся 30 % имеют очень низкий уровень Е-кадгерина, который локализован не на мембранах, а диффузно в цитоплазме.

$\beta$ -Катенин известен как белок-партнер Е-кадгерина. Их взаимодействие удерживает  $\beta$ -катенин на внутренней поверхности клеточной мембраны. Комплексы Е-кадгерина с белками группы катенинов формируют основные межклеточные взаимодействия эпителиальных клеток. Если взаимодействие белков в Е-кадгериновых комплексах адгезии изменено или нарушено, то структурные белки, такие как  $\beta$ -катенин, высвобождаются и уходят в цитоплазму. Кроме того, дисфункция  $\beta$ -катенина может привести к накоплению его гипофосфорилированной устойчивой формы в цитоплазме, перемещению  $\beta$ -катенина в ядро, где он является коактиватором фактора транскрипции Tcf/LEF и стимулирует активацию целых генов, таких как *c-myc* и *cyclin D1* (Brembreck et al., 2006). Белки Е-кадгерин и  $\beta$ -катенин регулируют развитие рака кишечника и метастазирования в печень (Sreekumar et al., 2011). Кроме того, свободный  $\beta$ -катенин, попадая в ядро, активирует сигнальные пути Wnt и Notch, что способствует прогрессии колоректального рака (Hoffmeyer et al., 2012).

Многообещающей биологической моделью для исследования метастазирования служат клеточные линии одного происхождения с различающимися уровнями экспрессии СЕА и с разным метастатическим потенциалом. Одна из таких моделей — клеточная линия толстого кишечника человека MIP101: низкодифференцированная, слабометастатическая, не продуцирующая СЕА. Слабодифференцированные клетки имеют более удлиненную форму, отличаются высокой инвазивностью и более адгезивны и подвижны, чем хорошо дифференцированные клеточные линии колоректальной карциномы (CX-1 и DLD-2), которые продуцируют высокий уровень СЕА (Wagner et al., 1992). Как говорилось ранее, СЕА широко используется в качестве опухолевого маркера, связанного с увеличением метастатического потенциала в колоректальных раках (Jessup, Thomas, 1998; Goldstein, Mitchell, 2005; Lee et al., 2012). Создание коллекции линий, производных от MIP101, сделало возможным сравнить свойства клеток, различающихся по экспрессии только одного фактора — СЕА. Если исходная линия MIP101 не продуцирует СЕА, но экспрессирует его рецептор hnpRNP, то ее производные имеют следующие характеристики (Thomas et al., 2011): MIP101 клон 8 вырабатывает СЕА и экспрессирует рецептор к нему; MIP101-7 не экспрессирует ни СЕА, ни его рецептор, а клон 8-7 вырабатывает СЕА, но имеет подавленную экспрессию его рецептора. Было показано, что СЕА и Е-кадгерин как онкомаркеры не являются независимыми в клинической диагностике опухолей и что существует связь оверэкспрессии СЕА с увеличением фракции растворимого Е-кадгерина (Vajenova et al., 2012). Не вполне ясно, происходит ли рост уровня растворимого Е-кадгерина только за счет высвобождения его из комплекса десмосом и отражает ли этот процесс непосредственно разрыхление зоны клеточных контактов, способствующее откреплению раковых клеток, которые далее инициируют вторичные опухоли, т. е. метастазирование.

В нашу задачу входило сравнение характеристик клеток, различающихся по уровню экспрессии СЕА, в том числе их метастатического, туморгенного потенциала и молекулярных маркеров.

## Материал и методика

Культивирование клеток линии рака прямой кишки MIP101 проводили в среде RPMI 1640 (Gibco, США), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Sigma, США). Клетки пересеивали с использованием раствора трипсина (Gibco, США) 1 раз в 3 сут в соотношении 1 : 3. Для наработки вирусных частиц использовали клетки линии эмбриональной почки человека HEK293T, которые культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, и пересеивали через каждые 3 сут в соотношении 1 : 4.

Упаковка вирусных частиц и заражение клеток *in vitro* вирусом. Для сборки вирусных частиц клетки линии 293T трансфицировали кальций-фосфатным методом, вводя плазмидную конструкцию на основе лентивирусного интегрирующегося вектора, а также вспомогательные плазмиды для обеспечения сборки вирусных частиц (<http://tcf.epfl.ch/page-6766-en.html>).

Среду, в которой культивировали трансфицированные клетки, собирали в течение 48 ч после трансфекции, содержащиеся в ней вирусные частицы концентрировали ультрацентрифугированием по стандартной методике (<http://tcf.epfl.ch/page-6764.html>).

Инфекцию раковых клеток лентивирусом проводили в 24-луночном планшете, в который за 1 сут до заражения высевали клетки линии MIP101 с плотностью 100 тыс. клеток на 1 лунку. К клеткам добавляли 10 мкл концентрированных вирусных частиц. Заражение проводили в среде для культивирования клеток линии MIP101. Через 3 сут после вирусного заражения клетки пересеивали на 10-сантиметровые культуральные чашки (Falcon, США). На следующие сутки в среду добавляли антибиотик пуромидин (Sigma, США) в концентрации 30 мкг на 1 мл среды. Селекцию проводили, меняя среду каждые 2 сут, в течение 10—14 сут. Вырастающие колонии отбирали индивидуально и, после обработки трипсином, высевали на лунку 6-луночного планшета.

Тесты на формирование опухолей. Для оценки темпов роста опухоли клетки исходной линии MIP101 и клонов, отобранных на устойчивость к пуромидину после вирусного заражения, инъецировали иммунодефицитным лабораторным мышам линии Nude (производные линии BALB/c, гомозиготные по мутации *Foxn1nu*) подкожно в область бедра по 500 тыс. на 1 инъекцию. Вырастающие опухоли измеряли штангенциркулем через 20 и 30 сут после инъекции.

Для моделирования печеночного метастазирования использовали введение исследуемых клеток в селезенку иммунодефицитных мышей Nude. Инъекцию проводили с применением лапаротомии в стерильных условиях, все инструменты и вспомогательные материалы автоклавируют. Мышь вводили в общий наркоз путем внутривенной инъекции авертина: раствор 2,2,2-трибромэтанола в 2-метилбутаноле 1 г/мл, рабочее разведение 1 : 50 в PBS, дозировка 15 мкл на 1 г массы тела (протокол, оптимизированный в нашей лаборатории). Через разрез на правом боку селезенку частично извлекали из брюшной полости и помещали на стерилизованную подложку из ватмана. Суспензию клеток (MIP101 или производные) в культуральной среде или растворе Хэнкса (2,5 млн клеток в 50 мкл) инъецировали в толщу селезенки с помощью микролитрового шприца (Hamilton Microliter Syringes), после чего место инъекции прижимали стерилизованной фильтровальной бумагой для предот-

ращения вытекания жидкости. Затем селезенку возвращали в брюшную полость и на место разреза накладывали шов с помощью хирургической шелковой нити 0.08 мм (Fine Science Tools) и кожных зажимов 5 мм (Perfect Ets, Bruneau). Через 90 сут после операции мышью умерщвляли путем цервикальной дислокации, после чего производили вскрытие. Селезенки и печени осматривали невооруженным глазом на наличие опухолей и затем фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в PBS.

Культивирование в Матригеле проводили по стандартной методике, модифицированной для линий эпителиальных карцином кишечника (Yeung et al., 2010). Клетки обрабатывали раствором трипсина до состояния одноклеточной суспензии, брали по 50 мкл суспензии, содержащей 1000 клеток, и смешивали с Матригелем (BD Biosciences, США) в равных объемах. Далее смесь помещали в лунку 96-луночного планшета, полимеризовали при 37 °C и добавляли по 100 мкл культуральной среды в каждую лунку. Культивирование проводили в бессывороточной среде RPMI 1640 с антибиотиками и L-глутамином в течение 2—4 нед. Количество и морфологию растущих «мегаколоний» анализировали с помощью светового фазово-контрастного микроскопа Zeiss Axiovert.

Трансфекция и измерение активности люциферазы. Люциферазный метод широко применяется при изучении транскрипционных факторов и путей передачи сигналов. За 18 ч до трансфекции клетки рассаживали по 2 млн клеток на чашку диаметром 10 см или по 60 тыс. клеток в лунки 24-луночного планшета. За 1 ч до проведения трансфекции среду меняли на свежую. Трансфекцию проводили стандартным кальций-фосфатным или липидным методом, при этом одновременно вводили репортерную плазмиду TOPflash, содержащую ген люциферазы светляка, и плазмиду с геном  $\beta$ -галактозидазы (для контроля за эффективностью трансфекции). Спустя 12 ч среду в сосудах меняли на свежую (в случае кальциевой трансфекции).

Для проведения люциферазного анализа использовали набор компании Promega (США) Bright-Glo(tm) Luciferase Assay. Через 2 сут после трансфекции клетки лизировали буфером Glo-Lysis, после чего 50 мкл полученного лизата смешивали с равным объемом субстрата Bright-Glo, содержащего люциферин. В результате в образцах происходила двухстадийная ферментативная реакция, катализируемая люциферазой. Интенсивность возникшего свечения определяли с помощью биолюцинометра. Параллельно проводили нормализацию — определение относительного содержания клеток в лунках в момент их лизирования, что необходимо для коррекции полученных при люминесцентном анализе данных. Для этого 20 мкл лизата смешивали с 60 мкл раствора, содержащего 60 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола и 20 мкл раствора, содержащего субстрат  $\beta$ -галактозидазы ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside), в концентрации 2 мг/мл. В течение 1 ч в пробах развивалась желтая окраска, интенсивность которой определяли на спектрофотометре при длине волны 420 нм. Перед определением оптической плотности реакцию останавливали внесением в пробы 50 мкл 1 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Нормализованное значение яркости свечения люциферазы определяли путем деления абсолютной яркости по прибору (в отн. ед.) на оптическую плотность после  $\beta$ -галактозидазной реакции.

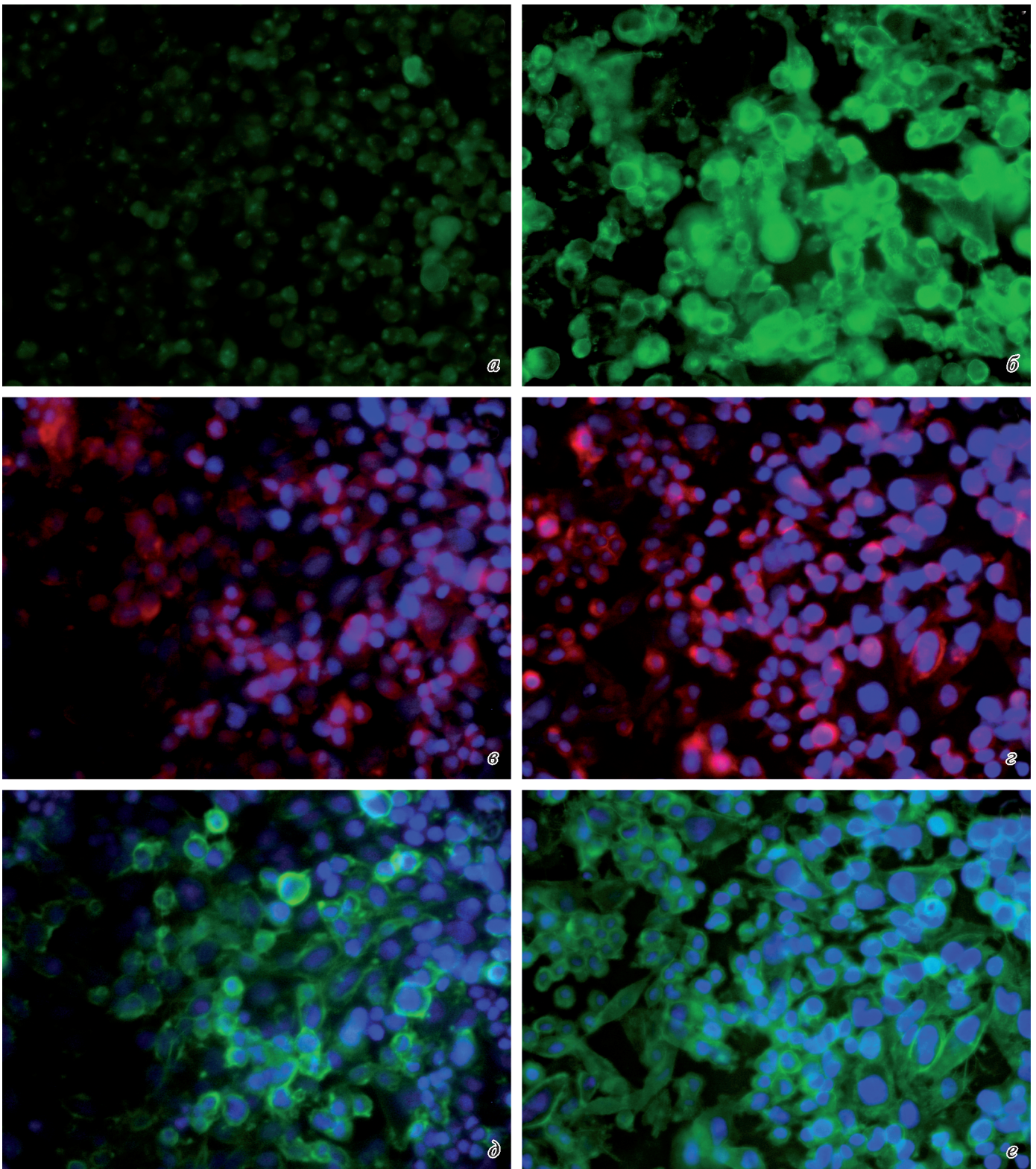


Рис. 1. Результаты иммунофлуоресцентного анализа культуры клеток карциномы прямой кишки линии MIP101 (а, в, д) и ее производной MIP101 клон 8 (б, г, е) с антителами к СЕА,  $\beta$ -катенину и Е-кадгерину человека.

Ядра клеток окрашены красителем DAPI (синий). а, б — СЕА; в, г —  $\beta$ -катенин (красный); д, е — Е-кадгерин (зеленый). Разъяснения см. в тексте.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки в лунках 24-луночного планшета или на покровных стеклах отмывали от среды раствором PBS и фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Фиксирующий раствор удаляли, клетки отмывали 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА), после чего проводили пермеабелизацию в 1%-ном растворе Тритона X-100 на PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее сайты неспецифического связывания антител блокировали в буфере, содержащем 1 % БСА и 1 % овечьей сыворотки, в течение 15 мин при комнатной температуре. Для выявления экспрессии СЕА фиксированные клетки метили первыми антителами к СЕА. После 4-кратной отмывки клетки инкубировали при 37 °С в течение 30 мин в растворе вторых флуоресцентных антител Goat  $\alpha$  Rabbit·Alexa<sup>488</sup> (1 : 1000). После очередной 4-кратной отмывки препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert (Германия).

Антитела. Поликлональные антитела Rabbit  $\alpha$  СЕА (ab15987, Abcam), поликлональные антитела Rabbit  $\alpha$  E-Cadherin (H-101 и SC-7870, Santa Cruz Biotechnology), Mouse  $\alpha$   $\beta$ -catenin (C7207, Sigma), вторые антитела Alexa Fluor (Mouse  $\alpha$  Goat·Alexa<sup>633</sup> и Goat  $\alpha$  Rabbit·Alexa<sup>488</sup>) были приобретены в компании Invitrogen (США).

Гистологические исследования проводили на органах, зафиксированных и хранящихся в 4%-ном растворе формальдегида в PBS при 4 °С. Образцы обезживали и заключали в среду для порезки Paraplast Plus (McCormick Scientific, США) по модифицированному протоколу с использованием изобутилового и этилового спиртов: этиловый спирт 70, 80 и 96 % по 30 мин при комнатной температуре; далее смесь этилового и изобутилового спирта (1 : 1) — 30 мин; 2 смены 100%-ного изобутилового спирта по 30 мин; смеси изобутилового спирта и парапласта в соотношениях 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 по 30 мин при 60 °С; парапласт (первая смена) — 1 ч при 60 °С; парапласт (вторая смена) — 12 ч при 60 °С; заливка в форму.

Срезы толщиной 5—8 мкм, полученные на санном микротоме Reichert, были депарафинированы с помощью орто-ксилола и регидратированы в серии спиртов понижающейся концентрации. Срезы окрашивали гемалауном Майера (водный раствор 0.1 % гематеина, 2.5 % алюмокалиевых квасцов, 0.01 % иодноватистого натрия и 0.05 % лимонной кислоты) с последующей промывкой в проточной воде, а затем водным эозином (1 %). Окрашенные срезы обезживали в серии спиртов повышающейся концентрации, просветляли в орто-ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Работу с рекомбинантными ДНК проводили по стандартным методикам.

В работе использовали следующие реактивы: моногидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, бычий сывороточный альбумин, параформальдегид, Тритон X-100, ампициллин, канамицин, фенол и хлороформ, 2,2,2-трибромэтанол и 2-метилбутанол (Sigma, США); Trisma Base (Fluka, США); глюкоза, хлорид натрия, дрожжевой экстракт и пептон (Difco, США); обезжиренное сухое молоко (Roth, Германия); трипсин, смесь антибиотиков и антимикотиков, глютамин и среды для культивирования клеток эукариот (Gibco, США); FBS (Invitrogen, США); гистохимические реактивы (Ленреактив).

## Результаты и обсуждение

Основываясь на предположении о важности клеточных контактов в метастатической активности клеток МР101 и их производных, мы провели иммунологический анализ культивируемых клеток с антителами на E-кадгерин,  $\beta$ -катенин и СЕА (рис. 1). Несмотря на очевидные различия в экспрессии СЕА (*a*, *b*), характерные для изучаемых линий, разницы в паттерне экспрессии E-кадгерина (*в*, *з*) и  $\beta$ -катенина (*д*, *е*) мы не заметили.

Для оценки метастатического потенциала клеток мы использовали общепринятый метод их инъекции в селезенку иммунодефицитных мышей. Через 3 мес после инъекций производили вскрытие и анализ зон первичного (в селезенке) и вторичного опухолеобразования (в печени). Результаты отражены в таблице и на рис. 2 и 3. Большинство клонов дали заметные первичные опухоли в месте инъекции (рис. 2, *a*, *в*, *з*; 3, *a*), однако у клона 8-7 опухоль наблюдалась в 1 случае из 9, а клон МР101-7 не образовывал опухоли совсем (рис. 2, *б*).

Для детекции присутствия в органах мыши опухолевых клеток человека из печени и селезенки контрольных и опытных животных выделяли геномную ДНК и анализировали ее методом ПЦР в реальном времени на наличие специфических для человека сателлитных повторов LINE1. Часть органов фиксировали для гистологического анализа.

Вопреки ожиданиям, в подавляющем большинстве случаев мы не обнаружили вторичных опухолей ни при анатомическом анализе (см. таблицу), ни при анализе методом ПЦР (результаты не приводятся). Единственный пример опухоли в печени наблюдали после инъекции клона 8, который предположительно является наиболее метастатически активным. Для этого же клона характерна наибольшая частота возникновения первичных опухолей, достигающая 89 %, тогда как для исходной линии МР101 частота опухолей составляет 42 %, для клона 8-7 с подавленной экспрессией рецептора СЕА — 20 % (см. таблицу). Клетки 101-7, не экспрессирующие ни рецептор, ни лиганд СЕА, в наших условиях опухолей не образовывали. На гистологическом уровне опухоли, полученные при инъекции разных клонов, заметных различий не имели.

Для оценки инвазивности исследуемых клеток мы проводили их культивирование в Матригеле (Yeung et al., 2010). Образующиеся при этом трехмерные дифференцированные колонии (мегаколонии) различались как по внутренней структуре, так и по склонности к образованию выростов на поверхности (рис. 4). Выросты характеризуют способность клеток к распространению в толще субстрата культивирования, т. е. инвазивность. Клетки клона 8 по результатам этого анализа являются наиболее инвазивными.

Считается (Yeung et al., 2010), что способностью образовывать мегаколонии с криптообразными структурами обладает субпопуляция присутствующих в опухоли раковых стволовых клеток. Нами была предпринята попытка обогатить культуру раковыми стволовыми клетками. Для этого использовали описанный нами ранее (Лисковых и др., 2011; Давыдов-Синицын и др., 2013) метод отбора клеток с повышенным уровнем экспрессии стволового маркера Oct4 с помощью лентивирусного вектора, содержащего «суицидальную кассету»: ген тимидинкиназы вируса герпеса и слитый с ним ген устойчивости к пуромину под контролем Oct4-зависимого промотора.

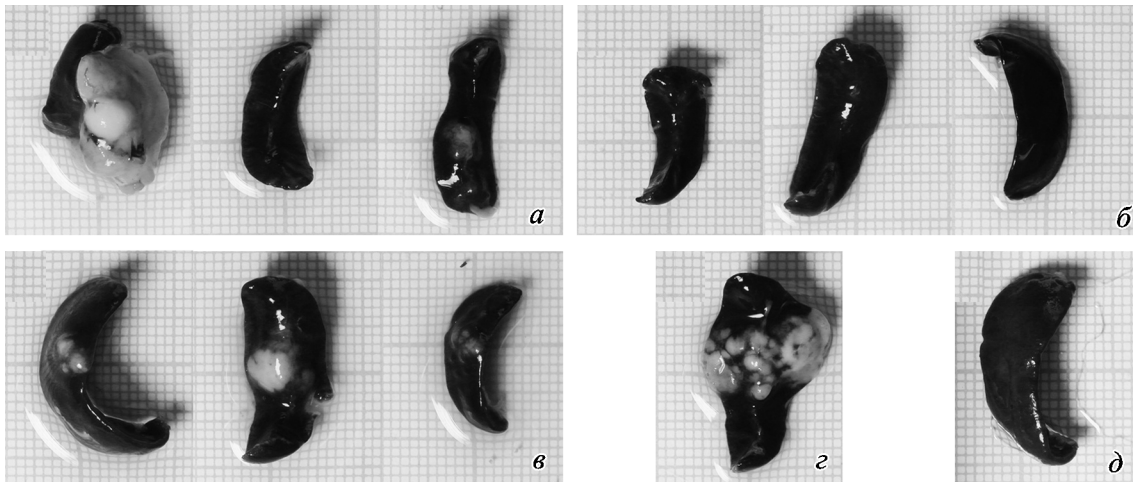


Рис. 2. Внешний вид селезенок мышей Nude через 60—80 сут после инъекции клеток карциномы MIP101 и ее производных с различным профилем экспрессии СЕА и его рецептора: MIP101-7, MIP101 клон 8, MIP101 клон 8-7.

*a* — MIP101 (опухоли в 2 из 3 представленных образцов), *б* — MIP101-7 (опухолей нет), *в* — MIP101 клон 8 (опухоли разного размера во всех образцах), *г* — MIP101 клон 8-7 (единственный образец из 9 повторностей, имевший опухоль), *д* — отрицательный контроль.

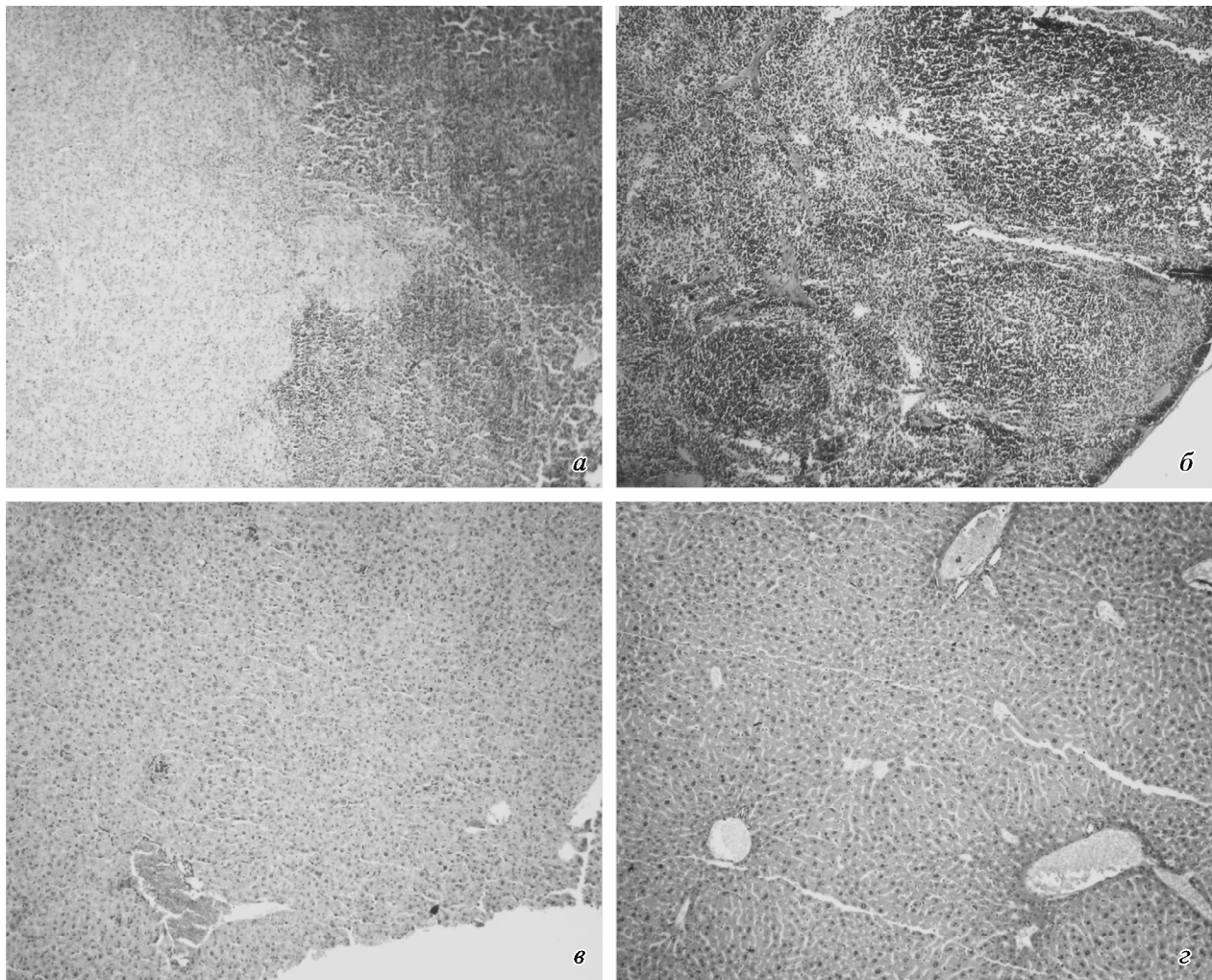


Рис. 3. Гистологические срезы селезенки и печени здоровой мыши (*б, г*) и опытного животного через 80 сут после инъекции клеток карциномы MIP101 клон 8 (*а, в*).

Окраска гематоксилином и эозином. *а* — селезенка с развитой опухолью (светлая зона в левой части снимка); *б* — здоровая селезенка мыши с выраженной узелковой структурой (для сравнения); *в* — печень мыши, имевшей крупную первичную опухоль в селезенке (морфологические отличия печени от нормы отсутствуют); *г* — здоровая печень мыши (для сравнения).

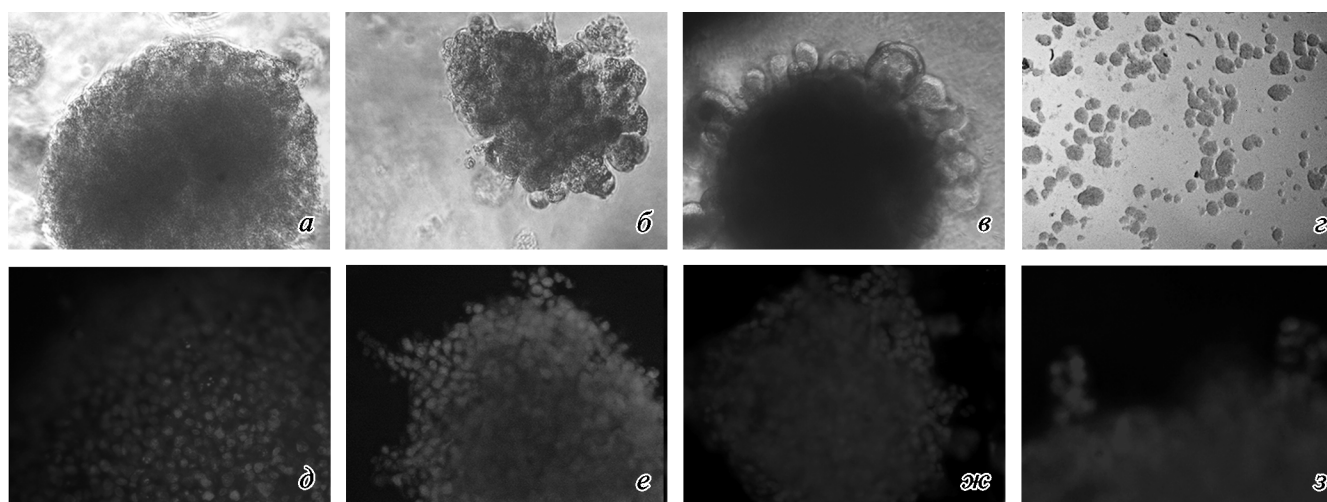


Рис. 4. Колонии клеток карциномы прямой кишки линии MIP101 и ее производной MIP101 клон 8 в Матригеле. Для сравнения показан внешний вид колонии диссоциированных крипт тонкой кишки молодой мыши (в).

Внешний вид в фазово-контрастной оптике (а–з) и флуоресцентное окрашивание ядерным красителем DAPI (д–з). Об. 8× (общий план з), 40× (а–в, д–жс), 80× (з). а, д — MIP101; б, з, е–з — MIP101 клон 8; в — культура диссоциированных крипт тонкой кишки мыши (для сравнения). У колоный MIP101 клон 8 наблюдаются многоклеточные выпячивания на поверхности (б, е, жс, увеличенное изображение з), напоминающие криптообразные выросты в колонии первичного клеточного материала кишки (в). Колонии MIP101 (а, д) имеют более ровную сферическую форму и таких выростов не образуют.

Клетки, несущие эту кассету и одновременно экспрессирующие эндогенный Oct4, благодаря активности кассеты устойчивы к антибиотику пурамицину, но при этом чувствительны к противовирусному препарату ганцикловиру (за счет тимидинкиназы), что позволяет как избирательно культивировать, так и прицельно уничтожать эти клетки.

В результате заражения вирусом и последующего отбора клеток, резистентных к пурамицину, нами были выделены субпопуляции, названные 101-PuroR и 8-PuroR. Данные субпопуляции характеризуются повышенным уровнем экспрессии Oct4 : в 3.1 раза для 101-PuroR и в 36.2 раза для 8-PuroR (Давыдов-Синицын и др., 2013). При дальнейшем культивировании отобранных клеток на среде без пурамицина происходит их спонтанная дифференцировка, и последующая обработка в течение 1 нед ганцикловиrom вызывает гибель оставшихся стволовых клеток. Таким образом, нами были получены популяции, как обогащенные, так и обедненные стволовым компонентом.

Чтобы проверить, влияет ли повышенная экспрессия CEA на Wnt-сигнальный путь, являющийся одним из ключевых в клетках эпителия кишечника, мы сравнили уровень активности эндогенного  $\beta$ -катенина в исследуемых субпопуляциях. Для этого использовали векторную

конструкцию TOPflash, экспрессирующую люциферазу под контролем Tcf/LEF-зависимого промотора. Результаты измерения люциферазной активности (рис. 5) показывают, что уровень эндогенного  $\beta$ -катенина у исходной популяции клон 8 в 1.5 раза выше, чем у MIP101. При обогащении популяции по стволовому компоненту этот уровень повышается в 4 раза для линии MIP101 и в 2 раза для клон 8. У обедненных по стволовому компоненту популяций (через 7 сут после обработки ганцикловиrom в культуре) этот уровень снижается более чем в 2 раза по сравнению с исходными клетками и почти не различается у MIP101 и клон 8.

Таким образом, мы наблюдаем положительную корреляцию между стволовостью и уровнем эндогенного

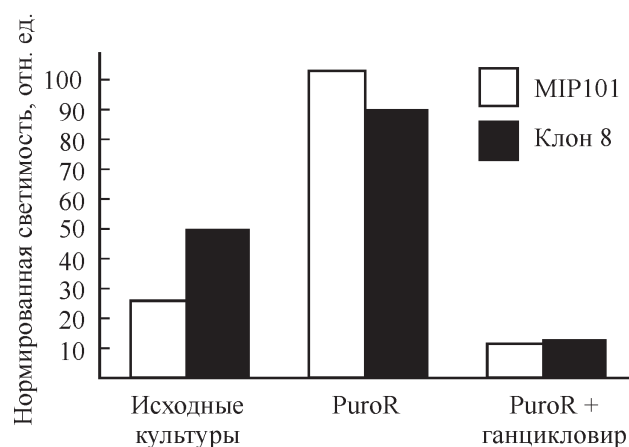


Рис. 5. Активность репортерной плазмиды TOPflash, экспрессирующей ген люциферазы светляка под контролем  $\beta$ -катенинзависимого транскрипционного фактора Tcf/LEF, в клетках карциномы прямой кишки линии MIP101 (светлые столбцы) и ее производной MIP101 клон 8 (темные столбцы).

Показана активность в исходных культурах, в клонках, отобранных на пурамицине (PuroR), и в клонках, отобранных после обработки ганцикловиrom (PuroR + ганцикловир).

#### Характеристики производных линии карциномы прямой кишки человека MIP101 по экспрессии CEA и его рецептора CEAR

Клетки	CEA	CEAR	Число мышей	Опухоли в селезенке	Опухоли в печени
MIP101	–	+	7	3 (42 %)	0
MIP101-7	–	–	6	0	0
MIP101 клон 8	+	+	9	7 (89 %)	1 (11 %)
MIP101 клон 8-7	+	–	5	1 (20 %)	0

Примечание. Представлены результаты эксперимента по введению клеток в селезенку иммунодефицитных мышей линии Nude (данные вскрытия через 60–80 сут).

$\beta$ -катенина, что согласуется с представлением о ключевой роли Wnt-сигнального пути в обеспечении нормальных функций стволовых клеток крипты кишечника (Fodde, Brabletz, 2007).  $\beta$ -Катенин, являясь эффектором Wnt-сигнального пути, играет центральную роль в поддержании баланса между стволовостью и дифференцировкой. Повышенный уровень эндогенного  $\beta$ -катенина у клона 8 коррелирует с повышенным метастатическим и опухолевым потенциалом этого клона. Можно предположить, что клон 8 изначально обладает более высокими стволовыми характеристиками. Его отличие от исходной линии MIP101 заключается в индуцированной экспрессии СЕА, которая, очевидно, и обеспечивает его повышенный стволовой потенциал.

Если исходить из того, что высокий уровень активности Wnt-сигнального пути характеризует именно стволовую популяцию клеток (Fodde, Brabletz, 2007; Le et al., 2008), то полученные нами результаты подтверждают, что содержание стволового компонента у клона 8 выше, чем у базовых MIP101, что может объяснять его повышенный метастатический и опухолевым потенциалом.

Представляет определенный интерес сравнить линии, обогащенные и обедненные по стволовому компоненту, по их опухолевым потенциалу. К настоящему времени такое сравнение было проведено только для линии MIP101. По нашим предварительным данным, удаление стволового компонента из популяции лишает ее опухоленности. Сравнение линий с различной метастатической активностью на предмет зависимости опухоленности от обогащения или обеднения стволовыми клетками — предмет наших дальнейших исследований.

Существует точка зрения, согласно которой именно стволовые раковые клетки обеспечивают метастазирование (Reya et al., 2001; Marotta, Polyak, 2009; O'Brien et al., 2009; Li et al., 2010). В то же время из клинической практики известно, что СЕА является маркером метастазирующих колоректальных опухолей. Наши результаты позволяют предположить прямую связь между экспрессией СЕА и стволовыми характеристиками опухолевой клеточной линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 11-04-01711) и ФЦП (Госконтракт 16.512.11.2085).

### Список литературы

- Давыдов-Синицын А. П., Баженова О. В., Лисковых М. А., Чечик Л. Л., Пономарев С. В., Томилин А. Н., Толкунова Е. Н. 2013. Получение *in vitro* и характеристика субпопуляции стволовых клеток рака кишечника. Цитология. 55 (5) : 000—000.
- Лисковых М. А., Чуйкин И. А., Раян А., Сафина Д. А., Толкунова Е. Н., Минина Ю. М., Жданова Н. С., Дыбан П. А., Маллинс Дж., Костылева Е. И., Чихиржина Е. В., Бадер М., Аленина Н., Томилин А. Н. 2011. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток крысы: анализ условий репрограммирования и культивирования. Цитология. 53 (12) : 939—945.
- Bajenova O., Chaika N., Thomas P. 2012. Carcinoembryonic antigen promotes metastasis via disruption of E-cadherin adherens junction complexes. 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society, September 2012, Brisbane, Australia, № 96.
- Bajenova O., Stolper E., Gapon S., Sundina N., Zimmer R., Thomas P. 2003. Surface expression of heterogeneous nuclear RNA binding protein M4 on Kupffer cell relates to its function

as a carcinoembryonic antigen receptor. *Exp. Cell Res.* 291 : 228—241.

Ballantyne G. H., Quin J. 1993. Surgical treatment of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer.* 71 : 4252—4266.

Berinstein N. L. 2002. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J. Clin. Oncol.* 20 : 2197—2207.

Blumenthal R. D., Hansen H. J., Goldenberg D. M. 2005a. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (carcinoembryonic antigen). *Cancer Res.* 65 : 8809—8817.

Blumenthal R. D., Osorio L., Hayes M. K., Horak I. D., Hansen H. J., Goldenberg D. M. 2005b. Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. *Cancer Immunol. Immunother.* 54 : 315—327.

Brembreck F. H., Rosario M., Birchmeier W. 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 16 : 51—59.

Camacho-Leal P., Stanners C. P. 2008. The human carcinoembryonic antigen (CEA) GPI anchor mediates anoikis inhibition by inactivation of the intrinsic death pathway. *Oncogene.* 27 : 1545—1553.

Duxbury M. S., Ito H., Zinner M. J., Ashley S. W., Whang E. E. 2004. CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and *in vivo* metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 23 : 465—473.

Edelman F. J., Fuks A., DeMarte L., Taheri M., Stanners C. P. 1993. Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J. Cell Biol.* 123 : 467—475.

Fiorentino F., Hunt I., Teoh K., Treasure T., Utley M. 2010. Pulmonary metastasectomy in colorectal cancer: a systematic review and quantitative synthesis. *J. R. Soc. Med.* 103 : 60—66.

Fodde R., Brabletz T. 2007. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Biol.* 19 : 150—158.

Fusai G., Davidson B. R. 2003. Management of colorectal liver metastases. *Colorectal Dis.* 5 : 2—23.

Goldstein M. J., Mitchell E. P. 2005. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* 23 : 338—351.

Goya T., Miyazawa N., Kondo H., Tsuchiya R., Naruke T., Suetama K. 1989. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: 10-year follow-up. *Cancer.* 64 : 1418—1421.

Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudolph S., Anton R., Heirholzer A., Del Valle I., Herin K., Vogt R., Kemler R. 2012. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science.* 336 : 1549—1554.

Hostetter R. B., Augustus L. B., Mankarious R. 1990. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J. Nat. Cancer. Inst.* 82 : 380—385.

Huerta S. 2008. Recent advances in the molecular diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 8 : 277—288.

Jessup J. M., Thomas P. 1998. CEA and metastasis: a facilitator of site-specific metastasis. In: Cell adhesion and communication mediated by the CEA family: basic and clinical perspectives. New York: CRC Press. 195—222.

Knychalski B., Lukienzuk T. 2012. The evaluation of diagnostic value of the tumor markers: CCSA-2 and CEA in colorectal cancer. *Pol. Przegl. Chir.* 82 : 86—92.

Laguinje L., Bajenova O., Bowden E., Sayyah J., Thomas P., Juhl H. 2005. Surface expression and CEA binding of hnRNP M4 protein in HT29 colon cancer cells. *Anticancer Res.* 25 : 23—31.

Le N. H., Franken P., Fodde R. 2008. Tumor-stroma interactions in colorectal cancer: converging on beta-catenin activation and cancer stemness. *Br. J. Cancer.* 98 : 1886—1893.

Lee W. S., Baek J. H., Kim K. K., Park Y. H. 2012. The prognostic significance of percentage drop in serum CEA post curative resection for colon cancer. *Surg. Oncol.* 21 : 45—51.



- Li F., Tiede B., Massague J., Kang Y. 2007. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17 : 3—14.
- Li Y., Cao H., Jiao Z., Pakala S. B., Sirigirl D. N. R., Li W., Kumar R., Mishra L. 2010. Carcinoembryonic antigen interacts with TGF- $\beta$  receptor and inhibits TGF- $\beta$  signaling in colorectal cancers. *Cancer Res.* 70 : 8159—8168.
- Liotta L. A. 1984. Tumor invasion and metastases; role of basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. *Amer. J. Pathol.* 117 : 339—348.
- Marotta L. L., Polyak K. 2009. Cancer stem cells: a model in the making. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 19 : 44—50.
- Mourtzikou A., Stamouli M., Kroupis C., Christodoulou S., Skondra M., Kastania A., Pestasides D., Athanases G., Dimas C. 2012. Evaluation of carcinoembryonic (CEA), epidermal growth factor receptor (EGFR), epithelial cell adhesion molecule EpCAM (GA733-2), and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) levels in colorectal cancer patients and correlation with clinicopathological characteristics. *Clin. Lab.* 58 : 441—448.
- O'Brien C. A., Kreso A., Dick J. E. 2009. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin. Radiat. Oncol.* 19 : 71—77.
- Ordoñez C., Screaton R. A., Ilantzis C., Stanners C. P. 2000. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res.* 60 : 3419—3424.
- O'Reilly D. A., Poston G. J. 2006. Colorectal liver metastases: current and future perspectives. *Future Oncol.* 2 : 525—531.
- Perez L., Ayala M., Pimentel G., Bell H., Canaan-Haden L., Bequet M., Gonzalez L. J., Miranda M., Ravelo R., Roque L., Acevedo B., Oliva J. P., Gavilondo J. V. 2006. A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. *Bio-technol. Appl. Biochem.* 43 : 39—48.
- Rao U. S., Hoerster N. S., Thirumala S., Rao P. S. 2012. The influence of metastatic site on the expression of CEA and cellular localization of  $\beta$ -catenin in colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* (In press).
- Reya N., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414 : 101—111.
- Rotolo N., De Monte L., Imperatori A., Dominioni L. 2007. Pulmonary resections of single metastases from colorectal cancer. *Surg. Oncol.* 16 (Suppl. 1) : S141—S144.
- Samara R. N., Laguine L. M., Jessup J. M. 2007. Carcinoembryonic antigen inhibits anoikis in colorectal carcinoma cells by interfering with TRAIL-R2 (DR5) signaling. *Cancer Res.* 67 : 4774—4782.
- Screaton R. A., DeMarte L., Draber P., Stanners C. P. 2000. The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidyl-inositol anchor. *J. Cell Biol.* 150 : 613—626.
- Screaton R. A., Penn L. Z., Stanners C. P. 1997. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J. Cell Biol.* 19; 137 : 939—952.
- Soeth E., Wirth T., List H. J., Kumbhani S., Petersen A., Neumaler M., Czubayko F., Juhl H. 2001. Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 7 : 2022—2030.
- Sreekumar R., Sayan B. S., Mimezami A. H., Sayan A. E. 2011. MicroRNA Control of invasion and metastasis pathways. *Front. Genet.* 2 : 58.
- Taheri M., Saragovi H. U., Stanners C. P. 2003. The adhesion and differentiation-inhibitory activities of the immunoglobulin superfamily member, carcinoembryonic antigen, can be independently blocked. *J. Biol. Chem.* 278 : 14 632—14 639.
- Tan E., Gouvas N., Nicholls R. J., Ziprin P., Xynos E., Tekkis P. P. 2009. Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surg. Oncol.* 18 : 15—24.
- Thomas P., Forse R. A., Bajenova O. 2011. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin. Exp. Metastasis.* 28 : 923—932.
- Thomas P., Gangopadhyay A., Steele G., jr., Andrews C., Nakazato H., Oikawa S., Jessup J. M. 1995. The effect of transfection of the CEA gene on the metastatic behavior of the human colorectal cancer cell line MIP-101. *Cancer Lett.* 92 : 59—66.
- Uchino J., Takayama K., Harada A., Sone T., Harada T., Curiel D. T., Kuroki M., Nakanishi Y. 2008. Tumor targeting carboxylesterase fused with anti-CEA scFv improve the anticancer effect with a less toxic dose of irinotecan. *Cancer Gene Ther.* 15 : 94—100.
- Wagner H. E., Toth C. A., Steele G. D., jr., Thomas P. 1992. Metastatic potential of human colon cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. *Clin. Exp. Metastasis.* 10 : 25—31.
- Yeung T. M., Gandhi S. C., Wilding J. L., Muschel R., Bodmer W. F. 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 107 : 3722—3727.

Поступила 4 III 2013

#### A COMPARATIVE ANALYSIS OF COLORECTAL CARCINOMA CELL LINES THAT DIFFER IN METASTATIC POTENTIAL

A. P. Davydov-Sinitsyn,<sup>1,\*</sup> O. V. Bajenova,<sup>2</sup> M. A. Liskovykh,<sup>1</sup> S. V. Ponomartsev,<sup>1</sup>  
L. L. Chechik,<sup>1</sup> A. N. Tomilin,<sup>1</sup> E. N. Tolkunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> St. Petersburg State University;  
\* e-mail: ads707@ya.ru

In the current work we make an attempt to compare cancer cells of one origin, but differing in the expression of CEA protein, a clinical marker of metastatic carcinomas, presumably one of the key factors in metastatic activity. We have explored the morphology of cell colonies *in vitro*, expression patterns of epithelial markers, the ability of these cells to form tumors and metastases *in vivo*, and evaluated their stem compartment with the aid of a suicidal genetic construct sensitive to the embryonic stem cell marker, Oct4.

Key words: cancer stem cells, tumorigenicity, Oct4, POU5F1.