

## ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ОПУХОЛЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© 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> И. В. Рыков,<sup>3</sup> С. А. Кошкин,<sup>2</sup> Р. В. Орлова,<sup>2</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 и

<sup>3</sup> Клиническая больница № 122 им. Л. Г. Соколова, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: ads707@ya.ru

Ранее мы сообщали о получении нами из линии карциномы прямой кишки человека MIP101 субпопуляции раковых стволовых клеток, которые обладали повышенным клоногенным и туморогенным потенциалом в сравнении с исходной популяцией. Согласно нашим данным, удаление стволового компонента из популяции раковых клеток лишает ее туморогенности. Данная работа посвящена сравнению туморогенного потенциала линий, обогащенных и обедненных по стволовому компоненту. Показано, что рост опухолей, полученных при ксенотрансплантации клеток, обогащенных по стволовому компоненту, может быть остановлен внутримышечным введением ганцикловира. Таким образом, был разработан метод, позволяющий выделять в культуре колоректальной карциномы MIP101 клетки, отличающиеся высоким уровнем транскрипции с промотора Oct4, а также удалять эти клетки из популяции *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** раковые стволовые клетки, туморогенность, Oct4.

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

Концепция раковых стволовых клеток (РСК) широко обсуждается и развивается в последние годы. С целью определить значение, вкладываемое в термин «раковые стволовые клетки», и исключить разночтения в 2011 г. на конференции по РСК приняли общее соглашение на этот счет (Valent et al., 2012). Опухоль, согласно концепции раковых стволовых клеток, рассматривается как патологический орган, который, подобно нормальному органу, состоит из клеточных популяций различной степени дифференцированности. Наиболее дифференцированные клетки в составе опухоли несут признаки той ткани, из которой произошла опухоль, и позволяют ее идентифицировать.

РСК были исходно идентифицированы и выделены в культуре клеток острой миелоидной лейкемии (Lapidot et al., 1994; Bonnet, Dick, 1997), а впоследствии концепция стволовых раковых клеток распространилась на ряд плотных опухолей: мозга (Singh et al., 2004), головы и шеи (Prince et al., 2007), поджелудочной железы (Li et al., 2007), меланому (Schatten et al., 2008), опухоли печени (Yang et al., 2008), легких (Eramo et al., 2008), простаты (Collins et al., 2005), яичников (Curley et al., 2009) и злокачественные опухоли толстого кишечника (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Весьма схожие со взрослыми стволовыми клетками РСК также характеризуются

фенотипической и функциональной гетерогенностью. Среди плотных опухолей стволовые раковые клетки впервые были обнаружены в составе злокачественных опухолей молочной железы. РСК активно изучаются в опухолях мозга, прежде всего в глиомах (Glioblastoma multiforme, GBM).

В настоящее время идентификация и изоляция раковых стволовых клеток осуществляются на основании характерного для каждого типа опухолей спектра поверхностных клеточных маркеров (Cell surface phenotypes of CSCs). Для обогащения популяции РСК используют технологию клеточного сортирования, основанную на мечении клеток антителами к специфическим маркерам клеточной поверхности, и затем тестируют отобранные популяции на иммунодефицитных мышцах. Так, для стволовых раковых клеток карциномы толстого кишечника чаще всего используют маркеры CD133, CD44, CD166, EpCAM и CD24 (Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Yeung et al., 2010). Однако ни один из этих маркеров не является специфичным, т. е. экспрессируемым исключительно опухолевыми клетками.

Комбинацию поверхностных клеточных маркеров принято называть фенотипом РСК. Фенотипы РСК могут различаться даже у пациентов с одним типом рака, что, возможно, объясняет разницу в результатах терапии рака

определенного типа у разных пациентов. В одном из недавних обзоров (Visvader, Lindeman, 2012) авторы объясняют такую разницу фенотипов наличием множественных пулов (субпопуляций) раковых стволовых клеток. Гетерогенность компартмента РСК в родительской (исходной) опухоли и генерируемых после трансплантации опухолях была недавно описана для раковых опухолей яичников и груди (Meyer et al., 2010; Stewart et al., 2011).

Изначально стволовые клетки колоректального рака были идентифицированы в составе популяции CD133<sup>+</sup>. CD133, или промнин-1, — это гликопротеин, представляющий собой единичную полипептидную цепь с мол. массой около 120 кДа (Yin et al., 1997). Несмотря на то что функции его неизвестны, предполагают, что он может регулировать полярность клетки, межклеточное и матрикс-клеточное взаимодействие (Giebel et al., 2004). В 2007 г. Риччи-Витиани с коллегами (Ricci-Vitiani et al., 2007) сообщили, что фракция позитивных по CD133 клеток может формировать опухоли *in vivo*, поддерживать самовозобновление после серийных трансплантаций, тогда как негативные по промнину клетки этими способностями не обладают. Также позитивные клетки CD133<sup>+</sup> способны расти в виде сфер в недифференцированном состоянии, сохраняя свою способность дифференцироваться при помещении в среду, содержащую сыворотку. Список маркеров для идентификации раковых стволовых клеток толстой кишки постоянно растет. В качестве маркеров для идентификации CCSC были предложены CD44 (Du et al., 2008), CD24 (Choi et al., 2009), ALDH1 (Huang et al., 2009), MSI1 (Potten et al., 2003) и CD 29 (Vermeulen et al., 2008). Углубление наших знаний в области РСК будет способствовать разработке новых, более эффективных противоопухолевых препаратов, направленных против низкодифференцированных клеток, которые в сочетании с существующими хирургическими и химическими подходами позволят бороться с раковой опухолью на всех уровнях ее развития. Молекулярный таргетинг таких стволовых раковых клеток должен рассматриваться как ключ к эффективности противораковых стратегий, как метод повышения чувствительности опухоли к традиционным методам терапевтического воздействия и замедления ее роста.

В качестве клеточной модели для изучения СК аденокарциномы толстой кишки человека нами была использована клеточная линия MIP101 — низкодифференцированная, слабометастатическая, не продуцирующая раково-эмбрионального антигена СЕА. Слабодифференцированные клетки имеют более удлинённую форму, отличаются высокой инвазивностью и более адгезивны и подвижны по сравнению с высокодифференцированными клеточными линиями колоректальной карциномы (CX-1 и DLD-2), которые продуцируют большое количество СЕА (Wagner et al., 1992). СЕА широко используется в качестве опухолевого маркера, связанного с увеличением метастатического потенциала клеток опухолей толстой кишки (Jessup, Thomas, 1998; Goldstein, Mitchell, 2005; Lee et al., 2012). Если исходная линия MIP101(A-R+) не продуцирует СЕА, но экспрессирует его рецептор hnRNPМ (Bajanova et al., 2003), то ее производные имеют следующие характеристики: MIP101 клон 8 (A+R+) вырабатывает СЕА и экспрессирует рецептор к нему; MIP101-7 (A-R-) не экспрессирует ни СЕА, ни его рецептор, а клон 8-7 (A+R-) вырабатывает СЕА, но имеет подавленную экспрессию его рецептора (Thomas et al., 2011). Используя лентивирусные частицы, содержащие

конструкцию, которая экспрессируется под контролем энхансера 2A2В гена *Ost4*, мы заражали описанные выше клеточные линии и отбирали клетки с интегрировавшейся конструкцией, инкубируя их на селективной среде, содержащей 20 мкг/мл антибиотика пуромицина. Таким образом нами были получены клеточные культуры с генетически сенсibilizированным стволовым компонентом (Давыдов-Синицын и др., 2013). Мы предлагаем их как модель для разработки перспективного метода лечения рака, предполагающего направленное уничтожение стволовых клеток опухоли.

## Материал и методика

Культивирование клеток раковой опухоли прямой кишки линии MIP101 проводили в среде RPMI 1640 (Gibco, США), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Sigma, США). Клетки пересевали 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 HEK293Т, которые культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (Sigma, США), и пересевали через каждые 3 сут в соотношении 1 : 4.

Упаковка вирусных частиц и заражение клеток *in vitro* вирусом. Для сборки вирусных частиц клетки линии 293Т 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 пересевали на 10-сантиметровые культуральные чашки (Falcon, США). На следующие сутки в среду добавляли антибиотик пуромицин (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.

Анализ сферообразования клеток MIP101 на низкоадгезивном субстрате проводили в среде DMEM-F12 с добавлением 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 1 % супплемента B27 и 1× культуральной смеси антибиотиков. Для проведения эксперимента клетки, растущие в монослое, обрабатывали раствором трипсина до состояния одноклеточной суспензии, проводили подсчет клеток в камере Горяева, после чего переносили по 100 мкл суспензии с концентрацией 1000 кл./мл в лунки 96-луночного низкоадгезивного планшета. Через 1 сут добавляли по 25 мкл свежей среды того же состава, далее культивировали клетки в течение 10 сут. По окончании срока в каждой лунке подсчитывали сферы размером более 90 мкм.

Тесты на формирование опухолей. Клеточные культуры обрабатывали трипсином для получения одноклеточной суспензии, после чего промывали раствором Хэнкса 3 раза с осаждением на центрифуге (300 g, 3 мин). После всех промывок измеряли концентрацию клеток с помощью камеры Горяева и доводили концентрацию до 10 млн/мл. Полученную суспензию инъецировали иммунодефицитным лабораторным мышам линии Nude подкожно в область бедра по 100 мкл (1 млн клеток). Для предотвращения вытекания жидкости иглу шприца вводили с верхней стороны бедра сквозь мышцу до просвета между кожей и мышцами на нижней стороне. Каждая мышь получала по две инъекции — в правое и левое бедра. Вырастающие опухоли измеряли каждые 10 сут начиная с 20-х сут после инъекции. Измерения производили штангенциркулем по максимальному диаметру с точностью до 1 мм.

Лечение ганцикловиром *in vivo*. Для исследования действия ганцикловира на опухоли *in vivo* были подготовлены животные, несущие подкожные опухоли, согласно вышеописанному протоколу. Раствор ганцикловира разбавляли стерильным PBS до концентрации 2 мг/мл и использовали в дозировке 10 мкл на 1 г массы тела (200 мкл на одну мышшь среднего размера). Инъекции производили внутримышечно 1 раз в сутки в течение 10 сут (с 11-х по 20-е сут после инъекции клеток).

Работу с рекомбинантными ДНК проводили по стандартным методикам.

Использованные 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 антимиотиков, глутамин и среды для культивирования клеток эукариот (Gibco, США); FBS (Invitrogen, США); гистохимические реактивы (Ленреактив).

## Результаты и обсуждение

Клоногенность клеток MIP101. Раковые стволовые клетки, согласно своему определению, отвечают за формирование опухолей и поддержание их роста. Этот процесс можно воспроизвести *in vitro* в уменьшенном масштабе путем высевания клеток на низкоадгезивный пластик. В таких условиях культивирования об-

Таблица 1

**Диаметр опухолей, развивающихся после подкожного введения исходной и обогащенной популяций клеток MIP101**

| Клетки         | Диаметр опухоли на разных сроках, мм |            |            |
|----------------|--------------------------------------|------------|------------|
|                | 20 сут                               | 30 сут     | 40 сут     |
| 101 (исходные) | 4.0 ± 0.7                            | 5.2 ± 1.1  | 6.6 ± 2.1  |
| 101S           | 7.0 ± 2.6                            | 11.8 ± 2.3 | 13.2 ± 2.0 |

Примечание. Указано среднее значение ± стандартное отклонение.

Таблица 2

**Диаметр и частота возникновения опухолей, развивающихся после подкожного введения исходной, обогащенной и обедненной популяций клеток-производных MIP101**

| Клетки | Частота возникновения опухолей, % | Диаметр опухоли на разных сроках, мм |            |
|--------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------|
|        |                                   | 20 сут                               | 30 сут     |
| 101    | 33 (1 из 3)                       | 6                                    | 8          |
| 101+G  | 33 (1 из 3)                       | 5                                    | 13         |
| 101S   | 60 (3 из 5)                       | 7.3 ± 2.1                            | 11.3 ± 3.1 |
| 101+G  | 0                                 | —                                    | —          |

Примечание. Указано среднее значение ± стандартное отклонение.

разуются колоносферы — многоклеточные колонии, происходящие из клеток, которые способны давать долгоживущее и пролиферирующее потомство, т. е. обладающих стволовыми свойствами.

Задачей эксперимента являлась оценка изменения количества клоногенных клеток в культуре MIP101 в исходном состоянии и после предполагаемого обогащения по стволовым клеткам. В опыте использовали клетки базовой линии MIP101(A-R+) в исходном состоянии, а также зараженные лентивирусом с суицидальной кассетой и обработанные пуромицином MIP101(A-R+)S.

Результаты эксперимента показали, что в таких условиях базовые клетки MIP101(A-R+) не образуют заметных колоний на фоне массовой гибели клеток. Отобранные на пуромицине клетки MIP101(A-R+)S дают в среднем 48 ± 16 колоний на лунку (среднее ± станд. откл.).

Этот эксперимент явился первым подтверждением взаимосвязи активности Ост-подобных транскрипционных факторов и пролиферативных характеристик раковых клеток линии MIP101.

Туморогенность MIP101. Задачей эксперимента была сравнительная оценка туморогенности клеток MIP101 в исходной популяции, после обогащения по стволовому компоненту и после уничтожения стволового компонента. В опытах использовали клетки базовой линии MIP101(A-R+), зараженные лентивирусом с суицидальной кассетой TK-ires-Puro. Обогащение клеточной популяции производили путем отбора на селективной среде с пуромицином (30 мг/л) в течение 10 сут, в результате чего выживали только клетки, несущие суицидальную кассету и активно экспрессирующие ее за счет эндогенных транскрипционных факторов. Оценка туморогенности производили путем измерения диаметров опухолей на сроках 20, 30 и 40 сут от дня инъекции. Клетки 101S дали опухоли у всех 6 животных, а базовые 101 — у 5 из 6 (83 %). Размеры опухолей на различных сроках приведены в табл. 1.

Оценка достоверности различий с помощью *t*-критерия Стьюдента показала, что размеры опухолей 101 и 101S достоверно различаются на всех сроках ( $P < 0.05$ , на 30-е и 40-е сут  $P < 0.01$ ).

Во втором опыте использовали клетки 101 и 101S. Каждая культура была разделена на две части, одна из которых проходила обработку ганцикловиром (+G), а вторая — нет. Итого получили 4 популяции — 101, 101+G, 101S и 101S+G. Условия инъекции были такими же, как в

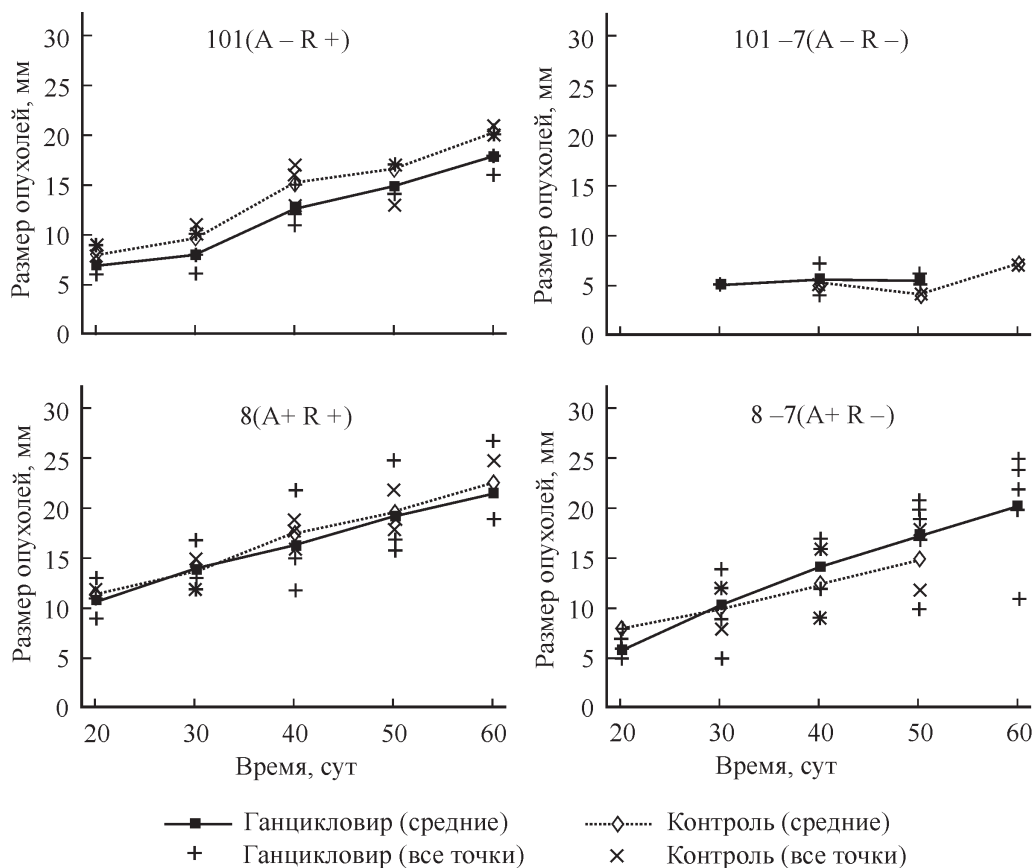


Рис. 1. Графики роста опухолей после инъекций различных производных клеточной линии MIP101 в контроле и при обработке ганцикловиром (контрольный эксперимент) в абсолютных величинах (средние значения и измерения каждой опухоли).

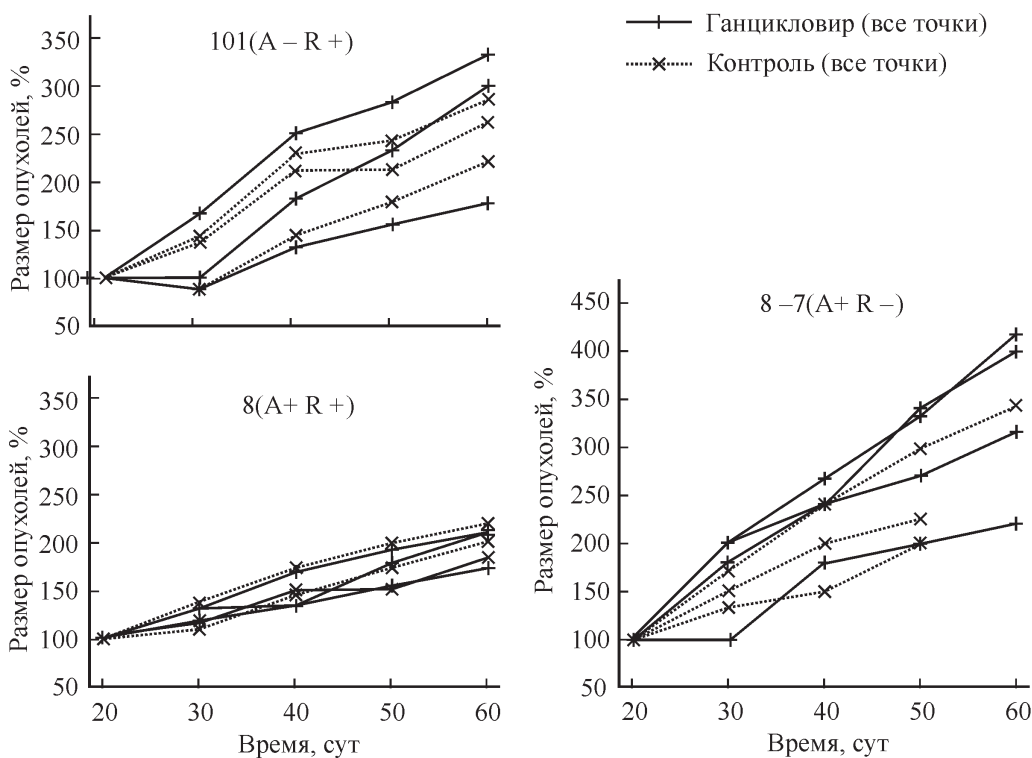


Рис. 2. Графики роста опухолей после инъекций различных производных клеточной линии MIP101 в контроле и при обработке ганцикловиром (контрольный эксперимент) в относительных размерах, нормализованных по первому измерению (20-е сут).

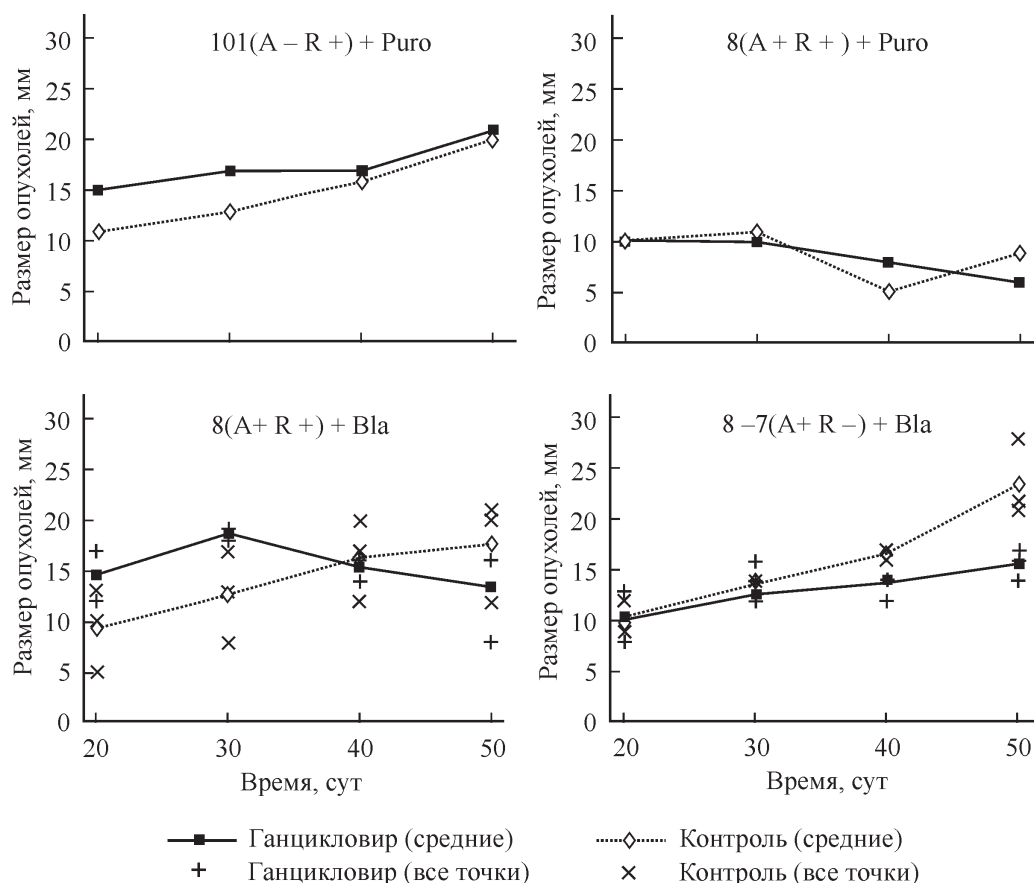


Рис. 3. Графики роста опухолей после инъекций клеток-производных клеточной линии MIP101, несущих суицидальную кассету, в контроле и при обработке ганцикловиром в абсолютных величинах (средние значения и измерения каждой опухоли).

предыдущем опыте. Клетки 101 и 101+G (не несущие кассеты) были инъектированы 3 мышам, 101S и 101S+G (несущие кассету и прошедшие обогащение) — 5 мышам. Клетки 101S+G, т. е. прошедшие отбор на наличие кассеты и затем лишённые стволового компонента, не дали ни одной опухоли. Клетки 101 и 101+G дали опухоли у одного из трех подопытных животных и имели сходные размеры, т. е. эти клетки не реагировали на ганцикловир (табл. 2).

Таким образом, показано, что обогащение популяции MIP101 с помощью суицидальной кассеты, содержащей энхансер гена Oct4, способствует увеличению их туморогенности, тогда как уничтожение клеток, в которых активен этот энхансер, ведет к исчезновению туморогенности.

Подавление РСК *in vivo*. Ключевым этапом исследований раковых стволовых клеток в популяции MIP101 стали опыты по их удалению из опухоли *in vivo*, что, согласно имеющимся представлениям, должно со временем приводить к замедлению темпов роста опухоли. Имеющаяся система с интегрированной в геном суицидальной кассетой позволяет системно во всем организме уничтожать клетки, экспрессирующие кассету, при помощи инъекций ганцикловира.

Вначале был проведен контрольный эксперимент, задачей которого было исключение действия ганцикловира на клетки, не несущие суицидальной кассеты. В опыт было включено 16 мышей в возрасте 90—120 сут. Проверяли все 4 клеточные линии, не несущие суицидальной кассеты. Клетки 101-7(A-R-) давали небольшие (4—5 мм) опухоли в 3 случаях из 4. Результаты их из-

мерений не приводятся по причине недостоверности. Остальные измерения приведены на рис. 1 и 2.

Для опыта по лечению *in vivo* были взяты 9 мышей в возрасте 45—50 сут. Клетки были предварительно инфицированы лентивирусом, несущим суицидальную кассету, и затем отобраны на селективной среде с добавлением антибиотика: пурамицин в концентрации 30 мкг/л — для клеток 101(A-R+) и 8(A+R+), бластицидин 10 мкг/л — для 101-7(A-R-), 8(A+R+) и 8-7(A+R-). Популяция 101-7(A-R-) полностью погибала в ходе селекции, что может быть связано с чрезвычайно малым количеством стволовых клеток в ее составе. В дальнейших опытах клетки 101-7(A-R-) не использовали.

Спустя 20 сут после инъекции образовавшиеся опухоли измеряли, после чего 3 мыши из первой группы и 2 мыши из второй группы начали получать ежедневные инъекции ганцикловира внутримышечно (по 100 мкл, 2 мг/мкл). Инъекции повторяли в течение 10 сут. Повторное измерение диаметров опухолей проводили на 30-е сут (10 сут от начала лечения), 40-е и 50-е сут (30 сут от начала лечения) (рис. 3, 4).

Поскольку на момент начала лечения опухоли имели разный диаметр (5—17 мм), для нормализации измерений были рассчитаны относительные размеры опухолей в процентах от первого измерения (20-е сут). Соответственно все опухоли, которые не наблюдались на 20-е сут, были исключены из расчетов.

Статистическую обработку проводили с помощью непараметрического критерия Уилкоксона. Проверяли наличие разницы между относительными размерами опу-

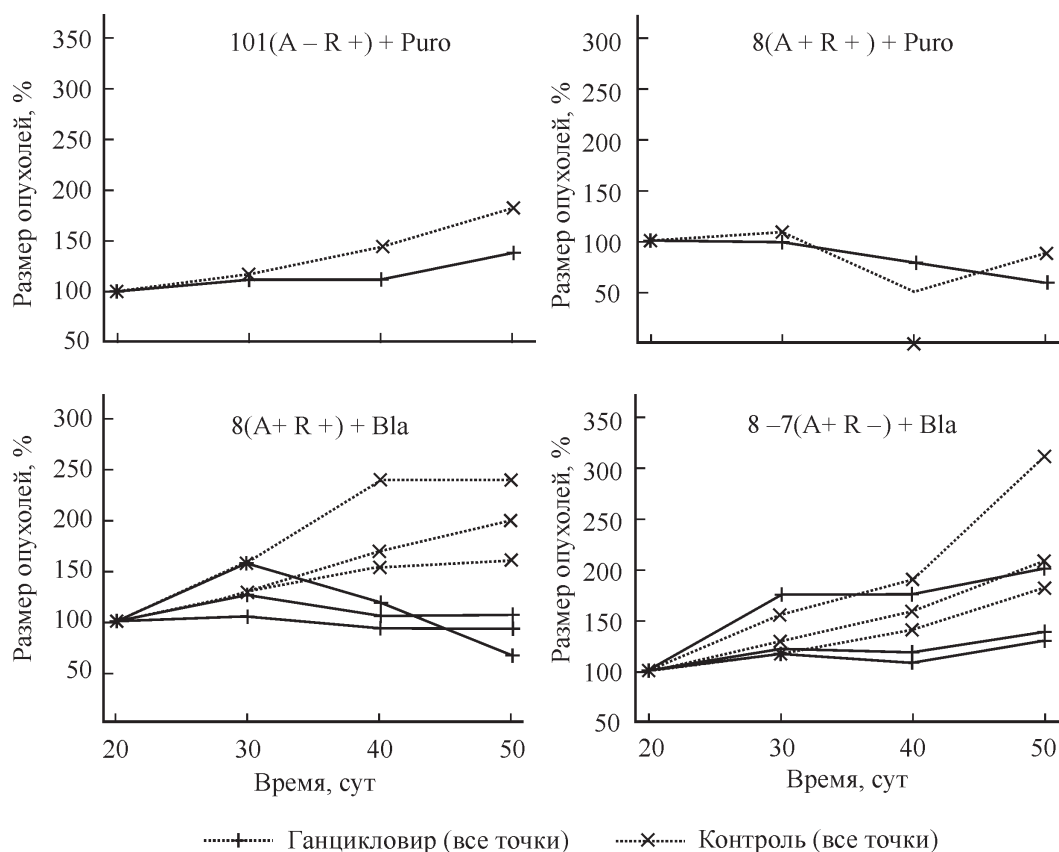


Рис. 4. Графики роста опухолей после инъекций клеток-производных клеточной линии MIP101, несущих суицидальную кассету, в контроле и при обработке ганцикловиром в относительных размерах, нормализованных по первому измерению (20-е сут).

холой на всех сроках на фоне наличия или отсутствия лечения ганцикловиром. Наличие достоверных различий должно показать, что на всех сроках после лечения темп роста оказывается достоверно ниже, чем без лечения.

Результаты измерений приводятся в виде графиков абсолютных размеров опухолей, усредненных для каждого типа клеток (поверх графиков точками обозначены измерения каждой опухоли), и графиков относительных размеров для каждой опухоли (рис. 1—4). Поскольку клетки 101-7(A-R-) не дали ни одной видимой опухоли на 20-е сут эксперимента, вычисления относительных размеров опухолей для них не проводили.

Клетки, не несущие суицидальной кассеты, не показали статистически достоверного изменения темпов роста опухоли при лечении ганцикловиром, что свидетельствует об отсутствии влияния ганцикловира на исходные клетки MIP101 всех вариантов. Клетки, несущие суицидальную кассету и обогащенные на среде с антибиотиком, практически во всех случаях демонстрировали замедление роста опухолей после начала лечения ганцикловиром. Клетки 8-Puro могут быть рассмотрены как выпадающая точка, поскольку для них были доступны только одна контрольная и одна опытная опухоль. Статистическая достоверность по критерию Уилкоксона доказана для клеток 8(A+R+)-Bla (>95 %) и 8-7(A+R-)-Bla (>90 %).

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что клетки, экспрессирующие суицидальную кассету с онхансерным элементом 2A2B, определяют способность опухоли к росту, а удаление этих клеток из популяции лишает ее туморогенности.

Итоги работы, доказывающие активность экспрессии Ост-подобных транскрипционных факторов именно в стволовом компоненте опухолевой популяции, характеризуют это семейство белков как маркер раковых стволовых клеток и потенциальную мишень для генетической терапии рака.

### Список литературы

- Давыдов-Синицын А. П., Баженова О. В., Лисковых М. А., Чечик Л. Л., Пономарцев С. В., Томилин А. Н., Толкунова Е. Н. 2013. Получение *in vitro* и характеристика субпопуляции стволовых клеток рака кишечника. Цитология. 55 (5) : 36—41. (Davydov-Sinitsyn A. P., Bazhenova O. V., Liskovykh M. A., Chchik L. L., Ponomartsev S. V., Tomilin A. N., Tolkunova E. N. 2013. *In vitro* derivation and characterization of a colorectal cancer stem cell subpopulation. Cell Tissue Biol. 7 (4) : 320—324.)
- 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.
- Bonnet D., Dick J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. 3 : 730—737.
- Choi D., Lee H. W., Hur K. Y., Kim J. J., Park G. S., Jang S. H., Song Y. S., Jang K. S., Paik S. S. 2009. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. World J. Gastroenterol. 15 : 2258—2264.
- Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J., Maitland N. J. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res. 65 : 10 946—10 951.

- Curley M. D., Therrien V. A., Cummings C. L., Sargent P. A., Koulouris C. R., Friel A. M., Roberts D. J., Seiden M. V., Scadden D. T., Rueda B. R., Foster R. 2009. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*. 27 : 2875—2883.
- Dalerba P., Dylla S. J., Park I.-K., Liu R., Wang X., Cho R. W., Hoey T., Gurney A., Huang E. H., Simeone D. M., Shelton A. A., Parmiani G., Castelli C., Clarke M. F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 10 158—10 163.
- Du L., Wang H., He L., Zhang J., Ni B., Wang X., Jin H., Cahuzac N., Mehrpour M., Lu Y., Chen Q. 2008. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin. Cancer Res*. 14 : 6751—6760. Erratum in: *Clin Cancer Res*. 14 : 7964—7967.
- Eramo A., Lotti F., Sette G., Pilozi E., Biffoni M., Di Virgilio A., Conticello C., Ruco L., Peschle C., De Maria R., 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15 : 504—514.
- Giebel B., Corbeil D., Beckmann J., Hohn J., Freund D., Giesen K., Fischer J., Kogler G., Wernet P. 2004. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 104 : 2332—2338.
- 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.
- Huang E. H., Hynes M. J., Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., Fields J. Z., Wicha M. S., Boman B. M. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 69 : 3382—3389.
- 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.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 367 : 645—648.
- Lee W. S., Baek J. H., Kim K. K., Park Y. H. 2012. The prognostic significant of percentage drop in serum CEA post curative resection for colon cancer. *Surg. Oncol*. 21 : 45—51.
- Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F., Simeone D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 67 : 1030—1037.
- Meyer M. J., Fleming J. M., Lin A. F., Hussnain S. A., Ginsburg E., Vonderhaar B. K. 2010. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 70 : 4624—4633.
- O'Brien C. A., Pollett A., Gallinger S., Dick J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 445 : 106—110.
- Potten C. S., Booth C., Tudor G. L., Booth D., Brady G., Hurley P., Ashton G., Clarke R., Sakakibara S., Okano H. 2003. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker: musashi-1. *Differentiation*. 71 : 28—41.
- Prince M. E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G. T., Kaplan M. J., Dalerba P., Weissman I. L., Clarke M. F., Ailles L. E. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 973—978.
- Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Pilozi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 445 : 111—115.
- Schatton T., Murphy G. F., Frank N. Y., Yamaura K., Waga-Gasser A. M., Gasser M., Zhan Q., Jordan S., Duncan L. M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R. C., Kupper T. S., Sayegh M. H., Frank M. H. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 451 : 345—349.
- Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Cusimano M. D., Dirks P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432 : 396—401.
- Stewart J. M., Shaw P. A., Gedye C., Bernardini M. Q., Neel B. G., Ailles L. E. 2011. Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian tumor initiating cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 6468—6473.
- Thomas P., Forse R. A., Bajenova O. 2011. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin. Exp. Metastasis*. 28 : 923—932.
- Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J. V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J. J., Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G. J., Wohrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H. E., Andreeff M., Eaves C. 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat. Rev. Cancer*. 12 : 767—775.
- Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M. R., Kemper K., Perez Alea M., Richel D. J., Stassi G., Medema J. P. 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 13 427—13 432.
- Visvader J. E., Lindeman G. J. 2012. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 10 : 717—728.
- 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.
- Yang Z. F., Ho D. W., Ng M. N., Lau C. K., Yu W. C., Ngai P., Chu P. W., Lam C. T., Poon R. T., Fan S. T. 2008. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. 13 : 153—166.
- 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.
- Yin A. H., Miraglia S., Zanjanj E. D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A. G., Olweus J., Kearney J., Buck D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 90 : 5002—5012.

Поступила 28 XII 2014

#### SUPPRESSION OF TUMOR GROWTH AFTER XENOGRAFTING OF HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS

A. P. Davydov-Sinitsyn,<sup>1</sup>\* O. V. Bazhenova,<sup>2</sup> M. A. Liskovykh,<sup>1</sup> S. V. Ponomartsev,<sup>1</sup> I. V. Rykov,<sup>3</sup>  
S. A. Koshkin,<sup>2</sup> R. V. Orlova,<sup>2</sup> A. N. Tomilin,<sup>1</sup> E. N. Tolkunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, <sup>2</sup> St. Petersburg State University  
and <sup>3</sup> 122nd L. G. Sokolov Clinical Hospital, St. Petersburg; \* e-mail: ads707@ya.ru

Previously we've described the obtainment of a subpopulation of cancer stem cells from a human colorectal carcinoma cell line MIP101. These cells possess elevated clonogenic and tumorigenic capacities. According

to our data, depletion of stem compartment in a cancer cell population blocks its tumorigenicity. The current work is dedicated to the comparison of tumorigenic potential between cell populations with enriched or depleted stem compartment. We show that tumor growth following xenografting of enriched stem cell population can be suppressed by intramuscular injections of ganciclovir. Thus, we report a method to obtain a cell population with high Oct4 promoter expression within the MIP101 colorectal carcinoma cell line and to eliminate these cells from the population *in vitro* as well as *in vivo*.

Key words: cancer stem cells, tumorigenicity, Oct4.

---