

DOI: 10.7868/S0041377118100077

ДОЛЯ КЛЕТОК CD146⁺ В ПОПУЛЯЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СНИЖАЕТСЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭФР И TGF- α

© Р. С. Каменцева,^{1,*} В. В. Кошеверова,¹ М. В. Харченко,¹ М. В. Истомина,²
О. М. Семенов,³ А. Н. Шатрова,¹ А. П. Домнина,¹ Е. С. Корнилова^{1–3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: rkamentseva@yandex.ru

Известно, что в культурах мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека существуют субпопуляции клеток, различающиеся набором поверхностных маркеров. Показано, что численность разных субпопуляций может быть связана с длительностью культивирования, но мало известно о влиянии экзогенных факторов на разнообразие клеток в культурах МСК. В настоящей работе мы оценили влияние эпидермального (ЭФР) и трансформирующего (TGF- α) факторов роста, двух лигандов рецептора ЭФР, на пролиферацию МСК, выделенных из десквамированного эндометрия человека (эМСК), и поверхностную экспрессию CD146, рассматриваемого многими исследователями в качестве одного из предполагаемых маркеров стволовости. Обнаружено, что под действием этих лигандов пролиферация эМСК усиливалась, но при этом доля клеток CD146⁺ в популяции значительно снижалась. Эффект не зависит от увеличения плотности клеток в связи с усилением пролиферации. Полученные данные позволяют предположить, что субпопуляции эМСК CD146⁺ и CD146⁻ могут в разной степени отвечать на активацию рецептора ЭФР.

Ключевые слова: эндометриальные мезенхимные стромальные/стволовые клетки, эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста- α , CD146

Выделяемые из различных тканевых источников мезенхимные стромальные клетки (МСК), как правило, представляют собой довольно разнородную культуру клеток, в которой выделяют субпопуляции, экспрессирующие разные наборы поверхностных маркеров, причем паттерн их экспрессии меняется в течение культивирования МСК (Halfon et al., 2011). Какие из поверхностных маркеров позволяют наиболее точно идентифицировать «подлинные» МСК в этой разнородной популяции, до сих пор остается предметом споров. Одним из предполагаемых маркеров МСК многие исследователи считают CD146, также известный как MCAM (молекула клеточной адгезии меланомы), причем согласно недавним исследованиям этот маркер экспрессируется частью популяции МСК, обладающей большим пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке по сравнению с клетками CD146⁻, в том числе в культурах МСК эндометрия (эМСК) (Lv et al., 2014).

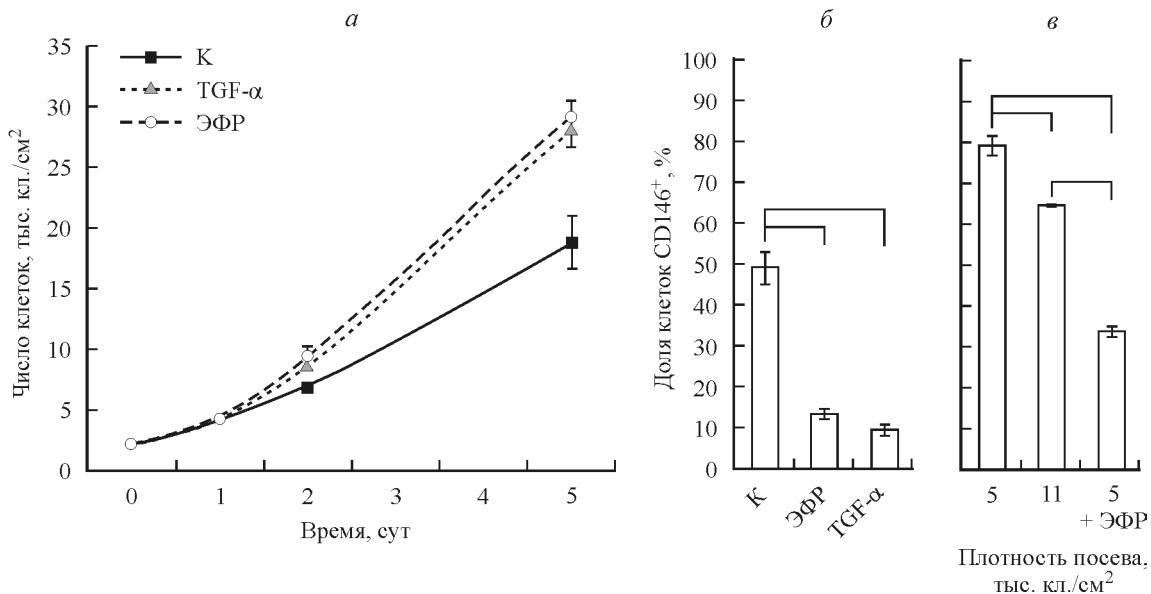
Поскольку для использования МСК необходимо уметь быстро наращивать значительное количество клеток ex vivo при сохранении исходного пролиферативного и дифференцировочного потенциала, одной из важнейших фундаментальных задач в этой области является исследование регуляции пролиферации МСК под действи-

ем различных ростовых факторов. Так, известно, что эпидермальный фактор роста (ЭФР) и связывающий гепарин ЭФР-подобный фактор роста (HB-EGF) — два наиболее изученных лиганда рецептора ЭФР (EGFR, c-ErbB1, HER1) — оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку МСК, выделенных из костного мозга (Krampera et al., 2005; Tamama et al., 2010). Однако влияние лигандов рецептора ЭФР на МСК, выделенные из эндометрия, практически не исследовано, хотя они также экспрессируют рецептор ЭФР и в эндометрии его лиганды имеют тканеспецифические функции, в том числе связанные с дегидратацией дифференцировкой (Gargett et al., 2008).

В настоящей работе мы исследовали влияние на пролиферацию эМСК ЭФР и трансформирующего ростового фактора (TGF)- α , который также является лигандом рецептора ЭФР. Кроме того, оценивали долю клеток в популяции, несущих маркер CD146.

Материал и методика

В работе были использованы клетки линии эМСК человека, выделенной из десквамиированного эндометрия менструальной крови и охарактеризованной в Институте



Влияние факторов роста ЭФР и TGF- α на пролиферацию эндометриальных мезенхимных стромальных клеток (а) и долю клеток CD146⁺ в популяции (б, в).

а — клетки культивировали в среде, содержащей только 10 % сыворотки (контроль, К) или еще указанный лиганд; б — доля клеток CD146⁺ через 5 сут в контрольной среде или среде с лигандом; в — доля клеток CD146⁺ через 5 сут в контрольной среде или среде с ЭФР при плотности посева 5 или 11 тыс. кл./см². Даны средние и их ошибки; горизонтальные скобки указывают достоверность различия ($P < 0.05$).

цитологии РАН (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % FBS (HyClone, США), 50 мкг/мл гентамицина (Микроген, Россия) и GlutaMAX (Gibco, Великобритания).

В экспериментах использовали клетки 8–13-го пасажей. Для оценки влияния исследуемых лигандов на эМСК клетки сеяли на 35-миллиметровые чашки с плотностью 5 тыс. кл./см² (если не указано иное) и на следующие сутки (сут 0) заменяли среду на свежую, содержащую дополнительно 10 нМ ЭФР из подчелюстных слюнных желез мыши (Molecular Probes, США) или 20 нМ рекомбинантного TGF- α человека (R&D Systems, США). В указанные дни после добавления лигандов клетки снимали с чашек, используя 0.05%-ный трипсин (HyClone, США). С помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) оценивали число клеток, а также поверхностную экспрессию CD146, используя моноклональные мышиные антитела против CD146, коньюгированные с FITC (клон P1H12, BD Pharmingen, США). В качестве негативного (изотипического) контроля использовали FITC-коньюгированные изотипические IgG1 (BD Pharmingen, США). CD146-положительными (CD146⁺) считали клетки, интенсивность флуоресценции которых выше, чем у изотипического контроля при близких значениях показателя прямого светорассеяния.

Анализ данных производили в программе Microsoft Excel. Для оценки статистических различий использовали *t*-критерий Стьюдента; различия считали достоверными при $P < 0.05$. На графиках данные представлены в виде средних со стандартными ошибками среднего.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что ЭФР и HB-EGF стимулируют пролиферацию МСК, выделенных из костного мозга (Krampera et al., 2005; Tamama et al., 2010). Эти лиганды

при связывании с рецептором ЭФР вызывают его internalизацию и затем последующую деградацию рецептора в лизосомах. В отличие от них комплекс TGF- α с рецептором вскоре после internalизации диссоциирует в ранних эндосомах, рецептор деактивируется и рециклируется обратно на плазматическую мембрану.

При анализе скорости пролиферации клеток под действием ЭФР и TGF- α мы тем не менее обнаружили, что при действии обоих лигандов число клеток увеличивалось с одинаковой динамикой, хотя и быстрее, чем в контроле (см. рисунок, а). Этот результат нельзя назвать ожидаемым, поскольку под действием TGF- α сигнальные каскады собираются в основном на плазматической мембране, в то время как при связывании с ЭФР активный рецептор в основном ассоциирован с эндосомами, в том числе поздними (Wiley, Burke, 2008). В то же время известно, что ЭФР-зависимый ERK-киназный каскад может собираться на поздних эндосомах с помощью скап-фолд-комплекса p14/MP1, необходимого для продолжительной активации ERK и усиливающего ядерный сигнал ERK в результате активации большего числа молекул ERK (Kolch, 2005).

Существует еще целый ряд данных, свидетельствующих о различных механизмах действия ЭФР и TGF- α . Так, показано, что иммобилизованный ЭФР, препятствующий internalизации рецептора, стимулирует дифференцировку МСК, выделенных из костного мозга, в осзогенном направлении (Tamama et al., 2010). Кроме того, локализованный в эндосомах рецептор ЭФР в отличие от рециклирующего не способен активировать фосфолипазу C (PLC)- γ , поэтому TGF- α в большей степени, чем ЭФР, стимулирует подвижность клеток (Wiley, Burke, 2008). Также известно, что в МСК, выделенных из костного мозга, TGF- α регулирует паракринную активность — малые концентрации лиганда подавляют секрецию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а высокие усиливают (Wang et al., 2008). В связи с этим наши дан-

ные представляют интерес, поскольку мы впервые показали способность TGF- α стимулировать пролиферацию эМСК в степени, сопоставимой с ЭФР, однако для понимания сути этого эффекта необходимо подробно сравнить особенности динамики эндоцитоза и сигналинга рецептора ЭФР в этих клетках при активации разными лигандами.

При анализе экспрессии поверхностных маркеров мы заметили, что под действием ЭФР и TGF- α в популяции эМСК снижается доля клеток CD146⁺ (см. рисунок, б), в то время как поверхностная экспрессия CD105 и CD140b не изменяется (данные не представлены). Также в исследуемой культуре эМСК наблюдается зависимость численности клеток CD146⁺ от пассажа: на 8-м и 13-м оно составляет 80 ± 2 и $49 \pm 4\%$ соответственно (см. рисунок, б, в), что согласуется с данными других авторов (Halfon et al., 2011).

Ранее было показано, что в плотных культурах МСК количество поверхностного CD146 ниже (Kaltz et al., 2010), поэтому, учитывая усиление пролиферации при действии лигандов рецептора ЭФР, мы предположили, что снижение численности клеток CD146⁺ может быть связано с увеличением плотности клеток. Чтобы проверить эту гипотезу, мы сравнили эМСК, обработанные ЭФР, с клетками, которые были исходно посеяны с разной плотностью (см. рисунок, в). При посеве 5 тыс. кл./см² через 5 сут число клеток, культивируемых в контрольной среде, составило 17.7 ± 0.4 , а в среде с ЭФР — 23.9 ± 0.08 тыс. кл./см². В то же время при посеве 11 тыс. кл./см² плотность клеток на 5-е сут была даже несколько выше — 28.5 ± 1.3 тыс. кл./см². При этом число эМСК CD146⁺ в исходно более плотной культуре в самом деле оказалось ниже, чем в менее плотной (см. рисунок, в). Однако численность эМСК CD146⁺ при обработке ЭФР была ниже, чем в контрольной среде, независимо от плотности посева. Таким образом, снижение доли эМСК CD146⁺ под действием ЭФР и TGF- α не обусловлено исключительно увеличением плотности клеток, которое является прямым следствием усиления пролиферации.

Полученные данные позволяют предположить, что субпопуляции эМСК CD146⁺ и CD146⁻ могут в разной степени отвечать на активацию рецептора ЭФР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-34-00188).

Список литературы

- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичевая Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамиированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919—929. (Zemel'ko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artsybasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Isolation, characterization and using as a feeder layer for human embryonic stem cells cultivation. Tsitologiya. 53 (12) : 919—929.)
- Gargett C. E., Chan R. W. S., Schwab K. E. 2008. Hormone and growth factor signalling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. Mol. Cell. Endocrinol. 288 : 22—29.
- Halfon S., Abramov N., Grinblat B., Ginis I. 2010. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. Stem Cells Develop. 20 : 53—66.
- Kaltz N., Ringe J., Holzwarth C., Charbord P., Niemeyer M., Jacobs V. R., Peschel C., Häupl T., Oostendorp R. A. 2010. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. Exp. Cell Res. 316 : 2609—2617.
- Kolch W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6 : 827—837.
- Krampera M., Pasini A., Rigo A., Scupoli M. T., Tecchio C., Malpeli G., Scarpa A., Dazzi F., Pizzolo G., Vinante F. 2005. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. Blood. 106 : 59—66.
- Lv F. J., Tuan R. S., Cheung K. M. C., Leung V. Y. L. 2014. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 32 : 1408—1419.
- Tamama K., Kawasaki H., Wells A. 2010. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. BioMed Res. Int. 2010. Doi: 10.1155/2010/795385
- Wang Y., Crisostomo P. R., Wang M., Markel T. A., Novotny N. M., Meldrum D. R. 2008. TGF- α increases human mesenchymal stem cell-secreted VEGF by MEK- and PI3-K-but not JNK- or ERK-dependent mechanisms. Amer. J. Physiol. Reg. Integ. Compar. Physiol. 295 : R1115—R1123.
- Wiley H. S., Burke P. M. 2001. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. Traffic. 2 : 12—18.

Поступила 15 V 2018

CD146⁺ CELLS CONTENT IN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS (enMSC) POPULATION DECREASED AFTER TREATING WITH EGF AND TGF- α

R. S. Kamentseva,^{1,*} V. V. Kosheverova,¹ M. V. Kharchenko,¹ M. V. Istomina,²
O. M. Semyonov,³ A. N. Shatrova,¹ A. P. Domnina,¹ E.S. Kornilova^{1—3}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and

³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;

* e-mail: rkamentseva@yandex.ru

The heterogeneity of mesenchymal stromal cells (MSC) in surface markers expression is thought to be related to prolonged maintaining in culture, but little is known about differential effects of exogenous factors on distinct cell subpopulations within MSC culture. In this study we have evaluated the effect of epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor (TGF)- α , which are the ligands of EGF receptor, on the human desquamated endometrium-derived MSC (enMSC) proliferation and surface expression of CD146 that is belie-

ved to be a stemness marker. We have found that under EGF or TGF- α treatment enMSC proliferation was increased, but the portion of CD146 $^{+}$ cells was significantly decreased. Also the decrease of CD146 $^{+}$ cells portion was shown to be unrelated with increased cell density due to strong proliferation in EGF-treated enMSC. The data obtained allow us to suggest that CD146 $^{+}$ and CD146 $^{-}$ enMSC subpopulations might respond to the EGF receptor activation to a different extent.

Key words: CD146, endometrial mesenchymal stromal, stem cells, epidermal growth factor, transforming growth factor- α