

УДК 591

ЧАСТИЧНАЯ РЕВЕРСИЯ ФЕНОТИПА НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ В ТРЕХМЕРНОЙ КУЛЬТУРЕ¹

© 2010 г. Т. Д. Рудинская, Н. И. Куприна, Н. Л. Лазаревич, Н. И. Полянская,
В. С. Полторанина, Д. А. Шавочкина, Н. В. Энгельгардт

НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина РАМН

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: nvengelhardt@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.08 г.

Окончательный вариант получен 25.06.09 г.

Нормальные ткани и органы *in vivo* обладают трехмерной структурой и функционируют в трехмерном окружении. В стандартной двумерной культуре условия жизни клеток резко отличаются от таковых *in vivo*, поэтому более адекватной системой для анализа нормального и опухолевого роста клеток являются трехмерные культуры с использованием различных вариантов внеклеточного матрикса. При культивировании низкодифференцированной гепатокарциномы в геле коллагена образовывались сфероиды, в которых наблюдали сдвиг фенотипа клеток в эпителиальную сторону. Это выразилось в изменении цитоскелета клеток, увеличенном образовании фибрилл внеклеточного матрикса между клетками и в образовании на внешней поверхности сфероидов оболочки из фибрилл фибронектина. Среди 25 проанализированных генов, отражающих уровень морфологической и функциональной дифференцировки гепатоцитов, наиболее значимым изменением было подавление транскрипции гена трансформирующего фактора роста TGFβ2.

Ключевые слова: гепатокарцинома, дифференцировка, трехмерная культура, гель коллагена типа I.

Опухоли, возникающие из эпителиальных клеток, — карциномы в ходе прогрессии постепенно утрачивают характерные черты строения исходной ткани (Абелев, Эрайзер, 2008; Thiery, 2002; Abelev, Lazarevich, 2006; Weinberg, 2006). В нормальном организме клетки эпителиальных тканей плотно связаны друг с другом и с подстилающей их базальной мембраной, образованной белками внеклеточного матрикса (ВКМ), или с белками ВКМ (в случае печени). Они образуют непрерывные пласты, выстилающие полости и свободные поверхности организма, а также создают основу ряда желез — молочной, простаты, печени и др. Характерной особенностью эпителиальных клеток является выраженная морфологическая и функциональная апикально-базальная полярность, которая создается благодаря специфическим межклеточным контактам и поддерживается взаимодействием с базальной мембраной и белками ВКМ (Alberts et al., 1994). Даже частичное сохранение этих связей в карциномах способно сдерживать их рост и выход из-под контроля организма (Abelev, Lazarevich, 2006).

В стандартной двумерной (2М) культуре специфическая структура эпителиальной ткани не воспроизводится, и происходит быстрая дедифференцировка клеток. Так, при посеве *in vitro* взрослые гепатоциты теряют объем и полигональность, уплотняются, становятся фибробластоподобными и подвижными. В них прекращается синтез ряда белков взрослой сыворотки, в первую очередь альбумина, и возобновляется синтез фетального белка — α-фетопротеина (АФП) (Глейberman, 1982; Ben-Ze'ev et al., 1988).

Исходя из того что *in vivo* ткани и органы обладают трехмерной (3М) структурой и функционируют в 3М-окружении, многие исследователи на протяжении последних трех десятилетий стремились разработать культуральные системы, максимально приближающиеся к условиям *in vivo* (Elsdale, Bard, 1972; Emerman, Pitelka, 1977; Bissell, 1981; Ingber, Folkman, 1989; Gleiberman et al., 1989a). Одним из главных результатов этих работ стало ясное понимание того, что в культурах 2М и 3М клетки по-разному реагируют на сигналы, поступающие из микроокружения, — на ростовые факторы, на взаимодействия с ВКМ и с соседними клетками (Roskelley et al., 1995; Bissell et al., 2002; Cunha et al., 2002; Ingber, 2002; Radisky et al., 2002; Schmeichel, Bissell, 2003; Debnath, Brugge, 2005). Самые интересные и важные данные

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 08-04-00400а, 07-04-01422а) и Программой Президента РФ по поддержке ведущих научных школ РФ (проект № НШ-5177.2008.4).

были получены при работе с серией культур молочной железы мыши и человека разного уровня дифференцировки (Weaver et al., 1997; Wang et al., 1998, 2002; Muthuswamy et al., 2001; Debnath et al., 2002; Weaver et al., 2002) и на культуре гепатоцитов мышей (Gleiberman et al., 1989a, b).

Чтобы получить 3М-культуры, исследуемые клетки растят внутри или между двумя слоями геля, который по составу и происхождению соответствует их физиологии, а также применяют специально разработанные полимеры. Для гепатоцитов с успехом был использован матригель – гель препарата, который выделен из саркомы мышей Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) и содержит в основном ламинин, а также коллаген типа IV, гепаран сульфат, энтактин и ростовые факторы (Bissell et al., 1987; Ben-Ze'ev et al., 1988), и гель коллагена типа I (Gleiberman et al., 1989 a,b; Bader et al., 1996). Глейберман с соавторами (Gleiberman et al., 1989 a,b) четко показали, что культивирование в геле коллагена сохраняет нормальную дифференцировку взрослых гепатоцитов мыши. В них прекращается синтез АФП и восстанавливается полигональная форма, они объединяются в балкоподобные структуры, внутри которых формируются желчные капилляры. Между гепатоцитами устанавливаются межклеточные контакты и появляется полярность клеточной мембраны.

Цель нашей работы – подбор культуральной системы, обеспечивающей поддержку и индукцию дифференцировки гепатокарцином (ГК). В работе использован клон E12, выделенный из культуры низкодифференцированной ГК мыши НЗЗ. Клетки исходной опухоли и ее культуры отличались отсутствием контактов с ВКМ, утратой характерной для эпителия организации цитоскелета и полярности клеточной мембраны, отсутствием экспрессии альбумина и гепатоспецифических транскрипционных факторов HNF4 α , HNF1 α , C/EBP α и HNF6. Из эпителиальных и гепатоцитарных признаков в ней сохранилась слабая экспрессия трансферрина, белка адгезионных контактов E-кадгерина и цитокератина 18. Наряду с цитокератином в клетках НЗЗ экспрессировался виментин – белок промежуточных филаментов мезенхимных клеток (Энгельгардт и др., 2000; Кудрявцева и др., 2001; Lazarevich et al., 2004). При культивировании клона в геле коллагена клетки E12 образовывали сфероиды. По сравнению с 2М-культурой в сфероидах наблюдалось изменение цитоскелета клеток в сторону эпителиального фенотипа, а также увеличенное отложение фибрилл ВКМ между клетками и образование на внешней поверхности сфероидов неполного аналога базальной мембраны – оболочки из фибрилл фибронектина. При анализе экспрессии 25 генов, которые отражают степень морфологической и функциональной дифференцировки гепатоцитов, наиболее значимым изменением оказалось подавление в сфероидах транскрипции гена трансформирующего фактора роста TGF β 2, который, по нашим данным, является ауто-

кринным стимулятором роста ГК НЗЗ (Овчинников, 2004).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работу проводили на клоне E12, полученном из культуры быстрорастущей полиморфной ГК мышей НЗЗ (Кудрявцева и др., 2001) при ее клонировании методом лимитирующего разведения двукратно и в полужидкой агарозе – однократно. По сравнению с другими клонами E12 обладал большей скоростью роста и неспособностью расти в суспензии. Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с 10%-ной фетальной сывороткой (“HyClone”, США). При пересеве культуры использовали смесь 0.25%-ного трипсина с 0.2%-ным версеном (1 : 1).

Для получения 2М-культуры клетки E12 высевали в чашки объемом 35 мм (“Costar”, США) по 1×10^5 клеток на чашку, через 3–5 сут монослой фиксировали в метаноле (20 мин при температуре -20°C).

Для получения 3М-культуры клетки E12 высевали в гель коллагена. Коллаген типа I получали из хвостов крыс по методу Данна и др. (Dunn et al., 1989). Хвосты (4 образца) оставляли на 1 сут в этиловом спирте, затем препаративанные сухожилия экстрагировали 3 сут в 200 мл 0.125 М уксусной кислоты. Экстракт фильтровали через двойной слой марли, центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин и хранили при 4°C в течение 1 мес.

Суспензию клеток в коллагене готовили, добавляя один объем суспензии клеток E12 в концентрации $5-8 \times 10^5$ в мл сывороточной среды к девяти объемам нейтрального охлажденного коллагена. Для нейтрализации 1 мл экстракта коллагена требовалось 130 мкл смеси $10 \times \text{MEM}$ и 0.66 N NaOH в соотношении 2 : 1. При посеве на чашки (35 или 65 мм) коллагеновые капли с клетками объемом 60 мкл наслаивали на капли-подложки из коллагена объемом 10 мкл, которые предварительно наносили на чашки и полимеризовали 30 мин при 37°C . Капли с клетками инкубировали еще 60 мин при 37°C для застывания коллагена, а затем в чашки добавляли ростовую среду.

После 5–8 сут культивирования капли переносили в заливочную среду OCT compound (“Sakura Finetek”, США) или в 7%-ный раствор желатины на забуференном физиологическом растворе (ЗФР), замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Для иммуноморфологического анализа получали криостатные срезы капель с клетками E12 и срезы печени мышей и крыс толщиной 12 и 6 мкм соответственно. Срезы фиксировали ацетоном (10 мин) или метанолом (20 мин) при -20°C и до проведения реакции хранили при этой же температуре. Локализацию антигенов определяли непрямой метод иммунофлуоресценции. Инкубацию срезов и клеток 2М-культуры с антителами проводили в течение 30–60 мин при комнатной температуре, первые и вто-

рые антитела отмывали в трех сменах ЗФР в течение 15 мин. Препараты заключали в эльванол, просматривали в микроскопе AxioPlan-2 ("Zeiss", Германия) и фотографировали с помощью системы AxioCam-4.

Были использованы кроличьи антитела к фибронектину мыши (разведение 1 : 80–1 : 160), ламинину мыши (1 : 80–1 : 160), коллагену типа IV человека (1 : 40–1 : 80) ("Chemicon", США), $\alpha 5$ - $\beta 1$ -интегрину (1 : 40), виментину мыши (1 : 40), рецептору асиалогликопротеидов (1 : 100); моноклональные антитела мыши к цитокератину 18 человека (асцит клона ОС-04, 1 : 100–1 : 200) ("Bioprobes", Голландия) и моноклональные антитела крысы к белку плотных контактов ZO-1 (1 : 60) ("Biogenesis", Англия). Вторыми антителами служили антикроличьи, антикрысиные и антимышинные антитела, меченные красителем Alexa-488 (1 : 100) ("Invitrogen", США). Актин локализовали с помощью фаллоидин-родамина (1 : 100) ("Invitrogen", США).

Для анализа экспрессии генов использовали $2\text{--}4 \times 10^6$ клеток в 2М-культуре. Для анализа клеток 3М-культуры в двух-трех чашках (35 мм) готовили коллагеновую подложку, внося в каждую чашку по 0.5 мл коллагена. После его застывания чашки засевали суспензией клеток в коллагене, внося по 1 мл суспензии, содержащей $5\text{--}8 \times 10^4$ клеток. Через 5–7 сут культивирования клетки в чашках отмывали ЗФР и инкубировали с раствором коллагеназы на среде Лейбовича (2.0 мл, 500 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C. Сразу после инкубации содержимое чашек объединяли и добавляли двойной объем ростовой среды. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 1000 об/мин). Осадок клеток культур 2М и 3М многократно отмывали ЗФР и замораживали в жидком азоте. Количество живых клеток составляло 85–90% (тест с трипановым синим).

Суммарную клеточную РНК из отмывого осадка клеток выделяли при помощи набора для выделения РНК (Wizard SV Total RNA Isolation System, "Promega", США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения экспрессии генов использовали обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) препаратов РНК с использованием обратной транскриптазы MMLV и смеси случайных гексамерных олигонуклеотидов, как описано ранее (Флейшман и др., 2008; Lazarevich et al., 2004). Контролем специфичности реакции служили препараты тотальной РНК, не содержащие MMLV. После инактивации обратной транскриптазы алиquotы полученной кДНК использовали для проведения ОТ-ПЦР со специфическими праймерами. Нормализацию кДНК-библиотек, используемых в ПЦР, проводили по реакции с праймерами к последовательности гена домашнего хозяйства *GAPDH* (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа). Затем проводили реакции со специфическими праймерами, подобрав предварительно для каждой пары праймеров оптимальное число циклов ПЦР, при котором увеличение продукта реакции находит-

ся в экспоненциальной стадии для всех исследуемых образцов (Флейшман и др., 2008; Lazarevich et al., 2004). Для проведения ОТ-ПЦР использовали амплификатор T3 Thermocycler ("Biometa", Германия). Проводили первичную полную денатурацию (94°C, 3 мин), каждый из ПЦР-циклов включал этапы денатурации (94°C, 50 с), отжига праймеров (1 мин) и элонгации (72°C, 1 мин); по окончании реакции осуществляли завершающее удлинение цепи (72°C, 10 мин). Последовательности и условия амплификации отдельных генов приведены в таблице.

Все эксперименты повторяли не менее трех раз, используя независимо полученные образцы РНК. Контролем в этих экспериментах служила РНК из нормальной печени взрослой мыши.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходная культура Н33 содержала три морфологических типа клеток: 1) растущие на пластике распластаные одиночные клетки веретеновидной формы; 2) клетки шаровидной формы, организованные в рыхлые многоклеточные агрегаты, легко отрывающиеся от субстрата и переходящие к росту в суспензии; 3) гигантские многоядерные полиплоидные клетки. Все три типа клеток воспроизводились при пересеве культуры, а два первых при определенных условиях переходили один в другой.

Использованный в нашей работе клон Е12 отличался от других клонов культуры Н33 наибольшей скоростью роста, а также наименьшей способностью расти в суспензии и образовывать на пластике подобие монослоя.

В геле коллагена единичные клетки Е12 активно пролиферировали и на 2–3-и сут образовывали многоклеточные сфероиды. В центре части сфероидов к 5–8-м сут культивирования возникали полости, по-видимому, в результате апоптоза, затем превращающиеся в цисты.

Чтобы оценить степень восстановления эпителиального фенотипа и уровень дифференцировки клеток Е12 в 3М-культуре по сравнению с 2М, растущей на пластике, мы определяли в этих культурах локализацию и организацию белков ВКМ, компонентов цитоскелета и маркеров полярности клеточной мембраны – белка плотных контактов ZO-1 и рецептора асиалогликопротеидов. Картина локализации тех же маркеров с помощью использованных в работе антител на срезах нормальной печени мыши и крысы представлена на рис. 1–3.

Локализация белков ВКМ. В нормальной паренхиме печени нет сформированной базальной мембраны, но в пространстве Диссе, отделяющем базальные домены гепатоцитов от кровеносных синусов, присутствуют основные белки ВКМ. На срезах печени они обнаруживаются по специфической флуоресценции, очерчивающей сеть синусов (рис. 1, а, ж, к; вклейка). Значительно слабее других представлен в пространстве Диссе ламинин (рис. 1, к).

Последовательности праймеров и условия амплификации проанализированных генов

Ген	Температура отжига, °С	Последовательность праймера (5'-3')		Размер ПЦР-продукта, п. н.	Количество циклов
		прямого	обратного		
Альбумин	65	cccactagcctctggcaaaat	cttaaaccgatggcgatctca	129	25
α -Фетопротеин	65	tcgtattccaccaggagg	aggctttgtctcaccag	180	28
<i>C/EBPα</i>	65	gccaagaagtcggtggaca	gttcgcggtcagctgtt	184	25
Виментин	65	tcctaccgcaggatgttcgg	gcacctgtcagtagttgg	337	21
Е-кадхерин	65	tcccagtccttcacgcaaga	gagcgcagatggcatgtct	245	25
<i>GAPDH</i>	63	actggcgtcttcaccaccat	tgatggcatggactgtgtc	250	19
<i>HNF1α</i>	60	tctaagctgagccagctgcagacg	gctgaggttctccggctcttcag	273	24
<i>HNF3β</i>	65	actggagcagctactacg	cccacataggatgacatg	169	26
<i>HNF4α</i>	65	acacgtcccacatctgaag	cttccttctcatgccag	271	25
<i>HNF6</i>	65	aactcccagcaaggactcccact	ccatctgccctgaattactccattgc	295	25
α 3-Интегрин	65	cttgcaaccctctcaac	ccatctaccatgactctg	302	24
Коннексин 32	65	ctgctctacccggctatgc	caggctgagcatcggtcgtctt	386	25
<i>Snail</i>	65	gtctgcagcactgtggaaa	gacttctggtgcttggagct	230	24
<i>TGFβ1</i>	63	atccgtggccagatcctgt	attagcacgcgggtgacct	194	23
<i>TGFβ2</i>	63	ggcttcaccacaagacagg	ggagggaacaacattagca	236	20
Фибронектин 1	63	cagaaatgaccattgaaggt	gtgattgtgcaggactcat	565/720	20

В одиночных клетках E12, растущих на пластике, ламинин, коллаген типа IV и фибронектин обнаруживались в виде яркой флуоресценции внутри клеток. В зонах большей клеточной плотности цитоплазматическая флуоресценция этих белков уменьшалась, а между клетками и на их поверхности появлялись фибриллы коллагена типа IV и фибронектина, а также отложения ламинина (рис. 1, б, з, л).

Трансмембранный рецептор фибронектина α 5- β 1-интегрин (Ruoslahti, 1999) на одиночных клетках обнаруживался в виде кластеров на мембране и внутри клеток, а в островках локализовался в зонах клеточных контактов (рис. 1, д).

В 3М-культуре E12, судя по интенсивности флуоресценции, цитоплазматическая концентрация коллагена типа IV и фибронектина снижалась, а между клетками откладывались фибриллы коллагена типа IV и фибронектина. При этом на внешней поверхности слоя клеток сфероидов, граничащих с гелем коллагена, присутствовали только фибриллы фибронектина, иногда образующие сплошную мембрану (рис. 1, е). Специфичность локализации фибрилл фибронектина подтверждало распределение его рецептора α 5- β 1-интегрина, который присутствовал и на границе с оболочкой в виде штрихов и внутри сфероидов, преимущественно по внутренним контурам клеток (рис. 1, е). По-видимому, внешняя оболочка сфероидов является неполноценным аналогом базальной мембраны.

Ламинин на срезах сфер сохранялся в цитоплазме в виде ярких отложений по границам клеток, но не образовывал фибрилл (рис. 1, м).

Цитоскелет. Сдвиг клеток E12 в 3М-культуре в сторону эпителиального фенотипа четко выразился в изменении локализации белков цитоскелета. В 2М-культуре E12 актин и цитокератин 18 обнаруживались преимущественно внутри клеток, а актин также очерчивал контуры клеток (рис. 2, б, д; вклейка), тогда как в гепатоцитах и в клетках сфероидов они очерчивали периметр клеток (рис. 2, а, в, г, е).

Так же в сфероидах изменилась и локализация виментина — белка промежуточных филаментов мезенхимных клеток. Виментин отсутствовал в гепатоцитах, на срезах печени он обнаруживался в эндотелиальных клетках, выстилающих синусы и кровеносные сосуды (рис. 2, ж). Появление виментина в клетках ГК Н33 отражает эпителиально-мезенхимный переход — процесс, сопровождающий дедифференцировку и прогрессию карцином (Лазаревич, 2003). В клетках E12 в 2М-культуре виментин образовывал четкую сеть фибрилл в цитоплазме (рис. 2, ж), тогда как на срезах сфероидов он обнаруживался по периметру клеток (рис. 2, и). Хотя, по данным ОТ-ПЦР, экспрессия виментина в сфероидах по сравнению с 2М-культурой существенно не уменьшилась (рис. 3, б), следует отметить значительную гетерогенность сфероидов по интенсивности флуоресценции виментина (рис. 2, и).

Полярность клеточной мембраны. Белок плотных контактов ZO-1 маркирует в гепатоцитах границу апикального и латерального доменов клеточной

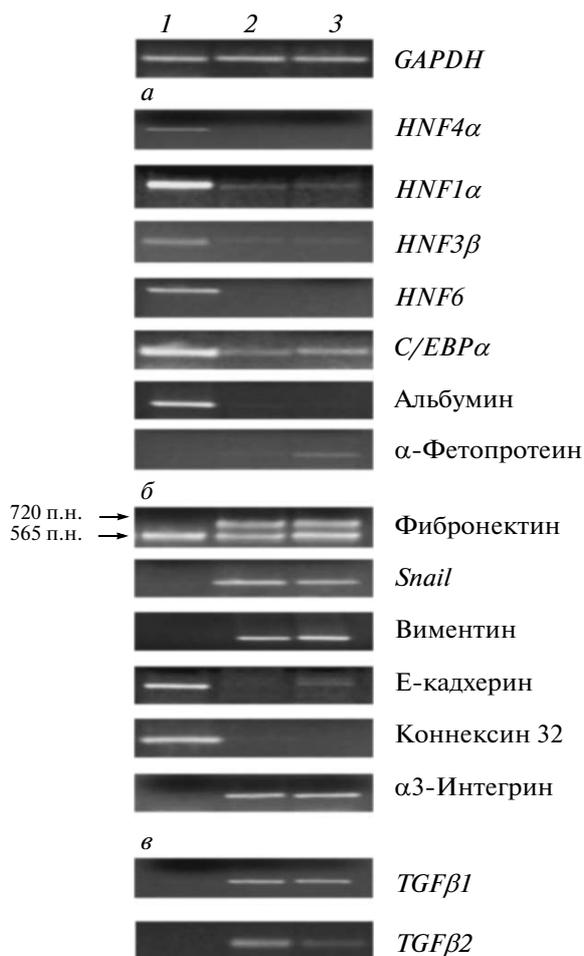


Рис. 3. Определение в 2М- и 3М-культурах E12 с помощью метода ОТ-ПЦР экспрессии генов: *а* – кодирующих гепатоспецифические транскрипционные факторы; *б* – продукты которых участвуют во взаимодействии клеток с ВКМ или являются компонентами межклеточных контактов; (→) – изоформы мРНК фибронектина, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, – нормальная форма EDA-, 565 п.н. и форма EDA+, 720 п.н.; *в* – кодирующих трансформирующие факторы роста β.

1 – нормальная печень мыши, 2, 3 – 2М- и 3М-культуры E12 соответственно.

мембраны, повторяя на срезах печени ход желчных капилляров (рис. 2, *к*). В большей части одиночных клеток E12 в 2М-культуре он не обнаруживался, однако на мембранах отдельных клеток присутствовали его кластеры. В плотных островках и просто между контактирующими клетками иногда наблюдалась четкая и яркая окраска контактирующих поверхностей клеток (рис. 2, *л*). В 3М-культуре ZO-1 выявлялся по всей клеточной мембране, без выделения отдельных доменов (рис. 2, *м*). Следовательно, клетки E12 и в 2М-, и в 3М-культурах способны синтезировать ZO-1, однако в 3М-культуре плотные контакты не формируются и полярность клеточной мембраны не устанавливается.

Отсутствие полярности клеточной мембраны в клетках E12 подтвердилось с помощью локализации в них рецептора асиалогликопротеидов. В организме он обеспечивает захват гепатоцитами из тока крови асиалированных белков (Rosenfeld et al., 1986), и его можно рассматривать как специфический маркер этих клеток. Он выявляется на базальном домене плазматической мембраны гепатоцитов, обращенном в пространство Диссе, и в виде мелких везикул в цитоплазме, прилежащей к этому домену. Последнее отражает рецепторный эндоцитоз захваченных отработанных белков (рис. 2, *н*). Клетки E12, несмотря на выраженную дедифференцировку, сохраняют экспрессию этого характерного маркера гепатоцитов, однако в 2М-культуре он присутствует внутри клеток, часто с повышенной окраской вокруг ядер (рис. 2, *о*), а в 3М-культуре – преимущественно вокруг ядер, а иногда по всей мембране (рис. 2, *п*).

Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках монослойной культуры E12 и в сфероиде. Утрата эпителиальной морфологии и дедифференцировка клеток при прогрессии ГК сопровождаются изменением транскрипции целого ряда генов, кодирующих гепатоспецифические транскрипционные факторы, дифференцировочные маркеры, адгезионные молекулы и компоненты ВКМ (Лазаревич, 2003; Lazarevich et al., 2004). Для того чтобы выяснить, как культивирование в трехмерном матриксе влияет на транскрипцию наиболее значимых из этих генов, мы исследовали экспрессию 25 генов в клетках E12, культивировавшихся в культурах 2М и 3М с помощью метода полуколичественной ОТ-ПЦР (рис. 3).

При культивировании в коллагеновом геле не произошло изменений в транскрипции гепатоспецифических транскрипционных факторов HNF4α, HNF1α, C/EBPα и HNF6, репрессия которых, как мы установили ранее, сопровождает прогрессию ГК мыши и, по крайней мере частично, определяет дедифференцировку гепатоцитов (Lazarevich et al., 2004). Культивирование в трехмерном матриксе не вызвало изменений экспрессии маркера дифференцированных гепатоцитов альбумина, однако экспрессия гена онкоэмбрионального белка АФП несколько повысилась (рис. 3, *а*). Необходимо отметить, что в высокодифференцированных ГК мыши обычно наблюдается активация этого гена, который не экспрессируется во взрослой печени, в то время как дальнейшая прогрессия таких опухолей в сторону более злокачественного фенотипа обычно сопровождается подавлением транскрипции АФП (Lazarevich et al., 2004). Таким образом, некоторое повышение уровня АФП в сфероиде можно рассматривать как дополнительное указание на то, что клетки в 3М-культуре приобретают более дифференцированный фенотип.

Ранее мы показали, что снижение уровня дифференцировки клеток и утрата их эпителиальной мор-

фологии при прогрессии ГК мышцы сопровождаются: снижением экспрессии генов E-кадгерина и коннексина 32; гиперэкспрессией субъединицы $\alpha 3$ -интегрина, характерной для незрелых и трансформированных гепатоцитов, маркера эпителиально-мезенхимного перехода виментина, транскрипционного репрессора E-кадгерина Snail, а также транскрипцией дополнительной изоформы РНК фибронектина, содержащей домен EDA (Лазаревич, 2003). По данным ОТ-ПЦР, культивирование в трехмерном коллагеновом геле ведет к некоторой активации транскрипции E-кадгерина, несмотря на продолжающуюся экспрессию его репрессора Snail. Изменений профиля экспрессии других генов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимным переходом, мы не зафиксировали (рис. 3, б). Важно отметить, что в клетках сфероидов не наблюдали снижения ни общего количества мРНК фибронектина, ни его изоформы EDA, которая характерна для дедифференцированных и интенсивно пролиферирующих клеток и не выявляется в нормальной печени (Manabe et al., 1999).

Наиболее значимым изменением среди проанализированных генов оказалось подавление в сфероиде транскрипции гена *TGF β 2*, но не *TGF β 1* (рис. 3, в). Механизмы такого подавления еще предстоит определить.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе мы продемонстрировали принципиальную возможность реверсии фенотипа культуры низкодифференцированной ГК мышцы при росте ее в геле коллагена.

В культуре 3М E12 по сравнению с 2М наблюдалось незначительное, но несомненное повышение уровня дифференцировки. Оно выразилось в сдвиге фенотипа клеток E12 в эпителиальную сторону. Наиболее четкие изменения произошли в организации цитоскелета — образование в клетках сфероидов подмембранного кольца актина и цитокератина 18. Хотя экспрессия виментина, показателя произошедшего в клетках ГК эпителиально-мезенхимного перехода, в 3М-культуре сохранилась, внутриклеточная локализация этого белка тоже стала подмембранной. Изменение цитоскелета, по-видимому, связано с усилением межклеточных взаимодействий в сфероиде по сравнению с 2М-культурой. Ранее была описана зависимость внутриклеточной локализации цитокератина 18 и мембранного антигена C5 от клеточной плотности в 2М-культуре гепатобластомы человека Нер G2 (Куприна и др., 1993). Кроме того, в сфероиде отмечалось образование и отложение между клетками фибрилл ВКМ — коллагена типа IV и фибронектина. При этом часть фибрилл фибронектина выходила на поверхность сфероидов, формируя неполноценный аналог базальной мембраны. Однако восстановить полярность

клеточной мембраны клеток E12 в использованной системе не удалось.

Культивирование в 3М-коллагене не привело к индукции в клетках E12 гепатоспецифических транскрипционных факторов. Очевидно, процесс дедифференцировки в этих клетках нарушил ключевые механизмы, восстановить которые изменением условий культивирования не удалось.

Культивирование в 3М-коллагене вызвало значительное падение уровня транскрипции гена *TGF β 2*, но не *TGF β 1* (рис. 3, в). В нормальных клетках и на ранних этапах канцерогенеза факторы этого семейства подавляют пролиферацию клеток, индуцируют дифференцировку и вызывают апоптоз. Однако при прогрессии карцином факторы TGF β гиперэкспрессируются во многих опухолях и способствуют развитию их злокачественного фенотипа за счет аутокринной стимуляции пролиферации и индукции эпителиально-мезенхимного перехода. На различных модельных системах показана способность TGF β 1 индуцировать изменение формы клеток, подавлять транскрипцию генов, характерных для эпителиоцитов, индуцировать экспрессию мезенхимных клеточных маркеров, усиливать клеточную подвижность и секрецию внеклеточных протеаз (Piek, Roberts, 2001). В то же время роль TGF β 2 в прогрессии ГК практически не исследована. В исходной опухоли уровень транскрипции гена *TGF β 2* оказался повышенным, а клетки культуры H33 активно секретировали этот фактор в культуральную среду. По нашим данным, он вызывал стимуляцию роста ряда клеточных культур. По-видимому, TGF β 2 является аутокринным стимулятором роста гепатоканциномы H33 (Овчинников, 2004), и подавление экспрессии *TGF β 2* в 3М-культуре E12 в коллагеновом геле также отражает ее частичную нормализацию.

В предварительных опытах мы показали, что при росте клеток E12 в неадгезивных культуральных флаконах в форме многоклеточных свободно плавающих агрегатов подавления экспрессии *TGF β 2* не происходит. Очевидно, для этого подавления трехмерного роста клеток и повышения их плотности недостаточно, необходимо влияние окружающего геля, имитирующего ВКМ. Анализ распределения использованных в нашей работе маркеров в суспензионной культуре E12 и в 3М-культуре E12 в геле агарозы — биологически инертном носителе, а также в матригеле позволит оценить вклад клеточной плотности и окружающего геля в повышение дифференцировки опухолевых клеток и поможет подобрать оптимальную культуральную систему для поддержки и индукции дифференцировки карцином.

Авторы приносят искреннюю благодарность Г.И. Абелеву за стимулирующий интерес и ценные обсуждения и О.А. Сальниковой за неоценимую помощь в подготовке и оформлении этой работы. Благодарим

В.М. Белкина за антитела к $\alpha 5\text{-}\beta 1$ -интегрину, А.А. Минина — за антитела к виментину мыши, Д.М. Беленького — за антитела к рецептору асиалогликопротеидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л.* На пути к пониманию природы рака // Биохимия. 2008. Т. 73. № 5. С. 605–618.
- Глейберман А.С.* Синтез альфа-фетопротеина в первичных культурах гепатоцитов взрослых мышей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1982. № 1. С. 55–58.
- Кудрявцева Е.И., Морозова О.В., Рудинская Т.Д. и др.* Нарушение межклеточных контактов и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом в быстрорастущей гепатокарциноме мышей // Арх. патологии. 2001. Т. 63. № 4. С. 33–37.
- Куприна Н.И., Савушкина Н.К., Андреев А.В. и др.* Модуляция фенотипа клеточной линии гепатобластомы человека Нер G2 под действием диметилсульфоксида // Онтогенез. 1993. Т. 24. № 4. С. 57–67.
- Лазаревич Н.Л.* Эпителиально-мезенхимальный переход при прогрессии гепатокарцином // Вестн. РОНЦ РАМН. 2003. Т. 14. № 3. С. 76–82.
- Овчинников Д.А.* Факторы, влияющие на пролиферацию и апоптоз в мышечных гепатокарциномах различного уровня дифференцировки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2004. 24 с.
- Флейшман Д.И., Морозова О.В., Лазаревич Н.Л.* Экспрессия тканеспецифических генов в гепатокарциномах мыши различного уровня дифференцировки // Вестн. РОНЦ РАМН. 2008. Т. 19. № 2. С. 22–27.
- Энгельгардт Н.В., Кудрявцева Е.И., Морозова О.В. и др.* Скачкообразная прогрессия перевиваемой гепатокарциномы мышей, сопряженная с утратой полярности клеток // Арх. патологии. 2000. Т. 62. № 3. С. 24–29.
- Abelev G.I., Lazarevich N.L.* Control of differentiation in the progression of epithelial tumors // Adv. Cancer Res. 2006. V. 95. P. 61–113.
- Alberts B., Bray D., Lewis J. et al.* Molecular biology of the cell. N.Y.: Garland Publ. Inc., 1994. 1294 p.
- Bader A., Knop E., Kern A. et al.* 3-D co-culture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes—design of an organotypical model // Exp. Cell Res. 1996. V. 226. P. 223–233.
- Ben-Ze'ev A., Robinson G. S., Bucher N. L. et al.* Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 2161–2165.
- Bissell M.J.* The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a “normal” cell in culture // Int. Rev. Cytol. 1981. V. 70. P. 27–100.
- Bissell D.M., Arenson D.M., Maher J.J. et al.* Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver // J. Clin. Invest. 1987. V. 79. P. 801–812.
- Bissell M.J., Radisky D.C., Rizki A. et al.* The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast // Differentiation. 2002. V. 70. P. 537–546.
- Cunha G.R., Hayward S.W., Wang Y.Z.* Role of stroma in carcinogenesis of the prostate // Ibid. 2002. V. 70. P. 473–485.
- Debnath J., Brugge J.* Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional culture // Nat. Rev. Cancer. 2005. V. 5. P. 675–686.
- Debnath J., Mills K., Collins N. et al.* The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini // Cell. 2002. V. 111. P. 29–40.
- Dunn J.C.S., Yarmush M.L., Koebe H.G. et al.* Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration // FASEB J. 1989. V. 3. P. 174–177.
- Elsdale T., Bard J.* Collagen substrata for studies on cell behavior // J. Cell Biol. 1972. V. 54. P. 626–637.
- Emerman J.T., Pitelka D.R.* Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes // In Vitro. 1977. V. 13. P. 316–328.
- Gleiberman A.S., Kudryavtseva E.I., Sharovskaya Yu.Yu. et al.* The synthesis of alpha-fetoprotein in hepatocytes is coordinately regulated with cell-cell and cell-matrix interactions // Mol. Biol. Med. 1989a. V. 6. P. 95–107.
- Gleiberman A.S., Sharovskaya Yu.Yu., Chailakhjan L.M.* “Contact inhibition” of α -fetoprotein synthesis and junctional communication in adult mouse hepatocyte culture // Exp. Cell Res. 1989b. V. 184. P. 228–234.
- Ingber D.E.* Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation // Differentiation. 2002. V. 70. P. 547–560.
- Ingber D.E., Folkman J.* How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? // Cell. 1989. V. 58. P. 803–805.
- Lazarevich N., Cheremnova O., Varga E. et al.* Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors // Hepatology. 2004. V. 39. P. 1038–1047.
- Manabe R., Ohe N., Sekiguchi K.* Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 5919–5924.
- Muthuswamy S.K., Li D., Lelievre S. et al.* ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. 785–792.
- Piek E., Roberts A.B.* Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor- β and its signaling pathways in tumorigenesis // Adv. Cancer Res. 2001. V. 83. P. 1–53.
- Radisky D., Muschler J., Bissell M.J.* Order and disorder: the role of extracellular matrix in epithelial cancer // Cancer Invest. 2002. V. 20. P. 139–153.
- Rosenfeld E.L., Belenky D.M., Bystrova N.K.* Interaction of hepatic asialoglycoprotein receptor with asialoorosomucoid and galactolyzed lysosomal alpha-glucosidase // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 883. № 2. P. 306–312.

- Roskelley C.D., Srebrow A., Bissell M.J.* A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. P. 736–747.
- Ruoslahti E.* Fibronectin and its integrin receptors in cancer // *Adv. Cancer Res.* 1999. V. 88. P. 1–20.
- Schmeichel K.L., Bissell M.J.* Modelling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 2377–2388.
- Thiery J.P.* Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2. P. 442–454.
- Wang F., Weaver V.M., Petersen O.W. et al.* Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 14821–14826.
- Wang F., Hansen R.K., Radisky D. et al.* Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts // *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. V. 94. P. 1494–1503.
- Weaver V.M., Petersen O.W., Wang F. et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies // *J. Cell Biol.* 1997. V. 137. P. 231–245.
- Weaver V., Lelievre S., Lakins J. et al.* Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium // *Cancer Cell.* 2002. V. 2. P. 205–216.
- Weinberg R.* The biology of cancer. N. Y.: Garland Sci., 2006. 796 p.

Partial Reversion of the Phenotype of a Poorly Differentiated Hepatocellular Carcinoma in a Three-Dimensional Culture

T. D. Rudinskaya, N. I. Kuprina, N. L. Lazarevich, N. I. Polyanskaya, V. S. Poltoranina,
D. A. Shavochkina, and N. V. Engelhardt

*Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences,
Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia
e-mail: nvengelhardt@mail.ru*

Abstract—*In vivo*, normal tissues and organs have a three-dimensional structure and function in a three-dimensional environment. The standard two-dimensional cell culture conditions drastically differ from those *in vivo*. For this reason, three-dimensional cultures based on different variants of the extracellular matrix are more adequate for analyzing normal and tumor cell growth. Culturing a poorly differentiated hepatocellular carcinoma in a collagen gel yielded spheroids whose growth pattern shifted towards the epithelial phenotype. The shift was expressed in changes in the cytoskeleton, enhanced formation of extracellular matrix fibrils between cells, and formation of fibronectin fibrils on the outer surface of spheroids. Analysis of 25 genes reflecting the level of morphological and functional hepatocyte differentiation showed that the expression of the gene encoding the transforming growth factor TGF β 2 was suppressed the most significantly.

Key words: hepatocellular carcinoma, differentiation, three-dimensional culture, type I collagen gel.