

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006.81:576.3.017.22:616-097.3

М.В. Оборотова, О.С. Бурова, М.А. Барышникова, Т.Н. Заботина, К.А. Барышников,
И.Н. Михайлова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, З.Г. Кадагидзе, А.Ю. Барышников

**ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Контактная информация

Оборотова Марина Вячеславовна, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: vendettaflower@mail.ru

Статья поступила 02.02.2015, принята к печати 09.02.2015.

Резюме

Целью данной работы стало изучение экспрессии антигенов, ассоциированных со стволовыми опухолевыми клетками, на перевиваемых клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека, полученных в ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». В реакции прямой иммунофлуоресценции с помощью МКА была изучена экспрессия антигенов CD133, CD117, CD90, CD34, CD44 и CD24, ассоциированных с СОК. В качестве отрицательного контроля использовали изоспецифические антитела, с которыми показатели флуоресценции не превышали 0,5 % антиген-положительных клеток. Экспрессия антигенов, ассоциированных с СОК, была гетерогенна. Если принять за дискриминационный уровень 10 % антиген-положительных клеток, то экспрессия CD133 и CD117 наблюдалась на 6 (28,5 %), CD90 – на 12 (57 %), CD 34 – на 4 (19 %), CD 44 – на 17 (81 %) и CD 24 – на 5 (23,8 %) из 21 линии. На других линиях клеток экспрессия этих антигенов составила менее 10 % (1÷8,5 %). При клонировании в полужидком агаре клеток линии *mel 1br*, экспрессирующих на своей поверхности 8,5 % антигена CD133, был получен клон клеток, экспрессирующих 100 % CD133⁺. Таким образом, опухолевые клетки, экспрессирующие небольшой процент СОК-ассоциированных антигенов, также являются СОК, а остальные антиген-отрицательные клетки – их потомками.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, меланома, моноклональные антитела, проточная цитометрия.

M.V. Oborotova, O.S. Burova, M.A. Baryshnikova, T.N. Zabolina, K.A. Baryshnikov,
I.N. Mikhailova, L.F. Morozova, N.M. Surava, Z.G. Kadagidze, A.Yu. Baryshnikov

**CANCER STEM CELLS ANTIGENS EXPRESSION
AT MELANOMA CELL LINES**

FSBSI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow

Abstract

The aim of this work was to study antigen expression associated with cancer stem cells at human metastatic melanoma transplantable cell lines received in FSBSI «N.N. Blokhin RCRC». Expression of CD133, CD117, CD34, CD90, CD24, CD44 associated with cancer stem cells has been explored in immunofluorescence reaction with monoclonal antibodies. Isospecific antibodies which values of immunofluorescence didn't increase 0,5 %-level of positive cells were used for negative control. The cancer stem cells antigen expression was heterogeneous. If we take 10% antigen-positive cells for discrimination level, we can see CD133-expression at 6 (28,5 %) cell lines of 21, CD117 – at 6 (28,5 %) cell lines of 21, CD90 – at 12 (57 %) of 21 lines, CD34 – at 4 (19%) of 21 cell lines, CD44 – at 17 (81 %) of 21 cell lines and CD24 – at 5 (23,8 %) of 21 lines. This antigens expression was less than 10 % (from 1 to 8.5 %) at other cell lines. After cloning *mel 1br* cell line that expressed on surface about 8.5 % of CD133 in semi-solid agar, the clone of cells expressed 100 % CD133⁺ cells was obtained. Thus, tumor cells expressing a small percentage of CSC-associated antigens are also CSC, and other antigen-negative cells are their descendants.

Key-words: cancer stem cells, melanoma, monoclonal antibodies, flow cytometry.

Введение

В любой опухоли всегда имеется небольшая популяция, дающая потомство клеток во-первых, более дифференцированных, а во-вторых, способных к собственному воспроизведению [11; 35]. Эта популяция клеток со свойствами стволовости получила название стволовых. Первоначально СОК были обнаружены при остром миелоидном и хроническом миелоидном лейкозах [4; 12–14; 21; 22; 25; 32–34]. В последующем они были идентифицированы при многих злокачественных заболеваниях [23; 24; 26; 27; 29; 30; 31]. Эти клетки не только ответственны за рост и поддержание опухоли,

но и могут также запускать процессы рецидивирования неоплазмы, метастазирования и устойчивость к лучевому и химиотерапевтическому методам лечения. По данным литературы СОК экспрессируют следующие антигены: CD 133, CD 117, ALDH, CD44, CD34, CD271, CD90 и CD24 [3; 10; 35; 36].

В РОНЦ в рамках программы создания противоопухолевых вакцин получена большая коллекция клеточных линий метастатической меланомы кожи человека [1; 2; 5–8; 16; 18; 19]. Эти клеточные линии охарактеризованы по иммунологическому фенотипу и по наличию раково-тестикулярных антигенов, но у них не изучали экспрессию маркеров СОК [15; 17; 20; 28].

Таблица 1

Экспрессия антигенов на меланомных клеточных линиях

№ п/п	Название линии	Процент антиген-положительных клеток								
		Отрицательный Контроль	HLA-ABC	HLA-DR	CD133	CD117	CD90	CD34	CD24	CD44
1.	Mel Z	0,1	90,5	6,0	5,2	1,1	5,2	3,9	3,2	100
2.	Mel Kor	0,1	1,5	3,6	0,8	76,2	1,1	1,7	0,2	99,7
3.	Malme-3M	0,4	75,1	11,1	5,1	5,5	0,7	2,7	5,3	77,5
4.	Mel Ibr	0,4	92,0	8,8	8,5	3,0	55,2	1,7	1,7	100,0
5.	Mel P	0,6	71,3	9,4	3,0	6,2	4,6	4,2	4,5	44,6
6.	Mel Mtp	0,5	89,1	19,7	26,7	0,7	1,7	3,9	7,8	99,9
7.	Mel MtpX	0,1	1,4	5,2	2,1	2,1	1,2	1,4	0,2	1,2
8.	Mel Cher	0,2	33,2	7,6	7,7	18,1	5,2	7,5	1,0	92,5
9.	Mel Is	0,5	92,6	32,3	18,3	10,1	13,3	5,5	6,6	93,3
10.	Mel Me	0,3	35,8	5,5	5,3	6,5	14,8	0,8	3,0	74,8
11.	Mel H	0,0	77,2	28,9	11,3	1,2	10,0	10,2	3,2	100,0
12.	Mel Hn	0,3	32,5	1,5	36,0	16,0	2,6	8,2	6,9	65,6
13.	Mel BGF	0,4	73,5	6,0	3,8	8,0	13,7	6,5	7,7	3,7
14.	Mel Si	0,2	94	18,6	7,4	6,8	11,2	3,6	73,5	99,9
15.	Mel Rac	0,2	89,5	0,8	2,3	0,1	16,0	2,0	23,2	99,9
16.	Mel Gus	0,1	94,2	90,6	6,7	5,8	27,0	14,8	17,0	97,0
17.	Mel Gi	0,2	87,8	30,6	10,1	8,8	13,0	18,0	2,8	83,0
18.	Mel Ksen	0,1	79,2	85,6	3,3	11,3	11,8	7,4	3,1	97,9
19.	Mel Ch	0,0	80,9	7,5	11,4	6,0	15,7	10,0	14,2	5,7
20.	Mel R	0,0	79,8	4,0	8,2	28,9	2,4	4,5	13,0	2,4
21.	Mel Il	0,0	89,9	0,1	1,6	57,4	10,7	0,3	0,7	97,7

Целью данной работы стало изучение экспрессии на клетках меланомы человека антигенов CD133, CD117, CD90, CD34, CD44 и CD24.

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследование проводили на 21 клеточной линии меланомы человека: *mel Mtp*, *mel Mtp X*, *mel Z*, *mel Kor*, *Malme-3M*, *mel Ibr*, *mel P*, *mel Cher*, *mel Is*, *mel Me*, *mel H*, *mel Hn*, *mel BGF*, *mel Si*, *mel Rac*, *mel Gus*, *mel Gi*, *mel Ksen*, *mel Ch*, *mel Il*, *mel R*, полученных из банка клеточных культур ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 2 мМ L-глутамина (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицин (ICN,США), пируват натрия (ПанЭко, Россия), 0,1 %-ный р-р аминокислот и 0,1 %-ный раствор витаминов (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO₂. Культуры клеток пересевали через 3–4 дня.

Определение экспрессии антигенов

Экспрессию антигенов определяли в прямой РИФ. В работе использовали МКА анти-CD133/2 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD117 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD34 (MACS Miltenyi Biotec, Германия), анти-CD90 (BD Pharmingen, США), анти-CD24 (BD Pharmingen, США), анти-CD44 (BD Pharmingen, США), анти-CD90 (MACS Miltenyi Biotec, Германия).

В пробирки для проточной цитофлуориметрии помещали 5×10⁵ клеток в 50 мкл раствора PBS и добавляли 10 мкл МКА. После 30 мин инкубации клеток в холодильнике при +4 °С их двукратно отмывали PBS, далее отделяли центрифугированием в течение 6 мин при скорости 1000 об/с. Затем надосадочную жидкость удаляли и добавляли 300 мкл 1 %-ного р-ра формалина в PBS.

Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Beckton Dickinson, США).

Результаты и обсуждение

Клеточные линии различались по экспрессии антигенов, ассоциированных с СОК (табл. 1). В качестве отрицательного контроля использовали изо-специфические антитела.

В отрицательном контроле показатели не превышали 0,5 % клеток. В качестве положительного контроля использовали антигены HLA 1 и 2 классов.

Антигены HLA 1 класса были представлены на клетках 19 линий.

Они не репрезентировались на клетках линии *mel Kor*, в которой отсутствует β2-микроглобулин [9] и клетках *mel MtpX*.

С последними не реагировали никакие из использованных в эксперименте МКА (табл. 1). Антигены HLA 2 класса были экспрессированы на клетках 5 линий, что подтверждает ранее полученные результат [15; 19].

Экспрессия антигенов, ассоциированных с СОК, была гетерогенна (см. табл. 1). Если принять за дискриминационный уровень 10 % клеток, экспрессия CD133 и CD117 наблюдалась на 6 (28,5 %) из 21 линии, CD90 – на 12 (57 %), CD 34 – на 4 (19 %), CD44 – на 17(81 %) и CD 24 – на 5 (23,8 %) из 21 линии.

На других линиях клеток экспрессия этих антигенов была менее 10 % (от 1 до 8,5 %). Образцы гистограмм распределения антиген-положительных клеток представлены на рис. 1.

Клетки с невысоким уровнем экспрессии СОК-ассоциированных антигенов могут иметь небольшую популяцию СОК, так называемую «*side population*».

Для подтверждения этой гипотезы мы клонировали в полужидком агаре клетки линии *mel Ibr*, экспрессирующей на своей поверхности 8,5 % антигена CD133.

Был получен клон этих клеток, названный *mel Ibr RMCR*, экспрессирующий 100 % CD133⁺ клеток (рис. 2).

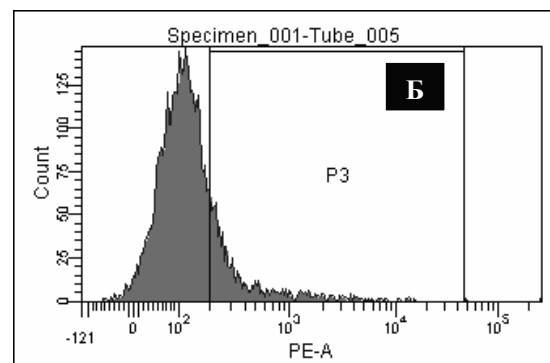
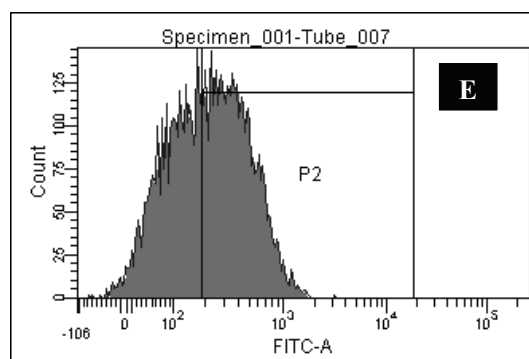
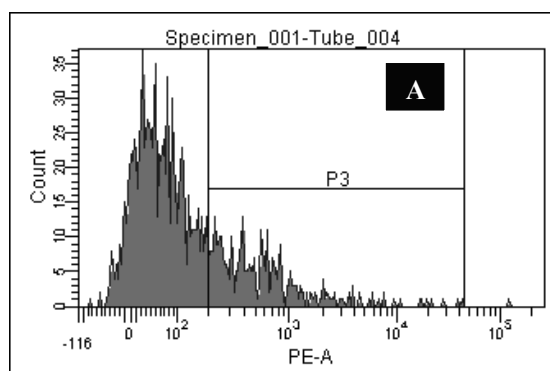


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток:
 А – *mel Mtp*, окрашенные антиCD133-PE;
 Б – *mel Is*, окрашенные антиCD133-PE;
 В – *Mel Hn*, окрашенные антиCD133-PE;
 Г – *Mel Kor*, окрашенные антиCD117-APC;
 Д – *mel Il*, окрашенные антиCD117-APC;
 Е – *mel Ibr*, окрашенные антиCD90- FITC.

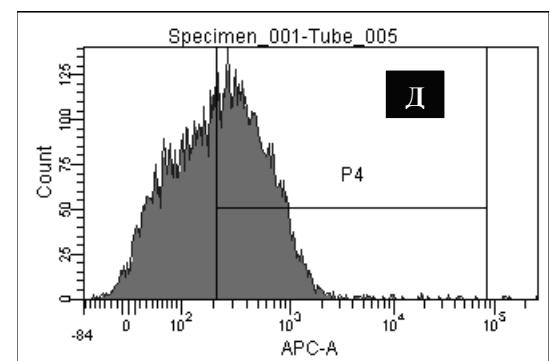
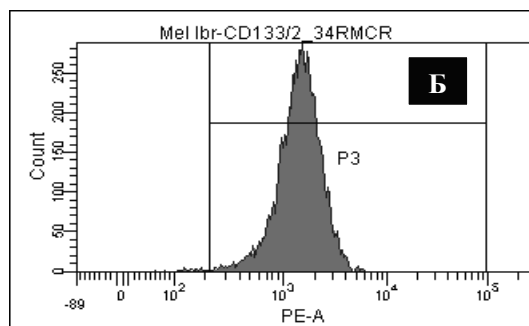
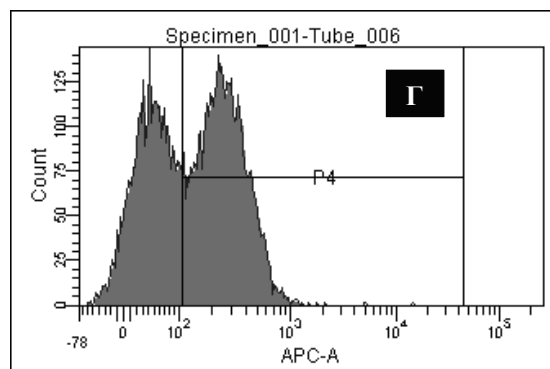
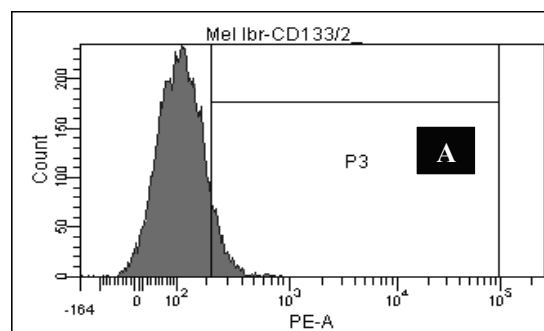
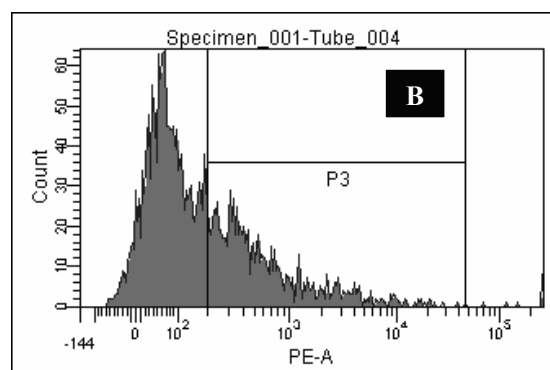


Рис. 2. Гистограммы распределения клеток линии *mel Ibr* и ее клон *mel Ibr RMCR*, окрашенных моноклональными антителами к CD133/2.

Таким образом, в одной клеточной линии опухолевые клетки, экспрессирующие небольшой процент СОК-ассоциированных антигенов, являются СОК, а остальные клетки – их потомками. Ранее было показано, что длительная инкубация CD133⁺ клеток с химиопрепаратами также приводит к увеличению доли CD133⁺ клеток [36].

Наиболее часто на клеточных линиях встречался антиген CD44 – на 18 (85,7 %) из 21 клеточной линии (табл. 1).

Он был выявлен на поверхности от 46 до 100 % клеток. Антиген CD44 в сочетании с другими СОК-ассоциированными антигенами помогает в выделении СОК.

Так, например, Chen et al. показали, что сочетание двух маркеров, CD117 и CD44, позволяет выделить СОК в популяции клеток рака яичника [26].

Не было выявлено особых различий в характеристике роста в культуре между линиями клеток, экспрессирующих разные проценты антиген-положительных клеток и степенью их морфологической характеристики.

Выводы

1. Клеточные линии, полученные из метастатической меланомы кожи человека, экспрессируют маркеры стволовых опухолевых клеток.

Литература

1. Афанасьева Д.А., Барышников М.А., Шербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // Иммунология. – 2014. – № 6. – С. 17–21.
2. Афанасьева Д.А., Барышников М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
3. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 8. – С. 4.
4. Барышников А.Ю. Иммунологический фенотип ранних гемопоэтических клеток-предшественников человека // Эксперим. онкология. – 1993. – Т. 15, № 6. – С. 3–7.
5. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
6. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
7. Барышников А.Ю., Барышников М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
8. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н. Современные проблемы биотерапии опухолей // Вестник Московского Онкологического Общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
9. Бережной А.Е., Сапрыкина Н.С., Козлов А.М. и др. Изучение противоопухолевой активности вакцин на основе генетически модифицированных опухолевых клеток, секретирующих ГМ-КСФ // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 47–53.
10. Боценовский В.А., Барышников А.Ю. Молекулы клеточной адгезии // Успехи современной биологии. – 1994. – Т. 114, № 6. – С. 741.
11. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработке новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 14. – С. 3–12.
12. Заботина Т.Н., Седяхина Н.П., Хорошко Н.Д. и др. Коэкспрессия антигена CD34 ранних гемопоэтических предшественников и антигена Fas/АРО-1, опосредующего апоптоз // Экспериментальная онкология. – 1994. – Т. 16, № 4–6. – С. 343–7.
13. Кадагидзе З.Г., Тулицын Н.Н., Заботина Т.Н. и др. Иммунофенотипические и функциональные особенности стволовых-клеточных лейкозов // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 43–8.
14. Кадагидзе З.Г., Тулицын Н.Н., Заботина Т.Н. и др. Дифференцировочные антигены ранних предшественников гемопоэтических клеток человека // Вестник ОНЦ. – 1996. – № 2. – С. 27–34.
15. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т. 37, № 1. – С. 29–39.
16. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
17. Михайлова И.Н., Бибилашвили Р.Ш., Ковалевский Д.А. Раково-тестикулярные антигены как потенциальные мишени для вакцинотерапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 17–26.
18. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
19. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Багирова Н.С. и др. Стерилизация многослойных протеолипосом // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 13–8.
20. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Бурова О.С. и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 43–8.
21. Туркина А.Г., Моисеев И.Н., Фролова Е.А. и др. «Примитивный» вариант бластного криза хронического миелолейкоза // Тер. архив. – 1995. – Т. 67, № 7. – С. 22–5.
22. Фролова Е.А., Френкель М.А., Лебедева Н.Б. и др. Моноклональные антитела ICO-115 к антигену CD34 человека // Вестник ОНЦ РАМН. – 1994. – Приложение. – С. 10–2.
23. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – P. 3983–8.
24. Barker N., van Es J.H., Kuipers J. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 // Nature. – 2007. – 449(7165). – P. 1003–7.
25. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nature. – 1997. – 37(7). – P. 730–7.
26. Chen X., Zhang J., Zhang J. et al. Cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, and drug resistance in high-grade ovarian serous // Human Pathology. – 2013. – 44(11). – P. 2373–84.
27. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer // Cell. – 2005. – 121(6). – P. 823–35.
28. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
29. Ricci-Vitani L., Lombardi D.G., Pilozi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. – 2007. – 445(7123). – P. 111–5.
30. Shackleton M., Vaillant F., Simpson K.J. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell // Nature. – 2006. – 439(7072). – P. 84–8.
31. Stingl J., Eirew P., Ricketson I. et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells // Nature. – 2006. – 439(7079). – P. 993–7.
32. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyakhina N.P. et al. Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // British Journal of Haematology. – 1996. – 92. – P. 88–96.
33. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetsov S.V. et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 1999. – 457. – P. 477–88.
34. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. et al. Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen // British J. Haematology. – 1998. – 28(5–6). – P. 469–82.
35. Valentin S., Bruttel J. Cancer Stem Cell Immunology: Key to Understanding Tumorigenesis and Tumor Immune Escape? // Frontiers Immunology. – 2014. – 5. – P. 360.
36. Woo T., Okudela K., Mitsui H. et al. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas // Int J Clin Exp Pathol. – 2010. – 4. – P. 32–42.

2. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток гетерогенна и колеблется от единичных процентов до 100 %.
3. Из клеточной линии, экспрессирующей низкий процент антиген-положительных клеток, можно выделить клон со 100 %-ной экспрессией СОК-ассоциированного антигена.
4. Исследованные клеточные линии могут быть использованы при изучении СОК, а также при поиске способов влияния на них при терапии меланомы.