

Л.А. Ведина, А.В. Шурлыгина, С.В. Сенников, В.А. Труфакин, В.А. Козлов

**ВЛИЯНИЕ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД, ПОЛУЧЕННЫХ
ОТ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ,
НА КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА**

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Установлено, что популяция клеток кишечного эпителия мыши содержит клетки-предшественники, обладающие способностью к образованию гемопоэтических селезеночных колоний на 9-е сутки (КОЕс-9). С помощью генетических методов доказано, что эти колониеобразующие клетки имеют донорское происхождение. Показано, что их способность к образованию гемопоэтических КОЕс-9 возрастает в 2,5 раза при предварительном культивировании клеток кишечника в среде с добавлением 30% кондиционной среды (КС), полученной от клеток эмбриональной печени (КЭП). В свою очередь, использование КС, полученных от КЭП, культивируемых с добавлением гемопоэтических ростовых факторов (ИЛ-1 β или эритропоэтин), приводит к отмене данного стимулирующего эффекта. Таким образом, полученные нами данные указывают, что клетки кишечника мышей-доноров могут образовывать гемопоэтические колонии у летально облученных мышей. Способность клеток кишечника к образованию гемопоэтических колоний можно использовать для восстановления гемопоэза и регулировать с помощью гуморальных факторов, продуцирующихся КЭП.

Ключевые слова: клетки кишечного эпителия, КОЕс-9, клетки эмбриональной печени, интерлейкин-1 β , эритропоэтин

Показано, что клетки эпителия тонкого кишечника обладают высокой пролиферативной активностью [8] и способностью к колониеобразованию в селезенке у летально облученных мышей на 8-е сутки (КОЕс-8) [1]. Известно, что этот процесс регулируется ростовыми факторами и цитокинами [4]. Установлено, что на 12-й день эмбрионального развития печень становится активным органом гемопоэза, где формируется определенное микроокружение, оптимальное для созревания и дифференцировки гемопоэтических предшественников [3]. Исходя из этого, целью работы было доказать с помощью гистологических, культуральных и генетических методов способность клеток кишечника образовывать гемопоэтические колонии в селезенке облученных мышей, а также изучить возможность регуляции их функциональной активности с помощью кондиционных сред от КЭП в период активного кроветворения.

Методика исследования

В работе использовались мыши линии (СВАхС57Bl/6)F1 в возрасте 3-6 месяцев, 12-14-дневные эмбрионы. Животные были по-

лучены из Научно-исследовательской лаборатории экспериментального биомедицинского моделирования ТНЦ СО РАМН. Опытные и контрольные животные находились на стандартной сбалансированной диете. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755). Забой животных проводили методом цервикальной дислокации. Облучение проводили на аппарате РУМ-25. Летальная доза составляла 8,5-9 Гр. Тотальную популяцию клеток печени 12-16-дневного эмбриона получали механическим способом. Жизнеспособность клеток определялась с помощью трипанового синего и составила 98%. Для получения КС клетки в концентрации 3 млн кл./мл инкубировали в культуральных флаконах в различных вариациях: 1) в среде RPMI-1640 (2 mM L-глутамин, гентамицин (80 мкг/мл)), без добавления каких-либо растворимых факторов, в течение 24, 48, 72 часов в 5% CO₂ при 37 °C; 2) в течение 24 часов в среде,

дополненной различными факторами: а) интерлейкином-1 β (8,4 нгр./мл), б) эритропоэтином (2 ед./мл). Получение тотальной популяции клеток кишечного эпителия осуществлялось способом, описанным ранее [11]. Показатель жизнеспособности составлял 50-60%. Затем клетки кишечника инкубировали 2 часа в среде RPMI-1640 при 37 °C в следующих вариантах: а) клетки; б) клетки + 30% КС, полученной от КЭП. Клетки костного мозга (ККМ) интактных мышей также инкубировали 2 часа в среде RPMI-1640 при 37 °C в следующих вариантах: а) ККМ; б) ККМ + 30% КС от КЭП, культивированных 24 часа. Введение клеток кишечника от самцов-доноров сингенным летально облученным мышам-реципиентам (самкам) осуществлялось внутривенно в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь, ККМ — 5×10^4 клеток/мышь. Забой животных производили на 9-е сутки после трансплантации. Количество колоний подсчитывали визуально. Для гистологического исследования колоний селезенку фиксировали в жидкости Телесницкого и заливали в парафин. На ротационном микротоме приготавливали срезы толщиной 5-7 мк. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике и изучали под микроскопом при увеличении ок. 10, об. 90 с применением иммерсии. Для подтверждения происхождения гемопоэтических колоний использовали маркер Y-хромосомы (ген sry), который был выявлен с помощью вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого получали суспензию клеток из КОЕс-9 от самок-реципиентов и клетки в концентрации 50 тыс. кл/мл культивировали в среде, содержащей метилцеллюлозу MethoCult M3430 (Stemcell Tech. Inc. Vancouver, B.C.). Сбор колоний, полученных *in vitro*, осуществляли на 14-й день. Пробы ДНК амплифицировали в реакционной смеси, содержащей мышинные праймеры, специфичные для Y-хромосомы [7]. Условия ПЦР: денатурация 95 °C — 3 мин; затем 30 циклов по 40 сек при 94 °C, 30 сек при 52 °C и 40 сек при 72 °C. Далее проводили ПЦР, используя вложенные праймеры [9]. В качестве матрицы использовали 1 мкл первичной ПЦР. Условия амплификации были теми же, что и в случае первичной ПЦР, только с 20 циклами. В результате амплификации был получен фрагмент 320 п.о. В качестве позитивного и негативного контроля использовали ткань интактных самцов и самок соответственно. Математическую обработку результатов проводили с использованием программы «Statistica». Достоверность различий оценивали по критерию Kruskal-Wallis ANOVA, результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты исследования

В наших исследованиях с помощью гистологического метода было показано, что популяция клеток кишечного эпителия мыши образует именно гемопоэтические колонии в селезенке (КОЕс-9) облученных мышей (Рис. 1). Для доказательства того, что отдельно взятая колония представляет собой клон клетки кишечного эпителия, мы трансплантировали клетки кишечного эпителия от самцов сингенным летально облученным самкам. Затем получали суспензию клеток из единичных КОЕс-9 и культивировали

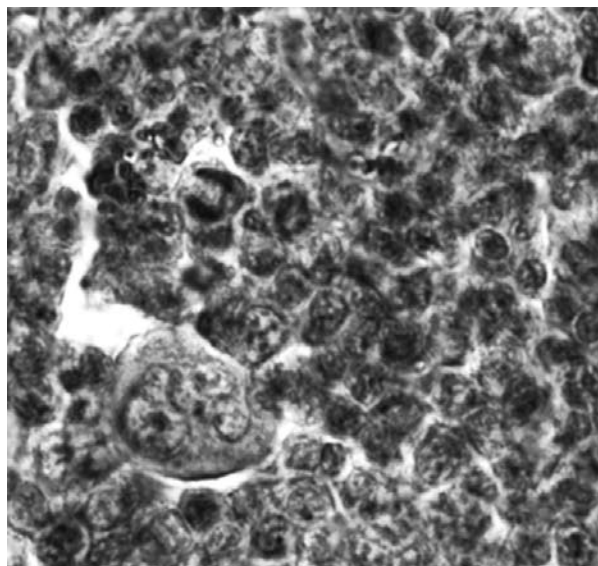


Рис. 1. Гистология миелоидной колонии в селезенке летально облученной мыши через 9 дней после трансплантации клеток кишечника. Окраска гематоксилином и эозином. Объектив 90, окуляр 10.

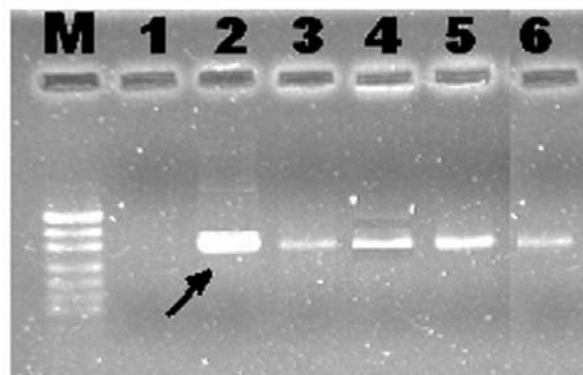


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена sry (Y-хромосома) на кДНК из клеток гемопоэтических колоний, полученных на 14-й день *in vitro* от клеток КОЕ селезенки летально облученных мышей-реципиентов (самок), которым была проведена трансплантация клеток кишечника доноров-самцов. М — маркер молекулярного веса. Стрелкой обозначен фрагмент ДНК размером 320 п.н., соответствующий кДНК гена sry. В качестве негативного контроля использовались клетки селезенки самки (проба 1), в качестве положительного контроля — клетки самца (проба 2). Пробы 3-6 — клетки из гемопоэтических колоний.

ли клетки в полувязкой среде, содержащей метилцеллюлозу (MethoCult M3430). С помощью ПЦР-анализа установлено, что полученные через 14 суток *in vitro* гемопоэтические колонии содержали маркер Y-хромосомы (Рис. 2). Таким образом, с помощью культуральных, гистологических и генетических методов было показано, что клетки кишечного эпителия способны образовывать гемопоэтические колонии.

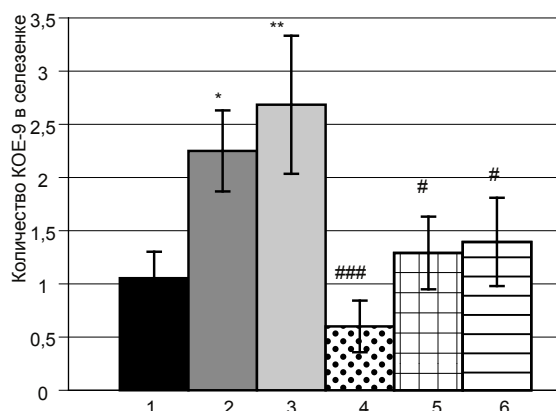


Рис. 3. Влияние кондиционных сред (КС), полученных от клеток эмбриональной печени, на колониобразующую активность (КОЕ-9) клеток кишечного эпителия

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по отношению к контролю; # — $p < 0,05$; ### — $p < 0,001$ по отношению ко второй группе.

- 1 — контроль или предварительная 2-часовая инкубация клеток кишечника в среде без добавления КС;
- 2 — с добавлением 30% КС от КЭП, культивированных 24 часа;
- 3 — с добавлением 30% КС от КЭП, культивированных 48 часов;
- 4 — с добавлением 30% КС от КЭП, культивированных 72 часа;
- 5 — с добавлением 30% КС от КЭП, культивированных 24 часа с эритропоэтином;
- 6 — с добавлением 30% КС от КЭП, культивированных 24 часа с интерлейкином-1 β

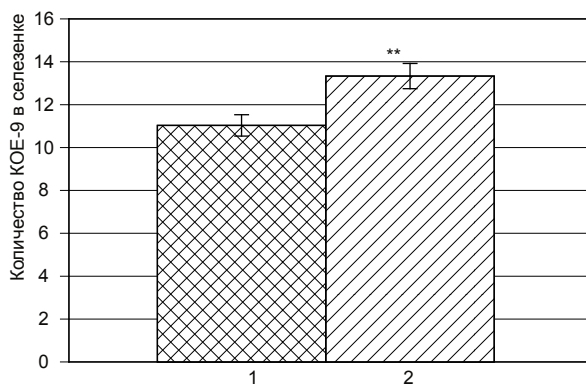


Рис. 4. Влияние кондиционных сред (КС), полученных от клеток эмбриональной печени (КЭП), на колониобразующую активность КОЕ-9 клеток костного мозга.

** — $p < 0,01$ по отношению к контролю

- 1 — контроль или предварительная инкубация ККМ в среде без добавления КС;
- 2 — с добавлением 30% КС от клеток эмбриональной печени (КЭП), культивированных 24 часа в среде без добавления растворимых факторов

В следующей серии экспериментов мы попытались изменить способность клеток кишечного эпителия к образованию гемопоэтических колоний с помощью кондиционных сред, полученных от клеток эмбриональной печени в период активной гемопоэтической активности (12-й день). Установлено, что предварительная культивация эпителиальных клеток кишечника мышей-доноров в среде, содержащей 30% кондиционных сред, полученных на 24 и 48 часов, приводит к статистически значимому увеличению их способности образовать гемопоэтические КОЕ-9 по сравнению с контрольной группой в 2,5 раза (Рис. 3). Полученный эффект можно объяснить тем, что КЭП в период активного гемопоэза синтезируют различные ростовые факторы, необходимые для пролиферации и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток [5]. При использовании КС от КЭП, полученной на 72 часа, стимулирующего влияния не зарегистрировано (Рис. 3). Вероятно, это связано с тем, что на 3-и сутки культивирования в КС от КЭП происходит изменение спектра ростовых факторов, которые эти клетки продуцируют *in situ* и в первые 2 дня культивирования *in vitro*. Опыт с клетками костного мозга продемонстрировал, что предварительная культивация ККМ в среде, содержащей 30% КС, полученной на 24 часа, приводит к статистически значимому увеличению их способности к образованию КОЕ-9 по сравнению с контрольной группой только в 1,2 раза (Рис. 4). Полученные данные можно связать с относительно медленным пролиферативным потенциалом костного мозга (10,5% митозов), для сравнения — для кишечного эпителия данный показатель составляет 53,9% митозов [2].

В следующей серии экспериментов мы попытались изменить способность кондиционных сред от КЭП стимулировать колониобразующую активность клеток кишечного эпителия. Известно, что такие факторы, как эритропоэтин и ИЛ-1 β , регулируют выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников гемопоэза [6, 10] и, соответственно, могут менять спектр продуцируемых этими клетками медиаторов. Влияние эритропоэтина преимущественно направлено на увеличение пролиферации и дифференцировки эритроидных предшественников в направлении зрелых эритроидных форм [10], а ИЛ-1 β способен оказывать ингибирующее влияние на эритропоэз, действуя опосредованно через ИНФ- γ [6]. В своих исследованиях мы показали, что предварительная культивация клеток кишечника в среде, содержащей 30% КС от КЭП, культивируемых в присутствии эритропоэтина или ИЛ-1 β , приводит к отмене стимулирующего эффекта (Рис. 3). Можно

предположить, что эти медиаторы меняют спектр гуморальных факторов, продуцируемых клетками эмбриональной печени.

Таким образом, доказано, что КОЕс-9, образующиеся при трансплантации летально облученным мышам клеток кишечного эпителия, являются гемопоэтическими колониями и представляют собой клон донорских клеток. Показано, что способность клеток кишечного эпителия образовывать КОЕс-9 можно увеличить при культивировании с КС от КЭП в 2,5 раза, в то время как способность ККМ к образованию КОЕс-9 возрастает только в 1,2 раза. Добавление таких ростовых факторов, как ИЛ-1 β , эритропоэтин, при культивировании КЭП приводит к получению КС, не обладающих способностью стимулировать колониеобразование клетками кишечника. Таким образом, полученные нами данные указывают, что клетки кишечника мышей-доноров могут образовывать гемопоэтические колонии у летально облученных мышей. Способность клеток кишечника к образованию гемопоэтических колоний можно использовать для восстановления гемопоэза и регулировать с помощью гуморальных факторов, продуцирующихся КЭП.

INFLUENCE OF CONDITIONED MEDIUM FROM MOUSE EMBRYONIC LIVER CELLS ON THE COLONY-FORMING ACTIVITY OF INTESTINAL CELLS

L.A. Vedina, A.V. Shurlygina, S.V. Sennikov, V.A. Trufakin, V.A. Kozlov

It is established the population of epithelial cells in the small intestine includes precursor cells possessing the ability to form hematopoietic splenic colony-forming unit on day 9 (CFU-9). It is proved by genetic methods these colony-forming cells have a donor origin. Their ability to give hematopoietic CFU-9 is shown to be increased in 2.5 times when intestinal cells preliminarily were cultivated with 30% conditioned medium (CM) produced by mouse liver embryonic cells (LEC). The use CM from LEC, which were cultured with hemopoietic growth factors (interleukin-1 β or erythropoietin), led to cancellation of this stimulation effect. Thus, the data indicated, that the mice-donors intestinal cells are capable to form hematopoietic colonies in lethally irradiated mice, and that their ability can be used for reconstruction of hematopoiesis. The intestinal cells capacity for hematopoietic colonies formation can be regulated by humoral factors produced by LEC.

Литература

1. Влияние гранулоцитарно-макрофагального КСФ, продуцируемого интестинальными эпителиальными клетками, на функциональную активность стволовых кроветворных клеток / С.В. Сеников, В.В. Темчура, В.А. Труфакин, В.А. Козлов. // Бюл. exper. биол. и мед. — 2002. — Т. 134. — № 12. — С. 634-636.
2. Контролирующее влияние Т-лимфоцитов супрессоров на пролиферацию клеток в различных тканях / Н.А. Краскина, Е.М. Верев, Н.М. Гуторова и др. // Бюл. exper. биол. и мед. — 1988. — Т. 105. — № 4. — С. 464-466.
3. Aminopeptidase N/CD13 regulates the fetal liver microenvironment of hematopoiesis / N. Sakane, Y. Asano, T. Kawamura et al. // Biol. Pharm. Bull. — 2004. — Vol. 27. — № 12. — P. 2014-2020.
4. Autocrine/Paracrine Mechanisms in Human Hematopoiesis / A. Janowska-Wieczorek, M. Majka, J. Ratajczak, M. Z. Ratajczak // Stem. Cells. — 2001. — Vol. 19. — № 2. — P. 99-107.
5. Establishment of a hepatocytic epithelial cell line from the murine fetal liver capable of promoting hemopoietic cell proliferation / M. Hata, M. Nanno, H. Doi et al. // J. Cell. Physiol. — 1993. — Vol. 154. — № 2. — P. 381-392.
6. Means R.T.Jr. Inhibition of human erythroid colony-forming units by interleukin-1 is mediated by gamma interferon / R.T.Jr. Means, E.N. Dessypris, S.B. Krantz // J. Cell. Physiol. — 1992. — Vol. 150. — № 1. — P. 59-64.
7. Pang W. Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice / W. Pang // Blood. — 2000. — Vol. 95. — № 3. — P. 1106-1108.
8. Pottern C.S. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor / C.S. Pottern, C. Booth, D.M. Pritchard // Int. J. Exp. Path. — 1997. — Vol. 78. — P. 219-243.
9. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue / B. Cousin, M. Andre, E. Arnaud et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2003. — Vol. 301. — № 4. — P. 1016-1022.
10. Sawyer S.T. Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells / S.T. Sawyer, S.B. Krantz, E. Goldwasser // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 5554.
11. Speekenbrink A.B.J. Modulation of in vitro thymidine incorporation into crypt cells from the murine small intestine / A.B.J. Speekenbrink, D.M.V. Parrot // Cell Tissue Kinet. — 1987. — Vol. 20. — P. 135-144.