

УДК 57.017.642:616-08

© Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНА LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR) НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ЛИНИИ R1

*Е.С. Лобанок<sup>1</sup>, Л.М. Межевикина<sup>2\*</sup>, Л.М. Бебянович<sup>1</sup>, Р.Р. Петрова<sup>2</sup>,  
И.Б. Василевич<sup>1</sup>, И.Д. Вологовский<sup>1</sup>, Е.Е. Фесенко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГНУ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072  
Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московской обл.,  
ул. Институтская, 3; эл. почта: mezhevikina@rambler.ru

Исследовано влияние цитокина LIF (Leukemia Inhibitory Factor) на жизнеспособность, пролиферацию и распределение мышечных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) линии R1 по фазам клеточного цикла. Показано, что цитокин LIF в концентрациях 5-20 нг/мл повышает эффективность роста колоний, поддерживает высокий пролиферативный потенциал и плюрипотентность клеток R1, а также подавляет процессы спонтанной дифференцировки и апоптоза, снижает отношение S/G<sub>2</sub>+M клеточного цикла и время удвоения популяции.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, цитокин LIF, пролиферация, клеточный цикл.

**ВВЕДЕНИЕ.** Линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), впервые полученные из внутренней клеточной массы бластоцист более 25 лет назад, являются важнейшими объектами молекулярно-биологических исследований, благодаря своей уникальной способности к неограниченной пролиферации и дифференцировке во все типы клеток трёх зародышевых листков [1-4]. Высокая зависимость ЭСК от регуляторных молекул определяет при их отсутствии потерю плюрипотентности - "стволовости", спонтанную дифференцировку и иммортализацию клеточной популяции. Динамика событий на ранних этапах взаимодействия ЭСК с ростовыми факторами и сигнальными молекулами недостаточно ясна. Это в полной мере относится к одному из важнейших регуляторов плюрипотентного состояния ЭСК мыши - цитокину LIF (Leukemia Inhibitory Factor).

Блокируя процессы дифференцировки и образование эмбрионных тел (аналогов ранних эмбрионов млекопитающих), LIF способствует высокой пролиферативной активности и росту мышечных линий ЭСК [5]. Согласно современным представлениям, его регуляторное действие осуществляется посредством гетеродимеризации расположенного на плазматической мембране LIF-рецептора (LIF-R) с трансмембранным переносчиком - гликопротеином gp130, что приводит к активации JAK-STAT3, MAPK и PI3K путей трансдукции триггерного сигнала [6]. В работах, проведенных на липосомах и ЭСК мыши, характеризующихся высокой зависимостью от цитокина LIF, показано, что данный белок выступает как мембранотропное соединение, влияющее на микровязкость липидного бислоя и мембранный потенциал стволовых клеток [7].

\* - адресат для переписки

Для выяснения механизмов, определяющих способность цитокина LIF поддерживать плюрипотентный статус - "стволовость" ЭСК мыши в течение культивирования, исследовано влияние на пролиферативную активность, скорость роста колоний и распределение плюрипотентных клеток по фазам клеточного цикла.

**МЕТОДИКА.** Работа проведена на мышинной линии клеток R1, полученной от эмбриона с мужским кариотипом после скрещивания 129/Sv × 129/Sv-CP [8]. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм или во флаконах объемом 50 мл в среде ДМЕМ (модифицированная Дульбекко среда Игла), содержащей глюкозу 4,5 мг/мл, 15% инактивированной фетальной сыворотки коров (иФСК), 2 мМ L-глутамин, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,0 мМ пируват Na и по 0,01 мг/мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика, смеси витаминов, незаменимых аминокислот и нуклеозидов.

ЭСК высевали в концентрации  $5 \times 10^4$  кл/мл на фидерный слой первичных эмбриональных фибробластов (ПЭФ) мыши, предварительно обработанных митомицином C (3-7 мкг/мл), и культивировали без добавления LIF и в присутствии 2,5 - 20 нг/мл LIF (Stem Cell Technologies Inc., Канада). Максимальное время инкубирования клеток с цитокином LIF составляло 72 ч. Плюрипотентность ЭСК оценивали по морфологии колоний, активности эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ), а также способности к дифференцировке в эмбрионидные тела.

Морфологию колоний ЭСК тестировали с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX-70 (Япония). Потерю монослойности колоний и/или выход ЭСК в суспензию рассматривали как начало эмбриональной дифференцировки. Время удвоения популяции рассчитывали в фазу активного роста. Число клеток и их жизнеспособность оценивали в камере Горяева с помощью витального красителя 0,1% раствора трипанового синего. Цитохимическое тестирование активности ЭЩФ проводили по методу Лойда с использованием  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфата и красителя ВВ синего прочного [9].

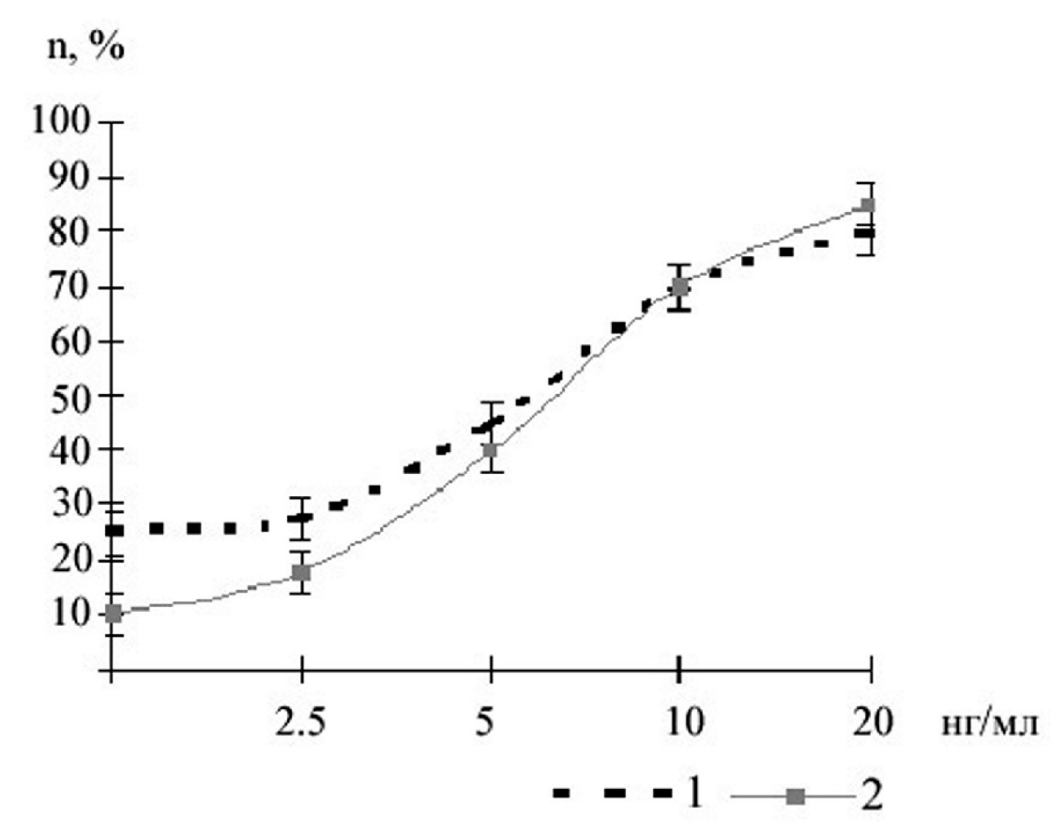
После формирования плотных монослойных колоний ЭСК дезинтегрировали в 0,05% растворе трипсин-ЭДТА. Клетки тщательно отмывали в среде ДМЕМ с 20% иФСК, центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и переводили в свежую среду ДМЕМ. Для получения чистой культуры ЭСК проводили 2 раза по 20 мин осаждение клеток ПЭФ на пластик. После этого суспензию ЭСК переносили на чашки Петри, предварительно покрытые 0,1% раствором желатины. Перед анализом клетки переводили в забуференный фосфатами физиологический раствор (ЗФР) в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл.

Распределение ЭСК по фазам клеточного цикла и количество апоптотных клеток через 18-24 ч определяли на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с 15 мВт 488 нм аргон-неоновым лазером, регистрация по каналу FL-2 в красной области спектра, с использованием программного обеспечения "CellQuest" и "ModFit 2,0". Клетки фиксировали в 0,5 мл ледяного этилового спирта в течение 1 ч, затем отмывали в ЗФР, центрифугировали (400 g, 5 мин), к осадку добавляли 25 мкг/мл пропидия иодида, 1,0 мкг/мл РНКазы и инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего выполняли измерения [10].

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методам вариационной статистики [11].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Альтернативными формами ответа ЭСК на действие ростовых факторов, в том числе цитокинов, являются пролиферация, дифференцировка или апоптоз. С целью определения оптимальной концентрации LIF для поддержания высокого пролиферативного потенциала и плюрипотентного состояния мышинных ЭСК линии R1 его вносили в среду культивирования в дозах от 2,5 до 20 нг/мл. Динамику развития культуры оценивали через 18, 24, 48 и 72 ч с учетом формы, количества, типа образуемых недифференцированных колоний, выхода сложных структур в виде эмбрионидных тел, а также поврежденных и неприкрепившихся к фидерной подложке клеток.

Установлено, что регуляторная функция LIF имеет выраженную дозовую зависимость (рис. 1). Культивирование ЭСК в присутствии 2,5 и 5 нг/мл LIF в течение 24 ч приводит к формированию 30 и 45% недифференцированных колоний с низкой пролиферативной активностью и сниженной адгезией клеток к подложке из клеток ПЭФ. К 48 ч в популяции ЭСК увеличивается количество поврежденных клеток, наблюдается формирование эмбриоидных тел. Подобная картина регистрировалась нами при выращивании ЭСК в течение 48 ч на желатиновой подложке в среде, не содержащей LIF.



**Рисунок 1.**

Зависимость образования недифференцированных плюрипотентных колоний эмбриональных стволовых клеток линии R1 через 24 ч (1) и 48 ч (2) от концентрации цитокина LIF в среде культивирования.

При внесении в питательную среду 10 нг/мл цитокина LIF количество недифференцированных плюрипотентных колоний на вторые сутки культивирования достигает 70%, максимальное образование которых (80%) наблюдается в присутствии 20 нг/мл LIF (рис. 1). Время удвоения клеточной популяции сокращается в среднем до 10 ч, скорость роста к 48 ч возрастает в 1,4 и 2,2 раза по сравнению с культурами, к которым цитокин не добавляли (табл.).

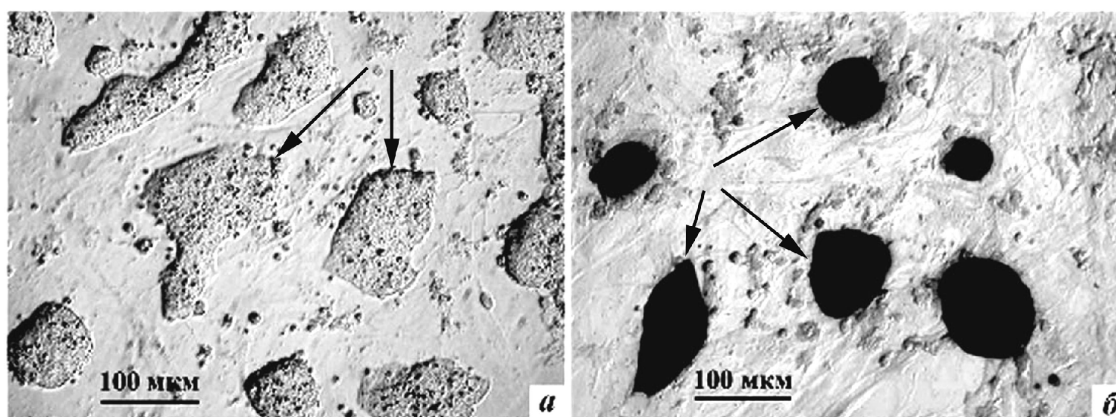
## ЦИТОКИН LIF И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

*Таблица.* Влияние цитокина LIF на пролиферативную активность и дифференцировку мышечных эмбриональных стволовых клеток линии R1.

Концентрация LIF, нг/мл	Количество клеток ( $\times 10^4$ )		Скорость роста	Время удвоения популяции ЭСК (ч)	Н/Д, %
	48 ч	72 ч			
5	19,7 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 0,2	12,2 $\pm$ 0,9	42,75
10	21,3 $\pm$ 0,7*	34,0 $\pm$ 1,1*	4,3 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,5**	67,45
20	34,3 $\pm$ 1,8*	32,3 $\pm$ 1,5*	6,9 $\pm$ 0,3*	7,0 $\pm$ 0,7**	82,90
Без LIF	15,6 $\pm$ 3,1	19,0 $\pm$ 8,0	3,1 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 1,8	33,70

Примечание: Н/Д - недифференцированные плюрипотентные колонии эмбриональных стволовых клеток с высокой активностью эндогенной щелочной фосфатазы. \* - Достоверное увеличение пролиферативной активности и скорости роста клеток в среде с 10-20 нг/мл LIF ( $p \leq 0,05$ ); \*\* - Достоверность различий по времени удвоения клеточных популяций в среде с LIF и без добавления LIF ( $p \leq 0,01$ ).

В концентрациях 10-20 нг/мл цитокин LIF обеспечивает высокую пролиферативную активность и формирование до 80% монослойных колоний без видимых признаков морфологической дифференцировки и с высокой активностью ЭЩФ (рис. 2), что отражает наличие плюрипотентных свойств ЭСК. Таким образом, высокие темпы роста ЭСК с цитокином LIF ограничивают способность этих клеток к спонтанным дифференцировкам и образованию эмбрионидных тел – аналогов эмбрионов ранних стадий развития.



**Рисунок 2.**

Морфология недифференцированных плюрипотентных колоний эмбриональных стволовых клеток мыши R1 на фидере (а), цитохимический тест на выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы (б). Стрелками обозначены колонии плюрипотентных клеток.

В условиях, когда затруднена клеточная дифференцировка, соотношение двух форм ответа стволовых клеток пролиферация/апоптоз может служить важным параметром их реакции на ростовые факторы и отражать потенциал популяции к самообновлению. Нами установлено, что цитокин LIF в концентрациях 5-20 нг/мл уменьшает в популяции ЭСК долю апоптозных клеток до 2,0% по сравнению 7,2%, наблюдаемыми после 18 ч инкубирования в среде без цитокина LIF. Эти данные свидетельствуют об антиапоптотическом действии цитокина LIF.

В концентрации 5 нг/мл этот цитокин более эффективно ингибирует гибель ЭСК по механизму апоптоза по сравнению 10 нг/мл. Это, по-видимому, обусловлено тем, что апоптоз представляет собой активную форму реакции клеток не только на неблагоприятные воздействия, такие как дефицит факторов роста в среде, но и на физиологические концентрации, активирующие рост клеток. В случае с ЭСК линии R1 такой концентрацией является 10 нг/мл LIF (табл.).

Важной характеристикой реакции ЭСК на ростовые факторы, отражающей потенциал культуры к самообновлению является распределение клеток по фазам клеточного цикла. Полученные нами гистограммы [ $G_{1/0}$  (содержание ДНК 2C), S (от 2 до 4C) и  $G_2 + M$  (4C)] свидетельствуют о том, что как при концентрации LIF 5 нг/мл, так и при 10 нг/мл доля клеток, находящихся в S-фазе, снижается (рис. 3).

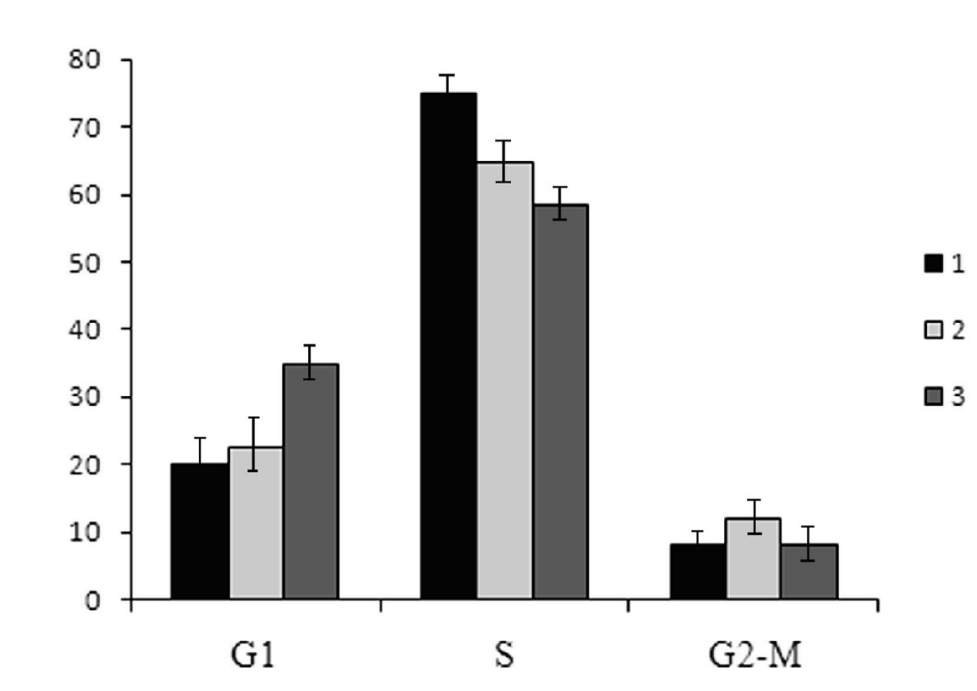


Рисунок 3.

Влияние концентрации цитокина LIF на распределение эмбриональных стволовых клеток линии R1 по фазам клеточного цикла.  
1 - контроль (без LIF), 2 - 5 нг/мл LIF, 3 - 10 нг/мл LIF.

Большую часть своего времени плюрипотентные ЭСК мыши проводят в S-фазе клеточного цикла, в ходе которой происходит синтез ДНК. В отличие от соматических клеток, для ЭСК не требуются внешние стимулы для инициации процессов репликации ДНК [12]. Это объясняет, почему трудно вывести ЭСК из клеточного цикла в  $G_1$  или  $G_0$ -фазу. Однако если эти клетки начинают дифференцироваться в эмбрионидные тела, то возрастает экспрессия D-циклина, удлиняется  $G_1$ -период, замедляется скорость клеточных делений [13].



Поскольку возможна остановка стволовых клеток в одной из стадий клеточного цикла, то увеличение их количества в синтетической S стадии не всегда будет отражать пролиферативную активность популяции. В связи с этим мы рассчитали отношение в популяции доли клеток в фазе S к  $G_2$ +M-фазе как S/ $G_2$ +M. Было установлено, что без цитокина LIF большинство ЭСК мыши (более 70%) находится в S фазе и отношение S/ $G_2$ +M, отражающее пролиферативный потенциал культуры, равно 10,9. После инкубации клеток в течение 18 ч с 5 нг/мл LIF данный параметр снижается до 4,7, с 10 нг/мл – только до 8,3. Подобная картина, по всей видимости, обусловлена тем, что в присутствии 10 нг/мл LIF часть стволовых клеток быстрее проходит S фазу и только около 10% клеток задерживается в точке рестрикции  $G_1$ -фазы, тогда как малые дозы этого цитокина влияют на выход клеток из S фазы, увеличивая тем самым пролиферативный индекс популяции и долю клеток с содержанием ДНК  $\geq 2C$ .

Специфика ЭСК заключается в том, что у этих клеток слишком короткий  $G_1$  период, поэтому механизмы сигнальной трансдукции для обеспечения пролиферативного ответа у них могут быть не столь многочисленны, как в соматических клетках [13-15]. Отсутствие цитокина LIF не останавливает рост ЭСК мыши в  $G_1$  фазе клеточного цикла, что указывает на конститутивную активность сигнальных каскадов, ответственных за переход из  $G_1$  в S фазу [16]. В среде без цитокина LIF эти клетки сохраняют способность к пролиферации и росту в виде колоний, но темпы их деления снижены по сравнению с клетками, развивающимися в среде с цитокином LIF (табл.).

Постоянные митотические деления ингибируют дифференцировку ЭСК *in vitro*, которая может возникать в этих популяциях спонтанно при удалении сигнала к пролиферации [12]. Подобная ситуация наблюдается в ходе культивирования ЭСК мыши в среде без цитокина LIF. Удаление LIF из среды приводит к подавлению эффектов D-циклина и циклинзависимой киназы [13, 15]. В этом случае митотические деления продолжаются всего лишь несколько дней, после чего начинается быстрая спонтанная дифференцировка ЭСК с образованием эмбрионидных тел [17, 18].

В условиях культивирования ЭСК мыши с цитокином LIF сигналы от активированного рецепторного комплекса LIF-R-gp130 [6] поступают в специальную зону хроматина, контролирующую вступление клеток в  $G_1$  и S фазу клеточного цикла. Плюрипотентные клетки не имеют системы контроля стадии  $G_0$  и могут постоянно находиться в режиме деления [16, 18]. Таким образом, существует тесная связь между клеточными циклами и сигнальными путями, обеспечивающими рост и пролиферативную активность ЭСК мыши в системе *in vitro*.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что способность цитокина LIF поддерживать высокий пролиферативный потенциал и плюрипотентность ЭСК мыши, связана с ингибированием клеточной гибели по механизму апоптоза, снижением отношения S/ $G_2$ +M клеточного цикла и времени удвоения популяции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Molofsky A.V., Pardal R., Morrison S.J. (2004) Cell Biol., **16**, 700-707.
2. Constantinescu S. (2003) J. Cell. Mol. Med., **7**, 103-112.
3. Wobus A., Boheler K. (2005) Phys. Rev., **85**, 635-678.
4. Dani C., Smith A.G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageoi P., Darimont C., Ailhaud G. (1997) J. Cell Sci., **110**, 1279-1285.
5. Auernhammer C.J., Melmed S. (2001) J. Clin. Invest., **108**, 1735-1740.
6. Giese B., Roderburg C., Sommerauer M., Wortmann S.B., Metz S., Heinrich P.C., Muller-Newen G. (2005) J. Cell Sci., **118**, 5129-5140.
7. Серышева В.В., Борисова М.П., Межевикина Л.М., Полтавцева Р.А., Сухих Г.Т. (2002) Бюлл. экспер. биол. мед., **134**, 620-623.

8. *Nagy A., Rossant J., Nagy R., Prideaux V.R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8424-8428.
9. *Лойда З., Госсрай Р., Шублер Т.* (1982) В: Гистохимия ферментов. Лабораторные методы (под ред. проф. Райхлина Н.Т.) Мир, М.
10. *Nikoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C.* (1991) *J. Immunol. Methods.*, **139**, 271-279.
11. *Рокицкий П.Т.* (1987) Биологическая статистика, Высшая школа, Минск.
12. *Smith A.G.* (2001) in: *Embryonic stem cells* (D.R. Marshak, D.K. Gardner, D. Gottlieb, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 205-230.
13. *Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L.A., Rudkin B.B., Samarut J.* (1996) *Oncogene*, **12**, 309-322.
14. *Rohwedel J., Sehlmeier U., Shan J., Meister A., Wobus A.M.* (1996) *Cell Biol. Int.*, **20**, 579-587.
15. *Wianny F., Real F.X., Mummery C.L., Van Rooijen M., Lahti J., Samarut J., Savatier P.* (1998) *Dev. Dyn.*, **212**, 49-62.
16. *Choo A.B.H., Padmanabhan J., Chin A.C.P., Oh S.K.W.* (2004) *Biotech. Bioeng.*, **88**, 321-331.
17. *Weissman I.L.* (2000) *Cell*, **100**, 157-168.
18. *Prudhomme W.A., Duggar K.H., Lauffenburger D.A.* (2004) *Biotech. Bioeng.*, **88**, 264-272.

Поступила: 15. 02. 2008.

#### THE INFLUENCE OF LIF (LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR) ON THE FUNCTIONAL STATUS OF MOUSE LINE R1 EMBRYONIC STEM CELLS

*E.S. Lobanok<sup>1</sup>, L.M. Mezhevikina<sup>2</sup>, L.M. Belyanovich<sup>1</sup>, R.R. Petrova<sup>2</sup>, I.B. Vasilevich<sup>1</sup>,  
I.D. Volotovskiy<sup>1</sup>, E.E. Fesenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biophysics and Cell Technology NAN Belarus, Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics RAS, Institutskaya ul., 3, Pushchino, Moscow Reg., 142290 Russia;  
e-mail: mezhevikina@rambler.ru

The influence of cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor) on the viability, and proliferation of mouse R1 line embryonic stem cells (ESC) and their distribution by cell cycle stages has been investigated. LIF (5-20 ng/ml) increased growth of colonies and maintained high proliferative and pluripotent properties of R1. LIF was also involved into the inhibition of spontaneous cell differentiation and apoptotic cell death; it also decreased the rations of S/G<sub>2</sub>+M cell cycle and doubling-time of cell population.

**Key words:** embryonic stem cells, cytokine LIF, proliferation, cell cycle.