

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 576.36:57.016

Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека**Ю.Е. Воронцова*** , **А.А. Акишина** , **Р.О. Черезов** , **О.Б. Симонова** *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26
e-mail: vorontsova@idbras.ru

Остеогенная саркома – агрессивная злокачественная опухоль костной ткани, возникающая в молодом возрасте (10–19 лет) и, как правило, заканчивающаяся фатально. Арил-гидрокарбоновый рецептор человека (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) – лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. Известно, что некоторые лиганды AHR входят в состав фармацевтических препаратов, применяемых в онкотерапии. Однако в мировой литературе мало работ, посвященных исследованию последствий их воздействия на клетки остеосаркомы. В данной работе были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухолей костной ткани остеогенной саркомы человека. Во всех культурах остеосарком было отмечено повышенное содержание белка AHR по сравнению с линиями клеток неопухолевого происхождения. Функциональную активность AHR в клетках остеосарком оценивали по специфичности активации его генов-мишеней после применения известных экзогенных лигандов: индирубина и индол-3-карбинола. В качестве генов-мишеней AHR анализировали гены одного семейства цитохромов: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*. Было показано, что во всех полученных культурах AHR функционально активен, однако профиль активации экспрессии его генов-мишеней в ответ на действие лиганда варьировал.

Ключевые слова: арил-гидрокарбоновый рецептор AHR, цитохромы P450 семейства CYP1, остеосаркома, индирубин, индол-3-карбинол, первичные культуры

Остеогенная саркома, или остеосаркома – первичная злокачественная опухоль, происходящая из костной ткани. Является наиболее распространенным злокачественным процессом в костях. Эти опухоли характеризуются быстрым прогрессирующим ростом, ранним метастазированием, частым возникновением рецидивов после оперативного лечения и заканчиваются, как правило, фатально. Остеосаркома чаще наблюдается у молодых пациентов, пик заболеваемости приходится на период быстрого роста: 10–14 лет у девочек и 15–19 лет у мальчиков [1]. Несмотря на большое количество проведенных исследований, направленных на оптимизацию режимов системной терапии сарком [2–4], эффективность терапии этих злокачественных новообразований остается низкой. Накопленные данные свидетельствуют о необходимости изучения факторов, влияющих на прогноз заболевания и результатов химиотерапии, а также поиска альтернативных методов лечения остеосарком.

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) – лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. На данный момент известно большое количество соединений, которые могут выступать в качестве лиганда для AHR, среди них пищевые вещества,

природные и синтетические флавоноиды, а также фармацевтические препараты, в том числе применяемые в онкотерапии [5–7].

В неактивном состоянии AHR существует в цитоплазме в мультипептидном комплексе с димером белка теплового шока HSP90 (Heat Shock Protein 90), кошапероном p23 и белком AIP (AHR Interacting Protein). После связывания лиганда с AHR комплекс диссоциирует и AHR перемещается в ядро, где связывается с ядерным переносчиком AHR – ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [8]. Образованный гетеродимер AHR:ARNT взаимодействует с регуляторными элементами *XRE* (Xenobiotic Response Element) генов-мишеней, что приводит к инициации их транскрипции [9–11].

Наиболее изученными мишенями AHR являются гены, кодирующие ферменты метаболизма ксенобиотиков, а именно – ферменты системы цитохрома P450 (cytochrome P450, CYP). В настоящее время известно, что во многих опухолевых клетках изменения соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности отличаются от таких изменений в неопухолевых клетках, и это может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

В настоящее время AHR рассматривают в качестве потенциальной мишени для противорако-

вой терапии [5–7, 12, 13]. Несмотря на множество работ, посвященных изучению активности АНР при разных типах онкологических заболеваний, среди них мало исследований, касающихся его роли в злокачественных новообразованиях костей, в частности, при остеогенных саркомах [14, 15].

Целью нашей работы стало исследование функциональной активности АНР в первичных культурах клеток остеогенных сарком человека после воздействия на них его экзогенных лигандов.

Материалы и методы

Получение первичных культур клеток остеогенной саркомы. Образцы опухолевой ткани были получены в 2018 г. из биопсийного материала больных с диагнозом «конвенциональная остеогенная саркома, остеобластический вариант». Пациенты мужского и женского пола в возрасте 14–16 лет, химиотерапевтическое лечение до взятия биопсийного материала не проводилось. Опухолевые образцы транспортировали в лабораторию в течение 2–3 ч в бессывороточной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 100 мкг/мл гентамицина (Микроген, Россия). Далее полученную ткань обрабатывали механически и ферментативно (раствор трипсина-ЭДТА 0,25%, ПанЭко, Россия) до получения клеточной суспензии, которую переносили во флаконы (Corning Costar, США) со средой DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина (50 мкг/мл).

Клеточные линии и условия культивирования. Линии клеток эмбриональной почки человека НЕК293 и мезенхимальных стволовых клеток MSC культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия) и гентамицина в концентрации 50 мкг/мл.

Обработка клеток лигандами. Первичные культуры клеток остеосаркомы рассеивали на 6-луночные чашки и через сутки в клеточную среду добавляли лиганды с конечной концентрацией 100 нМ для индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мкМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия). Стоковые растворы лигандов были приготовлены с использованием ДМСО (диметилсульфоксид; ПанЭко, Россия). Соответствующее количество ДМСО было добавлено к контрольному образцу клеток. Клетки инкубировали с лигандами в течение 24 ч.

Выделение РНК, ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью RNeasy RT reagent (Sigma-Aldrich, США) по протоколу производителя. Качество выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,01% бромистого

этидия. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени — с помощью набора реактивов qPCRMix-HS SYBR+HighRox (Евроген, Россия). Реакцию ставили в амплификаторе ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, США). Условия амплификации: 95° — 5 мин, затем 40 циклов (95° — 15 с, 60° — 15 с, 72° — 30 с). В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *HPRT1*. Уровень экспрессии генов оценивали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой — *TGCACCACCAACTGCTTAGC*, обратный — *GGCATGGACTGTGGTCATGAG*; для гена *HPRT1*: прямой — *TGAGGATTTGGAAAGGGTGT*, обратный — *GAGCACACAGAGGGCTACAA*; для гена *CYP11A1*: прямой — *GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC*, обратный — *CCAAAGAGGTCCAAGACGATGTTA*; для гена *CYP11A2*: прямой — *ATCCTGGAGACCTTCCGACACT*, обратный — *GATGTAGAAGCCATTCAGCGTTGTG*; для гена *CYP11B*: прямой — *CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC*, обратный — *AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT*. Для каждого образца было сделано три повтора. Статистическую значимость различий между образцами оценивали с помощью программного обеспечения REST (Qiagen, США) [16]. Значение $p < 0,05$ считали значимым.

Вестерн-блоттинг. Общий клеточный белок выделяли в буфере по Лэммли (10% SDS, 50 мМ Tris-HCl pH 6,8, 25% глицерина, 0,05% бромфенолового синего и 6% 2-меркаптоэтанола). Белковый экстракт разделяли с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле в камере Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя, белки переносили на мембрану Hybond ECL (Sigma Aldrich, США). Мембрану инкубировали в буфере TBS-T (10 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,1% Tween 20), содержащем 2% BSA, в течение 1 ч, а затем инкубировали с первичными антителами при 4°С в течение ночи (против АНР — D5S6H, Cell Signaling Technology, США, 1:7000; против *GAPDH* — ab9385, Abcam, Великобритания, 1:10000). После этого мембрану отмывали в буфере TBS-T 3 раза по 20 мин и инкубировали со вторичными антителами (C1313, Santa Cruz, США, 1:12000) в течение 2 ч при комнатной температуре. Иммунокомплексы выявляли с помощью набора реактивов ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Sigma Aldrich, США).

Результаты и обсуждение

Были получены три первичные культуры из биопсийного материала злокачественных опухо-

лей костной ткани остеогенной саркомы человека (O.src 25/16, O.src 17/18, O.src 20/18). Во всех культурах остеосаркомы было обнаружено повышенное содержание белка АНР по сравнению с неопухолевыми клетками HEK293 и MSC (рис. 1).

Также мы сравнили исходный уровень экспрессии генов *CYP* в культурах клеток остеосаркомы без активации АНР лигандами. Самый высокий уровень экспрессии гена *CYP1A1* наблюдался в культуре O.src20/18, гена *CYP1A2* – в O.src17/18, а гена *CYP1B* – в культуре O.src25/16 (рис. 2).

Функциональная активность АНР оценивалась по изменению экспрессии генов семейства 1 цитохрома Р450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) после воздействия на клетки его известных экзогенных лигандов – индирубина и индол-3-карбинола.

При сравнении уровня экспрессии генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) в полученных культурах остеогенных сарком были выявлены различия в интенсивности активации генов-мишеней разными лигандами. В культуре O.src17/18 уровень экспрессии *CYP1A1* повышался в 7 раз при добавлении индирубина, но при добавлении индол-3-карбинола – только в 2 раза, при этом уровень

экспрессии других генов, *CYP1A2* и *CYP1B*, практически не менялся (рис. 3А). В клеточной культуре остеосаркомы O.src 20/18 было выявлено, что при добавлении индол-3-карбинола уровни экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B* повышаются в 2 и в 3 раза соответственно, но не меняются при добавлении индирубина, а уровень экспрессии гена *CYP1A2* снижается после добавления лигандов (рис. 3Б). При анализе экспрессии генов-мишеней в культуре O.src25/16 после добавления лигандов уровень экспрессии гена *CYP1A1* повышался в 32 и 49 раз, уровень гена *CYP1A2* увеличивался в 12 и 15 раз, при этом экспрессия гена *CYP1B* под воздействием лигандов повышалась не более чем в 3 раза (рис. 3В).

В таблице (рис. 3Г) приведены суммарные результаты по анализу изменения уровня экспрессии генов-мишеней АНР после воздействия лигандов на первичные культуры клеток остеогенной саркомы.

В наших сравнительных экспериментах мы обнаружили, что в большинстве случаев АНР функционально активен как лиганд-зависимый транскрипционный фактор генов-мишеней семейства *CYP* в первичных культурах клеток остео-

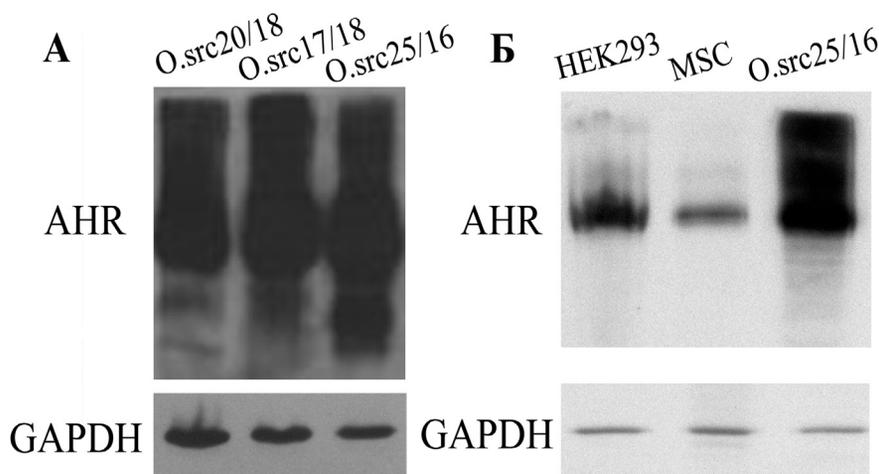


Рис. 1. Иммуноблот-анализ белка АНР в полученных нами клеточных культурах остеогенных сарком O.src20/18, O.src17/18, O.src25/16 (А) и в клеточных линиях неопухолевого (HEK293, MSC) происхождения (Б). Белок GAPDH использовался как референсный.

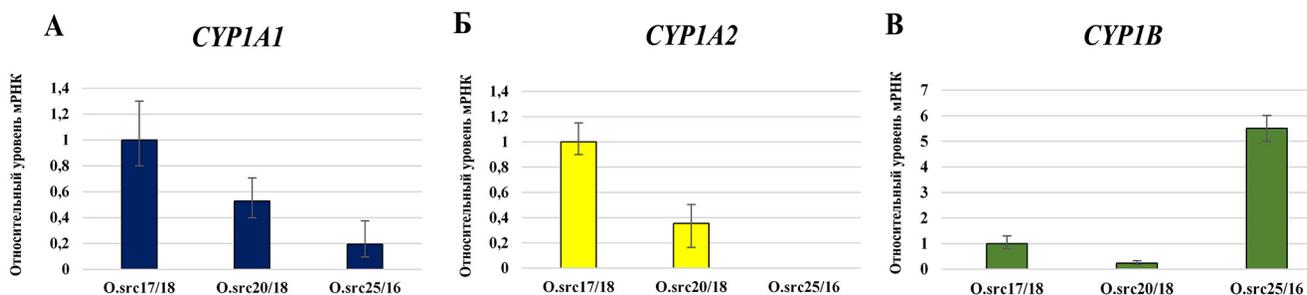


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *CYP* в клеточных культурах остеосарком без активации АНР лигандами: А–В: Уровень экспрессии выровнен относительно клеточной линии O.src17/18. На оси ординат представлено значение $R = 2\Delta Ct$, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *HPRT1*.

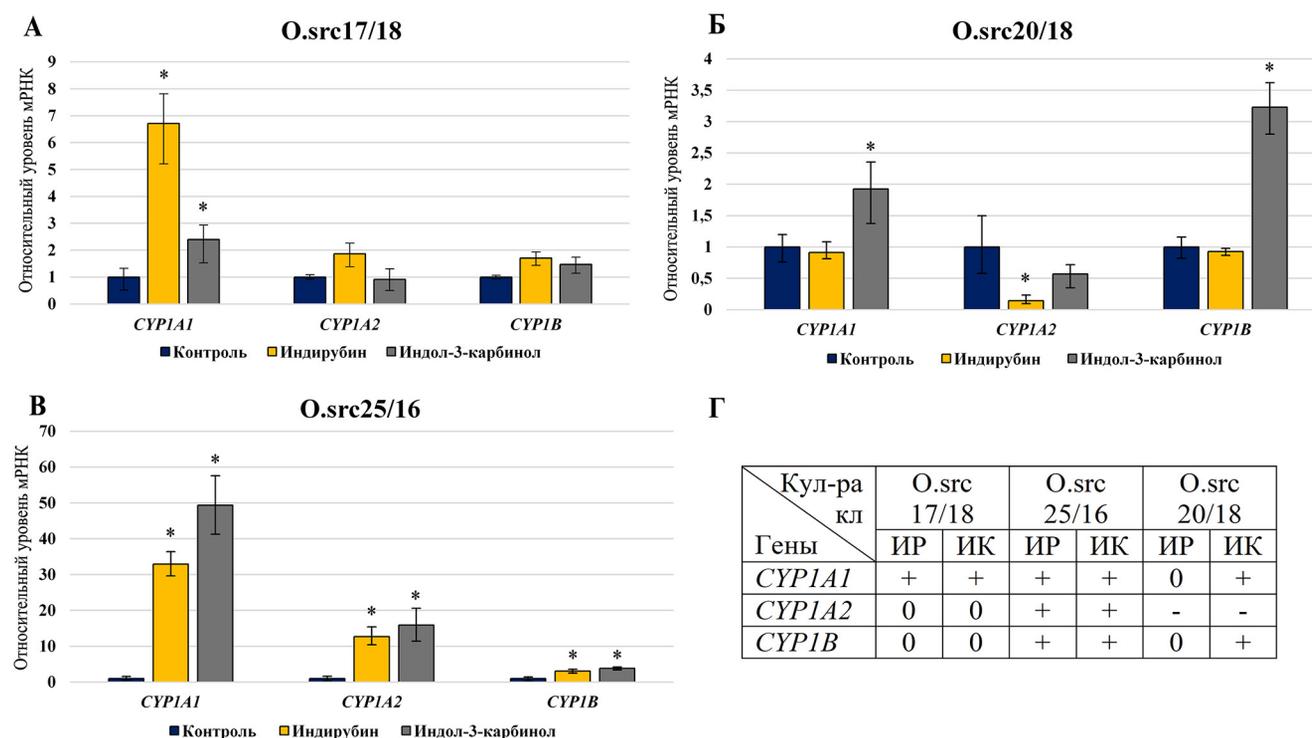


Рис. 3. Уровень экспрессии генов-мишеней АНР (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) в первичных клеточных культурах остеосарком до (контроль) и после добавления лигандов (индирубин, индол-3-карбинол). А – O.src20/18, Б – O.src17/18, В – O.src26/16. На оси ординат представлено значение $R = 2\Delta Ct$, т.е. отношение количества мРНК целевого гена к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *GAPDH* и *HPRT1*. Звездочка указывает на значимое различие в экспрессии генов по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Г – Направленность изменения относительного уровня экспрессии генов *CYP* после добавления лигандов. Условные обозначения: «+» – уровень транскрипции повышался, «-» – уровень транскрипции понижался, «0» – уровень транскрипции не менялся (все – относительно контрольной группы). ИР – индирубин, ИК – индол-3-карбинол. Кул-ра кл. – культура клеток остеогенной саркомы.

саркомы. Интересно, что гены-мишени одного семейства цитохромов P450, участвующие в процессах метаболизма, по-разному реагировали на воздействие лиганда в пределах одной культуры клеток. Также была различна интенсивность активации одного и того же гена разными лигандами.

Возможно, последствия активации АНР в культурах остеогенных сарком зависят от дополнительных факторов, например, от эпигенетического статуса его целевых генов и наличия неизвестных эндогенных лигандов, что требует дальнейшего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amankwah E.K., Conley A.P., Reed D.R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma // Clin. Epidemiol. 2013. Vol. 5. P. 147–162.
2. Ritter J., Bielack S.S. Osteosarcoma // Ann. Oncol. 2010. Vol. 21. Suppl. 7. P. 320–325.
3. Hattinger C.M., Serra M. Role of pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in treating osteosarcoma // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2015. Vol. 11. N 9. P. 1449–1463.
4. Byrgazov K., Anderson C., Salzer B., Bozsaky E., Larsson R., Gullbo J., Lehner M., Lehmann F., Slipicevic A., Kager L., Fryknäs M., Taschner-Mandl S. Targeting aggressive osteosarcoma with a peptidase-enhanced cytotoxic melphalan flufenamide // Ther. Adv. Med. Oncol. 2020. Vol. 12: e1758835920937891.

Авторы выражают благодарность Пантелееву Дмитрию Юрьевичу, сотруднику Института биологии гена РАН, за помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0001. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с человеческим материалом, установленными этической комиссией Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

5. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy // Biochem. (Mosc.), Suppl., Ser. B Biomed. Chem. 2019. Vol. 13. N 1. P. 36–54.
6. Feng S., Cao Z., Wang X. Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1836. N 2. P. 197–210.
7. Safe S., Jayaraman A., Chapkin R.S. Ah receptor ligands and their impacts on gut resilience: structure-activity effects // Crit. Rev. Toxicol. 2020. Vol. 50. N 6. P. 463–473.
8. Pollenz R.S., Barbour E.R. Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation // Mol. Cell Biol. 2000. Vol. 20. N 16. P. 6095–6104.

9. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis // *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 59. N 1. P. 65–85.

10. Beischlag T.V., Luis Morales J., Hollingshead B.D., Perdue G.H. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2008. Vol. 18. N 3. P. 207–250.

11. Pollenz R.S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation // *Chem. Biol. Interact.* 2002. Vol. 141. N 1–2. P. 41–61.

12. Narasimhan S., Stanford Zulick E., Novikov O., Parks A.J., Schlezinger J.J., Wang Z., Laroche F., Feng H., Mulas F., Monti S., Sherr D.H. Towards resolving the pro- and anti-tumor effects of the aryl hydrocarbon receptor // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. N 5. e1388.

13. Murray I.A., Morales J.L., Flaveny C.A., Dinatale B.C., Chiaro C., Gowdahlalli K., Amin S., Perdue G.H. Evidence for ligand-mediated selective modula-

tion of aryl hydrocarbon receptor activity // *Mol. Pharmacol.* 2010. Vol. 77. N 2. P. 247–254.

14. Miki Y., Hata S., Ono K., Suzuki T., Ito K., Kumamoto H., Sasano H. Roles of aryl hydrocarbon receptor in aromatase-dependent cell proliferation in human osteoblasts // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 10: 2159.

15. Montazeri-Najafabady N., Dabbaghmanesh M.H., Chatrabnous N., Arabnezhad M.R. The effects of astaxanthin on proliferation and differentiation of MG-63 osteosarcoma cells via aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway: A comparison with AhR endogenous ligand // *Nutr. Cancer.* 2019. Vol. 72. N 8. P. 1400–1410.

16. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30. N 9: e36.

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 27.09.2020 г.

Принята в печать 09.10.2020 г.

SHORT COMMUNICATION

Functional activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures

Yu.E. Vorontsova* , A.A. Akishina , R.O. Cherezov , O.B. Simonova 

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Russia, 119334, Moscow, Vavilov Street, 26.

*e-mail: vorontsova@idbras.ru

Osteosarcoma is the most prevalent bone malignant tumor with a high mortality rate among children and adolescents. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor associated with xenobiotic detoxification and carcinogenesis. It is known that some AHR ligands are included in the composition of drugs used in cancer therapy. However there are few works devoted to the study of their effect on osteosarcoma cells. In this work, three primary cell cultures were obtained from biopsy material of malignant bone tumors of human osteosarcoma. AHR protein levels were high in all primary osteosarcoma cell cultures. The functional activity of AHR in osteosarcoma cells was estimated by induction of its target genes by known exogenous ligands: indirubin and indole-3-carbinol. The genes of Cytochrome P450 1 family were analyzed as AHR target genes: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*. It was shown that the aryl-hydrocarbon receptor is functionally active in all cultures, but the target genes were induced differently by ligand treatment within the same cell culture.

Keywords: *aryl hydrocarbon receptor AHR, cytochrome P450 family CYP1, osteosarcoma, indirubin, indol-3-carbinol, cell culture*

Сведения об авторах

Воронцова Юлия Евгеньевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: vorontsova@idbras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3378-1515>

Акишина Ангелина Александровна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ilitiri@bk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3428-7287>

Черезов Роман Олегович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: ro-tcherezov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3955-9771>

Симонова Ольга Борисовна — докт. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: osimonova@hotmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9439-524X>