

ОСОБЕННОСТИ АССОЦИИРОВАННОГО СО СТАРЕНИЕМ СЕКРЕТОРНОГО ФЕНОТИПА ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ (ГИСТ)

Б.Р. Рамазанов¹, С.В. Бойчук¹, А.А. Ризванов²

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Features of senescence associated secretory phenotype (SASP) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs)

B.R. Ramazanov¹, S.V. Boichuk¹, A.A. Rizvanov²

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Целью исследования стало изучение механизма клеточного старения и ассоциированного со старением секреторного фенотипа опухолевых клеточных линий в ответ на генотоксическое воздействие доxorубина.

В исследовании использовали следующие клеточные линии: фибробласты человека линии BJ, клетки остеосаркомы человека линии U-2 OS и клеточную линию гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST-T1. Генотоксический стресс индуцировали внесением доxorубина в концентрации 0,25 мкг/мл. Продолжительность инкубации клеток с химиопрепаратом составляла 5 ч. Наличие двуниевых разрывов в клетках оценивали по уровню экспрессии и фокальному накоплению фосфорилированной формы гистона 2A (γ -H2AX), а запуск сигнальных путей репарации двуниевых разрывов ДНК оценивали по фокальному распределению фосфорилированной формы АТМ-киназы (pATM Ser1981). Синтез опухолевыми клетками интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) оценивали методом ИФА на 3, 6, 9, 12 сут. культивирования после 5-часовой экспозиции с доxorубином.

Установлено, доxorубин индуцирует повреждения ДНК, что запускает процессы клеточного старения. Выявлено, что результатом воздействия доxorубина на фибробласты человека и опухолевые клетки U-2 OS является значительное и время-зависимое увеличение уровня секреции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8, в то время как GIST-T1 в аналогичных условиях секретируют исключительно ИЛ-6.

В отличие от нетрансформированных клеток, опухолевые клетки после экспозиции с доxorубином претерпевают необратимое повреждение ДНК, активацию программы клеточного старения и продуцируют провоспалительные цитокины (ИЛ-6, 8). Связанный со старением секреторный фенотип в клетках GIST-T1 отличается от фенотипа, выявленного у других раковых и нормальных клеток. Это может быть принято во внимание в ходе разработки новых методов лечения пациентов с GIST-T1.

Ключевые слова: клеточное старение, секреторный фенотип, гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСТ), ИЛ-6, ИЛ-8, доxorубин.

Активация многочисленных путей репарации повреждений ДНК, так же, как и запуск программы клеточного старения являются общепризнанными барьерами опухолевой трансформации клеток [1]. Известно, что одним из главных факторов, инициирующим каскад реакций, направленных как на репарацию повреждений ДНК, так и активацию программы клеточного старения является повреждение ДНК, именуемое как «генотоксический стресс» [2]. Клетки, подвергающиеся старению, характеризуются рядом особенностей: остановкой клеточного цикла, изменением морфологии клеток и организации хроматина, повышением активности СА- β -галактозидазы в цитоплазме, а также секрецией провоспалительных цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и протеаз [3]. В то время как индук-

To study the cellular senescence mechanisms and senescence-associated secretory phenotype of the tumor cell lines in response to doxorubicin exposure.

The cell lines indicated above were used in present study: human fibroblasts lines BJ, human osteosarcoma cell line U-2 OS and gastrointestinal stromal tumor cell line GIST-T1. Genotoxic stress was induced by the transient exposure of doxorubicin (0.25 μ g / ml) for 5 hours. DNA double-strand breaks formation was assessed by an increased expression and focal accumulation of the phosphorylated form of histone 2A (γ -H2AX), whereas the activation of DNA repair pathway was assessed by focal accumulation of the phosphorylated form of ATM-kinase (pATM Ser1981). An increase of β -galactosidase activity was estimated by X-gal assay (5-bromo-4-chloro-3-indo-beta-D-galactoside). Interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) production was assessed by ELISA at 3, 6, 9, 12 days after 5h exposure to doxorubicin.

Incubation of the tumor cell lines with doxorubicin induced DNA damage which triggered the DNA damage response (DDR) and activated a cellular senescence program associated with typical morphological changes, decrease of Lamin B1 expression and accumulation of β -galactosidase in the cytoplasm known as a traditional senescence markers. We observed a significant increase of IL-6 and IL-8 production in doxorubicin-treated human fibroblasts and tumor U-2 OS cells, whereas GIST-T1 cells secreted IL-6 only.

In contrast to non-transformed cells, tumor cells after being exposed to doxorubicin triggered a permanent DNA damage, activation of cellular senescence program and production of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and -8). Senescence-associated secretory phenotype (SASP) in GIST-T1 cells differs from the phenotype observed in the other of cancer cells and normal cells, as well. This might be taken into account during the development of the novel treatment options for the patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs).

Key words: cellular senescence, senescence associated secretory phenotype (SASP), gastrointestinal tumors (GISTs), IL-6, IL-8, doxorubicin.

ция процессов старения в ответ на генотоксическое действие химиопрепаратов и лучевой терапии направлена на относительно быстрое подавление пролиферации опухолевых клеток, сам процесс клеточного старения является достаточно протяженным во времени и сопровождается секрецией множества факторов, которые позже были объединены в название «секреторный фенотип, ассоциированный со старением» (от англ. – senescence associated secretory phenotype (SASP)). Показано, что через секрецию данных факторов стареющие клетки способны оказывать влияние на свое микроокружение, в том числе, воздействовать на процессы пролиферации, дифференцировки и выживания соседних клеток [4]. В результате вокруг стареющих клеток могут создаваться благоприятные условия для роста

e-mail: boichuksergei@mail.ru

и размножения клеток, в том числе, для клеток со злокачественным фенотипом [5]. Таким образом, с одной стороны, процесс клеточного старения следует считать важным механизмом, предотвращающим пролиферацию потенциально злокачественных клеток. С другой стороны, наличие у стареющих клеток секреторного фенотипа может оказывать противоположный эффект и вызывать усиление пролиферации опухолевых клеток различного происхождения [6].

Одним из основных компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением, является продукция провоспалительных цитокинов, в частности, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и 8 (ИЛ-8). Известно, что ИЛ-6 является цитокином широкого спектра действия и способен регулировать процессы пролиферации, дифференцировки, а также выживания клеток [7]. Интерлейкин-8 хорошо известен как фактор хемотаксиса нейтрофилов, в качестве клеток-мишеней данного хемокина могут выступать и эндотелиальные клетки, миграция и пролиферация которых определяет эффективность процессов неоангиогенеза, что, в свою очередь, играет важную роль в кровоснабжении и метастазировании опухолей [8]. Установлено, что секреторный фенотип стареющих клеток, а именно экспрессия интерлейкина-6 может зависеть от функциональной активности белков системы распознавания и репарации повреждений ДНК, а именно киназ ATM, NBS1 и CHK2, но не зависит от активационного статуса белка p53 [9]. Данные провоспалительные цитокины совместно с некоторыми онкогенами способны принимать активное участие в процессах канцерогенеза [10, 11].

Несмотря на достаточно обширные представления о роли процессов старения как анти-ракового барьера, так и факторе опухолевой прогрессии, молекулярные механизмы регуляции данного процесса, а также факторов, определяющих секреторный фенотип стареющих клеток, остаются не до конца изученными. В настоящем исследовании была предпринята попытка изучить пусковые механизмы клеточного старения и особенности секреторного фенотипа нормальных и опухолевых клеток различного происхождения.

Материал и методы

В исследовании использовали следующие клеточные линии: фибробласты человека линии BJ, клетки остеосаркомы человека линии U-2 OS и клеточную линию гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST T1. Культивирование клеток проводили с использованием соответствующих питательных сред (DMEM и RPMI, ПанЭко, Россия) с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), антибиотиков и L-глутамин (ПанЭко, Россия). Генотоксический стресс индуцировали внесением доксорубина (Sigma, США) в концентрации 0,25 мкг/мл. Продолжительность инкубации с химио-препаратом составляла 5 часов, после чего клетки 5-кратно отмывали от препарата полной культуральной средой и культивировали в течение последующих 10 дней.

Возникновение двунитевых разрывов ДНК и активацию сигнальных репаративных путей проводили методом иммунофлуоресцентной микроскопии (Olympus BX63F) по оценке фокального распределения фосфорилированных форм гистона 2A по

остаткам серина 139 (γ -H2AX) и ATM-киназы (pATM S1981), соответственно. С этой целью были использованы моноклональные АТ к фосфорилированным формам гистона 2A (H2AX Ser139, Millipore, США), ATM-киназы (pATM Ser1981, Rockland, США). В качестве вторичных антител использовали антитела, меченые Alexa-Fluor-488 (Invitrogen, США) и Cy3+ (Jackson ImmunoResearch, США).

Изменения в уровне экспрессии белков γ -H2AX, ламина B1 и актина до и после воздействия химио-препарата также оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител (Cell Signaling, Santa Cruz и Abcam, соответственно). Для выявления двунитевых разрывов ДНК и активации репарации возникших повреждений оценивали уровень экспрессии фосфорилированных форм гистона 2A (H2AX Ser139) и ATM-киназы (pATM Ser1981) (Cell Signaling и Abcam, соответственно).

Накопление SA- β -галактозидазы в клетках оценивали с помощью реагента X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактозида) по общепринятой методике. Изменение морфологии клеток регистрировали на микроскопе Leica DM IL (Германия).

Синтез опухолевыми клетками интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) оценивали методом ИФА (Вектор-Бест, Россия) на 3, 6, 9, 12 сут. культивирования после инкубации с доксорубицином (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

Было обнаружено, что кратковременная (в течение 5 ч) инкубация всех вышеперечисленных опухолевых клеточных линий с ингибитором топоизомеразы II типа доксорубицином и последующее их культивирование в питательной среде индуцирует процесс клеточного старения, о чем свидетельствовали как время-зависимое изменение морфологии клеток и увеличение их размеров, так и накопление в их цитоплазме фермента β -галактозидазы (рис. 1). Известно, что данный фермент накапливается в лизосомах и других органеллах клеток в процессе клеточного старения, и осуществляет функцию деградаци (расщепления) дефектных биомолекул [12]. Поэтому, повышение уровня экспрессии β -галактозидазы в клетках в настоящее время рассматривается в качестве одного из основных маркеров клеточного старения [13].

Предполагается, что одним из главных факторов, запускающих процесс клеточного старения, является наличие нерепарируемых повреждений ДНК. Для подтверждения правомочности данной гипотезы, был проведен анализ уровня экспрессии гистона 2A, фосфорилированной по остаткам серина в положении 139 (γ -H2AX), являющегося, как известно, общепризнанным маркером повреждений ДНК, а именно, двунитевых разрывов. Было показано, что в клетках остеосаркомы человека линии U-2 OS (в отличие от нетрансформированных клеток, например, фибробластов линии BJ), после кратковременного воздействия на них доксорубина происходит транзитное снижение уровня экспрессии γ -H2AX, но дальнейшее культивирование клеток приводит к существенному повышению уровня экспрессии данного маркера (рис. 2). Важно отметить, что аналогичные результаты были получены и на других опухолевых клеточных линиях, например, на клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей GIST-T1.

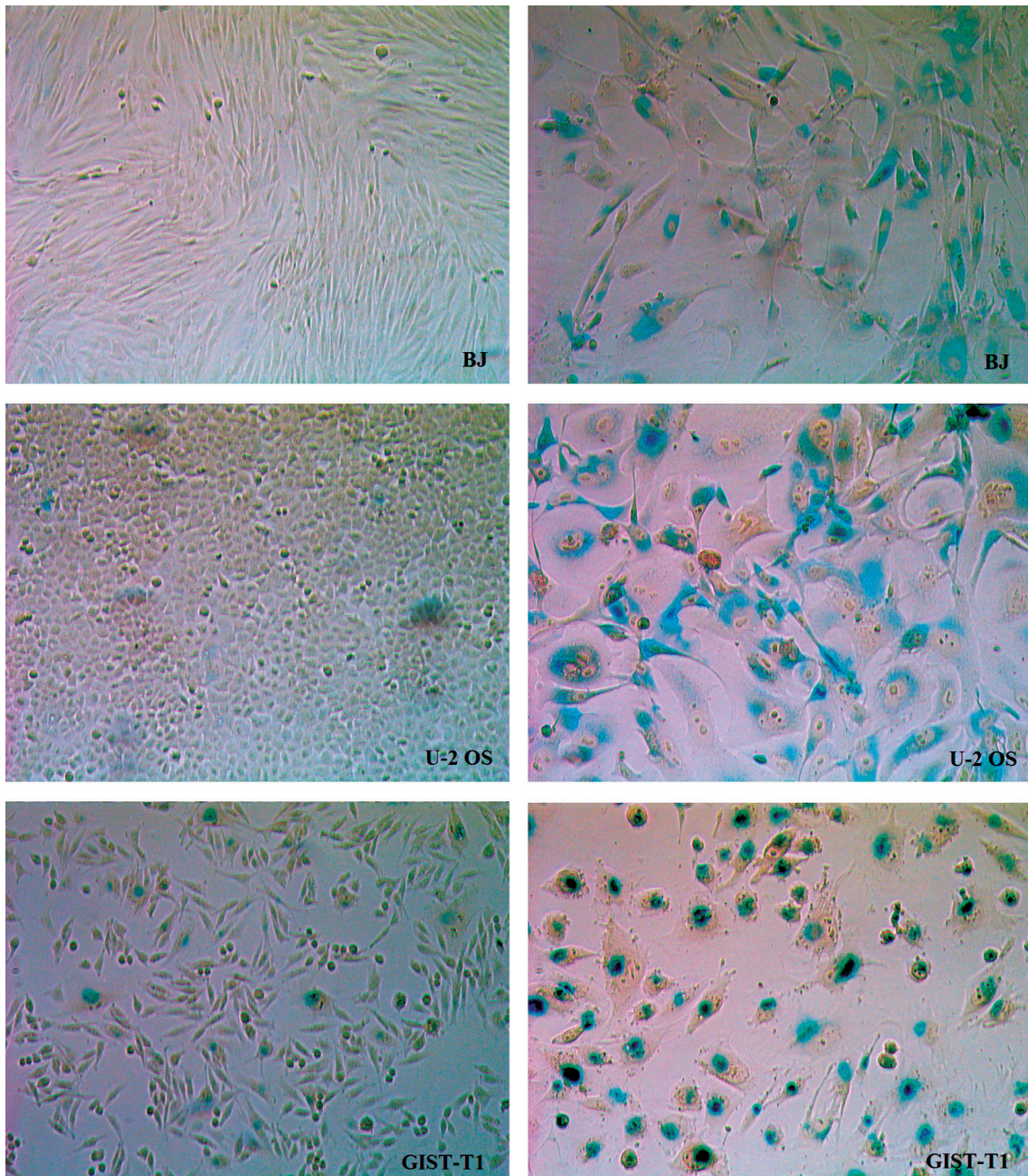


Рис. 1. Накопление β-галактозидазы клетками линий BJ, U-2 OS и GIST-T1 после генотоксического стресса, вызванного химиопрепаратом доксорубицин: слева – контроль; справа – 12 сут. после генотоксического стресса. Окраска: X-gal. Ув. ×100

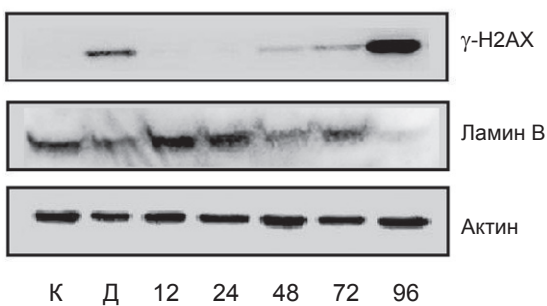


Рис. 2. Уровень экспрессии фосфорилированной формы гистона H2AX, ламина B1 и белка актина. Цифрами указано время после 5-часовой экспозиции доксорубицином (ч); К – контроль; Д – экспозиция доксорубицина в течение всего эксперимента

Этот факт свидетельствует о несостоятельности репаративных процессов в исследованных нами опухолевых клетках. Примечательно, что повышение уровня экспрессии γ -H2AX в опухолевых клетках находилось в обратной зависимости от уровня экспрессии ядерного белка ламина В1. Исследования последних лет показали, что уровень экспрессии данного белка в клетках снижается при запуске механизмов старения, индуцированных различными стимулами, такими как экспрессия онкогена, повреждений ДНК и пр. [14]. Следовательно, снижение уровня экспрессии данного белка может являться одним из универсальных маркеров клеточного старения.

Очевидно, что анализ уровня экспрессии белков не может отражать реакции каждой индивидуальной клетки в ответ на повреждение ДНК, а, следовательно, не исключает возможности развития процессов старения в опухолевых клетках без признаков генотоксического стресса. В то же время, в ряде случаев уровень экспрессии определенных белков в индивидуальных клетках может быть очень высоким и, тем самым, нивелировать тенденцию изменений уровня экспрессии белков в общей популяции клеток.

Поэтому, для получения прямых доказательств о причинно-следственной связи между возникновением нерепарируемых повреждений ДНК (а именно, двуниевых разрывов) и клеточным старением была произведена оценка уровня экспрессии γ -H2AX и морфологических на уровне индивидуальных клеток с помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии.

Результаты проведенных исследований показали, что на 5-е сут. после транзиторной индукции повреждений ДНК химиопрепаратом, в опухолевых клетках происходят значительные морфологические изменения, которые сопровождаются фокальным распределением γ -H2AX (рис. 3Б). Фосфорилированная форма гистона 2A экспрессировалась исключительно в клетках с признаками старения, в то время как в клетках контрольной группы, а также в клетках с неизменной морфологией в опытной группе аналогичных изменений не наблюдалось (рис. 3А и 3Б, соответственно). Примечательно, что часть клеток с признаками старения погибала по механизму апоптоза (рис. 3В), в то время как оставшиеся в живых клетки продолжали длительное время оставаться жизнеспособными и экспрессировать данную форму гистона. Было также отмечено, что в клетках с признаками старения фокальное распределение γ -H2AX имеет высокий процент ко-локализации с фосфорилированной формой АТМ-киназы (рис. 4), что свидетельствовало о несостоятельности эффекторных механизмов репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках несмотря на активацию сигнальных путей повреждений ДНК.

Учитывая литературные данные, свидетельствующие о корреляции между повышенным уровнем экспрессии интерлейкина-6 и функциональной активностью систем распознавания/репарации повреждений ДНК (особенно двуниевых разрывов), логичным, на наш взгляд, являлось изучение уровня секреции определенных цитокинов (в первую очередь, ИЛ-6) в нашей экспериментальной модели.

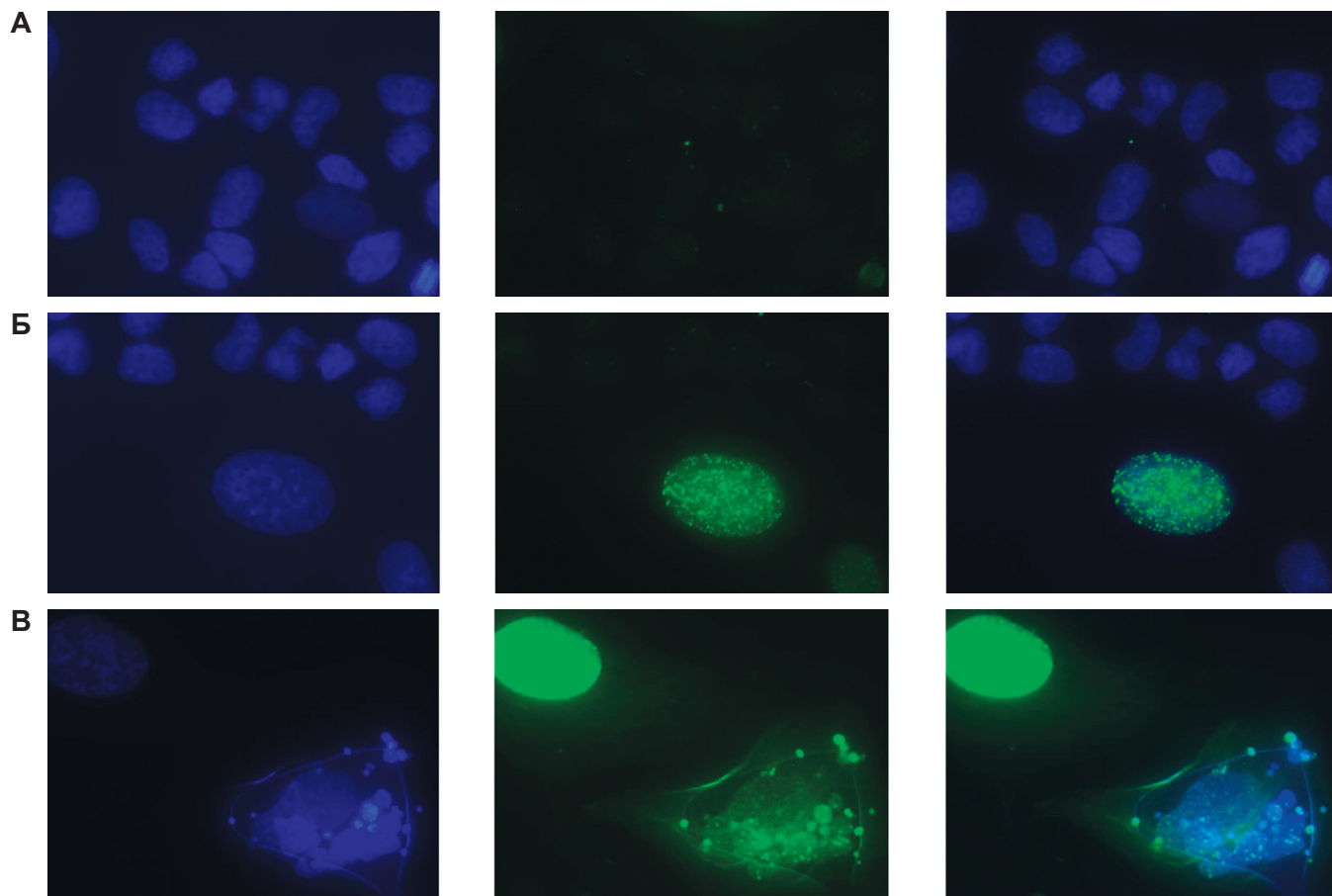


Рис. 3. Распределение фосфорилированной формы гистона 2A (γ -H2AX) в клетках U2-OS: А – контроль; Б, В – доксорубин (96 ч). Зеленое свечение – гистон 2A. Окраска ядер – DAPI (синий цвет)

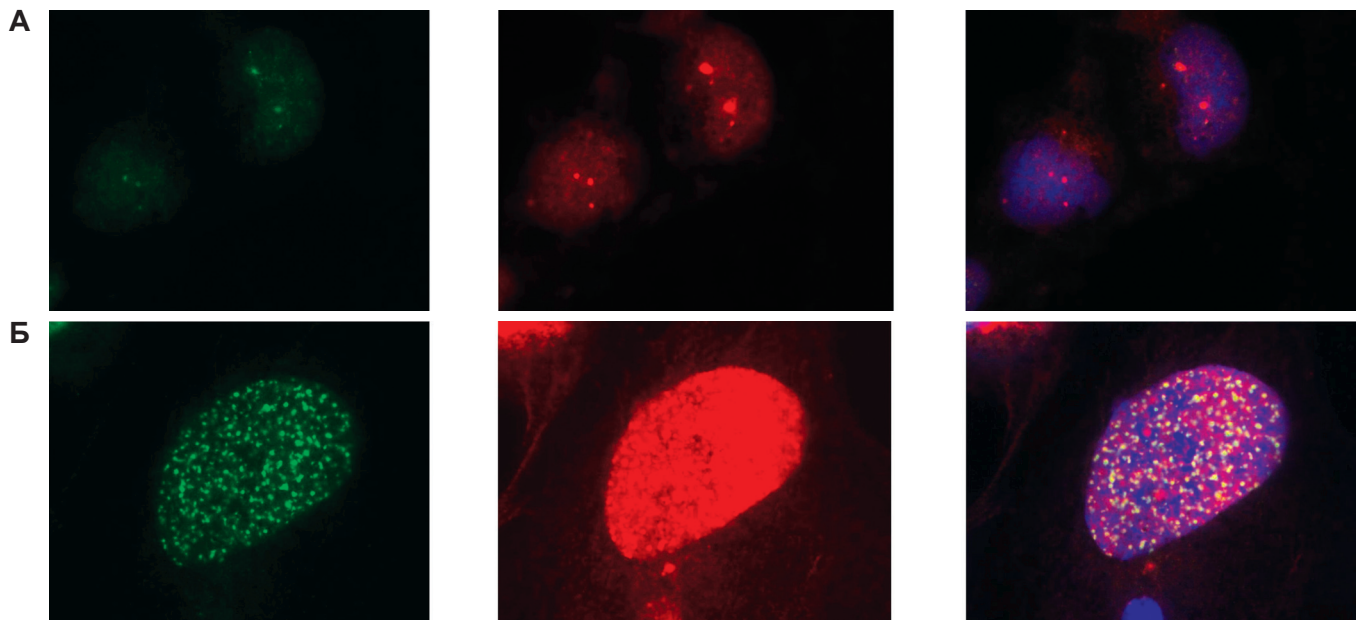


Рис. 4. Распределение фосфорилированных форм гистона 2A (γ -H2AX) (зеленый) и АТМ-киназы (красный) в клетках ГИСТ: А – контроль; Б – доксорубин (96 ч). Окраска ядер – DAPI (синий цвет)

Нами было выявлено, что фибробласты человека линии ВJ и опухолевые клетки U-2 OS даже в физиологических условиях секретируют фоновые уровни ИЛ-6 и ИЛ-8, что было подтверждено методом ИФА (иммуноферментного анализа) к данным цитокинам (рис. 5). Кратковременная инкубация клеток с доксорубином вызывала значительное повышение концентрации вышеперечисленных цитокинов в супернатантах клеточных культур. Тем не менее, мы обнаружили, что в то время как клетки линии остеосаркомы U2-OS наряду с ИЛ-6 также секретировали повышенные количества ИЛ-8, клетки GIST-T1 не обладали аналогичной способностью.

Обнаруженные нами различия в секреторном фенотипе, ассоциированном с процессами старения, между опухолевыми клетками остеосаркомы и гастроинтестинальных стромальных опухолей, вызывает безусловный интерес и может обуславливать особенности патогенеза данных заболеваний. Следует отметить, что ИЛ-8 имеет важное прогностическое значение в терапии злокачественных новообразований, повышение его уровня способствует инвазивному росту и прогрессированию опухолей [15]. Было установлено, что ИЛ-8 через связыва-

ние с рецепторами CXCR1 и CXCR2 способен активировать тирозинкиназы Crs и FAK (от англ. p125 focal adhesion kinase), тем самым усиливать пролиферацию, выживаемость, миграцию и инвазивность опухолевых клеток, а также приводить к химиорезистентности [16, 17]. ИЛ-8, продуцируемый опухолевыми клетками, усиливает метастазирование опухолевой ткани, а через индукцию и дифференцировку остеокластов способен приводить к остеолитической диссеминации некоторых типов рака молочной железы [18]. Продукция данного цитокина в опухолевых клетках может носить аутокринный или паракринный характер и служить «спасательным» механизмом для опухолевых клеток от стресс-индуцированного апоптоза [19].

Следует принимать во внимание, что основные виды нехирургического лечения больных со злокачественными новообразованиями основаны на индукции в опухолевых клетках генотоксического стресса (химио- и радиотерапия) и могут вызвать состояние клеточного старения, сопровождающееся снижением опухолевой массы и роста. В то же время секреторный фенотип клеток, находящихся в данном состоянии, может существенным образом повышать

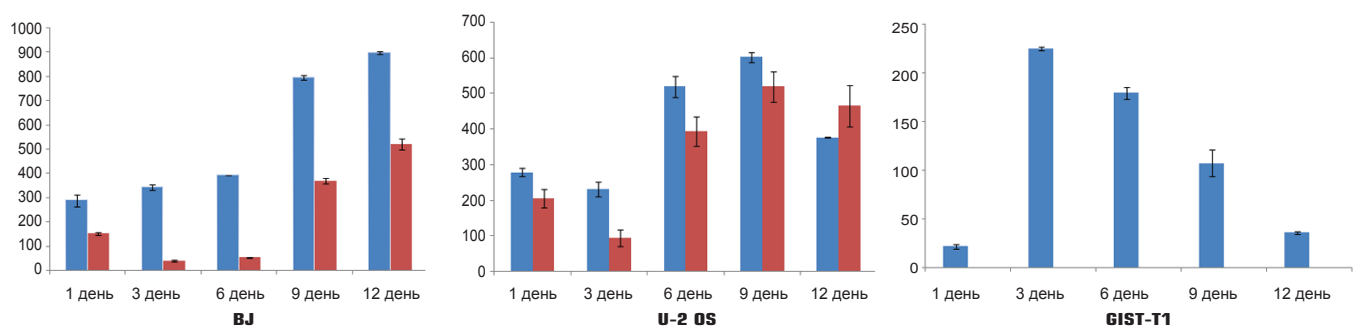


Рис. 5. Концентрации интерлейкина-6 и интерлейкина-8, в супернатантах клеток линий ВJ, U-2 OS и GIST-T1 на различных сроках после генотоксического стресса, вызванного доксорубином. Синим обозначены уровни концентрации ИЛ-6 (пг/мл), красными – ИЛ-8 (пг/мл)

риск рецидива и прогрессии злокачественных новообразований [20].

Заключение

Несостоятельность репаративных процессов и, как следствие, персистирующее повреждение ДНК в опухолевых клетках являются факторами, обуславливающими запуск программы клеточного старения. Запуск процессов старения в клетках сопровождается существенным изменением секреторного

фенотипа, проявляющегося в повышенной секреции цитокинов ИЛ-6 и -8. Ассоциированный со старением секреторный фенотип клеток опухолевой линии GIST-T1 имеет свои особенности, которые могут внести вклад в патогенез гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ).

Благодарности

Работа финансировалась грантом Российского Научного Фонда (РНФ) № 14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120: 513–22.
2. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8: 512–22.
3. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Ann. Rev. Physiol.* 2013; 75: 685–705.
4. Coppe J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Ann. Rev. Pathol.* 2010; 5: 99–118.
5. Chen F., Qi X., Qian M. et al. Tackling the tumor microenvironment: what challenge does it pose to anticancer therapies? *Protein & Cell*. 2014; 5(11): 816–26.
6. Davalos A.R., Coppe J.P., Campisi J., Desprez P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29: 273–83.
7. Kojima H., Inoue T., Kunimoto H., Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAKSTAT*. 2013; 2(4):e25763.
8. Palena C., Hamilton D.H., Fernando R.I. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* 2012; 8: 713–22.
9. Rodier F., Copper J.P., Patil C.K. et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell. Biol.* 2009; 11: 973–9.
10. Sparmann A., D. Bar-Sagi. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004; 6: 447–58.

11. Ancrile B., Lim K.H., Counter C.M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007; 21: 1714–9.
12. Dimri G.P., Lee X., Basile G. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS USA* 1995; 92: 9363–7.
13. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer.* 1997; 33: 703–9.
14. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell.* 2012; 23(11): 2066–75.
15. Chang D.H., Rutledge J.R., Patel A.A. et al. The effect of lung cancer on cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* 2013; 8: e64456.
16. Kopetz S., Shah A.N., Gallick G.E. Src continues aging: current and future clinical directions. *Clin. Cancer. Res.* 2007; 13: 7232–6.
17. Siesser P.M., Hanks S.K. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clin. Cancer. Res.* 2006; 12: 3233–7.
18. Bendre M.S., Marquies A.G., Walser B. et al. Tumor derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand pathway. *Cancer Res.* 2005; 65: 11001–9.
19. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 6735–41.
20. Velarde M.C., Demaria M., Campisi J. Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Interdisciplinary Topics in Gerontology* 2013; 38: 17–27.

Поступила: 15.08.2014