

## ВЛИЯНИЕ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА- $\beta$ , ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ИНСУЛИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК В СРЕДЕ С ПОЛУЖИДКИМ АГАРОМ

Р. С. Стойка, С. И. Сушельницкий, С. И. Кусень

**Введение.** Среди различных биорегуляторов пролиферации клеток животных и человека ведущую роль играют полипептидные факторы роста [1—3]. Эти факторы оказывают также существенное влияние на дифференцировку клеток и метаболические процессы, происходящие в них [1—3]. Впервые Де Ларко и Тодаро [4], а затем другие исследователи [5, 6] показали, что некоторые факторы роста индуцируют у нормальных клеток проявление фенотипических признаков трансформированных клеток, в частности стимулируют пролиферацию клеток в полужидких культуральных средах без прикрепления к твердой подложке. Сейчас этот феномен является одним из наиболее удобных и часто используемых критериев, по которому оценивают уровень трансформированности клеток [5, 6].

Полипептидные факторы роста с трансформирующей активностью чаще всего выделяются клетками, подвергшимися действию экзогенных трансформирующих агентов, например онкогенных ретровирусов [4—6], но они обнаруживаются также и в некоторых нормальных клетках [5, 6]. Наиболее четко выраженный эффект индукции пролиферации нормальных клеток в полужидких культуральных средах наблюдается под влиянием смеси трансформирующих факторов роста (ТФР) двух типов —  $\alpha$  и  $\beta$  [5, 6]. ТФР- $\alpha$  по структуре и свойствам сходен с эпидермальным фактором роста (ЭФР) и имеет общие с ним специфические рецепторы на поверхности клеток [5, 6]. ТФР- $\alpha$  и, следовательно ЭФР, слабо стимулируют фенотипическую трансформацию нормальных клеток, однако это действие существенно усиливает ТФР- $\beta$ , который в отсутствие ТФР- $\alpha$  (или ЭФР) совсем не оказывает трансформирующего влияния на клетки [5, 6].

Недавно обнаружено, что в некоторых клеточных системах ТФР- $\beta$  потенцирует действие не только ТФР- $\alpha$  (ЭФР), но и фактора роста из тромбоцитов [7], фактора роста фибробластов [7], инсулиноподобного фактора роста II [8]. Благодаря исключительно широкому распространению ТФР- $\beta$  в тканях животных и человека [5, 6, 9, 10] он чаще других факторов роста оказывается в наборе биорегуляторов, влияющих на различные клеточные процессы. Кроме того, обнаружено, что ТФР- $\beta$  способен существенно модулировать чувствительность клеток к другим факторам роста, в частности к ЭФР [5, 6, 9]. Таким образом, ТФР- $\beta$  может выполнять уникальную роль в модуляции регуляторных сигналов, возникающих под влиянием различных полипептидных факторов роста, причем во многих случаях результатом их совместного действия является фенотипическая трансформация клеток.

Целью нашей работы было выяснение особенностей действия ТФР- $\beta$ , ЭФР и инсулина в процессах стимуляции фенотипической трансформации родственных по происхождению мышечных фибробластов линий *NIH-3T3* и *Swiss-3T3*, а также перевиваемых «нормальных» клеток *NRK-49F* из почек крысы. Это важно знать в связи с тем, что исследуемые факторы роста имеют реальное (инсулин) или потенциальное (ТФР- $\beta$  и ЭФР) значение для медицинской практики [5, 9].

**Материалы и методы.** Мышечные фибробласты линий *NIH-3T3* и *Swiss-3T3*, а также клетки линии *NRK-49F* из почек крысы получены из коллекции Ин-та цитологии АН СССР. Культивирование клеток проводили в среде Игла в модификации Дальбекко («Flow Laboratory», США) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота того же производства.

Тестирование на колониеобразование клеток при росте в среде с полужидким агаром осуществляли, используя 40 мм чашки Петри (ПО «Полимер», Таллин), в которые предварительно заливали 1 мл подложки, содержащей 0,5% агара («Difco», США), приготовленного на среде для культивирования клеток. После затвердевания подложки в чашки вносили индикаторные клетки *NIH-3T3* ( $1 \cdot 10^4$  клеток/мл), *Swiss-3T3* ( $1 \cdot 10^4$  клеток/мл) или *NRK-49F* ( $5 \cdot 10^3$  клеток/мл), суспендированные в конечном объеме 1 мл культуральной среды с 0,33%-ным агаром.

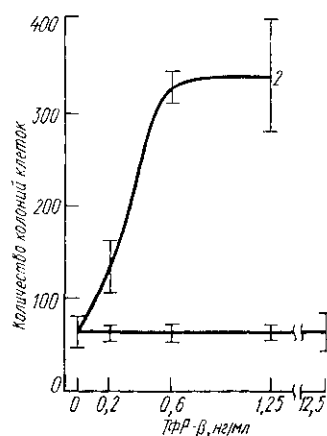
В зависимости от эксперимента в эту же среду добавляли 0,05—50,0 нг/мл ТФР- $\beta$ , очищенного нами из тромбоцитов свиньи [11], 2,5 нг/мл ЭФР («Serva», ФРГ), 1 мкг/мл инсулина («Serva»). Чашки с клетками инкубировали в атмосфере

с 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % воздуха при 37 °С и 100 %-ной влажности в течение 14 сут. Затем подсчитывали количество образовавшихся колоний клеток, учитывая только те, диаметр которых превышал 50—60 мкм.

**Результаты и обсуждение.** Для тестирования биологической активности ТФР-β наиболее часто используют «нормальные» клетки линии *NRK-49F* из почек крысы [4, 5—10]. Мы проверили в этой же клеточной системе ростстимулирующую активность ТФР-β, выделенного нами из тромбоцитов свиньи. Как видно из рис. 1, концентрация ТФР-β, при которой достигается полумаксимальный эффект ( $ED_{50}$ ) по стимуляции образования колоний клеток *NRK-49F* в присутствии ЭФР (2,5 нг/мл), составляет около 0,25 нг/мл. Эта величина практически совпадает с величиной  $ED_{50} = 0,1—0,4$  нг/мл, определенной другими исследователями [5, 12], изучавшими действие на такие же клетки высокоочищенного препарата ТФР-β из тромбоцитов свиньи. Таким образом, ТФР-β, выделенный нами, по удельной биологической активности и по данным электрофореза в полиакриламидном геле с окраской серебром [11] соответствует наиболее очищенному из пока имеющихся препаратов этого фактора. Следовательно, его регуляторное действие вряд ли обусловлено какими-либо примесями. Этот вывод косвенно подтверждается данными, показывающими, что сам ТФР-β даже в концентрации 50 нг/мл практически не влияет на уровень спонтанного колониеобразования в полужидком агаре клеток трех исследуемых линий (рис. 1, 2).

Рис. 1. Пролиферация клеток *NRK-49F* в среде с полужидким агаром под влиянием ТФР-β (1) и смеси ТФР-β с 2,5 нг/мл ЭФР (2)

Fig. 1. Proliferation of *NRK-49F* cells in the medium with semisolid agar under the influence of TGF-β (1) or TGF-β with 2.5 ng/ml EGF (2)



Спонтанный рост нетрансформированных клеток в полужидких культуральных средах может быть объяснен тем, что большинство клеточных линий, используемых для этих целей, не могут считаться абсолютно нормальными. Ведь они выделены путем длительной селекции с получением клеток, способных к неограниченному размножению *in vitro*. Кроме того, разные партии сыворотки могут различаться по содержанию факторов роста с трансформирующей активностью [13]. Поэтому иногда даже простое повышение концентрации сыворотки без добавления в культуральную среду ТФР вызывает проявление признаков фенотипической трансформированности клеток [14]. В наших экспериментах также наблюдалось спонтанное колониеобразование в полужидком агаре клеток *NRK-49F* (рис. 1), *NIH-3T3* (рис. 2, а) и *Swiss-3T3* фибробластов (рис. 2, б).

Известно, что в подавляющем большинстве клеточных тест-систем действие, оказываемое ЭФР, практически не отличается от такового ТФР-α [5—9]. Поэтому для индукции фенотипической трансформации клеток мы использовали смесь ТФР-β с ЭФР. Как видно из рис. 2, а, при исследовании клеток *NIH-3T3* в присутствии ЭФР  $ED_{50}$  для ТФР-β составляет 0,7—1,0 нг/мл. Столь высокая чувствительность этих клеток к восприятию регуляторного действия ТФР-β позволяет рекомендовать их в качестве альтернативной тест-системы для определения ростстимулирующей активности ТФР-β.

Неожиданным оказалось влияние инсулина на стимуляцию колониеобразования клеток *NIH-3T3*, индуцированную смесью ЭФР с ТФР-β (рис. 2, а). Обнаружено, что в присутствии 5—50 нг/мл ТФР-β и 2,5 нг/мл ЭФР инсулин снижает уровень колониеобразования этих клеток. В отсутствие ЭФР ингибирующий эффект инсулина не обнаруживается, а, наоборот, отмечается незначительная стимуляция колониеобразования. Сам инсулин не снижает уровня спонтанного колониеобразования клеток *NIH-3T3*, что свидетельствует о том, что его влияние в присутствии упомянутых факторов не связано с какими-либо цитотоксическими эффектами. Пока трудно ответить на вопрос о механизмах ингибирующего действия инсулина в этой клеточной системе при наличии в среде ТФР-β и ЭФР.

При изучении пролиферации в полужидком агаре мышинных фибробластов линии *Swiss-3T3* показано, что ни один из используемых нами факторов роста в отдельности не влияет на этот процесс (рис. 2, б). Лишь небольшой прирост колониеобразования этих клеток обнаружен после действия на них смеси ЭФР с ТФР-β, которая, как упоминалось выше, существенно стимулирует размножение в полужидкой среде клеток *NRK-49F* и *NIH-3T3* (рис. 1, 2, а). Однако для клеток *Swiss-3T3* в отличие от клеток *NIH-3T3* нами выявлен значительный стимулирующий эффект инсулина на колониеобразование клеток в присутствии ЭФР и ТФР-β. Имеется сообщение [8] о том, что инсулиноподобный фактор роста II потенцирует действие других

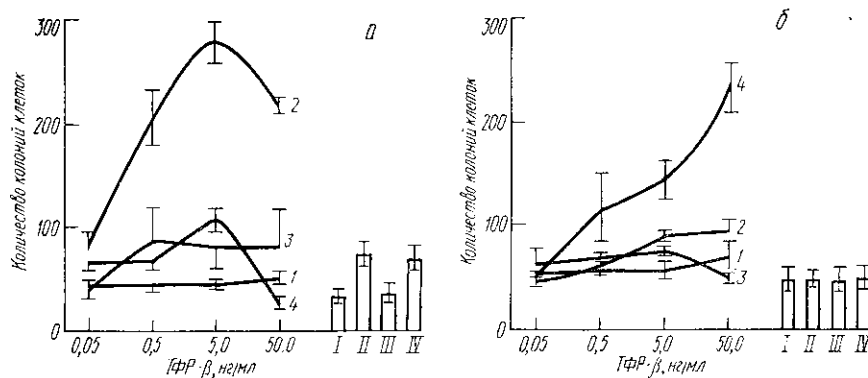


Рис. 2. Пролиферация клеток *NIH-3T3* (а) и *Swiss-3T3* (б) в среде с полужидким агаром под влиянием ТФР-β (1); ТФР-β + ЭФР (2); ТФР-β + инсулин (3); ТФР-β + ЭФР + инсулин (4) (1 — спонтанное колониеобразование клеток в отсутствие добавляемых факторов роста; колониеобразование в присутствии ЭФР (II); инсулина (III) и смеси ЭФР с инсулином (IV))

Fig. 2. Proliferation of *NIH-3T3* (a) and *Swiss-3T3* (б) cells in the medium with semisolid agar under the influence of TGF-β (1), TGF-β + EGF (2), TGF-β + insulin (3), TGF-β + EGF + insulin (4) (1 — spontaneous colony forming in the absence of added growth factors; colony forming in the presence of EGF (II); colony forming in the presence of insulin (III); — colony forming in the presence of EGF and insulin (IV))

факторов по индукции фенотипической трансформации мышинных фибробластов линии *BALB/C-3T3*, но не влияет на этот процесс у клеток *NRK-49F*. В этой клеточной системе (*BALB/C-3T3*) инсулин действует почти на порядок менее активно. Обнаруженное нами (рис. 2, б) стимулирующее влияние инсулина на уровень колониеобразования фибробластов *Swiss-3T3* более выражено, чем описанное для фибробластов линии *BALB/C-3T3* [8]. В нашем случае все три используемых фактора роста проявляют четкий синергизм в стимуляции фенотипической трансформации клеток.

Таким образом, нами показано, что две линии клеток (*NIH-3T3* и *Swiss-3T3*), выделенные по похожей схеме из эмбрионов одного и того же вида животных [15], существенно различаются по способности проявлять признаки трансформированного фенотипа в ответ на действие одинакового набора полипептидных факторов роста (ТФР-β, ЭФР, инсулин). Эти данные предполагают различия между упомянутыми линиями клеток по некоторым механизмам регуляции их пролиферации. Анализ клеточных процессов, происходящих в ответ на действие разных комбинаций биорегуляторов роста, способствует лучшему пониманию механизмов, запускающих неконтролируемое со стороны организма размножение клеток в ходе их злокачественной трансформации. По-видимому, только многофакторный анализ может дать объективную оценку того, как эти клетки функционируют *in vivo*. Кроме того, данные, полученные нами, свидетельствуют о необходимости более осторожной интерпретации результатов тестирования на клеточных культурах отдельных биологически активных веществ. Для правильного вывода об особенностях действия этих веществ *in vivo* необходимо испытать их не только в присутствии других биорегуляторов, но и с использованием разных клеточных линий и первичных культур разных тканей.

THE INFLUENCE OF THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ ,  
EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND INSULIN ON CELLULAR  
PROLIFERATION IN SEMISOLID AGAR MEDIUM

R. S. Stoika, S. I. Sushelnitsky, S. I. Kusen'

Lvov Branch of A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Lvov

Summary

The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), which was isolated and purified by the authors from pig thrombocytes, epidermal growth factor (EGF) and insulin are studied for their effect on cellular proliferation in semisolid culture medium with 0.33 % agar. The lines *NIH-3T3* and *Swiss-3T3* of the mouse fibroblasts and rat *NRK-49F* cells are tested. It was shown that TGF- $\beta$  (0.05-50.0 ng/ml) stimulates multiplication of the cells of the mentioned lines only in the presence of EGF (2.5 ng/ml). Synergism in the action of two growth factors is detected when *NIH-3T3* and *NRK-49F* cells are used but it is less expressed in the case of *Swiss-3T3* cells. Insulin (1  $\mu$ g/ml) intensifies the growth stimulating activity of EGF plus TGF- $\beta$  mixture for *Swiss-3T3* cells but it inhibits this activity when *NIH-3T3* cells are tested. Thus, the same combination of growth factors can inhibit the expression of phenotypic transformation in one type of cells and can intensify it in other cells being closely related by their origin.

1. Кусень С. И., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста.— М.: Наука, 1985.—236 с.
2. Калюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани.— Минск: Наука и техника, 1984.—216 с.
3. Никольский Н. Н., Соркин А. Д., Сорокин А. Б. Эпидермальный фактор роста.— Л.: Наука, 1987.—200 с.
4. De Larco J. E., Todaro G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 8.—P. 4001—4005.
5. Roberts A. B., Sporn M. B. Transforming growth factors // Cancer Surveys.—1985.—4, N 4.—P. 683—705.
6. Growth factors and cancer / A. S. Goustin, E. B. Leof, G. D. Shipley, H. L. Moses // Cancer Res.—1986.—46, N 3.—P. 1015—1029.
7. Rizzino A., Ruff E., Rizzino H. Induction and modulation of anchorage-independent growth by platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor and transforming growth factor- $\beta$  // Ibid.—N 8.—P. 2816—2820.
8. Massague J., Kelly B., Mottola C. Stimulation by insulin-like growth factors is required for cellular transformation by type  $\beta$  transforming growth factors // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 8.—P. 4551—4554.
9. Transforming growth factor- $\beta$ : biological function and chemical structure / M. B. Sporn, A. B. Roberts, L. M. Wakefield, R. K. Assoian // Science.—1986.—233, N 4763.—P. 532—535.
10. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta / M. B. Sporn, A. B. Roberts, L. M. Wakefield, V. de Crombrughe // J. Cell Biol.—1987.—105, N 4.—P. 1039—1045.
11. Сушельницький С. І., Стойка Р. С., Гарасько С. Й. Часткова очистка та деякі властивості  $\beta$ -типу трансформуючого фактора росту тромбоцитів свині // Тези доп. V Укр. біохім. з'їзду (Івано-Франківськ, 1987).—К., 1987.—Ч. 2.—С. 249.
12. Cytokine bulletin.—Minneapolis: R and D Systems, 1987.—Vol. 1.—8 p.
13. Rizzino A. Behaviour of transforming growth factors in serum-free medium: an improved assay for transforming growth factors // In Vitro.—1984.—20, N 10.—P. 815—822.
14. Kaplan P. L., Ozanne B. Cellular responsiveness to growth factors correlates with a cell's ability to express the transformed phenotype // Cell.—1983.—33, N 5.—P. 931—938.
15. Баркан Р. С., Никольский Н. Н. Минимально трансформированные клеточные линии 3T3 как объект исследования механизмов пролиферации // Цитология.—1985.—27, № 1.—С. 5—27.

Львов. отд-ние Ин-та биохимии  
им. А. В. Палладина АН УССР

Получено 09.12.87