



УДК 576.355

Р. С. Стойка, С. И. Сущельницкий, С. И. Кусень

ВЛИЯНИЕ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА β , ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ИНСУЛИНА НА БИОСИНТЕЗ ДНК В МЫШИНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЛИНИИ SWISS-3T3 ПРИ НИЗКОЙ И ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК В МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ

Обнаружено, что влияние разных сочетаний трансформирующего фактора роста β (0,05—50,0 нг/мл), эпидермального фактора роста (50 нг/мл) и инсулина (1 мкг/мл) на биосинтез ДНК в мышечных фибробластах линии Swiss-3T3 существенно отличается при низкой и высокой плотности клеток в монослойной культуре.

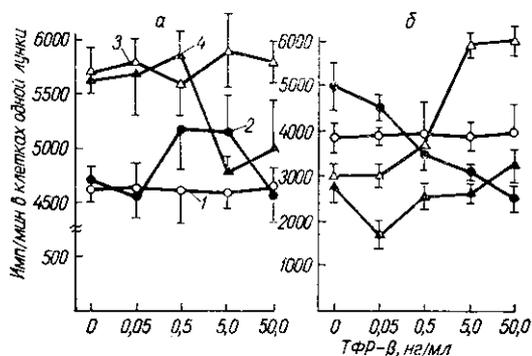
Введение. Молекулярные механизмы, определяющие контактное ингибирование роста клеток, находящихся в плотных монослойных культурах, пока малопонятны. Некоторые исследователи считают, что в условиях конfluence клетки «экранируют» доступ молекул стимуляторов роста к их специфичным рецепторам на поверхности соседних клеток [1]. Обнаружено также, что с увеличением плотности клеток в культуре уменьшается количество клеточных рецепторов целого ряда полипептидных факторов роста [2, 3]. Кроме того, контактное ингибирование пролиферации связывают с экспрессией отдельных гликопротеинов на поверхности клеток, хотя конкретные их функции пока изучены недостаточно [4].

Мы исследовали эффективность разных сочетаний полипептидных факторов роста на биосинтез ДНК в мышечных фибробластах линии Swiss-3T3 в условиях жидкой и плотной культур. При этом учитывали, что отдельные факторы роста могут влиять не только на специфичное связывание [5, 6], но и на рострегулирующее действие [7, 8] друг друга. Это относится и к трансформирующему фактору роста β (ТФР- β), который в зависимости от типа клеток-мишеней [7] и условий их культивирования [8] может действовать в качестве стимулятора или ингибитора биосинтеза ДНК и пролиферации клеток, причем его регуляторные эффекты зависят от наличия в среде других полипептидных факторов роста.

Материалы и методы. Фибробласты линии Swiss-3T3 из нормальных эмбрионов мыши получены из Всесоюзной коллекции клеточных культур при Ин-те цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде Игла, модифицированной Дальбекко («Flow Laboratory», Великобритания) с добавлением 10 % сыворотки крови плодов крупного рогатого скота (Предприятие диагностических и лекарственных препаратов «Диалек», Минск). Клетки, суспендированные в культуральной среде, содержащей 0,1 % сыворотки крови, высевали в 24-луночные пластиковые планшеты («Flow Laboratory»). Количество клеток в жидкой культуре составляло 10^4 /лунку, в плотной — 10^5 /лунку. В среду вносили различные количества ТФР- β (0,05—50,0 нг/мл),

© Р. С. СТОЙКА, С. И. СУЩЕЛЬНИЦКИЙ, С. И. КУСЕНЬ, 1992

эпидермальный фактор роста (ЭФР, 5,0 нг/мл), инсулин (1 мкг/мл) или разные сочетания названных факторов роста. Клетки инкубировали в CO_2 -термостате в течение 24 ч. В последние 18 ч инкубации в среду добавляли ^3H -тимидин (18,5 Бк/мл). В дальнейшем клетки обрабатывали по общепринятому методу [8], определяя радиоактивность в ТХУ-нерастворимом осадке с помощью сцинтилляционного счетчика Mark III («Трасог», Нидерланды). ТФР- β получен нами из тромбоцитов крови свиньи, как описано ранее [6]. В работе использовали ЭФР



Влияние ТФР- β и его сочетаний с ЭФР и (или) инсулином на интенсивность включения ^3H -тимидина в ДНК мышечных фибробластов линии Swiss-3T3 при разной плотности клеток в монослойной культуре: а — плотная культура (10^5 клеток/2 cm^2); б — жидкая культура (10^4 клеток/2 cm^2); 1 — ТФР- β ; 2 — ТФР- β +ЭФР; 3 — ТФР- β +инсулин; 4 — ТФР- β +ЭФР+инсулин. Вертикальные отрезки — 95 %-ные доверительные интервалы средних значений

из подчелюстных слюнных желез мыши («Serva», Германия) и инсулин из поджелудочной железы свиньи («Sigma», США).

Результаты и обсуждение. Из данных, приведенных на рисунке, видно, что сам ТФР- β независимо от используемой концентрации не влияет на биосинтез ДНК как в жидкой, так и в плотной культурах мышечных фибробластов линии Swiss-3T3. Инсулин в первом случае не оказывает воздействия на этот процесс, во втором — стимулирует его. В плотной культуре клеток ТФР- β в присутствии инсулина не влияет на биосинтез ДНК. В то же время действие такого сочетания факторов роста на клетки, находящиеся в жидкой культуре, зависит от концентрации ТФР- β в среде. Так, при низких концентрациях (0,05—0,5 нг/мл) ТФР- β не обнаружено изменений в интенсивности биосинтеза ДНК, тогда как при его относительно высоких концентрациях (5,0—50,0 нг/мл) наблюдается существенная стимуляция включения ^3H -тимидина в ДНК.

Сам ЭФР достоверно не влияет на биосинтез ДНК в фибробластах линии Swiss-3T3 в плотной культуре, но стимулирует этот процесс в жидкой культуре. Между клетками исследуемой линии в зависимости от их плотности в культуре обнаруживаются существенные различия и в действии ЭФР в присутствии разных концентраций ТФР- β . Так, в плотной культуре ТФР- β достоверно не влияет на рострегулирующее действие ЭФР, тогда как в жидкой культуре с повышением концентрации ТФР- β происходит ингибирование биосинтеза ДНК, индуцированного ЭФР.

При одновременном влиянии на исследуемые клетки ЭФР и инсулина биосинтез ДНК в них независимо от плотности в культуре остается на уровне, характерном для влияния самого инсулина. Добавление в эту тест-систему еще ТФР- β в условиях плотного посева клеток способствует ингибированию ростстимулирующего действия инсулина, причем этот эффект обнаруживается только в присутствии относительно высоких концентраций ТФР- β (5,0—50,0 нг/мл). В то же время в условиях жидкой культуры достоверного влияния ТФР- β на ростстимулирующее действие ЭФР и инсулина на клетки линии Swiss-3T3 не отмечено.

Таким образом, направленность и выраженность влияния ТФР- β , ЭФР и инсулина на биосинтез ДНК в мышечных фибробластах линии Swiss-3T3 существенно зависит от плотности клеток в культуре. Кро-

ме того, обнаружено, что рострегулирующие эффекты ЭФР и(или) инсулина могут модулироваться ТФР- β в разной степени в зависимости от его концентрации в среде.

Общеизвестно, что интенсивность пролиферации клеток в конфлюентных культурах существенно ниже, чем в жидких культурах. Обнаружено также, что с увеличением плотности клеток в монослойной культуре у них уменьшается количество специфических рецепторов ЭФР, ТФР- β , фактора роста фибробластов, фактора роста из тромбоцитов, инсулиноподобных факторов роста I и II [2, 3]. На основании этих данных выдвинуто предположение о том, что такое уменьшение количества рецепторов в расчете на одну клетку является одним из универсальных механизмов ограничения ее способности в норме пролиферировать в условиях высокой плотности на единицу площади подложки [2, 3].

Показано, что в клетках линии BSC-1 из почки обезьяны при большой плотности в культуре не только уменьшается специфическое связывание ЭФР, но и почти теряется способность последнего стимулировать пролиферацию [9]. Аналогично фибробласты кожи человека в плотных культурах имеют значительно меньше рецепторов инсулиноподобного фактора роста I, чем в жидких культурах, и поэтому требуют существенно более высоких концентраций данного фактора роста для стимуляции своей пролиферации [10].

Используя фибробластоподобные крысиные клетки линии NRK-49F, Рицино и соавт. [3] отметили, что при увеличении плотности клеток в стандартной 16-мм лунке планшета с $1,77 \cdot 10^4$ до $15,76 \cdot 10^4$, то есть примерно в 10 раз, величина относительного связывания ТФР- β уменьшается почти в 3 раза. Примерно такая же закономерность наблюдается и в случае использования клеток других типов. Упомянутые авторы, однако, не приводят данных о том, как в этих условиях изменяется рострегулирующее действие ТФР- β .

По данным Гудмана и Маяка [4], ТФР- β ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток аорты крысы в жидких культурах ($(2,0-2,5) \cdot 10^3$ клеток/см²), но стимулирует ее в конфлюентных культурах ($5,0 \cdot 10^4$ клеток/см²). Уровень специфического связывания ТФР- β в первом случае более чем в 2 раза выше по сравнению со вторым. Необходимо отметить, что в жидких культурах этих клеток выявляются два типа рецепторов — с высоким и низким сродством к ТФР- β . Кроме того, между гладкомышечными клетками из жидких и плотных культур существуют различия в составе молекулярных форм специфических рецепторов ТФР- β [4]. Из результатов этих исследований можно сделать вывод о том, что эффективность ростстимулирующего действия ТФР- β предопределяется не одним только количеством рецепторов данного фактора роста. По-видимому, существуют и другие механизмы, влияющие на направленность пролиферативного ответа клеток на действие ТФР- β в условиях конфлюентной и жидкой культур.

Имеются сведения о том, что отдельные полипептидные факторы роста могут менять уровень специфического связывания друг друга. Например, ТФР- β регулирует связывание ЭФР [5], а ЭФР и(или) инсулин — связывание ТФР- β [6]. Поэтому было целесообразно провести сравнительное изучение влияния ТФР- β , ЭФР, инсулина и разных сочетаний этих факторов роста на интенсивность биосинтеза ДНК в псевдонормальных мышечных фибробластах линии Swiss-3T3 в условиях плотной и жидкой культуры. Использование разных сочетаний полипептидных факторов роста позволило учесть взаимное влияние каждого из них в отдельности на биологическое действие друг друга.

Можно с уверенностью заключить, что среди известных факторов роста в последнее время наибольшим вниманием пользуется ТФР- β . Это обусловлено целым рядом его структурно-функциональных особенностей, среди которых необходимо в первую очередь выделить уникальную способность этого фактора оказывать разнонаправленное влияние на пролиферацию не только клеток из разных тканей [7], но и

однотипных клеток, находящихся в разных условиях культивирования [8]. Среди условий, наиболее существенно влияющих на направленность и выраженность пролиферативного ответа клеток на действие ТФР- β , отмечают прикрепленность клеток к субстрату-подложке, концентрацию сыворотки крови в культуральной среде, наличие в ней других полипептидных факторов роста, продолжительность взаимодействия клеток с ТФР- β [7, 8, 11].

Как видно из результатов нашей работы, отдельные полипептидные факторы роста оказывают взаимное влияние на рострегулирующие свойства друг друга. Например, в условиях жидкой культуры биосинтез ДНК в мышинных фибробластах линии Swiss-3T3 наиболее интенсивно происходит в присутствии инсулина и высоких концентраций ТФР- β , а наименее интенсивно — при действии ЭФР и высоких концентраций ТФР- β . Эти закономерности не обнаруживаются в условиях плотной культуры клеток. Здесь биосинтез ДНК осуществляется с максимальной интенсивностью в присутствии инсулина, с минимальной — в присутствии ЭФР, причем в обоих случаях эти процессы мало зависят от одновременного действия на клетки ТФР- β . Следовательно, в условиях жидкой культуры фибробласты линии Swiss-3T3 более подвержены рострегулирующему влиянию ТФР- β , чем в условиях плотной культуры, а направленность этого регуляторного действия существенно зависит от влияния других полипептидных факторов роста, находящихся в среде.

Ранее нами [6] показано, что ЭФР и (или) инсулин по-разному влияют на уровень специфического связывания ТФР- β псевдонормальными фибробластоподобными клетками линии NRK-49F и карциномными клетками линии A-549. В частности, под действием инсулина возрастает количество локусов связывания ТФР- β в клетках линии NRK-49F, а под действием ЭФР и инсулина — уменьшается. ЭФР вызывает увеличение количества локусов связывания ТФР- β в карциномных клетках линии A-549. Все это происходит без существенных изменений K_d рецепторов ТФР- β .

Не исключено, что выявленные нами отличия в действии разных сочетаний полипептидных факторов роста на интенсивность биосинтеза ДНК в псевдонормальных мышинных фибробластах линии Swiss-3T3 также каким-то образом связаны с изменением количества рецепторов одних факторов роста под влиянием других. Выяснение таких механизмов в первую очередь необходимо при изучении биологического действия ТФР- β . Ведь этот фактор роста обладает исключительной полифункциональностью и может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на пролиферативную активность клеток [11].

Summary. The influence of different combinations of transforming growth factor β (0.05—50.0 ng/ml), epidermal growth factor (5.0 ng/ml) and insulin (1 μ g/ml) on DNA biosynthesis in mouse fibroblasts of Swiss-3T3 line considerable differ in monolayer cultures with low and high cell density.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lieberman M. A., Raben D., Glaser L. Cell surface-associated growth inhibitory proteins // *Exp. Cell Res.*— 1981.— 133, N 2.— P. 413—419.
2. Cell density regulates the number of cell surface receptors for fibroblast growth factor / G. Veomett, C. Kuszynski, P. Kazakoff, A. Rizzino // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1989.— 159, N 2.— P. 694—700.
3. Rizzino A., Kazakoff P., Nebelsick J. Density-induced down regulation of epidermal growth factor receptors // *In Vitro Cell. Devel. Biol.*— 1990.— 26, N 5.— P. 537—542.
4. Goodman L. V., Majack R. A. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor- β receptor phenotypes as a function of cell density in culture // *J. Biol. Chem.*— 1989.— 264, N 9.— P. 5241—5244.
5. Assoian R. K. Biphasic effects of type β transforming growth factor on epidermal growth factor receptors in NRK fibroblasts // *Ibid.*— 1985.— 260, N 17.— P. 9613—9617.

6. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С., Кусень С. И. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на специфическое связывание трансформирующего фактора роста β клетками линий NRK-49F и A-549 // Цитология.— 1991.— 33, № 3.— С. 80—87.
7. Влияние трансформирующего фактора роста β -типа и его комбинаций с эпидермальным фактором роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и опухолевых клеток / С. И. Сушельницкий, Р. С. Стойка, С. И. Гарасько и др. // Там же.— 1989.— 31, № 7.— С. 767—774.
8. Стойка Р. С., Сушельницкий С. И., Кусень С. И. Влияние трансформирующего фактора роста β на интенсивность синтеза ДНК клеток в зависимости от их типа и условий культивирования // Там же.— 1990.— 32, № 2.— С. 132—139.
9. *Density-dependent* regulation of growth of BSC-1 cells in cell culture: Control of growth by serum factors/R. W. Holley, R. Armour, J. H. Baldwin et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 12.— P. 5046—5050.
10. Rosenfeld R. G., Dollar L. A., Conover C. A. Density-associated loss of functional receptors for somatomedin-C / insulin-like growth factor I. (SM-C/IGF-I) on cultured human fibroblast monolayers // J. Cell. Physiol.— 1984.— 121, N 4.— P. 419—424.
11. Стойка Р. С., Кусень С. И. Трансформирующий фактор роста β — новый тип ингибитора пролиферации нормальных и опухолевых клеток // Молекуляр. биология.— 1990.— 24, № 4.— С. 897—908.

Львов, отделение Ин-та биохимии
им. А. В. Палладина АН Украины

Получено 04.01.92

УДК 617.3—076:616.419

В. С. Астахова, Е. В. Таран, Л. М. Панченко

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЛИНИИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Изучали свойства колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) при культивировании с фидером кролика. Линия стромальных клеток-предшественников костного мозга гетерогенна по своему пролиферативному потенциалу, что проявляется в различном отношении КОЕф к фидеру. Имеются две фракции КОЕф: фидерзависимая, дающая в культурах колонии только при добавлении фидера, и фидернезависимая, способная образовывать колонии в отсутствие фидера. Под воздействием фидера одна часть КОЕф, дающая в обычных условиях кластер, совершает несколько дополнительных делений и вырастает до колонии, другая часть КОЕф не способна образовывать в этих условиях колоний. Гетерогенность КОЕф с одной стороны, обусловлена свойствами самих КОЕф, а именно: их пролиферативным потенциалом, с другой — связана с влиянием микроокружения, создаваемого непрлипающей фракцией костномозговых клеток.

Введение. Стромальные клетки-предшественники костного мозга человека и животных, именуемые колониеобразующими единицами фибробластов (КОЕф), имеют свойства стволовых клеток, являются остеогенными клетками-предшественниками и создают кроветворное микроокружение для созревания стволовых кроветворных клеток [1—3]. Экспериментально доказано, что образование участков костномозгового кроветворения во взрослом организме наступает после того, как стромальные клетки-предшественники построят костную ткань, которая затем заселяется стволовыми кроветворными клетками. На решающую роль стромы костного мозга в кроветворении указывает также вторичная аплазия костного мозга в результате радиационного поражения. Эта форма аплазии связана с гибелью стромальных элементов костного мозга в месте поражения [3].

Основным способом изучения свойств стромальных клеток-предшественников костного мозга человека является метод клонирования *in vitro*. Как установлено ранее, добавление в культуральную среду фидера, представляющего собой ластально облученные клетки костного мозга, значительно повышает эффективность клонирования КОЕф. Причем наиболее эффективным из изученных оказался фидер из кле-

© В. С. АСТАХОВА, Е. В. ТАРАН, Л. М. ПАНЧЕНКО, 1992