

## СТИМУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ДНК В ГЕПАТОЦИТАХ ФРАКЦИЯМИ СЫВОРОТКИ ГЕПАТЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

Л. А. Осипова, Ю. Д. Иващенко, Н. И. Немлий, А. И. Быкорез

**Введение.** Выделение и очистка факторов, специфически контролирующих пролиферацию гепатоцитов, является необходимым этапом в решении вопроса о взаимодействии нормальных и трансформирующих факторов роста при гепатоканцерогенезе. Физиологическая стимуляция покоящихся гепатоцитов к вступлению в митотический цикл частичной гепатэктомией предоставляет естественную возможность поиска факторов пролиферации клеток печени (гепатотропинов). Рядом исследований, начатых на крысах-парабионтах с перекрестной циркуляцией крови [1, 2], установлено присутствие в сыворотке гепатэктомированных животных факторов, стимулирующих синтез ДНК в печени интактных особей [3], в первичной культуре эмбриональных гепатоцитов [4], гепатоцитах взрослых крыс [5, 6], клетках гепатомы НТС [7] и отличающихся от известных полипептидных факторов роста и гормонов. Во всех указанных работах исследовали сыворотку, полученную от животных через 12—48 ч после частичной гепатэктомии, т. е. в период завершения G<sub>1</sub>-фазы митотического цикла гепатоцитами неудаленных долей (12 ч) либо максимума синтеза ДНК в популяции гепатоцитов (24 ч), или непаренхиматозных клеток (48 ч). В то же время наибольшую концентрацию гепатотропных митогенов в сыворотке гепатэктомированных животных можно ожидать в более ранние сроки после операции.

Целью настоящей работы явилась частичная очистка и характеристика факторов сыворотки гепатэктомированных крыс, стимулирующих пролиферацию гепатоцитов взрослых крыс.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на взрослых беспородных крысах-самцах разведения вивария Института проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР. Частичную гепатэктомию по [8] осуществляли между 9 и 11 ч утра, через различные промежутки времени (3 ч, 24 ч) крыс декапитировали, собирали кровь и получали сыворотку общепринятым методом. Кислотно-этанольную экстракцию белков сыворотки проводили по [9], суммарный белок, полученный осаждением кислотно-этанольного экстракта смесью этанол:эфир (2:4), собирали центрифугированием, высушивали на воздухе, растворяли в 1 М уксусной кислоте. Хроматографию белков осуществляли на колонке 2,5×75 см, заполненной биогеом Р-60 («Bio-Rad», США), элюцию проводили 1 М уксусной кислотой со скоростью 18—20 мл/ч. Фракции, соответствовавшие пикам поглощения при  $\lambda=280$  нм, собирали, лиофилизировали, растворяли в 0,04 М HCl в концентрации 1 мг/мл и использовали для: 1) тестирования в первичной культуре гепатоцитов; 2) изофокусировки на амфолинах («LKB», Швеция) в диапазоне величин pH 3—10. Эпидермальный фактор роста из подчелюстных слюнных желез мышей выделяли, как описано ранее [11].

Для получения первичной культуры гепатоцитов изолированные клетки печени выделяли при помощи коллагеназы («Fluka», Швейцария) [12], гепатоциты отделяли от непаренхиматозных клеток двукратным центрифугированием при 50 g в течение 40 с, промывали в среде Игла и наносили в этой же среде с 20 %-ной сывороткой крупного рогатого скота (Киевский мясокомбинат) на покрытые коллагеном покровные стекла из расчета (60—70)·10<sup>3</sup> гепатоцитов на стекло. Коллаген выделяли по [13]. Первую смену среды осуществляли через 18 ч, при этом вносили разные фракции сыворотки до конечной концентрации 2 мкг/мл среды, в состав которой входили также 10 %-ный гидролизат лактальбумина и инсулин («Bio-Rad», США) в концентрации 10<sup>-7</sup> М. Через 20—22 ч в чашки добавляли <sup>3</sup>H-тимидин (СССР) в дозе 74 Бк/мл среды на 60 мин, затем клетки промывали двумя сменами 0,15 М NaCl, фиксировали смесью спирт:уксусная кислота (3:1), монтировали покровные стекла на предметные и покрывали фотоэмульсией типа М (завод технических фотопластинок, Москва). После экспозиции в течение 10—14 дней проявленные радиоавтографы клеток окрашивали гематоксилин-эози-

ном и подсчитывали индекс мечения среди 1000 гепатоцитов произвольно выбранных полей зрения (X400).

**Результаты и обсуждение.** В качестве первого этапа очистки сыворотки крови от высокомолекулярных белков, часть из которых оказывает неспецифическое стимулирующее действие на синтез ДНК в клетках линии *L* [14], использовали кислотно-этанольную экстракцию. Дальнейшее исследование фракций, полученных при хроматографии кислотно-этанольного экстракта на биогеле Р-60, показало, что сыворотка гепатэктомированных крыс содержит белки, стимулирующие синтез ДНК в первичной культуре гепатоцитов (таблица). При исследовании дозовой зависимости митогенного эффекта белков фракций установлено, что некоторая стимуляция синтеза ДНК в гепатоцитах наблюдается при внесении в культурную среду 0,5—1 мкг белка на 1 мл, максимальная — при добавлении 2—5 мкг, а добавление больших количеств (до 10 мкг) вызывает некоторое угнетение пролиферативной активности гепатоцитов. Характерно, что при кумулятивной метке (<sup>3</sup>H-тимидин, 24 ч) индекс мечения гепатоцитов достигает 72,5 %, что приближается к размеру пролиферативного пула клеток регенерирующей печени и свидетельствует о специфичности белков-гепатотропинов. При этом уровень стимуляции в значительной мере зависит от времени, прошедшего от момента операции частичной гепатэктомии. Так, при внесении в культуральную среду одного и того же количества белка (2 мкг/мл) аналогичных фракций экстракта, выделенного через 3 и 24 ч после частичной гепатэктомии, наблюдается соответственно 14—17- и 2,5-кратное повышение индекса мечения гепатоцитов. Как видно из данных, представленных на рис. 1, проявление стимулирующего эффекта фракции I в значительной степени зависит от присутствия сыворотки в культуральной среде, а в бессывороточной среде усиливается инсулином. Следует подчеркнуть, что в присутствии белков фракций 1—2 значительно удлиняется продолжительность культивирования

*Влияние ЭФР, фракций сыворотки интактных и гепатэктомированных крыс на синтез ДНК в первичной культуре гепатоцитов взрослых крыс*  
*Effect of EGF and serum fractions of intact and partially hepatectomized rats on DNA synthesis of adult rat hepatocytes cultures*

Фракция	Индекс мечения гепатоцитов			
	А		Б	
	Центр	Периферия	Центр	Периферия
контроль	0,34±0,14	3,31±0,84	—	—
I	0,27±0,15	3,64±0,91	5,75±1,12	18,42±1,78
II	0,12±0,06	3,17±0,94	4,81±1,03	15,34±1,45
III	0,29±0,16	2,54±0,63	1,15±0,42	5,29±0,88

Фракция	Индекс мечения гепатоцитов			
	В		1 нМ ЭФР	
	Центр	Периферия	Центр	Периферия
контроль	—	—	7,37±1,62	13,05±1,94
I	0,85±0,23	4,46±0,98	—	—
II	0,87±0,18	3,22±0,71	—	—
III	0,41±0,16	1,62±0,53	—	—

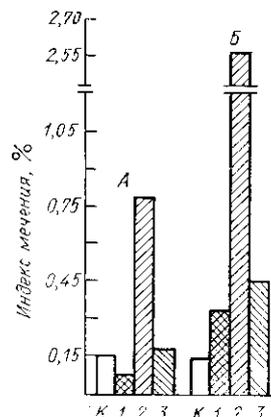
**Примечание.** Для определения индекса мечения гепатоцитов культуру клеток импульсно метили <sup>3</sup>H-тимидином (60 мин) через 20—22 ч после внесения белков тестируемых фракций. Индекс мечения выражен как  $M \pm \sigma$  из трех независимых экспериментов (три параллели в каждом). А — фракции сыворотки интактных крыс; Б и В — сыворотки животных через 3 и 24 ч после частичной гепатэктомии соответственно.

гепатоцитов, позднее наступает их вакуолизация и деградация, «сползание» с субстрата и замещение их фибробластами.

Использованное в опытах количество белка, оказывающее выраженный митогенный эффект на гепатоциты, эквивалентно 0,035 мкл цельной сыворотки. Если учесть, что по данным изоэлектрофокусировки (рис. 2) в активных фракциях присутствуют 6—8 белков, среди которых преобладают альбумины, то очевидно, что тестируемые митогенные стимуляторы по своей активности близки к полипептидным

Рис. 1. Индекс мечения гепатоцитов в первичной культуре в бессывороточной среде без (А) и с  $10^{-7}$  М инсулином (Б). 1, 2, 3 — с добавлением 2 мкг/мл среды белков фракции 1 сыворотки интактных и гепатэтомизированных (через 3 и 24 ч после операции) крыс соответственно; К — контроль (среда без добавления исследуемых фракций).

Fig. 1. The labelling index of hepatocytes in primary cell culture in the serum-free medium without (A) and with  $10^{-7}$  M insulin (B). 1, 2, 3 — with addition of 2  $\mu$ g/ml of fraction 1 proteins of the intact and hepatectomized rat serum (3 and 24 hours after partial hepatectomy), respectively; K — control.



факторам роста. Действительно, стимуляция синтеза ДНК в культуре гепатоцитов, индуцированная белками фракций I—II, сравнима с таковой, вызванной введением в культуруальную среду 1 нМ (или 6 нг/мл среды) эпидермального фактора роста (ЭФР, таблица). Так же как и при действии ЭФР, существенное увеличение индекса мечения гепатоцитов наблюдается в центральных участках и в меньшей мере на периферии монослоя, тогда как при воздействии инсулина отмечается повышение пролиферативной активности гепатоцитов, локализованных на периферии культуры. Соответствующие фракции сыворотки, полученной через 24 ч после частичной гепатэктомии, не оказывают стимулирующего действия на синтез ДНК в гепатоцитах, растущих в бессывороточной среде, что также свидетельствует о более низком содержании гепатотропных митогенов.

Поскольку кислотно-этанольная экстракция белков применяется и для выделения ЭФР [9], нельзя исключить, что митогенная активность фракций сыворотки обусловлена присутствием данного фактора роста, находящегося в виде комплекса с белком-носителем (так как молекулярная масса белков активных фракций находится в диапазоне 50000—70000 по данным хроматографии на биогеле Р-60, рис. 3). Результаты определения содержания ЭФР во фракциях после лиофилизации и соответствующего растворения в 0,04 М HCl с помощью радиоиммунологического анализа свидетельствуют о том, что концентрация ЭФР в них составляет менее 3 пг/мг белка фракций и, следовательно, не может обуславливать их митогенный эффект.

Известно, что в клетках-продуцентах ЭФР определяется в виде комплекса с белком аргинин-эстеразой, однако последний никоим образом не модулирует биологического действия фактора роста [10]. В крови ЭФР, как и многие другие гормоны и факторы роста, существует в виде комплекса с белками-носителями типа альбуминов или глобулинов, основной функцией которых является защита молекул гормонов от действия ферментов при доставке к клеткам-мишеням. Биологически активными являются, как правило, свободные молекулы факторов роста.

При сравнительном исследовании гетерогенности белков активных фракций и соответствующих им фракций сыворотки нормальных крыс при изоэлектрофокусировке выявлены значительные различия в спек-

рах белков с определенным сдвигом основных компонентов в зону более кислых рН. Это указывает на появление новых белков в сыворотке крови крыс уже через 3 ч после частичной гепатэктомии. Действительно, по имеющимся данным [3, 5, 6], в сыворотке гепатэктомированных крыс присутствует ряд относительно высокомолекулярных (с молекулярной массой 35000—70000) соединений белковой природы,

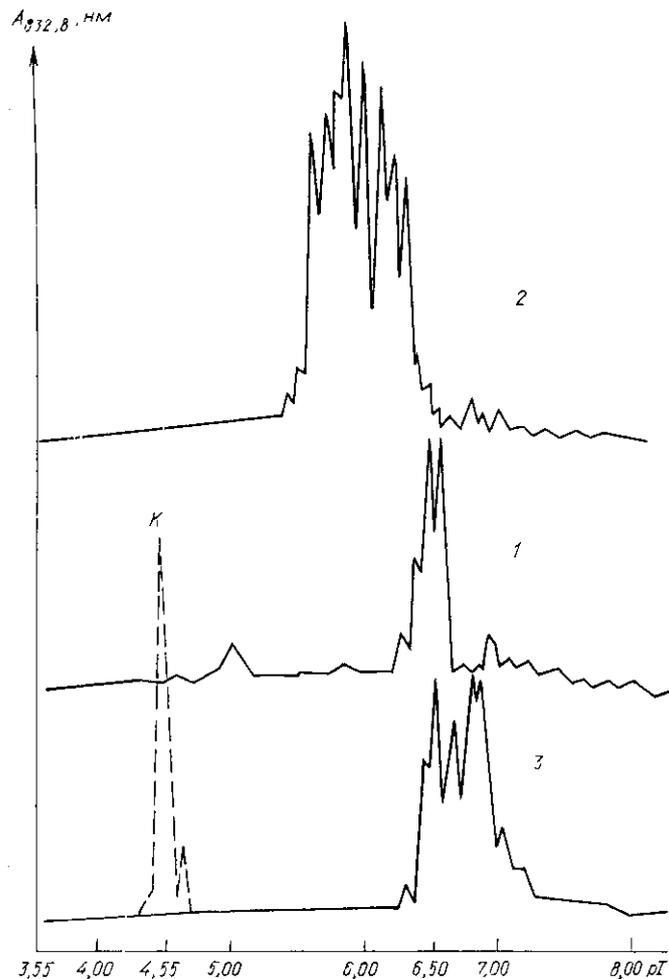


Рис. 2. Денситограмма изоэлектрограмм белковой фракции 1: 1 — интактные животные; 2, 3 — через 3 и 24 ч после гепатэктомии соответственно. Амфолины фирмы «ЛКВ», рН 3—10; окраска — кумасси R-250; K — трипсиновый ингибитор из сои, рI 4,6.

Fig. 2. Densitogram of the fractions 1 proteins isoelectroforegrams: 1 — intact rats; 2, 3 — 3 and 24 hours after partial hepatectomy, respectively. LKB ampholines, pH 3—10; staining — Coomassie R-250; K — soybean trypsin inhibitor, pI 4.6.

стимулирующих включение  $^3\text{H}$ -тимидина гепатоцитами *in vitro* и не являющихся известными неспецифическими гормоноподобными веществами типа соматомединов, инсулинподобных факторов, инсулина, глюкагона. Определяемая нами ДНК-стимулирующая активность связана с белками с молекулярной массой 35000—70000 и по этой характеристике наиболее близка к гепатотропину, идентифицированному в тромбоцитарных пластинках крови интактных взрослых крыс, с молекулярной массой около 67000 [15]. Однако, как указывают авторы, данный белок инактивируется при рН ниже 5,5 и концентрации NaCl меньше 0,05 М, т. е. именно в тех условиях, при которых ведется кислотно-этанольная экстракция. Клетки регенерирующей печени не являются источником белков, обладающих ДНК-стимулирующей актив-

ностью, так как соответствующая экстракция, последующее фракционирование и тестирование белков ткани не выявило влияния на интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК гепатоцитов *in vitro*. Возможно, что белки — стимуляторы пролиферативной активности гепатоцитов — присутствуют и в сыворотке интактных животных, но действие их блокировано высокими концентрациями ингибиторов [16].

Таким образом, в сыворотке крыс через 3 ч после частичной гепатэктомии выявляются «кислые», относительно высокомолекулярные бел-

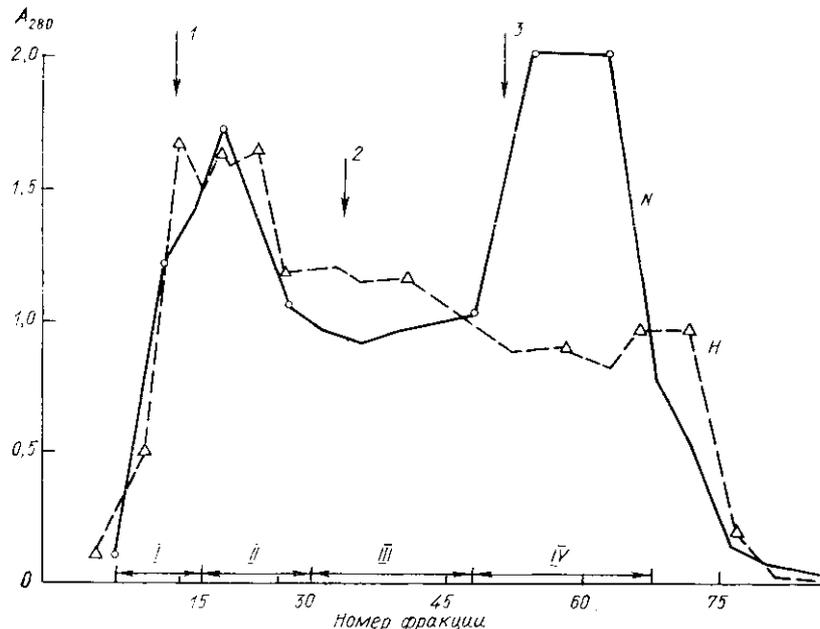


Рис. 3. Хроматограмма кислотно-этанольного экстракта сыворотки интактных (*N*) и гепатэктомированных (*H*, 3 ч после операции) крыс на биогеле Р-60. 1 — бычий сывороточный альбумин (68 кД); 2 — трипсиновый ингибитор из сои (22 кД); 3 — инсулин (6 кД). I—IV — объединенные фракции, использованные для тестирования на митогенную активность.

Fig. 3. The bio-gel P-60 chromatogram of the acid-ethanol extract of the intact (*N*) and hepatectomized (*H*, 3 hours after operation) rat serum. 1 — bovine serum albumin (68 kDalton); 2 — soybean trypsin inhibitor (22 kDalton); 3 — insulin (6 kDalton). I-IV — the pooled fractions tested for the mitogenic activity.

ки, стимулирующие синтез ДНК в гепатоцитах *in vitro*. Дальнейшие исследования по очистке и характеристике указанных белков-гепатотропинов позволят определить, создают ли они состояние компетентности гепатоцитов к известным факторам роста (типа ЭФР, фактора роста из тромбоцитов) или непосредственно специфически обуславливают переход гепатоцитов из  $G_0$  периода в митотический цикл.

#### STIMULATION OF DNA SYNTHESIS IN HEPATOCYTES BY SERUM FRACTIONS OF HEPATECTOMIZED RATS

L. A. Osipova, Yu. D. Ivashchenko, N. I. Nemly, A. I. Bykorez

R. E. Kavetsky Institute for Oncology Problems,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The acid-ethanol extract of the hepatectomized rat serum (obtained 3 or 24 hs after the partial hepatectomy) contains proteins stimulating DNA synthesis in the primary culture of the adult rat hepatocytes. The active fractions partially purified by gel-filtration on the bio-gel P-60 include the spectrum of proteins with a molecular weight of 50-70 kDalton characterized by a shift towards more acidic pH values in comparison with the control,

as it was shown by electrofocusing electrophoresis. Stimulation of DNA synthesis in hepatocytes *in vitro* is more pronounced under the effect of the active fractions of serum obtained in the earlier periods after the partial hepatectomy.

1. Moolten C., Bucher N. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent across circulation // *Science*.—1967.—153, N 3798.— P. 272—274.
2. A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration / B. Fisher, P. Szuch, M. Levine, E. Fisher // *Ibid.*—1971.—171, N 3971.— P. 575—577.
3. Morley C., Kingdon H. The regulation of cell growth. I. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats // *Biochim. et biophys. acta.*—1973.—308, N 2.— P. 260—275.
4. Sakai A., Kountz S. Stimulation of hepatocytes and lymphocytes *in vitro* by liver regeneration // *Nature*.—1975.—257, N 5521.— P. 53—54.
5. Nakamura T., Nawa K., Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1984.—122, N 3.— P. 1450—1459.
6. Control of hepatocyte replication by two serum factors / G. Michalopoulos, K. Houck, M. Dolan, N. Luetke // *Cancer Res.*—1984.—44, N 10.— P. 4414—4419.
7. Labrecque D., Wilson M., Fogarty S. Stimulation of HTC hepatoma cells growth *in vitro* by hepatic stimulator substance (HSS) // *Exp. Cell Res.*—1984.—150, N 2.— P. 419—429.
8. Higgins G., Anderson R. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rats following partial surgical removal // *Arch. Pathol.*—1931.—31.— P. 186—202.
9. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues / A. Roberts, M. Ansano, L. Lamb et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 9.— P. 5339—5343.
10. Taylor J., Mitchell W., Cohen S. Characterization of the binding protein for epidermal growth factor // *J. Biol. Chem.*—1974.—248, N 7.— P. 2188—2194.
11. Ускоренное получение высокоочищенного эпидермального фактора роста с помощью жидкостной хроматографии в обращенной фазе / Ю. Д. Иващенко, Л. А. Осипова, И. Т. Гут, Л. В. Гарманчук // *Эксперим. онкология*.—1985.—7, № 6.— С. 47—49.
12. Гринчишин В. П., Осипова Л. А., Винарчук М. П. Получение изолированных гепатоцитов и их оценка // *Цитология и генетика*.—1981.—15, № 3.— С. 29—31.
13. Strom S., Michalopoulos G. Collagen as a substrate for cell growth and differentiation // *Meth. Enzymol.*—1982.—82.— P. 544—555.
14. Шуклинов В. А., Шумилина В. В. Влияние различных сывороточных фракций на дифференцировку клеток линии L // *Цитология*.—1982.—24, № 12.— С. 1454—1457.
15. Russell W., McGowan J., Bucher N. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets // *J. Cell Physiol.*—1984.—119, N 1.— P. 183—192.
16. Iype P., McMahon B. Hepatic proliferation inhibitor // *Mol. and Cell. Biochem.*—1984.—59, N 1.— P. 57—80.

Ин-т пробл. онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР,  
Киев

Получено 13.06.85