

О.В. Морозова, А.Ф. Карамышева, Д.А. Шавочкина

ЭКСПРЕССИЯ VEGFA В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ГЕМАНГИОЭНДОТЕЛИОМЫ ПОЧЕЧНОЙ КАПСУЛЫ У МЫШЕЙ

НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Изучалась роль VEGFA в индукции злокачественной гемангиоэндотелиомы (ГАЭ) в бессосудистой ткани почечной капсулы (ПК) мышей. Экспрессия мРНК VEGFA и его рецептора Flk1 в ПК и почках у самцов мышей линий CBA и C57Bl/6 исследовалась на разных сроках введения химического канцерогена 1,2-диметилгидразина (ДМГ), который индуцирует с высокой частотой ГАЭ ПК у самцов CBA, а у линии C57Bl/6 с низкой частотой. В почках мышей-самцов обеих линий на всех сроках наблюдалась выраженная экспрессия как VEGFA, так и Flk1, но линейных различий не обнаружено. В ПК этих мышей экспрессии исследуемых генов обнаружено не было. Лишь на последнем сроке канцерогенеза в ПК резистентной линии C57Bl/6 и в ГАЭ ПК линии CBA появилась слабая экспрессия мРНК VEGFA, но мРНК Flk1 не экспрессировалась. Подобный профиль экспрессии характерен, скорее, для перицитов и макрофагов, но не для клеток эндотелия, что указывает либо на происхождение ГАЭ ПК из неэндотелиальных клеток, либо на атипичную эндотелиальную природу клеток-предшественников этой опухоли.

Ключевые слова: 1,2-диметилгидразин, злокачественная гемангиоэндотелиома, фиброзная почечная капсула, VEGFA, Flk1, мышь

Под действием химического канцерогена ДМГ у мышей самцов линии CBA в высоком проценте случаев возникают злокачественные гемангиоэндотелиомы почечной капсулы (ГАЭ ПК, синонимы ангиосаркома ПК, параренальная ангиосаркома) [22]. Существуют резко выраженные различия в частоте ГАЭ ПК у мышей разного пола и линий. У самцов линий CBA частота этих опухолей достигает 70–100%, а у линий C57Bl/6 и C3H возникают редко (4–7%), также ГАЭ ПК не индуцируются у самок [4]. Андрогенная зависимость ГАЭ ПК подтверждена экспериментами, в которых показано, что предварительная кастрация самцов полностью

тормозит индукцию ГАЭ ПК, а введение тестостерона (Те) восстанавливает частоту этих опухолей, вызванных ДМГ. У овариэктомированных самок CBA одновременное действие ДМГ и Те вызывает развитие этих опухолей в высоком проценте случаев (до 100%) [5, 6].

Эта модель удобна, и успешно используется в исследованиях гормональной чувствительности опухолей и индивидуальной (линейной) чувствительности к действию химических канцерогенов. Экспериментальная ГАЭ ПК представляет большой интерес для изучения сосудистых новообразований и их гистогенеза. Показана адекватность этой модели соответствующим опухолям человека [2, 14].

Необычность этой ГАЭ в том, что она возникает в бессосудистой ткани — фиброзной ПК. Фиброзная ПК (capsula fibrosa) представляет собой плотный чехол из соединительной ткани, покрывающий почку снаружи. Она состоит из тяжелой клеток, анастомозирующих между собой, в ней также присутствуют пучки коллагеновых волокон и многочисленные тучные клетки.

Молекулярно-генетические механизмы, приводящие к образованию эндотелиальной опухоли в бессосудистом органе, остаются совершенно неизвестными. Наиболее вероятным фактором, участвующим в образовании сосудистых структур, является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF или VEGFA) — один из ключевых факторов ангиогенеза как в эмбриональном, так и в раннем постнатальном периодах развития. Этот фактор также является одним из основных регуляторов неоангиогенеза опухолей. Показано, что уровень экспрессии VEGF коррелирует с количеством кровеносных сосудов в опухолях самой различной локализации, а также с метастазированием и прогнозом развития заболевания. В настоящее время описаны 2 рецептора VEGFR, передающие сигналы VEGFA внутрь клетки. Основным функциональным рецептором этого фактора роста считается VEGFR2/Flk1. Этот рецептор является высокоспецифичным для клеток эндотелия, он запускает пролифера-

тивные процессы и стимулирует проявление хемотаксиса эндотелиальными клетками [1, 13]. В отличие от VEGFR2/Flk1, рецептор VEGFR1 не является высокоспецифичным для клеток эндотелия, его экспрессия обнаружена также в моноцитах и макрофагах [8, 18].

Известно, что в эндотелиальных опухолях человека экспрессируется VEGFA и VEGFR2 [20]. В процессе возникновения и роста ГАЭ ПК, безусловно, принимают участие и другие факторы, но нам представлялось интересным выяснить, какова роль VEGFA в образовании ГАЭ ПК. Кроме ПК, мы выбрали объектом наших исследований почку, так как этот орган также затронут действием ДМГ.

Материалы и методика

В эксперименте использованы 3-месячные мыши, 18 самцов линии СВА и 18 самцов линии С57Bl/6, полученные из питомника «Столбовая» РАМН. Мыши содержались в стандартных условиях вивария РОНЦ.

Водный раствор ДМГ («Fluka») вводили подкожно 1 раз в неделю в дозе 8 мг/кг массы тела в течение 15 недель. Для контроля были использованы интактные мыши 7 самцов СВА и 8 самцов С57Bl/6, от которых было получено 7 и 8 образцов почечной ткани для выделения РНК. В связи с малым количеством ткани, для выделения РНК образцы ПК в каждой линии были объединены. Опытные мыши были забиты на 2-х сроках: после 16 недель с начала введения ДМГ (неделю спустя после последней инъекции) и на 36 неделе (срок появления ГАЭ ПК). В первую серию опыта (16 недель после начала введения ДМГ) было взято 8 образцов почечной ткани и объединенный образец ПК от 5 самцов СВА и 10 образцов ткани почек и объединенный образец ПК от 5 самцов С57Bl/6. На 36 неделе опыта образцы ткани почек получили от 4 самцов СВА и 5 самцов С57Bl/6. ПК линии С57Bl/6 были объединены. Опухолевая ткань ГАЭ ПК линии СВА была объединена в 2 образца. Мышей умерщвляли наркозным эфиром. Почки экспериментальных животных брали для микроскопического исследования. Почки фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем обезживали в спиртовой проводке, заливали в гистомикс. Срезы толщиной 5 мкм красили гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование проводили на микроскопе Leica DM LB 2.

Выделение РНК. Для выделения тотальной РНК из ткани использовали реагент Trizol («Sigma», USA), выделение РНК проводили в соответствии со стандартным протоколом фирмы «Sigma». Кусочки ткани замораживали при температуре жидкого азота, растирали в ступке и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением реагента Trizol из расчета 1 мл приблизительно на 100–150 мг ткани. К полученному лизату ткани добавляли 200 мкл хлороформа на 1 мл Trizol, тщательно перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 5 мин. и центрифугировали (15 мин при 12000g, 4°C). После центрифугирования отбирали супернатант и добавляли к нему 500 мкл изопропанола («Sigma», USA). Пробирки несколько раз аккуратно переворачивали и оставляли при комнатной температуре на 15 мин., после этого центрифугировали (10 мин при 12000g, 4°C). Осадок промывали 75% этанолом и растворяли в стерильной воде («Микроген», Россия). Качество полученной РНК определяли по характеру полос рибосомальной РНК путем электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию РНК оценивали с помощью измерений

на спектрофотометре (Spectrophotometer ND 1000 «Thermo-Fisher Scientific, Inc.») при длине волны 260 нм. Образцы РНК хранили при –20°C.

Реакция обратной транскрипции. Реакционная смесь для синтеза кДНК VEGFA и Flk1 содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 0,1 мкг «случайных» праймеров (гексануклеотидов) (Литех, Россия), по 0,25 мМ каждого из dNTP (Силекс, Россия), 2,5 ед. ингибитора РНКаз (Хеликон, Россия), 2 мМ дитиотритол (ДТТ) (Sigma), 50 ед. обратной транскриптазы MMLV (Promega, США). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили при 42°C, 50 мин. Реакцию останавливали при помощи нагревания до 95°C в течение 10 мин.

Полимеразная цепная реакция. Реакционная смесь для наработки продуктов ПЦР содержала 1 мкл раствора кДНК; 2 нг/мкл каждого из специфических праймеров; по 0,05 мМ каждого из dNTP (Силекс, Россия); 2,5 мкл 10-кратного Taq-буфера (Силекс, Россия); 1,25 ед. Taq-полимеразы (Силекс, Россия) и H₂O до конечного объема 25 мкл. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для амплификации кДНК VEGFA, Flk1 и взятого в качестве внутреннего контроля GAPDH, а также количество циклов амплификации и Tm приведены в табл. 1. Праймеры для VEGF-A были подобраны таким образом, что выявляли 2 транскрипта: VEGFA120 (304 пн) и VEGFA164 (436 пн). Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Biometa T3 Thermocycler» по следующей схеме: денатурация — 95°C, 50 сек; отжиг праймеров — Tm, 50 сек; синтез — 72°C, 50 сек.

Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДН К. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры «Samsung CCTV LENZ».

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров

Название	Нуклеотидная последовательность	Tm	Кол-во циклов
VEGF-A forward	TGCGGATCAAACSTCACAA	640°C	28
VEGF-A reverse	CCTCCGACCCAAAGTGCT		
Flk1 forward	GTCCGAATCCCTGTGAAGTATCTC	550°C	27
Flk1 reverse	CTTCTTAGCTGCCAGTACCACT		
GAPDH forward	GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG	630°C	22
GAPDH reverse	GCCTGTTCACCACCTTCTTGATGTC		

Результаты и обсуждение

При исследовании экспрессии мРНК VEGFA и Flk1 во всех образцах почек интактных самцов как чувствительной к индуцируемому ДМГ канцерогенезу линии СВА, так и резистентной линии С57Bl/6 мы наблюдали активную экспрессию VEGFA и его рецептора (рис. 1). Стоит отметить, что данный профиль экспрессии в почках обеих линий не изменился под действием ДМГ на 16 и на 36 неделе опыта.

В образцах ПК интактных самцов СВА и С57Bl/6 мРНК VEGFA и Flk1 не экспресси-

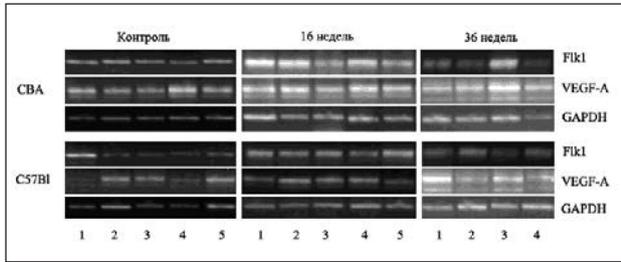


Рис. 1. Экспрессия мРНК Flk1, VEGF-A и GAPDH в почках интактных мышей самцов линий CBA и C57Bl (контроль), и на разных сроках после начала введения ДМГ. Для первых 2-х сроков (контроль и 16 недель) на рисунке приведена экспрессия 5 типичных образцов

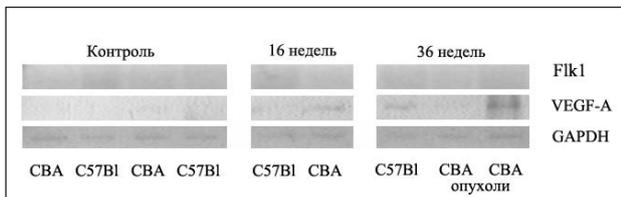


Рис. 2. Экспрессия мРНК Flk1, VEGF-A и GAPDH в ПК интактных мышей самцов линий CBA и C57Bl (контроль), и на разных сроках после начала введения ДМГ. Каждый из образцов представляет собой объединенный материал ПК, полученный от нескольких мышей (см. пояснения в тексте)

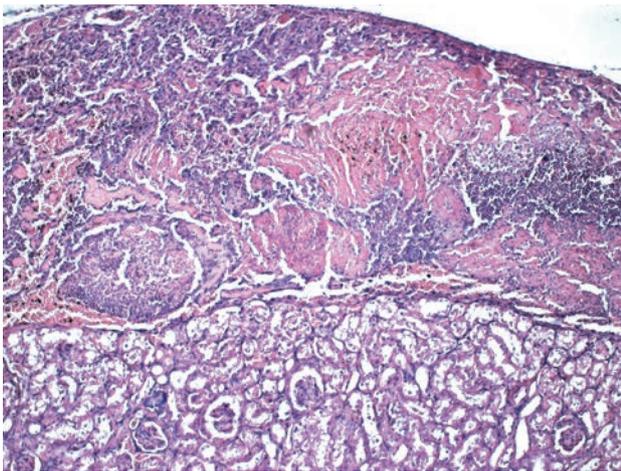


Рис. 3. Злокачественная гемангиоэндотелиома почечной капсулы, индуцированной ДМГ у самца CBA. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$

ровалась. Через 16 недель опыта (после 15 введений ДМГ) экспрессия мРНК Flk1 в ПК обеих линий не обнаруживалась. А в ПК линии CBA был выявлен слабый сигнал м-РНК VEGFA (рис.2). На 36-й неделе эксперимента у самцов линии CBA было обнаружено 2 случая опухоли ПК, которые гистологически были верифицированы как ГАЭ (рис.3). На этом сроке в ПК резистентной линии C57Bl/6 и в опухолях ГАЭ ПК линии CBA наблюдалась слабая экспрессия мРНК (рис.2). Однако мРНК Flk1 и на этом сроке эксперимента ни в ПК резистентной линии C57Bl/6, ни в ГАЭ ПК у CBA не экспрессировалась. В нашем эксперименте ни в контрольных, ни в опытных группах не было выявлено ли-

нейных различий в профиле экспрессии мРНК Flk1 и VEGFA.

Наблюдаемый нами в индуцированных ДМГ ГАЭ ПК профиль экспрессии (отсутствие экспрессии мРНК Flk1 и появление экспрессии мРНК VEGFA) не соответствует клеткам эндотелия. Экспрессия рецептора Flk1 характерна и высоко специфична для клеток эндотелия. В то же время, возможность экспрессии VEGFA клетками эндотелия долгое время подвергалась сомнению, поскольку такая экспрессия привела бы к возникновению аутокринной сигнальной регуляции их размножения. В настоящее время предполагается, что клетки эндотелия экспрессируют VEGFA, хотя и на достаточно низком уровне, и это обеспечивает их выживаемость [16].

Изменения, происходящие в ПК на разных сроках ДМГ канцерогенеза, подробно описаны К.М. Пожарисским и соавт. [3]. Эти авторы пришли к выводу, что в почечной капсуле под действием ДМГ образуются эндотелиальные структуры. Это происходит вследствие раскрытия просветов в тяжах клеток, образующих петлистую сеть в фиброзной ПК, и интрацитоплазматического образования сосудистых просветов. В почке под действием ДМГ также происходят изменения, характеризующиеся резко выраженным полнокровием и миграцией элементов крови в ПК, что, в свою очередь, может оказывать влияние на ДМГ канцерогенез почечной капсулы.

К.М. Пожарисский и соавт. полагают, что на ранних этапах ГАЭ ПК были представлены образованными de novo в бессосудистом органе клетками эндотелия, которые уже обладали явной атипией, свойственной опухолевым клеткам. Возможно, что наблюдавшийся в нашей работе нетипичный для клеток эндотелия профиль экспрессии мРНК VEGFA и Flk1 объясняется атипией вновь образованного эндотелия. В связи с этим возникает вопрос, из каких клеток может происходить образовавшийся в ПК эндотелий. Как полагают К.М. Пожарисский и соавт., вновь образованный эндотелий с признаками неопластической атии происходит из плюрипотентных мезенхимальных клеток.

Действительно, существуют данные, свидетельствующие о том, что клетки метанефрической мезенхимы при определенных условиях проявляют некоторые свойства клеток эндотелия и потенциально способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные клетки [23]. Есть также данные о том, что моноциты обладают способностью к трансдифференцировке в клетки эндотелия под действием плейотропина, секретлируемого фактора дифференцировки, обладающего, в том числе, ангиогенными свойствами [12, 19]. Однако во всех этих работах одним из призна-

ков трансдифференцировки исследуемых клеток в клетки эндотелия являлось появление в них экспрессии VEGFR2/Flk1 [17].

Большой интерес исследователей в последнее время привлекают еще одни клетки мезенхимального происхождения — перициты. Перициты — плюрипотентные клетки, находящиеся в тесном контакте с клетками эндотелия и являющиеся одной из важнейших составляющих стенки сосудов. Перициты активно участвуют в формировании сосудистой системы, контролируя, в том числе, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия [15]. Известно, что перициты экспрессируют VEGFA и рецептор VEGFR1 [7, 10, 11, 21].

Наблюдаемый в нашей работе профиль экспрессии генов в ПК при воздействии ДМГ (VEGFA+/Flk1-) характерен, скорее, для перицитов и макрофагов, но не для клеток эндотелия, что не согласуется с предположением о происхождении ГАЭ ПК из клеток эндотелия. Недавно появились интересные данные, касающиеся происхождения инфантильной гемангиомы (Infantile hemangioma, или IH) [22]. Авторы работы выделили стволовые клетки, дающие рост инфантильной гемангиоме, и показали, что эти клетки при определенных условиях могут дифференцироваться как в клетки эндотелия, так и в перициты.

В связи с этим, в дальнейшем представляется интересным исследовать экспрессию некоторых других маркеров, в том числе, рецептора VEGFR1, а также характерных для перицитов маркеров NG2 (Neural glial antigen-2), PDGFR- β (Platelet Derived Growth Factor Receptor- β), α -SMA (α -smooth muscle actin) [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Введение в молекулярную медицину. / Под ред. М.А. Пальцева. М.: «Медицина». — 2004.
2. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф., Чемерис Г.Ю. Морфология экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы // *Вопр. онкол.* — 1990. — Т. 36. — С. 321–327.
3. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф. и др. Морфогенез и гистогенез экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы // *Вопр.онкол.* — 1990. — Т. 36. — С. 440–448.
4. Турусов В.С., Ланко Н.С. Параренальная ангиосаркома как проявление полового диморфизма в канцерогенезе // *Бюлл. экспер. биол. и мед.* — 1979. — № 7. — С. 74–75.
5. Турусов В.С., Чемерис Г.Ю. Влияние кастрации и линии мышей на индукцию параренальных ангиосарком и аденом почек 1,2-диметилгидразином // *Вопр. онкол.* — 1982. — №3. — С. 82–83.
6. Чемерис Г.Ю. Влияние половых гормонов на индукцию ангиосарком почечной капсулы у мышей // *Экспер. онкол.* — 1989. — № 2. — С. 71–72.
7. Amadio M, Osera C, Lupo G, et al. Protein kinase C activation affects, via the mRNA-binding Huantigen R/ELAV protein, vascular endothelial growth factor expression in a pericytic/endothelial coculture model // *Molecular Vision.* — 2012. — Vol. 18. — P. 2153–2164.
8. Barleon B, Sozzani S, Zhou D. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1 // *Blood.* — 1996. — Vol. 87. — P. 3336–3343.
9. Boscolo E, Stewart CL, Greenberger S. et al. JAGGED1 signaling regulates hemangioma stem cell-to pericyte/vascular smooth muscle cell differentiation // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 2011. — Vol. 31. — P. 2181–2192.
10. Cai J, Hong Y, Weng C, Tan C. et al. Androgen stimulates endothelial cell proliferation via an androgen receptor/VEGF/cyclin A-mediated mechanism // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* — 2011. — Vol. 300. — P. H1210–H1221.
11. Cao R, Xue Y, Hedlund EM. et al. VEGFR1-mediated pericyte ablation links VEGF and PlGF to cancer-associated retinopathy // *PNAS.* — 2010. — Vol. 107. — P. 856–861.
12. Chen H, Campbell RA, Chang Y. et al. Pleiotrophin produced by multiple myeloma induces transdifferentiation of monocytes into vascular endothelial cells: a novel mechanism of tumor-induced vasculogenesis // *Blood.* — 2009. — Vol. 113. — P. 1992–2002.
13. Ferrara N., Gerber HP., Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 669–676.
14. IARC Scientific Publications № 111 Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Volumell –Tuomours of the mouse. Second edition / Ed. by V.S. Turusov and U.Mohr, IARC.-Lyon, France. — 1994. — P. 360–361.
15. Kutcher ME, Herman IM. The pericyte: Cellular regulator of microvascular blood flow // *Microvasc Res.* — 2009. — Vol. 77. — P. 235–246.
16. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine vegf signaling is required for vascular homeostasis // *Cell.* — 2007. — Vol. 130. — P. 691–703.
17. Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor localization in the adult // *Am J Pathol.* — 2006. — Vol.168. — P. 639–648.
18. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M. et al. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2008. — Vol. 28. — P. 658–664.
19. Sharifi BG, Zeng Z, Wang L. et al. Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 1273–1280.
20. Suhail Al-Salam, Nahed Balalaa, Issam Faour. et al. HIF-1 α , VEGF and WT-1 are protagonists in bilateral primary angiosarcoma of breast: a case report and review of literature // *Int J Clin Exp Pathol.* -2012. — Vol. 5. — P. 247–253.
21. Talavera-Adame D, Ng TT, Gupta A. et al. Characterization of microvascular endothelial cells isolated from the dermis of adult mouse tails // *Microvasc. Res.* — 2011. — Vol. 82. — P. 97–104.
22. V.S.Turusov, G.Y.Chemeris and Y.D.Parfenov. Pararenal angiosarcoma induced in male mice by 1,2-dimethylhydrazine — a model for studying the role of androgens

in chemical carcinogenesis // *Carcinogenesis*. — 1985. — Vol. 6. — P. 325–331.

23. Usui J, Yamada R, Kanemoto K. et al. Murine metanephric mesenchyme possesses characteristics of vascular endothelial cells in vitro // *Nephron Exp Nephrol*. — 2006. — Vol. 102. — P. e93–e98.

O.V. Morozova, A.F. Karamysheva, D.A. Shavochkina

**EXPRESSION OF VEGFA DURING
1,2-DIMETHYLHYDRAZINE INDUCTION
OF MALIGNANT HEMANGIOENDOTHELIOMA
OF RENAL CAPSULE IN MICE**

Research Institute of Carcinogenesis N.N. Blokhin
Russian Cancer Research Center, Moscow

There was examined the role of VEGFA in the induction of malignant hemangioendothelioma (HAE) in the non-vascular tissue of renal capsule (RC) in mice. Expression mRNA VEGFA and its receptor Flk1 in RC and the kidneys in male mice of CBA and C57Bl/6 lines was studied at different stages of the administration of a chemical carcinogen 1,2-dimethylhydrazine (DMH), which induced HAE of PC in CBA males with a high frequency, and in C57Bl/6 line — with a low frequency. In the kidneys of male mice of both lines at all stages there was observed significant expression both VEGFA and Flk1 but no linear differences were found. In RC of these mice expression of studied genes were not found. Only at the last stage of carcinogenesis in RC of resistant line C57Bl/6 and in HAE of RC of line CBA there was appeared weak expression of mRNA VEGFA but mRNA Flk1 was not expressed. A similar profile of expression is appropriate more for pericytes and macrophages but not endothelial cells indicating either on the origin of HAE RC from non-endothelial cells or on atypia of endothelial cells — progenitors of this tumor.

Поступила в редакцию 09.10.2013