

# Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji nowotworów wątroby u szczurów

MARTA WÓJCIK, MARIO GIORGI\*, RYSZARD BOBOWIEC

Zakład Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Zakład Farmakologii i Toksykologii, Kliniki Weterynaryjne, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet w Pizie, San Piero a Grado 56122, Piza, Włochy

Wójcik M., Giorgi M., Bobowiec R.

## Significance of stem cells in hepatocarcinogenesis in rats

### Summary

Hepatic oval cells (OC) are considered to be the stem cells of the liver and have been linked to the development of hepatocellular carcinoma HCC, one of the most lethal cancers. The objective of this study was to analyse the proliferative response of OC obtained from rats receiving diethylnisamine DEN. In addition, we investigated the effects of resveratrol (Res) on the proliferation and oxidative markers of OC in vitro. OC isolated by in situ collagenase liver perfusion methods were treated with different concentrations of Res for 24, 48 and 72 hours. At the end of these periods the proliferative activity of OC, the release of superoxide anion by OC and the medium concentration of malonyldialdehyd were analyzed.

The proliferation of OC cultured without Res increased from  $IP = 0.945 \pm 0.02$  to  $IP = 1.525 \pm 0.031$  after 24 and 72 hours respectively. A marked ( $p \leq 0.05$ ) inhibition of OC proliferation was observed in the presence of 1.0  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of Res. A significant decrease in the release of  $\text{O}_2^-$  by OC, observed throughout the experimental period, was attributed to the presence of 25  $\mu\text{M}$  of Res. Exposition of OC to 100  $\mu\text{M}$  of Res inhibited the release of  $\text{O}_2^-$  only after 48 and 72 hours of incubation. The presence of 25  $\mu\text{M}$  of Res resulted in the depletion of MDA level, which did not exceed  $0.19 \pm 0.009$  nM.

Proliferative activity of OC isolated from carcinogenic rats intensified throughout the culture period. When subjected to the carcinogenic effect of DEN, Res exerts anti-proliferative influence on OC. Moreover, our results provide evidence that Res attenuates oxidative stress during hepatocarcinogenesis.

**Keywords:** oval cells, hepatocellular carcinoma, proliferative activity, resveratrol

Dotychczas uważano, że to nadmierna proliferacja dojrzałych hepatocytów jest źródłem nowotworów wątroby, w tym przede wszystkim raka wątrobowo-komórkowego (*hepatocellular carcinoma* – HCC). Nowotwór ten pojawia się niezależnie od wieku u ludzi oraz u starych psów, rzadziej kotów i koni (4, 7, 14). Wyniki ostatnich badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach hepatokarcinogenezy wskazują na uprzednią aktywację bipotencjalnych komórek macierzystych wątroby jako momentu zapoczątkowującego HCC (11, 13). Komórki te, nazywane ze względu na kształt jądra komórkami owalnymi (KO), nie biorą udziału w fizjologicznej regeneracji narządu. Natomiast pobudzone po rozległej (2/3 masy wątroby) hepatektomii oraz po ciężkich i chronicznych stanach uszkodzeń wątroby warunkują pełną jej regenerację (11, 13). Wytwarzany w takich przypadkach przez komórki Kupffera czynnik martwicy nowotworów (TNF $\alpha$ ) stymuluje KO do podziałów, powodując ich rozplem. Z kolei uwalniane przez aktywowane ko-

mórki gwiazdziste (HSC) czynniki wzrostu (np. EGF, TGF- $\alpha$ , HGF) uruchamiają sygnalizację nasilającą ich wzrost i różnicowanie do hepatocytów lub/i cholangiocyty (8, 19). Okazało się, że po nowotworowej transformacji izolowanych KO, a następnie transplantacji dochodzi do nadmiernej ich proliferacji, upośledzenia różnicowania i zapoczątkowania guzogenezy. Istotny w przebiegu transformacji nowotworowej KO jest udział produktów genów, tj. c-myc, c-Ha-ras, p53 oraz koneksyn będących specyficznymi białkami transbłonowymi, niezbędnymi do utworzenia i działania tzw. połączeń szczelinowych (gap junctions) (7). Transgeniczne myszy, ekspresjonujące w nadmiarze onkogen c-myc w KO, dotknięte zostają rakiem wątrobowokomórkowym, zaś „wyłączenie” ekspresji tego genu prowadzi do regresji nowotworu z apoptozą lub różnicowaniem KO.

Biorąc pod uwagę powyższe cechy KO, postanowiono określić aktywność proliferacyjną tych komórek wyizolowanych od szczurów, poddanych działa-

niu chemicznego karcinogenu (dietylnitrozoaminy – DEN) o działaniu genotoksycznym. Ponadto, opierając się na dotychczasowych wynikach badań wskazujących na antyproliferacyjne i antyoksydacyjne działanie resweratrolu (Res), postanowiono zbadać wpływ tego fitoestrogenu na proliferację oraz parametry równowagi oksydoredukcyjnej KO w warunkach *in vitro*.

### Materiały i metody

Do doświadczenia użyto 10-tygodniowych szczurów rasy Wistar (samice, 200-250 g). W celu indukcji KO wykonano w znieczuleniu ogólnym częściową hepatektomię (PH), poprzez usunięcie lewego i prawego płata wątroby, a następnie po 7-dniowym okresie rekonwalescencji podawano 0,005% roztwór dietylnitrozoaminy (DEN) w wodzie do picia. Po 6 tygodniach przyjmowania karcinogenu przeprowadzono izolację KO metodą perfuzji wątroby buforem Krebsa-Ringera: a) zawierającym EGTA, b) nie zawierającym jonów  $Ca^{2+}$  i EGTA, c) zawierającym kolagenazę typu IV (17). Wątrobę umieszczono w podłożu DMEM-HAMS12, rozdrobniono, przefiltrowano, a następnie poddano trawieniu (1 godz., 37°C) w roztworze PBS zawierającym: kolagenazę, protezę E, trypsynę i DNazę I. W kolejnym etapie zawieszinę komórek wirowano w gradiencie Percolu (2000 rpm, 20 min). Po przepłukaniu komórki zawieszono w podłożu DMEM-HAMS12 z dodatkiem: płodowej surowicy bydlęcej, insuliny, heparyny i mieszaniny antybiotyków, a następnie wysiano do 24-dołkowych płytek ( $5 \times 10^5$  komórek/ml). Żywotność komórek wyizolowanych w obu grupach doświadczalnych, oceniono na podstawie barwienia błękitem trypanu, wynosiła 75-85%. Po 24 godzinach przyklejone do podłoża komórki inkubowano: bez dodatku Res; I – z dodatkiem 1,0  $\mu$ M/ml Res; II – z dodatkiem 25  $\mu$ M/ml Res; III – z dodatkiem 100  $\mu$ M/ml do pożywki hodowlanej.

Po 24, 48 i 72 godz. inkubacji analizowano aktywność proliferacyjną komórek na podstawie testu MTT oraz uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) (16, 17). Aktywność proliferacyjną KO mierzono metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika MTT (sól tetrazolowa (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl] diphenylotetrazolium bromide). Absorbancję odczytywano przy długości fali 570 nm, a uzyskane wyniki gęstości optycznej (OD) wykorzystano do obliczenia indeksu proliferacji (IP). Wytwarzanie  $O_2^-$  przez komórki oceniono za pomocą reakcji Conffera. Na płytce 96-dołkowej 50  $\mu$ l hodowli i 100  $\mu$ l 0,1% roztworu błękitu tetrazoliowego (NBT) inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej. Wyniki odczytano w OD (przy długości fali 545 nm) i za pomocą współczynnika ekstynkcji równego 21,1 nM przeliczono na nM anionu ponadtlenkowego wytwarzanego przez  $1 \times 10^5$  komórek. Aldehyd dwumalonowy (MDA) oznaczano w podłożu hodowlanym metodą spektrofotometryczną (18). Do 1 ml zebranego podłoża dodano 2,5 ml TCA (1,22 M w 0,6 M HCl). Po inkubacji w temperaturze pokojowej zawieszina została zmieszana z 1,5 ml TBA (kwasu tiobarbiturowego) i wstawiona do łaźni wodnej na 25 minut. Po wystudzeniu dodane zostało 4 ml butanolu, zworteksowane i zwirowane przez 10 min. przy  $1500 \times g$ . Zawartość MDA mierzona była wobec czystego butanolu przy długości fali 532 nm.

Tab. 1. Średnia procentowa zawartość resweratrolu w podłożu hodowlanym w warunkach doświadczalnych

Wyjściowe stężenie Res w podłożu hodowlanym	24 godz.	48 godz.	72 godz.
Res 1 $\mu$ g/ml	92,5 $\pm$ 8,2	ND	ND
Res 25 $\mu$ g/ml	87,0 $\pm$ 2,8	81,5 $\pm$ 7,4	78,2 $\pm$ 8,5
Res 100 $\mu$ g/ml	78,0 $\pm$ 10,5	75,0 $\pm$ 18,2	69,5 $\pm$ 12,0

Objaśnienie: ND – poziom nieoznaczalny wybraną metodą

Stężenie Res w podłożu hodowlanym oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (15). Rozdziału dokonano w układzie faz odwróconych przy użyciu kolumny LiChrospher 100 RP C18 (250  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m) i detekcji UV (długości fali  $\lambda = 220$  nm). Stężenie Res obliczono w stosunku do standardów zewnętrznych wg wzoru:

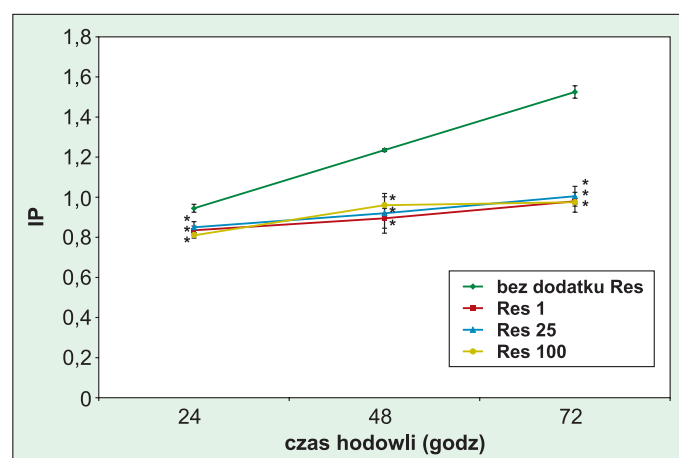
$$C_p = C_s / A_s \times A_p$$

gdzie:  $C_p$  – oznacza stężenie Res w danej próbce;  $C_s$  – stężenie standardu;  $A_s$  – pole powierzchni piksu standardu;  $A_p$  – pole powierzchni piksu Res po analizie próbki. Opierając się na ubytku standardu wewnątrznej w każdej próbce, uwzględniono straty powstałe podczas ekstrakcji.

Dla każdego badanego parametru różnice między średnimi wartościami kontrolnymi a badanymi porównywano, używając testu t-Studenta i analizowano programem Statistica.pl.

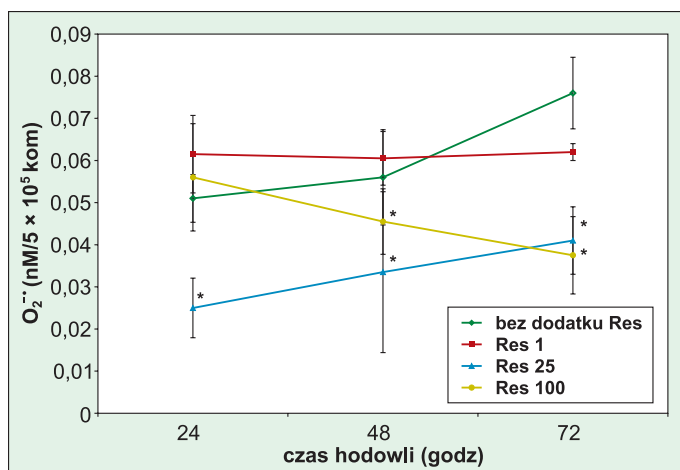
### Wyniki i omówienie

Aktywność proliferacyjna KO izolowanych od szczurów poddanych działaniu DEN i inkubowanych bez dodatku Res wzrastała od  $0,945 \pm 0,02$  do  $1,525 \pm 0,031$ , odpowiednio, po 24 i 72 godzinach (ryc. 1). Res we wszystkich użytych w doświadczeniu stężeniach znacząco ( $p \leq 0,05$ ) hamował proliferację KO. Zastosowanie 100  $\mu$ M Res wiązało się z najniższym indeksem proliferacji, widocznym już w 24. godzinie hodowli ( $IP = 0,81 \pm 0,014$ ). Po 72 godzinach Res



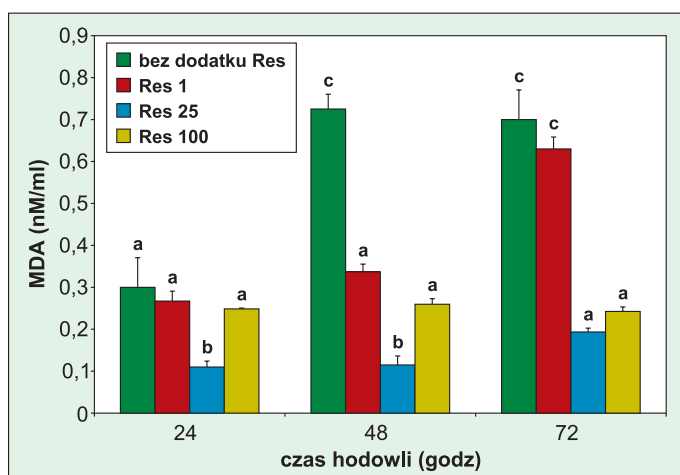
Ryc. 1. Indeks proliferacji KO inkubowanych bez dodatku Res oraz w warunkach ekspozycji na jego wzrastające stężenia ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Objaśnienie: \*  $p \leq 0,05$  w porównaniu do hodowli bez dodatku Res



Ryc. 2. Wpływ Res na poziom uwalnianego przez KO anionorodnika ponadtlenkowego ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Objaśnienie: jak na ryc. 1



Ryc. 3. Stężenie MDA w podłożu hodowlanym w przebiegu hodowli KO bez resweratrolu oraz z jego dodatkiem we wzrastających stężeniach ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Objaśnienie: a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy  $p < 0,05$

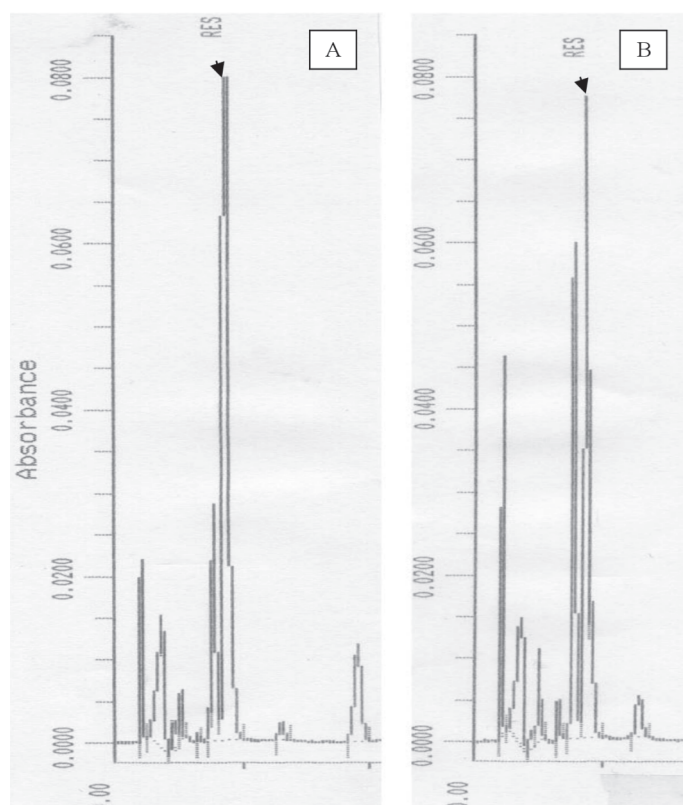
w tym stężeniu również istotnie ograniczał proliferację KO do  $IP = 0,97 \pm 0,04$ .

W hodowlach KO bez dodatku Res uwalnianie  $O_2^{\cdot-}$  nasilało się w czasie trwania doświadczenia, osiągając wartość  $0,076 \text{ nM}/5 \times 10^5$  komórek w 72. godz. (ryc. 2). Res w stężeniu  $25 \mu\text{M}$  znamienne zmniejszał przez cały okres inkubacji uwalnianie  $O_2^{\cdot-}$  w KO. Najwyższe stężenie Res ograniczało uwalnianie tego rodniczka jedynie po 48 i 72 godz. inkubacji, odpowiednio, do  $0,045 \text{ nM}/5 \times 10^5$  komórek i  $0,037 \text{ nM}/5 \times 10^5$  komórek.

Bez dodatku Res obserwowano najpierw wzrost ( $0,76 \pm 0,03$  po 48 godz.), a następnie niewielki spadek ( $0,7 \pm 0,07$  po 72 godz.) stężenia MDA w podłożu hodowlanym (ryc. 3). Po najniższym stężeniu Res ( $1 \mu\text{M}/\text{ml}$ ) zawartość aldehydu obniżała się jedynie przez pierwsze 48 godzin. Znaczący ( $p \leq 0,05$ ) spadek MDA, utrzymujący się przez cały okres inkubacji KO, obserwowano jedynie pod wpływem  $25 \mu\text{M}$  Res,

gdzie maksymalna wartość MDA nie przekraczała  $0,19 \pm 0,009 \text{ nM}$ .

KO wyizolowane od szczurów poddanych działaniu DEN charakteryzowały się narastającą aktywnością proliferacyjną z jednoczesnym nasilonym uwalnianiem przez nie anionorodnika ponadtlenkowego. DEN jako karcinogen środowiskowy jest metabolizowana w wątrobie do reaktywnych metabolitów etylowych, które wchodząc w interakcje z DNA hepatocytów hamują ich proliferację oraz powodują ich uszkodzenie (1, 2). Wielu autorów (3, 5, 12, 13), w tym po raz pierwszy Wilson i Leduc, wykazało, iż masowe uszkodzenie hepatocytów i w związku z tym brak fizjologicznej regeneracji narządu jest sygnałem do pobudzenia puli „rezerwowych komórek owalnych”. Aktywacja bipotencjalnych KO obserwowana jest przede wszystkim w chronicznych uszkodzeniach wątroby, tj. ciężkim zatruciu alkaloidami pyrrolizydynowymi u koni, w chorobie Tyzzeria na tle *Clostridium piliforme*, w hemochromatozie, aflatoksynowym rozległym zapaleniu wątroby czy kamicy żółciowej oraz u psów na tle chronicznego *hepatitis* (3, 12). Poza doniosłą rolę KO w regeneracji wątroby podnosi się ich udział w wątrobowej karcinogenezie, a w szczególności powstawaniu HCC (5, 13). Dotychczasowe badania własne, oparte na modelu wątrobowej karcinogenezy, wskazują, iż zapoczątkowanie neoplazji było poprzedzone aktywacją komórek owalnych, ich nadmierną proliferacją bez jednoczesnego różnicowania do hepatocytów i/lub cholangiocytołów (17). W proliferacyjnej od-



Ryc. 4. Rozdzielanie chromatograficzne resweratrolu ( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) w podłożu hodowlanym po 48 godz. (A) oraz 72 godz. hodowli (B)

powiedzi KO na działanie chemicznego uszkodzenia wątroby bierze udział szereg czynników wzrostu, tj, EGF (epidermal growth factor), TGF $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), HGF (hepatocyte growth factor), rodzina TNF (tumor necrosis factor) oraz interferon- $\gamma$ . (9, 10). Działanie EGF i TGF $\alpha$  wiąże się z aktywacją receptorowej (EGFR) kinazy tyrozynowej. Z kolei wytwarzany zarówno w wątrobie, jak i poza nią HGF łączy się z odmiennym receptorem (c-met), nasilając proliferację KO (9).

Wobec braku skutecznej terapii HCC coraz częściej zwraca się uwagę na „chemoprewencję” tego typu nowotworu z użyciem naturalnych składników pokarmowych, do których należy m.in. resweratrol (1, 2). Szereg dotychczasowych wyników badań wskazuje, iż ta fitoaleksyna, obok wpływu na proces zapalny towarzyszący karcinogenezie, moduluje proliferację i apoptozę komórek w różnych typach nowotworów. Ponadto wpływa na angiogenezę i potencjał metastatyczny guzów nowotworowych (1, 2). Zastosowany w niniejszym doświadczeniu Res hamował aktywność proliferacyjną KO *in vitro*, a efekt ten pozostawał niezależny od zastosowanego stężenia fitoestrogenu. W stosunku do uwalniania przez KO anionorodnika ponadtlenkowego udział Res nie był już tak jednoznaczny. Jedynie fitoestrogen w średnim i najwyższym stężeniu skutecznie ograniczał uwalnianie O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Podobnie Res wpływał na poziom MDA, ograniczając tym samym jego mutageny i karcinogeny wpływ na komórki. Uzyskane wyniki własne wydają się potwierdzać osiągnięcia Bishayee i wsp. (2), którzy wykazali że Res obecny w diecie w niskich stężeniach nie hamował promocji guzów wątroby wywołanych podawaniem szczurom 3,3',4,4'-tetrachlorobifenyłu. Z drugiej jednak strony, regulując ekspresję białek i czynników transkrypcyjnych włączonych w syntezę DNA i cykl komórkowy (p53, cykliny, CDK – cell division kinases, NF $\kappa$ B, MAPKs), Res uznawany jest przez wielu autorów za skuteczny czynnik chemoprewencyjny (1, 2, 6). Jego działanie przeciwzapalne polegające na hamowaniu aktywności cyklooksygenazy-2 (COX-2), a tym samym ograniczeniu wytwarzania prostaglandyn, nasila efekt hepatoprotekcyjny (6).

## Wnioski

Obok działania antyoksydacyjnego, resweratrol wpływał hamująco na proliferację komórek owalnych, wzbudzanych podawaniem chemicznego karcinogenu u szczurów.

## Piśmiennictwo

1. Bishayee A., Barnes K. F., Bhatia D., Darves A. S., Carrol R. T.: Resveratrol suppress oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev. Res.* 2010, 3, 753-763.
2. Bishayee A., Dhir N.: Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 179, 131-144.
3. Bergero D., Nery J.: Hepatic diseases in horses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2008, 92, 345-355.

4. Fukui Y., Sato J., Sato R., Yasuda J., Naito Y.: Canine serum thermostable alkaline phosphatase isoenzyme from a dog with hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* 2006, 68, 1129-1132.
5. Laconi E.: Differential growth: From carcinogenesis to liver repopulation. *Am. J. Pathol.* 2000, 156, 389-392.
6. Lee E., Shin M., Yoon S., Moon J.: Resveratrol inhibits dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Arch. Pharm. Res.* 2010, 33, 925-932.
7. Libbrecht L., Roskams T.: Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Cell. Dev. Biol.* 2002, 13, 389-396.
8. Lowes K. N., Croager E. J., Olynyk J. K., Abraham L. J., Yeoh G. C.: Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003, 18, 4-12.
9. Nagy P., Bisgaard H. C., Santoni-Rugiu E., Thorgeirsson S. N.: In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (Oval) cells after administration of 2-Acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996, 23, 71-79.
10. Oh S. I., Leather M., Iatch I., Petersen B. E.: Hepatic oval "stem" cell in liver regeneration. *Cell. Dev. Biol.* 2002, 13, 405-409.
11. Petersen B. E.: Hepatic stem cells: coming full circle. *Blood. Cell. Mol. Dis.* 2001, 27, 590-600.
12. Routhuizen J., Van den Ingh T. S.: Hepatitis in dog, a review. *Tijdschr. Diergenees.* 1998, 15, 246-252.
13. Sell S.: Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Cell. Dev. Biol.* 2002, 13, 419-424.
14. Shiga A., Shirota K., Enomoto M.: Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 2001, 63, 483-486.
15. Wang Ch., Prasain J., Barnes S.: Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J. Chromatogr.* 2002, 777, 3-28.
16. Wessely-Szponder J., Szponder T.: Comparison of the effects of two anaesthetic combinations in rabbits on some neutrophil functions in vitro. *World Rabbit Sci.* 2010, 18, 169-177.
17. Wójcik M., Bobowiec R., Martelli F.: Effect of carotenoids on in vitro proliferation and differentiation of oval cells during neoplastic and non-neoplastic injuries in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 59, Supl. 2, 203-213.
18. Wójcik M., Kosior-Korzecka U., Bobowiec R.: Cytoprotective action of 17 $\beta$ -oestradiol against iron-induced hepatic oxidative stress in vitro. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 259-263.
19. Zimmermann A.: Liver regeneration. The emergence of new pathways. *Med. Sci. Monit.* 2002, 8, 53-63.

Adres autora: dr Marta Wójcik, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin;  
e-mail: marta.wojcik@up.lublin.pl