

Изучение дифференцировки эмбриональных стволовых клеток при длительном кокультивировании с адипоцитами

М.В. Ковина¹, Л. Зильберман², Ю.М. Ходарович³

¹ – Институт Биохимии им. Баха РАН, Москва

² – The University of Texas Health Science Center at Houston, Medical School, Department of Integrative Biology & Pharmacology

³ – Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Контактная информация: Институт Биохимии им. Баха, РАН, Ленинский проспект 33, 119071, Москва, Россия, тел. (7-499)-613-3223, факс (7-495)-954-2732, e-mail gershi2001@yahoo.com

В зрелом монослое адипоцитов, крупных сферических светоотражающих клеток, проделали скребком бесклеточные дорожки 1-5 мм ширины. Плоские веретенообразные свето-поглощающие клетки, мигрирующие с границ дорожек, покрыли их монослоем через 8-10 дней. Новый монослой морфологически стабилен в течение нескольких недель после образования и резко отличается от старого – его клетки плоские и темные, без свето-отражающих включений (жировых капель). Если к адипоцитарному монослою с прорытыми бесклеточными дорожками добавить мышинные эмбриональные стволовые клетки (мЭСК), то формирующийся к 6-7 дню новый монослой содержит блестящие точки, и к 15-20 дню превращается в сплошной блестящий ковер молодых адипоцитов, наполненных по периферии каждой клетки циркулярно расположенными мелкими светоотражающими липидными капельками. Обсуждается вопрос об истинной или индуктивной дифференцировке, как причине данного явления.

Ключевые слова: дифференцировка, контактная дифференцировка, кокультивирование, эмбриональные стволовые клетки, адипоциты.

Введение

Одним из способов индукции дифференцировки стволовых клеток является их кокультивирование с дифференцированными клетками. Дифференцированные клетки секретируют регуляторные молекулы и формируют со стволовыми клетками межклеточные контакты, что и является стимулом к дифференцировке стволовых клеток. Наиболее часто

кокультивирование используется для терминальных этапов дифференцировки стволовых клеток, причём, как правило, совместно с добавлением в культуральную среду экзогенных ростовых факторов. Влияние кокультивирования на ранних этапах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток изучено мало. Ранее нами было показано, что при кокультивировании мЭСК

с эндотелиоцитами можно добиться эффективной дифференцировки при условии длительной копролиферации и многократного пересева культуры [1]. В настоящей работе мы изучали дифференцировку в случае, если возможность многократного пересева отсутствует. В качестве матричной культуры мы взяли адипоциты, полученные дифференцировкой из культуры преадипоцитов 3T3-L1. В настоящее время для дифференцировки ЭСК в адипоциты используется многостадийная методика, имитирующая адипоцитарную дифференцировку ходе эмбриогенеза [2, 7]. По этой методике, вначале из ЭСК формируются эмбриоидные тельца, которые затем культивируются в присутствии ретиноевой кислоты, а на последнем этапе - в присутствии инсулина и трийодтиронина. При этом образуется смешанная популяция клеток, с долей адипоцитов около 15%. Для получения более чистой культуры необходимы дополнительные этапы, включающие сортировку клеток с активированной флуоресценцией [5]. Недавно было показано, что возможна эффективная прямая дифференцировка ЭСК в адипоциты без промежуточных этапов с помощью введения в ЭСК малой интерферирующей РНК, подавляющей экспрессию гена Oct4 [3]. Целью нашей работы было выяснить, возможна ли прямая дифференцировка мЭСК в адипоциты под влиянием кокультуры зрелых адипоцитов, а также насколько гомогенна полученная культура потомков мЭСК.

Методы

Получение и культивирование адипозных клеток. Адипозные клетки получали из 3T3-L1 преадипоцитов

как описано ранее [4] с небольшими изменениями. 3T3-L1 клетки были любезно предоставлены доктором Knutson (University of Texas Health Science Center at Houston) и культивировались в 100 мм чашках Петри в среде DMEM (Cellgro) содержащей 10% фетальной сыворотки телят (Sigma). Для проведения дифференцировки преадипоциты растили до достижения 100% конфлуэнтности. Через два дня после достижения 100% конфлуэнтности клетки помещали в свежую среду объёмом 3.5 мл, содержащую 10% фетальной сыворотки телят, 0.5 мМ изобутилметилксантин (Sigma), 1 пгр. дексаметазон на 1 мл (Sigma) и 10 пгр. инсулина на 1 мл (Elanco). Каждые два дня среда менялась на свежую такого же состава. На седьмой день более 90% клеток экспрессировало адипозный фенотип. Клеточный монослой адипоцитов использовался в экспериментах в возрасте 7-10 дней культивирования после начала дифференцировки. За 48 часов перед началом эксперимента клетки переносили в среду, не содержащую инсулина (DMEM и 10% фетальной сыворотки), среда менялась трижды перед началом экспериментов по кокультивированию.

Кокультивирование мЭСК и адипоцитов. Несколько дорожек, лишённых клеток, шириной 1-5-мм и длиной 50-100-мм, были сделаны на каждой чашке с адипоцитами методом механического соскрёба стерильным шпателем. Каждый эксперимент повторялся 3 раза. Плашки засеивались 5×10^3 - 1×10^4 мЭСК, в то время как контроль оставался незасеянным. Среду меняли каждый второй день. Культуру после начала эксперимента не пересевали.

Результаты и их обсуждение

Для изучения дифференцировки мЭСК в присутствии зрелых адипоцитов мы использовали чашки с монослоем зрелых адипоцитов, полученные, как описано в материалах и методах. В монослое адипоцитов с помощью шпателя делали дорожки, лишённые клеток. Уже через день после соскребка в образовавшемся просвете можно наблюдать морфологически отличные от адипоцитов плоские веретенообразные свето-поглощающие клетки, мигрирующие с границ дорожек. Это адипоциты, подвергшиеся частичной дедифференцировке при потере части клеточных контактов и приобретшие свойства преадипоцитов. В дальнейшем дорожки постепенно заполняются этими клетками, оставаясь морфологически стабильными, т.е. сохраняя отмеченный выше диморфизм: круглые крупные жиросодержащие зрелые адипоциты и темные плоские веретенообразные преадипоциты. К части чашек с дорожками мы добавляли ЭСК мыши. В этом случае преадипоциты и мЭСК копролиферировали вместе на свободных поверхностях. По нашим данным, копролиферация ЭСК с детерминированными клетками (в данном случае, с преадипоцитами) способствует дифференцировке ЭСК по этому же пути [1]. На рис. 1 показаны контрольные и засеянные дорожки через одну-пять недель после соскребка; панели слева показывают незасеянные ЭСК области, справа - засеянные. Клетки в засеянных каналах растут более быстро; очень хорошо видна их диморфность: наряду с описанными выше темными веретенообразными клетками появляются новые клеточные кластеры, образованные маленькими, ярко блестящими клетками, заполнен-

ными липидными каплями (рис. 1 Е, вставка). Эти клетки морфологически неотличимы от терминально дифференцированных адипоцитов. Мы полагаем, что кластеры блестящих круглых клеток получены из мЭСК, в то время как темные веретенообразные клетки происходят из клеток матрицы (адипозного слоя). Неспособность преадипоцитов в присутствии кокультуры зрелых адипоцитов к терминальной дифференцировке подтверждается и в недавней работе доктора Song с коллегами [6]. Почему делящиеся потомки клеток матрицы не переходят к конечной стадии дифференцировки – экспрессии жировых капель, а потомки мЭСК – их быстро экспрессируют? Вероятно, потомки мЭСК, детерминируясь по адипоцитарному пути, развивают мощные внутренние сигналы к дифференцировке в данном направлении и уже не могут остановить начавшуюся дифференцировку на промежуточных стадиях (преадипоциты), быстро достигая конечной стадии, в то время как пролиферирующие клетки матрицы, не имеют таких сигналов. В следующие недели липидные капли в ярко блестящих круглых клетках увеличились в количестве, формируя кольца на поверхности каждой клетки, и выросли в размерах. На рисунке 2 показаны молодые, только что сформировавшиеся (слева) и старые, предсуществующие (справа) адипоциты при увеличении 450х.

Множественное формирование клеток со светящимися кольцами из капель на плашке, засеянной мЭС клетками, наблюдалось на всей области соскребка, (рисунок 1 Е-К), в то время как дорожки в контрольных чашках зарастали сплошь темными клетками; иногда мы находили

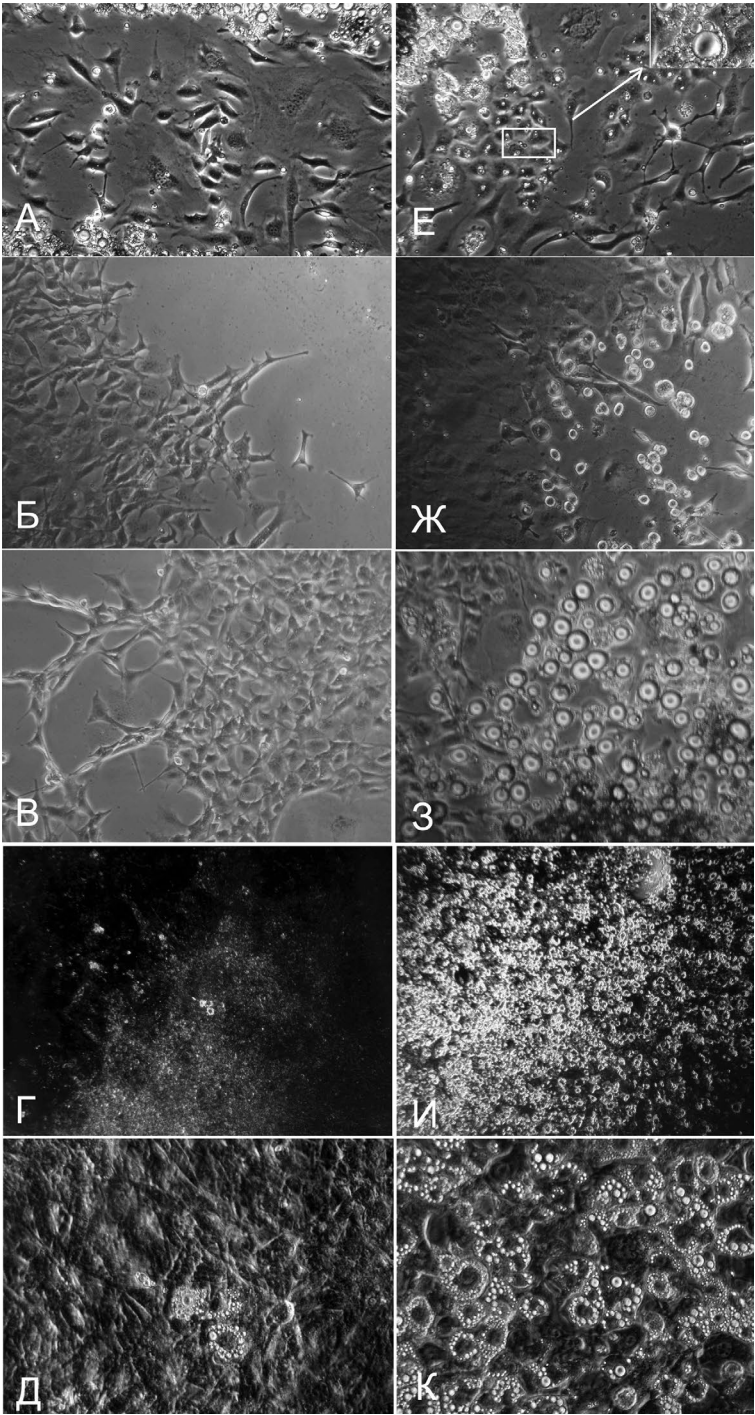


Рис. 1. Не засеянные (А-Д) и засеянные мЭСК (Е-К) адипоциты через 1 (А, Е), 2 (Б,Ж), 3 (В,З) и 5 (Г, Д и К) недель после соскрёба дорожки при увеличении 100х (А-В, Е-З), 40х (Г, И), и 200х (Д, К).

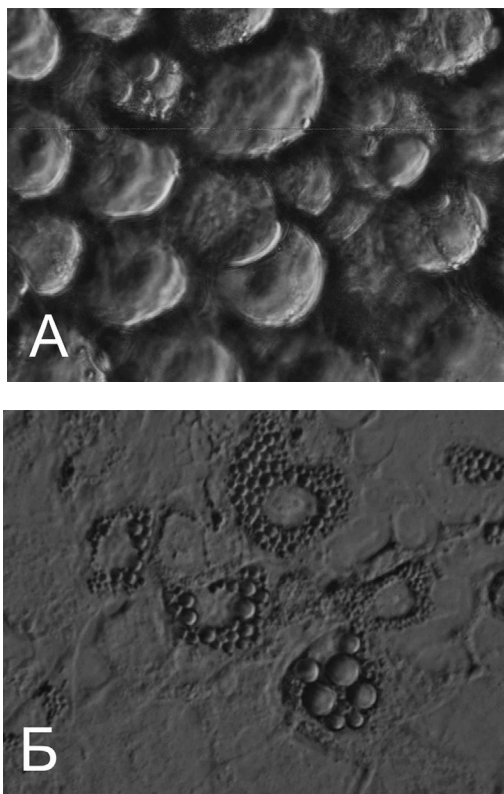


Рис. 2. Фотография с высоким разрешением старых (А) и молодых (Б) адипоцитов; увеличение 450х.

только одну-две молодые адипоцитарные клетки на всей контрольной чашке (рисунок 1 Г,Д). Стволовые клетки не росли ни в свежей среде для роста адипоцитов, ни в прекоинкубационной среде. Таким образом, направленная дифференцировка мЭСК в адипоциты под влиянием матричной культуры является наиболее вероятным объяснением наблюдаемых результатов. При дальнейшем культивировании клеток, параллельно с процессом образования адипоцитарного монослоя в бесклеточных дорожках, засеянных ЭСК, к концу второй недели после начала эксперимента мы заме-

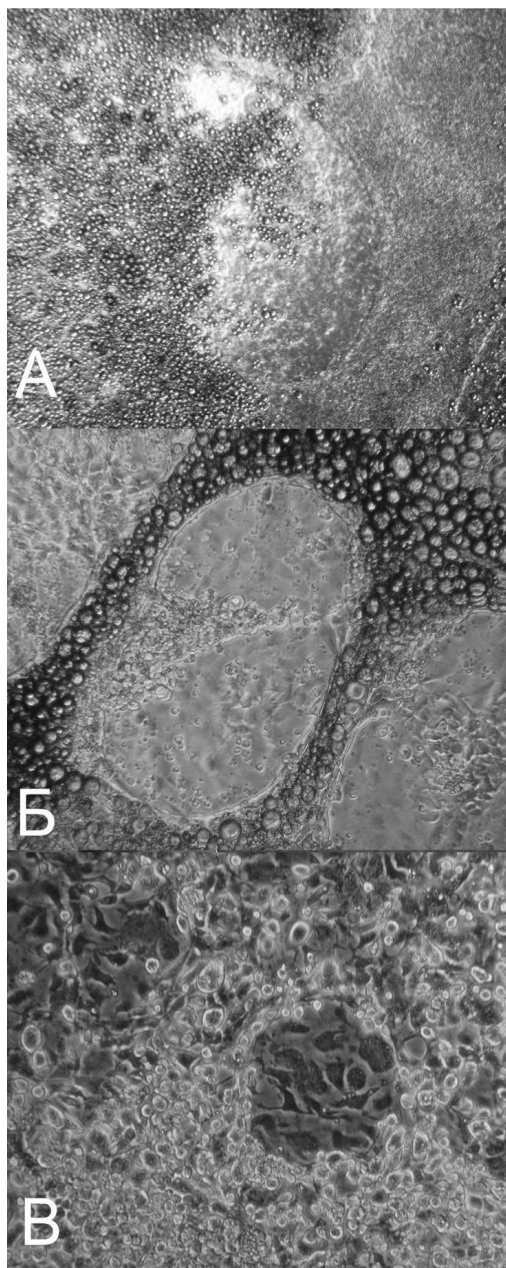


Рис. 3. А, Б - Эмбриональные тельца, сформировавшиеся в исходном монослое зрелых адипоцитов за 3 недели кокультивирования с 10^4 мЭСК. В - начальная стадия образования эмбрионального тельца в молодом слое адипоцитов, выросшем на месте соскреба, 4 недели с момента засева мЭСК. Увеличение 40х (А) и 100х (Б и В).

чали в толще старого слоя адипоцитов многочисленные кругообразные расхождения адипоцитарного слоя. В центре образующихся четко очерченных кругов и овалов через 3-4 недели после засева начинается биение (рисунок 3 АБ). С некоторым запозданием, начиная с 4-5 недели, подобный же процесс начинается и в новом слое образовавшихся молодых адипоцитов (рисунок 3Д), нарушая, таким образом, диморфное однообразие молодого монослоя внедрением растущих эмбриональных телец. Таким образом, через 4-7 недель после высева на адипоцитарную культуру, ЭСК формировали многочисленные бьющиеся эмбриональные тельца без добавления нами в среду индукторов кардиомиоцитарной дифференцировки. В отсутствии кокультуры адипоцитов образование эмбриональных телец идет существенно менее эффективно. Увеличение эффективности образования эмбриональных телец при длительном кокультивировании без пересева мы ранее наблюдали и при кокультивировании мЭСК и эндотелиоцитов [1]. Таким образом, в отсутствии пересева кокультуры, наряду с образованием дифференцированных потомков мЭСК появляются разросшиеся колонии мЭСК, которые, под влиянием кокультуры, эффективно образуют бьющиеся эмбриональные тельца.

Выводы

Беспересевное кокультивирование мЭСК и адипоцитов приводит к направленной дифференцировке мЭСК в адипозном направлении, причем первые 2-3 недели молодая кокультура, растущая на свободной поверхности, сохраняет строгий биморфизм – в ней присутствуют только плоские темные веретено-

образные клетки (предположительно, преадипоциты) и молодые адипоциты, экспрессирующие светоотражающие жировые включения. В последующие недели, при отсутствии пересева, в кокультуре начинают появляться гетерогенные колонии, содержащие, в частности, бьющиеся островки клеток. Таким образом, направленная дифференцировка мЭСК в направлении кокультуры наблюдается только в условиях копролиферации используемых культур клеток.

**«Работа была поддержана
Министерством образования и науки,
Государственный контракт
№ 16.512.11.2086.»**

Список литературы

1. **Ковина М.В., Ходарович Ю.М.** Эффективная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в эндотелиоциты методом длительного со-культивирования с первичной тканевой культурой // В сб.: Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей. М., МАКС Пресс. 2011. С.189-200.
2. **Dani C., Smith A., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G.** Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro // J Cell Sci, 1997.v. 110 p. 1279-1285.
3. **Hannan N.R., Wolvetang E.J.** Adipocyte differentiation in human embryonic stem cells transduced with Oct4 shRNA lentivirus // Stem Cells Dev. 2009. v. 18. P. 653-660.
4. **Ronnett G.V., Knutson V.P., Lane M.D.** Insulin-induced down-regulation of insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered rate of receptor inactivation // J Biol Chem. 1982.v. 257. P. 4285-4291.

5. *Schaedlich K, Knelangen J.M., Navarrete Santos A., Fischer B., Navarrete Santos A.* A simple method to sort ESC-derived adipocytes // *Cytometry A*. 2010.v. 77. P. 990-995.
6. *Song K., Li W., Wang H., Wang H., Liu T., Ning R., Wang L.* Investigation of coculture of human adipose-derived stem cells and mature adipocytes // *Appl Biochem Biotechnol*, 2012. v.167. p. 2381-2387.
7. *Taha M.F., Valojerdi M.R., Mowla S.J.* Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on adipocyte differentiation from mouse embryonic stem cells // *Anat Histol Embryol*. 2006.v. 35. P. 271-278.

Studying of embryonic stem cells differentiation at a long cocultivation with adipocits

M.V. Kovina, L. Zilberman, Yu.M. Hodarovich

In a mature monolayer adipocits, large spherical reflecting cages, did a scraper acellular paths of 1-5 mm of width. The flat spindle-shaped light-absorbing cages migrating from borders of paths, covered them with a monolayer in 8-10 days. The new monolayer is morphologically stable within several weeks after education and is sharply other than the old – its cage flat and dark, without reflecting inclusions (fatty drops). If to an adipocitsitarny monolayer with the dug acellular paths to add mouse embryonic stem cells (MESK), the new monolayer which was formed to 6-7 day contains brilliant points, and by 15-20 day turns into a continuous brilliant carpet young адипоцитов, filled on the periphery of each cage tsirkulyarno the located small reflecting lipidic droplets. The question of a true or inductive differentiation, as to the reason of this phenomenon is discussed.

Key words: differentiation, contact differentiation, kokultivirovaniye, embryonic stem cells, adipocits.