

УДК 57.084. 1+578.74

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ “РАННЕГО” БЕЛКА ПАПИЛЛОМАВИРУСА ВПЧ16 E2 НА ОПУХОЛИ СЕМЕННИКОВ МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКАМИ HeLa

Член-корреспондент РАН Р. К. Саляев*, Н. И. Рекославская, А. С. Столбиков

Поступило 11.04.2019 г.

Выявлено антипролиферативное действие “раннего” белка ВПЧ16 E2 на опухоли семенников мышей, появление которых индуцировали внутримышечной инъекцией клеток HeLa. Регрессия опухолей была наиболее эффективной в первые двое суток после перорального вакцинирования ВПЧ16 E2 (500 мг на мышь), постепенно уменьшаясь до контрольного варианта. После высева клеток из семенников на среду DMEM наблюдали характерный монослой клеток на дне флакона, из которых только 18% были функционально активными.

Ключевые слова: “ранний” белок ВПЧ16 E2, клетки HeLa, индукция опухолей семенников, регрессия, терапевтическая вакцина.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524881103-107>

“Ранний” белок E2 папилломавирусов человека типов 16, 18 и бычьего папилломавируса БПВ является репрессором транскрипции “ранних” онкогенов *hprvE1*, *hprvE6* и *hprvE7* [1]. На протяжении жизненного цикла папилломавируса количество белка E2 возрастает, при этом активируется синтез белков оболочки L1 и L2, что в конечном итоге приводит к формированию и упаковке полноценной вирусной частицы и её “вычищению” (клирингу) из клеток хозяина [2]. Опухолевые клетки цервикального рака, а также клетки других типов рака содержат большое количество клеток HeLa, в ДНК которых обнаружены множественные копии генома папилломавируса, но белок E2 в них отсутствует, так как деградирует при инсерции, хотя другие “ранние” белки E6 и E7 обнаружены в больших количествах [3].

При попытках клонировать “ранний” ген *hprv16 E2* в составе рекомбинантных плазмид в клетках кератиноцитов [4] или в клетках HeLa [5] и др. было обнаружено цитотоксическое действие белка E2, так как эти культуры клеток погибали в результате апоптоза. По этой причине использование бактериальных экспрессионных систем для синтеза “раннего” белка E2 папилломавируса было затруднительно. В нашей работе по изучению синтеза “ранних” белков папилломавируса [6] мы исполь-

зовали растительную экспрессионную систему плодов томата [7] для получения высоких количеств белка E2 с целью изучения его онколитического действия, которому уделялось мало внимания в литературе.

В связи с этим в задачу работы входило изучение антипролиферативного действия белка E2, для чего был проведен поиск модели опухолеобразования, индуцированной раковыми (иммортизированными) клетками HeLa. В этой работе нам впервые удалось вызвать опухолеобразование гениталий (семенников) мышей после внутримышечной инъекции клеток HeLa. Пероральное вакцинирование мышей вакцинным материалом плодов томата, трансгенного по гену *hprv16 E2*, вызывало обратное развитие опухолей семенников и регрессию канцерогенеза. Эти данные имеют приоритетный характер, так как подобные эксперименты в научной литературе нами не обнаружены.

Культура клеток HeLa получена из фирмы “БИОЛОТ” (Санкт-Петербург, Россия), выращивание производили на среде DMEM (“БИОЛОТ”) с добавлением в соотношении 10:1 сыворотки эмбриона (плодов) коровы (“БИОЛОТ”) и антибиотиков: 1000 ед/мл пенициллина и 5,0 мг/мл стрептомицина на 10 мл среды DMEM (по прописи «БИОЛОТа»). До начала эксперимента клетки HeLa хранили при –62 °С в низкотемпературном морозильнике в режиме криоконсервации (по прописи “БИОЛОТа”). Затем клетки HeLa оттаивали на водяной бане при температуре 37 °С. После высева клеток HeLa на питательную среду в пропорции 1:10 наблюдали по-

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской Академии наук, Иркутск

² Иркутский научный центр Сибирского отделения
Российской Академии наук

* E-mail: salyaev@sifbr.irk.ru



Рис. 1. Определение жизнеспособности клеток HeLa после криоконсервации. Слева — клетки монослоя без окрашивания в световом микроскопе (увеличение объектива 100× с масляной иммерсией), в центре — окраска монослоя 0,2% раствором нитротетразолия синего (увеличение объектива 20× без иммерсии), справа — обработка монослоя 0,4% раствором трипанового синего (увеличение объектива 40× без иммерсии). Изображение снято на видеокамеру Levenguk C310 NG (максимальное разрешение 2048×1536 пикселей). Для масляной иммерсии использовали препарат Cedarwood Oil фирмы “PanReac AmpliChem” (Германия).

явление монослоя в течение 5–10 мин на дне флакона, который через сутки роста давал полное зарастание поверхности дна.

Перед экспериментами проверяли функциональную активность клеток HeLa путем окраски с 0,2% раствором нитротетразолия синего, а также наличие живых клеток с помощью 0,4%-го раствора трипанового синего (рис. 1).

Как можно видеть из рис. 1, клетки монослоя HeLa, высевшиеся после криоконсервации, имели четкую структуру при просмотре в световом микроскопе (видны ядрышки — по 2–3 внутри клеток) (слева), клетки на 100% прокрашивались 0,2%-м раствором нитротетразолия синего и при этом формировали монослой (в центре). При внесении 0,4%-го раствора трипанового синего не наблюдали окрашивания (справа). Таким образом, все использованные тесты показали полную жизнеспособность клеток после криоконсервации.

Для внутримышечной инъекции мышам использовали суточную суспензию клеток HeLa в среде выращивания из расчета 200 мкл на 1 мыш. Перед инъекцией и далее проводили замеры области семенников, перемножая высоту (h от англ. height) на длину (l от англ. length) области семенника (индекс hl). Через месяц наблюдали увеличение размера семенников. Мышей выдерживали еще в течение 6 месяцев после инъекции. За этот период размер семенников (индекс hl) увеличивался в 5–10 раз против контроля и более в зависимости от мыши, при этом мыши, вероятно, не особенно страдали от увеличения семенников, так как при стандартном рационе прибавляли в весе. Других опухолей как снаружи, так и внутри (после вскрытия) у мышей не обнаружили.

Для перорального вакцинирования был взят гомогенат сырых плодов трансгенного по гену *hpy16 E2* томата с высоким содержанием антигенного белка E2, который хранился в замороженном состоянии при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Гомогенат оттаивали при комнатной температуре, наносили на ломтики белого свежего хлеба для кормления мышей в течение 2 сут, при этом вода была в достаточном количестве. По подсчетам мыши при этой вакцинации получили не менее 500 мг белка ВПЧ16 E2 на каждого самца.

Уже через двое суток после окончания вакцинации визуально было отмечено значительное уменьшение опухолей (индекс hl) у всех самцов примерно в 2–4 раза (табл. 1). Далее из табл. 1 видно, что в последующие 5–12 сут происходило более медленное уменьшение семенников. Повторная аналогичная пероральная вакцинация ВПЧ16 E2, проведенная на 6-е сут после первой, видимых результатов не дала, так как опухоли уже существенно уменьшились в размере. Динамика регрессии опухолей семенников, вызванных инъекцией клеток HeLa, после перорального вакцинирования материалом плодов томата с белком E2 представлена на рис. 2.

Затем семенники мышей, прошедших пероральное вакцинирование, изолировали и выкладывали во флаконы на среду DMEM с добавлением сыворотки эмбрионов коровы. Вскоре (10–15 минут) наблюдали обычный высев клеток HeLa на дне флакона и образование характерного монослоя (рис. 3, слева). Эти клетки можно было пассировать. При окрашивании и подсчете окрашенных клеток было установлено, что при добавлении нитротетразолия синего только 18% было темноокрашенных (функционально жизнеспособных) клеток, 71% слабо-

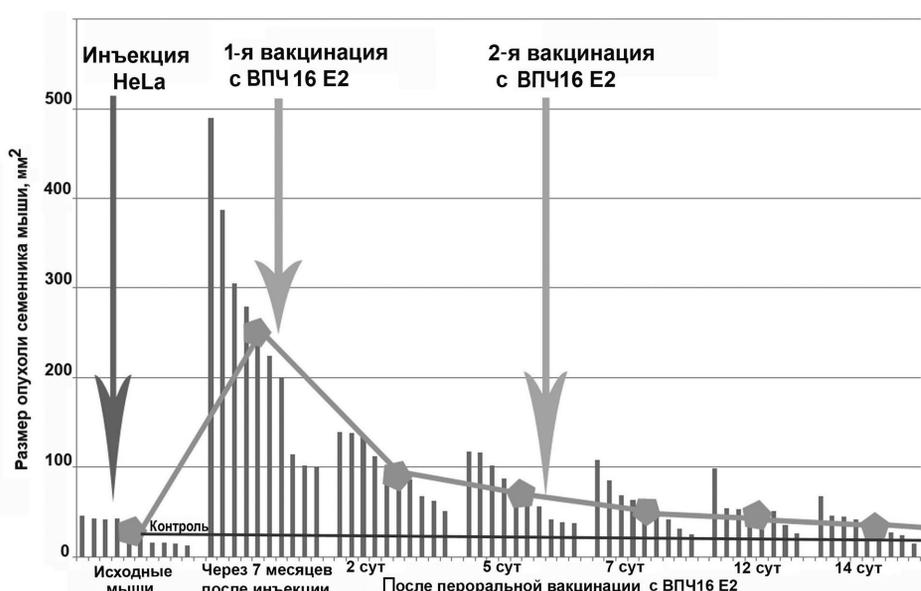


Рис. 2. Динамика регрессии опухолей семенников мышей, вызванных инъекцией клеток HeLa, после пероральной вакцинации вакцинным материалом плодов томата с *hpv16 E2*.

Таблица 1. Влияние перорального вакцинирования ВПЧ16 E2 на регрессию опухолей семенников мышей (индекс *hl*), индуцированных внутримышечной инъекцией клетками HeLa, мм²

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Среднее значение
	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	мышь	
Контроль, неинъекцированные мыши	47,0	43,8	42,8	43,7	21,3	15,6	13,8	23,1	16,5	16,3	28,9±13,8
После 6 мес инъекции клеток HeLa	225,0	103,0	114,9	264,4	200,7	101,2	387,5	490,0	305,6	279,9	257,4±126,3
Через 2 сут после вакцинации ВПЧ16 E2	62,8	68,6	86,7	113,1	86,6	52,2	135,2	101,1	138,5	139,6	98,6±30,8
Через 5 сут после вакцинации ВПЧ16 E2	42,3	38,0	67,9	102,6	56,9	39,8	118,2	70,5	87,8	116,7	74,2±29,4
Через 7 сут после вакцинации ВПЧ16 E2	42,3	26,4	64,3	Мышь взята на высеv клеток HeLa	52,5	32,6	86,1	63,8	69,9	109,1	61,2±24,2
Через 12 сут после вакцинации ВПЧ16 E2	35,9	26,0	54,6	Не определяли	52,5	25,5	51,8	52,8	54,4	99,2	50,4±20,6
Через 14 сут после вакцинации ВПЧ16 E2	28,2	25	45,9	Не определяли	41,8	16	39,8	43	46,5	68,8	39,6±14,5

Примечание. *hl* — индекс перемножения высоты опухоли *h* на длину опухоли *l*.

окрашенных клеток и 11% неокрашенных (рис. 3, в центре). После добавления трипанового синего было 28% тёмноокрашенных (мёртвых) клеток, 46% слабоокрашенных (с нарушениями барьерных функций мембран) и 26% неокрашенных (живых) (рис. 3, справа).

Таким образом, получены экспериментальные доказательства о возможности создания опухолевых

образований у мышей в результате введения им раковых клеток HeLa. На изучаемой модели оказалось возможным проведение экспериментальной работы по регрессии индуцированных опухолей у мышей с помощью регуляторного “раннего” белка E2 папилломавируса.

В нашей работе удалось сочетать высокопродуктивную растительную систему для синтеза активного



Рис. 3. Высев клеток HeLa из семенников и определение их жизнеспособности. Слева — формирование монослоя клеток HeLa через сутки после высева из семенников без окрашивания (увеличение объектива светового микроскопа 20х, без иммерсии), в центре — окрашивание 0,2%-м раствором нитротетразолия синего (увеличение объектива 100х с иммерсией), справа — окрашивание 0,4%-м раствором трипанового синего (увеличение объектива 100х с иммерсией).

гетерологичного антипролиферативного “раннего” белка папилломавируса E2 и возможность создания природного резервуара для размножения папилломавирусов в семенниках мышей. При этом в результате инфекции клетками HeLa зоны семенников разрастались в 10 и более раз.

В литературе есть указание [8], что в радиальной части головки сперматозоида присутствует природный рецептор белок синдекан-1, который специфически связывается с белком L1 оболочки папилломавируса. Возможно, именно этим объясняется активное размножение клеток HeLa в зоне семенников. Мы инфицировали также и самок культурой клеток HeLa, после чего самки заметно худели и впоследствии гибли в течение первого месяца. При вскрытии у них были обнаружены опухоли на внутренних органах, из которых также был возможен высев клеток HeLa на питательную среду и дальнейшее пассирование. Можно предположить, что более высокая выживаемость самцов после инъекции клеток HeLa обусловлена наличием у них специфических тканей, помогающих мышам выжить.

В итоге следует отметить, что белок E2, продуцируемый в папилломавирусе ВПЧ16, обладает четко выявляемым антипролиферативным действием, вызывая сильный регресс опухолей семенников

самцов мышей. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшей работы над терапевтической вакциной против цервикального рака и детализации её воздействия у самцов и самок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blakaj D.M., Fernandes-Fuentes N., Chen Z., Hegde R., Fiser A., Burk R. D., Brenowitz M. // *Front Biosci.* 2013. V. 14. P. 900–917.
2. Siddiqi A., Leon K.C., James C.D., Bhatti M.F., Roberts S., Parish R.S. // *J. of General Virology.* 2015. V. 96. № 8. P. 2274–2285.
3. Alazawi W., Pett M., Strauss S., Moseley R., Gray J., Stanley M., Coleman M. // *British J. of Cancer.* 2004. V. 91. № 12. P. 2063–2070.
4. Frattini M.G., Hurst S.D., Lim H.B., Swaminathan S., Laimins L.A. // *The EMBO J.* 1997. V. 16. № 2. P. 318–331.
5. Desaintes C., Demeret C., Goyat S., Yaniv M., Thierry F. // *The EMBO J.* 1997. V. 16. № 3. P. 504–514.
6. Саляев P.K., Рекославская H.И., Столбиков A.C. // *ДАН.* 2018. Т. 482. № 5. С. 601–604.
7. Саляев P.K., Рекославская H.И., Столбиков A.C. // *ДАН.* 2019. Т. 484. № 4. С. 503–506.
8. Foresta C., Patassini C., Bertoldo A., Menegazzo M., Francavilla F., Barzon L., Ferlin A. // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. № 3. e15036.

THE ANTIPROLIFERATIVE ACTION OF THE “EARLY” PROTEIN OF PAPILLOMAVIRUS HPV16 E2 ON TESTIS TOUMORS OF MICE INDUCED BY THE INJECTION OF HELA CELLS

Corresponding Member of the RAS **R. K. Salyaev, N. I. Rekoslavskaya, A. S. Stolbikov**

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

² *The Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

Received April 11, 2019

The antiproliferative effect of the “early” protein of high-risk oncogenic human papillomavirus HPV16 E2 on mice testis tumors was discovered after the induction that was happened after the intramuscular injection of cancer HeLa cells suspension. The regression of mice testis tumors was mostly dramatic during first 1–2 days after oral vaccination with HPV16 E2 (500 mg per mice) made in tomato plant expression system that was gradually decreasing to control variant. The typical monolayer of HeLa cells on the cultivation flask bottom was appeared after seeding of testis tissue cells on the DMEM medium they were only for 18% functionally active according to the detection by the staining with nitroblue tetrazolium and trypan blue.

Keywords: “early” protein HPV16 E2, HeLa cells, the induction of testis tumors, regression, therapeutic vaccine.