

УДК 518.218

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ГЕПАТОЦИТОВ И ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. О. Ю. Буренина<sup>1,\*</sup>, Т. С. Зацепин<sup>1,2</sup>, Э. Ф. Ким<sup>3</sup>, А. В. Метелин<sup>3</sup>,  
Д. А. Скворцов<sup>2,4</sup>, М. П. Рубцова<sup>1,2</sup>, академик РАН О. А. Донцова<sup>1,2</sup>

Поступило 10.03.2020 г.  
После доработки 23.03.2020 г.  
Принято к публикации 23.03.2020 г.

Длинные некодирующие РНК (днРНК) – перспективные биомаркеры и потенциальные мишени для терапии рака печени. Для изучения функций днРНК, количество которых в клетке меняется при канцерогенезе, используют стабильные линии гепатоцитов *in vitro*. Мы впервые сравнили экспрессию генов известных днРНК в клетках условной нормы печени человека НераRG и раковых линиях Нuh7 и НерG2 и показали, что относительное количество этих днРНК в НераRG наиболее близко к аналогичным показателям, измеренным в образцах здоровой печени доноров. Полученные данные свидетельствуют об уникальных особенностях НераRG и подтверждают целесообразность ее использования в качестве модели нормальных гепатоцитов человека для изучения функций днРНК.

**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК, НераRG, рак печени

**DOI:** 10.31857/S2686738920040071

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является шестым по распространенности в мире злокачественным заболеванием. Отсутствие специфических биомаркеров вместе с бессимптомным протеканием болезни приводят к поздней диагностике данного типа рака и низкой выживаемости пациентов [1]. Длинные некодирующие РНК (днРНК) – многочисленный класс регуляторных молекул длиной более 200 нуклеотидных остатков, которые не подвергаются трансляции. Многие днРНК вовлечены в канцерогенез гепатоцитов и активность экспрессии их генов существенно меняется при ГЦК, что может быть использовано как для ранней диагностики, так и

для потенциальной таргетной терапии этого вида рака [2].

Большинство исследований ГЦК *in vitro* проводится с использованием раковых клеточных культур печени человека, чаще всего Нuh7 и НерG2. Обе линии выведены из первичных культур ГЦК пациентов (хотя НерG2 позднее была аннотирована как гепатобластома [3]), характеризуются высокой степенью дифференцировки и обладают по крайней мере основными фенотипическими особенностями, присущими опухолевым клеткам печени, включая экспрессию ГЦК-ассоциированных генов [4]. Ввиду невозможности иммортализации здоровых клеток печени, в качестве модели нормы часто используют культуры первичных гепатоцитов человека, которым, однако, свойственна высокая вариабельность от донора к донору, быстрая дедифференциация и отсутствие пролиферативных свойств, что сопряжено с низкой воспроизводимостью результатов [5].

На сегодняшний день единственной клеточной культурой, приближенной к нормальным гепатоцитам по фенотипу и уровню экспрессии ключевых генов, является НераRG – продукт компании Biopredic (Франция) [6]. Несмотря на тот факт, что данная клеточная линия была выведена из первичной культуры ГЦК, полностью дифференцированные клетки (НераRG(d)) де-

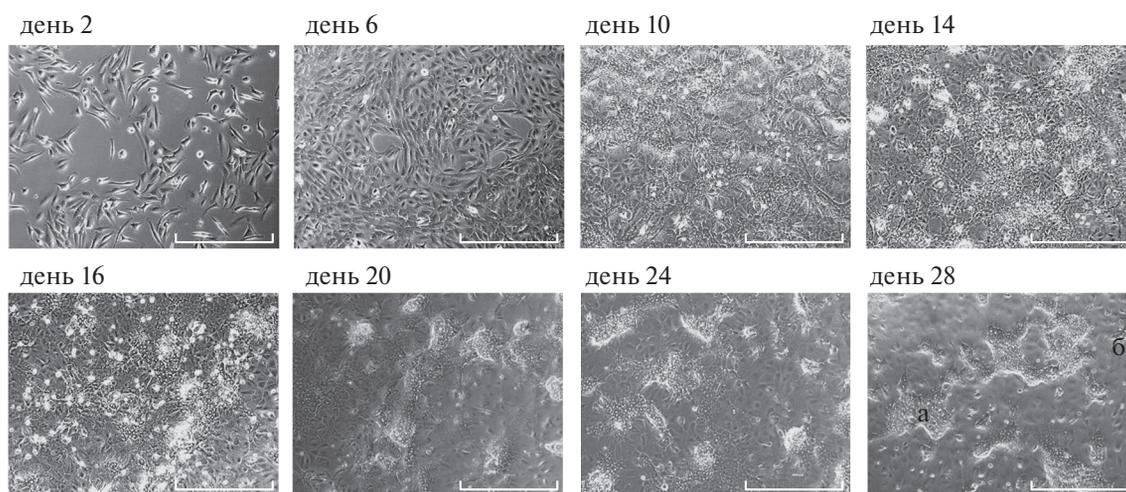
<sup>1</sup> Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского и Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия

<sup>4</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, Москва, Россия

\*e-mail: alunit@inbox.ru



**Рис. 1.** Изменение морфологии клеток HepaRG в процессе культивирования (а — колонии зрелых гепатоцитов, б — эпителиальные (гепатобилиарные) клетки). Активная дифференциация клеток после 14-го дня культивации инициируется добавлением в среду 1.8% (v/v) ДМСО.

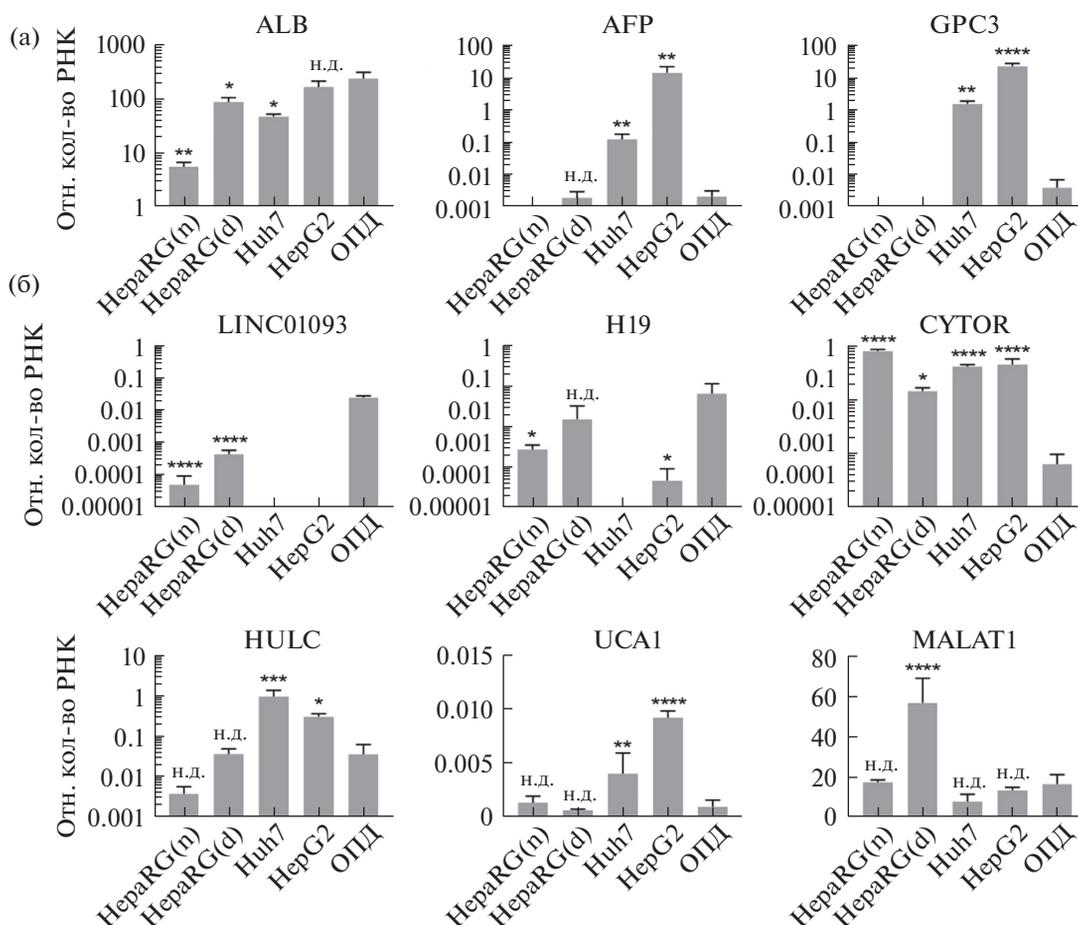
монстрируют активную экспрессию генов основных цитохромов (CYP2E1, CYP3A4), цитокератина 18 (CK18) и различных ядерных рецепторов, нехарактерных для раковых клеточных линий печени [5, 7]. Это позволяет использовать HepaRG для тестирования различных лекарственных препаратов и проведения доклинических исследований [8]. Исходная недифференцированная культура HepaRG (HepaRG(n)) проявляет пластичность, свойственную стволовым клеткам печени (так называемым клеткам-предшественникам, “liver progenitor cells”), и в процессе культивирования дифференцируется в смешанную популяцию зрелых гепатоцитов и примитивных гепатобилиарных клеток (рис. 1).

Множество исследований посвящено сравнительному анализу дифференциально экспрессируемых кодирующих генов в культурах клеток HepaRG и Huh7/HepG2 [9, 10], однако данные об экспрессии генов днРНК в HepaRG практически отсутствуют. Таким образом, целью данной работы являлся анализ экспрессии генов известных днРНК, ассоциированных с ГЦК, в клетках HepaRG разной степени дифференцировки и раковых линиях гепатоцитов Huh7 и HepG2. В экспериментах использовали культуру HepaRG 16-го пассажа (данная клеточная линия не является иммортализованной и сохраняет свои свойства до 20 пассажа). Выделение экстрактов общей клеточной РНК проводили по истечении 48 ч после посева клеток (HepaRG(n)) и на 28-й день культивации (HepaRG(d)), проведенной согласно соответствующему протоколу для дифференциации (Biopredic). Измерение количества РНК проводили с помощью обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени; для нормировки использовали U6 мРНК. В первую оче-

редь в качестве объектов исследования мы выбрали две печень-специфичные днРНК: HULC (от англ. “highly upregulated in liver cancer”), синтез которой активируется при ГЦК [11], и недавно открытую LINC01093, экспрессия гена которой, наоборот снижается при канцерогенезе [12], а также четыре известных онкогенных днРНК, характерных для многих типов раков: H19, CYTOR, MALAT1 и UCA1 [2]. Для сравнения мы оценили экспрессию генов всех выбранных нами днРНК в образцах ткани донорской (здоровой) печени.

На первом этапе работы для подтверждения статуса дифференцировки HepaRG мы оценили количество мРНК специфичного для гепатоцитов белка альбумина (ALB), которое ожидаемо повышалось в HepaRG(d) по сравнению с HepaRG(n) (рис. 2а). Активную экспрессию ALB наблюдали также и в других линиях клеток, причем ее уровень был сравним с аналогичным для нормы печени (ОПД). При этом содержание мРНК двух биомаркеров рака печени — альфа-фетопротейна (AFP) и глипикана 3 (GPC3) — в HepaRG было сравнимо или даже меньше, чем для ОПД, в отличие от Huh7 и HepG2, экспрессирующих эти гены на 2–4 порядка активнее. Таким образом HepaRG демонстрирует паттерн экспрессии генов, свойственный нормальным (здоровым) гепатоцитам.

На следующем этапе мы проанализировали экспрессию генов различных днРНК. LINC01093 практически не детектировалась в Huh7 и HepG2 — моделях ГЦК, тогда как клетки HepaRG(n) и, в большей степени, HepaRG(d), по-прежнему экспрессировали ген этой днРНК на высоком уровне (рис. 2б). Похожая ситуация была отмечена для днРНК H19, экспрессия гена которой также по-



**Рис. 2.** Сравнительный анализ относительной экспрессии (ОТ-кПЦР) генов печень-специфического белка ALB и ГЦК-специфичных белков AFP и GPC3 (а), а также печень-специфичных днРНК (LINC01093, HULC) и ГЦК-специфичных днРНК (H19, CYTOR, UCA1, MALAT1) (б), в раковых линиях гепатоцитов Huh7 и HepG2 и в клетках HepaRG разной степени дифференцировки (n – недифф., d – дифф.) по сравнению с усредненными значениями по трем образцам печени доноров (ОПД). Достоверный уровень значимости результатов согласно проведенному дисперсионному анализу (ANOVA): \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p = 0.0002$ , \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ , н.д. – нет достоверных отличий.

давлена при ГЦК, и, как следствие, в клетках Huh7 и HepG2 (по сравнению с нормой печени и HepaRG). При этом относительное количество этих днРНК в дифференцированных клетках HepaRG было в среднем на порядок выше, чем в HepaRG(n), что свидетельствовало об их активном синтезе именно в зрелых гепатоцитах. Обратную тенденцию наблюдали в случае известных биомаркеров ГЦК HULC и UCA1 [2] – уровни экспрессии этих генов были повышены только в Huh7 и HepG2, но при этом содержание этих днРНК в HepaRG(d) было сравнимо с нормой печени (рис. 2б). Активная экспрессия HULC в Huh7 по сравнению с другими раковыми культурами гепатоцитов была описана ранее в работе [11].

Интересные данные были получены для двух других онкогенных днРНК, ассоциированных с ГЦК – CYTOR и MALAT1. А именно, все четыре клеточные линии характеризуются повышенным содержанием CYTOR по сравнению с нормой печени. Еще более неожиданным результатом ока-

залась активация синтеза MALAT1 в дифференцированных клетках HepaRG (рис. 2б). Тем не менее, несмотря на кажущееся противоречие этих данных с условным нераковым статусом HepaRG, необходимо принимать во внимание многообразие регуляторных функций днРНК. В частности, CYTOR оказывает непосредственное влияние на клеточный цикл, активируя экспрессию циклина D1 (CCND1) [13]. Активное деление характерно для *in vitro* культур гепатоцитов, в то время как в условиях *in vivo* эти клетки делятся крайне медленно. В процессе дифференциации HepaRG(n) скорость деления этих клеток снижается, что согласуется с соответствующим снижением относительного количества CYTOR в HepaRG(d) (рис. 2б).

MALAT1, наоборот, принимает непосредственное участие в дифференцировке гепатоцитов из их предшественников, связываясь с белками TGF- $\beta$ /Smad сигнального каскада [14], а также регулирует Wnt/ $\beta$ -катениновый путь, сти-

мулируя регенеративные процессы в печени [15]. Следовательно, мы предполагаем, что повышенная экспрессия MALAT1 в HepaRG(d) не связана с его онкогенными свойствами, а является отличительной особенностью данной клеточной культуры.

Таким образом, в ходе данной работы мы впервые провели сравнительный анализ экспрессии генов различных днРНК – потенциальных маркеров канцерогенеза печени в раковых и в условно нормальных клеточных линиях гепатоцитов человека и подтвердили уникальные свойства культуры клеток HepaRG, выгодно отличающие ее от клеточных линий ГЦК. На основании полученных данных мы предлагаем использовать линию клеток HepaRG в качестве модели нормальных гепатоцитов человека для изучения функций днРНК.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность правообладателям патента на изобретение клеток HepaRG К. Гуген-Гилузо, Ф. Грипон и К. Трепо (INSERM, Франция).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-74-00120.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликтов интересов. Образцы донорской печени, используемые в данном исследовании, были получены с информированного согласия пациентов в ФГБНУ “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Пет-

ровского” в соответствии с разрешением этического комитета организации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mak L.Y., Cruz-Ramón V., Chinchilla-López P., et al. // Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2018. V. 38. P. 262–279.
2. Lim L., Wong S.Y.S., Huang F., et al. // Cancer Res. 2019. V. 79. № 20. P. 5131–5139.
3. López-Terrada D., Cheung S.W., Finegold M.J., et al. // Hum Pathol. 2009. V. 40. № 10. P. 1512–1515.
4. Nwosu Z.C., Battello N., Rothley M., et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2018. V. 37. P. 211.
5. Kammerer S., Kupper J.-H. // J. Cell. Biotechnol. 2017. V. 3. P. 85–93.
6. Parent R., Marion M.-J., Furio L., et al. // Gastroenterology. 2004. V. 126. № 4. P. 1147–1156.
7. Marion M.-J., Hantz O., Durantel D. // Methods Mol Biol. 2010. V. 640. P. 261–272.
8. Poloznikov A., Gazaryan I., Shkurnikov M., et al. // AL-TEX. 2018. V. 35. № 3. P. 397–412.
9. Yokoyama Y., Sasaki Y., Terasaki N., et al. // Biol Pharm Bull. 2018. V. 41. № 5. P. 722–732.
10. Ivanova O.N., Snezhkina A.V., Krasnov G.S., et al. // Cells. 2018. V. 7. № 12. P. 275.
11. Zhang H., Liao Z., Liu F., et al. // Aging. 2019. V. 11. № 20. P. 9111–9127.
12. He J., Zuo Q., Hu B., et al. // Cancer Lett. 2019. V. 450. P. 98–109.
13. Ma P., Wang H., Sun J., et al. // Cell Cycle. 2018. V. 17. № 8. P. 974–984.
14. Zhang J., Han C., Song K., et al. // PLoS One. 2020. V. 15. № 1. P. e0228160.
15. Li C., Chang L., Chen Z., et al. // Int. J. Mol. Med. 2017. V. 39. № 2. P. 347–356.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF LONG NONCODING RNA EXPRESSION IN HUMAN HEPATOCYTE CELL LINES AND LIVER

O. Y. Burenina<sup>a, #</sup>, T. S. Zatsepin<sup>a, b</sup>, E. F. Kim<sup>c</sup>, A. V. Metelin<sup>c</sup>, D. A. Skvortsov<sup>b, d</sup>,  
M. P. Rubtsova<sup>a, b</sup>, and Academician of the RAS O. A. Dontsova<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology and Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Faculty of biology and biotechnologies, Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: alunit@inbox.ru

Long noncoding RNAs (lncRNAs) are promising biomarkers and potential targets for liver cancer therapy. Stable hepatocyte lines are used *in vitro* to investigate functions of lncRNAs which amount in cell fluctuates during carcinogenesis. For the first time we compared gene expression of known lncRNAs in human conditional normal liver cells HepaRG and cancer cell lines Huh7 and HepG2. We showed that relative amounts of these lncRNAs in HepaRG are close to analogous variables measured for liver samples from healthy donors. Obtained data demonstrate exclusive peculiarities of HepaRG and confirm its reasonable application as a model of normal human hepatocytes for studying functions of lncRNAs.

**Keywords:** long noncoding RNAs, HepaRG, liver cancer