

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-1-16-21

# СРАВНЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА ПЕЧЕНОЧНЫХ МЕТАСТАЗОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПЕЧЕНИ

ЮЖАЛИН А.Е., МУШЕЛ Р.Ж.

Кафедра онкологии, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, Оксфорд,  
Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

## ORIGINAL ARTICLE

### PROTEOMIC COMPARISON OF EXTRACELLULAR MATRIX WITHIN LIVER METASTASES OF COLORECTAL CANCER AND NORMAL LIVER

ARSENIY E. YUZHALIN, RUTH J. MUSCHEL

CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology (Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive,  
Oxford OX3 7DQ), United Kingdom

#### Резюме

**Цель.** Сравнить состав белков экстрацеллюлярного матрикса в индуцированных *in vivo* печеночных метастазах колоректального рака и нормальных тканях печени.

**Материалы и методы.** Экстрацеллюлярный матрикс выделялся посредством децеллюляризации с использованием коктейля детергентов. Белковый состав печеночных метастазов колоректального рака и нормальных тканей печени исследовался при помощи масс-спектрометрии и иммунофлюоресцентного окрашивания.

**Результаты.** Протеомный анализ выявил

значительные различия в экспрессии белков экстрацеллюлярного матрикса между печеночными метастазами колоректального рака и нормальными тканями печени. Результаты масс-спектрометрии были подтверждены окрашиванием на соответствующие белки.

**Заключение.** Качественный и количественный состав белков экстрацеллюлярного матрикса печеночных метастазов колоректального рака и нормальных тканей печени существенно отличается.

**Ключевые слова:** экстрацеллюлярный матрикс, метастазы, колоректальный рак, масс-спектрометрия, протеомика.

English ►

#### Abstract

**Aim.** To investigate the composition of extracellular matrix proteins in colorectal cancer liver metastases and normal liver.

**Materials and Methods.** Following decellularization of the extracellular matrix using a specific cocktail of detergents, we examined protein content of metastatic and normal liver tissues by means of mass-spectrometry and immunofluorescence staining.

**Results.** Proteomic analysis revealed signifi-

cant differences in the expression of extracellular matrix proteins between cancerous tissue and normal liver. Results of mass-spectrometry were verified by immunofluorescence staining to the relevant proteins.

**Conclusion.** Qualitative and quantitative composition of extracellular matrix proteins substantially differs between colorectal cancer liver metastases and normal liver.

**Keywords:** extracellular matrix, metastasis, colorectal cancer, mass-spectrometry, proteomics.

## Введение

Экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) играет важнейшую роль в физиологии и механобиологии тканей организма, обеспечивая поддержание структуры и нормальный гомеостаз органов [1]. Ряд ключевых физиологических процессов, таких, как клеточная адгезия, дифференцировка и межклеточные взаимодействия, регулируется напрямую или опосредованно через белки ЭЦМ [2]. Кроме того, ЭЦМ также отвечает за восстановление тканей после травм и развития различных патологических процессов, в частности, фиброза [3]. В отсутствие контакта с белками ЭЦМ, клетки млекопитающих подвержены апоптозу - особому типу апоптоза, обусловленного утратой механосенсорных взаимодействий с субстратом. Таким образом, ЭЦМ интегрирует отдельные клетки в объединенные комплексные системы, отвечая за правильную работу тканей, органов и систем органов.

Белки ЭЦМ определяют многие аспекты биологии рака, включая малигнизацию, локальное распространение раковых клеток в органе, а также дистантные метастазы [4]. Для колоректального рака наиболее характерно метастазирование в печень, что во многом определяет плохой прогноз данного заболевания [5]. Пациентам с печеночными метастазами, как правило, назначается хирургическое лечение, однако лишь 20% пациентов допускаются до операции. Вследствие частого рецидива заболевания пятилетняя выживаемость для этой группы пациентов не превышает 20-25% [5]. Для понимания патофизиологии метастазирования колоректального рака в печень и разработки новых методов лечения печеночных метастазов колоректального рака необходимы фундаментальные исследования механизмов метастазирования.

## Цель исследования

Сравнить состав белков ЭЦМ в индуцированных *in vivo* печеночных метастазах колоректального рака и нормальных тканях печени.

## Материалы и методы

В данном исследовании использовалась мышьяная клеточная линия колоректального рака MC38, культивируемая в среде DMEM при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для развития печеночных метастазов 5×10<sup>6</sup> клеток, растворённых в фосфатно-щелочном буфере, вводились мышам линии

C57BL/6 в паренхиму селезенки. Через 20 секунд после инъекции проводилось удаление селезенки с предотвращением кровотечения при помощи электрокоагуляции. Спустя 12-14 дней после инъекции осуществлялся вывод животных из эксперимента и сбор печеночных метастазов для анализа.

ЭЦМ экстрагировался методом децеллюляризации [6]: метастазы иссекались и помещались в пробирки с раствором 0,1% додецилсульфата натрия и 0,01% гидроксида аммония на шейкер на 72 ч со сменой децеллюляризирующего раствора каждые 12 ч. Полученные ЭЦМ замораживали в жидком азоте и нарезали на криотоме с последующей окраской гематоксилин-эозином по стандартному протоколу.

Для протеомного анализа ЭЦМ гомогенизировались на механическом и ультразвуковом дезинтеграторах, после чего проводилось обогащение образцов на белки ЭЦМ методом градиента с помощью набора CNMCS Compartmental Protein Extraction Kit (K3013010, BioChain Institute). Полученные агрегации ЭЦМ растворялись в коктейле восстановительных агентов (8М мочевины, 100 мМ бикарбонат аммония и 10 мМ дитиотреитол) и инкубировались при 37° в течение 30 мин. После этого к образцам добавлялся йодацетамид в концентрации 25 мМ с последующим инкубированием в течение 30 минут при комнатной температуре. На последнем этапе пробоподготовки белки преципитировались метанол-хлороформным методом и растворялись в 8М мочевины. После этого концентрация мочевины доводилась до 1М с помощью разбавления дистиллированной водой, и белки растворялись трипсином в отношении 1:50 (энзим:субстрат) в течение 18 ч при 37°C.

Тандемная масс-спектрометрия проводилась с использованием хроматографического аппарата Acquity, спаренного с масс-спектрометром Thermo LTQ Orbitrap Elite (разрешение 120,000 при 400 m/z). Для определения белков применялся градиент 1-35% ацетонитрила в течении 1 ч при скорости 250 нл/мин. Спектральные пики генерировались с помощью MSConvert (Proteome Wizard). Для полуколичественного сравнения концентрации белка в образцах использовался метод emPAI [7].

Для иммунофлуоресцентного окрашивания культивируемые клетки фиксировались 100% метанолом. В целях предотвращения неспецифического связывания антител клетки инку-

бировались в 20% растворе бычьего сывороточного альбумина в течение 1 ч. Далее клетки были пермеабиллизированы 0,01% раствором додецилсульфата натрия с последующей трехкратной отмывкой фосфатно-щелочным буфе-

ром. Затем клетки инкубировали в растворе с первичным антителом (Proteintech, 10237-1-A) в течение 18 ч при 4°C с последующей инкубацией в растворе со вторичным антителом (Life Technologies, A-10040) в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки отмывались, красились 4,6-диамидино-2-фенилиндолом дигидрохлоридом и визуализировались на микроскопе LEICA DM IRBE.

Статистический анализ различий между группами проводился с использованием критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

## Результаты

Для того чтобы оценить состав ЭЦМ раковых клеток, была использована животная модель печеночных метастазов, при которой клетки мышшиной колоректальной аденокарциномы MC38 инъекционно вводились в паренхиму селезенки. Полученные метастазы децеллюляризовали с помощью коктейля детергентов. На **рисунке 1** представлена окраска интактных (контрольных) и децеллюляризованных образцов по гематоксилин-эозину. Отсутствие пурпурной гематоксилин-положительной окраски на клеточные ядра в последних подтверждает полную децеллюляризацию исследуемых тканей.

Полученные ЭЦМ были подвергнуты биохимическому очищению с последующей пробоподготовкой для масс-спектрометрического анализа. Из 618 белков, обнаруженных при анализе, 96 относились к белкам ЭЦМ в соответствии с классификацией, предложенной Hupes с соавт. [8] (**рисунке 2**).

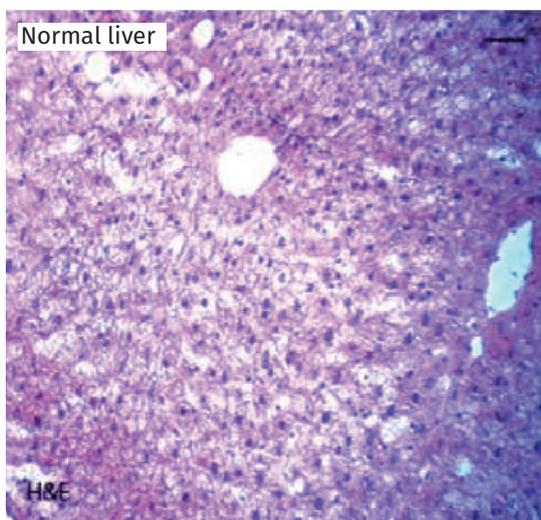
Полуколичественное сравнение наиболее важных белков ЭЦМ представлено на **рисунке 3**. В сравнении с интактной печенью раковые ткани имели значительно большие концентрации белков *S100-A11* (в 15 раз), *Ltbp1* (в 15 раз), и *Anxa7* (в 5 раз).

В то же время по сравнению с раковой тканью в нормальных тканях печени статистически достоверно преобладали ламинины – *Lama2*, *Lamb2* и *Lamg1*. Следует учитывать, однако, что данный полуколичественный метод не является высокоточным и может отражать только тенденции к увеличению или уменьшению концентрации того или иного белка.

Для того чтобы удостовериться в надежности данных, полученных протеомным анализом, культивируемые клетки MC38 тестиро-

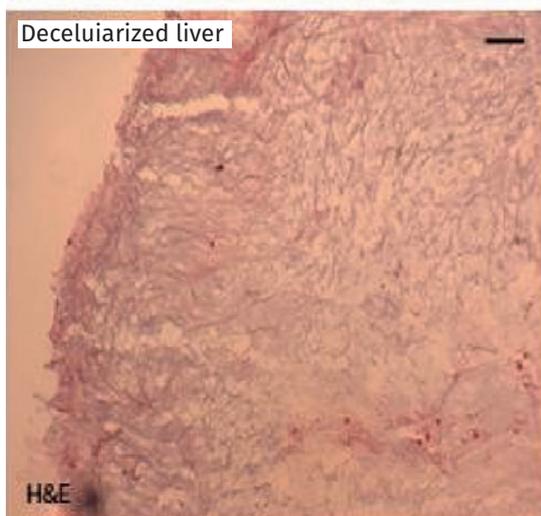
**Рисунок 1.**

Окраска интактной печени (вверху) и экстрацеллюлярного матрикса (внизу) по гематоксилин-эозину. Шкала = 100 мкм



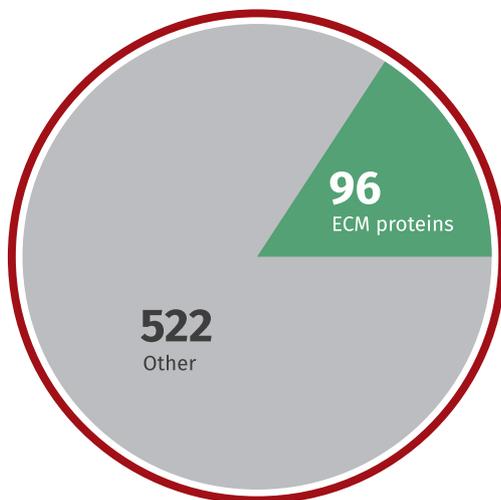
**Figure 1.**

H&E stain of intact liver (above) and the extracellular matrix (below). Scale bar = 100 μm



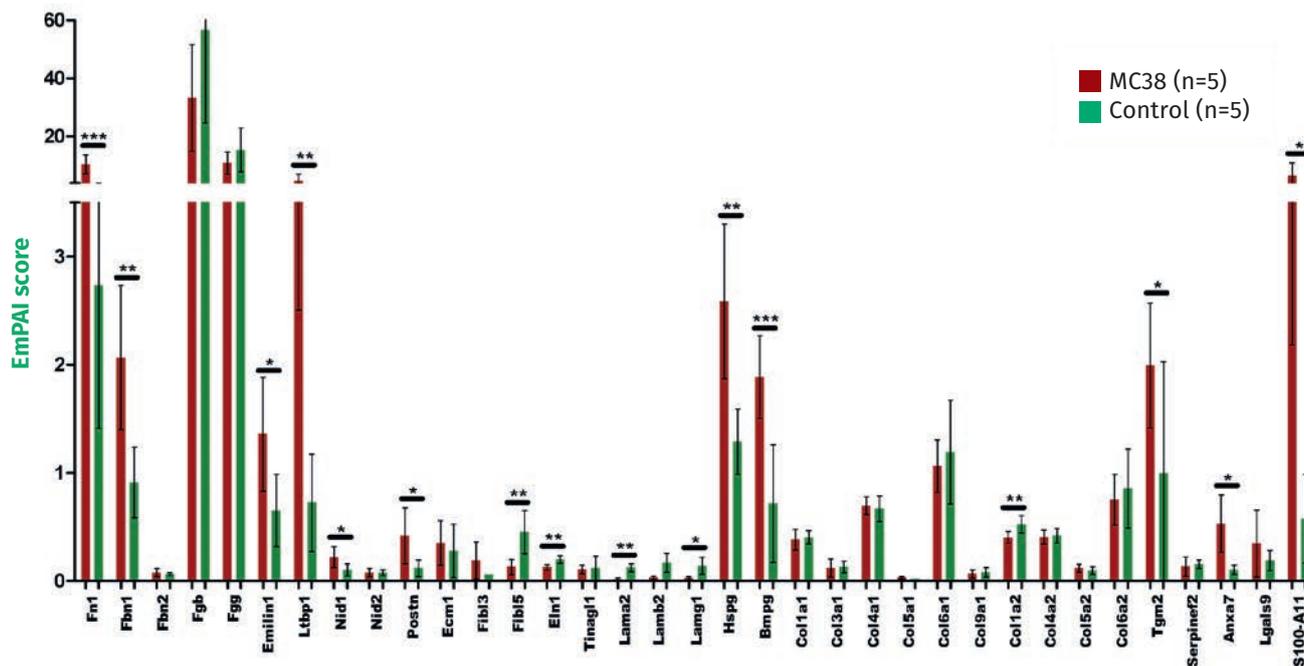
**Рисунок 2.**

Круговая диаграмма, показывающая количество белков экстрацеллюлярного матрикса (зеленый) и прочих белков (серый), выявленных в результате протеомного анализа



**Figure 2.**

The pie chart showing the number of extracellular matrix proteins (green) and other proteins (gray) revealed by mass-spectrometry analysis



\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

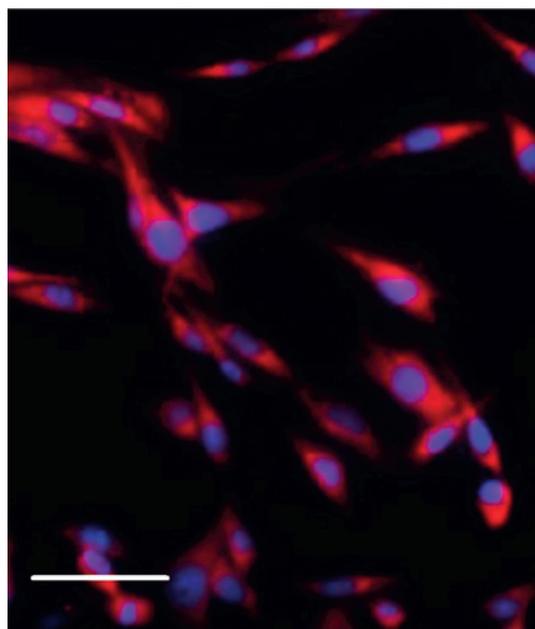
вались на предмет положительной окраски на *S100-A11* методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Данная окраска продемонстрировала высокую степень экспрессии белка *S100-A11* клетками MC38 (рисунок 4), выявив его внутриклеточную локализацию. Таким образом, была проведена валидация результатов протеомного анализа альтернативным методом.

### Обсуждение

Метастазы являются причиной подавляющего большинства смертей от злокачественных новообразований [9]. В последние годы применение протеомных технологий позволило значительно расширить понимание патофизиологии многих заболеваний, включая злокачественные опухоли [10]. В данном исследовании было проведено сравнение ЭЦМ печеночных метастазов колоректального рака, индуцированных *in vivo*, и нормальных тканей печени путем протеомного анализа с дальнейшей верификацией его результатов при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания. В результате был оптимизирован метод выделения белков ЭЦМ для масс-спектрометрического анализа и получены данные об экспрессии белков ЭЦМ печеночных метастазов колоректального рака в сравнении с нормальной печенью.

Печеночные метастазы колоректального рака характеризовались повышением концентрации белков *S100-A11*, *Ltbp1* и *Anxa7*. Данные литературы указывают на определяющую роль

этих белков в развитии опухолевого процесса. Так, белок *Ltbp1* является частью сигнального пути трансформирующего фактора роста  $\beta$  (*ТФР- $\beta$* , transforming growth factor- $\beta$ , *TGF- $\beta$* ), который является одним из центральных белков в патогенезе колоректального рака [11-13]. Кроме того, *Ltbp1* значительно повышен в тканях рака молочной железы [14], где он стимулирует выработку *ТФР- $\beta$*  и вызывает прогрессию опухоли [15]. Экспрессия *Anxa7* была связана с противораковой активностью в злокачественных опухолях простаты [16], которая



DAPI/S100-A11

Рисунок 3.

Полуколичественное сравнение важнейших белков экстрацеллюлярного матрикса в группах печеночных метастазов (красный) и intact liver group (серый)

Figure 3.

Semi-quantitative analysis of major extracellular matrix proteins in liver metastases group (red) and intact liver group (gray)

Рисунок 4.

Окраска клеток MC38 на *S100-A11* (красный) и DAPI (синий). Шкала = 100 мкм

Figure 4.

Staining of MC38 cells for *S100-A11* (red) and DAPI (blue). Scale bar = 100  $\mu$ m

была обусловлена активацией AMPK, приводящей к ингибированию *mTORC1* и *STAT3*, в конечном итоге снижая экспрессию про-раковых факторов *CCL2*, *APLN* и *IL6ST*. Схожие результаты были получены для клеток рака желудка [17]. Наконец, экспрессия *S100-A11* коррелировала с лимфатическими метастазами у пациентов с колоректальным раком [18] и способствовала пролиферации клеток рака поджелудочной железы через сигнальный путь *PI3K/AKT* [19].

Напротив, экспрессия белков *Lama2*, *Lamb2* и *Lamg1* была достоверно повышена в интактной паренхиме печени в сравнении с печеночными метастазами колоректального рака. Данное наблюдение может быть объяснено тем, что ламинины, как основополагающий компонент базальной мембраны, широко представлены в таком активно кровоснабжаемом органе, как печень [20].

Результаты, представленные в настоящей статье, могут послужить основой для углубленного изучения компонентов ЭЦМ в этиологии и патогенезе злокачественных новообразований. Внедрение новых онкомаркеров, а также выявление кандидатов для таргетной терапии из числа белков ЭЦМ могут помочь снизить инвалидизацию и смертность от колоректального рака.

## Заключение

Качественный и количественный состав белков ЭЦМ печеночных метастазов колоректального рака и нормальных тканей печени существенно отличается: метастазы характеризуются повышенной экспрессией белков *S100-A11*, *Ltbp1* и *Anxa7*, а нормальная ткань – белков *Lama2*, *Lamb2* и *Lamg1*.

## Литература / References:

- Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(12): 786-801.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 4-27.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123(24): 4195-4200.
- Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen AC, et al. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev Technol.* 2013; 11(2): 70-92.
- Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016; 7(3): 105-114.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32(12): 3233-3243.
- Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4(9): 1265-1272.
- Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11(4): M111.014647.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2): 69-90.
- Dimitrakopoulos L, Prassas I, Diamandis EP, Charames GS. Onco-proteogenomics: Multi-omics level data integration for accurate phenotype prediction. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017; 54(6): 414-432.
- David CJ, Huang YH, Chen M, Su J, Zou Y, Bardeesy N, et al. TGF- $\beta$  Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell.* 2016; 164(5): 1015-1030.
- Standiford TJ, Kuick R, Bhan U, Chen J, Newstead M, Keshamouni VG. TGF- $\beta$ -induced IRAK-M expression in tumor-associated macrophages regulates lung tumor growth. *Oncogene.* 2011; 30(21): 2475-2484.
- Johansson J, Tabor V, Wikell A, Jalkanen S, Fuxe J. TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Front Oncol.* 2015; 5: 3.
- Yang S, Chen L, Chan DW, Li QK, Zhang H. Protein signatures of molecular pathways in non-small cell lung carcinoma (NSCLC): comparison of glycoproteomics and global proteomics. *Clin Proteomics.* 2017; 14(1): 31.
- Zhuang X, Zhang H, Li X, Li X, Cong M, Peng F, et al. Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1. *Nat Cell Biol.* 2017; 19(10): 1274-1285.
- Liu S, Li X, Lin Z, Su L, Yan S, Zhao B, et al. SEC-induced activation of ANXA7 GTPase suppresses prostate cancer metastasis. *Cancer Lett.* 2018; 416: 11-23.
- Ye W, Li Y, Fan L, Zhao Q, Yuan H, Tan B, et al. Effect of annexin A7 suppression on the apoptosis of gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2017; 429(1-2): 33-43.
- Meding S, Balluff B, Elsner M, Schone C, Rauser S, Nitsche U, et al. Tissue-based proteomics reveals FXVD3, S100A11 and GSTM3 as novel markers for regional lymph node metastasis in colon cancer. *J Pathol.* 2012; 228(4): 459-470.
- Xiao M, Li T, Ji Y, Jiang F, Ni W, Zhu J, et al. S100A11 promotes human pancreatic cancer PANC-1 cell proliferation and is involved in the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett.* 2017; 15(1): 175-182.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 2005; 24(5): 326-332.

## Сведения об авторах

**Южалин Арсений Евгеньевич**, аспирант кафедры онкологии, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

**Вклад в статью:** проведение экспериментов, написание статьи.

**Мушел Рут Жаклин**, профессор кафедры онкологии, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

**Вклад в статью:** разработка дизайна исследования.

### Корреспонденцию адресовать:

Южалин Арсений Евгеньевич,  
Headley Way 55C, Oxford, OX30LS, United  
Kingdom  
E-mail: yuzhalin@gmail.com

**Выражение признательности:** исследование было поддержано грантом Cancer Research UK C5255/A15935.

Статья поступила: 26.01.18г.

Принята к печати: 01.03.18г.

## Authors

**Mr. Arseniy E. Yuzhalin**, MSc (Res), DPhil student, CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom.

**Contribution:** performed the experiments; wrote the manuscript.

**Prof. Ruth J. Muschel**, MD, PhD, CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom.

**Contribution:** conceived and designed the study.

### Corresponding author:

Mr. Arseniy E. Yuzhalin,  
Headley Way 55C, Oxford, OX30LS, United  
Kingdom  
E-mail: yuzhalin@gmail.com

**Acknowledgements:** this study was financially supported by Cancer Research UK C5255/A15935.