

Влияние нарушенной экспрессии HNF4 α на чувствительность клеток гепатоцеллюлярной карциномы к действию ингибиторов проопухолевых сигнальных каскадов

А.С. Макарова¹, О.М. Кривцова^{1,2}, М.С. Чесноков¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Наталия Леонидовна Лазаревич lazarevich.nl@gmail.com

Введение. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) характеризуется агрессивным течением, высокой частотой случаев летальности и устойчивостью к существующим схемам терапии. Исследование ассоциированных с патогенезом ГК молекулярных нарушений, которые влияют на биологические свойства клеток ГК, позволяет оценить потенциальную эффективность ингибирования конкретных проопухолевых сигнальных каскадов. Настоящая работа посвящена изучению действия снижения экспрессии ключевого регулятора гепатоцитарной дифференцировки HNF4 α , которое часто происходит в ГК, на чувствительность клеток культур ГК к ингибиторам важных проопухолевых сигнальных путей mTOR, CDK4/6-pRb и ROCK.

Материалы и методы. В культурах ГК человека HepG2 и Huh7 со стабильным нокаутом гена HNF4A определяли изменение пролиферативного и миграционного потенциалов клеток, а также изменение данных свойств при действии ингибиторов mTOR (рапамицина), CDK4/6 (PD0332991, палбоциклиба) и ROCK 1/2 (Y27632). Уровни экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Нокаут гена HNF4A вызывает изменение миграционной способности клеток HepG2 и Huh7, ассоциированное с изменением экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина. Снижение экспрессии HNF4 α ослабляет опосредованное Y27632-подавление миграционного потенциала в клетках ГК. Нокаут гена HNF4A приводит к возникновению устойчивости клеток Huh7 и увеличению чувствительности клеток HepG2 к действию рапамицина и PD0332991, блокирующих миграционную способность клеток.

Заключение. Уровень экспрессии HNF4 α влияет на миграционную способность клеток ГК и их чувствительность к действию ингибиторов mTOR, CDK4/6 и ROCK1/2 на миграционную активность.

Ключевые слова: HNF4 α , гепатоцеллюлярная карцинома, определение действия противоопухолевых ингибиторов, рапамицин, палбоциклиб, Y27632

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-83-91

Impact of HNF4 α disrupted expression on hepatocellular carcinoma cells sensitivity to oncogenic pathways inhibitors

A.S. Makarova¹, O.M. Krivtsova^{1,2}, M.S. Chesnokov¹, N.L. Lazarevich^{1,2}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Introduction. Hepatocellular carcinoma (HCC) is characterized by aggressive course, high lethality rate and resistance to current systemic treatment. Analysis of molecular aberrations associated with HCC pathogenesis that control biological properties of HCC allows to evaluate potential efficacy of inhibiting certain oncogenic cascades. The present study is focused on investigation of the impact of reduced expression of the key hepatocyte differentiation regulator, HNF4 α , often downregulated in HCC, that influences sensitivity of HCC cells to inhibitors of the major oncogenic pathways mTOR, CDK4/6-pRb and ROCK.

Materials and methods. Changes in cells proliferation and migration caused by HNF4A gene stable knockdown were tested in human HCC cell cultures HepG2 and Huh7 followed by examination of these cellular properties under mTOR (rapamycin), CDK4/6 (PD0332991, palbociclib) and ROCK 1/2 (Y27632) inhibitors treatment. Gene expression levels were estimated by the real-time polymerase chain reaction method (Real-Time PCR).

Results. HNF4A gene knockdown alters HepG2 and Huh7 cell migration associated with E-cadherin and N-cadherin expression changes. The HNF4 α repression weakens Y27632-induced blockade of HCC cells migration potential. HNF4A gene knockdown causes resistance of Huh7 cells and increase of HepG2 cells sensitivity to rapamycin and PD0332991 that block cells migration ability.

Conclusions. Expression level of HNF4 α renders influence on migration of HCC cells and contributes to their sensitivity to mTOR, CDK4/6 and ROCK1/2 inhibitors' impact on cell migration activity.

Key words: HNF4 α , hepatocellular carcinoma, cancer drug tests, rapamycin, palbociclib, Y27632

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2015 г., опухоли печени занимают 2-е место по уровню смертности среди онкологических заболеваний [1]. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — самый распространенный тип рака печени, который диагностируют в основном на поздних стадиях. Для ГК характерно агрессивное течение, обуславливающее крайне неблагоприятный прогноз. Высокая генетическая гетерогенность ГК определяет низкую чувствительность к стандартной химиотерапии и невысокую эффективность таргетных препаратов [2].

При гепатоканцерогенезе, как и при других злокачественных процессах, нарушается дифференцировка клеток, ускоряется их пролиферация, и трансформированные клетки приобретают способность к метастазированию [3, 4]. Регуляция этих событий, формирующих злокачественный фенотип опухоли, осуществляется на разных уровнях.

Система гепатоцитарных транскрипционных факторов, в которой ключевую роль играет гепатоцитарный ядерный фактор альфа (HNF4 α), осуществляет тканеспецифическую регуляцию дифференцировки, морфогенеза и пролиферации гепатоцитов [4]. Транскрипция гена *HNF4A* с 2 альтернативно регулируемых промоторов обуславливает генерацию групп изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2 [5, 6]. Прогрессия ГК ассоциировано с подавлением экспрессии HNF4 α P1, которое вызывает дедифференцировку клеток и нарушение эпителиальной морфологии [4]. При развитии ГК индуцируется экспрессия эмбриоспецифичных изоформ HNF4 α P2 [7]. На поздних этапах опухолевой прогрессии может происходить репрессия обеих групп изоформ [8]. На модельных системах ГК показано, что HNF4 α выполняет функцию опухолевого супрессора, а его экзогенная экспрессия в клетках ГК способствует снижению их пролиферативной активности и уменьшению метастатического потенциала [8–10]. Временный нокдаун *HNF4A* в клетках культур ГК повышает их пролиферативный потенциал и способность к инвазии [11].

Прогрессия ГК сопровождается активацией проопухолевых сигнальных путей Wnt/ β -катенин, PI3K/AKT/mTOR и нарушением контроля клеточного цикла вследствие инактивации его негативных регуляторов — p53, pRb и p21^{WAF1/CIP1} [2, 3]. При гепатоканцерогенезе приобретение трансформированными клетками подвижности и способности к метастазированию происходит вследствие активации сигнальных путей с участием малых ГТФаз: Rac1, RhoA/ROCK и Cdc42 [12].

Происходящее при прогрессии ГК нарушение перечисленных регуляторных систем определяет изменение биологических свойств опухолевых клеток, однако совместное влияние репрессии HNF4 α и активации онкогенных каскадов на свойства клеток ГК не изучено. Стабильное подавление экспрессии HNF4 α

в дифференцированных культурах ГК может быть моделью этапа прогрессии ГК, ассоциированного с нарушением опухолесупрессорной функции HNF4 α . Мы провели исследование влияния нокдауна гена *HNF4A* на биологические свойства культур ГК и оценили в данной системе эффекты ингибирования проопухолевых сигнальных каскадов на ключевые свойства клеток, формирующие опухолевый фенотип.

Материалы и методы

Культивирование клеточных линий. В работе использовали культуры ГК человека HepG2 (получена из американской коллекции клеточных культур) и Huh7 (получена из Европейского банка клеточных культур). Клетки HepG2 культивировали в среде игла (Invitrogen, США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), заменимые аминокислоты (Invitrogen, США), 110 мг/л пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 300 мг/л глутамин (ПанЭко, Россия) и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки Huh7 культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, глутамин и антибиотиков в дозах, указанных выше. Клетки культивировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Каждые 2–3 дня клетки обрабатывали 0,25 % раствором трипсина и пересевали. Для проведения функциональных тестов количество клеток в суспензии подсчитывали с помощью автоматического счетчика Bio Rad TC10 (Bio Rad Laboratories, США) в присутствии трипанового синего.

Для обработки клеток применяли ингибиторы: рапамицин (Calbiochem, США), PD0332991 (Sellekchem, США), Y27632 (Calbiochem, США), растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для выбора оптимальных концентраций ингибиторов использовали МТТ-тест по протоколу, описанному ранее [13]. Клетки культур ГК, посеянные в количестве 16 тыс./лунка 96-луночного планшета, каждые сутки обрабатывали ингибиторами или ДМСО в течение 48 ч, затем инкубировали клетки с МТТ в течение 3 ч и измеряли оптическую плотность полученных растворов формазана с помощью планшетного считывателя SpectraMax M5e (Molecular Devices, США) при длине волны 570 нм. Для всех концентраций ингибиторов рассчитывали долю жизнеспособных клеток относительно контроля, обработанного ДМСО. На основании кривых «доза–эффект» и с учетом данных литературы об используемых концентрациях и действии изучаемых ингибиторов были выбраны эффективные концентрации, которые составили 100 нМ, 1 мкМ и 10 мкМ для рапамицина, PD0332991 и Y27632 соответственно.

При изучении действия ингибиторов на клетки культур ГК с подавленной экспрессией HNF4 α в течение суток перед постановкой функциональных тестов

и при их проведении клетки культивировали в среде с ингибиторами или ДМСО в качестве контроля.

Получение культур ГК HepG2 и Huh7 с подавленной экспрессией HNF4 α . Для получения культур с подавленной экспрессией HNF4 α были использованы лентивирусные векторы, экспрессирующие 4 разных малых шпилечных РНК (мшРНК; short hairpin RNA, shRNA), комплементарные участкам матричной РНК *HNF4A* (shHNF4 α), – pLKO.1-shHNF4 α (SHDNA-NM_000457, Sigma, США). Для получения контрольных культур использовали лентивирусный вектор, кодирующий мшРНК к последовательности зеленого флуоресцентного белка GFP (shGFP), – pLKO.1-shGFP (Sigma, США). Используемые векторы содержат ген устойчивости к пуromицину. Для получения лентивирусных частиц использовали систему ViraPower (Invitrogen, США), включающую векторы pLP1, pLP2 и pCMV-VSVg и пакующие клетки HEK293T, как описано ранее [14]. После трансдукции была проведена селекция в среде с антибиотиком: для HepG2 при концентрации пуromицина 5,5 мкг/мл, для Huh7 – 7,0 мкг/мл. По завершении селекции, когда неинфицированные клетки исходных культур погибли, были получены культуры HepG2-shGFP, Huh7-shGFP и 4 варианта культур HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α .

Анализ экспрессии генов. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для получения комплементарной ДНК проводили обратную транскрипцию с использованием случайных гексамерных олигонуклеотидов (Синтол, Россия) и обратной транскриптазы MMLV-RT (Promega, США). В реакцию брали 2,5 мкг тотальной РНК.

Количественное определение уровня экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) с применением амплификатора Bio Rad IQ5 (Bio Rad Laboratories, США). Были использованы специфические праймеры: *TBP*-прямой 5'-gcacagagccsaagatgta-3', *TBP*-обратный 5'-acttcacatcacagctcccca-3', *HNF4A*-прямой 5'-gcgtgcggaagaaccasa-3', *HNF4A*-обратный 5'-tgatcccggtcccgcctcat-3', *HNF4AP1*-прямой 5'-atgtgcaggtgttgacgatg-3', *HNF4AP1*-обратный 5'-ctcgaggcaccgtagtggtt-3', *HNF4AP2*-прямой 5'-ggccatggtcagcgtgaa-3', *HNF4AP2*-обратный 5'-ctcgaggcaccgtagtggtt-3', *CDH1*-прямой 5'-cggaggagagcgggtggtc-3', *CDH1*-обратный 5'-ggcagggcggggaagata-3', *CDH2*-прямой 5'-accaggaaggtggcaggt-3', *CDH2*-обратный 5'-gcggaatgaccagctctct-3'. Температуры отжига для реакций с праймерами к генам: *TBP* – 62,8 °С, *HNF4A* – 62,7 °С, *HNF4AP1* – 62,7 °С, *HNF4AP2* – 62,7 °С, *CDH1* – 68,0 °С, *CDH2* – 63,5 °С. Количество комплементарной ДНК в образцах нормировали по уровню экспрессии гена *TBP*. Постановку ПЦР-РВ и обработку данных выполняли, как описано ранее [15].

Определение пролиферативного потенциала опухолевых клеток проводили путем оценки ДНК-синтети-

ческой активности клеток методом включения 5-бром-дезоксисуридина (5-BrdU) по протоколу, описанному ранее [14].

Определение миграционной активности клеток. Оценку способности клеток к направленной миграции выполняли в камерах Бойдена с диаметром пор 8,0 мкм (BD Falcon Cell Culture Insert, BD Biosciences, США) по схеме, описанной ранее [14]. В качестве аттрактанта для клеток использовали фетальную бычью сыворотку (HyClone, США), добавляя ее в культуральную среду до концентрации 7 %. В камеры Бойдена высевали по 30 тыс. клеток. Время теста составляло 24 ч.

Обработка данных. Эксперименты проведены не менее чем в 3 независимых повторах. Данные обрабатывали в программах Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, США) и Origin Pro 9.0 (Origin Lab Corporation, США). Для определения достоверности различий (порог $p < 0,05$) между группами данных использовали U-тест Манна–Уитни. Графическое представление результатов выполнено с применением программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение

Влияние подавления экспрессии HNF4 α на биологические свойства культур ГК HepG2 и Huh7. Для исследования эффектов подавления экспрессии HNF4 α на свойства культур ГК человека мы получили культуры HepG2 и Huh7, в которых транскрипция HNF4 α стабильно подавлена путем трансдукции лентивирусных векторов, экспрессирующих 4 разных варианта мшРНК, комплементарных последовательности матричной РНК *HNF4A* – HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α . В качестве контрольных использовали полученные аналогичным образом культуры HepG2 и Huh7, экспрессирующие мшРНК к последовательности гена *GFP*, – HepG2-shGFP и Huh7-shGFP. После инфекции клеток указанными лентивирусными векторами, содержащими ген устойчивости к пуromицину, проводили селекцию клеток в среде с пуromицином. По завершении селекции культуры HepG2-shGFP, Huh7-shGFP и 4 варианта культур HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α использовали для оценки уровня подавления экспрессии гена и синтеза белка HNF4 α методами обратной транскрипции – ПЦР-РВ и иммуноблоттинга соответственно. По результатам сравнения (данные не представлены) для каждой из культур ГК были выбраны варианты с наиболее выраженным подавлением HNF4 α , в которых методом ПЦР-РВ количественно определяли уровень снижения экспрессии HNF4 α и групп изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2 по сравнению с контрольными культурами. В культурах ГК с нокдауном гена *HNF4A* произошло примерно двукратное подавление экспрессии HNF4 α и групп его изоформ (рис. 1).

Далее в экспериментах на культурах HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α исследовано влияние сниженной экспрессии HNF4 α на пролиферативную активность клеток

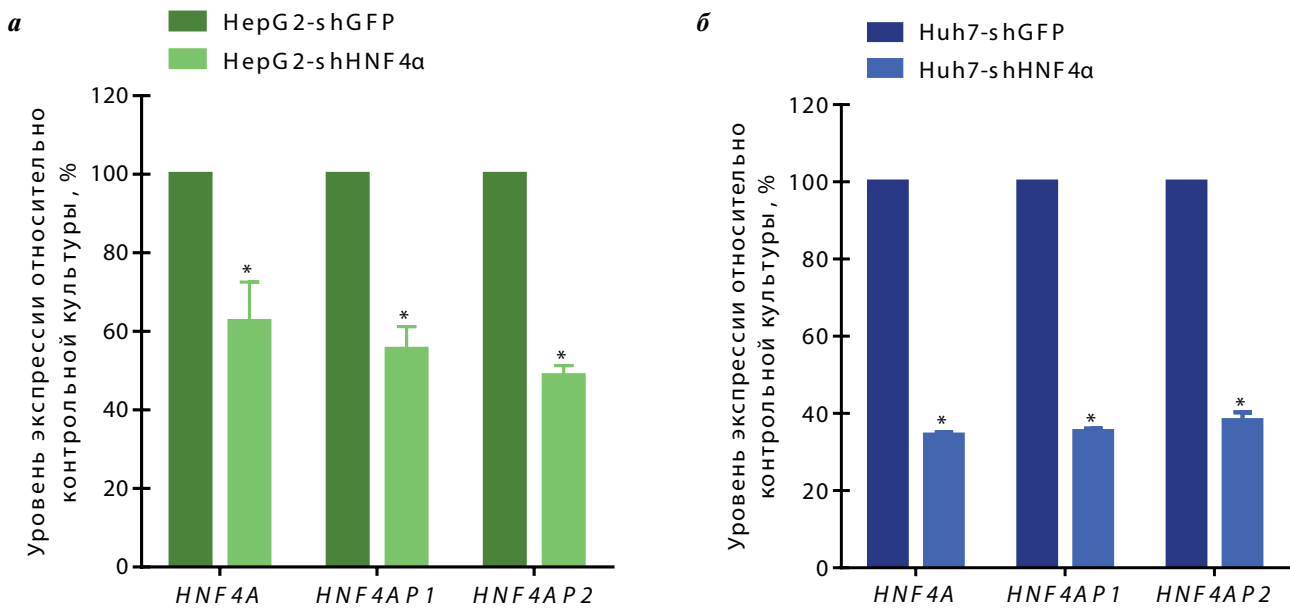


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии *HNF4α* и групп изоформ *HNF4α* в клетках *HepG2-shHNF4α* (а) и *Huh7-shHNF4α* (б). Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени. Формат данных: среднее значение \pm стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. * $p < 0,05$.

и их миграционную способность — ключевых свойств, обеспечивающих формирование злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

Определение влияния нокдауна гена *HNF4A* на пролиферативный потенциал культур ГК, проведенное методом оценки включения 5-BrdU; показало, что в культурах *HepG2-shHNF4α* и *Huh7-shHNF4α* ДНК-синтетическая активность клеток по сравнению с контролем не изменилась (рис. 2а, б). Это может быть связано с тем, что в культурах *HepG2* и *Huh7* выявлена экспрессия мутантных вариантов онкогена *N-Ras* с активирующей мутацией Q61L и опухолевого супрессора p53 с инактивирующей мутацией Y220C соответственно [16], влияние которых может обуславливать исходно высокий пролиферативный потенциал этих культур.

Исследование миграционного потенциала культур ГК с подавленной экспрессией *HNF4α* показало, что способность к направленной миграции в камере Бойдена клеток культуры *HepG2-shHNF4α* в среднем почти в 4 раза выше по сравнению с *HepG2-shGFP* (рис. 2в), при этом *Huh7-shHNF4α* мигрируют более чем в 2 раза менее интенсивно, чем в контроле (рис. 2г).

Одним из механизмов регуляции миграционной активности клеток ГК является изменение состава кадгериновых клеточных контактов. Из литературы известно, что репрессия *HNF4α* в культурах ГК может вызывать подавление экспрессии E-кадгерина [8] и появление других кадгериновых контактов [17]. Ранее было показано, что повышение миграционной активности в иммортализованных гепатоцитах мыши с кратковременным нокдауном *HNF4α* ассоциировано с подавлением экспрессии E-кадгерина и увеличением экспрессии N-кадгерина [18]. Поэтому мы предположили, что на-

блюдающееся при нокдауне гена *HNF4A* изменение миграционного потенциала клеток ГК опосредовано нарушением экспрессии данных типов кадгеринов.

Количественная оценка экспрессии E-кадгерина (*CDH1*) и N-кадгерина (*CDH2*) методом ПЦР-РВ показала, что в клетках *HepG2-shHNF4α* (рис. 3а) увеличилась экспрессия *CDH2*, при этом экспрессия *CDH1* не изменилась. В клетках культуры *Huh7-shHNF4α* (рис. 3б) снизилась экспрессия обоих типов кадгеринов. Известно, что N-кадгерин играет важную роль в увеличении миграционной активности опухолевых клеток [19], поэтому мы предполагаем, что увеличение миграционной способности клеток *HepG2-shHNF4α* может быть связано с повышением уровня экспрессии N-кадгерина, а уменьшение миграционного потенциала клеток *Huh7-shHNF4α* опосредовано снижением экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина.

Влияние активности проопухолевых сигнальных каскадов на биологические свойства культур ГК с подавленной экспрессией *HNF4α*. На основании данных литературы для анализа влияния нарушенной экспрессии *HNF4α* на проопухолевое действие сигнальных путей, ассоциированных с патогенезом ГК, мы выбрали ряд молекулярных каскадов, активность которых можно блокировать с помощью низкомолекулярных ингибиторов.

Активация mTOR-регулируемого сигнального пути является частым событием при гепатоканцерогенезе, что обуславливает включение ингибиторов mTOR в клинические испытания для выбора терапии ГК [2, 3]. В опытах *in vitro* при ингибировании mTOR наибольшая эффективность блокирования пролиферации клеток *HepG2* и *Huh7* среди структурных аналогов показана для рапамицина [20].

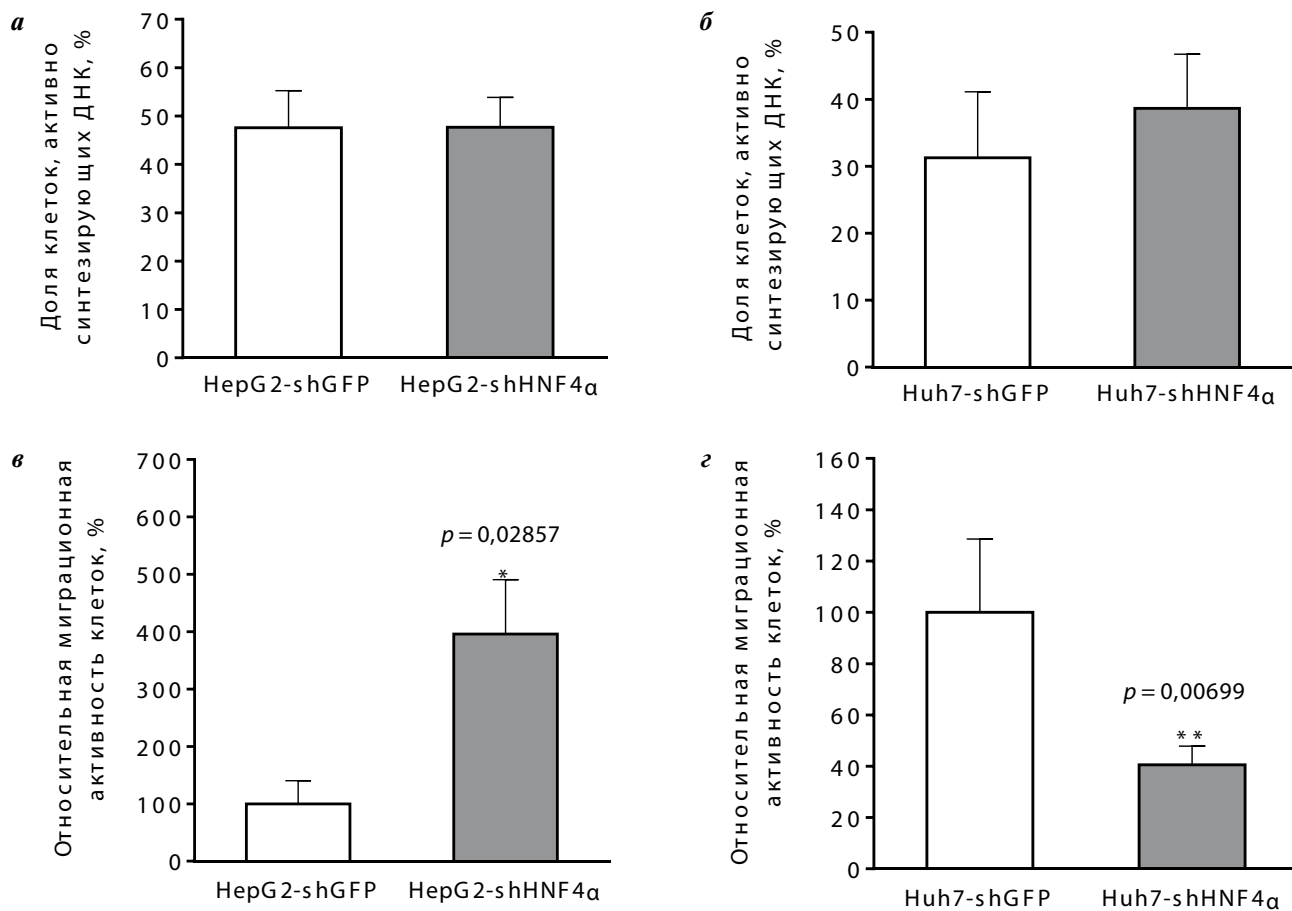


Рис. 2. Определение доли клеток, активно синтезирующих ДНК, методом включения метки 5-BrdU: HepG2-shGFP и HepG2-shHNF4α (а), Huh7-shGFP и Huh7-shHNF4α (б). Миграционный потенциал клеток HepG2-shHNF4α (в) и Huh7-shHNF4α (г), измеренный относительно контрольных культур HepG2-shGFP и Huh7-shGFP соответственно. Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. *p < 0,05; ***p < 0,01.

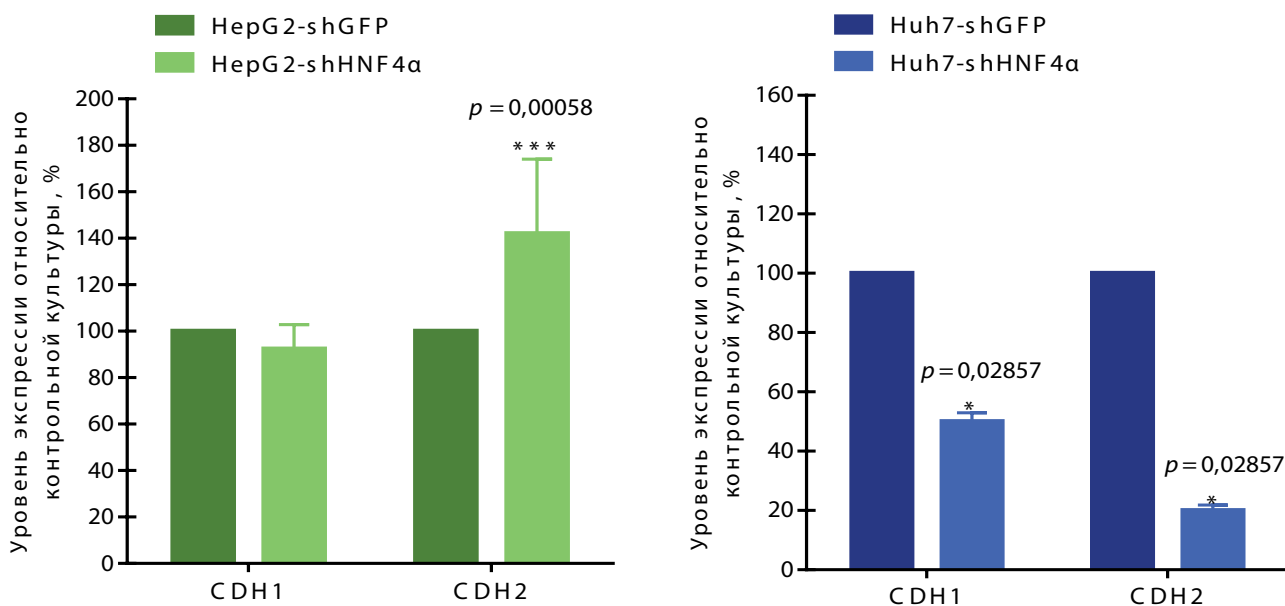


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии E-кадгерина (CDH1) и N-кадгерина (CDH2) в клетках культур HepG2-shHNF4α (а) и Huh7-shHNF4α (б). Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени. Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. *p < 0,05; ***p < 0,001.

Вследствие частых мутаций регуляторов клеточного цикла в ГК [2, 3] ингибирование pRb-зависимого пути регуляции пролиферации представляется перспективным подходом для терапии этого типа опухолей [3]. Для терапии ГК зарегистрировано клиническое испытание II фазы ингибитора CDK4/6 PD0332991 (палбоциклиба), который препятствует CDK4/6-зависимой инактивации pRb [21]. В исследовании D.V. Rivadeneira и соавт. продемонстрирован значительный антипролиферативный эффект PD0332991 для культур HepG2 и Huh7 [22].

Ингибирование киназ ROCK1/2, одних из основных регуляторов клеточной подвижности, показало значительную эффективность для блокирования миграционной активности клеток ГК и уменьшения их метастатического потенциала. Одним из наиболее эффективных ингибиторов ROCK1/2 *in vitro* является Y27632 [12].

Таким образом, ингибиторы рапамицин, PD0332991 и Y27632 были выбраны как наиболее специфические и потенциально эффективные в отношении блокирования пролиферации и миграции культур HepG2 и Huh7. Для постановки экспериментов на культурах ГК *in vitro* мы определили оптимальные концентрации ингибиторов, руководствуясь данными о дозах и ингибирующих эффектах веществ на свойства клеток HepG2 и Huh7 [20, 22, 23], а также оценкой выживаемости клеток ГК при действии рапамицина, PD0332991 и Y27632, выполненной по результатам МТТ-теста (данные не приведены).

Следующим этапом работы стало проведение экспериментов по определению действия ингибиторов сигнальных путей mTOR, CDK4/6 и ROCK1/2 на биологические свойства культур HepG2 и Huh7 с подавленной экспрессией HNF4a – пролиферативную активность и миграционную способность.

По результатам тестов по оценке пролиферативного потенциала клеток методом включения 5-BrdU при действии рапамицина, PD0332991 и Y27632 значимого влияния подавления экспрессии HNF4a на интенсивность синтеза ДНК в клетках HepG2-shHNF4a и Huh7-shHNF4a относительно соответствующих контрольных культур не выявлено (данные не представлены).

Результаты теста на определение способности клеток к направленной миграции в камерах Бойдена для культур HepG2-shHNF4a и Huh7-shHNF4a при воздействии ингибиторов представлены на рис. 4. Действие рапамицина в концентрации 100 нМ вызывает большее снижение миграционной способности клеток культуры HepG2-shHNF4a по сравнению с HepG2-shGFP ($p = 0,02857$) (см. рис. 4а). Клетки культуры Huh7-shHNF4a оказались устойчивыми к ингибирующему миграцию действию рапамицина по сравнению с Huh7-shGFP ($p = 1,19 \times 10^{-5}$) (см. рис. 4б).

Действие PD0332991 в концентрации 1 мкМ существенно уменьшает миграционный потенциал клеток

культуры HepG2-shHNF4a по сравнению с контрольными ($p = 0,00622$) (см. рис. 4в). В клетках Huh7-shHNF4a ингибирование активности CDK4/6 вызвало достоверно меньшее снижение миграционной способности по сравнению с культурой Huh7-shGFP ($p = 1,03 \times 10^{-4}$) (см. рис. 4г).

Подавление экспрессии HNF4a в исследуемых культурах ГК приводит к снижению чувствительности клеток к действию Y27632 при концентрации 10 мкМ, блокирующему миграционную активность клеток. Миграционная способность клеток Huh7-shHNF4a под действием Y27632 оказалась достоверно выше, чем в контрольной культуре Huh7-shGFP ($p = 0,01399$) (см. рис. 4д). Сравнение миграционных потенциалов культур HepG2-shGFP и HepG2-shHNF4a выявило меньшую чувствительность HepG2-shHNF4a к ингибирующему действию Y27632 (см. рис. 4е), однако статистическая достоверность в этом случае не была достигнута ($p = 0,05714$).

Таким образом, подавление экспрессии HNF4a привело к уменьшению чувствительности клеток Huh7 к действию ингибиторов mTOR и CDK4/6, вызывающих снижение миграционной активности клеток. Это может быть объяснено сочетанием влияния мутантного варианта p53 с эффектами подавления экспрессии HNF4a в клетках Huh7. По данным литературы, нарушение функции p53 вызывает активацию сигнального пути Akt/mTOR, которая обуславливает повышение клеточной подвижности [24]. Вследствие того, что ген *CDKN1A* является транскрипционной мишенью p53 [25], инактивация последнего может приводить к ослаблению p21^{WAF1/CIP1}-зависимого подавления активности комплексов циклин D–CDK4 [26], для которых описана неканоническая функция контроля клеточной подвижности [27]. Такие молекулярные нарушения способствуют поддержанию высокого миграционного потенциала клеток Huh7 при ингибировании mTOR и CDK4/6. При нокдауне гена *HNF4A* в культуре Huh7 указанные эффекты могут усиливаться, поскольку снижение уровня HNF4a в клетках Huh7 вызывает активацию mTOR [28], и подавление экспрессии HNF4a может привести к снижению экспрессии гена *CDKN1A*, который является его прямой транскрипционной мишенью [29].

В культуре HepG2 при действии ингибиторов mTOR и CDK4/6 миграционная активность клеток с подавленной экспрессией HNF4a по сравнению с контрольной культурой значительно снижается. Таким образом, вызванное нокдауном гена *HNF4A* повышение миграционной способности культуры HepG2 (см. рис. 2в) может быть обусловлено влиянием mTOR- и CDK4/6-зависимых механизмов.

Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют роль экспрессии HNF4a в регуляции миграционной активности клеток ГК. Нокдаун гена *HNF4A*

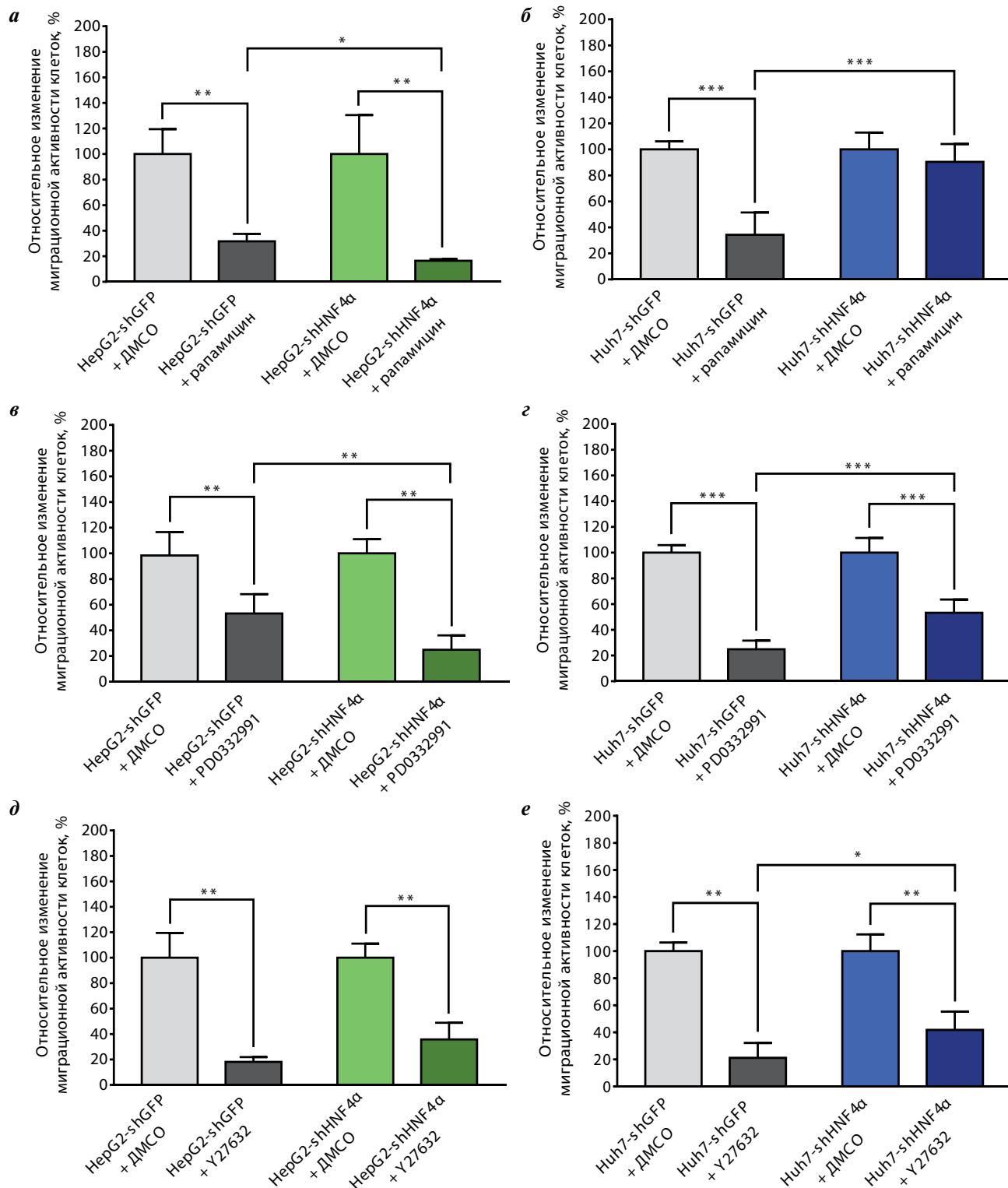


Рис. 4. Влияние ингибирования *mTOR*, *CDK4/6* и *ROCK1/2* на миграционную активность клеток гепатоцеллюлярной карциномы со сниженной экспрессией *HNF4α*. Относительное изменение миграционной способности культур *HepG2-shHNF4α* (а, в, д) и *Huh7-shHNF4α* (б, г, е) под действием 100 нМ рапамицина (а, б), 1 мкМ PD0332991 (в, г) и 10 мкМ Y27632 (д, е). Для каждой культуры проведено сравнение действия ингибитора относительно контроля (+ диметилсульфоксид (ДМСО)). Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

в исследованных культурах ГК человека вызывает изменение миграционной способности клеток, ассоциированное с нарушением экспрессии Е-кадгерина и N-кадгерина. Полученные данные указывают на то,

что уровень экспрессии *HNF4α* является фактором, влияющим на чувствительность клеток ГК к действию ингибиторов проопухолевых сигнальных путей *mTOR*, *CDK4/6* и *ROCK1/2* на миграционную активность.

Повышение устойчивости клеток ГК с нокаутом гена *HNF4A* к ROCK-зависимому ингибированию миграционной активности характеризует участие *HNF4α* в негативной регуляции миграционной способности клеток, что указывает на его опухолесупрессорную

функцию. Различная чувствительность изучаемых культур ГК к блокированию миграционной активности клеток при ингибировании mTOR и CDK4/6, вероятно, определяется спектром онкогенных мутаций, характерных для каждой культуры.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18. PMID: 27158749.
3. Aravalli R.N., Cressman E.N., Steer C.J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol* 2013;87(2):227–47. DOI: 10.1007/s00204-012-0931-2. PMID: 23007558.
4. Лазаревич Н.Л., Флейшман Д.И. Тканеспецифические транскрипционные факторы в прогрессии эпителиальных опухолей. *Биохимия* 2008;73(5):735–50. [Lazarevich N.L., Fleishman D.I. Tissue-specific transcription factors in the progression of epithelial tumors. *Biochimica = Biochemistry* 2008;73(5):735–50. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297908050106. PMID: 18605982.
5. Thomas H., Jaschowitz K., Bulman M. et al. A distant upstream promoter of the *HNF4α* gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 2001;10(19):2089–97. PMID: 11590126.
6. Torres-Padilla M.E., Fougère-Deschattre C., Weiss M.C. Expression of *HNF4α* isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3 end splicing. *Mech Dev* 2001;109(2):183–93. PMID: 11731232.
7. Lazarevich N.L., Shavochkina D.A., Fleishman D.I. et al. Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. *Exp Oncol* 2010;32(3):167–71.
8. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V. et al. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 2004;39(4):1038–47. DOI: 10.1002/hep.20155. PMID: 15057908.
9. Yin C., Lin Y., Zhang X. et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene. *Hepatology* 2008;48(5):1528–39. DOI: 10.1002/hep.22510. PMID: 18925631.
10. Ning B.F., Ding J., Yin C. et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010;70(19):7640–51. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0824. PMID: 20876809.
11. Hatzia Apostolou M., Polyarchou C., Aggelidou E. et al. An *HNF4α*-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* 2011;147(6):1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.043. PMID: 22153071.
12. Wong C.C., Wong C.M., Au S.L. et al. RHO GTPases and RHO-effectors in hepatocellular carcinoma metastasis: ROCK N^oRHO move it. *Liver Int* 2010;30(5):642–56. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02232.x. PMID: 20726051.
13. Omar H.A., Tolba M.F., Hung J.H. et al. OSU-2S/Sorafenib synergistic antitumor combination against hepatocellular carcinoma: the role of PKCδ/p53. *Front Pharmacol* 2016;(7):463. DOI: 10.3389/fphar.2016.00463. PMID: 27965580.
14. Чесноков М.С., Кустова И.Ф., Шавочкина Д.А. и др. Частичная редифференцировка и понижение выраженности черт злокачественного фенотипа клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека при экспрессии ядерного рецептора *HNF4α*. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;(3):17–23. [Chesnokov M.S., Kustova I.F., Shavochkina D.A. et al. Partial redifferentiation and decrease in the severity of the malignant phenotype of cells of human pancreatic ductal adenocarcinoma in the expression of the nuclear receptor *HNF4α*. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2012;(3):17–23. (In Russ.)].
15. Chesnokov M.S., Krivtsova O.M., Skovodnikova P.A. et al. Transcriptome-based identification of PDGFA as a candidate secreted biomarker for hepatocellular carcinoma. *Biopolymers and Cell* 2016;32(6):418–28. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000939>.
16. Barretina J., Caponigro G., Stransky N. et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483(7391):603–7. DOI: 10.1038/nature11003. PMID: 22460905.
17. Späth G.F., Weiss M.C. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 1998;140(4):935–46. PMID: 9472044.
18. Santangelo L., Marchetti A., Cicchini C. et al. The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4α. *Hepatology* 2011;53(6):2063–74. DOI: 10.1002/hep.24280. PMID: 21384409.
19. Hazan R.B., Phillips G.R., Qiao R.F. et al. Exogenous expression of N cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148(4):779–90. DOI: 10.1002/hep.24280. PMID: 21384409.
20. Pivonello C., Negri M., De Martino M.C. et al. The dual targeting of insulin and insulin-like growth factor I receptor enhances the mTOR inhibitor-mediated antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(9):9718–31. DOI: 10.18632/oncotarget.6836. PMID: 26756219.
21. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01356628>.
22. Rivadeneira D.B., Mayhew C.N., Thangavel C. et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroenterology* 2010;138(5):1920–30. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.007. PMID: 20100483.
23. Lontay B., Kiss A., Gergely P. et al. Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 2005;17(10):1265–75. DOI: 10.1016/j.cellsig.2005.01.008. PMID: 16038801.
24. Guo F., Gao Y., Wang L. et al. p19Arf-p53 tumor suppressor pathway regulates cell motility by suppression of phosphoinositide 3-kinase and Rac1 GTPase activities. *J Biol Chem* 2003;278(16):14414–9. DOI: 10.1074/jbc.M300341200. PMID: 12578823.
25. el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75(4):817–25. PMID: 8242752.
26. Paternot S., Bockstaele L., Bisteau X. et al. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle* 2010;9(4):689–99. DOI: 10.4161/cc.9.4.10611. PMID: 20107323.

27. Fusté N.P., Fernández-Hernández R., Cemeli T. et al. Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. *Nat Commun* 2016;7:11581. DOI: 10.1038/ncomms11581. PMID: 27181366.
28. Yang Y.M., Lee C.G., Koo J.H. et al. G α 12 overexpressed in hepatocellular carcinoma reduces microRNA-122 expression via HNF4 α inactivation, which causes c-Met induction. *Oncotarget* 2015;6(22):19055–69. DOI: 10.18632/oncotarget.3957. PMID: 25965999.
29. Chiba H., Itoh T., Satohisa S. et al. Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Exp Cell Res* 2005;302(1):11–21. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.08.014. PMID: 15541721.