

УДК 576.385.5

ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* РОЛИ TGF- β 1 И МУТАЦИЙ ГЕНА *C-Kit* В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ У БОЛЬНЫХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С

© 2019 М.Е. El-Houseini¹, А. Ismail², А.А. Abdelaal², А.Н. El-Habashy³,
Z.F. Abdallah¹, М.З. Mohamed⁴, М. El-Hadidi⁵,
W.C.S. Cho⁶, Н. Ahmed⁷, Т.А. Al-Shafie^{1,8*}

¹ Department of Cancer Biology, National Cancer Institute, Cairo University, Cairo 11796, Egypt; e-mail: tamer.alshafie@pua.edu.eg

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo 11566, Egypt

³ Department of Pathology, National Cancer Institute, Cairo University, Cairo 11796, Egypt

⁴ Department of Medical Laboratory, Medical Center of Egyptian Railways, Cairo 11669, Egypt

⁵ Center of Informatics Science, Nile University, Giza 12525, Egypt

⁶ Department of Clinical Oncology, Queen Elizabeth Hospital, Kowloon, Hong Kong, China

⁷ GlycoMantra, Inc., Baltimore MD 21227, USA

⁸ Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Pharmacy and Drug Manufacturing, Pharos University in Alexandria, Alexandria 21311, Egypt

Поступила в редакцию 19.03.2019

После доработки 19.04.2019

Принята к публикации 20.04.2019

Трансформирующий фактор роста- β (TGF- β – transforming growth factor- β) является цитокином, который подавляет рост опухоли в нормальных тканях и при доброкачественных опухолях. В то же время, при злокачественной трансформации клеток TGF- β может проявлять противоположные свойства, и опухолевые клетки могут использовать это в своих целях. Установлено, что *C-Kit* играет основную роль в активации стволовых клеток и при регенерации печени после ее повреждения. Однако мало что известно о перекрестных связях между TGF- β и *C-Kit* и их роли в прогрессировании гепатоцеллюлярной карциномы (HCC – hepatocellular carcinoma). В настоящей работе было изучено влияние возрастающих доз TGF- β 1 на стволовые клетки печени CD44⁺CD90⁺ (LSCs – liver stem cells) и экспрессию гена *C-Kit* в образцах злокачественных и прилегающих к ним тканей печени, полученных от 32 больных с гепатоцеллюлярной карциномой. Собранные нами данные показали, что количество злокачественных стволовых клеток печени в два раза превышало число клеток, не подвергающихся злокачественной трансформации. При обработке клеток печени возрастающими количествами TGF- β 1, происходило последовательное подавление стволовых клеток, как опухолевых, так и доброкачественных, однако низкие концентрации TGF- β 1 не подавляли злокачественные клетки. Кроме того, в отличие от злокачественных клеток печени, в клетках, не подвергающихся злокачественной трансформации, в экзонах 9 и 11 не наблюдалось экспрессии гена *C-Kit*. Мутационный анализ показал, что мутации в экзоне 9, но не в экзоне 11, гена *C-Kit*, в отдельных злокачественных клетках печени приводят к изменению аминокислотной последовательности и нарушают структуру и функцию белка. Следует особо отметить, что в злокачественных клетках печени выявлена ассоциация мутированного экзона 9 и высокого уровня вируса гепатита С (HCV – hepatitis C virus). При этом, экспрессия гена *C-Kit* в этих клетках не подавлялась при их обработке всеми использованными в работе дозами TGF- β 1. По нашим сведениям, это первая работа, свидетельствующая о том, что у больных с гепатоцеллюлярной карциномой, у которых в крови наблюдается высокая концентрация вируса гепатита С, в клетках печени происходит мутация гена *C-Kit*. Результаты нашей работы подчеркивают необходимость изучения уровня TGF- β 1 и мутаций гена *C-Kit* у больных с хроническим поражением HCV, чтобы предотвратить развитие гепатоцеллюлярной карциномы и улучшить качество лечения этих больных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гепатоцеллюлярная карцинома, хроническое заболевание печени, TGF- β 1, стволовые клетки печени, мутации *C-Kit*.

DOI: 10.1134/S0320972519080116

Принятые сокращения: HCC – гепатоцеллюлярная карцинома; TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста бета 1; LSC – стволовая клетки печени; CSC – стволовая опухолевая клетка; SCF – фактор стволовых клеток; *C-Kit* – рецептор фактора стволовых клеток; CLD – хронических заболеваниях печени; HCV – вирус гепатита С.

* Адресат для корреспонденции.

Печень является основным эндокринным и экзокринным органом, в котором происходит интенсивный метаболизм веществ и который осуществляет защиту организма. Печень образована несколькими типами клеток, преимущественно гепатоцитами и холангиоцитами. Из других типов клеток следует отметить синусоидальные эндотелиальные клетки, Купферовские клетки и звездчатые клетки [1]. Среди случаев первичного рака печени гепатоцеллюлярная карцинома (НСС) является основным гистологическим типом рака и поражает ~80% больных с раком печени. Ее прогноз является неблагоприятным с общим пятилетним уровнем смертности >88%. Поэтому НСС является второй в мире по распространенности причиной смерти от рака [2].

Результаты работ, полученные в последние годы, продолжают поддерживать гипотезу о том, что опухолевые стволовые клетки (CSC – cancer stem cell) являются корнем развития рака печени. Более 40% случаев НСС имеют клональное происхождение и образуются из клеток, подобных стволовым клеткам или CSC. [3]. Эти клетки печени характеризуются поверхностными клеточными маркерами, такими как CD13, CD133, CD90 и др. Кроме того, такие клетки ассоциируются с возникновением устойчивости к действию лекарств и неэффективностью проводимого лечения [4]. Поэтому, необходимо срочно расширить понимание механизмов и разработать способы направленного воздействия на CSC при гепатоцеллюлярной карциноме.

Допускаются два пути происхождения стволовых клеток печени (LSC): эндогенный (внутрипеченочные стволовые клетки) и экзогенный (внепеченочные стволовые клетки). В последнем случае они могут образовываться или из гематопоэтических стволовых клеток (HSC – hematopoietic stem cells) или из мезенхимных стволовых клеток (MSC – mesenchymal stem cells) [5]. CD133 является специфическим маркером гематопоэтических стволовых клеток, в то время как CD90 и CD44 являются специфическими поверхностными маркерами мезенхимных стволовых клеток. Таким образом, эти поверхностные белки можно вполне уверенно использовать для характеристики LSC [6, 7]. Для идентификации LSC также используются различные белки, включая OV6, EpCAM и др. [8].

В частности, CD44 играет роль в ремоделинге ткани, адгезии клеток на внеклеточном матриксе и миграции клеток, т.е. в процессах, которые вносят вклад в канцерогенез. CD90 также вовлечен во взаимодействия клеток и внеклеточного матрикса и в межклеточные взаимодействия, которые преимущественно обнару-

живаются при слабо дифференцированной гепатоцеллюлярной карциноме. Было показано, что CD90 играет важную роль в метастазировании, воспалении и фиброзе ткани печени [8, 9]. Клетки CD90⁺CD44⁺ представляют собой агрессивный фенотип, так как они способны, например, образовывать метастатические поражения в легких иммунодефицитных мышей [9]. Кроме того, предполагается, что положительность клеток по двум маркерам: по CD44, а также по CD133 или CD90, обеспечивает более корректную идентификацию опухолевых стволовых клеток печени [10].

Показано, что TGF- β , как плейотропный цитокин, в дополнение к его роли в развитии фиброза печени через активацию звездчатых клеток и образование компонентов внеклеточного матрикса (ECM – extracellular matrix), вовлечен в процессы регуляции дифференцировки стволовых клеток в различные линии клеток [11, 12]. В недавних работах было показано, что есть корреляция между aberrантной TGF- β -опосредованной передачей сигнала и размножением CSC в процессе развития НСС при хронических заболеваниях печени (CLD) [9]. Фактор стволовых клеток (SCF – stem cell factor) и его рецептор C-Kit играют ключевую роль в регенерации печени после ее повреждения и частичной гепатэктомии [13]. Связывание SCF с этим рецептором приводит к запуску C-Kit-зависимой передачи сигнала и последующей активации PI3K/AKT-, SRC- и JAK/STAT-зависимых сигнальных путей. Предполагается, что прогностическое предраковое состояние стволовых клеток печени в раковые клетки ассоциировано с повышенной экспрессией рецептора C-Kit [14]. Недавно появились сообщения о том, что взаимосвязь между TGF- β и C-Kit способствуют канцерогенезу в клетках HepG2 [15], однако необходимы дальнейшие исследования этих связей у больных с гепатоцеллюлярной карциномой.

В настоящей работе нами было предположено, что взаимодействия между трансформирующим фактором роста бета 1, стволовыми клетками печени и геном C-Kit при CLD могут привести к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Нами было предположено, что клетки печени, изолированные из злокачественной и доброкачественной частей опухолей, удаленных из печени больных с НСС, могут имитировать клетки печени больных с CLD и гепатоцеллюлярной карциномой соответственно. Поэтому, нами была предложена модель *ex vivo*, чтобы изучить эффект возрастающих доз TGF- β 1 на экспрессию генов CD44⁺CD90⁺ и C-Kit в стволовых клетках печени злокачественного и незлокачест-

венного происхождения. Мы считаем, что это исследование прольет свет на этиологическую основу развития гепатоцеллюлярной карциномы. Нами впервые показано, что умеренные и высокие дозы TGF- β 1 способны подавлять рост популяции LSC и ингибировать экспрессию гена *C-Kit* с мутированным экзоном 9. Однако низкие концентрации TGF- β 1 не подавляли рост стволовых клеток и не подавляли экспрессию гена *C-Kit*. Кроме того, впервые нами были обнаружены различные замены в экзоне 9 гена *C-Kit*, ассоциированные с высокими концентрациями вируса гепатита С в злокачественных клетках печени, с которыми можно связать устойчивость этих клеток к действию TGF- β 1. Интересно, что уровень экспрессии гена *C-Kit* в некоторых злокачественных клетках печени, полученных от больных, у которых в крови обнаруживается высокая концентрация HCV и мутации в экзоне 9, оставался без изменений даже при их обработке средними и высокими дозами TGF- β 1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дезагрегация и фракционирование клеток печени. Данная работа проводилась в соответствии с протоколом экспертного совета национального онкологического института (Каир, Египет). В ней были обследованы 32 пациента, у которых на основе лабораторных исследований, радиологических анализов и изучения патологии был установлен диагноз гепатоцеллюлярная карцинома и была проведена частичная гепатэктомия. Для получения клеток печени были обработаны злокачественные и доброкачественные ткани печени. Как было описано ранее [16, 17], были разделены клетки основной паренхимы печени и гепатоциты, чтобы получить фракцию непаренхимных клеток печени, которая содержит LSC. Вкратце, каждый образец злокачественной и доброкачественной ткани печени промывали гипотоническим солевым раствором и равным объемом среды DMEM, дополненной 5%-ным раствором антибиотиков и противогрибковых средств. Затем каждый образец ткани измельчали и подвергали перевариванию коллагеназой III типа, чтобы получить по отдельности клеточную суспензию злокачественных и доброкачественных тканей печени. Каждую клеточную суспензию пропускали через 100 мкм сито и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Каждый ресуспендированный образец центрифугировали при 50 g в течение 1 мин 3 раза. Затем, конечный супернатант наслаивали на смола Ficoll-Paque («Biowest», Франция) и центри-

фугировали в течение 20 мин при 800 g, чтобы получить фракцию стволовых клеток печени, локализованную в среднем слое (рис. 1).

Культивирование клеток печени и их изучение под микроскопом. Фракции паренхимных и непаренхимных клеток печени, которые содержали LSC, культивировали в среде DMEM, содержащей глутамин и неэссенциальные аминокислоты и дополненной по 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (b-FGF – basic fibroblast growth factor) и эпидермального фактора роста (EGF – epidermal growth factor) («Biowest Inc.», Франция). Культуры клеток выдерживали при 37 °C в увлажненном инкубаторе в смеси из 95% воздуха и 5% CO₂. Морфологию клеток изучали на микроскопе с инвертированной фазой Olympus®-СКХ41 («Olympus», Япония).

Анализ мутаций гена *C-kit* с помощью секвенирования ДНК. Геномную ДНК из клеток печени получали с помощью набора QIAamp DNA Purification Kit («Qiagen», Германия). Определение последовательностей ДНК проводили с помощью специфических праймеров следующим образом: 1-я пара праймеров *C-Kit* (расположена в экзоне 9): 5'-TGACATGGTCAATGTTGGAA-3' (прямой) и 5'-AGCCAGGGCTTTTGT-TTCT-3' (обратный); 2-я пара праймеров *C-Kit* (расположена в экзоне 11): 5'-CAGGTAACCATTTAT-3' (прямой) и 5'-GTTATGTGTACC-CAAAAAGG-3' (обратный), метод секвенирования ДНК на основе обрыва цепи с использованием красителей с помощью набора для секвенирования Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США) и ДНК-анализатора 3500 Genetic DNA Analyzers («Applied Biosystems», США). Для картирования полученных ридов относительно всех известных генов из базы данных NCBI и определения референсного гена *C-kit* человека использовали программу BLAST. NG_007456.1 был выбран в качестве референсного гена благодаря наивысшему значению счета (score) при сравнении нуклеотидных последовательностей [18]. Определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в мутированных генах проводили путем их сравнения с идентифицированной референсной последовательностью гена *C-kit* с использованием программ NovoSNP [19] и BioEdit [20].

Определение структуры мутантного белка *C-Kit*. Сравнение структур референсного белка и мутированных последовательностей проводили с помощью метода моделирования по гомологии с использованием программы Molecular Operating Environment tool [21]. Модели структуры исходного белка и мутированного белка налагали друг на друга и показывали места аминокислотных замен.

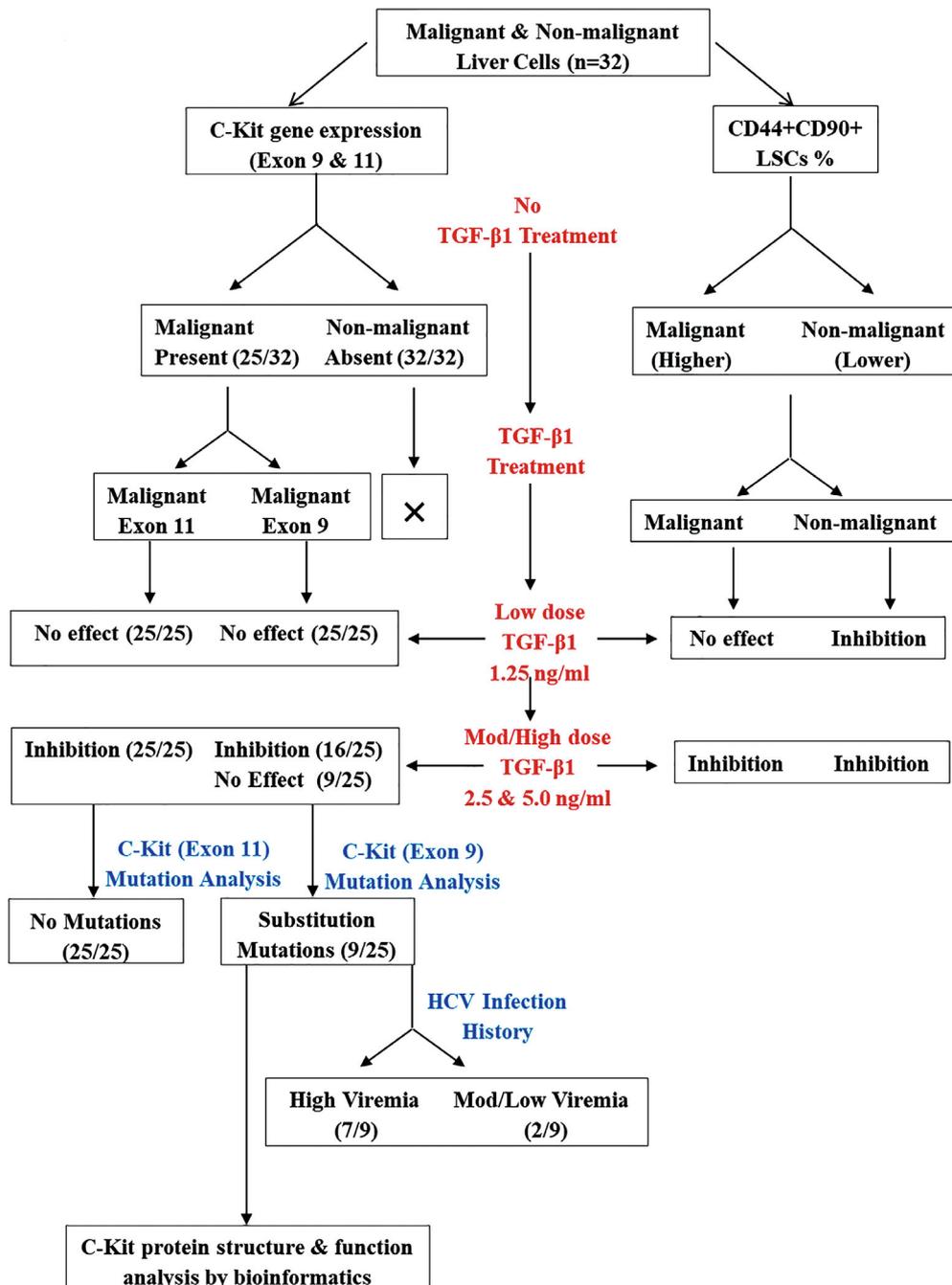


Рис. 1. План проведения исследования.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

кислотных замен. Новый мутантный аминокислотный остаток представлен на модели из шариков и палочек (ball and sticks representation) красным цветом, в то время как исходный аминокислотный остаток показан синим цветом.

Определение функций мутантного белка C-Kit. Для предсказания эффекта аминокислотной замены на функцию белка, использовали программ-

ный пакет SIFT [22]. Предсказания производили на основе подсчета степени консервативности аминокислотных остатков при сравнении близкородственных аминокислотных последовательностей с помощью программы PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool). Значение отсечки (cut-off) для вероятности произведения замены, ко-

торая была использована для обозначения влияния замены на функцию, было равно 0,05. Анализ функций белка проводили с использованием InterPro веб-портала, который классифицирует белки в виде семейств и предсказывает домены и значимые сайты [23, 24]. В нем находятся сигнатуры белков, собранные от различных баз данных, что может помочь в определении функций белков и изменений, возникающих в белках в результате мутаций

Обработка клеток трансформирующим фактором роста бета1. Рекombинантный TGF- β 1 человека («Koma Biotech Inc.», Южная Корея) в количестве 1,25, 2,5 и 5 нг/мл инкубировали с первичной культурой злокачественных и доброкачественных клеток печени в течение 24 ч. Затем клетки печени собирали с использованием 0,25%-ного раствора трипсина в ЭДТА для проведения цитометрии клеток и ОТ-ПЦР.

Проточная цитофлуориметрия клеток. Характеристику LSC проводили с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter Epics XL-Flow Cytometer («Beckman Coulter, Inc.», США) с использованием меченых фикоэритрином мышиных моноклональных антител против CD44 человека и меченых FITC мышиных моноклональных антител против CD90 человека («BD Biosciences», США) согласно инструкциям производителя (смотри ниже).

Определение уровня экспрессии гена *C-Kit* (экзоны 9 и 11) в клетках печени с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (reverse-transcriptase (RT)-PCR). Препараты общей РНК получали путем экстракции РНК из злокачественных и доброкачественных клеток с использованием набора SV-total RNA Isolation System («Promega», США) в соответствии с инструкциями производителя. Определение количества РНК проводили на спектрофотометре Nanodrop-2000 («Thermo Scientific», США). кДНК первой цепи на основе РНК получали с помощью набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR, ОТ-ПЦР), в качестве матриц использовали кДНК первой цепи. Все процедуры амплификации ПЦР выполняли на термоциклере Eppendorf Mastercycler («Eppendorf», Германия) с использованием ДНК-полимеразы Taq («Promega», США) в буфере и растворе Mg^{2+} , поставленных производителем. Отжиг производили в диапазоне температур 58–61 °С. Были использованы следующие специфические праймеры: 3-я пара праймеров *C-Kit* (расположена в экзоне 9): 5'-CTGGAGCTTTTCGGGAAGGTT-3' (прямой) и 5'-GGTGTGGGGATGGATTTGCT-3'

(обратный), ожидаемый размер продукта 300 п.н. и 4-я пара праймеров *C-Kit* (расположена в экзоне 11): 5'-AGCAAATCCATCCCCACACC-3' (прямой) и 5'-TGGAGCATGCCATTACGAG-3' (обратный), ожидаемый размер продукта 269 п.н.; и β -актин: 5'-AAAGGGTGTAAACG-CAACTAA-3' (прямой) и 5'-GGACCTGACTGACTACCTCA-3' (обратный), ожидаемый размер продукта 612 п.н. Продукты ПЦР разделяли с помощью гель-электрофореза в агарозе и визуализировали с помощью транс-иллюминатора в ультрафиолете и видимом свете.

Обнаружение HCV с использованием ПЦР в реальном времени: титр вируса гепатита С определяли у всех больных с помощью набора Anatolia Genework («Anatolia», Турция) и прибора DPrime Real Time Thermal cycler («ДНК-технология», Россия).

Статистическая обработка полученных результатов. Чтобы определить % относительного изменения переменных величин, рассчитывали относительную величину процента изменений: относительная величина процента изменений = [(после обработки – до обработки)/до обработки] \times 100. Непрерывно измеряемые значения представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD). Сравнение данных между парными группами проводили при использовании повторяющихся измерений с помощью программы ANOVA. После этого, попарные сравнения проводили с использованием критерия наименьших достоверных различий Фишера (Fisher's Least Significant Difference). Значение величины $p < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное. Все статистические анализы проводились при использовании программного обеспечения SPSS version 15 («SPSS Inc.», США.)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о больных гепатоцеллюлярной карциномой. Лабораторные анализы показали повышенную функцию печени и содержание альфа-фетопротейна (AFP – α -fetoprotein), в то время как значения гематологических тестов были низкими (табл. 1 и 2). Из 32 больных с НСС, 20 больных были в различной степени инфицированы вирусом гепатита С. У 10 из них наблюдалась вирусемия низкой степени, 3 больных были диагностированы с умеренной вирусемией и у 7 больных была установлена высокая вирусемия. Все принявшие участие в данном исследовании больные с НСС до проведения частичной гепатектомии не проходили химиотерапию. Только инфицированные вирусом гепатита С больные

Таблица 1. Пол, возраст, диагноз, патологические, гематологические и радиологические данные больных с гепатоцеллюлярной карциномой

Число случаев	<i>n</i> = 32	
Мужчины	62,5% (<i>n</i> = 20)	
Женщины	37,5% (<i>n</i> = 12)	
Возраст (лет)	58,8 ± 7,04	
Диагноз	гепатоцеллюлярная карцинома	
Степень развития опухоли	I степень тяжести	25% (<i>n</i> = 8)
	II степень тяжести	75% (<i>n</i> = 24)
	US, CT & MRI	– цирротическая печень с очаговыми поражениями различных размеров; – большая масса с общим некрозом и агрессивные диспластические узлы; – тромб главного PV; – увеличенная селезенка; – асциты.

US – УЗИ; CT – компьютерная томография; MRI – магнитно-резонансная томография.

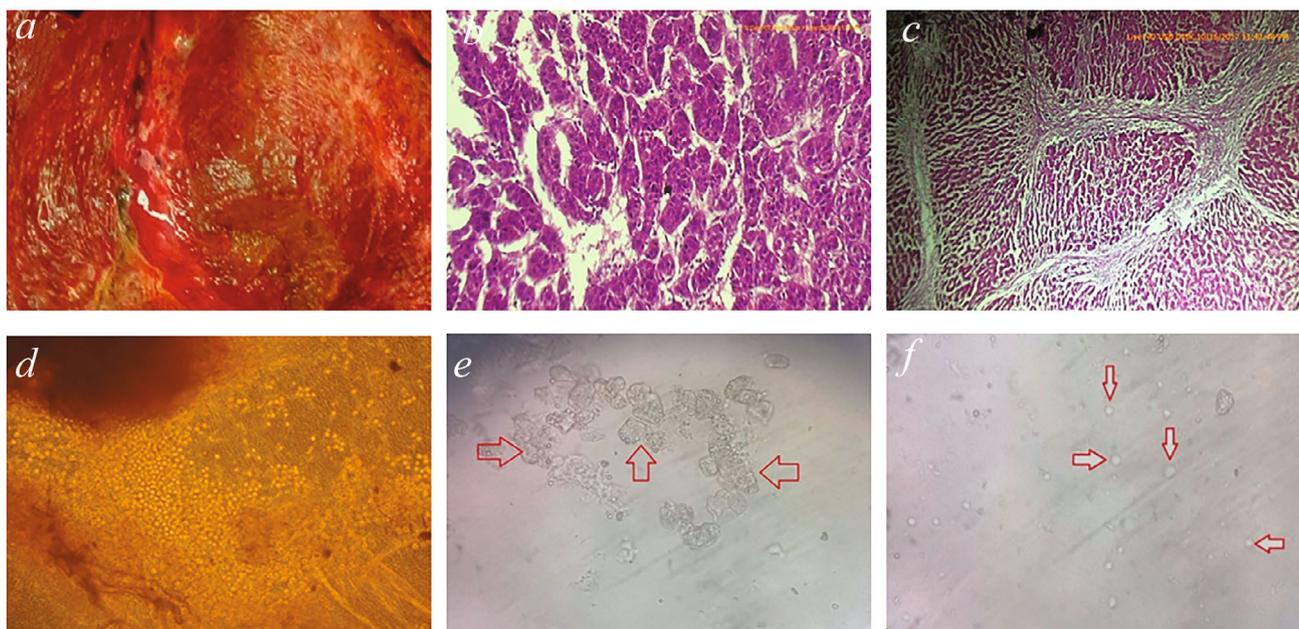


Рис. 2. *a* – Изображение целой, вырезанной опухоли печени, содержащей злокачественную и доброкачественную ткани. *b* – Гистопатологическое изображение злокачественной опухоли печени. Опухоль состоит из трабекул и нескольких гроздевидных образований злокачественных гепатоцитов, для которых характерно центральное гиперхроматичное ядро и обильная эозинофильная цитоплазма. Эти трабекулы отделены друг от друга тонкой фиброваскулярной стромой. *c* – Гистопатологическое изображение цирротической ткани печени с диффузными нарушениями нормальной структуры печени (утрата нормальных взаимоотношений центра и частей). Есть соединяющая волокнистая перемычка с образованием паренхиматозных узлов из регенерирующих гепатоцитов. *d* – Изображение, полученное с помощью инвертированного микроскопа, демонстрирующее первичный эксплантат печени, из которого высвобождаются различные печеночные и непеченочные клетки. *e* – Изображение, полученное с помощью инвертированного микроскопа, демонстрирующее гепатоцит (клетка паренхимы печени) в виде многоугольной клетки большого размера в 1-ый день культивирования; увеличение $\times 1000$. *f* – Изображение, полученное с помощью инвертированного микроскопа, демонстрирующее непаренхиматозные клетки печени округлой и овальной формы маленького размера в 1-ый день культивирования; увеличение $\times 1000$. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

получали комбинированную противовирусную терапию в виде пегилированного интерферона α и рибавирина и в разной степени реагировали на прием этих препаратов, прежде чем у них была диагностирована НСС (табл. 3).

Культура клеток печени. Все вырезанные части печени (рис. 2, *a*) содержали кусочки злокачественной и доброкачественной ткани, что было также подтверждено гистопатологическими методами (рис. 2, *b* и *c*). Клетки печени выделяли из злокачественной и доброкачественной тканей печени и далее их культивировали (рис. 2, *d*). Гепатоциты имели форму больших многоугольников (рис. 2, *e*), в то время как непаренхимные

клетки (NPCs – non-parenchymal cells), в число которых входят также LSC, – меньше и округлой формы (рис. 2, *f*).

Более высокое содержание популяции CD44⁺90⁺ LSC среди злокачественных клеток печени по сравнению с доброкачественными клетками печени. Принято считать, что прогрессирование гепатоцеллюлярной карциномы обусловлено CSC, которые способны к самообновлению и бесконечному размножению [25]. В настоящей работе с помощью проточного цитометра нами была определена доля LSC среди клеток печени, полученных в результате дезагрегации доброкачественной и злокачественной тканей. Для про-

Таблица 2. Функции печени, гематологические тесты, опухолевый маркер, вирусные маркеры больных с гепатоцеллюлярной карциномой

Лабораторные исследования	Показатели	Среднее значение \pm SD	Контрольные значения
Тесты определения функций печени	аланинаминотрансфераза (ед./л)	35,25 \pm 13,59	До 40 ед./л
	аспартатаминотрансфераза ед./л)	54,91 \pm 12,99	До 40 ед./л
	общий билирубин (мг/дл)	1,91 \pm 1,49	До 1,0 мг/дл
	прямой билирубин (мг/дл)	0,78 \pm 0,55	До 0,2 мг/дл
	альбумин (г/дл)	3,25 \pm 0,44	3,5-5,5 г/дл
	щелочная фосфатаза (ед./л)	116 \pm 50,68	До 180 ед./л
	ГГТ (ед./л)	75,3 \pm 53,6	12-32 ед./л
Гематологические тесты	гемоглобин (г/дл)	10,5 \pm 2,0	12,5-14,5 г/дл
	лейкоциты (10^3 /мкл)	4,1 \pm 2,1	4-11 $\times 10^3$
	тромбоциты (10^3 /мкл)	98 \pm 43	150-450 $\times 10^3$
Опухолевый маркер	АФП (нг/мл)	177 \pm 130	10 нг/мл

Таблица 3. Степень виремии при вирусном гепатите и режим приема противовирусных препаратов больных гепатоцеллюлярной карциномой*

Тип вирусного гепатита	Степень виремии	(Среднее значение \pm SD) IU/мл	Контрольные значения	Противовирусный режим*
Non-HBV/Non-HCV (<i>n</i> = 12)	нет	–	не определены	none
HBV/HCV (<i>n</i> = 0)	нет	–	не определены	none
HBV-положительный (<i>n</i> = 0)	нет	–	не определены	none
HCV-положительный (<i>n</i> = 20)	низкая § (<i>n</i> = 10)	70,000 \pm 110	не определены	респондер
	умеренная † (<i>n</i> = 3)	450,000 \pm 100,000		респондер
	высокая # (<i>n</i> = 7)	1.5,000,000 \pm 190,000		нереспондер

* Все обследованные больные с гепатоцеллюлярной карциномой (*n* = 32) не проходили химиотерапию до проведения частичной гепатэктомии. Все HCV-положительные больные (*n* = 20) получали пегилированный интерферон и рибавирин до того момента, когда у них диагностировали гепатоцеллюлярную карциному.

§ Низкая степень виремии: 16–200,000 IU/мл.

† Умеренная виремия: 200,000–1,000,000 IU/мл.

Высокая виремия: >1,000,000 IU/мл.

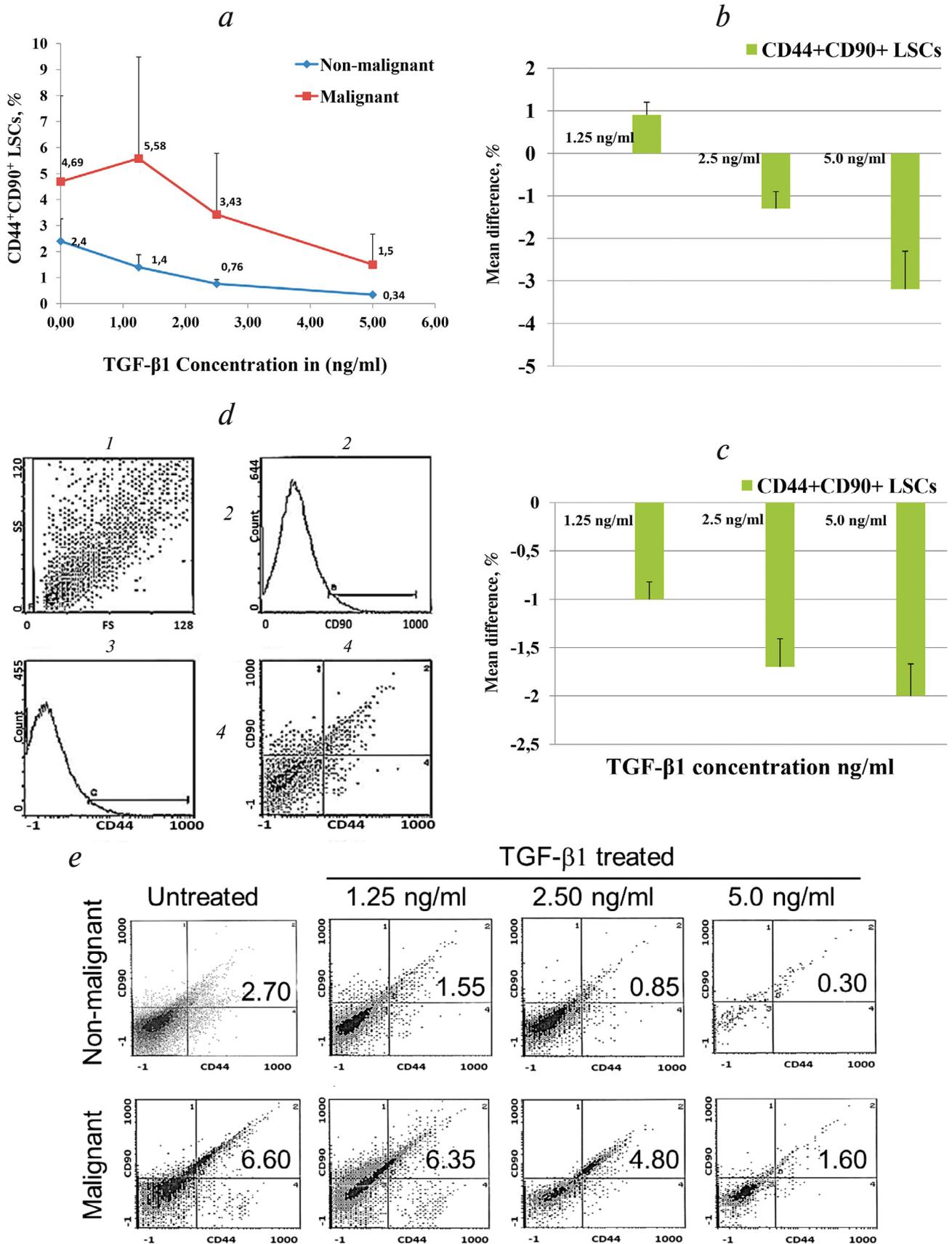


Рис. 3 (см. подпись на стр. 1197).

Таблица 4. Сравнение с помощью метода проточной цитометрии экспрессии печеночных стволовых клеток CD44⁺CD90⁺ (LSCs) до и после их обработки *in vitro* повышающимися дозами TGF- β 1 в клетках печени, происходящих из доброкачественной и злокачественной тканей

Источник ткани	Клетки необработанной печени	Клетки печени, обработанные TGF- β 1			
		1,25 нг/мл	2,50 нг/мл	5,0 нг/мл	Значение <i>p</i>
CD44 ⁺ CD90 ⁺ LSCs из доброкачественной ткани (%)	2,4 ± 0,9	1,4 ± 0,5	0,76 ± 0,16	0,34 ± 0,06	0,001*
CD44 ⁺ CD90 ⁺ LSCs из злокачественной ткани (%)	4,69 ± 3,3	5,58 ± 4	3,43 ± 2,4	1,5 ± 1,2	0,019*

* Различия статистически достоверны при $p < 0,05$.

ведения более точной идентификации стволовых клеток печени нами были выбраны клетки печени, экспрессировавшие два общих маркера стволовых клеток, CD44 и CD90, которые обычно экспрессируются почти во всех LSC, но в различной степени в зависимости от здоровой или поврежденной печени [26]. Стволовые клетки печени пролиферируют в ответ на различные повреждения печени в процессе регенерации, который зависит от типа повреждения печени и тяжести прогрессирования болезни [27]. Нами было показано, что процент CD44⁺CD90⁺ LSC среди злокачественных клеток печени была в 2 раза выше, чем в доброкачественных клетках печени (рис. 3, *f–c*, табл. 4 и 5). Таким образом, повышение количества стволовых клеток в злокачественных тканях печени может быть ассоциировано с образованием опухолевой ткани.

Различные ответы популяций CD44⁺90⁺ LSC из доброкачественных и злокачественных тканей на обработку TGF- β 1. Выявлена ассоциация между aberrантным супрессорным эффектом TGF- β 1 и размножением стволовых клеток печени при возникновении гепатоцеллюлярной карциномы у больных с CLD [12, 13]. Чтобы

изучить влияние TGF- β 1 на LSCs, клетки печени получали из злокачественных и доброкачественных участков и обрабатывали возрастающими количествами TGF- β 1. Было показано, что эти стволовые клетки по-разному отвечают на действие TGF- β 1. Доля стволовых клеток CD44⁺CD90⁺ из доброкачественной ткани печени последовательно снижалась в ответ на обработку различными дозами TGF- β 1 (1,25, 2,5 и 5,0 нг/мл) (рис. 3, *a*, табл. 4). В то же время процент CD44⁺CD90⁺ среди злокачественных клеток печени снижался только при обработке клеточек умеренными и высокими дозами TGF- β 1 (2,5 и 5,0 нг/мл) (рис. 3, *a*, табл. 5). Показаны результаты попарного сравнения CD44⁺CD90⁺ LSC, полученных из доброкачественной и злокачественной тканей, обработанных возрастающими количествами TGF- β , и необработанных клеток (рис. 3, *b* и *c*, табл. 4 и 5). Полученные данные были проанализированы с помощью программ SPSS v.20 и Prism. Результаты репрезентативного анализа CD44⁺CD90⁺ LSC в доброкачественной и злокачественной тканях с помощью метода проточной цитометрии показаны на рис. 3, *d* и *e*. Нами было установлено, что в отличие от стволовых клеток, полученных из

Рис. 3 (см. стр. 1196). *a* – Влияние обработки *in vitro* возрастающими количествами (1,25, 2,5 и 5,0 нг/мл) трансформирующего фактора роста TGF- β 1 на стволовые клетки печени CD44⁺CD90⁺, выделенные из образцов злокачественной и доброкачественной тканей печени. Средние значения различий влияния возрастающих концентраций TGF- β на стволовые клетки CD44⁺CD90⁺, происходящие из доброкачественной (*b*) и злокачественной ткани (*c*) в сравнении с необработанными клетками. *d* – Этапы характеризации стволовых клеток печени с помощью метода проточной цитометрии с использованием клеточных маркеров CD90 и CD44: 1 – мертвые клетки и обломки клеток удаляли с помощью метода исключения прямого рассеивания и бокового рассеивания (FSc/SSc – Forward scatter/Side scatter) точечных участков образцов на основании размера и зернистости клеток, 2 – гистограмма CD44-PE, использованная для идентификации печеночных стволовых клеток CD44⁺, 3 – гистограмма CD90-ФИТЦ, использованная для идентификации печеночных стволовых клеток CD90⁺ и 4 – контурная диаграмма CD90-ФИТЦ и CD44-ФЭ для идентификации печеночных стволовых клеток CD44⁺CD90⁺. Верхний правый квадрант (область D2) считался содержащим популяцию CD44⁺CD90⁺ LSC. *e* – Репрезентативные цитограммы, показывающие стволовые клетки CD44⁺CD90⁺ из образцов доброкачественной и злокачественной ткани в отсутствии или в присутствии увеличивающихся концентраций TGF- β 1. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Таблица 5. Парные сравнения CD44⁺CD90⁺ LSCs из доброкачественных и злокачественных тканей, обработанных возрастающими концентрациями TGF-β1, в сравнении с необработанными клетками

	Клетки печени, обработанные TGF-β1		
	1,25 нг/мл	2,50 нг/мл	5,0 нг/мл
CD44 ⁺ CD90 ⁺ LSCs из доброкачественной ткани (%)	1,0 (0,5; 1,4) <i>p</i> = 0,003*	1,7 (0,9; 2,4) <i>p</i> = 0,002*	2,0 (1,2; 2,9) <i>p</i> = 0,001*
CD44 ⁺ CD90 ⁺ LSCs из злокачественной ткани (%)	-0,9 (-1,7; -0,06) <i>p</i> = 0,04*	1,3 (0,18; 2,3) <i>p</i> = 0,03*	3,2 (0,8; 5,6) <i>p</i> = 0,02*

† Средние значения различий с 95% CI в круглых скобках. Статистически достоверные значения *p* при $\alpha < 0,05$.

доброкачественной ткани печени, низкие дозы TGF-β (1,25 нг/мл) не вызвали ингибирование CD44⁺CD90⁺ LSC, полученных из злокачественной ткани. С другой стороны, умеренные и высокие дозы (2,5 и 5,0 нг/мл) этого фактора роста вызвали ингибирование CD44⁺CD90⁺ LSC, как подвергающихся, так и не подвергающихся злокачественной трансформации. Этот результат согласуется с тем, что низкий уровень TGF-β1, который часто наблюдается при хронических заболеваниях печени, не приводит к подавлению стволовых клеток, что, в конечном итоге, повышает риск развития гепатоцеллюлярной карциномы [13].

Экспрессия гена *C-Kit* (экзоны 9 и 11) в доброкачественных клетках печени, не подвергающихся злокачественной трансформации, отличается от экспрессии этого гена в злокачественных клетках. Известно, что рецептор *C-Kit* и его лиганд, SCF,

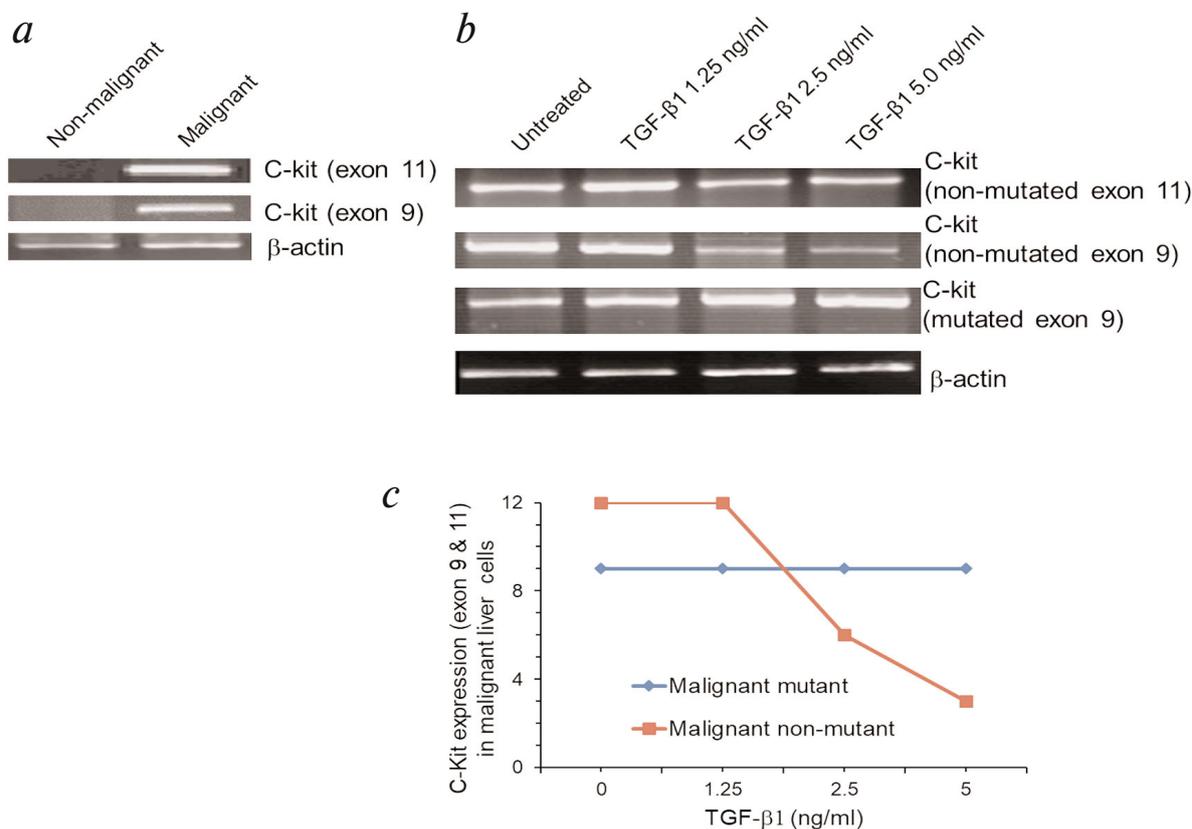


Рис. 4. *a* – Репрезентативная полуколичественная ПЦР гена *C-Kit* (экзоны 11 и 9 соответственно). Оба экзона гена *C-Kit* (экзон 11 и 9) экспрессируются в злокачественных клетках печени. В то же время в доброкачественных клетках их экспрессия не наблюдается. *b* – Экспрессия гена *C-Kit* (экзон 11, 9 соответственно) после обработки возрастающими количествами TGF-β1 (1,25, 2,5 и 5,0 нг/мл). TGF-β1 ингибировал экспрессию экзона 11 гена *C-Kit* в, в то время как экспрессия экзона 9 не изменялась. *c* – График, демонстрирующий изменения экспрессии гена *C-Kit* (экзон 11, 9) в ответ на обработку злокачественных клеток печени трансформирующим фактором роста TGF-β1. Экспрессия не подвергшегося мутациям гена *C-Kit* (экзоны 9 и 11) ингибировалась умеренными и высокими дозами и не ингибировалась низкими дозами, в то время как экспрессия мутантного по экзону 9 гена *C-Kit* не изменялась при изученных в данной работе дозах TGF-β1. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Таблица 6. Типы мутаций гена *C-Kit*, наблюдаемые в экзонах 11 и 9

Ген <i>C-kit</i>	Мутация
Экзон 11	нет мутаций $n = 25$ из 25
Экзон 9	нет мутаций $n = 16$ из 25 мутации, приводящие к замене $n = 9$ из 25

участвуют в пути передачи сигнала, ассоциированного с выживанием, пролиферацией и дифференцировкой стволовых клеток, играя роль в развитии НСС [28]. Однако в то же время было показано, что гепатоциты, находящиеся в предраковом состоянии (т.е., гепатоциты, находящиеся в хронических узлах) экспрессируют ген *C-kit*, и эта аномалия может быть обусловлена гетерогенностью различных видов гепатоцеллюлярной карциномы [29]. Нами была изучена экспрессия гена *C-Kit* (экзоны 9 и 11) в клетках печени, полученных из доброкачественной или злокачественной тканей. С использованием 1-ой пары праймеров, локализованной в экзоне 9, было показано, что экспрессия гена *C-Kit* (экзон 9) была положительной в 28 случаях из 32 (87,5%) в доброкачественных клетках и в 25 из 32 случаев (78,1%) в клетках, изолированных из злокачественной ткани. Аналогичные результаты были получены в случае гена *C-Kit* (экзон 11) с использованием 2-ой пары праймеров, локализованной в экзоне 11. С другой стороны, в доброкачественных клетках не было обнаруже-

но экспрессии *C-Kit* (экзон 9 и 11) с использованием обеих пар праймеров (рис. 4).

Обнаружение мутаций в гене *C-Kit* (экзон 9) в отдельных злокачественных клетках печени. Мутации в гене *C-Kit* наблюдаются при различных типах рака человека. Считается, что они могут способствовать росту и прогрессированию опухолей, и они выявляются при самых различных случаях рака человека. Поэтому есть мнение, что они могут способствовать росту и прогрессии опухолевых клеток [30]. Эти мутации могут затрагивать самые различные экзоны, но часто мутации происходят в экзонах 11 и 9 [31]. В связи с тем, что в клетках из доброкачественной ткани печени не наблюдалась экспрессия *C-Kit*, мы изучили мутации в гене *C-Kit*, в экзонах 9 и 11 в клетках печени, выделенных из злокачественных тканей. Во всех злокачественных клетках не было обнаружено ни одной мутации в экзоне 11 (данные не приведены). С другой стороны, 9 различных мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности белка (substitution mutations) были обнаружены в экзоне 9, в 9 из 25 популяций клеток печени, изолированных из злокачественных тканей (табл. 6 и 7; рис. 5).

Мутированный ген *C-Kit* кодировал белок с нарушенной структурой и функцией. Принято считать, что мутации в гене *C-Kit* способствуют канцерогенезу [32, 33]. В частности, было показано, что мутации, приводящие к аминокислотным заменам, вызывают изменения в структуре белка. Кроме того, при многих типах рака, таких как рак кишечника [34] и рак простаты [35, 36], мутации в гене *C-Kit* приводят к образованию обрезанных форм белка *C-Kit*. Поэтому, необходимо рассмотреть взаимосвязь между мутация-

Таблица 7. Влияние аминокислотных замен, ассоциированных с экзоном 9, на структуру и функцию белка

No.	Положение нуклеотида		Тип мутации в экзоне 9	Влияние мутации на структуру и функцию белка	
	Контроль	Исследуемый образец		Структура белка	Функция белка
1	92	176	G > T	G31 > V	вредная
2	232	36	C > A	молчащая мутация	(нет влияния)
3	167	123	A > C	N56 > T	вредная
4	210	80	A > T	укорочение белка	вредная
5	211	79	G > A	укорочение белка	вредная
6	171	126	T > A	D57 > E	(допустимая)
7	91	201	G > T	G31 > L	вредная
8	92	200	G > T	G31 > L	вредная
9	171	121	T > C	молчащая мутация	(нет эффекта)

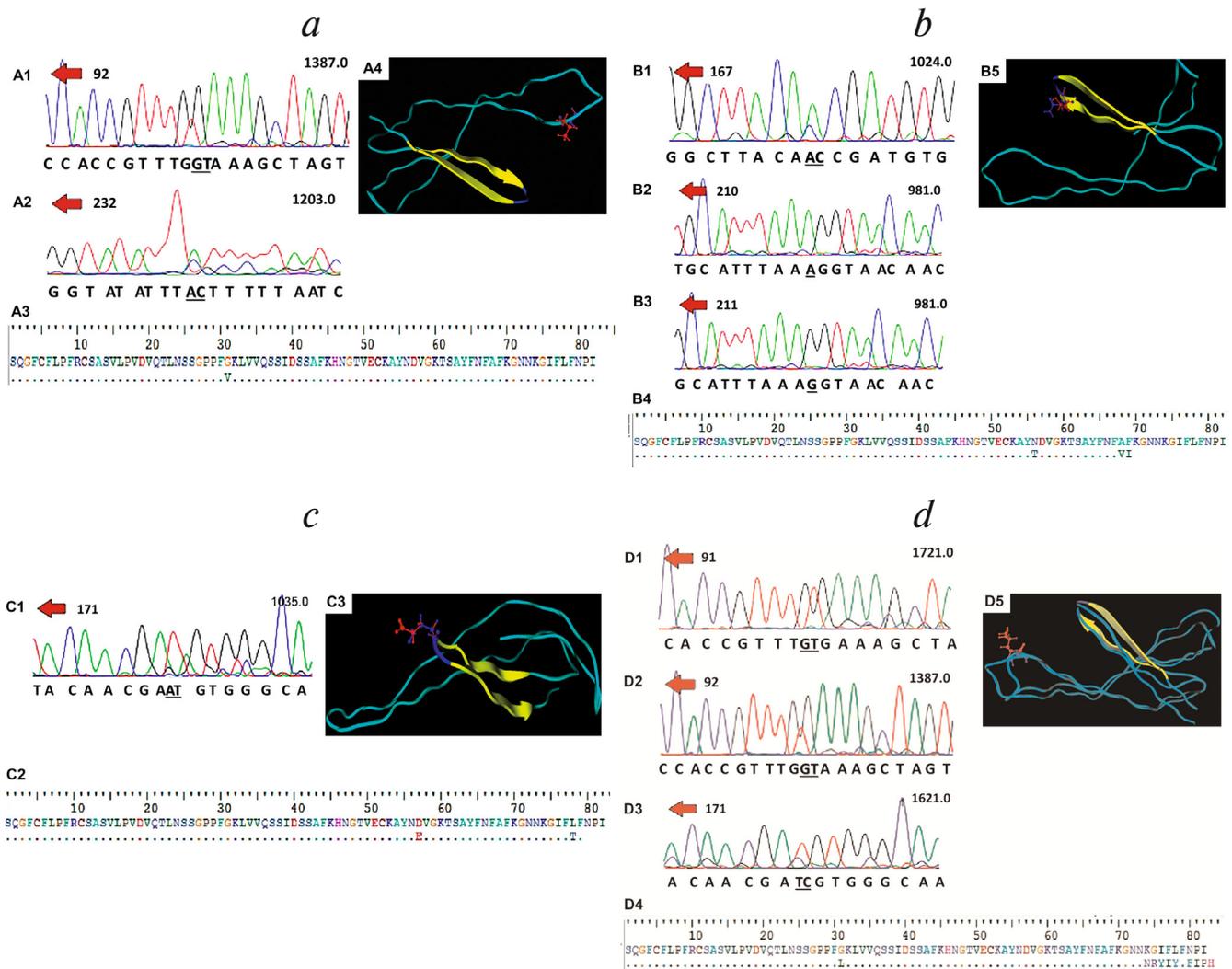


Рис. 5. Типы мутаций в гене *C-Kit* (экзон 9) и ассоциированные аминокислотные замены, и нарушение структуры белка. Мутация 1: наблюдалась в положении 92 референсного гена, где гуанин (G) в положении 176 был заменен на тимин (T) (счет 8) (A1). Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка из-за замены остатка глицина (G) в положении 31 на остаток валина (V) (A3, A4). Мутация 2: наблюдалась в положении 232 референсного гена, в котором цитозин (C) был заменен на аденин (A) в положении 36 в образце (счет 15) (A2). Это молчащая мутация, которая не вызывает изменений структуры и функции белка. Мутация 3: наблюдалась в положении 167 референсного гена, в котором аденин (A) был заменен на цитозин (C) в положении 123 в образце (счет 8) (B1). Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка из-за замены остатка аспарагина (N) в положении 56 на остаток треонина (T) (B3, B4). Мутация 4: наблюдалась в положении 210 референсного гена, в котором аденин (A) был заменен на тимин (T) в положении 80 в образце (счет 15) (B2). Эта мутация приводила к укорочению белка. Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка (B4, B5). Мутация 5: наблюдалась в положении 211 референсного гена, в котором гуанин (G) был заменен на аденин (A) в положении 79 в образце (счет 8) (B3). Эта мутация приводила к укорочению белка. Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка (B4, B5). Мутация 6: наблюдалась в положении 171 референсного гена, в котором тимин (T) был заменен на аденин (A) в положении 126 в образце (счет 9) (C1). Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка из-за замены остатка аспарагиновой кислоты (D) в положении 57 на остаток глутаминовой кислоты (E) (C2, C3). Мутация 7: наблюдалась в положении 91 референсного гена, в котором гуанин (G) был заменен на тимин (T) в положении 201 в образце (счет 14) (D1). Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка из-за замены остатка глицина (G) в положении 31 на остаток лейцина (L) (D4, D5). Мутация 8: наблюдалась в положении 92 референсного гена, в котором гуанин (G) был заменен на тимин (T) в положении 200 в образце (счет 8) (D2). Эта мутация оказывала отрицательное воздействие на структуру и функцию белка из-за замены остатка глицина (G) в положении 31 на остаток лейцина (L) (D4, D5). Мутация 9: наблюдалась в положении 171 референсного гена, в котором тимин (T) был заменен на цитозин (C) в положении 121 в образце (счет 9) (D3). Это молчащая мутация, которая не вызывает изменений структуры и функции белка.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ми и экспрессией этого гена [37]. В нашей работе было показано, что большинство мутаций, обнаруженных в гене *C-Kit*, приводят к изменению аминокислотной последовательности и нарушению нативной структуры и функций белка. Впервые нами с помощью программного пакета SIFT было показано, что из 9 мутаций в экзоне 9, обнаруженных в 9 образцах злокачественной ткани печени, 2 мутации приводили к укорочению аминокислотной последовательности, а 5 мутаций вызывали появление аминокислотных замен. Кроме того, были обнаружены 2 молчащие мутации и 1 мутация с заменой остатка аспарагиновой кислоты на остаток глутаминовой кислоты (D57>E). Эти мутации не приводили к заметным структурным изменениям и вызывали только положительный эффект в отношении функционирования белка. Все выявленные мутации наблюдали на поверхности белковой молекулы, на концах функциональных участков («рук») белка, и их расположение критично для нормального функционирования белка, вызывая нежелательные последствия (табл. 7 и рис. 5).

Кроме того, ранее во многих работах было показано, что мутации, приводящие к усилению функций (gain-of-function mutations) гена *C-Kit*, широко распространены в природе и имеют отношение к прогрессированию рака [35]. Проведенный нами функциональный анализ с использованием программы InterProScan показал, что все изученные последовательности гена *C-Kit* образуют семейство гомологичных генов с белковой сигнатурой, сходной с фолдом, характерным для иммуноглобулин-подобных белков. Удивительно, но при этом мутированные последовательности не совпадают с рецептором тирозинкиназы и рецептором фактора роста тучных/стволовых клеток. Необходимые дальнейшие исследования, чтобы выяснить являются ли такие мутантные белки *C-Kit* с аномальной функцией результатом или же драйвером гепатоцеллюлярной карциномы на поздних стадиях заболеваний печени.

Различные ответы экспрессии мутантного и немутантного экзона 9 *C-Kit* на воздействие TGF- β 1. Перекрестные связи между TGF- β и wnt/ β -катенин-, WNK1-зависимыми сигнальными путями и др., оказывающими влияние на биологию стволовых клеток, хорошо известны [38, 39]. Однако мало что известно о перекрестных связях между TGF- β и *C-Kit* при развитии гепатоцеллюлярной карциномы. Поэтому, нами был изучен эффект экспрессии гена *C-Kit* (экзоны 9 и 11) в злокачественных клетках печени при лечении возрастающими количествами TGF- β 1. Нами было установлено, что уровень экспрес-

сии *C-Kit* (экзоны 9 и 11) во всех злокачественных клетках (25 из 25) остается без изменений при обработке клеток низкими дозами TGF- β 1 (1,25 нг/мл). Интересно, что высокие и умеренные дозы TGF- β 1 (2,5 нг/мл и 5 нг/мл) были способны подавлять экспрессию экзонов 9 и 11 гена *C-Kit* во всех злокачественных клетках печени, но не в клетках с мутантным экзоном 9, которые оставались без изменений. Эти результаты, во-первых, подтверждают неэффективность низких концентраций TGF- β 1. Во-вторых, они предполагают, что мутации в гене *C-Kit* (экзон 9) могут быть вероятной причиной отсутствия чувствительности этих клеток к действию даже высоких доз TGF- β 1 (рис. 4, *b* и *c*).

Корреляция между мутациями в гене *C-Kit*, тяжестью инфицирования вирусом гепатита С и устойчивостью к противовирусной терапии больных с НСС. Показано, что у больных, инфицированных вирусом гепатита С, в стволовых клетках печени наблюдается повышенная экспрессия гена *C-Kit*. В особенности, это касается больных, у которых развивается гепатоцеллюлярная карцинома [40, 41]. В то же время, мало данных о том, есть ли у таких больных корреляция между мутациями в гене *C-Kit* и тяжестью инфицирования вирусом гепатита С. Из 32 больных НСС, которые приняли участие в этом исследовании, 20 человек были в различной степени тяжести инфицированы вирусом гепатита С: 10 с низкой вирусемией, 3 с умеренной и 7 больных с высокой вирусемией.

Следует отметить, что в нашей работе было показано, что в 7 из 9 случаев НСС с наблюдаемыми мутациями в гене *C-Kit* больные являются положительными по вирусу гепатита С, и у них наблюдается вирусемия высокой степени. В то же время в образцах, взятых у больных, также инфицированных вирусом гепатита С, но с низким или умеренным содержанием вируса в крови, мутации в гене *C-Kit* выявлены не были. Также, у 7 таких больных была выявлена устойчивость к действию противовирусной терапии с пэгилированным интерфероном α и рибавирином. Полученные нами результаты согласуются с результатами Du et al. и Li et al., которые показали, что длительное применение некоторых типов противовирусных лекарств против HBV и HCV может способствовать возникновению мутаций, повышающих устойчивость к действию лекарств и способствовать канцерогенезу [42, 43]. По нашим сведениям, это первая работа, в которой показана корреляция между мутациями в гене *C-Kit* и высокой вирусемией у больных с НСС, инфицированных HCV, с одной стороны, и устойчивостью к лечению с помощью пэгилированного интерферона α и рибавирина, с другой стороны.

C-Kit представляет собой потенциальную терапевтическую мишень у больных с раком кишечника и некоторых больных с гепатоцеллюлярной карциномой [44, 45], и эти пациенты могут отвечать на действие TGF- β 1. В нашей работе было показано, что экспрессия C-Kit в клетках печени, полученных от больных с НСС и высокой степенью вирусемии, которые также не поддаются лечению пэгиллированным интерфероном α и рибавирином, остается без изменений в присутствии умеренных и высоких доз TGF- β 1. Поэтому, эти больные могут не реагировать на действие TGF- β 1, что делает возможными развитие у них рака печени. В целом, чтобы улучшить лечение больных с хроническими заболеваниями печени и предотвратить развитие НСС, необходимо изучать мутации гена *C-Kit*, особенно, у больных гепатоцеллюлярной карциномой, ассоциированной с HCV, которые не поддаются лечению противовирусными препаратами и в крови у которых наблюдается высокая концентрация этого вируса.

По нашим сведениям, настоящая работа является первым сообщением о том, что больные, инфицированные HCV с высокой степенью вирусемии, которые невосприимчивы к лечению противовирусными препаратами, наиболее вероятно имеют мутации в гене *C-Kit* и предрасположены к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Наша работа подчеркивает необходимость изучения мутаций в гене *C-Kit* у хронических больных, инфицированных HCV с устойчивостью к противовирусной терапии для предотвращения развития гепатоцеллюлярной карциномы и улучшения качества лечения этих больных.

Финансирование. Выполнение данной работы было частично поддержано грантом

CA203420 National Institute of Health, предоставленным НА.

Благодарности. Эта работа была поддержана национальным онкологическим институтом Каирского университета, Египет. Авторы хотели бы выразить благодарность всем сотрудникам отдела биологии рака за проявленное внимание и оказанную помощь.

Вклад авторов. Все авторы принимали участие в подготовке этой статьи. MZ собрал полученные данные. TS, HA, WC прочли текст статьи. AI и AA запланировали и выполнили работу. MH, ZF и MH обобщили полученные результаты и доработали статью. AH внес значительный вклад в разработку плана исследовательской работы, ее проведение и доработал содержание этой статьи. Все авторы прочли и одобрили конечный вариант этой статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В соответствии с этическими нормами, для проведения исследований было получено разрешение от экспертного совета (IRB – Institution Review Board) национального онкологического института Каирского университета (#IRB00004025). Выполнение работы осуществлялось в соответствии с местными и международными положениями и руководствами для взятия образцов и проведения исследований. Это исследование подтвердило положения Хельсинкской декларации.

Информированное согласие. Все больные были информированы об исследовательском характере этой работы, и все они предоставили свое информированное согласие в письменном виде. Все больные, которые приняли участие в выполнении данной работы, предоставили информированное согласие.

Дополнительная информация. Полученные в ходе проведения настоящей работы данные и результаты их анализа доступны на сайте <http://www.chemcomp.com>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Friedman, S.L. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis, *Gastroenterology*, **134**, 1655–1669, doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.003.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 69–90, doi: 10.3322/caac.20107.
- Rao, S., Zaidi, S., Banerjee, J., Jogunoori, W., Sebastian, R., Mishra, B., Nguyen, B.N., Wu, R.C., White, J., Deng, C., Amdur, R., Li, S., and Mishra, L. (2017) Transforming growth factor- β in liver cancer stem cells and regeneration, *Hepatol. Commun.*, **1**, 477–493, doi: 10.1002/hep4.1062.
- Dragu, D.L., Necula, L.G., Bleotu, C., Diaconu, C.C., and Chivu-Economescu, M. (2015). Therapies targeting cancer stem cells: current trends and future challenges, *World J. Stem Cells*, **7**, 1185–1201, doi: 10.4252/wjsc.v7.i9.1185.
- Xu, L.B., and Liu, C. (2014) Role of liver stem cells in hepatocarcinogenesis, *World J. Stem Cells*, **6**, 579–590, doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.579.
- Qiu, L., Li, H., Fu, S., Chen, X., and Lu, L. (2018) Surface markers of liver cancer stem cells and innovative targeted-therapy strategies for HCC, *Oncol. Lett.*, **15**, 2039–2048.7, doi: 10.3892/ol.2017.7568.
- Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S.S., Hayashi, T., Kondo, M., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y.,

- Takamura, H., Wang, X.W., and Kaneko, S. (2013) Discrete nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ cancer stem cells in hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **57**, 1484–1497, doi: 10.1002/hep.26168.
8. Yamashita, T., Ji, J., Budhu, A., Forgues, M., Yang, W., Wang, H.Y., Jia, H., Ye, Q., Qin, L.X., Wauthier, E., Reid, L.M., Minato, H., Honda, M., Kaneko, S., Tang, Z.Y., and Wang, X.W. (2009) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features, *Gastroenterology*, **136**, 1012–1024, doi: 10.1053/j.gastro.2008.
 9. Ding, W., Mouzaki, M., You, H., Laird, J.C., Mato, J., Lu, S.C., and Rountree, C.B. (2009) CD133⁺ liver cancer stem cells from methionine adenosyl transferase 1A-deficient mice demonstrate resistance to transforming growth factor (TGF)-beta-induced apoptosis, *Hepatology*, **49**, 1277–1286, doi: 10.1002/hep.22743.
 10. Xiang, Y., Yang, T., Pang, B.Y., Zhu, Y., and Liu, Y.N. (2016) The progress and prospects of putative biomarkers for liver cancer stem cells in hepatocellular carcinoma, *Stem Cells Int.*, **2016**:7614971, doi: 10.1155/2016/7614971.
 11. Amin, R., and Mishra, L. (2008) Liver stem cells and TGF-β in hepatic carcinogenesis, *Gastrointestinal Cancer Res.*, **2**, S27–S30.
 12. Majumdar, A., Curley, S.A., Wu, X., Brown, P., Hwang, J.P., Shetty, K., Yao, Z.X., He, A.R., Li, S., Katz, L., Farci, P., and Mishra, L. (2012) Hepatic stem cells and transforming growth factor-β in hepatocellular carcinoma, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 530–538, doi: 10.1038/nrgastro.2012.114.
 13. Ren, X., Hu, B., and Colletti, L. (2008) Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy, *Surgery*, **143**, 790–802, doi: 10.1016/j.surg.2008.03.021.
 14. Chen, L., Shen, R., Ye, Y., Pu, X.A., Liu, X., Duan, W., Wen, J., Zimmerer, J., Wang, Y., Liu, Y., Lasky, L.C., Heerema, N.A., Perrotti, D., Ozato, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Yates, A.J., Carson, W.E. 3rd, Lin, H., Barsky, S.H., and Gao, J.X. (2007) Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation, *PLoS One*, **2**, e293.
 15. Rojas, A., Zhang, P., Wang, Y., Foo, W.C., Munoz, N.M., Xiao, L., Wang, J., Gores, G.J., Hung, M.C., and Blechacz, B. (2016) A positive TGF-β/C-KIT feedback loop drives tumor progression in advanced primary liver cancer, *Neoplasia*, **18**, 371–386, doi: 10.1016/j.neo.2016.04.002.
 16. Wang, M.K., Sun, H.Q., Xiang, Y.C., Jiang, F., Su, Y.P., and Zou, Z.M. (2012) Different roles of TGF-β in the multi-lineage differentiation of stem cells, *World J. Stem Cells*, **4**, 28–34.
 17. Anzano, M.A., Roberts, A.B., Smith, J.M., Sporn, M.B., and De Larco, J.E. (1983) Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6264–6268.
 18. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410.
 19. Weckx, S., Del-Favero, J., Rademakers, R., Claes, L., Cruts, M., De-Jonghe, P., Van Broeckhoven, C., and De Rijk, P. (2005) novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery, *Genome Res.*, **15**, 436–442.
 20. Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in *Nucleic Acids Symposium Series*, Oxford University Press, No **41**, pp. 95–98.
 21. Chemical Computing Group: the molecular operating environment (MOE), v. 2010. 10. Chemical Computing Group, Montreal, QC, Canada, 2010, URL: <http://www.chemcomp.com>.
 22. Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat. Protoc.*, **4**, 1073–1081, doi: 10.1038/nprot.2009.86.
 23. Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.Y., Lopez, R., and Hunter, S. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification, *Bioinformatics*, **30**, 1236–1240, doi: 10.1093/bioinformatics/btu031.
 24. Finn, R.D., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Bateman, A., Bork, P., et al. (2017) InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D190–D199, doi: 10.1093/nar/gkw1107.
 25. Oishi, N., and Wang, X.W. (2011) Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells, *Int. J. Biol. Sci.*, **7**, 517–535.
 26. Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., and Miyajima, A. (2011) Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms, *J. Biochem.*, **149**, 231–239, doi: 10.1093/jb/mvr001.
 27. Irfan, A., and Ahmed, I. (2015) Could stem cell therapy be the cure in liver cirrhosis? *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **5**, 142–146, doi: 10.1016/j.jceh.2014.03.042.
 28. Yashpal, N.K., Li, J., Wang, R. (2004) Characterization of C-Kit and nestin expression during Islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas, *Dev. Dyn.*, **229**, 813–825.
 29. Mansuroglu, T., Baumhoer, D., Dudas, J., Haller, F., Cameron, S., Lorf, T., Fuzesi, L., and Ramadori, G. (2009) Expression of stem cell factor receptor C-Kit in human nontumoral and tumoral hepatic cells, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **21**, 1206–1211, doi: 10.1097/MEG.0b013e328317f4ef.
 30. Abbaspour Babaei, M., Kamalidehghan, B., Saleem, M., Huri, H.Z., and Ahmadipour, F. (2016) Receptor tyrosine kinase (C-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells, *Drug Des. Devel. Ther.*, **10**, 2443–2459, doi: 10.2147/DDDT.S89114.
 31. Hussain, S.R., Naqvi, H., Ahmed, F., Babu, S.G., Bansal, C., and Mahdi, F. (2012) Identification of the C-Kit gene mutations in biopsy tissues of mammary gland carcinoma tumor, *J. Egypt. Natl. Cancer Institute*, **24**, 97–103.
 32. McDonnell, L.M., Kernohan, K.D., Boycott, K.M., and Sawyer, S.L. (2015) Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: two sides of the same coin, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, R60–R66, doi: 10.1093/hmg/ddv254.
 33. Lennartsson, J., and Ronnstrand, L. (2006) The stem cell factor receptor/C-Kit as a drug target in cancer, *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 561–571.
 34. Mostafa, M., El-Serafi, Abeer A., Bahnassy, M.D., Nasr, M., Ali, Salem M., Eid, Mahmoud M., Kamel, Nayera A., Abdel-Hamid, Abdel-Rahman, N., and Zekri, Ph.D. (2010) the prognostic value of C-Kit, K-ras codon 12, and p53 codon 72 mutations in Egyptian patients with stage II colorectal cancer, *Cancer*, **116**, 4954–4964.
 35. Cardoso, H.J., Figueira, M.I., and Socorro, S. (2017) The stem cell factor (SCF)/c-kit signaling in testis and prostate cancer, *J. Cell Commun. Signal.*, **11**, 297–307.
 36. Paronetto, M.P., Farini, D., Sammarco, I., Maturò, G., Vespasiani, G., Geremia, R., Rossi, P., and Sette, C. (2004) Expression of a truncated form of the C-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer, *Am. J. Pathol.*, **164**, 1243–1251.
 37. Bai, C.G., Liu, X.H., Xie, Q., Feng, F., and Ma, D.L. (2005) A novel gain of function mutant in C-Kit gene and

- its tumorigenesis in nude mice, *World J. Gastroenterol.*, **11**, 7104–7108.
38. Sun, Q., Guo, S., Wang, C.C., Sun, X., Wang, D., Xu, N., Jin, S.F., and Li, K.Z. (2015) Cross-talk between TGF- β /Smad pathway and Wnt/ β -catenin pathway in pathological scar formation, *In.t J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 7631–7639.
39. Lee, B.H., Chen, W., Stippec, S., and Cobb, M.H. (2007) Biological cross-talk between WNK1 and the transforming growth factor-Smad signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **282**, 17985–17996.
40. Tekin Koruk, S., Ozardali, I., Dincoglu, D., Guldur, M., and Calisir, C. (2012) Can the presence of C-Kit-positive hepatic progenitor cells in chronic hepatitis C have a role in the follow-up of the disease? *Erciyes Med. J.*, **34**, 44–49.
41. Kwon, Y.C., Bose S.K., Steele, R., Meyer, K., Di Bisceglie, A.M., Ray, R.B., and Ray, R. (2015) Promotion of cancer stem-like cell properties in hepatitis C virus-infected hepatocytes, *J. Virol.*, **89**, 11549–11556.
42. Du, Y., Su, T., Ding, Y., and Cao, G. (2012) Effects of antiviral therapy on the recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection or liver transplantation, *Hepat. Mon.*, **12**, e6031, doi: 10.5812/hepatmon.6031.
43. Li, L., Liu, W., Chen, Y.H., Fan, C.L., Dong, P.L., Wei, F.L., Li, B., Chen, D.X., and Ding, H.G. (2013) Antiviral drug resistance increases hepatocellular carcinoma: a prospective decompensated cirrhosis cohort study, *World J. Gastroenterol.*, **19**, 8373–81.
44. Shah, Y.M., and van den Brink, G.R. (2015) c-Kit as a novel potential therapeutic target in colorectal cancer, *Gastroenterology*, **149**, 534–537, doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.027.
45. Chung, C.Y., Yeh, K.T., Hsu, N.C., Chang, J.H., Lin, J.T., Horng, H.C., and Chang, C.S. (2005) Expression of *C-Kit* protooncogene in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.*, **217**, 231–236.

ROLE OF TGF- β 1 AND *C-Kit* MUTATIONS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PROGRESSION IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS: *in vitro* STUDY

M. E. El-Houseini¹, A. Ismail², A. A. Abdelaal², A. H. El-Habashy³,
Z. F. Abdallah¹, M. Z. Mohamed⁴, M. El-Hadidi⁵,
W. C. S. Cho⁶, H. Ahmed⁷, and T. A. Al-Shafie^{1,8*}

¹ Department of Cancer Biology, National Cancer Institute, Cairo University,
Cairo 11796, Egypt; e-mail: tamer.alshafie@pua.edu.eg

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo 11566, Egypt

³ Department of Pathology, National Cancer Institute, Cairo University, Cairo 11796, Egypt

⁴ Department of Medical Laboratory, Medical Center of Egyptian Railways, Cairo 11669, Egypt

⁵ Center of Informatics Science, Nile University, Giza 12525, Egypt

⁶ Department of Clinical Oncology, Queen Elizabeth Hospital, Kowloon, Hong Kong, China

⁷ GlycoMantra, Inc., Baltimore MD 21227, USA

⁸ Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Pharmacy and Drug Manufacturing,
Pharos University in Alexandria, Alexandria 21311, Egypt

Received March 19, 2019

Revised April 19, 2019

Accepted April 20, 2019

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a tumor-suppressing cytokine in normal and non-malignant conditions. Yet, in malignancy, TGF- β can exert opposite effects that cancer cells may exploit for their benefits. C-Kit plays a prominent role in stem cell activation and liver regeneration after injury. However, little is known about cross-talk between TGF- β and C-Kit and its role in hepatocellular carcinoma (HCC) progression. Here, we studied the effect of increasing doses of TGF- β 1 on CD44⁺CD90⁺ liver stem cells (LSCs) and *C-Kit* gene expression using malignant and adjacent non-malignant liver tissues excised from 32 HCC patients. Results showed that malignant LSCs percentage was 2.0-fold higher compared to their non-malignant counterparts. When treated with increasing doses of TGF- β 1, malignant and non-malignant LSCs were progressively suppressed, but low TGF- β 1 dose failed to suppress malignant LSCs. Moreover, *C-Kit* exons 9 and 11 were not expressed in non-malignant LSCs, in contrast to their malignant counterparts. Mutation analysis of *C-Kit* detected mutations in exon 9, but not in exon 11, in some malignant liver cells resulting in changes of amino acid sequence and in the deregulated protein structure and function. Interestingly, in malignant liver cells, mutated exon 9 was shown to be associated with high-level hepatitis C virus (HCV) viremia, and its expression was not suppressed by TGF- β 1 treatment at all doses. To our knowledge, this is the first report that the *C-Kit* gene is mutated in patients with HCC associated with high-level HCV viremia. Our study underscores the need to investigate TGF- β 1 level and *C-Kit* mutations in patients with chronic HCV for HCC prevention and better therapeutic management.

Keywords: HCC, chronic liver disease, TGF- β 1, liver stem cells, *C-Kit* mutation