



## The effect of retinoic acid on primary cultures of human pheochromocytoma cells

Ewa Wilczek<sup>1</sup>, Michał Mazurkiewicz<sup>1</sup>, Maciej Otto<sup>2</sup>, Dariusz Śladowski<sup>3</sup>, Barbara Górnicka<sup>1</sup>, Grzegorz M. Wilczyński<sup>4</sup>, Aleksander Wasiutyński<sup>1</sup>, Łukasz Koperski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical University, Warsaw

<sup>2</sup>Department of Vascular Surgery and Transplantology, Medical Academy Clinical Hospital, Warsaw

<sup>3</sup>Department of Transplantology and Central Tissue Bank, Center of Biostructure Medical University, Warsaw

<sup>4</sup>Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw

### Abstract

**Introduction:** Retinoic acid is a regulator of gene expression which, by binding to its nuclear receptor, determines the degree of differentiation in multiple cancer cell types. On the basis of this capability it was introduced, e.g. in the therapy of neuroblastoma. In cells derived from neural crest, such as neuroblastoma cells, retinoic acid initiates differentiation into neurons. This substance acts in a similar way on a rat pheochromocytoma cell line PC12.

The aim of our work was to examine the influence of retinoic acid on the phenotype of human pheochromocytoma cells in primary culture.

**Material and methods:** Observations were made on two primary cultures isolated from human pheochromocytoma. Cells were grown in RPMI1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum. Subsequently, the cultures were treated with 100 mMol retinoic acid for three-days.

An evaluation of the phenotype change was performed by estimating the expression levels of F-actin, MAP-2 protein, and chromogranin, with the use of a confocal microscopy.

**Results:** The introduction of retinoic acid into the culture caused an increase in the F-actin level and its redistribution in the form of stress fibers. Simultaneously, the cells changed their shape, generating more processes. No change was

detected in the expression level of neuroendocrine markers: MAP-2 and chromogranin.

**Conclusions:** Retinoic acid appears to have an influence on some phenotype parameters of human pheochromocytoma cells. Further work is needed to determine the molecular mechanisms of this process, and to evaluate thoroughly the benefits of introducing retinoic acid into therapy of pheochromocytoma tumors.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 57 (supl. A): A82–A87)

**Key words:** retinoic acid, pheochromocytoma, primary culture



Ewa Wilczek, MSc  
Department of Pathology, Medical University, Warsaw  
Pawińskiego 7, 02-106 Warszawa  
tel./fax: 022 822 70 53  
e-mail: ewawilczek@wp.pl



## Wpływ kwasu retinowego na komórki *pheochromocytoma*

Ewa Wilczek<sup>1</sup>, Michał Mazurkiewicz<sup>1</sup>, Maciej Otto<sup>2</sup>, Dariusz Śladowski<sup>3</sup>, Barbara Górnicka<sup>1</sup>, Grzegorz M. Wilczyński<sup>4</sup>, Aleksander Wasiutyński<sup>1</sup>, Łukasz Koperski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Anatomii Patologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantologii, Akademia Medyczna, Warszawa

<sup>3</sup>Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna, Warszawa

<sup>4</sup>Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

### Streszczenie

**Wstęp:** Kwas retinowy jest regulatorem ekspresji genów, który działając poprzez receptor jądrowy, wpływa na stopień zróżnicowania wielu typów komórek nowotworowych. Właściwości te stały się podstawą zastosowania go w onkologii, m.in. w terapii *neuroblastoma*. W komórkach pochodzących z grzebienia nerwowego, takich jak komórki *neuroblastoma*, kwas retinowy uruchamia proces różnicowania w kierunku neuronów. Substancja ta działa w sposób zbliżony również na komórki szczurzej linii *pheochromocytoma* (PC12).

Celem pracy było zbadanie wpływu kwasu retinowego na cechy fenotypowe ludzkich komórek *pheochromocytoma* w warunkach hodowli pierwotnej.

**Materiał i metody:** Badania przeprowadzono na dwóch hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z ludzkich guzów *pheochromocytoma*. Komórki hodowano w pożywce RPMI1640 z dodatkiem 10-procentowej surowicy bydlęcej, a następnie poddane działaniu kwasu retinowego, w stężeniu 100 nM przez 3 dni. Oceny fenotypu dokonano poprzez badanie ekspresji F-aktyny, białka MAP-2 (*microtubule-associated protein-2*, marker neuronalny), i chromograniny (marker neuroendokryny), z detekcją przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

**Wyniki:** Działanie kwasem retinowym spowodowało zwiększenie zawartości F-aktyny i jej redystrybucję w formie

włókien naprężeniowych, co znalazło odzwierciedlenie w zmianie kształtu komórek, które utworzyły więcej wypustek. Nie stwierdzono zmian w poziomie ekspresji markerów neuroendokryny: MAP-2 i chromograniny.

**Wnioski:** Kwas retinowy prawdopodobnie wpływa na niektóre parametry fenotypowe ludzkich komórek *pheochromocytoma*. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmów molekularnych tego zjawiska oraz głębszej oceny perspektyw zastosowania kwasu retinowego w leczeniu guza chromochłonnego.

(*Endokrynol Pol* 2006; 57 (supl. A): A82–A87)

**Słowa kluczowe:** kwas retinowy, *pheochromocytoma*, hodowla pierwotna

mgr Ewa Wilczek  
Zakład Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej  
w Warszawie  
ul. Pawińskiego 7, 02-106 Warszawa  
tel./faks: 022 822 70 53  
e-mail: ewawilczek@wp.pl

Źródło finansowania: grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa  
Wyższego nr 3 P05B 097 24

### Wstęp

Kwas retinowy jest regulatorem rozwoju i różnicowania wielu typów komórek. Mechanizm, za pośrednictwem którego związek ten wpływa na komórki, wyjaśniono po wykryciu całej rodziny receptorów jądrowych, receptorów retinoidów, które regulują ekspresję wielu genów [1–5]. Receptory te występują również w komórkach dojrzałej i embrionalnej tkanki nerwowej. Wykazano między innymi, że kwas retinowy stymuluje wzrost wypustek nerwowych, reguluje ekspresję markerów neuronalnych, a także hamuje proliferację komórek *neuroblastoma* w warunkach hodowli komórkowej [6–11].

Właściwości te stały się podstawą zastosowania go w onkologii, m.in. w terapii *neuroblastoma*. Substancja ta działa w sposób zbliżony również na komórki wywodzące się z guza chromochłonnego (*pheochromocytoma*) szczurzej linii PC12 [12].

Celem pracy było zbadanie wpływu kwasu retinowego na cechy fenotypowe ludzkich komórek *pheochromocytoma* w warunkach hodowli pierwotnej.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na dwóch hodowlach pierwotnych wyprowadzonych z ludzkich guzów *pheochro-*

*mocytoma*. Pacjenci w sposób świadomy wyrazili zgodę na wykorzystanie tkanek do badań. Guzy przeznaczone do hodowli natychmiast po usunięciu były umieszczane w sterylnym podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 10-procentowej surowicy bydlęcej i 1% antybiotyków (GIBCO). Następnie, pofragmentowaną tkankę poddano działaniu kolagenazy typu II (GIBCO) i inkubowano w 37°C w atmosferze z 5-procentowym CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. Po trawieniu enzymatycznym rozproszone komórki przeniesiono do butelek hodowlanych i inkubowano do momentu otrzymania jednolitej hodowli. Identyfikację komórek chromochłonnych przeprowadzono metodą immunohistochemiczną z wykorzystaniem chromograniny (DAKO) oraz białka MAP-2 (Chemicon) jako markerów komórek neuroendokrynnych. Jako markera proliferacji użyto przeciwciała Ki67 (DAKO). Detekcję sygnału przeprowadzono metodą peroksydazową z zastosowaniem diaminobenzydyny jako chromogenu. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na komórkach pochodzących z 9–10 pasażu. Komórki przeznaczone do badań pod kątem procesu różnicowania przeniesiono na szkiełka typu Chamberslide (Nunc), a następnie hodowane w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10-procentowej surowicy bydlęcej oraz kwasu retinowego (Sigma) w stężeniu 100 nM przez 3 dni. Oceny fenotypu dokonano poprzez badanie ekspresji F-aktyny, białka MAP-2 i chromograniny. Detekcję MAP-2 i chromograniny przeprowadzono przy użyciu przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z fluorochromami: anty-mysie z Alexa488 (zielony) oraz anty-królicze z Alexa647 (bliński podczerwieni; oba z Molecular Probes), natomiast obecność F-aktyny oceniano na podstawie wiązania falloidyny z TRITC (fluorochrom czerwony; Sigma). Jądra komórkowe wyznakowano odczynnikiem DAPI (Vector). Analizę immunofluorescencyjną przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego TCS SP2 (Leica), wyposażonego w lasery Arg, GeNe oraz MaiTai IRFemto. Analizę zmian długości wypustek przeprowadzono za pomocą programu MultiScan. Statystykę przeprowadzono na podstawie testu Manna-Whitneya.

## Wyniki

W warunkach hodowli pierwotnej komórki obu linii miały kształty nieregularne lub podłużne, niekiedy z obecnością dość licznych, lecz krótkich wypustek. Wiązało się to ze słabym wykształceniem włókien naprężeniowych, znakowanych falloidyną (ryc. 1). Komórki wykazywały skąpą ekspresję markera neuronalnego MAP-2 oraz białka ziarnistości wydzielniczych chromograniny (ryc. 2, 3). W hodowli rzadko znajdowano figury po-

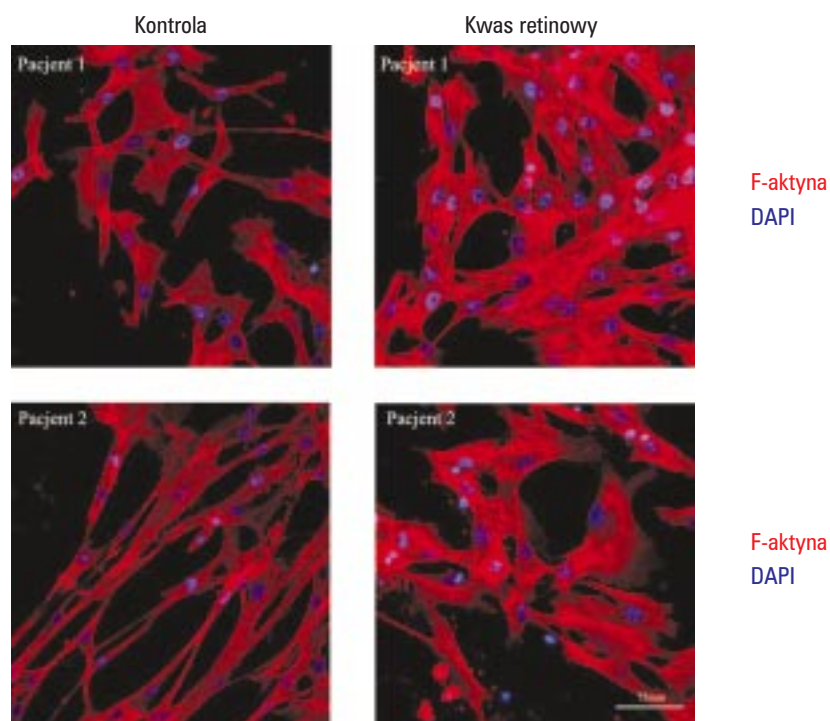
działu komórkowego, co potwierdzono barwieniem immunohistochemicznym z wykorzystaniem przeciwciała anty-Ki67 jako markera proliferacji (nie przedstawiono).

Traktowanie kwasem retinowym spowodowało zwiększenie zawartości F-aktyny i jej redystrybucję w formie włókien naprężeniowych. Znalazło to odzwierciedlenie w zmianie kształtu komórek, które utworzyły więcej dłuższych wypustek (ryc. 1). W przypadku pierwszego pacjenta przyrost długości wypustek był istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ; test Manna-Whitneya). U drugiego pacjenta również zaobserwowano podobną zmianę, jednak różnice nie były istotne statystycznie. Nie stwierdzono zmian w poziomie ekspresji markerów neuroendokrynnych: MAP-2 i chromograniny (ryc. 2, 3).

## Dyskusja

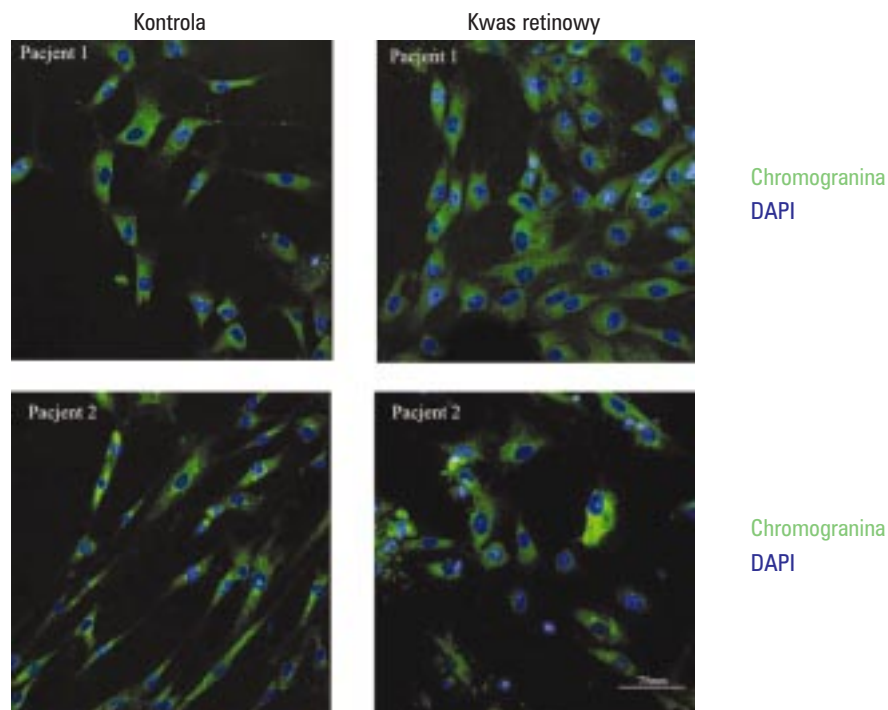
Guz chromochłonny jest wytwarzającym katecholaminy guzem wywodzącym się z istoty rdzennej nadnercza oraz zwojów współczulnych. Nie należy on do nowotworów częstych (częstość w populacji wynosi poniżej 0,5%), mimo to stanowi istotny problem kliniczny dla lekarzy wielu specjalności. *Pheochromocytoma* jest nowotworem składającym się z komórek o właściwościach neuroendokrynnych, gromadzących i wydzielających duże ilości amin katecholowych: adrenaliny i noradrenaliny. W niewielkiej liczbie przypadków guz może też wydzielać substancje zbliżone budową do hormonów peptydowych lub steroidowych (np. aldosteronu, somatostatyny, ACTH) [13]. Specyficzna czynność endokrynną sprawia, że dominującym elementem w obrazie klinicznym tego nowotworu jest znaczne, niekiedy zagrożające życiu nadciśnienie tętnicze. W większości przypadków, dzięki skutecznemu leczeniu chirurgicznemu, osiąga się trwałe wyleczenie. Jednak, w przypadkach złośliwych (w których powstają przerzuty odległe) rokowanie co do życia znacznie pogarsza się — odsetek 5-letnich przeżyć według różnych źródeł wynosi 20–45% [14, 15].

Przeprowadzone w ostatnich latach badania genetyczne w znacznym stopniu wyjaśniły molekularne podłoże powstawania guzów chromochłonnych. Okazało się, że w przypadkach guzów występujących sporadycznie i w zespołach dziedzicznych obecne są mutacje, które dotyczą: protoonkogenu *RET*, genów supresorowych *VHL* i *NF-1* oraz genów z rodziny *SDH* kodujących podjednostki kompleksu II mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (oksydoreduktazy bursztynianubichinon) [16–18]. Ponadto ustalono, że odsetek pacjentów z mutacjami dziedzicznymi jest znacznie wyższy, niż dotąd przyjmowano, i może sięgać nawet 20%.



**Rycina 1.** Barwienie immunofluorescencyjne na F-aktynę w komórkach hodowli pierwotnej wyprowadzonej z pheochromocytoma, z detekcją przy użyciu fluorochromu Alexa555 (czerwony); jądra komórkowe wyznakowane na niebiesko (DAPI)

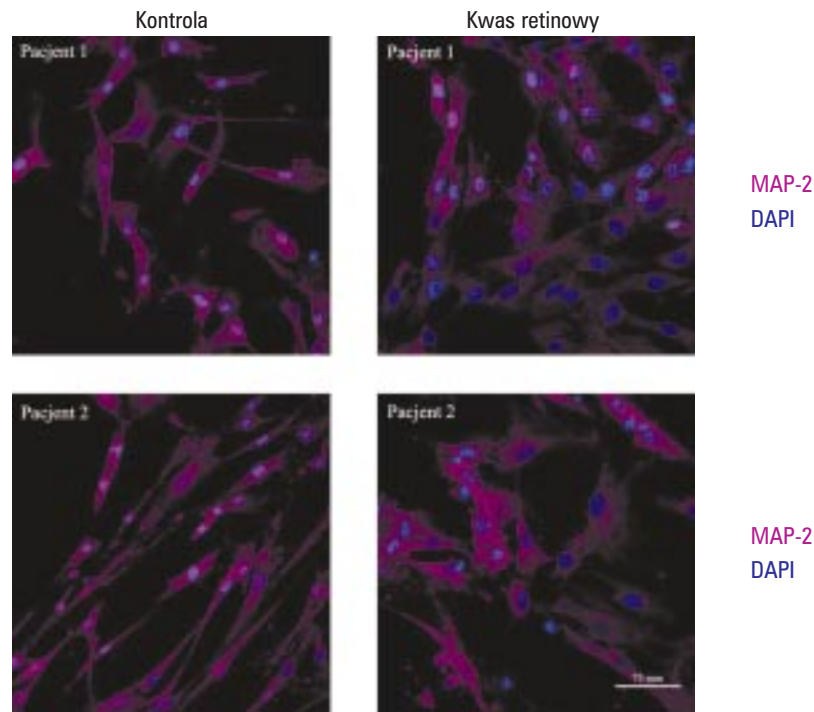
**Figure 1.** Immunofluorescence staining of F-actin in pheochromocytoma cell culture with the use of Alexa555 fluorochrome (red), additional nuclear staining using DAPI (blue)



**Rycina 2.** Barwienie immunofluorescencyjne na chromograninę w komórkach hodowli pierwotnej wyprowadzonej z pheochromocytoma, z detekcją przy użyciu fluorochromu Alexa488 (zielony); jądra komórkowe wyznakowane na niebiesko (DAPI)

**Figure 2.** Immunofluorescence staining of chromogranin in pheochromocytoma cell culture with use of Alexa488 fluorochrome (green), additional nuclear staining using DAPI (blue)





**Rycina 3.** Barwienie immunofluorescencyjne na MAP-2 w komórkach hodowli pierwotnej wyprowadzonej z pheochromocytoma z detekcją przy użyciu fluorochromu Alexa647 (bliski podczerwień, wizualizacja przy użyciu pseudokoloru — fioletowy); jądra komórkowe wyznakowane na niebiesko (DAPI)

**Figure 3.** Immunofluorescence staining of MAP-2 in pheochromocytoma cell culture with use of near-infrared Alexa647 fluorochrome (pseudocolored magenta), additional nuclear staining using DAPI (blue)

W niniejszej pracy zbadano, czy kwas retinowy, będący znanym modulatorem ekspresji genów w komórkach wywodzących się z grzebienia nerwowego, może wpływać na zmianę cech fenotypowych komórek pochodzących z guza chromochłonnego.

Modelem badawczym uczyniono komórki pochodzące z hodowli pierwotnych, wyprowadzone z *pheochromocytoma* usuniętych podczas operacji. Wiadomo, że kwas retinowy może indukować szlaki różnicowania w komórkach linii ustalonej PC12 (szczurzy model *pheochromocytoma*). W perspektywie ewentualnego zastosowania klinicznego, znacznie lepszym modelem wydają się być używane przez autorów niniejszej pracy komórki pochodzące z ludzkich guzów.

Wykazano, że kwas retinowy wpływa na zmianę cech fenotypowych ludzkiego *pheochromocytoma* w kierunku dojrzałych komórek neuroendokrynych. Objawiało się to przede wszystkim zmianą kształtu komórek — doszło do wzrostu liczby i długości wypustek. Ten efekt jest zgodny z obserwacjami innych autorów dotyczących wpływu kwasu retinowego na komórki *neuroblastoma* [6–11] i *teratocarcinoma* [19–22]. Podłożem molekularnym tych zmian było zwiększenie ilości F-aktyny i jej redystrybucja w postaci włókien naprężeniowych. Jednak szczegóły szlaku przekazywania sygnałów od receptora jądrowego do elementów cy-

toszkieletu pozostają w sferze spekulacji. Niewykluczone, że odbywa się to przez aktywację rodziny małych białek G: Rho, Rac i CDC42 [23–25].

Mimo że zaobserwowany efekt wydaje się wiązać z uruchomieniem procesu różnicowania *pheochromocytoma*, to jednak z pewnością nie jest ono pełne. Dojrzwienie komórek nerwowych/neuroendokrynych wiąże się bowiem z wieloma innymi zmianami. Dochodzi między innymi do reorganizacji układu mikrotubul, co wykazać można barwieniem immunocytochemicznym na obecność białka MAP2, a także następuje zwiększenie ekspresji markerów neuroendokrynych (i/lub synaptycznych), takich jak chromogranina i synaptofizyna. Żaden z tych parametrów nie uległ zmianie w układzie doświadczalnym. Z badań innych autorów wynika, że dalszą progresję procesu różnicowania można uzyskać poprzez aktywację szlaku cAMP/kinaza A [12]. Wpływ substancji działających na ten szlak wydaje się być ciekawym zagadnieniem wymagającym dalszych badań.

## Wnioski

Kwas retinowy wydaje się wpływać na niektóre parametry fenotypowe ludzkich komórek *pheochromocytoma*, co czyni go potencjalnym czynnikiem używanym w terapii tego nowotworu.

## Piśmiennictwo

1. Petkovich M, Brand NJ, Krust A i wsp. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330: 444–450.
2. Giguere V, Ong ES, Segui P i wsp. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 1987; 330: 624–629.
3. Brand N, Petkovich M, Krust A i wsp. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 1988; 332: 850–853.
4. Krust A, Kastner P, Petkovich M i wsp. A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 5310–5314.
5. Zelent A, Krust A, Petkovich M i wsp. Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* 1989; 339: 714–717.
6. Perez-Polo JR, Tiffany-Castiglioni E, Ziegler MG i wsp. Effect of nerve growth factor on catecholamine metabolism in a human neuroblastoma clone (SY5Y). *Dev Neurosci* 1982; 5: 418–423.
7. Sidell N, Altman A, Haussler MR i wsp. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1983; 148: 21–30.
8. Sidell N, Lucas CA, Kreutzberg GW. Regulation of acetylcholinesterase activity by retinoic acid in a human neuroblastoma cell line. *Exp Cell Res* 1984; 155: 305–309.
9. Sidell N, Sarafian T, Kelly M i wsp. Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma: a cell variant system showing two distinct responses. *Exp Cell Biol* 1986; 54: 287–300.
10. Shea TB, Fischer I, Sapirstein VS. Effect of retinoic acid on growth and morphological differentiation of mouse NB2a neuroblastoma cells in culture. *Brain Res* 1985; 353: 307–314.
11. Sugimoto T, Sawada T, Matsumura T i wsp. Morphological differentiation of human neuroblastoma cell lines by a new synthetic polypropenoic acid (E5166). *Cancer Res* 1987; 47: 5433–5438.
12. Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA. Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 1991; 113: 1173–1782.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Wyd. 7. Elsevier Saunders, Philadelphia 2005: 1219–1221.
14. Edstrom Elder E, Hjelm Skog AL, Hoog A i wsp. The management of benign and malignant pheochromocytoma and abdominal paraganglioma. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 278–283.
15. Eisenhofer G, Bornstein SR, Brouwers FM i wsp. Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 423–436.
16. Bryant J, Farmer J, Kessler LJ i wsp. Pheochromocytoma: the expanding genetic differential diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1196–1204.
17. Dluhy RG. Pheochromocytoma — death of an axiom. *N Engl J Med* 2004; 346: 1486–1488.
18. Neumann HP, Cybulla M, Shibata H i wsp. New genetic causes of pheochromocytoma: current concepts and the clinical relevance. *Keio J Med* 2005; 54: 15–21.
19. Scheibe RJ, Moeller-Runge I, Mueller WH. Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 21300–21305.
20. Jones-Villeneuve EM, Rudnicki MA, Harris JF i wsp. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 2271–2279.
21. Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 1984; 103: 285–293.
22. McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI i wsp. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci* 1988; 8: 1063–1073.
23. Bryan BA, Cai Y, Liu M. The Rho-family guanine nucleotide exchange factor GEFT enhances retinoic acid- and cAMP-induced neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 2006; 83: 1151–1159.
24. Pan J, Kao YL, Joshi S i wsp. Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2005; 93: 571–583.
25. Laplante I, Beliveau R, Paquin J. RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *J Neurobiol* 2004; 60: 289–307.