

高迁移率族蛋白B1激活NF- κ B/ α v β 3而增加A549细胞迁移与侵袭能力

朱建华, 胡娜, 赵岚, 黄炎

华中科技大学同济医学院附属武汉市第一医院临床免疫学实验室, 湖北 武汉 430022

[摘要] **背景与目的:** 高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)在多种肿瘤中高表达, 在肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。本研究旨在探讨HMGB1促进肺癌A549细胞侵袭的分子机制。**方法:** 肺癌A549细胞经HMGB1, NF- κ B抑制剂6-amino-4-quinazoline (QNZ) 或Bortezomib (Bort)处理后, 划痕实验和Transwell小室体外侵袭实验检测肿瘤细胞的迁移及侵袭能力; NF- κ B荧光素酶报告基因实验检测NF- κ B活性; Real-time RT-PCR和Western blot检测A549细胞NF- κ B和整合素 α v β 3表达。**结果:** HMGB1能增强A549细胞迁移和侵袭能力, 增加NF- κ Bp65蛋白的表达, 同时增强A549细胞NF- κ B活性, Real-time RT-PCR和Western blot检测结果发现HMGB1上调肿瘤细胞 α v β 3表达。NF- κ B抑制剂QNZ或Bort消除HMGB1促进A549细胞迁移及侵袭, 增强NF- κ B表达和活性以及 α v β 3表达的效应。**结论:** HMGB1通过激活A549细胞NF- κ B上调 α v β 3表达促进A549细胞迁移与侵袭行为。

[关键词] 高迁移率族蛋白B1; A549; 肿瘤转移; NF- κ B; α v β 3

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.02.005

中图分类号: R73-37 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)02-0105-07

HMGB1 activates NF- κ B/ α v β 3 to promote A549 cells migration and invasion ZHU Jianhua, HU Na, ZHAO Lan, HUANG Yan (Laboratory of Clinical Immunology, Wuhan No.1 Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan Hubei 430022, China)

Correspondence to: ZHU Jianhua E-mail: zhujh621@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** High mobility group 1 (HMGB1), frequently found to be over-expressed in many human tumors, plays an important role in tumor progress and metastasis. This study aimed to investigate the mechanism of HMGB1 promoting A549 cell metastasis. **Methods:** A549 cells were untreated or treated with HMGB1 (200 ng/mL) in absence or presence of NF- κ B inhibitors 6-amino-4-quinazoline (QNZ, 40 nmol/L) or Bortezomib (Bort, 20 nmol/L). Scratch assay and Transwell assay were performed to evaluate A549 cells migration and invasion ability. The activity of NF- κ B was examined by luciferase reporter assay. NF- κ Bp65 and α v β 3 expressions were detected by Real-time RT-PCR or Western blot. **Results:** HMGB1 increased A549 cells migration and invasion ability. HMGB1 enhanced NF- κ B protein level and NF- κ B activity in A549 cells. Real-time RT-PCR and Western blot showed that HMGB1 up-regulated α v β 3 expression in A549 cells. NF- κ B inhibitors QNZ or Bort reserved the promoting effects of HMGB1 on A549 cells migration and invasion, NF- κ B expression and activity as well as α v β 3 expression. **Conclusion:** HMGB1 promotes A549 cell migration and invasion through activating NF- κ B and up-regulating α v β 3.

[Key words] High mobility group box 1; A549; Invasion; NF- κ B; α v β 3

肺癌是近年来发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 肿瘤转移是导致死亡的主要原因, 肿瘤的侵袭转移与多种蛋白的表达有关。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)是细胞内一种含量丰富的非组蛋白染色体结合蛋白,

HMGB1在结直肠癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌及白血病等多种肿瘤中表达升高^[1]。人结肠癌细胞释放的HMGB1可抑制树突状细胞活性而抑制抗肿瘤免疫, 促进结肠癌淋巴结转移^[2]。研究表明, HMGB1介导金属基质蛋白酶9表达促进肿瘤细胞侵袭^[3]。尽管越来越多的研究发现HMGB1与肿瘤侵袭转移密切相关, 但其机制仍然

不明。本研究主要探讨HMGB1促进肺癌细胞迁移与侵袭的分子机制,证明HMGB1激活A549细胞NF- κ B,上调与侵袭相关蛋白的表达而促进肺癌侵袭,为临床治疗肺癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

人非小细胞肺癌A549细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉)。细胞培养所用试剂DMEM粉剂购自美国Gibco公司;特级胎牛血清购自杭州四季青公司;HMGB1购自美国Sigma-Aldrich公司;NF- κ B抑制剂6-氨基喹唑啉(6-amino-4-quinazoline, QNZ)购自德国Merck Biosciences公司;NF- κ B抑制剂硼替佐米(Bortezomib, Bort)购自美国Millennium Pharmaceuticals公司;Transwell小室购自美国BD公司;逆转录试剂盒购自美国Fermentas公司;羊抗人 α v和 β 3-抗、兔抗人NF- κ Bp65抗体、驴抗羊二抗及羊抗兔二抗均购自美国Santa Cruz公司;NF- κ B荧光素酶报告基因系统购自美国Invitrogen公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及细胞分组

将A549细胞接种在含10%胎牛血清的DMEM培养基,加入100 U/L青霉素和100 mg/L链霉素,置于37 $^{\circ}$ C,CO₂体积分数为5%的培养箱内培养。A549细胞经HMGB1(200 ng/mL)、NF- κ B抑制剂QNZ(40 nmol/L)或Bort(20 nmol/L)处理24 h,根据加入的试剂,分为以下6组:①正常对照组;②HMGB1组;③QNZ组;④HMGB1+QNZ组;⑤Bort组;⑥HMGB1+Bort组。

1.2.2 划痕实验

将对数生长期A549细胞接种于6孔板,细胞融合度达到70%以上时用Tip头在培养板划均匀直线。PBS洗去漂浮细胞,于37 $^{\circ}$ C,CO₂体积分数为5%条件下温育48 h,在显微镜下观察拍照,测量细胞迁移距离,并计算各组细胞的划痕修复率。划痕修复率(%)=[0 h划痕宽度-48 h

划痕宽度)/0 h划痕宽度] \times 100%。

1.2.3 肿瘤细胞侵袭迁移实验

预处理后的A549细胞,于37 $^{\circ}$ C,CO₂体积分数为5%的培养箱内培养24 h。Transwell小室用Matrigel包被(10 μ g/ μ L)的8 μ m孔径膜将其分隔为上、小室。下室加完全培养基600 μ L,将各组细胞用PBS洗涤后用无血清培养基悬浮,调整浓度至 1×10^6 /mL,加100 μ L至上室,于37 $^{\circ}$ C,CO₂体积分数为5%条件下温育8 h,取出小室,用PBS润湿,用棉签擦去微孔膜上层的细胞,PBS洗涤,将Transwell小室用4%甲醛溶液固定15 min,结晶紫染色,显微镜下观察,随机选取5个高倍视野(\times 200)进行细胞计数,并计算平均值,实验重复3次。

1.2.4 NF- κ B荧光素酶报告实验

预处理后的A549细胞,将 1×10^4 个对数生长期细胞接种至24孔板,融合度达70%~80%时,依照LipofectamineTM2000转染试剂的操作指南,转染质粒(pNF κ B-TA-Luc 0.4 μ g, pCMV β -gal 0.1 μ g),细胞继续培养24 h。彻底吸弃培养基,PBS洗涤2次,每孔加入100 μ L $1 \times$ Reporter Lysis缓冲液,冰上温育15 min,4 $^{\circ}$ C,10 000 \times g离心5 min,取细胞裂解上清液50 μ L加入96孔板,分别加入50 μ L Steady Glo reagent,冰上温育5 min。在激发波长430 nm,发射波长550 nm设置下,用HTS7000BioAssay Reader检测荧光素酶活性。取细胞裂解上清液50 μ L加入96孔板,加入50 μ L的 β -gal Assay 2 \times 缓冲液并混匀,37 $^{\circ}$ C温箱中温育,当溶液变为浅黄色时,加入150 μ L 1 mol/L碳酸钠中止反应。在吸收波长为405 nm处,使用HTS7000 Bio Assay Reader检测 β -gal值以标化转染效率。计算荧光素酶强度值/ β -gal值,得到相对荧光素酶活性,即相对发光值(relative light unit, RLU)。

1.2.5 Real-time RT-PCR检测 α v β 3的mRNA表达

预处理的A549细胞在6孔板中培养12 h后,提取各组细胞总RNA进行逆转录成cDNA,用SYBR Green I法,在Mx3000P实时定量荧光PCR仪进行荧光定量PCR检测 α v β 3的mRNA表达

水平, 每个样本做3个复孔, 设定阈值, 测定平均 Ct 值。

1.2.6 Western blot检测 $\alpha v \beta 3$ 和NF- κ B蛋白质水平

预处理后的A549细胞, 按照每 1.0×10^6 个细胞加入100 μ L RIPA蛋白裂解液, 混匀后置冰上20 min, 4 $^{\circ}$ C, 14 000 $\times g$ 离心30 min, 将上清液转入洁净EP管, 采用BCA蛋白定量分析检测蛋白含量。取20 μ g蛋白采用伯乐公司的8%~12%梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 电转移到0.45 μ m PVDF膜。将转有蛋白的PVDF膜置于5%脱脂奶粉-TBST室温中振荡封闭1 h, 然后置于适当稀释的一抗中4 $^{\circ}$ C温育过夜; 第2天室温用1 \times TBST洗涤PVDF膜, 将膜置于适当稀释的含辣根过氧化物酶标记二抗的1 \times TBST中, 室温温育1 h; 用1 \times TBST洗涤后, 进行化学发光操作, 伯乐公司ChemicDoc XRS系统曝光, 并用Quantity One imaging软件对曝光后条带进行分析。所用抗体为: 羊抗人 $\alpha v \beta 3$ 抗体, 兔抗人NF- κ Bp65抗体, β -actin (Santa Cruz Biotechnology; 1 : 1 000)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HMGB1及NF- κ B抑制剂对A549迁移能力的影响

划痕实验结果(图1), 与对照组, HMGB1+QNZ组和HMGB1+Bort组划痕修复率比较, HMGB1组细胞划痕修复率显著增加, 划痕区明显缩窄, 差异有统计学意义[(43.42 \pm 0.53)%、(42.79 \pm 0.37)%、(43.12 \pm 0.44)% vs (76.53 \pm 0.71)%], $P < 0.05$; 单独NF- κ B抑制剂QNZ组和Bort组划痕修复率分别为(41.89 \pm 0.25)%和(41.21 \pm 0.75)%, 与对照组比较, 划痕区无明显缩窄, 差异无统计学意义。以上结果表明HMGB1能促进A549细胞迁移,

NF- κ B抑制剂逆转HMGB1促A549细胞迁移效应。

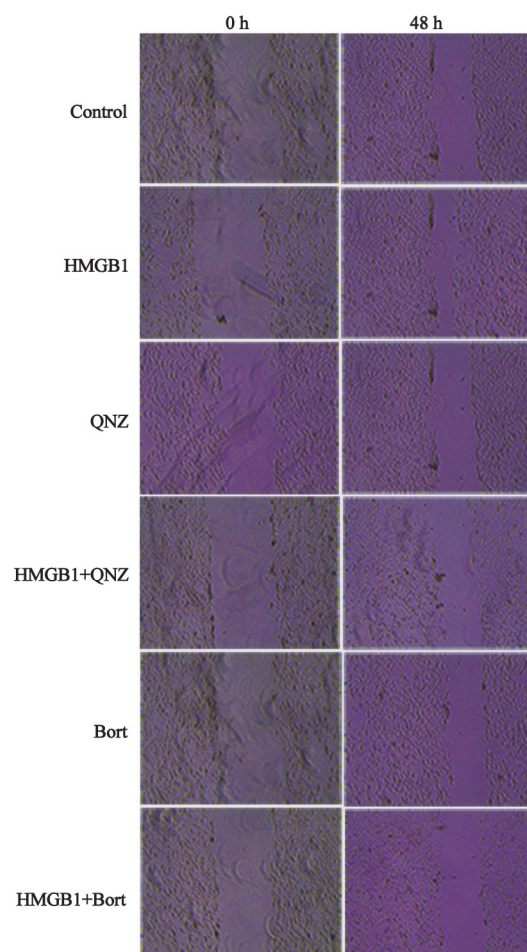


图1 HMGB1促进A549细胞迁移, NF- κ B抑制剂逆转HMGB1促A549细胞迁移效应

Fig. 1 HMGB1 promoted A549 cells migration and NF- κ B inhibitors reverse this effect

A549 cells were untreated or treated for 48 h with HMGB1 (200 ng/mL) in absence or presence of 6-amino-4-quinazoline (QNZ, 40 nmol/L), Bortezomib (Bort, 20 nmol/L). The migration ability was examined by scratch assay.

2.2 HMGB1及NF- κ B抑制剂对A549细胞体外侵袭能力的影响

体外侵袭实验结果(图2)显示, HMGB1组A549细胞穿过Matrigel人工基底膜的细胞数为(177 \pm 12), 与对照组(91 \pm 7)、HMGB1+QNZ组(45 \pm 3)和HMGB1+Bort组(53 \pm 7)比较, 明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); NF- κ B抑制剂QNZ组和Bort组细胞穿膜数分别为(39 \pm 6)和(42 \pm 5), 与对照组比较, 细胞穿膜数明显减

少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。此结果表明, HMGB1能增强A549细胞侵袭能力, 抑制NF- κ B

活性则抑制A549细胞侵袭且消除HMGB1促进A549细胞侵袭效应。

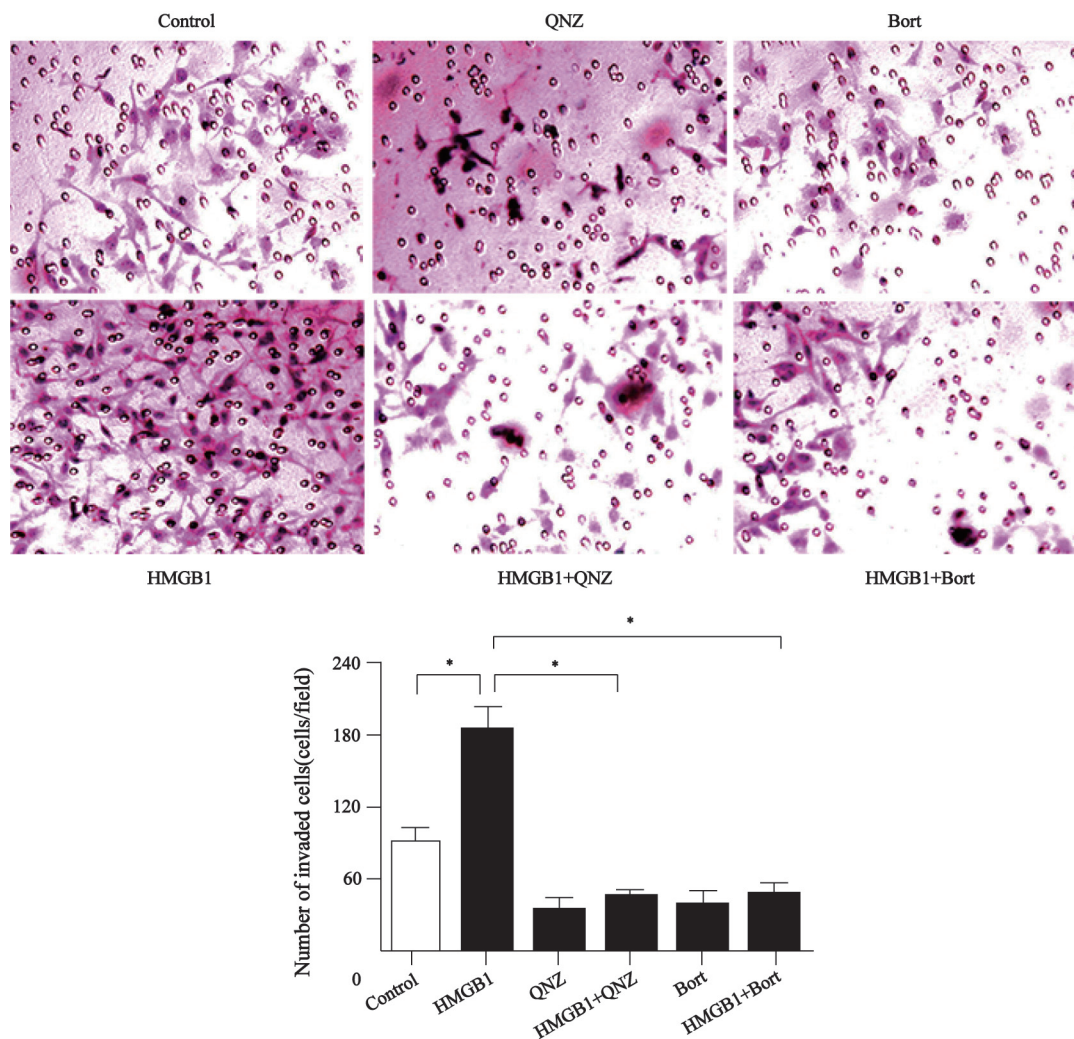


图2 HMGB1增强A549细胞侵袭, NF- κ B抑制A549细胞侵袭且消除HMGB1促进A549细胞侵袭效应

Fig. 2 HMGB1 promoted A549 cells invasion and NF- κ B inhibitors reverse this effect

A549 cells were untreated or treated for 24 h with HMGB1 (200 ng/mL) in absence or presence of 6-amino-4-quinazoline (QNZ, 40 nmol/L), Bortezomib (Bort, 20 nmol/L). The invasion ability was examined by Transwell assay. *: $P < 0.05$.

2.3 HMGB1及NF- κ B抑制剂对A549细胞NF- κ B表达及活性的影响

Western blot检测结果显示, 与对照组比较, HMGB1组A549细胞NF- κ B蛋白表达显著增加(图3A)。NF- κ B荧光素酶报告基因试验结果显示, HMGB1组A549细胞NF- κ B的活性与对照组比较增强3.12倍, 与HMGB1+QNZ组和HMGB1+Bort组比较, NF- κ B的活性分别增强了6.21倍和5.73倍, NF- κ B抑制剂消除了HMGB1的激活效应而且强烈抑制A549细胞基础NF- κ B活性(图3B)。这一结果说明HMGB1上调A549细胞

NF- κ B的表达, 进一步提示增强NF- κ B的表达和活性是HMGB1发挥效应的前提条件。

2.4 HMGB1及NF- κ B抑制剂对A549细胞整合素 α v β 3表达的影响

整合素 α v β 3是一种重要细胞黏附分子, 介导肿瘤细胞的侵袭迁移, 我们进一步研究了HMGB1是否影响A549细胞整合素 α v β 3的表达。结果显示, 经HMGB1处理后A549细胞整合素 α v β 3表达升高, QNZ或Bort处理组整合素 α v β 3表达较对照组降低, HMGB1+QNZ组与HMGB1+Bort组细胞与HMGB1组比较, 整合素

$\alpha v\beta 3$ 表达下降(图4)。这些结果表明HMGB1上调A549细胞整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达, NF- κB 抑制剂QNZ

或Bort抑制HMGB1促进A549细胞整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达的作用。

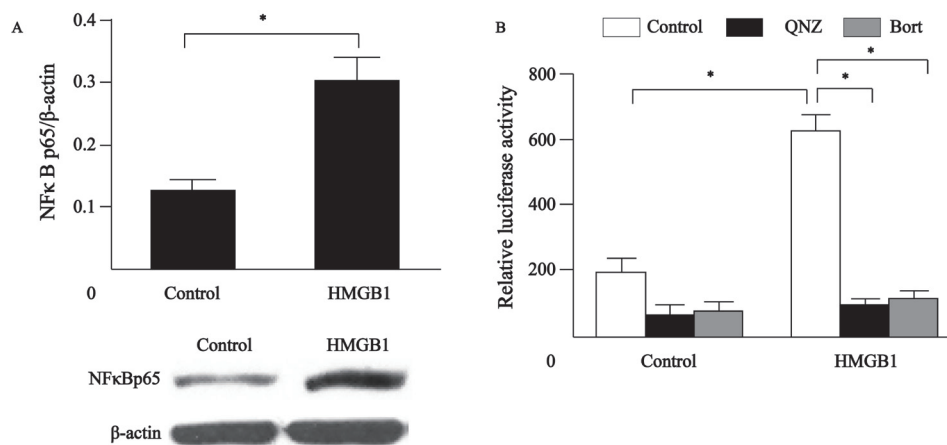


图3 HMGB1激活A549细胞NF- κB

Fig. 3 HMGB1 activated A549 cells NF- κB

A549 cells were untreated or treated for 24 h with HMGB1 (200 ng/mL) in absence or presence of 6-amino-4-quinazoline (QNZ, 40 nmol/L), Bortezomib (Bort, 20 nmol/L). A: The expression of NF- κB p65 was detected by Western blot. B: The activity of NF- κB was detected by luciferase reporter assay. *: $P < 0.05$.

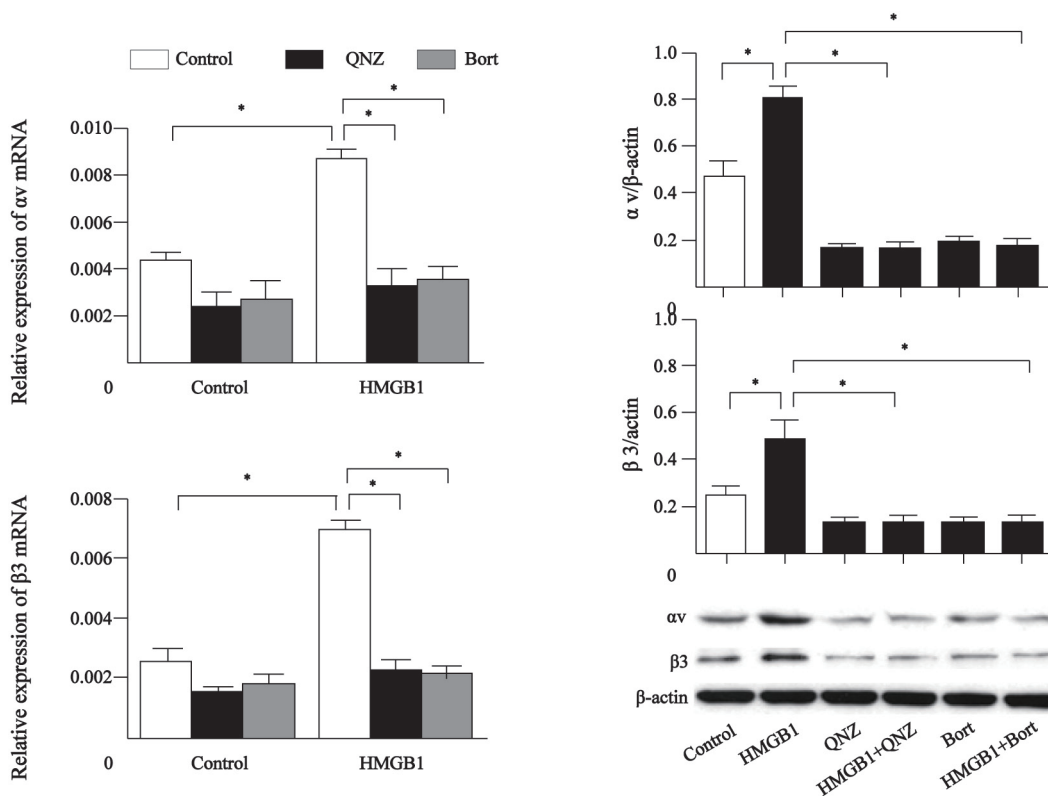


图4 HMGB1激活NF- κB 上调A549细胞整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达

Fig. 4 HMGB1 up-regulated integrin $\alpha v\beta 3$ expression in A549 cells

A549 cells were untreated or treated with HMGB1 (200 ng/mL) in absence or presence of 6-amino-4-quinazoline (QNZ, 40 nmol/L), Bortezomib (Bort, 20 nmol/L). The expression of $\alpha v\beta 3$ was detected by Real-time RT-PCR and Western blot. *: $P < 0.05$.

3 讨 论

肿瘤转移是肺癌致死的重要因素, 肿瘤侵袭转移是一个多步骤演进的复杂过程, 需要多基因参与, 关于肺癌侵袭转移的具体机制还不清楚, 相关蛋白及其作用机制的发现对肿瘤转移的预防与治疗具有重要意义。本研究探讨了HMGB1对肺癌A549细胞迁移侵袭的影响及其相关分子机制, 研究结果发现, HMGB1激活肺癌A549细胞NF- κ B上调整合素 α v β 3表达, 从而促进肿瘤细胞迁移和侵袭。

HMGB1是一种广泛存在于细胞核内的DNA结合蛋白, 在多种肿瘤细胞和组织中高表达, 促进肿瘤的发展及其转移^[4-5], HMGB1通过多种机制影响肿瘤侵袭转移, 研究发现HMGB1与其受体结合激活PI3K/Akt信号通路促进血管内皮生长因子(VEGF)的分泌维持血管生成^[6]; 肿瘤微环境中组织缺氧情况下释放的HMGB1激活TLR4/RAGE信号通路产生IL-1 β 和IL-18等炎症递质, 诱导炎症反应促进肝癌细胞侵袭和转移^[5]。划痕实验和侵袭试验的结果显示, HMGB1增强A549细胞侵袭迁移能力, 我们进一步探讨HMGB1促进A549细胞侵袭迁移的分子机制, 荧光素酶报告基因试验结果发现HMGB1激活A549细胞NF- κ B。有研究^[7]发现NF- κ B信号途径在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 调控肿瘤血管生成和侵袭迁移。有研究^[8]表明NF- κ B通过诱导趋化因子受体CXCR4的表达促进肿瘤细胞迁移和转移。

为了确定HMGB1是否通过激活NF- κ B而促进A549细胞侵袭转移, 我们选用了2种不同的NF- κ B抑制剂。QNZ是常用的NF- κ B抑制剂, Bort是一种有效的选择性抑制20S蛋白酶体抑制剂, 但它主要的生物学效应是抑制NF- κ B的激活, 组成性下调NF- κ B依赖性基因的表达。研究结果显示HMGB1促进A549细胞表达NF- κ B, NF- κ B抑制剂基本消除了HMGB1促进肿瘤细胞侵袭转移效应, 单独用NF- κ B抑制剂QNZ或Bort处理A549细胞后其侵袭转移能力也明显下降,

说明NF- κ B抑制剂可以抑制A549细胞基线侵袭能力。值得注意的是, 单独QNZ或Bort对A549细胞的迁移能力几乎没有影响, 可能NF- κ B调控影响肿瘤细胞侵袭能力蛋白的表达, 而不影响肿瘤细胞迁移能力的蛋白表达。NF- κ B荧光素酶报告基因实验和Western blot结果证明HMGB1通过上调并激活A549细胞NF- κ B而发挥作用。整合素是一类重要的细胞黏附分子, 研究报道 α v β 3整合素参与肿瘤细胞的侵袭和转移^[9-10]。 α v β 3通过与细胞外基质fibrinogen、fibronectin和laminin介导肿瘤细胞的黏附侵袭, 本研究结果显示在HMGB1刺激A549细胞表达 α v β 3, 而NF- κ B抑制剂消除HMGB1的促表达作用。

综上所述, 研究结果显示, 在HMGB1促进肺癌A549细胞侵袭迁移的基础上, 证明HMGB1通过激活A549细胞NF- κ B上调 α v β 3表达而促进肿瘤细胞侵袭转移, 但是HMGB1通过哪条信号途径激活A549细胞NF- κ B而促进 α v β 3表达有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] TAND D, KANG R, ZE H J, et al. High-mobility group box 1 and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1-2): 131-140.
- [2] KUSUME A, SASAHIRA T, LUO Y, et al. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer [J]. *Pathobiology*, 2009, 76(4):155-162.
- [3] LIU P L, TSAI J R, HWANG J J, et al. High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(5): 530-538.
- [4] TANG C H, KENG Y T, LIU J F, et al. HMGB-1 induces cell motility and α v β 3 integrin expression in human chondrosarcoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2012, 322(1): 98-106.
- [5] YAN W, CHANG Y, LIANG X, et al. High mobility group box1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1863-1875.
- [6] SCHLUETER C, WEBER H, MEYER B, et al. Angiogenic signaling through hypoxia HMGB1: an angiogenic switch molecule [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166 (4): 1259-1263.
- [7] KARIN M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441 (7092): 431-436.

- [8] HELBIG G, CHRISTOPHERSON II K W, BHAT-NAKSHATRI P, et al. NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4 [J] . J Biol Chem, 2003, 278 (24): 21631-21638.
- [9] ZHAO F, LI L, GUAN L, et al. Roles for GP II b/III a and α v β 3 integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction [J] . Cancer Lett, 2014, 344(1): 62-73.
- [10] KNOWLES L M, GURSKI L A, ENGEL C, et al. Integrin α v β 3 and fibronectin upregulate slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis [J] . Cancer Res, 2013, 73(20): 6175-6184.
- (收稿日期: 2014-09-26 修回日期: 2014-12-09)

“惠尔血支持按时足剂量化疗”2015年度有奖征文通知

众所周知, 按时足剂量化疗对于改善癌症患者(乳腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、结直肠癌及非小细胞肺癌等)的预后具有重要意义。然而, 大多数的化疗方案存在一定的血液毒性, 极大程度地降低了患者完成按时足剂量、足疗程化疗的比例。惠尔血(重组人粒细胞刺激因子)从上个世纪九十年代面世至今, 造福了数以百万计的癌症化疗患者。

为进一步探索并评估惠尔血支持按时、足剂量、足疗程化疗的临床效果, 促进临床经验交流, 《中国癌症杂志》特举办“惠尔血支持癌症患者按时足剂量化疗有奖征文”活动, 现将征文活动事项通知如下:

征文内容:

- (1) 根据惠尔血应用于癌症患者, 支持癌症患者完成按时足剂量化疗的多病例、分组研究等临床研究, 其中患者类型及化疗方案不限。
- (2) 惠尔血支持按时足剂量化疗的个案报道(个案报道要求特异性与新颖性)。
- (3) 惠尔血在不同的化疗方案中的作用等。

征文要求及提交:

- (1) 为首次投稿, 未公开发表过。
- (2) 征文格式参照《中国癌症杂志》稿约要求, 撰写论文。
- (3) 请将论文电子文档, 通过邮件发送至: kirin2015zwhd@163.com(注明“征文活动”);
- (4) 请注明作者、单位、地址、职称、邮编和联系电话等信息。

征文截止日期:

截止日期为2015年12月31日(以E-mail发出时间为准)。

评选方法:

- (1) 由《中国癌症杂志》编辑部组织专家成立评审委员会, 以公正、公平的方式评选, 在征文截稿后评选2015年度获奖情况。设立一等奖2名, 二等奖5名, 三等奖15名, 并颁发获奖证书。
- (2) 获奖论文经《中国癌症杂志》审稿通过后可优先在《中国癌症杂志》发表刊登。
- (3) 征文活动一等奖获资助参加欧美学术会议一次; 二等奖获资助参加亚太学术会议一次; 三等奖获资助参加国内学术会议一次。
- (4) 全部论文将以《中国癌症杂志》编辑部名义颁发证书, 并编入《论文汇编》。

《中国癌症杂志》编辑部
协和发酵麒麟(中国)制药有限公司