



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.013
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(12):1703-1708.

· 基础研究 ·

HMGB1 促进血管平滑肌细胞增殖与迁移的机制研究

徐韶飞, 聂晚频, 姚凯, 王征

(中南大学湘雅三医院 血管外科, 湖南 长沙 410013)

摘要

目的: 探讨高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 促进血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖与迁移的机制。

方法: 检测人主动脉血管平滑肌细胞 (HA-VSMC) 与 HMGB1 孵育后增殖与迁移的活性、晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 与 P38MAPK 表达改变, 以及 RAGE 抗体、P38MAPK 抑制剂 SB203580 预处理的影响。

结果: HMGB1 孵育后, HA-VSMC 增殖与迁移活性、RAGE 和 P38MAPK 的表达均明显增加 (均 $P < 0.05$), 且均呈一定的浓度依赖性。用 RAGE 抗体和 SB203580 预处理后, HMGB1 促进 HA-VSMC 增殖及迁移的作用均被明显抑制 (均 $P < 0.05$), RAGE 抗体预处理后, HMGB1 对 P38MAPK 表达的诱导作用明显抑制 ($P < 0.05$)。

结论: HMGB1 可能通过与细胞表面 RAGE 受体结合, 激活 P38MAPK 表达进而促进 VSMC 的增殖及迁移。

关键词

肌, 平滑, 血管; 高迁移率族蛋白质类; 细胞增殖

中图分类号: R654.3

Mechanism for HMGB1 in promoting migration and proliferation of vascular smooth muscle cells

XU Shaofei, NIE Wanpin, YAO Kai, WANG Zheng

(Department of Vascular Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of high mobility of protein B1 (HMGB1) in promoting migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Methods: The changes in migration and proliferation ability as well as the expressions of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and P38MAPK were measured in human aortic VSMCs (HA-VSMCs) after exposure to HMGB1. Further, the influence of RAGE antibody or P38MAPK inhibitor SB203580 pretreatment was observed.

Results: After exposure to HMGB1, the activity of the cell proliferation and migration, as well as the expression of RAGE and P38MAPK were increased significantly (all $P < 0.05$), and all presented in a concentration-dependent manner. The promoting effects of HMGB1 on migration and proliferation ability were significantly inhibited by either RAGE antibody or SB203580 pretreatment (all $P < 0.05$), and HMGB1-induced P38MAPK expression was significantly inhibited by RAGE antibody pretreatment ($P < 0.05$).

Conclusion: HMGB1 can probably promote the migration and proliferation of VSMCs through its binding to

收稿日期: 2015-09-15; 修订日期: 2015-11-19。

作者简介: 徐韶飞, 中南大学湘雅三医院硕士研究生 / 郴州市第一人民医院住院医师, 主要从事血管外科疾病方面的研究。

通信作者: 聂晚频, Email: niewanpin@medmail.com.cn

cell surface RAGE and then activating P38MAPK expression.

Key words Muscle, Smooth, Vascular; High Mobility Group Proteins; Cell Proliferation

CLC number: R654.3

经皮腔内血管成形术(PTA)、血管旁路移植、支架植入术等血管重建术是治疗外周动脉缺血疾病常用且有效的治疗方法。但术后容易发生血管再狭窄,其发生率可高达20%~35%^[1-2]。目前,多数研究^[3]认为血管平滑肌细胞受到炎症介质刺激发生的迁移及增殖是再狭窄发生发展的主要机理。胞外高迁移率蛋白B1(HMGB)是具有很强的致炎活性的晚期炎症因子^[4]。近年相关研究证实HMGB1血管平滑肌细胞(VSMC)膜上的Toll样受体(TLRs)结合而促进其迁移^[5]。晚期糖基化终产物受体(RAGE)作为HMGB1另一个重要受体,并且广泛表达VSMC膜上,可激活胞内重要信号通路(如MAPKs、NF- κ b、ERK_{1/2})参与细胞运动、迁移以及炎症反应^[6-7]等。基于此,本研究探讨不同浓度HMGB1对HA-VSMC的迁移和增殖的影响,并且探讨HMGB1与胞膜上的RAGE受体结合激活相关胞内的信号通路是否参与细胞的迁移及增殖,为防治再狭窄提供新的理论基础和新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞

重组人HMGB1购自abcam公司,RAGE抗体、P38MAPK购自proteintech公司,SB203580(P38MAPK抑制剂)购自Thermo pierce公司。DMEM培养基购自Gibco公司,胎牛血清购自WellBiology公司。蛋白磷酸酶抑制剂购自Roche公司。人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)由湘雅医学院肿瘤研究所提供,选用3~10代细胞进行实验。

1.2 血管平滑肌细胞培养与鉴定

取HA-VSMC在含12%FBS的1640培养基中培养,在37℃,5%CO₂的培养箱中培养,选用第3~10代的细胞进行实验,用特异性平滑肌细胞抗体 α -SMA进行免疫细胞化学鉴定。

1.3 MTT法测细胞增殖活性

各组取处于对数生长期的细胞,将HA-VSMC

以10⁴/孔密度接种在96孔板内,每孔200 μ L,共同孵育48 h。每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L,继续孵育4 h。终止培养后离心去掉上清液,加入二甲基亚砷150 μ L/孔,混匀振荡10 min,溶解细胞内的紫色结晶。用Bio-Tek酶标仪分析在490 nm处吸光度(OD)值,取均值并绘制生长曲线。

1.4 细胞迁移实验(Transwell法)

用胰酶消化各组细胞,在Transwell上室加入无血清培养基重悬的100 μ L细胞悬液(10⁵个细胞/孔);下室加500 μ L含12%胎牛血清1640培养液。在细胞培养箱中培养24 h,用棉球抹去上室细胞,用甲醛固定,结晶紫染色,光镜下观察迁移到滤膜下室面的HA-VSMCs并计数,每个样本计数4个随机选择高倍视野 \times 200的细胞数。

1.5 Western blot法检测蛋白浓度

各组细胞经PBS洗涤后加入蛋白裂解缓冲液中提取总蛋白。离心后蛋白样品经12%的SDS-PAGE凝胶电泳分离后,转移至硝酸纤维素膜上。在室温条件下用5%脱脂奶粉封闭后,分别加入RAGE抗体、P38MAPK抗体、GAPDH抗体以及辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育。蛋白检测由ECL化学发光检测试剂盒完成。

1.6 统计学处理

实验中各项指标的数据都采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 19.0统计软件进行数据处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HA-VSMC鉴定

取培养3~10代的细胞,利用特异的平滑肌 α -SMA免疫荧光染色,结果可见到长梭形胞体,胞质呈红色,胞核呈蓝色,培养的HA-VSMC阳性率92%;在荧光高倍显微镜下可见胞质内有大量与细胞长轴平行的条丝状物,并且向细胞两极放射,即 α -SMA。所得细胞为典型的HA-VSMC(图1)。

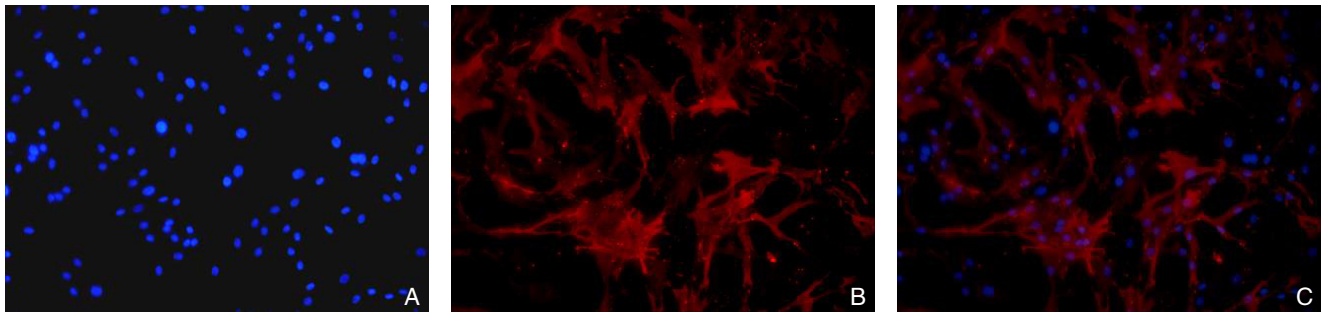


图 1 HA-VSMC 鉴定 (免疫荧光染色 ×200) A: DAPI 核染色; B: α-SMA 染色; C: 合并图像

Figure 1 Identification of HA-VSMCs (immune fluorescence staining ×200) A: DAPI staining for nuclear; B: Fluorescence staining for α-SMA; C: Merged image

2.2 HMGB1 对 HA-VSMC 增殖及迁移活性的影响

分别用不同浓度 (0、1、10、100、500、1 000 ng/mL) HMGB1 诱导 HA-VSMC 24 h, 结果显示: 随着 HMGB1 浓度增加, 其增殖及迁移活性均明显增加, 当浓度为 100 ng/mL, 其增殖活性基本达到高峰 (图 2), 但其迁移活性继续明显增加 (图 3)。各浓度间的差异部分均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

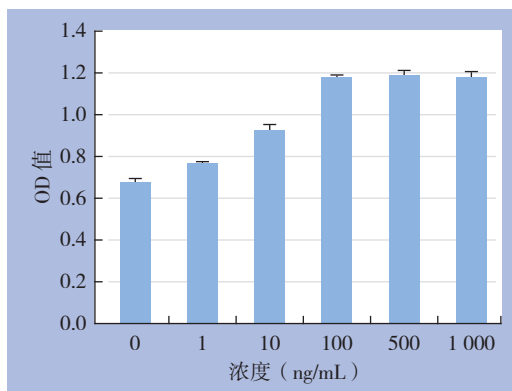


图 2 不同浓度 HMGB1 对 HA-VSMC 增殖活性的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of HMGB1 on the proliferation of HA-VSMCs

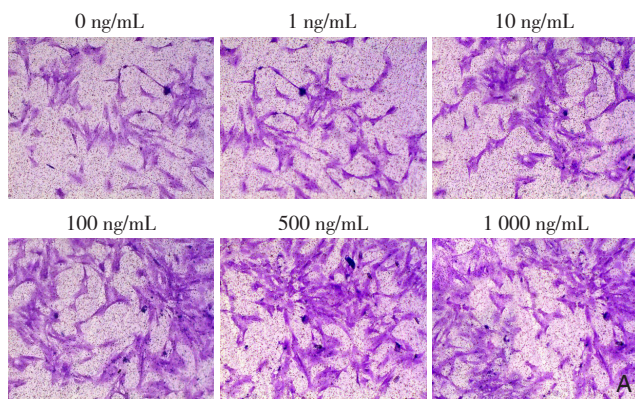


图 3 不同浓度 HMGB1 对 HA-VSMC 迁移影响 A: Transwell 实验结果 (×200); B: 迁移细胞数比较

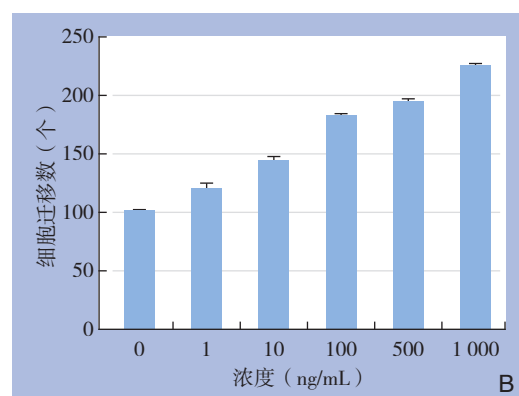
Figure 3 Effects of different concentrations of HMGB1 on the migration of HA-VSMCs A: Results of Transwell assay (×200); B: Comparison of numbers of cell migration

2.3 HMGB1 对 RAGE 受体和 P38MAPK 表达的影响

用不同浓度的 HMGB1 诱导 HA-VSMC 24 h 后, 用 Western blot 法检测 HMGB1 对细胞膜表面 RAGE 受体和胞内 P38MAPK 表达, 结果显示: HMGB1 能明显诱导 HA-VSMC 细胞膜上 RAGE 受体及胞内 P38MAPK 的表达。当 HMGB1 达到 100 ng/mL 时, RAGE 表达和 P38MAPK 达到高峰 (图 4-5)。

2.4 RAGE 和 P38MAPK 对 HMGB1 介导 HA-VSMC 的增殖与迁移的影响

为了进一步检测 RAGE 和 P38MAPK 对 HMGB1 介导 HA-VSMC 迁移和增殖的影响, 将细胞分为 4 组: 空白对照组、HMGB1 组 (100 ng/mL)、HMGB1+RAGE 抗体组、HMGB1+SB203580 组, 后两组细胞分别先用 RAGE 抗体和 SB203580 分别预处理细胞 1 h 后在用 100 ng/mL HMGB1 孵育。结果显示: RAGE 抗体与 SB203580 干预后的细胞的迁移和增殖均受到明显抑制 (均 $P < 0.05$) (图 6) (表 1)。



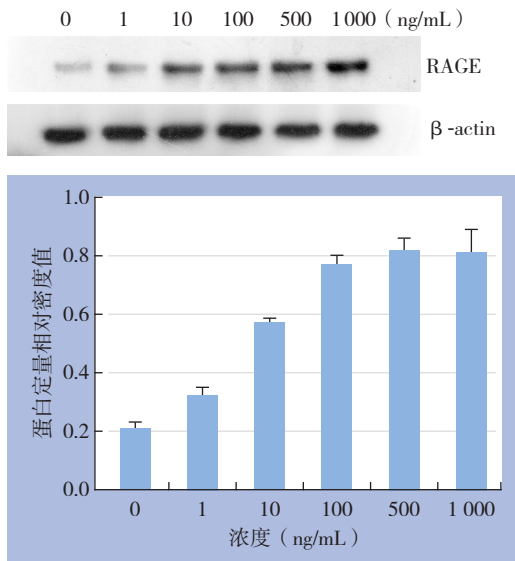


图 4 不同 HMGB1 浓度对 HA-VSMC 表达 RAGE 的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of HMGB1 on RAGE expression

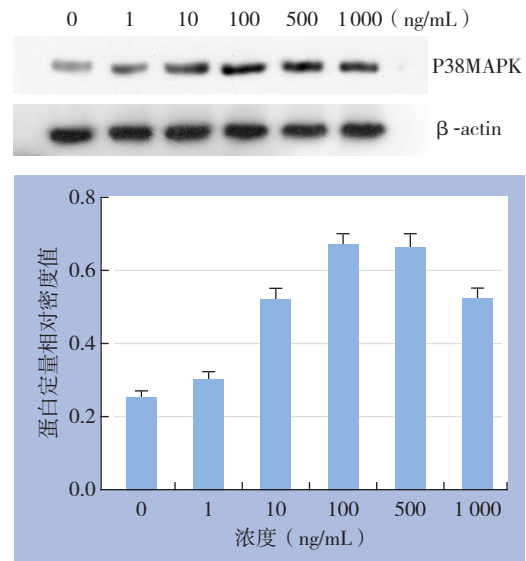


图 5 不同 HMGB1 浓度对 HA-VSMC 中 P38MAPK 表达影响
Figure 5 Effects of different concentrations of HMGB1 on expression of P38MAPK

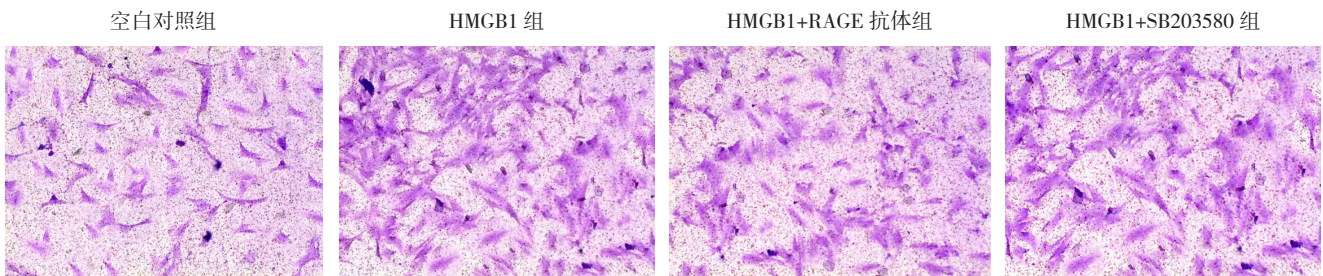


图 6 各组 HA-VSMC 迁移活性 Transwell 实验结果 (×200)
Figure 6 Results of Transwell assay for migration activity of HA-VSMCs in each group (×200)

表 1 RAGE 受体和 P38MAPK 抑制剂对 HA-VSMC 细胞迁移与增殖活性影响

Table 1 Effects of RAGE antibody and P38MAPK inhibitor on the migration and proliferation activities of HA-VSMCs

组别	细胞计数 (个)	OD 值
空白对照组	94 ± 2.996	0.56 ± 0.015
HMGB1 组	181 ± 3.742 ¹⁾	0.96 ± 0.011 ¹⁾
HMGB1+RAGE 抗体组	122 ± 3.367 ^{1),2)}	0.72 ± 0.023 ^{1),2)}
HMGB1+SB203580 组	139 ± 2.581 ^{1),2)}	0.80 ± 0.034 ^{1),2)}

注: 1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与 HMGB1 组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. HMGB1 group

2.5 HMGB1 通过 RAGE 受体调节 P38MAPK 的表达

为了检测 RAGE 对 HMGB1 诱导 P38MAPK 的表

达的影响, 将细胞分为 3 组: 空白对照组、HMGB1 (100 ng/mL) 组、HMGB1+RAGE 抗体组, 后者先用 RAGE 抗体预处理 1 h 后在用 100 ng/mL HMGB1 孵育。Western blot 结果显示, RAGE 抗体明显抑制 HMGB1 诱导的 P38MAPK 的表达 ($P < 0.05$) (图 7) (表 2)。

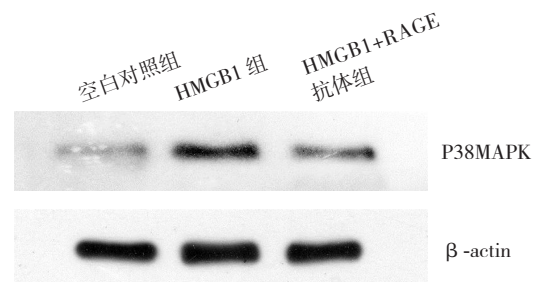


图 7 Western blot 方法检测各组 P38MAPK 表达
Figure 7 P38MAPK expressions of different groups determined by Western blot analysis

表 2 RAGE 受体对 HA-VSMC 表达 P38MAPK 的影响
Table 2 Effects of RAGE antibody on P38MAPK expression in HA-VSMCs

分组	相对表达量
空白对照组	0.24 ± 0.05
HMGB1 组	0.66 ± 0.08 ¹⁾
HMGB1+RAGE 抗体组	0.46 ± 0.06 ^{1),2)}

注: 1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与 HMGB1 组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. HMGB1 group

3 讨 论

VSMC 的过度增殖和迁移被认为是血管再狭窄的主要机理, 在这过程中炎性介质发挥着至为关键作用。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[8]、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)^[9]、血小板衍生生长因子 (PDGF)^[10] 等。正常情况下 HMGB1 只存在于真核细胞核内, 参与 DNA 的修复、保持和稳固 DNA 结构等正常的细胞生命活动。只有细胞受损或者坏死的时候, HMGB1 就会释放到胞外^[11], 相当于一种很强的炎性介质, 可参与脓毒血症、动脉粥样硬化及血管重构等病理过程。血管平滑肌细胞在正常情况下含有极少量的 HMGB1, 而血管内皮细胞含量大。在行血管重建术的操作过程中, 不可避免损害血管内皮细胞及引起炎性细胞聚集, 受损的内皮细胞和炎性细胞就可释放大量的 HMGB1^[12]。有临床研究^[13]证实行冠脉介入治疗的患者术后血清 HMGB1 的浓度较术前有着显著的增高, 指出 HMGB1 可做为判断术后再狭窄的指标, 此外间接反应了血管壁的损伤和炎症反应程度。在以往研究中, HMGB1 可刺激多种细胞迁移, 如肿瘤细胞、炎症细胞及 VSMC。在本实验中同样显示 VSMC 迁移活性是随着 HMGB1 的浓度增加而增加, 同时还发现还刺激 VSMC 的增殖活性, 并且当浓度为 100 ng/mL, 其活性达到高峰。因此, HMGB1 是通过刺激 VSMC 发生迁移和增殖的双重作用来参与血管再狭窄的发生发展。

HMGB1 的受体主要两种是 TLRs 和 RAGE, TLRs 广泛表达于脉管系统, 可激活细胞内的信号传导通路 (MAPK、JNK、NF- κ B) 诱导炎症反应和恶性肿瘤细胞迁移增殖反应^[14-15]。近年来相关研究^[12]发现 HMGB1 能诱导大鼠胸主动脉平滑肌细胞迁移; 另外还发现 HMGB1 通过胞膜 TLR4 激活

PI3/Akt 及 NF- κ B 途径参与此调控过程^[16-17]。但在这些研究中发现用 TLR4 抗体抑制剂及 PI3 抑制剂均不能完全抑制 VSMC 迁移, 这说明其它胞膜受体及信号通路参与 HMGB1 介导 VSMC 的迁移和增殖。RAGE 受体可表达于内皮细胞、VSMC、神经元细胞等细胞膜上^[18-19]。正常情况下胞膜上 RAGE 呈低表达, 但 RAGE 的表达量是随着其配体分子增多而增加, 而且 HMGB1 是目前唯一已知的 RAGE 的高亲和力的配体^[20]。MAPKs 级联通路是 VSMC 增殖和迁移的主要的 3 条信号通路之一, P38MAPK 通路是 MAPKs 的主要家族成员^[21-22]。因此, 推测 HMGB1 介导的 VSMC 的迁移和增殖可能与 RAGE 受体和 P38MAPK 通路激活有关。在本次研究中, RAGE 和 P38MAPK 的表达是随着 HMGB1 浓度的增加而增加, 并且当浓度达到 100 ng/mL 时, 两者的表达量都达到最高峰。此外 RAGE 抗体干预组和 P38MAPK 抑制剂干预组可明显抑制 HMGB1 介导的 HA-VSMC 迁移和增殖, 因此说明胞膜上 RAGE 表达和胞内 P38MAPK 通路参与了 HMGB1 介导 HA-VSMC 增殖与迁移的调控。在实验过程中发现, RAGE 和 P38MAPK 这两者之间具有很好的一致性, 在下一步实验中发现 RAGE 抗体干预组能显著的抑制细胞 P38MAPK 的表达。因此 HMGB1 可能通过 RAGE 受体调控 P38MAPK 的表达来调控 VSMC 的迁移和增殖。

综上, HMGB1 是通过与胞膜上 RAGE 受体结合, 激活胞内 P38MAPK 信号传导通路, 促进 HA-VSMC 的增殖及迁移。本研究为 HMGB1 对血管再狭窄的发生发展及分子机制提供了新的理论基础, 为防治血管再狭窄提供了新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Takasawa Y, Iijima R, Shiba M, et al. Predictor of subsequent target lesion revascularization in patients with drug-eluting stent restenosis undergoing percutaneous coronary intervention[J]. J Cardiol, 2010, 55(3): 391-396.
- [2] 王玉琦, 史振宇. 我国血管外科的现状与展望[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 15(6):387-389.
- [3] Jukema JW, Ahmed TA, Verschuren JJ, et al. Restenosis after PCI. Part 2: prevention and therapy[J]. Nat Rev Cardiol, 2012, 9(2): 79-90.
- [4] Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease[J]. Nat Rev

- Rheumatol, 2012, 8(4): 195-202.
- [5] Yang J, Chen L, Yang J, et al. High mobility group box-1 induces migration of vascular smooth muscle cells via TLR4-dependent PI3K/Akt pathway activation[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3):3361-3367.
- [6] Qin YH, Dai SM, Tang GS, et al. HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products[J]. J Immunol, 2009, 183(10):6244-6250.
- [7] Kokkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. Scand J Immunol, 2005, 61(1): 1-9.
- [8] Wildgruber M, Weiss W, Berger H, et al. Association of Circulating Transforming Growth Factor beta, Tumor Necrosis Factor alpha and Basic Fibroblast Growth Factor with Restenosis after Transluminal Angioplasty[J]. Eur J Vasc Endovas Surg, 2007, 34(1): 35-43.
- [9] Yang J, Zeng Y, Li Y, et al. Intravascular site-specific delivery of a therapeutic antisense for the inhibition of restenosis[J]. Eur J Pharm Sci, 2008, 35(5):427-434.
- [10] Nakagawa M, Ohno T, Maruyama R, et al. Sesquiterpene lactone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle progression[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(9):1754-1757.
- [11] Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1):296-301.
- [12] Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells[J]. J Cell Biol, 2001, 152(6):1197-1206.
- [13] 张巍. PCI手术前后CGRP、HMGB1的变化及其与再狭窄临床相关性因素的研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2013.
- [14] Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. Am J Physiol, Cell Physiol, 2006, 290(3):C917-924.
- [15] van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo[J]. Shock, 2009, 31(3):280-284.
- [16] Yang J, Huang C, Yang J, et al. Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation: a key role for TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 345(1/2): 189-195.
- [17] 杨简, 范致星, 李馨欣, 等. 高迁移率蛋白B1对血管平滑肌细胞迁移的影响及分子机制研究[J]. 重庆医学, 2015, 44(4):439-441.
- [18] Chavakis E, Hain A, Vinci M, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells[J]. Circ Res, 2007, 100(2):204-212.
- [19] Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation[J]. J Cell Biol, 2004, 164(3):441-449.
- [20] Rauvala H, Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease[J]. Curr Mol Med, 2007, 7(8):725-734.
- [21] Lai K, Wang H, Lee WS, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat arterial smooth muscle cell proliferation[J]. J Clin Invest, 1996, 98(7):1560-1567.
- [22] Liu B, Ryer EJ, Kundi R, et al. Protein kinase C-delta regulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells through the extracellular signal-regulated kinase 1/2[J]. J Vasc Surg, 2007, 45(1):160-168.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 徐韶飞, 聂晚频, 姚凯, 等. HMGB1促进血管平滑肌细胞增殖与迁移的机制研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(12):1703-1708. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.013

Cite this article as: XU SF, NIE WP, YAO K, et al. Mechanism for HMGB1 in promoting migration and proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(12):1703-1708. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.12.013