

高迁移率族蛋白 B1 对人气道平滑肌细胞增殖和迁移及 Akt 磷酸化的影响

柏芳芳¹, 陈子¹, 韩露¹, 闫兆², 王楠¹, 解卫平¹, 黄茂¹, 周林福^{1,3*}

(¹南京医科大学第一附属医院呼吸内科, 江苏 南京 210029; ²徐州医科大学附属医院淮海医院呼吸内科, 江苏 徐州 221000; ³南京医科大学附属江苏盛泽医院呼吸内科, 江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的:探讨高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein box 1, HMGB1)刺激对人气道平滑肌细胞(human airway smooth muscle cells, HASMC)增殖和迁移的影响及其机制。方法:体外培养 HASMC,将纯化的第 3~8 代细胞随机分为对照组、HMGB1 组(125、250、500 和 1 000 ng/mL)、TGF- β 阳性对照组 (1 ng/mL)、CCK-8 法测定 HASMC 增殖能力,Transwell 小室观察 HMGB1 对 HASMC 迁移的影响,Western blot 检测 HASMC 的 Akt 磷酸化。结果:与对照组相比,HMGB1 呈浓度依赖性刺激 HASMC 增殖($P < 0.05$);HMGB1 (500 ng/mL)刺激 HASMC 后,细胞迁移能力显著高于对照组($P < 0.01$);HMGB1 (500 ng/mL)组 HASMC 的 Akt 磷酸化水平较对照组显著增高($P < 0.05$)。结论:HMGB1 促进 HASMC 增殖和迁移,可能是通过调节 PI3K/Akt 通路参与气道重塑,为今后治疗哮喘提供了新思路。

[关键词] 高迁移率族蛋白 B1;气道平滑肌细胞;增殖;迁移;气道重塑;哮喘

[中图分类号] R562.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-794-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160706

Effects of high-mobility group box protein 1(HMGB1) on the proliferation, migration and phosphorylation of Akt in human airway smooth muscle cells

Bai Fangfang¹, Chen Zi¹, Han Lu¹, Yan Zhao², Wang Nan¹, Xie Weiping¹, Huang Mao¹, Zhou Linfu^{1,3*}

(¹Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Respiratory Medicine, Xuzhou Huaihai Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000; ³Department of Respiratory Medicine, Jiangsu Shengze Hospital, NJMU, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and underlying mechanism of high mobility group protein box 1 (HMGB1) on the proliferation and migration of human airway smooth muscle cells (HASCs). **Methods:** Normal HASMC between passages 3 and 8 were randomly divided into the control group, HMGB1 group with different concentrations (125, 250, 500, and 1 000 ng/mL), and TGF- β (1 ng/mL) group as a positive control, respectively. The HMGB1-stimulated proliferation of HASCs was evaluated by cell counting of CCK-8. The number of migrated cells was performed using Transwell migration assay. Western blotting assay was performed to detect the phosphorylation of Akt following HMGB1 stimulation. **Result:** The proliferation of HASCs treated with HMGB1 was significantly increased in a dose-dependent manner than those of untreated control group ($P < 0.05$). Furthermore, the number of migrated cells was significantly increased after HMGB1 activation compared to the control group ($P < 0.01$). The phosphorylation level of Akt in the HMGB1 group (500 ng/mL) was significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our data suggest that HMGB1 contributes to airway remodeling by stimulating the proliferation and migration of HASCs through regulating phosphorylation of PI3K/Akt pathway, which provides a promising target for future therapy of asthma.

[Key words] high-mobility group box protein 1; airway smooth muscle cells; proliferation; migration; airway remodeling; asthma

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 794-797]

[基金项目] 国家自然科学基金(81370133、81170018);江苏省医学重点人才项目(RC2011066);江苏省高校自然科学研究项目(11KJB320008);江苏省临床医学科技专项(BL2012012);江苏省社会发展重点研发专项(BE2015651);江苏省卫生计生委预防医学科研课题(Y2015026);江苏省中医药科技项目(YB2015110);苏州市科技计划项目(SYS201402)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lfzhou@njmu.edu.cn

支气管哮喘(简称哮喘)系树突状细胞介导的以 Th2 优势免疫为特征的慢性气道炎症性疾病。气道炎症、气道高反应性和气道重塑是哮喘最显著的临床特征^[1]。气道重塑与气道炎症和肺功能下降密切相关。气道炎症促进组织发生损伤和修复,引起气管壁结构破坏乃至气道重塑。气道重塑可累及气道各层,主要包括上皮细胞损伤、气道平滑肌细胞增生和肥大、黏液腺及杯状细胞增生、新生血管生成等。现认为,气道重塑在气道炎症的早期便已出现,并参与难治性哮喘的病理生理进程^[2-3]。

高迁移率族蛋白 B1(high morbidity group protein box 1,HMGB1)是一种由 215 个氨基酸组成的非组蛋白染色体结合蛋白^[4]。在生理状态下,HMGB1 主要存在于细胞核,有稳定核小体、调节 DNA 基因转录调控、DNA 重组修复等作用。当分泌到细胞间隙时,HMGB1 则发挥细胞因子样作用,与细胞增殖、迁移、分化以及炎症发生发展密切相关^[5-7]。本研究旨在观察 HMGB1 是否诱导人气道平滑肌细胞(human airway smooth muscle cells,HASMC)增殖和迁移,并探讨其分子机制,为哮喘气道重塑防治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

HASMC 细胞株、平滑肌细胞培养基(SMCM)(Sciencell 公司,美国);二甲基亚砜(DMSO)和重组人 HMGB1(Sigma 公司,美国);兔抗 Akt 抗体、兔抗磷酸化 Akt 抗体(p-Akt 抗体)(Cell Signaling 公司,美国);GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(南京巴傲得公司);Transwell 小室(Corning 公司,美国);0.25%胰蛋白酶(Gibco 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 HASMC 的培养和传代

在无菌操作下,复苏冻存的原代 HASMC 并接种至培养瓶,加入含 2% SMCM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中绝对静置。此后,每 2 d 换液。当细胞生长达融合时,胰酶消化,按 1:3 比例传代,取第 3~8 代细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8 法检测 HASMC 增殖

取对数生长期细胞,以 5 000 个/孔接种于 96 孔板,孵育 24 h 后,换不含血清的 SMCM 饥饿 24 h,使细胞生长同步化。将细胞随机分成 6 组,对照组、不同浓度 HMGB1 组(125、250、500 和 1 000 ng/mL)、TGF-β(1 ng/mL)组,每组 6 个复孔。培养 24 h 后,

每孔加入 10 μL CCK-8 原液(日本同仁研究所),培养箱中孵育 2~3 h,置酶标仪,于波长 450 nm 处测吸光度值,计算 HASMC 增殖能力。

1.2.3 迁移功能检测

消化的 HASMC 以不含血清的 SMCM 制成密度为 1×10^5 个/mL 细胞悬液,共分 3 组,对照组、HMGB1(500 ng/mL,H500)组和 TGF-β(1 ng/mL,T1)组,每组 3 个复孔,相同实验重复 3 次。各孔上室加入细胞悬液 100 μL,下室加不含生长因子的 2% SMCM 培养基 600 μL,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24 h。弃上室培养液,PBS 清洗 3 次,多聚甲醛室温固定 30 min 后,结晶紫染色。轻轻拭去小室上室面未穿膜的细胞,下室面即是迁移的 HASMC。倒置显微镜(×200)下,随机计数 5 个视野的细胞数,读取平均值。

1.2.4 Western blot 分析

处于生长期细胞饥饿过夜,随机分成 3 组,包括对照组、HMGB1(500 ng/mL,H500)组、TGF-β(1 ng/mL,T1)组。各组细胞孵育 30 min 后,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min。刮下细胞,移至 1.5 mL EP 管,4℃、1 4000 r/min 高速离心 20 min,吸取上清,加入蛋白上样缓冲液,100℃水浴锅中煮沸 5 min。蛋白上样量为 10 μL,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 mA 湿转,将蛋白转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。5% 胎牛血清(BSA)室温封闭 1 h,再分别加入 p-Akt 抗体(1:1 000),Akt 抗体(1:1 000),GAPDH 抗体(1:5 000),4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。曝光成像,应用 Image J 分析软件采集数据。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计学软件进行分析,数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HMGB1 对 HASMC 增殖的影响

HMGB1 对 HASMC 增殖的影响见表 1。显然,HMGB1 呈浓度依赖性促进 HASMC 增殖,与对照组相比,HMGB1 的浓度达到 250 ng/mL H250 组差异即有统计学意义,而 HMGB1 500 ng/mL 可显著促进 HASMC 增殖(0.868 ± 0.007 vs. 0.708 ± 0.008 , $P < 0.05$),

表1 HMGB1对HASC MC增殖的影响
Table 1 Effect of HMGB1 on the proliferation of HASC MC
($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	450 nm 处吸光度值
对照组	0.708 ± 0.008
H125 组	0.766 ± 0.004
H250 组	$0.830 \pm 0.014^*$
H500 组	$0.868 \pm 0.007^*$
H1000 组	$0.892 \pm 0.006^*$
T1 组	$0.847 \pm 0.007^*$

与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

故在后续实验中选择 HMGB1 (500 ng/mL, H500) 为最佳浓度。

2.2 HMGB1 对 HASC MC 迁移的影响

与对照组相比, HMGB1 刺激细胞 24 h 后 HASC MC 迁移细胞数显著增加 [(79.2 ± 8.1) 个 *vs.* (31.2 ± 6.6) 个, $P < 0.01$, 表 2], 提示 HMGB1 (500 ng/mL) 可促进 HASC MC 迁移。

表2 HMGB1对HASC MC迁移的影响
Table 2 Effect of HMGB1 on the migration of HASC MC
(个/高倍镜视野, $n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	透膜细胞数
对照组	31.2 ± 6.6
H500 组	$79.2 \pm 8.1^*$
T1 组	$56.0 \pm 4.5^*$

与对照组相比, $*P < 0.01$ 。

2.3 HMGB1 对 Akt 磷酸化的影响

Western blot 分析显示, HMGB1 组 Akt 磷酸化水平较对照组显著升高 (1.875 ± 0.107 *vs.* 0.999 ± 0.010 , $P < 0.05$, 图 1), 表明 HMGB1 刺激能够诱导 HASC MC 的 Akt 发生磷酸化。

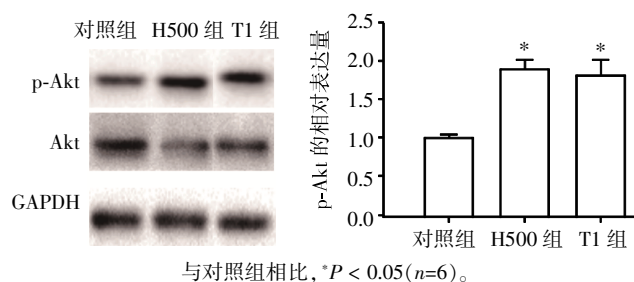


图1 HMGB1对HASC MC Akt磷酸化的影响

Figure 1 Effect of HMGB1 on the phosphorylation of Akt in HASC MC

3 讨论

临床上, 5%哮喘患者即使长期使用吸入性糖皮质激素和(或)长效 β_2 受体激动剂, 仍有不同程度的不可逆性气流阻塞, 需反复急诊就医和住院治疗。

全球哮喘防治倡议(GINA)将经过第4步治疗(缓解药物加2种或更多的控制药物)尚未达到可控制水平的哮喘, 称为难治性哮喘(重症哮喘)^[2]。尤其重症哮喘急诊就医率和住院率分别为轻、中度哮喘的15倍和20倍, 是导致哮喘治疗费用骤增的重要原因。

气道重塑导致患者肺功能减退, 这是重症哮喘重要的发病基础。HASC MC 既是气道的主要结构细胞, 也是气道狭窄的主要效应细胞。在炎症环境下, 分泌的细胞因子和炎症介质可以促进平滑肌细胞肥大和增生, 参与哮喘患者的气道重塑。越来越多的证据表明, HASC MC 增生与哮喘的严重程度呈正相关^[8]。

HMGB1 作为一种胞核内蛋白, 在感染或其他炎症刺激下, 可由炎症细胞主动分泌, 或由坏死细胞被动释放至胞外, 与细胞表面的晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、Toll 样受体 4(TLR-4)、TLR-2 等多种受体相结合, 从而产生细胞因子样作用^[9]。体外研究显示, HMGB1 可通过激活基质金属蛋白酶 9(MMP-9) 而促进人肺成纤维细胞发生分化和迁移^[10]。在小鼠慢性哮喘模型中, HMGB1 可以协同加重过敏原诱导的气道重塑^[11]。慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者血清 HMGB1 表达量显著增加, 印证了 HMGB1 在气道重塑中起重要作用^[12]。并有文献报道哮喘患者诱导痰中 HMGB1 的表达水平(0~590 ng/mL), 明显高于正常人群(0~45.2 ng/mL)^[13]。

本研究采用 HASC MC 体外模拟气道增殖和迁移, 首次观察 HMGB1 在气道重塑中的作用。结果显示, HMGB1 呈浓度依赖性方式促进 HASC MC 增殖, 并且 HMGB1 刺激诱导 HASC MC 迁移, 提示 HMGB1 将成为治疗哮喘气道重塑的新思路。

磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)是一类参与细胞增殖、分化、凋亡的蛋白家族。Akt 系 PI3K 通路的下游效应分子之一, 其磷酸化水平被视为 PI3K 通路活化的重要指标^[14]。据报道, PI3K 抑制剂可以显著改善哮喘模型的气道炎症和重塑^[15]。而且, PI3K 基因敲除小鼠的哮喘特征显著减弱^[16], 有趣的是, 罗红霉素通过抑制 PI3K/Akt 通路, 能够显著减轻 TGF- β 诱导的鼠气道平滑肌细胞增殖和迁移^[17]。本研究采用 HASC MC, 体外研究发现 HMGB1 激活 Akt 通路, 诠释了 HMGB1 参与气道重塑的可能机制。

综上所述, HMGB1 可促进 HASC MC 增殖和迁移, 可能是通过调节 PI3K/Akt 通路而参与气道重塑。进一步研发针对 HMGB1 和 PI3K/Akt 通路的单

抗、小分子化合物或中药单体,有望为今后治疗哮喘尤其是重症哮喘带来新方法。

[参考文献]

- [1] Zhou LF,Zhang MS,Hu AH,et al. Selective blockade of NF-kappa B by novel mutated I kappa B alpha suppresses CD3/CD28-induced activation of memory CD4 (+)T cells in asthma[J]. Allergy,2008,63(5):509-517
- [2] 苗伟伟,汪凤凤,刘洪洪,等.支气管哮喘气道重塑的新视角:免疫球蛋白 E[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(5):367-370
- [3] Wang WL,Li HY,Zhang MS,et al. Thymic stromal lymphopoietin:a promising therapeutic target for allergic diseases[J]. Int Arch Allergy Immunol,2013,160(1):18-26
- [4] Chen YC,Statt S,Wu R,et al. High mobility group box 1-induced epithelial mesenchymal transition in human airway epithelial cells[J]. Sci Rep,2016,6(2):18815
- [5] Bangert A,Andrassy M,Müller AM,et al. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2016,113(2):E155-E164
- [6] Peng T,Hu M,Wu T,et al. Effects of high mobility group box 1 knockdown on proliferation,migration and invasion of the HONE 1 human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. Mol Med Rep,2015,12(5):7531-7537
- [7] Shim EJ,Chun E,Lee HS,et al. The role of high-mobility group box-1 (HMGB1)in the pathogenesis of asthma[J]. Clin Exp Allergy,2012,42(6):958-965
- [8] Zhang WX,Li CC. Airway remodeling:a potential therapeutic target in asthma[J]. World J Pediatr,2011,7(2):124-128
- [9] Lu B,Wang C,Wang M,et al. Molecular mechanism and therapeutic modulation of high mobility group box 1 release and action:an updated review[J]. Expert Rev Clin Immunol,2014,10(6):713-727
- [10] Lee CC,Wang CN,Lee YL,et al. High mobility group box 1 induced human lung myofibroblasts differentiation and enhanced migration by activation of MMP-9[J]. PLoS One,2015,10(2):e0116393
- [11] Hou C,Kong J,Liang Y,et al. HMGB1 contributes to allergen-induced airway remodeling in a murine model of chronic asthma by modulating airway inflammation and activating lung fibroblasts[J]. Cell Mol Immunol,2015,12(4):409-423
- [12] Pouwels SD,Nawijn MC,Bathoorn E,et al. Increased serum levels of LL37,HMGB1 and S100A9 during exacerbation in COPD patients[J]. Eur Respir J,2015,45(5):1482-1485
- [13] Watanabe T,Asai K,Fujimoto H,et al. Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients[J]. Respir Med,2011,105(4):519-525
- [14] Ito K,Caramori G,Adcock IM. Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease[J]. J Pharmacol Exp Ther,2007,321(1):1-8
- [15] Duan W,Aguinaldo Datiles AM,Leung BP,et al. An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model[J]. Int Immunopharmacol,2005,5(3):495-502
- [16] Takeda M,Ito W,Tanabe M,et al. Allergic airway hyper-responsiveness,inflammation,and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice [J]. J Allergy Clin Immunol,2009,123(4):805-812
- [17] Dai Y,Li F,Wu L,et al. Roxithromycin treatment inhibits TGF-β1-induced activation of ERK and AKT and down-regulation of caveolin-1 in rat airway smooth muscle cells [J]. Respir Res,2014,15(6):96

[收稿日期] 2015-12-01

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6 448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1 939 种学术期刊进入核心期刊区。