

HMGB1对小鼠系膜细胞细胞周期及细胞周期相关蛋白表达的影响

封晓娟 刘淑霞* 吕欣 徐宁

(河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017)

摘要 该实验以小鼠系膜细胞MMC为研究对象, 以重组HMGB1为刺激物, 通过检测细胞周期的变化及细胞中PCNA、CyclinD1、CDK4和p16的表达水平, 初步探讨HMGB1对系膜细胞的细胞周期及其相关调控因子的影响。选取小鼠系膜细胞MMC为研究对象, 随机分为对照组及0.05 mg/L HMGB1刺激组, 经流式细胞术检测发现HMGB1能够上调小鼠系膜细胞中S期细胞所占比例; 免疫细胞化学检测显示, PCNA蛋白在小鼠系膜细胞中的表达上调; 通过RT-PCR技术及Western blot技术检测到小鼠系膜细胞中CyclinD1 mRNA和蛋白以及CDK4蛋白的高表达情况, 而p16蛋白的表达呈时间依赖性降低。由此可见, HMGB1可能是通过上调CyclinD1/CDK4的表达, 并下调p16的表达, 促进细胞从G₀/G₁期进入S期, 介导了小鼠系膜细胞的异常增殖, 可能是HMGB1参与狼疮性肾炎发病的可能机制之一。

关键词 狼疮性肾炎; HMGB1; 细胞周期; 细胞增殖; CyclinD1/CDK4/p16

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见的由免疫复合物沉积造成多器官损伤的自身免疫性疾病, 而狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)在SLE中发生率很高且难以治愈, 是该病致死的主要原因之一。系统性红斑狼疮的发病机制仍不明朗。高迁移率族蛋白1 (high mobility group protein box1, HMGB1)作为一种促炎因子, 可与炎症因子相互作用, 引发及放大炎症效应; 同时, HMGB1还介导了免疫应答的完成^[1-2]。

我们前期的实验检测了HMGB1及其可能受体在狼疮性肾炎患者的外周血及狼疮小鼠模型肾组织中的表达水平^[3-4], 结果显示: HMGB1及其可能受体在狼疮性肾炎发病过程中呈明显的高水平表达, 同时与系膜细胞增生相关, 考虑到HMGB1可能通过诱导系膜细胞的异常增殖促使了增生性肾小球肾炎的发生, 但其对系膜细胞可能的作用机制目前尚缺乏深入研究, 因此开展了此次实验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠系膜细胞MMC由本实验室冻存。

1.1.2 培养基 DMEM/F12培养基购自美国Gibco

公司。

1.1.3 主要试剂 鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和鼠抗CyclinD1多克隆抗体购自Santa Cruz公司; 兔抗CDK4多克隆抗体购自北京博奥森公司; 兔抗p16多克隆抗体和鼠抗 β -actin单克隆抗体购自石家庄博海生物公司; 辣根酶标记羊抗兔IgG和辣根酶标记羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术公司; 重组人HMGB1购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 小鼠系膜细胞MMC为本实验室冻存, 以含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基, 于37 °C、5% CO₂孵箱中培养。悬浮正常生长的小鼠系膜细胞, 按1×10⁴/孔接种于6孔板和100 mL培养瓶中, 待细胞贴壁24 h后, 轻轻吸去培养基后换含0.05 mg/L HMGB1刺激物的培养基刺激细胞, 继续孵育4, 8, 12 h, 收集不同时间点细胞, 同时设不含刺激物的阴性对照组, 每个时间点重复设6组。

1.2.2 流式细胞学检测HMGB1刺激后MMC细胞周

收稿日期: 2011-04-07 接受日期: 2011-08-02

国家自然科学基金(No.81000301)、河北省自然科学基金(No.C2010000463)和教育部博士点基金(No.20101323120007)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: susanliu1976@163.com

期的分布 悬浮并收集不同时间点细胞,生理盐水冲洗细胞两遍,70%乙醇固定细胞。以10%鸡红细胞作为内参标准,加入碘化丙啶,插入DNA荧光染色(propidium iodide, PI: 50 mg/L, Triton X-100 1.0%),4 °C冰箱避光染色30 min,铜网过滤,使样本成为合格的单细胞悬液,采用Epics-XL II型流式细胞仪进行DNA检测,应用Expo 32ADC进行免疫荧光数据分析,用Muticycle AV分析软件对DNA细胞周期拟合分析。以增殖指数(PI)表示细胞的增殖活性, $PI = (S期 + G_2M期) / (S期 + G_2M期 + G_0期 / G_1期) \times 100\%$ 。

1.2.3 免疫细胞化学检测HMGB1刺激后MMC中PCNA的表达 收集不同时间点的细胞,4%多聚甲醛固定;0.3% H₂O₂甲醇孵育,以清除内源性过氧化物酶;PBS冲洗后10%正常山羊血清封闭以减少非特异性染色;一抗4 °C过夜;PBS冲洗后生物素化羊抗鼠IgG 37 °C 30 min;PBS冲洗后辣根过氧化物酶标记的链卵白素工作液IgG 37 °C 30 min;新鲜配制的DAB-H₂O₂液显色;苏木素复染,中性树胶封片,光学显微镜下观察;免疫细胞化学染色结果判定:PCNA蛋白阳性信号主要定位于细胞核,呈黄色至棕黄色,颗粒状。

1.2.4 蛋白印迹(Western blot)检测系膜细胞中CyclinD1、CDK4和p16蛋白表达 收集不同时间点细胞,低温下提取细胞蛋白并以紫外分光光度仪定量。等量蛋白进行SDS-PAGE电泳,转膜,以5%脱脂奶粉37 °C封闭2小时,一抗4 °C过夜,浓度如下:鼠抗CyclinD1 (1:500),兔抗CDK4 (1:300),兔抗p16 (1:250)多克隆抗体、鼠抗β-actin单克隆抗体(稀释比例1:1 000)。TBST洗膜后以HPR标记的IgG二抗(1: 5 000) 37 °C封闭2 h, TBST洗膜后ECL化学发光成像。底片透扫后以LabWorks 4.5软件对条带进行定量分析,以目的条带和β-actin条带积分光密度值的比值(D值)代表目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 RT-PCR技术检测HMGB1刺激后MMC中Cy-

clinD1 mRNA的表达水平 收集不同时间点细胞,Trizol 1 mL/瓶,冰上裂解细胞,加入氯仿混匀并离心,取上层,加入异丙醇冰上静置10 min后离心,70%乙醇洗涤后以DEPC水溶解,即为RNA。紫外分光光度计定量。取等量RNA,以M-MLV反转录为cDNA, TaqDNA聚合酶催化下进行PCR扩增,引物序列见表1。经1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像,以LabWorks 4.5软件对条带进行定量分析,以目的条带和β-actin条带积分光密度值的比值(IOD值)代表目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 统计学分析 采用SPSS13.0软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGB1对小鼠系膜细胞细胞周期分布的影响

小鼠系膜细胞经HMGB1刺激4~8 h可检测到处于G₁期细胞所占比例减少,处于S期细胞所占比例明显增多,同时PI值升高,与对照组相比,其差异具有统计学意义。至HMGB1刺激12 h,其细胞周期分布与对照组相比无统计学差异(表2和图1)。

2.2 HMGB1上调小鼠系膜细胞中PCNA蛋白表达

免疫细胞化学结果显示,PCNA蛋白在对照组的小鼠系膜细胞的细胞核内有基础水平的表达,经HMGB1刺激后4 h,表达部位仍然是在细胞核内,但表达信号呈强阳性, HMGB1作用后8~12 h, PCNA蛋白的表达量逐渐下降至正常基础水平(图2)。

2.3 HMGB1能够上调小鼠系膜细胞CyclinD1 mRNA和蛋白表达

RT-PCR结果显示, *CyclinD1* mRNA在正常的小鼠系膜细胞有基础量的表达,经HMGB1刺激后, *CyclinD1* mRNA在4 h出现明显的高表达,至8 h逐渐降低,12 h降至基础水平(图3)。

Western blot结果亦显示, CyclinD1蛋白在正常

表1 引物序列及PCR反应条件
Table 1 Primer sequences and PCR reactive conditions

基因	引物序列	长度(bp)	退火温度(°C)
Genes	Primers	Length (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>CyclinD1</i>	5'-AGC TCC TGT GCT GCG AAG TGG AAA C-3'	480	59
	5'-AGT GTT CAA TGA AAT CGT GCG GGG-3'		
<i>β-actin</i>	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC A-3'	540	59
	5'-CTT CCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT C-3'		

表2 HMGB1对小鼠系膜细胞 PI值及细胞周期分布的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of PI and distribution of cell cycle of MMC cell line induced by HMGB1 in different time group by FCM ($\bar{x}\pm s$)

分组	对照组	4小时	8小时	12小时
Group	Control	4 h	8 h	12 h
G ₁ (%)	48.20±0.03	31.40±0.02	31.30±0.06	33.50±0.13
G ₂ (%)	14.60±0.06	15.70±0.04	15.60±0.27	16.20±0.02
S (%)	37.20±0.12	54.20±0.12	52.20±0.06	47.10±0.23
PI	53.80±0.17	63.70±0.13*	67.30±0.12*	57.50±0.20

*P<0.05 与对照组相比。

*P<0.05 vs control group.

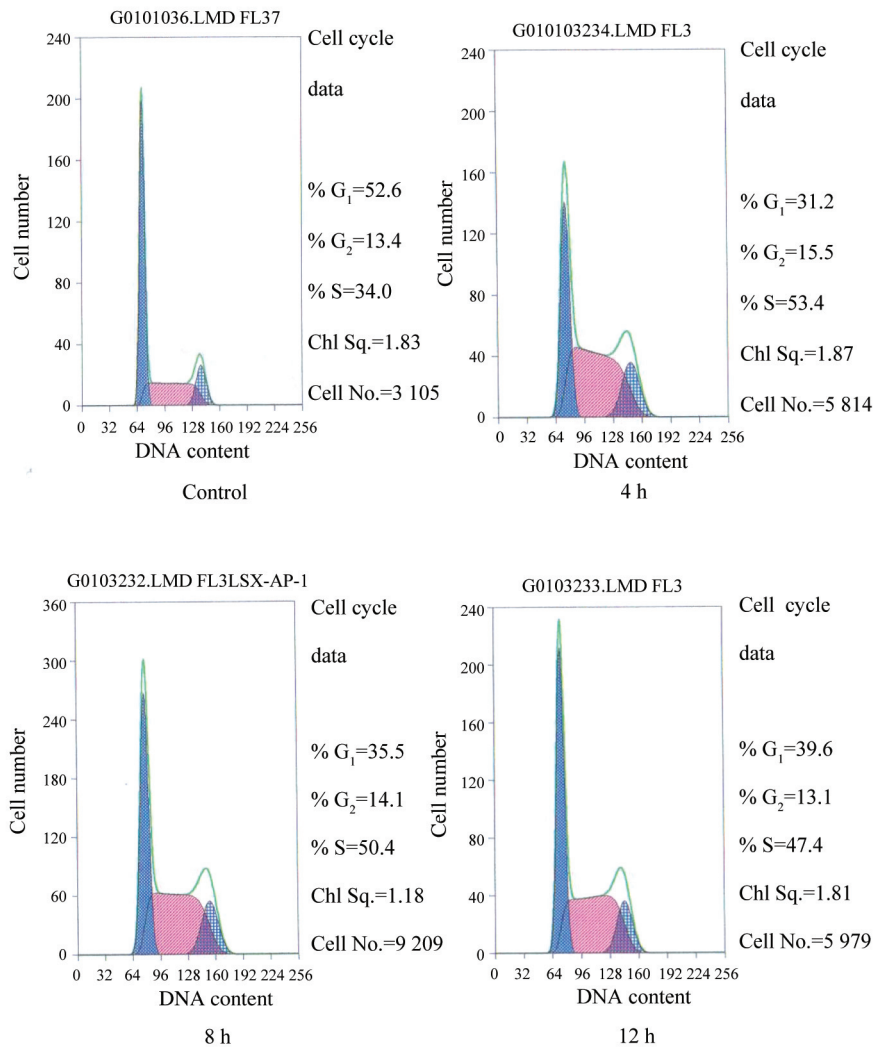


图1 流式细胞仪检测不同组MMC的细胞周期DNA直方图分布

Fig.1 DNA histograms of the cell cycle distribution of MMC cells by FCM

的小鼠系膜细胞有基础量的表达, 经HMGB1刺激后, CyclinD1蛋白在4 h出现明显的高表达, 至8 h逐渐降低, 12 h降至基础水平(图4)。

2.4 HMGB1刺激后上调小鼠系膜细胞中CDK4蛋白的表达

CDK4蛋白在正常的小鼠系膜细胞有基础量的

表达, 经HMGB1刺激后, CDK4蛋白在4 h出现明显的高表达, 至8~12 h逐渐降低(图5)。

2.5 HMGB1刺激后小鼠系膜细胞p16蛋白表达下降

P16蛋白在正常的小鼠系膜细胞有基础量的表达, 经HMGB1刺激后4 h其表达量逐渐降低, 并随刺激时间延长, 其表达下降, 并具有时间依赖性(图5)。

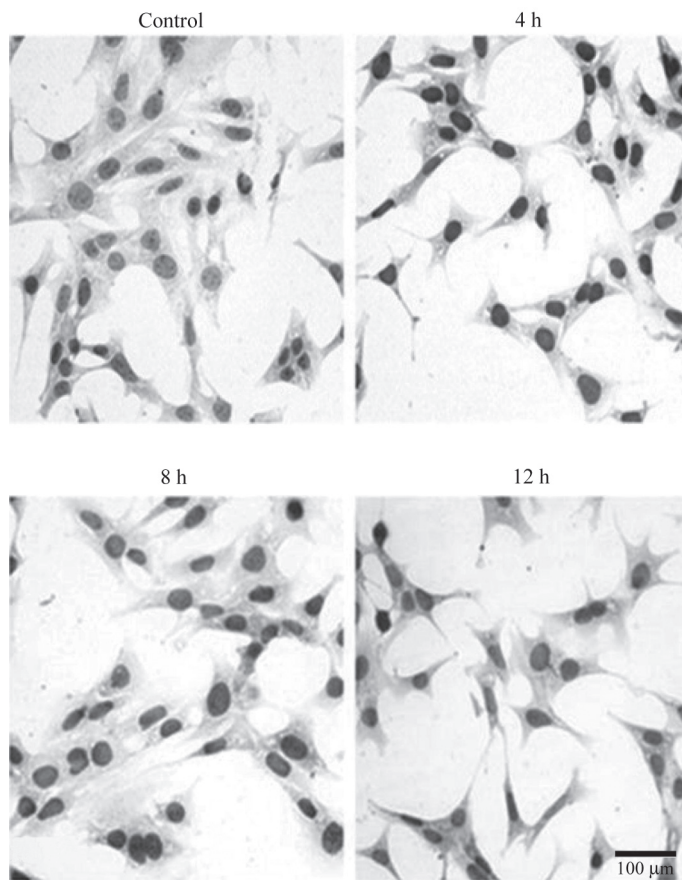
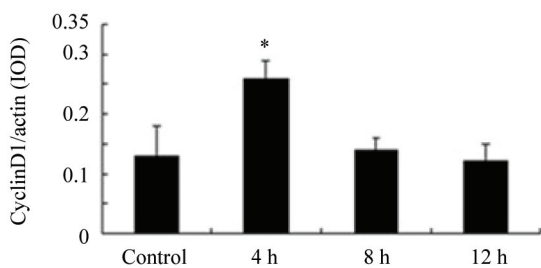
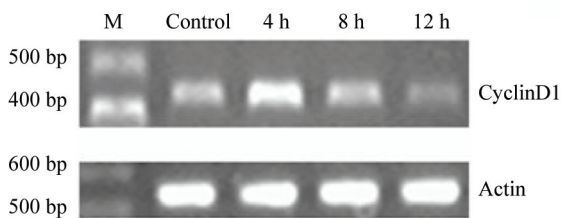


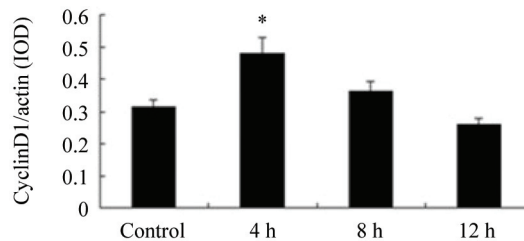
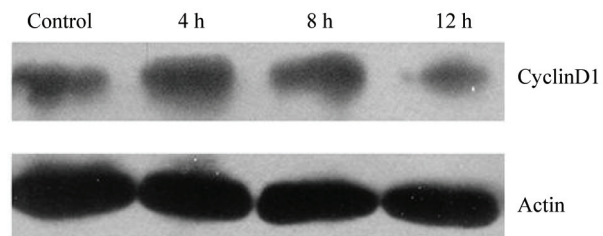
图2 细胞免疫化学检测不同组MMC中PCNA蛋白的表达
Fig.2 Expression of PCNA protein in MMC cells by ICC



* $P < 0.05$ 与对照组相比。

* $P < 0.05$ vs control group.

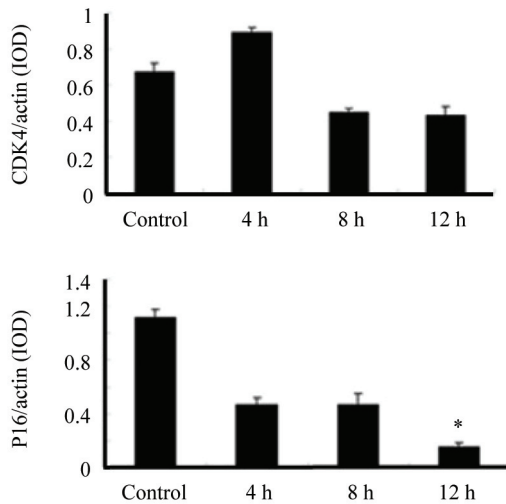
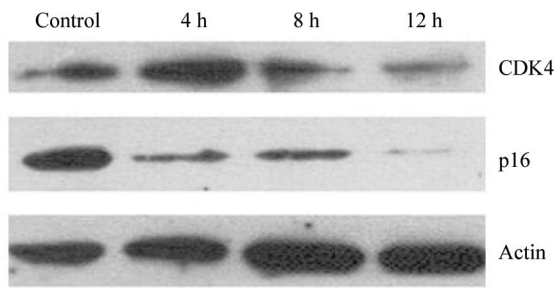
图3 RT-PCR检测不同组MMC中CyclinD1 mRNA的表达
Fig.3 Expression of CyclinD1 mRNA in MMC cells detected by RT-PCR



* $P < 0.05$ 与对照组相比。

* $P < 0.05$ vs control group.

图4 Western blot检测不同组MMC中CyclinD1蛋白的表达
Fig.4 Expression of CyclinD1 protein in MMC by Western blot



* $P < 0.05$ 与对照组相比。

* $P < 0.05$ vs control group.

图5 Western blot检测MMC中CDK4和p16蛋白的表达
Fig.5 Expression of CDK4 and p16 protein in MMC of control and HMGB1 group by Western blot

3 讨论

HMGB1是HMG超家族成员之一,因其分子量小且在凝胶电泳时泳动迁移率很高而得名。HMGB1作为一种DNA结合蛋白,在细胞核内参与维持核小体的结构、DNA重组、基因调控、稳定染色质等重大生命活动的调控^[1]。HMGB1也可由活化的单核/巨噬细胞、免疫细胞及受损或坏死细胞等分泌并释放至胞外,刺激诱导致炎因子并与其相互作用从而引发并放大炎性反应,在机体的损伤及坏死中发挥重要作用。同时, HMGB1作为一种免疫佐剂,通过与靶细胞表面的受体结合,活化细胞内的信号传导途径,为免疫细胞提供损伤或坏死信号,介导了体内的免疫应答^[2]。HMGB1还在恶性肿瘤^[7-10]、免疫性疾病^[11-13]、急性损伤及心血管疾病^[14-15]等多种疾病的发生发展过程中发挥着重要作用。Kuniyasu等^[16]研究发现,采用反义核酸技术转

染反义HMGB1,可以明显的抑制结肠肿瘤细胞在体外增殖、侵袭且其转移能力显著下降。我们前期的实验通过研究HMGB1在狼疮性肾炎患者外周血以及在狼疮性肾炎模型中表达发现, HMGB1是狼疮性肾炎发病过程中的重要的细胞因子之一,通过激活NF- κ B信号途径、JAK/STAT信号途径等多种方式参与介导了系膜细胞的增殖,从而导致狼疮性肾炎的发生,而细胞周期的失控则是导致细胞异常增殖的重要因素之一, HMGB1能否通过影响细胞周期的分布影响细胞增殖?目前研究甚少。

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在细胞核内合成并表达,作为DNA聚合酶D和E的辅助蛋白, PCNA参与了细胞增殖的启动,在细胞增殖至S期时表达量最高, G₀/G₁期及G₂期表达水平较低,是反映细胞增殖情况的良好指标^[17]。本实验以重组的HMGB1刺激正常的小鼠系膜细胞,通过免疫细胞化学方法检测小鼠细胞核内PCNA蛋白的表达情况,结果显示,与正常细胞相比,经HMGB1刺激后4 h,系膜细胞中PCNA呈高表达状态,但随着刺激时间的延长,表达降低;流式细胞术结果亦提示, HMGB1刺激4 h时细胞的增殖指数(PI)最高,其趋势与PCNA蛋白表达相一致,提示HMGB1刺激早期能够促进系膜细胞增生。

细胞周期是指细胞从前一次分裂结束到下一次分裂开始的过程,分为G₁期、S期(DNA合成期)、G₂期和M期。细胞在适当的刺激下,可由G₀/G₁期进入S期,开始增殖分裂活动。我们对刺激后的小鼠系膜细胞进行了流式细胞学检测,发现其细胞周期分布存在异常,处于G₁期细胞数比例明显减少,而处于S期细胞比例增加,提示HMGB1可能通过促进细胞从G₁期向S期转化促进细胞增生的。

细胞周期的调控是由细胞周期正控蛋白和负控蛋白共同完成的。CyclinD1是细胞周期蛋白的亚型之一,在G₁早期表达,与多种蛋白相互作用促进细胞进入S期,是细胞周期的启动因子。正常情况下, CyclinD1在G₁期呈恒定水平表达,一旦其表达增强,便有可能诱导细胞提前进入S期,从而使细胞周期缩短,加快细胞增殖。细胞周期蛋白依赖性激酶CDK属于细胞周期的正性调节蛋白,其中, CDK4可与CyclinD1形成激酶复合物,此复合物能够促进细胞由G₀/G₁期进入S期,从而实现其正性调节作用^[18]。本实验通过检测HMGB1刺激后小鼠系膜细胞Cy-

clinD1的表达发现, 在HMGB1作用后初期4 h左右, *CyclinD1* mRNA和蛋白以及CDK4蛋白呈现有明显高于正常水平的过表达, 提示HMGB1可能通过某种信号途径, 诱导了CyclinD1及CDK4的过度表达及CyclinD1-CDK4复合物的明显增多, 而其活性复合物通过介导细胞周期的变化, 促使细胞G₀/G₁期进入S期, 实现小鼠系膜细胞的过度增殖, 从而导致了增生性的肾小球肾炎的形成, 而这一过程是狼疮性肾炎发病的重要机制。

INK4家族及CIP/KIP家族统称为CKI, 即细胞周期负性调控蛋白, CKI通过抑制Cyclin-CDK复合物起到负性调节蛋白的作用。这种调节通过多种调节途径实现, 目前, 关于p16/CyclinD1/CDK4负向调控通路的研究比较明确。p16作为INK4家族的一员, 可与CyclinD1竞争性结合CDK4, 从而抑制Cyclin-CDK4复合物的活性, 实现其负性调节作用^[6]。本实验结果支持上述理论: 随着CyclinD1的过表达, p16蛋白的表达量下降, 从而在一定程度上加剧了CyclinD1-CDK4复合体所诱导的细胞的过度增殖及异常分化。

综上所述, 经HMGB1刺激初期小鼠系膜细胞增殖指标PCNA就呈现出高水平的表达, 其表达趋势与细胞周期蛋白调控因子CyclinD1、CDK4的表达趋势相同, 而细胞周期的变化也与CyclinD1-CDK4表达一致, 提示HMGB1可能通过某种信号途径, 促进细胞CyclinD1-CDK4复合物活化影响了细胞周期, 使细胞由G₀/G₁期进入S期, 从而启动了细胞的新一轮生长周期, 同时可能是通过抑制细胞周期蛋白激酶抑制剂p16, 使其表达远低于正常的基础水平并维持较长时间, 减弱了其CyclinD1竞争结合CDK4的能力, 在更大程度上加大了CyclinD1-CDK4复合物的表达活性, 起到了促进系膜细胞增殖转化的作用, 而这有可能是其介导狼疮肾炎中增殖性肾小球肾炎发生的途径。

参考文献 (References)

- 1 Deruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007; 369(9561): 587-96.
- 2 朱明光, 常雅萍. 高迁移率族蛋白B1的致炎因子作用研究进展. *国际免疫学杂志* 2006; 29(4): 257-60.
- 3 唐丽娟, 郝军, 陈宁, 郭惠芳, 刘青娟, 刘淑霞. TLR/STAT通路在HMGB1诱导的系膜细胞增殖中的作用. *中国免疫学杂志* 2009; 25(7): 658-61.
- 4 封晓娟, 刘淑霞, 张玉军, 郭惠芳, 郝军, 陈宁, 等. NF- κ B信号途径在小鼠狼疮性肾炎发病中的可能作用. *中国免疫学杂志* 2010; 26(2): 169-73, 177.
- 5 Xu J, Morris GF. p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear anti-gen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 12-20.
- 6 吴松. 正常妊娠及老化胎盘组织中PCNA蛋白表达的研究. *黑龙江医学* 2007; 31(5): 339-40.
- 7 Pullerits R, Jonsson IM, Kollias G, Tarkowski A. Induction of arthritis by high mobility group box chromosomal protein 1 is independent of tumour necrosis factor signalling. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(3): R72.
- 8 黄庆先, 王国斌, 孙念峰, 王春友. 高迁移率族蛋白1反义核酸抑制人胰腺癌细胞系PCNA-1侵袭的研究. *癌症* 2004; 23(9): 1036-40.
- 9 黄庆先, 孙念峰, 王国斌, 王春友. 高迁移率族蛋白基因在胰腺癌组织中的表达及其临床意义. *实用癌症杂志* 2004; 19(1): 19-23.
- 10 Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H. Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer. *Cancer* 2003; 104(6): 722-7.
- 11 Tanaka H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakahata T, Ito E. Long-term mizoribine intermittent pulse therapy for young patients with flare of lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* 2006; 21(7): 962-6.
- 12 孙利平, 杨丽丽, 米亚英, 武永明, 王建宾. 应用高迁移率族蛋白1探索系统性红斑狼疮发病机制. *实用医技杂志* 2010; 17(11): 1009-11.
- 13 刘淑霞, 郭惠芳, 张玉军, 刘青娟, 唐丽娟, 段惠军. 高迁移率族蛋白及其受体TOLL样受体4在系统性红斑狼疮肾脏损害中的作用. *中国免疫学杂志* 2008; 24(10): 948-51.
- 14 Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, *et al.* High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003; 48(4): 971-81.
- 15 Hulda S H, Therese O, Heidi W, Hanna S, Ann-Charlotte A, Lena K, *et al.* The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3): 3655-62.
- 16 Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H. Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Cancer* 2003; 104(6): 722-7.
- 17 Xu J, Morris GF. p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1): 12-20.
- 18 Lees E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(6): 773-80.
- 19 邹琼, 章宗籍, 申丽娟, 张华献, 雷普平, 熊昌庆. 人类肝癌发生过程中CyclinD1和CDK4及p16蛋白的表达. *肿瘤防治杂志* 2005; 12(15): 1127-30.

The Effect of High Mobility Group Box 1 on Cell Cycle Distribution and the Expression of Cell Cycle Protein in Mouse Mesangial Cell

Feng Xiaojuan, Liu Shuxia*, Lü Xin, Xu Ning

(Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract At this study we detected the distribution of cell cycle and the expression changes of PCNA, CyclinD1, CDK4 and p16 in MMC. We also analyze the relationship among them in order to explore the possible effect of HMGB1 on the generation of MMC. MMC were obtained from the Department of Medical Pathology of Hebei Medical University. MMC selected for the study were randomly divided into control group and HMGB1 stimulation group (0.05 mg/L). The cells were collected after 4, 8, 12 h. The changes in cells cycle distribution were detected by flow cytometry. Immunocytochemical stain were used to detect the over expression of PCNA protein in MMC; the level of *CyclinD1* mRNA were detected by RT-PCR; Western blot detected that HMGB1 up-regulated the levels of CDK4 protein and the CyclinD1 protein in MMC, decreased the expression of p16 protein in MMC. We can see that: HMGB1 could induce mouse mesangial cells proliferation and promote the transition of cell cycle from G₁ stage to S stage by up-regulating CyclinD1/CDK4/p16 pathway, which might be an effect mechanism of HMGB1 in lupus nephritis pathogenesis.

Key Words Lupus nephritis; HMGB1; cell cycle; cell proliferation; CyclinD1/CDK4/p16

Received: April 7, 2011 Accepted: August 2, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81000301), Hebei Provincial Natural Science Foundation (No. C2010000463) and the Doctoral Fund of Youth Scholars of Ministry of Education of China (No.20101323120007)

*Corresponding author. Tel: 86-311-886265734, E-mail: susanliu1976@163.com