

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.07.005

LPS 对宫颈癌细胞 HMGB1 主动释放及侵袭转移能力的影响

王景¹, 蔡红兵², 李伟³, 李著艳²

Effect of LPS Stimulation on Active Release of HMGB1 in Cervical Cancer Cells and Ability of Invasion and Migration

WANG Jing¹, CAI Hongbing², LI Wei³, LI Zhuyan²

1. Department of Gynecology and Obstetric, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021, China; 2. Department of Gynecological Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University; 3. Department of Gynecology and Obstetric, Xiangyang No. 1 People's Hospital

Corresponding Author: CAI Hongbing, E-mail: chb2105@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of LPS stimulation on the active release of HMGB1 in Cervical cancer cells and the ability of invasion and migration. **Methods** Three cell lines were cultured in DMEM: HeLa cell lines, C33A cell lines and HUVEC cell lines (Normal cervical epithelial cells). Western blot was used to detect the intracellular and extracellular protein expression changes of HMGB1 before and after LPS added to the three cell lines. Transwell assay was used to compare the ability of invasion and migration before and after LPS added. **Results** After stimulated with 100 ng/ml LPS, intracellular total protein HMGB1 all decreased in the three cells, while the expression of HMGB1 in the supernatant increased ($P < 0.05$); the ability of invasion and migration in HeLa and C33A cancer cells significantly enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion** LPS could facilitate the active release of HMGB1 in cervical cancer cells, and therefore enhanced the ability of invasion and migration.

Key words: Lipopolysaccharide(LPS); High-mobility group box-1; Cervical cancer cells; Tumour cell invasion

摘要:目的 探讨脂多糖(LPS)对宫颈癌细胞 HMGB1 主动释放及侵袭迁移能力的影响。**方法** 高糖培养液培养三种细胞系:宫颈癌 HeLa 细胞系、宫颈癌 C33A 细胞系和正常宫颈上皮 HUVEC 细胞系,加 LPS 前后分别做 Western blot 检测 HMGB1 在宫颈癌细胞系(HeLa 和 C33A)及正常宫颈上皮 HUVEC 细胞系细胞内外的表达情况。LPS 刺激前后行小室细胞侵袭实验分析检测宫颈癌细胞株的侵袭迁移能力。**结果** 100 ng/ml LPS 刺激后,三种细胞内 HMGB1 总蛋白较刺激前均减少,而上清液 HMGB1 表达增加($P < 0.05$);HeLa 及 C33A 宫颈癌细胞侵袭迁移能力明显增强($P < 0.05$)。**结论** LPS 能刺激宫颈癌细胞 HMGB1 主动释放从而增强其侵袭迁移能力。

关键词: 脂多糖;高迁移率族蛋白 1;宫颈癌细胞;肿瘤侵袭

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A

0 引言

迄今已有大量研究证实,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移过程中发挥重要的作用, HMGB1 的过表达几乎存在于所有类型的肿瘤细胞

(结肠癌、胰腺癌、胃癌等)。胞外的 HMGB1 促进肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤血管再生,导致肿瘤进一步长大并向远处转移^[1]。脂多糖(LPS)能激活 JAK/STAT 通路从而促进肝癌细胞 HMGB1 的胞外释放^[2]。那么对于宫颈癌细胞, LPS 能否诱导其主动释放 HMGB1;假如能证明 LPS 可以诱导宫颈癌 HeLa 和 C33A 细胞主动释放 HMGB1,那么释放至胞外的这些 HMGB1 究竟能否增强宫颈癌细胞侵袭迁移能力。如果这些问题得到证实,将为 HMGB1 对宫颈癌作用机制的后续研究奠定基础,这也是本实验的初衷及目的。

收稿日期:2012-07-20;修回日期:2012-12-17

作者单位:1. 441021 襄阳,襄阳市中心医院(湖北文理学院附属医院)妇产科;2. 武汉大学中南医院妇科;3. 襄阳市第一人民医院妇产科

通信作者:蔡红兵, E-mail: chb2105@163.com

作者简介:王景(1985-),男,硕士,住院医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究

1 材料与方法

1.1 材料

主要仪器设备及 HeLa、C33A、正常宫颈上皮细胞系均由武汉大学中南医院科学研究中心提供, HMGB1 抗体购自美国 Sigma 公司, GAPDH 抗体购自海基生物科技有限公司, HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, Matrigel 基质胶购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司, 24-Tranwell 板(Coster)购自北京科瑞公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞准备 HeLa、C33A、HUCEC 细胞用 DMEM 加 10% FCS 培养, 据细胞密度 3~5 天传一代, 取对数生长期细胞 0.25% 胰酶消化后, 无血清培养液洗 3 次, 制成单细胞悬液。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 收集对数期细胞, 转种于 96 孔平底板中, 以 100 ng/ml 的 LPS 分别刺激 4、12、24、36 和 48 h, 每孔加入 20 μ l MTT 溶液, 继续培养 4 h。吸去孔内培养液, 每孔加 150 μ l 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min。设置对照及调零孔后, 在酶联免疫检测仪 OD_{490 nm} 处测量各孔的吸光度值, 计算细胞存活率。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达 将三组细胞悬液接种于 6 孔板, 每组细胞接种 2 孔。三组细胞各取一孔加 LPS, LPS 终浓度为 100 ng/ml。LPS 刺激 24 h 后收获各组细胞各约 1×10^6 个, 蛋白裂解液裂解蛋白、变性, 各细胞组均取蛋白 50 μ g, 10% SDS-PAGE 电泳, 湿法转印 PVDF 膜, TBST 漂洗后, 5% 脱脂奶粉封闭, 各组分别加 HMGB1 及 GAPDH 一抗、二抗孵育, ECL 显色, 胶片曝光应用灰度分析软件半定量分析。

1.2.4 侵袭小室的构建 Matrigel 胶用 4 $^{\circ}$ C DMEM 稀释, 每个侵袭小室 30 μ l, 确保人工基质胶能将膜上所有微孔覆盖。制备好的小室紫外线照射 2 h 杀菌, 使用前加少量无血清培养液水化, 取一小室用考马斯亮蓝染色确定无漏孔。

1.2.5 体外侵袭能力的测定 上述备用细胞悬液中 HeLa、C33A 细胞、HUCEC 细胞悬液均取细胞数为 1×10^5 , 加入侵袭小室上室内, 每组细胞用 2 个小室, 其中三组细胞各取一小室加 LPS 终浓度为 100 ng/ml, 每小室总体积为 200 μ l。下室内加入 DMEM 和 FCS 共 600 μ l, 使 FCS 浓度为 20%。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 36 h, 棉签擦净上室面细胞, 甲醛固定后, 结晶紫染色, 400 倍光学显微镜下取上、下、左、右 4 个视野, 计数下室面的细胞数, 取均数。

1.3 统计学方法

数据均由 SPSS13.0 统计软件分析, HMGB1

蛋白表达量及细胞侵袭个数用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞存活率

C33A、HeLa 及 HUCEC 细胞以 100 ng/ml 的 LPS 分别刺激 4、12、24、36 和 48 h, 检测存活率绘制曲线, 见图 1, LPS 刺激超过 24 h 后, 细胞存活率不足 90%。为减少坏死细胞被动释放 HMGB1 对实验的干扰, 实验选择 LPS 刺激 24 h 最佳。

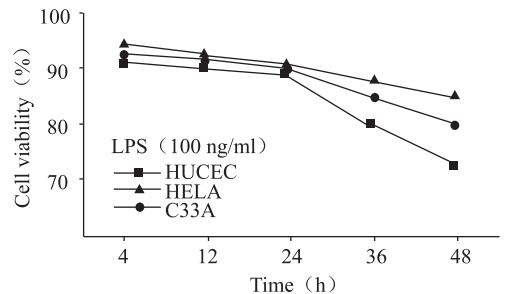


图 1 LPS(100 ng/ml) 刺激不同时间的细胞存活率

Figure 1 LPS (100 ng/ml) used to stimulate the different times of cell viability

2.2 Western blot 检测 LPS 刺激后 C33A、HeLa 及 HUCEC 细胞内外 HMGB1 蛋白变化

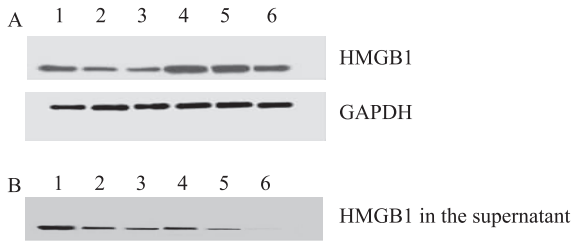
C33A、HeLa 及 HUCEC 细胞加 LPS 刺激前后提取细胞内 HMGB1 蛋白行 Western blot 检测, 结果见图 2A, 收集细胞上清液浓缩后行 Western blot 检测, 结果见图 2B; 统计学分析采用 *t* 检验, 三种细胞经 LPS 刺激后胞内 HMGB1 蛋白均明显减少, $P < 0.05$ 。图 3 结果可见 C33A、HeLa 及 HUCEC 细胞经 LPS 刺激后, 胞外 HMGB1 相对增多。

2.3 小室侵袭实验分析 LPS 刺激后细胞侵袭能力的变化

加 LPS 刺激前后的 HUCEC 细胞照相如图 3A、3B; C33A 细胞如图 3C、3D; HeLa 细胞如图 3E、3F; 统计学分析采用 *t* 检验, 加 LPS 刺激后 C33A、HeLa 及 HUCEC 细胞侵袭数与加 LPS 前相比均显著增多, $P < 0.05$ 。

3 讨论

研究已经证实, HMGB1 在神经系统肿瘤、肺癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌、前列腺癌中过表达^[3-7], 还可以作为治疗前列腺癌的有效靶点^[8]; HMGB1 在宫颈癌细胞中过表达, 其可以作为评价肿瘤侵袭、转移及预后的参数之一, 可成为基因治疗的新靶点^[9]; HMGB1 在子宫内膜癌中高表达, 且随着手术病理



HMGB1: high mobility group box 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

A; 1, 4: the HMGB1 protein of the HeLa cells LPS stimulated before and after; 2, 5: the HMGB1 protein of the C33A cells LPS stimulated before and after; 3, 6: the HMGB1 protein of the HUVEC cells LPS stimulated before and after; B; 1, 4: the HMGB1 protein in the supernatant of HeLa cells LPS stimulated before and after; 2, 5: the HMGB1 protein in the supernatant of the C33A cells LPS stimulated before and after; 3, 6: the HMGB1 protein in the supernatant of the HUVEC cells LPS stimulated before and after

A: HMGB1 protein in the cells before and after LPS stimulation (GAPDH was the internal reference) B: the change of HMGB1 protein in the supernatant before and after LPS stimulation

图 2 LPS 刺激前后细胞内和上清液 HMGB1 蛋白的变化 (GAPDH 为内参)

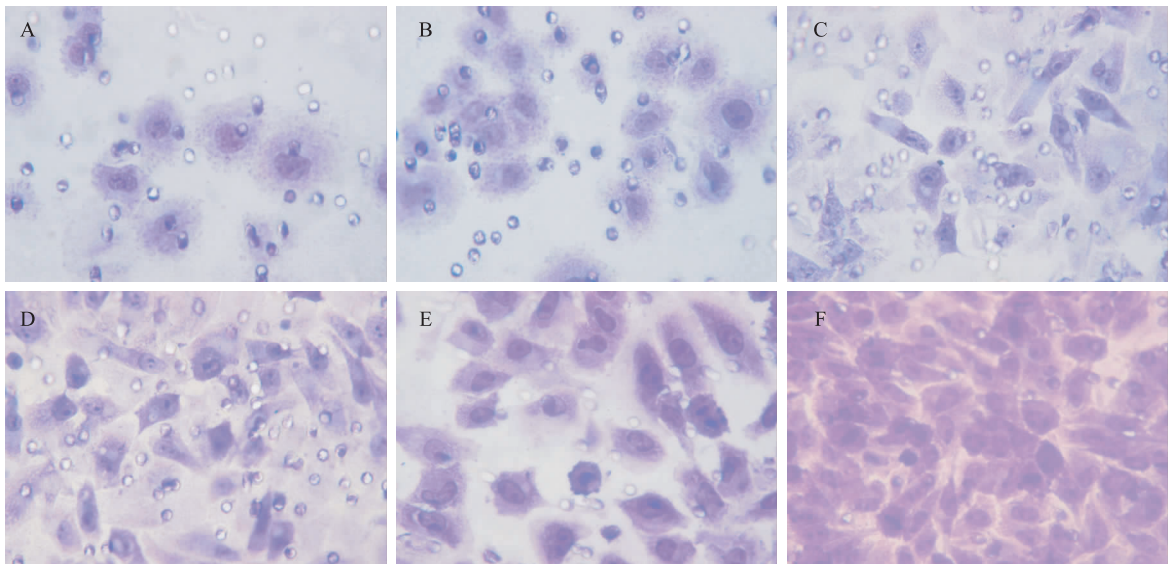
Figure 2 HMGB1 protein in the cells and in the supernatant before and after LPS stimulation (GAPDH was the internal reference)

分级的增加其表达也增加^[10]; 在卵巢癌中 HMGB1 基因的表达是评价卵巢癌化疗疗效的重要指标^[11]。

细胞内 HMGB1 可通过细胞的被动释放和主动分泌两种方式向胞外转运, 被动释放即受损和坏

死的细胞膜通透性增高, 使细胞肿胀裂解, 释放细胞内的 HMGB1, 而主动分泌是单核巨噬细胞等受脂多糖、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1、生物活性脂或干扰素等刺激后, 经分泌型溶解酶体转运, 并依赖胞外 ATP 或可溶性磷脂酰肌醇介导的分泌信号向胞外分泌 HMGB1^[12]。HMGB1 缺少信号肽, 不能通过内质网和高尔基体而通过溶血磷脂酰胆碱触发, 以一种非典型的囊泡方式将核 HMGB1 释放。而最近研究发现, HMGB1 是经过经典型蛋白激酶 C 途径发生磷酸化, 以钙依赖机制分泌到胞外^[13]。HMGB1 并非总是在细胞坏死的过程当中被动释放到细胞外, 有一些活化的免疫细胞在受刺激后可主动释放 HMGB1。

本实验中给予 100 ng/ml 的 LPS 刺激三组细胞, MTT 实验证实加 LPS 作用 24 h 细胞存活率均在 90% 以上, 排除因 LPS 所致细胞坏死导致 HMGB1 蛋白被动释放至胞外, 三种细胞内的 HMGB1 总蛋白均减少且细胞外 HMGB1 增加, 与刺激前相比较, 差异有统计学意义。而 Western blot 实验中 LPS 刺激之前 HeLa 细胞内的 HMGB1 蛋白的表达与 C33A 细胞及正常宫颈上皮细胞相比明显增高, 且差异均有统计学意义; C33A 细胞内的 HMGB1 蛋白明显高于正常宫颈上皮细胞, 差异也具有统计学意义。可能是由于三种细胞本身 E6 基因的作用所致, HeLa 细胞 E6 基因高表达, C33A 细胞 E6 基因缺陷, 而正常宫颈上皮细胞除 E6



A, B: the cell number of the HUVEC cells LPS stimulated before and after; C, D: the cell number of the C33A cells LPS stimulated before and after; E, F: the cell number of HeLa cells LPS stimulated before and after

图 3 LPS 刺激前后三种细胞侵袭能力的变化 (结晶紫 × 400)

Figure 3 The cell number of small rooms invasion assay before and after LPS stimulated in three cells (crystal violet × 400)

基因外, E5、E7 等其他致癌基因均不表达。Western blot 显示三种细胞加 LPS 刺激前后细胞内 HMGB1 蛋白量均减少, 同时三种细胞 HMGB1 胞外释放增多, MTT 实验排除坏死细胞被动释放 HMGB1, 说明 LPS 刺激细胞内 HMGB1 主动释放至胞外。

本侵袭实验中, 三种细胞加 LPS 刺激后透过人工基底膜的细胞数明显增多, 即侵袭能力增强, 表明释放至胞外的 HMGB1 与肿瘤细胞侵袭性有密切的关系。

HMGB1 蛋白可能作用于纤维蛋白溶酶催化系统, 该系统包括调节细胞的周围蛋白溶酶活性、炎症浸润、细胞转移、组织损伤修复、纤维蛋白溶解和肿瘤浸润。有研究发现 HMGB1 可结合于纤溶酶原系统几个组成部分, 且提高纤维蛋白溶酶催化活性。Taguchi 等^[14]发现, HMGB1 蛋白通过与 RAGE 结合, 可激活 MAPK、P38、JNK 和 P42/P44 等信号通路, 继而导致 MMP-2 和-9 激活, 后两者为纤维蛋白溶酶激活级联下游目标, 可使细胞外基质降解而促进肿瘤浸润转移。推测肿瘤转移可能是由于在较大肿瘤组织内部, 坏死的肿瘤细胞释放 HMGB1 蛋白至周围环境作用于纤溶系统破坏基底膜和细胞外基质所致; 肿瘤的侵犯则是通过与同种类型肿瘤外围肿瘤细胞上的 RAGE 受体结合完成。

总之 HMGB1 在多种动物及人类肿瘤组织中表达, 且其表达水平与肿瘤的发生和浸润性生长密切相关, 但是其与肿瘤生长转移的确切关系仍需临床实验进一步证实。是否可以通过个体化治疗抑制 HMGB1 过度表达而达到预防肿瘤的发生和转移的目的? 在恶性肿瘤的预后方面, 是否可以通过对 HMGB1 促进肿瘤生长、转移的信号转导途径及分子机制的研究, 进一步明确在不同肿瘤中 HMGB1 的表达变化规律, 从而预测肿瘤的治疗效果? 是否可以利用 HMGB1 对抗癌药物的影响研制出一些相关制剂如抗 HMGB1 抗体治疗恶性肿瘤? 这一系列的问题尚有待深入研究, 相信 HMGB1 将会为治疗肿瘤提供一个全新的、重要的靶点。

参考文献:

[1] Friedmen SG, Czura CJ, Tracey KJ. The gesture life of high mobility group box 1[J]. *Cure Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6(3):283-7.

- [2] Zhang J, Shuai ZX, Hu ZH, *et al.* Effect of JAK/STAT signaling pathway on extracellular release of HMGB1 in lipopolysaccharide-induced hepatocytes[J]. *Nanjing Yi Ke Da Xue Xue Bao: Zi Ran Ke Xue Ban*, 2009, 29(11):1514-6. [张健, 帅朝霞, 胡志刚, 等. JAK/STAT 通路在脂多糖诱导肝细胞 HMGB1 释放中的作用[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2009, 29(11):1514-6.]
- [3] Curtin JF, Liu N, Candolfi M, *et al.* HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression[J]. *PLoS Med*, 2009, 6(1):e10.
- [4] Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, *et al.* RAGE and RAGE ligands in cancer[J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(8):777-89.
- [5] Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, *et al.* Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(2):184-9.
- [6] Song Z, Liu Q, Bao GQ, *et al.* The expression of HMGB1 in colorectal cancer and its significance[J]. *Xian Dai Zhong Liu Yi Xue*, 2008, 16(7):1191-4. [宋舟, 刘屹, 包国强, 等. HMGB1 在大肠癌组织中的表达及其意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(7):1191-4.]
- [7] Jiao Y, Wang HC, Fan SJ. Growth suppression and radiosensitivity increase by HMGB1 in breast cancer[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(12):1957-67.
- [8] Gnanasekar M, Thimnnam S, Ramaswamy K. Short hairpin RNA(shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(2):425-31.
- [9] Fu X, Du XQ, Hao Q. Expression of HMGB1 protein in human cervical squamous epithelium carcinoma[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2008, 5(1):53-7.
- [10] Luan YF, Huang GX. High mobility group box-1 in endometrial cancer research progress[J]. *Zhongguo Dang Dai Yi Yao*, 2010, 17(36):16. [栾允峰, 黄桂香. HMGB1 在子宫内膜癌方面的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2010, 17(36):16.]
- [11] Su WM, Bi MH. High mobility group protein B1 expression and in tumor invasiveness[J]. *Lin Chuang Fei Ke Za Zhi*, 2011, 16(2):245-7. [苏卫民, 毕明宏. 高迁移率族蛋白 B1 的表达与肿瘤侵袭性的关系[J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16(2):245-7.]
- [12] Jing RR, Wang HM. HMGB1 gene, an important regulatory gene of tumors[J]. *Xian Dai Jian Yan Yi Xue Za Zhi*, 2007, 22(4):70-2. [景蓉蓉, 王惠民. HMGB1 基因一个重要的肿瘤调节基因[J]. *现代检验医学杂志*, 2007, 22(4):70-2.]
- [13] Oh YJ, Youn JH, Ji Y, *et al.* HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2009, 182(9):5800-9.
- [14] Taguchi A, Blood DC, del Toro G, *et al.* Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastasis[J]. *Nature*, 2000, 405(6784):354-60.

[编辑校对:刘红武]