

电离辐射对不同放射敏感性细胞中高迁移率簇蛋白 B1 的诱导表达作用

康红 杨慧 柯少波 周福祥 周云峰

430071 武汉大学中南医院放化疗科 湖北省肿瘤生物学行为重点实验室

通信作者:周云峰, Email: yfzhouwu@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2016.07.002

【摘要】 目的 探讨电离辐射对已建立的宫颈癌放射抗拒细胞对比模型中高迁移率簇蛋白 B1 (HMGB1) 和 mRNA 诱导表达的差异性, 分析 HMGB1 对宫颈癌放射敏感性调控的可能性。**方法** 人宫颈癌细胞系 HeLa 重复照射 12 次后, 传代培养调整细胞状态至细胞增殖稳定, 筛选得抗拒细胞系 HeLaR。以 2、5、10 Gy X 射线分别照射亲代 HeLa 和 HeLaR 细胞, 于照射后 0、0.5、2、4、6、12、18、24、36、48 h 收集细胞, 提取蛋白质和 RNA, 采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR 法分别检测样本中 HMGB1 蛋白和 mRNA 的表达情况。**结果** 在蛋白水平, 2、5、10 Gy X 射线照射后, HeLaR 细胞在 48 h 内均表现为 HMGB1 表达量下降, 在 48 h 达到未照射水平, 后有增加趋势, 与照射后 0 h 比较, 2、5、10 Gy 照射后 6~36 h 各时间点, 差异具有统计学意义 ($t=3.574\sim9.754, P<0.05$); 相反, HeLa 细胞在照射后 6 h, 其 HMGB1 表达逐渐增多, 尤其在 5 和 10 Gy 表现明显, 与照射后 0 h 比较, 2 Gy 照射后 6、12、48 h ($t=3.945\sim4.864, P<0.05$)、5 Gy 照射后 6、36、48 h ($t=-2.875\sim3.295, P<0.05$) 及 10 Gy 照射后 36、48 h ($t=-4.480, -4.517, P<0.05$), 差异具有统计学意义。在 mRNA 水平其趋势与蛋白水平基本一致。**结论** 不同剂量 X 射线照射后可诱导人宫颈癌细胞中 HMGB1 的表达变化, 且其变化在人宫颈癌放射敏感细胞及放射抗拒细胞中不同。HMGB1 可能参与人宫颈癌放射抗拒机制。

【关键词】 高迁移率簇蛋白 B1; 放射抗拒; 放射敏感性; 电离辐射

基金项目: 国家自然科学基金(81472799)

Radiation induced expression of HMGB1 in the cells with different radiosensitivity Kang Hong,

Yang Hui, Ke Shaobo, Zhou Fuxiang, Zhou Yunfeng

Department of Radiation Oncology and Medical Oncology, Zhongnan Hospital Affiliated to Wuhan University

Hubei Key Laboratory of Tumor Biological Behavior, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Zhou Yunfeng, Email: yfzhouwu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ionizing radiation (IR) on the expressions of HMGB1 in the radiation-sensitive and radiation-resistant human cervical cancer cells and to analysis the role of HMGB1 in the regulation of radiosensitivity. **Methods** Human cervical cancer cells HeLa and its radioresistant strain HeLaR cells were irradiated with different doses of X-rays. The cells were collected at different time points after irradiation. The expressions of protein and mRNA of HMGB1 were detected by Western blot and real-time quantitative PCR. **Results** At the protein level, the expression of HMGB1 in HeLaR cells was significantly reduced at 6~36 h after 2, 5 and 10 Gy X-ray irradiation ($t=3.574\sim9.754, P<0.05$), and then it was recovered to the control level at 48 h after IR. On the contrary, the expression of HMGB1 in HeLa cells was significantly increased at 6, 12, 48 h after 2 Gy IR ($t=3.945\sim4.864, P<0.05$), at 6, 36, 48 h after 5 Gy IR ($t=-2.875\sim3.295, P<0.05$), and at 36, 48 h after 10 Gy IR ($t=-4.480, -4.517, P<0.05$). At mRNA level, the trend of HMGB1 expression alteration was consistent with that of protein expression. **Conclusions** The changes of HMGB1 expression can be differently induced by X-rays in the human cervical cancer radiation-sensitivity cells and radiation-resistant cells. HMGB1 may be involved in the radioresistance of human cervical cancer.

【Key words】 High mobility group box 1; Radioresistance; Radiosensitive; Ionizing radiation

Fund program: National Natural Science Foundation(81472799)

宫颈癌是全球女性的第 3 位新发恶性肿瘤。放射治疗作为其主要的治疗手段,在临床治疗中取得了良好效果,但复发患者的 5 年生存率不足 15%^[1]。因此,探索宫颈癌放疗抗拒机制,提高放疗敏感性具有重要意义。

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种非组蛋白染色体蛋白,其在胃癌、食管癌、乳腺癌、肺癌 中高表达,且与预后呈明显的负相关性^[2-5]。有研究表明抑制 HMGB1 后,乳腺癌侵袭转移能力和放射抗拒性皆降低^[6],但也有研究提示在野生型 Rb 基因表达的乳腺癌中,过表达 HMGB1 导致了生长抑制和放射增敏^[7]。除此之外,本课题组前期采用差异蛋白质组学技术,筛选喉鳞癌放射敏感/抗拒细胞模型中差异表达的蛋白质,发现 HMGB1 属于明显差异表达的蛋白质之一^[8]。然而, HMGB1 的表达是否与细胞的放射敏感性相关,且其表达是否受射线调控尚不明确。因此,本研究旨在探索不同剂量射线作用于同一遗传背景放射敏感性不同的细胞后 HMGB1 的表达变化。

材料与amp;方法

1. 细胞与试剂:人宫颈癌细胞系 HeLa 购于中国科学院上海细胞库,人宫颈癌放射抗拒细胞系 HeLaR 为本室诱导建立。MEM 培养液、胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司,蛋白裂解液购自美国 Thermo 公司,BCA 蛋白质定量试剂盒、Real-Master—Mix (SYBR Green) 试剂购自北京天根生化公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自美国 Promega 公司,抗 HMGB1 抗体购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥公司。

2. 建立放射抗拒细胞模型:将 HeLa 细胞培养于 75 cm² 培养瓶中,待细胞长至 60% 密度时进行 2 Gy X 射线照射。待细胞长至 80% 左右时,消化传代至新的培养瓶。直至细胞长至 60% 密度时,再次进行照射,如此反复,直至照射总剂量达到 72 Gy。将所获得的细胞命名为 HeLaR 细胞。

3. 细胞培养:将 HeLa 及 HeLaR 细胞系在含有 10% FBS 的 MEM 培养液中,5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

4. 照射条件:利用德国西门子 Primus 直线加速器,6 MV X 射线,35 cm × 35 cm 照射野,源靶距

100 cm,分别给予不同剂量的 X 射线单次照射 (2、5、10 Gy)。吸收剂量率 2 Gy/min。

5. 细胞收集:于照射后 0、0.5、2、4、6、12、18、24、36、48 h 胰酶消化收集细胞,每组细胞各 2 份,细胞团用 PBS 清洗 2 次,分别加入蛋白裂解液和 TRIzol,放置于 -80℃ 冰箱备用。

6. 克隆形成实验:将 HeLa 和 HeLaR 细胞接种于 6 孔板中,分别接受 0、1、2、4、6、8、10 Gy 剂量 X 射线照射,后将细胞置于培养箱中培养 14 d。14 d 后,将细胞用结晶紫染色,计算克隆形成率 (PE) 及细胞存活分数 (SF)。PE (%) = 集落数/接种细胞数 × 100%, SF = 某一剂量照射组的集落数/(该组的细胞接种数 × 照后 0 h PE)。此实验重复 3 次。剂量-效应关系模型分析采用多靶单击模型。用 GraphPad Prism 5 软件制作拟合曲线。

7. Western blot 免疫印迹:取加了蛋白裂解液的细胞样品提取总蛋白,用二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白上样量,用 10% 的 SDS-PAGE 胶恒压电泳,湿转的方法将蛋白转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,4℃ 条件下孵育一抗过夜,TBST 漂洗 10 min × 3 次,室温孵育二抗 2 h,TBST 漂洗 10 min × 3 次,用化学发光法显像。

8. 实时荧光定量 PCR:按 TRIzol 试剂说明书提取 HeLa 和 HeLaR 的 mRNA。以 1 μg mRNA 为模板,Oligo dT 为引物,20 μl 体系反转录成 cDNA。用 Real-Master-Mix (SYBR Green) 在 CFX manage 3.0 定量 PCR 仪 (美国 BioRad 公司) 中进行实时 PCR 分析,每样本平行 3 孔,PCR 反应条件为:95℃, 2 min;95℃, 5 s;60℃, 30 s,39 个循环之后,95℃, 5 s。HMGB1 上下游引物分别为 5' ATATGCGAAA AGCGGACAAG 3' 和 5' GCAACATCACCAATGGAC AG 3'。

9. 荧光定量 PCR 数据分析:定量 PCR 的数据采用比较 Ct 值的方法。以 GAPDH 为内参,依据下列公式计算 HMGB1 mRNA 的表达量 (relative quantity, RQ): $RQ = 2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$, 其中, $\Delta\Delta Ct$ = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值;采用 CFX Manage 3.0 自身软件采集数据。HMGB1 mRNA 的表达变化以相对量表示,即以照射后 0 h 对照样品中的 HMGB1 mRNA 表达量作为参比对照定为 1,其他样品中的均为对照样品的倍数。

10. 统计学处理:用 SPSS 13.0 统计软件分析数

据,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 克隆形成实验:结果如图 1 所示。可以看出 HeLaR 细胞的生存曲线明显高于 HeLa 细胞,HeLaR 细胞放射敏感性明显低于 HeLa 细胞。

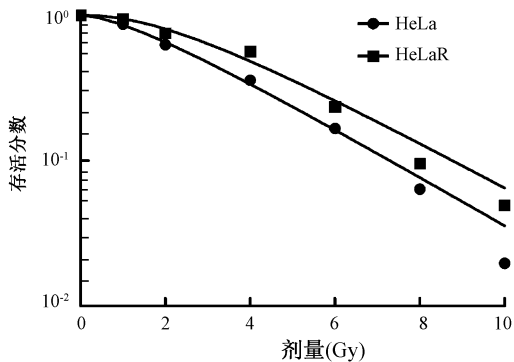


图 1 HeLa 及 HeLaR 细胞生存曲线

Figure 1 Survival curves of HeLa and HeLaR cells

2. X 射线照射后 HeLa 和 HeLaR 细胞中 HMGB1 蛋白表达变化:结果见图 2,3。其中,2、5、10 Gy X 射线照射后,HeLaR 细胞在 48 h 内均表现为 HMGB1 蛋白表达量下降,在 48 h 达到未照射水平,后有增加趋势。与照后 0 h 比较,2、5、10 Gy 照射后 6~36 h 差异均具有统计学意义($t = 3.574 \sim 9.754, P < 0.05$)。相反,HeLa 细胞在照射后 6 h,

其 HMGB1 表达逐渐增多,尤其在 5 和 10 Gy 表现明显。与照后 0 h 比较,2 Gy 照射后 6、12、48 h 差异具有统计学意义($t = 3.945 \sim 4.864, P < 0.05$); 5 Gy 照射后 6、36、48 h 差异具有统计学意义($t = -2.875 \sim 3.295, P < 0.05$); 10 Gy 照射后 36、48 h 差异具有统计学意义($t = -4.480, -4.517, P < 0.05$)。值得指出的是,在照射后 6 h,两组细胞中 HMGB1 蛋白表达均下降,因此,检测了照射后更早期时间点 HMGB1 的表达。结果见于图 4,5。可以看出,在照射后早期,HeLa 和 HeLaR 细胞中 HMGB1 的表达量都是升高的,尤其是在 2 Gy 剂量照射后。

3. X 射线照射后 HeLa 和 HeLaR 细胞 HMGB1 mRNA 表达变化:结果见图 6。其中 2 Gy 照射 HeLa 细胞后, HMGB1 的表达整体呈升高趋势,在 24 h 出现一个高峰,36 h 出现一个低谷; 5 Gy 照射后, HMGB1 mRNA 表达整体呈下降趋势,至 48 h 下降明显; 10 Gy 照射后 24 h, HeLa 细胞出现 HMGB1 mRNA 表达明显下降。2 Gy 照射 HeLaR 细胞后, HMGB1 mRNA 表达呈下降趋势,在照射后 6 h 即显著下降,随后至 36 h 急剧升高至 0 h 水平后又迅速下降; 5 Gy 照射后,立即出现急剧下降,至 6 h 后变化平缓,总体呈表达减少趋势; 10 Gy 照射后,在 24 h 前表达逐渐下降,至 24 h 开始上升至未照射水平, 36 h 后又急剧下降。

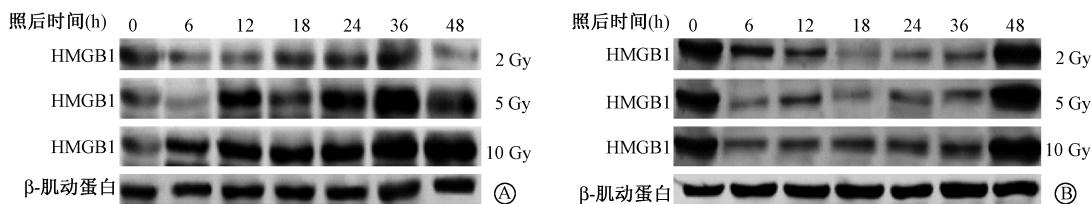
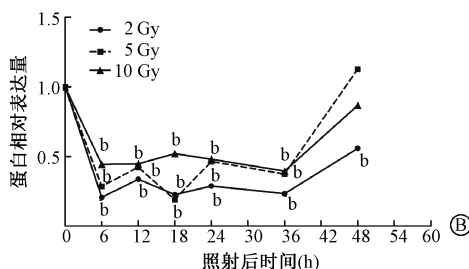
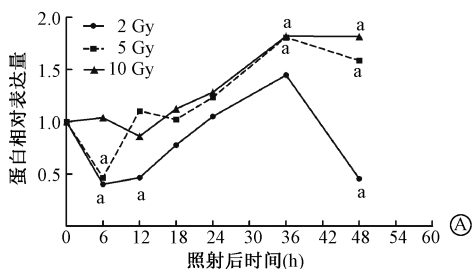


图 2 不同剂量 X 射线照射后不同时间 HeLa(A) 和 HeLaR(B) 细胞 HMGB1 蛋白表达变化

Figure 2 Protein levels of HMGB1 in HeLa(A) and HeLaR(B) cell after different doses of X-ray irradiation



注:与照射后 0 h 比较, ^a $t = -4.517 \sim 4.864, P < 0.05$; ^b $t = 3.574 \sim 9.754, P < 0.05$

图 3 不同剂量 X 射线照射 HeLa(A) 和 HeLaR(B) 细胞 HMGB1 蛋白含量变化

Figure 3 Temporal expression of HMGB1 protein in HeLa(A) and HeLaR(B) cell after radiation

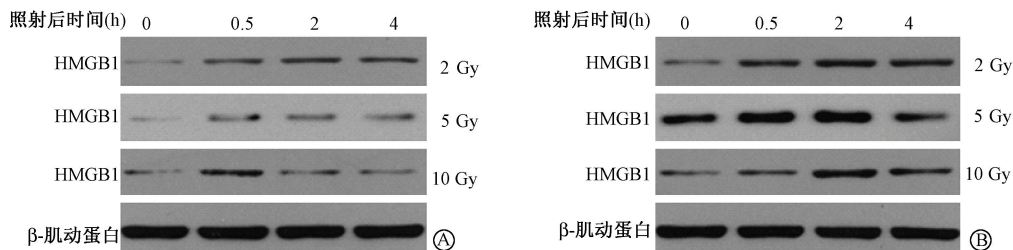
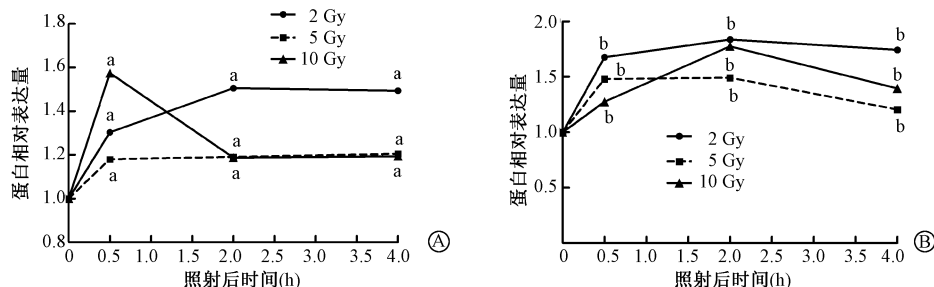


图 4 不同剂量 X 射线照射 HeLa (A) 和 HeLaR (B) 细胞后 HMGB1 蛋白表达变化

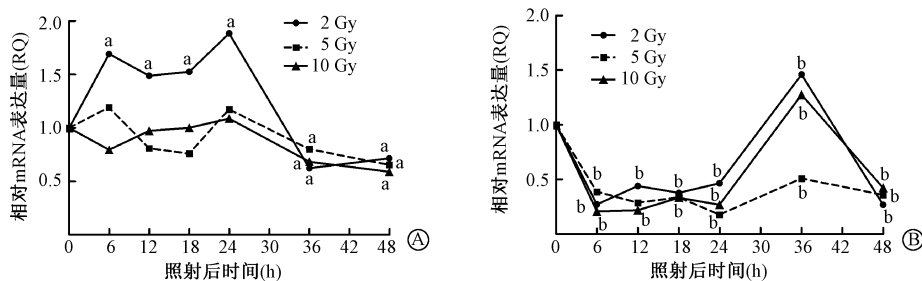
Figure 4 Protein levels of HMGB1 in HeLa (A) and HeLaR (B) cell after different doses of X-ray irradiation



注:与照射后 0 h 比较, ^at = -2.143 ~ -4.357, P < 0.05; ^bt = -2.759 ~ -4.637, P < 0.05

图 5 不同剂量 X 射线分别照射 HeLa (A) 和 HeLaR (B) 细胞后 HMGB1 蛋白含量变化

Figure 5 Temporal expression of HMGB1 protein in HeLa (A) and HeLaR (B) cell after radiation



注:与照射后 0 h 比较, ^at = -4.748 ~ 5.593, P < 0.05; ^bt = -27.398 ~ 5.181, P < 0.05

图 6 不同剂量 X 射线分别照射 HeLa (A) 和 HeLaR (B) 细胞后 HMGB1 mRNA 含量变化

Figure 6 Temporal expression of HMGB1 protein in HeLa (A) and HeLaR (B) cell after radiation

讨 论

HMGB1 在多种恶性肿瘤中高表达,并可促进肿瘤生长,但另一方面,在抗肿瘤治疗后 HMGB1 又可激活树突状细胞启动抗肿瘤 T 细胞免疫^[9]。已有研究发现,敲除哺乳动物细胞中的 HMGB1 将导致细胞对辐射更敏感,辐射后细胞 DNA 损伤更加严重,导致细胞死亡或基因突变^[10]。本课题组前期研究发现,在乳腺癌 MCF-7 细胞中,利用小干扰 RNA 抑制 HMGB1 的表达,将提高细胞的放射敏感性,同时诱导细胞发生 G₂/M 期阻滞^[6]。但是,另有研究认为, HMGB1 作为一种抑癌基因,可通过成视网膜母细胞基因 (RB) 依赖性的方式显著抑制体内和体

外乳腺癌的生长、转移和侵袭,增加 HMGB1 的表达可以诱导 RB 依赖的细胞凋亡和发生 G₁ 期阻滞,并增加 MCF-7 肿瘤细胞的辐射敏感性^[7]。由此可知, HMGB1 与肿瘤的放射敏感性相关,但其对宫颈癌细胞放射敏感性的影响尚不明确。

本研究中,3 个不同剂量 X 射线照射后早期,即 6 h 以内,两组细胞中 HMGB1 的表达均升高,说明在 HMGB1 的表达方面,两组细胞对射线的早期反应是一致的。提示在射线照射后早期, HMGB1 的表达量对于判断细胞的放射敏感性没有指导意义。在照射 6 h 以后,两组细胞表现出了完全相反的结果,在 HeLa 细胞中, HMGB1 表达整体升高,且随着照射后时间的延长,其表达量也随之变化;在 HeLaR

细胞中, HMGB1 表达整体降低, 与照射后时间也存在联系, 该变化与受照剂量无明显联系。研究表明, 电离辐射可以增强 HMGB1 等免疫刺激调控分子的合成^[11], 并且射线照射后导致细胞释放大量的活性氧簇(ROS), 而 ROS 引起的氧化损伤可进一步促进肿瘤细胞 HMGB1 的表达^[12]。HeLa 细胞对射线更敏感, 射线作用后导致的细胞损伤更严重, 如炎症反应。因此, 射线作用于 HeLa 细胞后, HMGB1 的表达整体升高。然而, 对于辐射抗拒的 HeLaR 细胞, 射线作用后, 细胞发生的损伤较轻, 电离辐射及细胞损伤对 HMGB1 表达的刺激作用较弱, HMGB1 表达未增高, 反而降低。表明 HeLaR 细胞中可能存在某一机制通过抑制 HMGB1 的表达而调控宫颈癌细胞放射敏感性, 该机制可能与细胞免疫反应及氧化应激有关。

需要指出的是, 在两组细胞经照射后 36 及 48 h, HMGB1 在蛋白水平及 mRNA 水平的表达相反, 且在重复了 3 次后仍得出此结果。这一现象可能由以下 3 个原因导致, 首先, 真核基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔; 其次, 在转录后, 又会有转录后加工, 转录产物的降解、翻译, 翻译后加工及修饰好几个层面; 再次, 样品提取时间点无法完全相同, 可能在蛋白达到峰值的时候 mRNA 已经降解了或者在 mRNA 达到峰值的时候蛋白量还在增加中^[13]。因此, 从转录水平调控 HMGB1 表达的因素以及影响 HMGB1 蛋白翻译后修饰的相关因素, 都可能参与 HMGB1 介导的放射敏感性的调控。

综上所述, HMGB1 表达水平可能与细胞的 DNA 损伤修复能力及细胞损伤水平有关。除此之外, 参与调控 HMGB1 的相关因素, 如转录水平及翻译后修饰水平的调控因素, 可能参与 HMGB1 介导的放射敏感性的调控。然而, 尚需进一步的体内外实验研究, 明确 HMGB1 作为宫颈癌放射增敏靶点的可能性, 并深入探讨 HMGB1 在不同放射敏感性细胞中表达差异的机制, 为临床预测肿瘤患者的个体放射敏感性提供理论依据。

利益冲突 本人与本人家属、其他研究者未因进行该研究而接受任何不正当的职务或财务利益, 在此对研究的独立性和科学性予以保证

作者贡献声明 康红设计研究方案, 进行试验, 收集数据并起草论文; 杨慧、柯少波提供实验技术指导; 周福祥、周云峰负责论文修改及总体思路指导

参 考 文 献

- [1] Goncalves A, Fabbro M, Lhommé C, et al. A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(1):42-46. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.07.057.
- [2] Zhang J, Zhang R, Lu WW, et al. Clinical significance of hmgb1 expression in human gastric cancer [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2014, 27(4):543-551.
- [3] Chen CG, Tang P, Yu ZT. The expression of high mobility group box 1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(4):1021-1027. DOI: 10.1007/s12253-012-9539-3.
- [4] Flohr AM, Rogalla P, Meiboom M, et al. Variation of HMGB1 expression in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(6A):3881-3885.
- [5] Sun KK, Ji C, Li X, et al. Overexpression of high mobility group protein B1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5):1678-1682. DOI: 10.3892/mmr.2013.1362.
- [6] Ke S, Zhou F, Yang H, et al. Downregulation of high mobility group box 1 modulates telomere homeostasis and increases the radiosensitivity of human breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3):1051-1058. DOI: 10.3892/ijo.2014.2793.
- [7] Jiao Y, Wang HC, Fan SJ. Growth suppression and radiosensitivity increase by HMGB1 in breast cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(12):1957-1967. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00669.x.
- [8] 张喜梅, 周福祥, 胡柳, 等. 辐射诱导放射抗拒鳞癌细胞株的蛋白质组学差异分析 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2011, 31(5):548-551. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2011.05.010.
Zhang XM, Zhou FX, Hu L, et al. Differential proteomic analysis of a squamous cell carcinoma cell line induced by radiation [J]. *Chin J Radiol Med Prot*, 2011, 31(5):548-551. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2011.05.010.
- [9] Shen XK, Hong LZ, Sun HM, et al. The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(3):535-539. DOI: 10.3892/or_00000468.
- [10] Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10320-10325. DOI: 10.1073/pnas.0803181105.
- [11] Schmid TE, Multhoff G. Radiation-induced stress proteins - the role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(12):1765-1770. DOI: 10.2174/092986712800099767.
- [12] Tang D, Kang R, Zeh HJ, et al. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(7):1315-1335. DOI: 10.1089/ars.2010.3356.
- [13] de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels [J]. *Mol Biosyst*, 2009, 5(12):1512-1526. DOI: 10.1039/b908315d.