

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.003

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*

杨 简,范致星,李馨欣,彭家芹,姜玉蓉,陈 勇
(三峡大学第一临床医学院心内科,湖北宜昌 443003)

摘要:目的 探讨高迁移率蛋白 B1(HMGB1)对血管平滑肌细胞(VSMCs)迁移的影响及 TLR4 依赖的 TLR4/PI3K/Akt 信号通路介导的分子机制。方法 体外分离培养大鼠胸主动脉 VSMCs,采用不同浓度 HMGB1(0.1~1 000.0 ng/mL)处理,分为对照组(未经任何处理)、HMGB1 组、HMGB1+TLR4 siRNA 转染组、Control siRNA 转染组和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抑制剂(LY294002)干预组,观察各组细胞活性及 HMGB1 对 VSMCs 迁移的影响;实时定量 RT-PCR 与 Western blot 分别检测 TLR4、Akt、p-Akt、PI3K mRNA 和蛋白的表达;ELISA 测定 PI3K 的活性。结果 HMGB1(0.1~1 000.0 ng/mL)呈剂量依赖性促进 VSMCs 迁移($P<0.05$);经细胞活性测定, HMGB1 在使用的浓度范围内对 VSMCs 未造成细胞毒性作用($P<0.05$);HMGB1(100 ng/mL)处理的 VSMCs 细胞组 PI3K 活性及 Akt 磷酸化水平明显增加($P<0.05$);经 TLR4 siRNA 转染发现, HMGB1 引起的 VSMCs 迁移明显减弱($P<0.05$),同样在 PI3K 抑制剂干预组,PI3K/Akt 途径活化和 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移也被明显抑制($P<0.05$)。结论 HMGB1 呈剂量依赖性促进 VSMCs 迁移,TLR4 依赖的 TLR4/PI3K/Akt 信号通路参与了此过程,提示以 TLR4 依赖的 PI3K/Akt 途径为靶点,可为阻塞性血管疾病的治疗提供新思路。

关键词:Toll 样受体 4;高迁移率蛋白 B1;PI3K/Akt 信号通路;血管平滑肌细胞

中图分类号:R54

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)04-0439-03

Effect of HMGB1 on the migration of vascular smooth muscle cells and its molecular mechanism*

Yang Jian, Fan Zhixing, Li Xinxin, Peng Jiaqin, Jiang Yurong, Chen Yong
(Department of Cardiology, the First Clinical Medical College, The
Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of high mobility group box-1(HMGB1) on the migration of vascular smooth cells (VSMCs) and the role of TLR4-dependent PI3K/Akt pathway in the process. **Methods** Primary VSMCs were isolated from the thoracic aorta of male SD rats and cultured in vitro. Control group, TLR4 siRNA transfected group, control siRNA transfected group and PI3K inhibitor (LY294002) intervention group were stimulated by HMGB1 (0.1-1 000.0 ng/mL). Expression of TLR4 mRNA was detected by RT-PCR, protein expression of TLR4, Akt, pAkt, PI3K were detected by Western blot. Activity of the immunoprecipitated PI3K enzyme was assessed in a competitive ELISA. The migration and cell viability of every groups were observed. **Results** HMGB1 (0.1-1 000.0 ng/mL) stimulated VSMCs migration in a dose-dependent manner and incubation of VSMCs with 100 ng/mL caused a rapid migration ($P<0.05$). At the concentrations used, HMGB1 did not cause any cytotoxic effects ($P<0.05$). Migration of VSMCs toward HMGB1 was significantly inhibited by silencing of TLR4 ($P<0.05$). Pretreated cells with TLR4 siRNA or the PI3K inhibitor LY294002 could markedly block PI3K/Akt pathway activation and VSMCs migration mediated by HMGB1 (both $P<0.05$). **Conclusion** HMGB1 stimulated VSMCs migration in a dose-dependent manner and TLR4-dependent PI3K/Akt signaling pathway played an important role in the migration of VSMCs mediated by HMGB1. This research indicates that TLR4-dependent TLR4/PI3K/Akt signaling pathway could be the target in the treatment of obstructive cardiovascular disease.

Key words:Toll-like receptor 4;high mobility group box-1;PI3K/Akt pathway;vascular smooth muscle cells

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的迁移是动脉粥样硬化和经皮冠状动脉介入治疗后血管再狭窄发生的关键环节^[1],其受多种生物学信号的调节,如细胞因子、生长因子、血管活性肽等,其中促炎介质发挥关键作用^[2]。高迁移率蛋白 B1(HMGB1)是一种有效的促炎因子,参与了多种心血管疾病的发生、发展^[3]。在既往的研究中, HMGB1 被认为是一个作用于 VSMCs 等不同细胞系的化学诱导物^[4],其主要与 RAGE 结合而促进细胞的迁移^[5]。TLR4 作为 HMGB1 的另一个受体,广泛表达于脉管系统,可通过激活细胞内的信号传导通路(如 MAPK、JNK、NF- κ B)诱导免疫和炎

性反应^[6]。本课题组前期研究发现 TLR4/NF- κ B 信号通路能诱导 HMGB1 介导的血管内皮细胞激活^[7],而且有研究发现球囊损伤后的 VSMCs TLR4 表达明显增加^[8],这说明 TLR4 依赖的信号通路也可能参与了 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。磷脂酰肌醇 3-激酶类(PI3Ks)和其下游的丝氨酸-苏氨酸激酶 Akt (PI3K/Akt)在调控 VSMCs 的迁移、增殖、分化中扮演重要角色^[9]。PI3K/Akt 通路通过其配体与细胞表面的受体结合而激活,有研究发现 TLR4 与 PI3K/Akt 通路存在着交互效应^[10]。基于上述发现,本实验将探讨 TLR4 依赖的 PI3K/Akt 信号通路是否参与了 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200088);宜昌市科技研究与开发项目(A12301-01)。 作者简介:杨简(1982-),硕士,主要从事冠心病基础与临床研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 重组人 HMGB1 购自 Sigma 公司, PI3K 抑制剂(LY294002) 购自 Calbiochem 公司; 脂质体 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 磷酸化 Akt(Ser-473) 抗体、Akt 抗体购自 Cell Signaling 公司; TLR4 siRNA、Control siRNA、TLR4 抗体、PI3K 抗体、GAPDH 抗体均购自 Santa Cruz 生物公司。

1.2 血管平滑肌细胞的培养和鉴定 从雄性 SD 大鼠(100~150 g)胸主动脉中分离出原始 VSMCs, 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养, 将培养的第 3~10 代 VSMCs 用于实验研究。根据 VSMCs 生物形态特性及生长规律, 进行细胞形态学鉴定, 用特异性平滑肌细胞抗体 SM- α -Actin, 进行免疫细胞化学鉴定。

1.3 细胞活性测定 细胞活性测定用于评估 HMGB1 对于 VSMCs 的细胞毒性: 0.4% 台盼蓝染液处理经不同浓度 HMGB1(0.1~1 000.0 ng/mL) 刺激培养的 VSMCs, 染色 5 min 后于光镜下观察。细胞活性即未染色细胞占细胞总数的比例。

1.4 细胞迁移实验 使用直径 6.5 mm 的聚碳酸酯膜 transwell 小室进行 VSMCs 迁移实验: 将经胰酶消化的细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 transwell 小室的上室, 在其下室中加入含有不同浓度 HMGB1(0.1~1 000.0 ng/mL) 的无血清 DMEM 培养基。然后将制备好的 transwell 小室置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 取出滤膜, 去除上层 VSMCs, 用甲醇固定, 苏木素染色。光镜下观察迁移到滤膜下室面的 VSMCs 并计数, 每个样本计数 4 个随机选择的高倍视野($\times 200$)的细胞数。

1.5 siRNA 转染 培养的 VSMCs 达到 60%~70% 的融合后, 根据生物公司提供的操作说明, 运用 Lipofectamine 2000 将等量的 TLR4 siRNA 或 Control siRNA(作为阴性对照) 分别转染 VSMCs, 48 h 后收集细胞用实时定量 RT-PCR 与 Western blot 检测 TLR4 的沉默效果。

1.6 RT-PCR 检测基因的表达水平 采用 TRIzol 法抽提细胞总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA。本实验设定 GAPDH 为管家基因, 设计 PCR 扩增的引物序列(TLR4: 正向引物 5'-AGC CAT TGC TGC CAA CAT CA-3', 反向引物 5'-GCC AGA GCT ACT CAG AAA C-3'; GAPDH: 正向引物 5'-GAC AAC TTT GGC TCG TGG A-3', 反向引物 5'-ATG CAG GGG TTC TGG-3')。实时荧光定量 PCR 由 ABI Prism7500 序列检测系统完成, 定量结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

1.7 Western blot 检测蛋白的表达水平 细胞经 PBS 洗涤两次后, 于裂解缓冲液中采集。离心后蛋白样品经 10% 的 SDS-

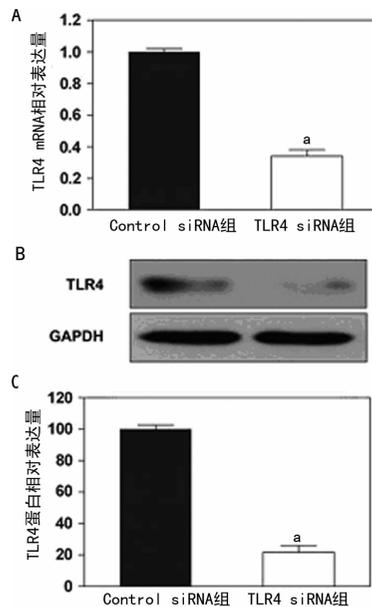
PAGE 凝胶电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上。在室温条件下用 5% 脱脂奶粉及 Tris-缓冲盐溶液封闭后, 分别加入 TLR4 抗体、磷酸 Akt(Ser-473) 抗体、Akt 抗体、GAPDH 抗体以及辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育。蛋白检测由 ECL 化学发光检测试剂盒完成。

1.8 PI3K 的活性测定 HMGB1(100 ng/mL) 处理 TLR4 siRNA 和 Control siRNA 转染的 VSMCs 6 h 后, 对获得的细胞裂解液进行免疫沉淀和 PI3K 活性测定^[11]。每个样本取 500 μ g, 加入 PI3K p85 抗体处理 4 $^{\circ}$ C 过夜, 析出的免疫复合物经蛋白 A 琼脂糖小体于 4 $^{\circ}$ C 处理 2 h。然后, 离心收集样本, 激酶缓冲液洗涤。PI3K 的活性由竞争性 ELISA 试剂盒测定。

1.9 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较用单因素方差分析, 各组间的两两比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

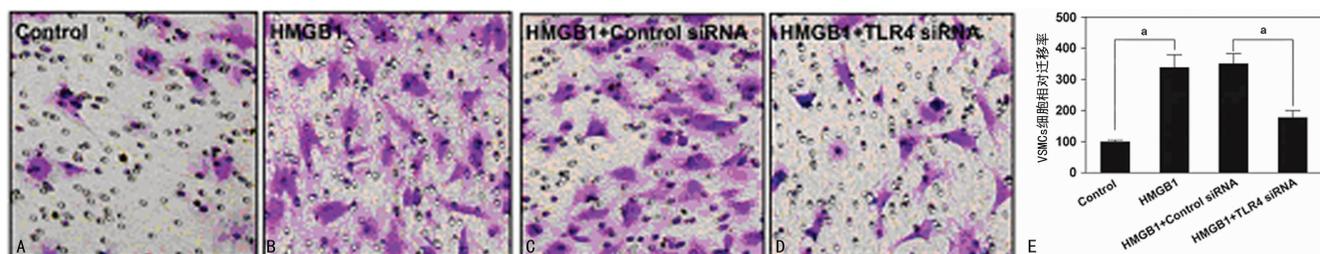
2 结 果

2.1 HMGB1 对 VSMCs 迁移的影响 培养的大鼠胸主动脉 VSMCs 在显微镜下呈典型的“峰谷”样生长。经特异性平滑肌细胞抗体 SM- α -Actin 免疫染色后证实, 本实验细胞纯度大约为 90%。经不同浓度 HMGB1 处理 VSMCs 可以显著增加其迁移活性, 且 HMGB1 浓度为 100 ng/mL 时, 细胞迁移效应最大。经细胞活性测定, HMGB1 在使用的浓度范围内并未对 VSMCs 造成细胞毒性作用。



A: TLR4 mRNA 分析图; B: Western blot 图; C: Western blot 图分析图; $^a: P < 0.05$ 。

图 1 各组细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达情况



A: 对照组; B: HMGB1 组; C: HMGB1 + Control siRNA 组; D: HMGB1 + TLR4 siRNA 组; E: VSMCs 细胞相对迁移分析图; $^a: P < 0.05$ 。

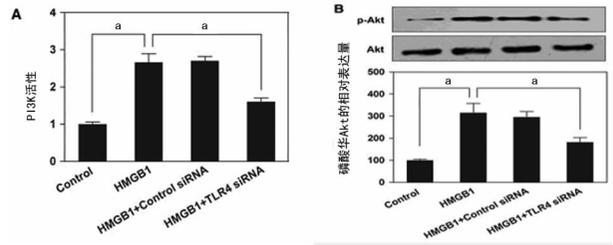
图 2 TLR4 在 HMGB1 介导 VSMCs 迁移中的作用

2.2 TLR4 在 HMGB1 介导 VSMCs 迁移中的作用 为确定 TLR4 是否参与了 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移,用 100 ng/mL HMGB1 处理经 TLR4 siRNA 转染后的 VSMCs。结果如图 1 所示,转染 48 h 后,与 Control siRNA 组比较,TLR4 siRNA 组 TLR4 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低,分别下降 (67.5±5.7)% 和 (78.3±3.2)% ($P<0.05$)。此外, HMGB1 刺激 TLR4 siRNA 转染的 VSMCs,迁移也受到明显抑制,见图 2。

2.3 PI3K/Akt 信号通路在 HMGB1 介导 VSMCs 迁移中的作用 与对照组比较,经 HMGB1(100 ng/mL)处理的 VSMCs 可以显著增加 PI3K 活性和 Akt(Ser-473)磷酸化水平 ($P<0.05$)。然而,TLR4 siRNA 转染 VSMCs 后再用相同剂量 HMGB1 刺激,PI3K 活性和 Akt(Ser-473)磷酸化水平被明显抑制 ($P<0.05$),见图 3。这些数据表明, HMGB1 可能通过 TLR4 激活 PI3K/Akt 途径介导 VSMCs 的迁移。

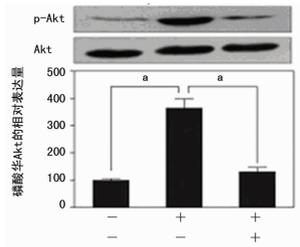
2.4 PI3k 在 HMGB1 介导 Akt 激活和 VSMCs 迁移中的作用 上述结果已经证实 PI3K 与 VSMCs 的迁移有关,为确定 PI3k 是否参与了 HMGB1 介导的 Akt 激活和 VSMCs 迁移。本研究采用 PI3K 抑制剂 LY 294002(10 μ M)预处理 VSMCs 30 min 后,再用 HMGB1 刺激,结果如图 4,LY 294002 预处理能明显减少 HMGB1 介导的 Akt 磷酸化水平 ($P<0.05$),但对其总蛋白表达水平没有影响。进一步研究发现,PI3K 抑制剂 LY 294002 能明显抑制 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移 ($P<$

0.05),见图 5。这些结果表明,PI3K 在 HMGB1 介导的 Akt 活化和 VSMCs 迁移中起着十分重要的作用。



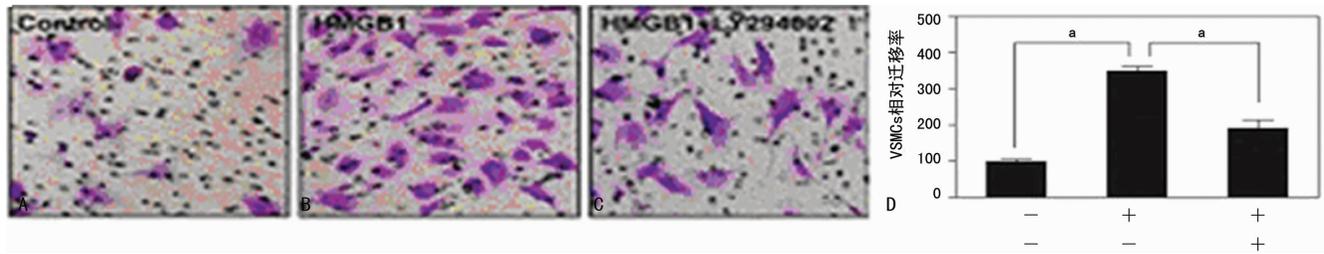
A:PI3K 的活性测定;B:总 Akt 及磷酸化 Akt(Ser-473)的表达水平;^a: $P<0.05$ 。

图 3 HMGB1 通过 TLR4 激活 PI3K/Akt 途径介导 VSMCs 迁移



^a: $P<0.05$ 。

图 4 Western blot 检测 p-Akt 和 Akt 蛋白表达情况



A:对照组;B:HMGB1 组;C:HMGB1+PI3K 抑制剂组;D:VSMCs 相对迁移率分析图;^a: $P<0.05$ 。

图 5 LY294002 抑制 HMGB1 介导的 Akt 磷酸化和 VSMCs 迁移

3 讨 论

近年来,有研究报道 HMGB1 主要通过结合其受体 RAGE 或者激活 TLR4/NF- κ B 通路产生炎症反应来促进 VSMCs 的增殖和迁移^[5,7]。但是,抗炎因子或 NF- κ B 与 RAGE 的抑制剂均不能完全抑制 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移,说明还存在其他的信号介质参与了 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。因此,关于 HMGB1 介导 VSMCs 迁移的细胞内信号转导机制仍需深入探究。PI3K/Akt 是常见的细胞信号通路,在细胞迁移、增殖、分化过程中发挥着重要作用^[9]。PI3K 是 Akt 良好的活化剂,有活性的 Akt(p-Akt)与 VSMCs 的迁移有关^[12],也有人发现 PI3K/Akt 与 TLR4 通路下游的激活有关^[13]。因此作者提出假设:PI3K/Akt 通路是否通过 TLR4 参与 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。本研究证实 HMGB1 在体外呈剂量依赖性的促进 VSMCs 迁移,在此过程中,TLR4 siRNA 可以抑制 HMGB1 诱导的 VSMCs 迁移,这说明 TLR4 参与了这一过程。TLR4 siRNA 还能明显抑制 HMGB1 诱导的 PI3K 活性和 Akt 磷酸化。同时 PI3K 的抑制剂 LY294002 也能有效抑制 Akt 的磷酸化和 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。这些结果提示 TLR4/PI3K/Akt 途径在 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移中扮演重要角

色。

本研究还发现,无论是 TLR4 沉默还是 PI3K 的抑制剂 LY294002 仍然不能完全抑制 Akt 磷酸化和 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。由此,推测 HMGB1 介导 VSMCs 迁移的调控机制可能还涉及其他受体,例如 TLR2 或细胞内其他信号途径的参与,这需要进一步实验研究来阐明这一复杂机制。

总之,本研究结果说明 TLR4/PI3K/Akt 信号通路参与了 HMGB1 介导的 VSMCs 迁移。这些发现不仅有助于更好地理解 HMGB1 介导 VSMCs 迁移的分子机制,也提示以 TLR4 依赖的 PI3K/Akt 途径为靶点,可为狭窄阻塞性血管疾病的治疗提供新思路。

参考文献:

[1] Jukema JW, Ahmed TA, Verschuren JJ, et al. Restenosis after PCI. Part 2: prevention and therapy [J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 9(2): 79-90.
 [2] Montezano AC, Callera GE, Yogi A, et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-(下转第 445 页)

细胞增殖情况,细胞增生启动于胰腺创伤早期,在 7 d 达到高峰。确定胰腺创伤后细胞增殖的变化规律为以后针对胰腺创伤后治疗的相关研究提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Thomas H, Madanur M, Bartlett A, et al. Pancreatic trauma-12-year experience from a tertiary center[J]. *Pancreas*, 2009, 38(2): 113-116.
- [2] Mayer JM, Tomczak R, Rau B, et al. Pancreatic injury in severe trauma: early diagnosis and therapy improve the outcome[J]. *Dig Surg*, 2002, 19(4): 291-297.
- [3] 戴睿武, 田伏洲, 董家鸿, 等. 一种大鼠胰腺创伤模型的建立及伤情特点分析[J]. *重庆医学*, 2007, 36(5): 444-446, 449.
- [4] Castro J, Ribó M, Navarro S, et al. A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 9.
- [5] Cheng S, Yan WM, Yang B, et al. A crucial role of nitric oxide in acute lung injury secondary to the acute necrotizing pancreatitis[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2010, 29(4): 329-337.
- [6] Sailai Y, Yu X, Baiheti P, et al. Influence of nuclear factor kappaB activation on inflammatory mediators of alveolar macrophages in rats with acute necrotizing pancreatitis[J]. *J Investig Med*, 2010, 58(1): 38-42.
- [7] 黄红霞, 黄晓英, 徐建如, 等. 临床肺部感染评分在呼吸机

相关性肺炎中的诊断价值和护理管理对策[J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(2): 30-32.

- [8] Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, et al. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats[J]. *Gut*, 2011, 60(2): 238-246.
- [9] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity[J]. *Brain Res*, 2010, 1352: 255-264.
- [10] Malla R, Gopinath S, Alapati K, et al. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13731.
- [11] Elbanna HG, Ebrahim MA, Abbas AM, et al. Potential value of estrogen receptor beta expression in colorectal carcinoma; interaction with apoptotic index[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2012, 43(1): 56-62.
- [12] Kong Y, Zhang H, He X, et al. Endoscopic management for pancreatic injuries due to blunt abdominal trauma decreases failure of nonoperative management and incidence of pancreatic-related complications[J]. *Injury*, 2014, 45(1): 134-140.

(收稿日期: 2014-08-18 修回日期: 2014-10-06)

(上接第 441 页)

- Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1511-1518.
- [3] Ding HS, Yang J, Chen P, et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 389-393.
 - [4] Smolarczyk R, Cichoń T, Jarosz M, et al. HMGB1—its role in tumor progression and anticancer therapy[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2012, 66(3): 913-920.
 - [5] Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(1): 55-68.
 - [6] Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1(HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity[J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 35-46.
 - [7] 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.
 - [8] Heo SK, Yun HJ, Noh EK, et al. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production[J]. *Immunol Lett*, 2008, 120(1/2): 57-64.

- [9] Gouffic Y, Guilluy C, Guérin P, et al. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(2): 339-348.
- [10] Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(3): 597-605.
- [11] Liu Q, Chen T, Chen G, et al. Triptolide impairs dendritic cell migration by inhibiting CCR7 and COX-2 expression through PI3-K/Akt and NF-kappaB pathways[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(10): 2686-2696.
- [12] Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. *Circ Res*, 2000, 86(1): 15-23.
- [13] Ha T, Hua F, Liu X, et al. Lipopolysaccharide-induced myocardial protection against ischaemia/reperfusion injury is mediated through a PI3K/Akt-dependent mechanism[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3): 546-553.

(收稿日期: 2014-08-10 修回日期: 2014-10-10)