

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.001>

· 论著 ·

HMGB1 激活肿瘤相关巨噬细胞表面 RAGE 促进淋巴管生成

苏才丽¹, 柳玮华¹, 郑晓丹¹, 刘红刚²

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院病理科, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京同仁医院病理科, 北京 100730)

[摘要] 目的: 探讨高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1, HMGB1)与肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAMs)促进人淋巴管内皮细胞(human lymphatic endothelial cell, HDLEC)增殖、迁移及淋巴管生成的关系以及作用机制。方法: 沉默人单核细胞株(THP-1)的晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end, RAGE)基因, 诱导RAGE^{+/-} THP-1细胞分化为RAGE^{+/-} M0巨噬细胞和RAGE^{+/-} TAMs; 用RT-PCR检测IL-10, IL-12, IL-1 β , CCL-13表达、ELISA检测TGF- β , IL-23, IL-10, TNF- α 分泌量; 蛋白质印迹检测RAGE, CD163, CD206蛋白水平。6种条件培养基及对照组培养HDLEC, CCK-8实验、细胞迁移实验、体外侵袭实验观察HDLEC增殖能力、迁移能力及成管能力的变化。结果: 与M0巨噬细胞相比, TAMs高表达IL-10及CCL-13 mRNA及低表达IL-12及IL-1 β mRNA; 上清液中TGF- β 及IL-10 mRNA也增加($P < 0.05$)。与对照组相比, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC增殖及迁移能力最强, 形成淋巴管数目最多($P < 0.05$); HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液促进HDLEC增殖及迁移能力明显比HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液促进HDLEC增殖及迁移能力更弱($P < 0.05$); RAGE⁻ TAMs上清液能明显减少HMGB1介导的促HDLEC形成的淋巴管数目($P < 0.05$)。与对照组相比, HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液中VEGF-C的含量最高($P < 0.05$)。结论: HMGB1刺激TAMs表面的RAGE促进HDLEC增殖、迁移及淋巴管形成, 该过程中细胞因子VEGF-C起重要作用。

[关键词] 高迁移率族蛋白B1; 晚期糖基化终产物受体; 肿瘤相关巨噬细胞; 淋巴管形成

HMGB1 promotes lymph angiogenesis through the activation of RAGE on tumor-associated macrophages

SU Caili¹, LIU Weihua¹, ZHENG Xiaodan¹, LIU Honggang²

(1. Department of Pathology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050; 2. Department of Pathology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China)

Abstract **Objective:** To evaluate whether the high mobility group box-1 (HMGB1) and tumor-associated macrophages (TAMs) involved in proliferation, migration and lymph angiogenesis of HDLEC and its mechanism. **Methods:** THP-1 cells expressed receptor for advanced glycation end (RAGE) gene was knocked down and

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-19

通信作者 (Corresponding author): 苏才丽, Email: 446955716@qq.com

基金项目 (Foundation item): 北京市医院管理局临床医学发展专项项目 (ZYLX101814)。This work was supported by Beijing Municipal Administration of Hospitals Clinical Medicine Development of Special Funding, China (ZYLX101814).

then polarized to M0 macrophages and TAMs. The mRNA expression of IL-10, IL-12, IL-1 β and CCL-13 by RT-PCR. The protein levels of IL-23, IL-10, TGF- β , TNF- α in supernatant of M0 macrophages and TAMs by ELISA. CD163, CD206 and RAGE protein expression in TAMs and M0 macrophages by Western blot. Six conditioned media were collected for human dermal lymphatic endothelial cells (HDLEC) proliferation, migration, matrigel assay and VEGF concentration analysis. **Results:** Compared with M0 macrophages, TAMs are overexpressed IL-10, CCL-13 mRNA and low expression of IL-12 and IL-1 β mRNA. The secretion of TGF- β mRNA and IL-10 mRNA increased in the supernatant ($P < 0.05$). Conditioned medium from HMGB1-stimulated RAGE⁺ TAMs activated lymph angiogenesis by upregulating the VEGF compared to M0 macrophages ($P < 0.05$). On the contrary, RAGE knockout obviously decreased the corresponding effects of HMGB1 preconditioned TAMs upon HDLEC. **Conclusion:** HMGB1 promotes the proliferation, migration and lymphatic formation of HDLEC by stimulating the RAGE receptor on TAMs and VEGF-C may be involved in that pathway.

Keywords high mobility group box-1; receptor for advanced glycation end; tumor-associated macrophages; lymph angiogenesis

恶性肿瘤发展至中晚期后, 患者常常伴有淋巴结转移, 肿瘤浸润和转移是造成肿瘤患者死亡的主要原因之一, 其确切机制目前尚不十分明确。淋巴管生成在肿瘤淋巴结转移中起重要作用。因此, 靶向作用于已经形成的淋巴管或抑制局部淋巴管的新生, 能够有效地减少肿瘤的淋巴结转移, 延长患者的生存时间^[1]。高迁移率族蛋白B1 (high mobility group box-1, HMGB1) 与肺癌、口腔癌、骨肉瘤等恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及预后等密切相关^[2-4]。HMGB1可以与多种受体结合促进肿瘤转移^[5], 晚期糖基化终产物 (receptor for advanced glycation end, RAGE) 是跨膜蛋白受体也是目前已知的HMGB1蛋白亲和力最高的受体^[6]。RAGE也可表达于巨噬细胞表面, 肿瘤微环境中的巨噬细胞称为肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs)。研究^[7]发现: 炎症诱导的淋巴管生成中有大量的TAMs募集, 虽然RAGE作为肿瘤细胞表面受体通过多种途径促进肿瘤进展, 但TAMs表面的RAGE与HMGB1蛋白结合后如何参与淋巴管生成尚不清楚。本研究旨在探讨HMGB1是否能通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞增殖、迁移及淋巴管生成。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞株 (THP-1) 购自北京中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 人淋巴管内

皮细胞 (human lymphatic endothelial cell, HDLEC) 购自德国海德堡 PromoCell 公司; 10% 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; R1640 培养基购自美国 Gibco 公司; Trypsin、青霉素链霉素双抗、PMA 均购自美国 Sigma 公司; 内皮细胞培养基 MV2, Hepess Bss, 0.025% 胰蛋白酶/0.01% EDTA, TNS 均购自德国 PromoCell 公司; IL-13 及 IL-4 均购自美国 PeproTech 公司; 台盼蓝溶液购自江苏凯基生物技术股份有限公司; DMSO 购自无锡市亚泰联合化工有限公司; RAGE shRNA (h) Lentiviral Particles, Control shRNA Lentiviral Particles, cop GFP Control Lentiviral Particles, Puromycin dihydrochloride, Polybrene 均购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗 CD163 单克隆抗体、兔抗 CD206 单克隆抗体、鼠抗 RAGE 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司; 鼠抗 GAPDH 抗体、羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒中国碧云天生物技术有限公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; HMGB1 溶液 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、VEGF-C 溶液均购自美国 R&D 公司。本研究已获得首都医科大学附属北京友谊医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

THP-1 细胞保存在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基中。HDLEC 保存在内皮细胞培养基 MV2 中。所有细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 环境中培养。

1.2.2 RAGE shRNA 慢病毒感染 THP-1 细胞

1×10^3 个 THP-1 细胞接种于 96 孔板, 加入 200 μL RAGE shRNA 慢病毒, Control shRNA 慢病毒作为内参, cop GFP Control 慢病毒作为对照。使用 Puromycin 挑选稳定感染 RAGE shRNA 的 THP-1 克隆细胞株, 并传代、分析 RAGE 的表达。每组实验进行 3 次。

1.2.3 THP-1 细胞极化为 TAMs 并收集条件培养基

PMA 诱导 THP-1 细胞分化获得巨噬细胞: 10 ng/mL PMA 培养 1×10^6 RAGE^{+/-} THP-1 细胞 24 h 获得 RAGE^{+/-} M0 巨噬细胞。10 ng/mL PMA 培养 1×10^6 RAGE^{+/-} THP-1 细胞 6 h 后加 20 ng/mL IL-13 和 IL-4 培养 18 h 获得 RAGE^{+/-} TAMs^[8]。去除极化刺激后, 将 HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入 RAGE^{+/-} M0 巨噬细胞和 RAGE^{+/-} TAMs 培养基中孵育 12 h 后收集条件培养基备用; 同时收集孵育 12 h 后未加入 HMGB1 的 RAGE⁺ M0 巨噬细胞和 RAGE⁺ TAMs 的上清液, 存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.4 蛋白质印迹法检测 M0 巨噬细胞及 TAMs 细胞 CD163, CD206 及 RAGE 蛋白表达变化

M0 巨噬细胞及 TAMs 细胞约 1×10^6 个, 冷 PBS 洗 2 次。加入细胞裂解缓冲液 300 μL , 于冰上裂解 10 min, 收集到 Ep 管中, 煮沸 15 min, 离心 10 min, 提取含总蛋白的上清液, 进行蛋白浓度测定, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。配置 12% 的分离胶和 4% 浓缩胶, 固定于电泳装置, 加入电泳缓冲液。上样: 蛋白标志物及 1 \times SDS 共 10 μL , 检测样品每孔 10 μL 。电泳 35 min, 转膜及电转 2 h, 用 TBST 洗膜。于室温封闭 60 min, 加入牛奶稀释一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。用 TBST 洗膜后加入二抗, 于室温下孵育 60 min; 用 TBST 洗膜后化学发光分析仪分析蛋白质含量。

1.2.5 RT-PCR 法检测 M0 巨噬细胞及 TAMs 细胞的 IL-10, CCL-13, IL-12 及 IL-1 β 的 mRNA 表达

M0 巨噬细胞及 TAMs 细胞约 1×10^6 个, 冷 PBS 洗 2 次。加入 TRIzol 液消化、裂解, 离心、提取 RNA; 测定 RNA 浓度及 OD 值; 用 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录, 总体积 20 μL , 反转录程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 于冰上冷却后备用。基因引物序列 IL-1 β : 正向引物为 5'-AGTGCCTTGAGATTCT-3', 反向引物为 5'-GGTATGCCACTATGCAT-3'。IL-10: 正向引物为 5'-AGTGGGGATGTTAGCCCT-3', 反向引物为 5'-TAGGTTCTCTGGAATTG-3'。IL-12: 正向引物为 5'-AGTGGAGTGCCAGGAGGACA-3', 反向引物为 5'-TTCTTGGGTGGGTCAGGTTT-3'。

CCL-13: 正向引物为 5'-GCTGACCCAAAGGAGAAGTG-3', 反向引物为 5'-CCAAAGCATAGAAGAGGAGGC-3'。GAPDH: 正向引物为 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3', 反向引物为 5'-GAAGATAATGATGGGATTTC-3'。RT-PCR 反应体系: 使用 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 进行扩增, 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环, 分析目的基因 mRNA 相对含量。

1.2.6 ELISA 方法检测 M0 巨噬细胞和 TAMs 的上清液中 TGF- β , IL-23, IL-10, TNF- α 的表达量及条件培养基中 VEGF-C 的表达量

空白孔加标准品稀释液, 其余相应孔中加标本 (100 μL), 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min; 洗板 5 次; 空白孔加生物素化抗体稀释液, 其余孔加入生物素化抗体工作液 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min; 洗板 5 次; 空白孔加酶结合物稀释液, 其余孔加入酶结合物工作液 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 洗板 5 次; 加入显色底物 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min; 加入终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 混匀后立刻测量 OD_{450 nm} 值 (3 min 内)。

1.2.7 CCK-8 实验检测 HDLEC 在条件培养基中的增殖能力

HDLEC 生长融合度达到 80% 左右后去除旧培养基, 制成细胞悬液, 于 96 孔板中按照细胞数为 1×10^4 /孔接种, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养, HDLEC 细胞贴壁后, 去除培养基, 分别加入收集的条件培养基及对照组共 8 组: HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理的 RAGE⁺ M0 巨噬细胞上清液、HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理的 RAGE⁻ M0 巨噬细胞上清液、HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理的 RAGE⁺ TAMs 上清液、HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理的 RAGE⁻ TAMs 上清液、未加入 HMGB1 的 RAGE⁺ M0 巨噬细胞上清液、未加入 HMGB1 的 RAGE⁺ TAMs 上清液; HMGB1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液及淋巴管内皮细胞培养基 (MV2) 作为对照, 每组设置 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 24 h; 去除每组中的条件培养基, 加入 30 μL CCK-8 溶液, 1 h 后, 于分光光度计测量 OD_{450 nm} 值。

1.2.8 细胞迁移实验检测 HDLEC 在条件培养基中的迁移能力

Transwell 小室的下室内加入收集的条件培养基及阴性和阳性对照组培养基 (如上共 8 组); HDLEC 制成细胞悬液, 于 Transwell 小室的上室内按照 5×10^4 /孔接种 HDLEC, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养 6 h; 取出 Transwell 小室的上室, 用甲醛固定、苏木精染色后于显微镜下计数迁移 HDLEC 的数量、拍照, 每

组设置3个复孔。

1.2.9 体外侵袭实验检测 HDLEC 在条件培养基中形成淋巴管的能力

预热的基质(Matrigel)胶50 μ L/孔快速平铺于96孔板内, 4 $^{\circ}$ C内放置30 min, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中放置30 min后立即使用; HDLEC制成细胞悬液, 于96孔板内按照 1×10^4 /孔接种HDLEC(轻轻平铺于基质胶表面), 加入收集的条件培养基及阴性和阳性对照组培养基(如上共8组), 于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养6 h, 取出96孔板于显微镜下观察HDLEC成管情况并计数、拍照。每组设置3个复孔。

1.3 统计学处理

应用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。计量资料表示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$), 两样本均数的比较采用两独立样本 t 检验, 多样本均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导 THP-1 分化为 RAGE^{+/-} M0 巨噬细胞及 RAGE^{+/-} TAMs 细胞

2.1.1 在 THP-1 细胞中用 RAGE shRNA(h) Lentiviral Particles 沉默 RAGE 蛋白的表达

为观察HMGB1蛋白与TAMs表面的RAGE结合后是否具有生物学作用, 使用RAGE shRNA(h) Lentiviral Particles感染THP-1细胞, 以荧光素酶报告系统检测发现, shRAGE THP-1细胞内荧光素的活性高于RAGE⁺ THP-1细胞($P < 0.05$), 提示RAGE shRNA(h) Lentiviral Particles在THP-1细胞内稳定感染, 为后续诱导RAGE^{+/-} THP-1细胞分化为RAGE^{+/-} M0巨噬细胞及RAGE^{+/-} TAMs细胞奠定基础(图1A)。

2.1.2 成功诱导 RAGE^{+/-} THP-1 细胞分化为 RAGE^{+/-} M0 巨噬细胞及 RAGE^{+/-} TAMs 细胞

使用PMA孵育悬浮的RAGE^{+/-} THP-1细胞24 h后细胞贴壁, 部分细胞伸出伪足, 获得RAGE^{+/-} M0巨噬细胞(图1B)。使用PMA孵育RAGE^{+/-} THP-1细胞6 h后再加入IL-13及IL-4继续孵育18 h后, 细胞贴壁, 大部分细胞伸出伪足, 细胞体积增大,

诱导获得RAGE^{+/-} TAMs(图1C)。蛋白质印迹检测示: 由THP-1诱导的TAMs特异性的表达CD163, CD206蛋白也表达RAGE, 说明诱导TAMs成功。慢病毒shRAGE感染的TAMs低表达RAGE蛋白(图1D)。

2.2 THP-1 诱导的 TAMs 表达并分泌经典的炎性细胞因子

为进一步验证TAMs的促炎性细胞因子分泌功能, 本研究通过RT-PCR检测TAMs表达炎性细胞因子IL-10 mRNA及CCL-13 mRNA情况及TAMs分泌到上清液中的TGF- β mRNA和IL-10 mRNA的表达情况, 结果显示: 与M0巨噬细胞相比, TAMs高表达IL-10 mRNA(图2A)和CCL-13 mRNA(图2B), 低表达IL-12 mRNA(图2C)和IL-1 β mRNA(图2D), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。TAMs分泌到上清液的TGF- β mRNA(图2E)和IL-10 mRNA(图2F)表达量也较M0巨噬细胞增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。TAMs分泌到上清液的IL-23 mRNA(图2G)和TNF- α mRNA(图2H)表达量较M0巨噬细胞减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 HMGB1通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞增殖

收集的6组上清液(HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液、HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液、HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液、HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液、无HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液和无HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液)及对照组(淋巴管内皮细胞培养基和2 μ g/mL HMGB1)分别孵育HDLEC 24 h后, CCK-8实验结果显示: 与其他组及对照组相比, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC增殖能力最强($P < 0.05$, 图3)。另外, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液和HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液孵育的HDLEC增殖能力均比内皮细胞培养基组孵育的HDLEC增殖能力更强, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。然而HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液促进HDLEC增殖能力明显比HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液促进HDLEC增殖能力更弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。

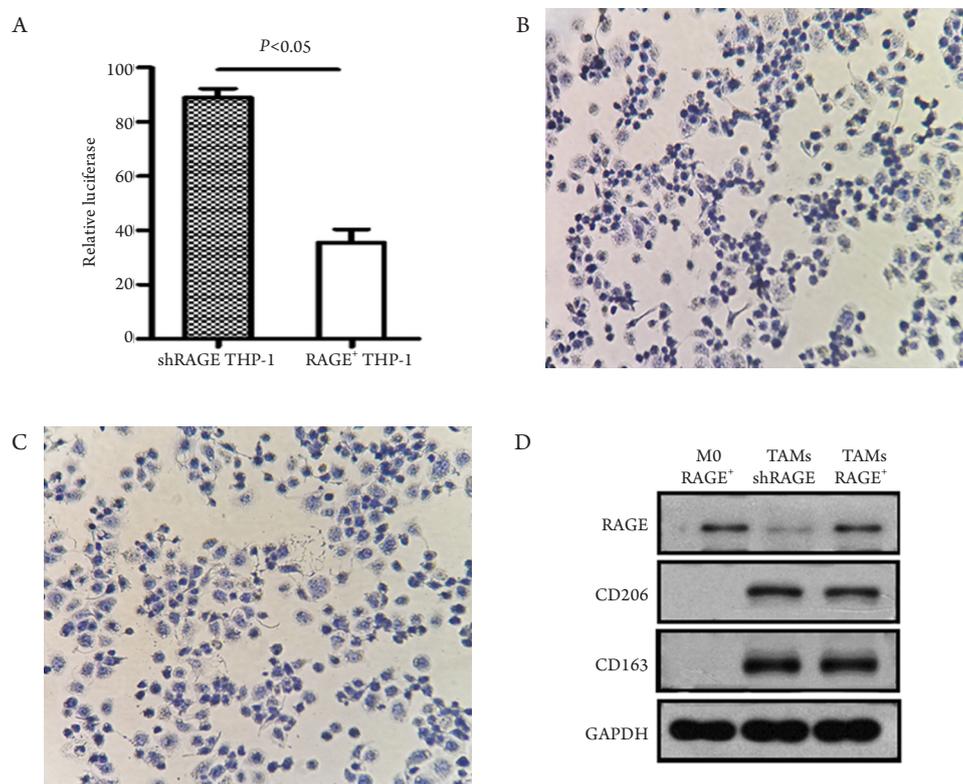


图1 诱导THP-1分化为RAGE^{+/-} M0巨噬细胞及RAGE^{+/-} TAMs细胞

Figure 1 THP-1 cells expressed RAGE gene was knocked out and polarized to M0 macrophages and TAMs

(A) shRAGE THP-1细胞内荧光素的活性高于RAGE⁺ THP-1细胞; (B) RAGE^{+/-} M0巨噬细胞(苏木精染色, × 400); (C) RAGE^{+/-} TAMs(苏木精染色, × 400); (D) 蛋白质印迹检测TAMs表达特异性的CD163, CD206蛋白同时表达RAGE, 慢病毒shRAGE感染的TAMs低表达RAGE蛋白($P < 0.05$)。

(A) The activity of luciferase in shRAGE THP-1 cells was higher than that in RAGE⁺ THP-1 cells; (B) RAGE^{+/-} M0 macrophages (hematoxylin dyeing, × 400); (C) RAGE^{+/-} TAMs (hematoxylin dyeing, × 400); (D) Western blot assay showed that TAMs expressed specific CD163 and CD206 proteins and RAGE receptors, while TAMs infected with lentivirus shRAGE expressed low RAGE proteins ($P < 0.05$).

2.4 HMGB1通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞迁移

收集的6组上清液及对照组2组分别孵育HDLEC 6 h后, 通过细胞迁移实验(图4)发现: 与其他5组及对照组比, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC迁移能力最强($P < 0.05$)。而RAGE⁻ TAMs上清液则能明显减弱HMGB1介导的促HDLEC迁移能力($P < 0.05$)。另外, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液和HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液孵育的HDLEC增殖能力均比未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(图4E)和淋巴管内皮细胞培养基(对照组, 图4F)孵育的HDLEC迁移能力更强, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。

2.5 HMGB1通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞形成淋巴管

收集的6组上清液及2组对照组分别孵育HDLEC 6 h后, 通过体外侵袭实验(图6)发现: 与其他5组及对照组比, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC形成的淋巴管数目最多($P < 0.05$)。而RAGE⁻ TAMs上清液则能明显减少HMGB1介导的促HDLEC形成的淋巴管数目($P < 0.05$)。另外, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液和HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液孵育的HDLEC形成的淋巴管数目均比未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(图6E)和淋巴管内皮细胞培养基(对照组, 图6F)孵育的HDLEC形成的淋巴管数目更多, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图7)。

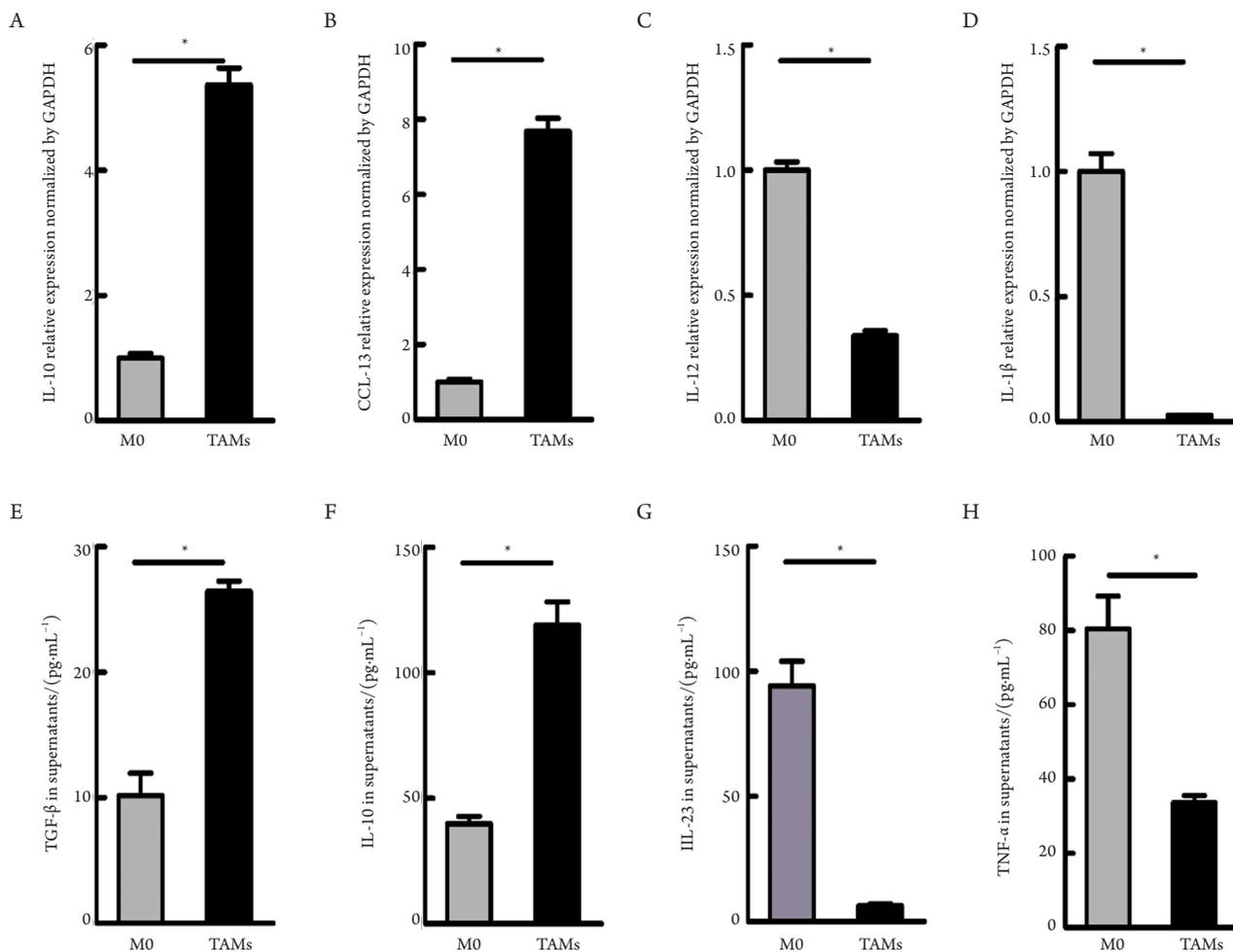


图2 THP-1诱导的TAMs表达并分泌炎症细胞因子

Figure 2 Cytokine and chemerin expression in TAMs and M0 macrophages

RT-PCR分析(A)IL-10 mRNA, (B)CCL-13 mRNA, (C)IL-12 mRNA及(D)IL-1β mRNA在TAMs和M0巨噬细胞的表达(* $P < 0.05$)。ELISA检测TAMs和M0巨噬细胞上清液(E)TGF-β mRNA, (F)IL-10 mRNA, (G)IL-23 mRNA及(H)TNF-α mRNA表达(* $P < 0.05$)。

RT-PCR was used to analyze the expression of (A) IL-10, (B) CCL-13, (C) IL-12 and (D) IL-1β in TAMs and M0 macrophages (* $P < 0.05$). The expressions of (E) TGF-β, (F) IL-10, (G) IL-23, and (H) TNF-α in supernatants of TAMs and M0 macrophages were detected by ELISA (* $P < 0.05$).

2.6 HMGB1 激活 TAMs 表面 RAGE 促进 VEGF-C 分泌增加

收集的6组上清液及2组对照组培养基, 通过ELISA实验检测上清液中VEGF-C的含量, 结果显示: 与其他5组及对照组相比, 由HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液中VEGF-C的含量最高($P < 0.05$, 图8)。而HMGB1刺激的RAGE⁻

TAMs上清液中VEGF-C的含量明显比HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液中VEGF-C的含量更少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图8), 由HMGB1刺激的RAGE^{+/-} M0巨噬细胞上清液中VEGF-C的含量与淋巴管内皮细胞培养基(对照组)中VEGF-C的含量无明显差异($P > 0.05$, 图8)。

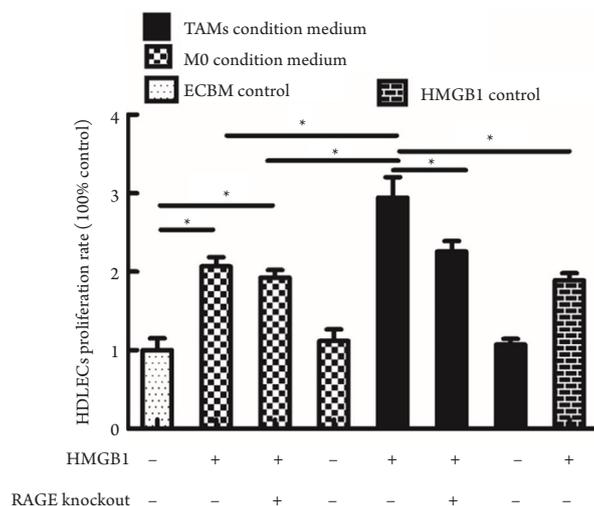


图3 CCK-8实验检测淋巴管内皮细胞的增殖能力

Figure 3 Detection of proliferation of human dermal lymphatic endothelial cells by CCK-8 assay

HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC增殖能力最强(*P<0.05)。

HDLEC with HMGB1 stimulating RAGE⁺ TAMs upper liquid incubation has the strongest proliferation ability (*P<0.05).

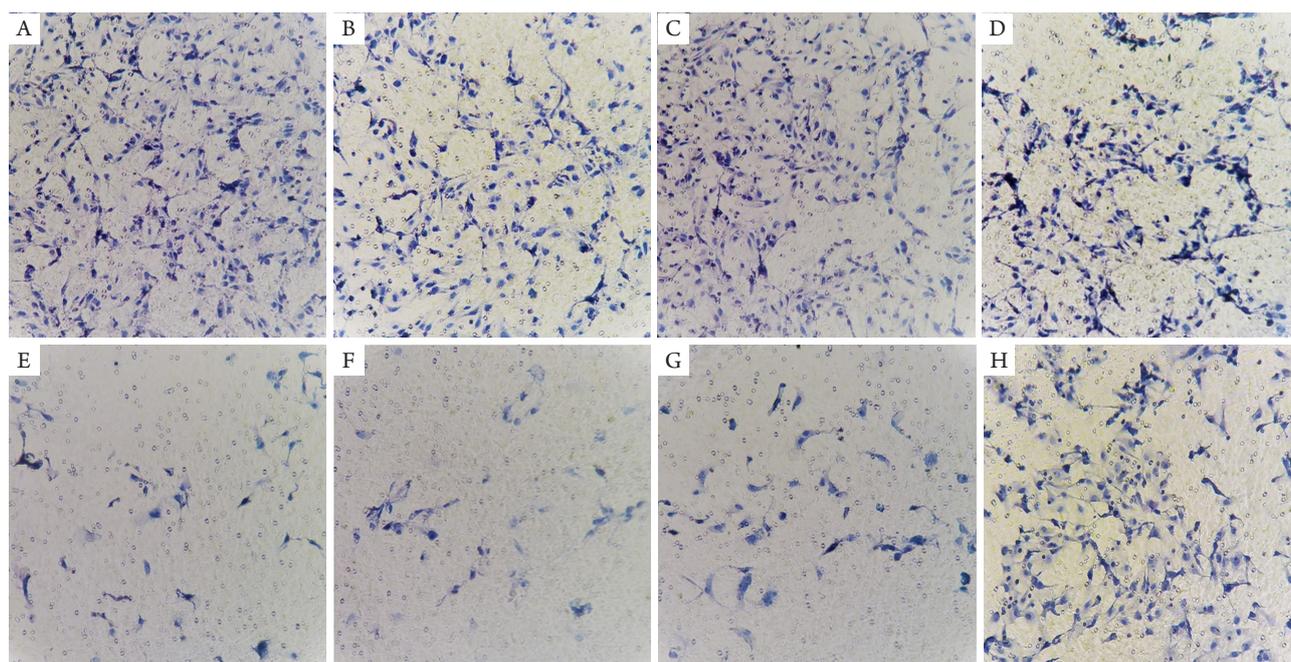


图4 HMGB1通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞迁移的数量(苏木精染色, × 400)

Figure 4 Number of lymphatic endothelial cells migrated by HMGB1 through activation of RAGE receptors on TAMs (hematoxylin dyeing, × 400)

HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液(A)、HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液(B)、HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(C)、HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液(D)、未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(E)、淋巴管内皮细胞培养基(F)、未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液(G)及HMGB1溶液(H)。

RAGE⁺ TAMs supernatant stimulated by HMGB1 (A), RAGE⁻ TAMs supernatant stimulated by HMGB1 (B), HMGB1-stimulated RAGE⁺ M0 macrophage supernatant (C), HMGB1-stimulated RAGE⁻ M0 macrophage supernatant (D), RAGE⁺ M0 macrophage supernatant without HMGB1 stimulation (E), lymphatic endothelial cell culture medium (F), RAGE⁺ TAMs supernatant without HMGB1 stimulation (G) and HMGB1 supernatant solution (H).

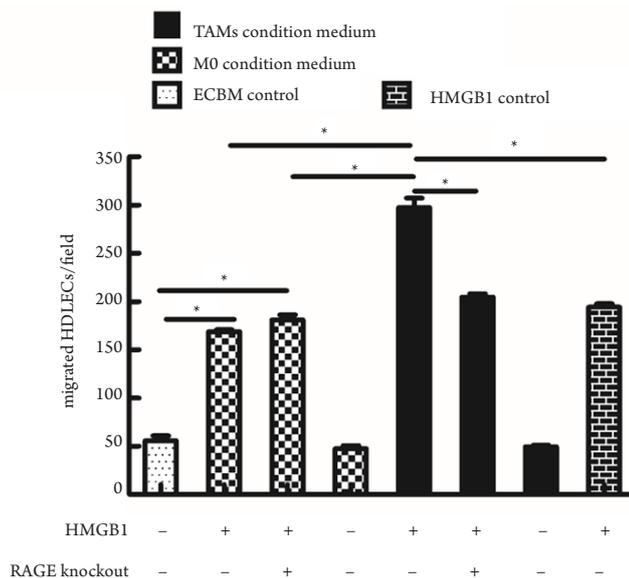


图5 Transwell法检测淋巴管内皮细胞的迁移的数量

Figure 5 Transwell method for detecting the number of human dermal lymphatic endothelial cells migration

RAGE⁻ TAMs上清液则能明显减弱HMGB1介导的促HDLEC迁移能力(*P<0.05)。

RAGE⁻ TAMs supernatant could significantly reduce the migration ability of HDLEC mediated by HMGB1(*P<0.05).

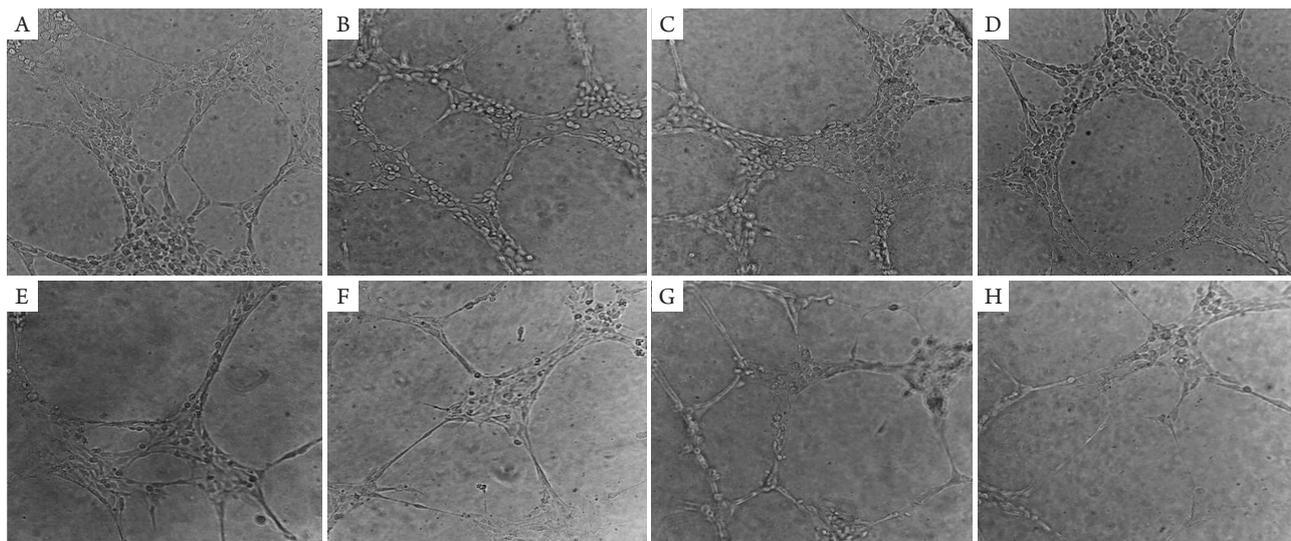


图6 HMGB1通过激活TAMs表面RAGE促进淋巴管内皮细胞形成淋巴管

Figure 6 HMGB1 promotes lymphatic vessel formation by activating RAGE receptors on TAMs

HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液(A)、HMGB1刺激的RAGE⁻ TAMs上清液(B)、HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(C)、HMGB1刺激的RAGE⁻ M0巨噬细胞上清液(D)、未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ M0巨噬细胞上清液(E)、淋巴管内皮细胞培养基(F)、未加入HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液(G)及HMGB1溶液(H)。

RAGE⁺ TAMs supernatant stimulated by HMGB1 (A), RAGE⁻ TAMs supernatant stimulated by HMGB1 (B), HMGB1-stimulated RAGE⁺ M0 macrophage supernatant (C), HMGB1-stimulated RAGE⁻ M0 macrophage supernatant (D), RAGE⁺ M0 macrophage supernatant without HMGB1 stimulation (E), lymphatic endothelial cell culture medium (F), RAGE⁺ TAMs supernatant without HMGB1 stimulation (G) and HMGB1 supernatant solution (H).

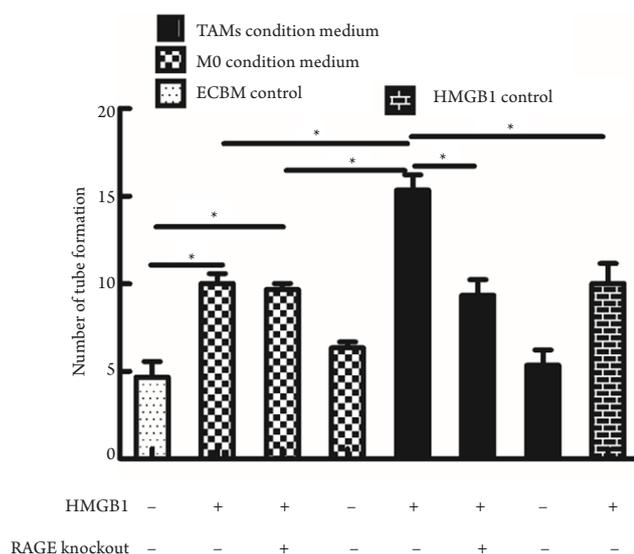


图7 体外侵袭实验检测HDLEC在条件培养基中形成淋巴管的能力

Figure 7 Matrigel test to detect the ability of HDLEC to form lymphatic vessels in conditioned medium

HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液孵育的HDLEC形成的淋巴管数目最多(* $P < 0.05$)。

HMGB1 stimulated RAGE⁺ TAMs supernatant incubated with HDLEC formed the largest number of lymphatic vessels (* $P < 0.05$).

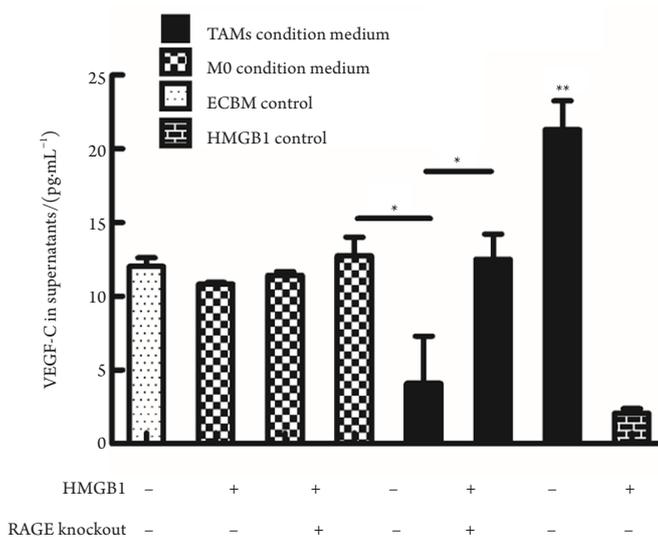


图8 HMGB1激活TAMs表面RAGE促进VEGF-C分泌增加

Figure 8 HMGB1 activates RAGE receptors on TAMs to promote the secretion of VEGF-C

HMGB1刺激的RAGE⁺ TAMs上清液中VEGF-C的含量最高(* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)。

The content of VEGF-C in RAGE⁺ TAMs supernatant stimulated by HMGB1 was the highest (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

3 讨论

异常的淋巴管生成作为肿瘤淋巴结转移过程中的一部分, 与肿瘤细胞无限繁殖及转移密切相关^[9]。然而, 肿瘤性淋巴管结构与正常发育淋巴管结构不一样, 其发育异常且在淋巴管内皮细胞之间有较大的不规则的间隙有利于肿瘤细胞间组织

液交换^[10]。增加的组织液使肿瘤间液体压增强, 同时来自肿瘤细胞和间质细胞的固体压力也在增强, 导致肿瘤性淋巴管内的压力比正常淋巴管大10~100倍^[11], 这种结构的改变使更多的来自肿瘤微环境的各种细胞因子与淋巴液一起流向正常的组织及淋巴组织, 肿瘤微环境中的细胞化学信号导致了淋巴系统的病理性改变^[12]。目前, 越来

越多的研究^[13]表明肿瘤相关淋巴管与肿瘤进展相关,特别是肿瘤转移。因此,靶向作用于已经形成的淋巴管或抑制局部淋巴管的新生,能够有效地降低恶性肿瘤的淋巴结转移,延长患者的生存时间^[1]。

RAGE是一种I型跨膜蛋白受体,其有2个潜在的n-糖基化区域,该区域羧酸化后促进RAGE与HMGB1结合并诱导下游信号通路转导^[14]。巨噬细胞表面的RAGE是目前已知的HMGB1蛋白亲和力最高的受体^[6]。HMGB1与上调的RAGE结合后可使丝裂原活化蛋白激酶如p38激酶, SAPK/JNK, ERK1/2磷酸化^[15],也可激活细胞分裂周期蛋白42(Cdc42)、鸟苷三磷酸酶(Rac)、Janus激酶/信号转导和转录激活子(JAK/STAT)信号转导通路^[16],促进趋化因子、细胞因子等的产生,并参与肿瘤增殖等。HMGB1信号通路转导也可以通过Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)进行,如TLR-2和TLR-4^[17],虽然RAGE与HMGB1的亲和力较TLR更强,但RAGE与TLR之间的相互作用所致的生物学效应也有报道,细胞种类的不同以及病理生理状态的不同也许是导致RAGE与不同受体结合的原因之一^[18]。在本研究中,当RAGE被敲除后, HMGB1促进淋巴管生成的能力明显降低,提示在淋巴管生成中,巨噬细胞表面的RAGE仍然是与HMGB1亲和力最强的受体;同时, RAGE可能也是HMGB1促淋巴管生成中起主要作用的受体。TAMs能诱导产生许多促内皮细胞生长的因子,其中被认为最重要的细胞因子是VEGF-C。Suzuki等^[19]研究发现:巨噬细胞通过诱导TGF- β 分泌而上调VEGF-C的表达最终诱导淋巴管生成。还有学者^[20]发现TNF- α 信号通路的激活完全依赖VEGFR3的活化,促炎性细胞因子TNF- α 可以激活巨噬细胞表面的肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)进而促进VEGF-C分泌, VEGF-C激活淋巴管内皮细胞表面的VEGFR3促进淋巴管生成。我们发现HMGB1刺激的RAGE⁺TAMs上清液中VEGF-C的含量最高,用该上清液培养的淋巴管内皮细胞形成的淋巴管数量也最多,证明VEGF-C在促进淋巴管生成中起重要作用。

本实验结果显示:虽然RAGE受体在M0巨噬细胞及TAMs表面均有表达,但由HMGB1刺激的RAGE⁺M0巨噬细胞上清液培养的淋巴管内皮细胞形成的淋巴管管腔数目却比HMGB1刺激的RAGE⁺TAMs上清液培养的淋巴管管腔数目更少。有学者^[21-22]发现:RAGE蛋白具有明显的多态性,在巨

噬细胞极化过程中常常出现RAGE mRNA转录本重编,使翻译的RAGE蛋白呈现出多态性,多态性有可能影响基因转录活性、与配体结合的亲和力,使RAGE发挥不同的生物学效应。因此,与M0巨噬细胞表面的RAGE相比, TAMs表面的RAGE很可能与HMGB1蛋白的亲和力更高。虽然已有报道^[15]显示激活的RAGE常常作为经典的促炎症反应蛋白,但本研究进一步证实了巨噬细胞极化状态不同能改变RAGE引起的生物学效应。另外,与淋巴管内皮细胞培养基相比,本实验提示HMGB1刺激的RAGE⁺M0巨噬细胞上清液虽然明显促进淋巴管内皮细胞增殖能力,但其上清液中的VEGF-C并没有明显升高;且HMGB1刺激的RAGE⁻M0巨噬细胞上清液与HMGB1刺激的RAGE⁻TAMs上清液培养的淋巴管内皮细胞的增殖能力也没有明显差异,我们推测HMGB1有可能作为促淋巴管生成因子作用于淋巴管内皮细胞进而促进淋巴管内皮细胞增殖^[23]。在人类发生炎症反应时HMGB1可以通过激活细胞间黏附分子1和内皮细胞黏附分子1改变内皮细胞功能^[24],但HMGB1是否需要与淋巴管内皮细胞表面的分子协同作用促进淋巴管生成目前仍不明确。

综上所述,本研究表明HMGB1通过激活肿瘤相关巨噬细胞表面RAGE促进淋巴管生成,在这一过程中细胞因子VEGF-C起着重要作用;当沉默TAMs的RAGE基因后,淋巴管形成能力明显降低。这将为寻找新制剂、抑制恶性肿瘤细胞发生淋巴管转移提供新的理论基础。但恶性肿瘤淋巴结转移过程与TAMs表面RAGE相关的下游信号通路之间的关系尚不明确,还需要进一步的研究。

参考文献

1. Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy?[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(6): F37-F42.
2. Feng A, Tu Z, Yin B. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20507-20519.
3. Sasahira T, Kirita T, Oue N, et al. High mobility group box-1-inducibile melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(9): 1806-1812.
4. He J, Zhang P, Li Q, et al. Expression of high mobility group box 1 protein predicts a poorer prognosis for patients with osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 293-298.

5. Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, et al. High-mobility group box 1 and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1/2): 131-140.
6. Korkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 61(1): 1-9.
7. Kelley PM, Connor AL, Tempero RM. Lymphatic vessel memory stimulated by recurrent inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(6): 2418-2428.
8. Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, et al. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 402(1/2): 76-81.
9. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.
10. Farnsworth RH, Lackmann M, Achen MG, et al. Vascular remodeling in cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(27): 3496-3505.
11. Munson JM, Shieh AC. Interstitial fluid flow in cancer: implications for disease progression and treatment[J]. *Cancer Manag Res*, 2014, 6: 317-328.
12. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(3): 159-172.
13. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression[J]. *Oncogene*, 2012, 31(42): 4499-4508.
14. Wilton R, Yousef MA, Saxena P, et al. Expression and purification of recombinant human receptor for advanced glycation endproducts in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 47(1): 25-35.
15. Qin YH, Dai SM, Tang GS, et al. HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products[J]. *J Immunol*, 2009, 183(10): 6244-6250.
16. Tsoyi K, Nizamutdinova IT, Jang HJ, et al. Carbon monoxide from CORM-2 reduces HMGB1 release through regulation of IFN- β /JAK2/STAT-1/INOS/NO signaling but not COX-2 in TLR-activated macrophages[J]. *Shock*, 2010, 34(6): 608-614.
17. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 367-388.
18. Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, et al. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours?[J]. *Mol Immunol*, 2013, 56(4): 739-744.
19. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, et al. Transforming growth factor- β induces vascular endothelial growth factor-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(9): 865-879.
20. Gomes FG, Nedel F, Alves AM, et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms[J]. *Life Sci*, 2013, 92(2): 101-107.
21. Novoselov VV, Sazonova MA, Ivanova EA, et al. Study of the activated macrophage transcriptome[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(3): 575-580.
22. Becker M, De Bastiani MA, Parisi MM, et al. Integrated transcriptomics establish macrophage polarization signatures and have potential applications for clinical health and disease[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13351.
23. Qiu Y, Chen Y, Fu X, et al. HMGB1 promotes lymphangiogenesis of human lymphatic endothelial cells in vitro[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 358-363.
24. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2652-2660.

本文引用: 苏才丽, 柳玮华, 郑晓丹, 刘红刚. HMGB1激活肿瘤相关巨噬细胞表面RAGE促进淋巴管生成[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(12): 2635-2645. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.001

Cite this article as: SU Caili, LIU Weihua, ZHENG Xiaodan, LIU Honggang. HMGB1 promotes lymph angiogenesis through the activation of RAGE on tumor-associated macrophages[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(12): 2635-2645. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.001