

• 论 著 •

S100A9 诱导单核细胞分泌血管内皮生长因子-A 的初步机制研究*

李春龙¹, 廖 洪^{1△}, 蒋 明²

(1. 深圳市盐田区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518081; 2. 深圳市盐田区人民医院, 广东深圳 518081)

摘要:目的 探讨 S100A9 诱导单核细胞分泌血管内皮生长因子-A(VEGF-A)的分子机制。方法 收集体检健康者外周血,利用免疫磁珠分选技术分离纯化出 CD14⁺ 单核细胞,流式细胞术检测晚期糖基化终产物受体(RAGE)的表达,然后在体外加入 S100A9 刺激培养,或预先加入抗 RAGE 抗体或 NK- κ B 信号抑制剂孵育 1 h 后再进行刺激培养,酶联免疫吸附试验检测 VEGF-A 水平。结果 S100A9 受体 RAGE 高表达于单核细胞表面,S100A9 刺激的单核细胞以剂量和时间依赖的方式分泌 VEGF-A;加入抗 RAGE 抗体阻断后,单核细胞分泌 VEGF-A 的能力明显下降($P<0.01$)。进一步利用 NK- κ B 信号抑制剂可明显抑制 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的作用($P<0.01$)。结论 S100A9 通过 RAGE-NK- κ B 信号途径诱导单核细胞上调 VEGF-A 的分泌,从而有利于新生血管的生成。

关键词: S100A9 蛋白; 血管内皮生长因子-A; 晚期糖基化终产物受体; NK- κ B 信号

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)13-1816-03

Study on the mechanism of S100A9-induced secretion of vascular endothelial growth factor-A by monocytes*

Li Chunlong¹, Liao Hong^{1△}, Jiang Ming²

(1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital of Yantian District of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518081, China; 2. Shenzhen Yantian District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518081, China)

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism of S100A9-induced secretion of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) by monocytes. **Methods** Peripheral blood specimen were collected from healthy individuals undergoing physical examination and the CD14⁺ monocytes were purified by using immunomagnetic beads and the expression of the receptor for advanced glycation endproducts(RAGE) was detected by flow cytometry. In vitro CD14⁺ monocytes were stimulated by S100A9, and anti-RAGE antibody or NK- κ B signal pathway inhibitor were pre-incubated for 1 hour and then stimulated by S100A9, the levels of VEGF-A were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The high level of RAGE was expressed by isolated CD14⁺ monocytes, after S100A9 stimulation, the secretion of VEGF-A by CD14⁺ monocytes was significantly increased in a dose and time dependent manner. However, the inducing VEGF-A was significantly decreased ($P<0.01$), while pre-treated with anti-RAGE antibody or NK- κ B inhibitor ($P<0.01$). **Conclusion** S100A9 inducing the secretion of VEGF-A by monocytes and is depended on RAGE-NK- κ B signal pathway, suggesting that S100A9 might promote angiogenesis.

Key words: S100A9 protein; vascular endothelial growth factor-A; the receptor for advanced glycation endproducts; NK- κ B signal

S100 蛋白是一类由小分子蛋白组成的钙结合蛋白,在慢性炎症和肿瘤中发挥重要作用^[1]。作为 S100 蛋白的成员之一, S100A9 常在胃癌、前列腺癌等多个肿瘤组织中表达明显增加,并与患者的预后密切相关^[2-3],然而其在肿瘤中的作用机制并不清楚。晚期糖基化终产物受体(RAGE)是 S100A9 的受体, S100A9 可通过其调控下游信号的级联反应,从而促使炎症因子的产生^[4]。最近文献报道在胶质瘤中, RAGE 缺失的肿瘤相关巨噬细胞分泌促血管生成因子——血管内皮生长因子-A(VEGF-A)的能力明显下降^[5],表明 RAGE 受体信号可影响 VEGF-A 产生。为了探索 S100A9 是否可能通过 RAGE 受体及其下游信号诱导单核/巨噬细胞分泌 VEGF-A,本研究收集健康人外周血,将分离纯化得到的单核细胞进行体外培养,探讨 S100A9 刺激单核细胞分泌 VEGF-A 的水平,并进一步阐明其分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 10 例来深圳市盐田区妇幼保健院体检的健康人外周血,其中男 5 例,女 5 例,年龄 27~40 岁。

1.2 仪器与试剂 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品

科技有限责任公司, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,鼠抗人 RAGE 抗体购自美国 Abcam 公司,藻红蛋白(PE)标记的山羊抗鼠 IgG 购自天津三箭生物技术有限公司, CD14⁺ 免疫磁珠分选试剂盒和分选缓冲液购自加拿大干细胞生物技术有限公司, APC 标记的抗人 CD14 抗体购自美国 Biolegend 公司, NF- κ B 信号抑制剂(BAY 11-7082)购自上海碧云天生物技术有限公司,人 S100A9 重组蛋白购自美国 Abnova 生技股份有限公司,抗 RAGE 阻断抗体购自美国 RD 公司, VEGF-A 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自北京达科为生物技术有限公司。

1.3 方法 利用淋巴细胞分离液对外周血细胞进行密度梯度离心,收集中间层的单个核细胞,然后根据 CD14⁺ 细胞分选试剂盒的指南分离纯化单个核细胞中的单核细胞。分选后的细胞利用鼠抗人 RAGE 抗体染色 30 min,然后再用 PE 标记的山羊抗鼠 IgG 染色 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤后流式细胞仪上机检测 RAGE 的表达。体外培养则按照每孔 5×10^5 细胞加入到 24 孔板,设置 3 个复孔,加入不同浓度(10、25、50 ng/mL)的 S100A9 进行刺激,或在 S100A9 浓度为 25 ng/mL 的刺

激条件下,同时加入终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 RAGE 抗体进行阻断;或预先加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NF- κB 信号抑制剂作用 1 h 后更换新的培养基,再加入 S100A9 刺激 24 h,收集培养上清,ELISA 检测 VEGF-A 的水平,每个实验利用 4 个人的外周血进行重复。首先,在纯化的单核细胞中加入抗 RAGE 抗体预先孵育 1 h,对 RAGE 进行封闭,然后再加入 25 ng/mL 的 S100A9 刺激 24 h,

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理和统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 S100A9 受体 RAGE 在单核细胞的表达 为了证实磁珠分选的效果,流式细胞术检测 CD14⁺ 单核细胞的纯度。未分选前 CD14⁺ 单核细胞的纯度为 12.8%,而分选后的纯度则达 90% 以上,表明分选后的单核细胞可用于后续实验,见图 1。进一步检测 S100A9 受体 RAGE 在单核细胞的表达,结果显示与同型对照组相比,经 RAGE 染色的细胞峰值明显右移,表明分离纯化的单核细胞高表达 S100A9 受体 RAGE,见图 2。

2.2 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 水平的检测 ELISA 检测结果显示:单核细胞经 S100A9 刺激后,刺激组培养上清中的 VEGF-A 水平明显高于未刺激组,且 VEGF 的浓度随着剂量和时间的增加而增加,表明 S100A9 可以剂量和时间依赖的方式诱导单核细胞分泌促血管生长因子 VEGF-A。见图 3。

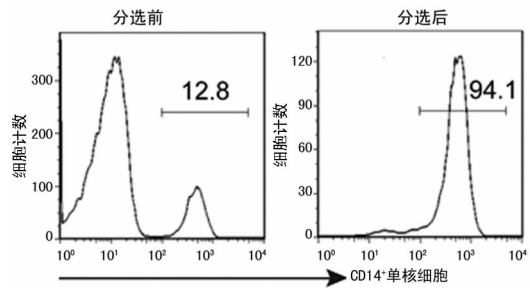
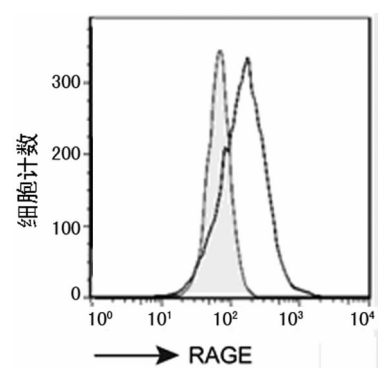


图 1 流式细胞技术染色检测分选前后 CD14⁺ 单核细胞占总细胞百分比

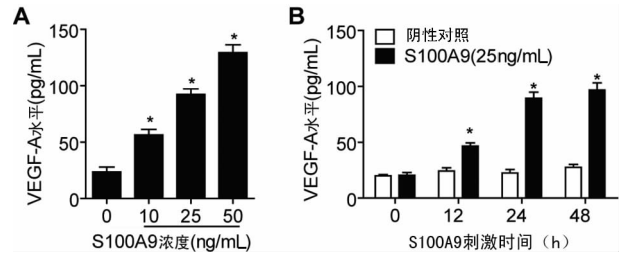


阴影部分:同型对照组。

图 2 RAGE 在单核细胞的表达

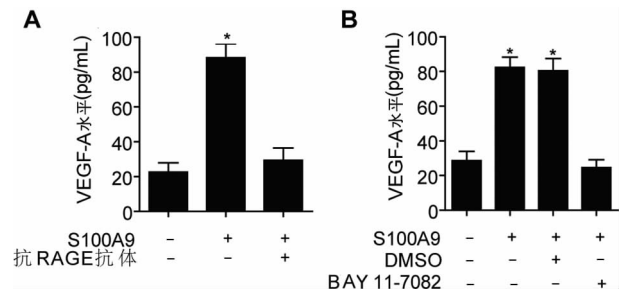
2.3 RAGE-NF- κB 信号介导 S100A9 刺激单核细胞分泌 VEGF-A 基于 S100A9 可诱导单核细胞分泌 VEGF-A 且单核细胞高表达 S100A9 的受体 RAGE,进一步探讨其可能的信号机制。ELISA 结果显示:RAGE 受体被封闭后,S100A9 刺激单核细胞分泌 VEGF-A 的能力受到明显抑制 ($P < 0.01$),表明 S100A9 经 RAGE 诱导单核细胞分泌 VEGF-A。见图 4A。由于 NF- κB 介导 RAGE 的下游信号传递,因此,在单核细胞培

养体系中预先加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NF- κB 信号抑制剂 (BAY 11-7082) 进行阻断。结果显示,在 S100A9 刺激的条件下,加入 NF- κB 抑制剂组 VEGF-A 水平明显低于未加抑制剂组 ($P < 0.01$),见图 4B。这些结果表明 S100A9 经 RAGE-NF- κB 信号诱导单核细胞分泌 VEGF-A。



A:不同浓度 S100A9 刺激单核细胞 24 h 后培养上清中 VEGF-A 的水平;B:25 ng/mL 的 S100A9 刺激单核细胞不同时间点培养上清中 VEGF-A 的水平;* : $P < 0.05$,图 A 中为与未加 S100A9 比较,图 B 中为与阴性对照比较。

图 3 S100A9 刺激单核细胞分泌 VEGF-A 的水平比较



A:抗 RAGE 抗体阻断下 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的水平;B:NF- κB 信号抑制剂作用下 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的水平;* : $P < 0.01$,图 A 中为与 S100A9(-)抗 RAGE 抗体(-)比较;图 B 中为与 S100A9(-)DMSO(-)BY 11-7082(-)比较。

图 4 抗 RAGE 抗体阻断和 NF- κB 信号抑制剂对 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的效果

3 讨 论

目前,越来越多的研究证实慢性炎症与肿瘤的发生、发展密切相关^[6]。髓样细胞来源的促炎因子可诱导正常细胞的恶性转化,并在肿瘤微环境中增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力,促进肿瘤的发生、发展^[7]。最近文献报道,肿瘤浸润的髓样细胞可分泌钙结合蛋白 S100A9,并与患者的预后呈明显负相关^[8],提示 S100A9 可能作为促炎因子促进了肿瘤的进展,但是其具体的作用机制仍不明确。

S100A9 可通过结合其相应的受体发挥功能^[9]。RAGE 作为 S100A9 的受体,在上皮细胞和髓样细胞表面均有表达。S100A9 与 RAGE 结合后,可促使上皮细胞和髓样细胞释放促瘤因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[10]。因此,笔者分离纯化出外周血中的单核细胞,利用流式细胞染色检测到其高表达 RAGE 受体,提示 S100A9 可经 RAGE 作用于单核细胞,介导下游信号的传递。

VEGF-A 作为促血管生成的因子,可诱导肿瘤新生血管的形成,从而为肿瘤的生长和转移提供营养^[11]。文献报道 RAGE 缺失的巨噬细胞分泌 VEGF-A 的能力明显下降,表明 RAGE 信号可影响 VEGF-A 的产生。本研究结果显示,在体外 S100A9 可刺激外周单核细胞分泌大量的促血管因子 VEGF-A,而且具有剂量和时间依赖性,表明 S100A9 除了诱导单核细胞产生促炎因子外,还可诱导单核细胞分泌促血管因子,二者能够协同介导肿瘤的进程。此外,笔(下转第 1820 页)

GST 分子,在此基础上利用分析软件 DNASTar、在线 T 淋巴细胞表位预测软件 ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction Server,以及从中国军事医学科学研究所购买的专业细胞抗原表位分析软件 Biosun 对 EgGST 的 B 淋巴细胞表位和 T 淋巴细胞表位分别进行预测分析。B 淋巴细胞表位是抗原分子中能特异性结合并激活产生抗体的 B 淋巴细胞的特定结构域,B 淋巴细胞表位通常由 5~20 个氨基酸组成。常用的 B 淋巴细胞表位预测方案有亲水性、抗原性、可塑性、表面可及性、二级结构和电荷分布方案。单参数检测的准确率往往不高,需要将多个参数综合进行分析以此提高分析的准确率^[5-6]。本研究采用 DNASTar 和 Biosun 软件分析 EgGST 的 B 淋巴细胞表位,两个软件分析得到的表位信息基本一致,从而提高了数据分析的可靠性,经过软件预测筛选得到 8 个 B 淋巴细胞表位。相对于 B 淋巴细胞表位的预测分析而言,T 淋巴细胞表位的预测分析相对不成熟。T 淋巴细胞不像 B 淋巴细胞可以直接识别抗原上的表位,而只能识别结合到 MHC 分子,因此对 T 淋巴细胞表位的研究多是从 MHC 分子入手^[7-8]。T 淋巴细胞表位是抗原经过抗原提呈细胞处理后经由 MHC 分子递呈给 T 淋巴细胞表面受体的抗原线性肽段。T 淋巴细胞对抗原的特异性识别主要通过 T 淋巴细胞受体(TCR)和 MHC-抗原肽段之间的相互作用来完成。TCR 所识别的是抗原递呈细胞表面的 MHC 分子及其递呈的线性短肽组成的复合物,分为 MHC I 类和 II 类分子。MHC I 类分子主要提呈一些细菌、病毒、原虫经抗原提呈细胞吞噬处理后衍生于抗原递呈细胞内部的抗原肽段,递呈给细胞毒性 T 淋巴细胞;而 MHC II 类分子主要递呈从细胞外环境摄取的外来病原体抗原,被辅助性 T 淋巴细胞(Th)识别并介导针对特异抗原的细胞免疫应答。由于细粒棘球绦虫为虫体较大的多细胞生物,其抗原分子被抗原

提呈细胞识别后主要由 MHC II 分子递呈给 CD4⁺ Th 细胞产生免疫应答效应。因此,笔者主要基于 MHC II 分子分析 EgGST 的 T 淋巴细胞表位。ProPred MHC Class- II Binding Peptide Prediction 软件主要是通过 motif 模型建立的预测方法,预测 EgGST 有 7 个特异性 T 淋巴细胞表位。在后续研究中还需要进一步通过实验对分析预测得到的实验数据和结果进行验证。

参考文献

[1] 蒋次鹏. 今日中国包虫病地区分布[J]. 中华医学杂志,2002,115(8):1244-1247.

[2] 李文佳,陈雅荣. 细粒棘球绦虫 AgB 研究进展[J]. 2008,24(2):170-172.

[3] Polat KY,Balik AA,Celebi F,et al. Hepatic alveola echinococcosis[J]. Can J Surg,2002,45(6):415-419.

[4] 黄艳新,鲍永利,李玉新,等. 抗原表位预测的免疫信息学方法研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(9):857-861.

[5] 梁瑾,王靖飞. B 细胞表位预测方法研究进展[J]. 生命科学,2009,21(2):320-323.

[6] Saha S,Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. Proteins,2006,65(1):40-48.

[7] Yang WC,Chen L,Li HB,et al. Identification of two novel immunodominant UreB CD4(+) T cell epitopes in Helicobacter pylori infected subjects[J]. Vaccine,2013,31(8):1204-1209.

[8] Leen AM,Christin A,Khalil M,et al. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy[J]. J Virol,2008,82(1):546-548.

(收稿日期:2015-04-18)

(上接第 1817 页)

者加入 RAGE 受体抑制剂阻断 S100A9 与 RAGE 结合,结果发现单核细胞分泌的 VEGF-A 明显下降。进一步探讨 S100A9 诱导单核细胞分泌 VEGF-A 的信号机制,结果发现在均有 S100A9 刺激条件下,预先加入 NF-κB 信号通路抑制剂的处理组上清中 VEGF-A 的浓度明显低于未处理组,基于 NF-κB 可介导 RAGE 受体的下游信号^[12],提示在体外培养的单核细胞体系中,S100A9 可经 RAGE-NF-κB 信号级联诱导 VEGF-A 的分泌。由于肿瘤细胞也表达 RAGE 受体,那么,S100A9 是否也能够有效刺激肿瘤细胞分泌 VEGF-A 还有待进一步研究。

综上所述,S100A9 可通过 RAGE 受体及其下游 NF-κB 信号通路诱导单核细胞分泌 VEGF-A,从而促进新生血管的形成。进一步全面阐明 S100A9 在肿瘤微环境中的调节功能,将为设计阻断 S100A9 及其受体的治疗方案提供帮助。

参考文献

[1] 蒋秋林,孙晓红. S100A8/A9 在炎症和肿瘤中的应用及作用机制研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(9):125-127.

[2] Wang L,Chang EW,Wong SC,et al. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins[J]. J Immunol,2013,190(2):794-804.

[3] Tidehag V,Hammarsten P,Egevad L,et al. High density of S100A9 positive inflammatory cells in prostate cancer stroma is associated with poor outcome[J]. Eur J Cancer,2014,50(10):1829-1835.

[4] Tobon-Velasco JC,Cuevas E,Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-κB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,2014,13(9):1615-1626.

[5] Chen X,Zhang L,Zhang IY,et al. RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma[J]. Cancer Res,2014,74(24):7285-7297.

[6] Francescone R,Hou V,Grivennikov SI. Cytokines,IBD, and Colitis-associated Cancer[J]. Inflamm Bowel Dis,2015,21(2):409-418.

[7] Caronni N,Savino B,Bonecchi R. Myeloid cells in cancer-related inflammation[J]. Immunobiology,2015,220(2):249-253.

[8] Tidehag V,Hammarsten P,Egevad L,et al. High density of S100A9 positive inflammatory cells in prostate cancer stroma is associated with poor outcome[J]. Eur J Cancer,2014,50(10):1829-1835.

[9] Markowitz J,Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer[J]. Biochim Biophys Acta,2013,1835(1):100-109.

[10] 张菁. S100A8/A9 和 RAGE 相互作用的研究[D]. 南方医科大学,2012.

[11] Fontana E,Sclafani F,Cunningham D. Anti-angiogenic therapies for advanced esophago-gastric cancer[J]. Indian J Med Paediatr Oncol,2014,35(4):253-262.

[12] Xie J,Méndez JD,Méndez-Valenzuela V,et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)[J]. Cell Signal,2013,25(11):2185-2197.

(收稿日期:2015-05-12)