

# HMBOX1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖和免疫逃逸的作用研究\*

杨小珍<sup>1</sup>, 何丹<sup>2</sup>, 杨小桃<sup>3\*\*</sup>

(1. 曲靖医学高等专科学校 微生物研究所, 云南 曲靖 655000; 2. 曲靖市第一人民医院 神经内科, 云南 曲靖 655000; 3. 昆明市五华区人民医院 血透室, 云南 昆明 650031)

**[摘要]** 为分析 HMBOX1 在非小细胞肺癌中的表达情况并探索其对肺癌细胞增殖和免疫逃逸能力的影响, 探寻了 HMBOX1 在非小细胞肺癌中的生物学功能. 采用免疫组化定量分析了肺癌组织和邻近正常组织中 HMBOX1 的表达; 采用细胞免疫荧光和 western blot 分析人正常支气管上皮样细胞系 (16HBE) 和人非小细胞肺癌细胞系 (A549) 中 HMBOX1 的表达; 采用 MTT 法检测人自然杀伤细胞系 (NK-92) 对 A549 细胞的细胞毒作用; 采用 CCK-8 法检测 A549 细胞的增殖能力. 结果显示: HMBOX1 在非小细胞肺癌组织中的表达显著低于癌旁正常组织 ( $P < 0.001$ ), 并且在 A549 细胞中的表达显著下降, 低于 16HBE 细胞 ( $P < 0.001$ ); 与阴性对照组相比, A549 细胞中的 HMBOX1 过表达后, 细胞增殖能力受到抑制 ( $P < 0.001$ ), 并且 NK-92 细胞对 A549 细胞的细胞毒作用得到显著加强 ( $P < 0.01$ ), A549 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  质量浓度显著下降 ( $P < 0.01$ ). 综上所述, HMBOX1 能够抑制非小细胞肺癌细胞的增殖能力和免疫逃逸能力, 可为非小细胞肺癌的免疫治疗提供新的作用靶点和治疗策略.

**[关键词]** 非小细胞肺癌; HMBOX1 蛋白; 增殖; 免疫逃逸

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639 (2023) 03-0113-06

**DOI:** 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2023.03.018

非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的肺癌种类, 约占所有肺癌病例的 85%, 包括 3 种临床亚型: 腺癌、鳞状细胞癌和大细胞癌<sup>[1]</sup>. 近年来, 针对肺部肿瘤的免疫检查点阻断剂的发现有效证明了非小细胞肺癌的免疫原性<sup>[2]</sup>. 与传统的铂类抗癌治疗方案相比, 接受尼伐单抗治疗的非小细胞肺癌患者生存期延长了 1 年<sup>[3]</sup>. 尽管免疫检查点阻断剂广泛应用于晚期 NSCLC 的治疗, 但大多数患者在免疫治疗过程中都会发生固有或后天的免疫抵抗<sup>[4]</sup>. 肿瘤免疫逃逸 (Tumor immune escape) 是指肿瘤细胞通过不同机制来抑制或逃避机体免疫细胞的识别攻击, 从而持续在机体内进行侵袭或增殖<sup>[5]</sup>. 研究<sup>[6]</sup>证实, 非小细胞肺癌的肿瘤微环境刺激免疫抑制细胞的有效激活, 免疫抑制细胞会分泌免疫抑制分子或其受体, 从而建立对免疫检查点阻断剂的耐药抵抗. 随着生物技术的进步, 在分子水平上调节免疫细胞功能为 NSCLC 的治疗提供了新的免疫见解<sup>[6]</sup>. 因此, 当前关于 NSCLC 的研究关键点在于发现可能逆转或阻止免疫逃逸的新分子靶标, 这将有助于进一步改善非小细胞肺癌患者的预后和生存率.

HMBOX1 (homeobox containing 1) 是一种新发现的人类同源盒基因, 首次从人类胰腺 cDNA 文库中分离得到. HMBOX1 属于 Hmbox 家族, 具有 78 个氨基酸的非典型同源框结构域和 1 个 HNF1-N 结构域, 定位于细胞质和细胞核, 广泛分布于包括肺、肝在内的器官和组织中<sup>[7]</sup>. 关于 HMBOX1 的生物学功能引起了研究者的关注, 有研究显示, HMBOX1 可以直接与端粒双链 DNA 结合, 并有助于细胞端粒维持<sup>[7]</sup>. 在肿瘤研究方面, 与邻近的正常组织相比, HMBOX1 在肝癌组织中的表达水平明显较低<sup>[8]</sup>. 更重要的是,

\* [收稿日期] 2022-10-19

[作者简介] 杨小珍, 男, 云南富源人, 曲靖医学高等专科学校实验师, 研究方向为微生物与免疫学.

\*\* [通信作者] 杨小桃, 女, 云南富源人, 昆明市五华区人民医院住院医师, 硕士, 研究方向为临床肿瘤基础, E-mail: 155179824@qq.com.

HMBOX1能够在自然杀伤(natural killer, NK)细胞中作为干扰素 $\gamma$ (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )的转录抑制因子<sup>[9]</sup>,而IFN- $\gamma$ 是促进包括NSCLC在内的多种恶性肿瘤细胞免疫逃逸的关键因子<sup>[10]</sup>.最近研究发现, HMBOX1可以抑制肝癌细胞的免疫逃逸,其潜在机制可能包括促进自噬,提高肿瘤细胞对NK细胞溶解作用的敏感性<sup>[11]</sup>.但目前关于HMBOX1在非小细胞肺癌中的确切生物学功能尚不清楚.

为了探索HMBOX1是否在非小细胞肺癌的免疫逃逸中发挥调控作用,课题组检测了61例非小细胞肺癌患者的肺癌组织和癌旁组织中HMBOX1的表达情况,分析了人正常支气管上皮样细胞16HBE和非小细胞肺癌细胞A549中HMBOX1的表达差异,并转染HMBOX1过表达载体增强A549细胞中HMBOX1的表达,探索其对A549细胞增殖和免疫逃逸能力的影响,从而为HMBOX1在非小细胞肺癌免疫治疗中的应用提供新的理论参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 临床样本采集

本研究共收集61对非小细胞肺癌患者(男性35例,女性26例,平均年龄55.89岁)的非小细胞肺癌组织和邻近正常组织样本,并立即在液氮中冷冻保存用于实验研究.本研究方案经云南省肿瘤医院伦理委员会审查和批准,并且已经获取了每位患者签署的书面同意书.

### 1.2 试剂和仪器

人正常支气管上皮样细胞系(16HBE, FH1013)、人非小细胞肺癌细胞系(A549, FH0045)购自上海富衡生物科技有限公司;RPMI-1640培养基(11875093)、胎牛血清(10099141)、100 U/mL青霉素-链霉素(15140148)、Lipofectamine 2000转染试剂(11668019)购自美国Thermo Fisher公司;HMBOX1抗体(DF13062)、GAPDH抗体(AF7021)和相应的辣根过氧化物酶标记的二抗购自Affinity Biosciences公司;IFN- $\gamma$ ELISA检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司;MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(C0009S)和western blot相关检测试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;枪头、细胞培养板等常用耗材购自无锡耐思生命科技股份有限公司.二氧化碳细胞培养箱(Forma, 美国赛默飞)、酶标仪(Multiskan FC, 美国赛默飞)、Olympus电子荧光显微镜(MIS 2000, 日本奥林巴斯公司),化学发光成像分析仪(ImageQuant LAS 4000, 美国通用公司).

### 1.3 细胞培养和过表达细胞

人正常支气管上皮样细胞系(16HBE)、人非小细胞肺癌细胞系(A549)和人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞(NK-92)使用RPMI-1640(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素-链霉素)进行培养,细胞在37℃的5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养. HMBOX1过表达载体HMBOX1-pcDNA3.1和相应的阴性对照品(pc-NC)均委托生物公司设计合成.使用Lipofectamine 2000试剂盒将上述质粒转染到A549细胞中,传代后使用第3代和第4代细胞开展研究.

### 1.4 免疫组织化学和评分

使用免疫组织化学技术分析临床组织样本中HMBOX1的表达.首先将石蜡包埋的组织块切成4  $\mu$ m的切片,在二甲苯中脱蜡,在梯度浓度酒精中重新水化,加入0.3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭,然后用5%山羊血清封闭后在4℃下与HMBOX1第一抗体(1:1 000)孵育过夜.在室温下用HRP标记的二抗孵育1 h后,使用二氨基联苯胺底物显影,最后用苏木精对切片进行复染. HMBOX1阳性表现为切片上的棕色颗粒.根据文献<sup>[10]</sup>报道的H-score方法评估HMBOX1的免疫染色强度,并将评分结果用于统计分析.

### 1.5 细胞免疫荧光

使用细胞免疫荧光观察不同细胞中HMBOX1的表达,将16HBE或A549细胞在96孔板中培养6 h后用4%多聚甲醛固定30 min后,再用5%山羊血清封闭加入HMBOX1抗体在4℃培养过夜.然后用PBS清洗细胞后使用二抗避光培养1 h,并用DAPI对细胞核进行复染,最后使用放大400倍的荧光显微镜在相应的激发波长下观察荧光强度.

### 1.6 NK细胞毒作用测试

使用MTT法检测NK-92细胞对A549细胞的细胞毒活性.转染不同质粒的A549细胞在转染后24 h以

$1 \times 10^4$  个细胞/孔的速度接种在 96 孔板中, 以 10:1、5:1 或 2.5:1 的比例添加 NK-92 细胞, 并孵育 6 h, 再加入  $20 \mu\text{L}$ /孔的  $10 \text{ mg/mL}$  的 MTT 溶液, 再培养 4 h 后读取 570/630 nm 处的吸光度值, 细胞毒性百分率的计算公式为: 裂解 (%) =  $1 - (OD_{E+T} - OD_E) / OD_T \times 100\%$ ; 式中,  $OD$  为吸光度;  $E$  表示效应细胞群;  $T$  表示靶细胞组;  $E + T$  表示效应细胞组和靶细胞组。

### 1.7 细胞增殖能力检测

采用 CCK-8 法检测 A549 细胞的增殖能力, 将转染细胞以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中, 在细胞培养 12 h、24 h、36 h、48 h 后, 分别向每个孔中添加  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 室温孵育 2 h 后, 使用酶标仪读取每个样品在 450 nm 处的吸光度。

### 1.8 蛋白印迹检测

使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液对细胞进行裂解后提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白浓度定量, 蛋白质 ( $30 \mu\text{g}$ ) 在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上通过 SDS-PAGE 进行分离, 然后转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 1 h, 加入 HMBOX1 一抗 (1:1 000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 然后在室温下用 HRP 标记的二抗孵育 2 h, 最后加入 ECL 试剂显色并拍摄蛋白条带。

### 1.9 酶联免疫吸附检测

采用酶联免疫吸附 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒分析 A549 细胞上清液中 IFN- $\gamma$  的浓度, 实验操作根据操作说明书进行, 使用酶标仪读取各组吸光度值, 并根据试剂盒提供的标准品绘制标准曲线, 以此计算样品中的 IFN- $\gamma$  的浓度。

### 1.10 统计分析

所有实验重复 3 次, 数据均使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行处理, 数据以平均值  $\pm$  标准差的形式表示。数据的组间两两比较采用 Student  $t$  检验,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HMBOX1 在非小细胞肺癌组织中表达下降

免疫组化结果显示, 在非小细胞肺癌患者的临床样本中, 癌组织和癌旁正常组织的细胞中均存在 HMBOX1 阳性表达, 但表达强度存在明显差异 (图 1)。评分结果表明, 非小细胞肺癌组织中 HMBOX1 的 H-Score 显著低于癌旁正常组织 ( $P < 0.001$ ), 证实非小细胞肺癌组织中 HMBOX1 的表达显著下降 (图 2)。

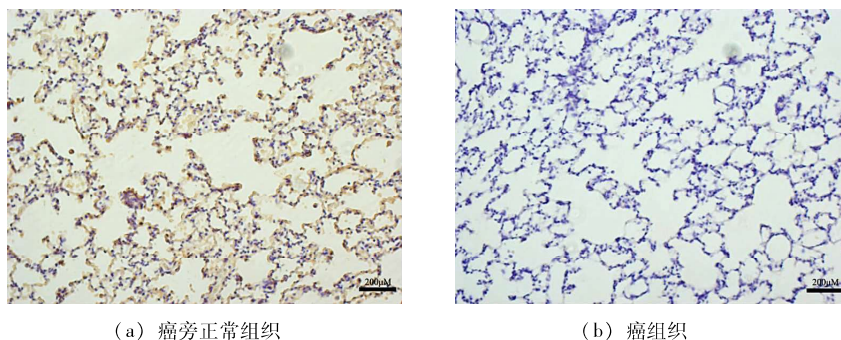


图 1 组织中 HMBOX1 的免疫组化染色

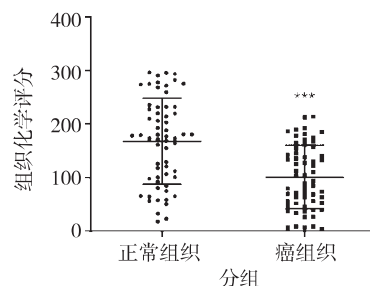


图 2 癌旁正常组织和肺癌组织中 HMBOX1 的免疫组化染色评分

注: \*\*\* 表示  $P < 0.001$ , 与正常组织组相比。

### 2.2 HMBOX1 在非小细胞肺癌细胞中表达下降

体外细胞免疫荧光实验观察到, 与16HBE细胞相比, HMBOX1在A549细胞中的表达明显下降(图3(a)). 使用蛋白免疫印迹检测进行定量分析表明, 非小细胞肺癌A549细胞中HMBOX1的表达显著下降, 差异具有统计学意义( $P < 0.001$ , 图3(b)).

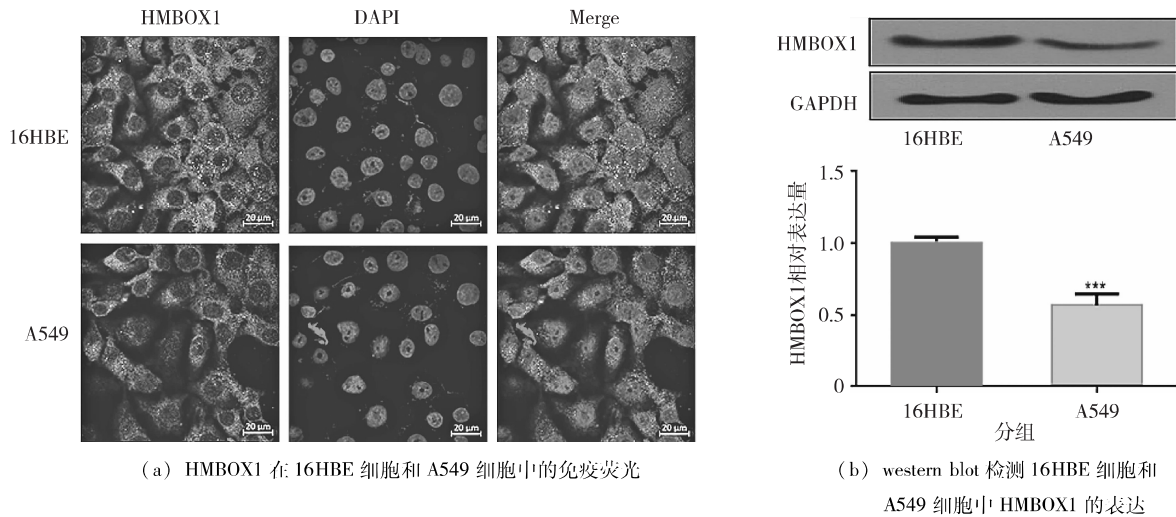


图3 HMBOX1 在 16HBE 细胞和 A549 细胞中的表达差异

注: \*\*\*表示  $P < 0.001$ , 与 16HBE 细胞相比.

### 2.3 HMBOX1 过表达抑制非小细胞肺癌增殖和免疫逃逸

为了探索 HMBOX1 在非小细胞肺癌中的调控作用, 课题组构建了 pcDNA 3.1-HMBOX1 过表达载体, 采用 western blot 验证转染效果, 结果表明, pcDNA 3.1-HMBOX1 转染的 A549 细胞中 HMBOX1 表达显著上调 ( $P < 0.001$ , 图 4(a)). 在此细胞模型基础上, 课题组使用 CCK-8 法检测了细胞增殖能力的改变, 结果显示, HMBOX1 过表达的 A549 细胞增殖能力显著下降, 呈时间依赖性, 并且在 48h 时与阴性对照组相比具有显著差异 ( $P < 0.001$ , 图 4(b)).

为了证实 HMBOX1 在非小细胞肺癌免疫逃逸中的作用, 课题组将 NK-92 与 A549 细胞共培养. 结果表明, HMBOX1 过表达的 A549 细胞受到 NK-92 的细胞毒作用显著增强 (与阴性对照组相比,  $P < 0.01$ , 图 4(c)), ELISA 检测结果显示, HMBOX1 过表达后, A549 细胞上清液中 IFN- $\gamma$  质量浓度显著下降 (与阴性对照组相比,  $P < 0.01$ , 图 4(d)), 上述结果表明 HMBOX1 过表达阻断了 A549 细胞的免疫逃逸.

### 3 讨论与结论

HMBOX1 是一种新型转录抑制因子, 其结构和生物功能尚未完全阐明. 在本研究中, 课题组发现非小细胞肺癌临床组织样本和细胞系中 HMBOX1 表达显著下调, 并且其功能与肺癌细胞的增殖能力和免疫逃逸有关, 证明 HMBOX1 在肺癌免疫调节中起着重要的调控作用, 并可作为免疫治疗靶点.

研究显示, HMBOX1 参与了多种癌症的病理进程, 并且发挥了不同的调控作用. 例如, Chen S 等<sup>[12]</sup>研究发现 WTAP 在功能上参与了骨肉瘤的体内外增殖和转移. 从机理上来看, HMBOX1 被鉴定为 WTAP 的靶基因, 其在骨肉瘤中表达下调, 是骨肉瘤患者总体生存率的独立预后因素, 并且 WTAP/HMBOX1 通过 PI3K/AKT 途径调节骨肉瘤的生长和转移. 但另一方面, 也有研究<sup>[13]</sup>认为, HMBOX1 在胃癌组织和细胞系中表达显著上调, 并与胃癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移和总体生存率相关, 而 HMBOX1 在胃癌细胞中的过度表达通过加速细胞周期、诱导细胞迁移来增强细胞增殖. 此外, HMBOX1 联合 CD133 可能有助于预测晚期胃癌患者的生存率<sup>[13]</sup>. 而本课题组的研究采用多种检测技术, 从临床样本到细胞株, 揭示了 HMBOX1 在非小细胞肺癌中表达下调, 是参与肺癌恶性表型和病理进程的重要因子.

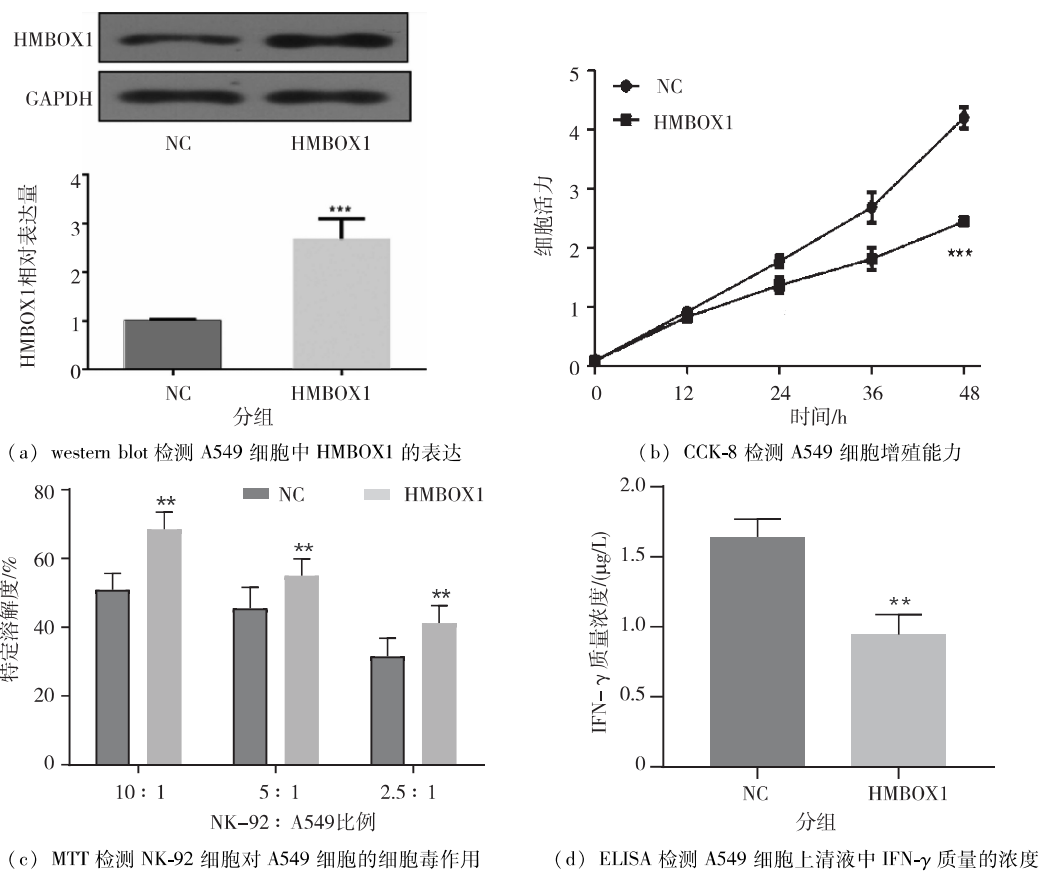


图 4 HMBOX1 过表达抑制非小细胞肺癌增殖和免疫逃逸

注: \*\* 表示  $P < 0.01$ 、\*\*\* 表示  $P < 0.001$ , 与 NC 组细胞相比。

越来越多的研究表明, NK 细胞在肿瘤免疫监测中发挥着关键作用, 并作为对抗癌细胞的第 1 道防线. NK 细胞受体与癌细胞表面配体之间的识别是 NK 细胞介导的细胞杀伤的第一步. 肺癌细胞可以通过多种机制抑制人体的抗肿瘤免疫反应<sup>[14]</sup>, 例如, 肺癌细胞分泌的 IFN- $\gamma$  会进一步激活 PD-L1 等免疫逃逸基因, 并且能增强调节性 T 细胞等免疫抑制细胞的增殖和活性, 从而促进癌细胞的免疫逃逸<sup>[15]</sup>. 因此, 本研究发现, 使用过表达载体转染 A549 细胞, 增强 HMBOX1 表达后, 课题组观察到细胞增殖能力减弱, IFN- $\gamma$  分泌减少, 同时能够有效增强 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫反应, 证实 HMBOX1 能够抑制 A549 细胞的增殖和免疫逃逸.

综上, 本研究首次证明了 HMBOX1 可以抑制非小细胞肺癌的免疫逃逸, 限制肿瘤细胞增殖, 提示通过靶向使用 HMBOX1 激动剂可能增强肺癌的免疫治疗效果, 并为肺癌的发生机制和临床治疗提供了新的视角.

#### [参考文献]

- [1] DUMA N, SANTANA-DAVILA R, MOLINA J R. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis and treatment [J]. Mayo Clinic Proceedings, 2019, 94 (8): 1623-1640.
- [2] PASSIGLIA F, COMMENDATORE O, VITALI M, et al. Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: a bridge between research and clinical practice [J]. Future Oncology, 2018, 14 (13): 41-60.
- [3] SURESH K, NAIDOO J, LIN CT, et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer: benefits and pulmonary toxicities [J]. Chest, 2018, 154 (6): 1416-1423.
- [4] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553: 446-454.
- [5] MORTEZAEE K. Immune escape: A critical hallmark in solid tumors [EB/OL]. (2020-10-01)[2022-10-10]. <https://>

www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520308614?via%3Dihub.

- [6] OSIPOV A, SAUNG M T, ZHENG L, et al. Small molecule immunomodulation; the tumor microenvironment and overcoming immune escape [J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7 (1): 224.
- [7] CHEN S, SAIYIN H, ZENG X, et al. Isolation and functional analysis of human HMBOX1, a homeobox containing protein with transcriptional repressor activity [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2006, 114 (2): 131-136.
- [8] MA H L, SU L, YUE H W, et al. HMBOX1 interacts with MT2A to regulate autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5 (1): 1-14.
- [9] WU L, ZHANG C, ZHENG X, et al. HMBOX1, homeobox transcription factor, negatively regulates interferon- $\gamma$  production in natural killer cells [J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11 (11): 1895-1900.
- [10] ANICHINI A, PEROTTI V E, SGAMBELLURI F, et al. Immune escape mechanisms in non small cell lung cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12 (12): 3605.
- [11] ZHAO H, JIA H, HAN Q, et al. Homeobox containing 1 inhibits liver cancer progression by promoting autophagy as well as inhibiting stemness and immune escape [J]. *Oncology Reports*, 2018, 40 (3): 1657-1665.
- [12] CHEN S, LI Y, ZHI S, et al. WTAP promotes osteosarcoma tumorigenesis by repressing HMBOX1 expression in an m6A-dependent manner [J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11 (8): 1-14.
- [13] DIAO N, LI Y, YANG J, et al. High expression of HMBOX1 contributes to poor prognosis of gastric cancer by promoting cell proliferation and migration [EB/OL]. (2019-04-18) [2022-10-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218382994?via%3Dihub>.
- [14] POCKLEY A G, VAUPEL P, MULTHOFF G. NK cell-based therapeutics for lung cancer [EB/OL]. (2019-04-18) [2022-10-10]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218382994?via%3Dihub>.
- [15] LAI Q, WANG H, LI A, et al. Decitabine improve the efficiency of anti-PD-1 therapy via activating the response to IFN/PD-L1 signal of lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (17): 2302-2312.

### Effect on HMBOX1 for Inhibiting Proliferation and Immune Escape of Non-Small Cell Lung Cancer Cells

YANG Xiaozhen<sup>1</sup>, HE Dan<sup>2</sup>, YANG Xiaotao<sup>3</sup>

(1. Institute of Microbiology, Qujing Medical College, Qujing, Yunnan, China 655000;

2. Department of Neurology, Qujing First People's Hospital, Qujing, Yunnan, China 655000;

3. Dialysis Room, People's Hospital of Wuhua District, Kunming, Yunnan, China 650031)

**Abstract:** In order to analyze the expression of HMBOX1 in NSCLC and explore its effect on the proliferation and immune escape ability of NSCLC cells, the biological function of HMBOX1 in NSCLC was explored. The expression of HMBOX1 in lung cancer tissues and adjacent normal tissues was quantitatively analyzed by immunohistochemistry; the expression of HMBOX1 in human normal bronchial epithelioid cell line (16 HBE) and human non-small cell lung cancer cell line (A549) was analyzed by immunofluorescence and western blot; the cytotoxic effect of human natural killer cell line (NK-92) on A549 cells was detected by MTT assay, and the proliferation ability of A549 cells was detected by CCK-8 assay. The results show that the expression of HMBOX1 in NSCLC tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ( $P < 0.001$ ), and the expression in A549 cells was significantly decreased, lower than that in 16 HBE cells ( $P < 0.001$ ); compared with the negative control group, the cell proliferation ability of A549 cells was inhibited after HMBOX1 overexpression ( $P < 0.001$ ), and the cytotoxic effect of NK-92 cells on A549 cells was significantly enhanced ( $P < 0.01$ ), and the concentration of IFN- $\gamma$  secreted by A549 cells was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). In summary, HMBOX1 is able to inhibit the proliferation ability and immune escape ability of non-small cell lung cancer cells and can provide new targets and therapeutic strategies for immunotherapy of non-small cell lung cancer.

**Key words:** Non-small cell lung cancer; HMBOX1; proliferation; immune escape

(责任编辑: 陈伟超)