

## 高迁移率族蛋白在卵巢癌的诊断价值及其对卵巢癌疾病进展的调控功能\*

李迎春 田菁 姚海荣 张文琪 郝权

**摘要 目的:**研究高迁移率族蛋白(HMGB1)在上皮性卵巢癌、卵巢良性疾病及健康人血清中的表达情况及与临床治疗的关系,通过RNA干扰抑制探讨HMGB1对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:**ELISA检测47例卵巢癌患者手术前及术后1个月血清中HMGB1表达水平,30例卵巢良性疾病患者作为良性肿瘤组,30例健康女性作为正常对照组;靶向HMGB1基因的慢病毒载体转染卵巢癌细胞,并利用RT-PCR和Western Blot方法检测干扰效果,CCK-8法检测细胞增殖情况,Transwell小室模型检测细胞侵袭迁移能力。**结果:**卵巢癌组HMGB1水平明显高于良性肿瘤组与正常对照组( $P<0.01$ ),卵巢癌术后HMGB1较术前明显降低( $P<0.01$ ),抑制HMGB1的表达可以降低卵巢癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力。**结论:**HMGB1水平与卵巢癌进展密切相关,其表达下调可显著抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移侵袭能力,有望对卵巢癌的临床检测及治疗提供新思路。

**关键词** 高迁移率族蛋白质类 卵巢肿瘤 RNA干扰

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20131067

### High-mobility group protein B1 (HMGB1) and its potential in diagnosis and treatment of ovarian cancer

Yingchun LI, Jing TIAN, Hairong YAO, Wenqi ZHANG, Quan HAO

Correspondence to: Quan HAO; E-mail: haoquandocor@126.com

Department of Gynecologic Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China.

This work was supported by a grant from the Tianjin Municipal Natural Science Foundation of the Tianjin Science and Technology Commission (No. 12JCYBJC17000).

**Abstract Objective:** The objective of this research is to study the serum level of the high-mobility group protein B1 (HMGB1) in human ovarian tumor (OvCa) and in a healthy control. This study also aims to identify different HMGB1 levels before and after surgery and to explore the inhibitory effect of HMGB1 gene silencing in the proliferation and invasion ability of OvCa. **Methods:** Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the serum level of HMGB1 in OvCa patients and healthy subjects. Lentivirus vector with HMGB1 shRNA was constructed and used to infect OvCa cells. The expressions of HMGB1 mRNA and protein were tested by real-time PCR and Western blot. Cell proliferation was detected using the Cell Counting Kit-8 assay, whereas cell invasion and migration were detected by Transwell assay. **Results:** The serum level of HMGB1 was more elevated in patients with malignant diseases compared with individuals with benign diseases and the control groups. In the malignant group, the serum level of HMGB1 decreased noticeably after therapy. Down-regulation of HMGB1 expression resulted in the inhibition of the biological behavior and metastasis of ovarian cancer cells. **Conclusion:** HMGB1 is closely associated with clinicopathologic features of OvCa. Knockdown of HMGB1 expression can significantly inhibit cell proliferation, cell migration, and cell invasion of OvCa. These findings indicate that HMGB1 can function as a therapeutic target for ovarian neoplasm in the future.

**Keywords:** high mobility group protein, ovarian neoplasm, RNA interference

卵巢癌早期症状轻微,进展迅速,死亡率高,被称为“安静的杀手”。早期诊断是降低卵巢癌患者死亡率重要的因素,有研究<sup>[1]</sup>提示卵巢癌局限于子宫时5年生存率为70%~82%,而进展期卵巢癌的5年生存率仅15%;其次,卵巢癌极易发生盆腹腔内侵袭播

散转移,复发和转移是卵巢癌致死的主要原因<sup>[2]</sup>,更好地抑制癌细胞侵袭、转移成为卵巢癌临床治疗以及基础研究的热点和难点。高迁移率族蛋白(high-mobility group protein B1, HMGB1)是一种高度保守的非组蛋白染色体蛋白,由于其在聚丙烯酰胺

作者单位:天津医科大学肿瘤医院妇科肿瘤科,国家肿瘤医学临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

\*本文课题受天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(编号:12JCYBJC17000)资助

通信作者:郝权 haoquandocor@126.com

胶电泳时的高移动性,所以被命名为高迁移性蛋白。HMGB1在细胞内广泛参与调节DNA复制、转录、重组和修复以及稳定核小体等多种重要功能,在细胞外由巨噬细胞、成熟的树突状细胞、自然杀伤细胞释放并参与损伤、感染及其他炎症性刺激。近年研究表明, HMGB1与肿瘤的生长、浸润、转移有密切关系,在多种肿瘤和未成熟细胞内表达较丰富,已有研究证实HMGB1与乳腺癌、前列腺癌<sup>[3]</sup>、结肠癌、头颈癌<sup>[4]</sup>、胰腺癌、胃癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>、以及肺癌<sup>[7]</sup>等肿瘤密切相关。本研究检测HMGB1在上皮性卵巢癌患者、卵巢良性疾病及健康人血清中的表达差异及其与临床治疗的关系,并通过RNA干扰抑制探讨HMGB1对卵巢癌细胞增殖和侵袭能力的影响,旨在为卵巢癌临床治疗提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 一般资料 47例卵巢癌及31例卵巢良性肿瘤患者选自天津医科大学肿瘤医院2011年10月至2012年8月住院患者,排除身体其他部位肿瘤。30例健康对照女性来自同期体检人群,未发现妇科及其他部位肿瘤。本试验符合伦理学规定,并于采血前取得被采集人的知情同意。

1.1.2 人卵巢癌细胞系 SKOV3、A2780购于北京协和细胞库,用含10%胎牛血清90% RPMI 1640的培养液培养于37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵箱中。

1.1.3 试剂 RPMI 1640、胎牛血清购自美国Gibco公司,ELISA试剂盒(human HMGB1 ELISA assay kits)购于日本IBL公司,SYBR GREEN Master Mix实时定量PCR系统购自美国ABI公司,兔抗人HMGB1抗体购于Abcam公司,Boyden小室购自美国BD公司。

### 1.2 方法

1.2.1 收集检测血标本 清晨空腹抽取静脉血5 mL,1 500 r/min离心20 min,吸出血清分装后于-80℃冰箱保存。检测时将标本室温融化后取10 μL/孔上样,摇匀后37℃孵育24 h,缓冲液洗脱5次,每次在吸水纸上拍干上样孔中残留液体,加入二抗25℃孵育2 h,同前方法洗脱5次,加入显色液室温孵育1 h,终止显色,450 nm处测定光吸光度,记录结果。

1.2.2 慢病毒介导的RNA干扰 靶向HMGB1基因的慢病毒vshRNA载体由上海吉凯基因化学技术公司构建:siRNA序列:5'-AACCTTTACATGAGGACTCTA-3';阴性对照siRNA序列为:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。转染前1天将1×10<sup>5</sup>个细胞铺于6孔板,第2天细胞融合度为30%~50%,以MOI(multiplicity of infection)值为50进行慢病毒转染,详细步骤

参见试剂盒说明书。

1.2.3 RT-PCR 用Trizol提取胞内总RNA,反转录成cDNA,并进行RT-PCR。PCR反应体系20 μL,包括1 μL cDNA,10 μL Lpower SYBR green PCR master mix(ABI),1 μL引物。引物设计:HMGB1上游引物:5'-GCCTCCTTCGGCCTTCT T-3';下游引物:5'-ACAGGCCAGGATGTTCTCCTT T-3'(71bp);β-actin上游引物:5'-CCTGGGCAYGG AGTCCTGTG-3';下游引物:5'-AGGGGCCGGACTCG TCATAC-3'(136 bp)。

1.2.4 Western Blot 免疫印迹检测 HMGB1表达的变化 细胞裂解后提取总蛋白,100℃煮沸10 min变性,BCA方法测细胞蛋白浓度后每孔上样30 μg,12% SDS-PAGE电泳1 h,280 mA下PVDF转膜1 h,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,抗HMGB1(1:10 000)和β-actin(1:5 000)一抗4℃孵育过夜,洗膜后辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5 000)室温孵育1 h,再次洗膜后ECL显影,成像。

1.2.5 CCK-8实验 将细胞按浓度4×10<sup>3</sup>个/孔接种于96孔板,每组设5个复孔,在37℃ 5%CO<sub>2</sub>孵箱中分别培养24、48、72、96 h,于相应时间点取出细胞,吸净上清,加入100 μL CCK-8工作液(10 μL CCK-8,100 μL RPMI 1640),37℃孵育2 h,450 nm处测定光吸光度,记录结果,绘制生长曲线。

1.2.6 迁移实验 将细胞按5×10<sup>4</sup>个/孔接种于无血清的Transwell小室上室,下室加入含20%FBS的培养液。37℃培养36 h后取出,用棉棒擦掉上室未迁移的细胞,4%多聚甲醛室温固定15 min,清水洗净3次,将固定好的小室放入5%的结晶紫中染色15 min,清水洗净并于显微镜下观察照像。比较各组迁移细胞数。

1.2.7 侵袭实验 将Matrigel基质胶1:8稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面,37℃放置5 h后加入70 μL空培养液水化30 min,吸净上液。每孔接种细胞5×10<sup>4</sup>个,37℃孵育48 h后用棉棒擦掉上室未迁移的细胞,4%多聚甲醛室温固定15 min,清水洗净3次,将固定好的小室放入5%的结晶紫中染色15 min,清水洗净并于显微镜下观察照相。比较各组迁移细胞数。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件分析系统处理结果,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用 $\chi^2$ 分析,两组间均数比较用 $t$ 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ELISA检测结果

卵巢癌组术前血浆HMGB1水平为(105.3 ±

115.37)ng/mL高于术后(64.46±31.95)ng/mL( $P<0.01$ ), 卵巢癌组血浆 HMGB1 水平明显高于卵巢良性疾 病组(33.19±13.50)ng/mL与正常对照组(27.78±8.49)ng/mL ( $P<0.01$ );而卵巢良性肿瘤组与正常对照组的差异无 统计学意义( $P>0.05$ )。HMGB1 水平与卵巢癌分期、 淋巴结转移相关( $P<0.01$ ),与年龄、病理类型、分化 程度无关( $P>0.05$ ,表1)。ROC 曲线提示, HMGB1 水平的测定对卵巢癌临床诊断有统计学意义 (AUC=0.933, $P<0.01$ ),HMGB1 对于卵巢癌有较高的 诊断功效,诊断阈值为 43.78 ng/mL,敏感性 87.20%, 特异性 89.30%,阳性预测值 87.20%,阴性预测值 89.30%。

表1 不同临床病理特征卵巢癌患者 HMGB1 含量比较

Table 1 Comparison of HMGB1 content in clinical cases with different pathologic characteristics

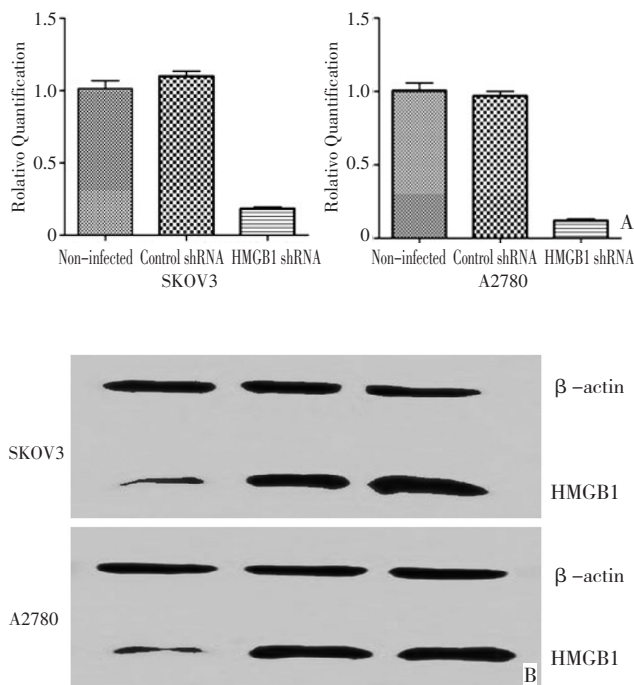
Variables	n	HMGB1 (ng/mL)	P
Age (years)			0.181
<55	18	97.09±73.35	
>55	29	110.39±136.12	
Pathologic type			0.850
Serous cystadenocarcinoma	24	99.33±93.17	
Endometrioid carcinoma	13	101.96±86.80	
Mucinous cystadenocarcinoma	10	123.98±187.89	
Cell differentiation			0.886
Well	12	112.91±126.27	
Moderate	11	80.92±56.86	
Poorly	24	100.74±126.19	
Tumor stage			0.005
Low	21	69.00±39.44	
High	26	134.62±145.75	
Distant metastasis			0.009
Non-metastasis	16	57.39±23.70	
Metastasis	31	130.20±135.17	

### 2.2 慢病毒载体感染卵巢癌细胞的效果

HMGB1 shRNA 感染卵巢癌细胞,3 天后观察绿 色荧光阳性细胞比率达 90%以上,提示慢病毒感染成 功。RT-PCR 实验结果(图 1A)与 Western Blot 实验结 果(图 1B)证实 shRNA 显著抑制了卵巢癌细胞中 HMGB1 在基因与蛋白水平上的表达。

### 2.3 HMGB1 基因表达对卵巢癌细胞增殖能力的影响

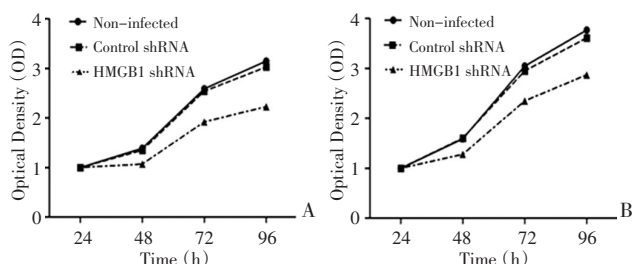
CCK-8 实验结果证实, HMGB1 的表达下调显著 降低了卵巢癌细胞的增殖能力( $P<0.05$ ),而未转染 组和空白对照组中肿瘤细胞增殖能力则无显著性 差异( $P>0.05$ ,图2)。



A. RT-PCR; B. Western Blot

图1 HMGB1 shRNA 转染后 Real-time PCR 和 Western Blot 结果

Figure 1 Real-time PCR and Western blot results of ovarian cancer cells transfected with HMGB1 shRNA



A. SKOV3; B. A2780

图2 HMGB1 shRNA 转染对卵巢癌细胞生长的影响

Figure 2 Effect of HMGB1 shRNA transfection on ovarian cancer cell growth

### 2.4 HMGB1 基因表达对卵巢癌细胞体外迁移能力的影响

经 Transwell 检测, HMGB1 表达下调明显抑制了 卵巢癌细胞的体外迁移能力( $P<0.05$ ),未转染组和 正常对照组中肿瘤细胞增殖能力则无显著性差异 ( $P>0.05$ ,图3)。

### 2.5 HMGB1 基因表达对卵巢癌细胞体外侵袭能力的影响

经 Transwell 检测, HMGB1 表达下调明显抑制了 卵巢癌细胞的体外侵袭能力( $P<0.05$ ),未转染组和 正常对照组中肿瘤细胞增殖能力则无显著性差异 ( $P>0.05$ ,图4)。

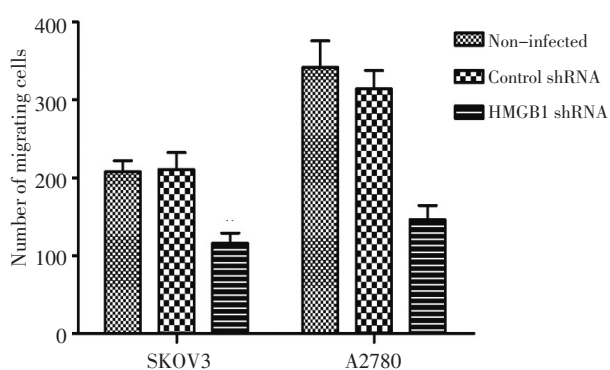


图3 HMGB1 shRNA 转染后对卵巢癌细胞迁移能力的影响

Figure 3 Effect of in vitro HMGB1 shRNA transfection on migration ability of human ovarian cancer cells

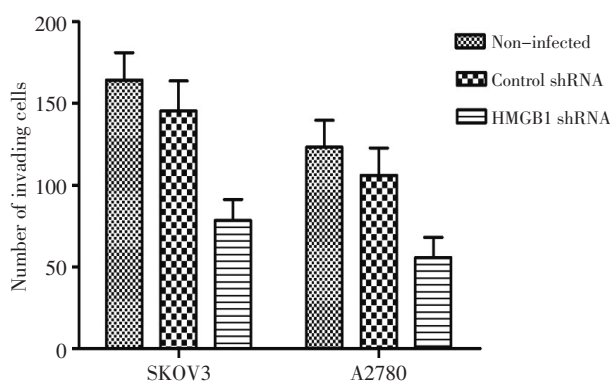


图4 HMGB1 shRNA 转染后对卵巢癌细胞侵袭能力的影响

Figure 4 Effect of in vitro HMGB1 shRNA transfection in human ovarian cancer cell invasion ability

### 3 讨论

大量研究证实 HMGB1 与肿瘤发生发展密切相关。Lee 等<sup>[8]</sup>研究证实,结肠癌患者血浆 HMGB1 水平是健康人的 1.5 倍,结肠癌细胞系也比对照细胞分泌更多 HMGB1 蛋白。Sheng 等<sup>[9]</sup>发现血浆 HMGB1 对于诊断复发宫颈癌有特殊临床价值。HMGB1 同样与肝癌的临床进展及诊断密切相关<sup>[10]</sup>。本研究结果显示卵巢癌患者血清中 HMGB1 水平明显高于卵巢良性肿瘤患者和正常女性,提示 HMGB1 的检测有助于鉴别卵巢良恶性肿瘤。HMGB1 水平与疾病分期、淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ ),表明 HMGB1 与卵巢癌的侵袭、浸润和转移有密切关系。值得重视的是,卵巢癌患者手术后 HMGB1 水平明显下降,提示 HMGB1 可能是卵巢癌疾病发生与进展的调节因子,控制 HMGB1 可能对卵巢癌的治疗起到重要作用。目前已有大量研究进展为本研究结果提供了有力的理论支持,但由于本研究中样本量相对较少,可能与真实分布情况有一定误差,需要后续通过扩大样本量进一步验证研究。

细胞的增殖能力是肿瘤形成的关键,有研究<sup>[11]</sup>

证实重组 HMGB1 可促进肿瘤细胞生长。HMGB1 通过调节修饰 NF- $\kappa$ B、PI3K/Akt 等信号通路,促进肿瘤细胞生长<sup>[12]</sup>。本研究采用慢病毒 shRNA 载体感染卵巢癌细胞,抑制其 HMGB1 的表达,结果证实沉默 HMGB1 抑制了卵巢癌细胞的增殖能力。

肿瘤的转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因。相关研究<sup>[13]</sup>结果证实,沉默 HMGB1 能抑制胃癌细胞的增殖迁移能力,促进凋亡水平,并降低胃癌细胞中 MMP-9 的表达;HMGB1 与非小细胞肺癌的临床分期呈正相关,并且通过 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B 途径促进 MMP-9 的表达<sup>[14]</sup>。HMGB1 与其配体晚期糖基化终末产物 RAGE 结合,激活信号传导通路激活 MAPK、P38、JNK 及 P42/P44 等信号通路,进而激活纤维蛋白溶酶激活级联的下游目标 MMP-2 和 MMP-9,降解细胞外基质,使肿瘤细胞产生浸润和转移<sup>[15]</sup>。本研究通过 Transwell 实验证实 HMGB1 的表达下调抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力,验证了沉默 HMGB1 对于抑制卵巢癌转移的重要作用。

综上所述, HMGB1 与卵巢癌患者的发病及病情发展密切相关,血清 HMGB1 的检测有望成为卵巢癌诊断的新方法。HMGB1 可促进卵巢癌细胞生长侵袭转移,为进一步研究 HMGB1 对卵巢癌的调控机制以及相关通路,研发阻断 HMGB1 药物为治疗卵巢癌提供了可靠依据。

### 参考文献

- 1 Brown PO, Palmer C. The preclinical natural history of serous ovarian cancer: defining the target for early detection[J]. PLoS Med, 2009, 6(7):e1000114.
- 2 Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 287-313.
- 3 Hu P, Si TG, Yu HP, et al. Significance of combined detection of serum HMGB1 and prostate-specific antigen in predicting the recurrence of local prostate cancer[J]. Chin J Clin Oncol, 2013, 40(8): 462-465. [胡萍, 司同国, 于海鹏, 等. 联合检测血清 HMGB1 PSA 在局限性前列腺癌冷冻术后复发中的应用价值[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(8):462-465.]
- 4 Liu Y, Xie C, Zhang X, et al. Elevated expression of HMGB1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(16):3007-3015.
- 5 Chung HW, Lee SG, Kim H, et al. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer[J]. J Transl Med, 2009, 28(7):38.
- 6 Liu FR, Zhang YJ, Chen MS, et al. Expression and prognostic significance of HMGB1 protein in hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy[J]. Chin J Clin Oncol, 2012, 29(10):722-727. [刘芙蓉, 张耀军, 陈敏山, 等. 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 作为肝癌根治性切除术后预后预测因子的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 29(10): 722-727.]
- 7 Liu PL, Tsai JR, Hwang JJ, et al. High-mobility group box 1-mediated

ated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(5):530-538.

8 Lee H, Song M, Shin N, et al. Diagnostic significance of serum HMGB1 in colorectal carcinomas[J]. PLoS One, 2012, 7(4):e34318.

9 Sheng X, Du X, Zhang X, et al. Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA levels[J]. Croat Med J, 2009, 50(5):455-464.

10 Xiao J, Ding Y, Huang J, et al. The association of HMGB1 gene with the prognosis of HCC[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89097.

11 He HC, Fan XG, Zhou RR, et al. Effect of HMGB1 on human hepatoma cell line-HepG2 proliferation[J]. J Cent South Univ, 2010, 35(5):451-457. [贺新春, 范学工, 周蓉蓉, 等. HMGB1 对人肝癌细胞株 HepG2 体外增殖的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(5): 451-457.]

12 Tafani M, Schito L, Pellegrini L, et al. Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF-(kappa)B[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(8):1167-1175.

13 Song B, Song WG, Li ZJ, et al. Effect of HMGB1 silencing on cell proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803 gastric cancer cells[J]. Cell Biochem Funct, 2011, 27. [Epub ahead of print].

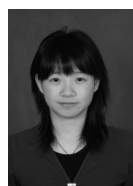
14 Liu PL, Tsai JR, Hwang JJ, et al. High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(5):530-538.

15 Taguchi A, Blood DC, del Toro G, et al. Blockade of RAGE-amyloid signaling suppresses tumour growth and metastases[J]. Nature, 2000, 405(6784):354-360.

(2013-08-12 收稿)

(2014-01-02 修回)

(本文编辑: 邢颖)



作者简介

李迎春 硕士研究生。研究方向为妇科恶性肿瘤的分子机制。

E-mail: chunchunyj@126.com

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于征集第二十三届世界抗癌大会中国专场论文的通知

各专业委员会, 各省、市、自治区抗癌协会, 各团体会员单位:

为彰显我国肿瘤科学技术的发展实力, 推进肿瘤学术进步, 我会在第二十三届世界抗癌大会期间承办以“凝心聚力, 加快防控进程(Joining Forces: Accelerating Progress)”为主题的中国专场。

本届中国专场将重点为我国中青年肿瘤科技工作者搭建学术交流平台, 展示他们在肿瘤临床、基础研究、预防等领域取得的科技成果和诊疗经验。中国专场将于2014年12月5日举行, 时间为90分钟。中国抗癌协会将给予减免发言人大会注册费的优惠政策, 大会注册费由我会支付。

中国专场现面向各专业委员会、省市抗癌协会、团体会员单位征集论文, 投稿截止时间为2014年4月30日。中国专场投稿不视为大会投稿, 仅由中国抗癌协会组织专家评审。请投稿人按照投稿要求提交论文摘要并将相关资料报送至中国抗癌协会国际交流部。

投稿要求:

1) 投稿人年龄不超过45周岁; 2) 从事肿瘤临床、基础研究至少5年, 具有主治医师及以上职称; 3) 硕士研究生及以上学历; 4) 论文摘要为英文, 1000个单词及以上; 5) 提交个人中英文简历; 6) 提交两封正高级职称人员出具的推荐信; 7) 请按正式发表论文的要求, 撰写论文摘要, 并注明论文题目、作者、单位、通讯地址、邮编、身份证号。摘要采取结构式, 即分为研究背景和目的、方法、结果、结论四部分。

联系人: 徐婷婷

电话: 022-23359958 转 803

传真: 022-23526512

邮箱: xutt@caca.org.cn

地址: 天津新技术产业园区兰苑路5号A座10楼, 300384

——中国抗癌协会  
2014年3月6日