



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.07.004

www.csumed.org/xbwk/fileup/PDF/201407673.pdf

RNA干扰抑制HMGB1基因表达对子宫内膜癌的增殖抑制作用及其分子机制

吴然然, 吴佳捷

(中南大学湘雅医院妇产科, 长沙 410008)

[摘要]目的: 研究RNA干扰抑制高迁移率族蛋白1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)的表达对子宫内膜癌细胞株HEC-1A的增殖抑制作用及对细胞周期、细胞凋亡的影响,并探讨其可能的分子机制。**方法:** 构建靶向HMGB1基因的慢病毒shRNA载体,转染子宫内膜癌细胞株HEC-1A,同时利用实时荧光定量RT-PCR和Western印迹检测转染HMGB1-siRNA后细胞HMGB1 mRNA和蛋白表达水平的变化。MTT法和流式细胞术分别检测转染HMGB1-siRNA后HEC-1A细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的变化。Western印迹检测转染HMGB1-siRNA后细胞AKT, pAKT和cyclinD1的蛋白表达水平。**结果:** 慢病毒HMGB1 shRNA载体成功抑制HMGB1 mRNA($P<0.05$)和蛋白($P<0.01$)在HEC-1A细胞中的表达;转染HMGB1 shRNA后HEC-1A细胞的增殖能力明显受抑制($P<0.01$),并能阻滞细胞于 G_0/G_1 期,且明显诱导细胞凋亡;转染HMGB1 shRNA组、空白对照组和阴性对照组的总凋亡率分别为 $(17.89\pm 0.23)\%$, $(4.69\pm 0.20)\%$ 和 $(4.62\pm 0.17)\%$,3组之间差异有统计学意义($P<0.01$)。转染HMGB1 shRNA后细胞pAKT和cyclinD1蛋白表达水平均下调(均 $P<0.01$)。**结论:** HMGB1表达下调可以有效地抑制子宫内膜癌细胞HEC-1A的增殖,细胞阻滞于 G_0/G_1 期,且可诱导细胞凋亡,影响磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路及下调cyclinD1的蛋白表达水平可能为其主要作用机制。

[关键词] 子宫内膜癌; HMGB1; 细胞增殖; 分子机制

Inhibition on the proliferation of human endometrial cancer cells by RNAi inhibiting HMGB1 gene expression and its possible molecular mechanism

WU Ranran, WU Jiajie

(Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of HMGB1 small interfering RNA (siRNA) on the proliferation, cell cycle and apoptosis of human endometrial cancer cell line HEC-1A, and its

收稿日期(Date of reception): 2013-12-30

作者简介(Biography): 吴然然, 硕士, 医师, 主要从事妇科疾病相关研究。

通信作者(Corresponding author): 吴佳捷, Email: wjj1958@hotmail.com

基金项目(Foundation item): 湖南省科技计划项目(2012SK4062)。This work was supported by the Science and Technology Project of Hunan Province, China (2012SK4062).

possible molecular mechanism.

Methods: Lentivirus vector with HMGB1 shRNA was constructed and infected the endometrial cancer cell line HEC-1A. After viral infection for 72 h, real time PCR and Western blot were performed to investigate HMGB1 mRNA and protein expression. The cell proliferation was determined with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Flow cytometry was performed to analyze the cell cycle progression of propidium iodide (PI)-stained HEC-1A cells and the apoptotic rate of annexinV/PI-stained cells. Western blot was used to detect the protein expression of AKT, pAKT and CyclinD1.

Results: Lentivirus vector with HMGB1 shRNA inhibited the mRNA ($P<0.05$) and protein ($P<0.01$) expression of HMGB1 in the cell line HEC-1A. The MTT assay demonstrated that HMGB1 knockdown significantly reduced the cell proliferation. FCM results showed that HMGB1 knockdown significantly resulted in the disruption of the cell cycle at G_0/G_1 phase and the induction of apoptosis. The apoptotic rate was $(17.89\pm 0.23)\%$, $(4.69\pm 0.20)\%$ and $(4.62\pm 0.17)\%$ in the HMGB1 knockdown group, the blank group and the negative group respectively. There was significance difference between the 3 groups ($P<0.01$). The protein expressions of pAKT and cyclinD1 were down-regulated after the HMGB1 knockdown for 72 h.

Conclusion: Knockdown of HMGB1 expression can significantly inhibit the proliferation and induce the cell cycle arrest and apoptosis in the endometrial cancer cell line HEC-1A. PI3K/AKT pathway and down-regulation of the protein expression of cyclinD1 may be involved in its therapeutic mechanism.

KEY WORDS

endometrial cancer; HMGB1; cell proliferation; molecular mechanism

目前在发达国家子宫内膜癌成为女性最常见的妇科恶性肿瘤,其发病率已超过宫颈癌^[1],且发病人群呈明显的年轻化趋势。虽然大多数子宫内膜癌诊断时处于疾病的早期阶段,但其治疗仍无突破性进展,特别是出现复发或远处转移时,预后往往较差。近年来有关肿瘤细胞增殖的研究受到人们的重视,而对子宫内膜癌细胞增殖的研究可为深入了解其发生发展机制提供分子基础,同时为其治疗提供新的方向。

高迁移率蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)作为一种非组蛋白染色体结合蛋白,几乎存在于所有的真核细胞;修饰后分泌到细胞外可作为信号分子影响细胞的生长^[2-3]。目前研究^[4-6]表明, HMGB1在大多数肿瘤中高表达,如胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等;其可促进肿瘤细胞的增殖,同时影响细胞的凋亡过程。本课题组前期研究表明, HMGB1在子宫内膜癌中高表达并可促进肿瘤细胞的增殖,但具体的分子机制尚不明确。本研究中旨在通过构建慢病毒载体介导的shRNA沉默子宫内膜癌细胞中HMGB1基因,从而探讨HMGB1对子宫内膜癌细胞增殖凋亡的影响及其促进细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和慢病毒系统

人子宫内膜癌HEC-1A细胞、人胚肾293T细胞购自中国科学院上海细胞库;采用四质粒慢病毒载体系统,包括重组干扰载体质粒、包装载体质粒pHelper vector-I, pHelper vector-II, pHelper vector-III(分别含Gag/Pol, Rev, VSV-G蛋白),由上海吉玛公司构建并测序鉴定。

1.1.2 主要材料和试剂

细胞培养基DMEM, FBS, 0.25%胰酶,青霉素链霉素双抗购于美国Gibco公司;RNAi-Mate转染试剂购于上海吉玛公司;高纯度质粒中量抽提试剂盒、感受态大肠杆菌DH5 α 购于北京天根有限公司;TRIzol购于美国Invitrogen公司;反转录试剂盒、DNase I、RNA酶抑制剂购于美国Fermentas公司;SYBR Green PCR Master Mix购于美国ABI公司;RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购于上海碧云天公司;HMGB1, pAKT和cyclinD1一抗及相应二抗购于美国Santa Cruz公司;Akt一抗及相应二抗购于

SAB公司; Annexin V-FITC&PI试剂盒、MTT购于美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体包装及滴度测定

本课题组前期实验^[7]证实HMGB1的有效RNAi序列为5'-GCGAAGAACTGGGAGAGATG-3', 阴性对照序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTTC-3', 相应的重组慢病毒载体质粒系统由上海吉玛公司设计并合成, 酶切测序正确后进行后续实验; 将重组慢病毒干扰载体质粒, pHelper vector-I, pHelper vector-II, pHelper vector-III按1:1:1:1的比例混合稀释, 再与稀释的RNAi-Mate混合, 共转染对数生长期293T细胞, 在37 °C, 5%CO₂培养箱孵育4~6 h后, 更换培养液后继续培养细胞72 h。荧光显微镜观察细胞转染状态, 并收集细胞培养上清液。4 °C, 4 000 r/min低速离心上清液4 min, 取离心后上清液经0.45 μm过滤, 再进行4 °C, 20 000 r/min高速离心2 h获得慢病毒颗粒浓缩液。采用逐孔稀释法测病毒滴度, 293T细胞按3×10⁴/孔接种于96孔板, 37 °C, 5%CO₂培养24 h, 待细胞融合度达约50%时分别加入100 μL病毒稀释液(10⁰, 10⁻¹, 10⁻²), 继续培养24 h, 弃去病毒培养液每孔加入含10%FBS的DMEM继续培养72 h, 荧光显微镜观察荧光情况, 并根据病毒液稀释倍数计算相应病毒滴度。

1.2.2 慢病毒颗粒转染HEC-1A细胞

细胞接种于6孔板, 加入含10%FBS的DMEM, 37 °C, 5%CO₂培养箱培养。待细胞融合度达约50%时, 观察细胞生长状态, 根据预实验结果选择最适MOI感染细胞。实验分为3组: 实验组即HMGB1敲减组(experimental group, EG)、空白对照组即未感染组(blank control group, BCG)和阴性对照组即感染无关序列组(negative control group, NCG); 细胞与病毒液共同培养8 h后更换培养液, 以后常规换液, 待细胞培养至72 h时荧光显微镜观察荧光表达情况, 并收集细胞进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测HEC-1A细胞中HMGB1 mRNA表达情况

转染72 h后收集3组细胞, 按RNA提取试剂盒说明书分别提取总RNA, 然后进行琼脂糖凝胶电泳; 1 μg总RNA加入1 μL DNase I去除DNA杂质。提纯后RNA 2 μg按试剂盒说明在冰上将各种反应物混合形成20 μL反应体系, 反转录获得cDNA。HMGB1上游引物5'-TATGGCAAAGCGGACAAGG-3', 下游引物5'-CTTCGCAACATCACCAATGGA-3', β-actin上游

引物5'-CATTAAGGAGAAGCTGTGCT-3', 下游引物5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3'。取反转录产物1 μL按实时荧光定量PCR试剂盒说明混合其他各种反应物形成25 μL体系, 扩增程序如下: 95 °C变性5 min后; 94 °C(20 s), 60 °C(20 s), 72 °C(20 s)共40个循环; 72 °C延伸5 min, 55 °C下10 s; 循环结束后进行熔点曲线分析。以2^{-ΔΔCt}表示HMGB1 mRNA的相对表达量。上述实验重复3次。

1.2.4 Western印迹检测HEC-1A细胞中HMGB1, AKT, pAKT和cyclinD1蛋白表达情况

分别收集转染72 h后细胞, 加1 mL RIPA充分裂解。将裂解液转移至离心管, 超声3 s/次, 总共3次。然后9 000 r/min(4 °C)离心10 min, 取上清液进行BCA蛋白定量测定; 制备SDS-PAGE凝胶; 100 °C加热3 min使蛋白变性, 分别取15 μL等量蛋白加入样品孔, 200 V电泳至溴酚蓝迁移至分离胶底部0.5 cm停止, 然后300 mA恒流70 min转膜, 加1×丽春红染色5 min, 电转膜置于5%脱脂奶粉37 °C封闭2 h; PBST洗膜3次, 加入稀释一抗, 室温下摇床孵育2 h, 弃去一抗PBST洗涤3次, 加入相应稀释二抗, 4 °C孵育过夜, 弃去二抗PBST洗涤3次, 加入发光底物试剂, 发光得到胶片。利用Gel pro4.0版凝胶光密度分析软件对结果进行分析, 测得相应的累积吸光度值(integrated optical density, IOD)。上述实验重复3次。

1.2.5 MTT法检测转染后HEC-1A细胞的增殖变化

细胞以1×10⁴/孔接种于96孔板, 常规培养24 h, 加入含慢病毒颗粒培养液培养8 h, 弃去含病毒培养液加入原培养液继续培养, 每组设立6个平行孔, 转染后72 h每孔加入50 μL MTT, 37 °C孵育4 h, 弃去上清液, 每孔加入150 μL DMSO, 平板摇床摇匀后, 酶标仪测定在570 nm的波长下各孔吸光度(A)值。

1.2.6 流式细胞术检测转染后HEC-1A细胞周期变化

收集转染72 h后的细胞约2×10⁶个, 经PBS洗涤, 离心后预冷75%乙醇固定4 °C孵育过夜, 弃去上清液, 再次PBS洗涤, 重悬细胞于800 μL PBS和1%牛血清白蛋白的混合液中, 再加入100 μL PI染色剂和100 μL 10 mg/mL RNase A, 37 °C孵育30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期变化。上述实验重复3次。

1.2.7 Annexin V-FITC&PI法检测转染后HEC-1A细胞凋亡

收集转染72 h后的各组细胞, 50 μL PBS重悬细胞1次, 然后离心并洗涤细胞, 灭菌去离子水配置Annexin V-FITC标记液, 以每10⁵~10⁶个细胞加100 μL标记液的比例进行孵育, 暗室孵

育15 min, 再加入10 μL PI染色剂, 按每100 μL 标记液加入400 μL 1 \times Binding Buffer的比例进行稀释, 然后上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。上述实验重复3次。

1.3 统计学处理

应用SPSS13.0软件对实验数据进行统计学分析。数据均进行正态性检验和方差齐性检验, 符合正态分布的数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计学描述, 组间两两差异采用LSD-*t*检验进行统计处理。检验水准为双侧 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒包装、滴度测定和HEC-1A细胞转染

慢病毒载体系统共转染293T细胞72 h后, 荧光显微镜观察可见细胞表达较强的荧光表达, 获得含慢病毒颗粒的上清液。逐孔稀释法测得人HMGB1-shRNA慢病毒液滴度为 5.0×10^8 TU/mL, 阴性对照慢病毒液滴度为 2.0×10^8 TU/mL。根据预实验结果选择MOI为50时感染HEC-1A细胞, 感染72 h后荧光显微镜观察绿色荧光表达较强, 通过比较同一区域荧光视野和明视野下细胞荧光表达情况, 可知细胞转染效率在80%以上, 说明慢病毒颗粒成功感染HEC-1A细胞(图1)。

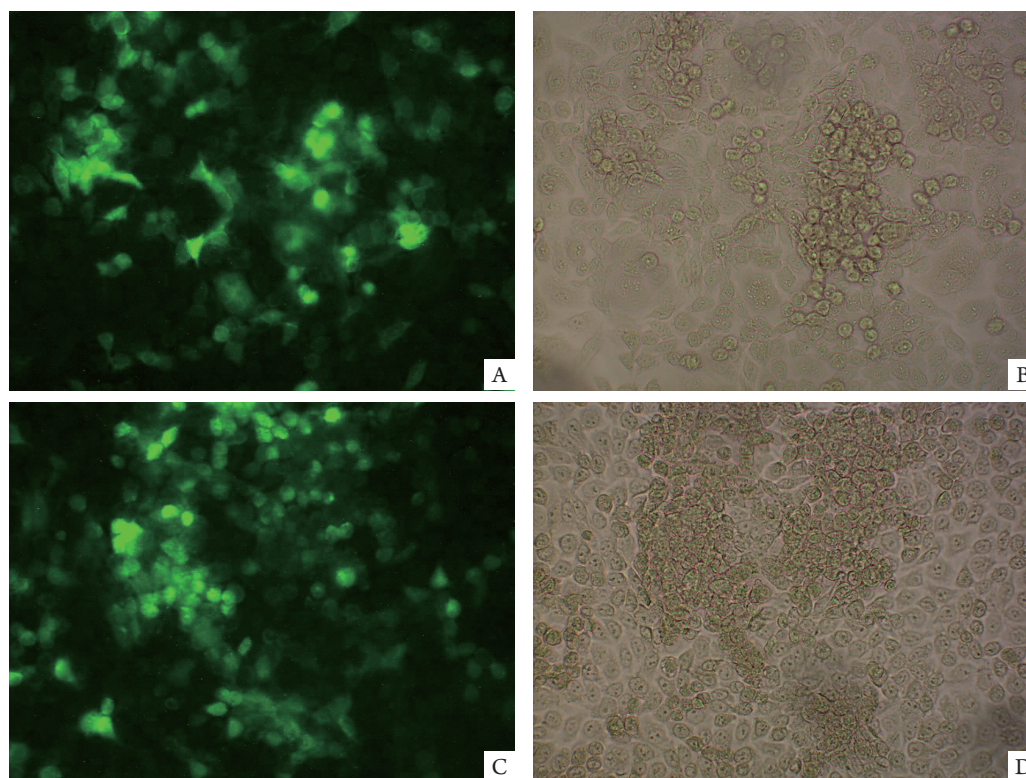


图1 慢病毒转染 HEC-1A 细胞 72 h 后的荧光图

Figure 1 Fluorescent of HEC-1-A 72 h after viral infection

A: Fluorescence field of negative control group; B: Bright field of negative control group; C: Fluorescence field of experiment group; D: Bright field of experiment group

2.2 转染后HEC-1A细胞HMGB1的表达情况

转染72 h后RT-PCR结果显示: 实验组HMGB1 mRNA的相对表达量(1.07 ± 0.20)较空白对照组(6.60 ± 0.54)和阴性对照组(6.58 ± 0.51)减少, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图2)。Western印迹结果显示: 实验组、空白对照组和阴性对照组HMGB1蛋

白的相对IOD值分别为(0.07 ± 0.01), (0.39 ± 0.03)和(0.37 ± 0.03)。实验组蛋白相对表达明显低于空白对照组和阴性对照组($P<0.01$, 图3)。上述结果表明, 沉默HMGB1基因的HEC-1A细胞实验模型构建成功。

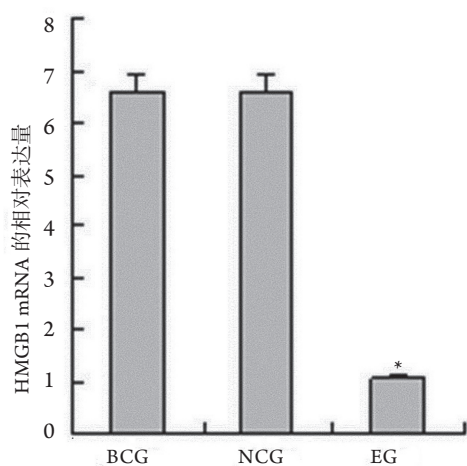


图2 RT-PCR示3组HMGB1 mRNA表达情况

Figure 2 RT-PCR showing the expression of HMGB1 mRNA of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group. * $P < 0.05$ vs BCG or NCG

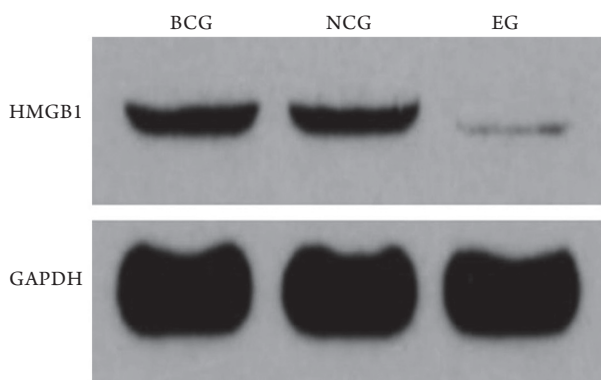


图3 Western印迹示3组HMGB1蛋白表达情况

Figure 3 Western blot showing the expression of HMGB1 protein of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

2.3 HEC-1-A细胞转染后Akt, pAkt和cyclinD1蛋白的表达情况

Western印迹结果显示: Akt在实验组、空

白对照组和阴性对照组中的表达无明显差别(均 $P > 0.05$), 而实验组中pAkt的表达较空白对照组和阴性对照组明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$; 图4, 表1); 实验组中cyclinD1的表达较空白对照组和阴性对照组也明显降低($P < 0.01$; 图5, 表1)。这表明, HMGB1可影响磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(P13K/Akt)信号通路中的关键分子Akt的磷酸化, 并且可通过一系列信号转导影响下游靶蛋白cyclinD1的降解, 从而作用于细胞增殖过程。

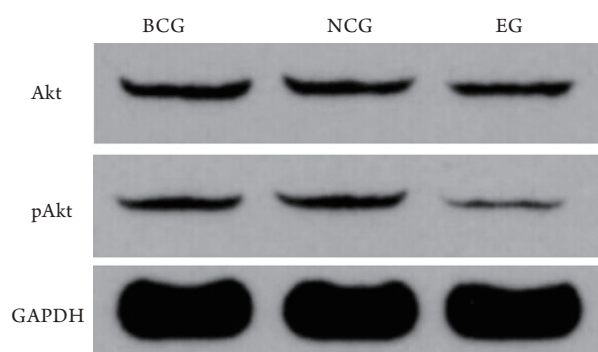


图4 Western印迹示3组AKT和pAKT蛋白表达情况

Figure 4 Western blot showing the expression of AKT and pAKT protein of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

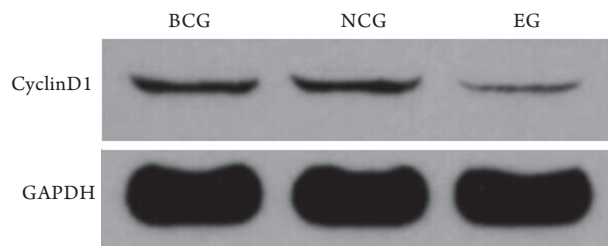


图5 Western印迹示3组cyclinD1蛋白表达情况

Figure 5 Western blot showing the expression of cyclinD1 protein of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

表1 3组Akt, pAkt, cyclinD1蛋白表达的相对IOD值

Table 1 IOD value of Akt, pAKT, cyclinD1 protein of the 3 groups

组别	Akt	pAkt	CyclinD1
BCG	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.01
NCG	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.21 ± 0.01
EG	0.24 ± 0.01	0.13 ± 0.02**	0.13 ± 0.01**

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group. ** $P < 0.01$ vs BCG or NCG

2.4 HEC-1A细胞转染后细胞增殖情况和细胞周期的变化

转染72 h后MTT法测得实验组、空白对照组和阴性对照组细胞在570 nm波长的吸光度值分别为 (0.32 ± 0.01) , (0.44 ± 0.01) 和 (0.44 ± 0.01) 。实验组与空白对照组或阴性对照组相比较其吸光度值明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 然而空白对照组与阴性对照组两组相比较无明显的差别($P > 0.05$, 图6)。流式细胞仪检测细胞周期的结果显示: 实验组细胞 G_0/G_1 期、S期和 G_2/M 期, 与空白对照组或阴性对照组比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 实验组细胞 G_0/G_1 期明显增多, 且在整个细胞周期分布中所占比例最高(表2, 图7)。

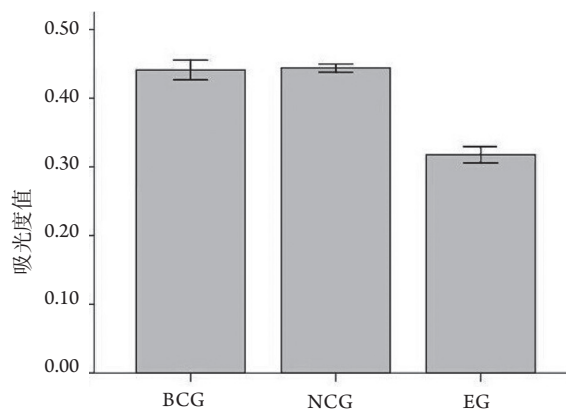


图6 转染72 h后3组细胞的吸光度值

Figure 6 Absorbance of the 3 groups 72 h after viral infection

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

表2 各组细胞周期变化情况 /%

Table 2 Change of cell cycle of the 3 groups/%

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
BCG	34.25 ± 0.91	40.79 ± 0.62	20.48 ± 0.83
NCG	33.91 ± 0.32	40.71 ± 0.36	20.87 ± 0.64
EG	$38.84 \pm 0.44^{**}$	$24.90 \pm 0.47^{**}$	$18.22 \pm 0.30^{**}$

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group. $^{**}P < 0.01$ vs BCG or NCG

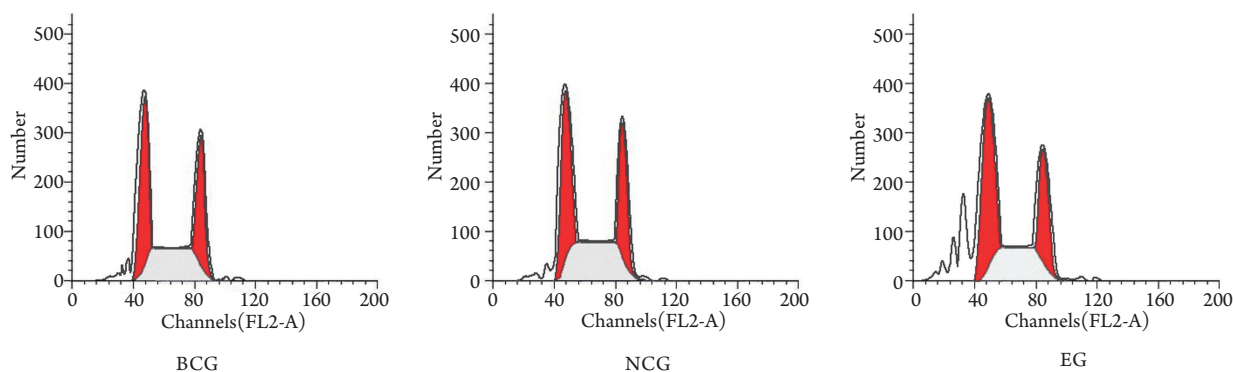


图7 3组细胞周期变化情况

Figure 7 Change of cell cycle of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

2.5 HEC-1-A细胞转染后细胞凋亡情况的变化

Annexin V-FITC&PI法检测细胞凋亡结果显示: 实验组的总凋亡率 $(17.89 \pm 0.23)\%$, 较空白对

照组 $(4.69 \pm 0.20)\%$ 和阴性对照组 $(4.62 \pm 0.17)\%$ 明显增高($P < 0.01$), 而空白对照组与阴性对照组之间则差别无统计学意义($P > 0.05$, 图8)。

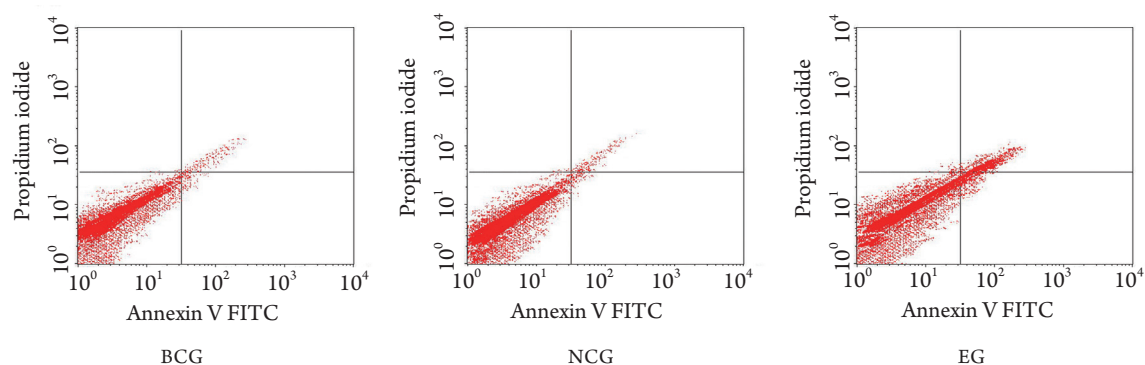


图 8 3 组细胞凋亡情况

Figure 8 Cell apoptosis of the 3 groups

BCG: Blank control group; NCG: Negative control group; EG: Experiment group

3 讨论

人HMGB1基因位于染色体13q12上, 编码含215个氨基酸残基的HMGB1蛋白, 该蛋白几乎在所有的真核细胞中持续性一般表达^[8], 而大量研究表明其在多种肿瘤中呈现高表达。细胞外HMGB1作为信号分子通过一系列级联反应影响着细胞的增殖凋亡, 在肿瘤的发生发展过程中发挥着重大的作用。在多种肿瘤细胞的增殖研究^[9]中发现PI3K/Akt信号通路的改变是最常见的, PI3K在生长有关信号的刺激下激活, 促使磷脂酰肌醇磷酸化, 生成三磷酸磷脂酰肌醇(PI3P)和二磷酸磷脂酰肌醇(PI2P), 而PI3P是调节该通路的主要作用点之一, 影响因素包括: PI3K激活后的生成作用和10号染色体同源丢失性磷酸酶与张力蛋白酶(PTEN)影响下的降解作用^[10]; PTEN是一种抑癌基因, 同时具有使PI3P去磷酸化的作用, 可抑制下游分子的活化从而负性调节PI3K/AKT信号通路; 细胞内PI3P与AKT结合, 在PDK1和PDK2的作用下发生磷酸化而活化, pAkt通过多种途径上调cyclinD1的表达, 调节细胞周期从而影响细胞的增殖情况^[11]。

Yang等^[12]在白血病的研究中发现HMGB1的表达与细胞增殖有关, 并可增加化疗敏感性, 这与PI3K/Akt信号通路关系密切。敲除卵巢癌SKOV3细胞株中HMGB1, 可明显抑制细胞增殖^[13]。该研究采用慢病毒载体转染子宫内膜癌细胞株, 检测显示HMGB1基因表达明显下调, 说明成功建立了子宫内膜癌HMGB1敲减模型。慢病毒载体感染方法与其他转染方法相比具有许多优势, 如可感染分裂期或非分裂期的细胞、容纳较长的外源基因片段、免疫原性较低, 但其所需的表达时间较长^[14-15]。下调HMGB1后的细胞株G₀/G₁增多, 而S期和G₂/M相对减少, 这说明细胞增殖受

抑制且阻滞于G₀/G₁。以上显示HMGB1可促进细胞增殖, 其可能通过一系列分子间变化影响进入G₁期的细胞数量, 这与国外报道一致^[13,16]; 同时Western印迹检测磷酸化Akt减少, 这说明HMGB1在影响子宫内膜癌的增殖过程中主要通过激活PI3K/Akt信号通路而发挥作用。细胞增殖阶段最主要的物质变化是DNA复制和蛋白质合成。因此, G₁/S和G₂/M成为调控细胞增殖的关键点^[17], 而cyclinD1发挥着调节增殖的始动蛋白的作用。本研究也说明了在HMGB1激活PI3K/Akt信号通路后, 活化的Akt作用于下游的效应分子cyclinD1, 从而影响细胞的增殖变化; 这与国外报道相一致^[11]。有报道^[18]显示, HMGB1常与其它物质形成复合物后共同与相应受体结合而发挥作用。

HMGB1影响细胞凋亡主要取决于细胞的类型和前期细胞受到的刺激^[2]。Gnanasekar等^[19]研究发现, 下调前列腺癌细胞HMGB1后通过抑制caspase-3介导的信号通路, 从而抑制细胞的凋亡。然而也有研究报道, HMGB1可能是一种抗凋亡蛋白, HMGB1的过表达可抑制细胞的凋亡活动; Volp等^[20]在结肠癌的研究中发现, 结肠癌中高表达的HMGB1, 可能促进抗凋亡蛋白c-IAP2的高表达, 从而抑制凋亡信号通路, 导致结肠癌细胞的凋亡减少。该研究发现, HMGB1敲减后可促进子宫内膜癌细胞的凋亡。由此推测在子宫内膜癌中HMGB1也可能作为一种抗凋亡蛋白参与影响细胞的凋亡过程。

综上所述, HMGB1在子宫内膜癌的发生发展中, 可能通过影响PI3K/Akt信号通路, 继而调节下游靶蛋白cyclinD1的降解, 最终促进细胞的增殖; 同时HMGB1又可作为一种抗凋亡蛋白, 抑制子宫内膜癌细胞的凋亡。以上说明, HMGB1在促使子宫内膜癌的发生发展中发挥重要的作用,

这使得HMGB1今后可能成为子宫内膜癌治疗的新靶点。然而由于HMGB1存在于几乎所有的真核细胞, 同时在不同的细胞中其对细胞增殖凋亡的影响不尽相同, 这可能成为作为靶点治疗的难点之一; 因此, 有待进一步的研究探讨HMGB1在肿瘤中的作用, 同时优化HMGB1作为新靶点的治疗方法。

参考文献

- Samulak D, Grosman-Dziewiszek P, Michalska MM, et al. Evaluation of expression of the PTEN gene, oestrogen and progesterone receptors as diagnostic and predictive factors in endometrial cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 20(1): 191-196.
- Tang D, Kang R, Zeh HR, et al. High-mobility group box 1 and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1/2): 131-140.
- Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5237-5246.
- Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 337(1/2): 251-258.
- Brezniceanu ML, Volp K, Bossler S, et al. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma[J]. *FASEB J*, 2003, 17(10): 1295-1297.
- Bao G, Qiao Q, Zhao H, et al. Prognostic value of HMGB1 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas[J]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8: 52.
- 冯力元, 吴佳捷. 小干扰 RNA 抑制 HMGB1 表达对子宫内膜癌细胞侵袭与迁移的影响[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2014, 39(1): 36-42.
FENG Liyuan, WU Jiajie. Effect of expression of high mobility group box-1 inhibited by small hairpin RNA on the invasion and migration of human endometrial carcinoma HEC-1A cells[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(1): 36-42.
- Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, et al. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13[J]. *Genomics*, 1996, 35(2): 367-371.
- Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(3): 135-164.
- Aggerholm A, Gronbaek K, Guldberg P, et al. Mutational analysis of the tumour suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders[J]. *Eur J Haematol*, 2000, 65(2): 109-113.
- Maira SM, Galetic I, Brazil DP, et al. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane[J]. *Science*, 2001, 294(5541): 374-380.
- Yang L, Yu Y, Kang R, et al. Up-regulated autophagy by endogenous high mobility group box-1 promotes chemoresistance in leukemia cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(2): 315-322.
- Chen J, Xi B, Zhao Y, et al. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126(1): 109-117.
- Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010, 58(2): 107-119.
- Anthony RV, Cantlon JD. Ribonucleic acid interference: a new approach to the in vivo study of gene function[J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(13 Suppl): E18-E19.
- Kang R, Tang D, Schapiro NE, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(4): 666-676.
- Gerard C, Goldbeter A. A skeleton model for the network of cyclin-dependent kinases driving the mammalian cell cycle[J]. *Interface Focus*, 2011, 1(1): 24-35.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1): 1-8.
- Gnanasekar M, Thirugnanam S, Ramaswamy K. Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(2): 425-431.
- Volp K, Brezniceanu ML, Bossler S, et al. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas[J]. *Gut*, 2006, 55(2): 234-242.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 吴然然, 吴佳捷. RNA干扰抑制HMGB1基因表达对子宫内膜癌的增殖抑制作用及其分子机制[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2014, 39(7): 673-680. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.07.004
Cite this article as: WU Ranran, WU Jiajie. Inhibition on the proliferation of human endometrial cancer cells by RNAi inhibiting HMGB1 gene expression and its possible molecular mechanism[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(7): 673-680. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.07.004