

# 敲减 *HMGB1* 表达对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的乳腺癌细胞侵袭能力的影响\*

马海明<sup>1</sup>, 强玲<sup>2</sup>, 刘晓康<sup>1</sup>, 张宝轩<sup>2Δ</sup>

[<sup>1</sup>广饶县人民医院肿瘤科, 山东 东营 257300; <sup>2</sup>山东省肿瘤防治研究院乳腺淋巴瘤科(内十科), 山东 济南 250117]

**[摘要]** 目的: 探讨敲减高迁移率族蛋白 B1 (*HMGB1*) 表达对肿瘤坏死因子  $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ) 诱导的乳腺癌细胞侵袭能力的影响及机制。方法: 采用 *HMGB1* 小干扰 RNA (siRNA) 转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别测定细胞中 *HMGB1* 的 mRNA 和蛋白表达情况。用  $\text{TNF-}\alpha$  处理敲减 *HMGB1* 表达的 MDA-MB-231 细胞, 流式细胞术测定各组细胞凋亡, Transwell 小室法测定各组细胞侵袭能力, 细胞划痕实验测定各组细胞的迁移能力, Western blot 法测定细胞中上皮钙黏素 (E-cadherin)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、神经钙黏素 (N-cadherin)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和 Bax 的表达情况。结果: *HMGB1* siRNA 转染后 MDA-MB-231 细胞中 *HMGB1* 的 mRNA 和蛋白表达水平明显低于没有转染的细胞 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比,  $\text{TNF-}\alpha$  处理后的乳腺癌细胞的凋亡水平升高, 细胞侵袭和迁移能力也升高, 细胞中 E-cadherin 蛋白水平降低, N-cadherin 蛋白水平升高, MMP-2、MMP-9 和 Bax 蛋白水平也升高 ( $P < 0.05$ )。敲减 *HMGB1* 表达的 MDA-MB-231 细胞经  $\text{TNF-}\alpha$  诱导以后, 细胞凋亡率增加, 侵袭及迁移能力下调, 细胞中 E-cadherin 蛋白水平升高, N-cadherin 蛋白水平下降, MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平也下降, Bax 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ )。结论: 敲减 *HMGB1* 表达可以增强  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的乳腺癌细胞凋亡, 抑制  $\text{TNF-}\alpha$  诱导的乳腺癌细胞侵袭、迁移和上皮-间充质转化, 其作用机制与 MMP-2、MMP-9 和 Bax 蛋白表达有关。

**[关键词]** 乳腺癌; 侵袭; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 高迁移率族蛋白 B1; 上皮-间充质转化

**[中图分类号]** R737.9; R730.23 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.02.017

## Effect of *HMGB1* expression knockdown on invasion ability of breast cancer cells induced by $\text{TNF-}\alpha$

MA Hai-ming<sup>1</sup>, QIANG Ling<sup>2</sup>, LIU Xiao-kang<sup>1</sup>, ZHANG Bao-xuan<sup>2</sup>

[<sup>1</sup>Department of Oncology, People's Hospital of Guangrao County, Dongying 257300, China; <sup>2</sup>Department of Breast Cancer & Lymphoma (Tenth Department of Internal Medicine), Shandong Provincial Institute of Cancer Prevention and Treatment, Jinan 250117, China. E-mail: zbx1057@126.com]

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of high-mobility group box-1 (*HMGB1*) expression knockdown on the invasion ability of breast cancer cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ). **METHODS:** *HMGB1* siRNA was used to transfect into the breast cancer MDA-MB-231 cells. The expression of *HMGB1* at mRNA and protein levels was determined by RT-qPCR and Western blot. After the MDA-MB-231 cells with *HMGB1* expression knockdown were treated with  $\text{TNF-}\alpha$ , the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry, the cell invasion ability was measured by Transwell assay, and the cell migration ability was detected by cell scratch test. The protein expression of E-cadherin, MMP-2, N-cadherin, MMP-9 and Bax was determined by Western blot. **RESULTS:** The expression of *HMGB1* at mRNA and protein levels in the MDA-MB-231 cells transfected with *HMGB1* siRNA was significantly lower than that in the non-transfected cells ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate in the cells was increased after  $\text{TNF-}\alpha$  treatment, and the cell invasion and migration abilities were also increased. The protein level of E-cadherin in the cells was decreased, the protein level of N-cadherin was increased, and the protein levels of MMP-2, MMP-9 and Bax were also increased ( $P < 0.05$ ). After the MDA-MB-231 cells with *HMGB1* expression knockdown were induced by  $\text{TNF-}\alpha$ , the apoptotic rate was increased, the invasion and migration abilities were decreased, the protein levels of E-cadherin and Bax were increased, and the protein levels of N-cadherin,

[收稿日期] 2018-02-01 [修回日期] 2018-07-02

\* [基金项目] 中国医疗手牵手工程委员会、北京医学会奖励基金会资助项目 (No. YXJL2015-138)

Δ通讯作者 Tel: 13964006866; E-mail: zbx1057@126.com

MMP-2 and MMP-9 were decreased, as compared with the cells only induced by TNF- $\alpha$  without knockdown of *HMGB1* expression ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Knockdown of *HMGB1* expression enhances the apoptosis of breast cancer cells induced by TNF- $\alpha$ , and inhibited the cell invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- $\alpha$ . The mechanism may be related with the changes of protein expression of MMP-2, MMP-9 and Bax.

**[KEY WORDS]** Breast cancer; Invasion; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; High mobility group box-1; Epithelial-mesenchymal transition

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 具有广泛的抗肿瘤作用, 而对于其在肿瘤生物学中的作用仍然存在争议。TNF- $\alpha$  是目前常用的肿瘤生物治疗因子, 其参与生物机体内的炎症反应和细胞凋亡等过程<sup>[1]</sup>。研究报道显示, TNF- $\alpha$  可以诱导乳腺癌细胞的凋亡, 促进乳腺癌细胞的侵袭和转移<sup>[2-3]</sup>。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1, HMGB1) 能够调控细胞的 DNA 重组、细胞自噬和炎性损伤等, 并且与肿瘤细胞的多种生物学特性有关, 下调 HMGB1 表达可以减弱乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭和迁移能力, 并诱导乳腺癌细胞凋亡, 下调 HMGB1 在乳腺癌中发挥抑制作用<sup>[4-5]</sup>。本研究拟通过体外细胞实验, 以乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为对象, 用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 敲减乳腺癌细胞中 *HMGB1* 的表达, 探讨 HMGB1 对 TNF- $\alpha$  诱导的乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响, 为明确 HMGB1 在免疫微环境中对乳腺癌的作用提供实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要材料

*HMGB1* siRNA 和阴性对照 siRNA (siRNA negative control, siRNA-NC) 购自 Abbexa; 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; TNF- $\alpha$  购自 Peprotech; 胰蛋白酶购自 Amresco; 兔抗 Bax 抗体和兔抗 HMGB1 抗体购自 Saierbio; 兔抗上皮钙黏素 (E-cadherin) 抗体购自 Novus Biologicals; 兔抗基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloprotease 2, MMP-2) 抗体、兔抗神经钙黏素 (N-cadherin) 抗体、兔抗基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotease 9, MMP-9) 抗体和 HRP 标记的 II 抗购自 Santa Cruz; GAPDH 引物和 HMGB1 引物为南京金斯瑞合成; 细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝。

### 2 方法

**2.1 细胞分组处理** 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 (购自 ATCC, 用 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 0.25% 胰蛋白酶传代) 分为对照 (control) 组、TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组、*HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC 组和 *HMGB1* siRNA 组, 其中

TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组的细胞于实验开始时在培养液中添加 15  $\mu\text{g/L}$  的 TNF- $\alpha$ ; *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA 组为转染 *HMGB1* siRNA 后的 MDA-MB-231 细胞; siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 siRNA-NC 组为转染 siRNA-NC 后的 MDA-MB-231 细胞; control 组和 TNF- $\alpha$  组为不做转染的 MDA-MB-231 细胞; control 组细胞的培养液中不添加 TNF- $\alpha$ 。MDA-MB-231 细胞转染按照 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂说明书操作。

**2.2 实时荧光定量 PCR 测定 HMGB1 的 mRNA 水平** Control 组、siRNA-NC 组和 *HMGB1* siRNA 组细胞培养 24 h 以后收集细胞, 用细胞总 RNA 提取试剂盒提取细胞中的总 RNA。用分光光度计测定各组样品中的 RNA 的浓度。以 GAPDH 为内参照, 按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书, 首先合成 cDNA 的第一链, 然后以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s、60  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 40 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各组样品中的 HMGB1 水平。HMGB1 的上游引物序列为 5'-GCGAAGAACTGG-GAGAGATGTG-3', 下游引物序列为 5'-GCATCAG-GTTTCCTTTAGCTCG-3'; GAPDH 的上游引物序列为 5'-TCATTGACCTCAACTACATGGTTT-3', 下游引物序列为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'。

**2.3 Western blot 测定 HMGB1 蛋白水平** Control 组、siRNA-NC 组和 *HMGB1* siRNA 组细胞培养 24 h 后, 加入含 PMSF 的蛋白裂解液, 在冰上放置 5 min, 使蛋白充分裂解; 用细胞刮刀收集细胞, 转移到离心管中, 放在 4  $^{\circ}\text{C}$  的低温离心机中, 14 000  $\times g$  离心 20 min。用 BCA 法对各组蛋白样品进行定量检测。用 10% 的分离胶进行蛋白电泳, 电泳前按照每个泳道中添加 40  $\mu\text{g}$  的样品将各组蛋白样品煮沸变性, 在浓缩胶中以 80 V 的电压电泳, 当蛋白进入到分离胶以后, 用 120 V 的电压继续电泳至结束。100 V 的条件下, 在冰上将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上, 封闭, 与 1:800 稀释后的 I 抗反应以后, 与 1:3 000 稀释的 II 抗结合, 以 ECL 发光, 用 Quantity One 对各自蛋白条带定量分析 (GAPDH 为内参照)。

**2.4 流式细胞术测定细胞凋亡** Control 组、TNF- $\alpha$

组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组细胞按照上述方法处理培养 24 h 后, PBS 洗细胞 2 次, 用胰蛋白酶消化各组细胞后, 收集细胞沉淀, 加入结合缓冲液重悬细胞, 再依次添加 Annexin V-FITC 和 PI 后, 把各组细胞放在避光条件下结合 15 min 以后, 在 1 h 内上机检测。

**2.5 Transwell 小室法测定细胞的侵袭能力** Control 组、TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组细胞按照上述方法处理, 用不含血清的培养液把细胞浓度都调整为  $1 \times 10^8/L$ , 分别吸取 500  $\mu L$  的各組细胞悬浮液加入基质胶湿化以后的 Transwell 小室的上室, 并且在其下室中添加 600  $\mu L$  含有血清的培养液, 培养 24 h 后, 乙醇固定、HE 染色以后, 在 400 倍的显微镜下随机选 5 个视野对侵袭细胞进行计数。

**2.6 细胞划痕实验测定迁移能力** Control 组、TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组细胞融合度超过 90% 以后, 按照 2.5 方法处理, 在长满的细胞底上画一条细痕, 并用 PBS 洗涤 2 次。添加新鲜的细胞培养液, 24 h 后, 用 Image-Pro Plus

测定划痕的距离, 结果取平均值。以迁移的距离占划痕初始宽度的百分比表示迁移率。

**2.7 Western blot 测定 E-cadherin、MMP-2、N-cadherin、MMP-9 和 Bax 的蛋白水平** Control 组、TNF- $\alpha$  组、siRNA-NC + TNF- $\alpha$  组和 *HMGB1* siRNA + TNF- $\alpha$  组细胞按照上述方法处理培养 24 h 后, 用 Western blot 方法测定 E-cadherin、MMP-2、N-cadherin、MMP-9 和 Bax 蛋白水平, 方法同 2.3。

### 3 统计学分析

实验数据均采用 SPSS 21.0 分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。多组间差异的比较用单因素方差分析, 多重比较均采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 转染后细胞中 *HMGB1* 的表达

转染 *HMGB1* siRNA 后, MDA-MB-231 细胞中 *HMGB1* 的 mRNA 和蛋白水平均明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而转染 siRNA-NC 对乳腺癌细胞中 *HMGB1* 的 mRNA 和蛋白水平没有影响, 见图 1。

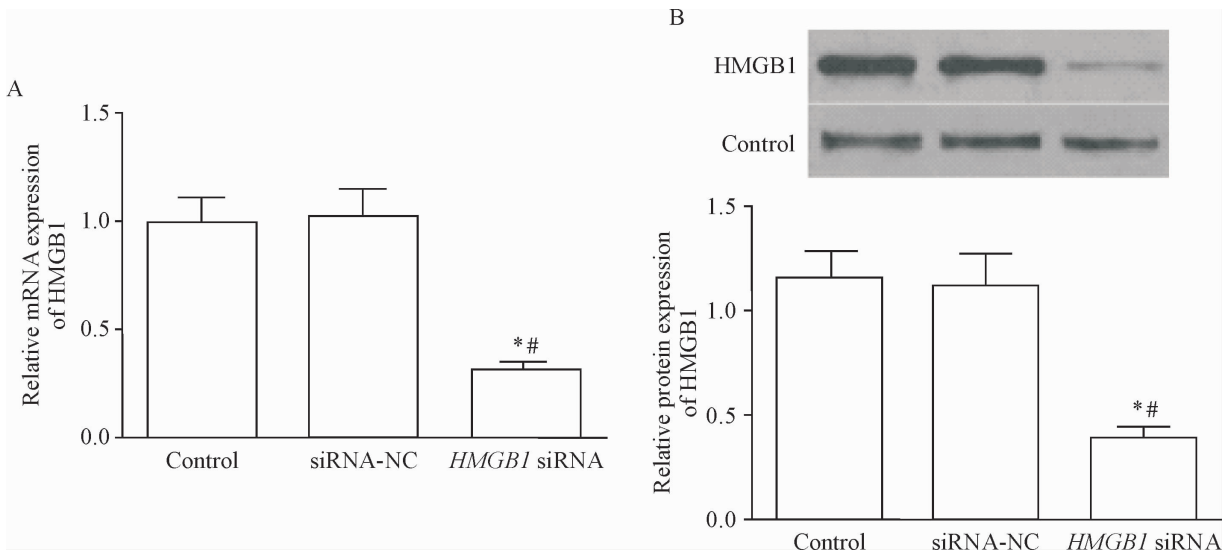


Figure 1. The expression of *HMGB1* at mRNA (A) and protein (B) levels in transfected breast cancer cells determined by RT-qPCR and Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs siRNA-NC group.

图 1 RT-qPCR 和 Western blot 测定转染后的乳腺癌细胞中 *HMGB1* 的表达水平

### 2 敲低 *HMGB1* 表达增加 TNF- $\alpha$ 对乳腺癌细胞凋亡的诱导作用

MDA-MB-231 细胞经过 TNF- $\alpha$  作用以后, 与对照组相比凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 TNF- $\alpha$  可以诱导乳腺癌细胞凋亡; 转染 *HMGB1* siRNA 后经 TNF- $\alpha$  处理, 细胞凋亡率更高 ( $P < 0.05$ ), 敲减 *HMGB1* 表达和 TNF- $\alpha$  刺激可以共同诱导乳腺癌细胞凋亡, 见图 2。

### 3 敲减 *HMGB1* 表达减弱 TNF- $\alpha$ 对乳腺癌细胞侵袭的诱导作用

MDA-MB-231 细胞经 TNF- $\alpha$  处理后侵袭细胞的数目较对照组明显增多 ( $P < 0.05$ ), 说明 TNF- $\alpha$  诱导乳腺癌细胞侵袭; 转染 *HMGB1* siRNA 后经 TNF- $\alpha$  诱导的侵袭细胞数目减少 ( $P < 0.05$ ), 说明 *HMGB1* siRNA 可以减弱 TNF- $\alpha$  诱导的乳腺癌细胞的侵袭能力, 见图 3。

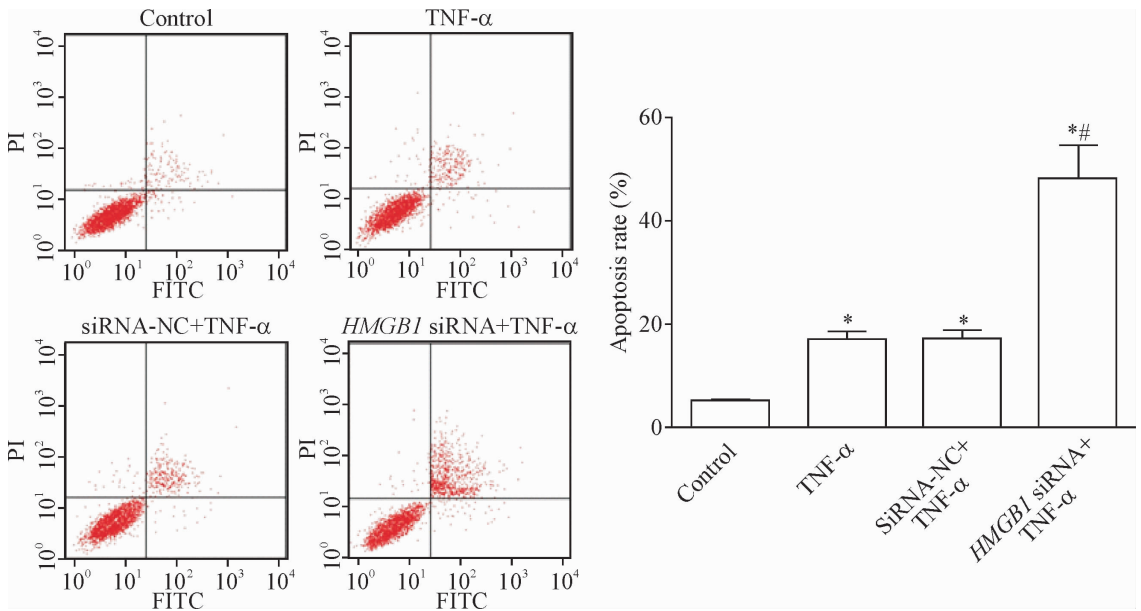


Figure 2. The apoptosis rate in each group analyzed by flow cytometry. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs siRNA-NC + TNF- $\alpha$  group.

图2 流式细胞术测定各组细胞的凋亡水平

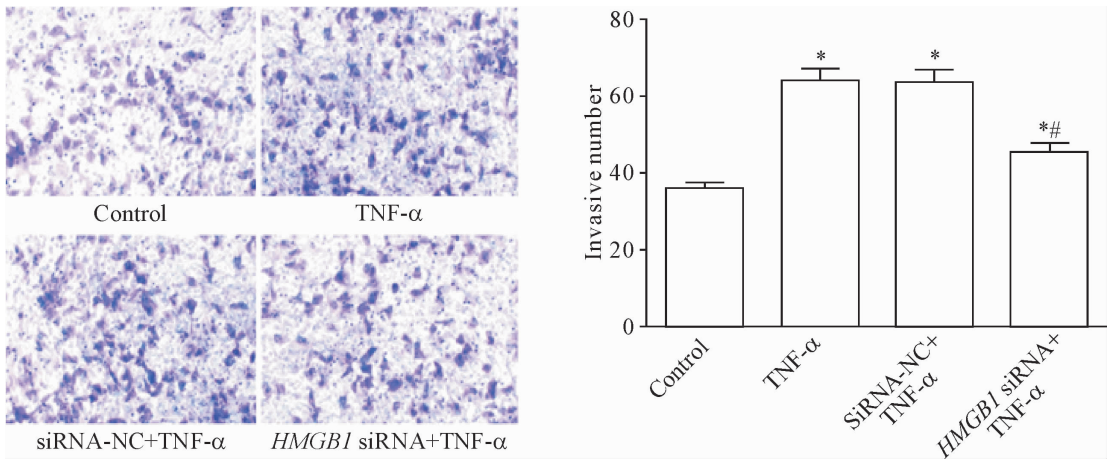


Figure 3. Transwell chamber determination of the invasion ability of breast cancer cells in each group ( $\times 200$ ). Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs siRNA-NC + TNF- $\alpha$  group.

图3 Transwell 小室测定各组乳腺癌细胞的侵袭能力

#### 4 敲减 *HMGB1* 表达减弱 *TNF- $\alpha$* 对乳腺癌细胞迁移的诱导作用

MDA-MB-231 细胞经 *TNF- $\alpha$*  处理后的迁移率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 *TNF- $\alpha$*  诱导乳腺癌细胞迁移; 转染 *HMGB1* siRNA 后经 *TNF- $\alpha$*  诱导的细胞迁移率降低 ( $P < 0.05$ ), 说明 *HMGB1* siRNA 可以降低 *TNF- $\alpha$*  诱导的乳腺癌细胞的迁移能力, 见图 4。

#### 5 敲减 *HMGB1* 表达减弱 *TNF- $\alpha$* 对乳腺癌细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的诱导作用

经 *TNF- $\alpha$*  处理后 MDA-MB-231 细胞中的上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达下调, 而间充质细胞标志蛋白 N-cadherin 表达升高 ( $P < 0.05$ ), 提示 *TNF- $\alpha$*  诱

导乳腺癌细胞 EMT; 转染 *HMGB1* siRNA 后经 *TNF- $\alpha$*  诱导的细胞中上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达升高, 而间充质细胞标志蛋白 N-cadherin 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 说明 *HMGB1* siRNA 可以抑制 *TNF- $\alpha$*  诱导的乳腺癌细胞 EMT, 见图 5。

#### 6 敲减 *HMGB1* 表达对 *TNF- $\alpha$* 作用的乳腺癌细胞 MMP-2、MMP-9 和 Bax 蛋白表达的影响

MDA-MB-231 细胞经 *TNF- $\alpha$*  处理后 MMP-2、MMP-9 和 Bax 蛋白的表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 转染 *HMGB1* siRNA 后经 *TNF- $\alpha$*  处理细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平降低, 而 Bax 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 *HMGB1* siRNA 对 *TNF- $\alpha$*  处理后的乳腺癌细胞的作用与 MMP-2、MMP-9 和 Bax 蛋

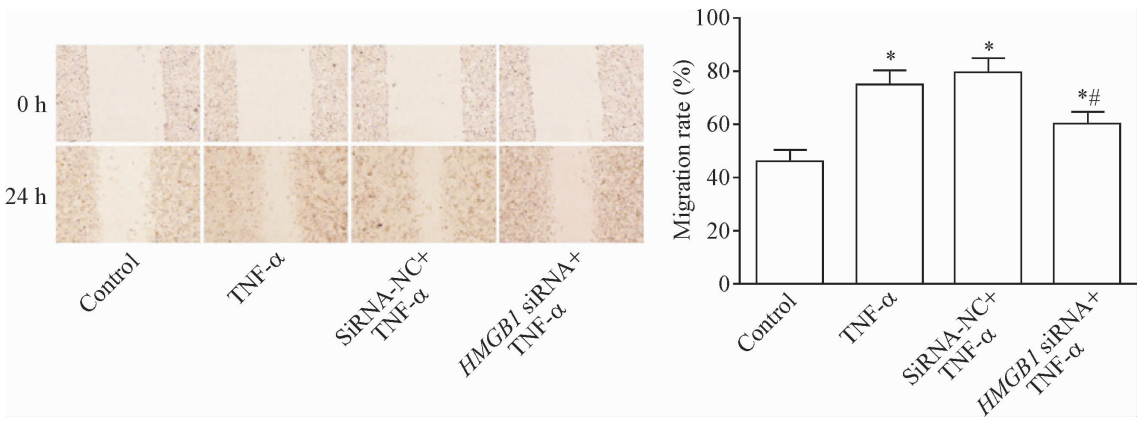


Figure 4. The migration ability of breast cancer MDA-MB-231 cells in each group detected by cell scratch test (×200). Mean ± SD. *n* = 3. \* *P* < 0.05 vs control group; # *P* < 0.05 vs siRNA-NC + TNF-α group.

图4 细胞划痕实验测定各组乳腺癌细胞的迁移能力

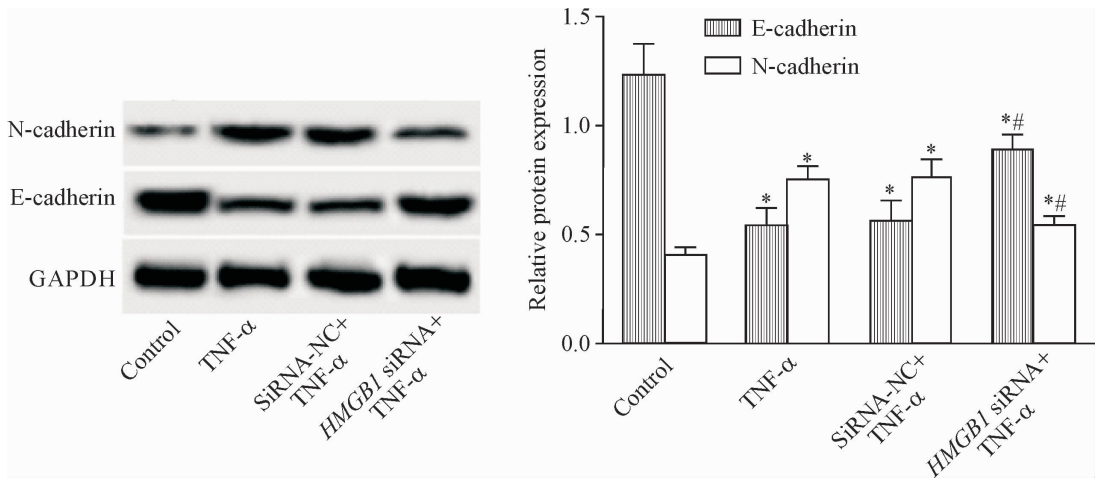


Figure 5. The expression of EMT marker proteins E-cadherin and N-cadherin in breast cancer MDA-MB-231 cells of each group determined by Western blot. Mean ± SD. *n* = 3. \* *P* < 0.05 vs control group; # *P* < 0.05 vs siRNA-NC + TNF-α group.

图5 Western blot 测定各组乳腺癌细胞中 EMT 标志蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达

白表达有关,见图6。

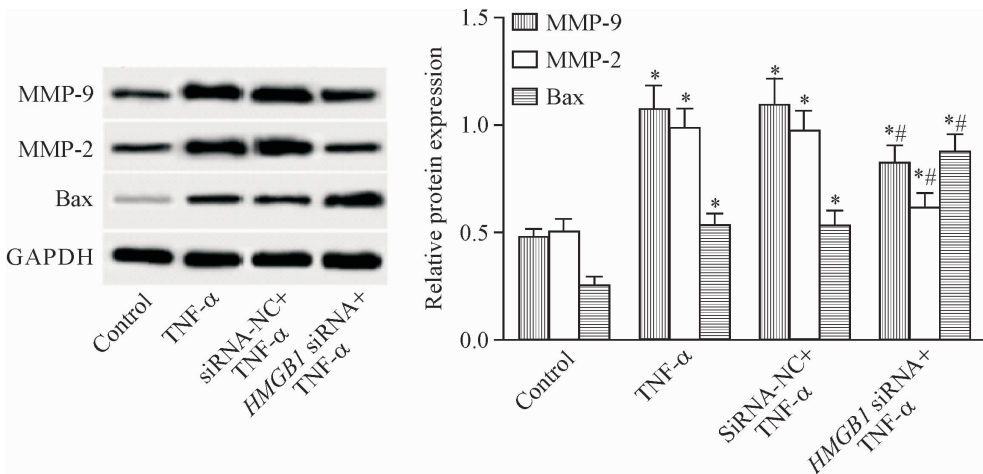


Figure 6. The protein expression of MMP-2, MMP-9 and Bax in the breast cancer MDA-MB-231 cells of each group determined by Western blot. Mean ± SD. *n* = 3. \* *P* < 0.05 vs control group; # *P* < 0.05 vs siRNA-NC + TNF-α group.

图6 Western blot 测定各组乳腺癌细胞中 MMP-2、MMP-9 和 Bax 的蛋白水平

## 讨 论

TNF- $\alpha$  是一种主要由免疫细胞分泌的抗肿瘤因子,其属于跨膜蛋白,在肠炎、关节炎和牛皮癣等自身免疫疾病中具有关键作用<sup>[6-7]</sup>。肿瘤小鼠模型经过脂多糖或微生物等处理后,TNF- $\alpha$  是主要的免疫反应因子,其可以引起炎症<sup>[8-9]</sup>。肿瘤的发生过程中,混乱的基因表达和转录引起肿瘤细胞对 TNF- $\alpha$  的敏感度增加,导致肿瘤细胞凋亡增多<sup>[10-12]</sup>。在多种体外实验中发现,外源性的 TNF- $\alpha$  可以促进肿瘤的转移,而在体内实验中发现自身接种 TNF- $\alpha$  可以减少黑色素瘤小鼠模型的肿瘤转移<sup>[13]</sup>。李晓敏等<sup>[14]</sup>的研究报道显示,给予乳腺癌细胞外源性的 TNF- $\alpha$  刺激以后,Transwell 小室实验中的乳腺癌细胞穿膜数目增加。侯娟<sup>[15]</sup>在探讨 TNF- $\alpha$  对乳腺癌化疗敏感性的研究中发现,TNF- $\alpha$  可以诱导乳腺癌细胞的凋亡,增加其化疗敏感性。本实验结果表明,TNF- $\alpha$  可以诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡,促进乳腺癌细胞的侵袭和迁移,这与上述实验报道相符。

HMGB1 含有一个可以调控转录的 C 端和 2 个可以与 DNA 结合的结构域,其能够与 Toll 样受体结合,调控多种炎症因子的释放<sup>[16]</sup>。在细胞受到外界环境的作用后,HMGB1 可以促进 TNF- $\alpha$  和内毒素等的释放,介导炎症损伤<sup>[17]</sup>。在肝癌和乳腺癌等多种肿瘤中已经发现 HMGB1 过度表达,并且可以调控肿瘤细胞的凋亡、侵袭和迁移过程,影响肿瘤细胞释放免疫因子<sup>[18-20]</sup>。Ni 等<sup>[4]</sup>通过细胞转染化学合成的 HMGB1 siRNA 构建下调 HMGB1 的乳腺癌 MCF-7 细胞,通过检测 HMGB1 表达及细胞增殖、凋亡和迁移水平,结果发现,HMGB1 沉默抑制人乳腺癌细胞的侵袭和迁移,促进细胞凋亡,提示 HMGB1 沉默可能是一种潜在的治疗靶点。本实验表明,HMGB1 敲低后的乳腺癌细胞经过 TNF- $\alpha$  诱导以后,细胞的凋亡水平进一步增加,而细胞的侵袭和迁移能力下降,这说明 HMGB1 敲低可以与 TNF- $\alpha$  共同发挥抗肿瘤的作用,综合上述实验报道,下调 HMGB1 不仅具有抗乳腺癌作用,还能够与 TNF- $\alpha$  协同共同抑制乳腺癌发生。

肿瘤细胞的侵袭、迁移和凋亡等多种生物学特性都受到细胞内多种蛋白的严格调控。Bax 是 Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白,其在肿瘤组织中表达下调,而促进其表达后可以诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[21-24]</sup>。在肿瘤的转移中,肿瘤细胞能够降解细胞外基质的蛋白酶,为肿瘤细胞突破组织屏障提供条件,MMP-2 和

MMP-9 是目前研究发现的能够降解细胞外基质的主要蛋白酶,在多种肿瘤组织中表达升高<sup>[25-27]</sup>。在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞的上皮细胞特性逐渐消失,而间充质细胞特性逐渐增加,这成为肿瘤细胞的 EMT,E-cadherin 是上皮细胞的标志性蛋白,而 N-cadherin 是间充质细胞的标志蛋白,E-cadherin 在肿瘤组织中表达下调,而 N-cadherin 在肿瘤组织中表达升高<sup>[28-30]</sup>。本实验结果显示,TNF- $\alpha$  处理后的乳腺癌细胞中 E-cadherin 表达水平下降,N-cadherin 表达水平升高,TNF- $\alpha$  诱导乳腺癌细胞 EMT,并且细胞中的 Bax 表达升高,MMP-2 和 MMP-9 水平也升高,而下调 HMGB1 可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导乳腺癌细胞 EMT,降低细胞中 MMP-2 和 MMP-9 水平,促进 Bax 的表达,这提示下调 HMGB1 可以通过调控细胞 EMT 及 Bax、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达影响 TNF- $\alpha$  对乳腺癌细胞的凋亡、侵袭和迁移的影响。

### [参 考 文 献]

- [1] Katanov C, Lerrer S, Liubomirski Y, et al. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- $\alpha$  and the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6:87.
- [2] Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, et al. Expression of TNF- $\alpha$  and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(7):1504-1514.
- [3] Jin L, Wessely O, Marcusson EG, et al. Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF- $\alpha$  in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(9):2884-2896.
- [4] Ni P, Zhang Y, Liu Y, et al. HMGB1 silence could promote MCF-7 cell apoptosis and inhibit invasion and metastasis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12):15940-15946.
- [5] Su Z, Ni P, She P, et al. Bio-HMGB1 from breast cancer contributes to M-MDSC differentiation from bone marrow progenitor cells and facilitates conversion of monocytes into MDSC-like cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(3):391-401.
- [6] Chiricozzi A, Guttmanyassky E, Suárezfariñas M, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- $\alpha$  in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(3):677-687.
- [7] Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, et al. A novel mechanism for TNF- $\alpha$  regulation by p38 MAPK: involvement of NF- $\kappa$ B with implications for therapy in rheumatoid

- arthritis[J]. *J Immunol*, 2004, 173(11):6928-6937.
- [8] Chung H, Lee YS, Mayoral R, et al. Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(27):3504-3513.
- [9] 孙伟, 商正玲, 左丽, 等. 重组 HMGB1 对 DEN2 感染 Ana-1 细胞分泌 TNF- $\alpha$  及 NO 的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(1):12-15.
- [10] 朱红霞, 周晓波, 刘梅, 等. HPV16 E7 蛋白对 TNF- $\alpha$  诱导食管癌细胞凋亡及其机制的探讨[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(1):5-9.
- [11] 程大丽. 核因子  $\kappa$ B 在 TNF- $\alpha$  诱导宫颈癌细胞凋亡过程中作用的研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2005.
- [12] 侍作亮, 陈孝平, 张万广, 等. 抑制蛋白激酶 C $\alpha$  活性增加 TNF- $\alpha$  对小鼠肝癌细胞毒性的实验研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2006, 21(5):364-366.
- [13] Wu MF, Lu HF, Hsu YM, et al. Possible reduction of hepatoma formation by Smmu 7721 cells in SCID mice and metastasis formation by B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice by *Agaricus blazei murill* extract [J]. 2011, 25(3):399-404.
- [14] 李晓敏, 王水, 夏金晶, 等. TNF- $\alpha$  对人乳腺癌 MCF-7 细胞株 CD44 表达以及细胞侵袭性的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(4):313-317.
- [15] 侯娟. TNF- $\alpha$  对乳腺癌细胞的化疗增敏作用及机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [16] 尹朝奇, 贺全勇, 罗成群, 等. HSF-1 在 HMGB1 诱导的炎症反应中的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(9):1291-1295.
- [17] Kim YM, Kim JH, Park SW, et al. Retinoic acid inhibits tissue factor and HMGB1 via modulation of AMPK activity in TNF- $\alpha$  activated endothelial cells and LPS-injected mice [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2):615-623.
- [18] Chang BP, Wang DS, Xing JW, et al. miR-200c inhibits metastasis of breast cancer cells by targeting HMGB1 [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2014, 34(2):201-206.
- [19] 陈艳美. HMGB1 在肝癌细胞增殖和侵袭中的作用及其机制[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [20] Exner R, Sachet M, Arnold T, et al. Prognostic value of HMGB1 in early breast cancer patients under neoadjuvant chemotherapy [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(9):2350-2358.
- [21] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1):49-63.
- [22] Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, et al. Many players in BCL-2 family affairs [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(3):101-111.
- [23] Zhao B, He T. Chidamide, a histone deacetylase inhibitor, functions as a tumor inhibitor by modulating the ratio of Bax/Bcl-2 and P21 in pancreatic cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1):304-310.
- [24] Zhang X, Bi L, Ye Y, et al. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4):656-661.
- [25] Fiorentini C, Bodei S, Bedussi F, et al. GPNMB/OA protein increases the invasiveness of human metastatic prostate cancer cell lines DU145 and PC3 through MMP-2 and MMP-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1):100-111.
- [26] Mehner C, Hockla A, Miller E, et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(9):2736-2749.
- [27] Binker-Cosen MJ, Richards D, Oliver B, et al. Palmitic acid increases invasiveness of pancreatic cancer cells AsPC-1 through TLR4/ROS/NF- $\kappa$ B/MMP-9 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(1):152-158.
- [28] Qian X, Anzovino A, Kim S, et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties [J]. *Oncogene*, 2014, 33(26):3411-3421.
- [29] Nelson ER, Li S, Kennedy M, et al. Chemotherapy enriches for an invasive triple-negative breast tumor cell subpopulation expressing a precursor form of N-cadherin on the cell surface [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51):84030-84042.
- [30] Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression; a three-dimensional study of the human cancer-host interface [J]. *J Pathol*, 2014, 234(3):410-422.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗森)