

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.002

## HMGB1 基因沉默促进多柔比星诱导的胃癌 BGC-823 细胞自噬及凋亡

张秋玉<sup>1,2</sup>, 豆文利<sup>1</sup>, 吴林青<sup>1</sup>, 韩艳非<sup>1</sup>, 许伟群<sup>1</sup>, 刘樑英<sup>1</sup>, 章涛<sup>1</sup> (1. 福建医科大学基础医学院免疫学系, 福建福州 350108; 2. 福建医科大学消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建福州 350108)

**[摘要]** **目的:**探讨高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1, *HMGB1*) 基因沉默对化疗药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 诱导 BGC-823 胃癌细胞发生自噬和凋亡的影响。**方法:**MTT、Western blotting 和激光共聚焦显微镜分别检测 DOX 对 BGC-823 细胞增殖及微管相关蛋白轻链 3-I (microtubule light chain-3 I, LC3 I)、LC3 II 表达和自噬小体形成的影响。构建靶向 *HMGB1* 的 shRNA 载体 pSuper-sh*HMGB1* 及其对照载体 pSuper-shNC 并转染 BGC-823 胃癌细胞, 建立 *HMGB1* 稳定沉默的细胞系。DOX 处理不同质粒转染组的 BGC-823 胃癌细胞, 激光共聚焦显微镜观察 *HMGB1* 沉默对 DOX 诱导的自噬小体形成的影响, MTT 法、流式细胞术分别检测对细胞增殖和凋亡的影响, Western blotting 检测对自噬及凋亡相关蛋白 (*HMGB1*、LC3、Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 和激活型 caspase-3) 表达的影响。**结果:**DOX 可上调 BGC-823 细胞中 LC3-II 蛋白的水平 and 促进细胞自噬体的形成 ( $P < 0.01$ )。与对照组相比, *HMGB1* 基因沉默可减少 DOX 诱导的胃癌细胞自噬 [(19.33 ± 2.96)% vs (71.67 ± 3.38)% ,  $P < 0.01$ ], 促进胃癌细胞发生凋亡 [(46.12 ± 3.15)% vs (12.37 ± 2.84)% ,  $P < 0.05$ ], 上调激活型 caspase-3 的表达水平。进一步分析发现, DOX 诱导胃癌细胞发生自噬时, Mcl-1 的降解增加, 而 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达无明显变化; *HMGB1* 基因沉默可抑制 DOX 诱导的 Mcl-1 降解。**结论:**DOX 可诱导 BGC-823 胃癌细胞发生自噬, *HMGB1* 基因沉默有助于逆转胃癌细胞对 DOX 的耐药性, 促进胃癌细胞发生凋亡。

**[关键词]** 高迁移率族蛋白 1 基因; 多柔比星; 短发夹 RNA; BGC-823 细胞; 胃癌; 自噬; 凋亡; 耐药性

**[中图分类号]** R735.2; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0610-07

## HMGB1 silencing-mediated increase in autophagy and apoptosis of human gastric cancer BGC-823 cells after doxorubicin treatment

Zhang Qiuyu<sup>1,2</sup>, Dou Wenli<sup>1</sup>, Wu Linqing<sup>1</sup>, Han Yanfei<sup>1</sup>, Xu weiqun<sup>1</sup>, Liu Liangying<sup>1</sup>, Zhang Tao<sup>1</sup> (1. Department of Immunology, College of Basic Medical Science, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, Fujian, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, Fujian, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of high-mobility group box 1 (*HMGB1*) gene silencing on chemotherapeutic agent Doxorubicin (DOX)-induced autophagy and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. **Methods:** Cell viability, microtubule light chain 3 (LC3-I, LC3-II) protein content and autophagic vesicle formation in DOX-induced BGC-823 cells were assessed by MTT assay, Western blotting and confocal microscopy, respectively. BGC-823 cells were transfected with pSuper-sh*HMGB1* (a shRNA targeting the *HMGB1* gene) and pSuper-shNC (a control vector) respectively and subjected to G418 selection. BGC-823 cells stably expressing pSuper-sh*HMGB1* or pSuper-shNC were treated with DOX. After treatment, autophagic vesicle formation was assessed by confocal microscopy. Cell viability and cell apoptosis were determined by the MTT assay and flow cytometry respectively. *HMGB1*, LC3, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 and cleaved caspase-3 proteins were assessed by Western blotting. **Results:** Treatment with DOX increased the protein content of LC3-II and the formation of autophagic vesicles in BGC-823 cells ( $P < 0.01$ ). As compared to the control,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81101558); 福建省自然科学基金资助项目 (No. 2012J01364); 教育部博士点基金资助项目 (No. 20113518120002)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101558), the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2012J01364), and the Foundation for the Doctoral Program from the Ministry of Education of China (No. 20113518120002)

**[作者简介]** 张秋玉 (1974 -), 女, 福建南平人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫的研究, E-mail: qiyuzhang2009@gmail.com

**[通信作者]** 章涛 (Zhang Tao, corresponding author), E-mail: zjdrzht@hotmail.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1500.002.html>

HMGB1 silencing inhibited DOX-induced autophagy ( $P < 0.01$ ), promoted apoptosis ( $[46.12 \pm 3.15]\%$  vs  $[12.37 \pm 2.84]\%$ ,  $P < 0.05$ ) and up-regulated the expression of cleaved caspase-3 in BGC-823 cells. Furthermore, antiapoptotic Mcl-1 protein degradation was increased in BGC-823 cells after induction of autophagy, however, Bcl-2 and Bcl-XL protein levels did not change significantly. HMGB1 gene silencing significantly attenuated the degradation of Mcl-1 protein. **Conclusion:** Autophagy can be induced by Doxorubicin in BGC-823 cells, which may contribute to DOX resistance. Knock-down of HMGB1 attenuates the DOX-induced autophagy and promotes apoptosis in gastric cancer cells.

[ **Key words** ] high mobility group box 1 (HMGB1) gene; doxorubicin; short hairpin RNA; BGC-823 cell; gastric carcinoma; autophagy; apoptosis; drug resistance

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 610-616 ]

高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种高度保守的非组蛋白染色质蛋白, 在一定病理条件下, 其可转移到胞质并释放到胞外, 参与急慢性炎症反应。研究<sup>[1-2]</sup>表明, HMGB1 在多种肿瘤细胞中高表达, 是肿瘤细胞发生自噬和凋亡的重要调节分子。新近研究<sup>[3]</sup>发现, 细胞自噬与肿瘤耐药密切相关。细胞内外的 HMGB1 通过不同途径调节肿瘤细胞发生自噬, 下调 HMGB1 的表达可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[4-5]</sup>。已有文献<sup>[6-8]</sup>报道, HMGB1 高表达于胃癌细胞并参与胃癌细胞的增殖、抗凋亡和浸润等过程, 但鲜见有关 HMGB1 与胃癌耐药性关系的报道。基于此, 本研究利用 RNAi 技术构建靶向抑制内源性 HMGB1 表达的 shRNA 表达载体, 初步探讨 HMGB1 表达下调对化疗药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 诱导的胃癌细胞自噬和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

BGC-823 胃癌细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。RPMI 1640 购自 HyClone 公司, DOX 及兔抗人 HMGB1 多克隆抗体购自 Sigma 公司, G418 购自 Cellgro 公司, GFP-LC3 质粒购自 Addgene 公司, pSR-Neo 质粒购自美国 OligoEngine 公司, X-treme GENE HP DNA 及 X-treme siRNA 转染试剂购自 Roche 公司, Annexin V/PI 双染法检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, 细胞质组分提取试剂盒及 ECL 工作液购自 Millipore 公司, 兔抗人微管相关蛋白 I 轻链 3-I (microtubule chain-3 I, LC3 I) 和 LC3 II、激活型 caspase-3、抗凋亡蛋白骨髓细胞白血病蛋白 1 (myeloid cell leukemia 1, Mcl-1)、Bcl-2、Bcl-XL 抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗均购自 Cell Signal Technology 公司。

1.2 MTT 实验检测 DOX 对 BGC-823 细胞增殖的影响

BGC-823 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养, 3~4 d 换液 1 次。接种  $5 \times 10^3$  细胞于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后加入不同质量浓度的 DOX (2.5、5、10、20、40、80 μg/ml), 同时设阴性对照组 (0.1% DMSO) 和空白组 (只加培养基, 无细胞), 每组 5 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 MTT 至终浓度为 50 μg/ml, 继续孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入 200 μl DMSO 溶解结晶, 置摇床低速振荡 10 min, 用酶标仪检测 570 nm 处的光密度 ( $D$ ) 值, 计算细胞生长抑制率 [细胞生长抑制率 (%) = (对照组  $D$  值 - 实验组  $D$  值) / (对照组  $D$  值 - 空白组  $D$  值) × 100%] 以及 DOX 对细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

1.3 Western blotting 方法检测 DOX 处理后细胞内 LC3 I、LC3 II 表达的变化

BGC-823 细胞接种于 6 孔培养板中, 加入不同剂量 DOX (0、5、10、20 μg/ml) 处理 24 h 或加入 20 μg/ml DOX 处理不同时间 (0、12、18、24 h), 提取细胞质蛋白, 测定自噬标志蛋白 LC3 I、LC3 II 的表达。每组均取 20 μg 总蛋白, 经 SDS-PAGE 分离、转膜和封闭后, 分别加入兔抗人 HMGB1 抗体或 LC3 抗体过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h, 加入 ECL 工作液, 用分子成像系统曝光、拍照。实验重复 3 次。

1.4 共聚焦显微镜观察 DOX 处理后 BGC-823 细胞内自噬小体数量的变化

BGC-823 细胞接种于 35 mm 玻盘, 待细胞贴壁后用 X-treme GENE HP DNA 转染试剂转染 GFP-LC3 质粒, 转染 24 h 后加入 20 μg/ml DOX 或 0.1% DMSO (阴性对照), 每组设 3 个复孔, 药物处理 24 h 后 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 用 PBS 洗两次, 加入含有抗淬灭剂的封片剂, 激光共聚焦显微镜下观察 GFP-LC3 蛋白的聚集及自噬小体数量变化。

1.5 pSuper-shHMGB1 载体的构建

靶向 HMGB1 的 4 条 siRNA 序列由上海吉玛制

药技术有限公司合成,按照 X-treme siRNA 转染试剂说明书转染 BGC-823 细胞并筛选有效干扰序列。根据筛选的有效序列设计并合成 2 对带有酶切位点的 HMGB1-shRNA 寡核苷酸单链,同时设计一对无

关于干扰序列 shNC(表 1),退火反应生成 dsDNA,通过 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点将针对 *HMGB1* 的有效干扰片段插入 pSR-Neo 质粒 H1 启动子之后,PCR 挑选阳性重组质粒,酶切及测序鉴定。

表 1 质粒名称及寡核苷酸 DNA 序列  
Tab. 1 Plasmids name and target sequences

Plasmid	Oligo DNA sequence (5'-3')
pSuper-shHMGB1-2	GATCCCCCCGTTATGAAAGAGAAATTTCAAGAGAATTTCTCTTTCATAAC GGTTTTTTA
	AGCTTAAAAACCCGTTATGAAAGAGAAATTTCTCTTGAAATTTCTCTTTCAT AACGGGGGG
pSuper-shHMGB1-3	GATCCCCCTGGGAGAGATGTGGAATATTTCAAGAGATATTCCACATCTCTC CCAGTTTTTA
	AGCTTAAAACTGGGAGAGATGTGGAATATCTCTTGAATATTCCACATCTC TCCCAGGGG
pSuper-shNC	GATCCCCTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCG AGAATTTTTA
	AGCTTAAAAATTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCC GGAGAAGGG

1.6 重组质粒转染 BGC-823 细胞及筛选稳定株

将构建的两个 pSuper-shHMGB1 质粒及其 pSuper-shNC 对照质粒分别转染 BGC-823 胃癌细胞,48 h 后加入 500 μg/ml G418 筛选稳定表达 shHMGB1 细胞株并扩增,21 d 后 Western blotting 测定稳定株细胞内 HMGB1 的表达水平,稳定株用 250 μg/ml G418 维持培养。

1.7 沉默 HMGB1 联合 DOX 对 BGC-823 细胞自噬的影响

取稳定表达 pSuper-shHMGB1( shHMGB 组)和对照质粒 pSuper-shNC( shNC 组)的细胞及未转染的 BGC-823 细胞( Con 组)接种 6 孔板,加入 20 μg/ml DOX 处理 24 h, Western blotting 检测 LC3I、LC3II 表达,具体方法参见 1.2。将上述 3 组细胞接种 35 mm 玻盘,转染 GFP-LC3 质粒 24 h 后加入 20 μg/ml DOX,24 h 后用激光共聚焦显微镜观察自噬小体数量变化。上述每组细胞均设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.8 沉默 HMGB1 联合 DOX 对 BGC-823 细胞凋亡的影响

将 *HMGB1* 基因沉默的 BGC-823 细胞及对照细胞(稳定转染 pSuper-shNC 的细胞系及未转染的细

胞)分别用不同剂量(0、2.5、5、10、20、40、80 μg/ml)DOX 处理 24 h,每组设 5 个复孔,MTT 法测定 *D* 值并计算 IC<sub>50</sub>。

将上述 3 组细胞用 10 μg/ml DOX 处理 24 h,每组设 3 个复孔,Annexin V/PI 双染法测定凋亡细胞比例。20 μg/ml DOX 处理未转染 BGC-823 细胞不同时间(0、12、18、24 h),*HMGB1* 基因沉默及对照细胞用 20 μg/ml DOX 处理 24 h;每组均设 3 复孔。Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Mcl-1 与激活型 caspase-3、Bcl-2、Bcl-XL 的表达。

1.9 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 GraphPad Prism 6 软件,两组间比较用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义

2 结果

2.1 DOX 诱导 BGC-823 细胞发生自噬

MTT 检测结果显示,DOX 处理 BGC-823 细胞 24 h 后的 IC<sub>50</sub> 约 48 μg/ml。用低于半数抑制剂量的 DOX(5、10、20 μg/ml)处理 BGC-823 细胞,结果(图 1A)显示,正常的 BGC-823 细胞表达有低水平 LC3

I 及 LC3 II 蛋白, DOX 处理可明显上调 LC3 II 蛋白表达,并呈时间和剂量依赖关系。激光共聚焦检测结果(图 1B)提示,DOX 处理组的 GFP-LC3 点状聚集阳性的 BGC-823 细胞比例较对照组显著增加 [ ( 73.67 ± 6.69 )% vs ( 6.67 ± 0.88 )% ,  $P < 0.01$  ]。

## 2.2 人 HMGB1-shRNA 表达载体的构建

Western blotting 检测结果(2A)显示,3 个干扰片段均能有效下调 *HMGB1* 的表达,其中 siHMGB1-3 的下调效果最显著。根据 siHMGB1-3 构建的人 *HMGB1* 的 shRNA 表达载体,经酶切、基因测序等鉴定证实,*HMGB1* shRNA 核苷酸链序列插入正确,与预期结果一致,分别命名为 pSuper-shHMGB1-2 及 pSuper-shHMGB1-3,两者的测序结果如图 2B 所示。Western blotting 检测转染载体的干扰效果,结果(图 2C)显示,pSuper-shHMGB1-2 及 pSuper-shHMGB1-3 表达载体转染组 *HMGB1* 蛋白的表达均较对照组显著下降 [ ( 0.56 ± 0.05 )、( 0.26 ± 0.05 ) vs ( 0.73 ± 0.03 ) , 均  $P < 0.01$  ], 并且 pSuper-shHMGB1-3 转染组 *HMGB1* 表达下调更显著。随后,将 pSuper-shHMGB1-3 及其对照质粒 pSuper-shNC 转染 BGC-823

细胞,G418 筛选稳定转染 shHMGB1 的 BGC-823 细胞株。

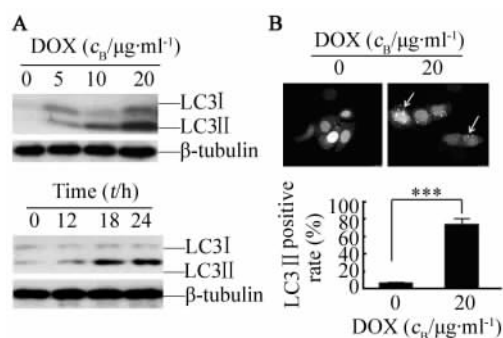


图 1 DOX 诱导 BGC-823 细胞发生自噬

Fig. 1 Autophagy induced by DOX in BGC-823 cells

A: BGC-823 cells treated with DOX ( 0 , 5 , 10 , 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) for 24 h or treated with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DOX for indicated time periods, then whole cell lysates were subjected to Western blotting analysis of LC3; B: GFP-LC3-transfected BGC-823 cells were observed by confocal fluorescence microscopy 24 h following DOX or control treatment (  $\times 200$  ). White arrows indicate the characteristic punctate pattern of GFP-LC3, which occurs upon autophagy induction

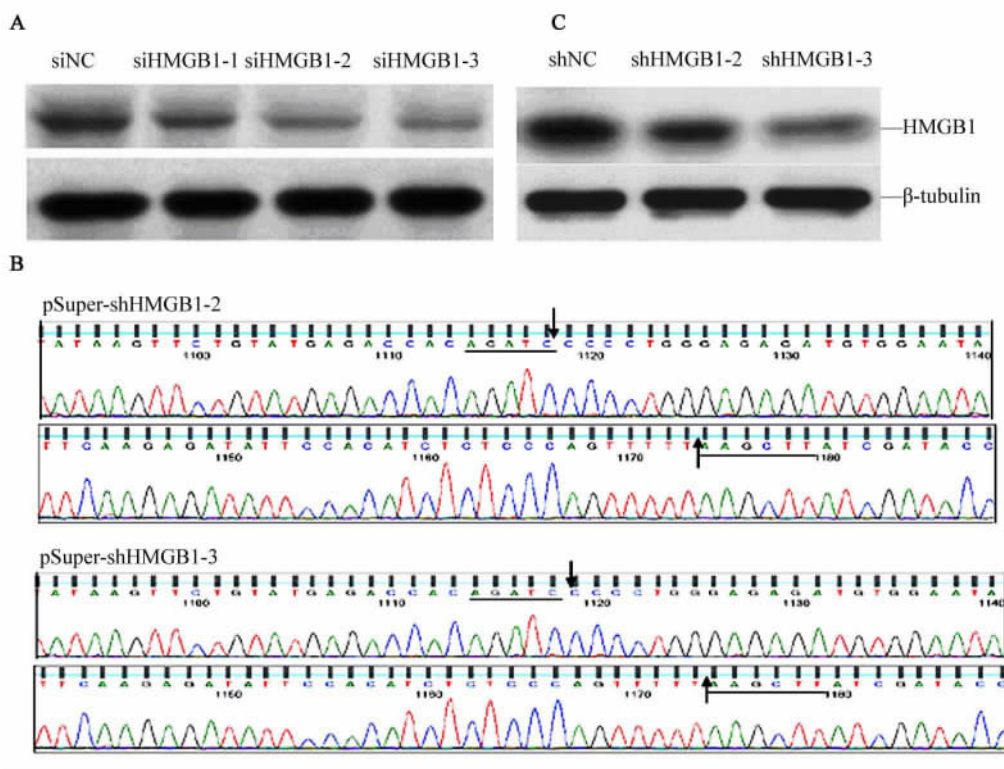


图 2 pSuper-shHMGB1-2 及 pSuper-shHMGB1-3 转染下调 BGC-823 细胞中 *HMGB1* 的表达

Fig. 2 Suppression of *HMGB1* expression in BGC-823 cells by pSuper-shHMGB1-2 and pSuper-shHMGB1-3 transfection

A, C: BGC-823 cells were transfected with siRNA or shRNA target sequence in the coding region of *HMGB1*, and knockdown efficiency was assessed by Western blotting; B: The sequencing map of the recombinant vector pSuper-shHMGB1-2 and pSuper-shHMGB1-3, the *HMGB1* target sequence is between site marked with upward and downward arrow, underline DNA bases are the sites of restricted enzymes

2.3 HMGB1 沉默对 DOX 诱导自噬作用的影响

Western blotting 检测结果(图 3)显示, shHMGB1 组的 HMGB1 蛋白(0.21 ± 0.03 vs 0.53 ± 0.02, P < 0.01)和 LC II 蛋白(0.12 ± 0.01 vs 0.34 ± 0.02, P < 0.05)表达均显著低于 shNC 组, 而 Con 组与 shNC 组间差异无统计学意义(P > 0.05)。激光共聚焦观察的结果(图 4)亦显示, shHMGB1 组每 10 个视野的 GFP-LC3 点状聚集阳性 BGC-823 细胞比例显著低于 shNC 组[(19.33 ± 2.96)% vs (71.67 ± 3.38)% , P < 0.01]。

2.4 HMGB1 沉默促进 DOX 诱导的细胞凋亡

MTT 检测结果(表 2)显示, shHMGB1 组细胞 DOX 的 IC<sub>50</sub> 值比 Con 组及 shNC 对照组明显降低(均 P < 0.01), 而后两者的差异无统计学意义(P > 0.05)。

流式细胞术检测结果(表 2, 图 5)显示, shHMGB1 组 BGC-823 细胞凋亡率比 Con 组及 shNC 组明显增高(均 P < 0.05)。

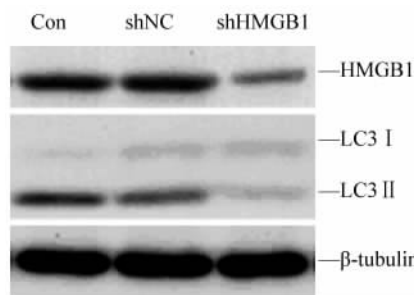


图 3 HMGB1 沉默下调了 DOX 诱导的 LC3-II 表达  
Fig. 3 LC3-II expression induced by DOX was suppressed by HMGB1 knockdown in BGC-823 cells

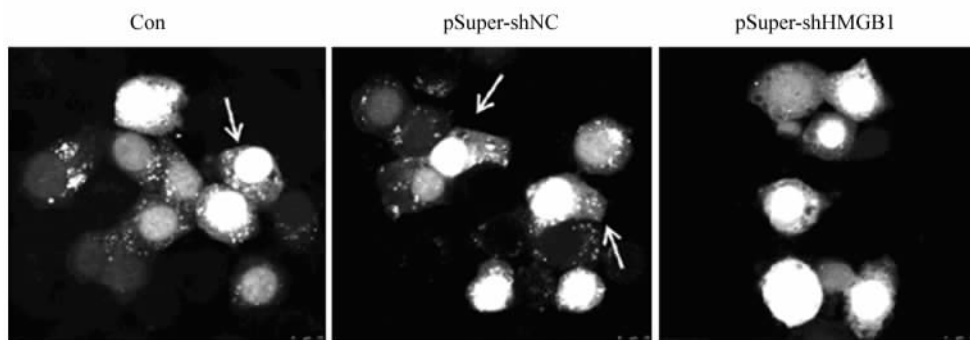


图 4 HMGB1 基因沉默抑制 DOX 诱导的 BGC-823 细胞内自噬小体的形成(×200)  
Fig. 4 The formation of autophagic vesicles induced by DOX was inhibited by HMGB1 gene knockdown in BGC-823 cells (×200)

表 2 HMGB1 基因沉默对 DOX 诱导 BGC-823 细胞 IC<sub>50</sub> 及凋亡率的影响

Tab. 2 Effects of HMGB1 knockdown on IC<sub>50</sub> and apoptotic rate of BGC-823 cells induced by DOX

Group	IC <sub>50</sub> (ρ <sub>B</sub> /μg · ml <sup>-1</sup> )	Apoptosis rate(%)
Con	48.87 ± 2.02	10.86 ± 2.51
ShNC	44.98 ± 3.25	12.37 ± 2.84
ShHMGB1	9.86 ± 1.23**	46.12 ± 3.15*

\* P < 0.05, \*\* P < 0.05 vs Con or ShNC group

2.5 HMGB1 基因沉默对凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 6)显示, 20 μg/ml DOX 处理 BGC-823 细胞不同时间后, 随着时间延长, LC3 II 水平升高、Mcl-1 水平下降。DOX 作用

24 h 后, 与未处理组相比, shHMGB1 组细胞内 LC II 的表达显著升高[(0.76 ± 0.12) vs (0.18 ± 0.03), P < 0.01], Mcl-1 表达显著降低[(0.25 ± 0.03) vs (0.82 ± 0.14), P < 0.01]。

20 μg/ml DOX 处理细胞 24 h 后, shHMGB1 组细胞内激活型 caspase-3 水平较 shNC 组明显升高[(0.74 ± 0.03) vs (0.49 ± 0.04), P < 0.01], 抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达减少[(0.43 ± 0.06) vs (0.68 ± 0.06), P < 0.05]。

3 讨论

自体吞噬是真核生物中的一种维持细胞基本功能的生命现象。在缺乏营养或饥饿的情况下, 细胞通过形成囊泡结构将自身细胞内成分进行消化降解和重新利用。作为一种分解代谢机制, 自噬可以保

护细胞抵抗不利的环境因素,维持细胞内环境和能量的平衡。随着对自噬研究的不断深入,自噬在肿瘤发生发展中的作用日渐引起肿瘤研究者的关注。研究<sup>[9]</sup>发现,肿瘤细胞自噬活性的异常与肿瘤的异常增殖、侵袭转移、及新生血管形成等过程密切相关。近年研究<sup>[3,4,10]</sup>证实,肿瘤细胞中的一些自噬活动可以在一些治疗因素下被激活,自噬被认为是一种增加化疗药物抗性的保护机制。DOX 是胃癌常用的化疗药物,已有文献<sup>[11]</sup>报道一些胃癌细胞株产

生耐药。本研究发现,分化程度低的胃癌细胞株 BGC-823 细胞对 DOX 诱导的凋亡作用相对不敏感,IC<sub>50</sub>高达 48  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。低分化人胃癌细胞 BGC-823 细胞一定基础水平的自噬发生,利用低剂量的 DOX (5 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )可上调胃癌细胞内自噬标志性蛋白 LC3-II 表达水平,并呈剂量和时间依赖关系;DOX 亦可促进胃癌细胞产生自噬小泡。由此可见,DOX 具有诱导胃癌细胞发生自噬的作用。

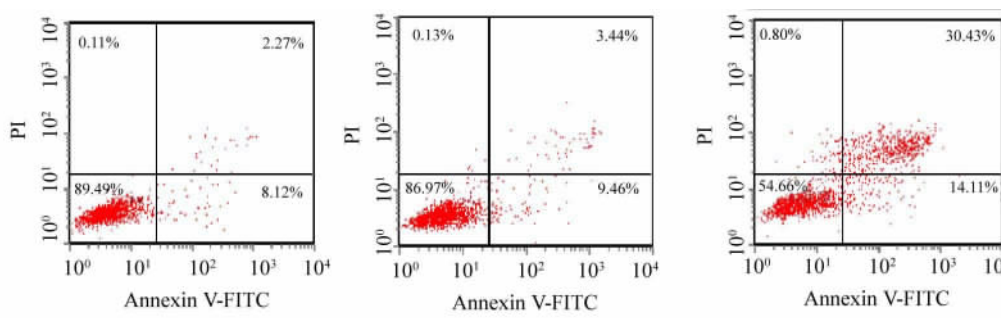


图 5 *HMGB1* 基因沉默促进 DOX 诱导的细胞凋亡

Fig. 5 Apoptosis induced by DOX was promoted by *HMGB1* gene knockdown in BGC-823 cells

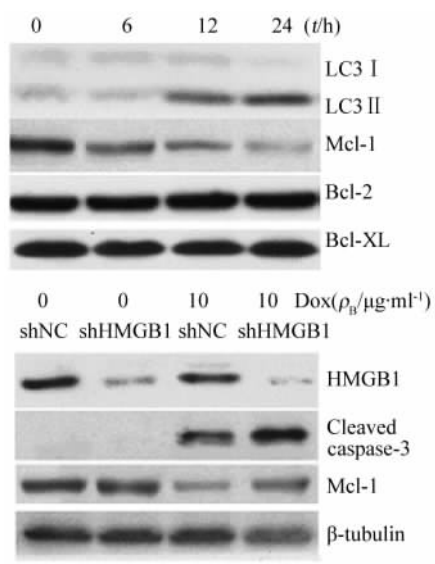


图 6 *HMGB1* 基因沉默对 DOX 诱导凋亡相关蛋白水平的影响

Fig. 6 Effects of *HMGB1* knockdown on the expression of the apoptosis related proteins induced by DOX

*HMGB1* 是一种广泛存在于哺乳动物细胞内的核蛋白,在多种肿瘤组织及细胞中高表达,并参与调控肿瘤细胞自噬和凋亡过程<sup>[4, 12-13]</sup>。本研究发现,低分化的人胃癌细胞 BGC-823 高表达 *HMGB1*,

*HMGB1* 不仅分布于其细胞核,细胞质中也有高水平分布(资料未列出)。*HMGB1* 基因的敲除可显著抑制 DOX 诱导自噬标志 LC3 II 的表达及自噬小体的形成,提示 DOX 诱导胃癌细胞发生自噬有赖于胞内 *HMGB1* 的表达。在自噬发生时,胞质型 LC3 (即 LC3 I)经半胱氨酸蛋白酶 ATG4 酶解去除 C 端的精氨酸,使得 E1 泛素活化,胞质型 LC3 转变为膜型(即 LC3 II),参与组成自噬小体<sup>[14]</sup>。*HMGB1* 表达下调时,膜型 LC3 及自噬小体形成均减少,由此推测,*HMGB1* 参与自噬小体形成过程。

更有意义的发现是,*HMGB1* 基因敲除的胃癌细胞经 DOX 诱导发生凋亡的细胞比例明显升高,凋亡信号通路中 caspase-3 酶原的裂解增加,DOX 的半数抑制浓度降低。这一结果表明,胃癌细胞胞内高水平 *HMGB1* 有助于保护胃癌细胞抵抗 DOX 诱导的凋亡。已有文献<sup>[15]</sup>报道,自噬与凋亡可通过细胞内在的分子机制相互调控。目前已知,抗凋亡因子 Bcl-2、Bcl-XL 可与自噬因子 Beclin1 的 BH3 结构域相结合,发挥抑制自噬的作用<sup>[16]</sup>。Tang 等<sup>[17]</sup>研究发现,细胞质内的 *HMGB1* 主要是通过自噬因子 Beclin1 结合,使得 Beclin1 与凋亡抑制因子 Bcl-2 分离而激活自噬。Zhan 等<sup>[18]</sup>报道了化疗药物长春新碱可促使胃癌细胞释放 *HMGB1*,外源性 *HMGB1* 蛋白可上调 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达,抑

制 HMGB1 的表达和释放可显著下调外源性 HMGB1 诱导的保护性自噬, 促进胃癌细胞发生凋亡。据此, 进一步分析 *HMGB1* 基因敲减后对 DOX 诱导自噬和凋亡相关蛋白表达的影响, 结果发现 DOX 诱导胃癌细胞发生自噬过程中, 抗凋亡蛋白 Mcl-1 水平并非上调, 而表现为降解增加; *HMGB1* 基因敲减可抑制 Mcl-1 的降解, 但对 Bcl-2 及 Bcl-XL 表达水平没有明显影响。长期以来, Mcl-1 的降解被认为有助于细胞发生线粒体途径的凋亡。新近, 在营养缺乏诱导发生自噬的神经元细胞及索拉非尼诱导发生自噬的肝癌细胞中均检测到 Mcl-1 的降解; 免疫共沉淀的结果提示, Mcl-1 能够与 Beclin-1 结合<sup>[19-20]</sup>。因此推测, DOX 诱导自噬的过程中, 胞质中 HMGB1 可与 Beclin-1 结合, 导致 Beclin-1 与 Mcl-1 分离, 游离 Mcl-1 通过泛素化或其他途径发生降解; HMGB1 表达水平下降时, Beclin-1 与 Mcl-1 结合增加, 抑制 Mcl-1 的降解。

总之, 本研究结果表明, DOX 处理的胃癌细胞对凋亡不敏感的可能原因之一是其诱导细胞发生自噬, BGC-823 细胞内高水平的 HMGB1 参与自噬的诱导过程, 抑制 HMGB1 的表达可增强胃癌细胞对 DOX 的敏感性。DOX 是临床常用的化疗药物, 由于该药能引起心脏毒性而限制了其临床应用。本研究提示, 在临床上治疗低分化类型的胃癌时, 联合应用 HMGB1 的抑制剂和化疗药物有助于克服胃癌细胞的药物耐受, 达到相对理想的化疗效果。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, et al. Masquerader: High mobility group box-1 and cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 ( 10 ): 2836-2848.
- [ 2 ] Tang D, Kang R, Cheh CW, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells [ J ]. *Oncogene*, 2010, 29( 38 ): 5299-5310.
- [ 3 ] Chen S, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806( 2 ): 220-229.
- [ 4 ] Liu L, Yang M, Kang R, et al. HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells [ J ]. *Leukemia*, 2011, 25( 1 ): 23-31.
- [ 5 ] Huang J, Ni J, Liu K, et al. HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma [ J ]. *Cancer Res*, 2012, 72( 1 ): 230-238.
- [ 6 ] 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, 7: 38.
- [ 7 ] Bao G, Qiao Q, Zhao H, et al. Prognostic value of HMGB1 over-expression in resectable gastric adenocarcinomas [ J ]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8( 1 ): 52.
- [ 8 ] 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*, 2012, 30 ( 1 ): 11-17.
- [ 9 ] Mathew R, White E. Why sick cells produce tumors: The protective role of autophagy [ J ]. *Autophagy*, 2007, 3( 5 ): 502-505.
- [ 10 ] Han W, Pan H, Chen Y, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2011, 6( 6 ): e18691.
- [ 11 ] Yu HG, Ai YW, Yu LL, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death [ J ]. *Int J Cancer*, 2008, 122( 2 ): 433-443.
- [ 12 ] Livesey KM, Kang R, Vernon P, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis [ J ]. *Cancer Res*, 2012, 72( 8 ): 1996-2005.
- [ 13 ] Huang J, Liu K, Yu Y, et al. Targeting HMGB1-mediated autophagy as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma [ J ]. *Autophagy*, 2012, 8( 2 ): 275-277.
- [ 14 ] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [ J ]. *Embo J*, 2000, 19( 21 ): 5720-5728.
- [ 15 ] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis [ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8( 9 ): 741-752.
- [ 16 ] Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1 [ J ]. *Oncogene*, 2010, 29( 12 ): 1717-1719.
- [ 17 ] Tang D, Kang R, Livesey KM, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy [ J ]. *J Cell Biol*, 2010, 190( 5 ): 881-892.
- [ 18 ] Zhan Z, Li Q, Wu P, et al. Autophagy-mediated HMGB1 release antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1 [ J ]. *Autophagy*, 2012, 8 ( 1 ): 109-121.
- [ 19 ] Tai WT, Shiao CW, Chen HL, et al. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells [ J ]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e485.
- [ 20 ] Germain M, Nguyen AP, Le Grand JN, et al. MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner [ J ]. *Embo J*, 2011, 30( 2 ): 395-407.

[ 收稿日期 ] 2014 - 08 - 12

[ 修回日期 ] 2014 - 10 - 23

[ 本文编辑 ] 黄静怡