

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.009

siRNA 干扰 *HMGB1* 表达对膀胱癌 T24 株细胞恶性生物学行为的影响及其可能的机制

印胡滨^{a,b}, 何卫阳^a, 苟欣^a, 谷文^a, 刘言^a (重庆医科大学附属第一医院 a. 泌尿外科; b. 重庆市分子肿瘤及表观遗传学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] **目的:** 探讨高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 对膀胱癌 T24 株细胞的增殖、凋亡及恶性生物学行为的影响及其潜在作用机制。**方法:** 收集 2014 年 12 月至 2016 年 1 月期间重庆医科大学附属第一医院泌尿外科病区手术切除的 20 例膀胱癌以及相应癌旁组织, 免疫组化方法检测膀胱癌和癌旁组织 HMGB1 表达差异; 应用 RNAi 处理 T24 细胞并分为空白对照组 (Blank)、阴性对照组 (NC) 和干扰组 (siHMGB1); CCK-8、流式细胞术、划痕实验和 Transwell 侵袭实验分别检测 *HMGB1* 敲低后对 T24 细胞增殖、凋亡、周期、迁移以及侵袭能力的影响; Western blotting 检测不同膀胱癌细胞株 BIU-87 和 T24 细胞的 HMGB1 表达水平以及敲低 *HMGB1* 对 T24 细胞恶性生物学行为相关蛋白的影响。**结果:** 与癌旁组织相比, HMGB1 在膀胱癌组织处于高表达状态 [(67.33 ± 4.91) vs (12.00 ± 3.79), $P < 0.05$]。与 NC 组和 Blank 组相比, siHMGB1 组细胞增殖受抑制 ($P < 0.05$); 流式细胞术提示敲低 *HMGB1* 后细胞凋亡率增加, 细胞周期阻滞在 G0/G1 期; 划痕实验及 Transwell 侵袭实验显示, 敲低 *HMGB1* 后细胞迁移 ($P < 0.05$) 以及侵袭 [穿膜细胞数: (16.33 ± 1.45) vs (35.00 ± 1.53), (34.00 ± 2.08) 个, 均 $P < 0.05$] 能力减弱; Western blotting 结果显示敲低后 E-钙黏着蛋白表达上调 ($P < 0.05$), N-钙黏着蛋白、波形蛋白、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、细胞周期蛋白 D1、c-Myc、 β -联蛋白表达下调 (均 $P < 0.05$)。**结论:** HMGB1 可通过促进膀胱癌细胞 EMT 进而增强其恶性生物学行为, 其机制可能是通过 β -联蛋白信号通路介导。

[关键词] 高迁移率族蛋白 1; 膀胱癌细胞; 上皮间质转化; β -联蛋白

[中图分类号] R737.14; R730.23

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)03-0264-07

Effects of siRNA interfering expression of *HMGB1* on malignant biological behaviors of bladder cancer T24 line cell and its possible mechanism

YIN Hubin^{a,b}, HE Weiyang^a, GOU Xin^a, GU Wen^a, LIU Yan^a (a. Department of Urinary Surgery; b. Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the 1st Hospital affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of high-mobility group box 1 (HMGB1) on proliferation, apoptosis and malignant biological behaviors of bladder cancer T24 cell line as well as its potential mechanism. **Methods:** Twenty cases of surgically resected bladder cancer and corresponding adjacent normal tissues from the patients who were hospitalized in Department of Urinary Surgery, the 1st Hospital affiliated to Chongqing Medical University during December 2014 to January 2016 were collected. The T24 cells were treated by RNAi technique and divided into blank control group, negative control (NC) group and interfere (siHMGB1) group. Differences of HMGB1 expression between bladder cancer and adjacent normal tissues were detected by immuno chemistry assay. CCK-8 assay, flow cytometry assay, scratch test and Transwell invasion test were used to examine effect of knocking down HMGB1 on abilities of proliferation, apoptosis, cell cycle, migration and invasion of the T24 cells respectively. Western blotting assay was used to detect expression levels of HMGB1 in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81372758)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372758)

[作者简介] 印胡滨 (1990 -), 男, 硕士生, 主要从事泌尿系统肿瘤基础与临床研究, E-mail: 470808343@qq.com

[通信作者] 何卫阳 (HE Weiyang, corresponding author), 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事泌尿系肿瘤信号通路以及膀胱肿瘤耐药机制的研究, E-mail: weiyang361@aliyun.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.r.20170305.1502.008.html>

BIU-87 and T24 cells and effect of knocking down HMGB1 on expression of malignant biological behavior related proteins in the T24 cells. **Results:** Expression of HMGB1 in the bladder cancer tissues was obviously higher than that in the adjacent normal tissues ($[67.33 \pm 4.91]$ vs $[12.00 \pm 3.79]$, $P < 0.05$). Comparing with the negative control and blank control groups, proliferation of the T24 cells was inhibited in the siHMGB1 group ($P < 0.05$). Results of flow cytometry assay suggested that apoptosis rate of the T24 cells increased and its cell cycle arrested in phase of G0/G1 after knocking down HMGB1; results of scratch and Transwell invasion tests showed that after knock-down of HMGB1, abilities of migration ($P < 0.05$) and invasion ($[16.33 \pm 1.45]$ vs $[35.00 \pm 1.53]$, $[34.00 \pm 2.08]$, $P < 0.05$) of the T24 cells decreased. Results of Western blotting assay showed that after the knock-down, expression of E-cadherin protein was up-regulated, expressions of N-cadherin, vimentin, matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, cyclinD1, c-Myc and β -catenin proteins were down-regulated (all $P < 0.05$). **Conclusion:** HMGB1 could promote epithelial-mesenchymal transition (EMT) of the bladder cancer cells and then enhance their malignant biological behaviors. The mechanism might be mediated by β -catenin signaling pathway.

[**Key words**] high-mobility group box 1 (HMGB1); bladder cancer cell; epithelial-mesenchymal transition (EMT); β -catenin

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(3): 264-270. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.009]

膀胱癌是泌尿系统第二常见的恶性肿瘤,且在所有恶性肿瘤中发病率高居第四^[1]。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一个高度保守的非组蛋白染色质结合蛋白,多位于胞核,维持核内稳态、调节基因转录和 DNA 损伤修复^[2]。HMGB1 在多种肿瘤中高表达,且与肿瘤的临床病理分期分级和预后密切相关^[3,4]。分泌到胞外的 HMGB1 可介导 NF- κ B、晚期糖基化终末产物受体 (receptor of advanced glycation end products, RAGE)、TLR4 和炎症体通路来维持炎症微环境,从而促进肿瘤生长、浸润转移^[5,6]。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 指细胞失去上皮细胞特性与极性的同时获得间皮细胞特性和运动能力,细胞彼此间连接减弱分散并向周围组织迁移侵袭^[7],从而促进肿瘤的发展和转移,也是肿瘤难以攻克的关键因素之一。因此,本研究首先观察膀胱癌及其配对的癌旁组织中 HMGB1 的表达差异,然后运用 RNAi 技术干扰内源性 HMGB1 的表达,探究干扰 HMGB1 对膀胱癌 T24 细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭能力以及对 EMT 相关蛋白表达的影响,并初步探讨其潜在机制,旨在为膀胱癌靶向治疗提供新的实验基础。

1 资料和方法

1.1 细胞株、临床标本和主要试剂

人膀胱癌细胞株 BIU-87 和 T24 由重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤与表观遗传学实验室保存。20 例膀胱癌以及癌旁组织于 2014 年 12 月至 2016 年 1 月取自重庆医科大学附属第一医院泌尿

外科病区。RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司;青霉素/链霉素/胰蛋白酶、羊抗兔/鼠辣根过氧化物酶 IgG 均购于上海碧云天生物技术有限公司购自碧云天公司;抗体 HMGB1 购自 Abcam 公司;抗体: E-钙黏着蛋白、N-钙黏着蛋白、波形蛋白、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、Myc、周期蛋白 D1 和 β -联蛋白均购自 CST 公司;抗体 β -actin 购自南京钟鼎生物技术有限公司;Transwell 小室 (8 μ m) 和 ECL 显影液购自 Millipore 公司;Matrigel 胶购自 BD 公司;免疫组化试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CCK-8 购自上海七海复泰生物科技有限公司;HMGB1 siRNA 和 siRNA 阴性对照购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;LipofectamineTM 2000 购于 Invitrogen 公司。

1.2 免疫组织化学染色

具体操作按 S-P 试剂盒说明书操作。石蜡切片脱蜡水化,枸橼酸缓冲液 (pH = 6.0) 抗原修复 30 min, 3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶 15 min, 山羊血清封闭 15 min, HMGB1 一抗 (1:250) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 二抗孵育 15 min, DAB 显色, 苏木素复染, 再次脱水, 最后中性树胶封片, 晾干。染色结果判定参照参考文献 [8] 中提及的标准。

1.3 膀胱癌细胞培养及 Western blotting 检测其 HMGB1 的表达水平

T24 和 BIU-87 细胞培养条件为 10% FBS、1% 青/链霉素的 RPMI 1640 培养基, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内。细胞密度长至 80% ~ 90% 时, 按 1:2 或 1:3 的比例传代。

取对数生长期的 T24 和 BIU-87 细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 加入上样缓冲液煮沸 10 min。按 40 μg /孔上样, 经过 SDS-PAGE (100 V)、转膜 (250 mA)、5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入 HMGB1 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜、TBST 洗涤 3 次 (5 min/次)、辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h、TBST 洗涤 3 次 (5 min/次) 之后, 采用 ECL 化学发光法显影。采用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.4 细胞转染与分组

将 T24 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞密度达到 50% ~ 60%, 根据 LipofectamineTM 2000 试剂盒说明书用无血清培养基完成转染。分组如下: 空白对照组 (Blank 组, 仅加转染试剂未转染 siRNA 的细胞)、阴性对照组 (NC 组, 转染无关序列 siRNA) 和干扰组 (siHMGB1 组), 转染 6 h 后换含血清培养基, 继续培养 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.5 CCK-8 法检测干扰 HMGB1 表达对 T24 细胞增殖的影响

取未转染和转染后 T24 接种于 96 孔板中, 约 5 000 个/孔, 待培养 12、24、48 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μl /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后使用酶标仪检测 450 nm 处的光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖水平。

1.6 流式细胞术检测干扰 HMGB1 表达对 T24 细胞凋亡和周期的影响

转染 48 h 后收集各组细胞, PBS 缓冲液洗涤, 0.25% 胰蛋白酶消化, 1 000 rpm 离心 5 min, 制备成单细胞悬液, PBS 洗涤, 用 Annexin V-PI 双染色后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率; 用预冷的 75% 乙醇在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定 24 h 以上, PBS 缓冲液洗涤 1 次, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.7 划痕实验检测干扰 HMGB1 表达对 T24 细胞迁移能力的影响

在 6 孔板底部划 3 条横线, 取对数生长期的 T24 接种于 6 孔板上, 待 50% ~ 60% 细胞密度时完成转染操作。待转染后细胞和未转染细胞长至 90% 左右时, 用 100 μl 枪头划与底部横线垂直的划痕带, PBS 洗涤, 显微镜下观察并拍下 0 h 的图片, 培养 48 h 后再次观察并拍照。

1.8 Transwell 实验检测干扰 HMGB1 表达对 T24 细胞侵袭能力的影响

操作步骤参考文献 [21] 的方法, 具体如下: 基质胶解冻, 用无血清的 RPMI 1640 培养基按 1:3 比例稀释, 取 50 μl 胶包被小室基底膜, 后放入 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 使其凝固。收集 3 组细胞, 将细胞数稀释至 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 取 200 μl 加入上室, 下室加入

800 μl 含血清的 1640 全培养基, 常规培养 48 h 后, 取出小室, 棉签拭去基质胶和细胞, 福尔马林固定, 结晶紫染色, 显微镜下随机选取 5 ~ 8 个视野拍照计数, 取平均值。

1.9 Western blotting 检测转染 siRNA 对 T24 细胞中相关蛋白表达的影响

T24 细胞转染 48 h 后收集各组细胞, 常规方法提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度后行 Western blotting 检测 (具体方法同 1.3) HMGB1、EMT 相关蛋白 (E-钙黏着蛋白、N-钙黏着蛋白、波形蛋白)、细胞周期调节蛋白 (周期蛋白 D1)、基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 和 Wnt 通路下游蛋白 β -联蛋白的表达水平。

1.10 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较运用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGB1 蛋白在膀胱癌组织中呈高表达

免疫组化结果表明 (图 1), 在 20 对膀胱癌和配对的癌旁组织中, HMGB1 在癌组织高表达而在癌旁组织中表达水平较低, 癌组织中表达密度明显高于癌旁组织 [(67.33 \pm 4.91) vs (12.00 \pm 3.79), $P < 0.01$]。

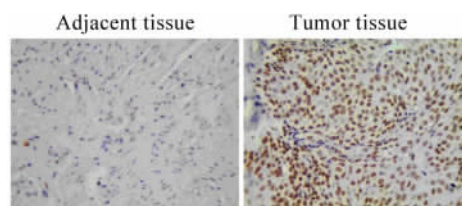


图 1 HMGB1 在膀胱癌和癌旁组织中的表达情况 (S-P 法, $\times 400$)
Fig.1 Expressions of HMGB1 protein in the bladder carcinoma tissues and the adjacent non-tumor tissues (S-P, $\times 400$)

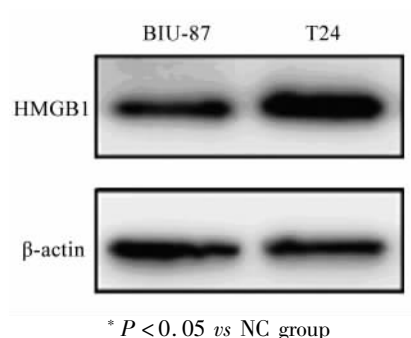
2.2 HMGB1 在膀胱癌细胞株 BIU-87、T24 中的表达情况

Western blotting 结果显示 (图 2), 在 2 种膀胱癌细胞株 BIU-87 和 T24 中均存在 HMGB1 蛋白的表达 [(1.07 \pm 0.03) vs (1.70 \pm 0.05), $P < 0.01$], 且 T24 细胞表达水平更高, 故选择 T24 作为后续实验的细胞株。

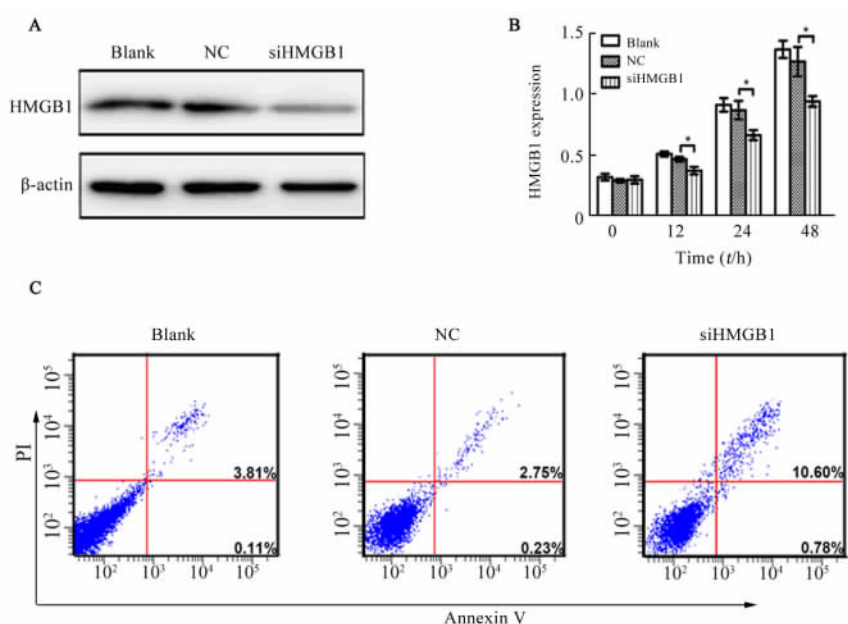
2.3 敲低 HMGB1 表达抑制 T24 细胞增殖并促进细

胞凋亡

利用 siHMGB1 转染 T24 细胞 48 h 后通过 Western blotting 试验检测其干扰效果。如图 3A 所示, 干扰组 HMGB1 表达明显低于空白对照组和阴性对照组 [(0.42 ± 0.06) vs (0.94 ± 0.03)、(1.01 ± 0.06), 均 $P < 0.01$]。CCK-8 检测结果显示 (图 3B), 与 Blank 组和 NC 组相比, 干扰组 T24 细胞增殖能力在 24 和 48 h 处明显受抑制 (均 $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示 (图 3C), 干扰组细胞凋亡率较 Blank 组和 NC 组增加 [(14.04 ± 1.49)% vs (4.63 ± 0.38)%、(4.02 ± 0.52)%, 均 $P < 0.01$], 而后两者无显著差异 ($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs NC group
图 2 HMGB1 在 BIU-87、T24 中的表达情况
Fig.2 Expressions of HMGB1 protein in the BIU-87 and T24 cells



* $P < 0.05$ vs NC group
 A: HMGB1 siRNA inhibited expression of HMGB1 in T24 cells
 B: Knockdown of HMGB1 expression inhibited proliferation of T24 cells
 C: Knockdown of HMGB1 expression promoted apoptosis of T24 cells

图 3 敲低 HMGB1 后对 T24 细胞增殖以及凋亡的影响

Fig.3 Impact of knockdown of HMGB1 expression on proliferation and apoptosis of T24 cells

2.4 敲低 HMGB1 表达阻滞 T24 细胞周期于 G1 期

流式细胞术结果 (图 4) 显示, 敲低 HMGB1 组处于 G0/G1 期的细胞比例较 Blank 组和 NC 组明显增加 [(63.01 ± 0.98)% vs (51.00 ± 0.31)%、(50.92 ± 1.10)%, 均 $P < 0.01$], 而后两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.5 敲低 HMGB1 表达抑制 T24 细胞的迁移和侵袭能力

划痕实验结果显示 (图 5A), 与 Blank 组和 NC 组相比较, 干扰组细胞体外迁移能力明显减弱 ($P >$

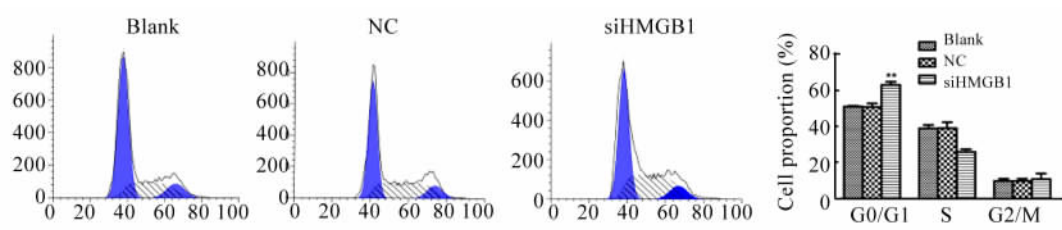
0.05), 而 Blank 组和 NC 组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。Transwell 体外侵袭实验结果显示 (图 5B), 与 Blank 组和 NC 组相比较, 干扰组每视野下穿透的细胞数量减少 [(16.33 ± 1.453) vs (35.00 ± 1.53)、(34.00 ± 2.08) 个, 均 $P < 0.01$], 而 Blank 组和 NC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 敲低 HMGB1 对 EMT 相关蛋白以及 β -联蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示 (图 3), 与 NC 组相比, HMGB1 干扰组的 EMT 相关蛋白 E-钙黏着蛋

白表达增加, N-钙黏着蛋白和波形蛋白表达降低; 基质金属蛋白酶家族的 MMP-2、MMP-9 蛋白表达下降; 细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达下降; 细胞增殖相

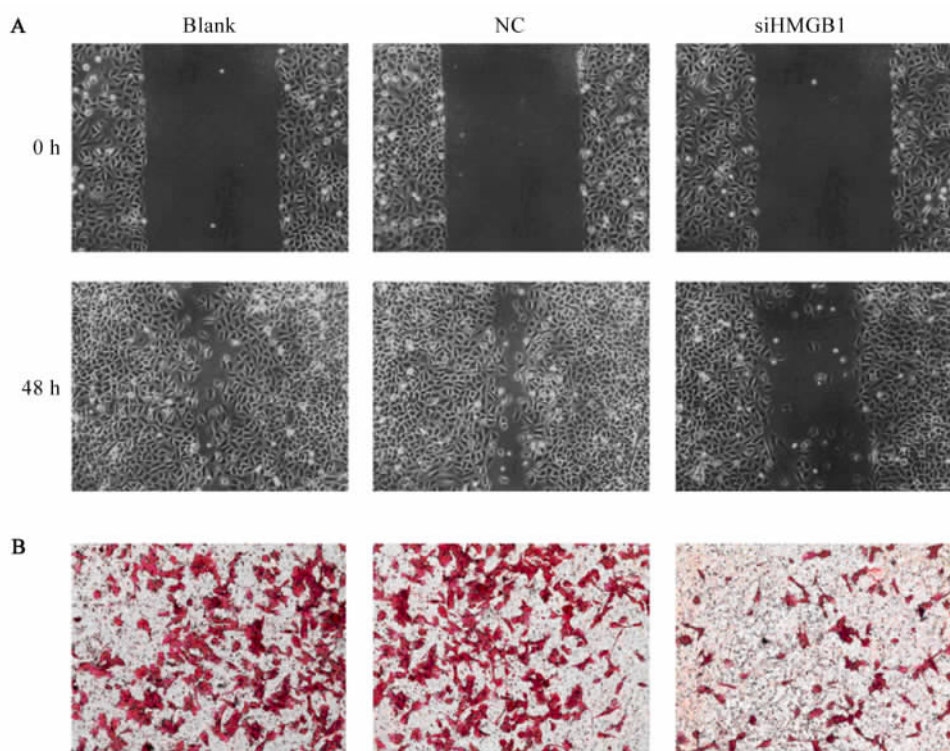
关蛋白 c-Myc 表达下调; Wnt 通路下游蛋白 β -联蛋白表达下调。



* $P < 0.05$ vs NC group or Blank group

图 4 敲低 HMGB1 表达对 T24 细胞周期的影响

Fig. 4 Impact of knockdown of HMGB1 expression on cell cycle of T24 cells



A: Inhibition effects of knockdown of HMGB1 expression on migration of T24 cells($\times 100$)

B: Inhibition effects of knockdown of HMGB1 expression on invasion of T24 cells($\times 100$)

图 5 敲低 HMGB1 降低 T24 迁移和侵袭能力($\times 100$)

Fig. 5 Inhibition effects of knockdown of HMGB1 expression on migration and invasion abilities of T24 cells($\times 100$)

3 讨论

作为高度保守的核蛋白、转录调控因子和细胞外损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP), HMGB1 参与了多种疾病发生发展如各种炎症性疾病、糖尿病、神经退行性病变和肿

瘤^[9], 在多种恶性肿瘤如膀胱癌^[8]、肝细胞肝癌^[10]和结肠癌^[11]中也发现了 HMGB1 过表达。这可能是因为实体肿瘤内部炎症微环境、低氧和肿瘤细胞本身刺激 HMGB1 分泌, 胞外的 HMGB1 又通过各种炎症信号通路诱导促炎症因子的释放, 形成一个正反馈环路^[11]。Huang 等^[8]发现, 与癌旁组织相比,

膀胱癌组织中 HMGB1 处于过表达状态,3 种不同的膀胱癌细胞株 5637、BIU-87 和 T24 其 HMGB1 在转录和翻译水平也显著高于正常人膀胱上皮细胞 SV-HUC-1。本研究也证实,在膀胱癌组织中 HMGB1 表达水平显著高于其癌旁组织,且 BIU-87 和 T24 也有较高水平的 HMGB1 表达。

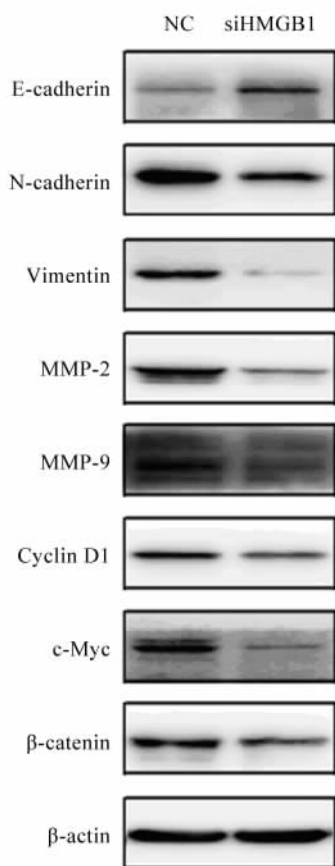


图 6 Western blotting 检测沉默 HMGB1 对 E-钙黏着蛋白、N-钙黏着蛋白、波形蛋白、MMP-2、MMP-9、周期蛋白 D1、c-Myc 和 β -联蛋白等蛋白的影响

Fig. 6 Effect of silencing HMGB1 on expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2, MMP-9, Cyclin D1, c-Myc and β -catenin proteins determined by Western blotting assay

HMGB1 在调控肿瘤细胞增殖、周期、凋亡、血管形成、侵袭转移、自噬和化疗耐药等方面也发挥着重要作用^[12-13]。Feng 等^[14]运用微阵列分析发现 HMGB1 表达与非小细胞肺癌的 TNM 分期密切相关,生存分析结果显示,肺腺癌患者 HMGB1 高表达组总生存数更低,无病时间更短。有报道称,高表达的 HMGB1 也与某些恶性肿瘤的淋巴结转移相关^[15]。Chen 等^[10]发现 HMGB1 与其受体 RAGE 作用并通过 NF- κ B 途径从而促进肝癌细胞增殖、迁移

和侵袭,利用 RNAi 或者抗体中和干扰 HMGB1 和 RAGE 表达后可抑制此过程。运用慢病毒介导的 RNA 干扰技术沉默 HMGB1 后可显著抑制卵巢癌细胞的增殖并导致细胞周期阻滞在 G0/G1 期,周期相关蛋白周期蛋白 D1 和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达也降低,与此同时凋亡率增加,侵袭转移能力降低,表现为 Bax 表达增加, Bcl-2、MMPs 表达降低^[16]。Wang 等^[17]发现 HMGB1 可作为 CpG 寡核苷酸重要的协同效应分子通过 MyD88 依赖的 RAGE 和 TLR4 途径增强人肺癌细胞的生长和侵袭能力,表现为 MMP-2、MMP-9 和 CDK2 表达上调。Meng 等^[18]利用 RNAi 敲低 HMGB1 后发现,骨肉瘤 MG-63 细胞较正常组和阴性对照组,其细胞增殖力、侵袭力减弱,而 G0/G1 期阻滞、凋亡增加。与上述研究结果相似,本研究发现干扰 HMGB1 后能明显抑制膀胱癌细胞 T24 的增殖速度,增加细胞凋亡率,使细胞阻滞在 G0/G1 期并导致 T24 迁移和侵袭能力明显减弱。在蛋白水平上发现,敲低 HMGB1 后基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9), c-Myc 以及周期蛋白 D1 都显著下调,提示 HMGB1 通过调控多种下游靶蛋白从而在众多肿瘤细胞的发生发展过程中发挥重要作用。重组人 HMGB1 促进结肠癌细胞株 HCT116 和 LoVo 上皮间质转化的同时也提高癌细胞的体外迁移能力,利用 siRNA 干扰 HMGB1、RAGE、Snail 蛋白表达以及利用 BAY 11-7082 抑制 NF- κ B 表达后可逆转 HMGB1 诱导的 EMT 和细胞迁移,提示 HMGB1 通过 RAGE/Snail/NF- κ B 通路参与结肠癌细胞的上皮间质转化^[19]。此外,Chen 等^[20]也证实了 HMGB1 可通过 RAGE/Akt/GSK-3 β / β -联蛋白通路直接诱导人呼吸道上皮细胞发生 EMT。结合本研究发现,干扰 HMGB1 后显著降低 N-钙黏着蛋白和波形蛋白表达,增加 E-钙黏着蛋白表达,同时抑制 β -联蛋白表达,这表明 HMGB1 除了可通过经典的 RAGE、TLR 和 NF- κ B 通路产生效应外,还可能通过不同的信号途径(如 β -联蛋白)直接或间接作用于多种效应器调控下游靶蛋白从而发挥调节肿瘤形成、发生发展和侵袭转移的作用。本研究结果与大多数其他实体肿瘤的研究结论基本一致。

综上所述,本研究初步探讨了 HMGB1 在膀胱癌组织和细胞株中处于过表达状态,通过 siRNA 敲低 HMGB1 后发现其对 T24 细胞增殖、凋亡、周期、迁移侵袭能力有影响,证实 HMGB1 与膀胱癌细胞的恶性生物学行为紧密相连。与此同时,本研究首次揭示 HMGB1 可能通过调控 β -catenin 信号通路而

影响膀胱癌细胞 T24 的 EMT 的进展, 为治疗膀胱癌的侵袭转移提供新的思路和靶点。

[参 考 文 献]

- [1] MALATS N, REAL F X. Epidemiology of bladder cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2015, 29(2): 177-189, vii. DOI:10.1016/j.hoc.2014.10.001.
- [2] KANG R, ZHANG Q, ZEH H J, et al. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(15): 4046-4057. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0495.
- [3] YANG G L, ZHANG L H, BO J J, et al. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer [J]. J Surg Oncol, 2012, 106(1): 57-61. DOI: 10.1002/jso.23040.
- [4] SHI Z, HUANG Q, CHEN J, et al. Correlation of HMGB1 expression to progression and poor prognosis of adenocarcinoma and squamous cell/adenosquamous carcinoma of gallbladder[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 2015-2025.
- [5] JUBE S, RIVERA Z S, BIANCHI M E, et al. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3290-3301. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3481.
- [6] GEBHARDT C, RIEHL A, DURCHDEWALD M, et al. RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development [J]. J Exp Med, 2008, 205(2): 275-285. DOI: 10.1084/jem.20070679.
- [7] KABASHIMA A, HIGUCHI H, TAKAISHI H, et al. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion[J]. Int J Cancer, 2009, 124(12): 2771-2779. DOI: 10.1002/ijc.24349.
- [8] HUANG Z, ZHONG Z, ZHANG L, et al. Down-regulation of HMGB1 expression by shRNA constructs inhibits the bioactivity of urothelial carcinoma cell lines via the NF- κ B pathway[J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 12807[2016-11-10]. <http://www.nature.com/articles/srep12807>. DOI: 10.1038/srep12807.
- [9] SIMS G P, ROWE D C, RIETDIJK S T, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 367-388. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603.
- [10] CHEN R C, YI P P, ZHOU R R, et al. The role of HMGB1-RAGE axis in migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 390(1/2): 271-280. DOI: 10.1007/s11010-014-1978-6.
- [11] LIU W, ZHANG Z, ZHANG Y, et al. HMGB1-mediated autophagy modulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin via MEK/ERK signaling pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(4): 511-517. DOI: 10.1080/15384047.2015.1017691.
- [12] TANG D, KANG R, ZEH H J, et al. High-mobility group box 1 and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(1/2): 131-140. DOI: 10.1016/j.bbagr.2009.11.014.
- [13] PAN B, CHEN D, HUANG J, et al. HMGB1-mediated autophagy promotes docetaxel resistance in human lung adenocarcinoma[J/OL]. Mol Cancer, 2014, 13: 165[2016-11-10]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-165>. DOI: 10.1186/1476-4598-13-165.
- [14] FENG A, TU Z, YIN B. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20507-20519. DOI: 10.18632/oncotarget.7050.
- [15] XU Y F, GE F J, HAN B, et al. High-mobility group box 1 expression and lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(11): 3256-3265. DOI: 10.3748/wjg.v21.i11.3256.
- [16] CHEN J, LIU X, ZHANG J, et al. Targeting HMGB1 inhibits ovarian cancer growth and metastasis by lentivirus-mediated RNA interference[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(11): 3629-3638. DOI: 10.1002/jcp.24069.
- [17] WANG C, FEI G, LIU Z, et al. HMGB1 was a pivotal synergistic effector for CpG oligonucleotide to enhance the progression of human lung cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(9): 727-736. DOI: 10.4161/cbt.20555.
- [18] MENG Q, ZHAO J, LIU H, et al. HMGB1 promotes cellular proliferation and invasion, suppresses cellular apoptosis in osteosarcoma[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12265-12274. DOI: 10.1007/s13227-014-2535-3.
- [19] ZHU L, LI X, CHEN Y, et al. High-mobility group box 1: a novel inducer of the epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2015, 357(2): 527-534. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.12.012.
- [20] CHEN Y C, STATT S, WU R, et al. High mobility group box 1-induced epithelial mesenchymal transition in human airway epithelial cells[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 18815[2016-11-10]. [http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(14\)00755-1/abstract](http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(14)00755-1/abstract). DOI: 10.1038/srep18815.
- [21] 伍鑫, 程勇, 庞云. AGEs 对结肠癌 SW620 细胞上皮间质转化及肿瘤干细胞标志物的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(3): 361-365. DOI: 10.3872/j.issn.007-385X.2016.03.005.

[收稿日期] 2016 - 12 - 12 [修回日期] 2017 - 02 - 10

[本文编辑] 黄静怡

热烈庆祝《中国肿瘤生物治疗杂志》改为月刊