

HMGB1 siRNA 对 HT-29 细胞侵袭转移能力的影响

刘彦华¹ 雷 宁^{2△} 韩 威¹ 曾庆乐² 刘俊达²

(1 成都医学院医学检验系 四川 成都 610083 2 成都理工大学 材料与化学化工学院 化工与制药系 四川 成都 610059)

摘要 目的：观察干扰 HMGB1 表达对 HT-29 细胞侵袭转移能力的影响。方法：HMGB1 siRNA 通过脂质体转染 HT-29 细胞，western blot 和实时定量 RT-PCR 检测 HT-29 细胞中 HMGB1 蛋白和 mRNA 的表达，Transwell 小室观察 HT-29 的转移侵袭能力。结果：干扰 HMGB1 后 HMGB1 蛋白和 mRNA 的表达均减少，HT-29 的转移侵袭能力下降。结论：HMGB1 能促进 HT-29 的转移侵袭能力，干扰其表达可抑制 HT-29 的转移侵袭。

关键词 HMGB1；HT-29；侵袭力

中图分类号 R730.231 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 11-2110-03

Effects of High Mobility Group Box-B1 on Invasive Ability of HT-29

LIU Yan-hua¹, LEI Ning^{2△}, HAN Wei¹, ZENG Qing-le², LIU Jun-da²

(1 Faculty of Laboratorial Examination, Chengdu Medical College Chengdu 610083;

2 Department of Chemical & Pharmaceutical Engineering, College of Material and Chemistry & Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059)

ABSTRACT Objective: To study the effect of HMGB1 on invasive ability of HT-29. **Methods:** HT-29 cells were divide into blank group, control group and HMGB1 siRNA groups. The effects of HMGB1 siRNA on HT-29 cells invasive ability in vitro was measured by Boyden chamber invasive models. Contents of HMGB1 protein and mRNA were detected by western blot and realtime RT-PCR methods, respectively. **Result:** In HMGB1 siRNA group, contents of HMGB1 protein and mRNA were decreased markedly, the invasive ability was decreased markedly, too. **Conclusion:** HMGB1 could increase the invasive ability of HT-29 cell.

Key words: HMGB1; HT-29; Invasive ability

Chinese Library Classification(CLC): R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2110-03

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一，恶性程度高，易发生侵袭转移，预后较差。高迁移率族蛋白 B-1 (high mobility group box-B1, HMGB1) 是一种非组蛋白 DNA 结合蛋白，在正常情况下位于细胞内，参与多种生物学过程^[1]。新近研究报道 HMGB1 与纤维蛋白溶酶催化系统、基质金属蛋白酶的活化和促进黏附细胞迁移有关^[2-4]。这些与细胞侵袭、转移有关，本研究拟探讨 HMGB1 对 HT-29 细胞侵袭转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞

HT-29 细胞株购自中科院上海细胞库。

1.2 试剂

胰蛋白酶 (Gibco 公司)，DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (GIBCO 公司)。细胞培养池和 Matrigel 胶(人工基底膜)为 Becton Dickison 公司产品。逆转录试剂盒、荧光定量 Realtime PCR 试剂盒 (TakaRa 公司)，LipofentamineTM 2000 (Invitrogen 公司)，HMGB1 一抗购自 Santa 公司。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱 (Forma 公司)，低温离心机 (Eppendorf 公

作者简介：刘彦华，女，讲师，主要研究方向：分子医学检验，E-mail: liuyanhu@163.com

△通讯作者：雷宁，博士，讲师。E-mail: leining@cdut.edu.cn

电话：028-84078937

(收稿日期：2010-12-21 接受日期：2011-01-16)

司)，凝胶成像系统 (Bio-Rad)，LightCycler II 型实时荧光定量基因扩增系统 (Bio-Rad)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 HT-29 细胞在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下用含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养 24 h，然后换用不含胎牛血清的 DMEM 培养液同步化 24 h 后分为三组：空白组、对照组、HMGB1 siRNA 组。

1.4.2 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 取 5~10×10⁵ 个细胞，加入 1ml Trizol，用加样枪吹打混匀，室温静置 5~10 min，加入 0.2 ml 氯仿，摇匀，室温下静置 15min，4℃ 12000g 离心 15 min，将上层水相转移至新的离心管中，加入等体积的异丙醇，摇匀，-20℃ 静置 2h 后，4℃ 10000g 离心 10min，弃上清，75% 乙醇清洗 1 次，将 RNA 沉淀晾干，用 20 ul 无 RNA 酶去离子水溶解。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书。取 1ul cDNA 样本作为 PCR 扩增模板，阴性对照扩增模板为去离子水。扩增条件为 95℃ 预变性 2 min；随后 95℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 45s，共 40 个循环。采用 "primer premier 5.0" 软件设计引物 (表 1)，引物由上海生工合成。

1.5.4 siRNA 合成及转染 根据 HMGB1 序列和 siRNA 的设计原则，针对 HMGB1 基因设计合成干扰序列 (Sense strand siRNA: UGUUACAGAGCGGAGAGAGUU, Antisense strand siRNA: CUCUCUCCGCUCUGUAACAUI)。对照序列 (Sense strand siRNA: GAUGAUCUAAUGGC GAGAGGU, Antisense

strand siRNA: GUCUCACUCGUCUCUAU ACU) : 转染操作按照试剂盒说明书进行 0.25%胰酶消化细胞, 离心收集细胞, 用无抗生素的 DMEM 高糖培养基(含 10 %胎牛血清)重悬, 计数。6 孔板中每孔接种 2ml 细胞(密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的), 37°C 培养 24h ,使转染时细胞密度达到 70%~80 %。第 2 天吸去原培养基,每孔加入 1.5ml 无血清、无抗生素 DMEM 高糖培养基培养基。取 10 μl siRNA ,用 240 μl Opti-MEM I 稀释,轻轻混合均

匀, 取 5 μl LipofentamineTM 2000, 用 245 μl / 孔 Opti-MEM I 稀释, 轻轻混合后室温孵育 5min 后与稀释的 siRNA 轻轻混合,室温静置 20min。将 500 μl 混合液加入 6 孔板中,轻轻摇晃孔板,使混匀。 37°C 培养 6h,用荧光显微镜检测荧光。吸去培养液,加入 2ml 新鲜高糖培养基(加 10 %胎牛血清), 37°C 继续培养 18h。对照组转染 siRNA control,空白组同步培养,但不做任何处理。

表 1 引物
Tab 1 primer

Gene	Length (bp)	Upstream primer	Downstream upstream	TM ($^{\circ}\text{C}$)	Serial numobr
HMGB1	171	5' GTGATGTTGCGAAGAACTGG 3'	5' TTTCAGCCTTGACAACCTCCCT 3'	58	NM_002128.4
GAPDH	117	5' CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG 3'	5' TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT 3'	60	NM_002046.3

1.4.5 Boyden 小室法检测细胞侵袭力 取生长良好的 HT-29 细胞, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液。取细胞悬液 250ul,加入铺好基质凝胶的细胞培养池(即 Boyden 小室的上室)中,分为三组 ①空白组,②对照组,③HMGB1 siRNA 组,常规培养 12h 后进行转染。继续培养 18h 后把细胞培养池放入 24 孔板,24 孔板的每孔(即 Boyden 小室的下室) 中加入细胞培养液 200 ul,细胞继续培养 12h,使细胞穿透 Matrigel 胶和 PET 膜,达到 PET 膜的下表面。12h 后从 Boyden 小室中取出细胞培养池,用棉签轻轻拭去 PET 膜上表面残留的细胞和基质凝胶后,将其下表面浸泡于 70%甲醇,固定 30 分钟,未结合型苏木素染色 10 分钟。在高倍镜下计数 PET 膜下面侵袭的细胞数,计数中间和四周 5 个视野,取平均值。

1.4.6 蛋白抽提及 western blo (1)蛋白抽提 取 $5\sim 10 \times 10^5$ 个细胞,吸取 100ul 蛋白裂解液,加入蛋白酶抑制剂后加入到细胞内, 4°C 旋转 15 分钟。12000rpm 离心 10min, 吸上清。(2) Western blot 蛋白上样后 80v 电泳 2h,100v 恒压湿转 1h,转膜

结束后脱脂奶粉封闭至少 30 分钟, 根据抗体的稀释比将相应的一抗加入牛奶中,用封膜带封好后放入 4°C 冰箱过夜。TBST 洗膜,3 遍,每次 10min。然后加入二抗,二抗的稀释比一般为 1: 3000,方法和加一抗相同,封好口后放室温 30-40min。TBST 洗膜,3 遍,每次 10min。显影液显影,凝胶成像仪获取图像。
1.4.7 统计学方法 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 11.0 专业统计学软件对数据进行统计学处理, 统计学方法采用 χ^2 检验,当 $P<0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGB1 siRNA 对 HT-29 细胞 HMGB1 mRNA 和蛋白表达的影响
本实验采用 realtime RT-PCR 法检测了 HMGB1 siRNA 对 HT-29 细胞 HMGB1 mRNA 和蛋白表达的影响。结果如表 2、图 1 所示 HMGB1 siRNA 能显著降低 HT-29 细胞 HMGB1 mRNA 和蛋白的表达。

表 2 HMGB1 mRNA 和蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, n=5)
Tab 2 The expression of HMGB1 mRNA and protein

Group	HMGB1/GAPDH (mRNA)	HMGB1/GAPDH (Protein)
Blank group	0.084 $\pm$ 0.016	0.96 $\pm$ 0.15
Control group	0.079 $\pm$ 0.014	0.91 $\pm$ 0.16
SiRNA group	0.029 $\pm$ 0.005**	0.15 $\pm$ 0.024**

**P<0.01 vs control group

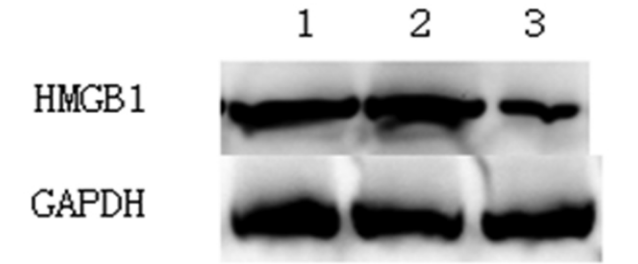


Figure 1 HMGB1 protein expression 1.blank group 2. control group 3. siRNA group

本实验采用 Boyden 小室法检测了 HMGB1 siRNA 对 HT-29 细胞侵袭转移能力的影响。结果如表 3 所示：干扰 HMGB1 后能明显降低 HT-29 细胞侵袭力。

表 3 HT-29 细胞侵袭力 ($\bar{x} \pm s$, n=5)
Tab 3 The invasiveness of HT-29

Group	Number of penetration
Blank group	138.97 $\pm$ 22.35
Control group	135.49 $\pm$ 22.92
SiRNA group	78.32 $\pm$ 13.78**

** P<0.01 vs control group

3 讨论

近年来,尽管结肠癌的外科治疗技术有了长足进步,但因结肠壁内有丰富的淋巴组织和血供,容易播散,临床治疗效果仍相当有限,预后不甚理想,病死率高。HMGB1 最初发现时是一种广泛存在的 DNA 结合蛋白,主要参与炎症反应,特别是在炎症后期^[5],巨噬细胞、单核细胞受内毒素、IL-1 和 TNF 刺激后释放 HMGB1, HMGB1 可再度激活巨噬细胞^[6,7]。近年发现,其与肿瘤细胞的生长、浸润和转移有密切关系。HMGB1 是一种抗凋亡结合蛋白,其过表达可抑制细胞凋亡,从而导致肿瘤的发生、生长^[8-10]。HMGB1 可促进血管内皮细胞的增加并诱导血管内皮生长因子(VEGF) 表达,抑制 HMGB1 的表达可抑制新生血管形成^[11-13]。HMGB1 和其受体在大多数结直肠癌组织中共表达,有共表达的 Duke B 和 C 期患者预后明显比非共表达的患者差^[14]。

有关 HMGB1 对人结肠癌细胞 (HT-29) 侵袭转移能力的影响尚未见报道,因此,本实验采用 HT-29 细胞为研究对象,观察了干扰 HMGB1 表达后对其侵袭转移能力的影响。发现,干扰 HMGB1 的表达能显著降低 HT-29 细胞的侵袭转移能力,说明 HMGB1 在 HT-29 细胞的侵袭转移中发挥了重要作用,有关这方面的机制值得我们进一步深入探讨。

参考文献 (References)

- [1] Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta*[J]. 2010,1799(1-2):101-113
- [2] Luo Y, Ohmori H, Fujii K, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defence of the liver in colorectal cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(4): 791-799
- [3] 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
- [4] Naumnik W, Nilklinska W, Ossolinska M, et al. Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small

cell lung cancer during chemotherapy[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47(4): 703-709

- [5] Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1-2): 149-156
- [6] Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 11942-11947
- [7] Levy RM, Mollen KP. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1 [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp-Physiol*, 2007, 293(4): R1538-1544
- [8] Thorburn J, Horita H, Redzic J, et al. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 175-183
- [9] Rossini A, Zacheo A, Mocini D, et al. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44 (4): 683-693
- [10] Thorburn J, Horita H, Redzic J, et al. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 175-183
- [11] Naumnik W, Nilklinska W, Ossolinska M, et al. Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47(4): 703-709
- [12] Kang HJ, Lee H, Choi HJ, et al. Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(8): 948-959
- [13] Zhang CL, Shu MG, Qi HW, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by HMGB1A box peptide[J]. *Med Hypotheses*, 2008, 70(2): 343-5
- [14] Kusume A, Sasahira T, Luo Y, et al. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer. *Pathobiology*[J]. 2009, 76(4): 155-162