

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.16.016

HMGB1 在胃癌组织及细胞系中表达的研究 *

李人立 瞿发林 李秋晨 贺加星 包国强[△]

(第四军医大学唐都医院普外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:近年来的研究表明,高迁移率族蛋白(HMGB1)在肿瘤的发生及恶性演变过程中发挥重要作用,本研究旨在探讨 HMGB1 在胃癌组织、正常组织、胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、AGS 及正常胃黏膜细胞系 GES 中表达情况。**方法:**免疫组织化学法检测 HMGB1 在 32 例可手术切除的胃癌患者组织标本(包括癌组织和正常组织)的表达情况;RT-PCR 及 Western Blot 检测 HMGB1 在胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、AGS 及正常胃黏膜细胞系 GES 的 mRNA 及蛋白质表达。**结果:**胃癌组织 HMGB1 免疫组织化学染色评分高于正常组织 ($P<0.05$); RT-PCR 结果显示 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、AGS、GES 细胞系 HMGB1 mRNA 表达丰度均较高;Western Blot 检测发现胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27 中 HMGB1 蛋白水平显著高于胃癌细胞系 AGS 及正常胃黏膜细胞系 GES。**结论:**HMGB1 在胃癌组织及正常组织中的表达具有显著性差异。胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27 相对于其它胃细胞系存在 HMGB1 高表达,适合后续基因敲除分析工作。

关键词: HMGB1; 胃癌; 胃癌细胞系

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)16-3065-04

Expression of HMGB1 in Gastric Cancer Tissues
and Gastric Cancer Cell Lines*LI Ren-li, QU Fa-lin, LI Qiu-chen, HE Jia-xing, BAO Guo-qiang[△]

(Department of General Surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Recent studies suggest that HMGB1 plays an important role in tumorigenesis and carcinoma malignant transformation. This study aims to examine the expression of HMGB1 in gastric cancer tissues and normal tissues, gastric cancer cell lines (SGC-7901, BGC-823, HGC-27, AGS) and human gastric mucosa epithelium cell line (GES). **Methods:** Immunohistochemistry staining was used to assess HMGB1 expression in 32 cancerous tissues and normal tissues from the resected gastric samples. RT-PCR and Western-blot were performed to determine HMGB1 mRNA level and protein level in gastric cancer cells, including SGC-7901, BGC-823, HGC-27, AGS and GES. **Results:** The overexpression of HMGB1 was found in cancerous tissues compared with normal tissues ($P<0.05$). Furthermore, we found that the mRNA level of HMGB1 was all high in SGC-7901, BGC-823, HGC-27, GES and AGS measured by RT-PCR. In addition, we also found that the protein level of HMGB1 was higher in SGC-7901, BGC-823, HGC-27 than GES and AGS measured by Western blot. **Conclusions:** The expression of HMGB1 is significantly different between gastric cancerous tissues and normal tissues. The expression of HMGB1 are higher in SGC-7901, BGC-823 and HGC-27 than the other gastric cell lines, thus these cell lines are suitable for HMGB1 gene knock down analysis in the subsequent work.

Key words: HMGB1; Gastric cancer; Gastric cancer cell lines

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2015)16-3065-04

前言

胃癌在三种最常见的胃恶性病变(胃癌、非霍奇金淋巴瘤、胃恶性间质瘤)中占 95%,同时也是世界最常见的恶性肿瘤之一^[1]。虽然在过去的 10 年中在全球胃癌的发病率有所下降,且肿瘤治疗在过去的几年发生了巨大的变化,但是胃癌仍然是第四大恶性肿瘤,致死率在恶性肿瘤中高居第二位^[2,3]。

HMGB1 是一种非组蛋白,属于高迁移率族蛋白家族,作为重要的炎症因子, HMGB1 可能通过 "炎症链" 影响肿瘤的

发生及演变^[4,5]。研究证实 HMGB1 可以通过晚期糖基化终产物受体(RAGE)^[6]和 Toll 样受体家族(TLRs)^[7]等受体结合,参与调控肿瘤的发生及生物学行为。现阶段以 HMGB1 为靶点,通过抑制其表达、分泌、释放、合成及信号传导过程治疗肿瘤已被建议为新的的肿瘤靶向治疗方式。但是 HMGB1 在胃癌中的研究仍不充分。我们的研究以胃肿瘤及正常组织、胃 5 种工具细胞为研究对象,检测 HMGB1 基因表达。将患者胃癌组织及正常组织中 HMGB1 的表达进行对比。细胞系 HMGB1 水平检测是为筛选出过表达胃癌细胞系,为下一步 RNAi 干扰及靶向治

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272201)

作者简介:李人立(1983-),男,硕士研究生,研究方向:胃癌机制研究,电话:029-84717389, E-mail: lrl_work@163.com

[△] 通讯作者:包国强,电话:029-84717389, E-mail: guoqiang@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2015-01-08 接受日期:2015-01-25)

疗胃癌打下基础。

1 材料和方法

1.1 病人信息及组织标本

收集 32 例唐都医院 2014 年 10 月至 2014 年 12 月胃癌手术患者资料及术中样本。经唐都医院伦理委员会同意,患者均签署知情同意书。手术后病理诊断 32 例均为胃癌,其中男 20 例,女 12 例,年龄 32-77 岁,平均年龄 59 岁。按国际抗癌联盟(UICC)及美国癌症联合会(AJCC)胃癌分期标准(第 7 版): I a-II a 期 10 例, II b-III a 13 例, III b-IV 期 9 例。伴有局部淋巴结转移者 24 例,远处转移者 3 例,均排除身体其它部位的原发性肿瘤。肿瘤组织及正常组织均在手术时收集,立即于 10%甲醛固定并在 24 小时内行石蜡包埋。

1.2 材料

胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、AGS, 正常胃粘膜细胞系 GES 购自上海吉凯基因; 细胞培养用胎牛血清 FBS、RIMP1640 购自 GIBCO 公司; Primer(R&F)由上海吉凯基因合成; SYBR Master Mixture 购自 TAKARA 公司; HMGB1 多克隆抗体购自 abcom 公司。

1.3 细胞培养

细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、AGS、GES, 以 RIMP1640 培养基加入 10% 的胎牛血清在 37℃ 细胞培养箱中进行培养。

1.4 免疫组织化学法

常规石蜡切片(4 μm), HE 染色, 免疫组织化学染色: 防脱蜡处理后捞片, 60℃ 烤片 30 min, 二甲苯及梯度酒精脱蜡至水, 切片放入 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶后, 切片至于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中水浴锅水浴 95℃, 自然冷却。BSA 封闭 30 min, HMGB1 一抗孵育(滴度 1:200)4℃ 过夜, 阴性对照采用 PBS 代替。二抗工作液孵育 37℃ 30 min, 辣根过氧化物酶孵育 37℃ 30 min; DAB 显色约 10-15 min (以上各步骤间均以 PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min); 苏木精复染, 脱水、透明、封片后镜下观察。结果判定: 根据肉眼镜下所见将染色强度按无色、浅黄色、棕黄色、棕褐色按分别评分为: 0 分、1 分、2 分、3 分; 高倍镜(× 400)下分别选取 5 个视野, 按阳性肿瘤细胞所占

比例记分, <5%、5-25%、25-50%、50-75%、>75% 分别为 0、1、2、3、4 分。染色强度与阳性百分比积分相乘 0 为 (-), 1-4 为 (+), 5-8 为(++), 9-12 为(+++)。所有读片均有两名研究者评估, 统计学分析组间差异。

1.5 Real-time PCR 试验

分别提取 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES 细胞系总 RNA, Nanodrop 2000/2000C 分光光度计分析测定所提取 RNA 的量。各取 2.0 μg RNA 进行反转录。利用 Real-time PCR 检测 HMGB1 在各细胞系中的表达情况。HMGB1 上游引物: 5'-TATGGCAAAAGCGGACAAGG-3', 下游引物: 5'-CTTCGCAACATCACCAATGGA-3', 扩增片段大小 196 bp; 内参照 GAPDH 上游引物: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物: 5'-CACCTGTGTGCTGTAGCCAAA-3', 扩增片段大小 121 bp。Real-time PCR 循环参数: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s 共 45 个循环; 延伸阶段 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 95℃ 15 s。采用吸光值计算 ΔCt 值后进行统计学分析。

1.6 Western-Blot 试验

SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES、AGS 蛋白抽提后, 经过聚丙烯酰胺凝胶(12%分离胶, 5%堆积胶)电泳, 然后转移至硝纤膜, 分别加入一抗和 FITC 标记的二抗。膜与抗体反应 2 h (室温), 每次反应后, 用 TBST 室温下洗涤 5 次, 每次 3 min。进行化学发光显影, 洗片。结果采用凝胶图像分析仪进行分析。

1.7 统计学方法

所得数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 所有统计学资料用 SPSS19.0 软件进行分析, 免疫组化染色等级资料间比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。RT-PCR 组间比较采用 X² 样本 t 检验。P<0.05 表示差异之间具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学鉴定

对 32 例患者癌组织及正常组织进行免疫组化鉴定, 免疫组织化学结果显示 HMGB1 在两组(胃癌组, 正常组)均有不同程度的表达, 其中肿瘤组织 HMGB1 阳性率为(30/32)93.75%, 染色强度以阳性(++)和强阳性(+++)为主, 正常组织 HMGB1 阳性率为(24/32)75%, 染色强度以主要集中在阴性(-)弱阳性

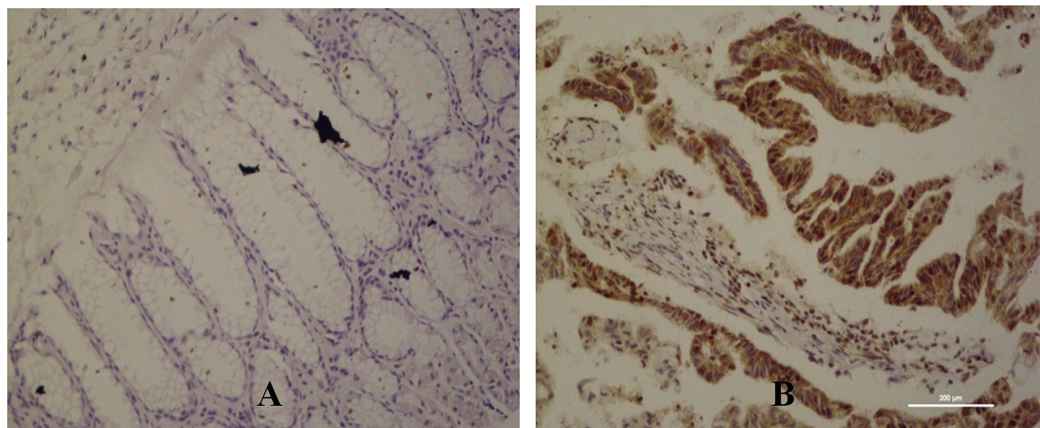


图 1 组织 HMGB1 免疫组织化学染色(× 200)

Fig.1 Immunohistochemistry staining of HMGB1 in tissue(× 200)

Note: A. Normal tissues; B. Cancerous tissues.

(+)和阳性(++)。目的基因 HMGB1 主要表达在组织的细胞核中,呈颗粒状,在细质中部分表达,呈片状, HMGB1 着色深度从无色至棕褐色不等(图 1)。对两组进行阅片并评分,对 2 名

研究者的评分取均值。所得数据 SPSS19.0 软件统计学分析,等级资料间以 Mann-Whitney U 秩和检验测得, $P < 0.05$ 两组间存在明显差异,胃癌组表达明显高于正常组。详见表 1。

表 1 胃癌组织与正常组织 HMGB1 免疫组化评分情况统计

Table1 Statistics of HMGB1 expression in cancerous tissues and normal tissues

Group	Sample	HMGB1 expression score				Positive rate%	Statistics	
		0(-)	1(+)	0(++)	0(+++)			
Cancerous tissues	32	2	5	15	10	93.75%	U=293.5	Z=-3.079
Normal tissues	32	8	10	11	3	75%	P<0.05	

Note: $P < 0.05$ Cancerous group compared with normal group.

2.2 Real-time PCR 检测 HMGB1 mRNA 在各细胞系中的表达

RT-PCR 检测吸光度,吸光度计算按以下公式: $\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$,三个复孔数值以并 $\bar{x} \pm s$ 表示,取各细胞系 ΔCt 值 SPSS19.0 软件统计学分析,采用两样本 t 检验统计学分析显示 5 个细胞系样本两两之间均不存在差异。($P > 0.05$)。所得 5 种胃细胞系 ΔCt 均 < 12 ,表示 HMGB1 在 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES、AGS 细胞中基因表达丰度均高。提示 5 种细胞系均有 HMGB1 mRNA 表达, HMGB1 在 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES、AGS 在 mRNA 水平均适

合做敲减。

2.3 Western-Blot 试验结果

Western-Blot 检测结果显示 SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES、AGS 等 5 株细胞系样本中。SGC-7901、BGC-823、HGC-27 中检测出目的条带,在 GES、AGS 细胞系中未检测出目的条带。目的基因 HMGB1 在细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27 中表达,在细胞系 GES、AGS 中无目的基因表达。胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27 适合 HMGB1 基因敲减。

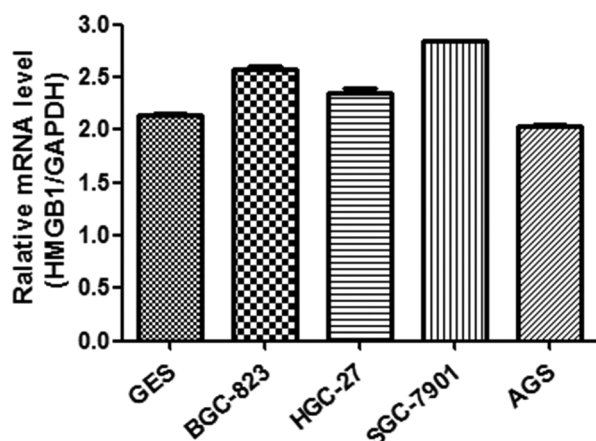


图 2 Real-time PCR 检测 HMGB1 mRNA 在 5 株细胞中的表达

Fig.2 Expression of mRNA HMGB1 in five cell lines by RT-PCR

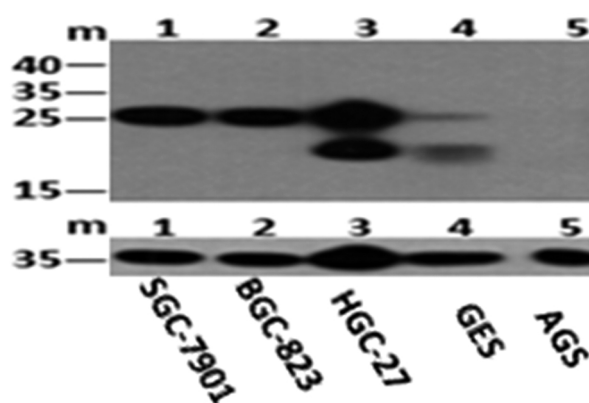


图 3 Western-Blotting 法检测 HMGB1 蛋白在 5 株细胞中的表达

Fig.3 Expression of HMGB1 protein in five cell lines by Western-Blot

3 讨论

HMGB1 在多种类型的肿瘤中均存在过表达,如肝癌^[9]、鼻咽癌^[9]、大肠癌^[10]、胰腺癌^[11]等,且与预后相关。HMGB1 功能因定位不同而不同,在大多数细胞中, HMGB1 位于细胞核中,在核内作为 DNA 分子伴侣来维持核平衡^[12],调节基因的转录和重组^[13],参与 DNA 修复和端粒长度的维持。在细胞浆和线粒体内, HMGB1 可以增加自噬^[1],抑制凋亡^[14],调控线粒体的形态和功能^[16,17]。在细胞表面, HMGB1 促进突触的萌发及神经突的生长^[18,19]。在细胞外液与多种受体结合,与其它免疫共激活剂形成复合物,调节炎症、免疫、迁移、增殖、代谢、凋亡、自噬^[20]。进而参与多种肿瘤的恶性演变进程^[21]。由此 HMGB1 也成为肿瘤研究的热点。

我们的研究以胃癌为对象,分别对组织及细胞做了不同层面的 HMGB1 表达检测,结果在胃癌组织中 HMGB1 显著高于正常组织($P < 0.05$),提示 HMGB1 在胃癌有可能作为新的肿瘤标记物,在胃癌的早期诊断中发挥价值。SGC-7901、BGC-823、HGC-27、GES、AGS 细胞系中 HMGB1 mRNA 水平均有较高的表达丰度。在蛋白质水平 HMGB1 在胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、HGC-27 高于 GES、AGS。分析在 GES、AGS 的蛋白质翻译过程中 HMGB1 可能受到翻译后修饰(如甲基化、乙酰化、磷酸化等)的作用,从而抑制蛋白质表达。正常胃粘膜细胞系 GES 在蛋白质水平低于 SGC-7901、BGC-823、HGC-27,怀疑 HMGB1 可能与胃癌的发生存在相关。AGS 是所选细胞系中唯一高分化腺癌,其蛋白质表达量低于其它胃癌细胞系和正常胃粘膜细胞系,由此推断 HMGB1 在胃癌中可能与胃癌分化程度

有关。

总之,本研究证实了 HMGB1 在胃癌组织的表达高于正常组织,提示 HMGB1 可以通过多种途径在胃癌的生物学活性中发挥作用。SGC-7901、BGC-823、HGC-27 作为我们筛选得到的 HMGB1 过表达细胞系,为我们后续 RNAi 慢病毒载体构建并验证胃癌细胞生物学功能的后续试验奠定了试验基础。HMGB1 作为研究热点,其对胃癌的早期诊断及治疗具有潜在的价值,对于其具体的生物学作用,尚需进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386
- [2] Strong V E, Song K Y, Park C H, et al. Comparison of gastric cancer survival following R0 resection in the United States and Korea using an internationally validated nomogram [J]. *Ann Surg*, 2010, 251(4): 640-646
- [3] Strong V E, Song K Y, Park C H, et al. Comparison of disease-specific survival in the United States and Korea after resection for early-stage node-negative gastric carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(6): 634-640
- [4] 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
- [5] Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4): 369-373
- [6] Zhang L, Ji Y, Kang Z, et al. Protocatechuic aldehyde ameliorates experimental pulmonary fibrosis by modulating HMGB1/RAGE pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 283(1): 50-56
- [7] Gupta K. HMGB1 takes a "Toll" in sickle cell disease[J]. *Blood*, 2014, 124(26): 3837-3838
- [8] Zhang L, Han J, Wu H, et al. The association of HMGB1 expression with clinicopathological significance and prognosis in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and literature review[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110626
- [9] Liu Y, Xie C, Zhang X, et al. Elevated expression of HMGB1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(16): 3007-3015
- [10] Ueda M, Takahashi Y, Shinden Y, et al. Prognostic significance of high mobility group box 1 (HMGB1) expression in patients with colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(10): 5357-5362
- [11] Hong S M, Park J Y, Hruban R H, et al. Molecular signatures of pancreatic cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2011, 135(6): 716-727
- [12] Travers A A. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins?[J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(2): 131-136
- [13] Lange S S, Vasquez K M. HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(7): 571-580
- [14] Tang D, Kang R, Cheh C W, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2010, 29(38): 5299-5310
- [15] Krynetskaia N, Xie H, Vucetic S, et al. High mobility group protein B1 is an activator of apoptotic response to antimetabolite drugs[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(1): 260-269
- [16] Tang D, Kang R, Livesey K M, et al. High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 701-711
- [17] Kang R, Tang D, Schapiro N E, et al. The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics [J]. *Oncogene*, 2014, 33(5): 567-577
- [18] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4): 331-342
- [19] Tang D, Kang R, Coyne C B, et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity [J]. *Immunol Rev*, 2012, 249(1): 158-175
- [20] Bell C W, Jiang W, Reich C R, et al. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(6): C1318-C1325
- [21] Ellerman J E, Brown C K, de Vera M, et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 2836-2848
- [20] 钟清连, 罗和生, 张佳, 等. 抗血管生成药苏拉明对大鼠肝星状细胞的影响[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2009, 18(10): 907-910
Zhong Qing-lian, Luo He-sheng, Zhang Jia, et al. Effects of Suramin on the rat hepatic stellate cell in vitro [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2009, 18(10): 907-910
- [21] Tochigi T, Sakurada Y, Aoki H, et al. The intravesical recurrence after 3-day consecutive intravesical instillation of pirarubicine hydrochloride (THP) following transurethral resection of bladder tumor (TURBT) for non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 2012, 103(4): 610-616
- [22] Chan E, Patel A, Heston W, et al. Mouse orthotopic models for bladder cancer research[J]. *BJU Int*, 2009, 104(9): 1286-129
- [23] Tochigi T, Sakurada Y, Aoki H, et al. The intravesical recurrence after 3-day consecutive intravesical instillation of pirarubicine hydrochloride (THP) following transurethral resection of bladder tumor (TURBT) for non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 2012, 103(4): 610-616

(上接第 3052 页)