

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.011

HMGB1 通过上调 E2F3 促进卵巢癌细胞增殖和侵袭能力*

梁婉琪 赵宗霞 李芬霞 常丽花[△]

(西安医学院第二附属医院 妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨高迁移率族蛋白 B1(High-mobility Group Box 1 protein, HMGB1)是否通过激活 E2F 转录调节因子 3(E2F transcription factor 3, E2F3)促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭作用。**方法:**选取本院 2017 年 10 月-2018 年 7 月收治的 38 例卵巢癌患者。qRT-PCR、Western blot 和免疫组化分别检测患者肿瘤组织和癌旁组织中 HMGB1 的表达;qRT-PCR 和 Western blot 检测 HMGB1 在卵巢癌细胞系 A2780、HO8910、ES-2 和 SKOV3 中的表达;RNA 沉默技术敲除 HMGB1 在 SKOV3 中的表达,同时 CCK-8 和 Trans-well 观察 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化;RNA 转录组测序(RNA transcriptome sequencing, RNA-seq)检测敲除 HMGB1 前后 SKOV3 细胞中 mRNA 的变化;qRT-PCR 和 Western blot 检测验证 RNA-seq 结果;RNA 沉默技术敲除 E2F3 在 SKOV3 细胞中的表达,同时 CCK-8 和 Trans-well 观察 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化。**结果:**卵巢癌肿瘤组织中 HMGB1 表达显著高于癌旁组织($P<0.05$);HMGB1 在四种卵巢癌细胞系中的 SKOV3 细胞中表达最高($P<0.05$);si-RNA 基因沉默后, HMGB1 在 SKOV3 细胞中几乎无表达, CCK-8 和 Trans-well 实验表明 HMGB1 si-RNA 沉默后其增殖和侵袭能力显著被抑制($P<0.05$);RNA-seq 检测结果表明, HMGB1 si-RNA 沉默后 E2F3、叉状头转录因子 3(Forkhead box protein P3, FOXP3)和趋化因子 5(chemokine 5, CXCL5)下调倍数最明显其中 E2F3 下调倍数最高,同时在细胞系中验证结果显示同样结果($P<0.05$);si-RNA 基因沉默 E2F3 后, E2F3 在 SKOV3 细胞中几乎无表达, CCK-8 和 Trans-well 实验表明 E2F3 si-RNA 沉默后其增殖和侵袭能力显著被抑制($P<0.05$)。**结论:**HMGB1 可能通过上调 E2F3 的表达增加促进卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和转移。

关键词:HMGB1; E2F3; 卵巢癌; 增殖; 侵袭

中图分类号:R-33; R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-654-07

HMGB1 Promotes Proliferation and Invasion of Ovarian Cancer Cells by Up-regulating E2F3*

LIANG Wan-qi, ZHAO Zong-xia, LI Fen-xia, CHANG Li-hua[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether high-mobility group box protein B1 (HMGB1) promotes the proliferation and invasion of ovarian cancer cells by activating nuclear transcription factor E2F3. **Methods:** A total of 138 patients with ovarian cancer admitted to our hospital from June 2016 to May 1818 were enrolled. qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of HMGB1 in tumor tissues and paracancer tissues. The expression of HMGB1 in ovarian cancer cell lines A2780, HO8910, ES-2 and SKOV3 was detected by qRT-PCR and Western blot. RNA silencing technique knocked out the expression of HMGB1 in SKOV3, while CCK-8 and Trans-well observed changes in SKOV3 cell proliferation and invasion ability. RNA transcriptome sequencing (RNA-seq) detected mRNA changes in SKOV3 cells before and after HMGB1 knockdown. The results of RNA-seq were verified by qRT-PCR and Western blot. The expression of E2F3 in SKOV3 cells was knocked out by RNA silencing technique. The proliferation and invasion ability of SKOV3 cells were observed by CCK-8 and Trans-well. **Results:** The expression of HMGB1 in ovarian cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P<0.05$). HMGB1 was the highest in SKOV3 cells of four ovarian cancer cell lines ($P<0.05$). After silencing of si-RNA gene, HMGB1 was almost no expression in SKOV3 cells. CCK-8 and Trans-well experiments showed that the proliferation and invasion ability of HMGB1 si-RNA was significantly inhibited after silencing ($P<0.05$). The results of RNA-seq assay showed that HMGB1 si-RNA was silenced. The down-regulation multiples of E2F3, FOXP3 and CXCL5 were the most obvious, and the E2F3 down-regulation was the highest, and the results in the cell line showed the same results ($P<0.05$). After silencing E2F3 by si-RNA gene, E2F3 showed almost no expression in SKOV3 cells, CCK-8 and Trans-well experiments showed that the proliferation and invasion ability of E2F3 si-RNA was significantly inhibited ($P<0.05$). **Conclusion:** HMGB1 may promote the proliferation and metastasis of ovarian cancer SKOV3 cells by up-regulating the expression of E2F3.

Key words: HMGB1; E2F3; Ovarian cancer; Proliferation; Metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.31 **Documen code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-654-07

* 基金项目:陕西省科技统筹基金项目(2016KTZDSF01-013-04)

作者简介:梁婉琪(1981-),女,硕士,主要研究方向:妇科肿瘤, E-mail: 2358857030@qq.com

△ 通讯作者:常丽花(1962-),女,副主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤, E-mail: 505408436@qq.com, 电话: 18392030303

(收稿日期:2019-06-08 接受日期:2019-06-30)

前言

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,约占原发性恶性妇科肿瘤 80%~95%^[1-3],因其复杂的发病机制,导致其死亡率逐年增加^[4-6]。临床上,很多卵巢癌患者确诊时已处于晚期,失去了手术治疗的最佳机会,只能采取辅助放化疗,患者总体预后较差。近些年,各项研究结果表明一些 HMGB1 在卵巢癌中表达异常^[7-9],在结肠癌、肺癌等肿瘤发生及发展过程中起促癌的作用^[10,11]。有文献报道 HMGB1 在多种恶性肿瘤组织包括在卵巢癌中均有表达,在肿瘤细胞凋亡、转移和侵袭过程中发挥重要的作用^[12-14],HMGB1 主要位于细胞核中发挥作用,在卵巢癌中 HMGB1 入核后如何发挥作用,通过调控哪些转录因子来发挥促癌作用尚不清楚。E2F3 是一种核转录因子,其在卵巢癌中的作用鲜有报道。因此,本研究采用卵巢癌患者肿瘤组织和卵巢癌细胞系,探讨了 HMGB1 是否通过上调 E2F3 相关蛋白表达从而对卵巢癌增殖和侵袭能力产生影响。

1 材料和方法

1.1 患者来源

本次研究共纳入本院 2017 年 10 月 -2018 年 7 月收治的 38 例上皮样卵巢癌患者。所有卵巢癌患者均经过病理检验科诊断证实,均未经过任何治疗。实验方法和目的均告知患者和家属,并签署知情同意书,研究获的医院伦理委员会批准。

1.2 材料

A2780、HO8910、ES-2 和 SKOV3 细胞购自中科院上海细胞库, RNA 沉默表达载体由上海吉凯提供, 蛋白定量试剂盒、SDS 凝胶试剂盒、细胞裂解液、结晶紫均购自武汉碧天根生物有限公司, 蛋白酶抑制剂购自罗氏试剂生物有限公司, 高糖 DMEM 培养基、优级胎牛血清、胰蛋白酶消化液均购自美国 HyClone, 青链霉素混合液、4%多聚甲醛购自北京碧云天有限公司, PGDH、PGE2、Twist 抗体购自英国 Abcam, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Advansta, 兔二抗购自英国 Abcam, Trans-well 小室购自康宁。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨严格按照产品说明书的步骤进行总 RNA 提取、逆转录和 PCR。TRIzol 试剂用于提取细胞总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。用 qPCR 仪器进行 RT-qPCR 测定以检测目的基因 RNA 的相对表达水平。反应条件设定如下:在 95℃ 预变性 10 分钟;在 95℃ 下退火 10 秒;在 60℃ 下退火 20 秒并在 72℃ 下延伸 35 秒。该 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法用于计算目的基因相对 mRNA 表达。引物序列见表 1。

1.3.2 Western blot 细胞计数以 1×10^6 个细胞/mL 的细胞数种到 6 孔板中,设 3 个复孔。细胞贴壁取出 6 孔板,弃掉上清; PBS 清洗 1 min 后加含有蛋白酶抑制剂的裂解液并吹打细胞团,后放置冰上裂解,30 min 后用细胞刮将细胞刮下来转移至 1.5 mL 试管中,高速离心并抽取上清,即为所提蛋白。取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨,裂解液裂解,低温离心取上清,即为组织蛋白。蛋白定量完成后加上样缓冲液,沸水煮 5 min,样品可冻于 -80℃ 保存。SDS-PAGE 电泳后进行转膜操作,转膜

成功后用脱脂牛奶进行封闭, PBST 清洗,裁剪条带并分别加入相应抗体,均为 1:1000 稀释,室温孵育 1 小时后 4 度过夜。次日反复清洗条带,加二抗室温孵育 90 min, PBS 反复冲洗,然后加 ECL 发光液,化学发光仪检测并拍照。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

序列 (5'-3')	
HMGB1	
Forward	AGCCAACGTTAACTGAGGAGT
Reverse	GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
E2F3	
Forward	AGCCAACGTTAAATGAGGACAG
Reverse	GGCAAGTTGATTGATGGGAGG
CXCL5	
Forward	AGCCAAGAGTTAACTCGTGAG
Reverse	GGCATTAGGATTGATGGAGGG
FOXP3	
Forward	AGCCAAGAGTTAAGTTAACTCG
Reverse	GGCATTAAAGGATTGATGGAGAG
β -actin	
Forward	ACCCACTCCTCCACCTTTG
Reverse	CACCACCTGTTGCTGTAG

1.3.3 免疫组化 石蜡切片脱蜡和水化,修复抗原,滴加封闭液。加一抗。PBS 冲洗,滴加生物素标记的二抗, PBS 冲洗。滴加链亲和素 - 过氧化酶溶液孵育。DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封固,以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照,阳性细胞着色为棕黄色。

1.3.4 si-RNA 转染 SKOV3 细胞 SKOV3 细胞培养于含 10% FBS 和 1%青链霉素的高糖 DMEM 培养液中,置于 37℃/5% CO₂ 的培养箱内。细胞稳定传代 3 次后,接种到 6 孔板中,每孔细胞密度为 4×10^5 个。24 h 后(汇合度约 60%)取去经内毒素提取的 si-RNA 重组载体和 mRNA-NC 空质粒按试剂盒操作说明进行转染,每孔转染试剂 Lipfectamine 2000 5 μ L,质粒 2.5 μ g,转染 24 h 后荧光显微镜下观察载体上荧光蛋白表达效果。

1.3.5 CCK-8 实验 调整细胞数 4×10^5 个 / 孔直接铺板后 37℃, 5% CO₂ 培养箱内培养 1-4 天。结束后每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂,避光 3 个小时,摇床震荡 15 分钟。设置酶标仪 570 nm 检测细胞 CCK-8 混合液 OD 值进行活力分析。

1.3.6 Trans-well 细胞侵袭实验 BD 胶和培养液(1:9)配制,在冰上操作,然后在 37℃ 细胞培养箱孵育 5 h,在 37℃ 细胞培养箱水化基底膜 30 min。对数生长期细胞,胰蛋白酶消化,计数,无血清 DMEM 培养液 5×10^4 / 孔, Trans-well 小室下室正常 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 600 μ L, 上室 200 μ L 无血清细胞悬液,接种至 24 孔板。16 h 后 PBS 洗 2 次,4%多聚甲醛固定 15 min,室温风干。0.1%结晶紫染色 15 min, PBS 洗 3 遍,用棉签轻轻擦去上层未迁移的细胞,33%乙酸脱色,570 nm 读数。

1.3.7 RNA 转录组测序 用 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent) 检测 RNA 质量, RNA 完整性 (RIN) 数 >8 的样品用于 RNA-seq 测定。首先用 DNA 酶 I 处理 RNA 样品以降解任何可能的 DNA 污染。然后通过使用 oligo(dT) 磁珠富集 mRNA。与片段化缓冲液混合后, 将 mRNA 片段化成短片段。然后通过使用随机六聚体引物合成 cDNA 的第一链。加入缓冲液, dNTP, RNase H 和 DNA 聚合酶 I 以合成第二条链。用磁珠纯化双链 cDNA。然后进行末端修复和 3'-末端单核苷酸 A(腺嘌呤) 添加。最后, 将测序衔接子连接到片段上。通过 PCR 扩增富集片段。在质量控制 (QC) 步骤中, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus 实时 PCR 系统对样品库进行鉴定和定量。通过 Illumina HiSeqTM 4000 对文库产物进行测序。将由 Illumina HiSeqTM 4000 产生的称为原始读数的初级测序数据进行 QC 以确定是否需要重新测序步骤。在 QC 之后, 将原始读数过滤成干净的读数, 其将与参考序列比对。进行 QC 校准以确定是否需要重新测序。比对数据用于计算参考基因的读数分布和映射比率。比对结果通过 QC 后, 进行下游分析, 包括基因表达和

基于基因表达的深度分析 (PCA, 相关性, 筛选差异表达的基因等)。基于 DEG 进一步进行深度分析, 包括基因本体论 (GO) 富集分析, KEGG 途径富集分析, 聚类分析, 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析和发现差异表达基因。

1.4 统计学分析

所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计, 计量资料均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用 F 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 HMGB1 在卵巢癌肿瘤组织和癌旁组织中的表达

为了观察 HMGB1 在卵巢癌肿瘤组织和癌旁组织是否存在表达差异, 分别用 qRT-PCR、Western blot 和免疫组化检测肿瘤组织和癌旁组织中 HMGB1 的表达, 结果发现卵巢癌患者肿瘤组织中 HMGB1 表达显著高于癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1A, B, C。

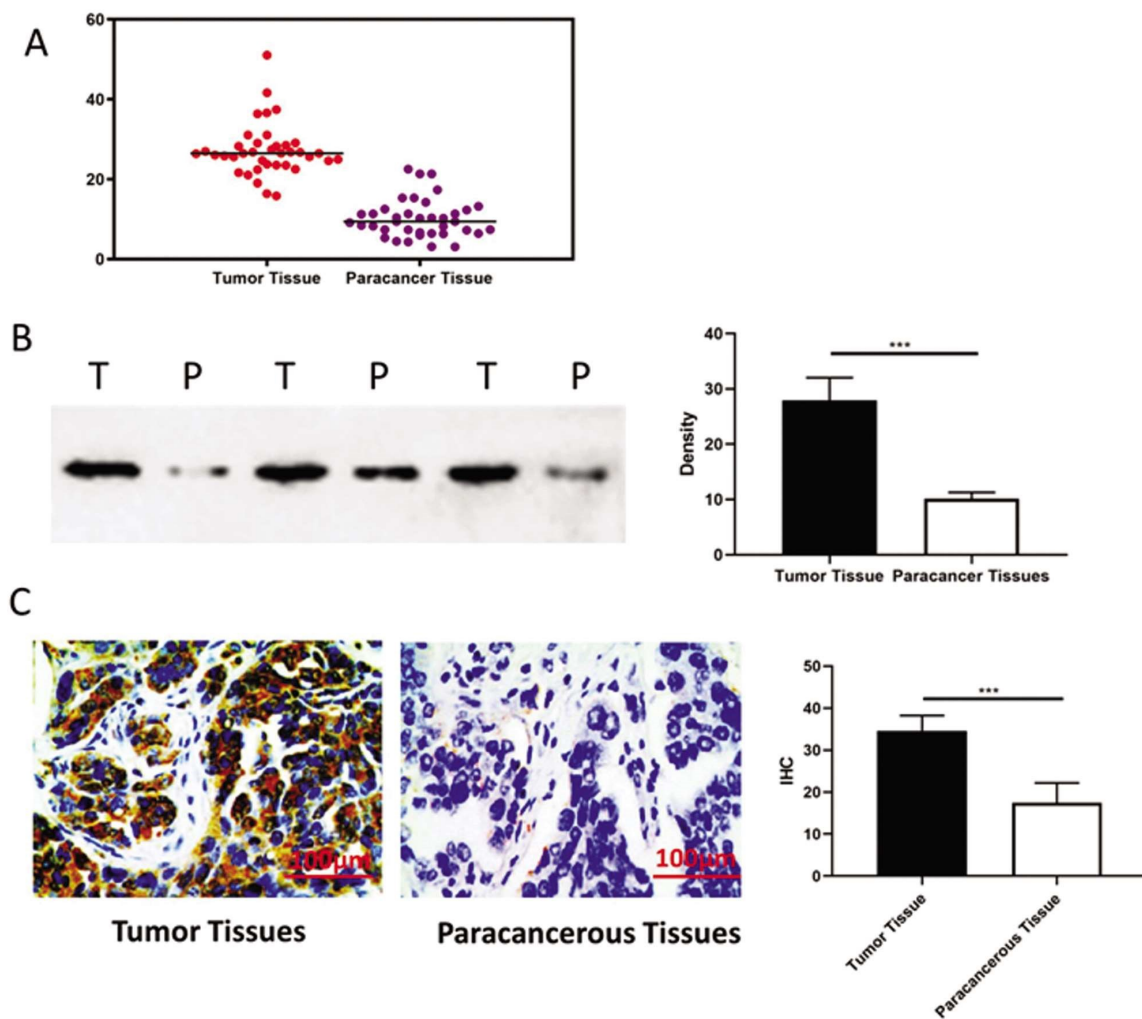


图 1 A: HMGB1 在卵巢癌肿瘤组织和癌旁组织 mRNA 水平的表达; B: HMGB1 卵巢癌肿瘤组织和癌旁组织蛋白水平的表达;

C: 免疫组化染色检测 HMGB1 在卵巢癌肿瘤组织和癌旁组织的表达

Fig.1 A: MicroRNA-21 expression in tumor tissues of ovarian cancer patients B: expression of microRNA-21 in metastatic tumor tissues and paracancerous tissues; C: microRNA-21 in non-metastasis tumor tissues, cancer Expression in tumor tissues and paracancerous tissues; D: expression in tumor tissues of patients with PGDH, PGE2 and Twist ovarian cancer

2.2 HMGB1 在卵巢癌细胞系 A2780、HO8910、ES-2 和 SKOV3 中的表达

观察完肿瘤组织中 HMGB1 的表达,接下来研究其在卵巢癌细胞系 A2780、HO8910、ES-2 和 SKOV3 中的表达。采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 HMGB1 在四种卵巢癌细

胞系 RNA 和蛋白水平的表达。结果发现与正常卵巢细胞 IOSE80 相比,无论是 RNA 水平还是蛋白水平, HMGB1 在 SKOV3 细胞中的表达最高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2A、B。

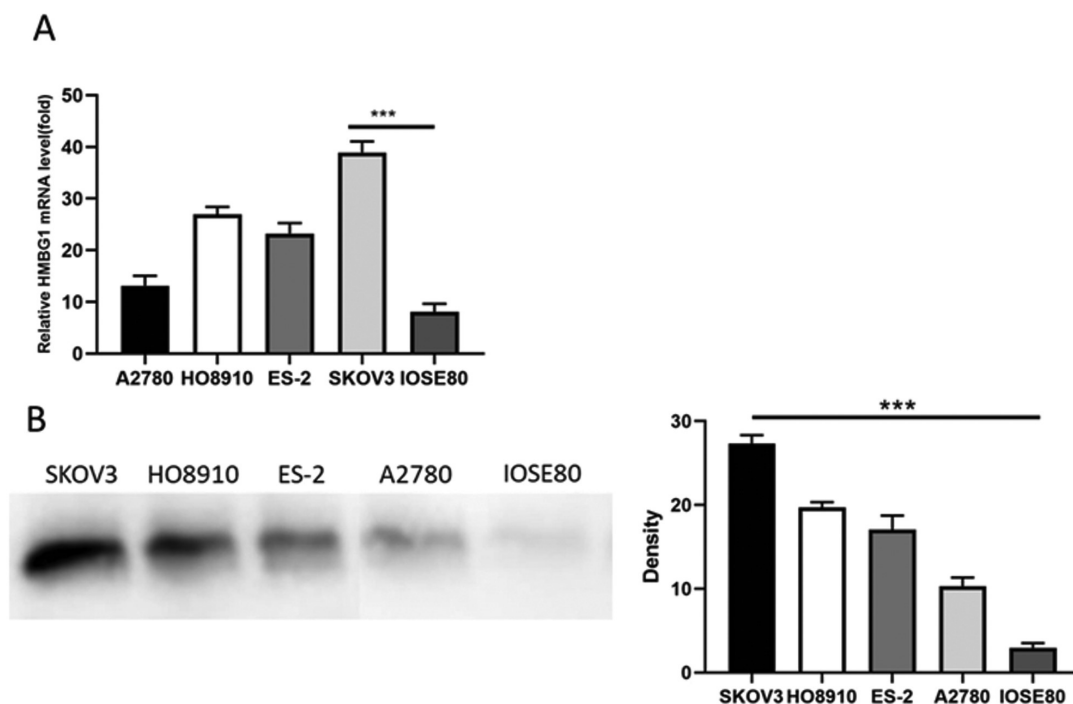


图 2 A: HMGB1 在四种卵巢癌细胞 RNA 水平表达; B: HMGB1 在四种卵巢癌细胞蛋白水平表达

Fig.2 A: Expression of HMGB1 in RNA levels of four ovarian cancer cells; B: HMGB1 expression in four ovarian cancer cell protein levels

2.3 沉默 HMGB1 后 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化

通过 2.2 可知 HMGB1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中表达最高,采用 si-RNA 技术沉默 HMGB1 在 SKOV3 细胞中表达,随后通过 CCK-8 和 Trans-well 观察 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化。结果发现沉默 HMGB1 后,与对照组相比,SKOV3 细胞增殖和侵袭能力均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3A、B、C,提示 HMGB1 对卵巢癌 SKOV3 细胞起到促增殖和侵袭的作用。

2.4 RNA-seq 观察沉默 HMGB1 前后 SKOV3 细胞各基因 RNA 差异变化

利用 RNA-seq 技术检测了 SKOV3 细胞转染前后各基因在 RNA 水平表达差异,发现 CXCL5、E2F3 和 FOXP3 下调倍数位于前三名,通过 KEGG 通路富集分析发现其均与肿瘤增殖通路相关,见图 4A;用 qRT-PCR 和 Western blot 在 si-RNA 组 SKOV3 细胞进行了验证,发现结果与 RNA-seq 保持一致,其中 E2F3 下调倍数最高, ($P<0.05$),见图 4B(所有结果均转为正数计算)。这提示 HMGB1 可能通过上调 E2F3 的表达促进卵巢癌增殖和侵袭能力。

2.5 沉默 E2F3 后 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化

通过 2.4 可知 RNA-seq 技术提示 HMGB1 可能通过上调 E2F3 的表达促进卵巢癌增殖和侵袭能力。为了进一步验证 E2F3 在卵巢癌 SKOV3 细胞中的作用,采用 si-RNA 技术沉默 E2F3 在 SKOV3 细胞中表达,随后通过 CCK-8 和 Trans-well 观察 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化。结果发现沉默 E2F3

后,与对照组相比,SKOV3 细胞增殖和侵袭能力均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 5A、B、C,说明 E2F3 在卵巢癌发生发展过程中起到促癌作用。

3 讨论

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于子宫颈癌和子宫体癌,死亡率居各类妇科肿瘤的首位,严重威胁女性健康^[58]。由于卵巢深居盆腔,体积小,缺乏典型症状,早期难以发现^[15,16]。卵巢癌患者肿瘤局限于卵巢仅占不足 30%,大多数已扩散到盆腔器官,治疗存在困难^[17-19]。目前针对卵巢癌研究热点更多的集中在新的靶向治疗,基因治疗作为一种新策略,已经取得了有效的成果^[20-22]。在本研究中,我们主要关注 HMGB1 和 E2F3 在卵巢癌中的功能作用。根据实验结果我们得出结论, HMGB1 可通过入核靶向激活转录因子 E2F3 从而促进卵巢癌细胞增殖和侵袭能力。

有研究报道 HMGB1 在不同类型的多种恶性肿瘤中作为一种肿瘤促进因子起到促进肿瘤的作用^[23,24]。HMGB1 是一种高度保守的 DNA 结合蛋白,近年来随着对其生物学功能的深入研究,发现 HMGB1 在脓毒血症、关节炎以及肿瘤等多种疾病的病理进程中发挥重要作用,当细胞发生损伤或机体产生严重的炎症反应时其大量释放至胞外,参与细胞外信号介导的多种信号转导通路调控,以及调节细胞的生长增殖、分化转化以及迁移侵袭等过程^[25-27]。为了进一步研究 HMGB1 在卵巢癌中的作用和分子机制,我们首先用 qRT-PCR、western blot 和免疫组

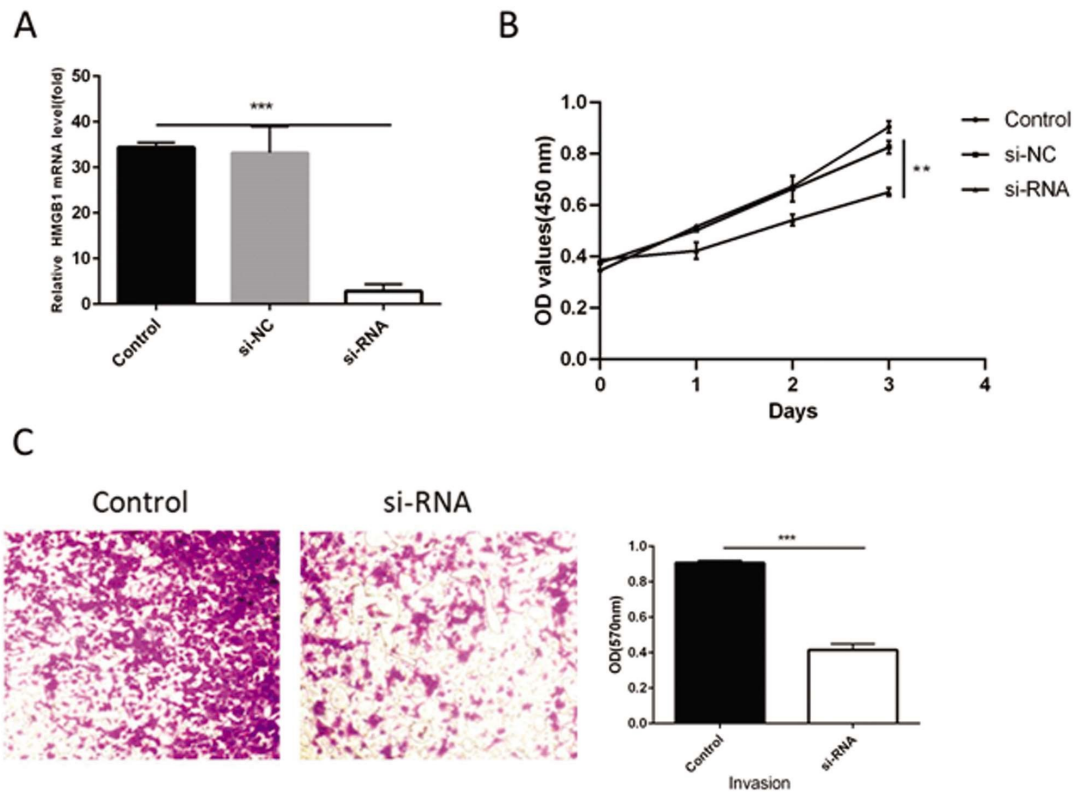


图 3 A:qRT-PCR 检测 si-RNA 转染效率;B:CCK-8 观察 SKOV3 细胞增殖能力变化;C:Trans-well 观察 SKOV3 细胞侵袭能力变化
Fig.3 A: qRT-PCR detection of si-RNA transfection efficiency; B: CCK-8 observation of SKOV3 cell proliferation ability changes; C: Trans-well observation of SKOV3 cell invasion ability changes

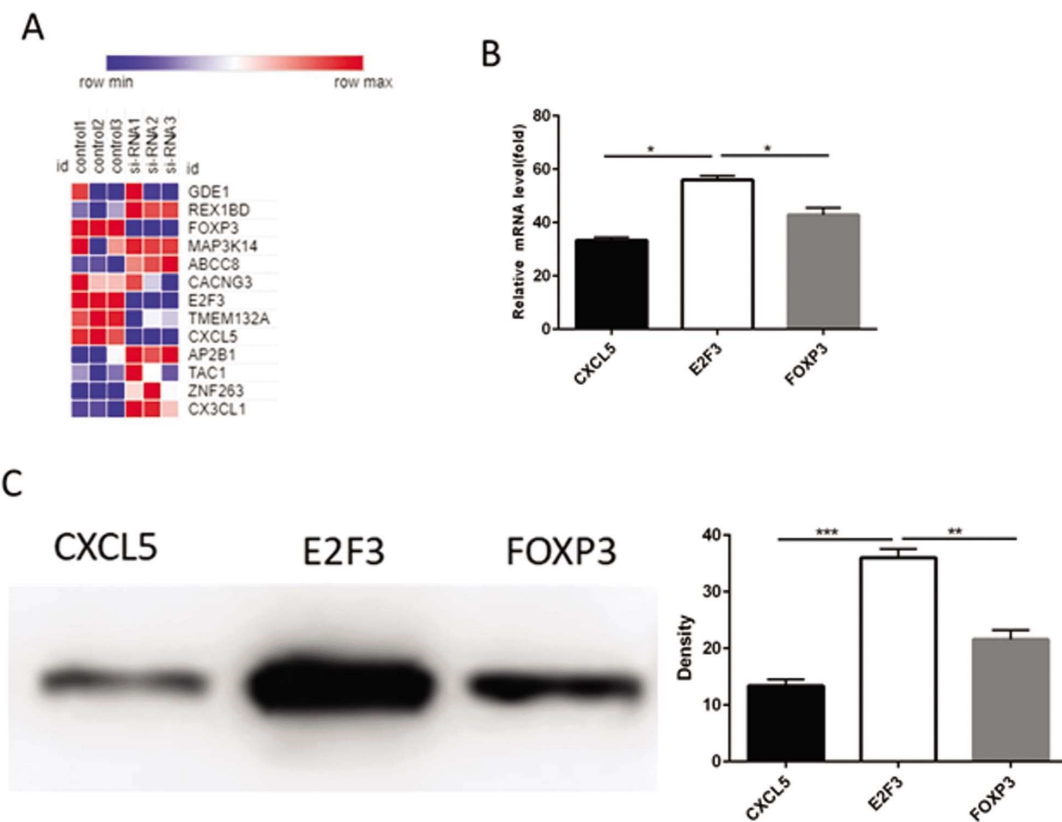


图 4 A:RNA-seq 技术检测了 SKOV3 细胞转染前后各基因在 RNA 水平表达差异; B:qRT-PCR 验证 CXCL5、E2F3 和 FOXP3 在 si-RNA 组 SKOV3 细胞表达;C:Western blot 验证 CXCL5、E2F3 和 FOXP3 在 si-RNA 组 SKOV3 细胞表达
Fig.4 A: RNA-seq technique was used to detect the difference in expression of SKOV3 cells at the RNA level before and after transfection; B: qRT-PCR confirmed the expression of CXCL5, E2F3 and FOXP3 in the si-RNA group SKOV3 cells; C: Western blot verified CXCL5, E2F3 and Expression of FOXP3 in SKOV3 cells in si-RNA group

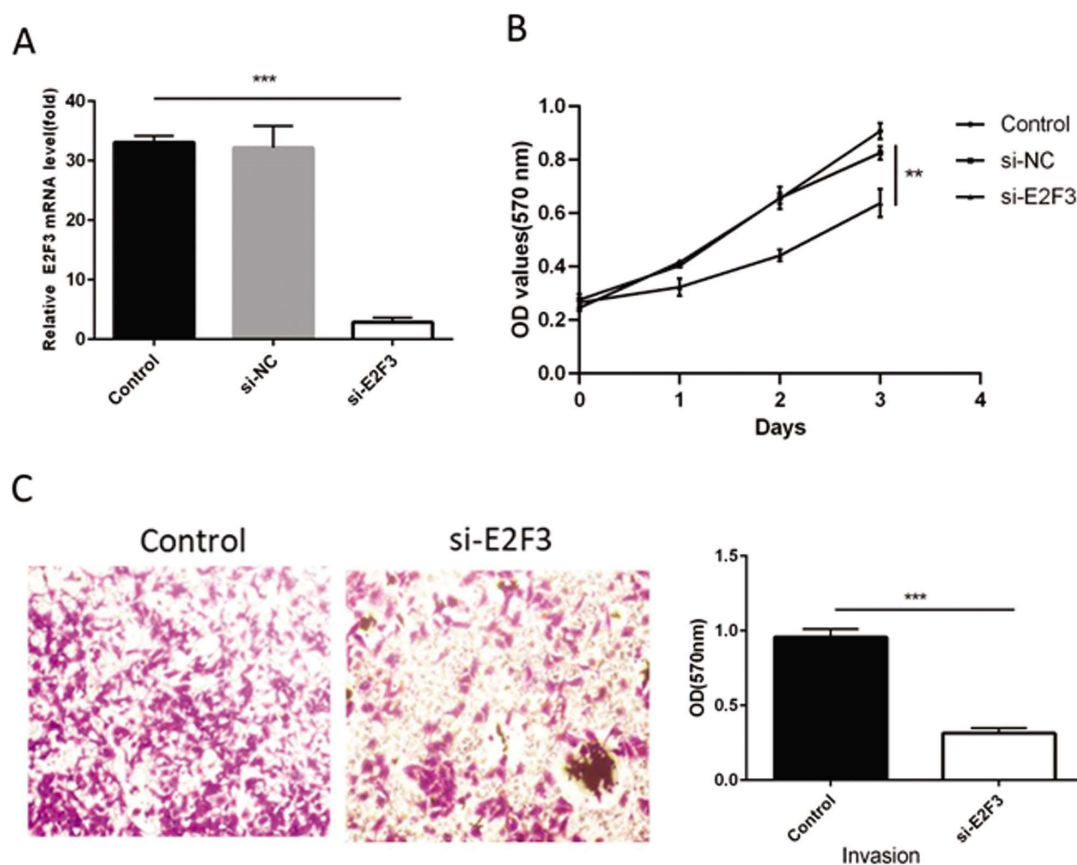


图5 A: qRT-PCR 检测 si-E2F3 转染效率; B: CCK-8 观察 si-E2F3 转染后 SKOV3 细胞增殖能力变化; C: Trans-well 观察 si-E2F3 转染 SKOV3 细胞侵袭能力变化

Fig.5 A: qRT-PCR detected the transfection efficiency of si-E2F3; B: CCK-8 observed the proliferation of SKOV3 cells after si-E2F3 transfection; C: Trans-well observed the invasive ability of si-E2F3 transfected SKOV3 cells

化实验检测 HMGB1 在卵巢癌组织和细胞系中的表达情况,结果显示 HMGB1 在卵巢癌组织和肝癌细胞系中显着上调,并且在 SKOV3 细胞上调倍数最高。在其他类型的人类恶性肿瘤中,比如食管癌,肺癌,膀胱癌和结肠直肠癌等,有数据和分析表明 HMGB1 促进了肿瘤细胞的增殖,侵袭和迁移能力^[28,29]。此外,CCK-8 和 Trans-well 实验分析表明,HMGB1 的下调显著抑制了 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力,这些结果表明 HMGB1 在卵巢癌发生发展过程中起到肿瘤促进因子的作用,其低表达后可以有效的抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的恶性生物学行为。

至于进一步的机制,我们假设 HMGB1 通过调节相应的基因来调节卵巢癌细胞的恶性生物学能力。我们采用 RNA-seq 的方法,检测了 HMGB1 低表达前后 SKOV3 细胞中基因在 RNA 水平的表达变化,结果发现 CXCL5、E2F3 和 FOXP3 在 HMGB1 低表达后下调的倍数位于前三,随后用 qRT-PCR 和 western blot 进行了验证,结果和 RNA-seq 的结果一致,其中 E2F3 的下调倍数最高。查阅文献我们发现 E2F3 在多种恶性肿瘤组织中的表达显着高于癌旁和正常组织^[30,31]。此外,较高的 E2F3 的过表达会导致结肠癌患者术后总体存活率较低。因此,为了找到证据证明 E2F3 参与卵巢癌进展的假设。在本研究中, RNA 沉默技术同样使 E2F3 在 SKOV3 细胞低表达,CCK-8 和 Trans-well 实验分析 E2F3 下调后 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力变化,结果发现其表达沉默后可以有效抑制 SKOV3 细胞增殖和侵袭能力,这与我们之前的生物信息学分析一致,进一步

证明 E2F3 在卵巢癌发生发展过程中充当致癌基因的角色。

综上所述,本研究揭示 HMGB1 通过直接靶向 E2F3 来促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭等恶性生物学行为。通过大量的实验检测和生物信息学分析,本研究对卵巢癌在基因水平发生机制有了一定的认识,同时为卵巢癌的临床治疗提供了可行的靶向治疗策略,因此对卵巢癌无论是致癌机制还是治疗都提供了一定的实验依据。但是 HMGB1 在入核靶向调控转录因子 E2F3 后,而 E2F3 又是激活下游哪条信号通路,将是我们下一步研究的重点。

参考文献(References)

- [1] Wolfram D, Tzankov A, Püzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids-a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management[J]. *Dermatol Surg*, 2015, 35(12): 171-181
- [2] Karagoz H, Bayram Y, Sever C, et al. A review of the prevention and treatment of hypertrophic scars: Part II experimental studies [J]. *Arch Clin Exp Surg*, 2015, 2(56): 49-58
- [3] Haga S, Ozawa T, Morita N, et al. Photo-Activatable Akt Probe: A New Tool to Study the Akt-Dependent Physiopathology of Cancer Cells[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(3): 467-472
- [4] Albiger L, Oudard S, Negrier S, et al. Complete remission with tyrosine kinase inhibitors in renal cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 30(5): 482-487
- [5] Y Umahara T, Uchiyama T, Hirokawa K, et al. Time-dependent and lesion-dependent HMGB1-selective localization in brains of patients

- with cerebrovascular diseases [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33 (2): 215-222
- [6] Xu T, Jiang L, Wang Z, et al. The progression of HMGB1-induced autophagy in cancer biology [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 31 (12): 365-377
- [7] Gong T, Su X, Xia Q, et al. Expression of NF- κ B and PTEN in osteosarcoma and its clinical significance [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6744-6748
- [8] Pongas GN, Annunziata CM, Staudt LM, et al. PI3K δ inhibition causes feedback activation of PI3K α in the ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 81794-81802
- [9] Liu G, Friggeri A, Yang Y, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis [J]. *J Exp Med*, 2015, 207 (31): 1589-1597
- [10] 郭辉, 张斌, 胡利民, 等. 微小 RNA-145 靶向调控 SOX11 表达及其对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2018, 23 (3): 200-205
- [11] Nishikawa M, Miyake H, Harada K, et al. Expression level of phosphorylated-4E-binding protein 1 in radical nephrectomy specimens as a prognostic predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with mammalian target of rapamycin inhibitors[J]. *Med Oncol*, 2015, 31(1): 792
- [12] She QB, Halilovic E, Ye Q, et al. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors[J]. *Cancer Cell*, 2016, 18(1): 39-51
- [13] 李妍晨, 黄才斌, 刘瑶, 等. 高迁移率蛋白 B1 在高糖微环境诱导人肝细胞恶性转化过程中作用和机制的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(02):137-142
- [14] 杨长群, 刘婷婷, 金志珊, 等. TTTY10 调控 miR-490-3p 通过 HMGB1 信号通路对宫颈癌细胞迁移和侵袭的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(06): 562-567
- [15] 姜亮亮, 王晶. 上皮性卵巢癌远处转移的诊治进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 12(05): 480-482
- [16] 杨芳芳, 杨清. 卵巢癌组织 BRCA1 转录调节:启动子位点 1-2 高甲基化介导的组蛋白修饰 H3K9ac 富集丢失 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 14(23): 3731-3734
- [17] 朱宏明, 尹丽, 何侠. Notch 信号通路介导 EMT 与肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 12(08): 808-812
- [18] 郭艳平, 武磊, 张兵, 等. DNMT1 在卵巢癌组织中的表达及其对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 21(24): 3885-3889
- [19] Monisha J, Padmavathi G, Roy NK, et al. NF- κ B Blockers Gifted by Mother Nature: Prospectives in Cancer Cell Chemosensitization[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(27): 4173-200
- [20] Cheng W, Deng C, Jin L, et al. Role of NF- κ B/survivin signal pathway on intima hyperplasia of rat carotid balloon injury restenosis model[J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2015, 43(3): 248-53
- [21] Zhang LN, Kong CF, Zhao D, et al. Fusion with mesenchymal stem cells differentially affects tumorigenic and metastatic abilities of lung cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 9(12): 23-25
- [22] Levin G, Coelho T M, Nobrega N G, et al. Spatio-temporal expression profile of matrix metalloproteinase (Mmp) modulators Reck and Sparc during the rat ovarian dynamics [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 116
- [23] Komiyama S, Nagashima M, Taniguchi T, et al. Ovarian Clear Cell Carcinoma Detected During Long-Term Management of Endometriotic Cysts in Young Patients: Possible Heterogeneity of this Tumor[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2018, 18(2): 1-8
- [24] Sehouli J, Braicu E I, Richter R, et al. Prognostic significance of Ki-67 levels and hormone receptor expression in low-grade serous ovarian carcinoma: an investigation of the tumor bank ovarian cancer network[J]. *Hum Pathol*, 2018, 26(1): 116-118
- [25] Lew R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 17(2): 23-26
- [26] Boulsourani Z, Geromichalos G D, Katsamakas S, et al. Mononuclear copper (II) complexes with 2-thiophene carboxylate and N-N donors; DNA interaction, antioxidant/anti-inflammatory and antitumor activity [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 14(94): 493-508
- [27] Sanchez-Iglesias J L, Perez-Benavente A, Correa-Paris A, et al. Impact of Laparoscopy to Assess Resectability in Stage IIIC Epithelial Ovarian, Tubal and Peritoneal Cancer Patients[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2018, 21(4): 1-9
- [28] Chen X, Xiao Z, Xie X, et al. TNF- α -Induced NOD2 and RIP2 Contribute to the Up-Regulation of Cytokines Induced by MDP in Monocytic THP-1 Cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5072-5081
- [29] Wang F, Zhao X, Tan W, et al. Early identification of recurrence in ovarian cancer: a comparison between the ovarian cancer metastasis index and CA-125 levels[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5912
- [30] Lin K K, Harrell M I, Oza A M, et al. E2F3 Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2018, 15(16): 21-25
- [31] Heitz F, Harter P, du Bois A. E2F3 Author Reflections: Systematic Lymph Node Dissection in Ovarian Cancer Under Attack [J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 31(26): 32-34