

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: CUCUCUCCGCUCUGUAACAUAU)。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 μl , 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

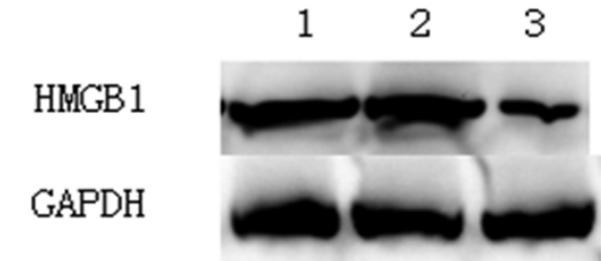


Figure 1 HMGB1 protein expression 1.blank group 2. control group 3. siRNA group

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