

人脑胶质瘤组织中 HMGB1 基因的表达及其意义

廖 锋 王穗暖 张 一 屈洪涛 贾文庆 杨国芳

摘 要 **目的** 通过检测人脑胶质瘤组织中 HMGB1 基因的表达水平,探讨其与胶质瘤发生发展的关系。**方法** 采用荧光实时定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法,检测了 42 例人脑胶质瘤组织和 20 例正常脑组织中 HMGB1 mRNA 表达水平,分析其与胶质瘤的关系。**结果** HMGB1 mRNA 在胶质瘤组、I ~ II 级胶质瘤组、III ~ IV 级胶质瘤组及对照组中的表达量分别为 $21.460\% \pm 3.185\%$ 、 $24.300\% \pm 6.673\%$ 、 $19.710\% \pm 3.179\%$ 、 $7.616\% \pm 1.449\%$ 。统计显示 HMGB1 mRNA 表达水平在胶质瘤组明显高于对照组($P < 0.05$),且在 I ~ II 级胶质瘤组及 III ~ IV 级胶质瘤组中均明显高于对照组($P < 0.05$),但 HMGB1 mRNA 在 I ~ II 级胶质瘤组与 III ~ IV 级胶质瘤组中的表达水平无显著差异($P > 0.05$)。**结论** HMGB1 基因在人脑胶质瘤组织中有高表达,说明 HMGB1 基因与胶质瘤的发生、发展过程密切相关。

关键词 脑胶质瘤 HMGB1 基因 实时定量 PCR

Expressions of HMGB1 in Human Gliomas and Their Significances with Pathological Grade. Liao Feng, Wang Suinuan, Zhang Yi, et al. Department of Neurosurgery, The Second Hospital of Shaoxing, Zhejiang 312000, China

Abstract **Objective** To explore the relationship between the gene and glioma. by detecting the expression level of HMGB1 gene in human glioma tumor tissue. **Methods** Real-time quantitative reverse transcription PCR was performed on 42 glioma surgical specimens and 20 normal brain specimens. Statistical analysis was used to interpret the relationship between the expression and glioma. **Results** HMGB1 mRNA expression level in glioma was significantly higher than that in normal brain tissues($P < 0.05$), but there was no significance statistical difference between the expression of HMGB1 mRNA in gliomas of grade I - II and that in gliomas of grade III - IV($P > 0.05$). **Conclusion** HMGB1 mRNA is highly expressed in human gliomas, which may play an important role in the oncogenesis and progression of human gliomas.

Key words Human glioma; HMGB1; RT-PCR

高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box-1, HMGB1) 是一种存在于真核生物细胞内的非组蛋白染色体结合蛋白。研究表明它不但是一种转录因子和促生长因子,而且是一种重要的炎性细胞因子,并与肿瘤的发生、浸润、转移等生物学行为关系密切,有很大的临床价值。HMGB1 在多种肿瘤中都存在蛋白高表达和基因扩增,但鲜有从基因水平研究 HMGB1 基因与胶质瘤关系的报道。本研究应用 RT-PCR 方法检测人脑胶质瘤患者肿瘤组织中 HMGB1 mRNA 的表达水平,探讨 HMGB1 基因与胶质瘤的关系。

材料与方法

1. 材料:收集常州市第一人民医院神经外科 2003 ~ 2007 年术后经病理证实的人脑胶质瘤标本 42 例为实验组,男性 26

例,女性 16 例。患者年龄 17 ~ 72 岁,平均年龄 45.86 ± 1.96 岁。肿瘤组织按 WHO 中枢神经系统病理分级标准(2000 年)分为 I ~ II 级 16 例,其中男性 11 例,女性 5 例,患者平均年龄 42.38 ± 2.87 岁;III ~ IV 级 26 例,其中男性 15 例,女性 11 例,患者平均年龄 48.00 ± 2.58 岁。统计学分析显示各组间年龄、性别构成无明显差异($P > 0.05$)。所有病理诊断均经两位以上有经验的病理医师同时确诊。另收集 20 例因颅脑外伤行开颅减压手术时的周围正常脑组织标本作为对照组。所有标本采集后均立即置入液氮灌。

2. 主要试剂:RNA 快速制备试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司)用于总 RNA 提取。RevertAid 首链 cDNA 合成试剂盒(立陶宛 MBI Ferments 公司)用于 cDNA 合成。HMGB1 质粒标准品(上海申友生物有限公司),Taq 酶、dNTP、 $10 \times$ Buffer、 25 mmol/L MgCl_2 (上海申能博彩生物科技有限公司),HMGB1 和 GAPDH 的引物及 TaqMan 探针序列(上海生物工程技术有限公司)用于实时定量 PCR。

3. 技术与方法:(1)总 RNA 提取和反转录合成 cDNA:严格按照 Trizol Reagent 试剂盒说明书提取组织总 RNA。紫外分光光度计测定显示 OD260/OD280 在 1.8 ~ 2.0 之间,并测定 RNA 浓度。取 $2 \mu\text{g}$ (据其浓度换算成体积 μl) 总 RNA 按反

作者单位:312000 浙江省绍兴第二医院神经外科(廖锋、贾文庆、杨国芳);213000 常州市第一人民医院神经外科(王穗暖、张一、屈洪涛)

通讯作者:廖锋,电子信箱:3731862@qq.com

转录试剂盒说明书进行反转录,反转录成 cDNA。(2)实时定量 PCR 检测:采用 Light Cycler 荧光实时定量 PCR 仪检测。以 3-磷酸甘油脱氢酶基因 GAPDH 的表达作为内参。HMGB1 和 GAPDH 的引物及 TaqMan 探针序列见表 1。PCR 的反应体积为 25μl,由 cDNA2μl,ddH₂O 16.95μl,10×Buffer 2.5μl,25mmol/L MgCl₂ 2.5μl,100μmol/L 上、下游引物及探

针各 0.1μl,dNTP0.5μl,Taq 酶 0.25μl。反应条件为:第一阶段预变性 95℃ 300s,第二阶段变性 95℃ 5s,退火延伸 60℃ 15s,共 40 个循环。最后 40℃ 30s 终止。将已知基因拷贝数的 HMGB1 阳性模板标准品从 10⁹ 到 10⁴ 倍稀释行标准曲线法。GAPDH 的 RT-PCR 反应体系与反应条件同 HMGB1。

表 1 HMGB1 和 GAPDH 的引物及 TaqMan 探针序列

引物名称	引物及 TaqMan 探针序列	产物长度
HMGB1	正义引物 5'-AGGATCCCAATGCACCCAAGAG-3'	112bp
	反义引物 5'-TTCGCAACATCACCAATGGACAG-3'	
	探针 5'-(FAM)CTCCTTCGGCCTTCTTCTCTTCTGC(TAMRA)-3'	
GAPDH	正义引物 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	258bp
	反义引物 5'-CGTTCTCAGCCTTGACGGT-3'	
	探针 5'-(FAM)TTTGTCGTATTGGCGGGTG(TAMRA)-3'	

4. 统计学方法:对于每一份标本均行复管检测,取其均值作为 HMGB1 基因拷贝数。以同一份标本 HMGB1 拷贝数/GAPDH 拷贝数表示 HMGB1 基因的表达水平,定义为 HMGB1_N(normalized HMGB1 expression level)。用 SPSS 15.0 软件处理数据,计量资料经过正态性检验和方差齐性检验,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 实验组与对照组中 HMGB1 mRNA 表达水平的比较:HMGB1 mRNA 在胶质瘤组、I~II 级胶质瘤组、III~IV 级胶质瘤组中的表达量与对照组中的表达量的比较均有显著差异。示实验组中 HMGB1 mRNA 表达水平明显高于对照组(*P* < 0.05),详见表 2。

表 2 HMGB1 基因在各实验组与对照组中的表达的比较(%)

组别	<i>n</i>	HMGB1 _N 表达量($\bar{x} \pm s$)
胶质瘤组	42	21.460 ± 3.185 *
胶质瘤 I~II 级	16	24.300 ± 6.673 *
胶质瘤 III~IV 级	26	19.710 ± 3.179 *
对照组	20	7.616 ± 1.449

与对照组比较,**P* < 0.05

2. I~II 级胶质瘤组与 III~IV 级胶质瘤组中 HMGB1 mRNA 表达水平的比较:HMGB1 mRNA 在胶质瘤 I~II 级组中的表达量与在胶质瘤 III~IV 级组中的表达量无显著差异(*P* > 0.05),详见表 3。

讨 论

胶质瘤是中枢神经系统最具有侵袭性的肿瘤之一,其发生发展涉及多种基因和蛋白交叉作用,对治疗的敏感度差^[1]。其难以控制的细胞增殖、细胞凋

亡速度的减慢、肿瘤细胞的侵袭性以及新生血管生长等生物学行为使胶质瘤的治疗面临巨大困难。因此如何进一步提高胶质瘤的治疗效果仍需要对包括胶质瘤发生、发展的分子机制以及新的治疗方法的不断探索。

表 3 HMGB1 基因在胶质瘤 I~II 级组与 III~IV 级组中的表达比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	HMGB1 _N 表达量
胶质瘤 I~II 级	16	24.300 ± 6.673
胶质瘤 III~IV 级	26	19.710 ± 3.179

HMGB1 因其分子质量小(<30kDa)且在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而被命名为高迁移率族蛋白(HMG 蛋白)。人 HMGB1 基因位于染色体 13q12,编码含 219 个氨基酸残基,可分为 3 个功能区:N-末端(A 区和 B 区)富含带正电荷的赖氨酸,而 C-末端(C 区)富含带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸^[2]。HMGB 主要通过参与增强体的形成来调节基因转录,它通过影响或参与转录起始复合物的形成而起上调基因表达的作用,在启动子/增强子中增强体的形成位点上,HMGB 使 DNA 序列发生弯折并结合于弯折的 DNA 小沟处,利于其他转录因子的结合。另外,HMGB1 还通过参与染色质/核小体重建来调节基因转录。HMGB1 与组蛋白 H1 可竞争结合 DNA 上的结合位点,使核小体结构趋于稳定,而 HMGB1 结合后可以使缠绕在核心组蛋白上的 DNA 局部移位、变形,使其他转录因子或复合物的结合位点暴露,促使转录相关的大分子复合物形成^[3]。

已有研究证实 HMGB1 在多种消化系统肿瘤及

许多癌性细胞株中都有过表达^[4]。刘勇等^[5]通过免疫组化证实, HMGB1 蛋白在喉鳞癌组织中的表达较癌旁组织显著上调, 且其高表达与喉鳞癌的 T 分期、临床分期、转移和复发密切相关。Sharma 等^[6]研究发现 HMGB1 的表达水平与肿瘤的发生阶段相关, 在肿瘤发生早期、晚期中的表达率分别为 20%、80%。有研究表明 HMGB1 在正常脑组织中不表达或低水平表达^[7]。本研究证实 HMGB1 基因在胶质瘤中存在高表达, 说明其在胶质瘤的发生、发展中起重要作用。Hao 等^[8]研究 HMGB1 在子宫颈癌中的表达发现其在子宫颈鳞状细胞癌与癌旁组织中的表达无明显差异, 但与正常子宫颈组织比较具有明显差异, 而且发现其过表达与肿瘤转移存在明显相关性, 但与肿瘤级别及大小无明显相关性。本研究发现 HMGB1 基因在胶质瘤组中的表达水平明显高于对照组, 但在 III ~ IV 级中的表达水平与 I ~ II 级无明显差异。由于本组例数相对较少, 尚不能确定 HMGB1 基因在胶质瘤中的表达与其恶性程度之间的关系, 但可以确定的是 HMGB1 的异常表达与胶质瘤的发生、生长及浸润有关。

HMGB1 是如何介导肿瘤产生, 其具体机制目前尚未完全阐明。HMGB1 对细胞的作用主要通过其与信号转导受体 RAGE 在细胞表面结合, 激发细胞内 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、细胞外信号调节激酶 1 和 2 (ERK1/2)、核因子 NF- κ B 等多种信号转导机制, 从而使细胞释放其他因子及功能发生改变或表达失调。HMGB1 启动星形胶质细胞激活, 分泌潜在的生物活性因子, 涉及脑部炎症反应和免疫反应, HMGB1 与其受体参与了某些中枢神经系统疾病的炎症反应、细胞凋亡以及血脑屏障通透性增加等病理生理学过程, 加重了缺血性卒中、神经胶质瘤等疾病的病情^[9,10]。Bassi 等^[11]对 HMGB1 及 RAGE 在 T98G 胶质瘤细胞系中的表达以及两者之间的关系的研究中, 发现 HMGB1 作为一种胶质瘤细胞自分泌因子参与了 RAGE 的活化, 证明胶质瘤中确实有 HMGB1/RAGE 信号通路的存在。还有人推测 HMGB1 的高表达影响肿瘤的发生, 其机制可能是前者高表达引起某种基因表达失调, 从而导致肿瘤表型, 抑或是 HMGB1 过表达可使获得肿瘤表型的细胞

免于凋亡, 促进肿瘤发生^[12]。

HMGB1 和人脑胶质瘤的发生发展相关, 但是否可以作为独立的判断指标, 以及其在胶质瘤诊断、治疗中的应用还需要进一步的研究。本课题着力于胶质瘤基因水平的研究, 下一步将进一步探讨其蛋白水平的表达, 力求从蛋白与基因双重水平进行验证。

参考文献

- 1 杨冬, 王忠诚. 胶质瘤的神经分子病理学检测指标及其意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(19): 1508-1511
- 2 Muller S, Scaffidi P, Degryse B, *et al.* The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal[J]. EMBO, 2001, 20(16): 4337-4340
- 3 Bonaldi T, Längst G, Strohner R, *et al.* The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding[J]. EMBO J, 2002, 21(24): 6865-6873
- 4 Xu Y, Sumter TF, Bhattacharya R, *et al.* The HMG-1 oncogene causes highly penetrant, aggressive lymphoid malignancy in transgenic mice and is overexpressed in human leukemia[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3371-3375
- 5 刘勇, 谢丛良, 邱元正, 等. 高迁移率族蛋白 1 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(2): 132-136
- 6 Sharma A, Ray R, Rajeswari MR. Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin[J]. Cancer Invest, 2008, 26(8): 843-851
- 7 Guazzi S, Strangio A, Franz AT, *et al.* HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(1): 29-33
- 8 Hao Q, Du XQ, Fu X. Expression and clinical significance of HMGB1 and RAGE in cervical carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2008, 30(4): 292-295
- 9 Pedrazzi M, Patrone M, Passalacqua M, *et al.* Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling[J]. J Immunol, 2007, 179(12): 8525-8532
- 10 王力娜, 刘玲玲, 崔丽丽, 等. 高迁移率族蛋白 B1 与中枢神经系统疾病[J]. 国际脑血管病杂志, 2009, 17(10): 797-800
- 11 Bassi R, Giussani P, Anelli V, *et al.* HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration[J]. J Neurooncol, 2008, 87(1): 23-33
- 12 Müller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function[J]. J Intern Med, 2004, 255(3): 332-343

(收稿日期: 2013-02-07)

(修回日期: 2013-03-18)