

## • 实验研究 Experimental research •

高迁移率族蛋白 B1 对激素难治性前列腺癌  
冷冻免疫反应的影响

刘长富, 郭志, 司同国, 邢文阁, 刘方, 于海鹏

**【摘要】 目的** 探讨高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 对激素难治性前列腺癌冷冻免疫反应的影响。**方法** 复制 RM-1 细胞激素非依赖性前列腺癌模型, 将 50 只小鼠随机分为对照组 ( $n = 25$ ) 和冷冻消融治疗组 ( $n = 25$ )。利用氩氦冷冻系统针式冷冻器行皮下移植瘤冷冻消融治疗。分别于冷冻消融治疗前、治疗后 1、7、14、21 d 应用 Western 印迹技术检测 HMGB1 蛋白在肿瘤局部的表达情况, 应用流式细胞术检测肿瘤局部树突状细胞 (DC) 的数量及活化比例。**结果** 治疗组肿瘤局部 HMGB1 表达水平及 DC 数量及活化比例均于术后第 7 天达最高值, 与术前相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 对照组 HMGB1 表达水平及 DC 数量及活化比例无明显改变, 组内比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。治疗组术后 1、7、14 d, 肿瘤局部 HMGB1 表达水平及 DC 数量及活化比例均高于对照组, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。相关性分析显示, 治疗组肿瘤局部 HMGB1 表达量与 DC 数量、DC 活化比例均呈高度正相关 ( $r = 0.883, r = 0.997, P < 0.05$ )。**结论** 冷冻消融治疗导致肿瘤细胞坏死的同时可释放大量 HMGB1, 这些释放至细胞外的 HMGB1 在冷冻消融治疗后刺激机体产生特异性抗肿瘤冷冻免疫反应中发挥重要作用。

**【关键词】** 前列腺癌; 冷冻消融; 高迁移率蛋白 B-1; 树突状细胞

中图分类号: R737.25 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2013)-06-0494-04

**The effect of high mobility group protein B1 on cryoimmunologic reaction in hormone-refractory prostate cancer: an experimental study in rats** LIU Chang-fu, GUO Zhi, SI Tong-guo, XING Wen-ge, LIU Fang, YU Hai-peng. Department of Interventional Therapy, Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

Corresponding author: GUO Zhi, E-mail: luichangfu@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact of high mobility group protein B1 (HMGB1) on cryoimmunology response in hormone-refractory prostate cancer (HRPC). **Methods** Mouse models of HRPC were established by subcutaneous injection of RM-1 prostate cancer cells, and a total of 50 tumor-bearing mice were randomly divided into control group ( $n = 25$ ) and cryoablation group ( $n = 25$ ). Cryoablation was applied to the tumor lesion through cryosurgery needle with 1.7mm diameter by using Endocare Argon-Helium cryosurgery system (AHCS). The number and maturation changes of dendritic cell (DC) in tumor were assessed by flow cytometry and the levels of HMGB1 in tumor tissues were determined by Western blot technology one day before cryosurgery as well as one, 7, 14 and 21 days after cryosurgery separately. **Results** In cryoablation group, the levels of HMGB1 as well as the number and maturation of DC in tumor tissues reached their highest peaks in the 7th day after AHCS, and compared with the levels determined before treatment the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). However, in control group no significant differences in the levels of HMGB1 as well as in the number and maturation of DC in tumor tissues

existed between preoperative data and post operative ones ( $P > 0.05$ ). The levels of HMGB1 as well as the number and maturation changes of DC in tumor tissues determined at one, 7 and 14 days after cryosurgery in cryoablation group were significantly higher than those in control group

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001002); 天津市卫生局科技基金资助项目(2010KZ71)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2013.06.013

作者单位: 300060 天津医科大学附属肿瘤医院介入治疗科 天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者: 郭志 E-mail: luichangfu@163.com

( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that the expression levels of HMGB1 had a parallel relationship with the number of DC ( $r = 0.883$ ,  $P < 0.05$ ) as well as with the maturation changes of DC ( $r = 0.997$ ,  $P < 0.05$ ) in the cryoablation group. **Conclusion** Cryoablation therapy can make the tumor cells release large amount of HMGB1 in association with tumor cell necrosis. And the released extracellular HMGB1 plays an important role in stimulating the body to produce the tumor-specific immune response after the cryoablation therapy. (J Intervent Radiol, 2013, 22: 494-497)

**【Key words】** prostate cancer; cryoablation; high mobility group protein B1; dendritic cell

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, 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, 参与包括基因转录、DNA 修复等多种生物学过程<sup>[1-2]</sup>, 释放至细胞外的 HMGB1 可作为内源性免疫调节因子, 影响免疫反应的启动和激烈程度<sup>[3-4]</sup>。相关研究显示, HMGB1 在多种肿瘤细胞中呈高表达<sup>[1,5-7]</sup>, 冷冻消融治疗是否能在导致大量肿瘤细胞坏死的同时使肿瘤细胞内的 HMGB1 释放至细胞外, 这些释放的 HMGB1 是否能促进树突状细胞(DC)数量增加及增高其活化程度, 进而对冷冻免疫反应产生影响, 目前尚少见相关研究报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及实验动物皮下移植瘤模型建立

小鼠前列腺癌细胞 (RM-1) 株由上海中科院细胞库提供。清洁级纯种近交系 C57BL/6(H-2D<sup>b</sup>) 雄性小鼠 50 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自中国科学院天津血液病研究所实验动物中心。取对数生长期的 RM-1 细胞, 调细胞浓度至  $5 \times 10^6$  个/ml。取雄性 C57BL/6 小鼠, 用 1 ml 注射器将 0.1 ml 肿瘤细胞接种于右腹股沟皮下, 每 3 d 观察肿瘤生长情况。

### 1.2 实验分组

将 50 只 RM-1 细胞激素非依赖性前列腺癌模型小鼠随机分为对照组 25 只, 不予任何治疗; 治疗组 25 只, 给予冷冻消融治疗。

### 1.3 氩氦冷冻消融治疗技术操作步骤

接种肿瘤后第 2 周(肿瘤直径约 1 cm), 于荷瘤鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg) 麻醉后, 仰卧固定于操作台上。采用的氩氦冷冻消融系统 (Cryocare™ Surgical System) 为美国 Endocare 公司产品。右侧腹股沟处常规消毒、铺巾, 在瘤旁切一小口, 直视下将直径 1.7 mm 的氩氦冷冻探针刺入肿瘤组织内 6~8 mm。启动氩气, 工作压力 17 225 kPa (2 500 psi), 初始功率均为 20% 条件下, 冷冻时间为 30 s, 冰球完全覆盖肿瘤, 可见肿物表面完全覆盖冻

霜, 中央温度可达  $-120^{\circ}\text{C}$ , 启动氦气复温至  $10^{\circ}\text{C}$ , 为第 1 个冷冻循环。同样方法重复第 2 个冷冻循环。冷冻治疗结束后拔出冷冻器, 缝合皮肤。

### 1.4 标本采集

两组分别于治疗前、治疗后 1、7、14、21 d 各取 5 只小鼠, 无菌条件下, 取肿瘤组织并制备单细胞悬液。

### 1.5 Western 印迹及流式细胞仪检测

采用 Western 印迹法检测不同时间点肿瘤局部组织中 HMGB1 表达情况, Western 印迹反应结果应用 Bio-Rad 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国) 照相记录, 应用 QuantityOne Basic 软件进行条带灰度扫描, 计算积分吸光度 (IA) 值。收集的细胞悬液混匀后, 分别取 100  $\mu\text{l}$  加入离心管, 分别标定为 CD11c、CD86、CD80, 同时设标准对照管, 应用流式细胞仪 (BD 公司, 美国) 检测细胞表面抗体的表达情况。

### 1.6 统计方法

采用 SPSS13.0 软件包进行数据分析。将数据统一编码后, 录入 EXCEL 数据库, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组内不同时间点的比较采用 ANOVA 方差分析、各时间点两组之间比较采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验、相关性分析采用 Pearson 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 治疗前、后肿瘤局部组织中 HMGB1 表达

与术前比较, 治疗组术后第 7 天肿瘤局部组织中 HMGB1 表达水平显著增高 ( $P < 0.01$ ), 随时间延长逐渐下降, 至术后 21 d 恢复至术前水平 ( $P > 0.05$ )。对照组肿瘤局部 HMGB1 表达水平无明显改变, 各时间点之间比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。相同时间点肿瘤局部 HMGB1 表达水平在术后 1、7、14 d 治疗组均高于对照组, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1 和图 1。

### 2.2 治疗前、后肿瘤局部浸润 DC 细胞比例变化

表 1 术后肿瘤局部 HMGB1 蛋白表达水平变化

(n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	HMGB1 蛋白表达水平				
	术前	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
对照组	0.235 5 ± 0.015 7	0.234 5 ± 0.014 2	0.237 5 ± 0.015 1	0.245 5 ± 0.014 9	0.248 7 ± 0.016 2
治疗组	0.243 0 ± 0.021 3	0.467 2 ± 0.079 2 <sup>ab</sup>	0.678 5 ± 0.102 1 <sup>ab</sup>	0.485 2 ± 0.084 2 <sup>ab</sup>	0.287 5 ± 0.021 9

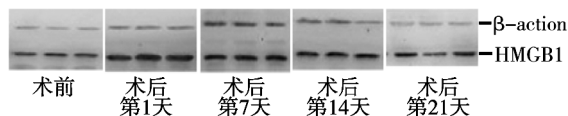
注: <sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 与对照组比较  $P < 0.05$ 

图 1 治疗组术后肿瘤局部 HMGB1 表达水平

与术前比较,治疗组术后第 7 天肿瘤局部组织中 DC 细胞比例显著增高( $P < 0.01$ ),随时间延长逐渐下降,至术后 21 d 恢复至术前水平( $P > 0.05$ )。对照组肿瘤局部 DC 细胞比例无明显改变,各时间点之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。治疗组术后 1、7、14 d 相同时间点肿瘤局部 DC 细胞比例均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 肿瘤局部 DC 细胞比例变化 (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	DC 细胞比例(%)				
	术前	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
对照组	3.80 ± 0.33	3.78 ± 0.23	3.69 ± 0.26	3.56 ± 0.31	3.55 ± 0.31
治疗组	3.70 ± 0.42	4.08 ± 0.50 <sup>ab</sup>	9.66 ± 0.51 <sup>ab</sup>	5.32 ± 0.39 <sup>ab</sup>	3.87 ± 0.51

注: <sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 与对照组比较  $P < 0.05$ 

### 2.3 冷冻消融治疗对肿瘤局部 DC 活化比例的影响

与术前比较,治疗组术后第 1 天肿瘤局部 DC 活化比例开始增多( $P < 0.01$ ),于术后第 7 天达最高值( $P < 0.01$ ),之后随时间延长,逐渐下降,至术后第 21 天恢复至术前水平( $P > 0.05$ )。对照组肿瘤局部 DC 活化比例无明显改变,各时间点之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。术后 1、7、14 d 相同时间点肿瘤局部 DC 活化比例治疗组均高于对照组,组间差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 治疗后肿瘤局部 DC 活化比例变化 (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	DC 细胞活化比例(%)				
	术前	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
对照组	11.2 ± 1.35	11.6 ± 1.27	11.4 ± 1.21	11.2 ± 1.64	10.8 ± 1.64
治疗组	10.8 ± 1.48	17.4 ± 1.17 <sup>ab</sup>	25.8 ± 0.84 <sup>ab</sup>	18.6 ± 1.52 <sup>ab</sup>	11.6 ± 1.14

注: <sup>a</sup> 与术前比较  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 与对照组比较  $P < 0.05$ 

治疗组肿瘤局部 HMGB1 表达量与 DC 数量、活化比例均成高度正相关( $r = 0.883$ ,  $r = 0.997$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

HMGB1 广泛分布于高等生物真核细胞核内,多种病理过程中组织细胞的坏死和损伤,均可使核内的 HMGB1 游离并释放至细胞外甚至血清中,作

为细胞因子的 HMGB1 释放到细胞外可产生多种生物学效应<sup>[3-4]</sup>。相关研究显示 HMGB1 在多种肿瘤均呈高表达<sup>[1,5-7]</sup>,氩氦冷冻消融治疗作为一种物理消融治疗方式能短时间内导致肿瘤细胞坏死,在肿瘤细胞坏死的同时是否会导致肿瘤细胞内 HMGB1 释放至细胞外,以及 HMGB1 释放至细胞外的量与时间的关系如何,国内外尚少见相关文献报道。

本实验结果显示,对荷瘤小鼠实施冷冻消融治疗后肿瘤局部组织中 HMGB1 明显增高,并于术后第 7 天达最高值,之后随着时间延长逐渐下降于术后第 21 天恢复至术前水平。以往实验结果证实, HMGB1 在前列腺癌组织中高表达<sup>[1,7]</sup>。冷冻消融治疗可以导致肿瘤细胞大量坏死,而细胞坏死或损伤是 HMGB1 释放的重要途径之一<sup>[8]</sup>,因此我们有理由相信肿瘤组织局部存在的大量 HMGB1 是由冷冻消融导致肿瘤细胞坏死后释放至细胞外。同时本实验结果亦显示在接受冷冻消融治疗后, HMGB1 于术后第 7 天达到最高值,分析其原因主要为:氩氦冷冻消融治疗可使肿瘤组织快速冷至  $-160^{\circ}\text{C}$  以下,可直接引起癌细胞脱水和破裂;同时也会破坏肿瘤小血管而致缺氧,进而导致更多的肿瘤细胞死亡<sup>[9]</sup>,释放更多的 HMGB1。

新近研究表明,作为免疫佐剂的 HMGB1 能够加速炎性粒细胞向抗原侵入的地方移动,并能促进 APC 和 DC 活化,并且能加速他们到达淋巴结及促进静止的 T 淋巴细胞活化,诱导细胞毒性因子释放,间接影响其他免疫细胞<sup>[10-13]</sup>。有关坏死细胞反应的成熟 DC 细胞中是否含有 HMGB1 的研究结果显示,在坏死的海拉癌细胞株培养上清液中含有具有 HMGB1 的成熟的 DC 细胞,在上清液中加入 HMGB1 抗体能阻止 DC 成熟,缺乏 HMGB1 的上清液中坏死细胞诱导 DC 细胞成熟作用明显减弱<sup>[14]</sup>。冷冻消融导致肿瘤细胞坏死释放的 HMGB1 对 DC 数量的变化及活化程度能够产生何种影响,本研究将肿瘤局部组织中 DC 数量、DC 活化比例与肿瘤组织局部 HMGB1 的表达水平行相关分析,结果显示 DC 细胞数量及活化程度与肿瘤组织 HMGB1 表达水平呈高度正相关关系。说明冷冻消融治疗后机体内 HMGB1 介导了体内 DC 数量、DC 活化比例的增

高。上述结果说明单纯冷冻消融治疗能够通过 HMGB1 释放刺激机体 DC 数量增加和活化程度提高,进而增强机体特异性抗肿瘤免疫反应。

然而, HMGB1 通过何种确切的机制实现对 DC 以及冷冻免疫反应的调节有待深入研究。随着对冷冻免疫反应及其受体调控机制研究的深入及相关信号通路的逐渐阐明,将为冷冻免疫反应研究开辟新途径。

#### [参考文献]

- [1] Todorova J, Pasheva E. High mobility group B1 protein interacts with its receptor RAGE in tumor cells but not in normal tissues [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3: 214 - 218.
- [2] Thomas JO, Stott K. H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40: 341 - 346.
- [3] 曹清心, 刘 宇, 凌昌全. HMGB1 与肿瘤相关性的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17: 282 - 285.
- [4] Kokkola B, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 61: 1 - 9.
- [5] Chen J, Xi B, Zhao Y, et al. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian Cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 126: 109 - 117.
- [6] 周宝勇, 郑 军, 侯俊丞, 等. HMGB1 在肝细胞癌中的表达及其与 VEGF、MVD 的关系 [J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37: 409 - 412.
- [7] Mengus C, Le Magnen C, Trella E, et al. Elevated levels of circulating IL-7 and IL-15 in patients with early stage prostate cancer[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 162.
- [8] Barqasho B, Nowak P, Abdurahman S, et al. Implications of the release of high - mobility group box 1 protein from dying cells during human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1800 - 1809.
- [9] Pitman M, Shapiro EY, Hruby GW, et al. Comparison of biochemical failure definitions for predicting local Cancer recurrence following cryoablation of the prostate [J]. *Prostate*, 2012, 72: 1802 - 1808.
- [10] Penza P, Moniuszko A, Zajkowska J. High mobility group box I (HMGB1) and its effect on dendritic cells [J]. *Pol Merkuriusz Lekarski*, 2012, 33: 129 - 132.
- [11] Allonso D, Belgrano FS, Calzada N, et al. Elevated serum levels of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in dengue - infected patients are associated with disease symptoms and secondary infection[J]. *J Clin Virol*, 2012, 55: 214 - 219.
- [12] Yang D, Chen Q, Yang H, et al. High mobility group box - 1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81: 59 - 66.
- [13] Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM - 3 and the alarmin HMGB1[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13: 832 - 842.
- [14] Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells[J]. *EMBO Rep*, 2004, 5: 825 - 830.

(收稿日期:2012-12-16)

(本文编辑:侯虹鲁)