

研究论文

槐定碱抑制人胃癌MKN45细胞的增殖并促进其凋亡

陈旭东, 华新宇*, 孔秀敏, 王晓兰

漯河医学高等专科学校组织胚胎学教研室, 漯河 462002

摘要: 本研究旨在探讨槐定碱对人胃癌MKN45细胞增殖和凋亡的影响及其可能的作用机制。将人胃癌MKN45细胞分为对照组和槐定碱组(设立6个浓度亚组)。用MTT法检测MKN45细胞增殖情况, 用免疫细胞化学染色法和Western blot观察细胞高迁移率组蛋白3 (high mobility group-box 3, HMGB3)的蛋白表达, 用Hoechst 33342染色法观察细胞形态变化, 用流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示, 槐定碱作用48 h能显著抑制MKN45细胞的增殖, 作用呈剂量依赖性。与对照组相比, 槐定碱作用48 h后MKN45细胞的HMGB3蛋白表达显著减少($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。以上结果提示, 槐定碱作用48 h可抑制人胃癌MKN45细胞的增殖, 促进其凋亡, 其机制可能与HMGB3表达下调有关。

关键词: 槐定碱; HMGB3; 胃癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R332; R338

Sophoridine inhibits the proliferation of human gastric cancer MKN45 cells and promotes apoptosis

CHEN Xu-Dong, HUA Xin-Yu*, KONG Xiu-Min, WANG Xiao-Lan

Department of Histology and Embryology, Luohe Medical College, Luohe 462002, China

Abstract: The purpose of the study was to investigate the effect of sophoridine on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer MKN45 cells and the possible mechanism. MKN45 cells were randomly divided into control and sophoridine (including 6 subgroups) groups. Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric method. The protein expression of high mobility group-box 3 (HMGB3) was observed by immunocytochemical staining and Western blot. Hoechst 33342 staining method was used to observe the morphological changes of cells treated with sophoridine. Apoptosis was detected by flow cytometry. The results showed that the proliferation of cells was inhibited by 48-hour treatment of sophoridine in a dose-dependent manner. Compared with control group, sophoridine group showed decreased HMGB3 protein expression and increased apoptotic rate. These results suggest that sophoridine can inhibit the proliferation of MKN45 cells and promote their apoptosis, which may be related to down-regulation of HMGB3 protein expression.

Key words: sophoridine; high mobility group-box 3; gastric cancer; proliferation; apoptosis

胃癌是全球癌症相关疾病而导致患者死亡的主要原因之一, 也是发展中国家的第二大最常见导致死亡的病因^[1, 2]。胃癌具有发病率高、生存周期短、死亡率高的特点, 在临床化疗中, 肿瘤细胞极易产生耐药性, 导致治疗效果大打折扣, 因此开发出更

多有效的抗肿瘤药物是胃癌治疗亟需解决的问题。目前公认胃癌是内因和环境因素共同作用的结果, 但具体细胞和分子发病机制仍不明^[3]。目前, 肿瘤的诊断和治疗正进入分子生物学时代, 分子生物标志物的应用不仅能提供诊断的依据, 而且也可能

Received 2018-01-15 Accepted 2018-03-17

This work was supported by the Natural Science Research Project of Luohe Medical College, Henan Province, China (No. 2014-S-LMC22).

*Corresponding author. Tel: +86-395-2112459; E-mail: 83106761@qq.com

为临床治疗提供治疗的靶点。高迁移率组蛋白 3 (high mobility group-box 3, HMGB3) 属于高迁移率族蛋白亚家族, 其在 DNA 复制、转录、重组、修复等方面起重要作用^[4,5]。HMGB3 在保持鼠造血干细胞自我更新与分化状态的平衡方面起重要作用^[6]。近来研究表明, 编码 HMGB3 蛋白的基因是白血病发病过程中一个新的致瘤基因^[7]。外周血 HMGB3 已被确定为肺癌的一个生物指标^[8]。HMGB3 在急性淋巴白血病的复发、进展期乳腺癌和胃癌患者体内呈现高表达^[9–12]。本研究组前期的研究表明, 与相应的癌旁正常组织相比, 胃癌组织 HMGB3 蛋白呈高表达^[13]。

槐定碱 (sophoridine) 为中药苦豆子中有效活性成分之一^[14], 属四环的喹诺里西啉单体生物碱, 其分子式为 C₁₅H₂₄N₀O₁₉32O, 分子量 248.36, 别名为苦参次碱-15-酮, 呈白色粗针状结晶或大棱柱状结晶 (可溶于石油醚), 具有抗炎抑菌、抗病毒、免疫抑制、抗肿瘤、抗心律失常等多种药理作用^[15]。近年来多项研究表明, 槐定碱能通过抑制肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移, 对肿瘤细胞发挥直接杀伤作用^[16]。槐定碱通过下调 Skp2 途径可抑制肺癌细胞的增殖和迁移^[17], 也能明显抑制人胃癌细胞株 SGC7901 细胞增殖^[18]。不过, 槐定碱对胃癌细胞 HMGB3 蛋白表达的影响尚未见报道。本研究通过研究槐定碱对人胃癌细胞 MKN45 的作用及其对细胞 HMGB3 蛋白表达的影响, 探讨槐定碱抗胃癌的可能作用机制, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌 MKN45 细胞系购自中国科学院上海细胞库; 槐定碱 (宁夏盐池县医药公司提供, 批号: 060630, 纯度 > 99%); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 RPMI-1640 培养基 (Gibco); 四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] (美国 Sigma 公司); Hoechst 33342 荧光染料 (碧云天生物技术有限公司); RIPA 裂解液、ECL 发光试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司, 二氟化树脂 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Millipore); 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 免疫细胞化学染色和 Western blot 所用一抗小鼠抗人 HMGB3 单克隆抗体、SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒 (棕黄色) 均购于北京中杉生物工程公司。其他仪器设备为: CO₂ 培养箱和超

低温冰箱 (美国 Thermo Forma 公司)、超纯水仪 (美国 Millipore 公司)、全自动酶标仪 (芬兰 Ladsystems 公司)、流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)、紫外分光光度计 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 细胞培养 人胃癌 MKN45 细胞系用 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、1 × 10⁵ U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 在培养箱内于 5% CO₂、37 °C 条件下培养。每 2~3 d 用胰酶消化, 传代培养, 密切观察细胞的生长情况, 槐定碱用 RPMI-1640 培养液溶解至 20 g/L 备用。

1.3 MTT 法检测槐定碱对胃癌细胞株 MKN45 增殖的影响

生长状态良好的 MKN45 细胞用无血清培养基同步化 12 h, 细胞浓度调至 5 × 10⁴ 个/mL 细胞悬液, 每孔 100 μL 加入 96 孔板中, 贴壁后弃上清, 板中设空白对照组 (孔内不含细胞, 只加等量的培养液)、阴性对照组 (给予等量的培养液)、槐定碱组 (含 6 个剂量组: 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mg/mL, 每个浓度设 5 个复孔)。37 °C、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 g/L), 37 °C 避光培养 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 DMSO 200 μL, 振荡 10 min, 使用酶标仪在 490 nm 波长处测量各孔吸光度值 (OD 值), 重复 4 次, 计算抑制率及半数抑制浓度 (IC₅₀)。抑制率 = (1 - 空白组 OD 值 / 实验组 OD 值) × 100%。

1.4 流式细胞仪凋亡分析 将阴性对照组和槐定碱组的 MKN45 细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中。处理 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, 用含血清的培养基清洗两次。离心收集 1 × 10⁵~5 × 10⁵ 个细胞, 500 μL 1× Annexin V 缓冲液 (Invitrogen) 重悬, 各加入 5 μL Annexin V-Cy-5 和 PI 溶液 (Invitrogen), 然后室温避光孵育 10 min。BD FACSCalibur 流式细胞仪测量荧光, CellQuest 软件分析数据。

1.5 免疫细胞化学染色检测 HMGB3 蛋白表达

取生长状态良好的 MKN45 细胞, 细胞密度调至 5 × 10⁴ 个/mL 细胞悬液, 接种在预置玻片的培养板中, 待细胞接近 70% 融合时, 参照 1.3 节方法分组并加药, 48 h 后取出玻片, 培养的细胞爬片经 40 g/L 多聚甲醛固定, PBS 洗涤后, 30 mL/L 过氧化氢室温 10 min, 血清封闭 20 min; 滴加小鼠抗人 HMGB3 抗体 (1:500), 4 °C 孵育过夜; PBS 冲洗后, 加生物素化大鼠抗小鼠二抗 (1:200), 37 °C 孵育 20 min, DAB 染色, 苏木素轻度复染、脱水、透明、中性树脂封片。以 PBS 代替一抗作空白对照, 在 400 倍显

显微镜下各组分别取 3 个 $6\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 大小的不同视野计算出阳性物质的 OD 值, 取其平均值, 作为该切片的数值。

1.6 Hoechst 33342 染色 按 1.5 节方法培养细胞于玻片上 48 h, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 Hoechst 33342 ($10\text{ }\mu\text{L}$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色 5 min, 在 200 倍荧光显微镜下观察细胞凋亡形态变化, 各组分别取 3 个 $6\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 大小的不同视野计算亮蓝色细胞核的数量, 取其平均值, 作为该玻片的数值。

1.7 Western blot 槐定碱作用 48 h 后, 收集各组细胞, RIPA 裂解液 (P0013B, 碧云天生物技术公司) 裂解细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法蛋白定量后, 取 $25\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离并转移至 PVDF 膜。封闭液 (5% BSA/TBST) 封闭 2 h, 加入一抗小鼠抗人 HMGB3 抗体 ($1:1\text{ }000$ 稀释), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ($1:1\text{ }000$ 稀释) 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光试剂盒 (P0018, 碧云天生物技术公司) 进行化学发光反应 2~5 min, 暗室 X 胶片显影, 随后在 BIO-RAD 化学发光成像系统下拍照并分析。用 ImageJ 软件进行灰度分析, 以 GAPDH 蛋白条带为内参, 并用 HMGB3 与 GAPDH 积分光密度值的比值表示 HMGB3 的相对水平。

1.8 统计分析 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。统计学分析采用 SPSS 17.0 软件。两样本平均值比较采用 Student's *t* 检验, 多样本间差异用单因素方差分析进行检验, 组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槐定碱抑制 MKN45 细胞增殖

MTT 检测结果显示, 与阴性对照组相比, 0.5 mg/mL 槐定碱组细胞增殖抑制率无明显变化, 而从 1.0 mg/mL 开始, 随着槐定碱浓度的升高, MKN45 细胞抑制率逐渐升高 ($P < 0.05$), 当达到 3.5 mg/mL 时, MKN45 细胞抑制率最高, 这表明当槐定碱浓度达到 1.0 mg/mL 以上时对 MKN45 细胞生长有显著的抑制作用, 且作用呈剂量依赖性 (图 1)。SPSS 17.0 软件计算结果显示, 槐定碱对 MKN45 细胞的 IC_{50} 值约为 2.51 mg/mL 。

2.2 槐定碱促进 MKN45 细胞凋亡

流式细胞术结果显示, 槐定碱处理 48 h 后, 和阴性对照组 ($10.3\% \pm 0.6\%$) 相比, 2.0 和 3.5 mg/mL

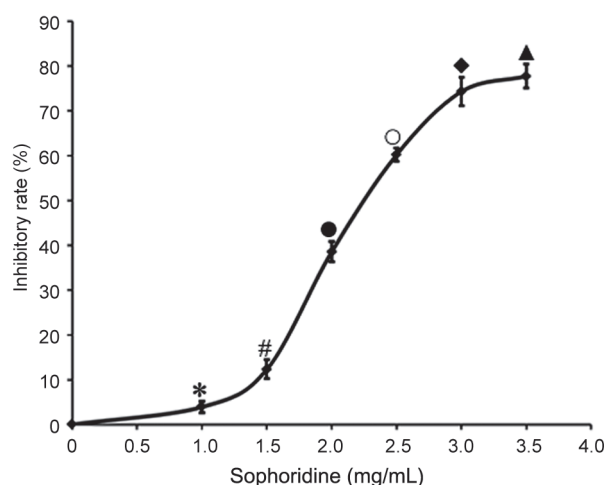


图 1 槐定碱对 MKN45 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1. Inhibitory effect of sophoridine on the proliferation of MKN45 cells detected by MTT assay. Mean $\pm$ SD, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control (0 mg/mL) group; # $P < 0.05$ vs 1.0 mg/mL ; • $P < 0.05$ vs 1.5 mg/mL ; ◯ $P < 0.05$ vs 2.0 mg/mL ; ♦ $P < 0.05$ vs 2.5 mg/mL ; ▲ $P < 0.05$ vs 3.0 mg/mL .

槐定碱组细胞凋亡率分别显著提高至 $32.5\% \pm 1.2\%$ 和 $40.2\% \pm 0.8\%$, 差异具有显著性 (均 $P < 0.05$, 图 2)。

Hoechst 33342 染色结果显示, Hoechst 33342 处理 5 min 后, 与对照组比较, 槐定碱组细胞核中染色质凝集固缩, 形成明显亮蓝色的凋亡小体。和阴性对照组 (4.21 ± 0.54) 相比, 2.0 和 3.5 mg/mL 槐定碱组细胞凋亡数分别提高至 11.31 ± 1.62 和 14.15 ± 1.25 , 差异具有显著性 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 槐定碱使 MKN45 细胞质中的 HMGB3 蛋白表达下降

免疫细胞化学染色结果显示, 对照组 HMGB3 蛋白在胞质中大量表达, 呈棕黄色; 与对照组相比, 2.0 和 3.5 mg/mL 槐定碱组 MKN45 细胞质中的 HMGB3 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 槐定碱下调 MKN45 细胞 HMGB3 蛋白表达

Western blot 结果显示, 和对照组相比, 2.0 和 3.5 mg/mL 槐定碱组 HMGB3 蛋白表达均显著下调, 差异具有显著性 ($P < 0.05$, 图 4)。

3 讨论

本研究结果显示, 槐定碱能显著抑制 MKN45 细胞的增殖。为了验证槐定碱对 MKN45 细胞凋亡率的影响, 我们采用流式细胞术和 Hoechst 33342 染色技术检测细胞凋亡情况。流式细胞术结果显示,

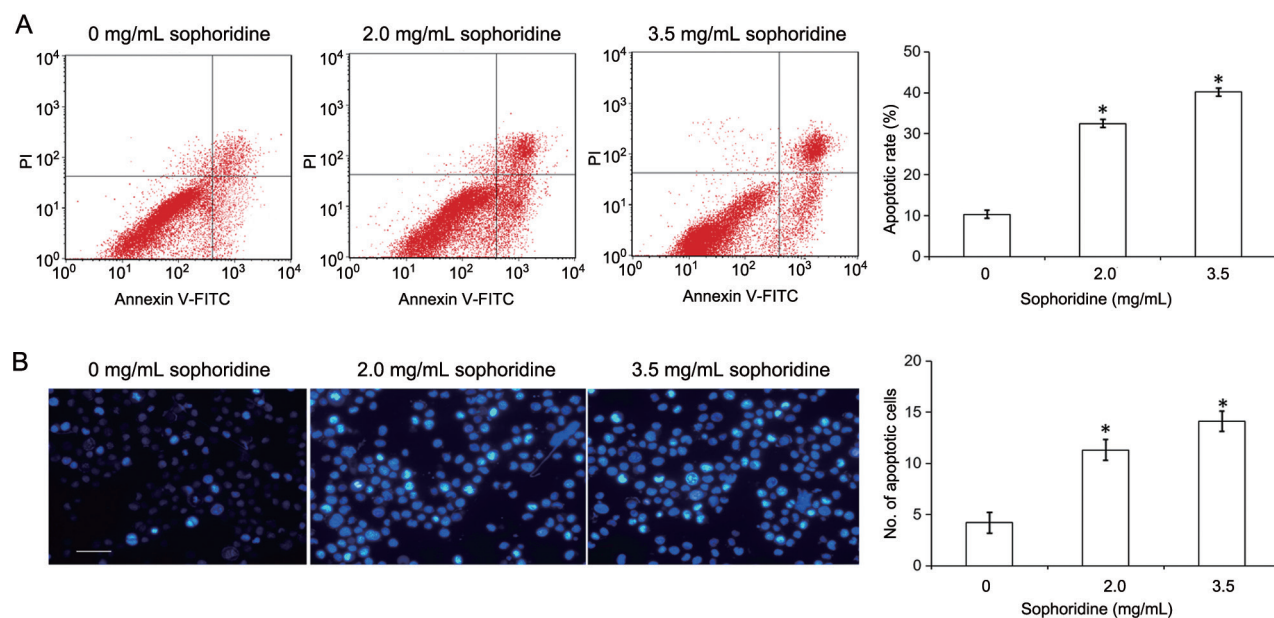


图 2. 槐定碱对MKN45细胞凋亡的影响

Fig. 2. Effects of sophoridine on apoptosis of MKN45 cells. *A*: Flow cytometry analysis results. *B*: Hoechst 33342 staining results. Mean $\pm$ SD, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control (0 mg/mL) group. Scale bar, 50 μ m.

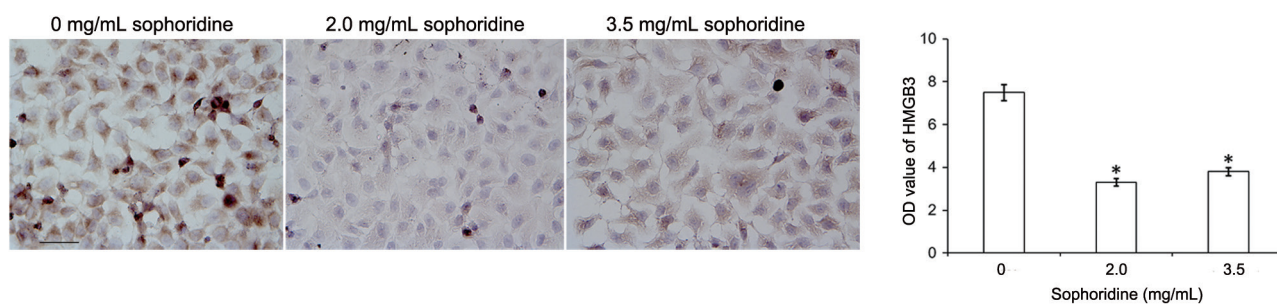


图 3. 槐定碱对MKN45细胞质中的HMGB3蛋白表达的影响

Fig. 3. Effect of sophoridine on the expression of HMGB3 protein in cytoplasm of MKN45 cells detected by immunocytochemical staining. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control (0 mg/mL) group. Scale bar, 50 μ m.

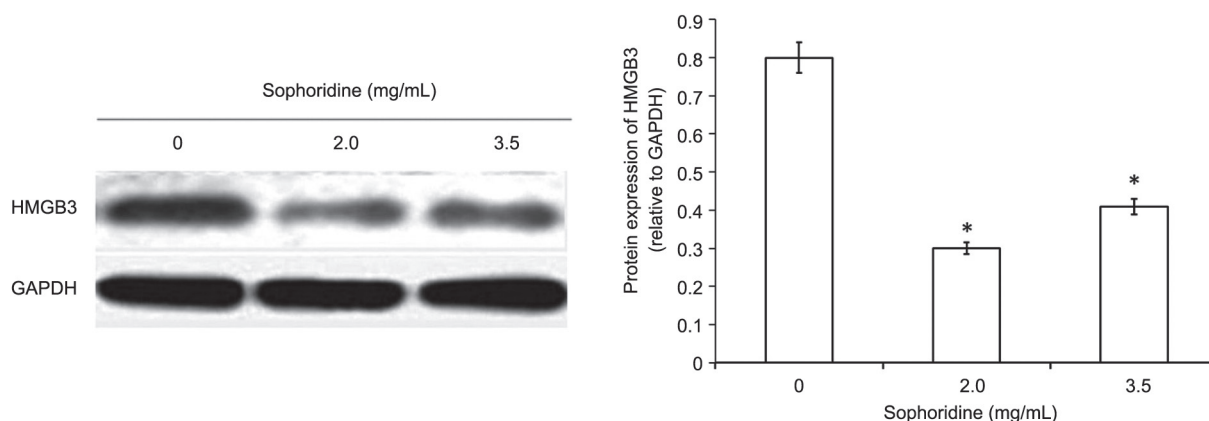


图 4. 槐定碱对MKN45细胞 HMGB3蛋白表达的作用

Fig. 4. Effects of sophoridine on the protein expression of HMGB3 of MKN45 cells detected by Western blot. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control (0 mg/mL) group.

和阴性对照组相比, 槐定碱处理后细胞凋亡率显著提高; Hoechst 33342 染色结果显示, 槐定碱组细胞核中染色质凝集固缩, 形成明显亮蓝色的凋亡小体, 与阴性对照组相比, 槐定碱组细胞凋亡数明显提高。以上结果提示, 槐定碱可抑制胃癌 MKN45 细胞的增殖, 并促进胃癌 MKN45 细胞的凋亡。免疫细胞化学染色结果表明, 槐定碱可下调 MKN45 细胞质中 HMGB3 的表达, 为进一步探究槐定碱对 HMGB3 表达的影响, 我们采用 Western blot 法检测了槐定碱对 HMGB3 蛋白水平的影响, 结果显示槐定碱可抑制胃癌 MKN45 细胞中 HMGB3 蛋白的表达水平。本研究结果初步探讨了槐定碱抑制胃癌 MKN45 细胞增殖并促进其细胞凋亡的分子机制。

目前关于槐定碱抗胃癌的机制还在研究初级阶段, 虽然动物实验结果也表明, 在胃癌模型大鼠体内, 槐定碱可有效缓解疼痛, 并通过下调 VEGF 等的表达来抑制肿瘤的进展^[19], 槐定碱治疗肺癌的研究也见诸报道^[20]。但是, 槐定碱在体内抑制胃癌生长的研究结果目前还未见报道, 因此后续工作有必要通过动物实验继续深入探究槐定碱在体内抑制胃癌细胞生长、促进凋亡作用的有效性和安全性。

研究表明, 染色体蛋白家族 high-mobility group (HMG) 与肿瘤的进展有关联^[21-23]。HMGB3 是 HMG 家族的一种, 近年来研究显示, HMGB3 影响多种恶性肿瘤的发生过程, 在良性间叶组织瘤、脂肪瘤和恶性淋巴瘤中存在 HMGB3 基因重组和缺失 (缺失外显子 4 和 / 或 5), 沉默 HMGB3 能激活内源性细胞周期蛋白 A 基因调控细胞周期并抑制肿瘤生长^[24]。进一步研究显示, HMGB3 mRNA 同样在小细胞肺癌和非小细胞肺癌中表达, HMGB3 类似于 HMGB1, 可能是肿瘤晚期糖基化的催化剂发生作用的受体^[25]。有研究显示, HMGB3 的高表达与胃癌广泛的穿透能力、淋巴结的转移、晚期肿瘤和重要的预后因素有关^[13], 本研究结果显示, 槐定碱显著下调胃癌 MKN45 细胞的 HMGB3 蛋白表达, 我们推测, 槐定碱可能通过调节 HMGB3 的表达, 抑制人胃癌细胞 MKN45 细胞增殖并促进细胞凋亡, 从而发挥其抗癌作用。但是, 槐定碱对其他胃癌细胞株以及临床上对不同类型胃癌细胞的影响如何, 有待后续实验的进一步阐明。

综上所述, 本研究提示槐定碱可下调胃癌细胞 MKN45 中 HMGB3 的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 发挥一定的抗癌作用。本研究为进一步

分析胃癌凋亡过程中槐定碱的调控机制提供了重要的科学依据。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69–90.
- 2 He M, Zhang Q. There still a long way to go for cancer registration in China. *Ann Transl Med* 2014; 2(7): 70.
- 3 Bălescu I, Godoroja D, Gongu M, Tomulescu V, Copăescu C. Laparoscopic HIPEC for peritoneal carcinomatosis from gastric cancer - Technique and early outcomes of our first cases. *Chirurgia (Bucur)* 2017; 112(6): 714–725.
- 4 Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(2): 170–178.
- 5 Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(1–2): 101–113.
- 6 Nemeth MJ, Kirby MR, Bodine DM. Hmgb3 regulates the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(37): 13783–13788.
- 7 Petit A, Ragu C, Della-Valle V, Mozziconacci MJ, Lafage-Pochitaloff M, Soler G, Schluth C, Radford I, Ottolenghi C, Bernard OA, Penard-Lacronique V, Romana SP. NUP98-HMGB3: a novel oncogenic fusion. *Leukemia* 2010; 24(3): 654–658.
- 8 Song N, Liu B, Wu JL, Zhang RF, Duan L, He WS, Zhang CM. Prognostic value of HMGB3 expression in patients with non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 2013; 34(5): 2599–2603.
- 9 Guo S, Wang Y, Gao Y, Zhang Y, Chen M, Xu M, Hu L, Jing Y, Jing F, Li C, Wang Q, Zhu Z. Knockdown of high mobility group-box 3 (HMGB3) expression inhibits proliferation, reduces migration, and affects chemosensitivity in gastric cancer cells. *Med Sci Monit* 2016; 12(24): 3951–3960.
- 10 Li X, Wu Y, Liu A, Tang X. MiR-27b is epigenetically downregulated in tamoxifen resistant breast cancer cells due to promoter methylation and regulates tamoxifen sensitivity by targeting HMGB3. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 477(4): 768–773.
- 11 Gong Y, Cao Y, Song L, Zhou J, Wang C, Wu B. HMGB3 characterization in gastric cancer. *Genet Mol Res* 2013; 12(4): 6032–6039.
- 12 Elgamal OA, Park JK, Gusev Y, Azevedo- Pouly AC, Jiang J, Roopra A, Schmittgen TD. Tumor suppressive function of mir-205 in breast cancer is linked to HMGB3 regulation. *PLoS One* 2013; 8(10): e76402.
- 13 Chen X, Zhao G, Wang F, Gao F, Luo H, Wang Y, Du Y,

- Chen X, Xue C, Dong Z, Song G. Upregulation of miR-513b inhibits cell proliferation, migration, and promotes apoptosis by targeting high mobility group-box 3 protein in gastric cancer. *Tumour Biol* 2014; 35(11): 11081–11089.
- 14 Hu ST, Shen YF, Gong JM, Yang YJ. Effect of sophoridine on Ca^{2+} induced Ca^{2+} release during heart failure. *Physiol Res* 2016; 65(1): 43–52.
 - 15 Guo LF (郭林丰), Tong SS, Yu JN, Xu XM. Advance in studies on anti-tumor mechanism of matrine. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)* 2013; 38(20): 3409–3412 (in Chinese with English abstract).
 - 16 Wang WX, Sun ZH, Chen HM, Xu BN, Wang FY. Role and mechanism of Sophoridine on proliferation inhibition in human glioma U87MG cell line. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(1): 464–471.
 - 17 Wu L, Wang G, Wei J, Huang N, Zhang S, Yang F, Li M, Zhou G, Wang L. Matrine derivative YF-18 inhibits lung cancer cell proliferation and migration through down-regulating Skp2. *Oncotarget* 2017; 8(7): 11729–11738.
 - 18 Peng X, Zhou D, Wang X, Hu Z, Yan Y, Huang J. Matrine suppresses proliferation and invasion of SGC7901 cells through inactivation of PI3K/Akt/uPA Pathway. *Ann Clin Lan Sci* 2016; 46(5): 457–462.
 - 19 Yan JG (严继贵), Yang YQ, Wang YJ, Kan J. Study on effect of sophoridine against bone cancer pain and its mechanism. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)* 2013; 38(23): 4134–4137 (in Chinese with English abstract).
 - 20 Wang W, Cai Y, Zhang G, Liu Y, Sui H, Park K, Wang H. Sophoridine-loaded PLGA microspheres for lung targeting: preparation, *in vitro*, and *in vivo* evaluation. *Drug Deliv* 2016; 23(9): 3674–3680.
 - 21 Tang D, Loze MT, Zeh HJ, Kang R. The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment. *Autophagy* 2010; 6(8): 1181–1183.
 - 22 Chen J, Xi B, Zhao Y, Yu Y, Zhang J, Wang C. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 126(1): 109–117.
 - 23 Song B, Song WG, Li ZJ, Xu ZF, Wang XW, Wang CX, Liu J. Effect of HMGB1 silencing on cell proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803 gastric cancer cells. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(1): 11–17.
 - 24 Tang HR, Luo XQ, Xu G, Wang Y, Feng ZJ, Xu H, Shi YW, Zhang Q, Wu LG, Xue CQ, Wang CW, Wu CY. High mobility group-box 3 overexpression is associated with poor prognosis of resected gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2013; 18(48): 7319–7326.
 - 25 Moser B, Janik S, Schiefer AI, Müllauer L, Bekos C, Scharrer A, Mildner M, Rényi-Vámos F, Klepetko W, Ankersmit HJ. Expression of RAGE and HMGB1 in thymic epithelial tumors, thymic hyperplasia and regular thymic morphology. *PLoS One* 2014; 9(4): e94118.