



项目批准号	81903117
申请代码	H1816
归口管理部门	
收件日期	



20221181903117

国家自然科学基金 资助项目结题/成果报告

资助类别: 青年科学基金项目

亚类说明:

附注说明:

项目名称: HMGB1及其下游靶分子介导放疗后肿瘤再增殖的机制研究

负责 人: 贺思佳 电话: 021-34206809

电子 邮 件: he-si-jia@163.com

依 托 单 位: 上海交通大学

联 系 人: 章俊梅 电话: 021-34206890

直 接 费 用: 20.5000 (万元) 执行年限: 2020.01-2022.12

填表日期: 2022年12月26日

国家自然科学基金委员会制 (2021年)



项目摘要

中文摘要：

肿瘤再增殖是指放化疗后残存的肿瘤细胞生长并形成新的肿瘤的过程，是导致放化疗失败的重要原因。我们前期研究发现放疗诱导产生的凋亡细胞中Caspase-3被激活，激活的Caspase-3进一步激活下游的iPLA2/AA/PGE2和PKC δ /Akt/VEGF-A通路刺激周围残存的肿瘤细胞增殖。然而，放疗除诱导细胞凋亡之外，还会诱导细胞坏死。释放到胞外的HMGB1被认为是细胞发生了坏死的重要标志物。我们前期研究发现放疗后出现大量细胞坏死，HMGB1释放增加。采用CRISPR/Cas9技术敲除肿瘤细胞中HMGB1基因，体外实验揭示抑制放疗后HMGB1释放可显著抑制肿瘤再增殖。本课题拟在此基础上深入研究HMGB1及其下游靶分子影响肿瘤再增殖的机制，并构建HMGB1与CASP3基因双敲除的肿瘤细胞，通过体内外肿瘤再增殖模型研究HMGB1与Caspase-3互作影响肿瘤再增殖的新机制。

Abstract:

Tumor repopulation is an important reason for the failure of radiotherapy and chemotherapy, which refers to a process that the remaining tumor cells grow and form new tumor after radiotherapy or chemotherapy. Our previous studies have found that the activation of Caspase-3 in radiation induced apoptosis cells can further activate the downstream iPLA2 / AA/PGE2 and PKC δ /Akt/VEGF-A pathways and promote residual tumor cell proliferation. Radiotherapy, however, in addition to induce cell apoptosis, also induce cell necrosis. The extracellular HMGB1 was thought to be a vital marker of cell necrosis. Our previous studies have found that cell necrosis occurred after radiotherapy, along with increasing HMGB1 release. We utilized the CRISPR/Cas9 technology to knockout HMGB1 gene in tumor cells, and revealed that blocking HMGB1 release after radiotherapy significantly inhibited the tumor repopulation. Thus, in this study, we propose to investigate the mechanism of HMGB1 and its downstream molecules mediating tumor repopulation, and construct HMGB1 and CASP3 genes double knockout tumor cells to figure out the mechanisms of HMGB1 and Caspase-3 interactions on tumor proliferation.

关键词（用分号分开）： 放射治疗； 高迁移率族蛋白B1； Caspase-3； 肿瘤再增殖；

Keywords (separated by;): Radiotherapy; High Mobility Group Box 1;
Caspase-3; Tumor Repopulation;

结题摘要

中文摘要（对项目的背景、主要研究内容、重要结果、关键数据及其科学意义等做简单概述）：

肿瘤再增殖是指放化疗后残存肿瘤细胞继续生长形成新的肿瘤的过程，是导致放化疗失败的重要原因之一。我们前期研究结果发现以caspase-3为中心的肿瘤再增殖机制，我们发现放疗诱导产生的凋亡细胞能通过caspase-3/iPLA2/AA/PGE2、caspase-3/PKC δ /Akt/VEGF-A通路促进肿瘤再增殖。但放化疗诱导产生的濒死细胞，除了凋亡细胞，还会产生大量坏死细胞。我们前期发现放疗诱导产生的坏死细胞，能够通过释放HMGB1，激活残存肿瘤细胞RAGE/MAPK信号通路参与肿瘤再增殖。此外，我们还发现放疗能够诱导濒死肿瘤细胞形成多核或巨核细胞（PGCCs），这些PGCCs虽然大部分会走向死亡，但仍有部分PGCCs表现出增殖潜能，能通过出芽或者分裂的方式形成新的克隆，促进肿瘤再增殖，而外源性加入HMGB1小分子抑制剂甘草酸（GL）以及丙酮酸乙酯（EP）能够抑制该过程。同时，我们也发现PGCCs的RAGE/MAPK信号通路激活，基于此，我们推测HMGB1蛋白可能以一种旁分泌的方式通过激活PGCCs的RAGE/MAPK信号通路，调控PGCCs介导的肿瘤再增殖。由此可见，肿瘤再增殖的调控机制极其复杂，有待更深入的探索，本课题研究在PGCCs层面阐述了HMGB1调控肿瘤再增殖的新机制，丰富了HMGB1蛋白的生物学功能。

Abstract (Brief description of research background, main methods, contributions, and research data):

Tumor repopulation is the process by which residual tumor cells continue to grow and form new tumors after radiotherapy, which is one of the important causes of radiotherapy failure. The results of our previous study revealed a caspase-3-centered mechanism of tumor repopulation, and we found that apoptotic cells generated by radiotherapy induction could promote tumor repopulation through caspase-3/iPLA2/AA/PGE2 and caspase-3/PKC δ /Akt/VEGF-A pathways. However, radiotherapy-induced generation of dying tumor cells produces a large number of necrotic cells in addition to apoptotic cells. We previously found that the necrotic cells generated by radiotherapy induction were able to activate the RAGE/MAPK signaling pathway in residual tumor cells to participate in tumor repopulation through the release of HMGB1. In addition, we also found that radiotherapy can induce dying tumor cells to form polyplloid giant cancer cells (PGCCs), and although most of these PGCCs will go to death, some of them still exhibit proliferative potential and can form new clones by budding or dividing to promote tumor repopulation, and exogenous addition of HMGB1 small molecule inhibitors glycyrrhetic acid (GL) and ethyl pyruvate (EP) was able to inhibit this process. We also found that the RAGE/MAPK signaling pathway was activated in PGCCs, and based on this, we hypothesized that HMGB1 protein might regulate PGCCs-mediated tumor repopulation by activating the RAGE/MAPK signaling pathway in PGCCs in a paracrine manner. It can be seen that the regulatory mechanism of tumor repopulation is extremely complex and needs to be explored in further depth. The present study illustrates a new mechanism of HMGB1 regulation of tumor repopulation at the level of PGCCs and enriches the biological functions of HMGB1 protein.

关键词（用分号分开）： 肿瘤； 放射治疗； 高迁移率族蛋白B1； 多核巨肿瘤细胞； 肿瘤再增殖

Keywords (separated by;): Tumor; Radiotherapy; High Mobility Group Box 1; Polypliod Giant Cancer Cell; Tumor Repopulation



正文

一、结题部分

(一)研究计划执行情况概述

研究目标、研究/研制内容调整和变动情况；

未按计划进行的研究/研制内容或未完成的研究目标请说明原因。

1、按计划执行情况

本课题原设定研究计划主要包括三方面：(1) 明确 HMGB1 促进肿瘤再增殖的作用。(2) 筛选 HMGB1 影响肿瘤再增殖的相关下游效应分子和所涉及的信号通路。(3) 探究 HMGB1 与 Caspase-3 在肿瘤再增殖中的相互影响及机制。在三年的资助期间，第一部分研究计划内容基本完成，后续两部分研究计划内容进行了调整，具体详见后续说明。另外，本课题也资助了另外一项与本课题方向非常接近的研究，具体详见后续说明。

2、研究目标完成情况

研究目标如有调整和变动，或有未完成的研究目标，均需说明原因。

(1) 成功构建放疗后肿瘤再增殖体外及体内模型。研究目标基本完成。

以大量 10Gy 处理后的肿瘤细胞饲养细胞，与少量的未放疗处理、带有 GFP-Luc2 肿瘤细胞为报告细胞共培养，无论是直接接触培养还是通过小室的非接触性培养，我们均观察到放疗处理后的饲养细胞较未放疗处理的饲养细胞，具有更强的刺激报告细胞生长的作用，并在动物体内重现了这一现象，成功构建肿瘤再增殖模型。

(2) 明确 HMGB1 正向调控肿瘤再增殖。研究目标部分完成。

说明：申请人前期研究发现 HMGB1 能够以旁分泌的方式刺激残存肿瘤细胞增殖，形成新的肿瘤，相关研究已于 2018 年发表在《Cell Death & Disease》杂志上，申请人作为第一作者，但该研究仅涉及体外实验，缺乏在体内实验证实 HMGB1 促进肿瘤再增殖。基于此，本课题拟通过构建 HMGB1 基因敲除的肿瘤细胞和相应细胞的皮下移植瘤模型，对 HMGB1 野生型和敲除裸鼠荷瘤模型进行 X 射线放疗处理，观察肿瘤体积的变化情况。刚开始申请人选用了结肠癌细胞株 HCT116 及 HT29 进行 HMGB1 基因敲除，通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了相应的 HMGB1 基因敲除细胞株，但是在后续培养过程中，发现 HMGB1 敲除的 HCT116 及 HT29 生长速度明显减慢，即便用高浓度血清进行培养，或者更换进口胎牛血清培养，均不能改善，且在缓慢生长大概 3 周左右，反

复出现 HMGB1 回复表达，尝试了数次，包括更换不同的 gRNA 序列以及不同肿瘤细胞株、严格把控单克隆挑选过程，均未获得满意的结果，最后在宫颈癌细胞株 HeLa 构建了 HMGB1 和/或 CASP3 基因敲除的细胞株。然而，HeLa 细胞无论是 HMGB1 和/或 CASP3 基因野生型还是 HMGB1 和/或 CASP3 基因敲除，均无法构建裸鼠荷瘤模型，申请人通过中科院重新购买 HeLa 细胞以及调整 HeLa 细胞接种细胞数，尝试半年有余，仍旧无法成瘤。这是本课题设计之初未考虑到的问题，也是在课题进行过程中逐渐发现，由此可见，在某些肿瘤细胞中，HMGB1 行使着十分重要的功能，可能并不适合构建本课题所需的工具细胞。

(3) 证实放疗能够诱导肿瘤细胞多核或巨核化，形成 PGCCs，这些 PGCCs 参与肿瘤再增殖的调控。此部分为研究内容调整。

说明：如前所述，在构建工具细胞时出现了棘手的问题，但申请人所在课题组长期从事肿瘤再增殖这一现象的机制研究，在多种瘤种（如胰腺癌、乳腺癌、胶质瘤、结肠癌、肺癌等）中也证实这一现象的普遍性。本课题组前期发现的放疗诱导产生的濒死细胞（dying cells），如凋亡细胞、坏死细胞、坏死性凋亡细胞等，均能够通过旁分泌的途径促进残存肿瘤细胞再增殖。表明肿瘤再增殖的调控机制极其复杂，单纯的某个基因、某种蛋白或者某种细胞死亡方式，均可能在其中发挥重要作用，肿瘤再增殖的机制研究依旧存在许多未知，值得深入探索。而申请人在本课题开展过程中，发现放疗能诱导肿瘤细胞的细胞核发生巨核，甚至多核化，这些多核或巨核化的肿瘤细胞也被称为 PGCCs（polyploid giant cancer cells）。事实上，PGCCs 广泛存在于多种人类恶性肿瘤中，低氧、放化疗等细胞毒性治疗均能够诱导细胞产生 PGCCs。大多数研究认为这些 PGCCs 与肿瘤恶性程度正相关，且这些 PGCCs 最终死亡。申请人在进行平板克隆形成实验时，发现放疗处理后的肿瘤细胞确实形成了许多 PGCCs，这些 PGCCs 大部分确实最终死亡，有意思的是，一部分 PGCCs 居然存活下来，且表现出增殖潜能，通过单个细胞的显微镜实时观察，申请人发现这些 PGCCs 能够去多倍体化，重新增殖形成新的克隆，这与本课题研究的肿瘤再增殖现象相符，而以往是未见任何研究将两者联系在一起，故后期研究把重心放在的 PGCCs 诱导的肿瘤再增殖现象研究中。

(4) 证实 HMGB1 通过旁分泌的方式调控 PGCCs 介导的肿瘤再增殖。此部分为研究内容调整。

说明：PGCCs 是一群巨核化或者多核化的细胞，目前关于 PGCCs 形成机制主要认为包括两方面，一个是通过细胞融合，而另一个则是细胞内复制。但是 PGCCs 后续

是如何分裂再回复至亲代二倍体状态的机制并不清楚。无论是哪种机制，必然是影响了维持基因组稳定性及细胞分裂的调控过程，而 HMGB1 是一种功能极其丰富的蛋白，参与了包括 DNA 复制、修复、重组、转录以及维持基因组稳定，和调节炎症、免疫、细胞生长、细胞增殖、细胞死亡等生理病理过程。因此，申请人用 HMGB1 小分子抑制剂对 PGCCs 进行处理，发现小分子抑制剂能够抑制 PGCCs 介导的肿瘤再增殖过程。证实 HMGB1 在 PGCCs 介导的肿瘤再增殖中扮演旁分泌促进因子的角色。同时，申请人也发现这些 PGCCs 也会存在 RAGE/MAPK 信号通路的激活，这与申请人前期研究发现放疗诱导的坏死细胞，通过激活残存肿瘤细胞的 HMGB1/RAGE/MAPK 信号通路促进肿瘤再增殖的结论相符。此部分内容是在第 3 部分调整内容进行的后续研究，也是我们在原有课题推进过程中出现瓶颈后，结合现有的研究基础适时做出的研究调整，从 PGCCs 的层面阐述 HMGB1 调控肿瘤再增殖的机制。

(二) 研究工作主要进展、结果和影响

1、主要研究内容

(1) 构建肿瘤再增殖体内及体外模型。

以大量 10Gy 处理后的肿瘤细胞饲养细胞，与少量的未放疗处理、带有 GFP-Luc2 肿瘤细胞为报告细胞共培养，无论是直接接触培养还是通过小室的非接触性培养，我们均观察到放疗处理后的饲养细胞较未放疗处理的饲养细胞，具有更强的刺激报告细胞生长的作用，并在动物体内重现了这一现象，成功构建肿瘤再增殖模型。证实无论是体内或是体外，肿瘤再增殖现象均存在，保障本课题顺利进行。

(2) 明确放疗能够诱导肿瘤细胞形成 PGCCs。

分别以不同剂量 X-ray (0Gy、2Gy、4Gy、6Gy、8Gy、10Gy、12Gy) 照射肿瘤细胞，利用时差显微镜及电镜对放疗处理后不同时间点 (day1、day3、day5、day7、day10、day12、day14) 的细胞进行观察，同时对这些细胞进行免疫荧光染色、HE 染色，观察细胞形态的改变，包括细胞体积大小、细胞核大小、核质比例等。同时，利用流式细胞检测技术，收集不同剂量及不同时间点放疗处理后肿瘤细胞，测定其细胞 DNA 含量的变化情况，明确放疗后肿瘤细胞发生巨核或多核化，即形成 PGCCs。同时，构建裸鼠荷瘤模型，通过在裸鼠右侧后腿部皮下进行肿瘤细胞接种，待肿瘤体积长至 200mm³ 左右，根据体积进行随机分组（每组平均体积无明显差异），A 组为对照组，B 组为进行后腿瘤体局部放疗的实验组。测量肿瘤体积变化情况，每周 2 次。放疗后不同时间



点处死荷瘤裸鼠，取出组织，进行 HE 及免疫组化染色，观察 PGCCs 的形成情况。

(3) 研究 PGCCs 与肿瘤再增殖的关系。

在证实放疗能够诱导肿瘤细胞产生 PGCCs 的基础上，我们对 PGCCs 这群细胞的性质进行评估。首先，我们利用 β -gal 染色对放疗后不同时间点的肿瘤细胞（day1、day3、day5、day7、day10、day12、day14）进行染色，评估 PGCCs 是否是衰老细胞。其次，利用免疫荧光染色，通过标记 Cleaved Caspase-3 以及 TUNEL 实验，评估 PGCCs 是否是凋亡细胞。最后，我们往放疗后的肿瘤细胞培养基中加入 BrdU，待 6 小时后，更换新鲜的培养基继续培养，收集不同时间（day1、day3、day5、day7、day10、day12、day14）的肿瘤细胞进行 BrdU 免疫荧光染色，评估 PGCCs 是否是具有增殖活力的细胞。利用流式分选技术，我们将放疗后产生的濒死细胞进行分选，根据细胞体积大小，筛选出一群 PGCCs，并将这些 PGCCs 一部分以 1-2 个细胞/孔分选至 96 孔板，另一部分以每孔 1000 个 PGCCs 接种于软琼脂中，用完全培养基进行培养，实时监测观察 PGCCs 的存活情况，14 天后对每个孔进行结晶紫染色，对超过 50 个肿瘤细胞的克隆进行统计，评估 PGCCs 克隆形成能力。其次，我们收集放疗后不同时间点（day1、day3、day5、day7、day10、day12、day14）的肿瘤细胞，提取相应的细胞蛋白，检测增殖相关蛋白的表达水平，如 Cyclin D1、PCNA、Ki67 等。

(4) 研究 HMGB1 与 PGCCs 介导的肿瘤再增殖的关系。

将利用流式细胞分选出的 PGCCs，以 1-2 个细胞/孔分选至 96 孔板，对照组 A 组用完全培养基培养，实验组则采用放疗后肿瘤细胞的上清液进行培养，其中 B 组单纯用放疗后肿瘤细胞的上清液，C 组为放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制剂甘草酸（glycyrrhizin, GL），D 组为放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制剂丙酮酸乙酯（ethyl pyruvate, EP）。实时监测观察 PGCCs 的存活情况，14 天后对每个孔进行结晶紫染色，对超过 50 个肿瘤细胞的克隆进行统计，比较各组间的差异。

2、取得的主要研究进展、重要结果、关键数据等及其科学意义或应用前景

(1) 放疗能够诱导肿瘤细胞多核或巨核化，产生 PGCCs。

以 10Gy 处理肿瘤细胞后，通过凋亡流式、HE 染色、免疫荧光及电镜观察，我们发现细胞会发生凋亡、坏死、自噬（图 1A-D），并产生多核或巨核化的肿瘤细胞群体，我们称之为 PGCCs（图 1E）。随着时间的推移，PGCCs 的比例不尽相同，放疗后第 3-5 天 PGCCs 的百分比达到最高（图 1E）。不同放疗剂量均能够诱导 PGCCs 产生，

且 PGCCs 产生与放疗剂量呈正相关，即放疗剂量越大，PGCCs 产生的比例越高（图 1G）。

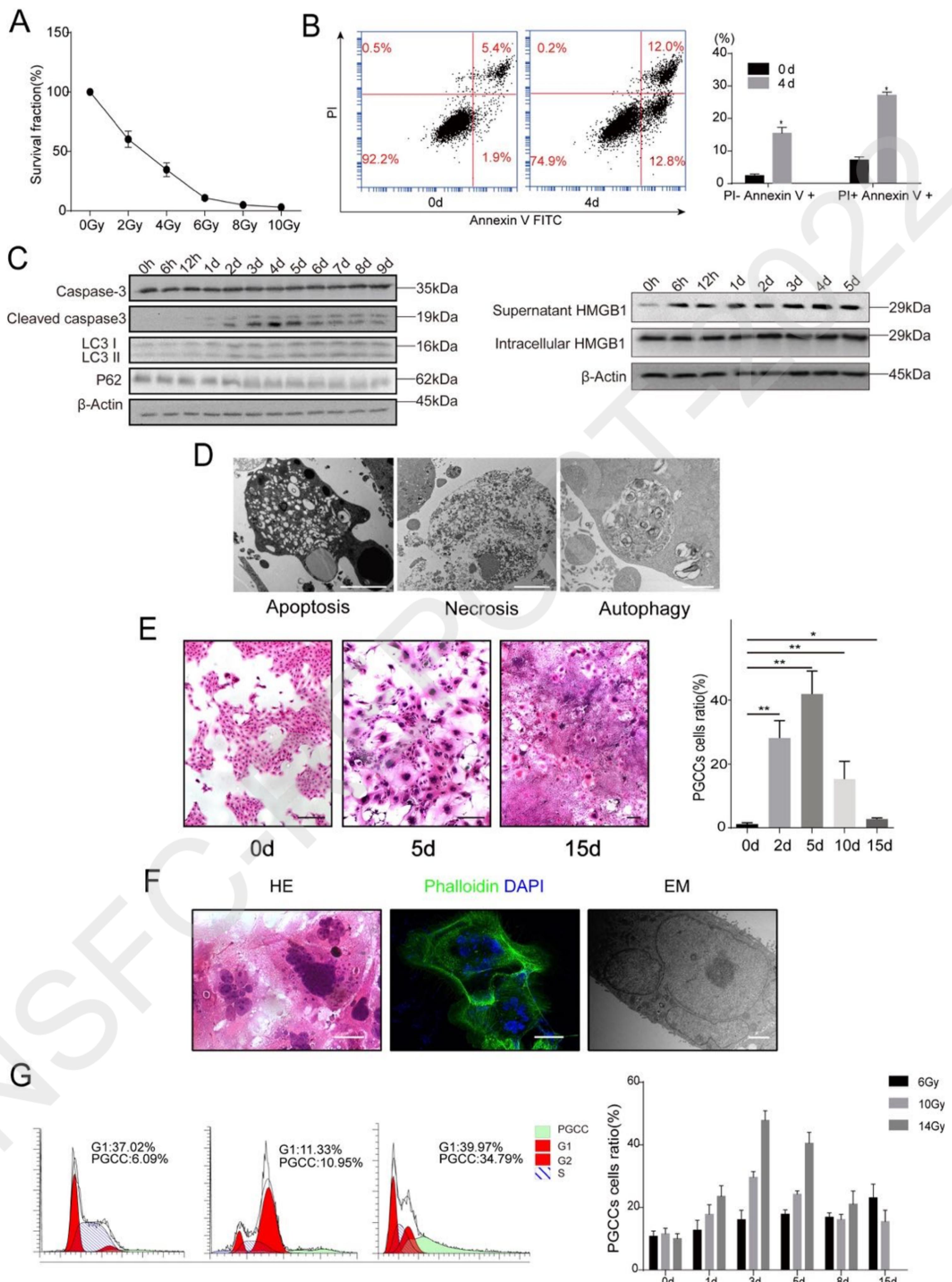


图 1 放疗诱导肿瘤细胞形成 PGCCs

A: 平板克隆形成实验显示不同放疗剂量下肿瘤细胞的存活率；B: 流式细胞检测 10Gy 放疗处理后第 4 天肿瘤细胞的凋亡比例；C: Western blotting 检测 10Gy 放疗处理后肿



瘤细胞 Cleaved Caspase-3、P62 以及上清液中 HMGB1 的表达水平变化；D：电镜显示放疗处理后肿瘤细胞发生凋亡、坏死以及自噬；E：通过 HE 染色显示放疗后不同时间点 PGCCs 形成的情况；F：HE 染色显示肿瘤细胞发生巨核或者多核化形成 PGCCs；G：对不同放射剂量处理后不同时间点的肿瘤细胞进行流式检测，计算 PGCCs 产生的比例。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

（2）放疗诱导产生的 PGCCs 具有增殖潜能。

我们发现放疗诱导产生的 PGCCs 部分最终还是发生死亡（图 2A），部分表现为坏死（图 2B）或凋亡（图 2C），但仍具有增殖潜能（图 2D-E），主要表现为 BrdU 染色、Ki67 增殖标记物染色阳性，另外，通过 γ -H2AX 染色与 BrdU 染色双染，我们发现放疗诱导产生的 PGCCs 即使在 DNA 损伤的情况下，仍具有增殖活力（图 2F）。

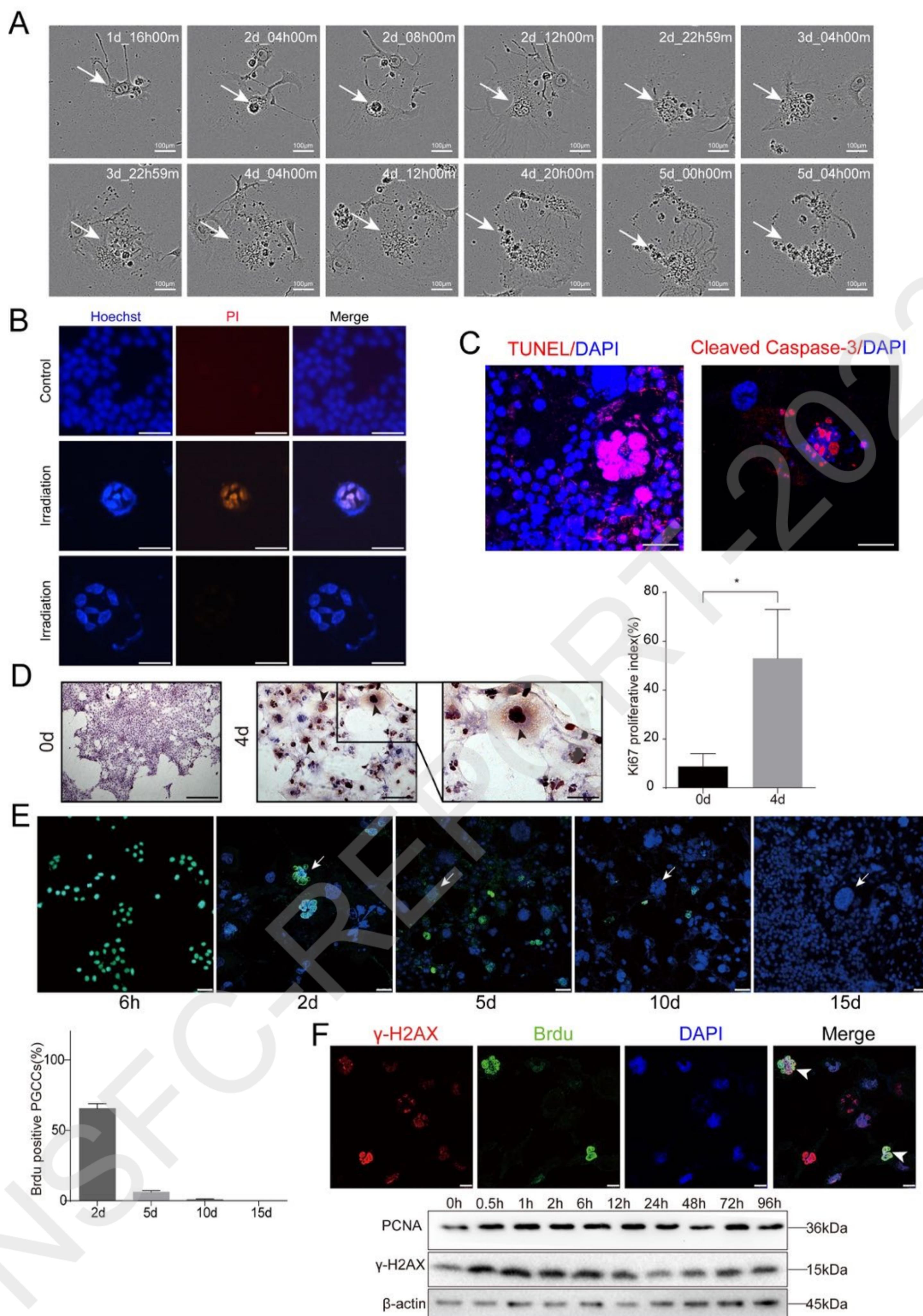


图 2 放疗诱导产生的 PGCCs 具有增殖潜能

A: 通过对单个 PGCCs 进行时差显微镜观察，我们发现放疗后部分细胞虽然出现多核或者巨核化，但是最终还是出现细胞崩解，发生死亡；B: 通过对 PGCCs 进行 Hoechst 33342/PI 双染，我们发现部分 PGCCs 发生坏死；C: 通过对放疗后肿瘤细胞进行 Cleaved Caspase-3 染色以及 TUNEL 检测，我们发现部分 PGCCs 发生凋亡；D: 分别对未被放疗处理的肿瘤细胞及 PGCCs 进行 Ki67 染色，发现 PGCCs 的增殖标记物 Ki67 染色为阳



性，表现出增殖潜能；E：通过外源性加入 BrdU，我们对放疗后肿瘤细胞进行 BrdU 染色，我们发现放疗后部分 PGCCs BrdU 染色阳性，随着时间推移，阳性 PGCCs 比例越来越少，证实部分 PGCCs 具有增殖活力；F：外源性加入 BrdU 后，我们对放疗后的肿瘤细胞进行 γ -H2AX 与 BrdU 免疫荧光双染，同时收集放疗后不同时间点的肿瘤细胞，提取蛋白，检测 γ -H2AX 与增殖标记物 PCNA 的表达水平，我们发现放疗产生的 PGCCs 即使在 DNA 损伤的情况下，仍具有增殖活力。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

(3) 在动物水平证实放疗诱导 PGCCs 产生，这些 PGCCs 具有增殖潜能。

首先构建裸鼠皮下移植瘤模型，待肿瘤长至 200 mm^3 大小时，以 10Gy 的 X-ray 照射肿瘤，同时每周 2 次利用游标卡尺分别测量肿瘤长、短径，计算肿瘤体积，绘制肿瘤生长曲线，判断治疗效果（图 3A-B）。同时在放疗处理后不同时间点处死裸鼠，取出瘤体进行 HE 染色以及 BrdU、Ki67 染色，证实放疗能够诱导 PGCCs 产生，这些 PGCCs 的 BrdU、Ki67 染色阳性，具有增殖活力（图 3D）。

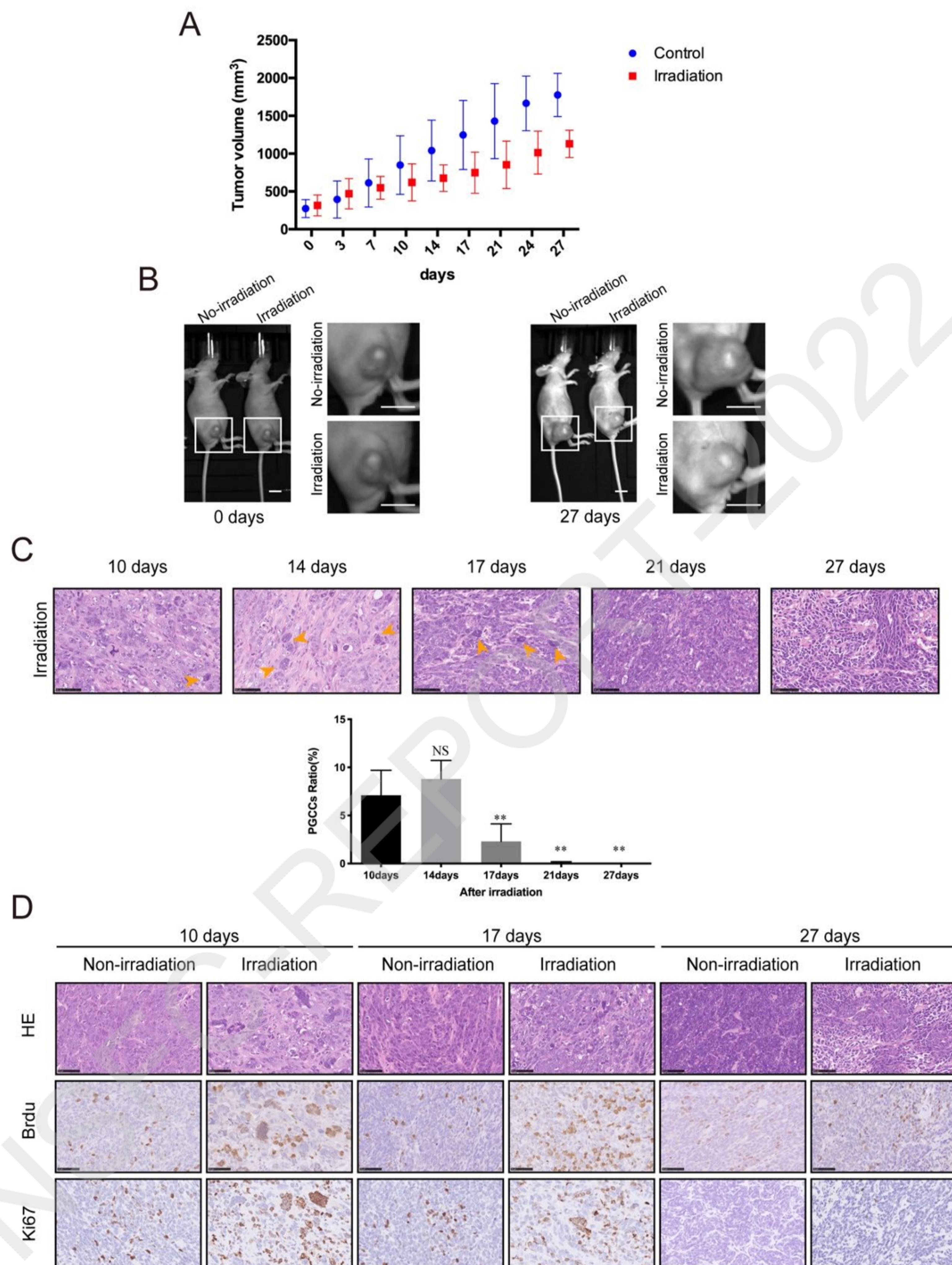


图 3 在动物水平证实放疗诱导 PGCCs 产生

A: 通过绘制肿瘤生长曲线，表明放疗抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长；B: 利用 IVIS 小动物成像仪器对荷瘤裸鼠进行成像，表明放疗抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长；C: 对放疗后不同时间点取出的肿瘤组织进行 HE 染色，证实放疗诱导 PGCCs 产生，黄色箭头所指为 PGCCs；D: 对肿瘤组织进行 HE 染色及 BrdU、Ki67 染色，证实部分 PGCCs 具有增殖活力。NS 表示没有统计学差异， $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ 。

(4) 放疗诱导产生的 PGCCs 通过 neosis 促进肿瘤再增殖。

通过流式分选，我们将单个 PGCCs 分选至 96 孔板中，利用时差显微镜进行连续观察，我们发现 PGCCs 最终可以通过出芽或者直接分裂的方式产生大量小细胞 (neosis)，逐渐长成新的克隆并继续增殖 (图 4A-D)。通过 Western blotting、软琼脂克隆形成实验、Sox2 免疫荧光染色，证实 PGCCs 具有增殖能力以及较强的干性，能够形成新的克隆从而促进肿瘤再增殖 (图 4E-G)。

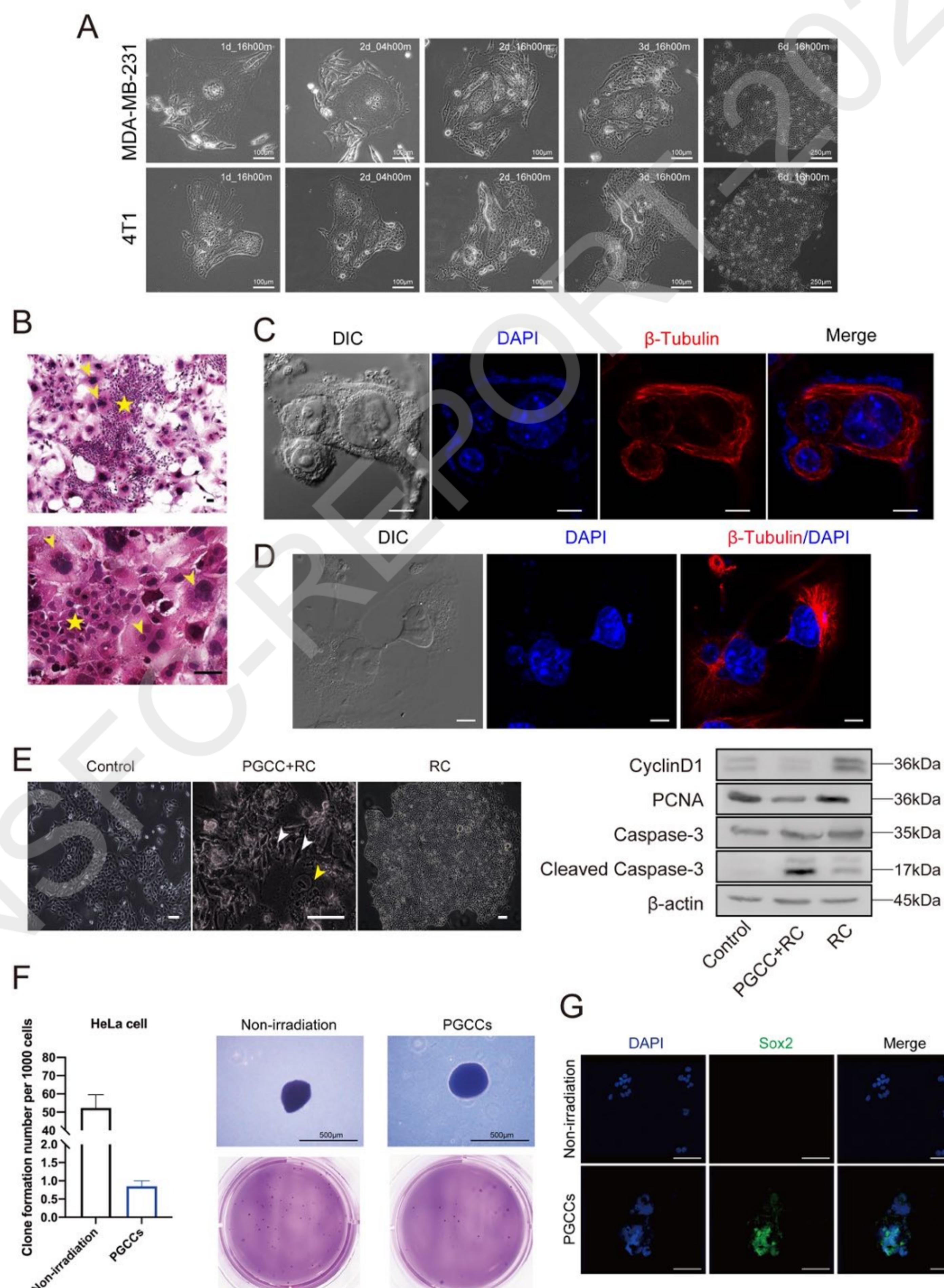


图 4 PGCCs 通过 neosis 促进肿瘤再增殖



A: 普通显微镜下观察单个 PGCCs 形成新克隆的过程; B: 对放疗后产生的 PGCCs 及 Raju 细胞进行 HE 染色, 其中黄色箭头所指为 PGCCs, 黄色星所标注为 Raju 细胞; C: 通过细胞免疫荧光显示 PGCCs 通过出芽的方式产生新的小细胞; D: 通过细胞免疫荧光显示 PGCCs 通过细胞分裂直接产生两个细胞; E: 光镜下显示 PGCCs (黄色箭头) 以及 Raju 细胞 (白色箭头), 利用 Western blotting 检测 PGCCs 以及 Raju 细胞 Cyclin D1、PCNA、Cleaved Caspase-3 的表达水平; F: 利用软琼脂克隆形成实验评估 PGCCs 形成克隆的能力; G: 通过对 PGCCs 进行干性标记物 Sox2 免疫荧光染色, 证实 PGCCs 具有较强的干性。

(5) HMGB1 参与 PGCCs 介导的肿瘤再增殖。

我们分别以完全培养基、放疗后肿瘤细胞的上清液、放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制剂甘草酸 (GL) 和放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制剂丙酮酸乙酯 (EP) 培养分选出的 PGCCs, 发现 HMGB1 小分子抑制剂 GL 和 EP 明显抑制了 PGCCs 形成克隆, 提示 HMGB1 与 PGCCs 介导的肿瘤再增殖相关 (图 5C)。申请人既往研究证实细胞外 HMGB1 能够通过激活 RAGE/MAPK 信号通路促进肿瘤再增殖, 我们对 PGCCs 进行 RAGE、p-P38 以及 p-ERK 免疫荧光染色, 证实 PGCCs 的 RAGE、p-P38 以及 p-ERK 表达增强, 提示 HMGB1 可能通过 RAGE/MAPK 信号通路参与 PGCCs 介导的肿瘤再增殖 (图 5D)。此外, 在动物水平, 我们发现放疗诱导产生的 PGCCs 其 HMGB1 表达增强且 BrdU 染色也为阳性, 但 Ki67 的染色却为阴性, 表明 PGCCs 的增殖潜力存在差异, 一部分 PGCCs 在早期增殖活跃, 而另一些则在晚期增殖活跃 (图 5E)。

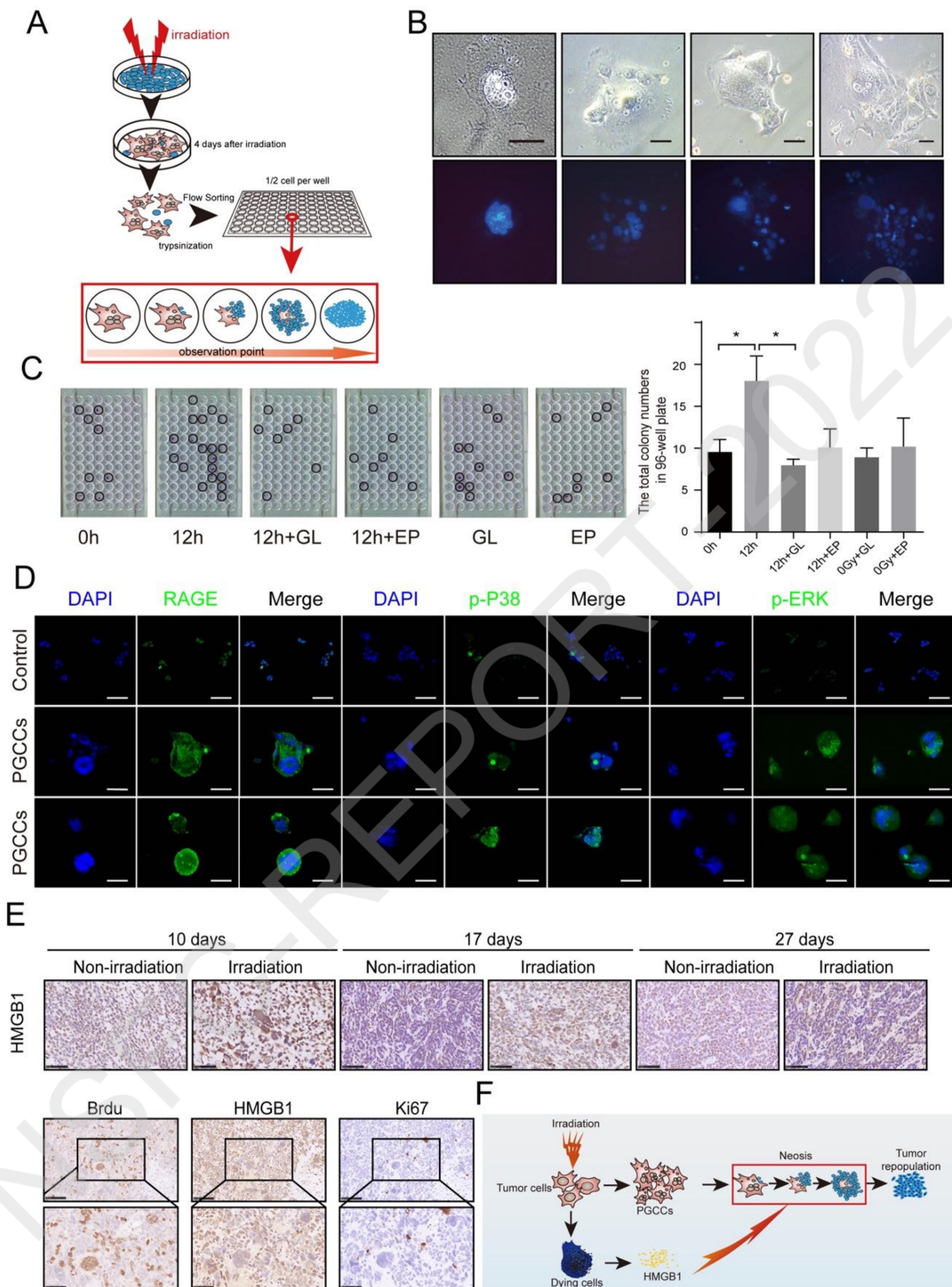


图 5 HMGB1 参与 PGCCs 介导的肿瘤再增殖过程

- A: 通过流式分选 PGCCs 并接种于 96 孔板，观察 PGCCs 形成克隆的情况（示意图）；
- B: 利用 Hoechst 33342 标记活细胞，我们发现 PGCCs 能通过产生大量小细胞形成新的克隆（neosis）； C: 我们分别以完全培养基、放疗后肿瘤细胞的上清液、放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制剂甘草酸（GL）和放疗后肿瘤细胞的上清液+HMGB1 抑制

剂丙酮酸乙酯 (EP) 培养分选出的 PGCCs, 发现 HMGB1 小分子抑制剂 GL 和 EP 明显抑制了 PGCCs 形成克隆; D: 对未被放疗处理的肿瘤细胞和放疗诱导产生的 PGCCs 进行 RAGE、p-P38、p-ERK 免疫荧光染色, 发现 PGCCs 的 RAGE、p-P38、p-ERK 表达增强。E: 对取出的肿瘤组织进行 HMGB1、BrdU 和 Ki67 染色, 发现 PGCCs 细胞的 HMGB1 表达增强且具有增殖活力; F: 放疗诱导产生的濒死细胞通过释放 HMGB1 促进 PGCCs 发生 neosis, 进而促进肿瘤再增殖 (示意图)。*P<0.05, **P<0.01。

(6) 所资助的与本项目方向非常相近的一项研究结果: 选择肝癌细胞 Huh7 和 Li7 作为研究对象, 并通过转染萤火虫荧光素蛋白-水母绿色荧光蛋白融合蛋白 (Fluc-GFP) 基因质粒构建相对应的报告细胞 Huh7-Fluc 和 Li7-Fluc。以 10Gy 剂量 X 射线照射过的 Huh7 和 Li7 作为饲养细胞, 分别与相应的报告细胞 Huh7-Fluc 和 Li7-Fluc 共培养构建肿瘤再增殖模型, 以单纯的报告细胞以及报告细胞与无 X 射线处理的饲养细胞共培养的体系为对照, 通过生物成像观察荧光素酶活性变化来判断报告细胞生长情况, 以及 HMGB1 抑制剂甘草酸 (glycyrrhizin, GL) 干预后的影响。通过 TIMER2.0 和 GEPIA2 数据库分析平台, 分析 HMGB1 在肝癌组织及癌旁组织的表达水平以及与肝癌预后的相关性。结果发现 HMGB1 在肝癌组织中呈高表达, 与肝癌患者总生存期预后负相关, 同时, HMGB1 参与了 X 射线诱导的肝癌细胞再增殖过程, 通过 HMGB1 抑制剂 GL 能够显著抑制这一过程。虽然, HMGB1 调控肝癌细胞再增殖的具体分子机制尚未明确, HMGB1 抑制剂能否用于临幊上预防放疗后肝癌复发, 还需要进一步的深入研究, 但本研究为理解和预防肝癌复发提供了新的思路。该研究已于 2021 年发表于中文核心期刊《中国普通外科杂志》, 本人为论文的第一作者, 本基金为第一标注。

（三）研究人员的合作与分工。

概述研究人员的合作、分工及实际贡献; 列出资助项目执行期间新增和退出的研究人员名单, 简要说明原因。

编号	姓名	单位名称	职称	项目分工及实际贡献
1	赵煜翠	上海交通大学	博士研究生	流式细胞检测、western blotting
2	邓铮	上海交通大学	博士研究生	细胞免疫荧光、形态学研究
3	程进	上海交通大学	副主任技师	数据分析



4	宋延伟	上海交通大学	硕士研究生	动物实验、免疫组化
5	孙浩然	上海交通大学	硕士研究生	细胞实验、平板克隆形成实验
6				
7				

(四)国内外学术合作交流等情况。

简要描述主办或参加学术会议以及国际学术合作研究情况等。

无

(五)存在的问题、建议及其他需要说明的情况。

无

二、成果部分

(一)项目取得成果的总体情况

本部分内容应简明扼要，客观、真实地反映项目研究的主要成果信息，内容包括项目研究取得的成果、知识产权情况、学术价值、社会影响和应用价值等。涉及到国家秘密的成果信息按相关法律法规执行。

肿瘤再增殖是指放化疗后残存肿瘤细胞继续生长形成新的肿瘤的过程，是导致放化疗失败、肿瘤复发的重要原因之一。我们前期研究结果发现放疗诱导产生的凋亡细胞能通过 caspase-3/iPLA2/AA/PGE2、caspase-3/PKCδ/Akt/VEGF-A 通路促进肿瘤再增殖。但放化疗诱导产生的濒死细胞，除了凋亡细胞，还会产生大量坏死细胞。我们前期发现放疗诱导产生的坏死细胞，能够通过释放 HMGB1，激活残存肿瘤细胞 RAGE/MAPK 信号通路参与肿瘤再增殖。此外，我们还发现放疗能够诱导濒死肿瘤细胞形成多核或巨核细胞（PGCCs），这些 PGCCs 虽然大部分会走向死亡，但仍有部分 PGCCs 表现出增殖潜能，能通过出芽或者分裂的方式形成新的克隆，促进肿瘤再增殖，而外源性加入 HMGB1 小分子抑制剂甘草酸（GL）以及丙酮酸乙酯（EP）能够抑制该过程。同时，我们也发现 PGCCs 的 RAGE/MAPK 信号通路激活，基于此，我们推测 HMGB1 蛋白可能以一种旁分泌的方式通过激活 PGCCs 的 RAGE/MAPK 信号通路，调控 PGCCs 介导的肿瘤再增殖。由此可见，肿瘤再增殖的调控机制极其复杂，有待更深入的探索，本课题研究在 PGCCs 层面阐述了 HMGB1 调控肿瘤再增殖的新机制，丰富了 HMGB1 蛋白

的生物学功能。本项目主要的研究成果也于 2021 年发表于《Molecular Oncology》杂志 (IF: 7.449)，本人是论文的共同通讯作者，本基金是第三标注。同时，另有已发表标注本项目资助的 SCI 综述 2 篇，中文核心期刊论著 1 篇，分别如下：SCI 综述：①《Cancers》(IF: 6.575，本人是论文的第一作者，本基金是第二标注)；②《Advanced Healthcare Materials》(IF: 11.092，本人是论文的共同第一作者，本基金是第二标注)；中文论著：《中国普通外科杂志》(本人是论文的第一作者，本基金是第一标注)。详见附件。

(二)项目成果转化及应用情况

总体描述资助项目研究成果转移转化的情况，应体现其直接经济价值、提高生产力及推动社会管理或服务发展的贡献。可根据《中华人民共和国促进科技成果转化法》对成果转化及应用情况进行描述。

无。

(三)人才培养情况

简要描述资助项目执行期间博士后及研究生培养情况，以及研究人员获得国家级人才计划资助情况等。

编号	姓名	研究生/ 博士后	论文题目	备注
1	赵煜翠	博士生	放疗诱导的异-多倍体肿瘤巨细胞去多倍体化导致肿瘤再增殖的分子机制研究	毕业
2	宋延伟	硕士生	结直肠癌放疗敏感性评估及放疗诱导的多倍体肿瘤巨细胞再增殖分子机制研究	毕业
3				
4				

(四)其他需要说明的成果

无。

(五)项目成果科普性介绍或展示网站

为呼应广大纳税人对公共财政支持的研发活动所取得研究成果的关切，推进项目研究成果的宣传与共享，项目组应根据研究情况提供项目成果科普性介绍或展示网站，力求简明扼要、通俗易懂。其中重点项目、重大项目、重大研究计划项目、国家杰出青年科学基金项目、创新研究群体项目、重点国际（地区）合作研究项目及国家重大科研仪器研制项目必须提供项目成果科普性介绍或展示



网站，同时鼓励其他类型项目提供相关信息。

无。