



## 重组高迁移率组蛋白N2蛋白入胞与细胞定位研究

马骁, 徐恩杰, 尹佳, 周许辉

引用本文:

马骁, 徐恩杰, 尹佳, 等. 重组高迁移率组蛋白N2蛋白入胞与细胞定位研究[J]. 中国临床医学, 2020, 27(2): 308-312.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191521>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### miRNA-106b失活可通过上调MMP2表达参与乳腺癌骨转移

Inactivation of miR-106b induces breast cancer metastasis to bone associated with overexpression of matrix metalloproteinase 2

中国临床医学. 2017, 24(5): 673-680 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170529>

### 抗衰老酶1-p53信号通路在吸入麻醉致原代海马神经元细胞凋亡中的神经保护作用

SIRT1-p53 pathway protects against sevoflurane-nitrous oxide anesthesia-induced apoptosis in primary-cultured hippocampal neurons

中国临床医学. 2019, 26(6): 848-854 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190774>

### 钠钙交换器1对肝细胞肝癌增殖与侵袭的影响

The role and mechanisms of NCX1 on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2017, 24(6): 873-878 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170291>

### 原发性肝细胞肝癌中核不均一核糖核蛋白A1的定位及临床意义

The location and significance of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A 1 in hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2016, 23(6): 720-724 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160996>

### 过表达锌指蛋白A20可抑制肺泡巨噬细胞炎症反应

A20 regulates the inflammatory responses of alveolar macrophage

中国临床医学. 2016, 23(6): 715-719 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160822>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191521

# 重组高迁移率组蛋白 N2 蛋白入胞与细胞定位研究

马 骁, 徐恩杰, 尹 佳, 周许辉\*

海军军医大学附属长征医院脊柱四科, 上海 200003

**[摘要]** 目的: 体外制备高迁移率组蛋白 N2 (high mobility group chromosomal protein N2, HMGN2) 蛋白, 观察其能否转运入骨肉瘤细胞及入胞后的细胞定位。方法: 构建 HMGN2 过表达慢病毒质粒并包装慢病毒, 在 HEK-293FT 细胞中过表达并纯化。用纯化的 HMGN2 蛋白处理骨肉瘤细胞。通过免疫细胞化学检测外源性 HMGN2 能否转运入骨肉瘤细胞及细胞定位。结果: 成功制备、纯化 HMGN2 蛋白, 并发现外源性 HMGN2 能转运入骨肉瘤细胞, 主要定位于细胞核。结论: 外源性 HMGN2 能转运入细胞并定位于细胞核, 为其发挥生物学效应奠定基础。

**[关键词]** 骨肉瘤; 转移; 高迁移率组蛋白 N2; 蛋白纯化

**[中图分类号]** R 738.1 **[文献标志码]** A

## Study on the entry of recombinant HMGN2 protein into osteosarcoma cells and cell localization

MA Xiao, XU En-jie, YIN Jia, ZHOU Xu-hui\*

Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective:** To prepare high mobility group chromosomal protein N2 (HMGN2) protein *in vitro*, and observe its capacity to enter into osteosarcoma cells and its cell localizations. **Methods:** After packaging HMGN2 overexpressing lentivirus, the recombinant lentivirus was delivered into HEK-293FT cells. HMGN2 protein was purified from the harvested 293FT cells using protein purification kit. Purified HMGN2 protein was used to treat cultured osteosarcoma cells. Whether the exogenous HMGN2 could enter into osteosarcoma cells and its cell localizations were detected by immunocytochemistry assay. **Results:** HMGN2 protein was successfully prepared and purified. The exogenous HMGN2 protein entered into osteosarcoma cells in culture, and mainly located in the nucleus. **Conclusions:** HMGN2 could be successfully prepared and purified, and can enter into cells. It mainly localizes in the nucleus, to lay a foundation for its biological effects.

**[Key Words]** osteosarcoma; metastasis; high mobility group chromosomal protein N2; protein purification

骨肉瘤是儿童和青少年中最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>, 特点为易早期转移。15%~25%的患者在确诊骨肉瘤时可检测到肺部转移<sup>[3]</sup>。骨肉瘤的主要治疗方法为肿瘤切除术和非特异性联合化疗<sup>[4-5]</sup>。随着肿瘤治疗技术的发展, 骨肉瘤患者的长期生存率有所提高<sup>[6]</sup>, 但合并远处转移患者的生存率仍很低<sup>[7-9]</sup>。因此, 抑制其转移仍是抗肿瘤治疗的关键。

高迁移率组蛋白 N2 (high mobility group chromosomal protein N2, HMGN2) 的异常表达与多种肿瘤的发生、发展相关<sup>[10-14]</sup>。研究<sup>[15-16]</sup>发现, HMGN2 能抑制膀胱癌细胞和口腔鳞状细胞癌细胞的生长, 并促进其凋亡。本课题组以往研究<sup>[17]</sup>也表明, 在骨肉瘤细胞中以慢病毒感染的方式过表达 HMGN2 会抑制细胞的转移, 提示 HMGN2 是一类抗肿瘤转移因子, 促进其

在肿瘤细胞内的表达可作为一种治疗骨肉瘤的临床策略。但是, 慢病毒过表达方法有潜在危险性。

有研究<sup>[18-20]</sup>表明, 人外周血单核细胞和淋巴细胞可在受到外界刺激后向胞外分泌 HMGN2。这种分泌的 HMGN2 可能也具有抑制骨肉瘤转移的功能, 而能否自行入胞是其发挥功能的基础, 目前鲜见相关研究。因此, 本研究探讨了外源性 HMGN2 蛋白能否进入骨肉瘤细胞及其细胞定位, 期望能为未来研发类 HMGN2 结构药物或刺激 HMGN2 释放的药物提供思路。

## 1 材料与方法

1.1 研究材料 U-2OS 骨肉瘤细胞和 HEK-293FT 细胞购自上海中国科学院细胞库。慢

**[收稿日期]** 2019-08-29 **[接受日期]** 2019-12-17

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81772305, U1603118), 上海市科学技术委员会科研计划(16140901800)。Supported by National Natural Science Foundation of China(81772305, U1603118), Shanghai Science and Technology Committee of China (16140901800)。

**[作者简介]** 马 骁, 硕士, 住院医师。E-mail: kugrdmx@163.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81886999, E-mail: xzhouspine@163.com

病毒载体以及病毒包装质粒购自吉凯基因。PVDF膜购自 Millipore 公司,牛血清白蛋白、FLAG M 纯化试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自 Sigma-Aldrich 公司,一抗及 ELISA 试剂盒购自 Abcam 公司,二抗购自 CST 公司,ECL 曝光液购自 Pierce 公司,DMEM 购自 Hyclone 公司,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,TRIzol 试剂、Lipofactamine 2000、双抗(青霉素、链霉素)均购自 Invitrogen 公司,PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、SYBR Green 预混液购自 Takara 公司,反转录试剂盒购自 Applied Biosystems 公司,NE-PER 核蛋白提取试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。

**1.2 细胞培养** 将 U-2OS 骨肉瘤细胞和 HEK-293 FT 细胞置入含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/L)和链霉素(100 mg/L)的 DMEM 培养基中,于含 5%CO<sub>2</sub> 的 37℃ 细胞培养箱中培养。

**1.3 HMGN2 过表达慢病毒载体构建与包装** 过表达慢病毒载体元件顺序:Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin,以 BamHI 和 AgeI 内切酶进行酶切后,切胶回收。用 TRIzol 提取 U-2OS 细胞的总 RNA,使用反转录试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA,并以获得的 cDNA 为模板扩增 HMGN2 片段。扩增引物序列正向:5'-AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC GCC ACC ATG CCC AAG AGA AAG GCT GAA G-3',反向:5'-TCC TTG TAG TCC ATA CCC TTG GCA TCT CCA GCA CCT TC-3'。PCR 扩增反应体系包括 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 0.5 μL、模板 1 μL、上游扩增引物 1 μL、下游扩增引物 1 μL、dNTP Mix 4 μL、5×PS Buffer 10 μL、无酶水 32.5 μL。PCR 反应条件:98℃ 预变性 5 min;98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳并切胶回收。

将 PCR 产物交换入酶切后的 GV492 载体并进行转化。将菌落 PCR 结果为阳性的菌落接种于 LB 培养基。菌落 PCR 引物序列正向:5'-GGG TCA ATA TGT AAT TTT CAG TG-3',反向:5'- CCT TAT AGT CCT TAT CAT CGT C-3'。将菌液于 37℃ 培养 12 h 后取适量进行测序。用 DNA 序列无误的菌液抽提质粒。过表达组:将过表达质粒与包装质粒共转染至 HEK-293FT 细胞;空白组:将空载体和包装质粒共转染至 HEK-293FT 细胞。转染后将细胞继续培养 48 h 后,收取培养基上清,0.45 μm 滤

器过滤,以 30 000 r/min 4℃ 离心 3 h。离心结束后弃上清,加入 Opti-MEM 培养基 1 mL 吹打重悬,深低温(-80℃)保存病毒液。

**1.4 HMGN2 的过表达和蛋白纯化** 用过表达慢病毒(HMGN2-flag<sup>oe</sup>组)和空白慢病毒(oeCON 组)感染 HEK-293FT 细胞。通过预实验确定 U-2OS 细胞病毒感染的最佳感染复数(MOI)为 10。为了增加阳性细胞的比例,在细胞感染 3 d 后进行流式分选,并继续培养携带绿色荧光的细胞。当细胞培养至 70%~80% 融合时,收集并提取 RNA,通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测过表达效率。确认 HMGN2 过表达效率后,收集过表达 HMGN2 的细胞,用 NE-PER 核蛋白提取试剂盒提取核蛋白,并应用 FLAG M 纯化试剂盒纯化 HMGN2-flag 蛋白。通过 ELISA 法(ab49763)检测 HMGN2 的浓度。

**1.5 RT-qPCR** 使用 SYBR Premix Ex Taq 和 ABI Prism 7900HT 进行 RT-qPCR,定量测定 HMGN2 的表达水平。应用 TRIzol 提取每组细胞的总 RNA,并使用反转录试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA,用特异性引物进行扩增(以人 β-actin 基因为内参)。PCR 引物序列:HMGN2 正向为 5'-CGA TTG TCT GCC CAT GTC CT-3',反向为 5'-GCA GAA CGT ACC CTG TTC CA-3';β-actin 正向为 5'-ACC GAG CGC GGC TAC AG-3',反向为 5'-CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析并统计数据。用相同的样品和相同的引物重复 RT-qPCR 实验 3 次。

**1.6 Western 印记** 使用 NE-PER 核蛋白提取试剂盒提取核蛋白。获得的蛋白溶液在 SDS-PAGE 凝胶上电泳,分离的蛋白质条带转移到 PVDF 膜上,并在 5% 牛血清白蛋白中封闭,分别用抗 HMGN2(1:1 000 稀释,ab199679)和抗 DDDDK(1:1 000 稀释,ab49763)在 4℃ 下孵育过夜,然后在室温下用二抗孵育膜 1 h。使用 ECL 曝光液显影,并进行观察、拍摄。

**1.7 免疫细胞化学** 用浓度为 10 μg/mL 的纯化 HMGN2 蛋白处理骨肉瘤细胞 24 h,然后将细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液透化 5 min,用 1% BSA 封闭细胞 2 h。将细胞用抗 DDDDK 抗体(1:100 稀释,ab49763)在 4℃ 孵育过夜,然后用二抗孵育 1 h,PBS 洗涤后用 DAPI 封固。在共聚焦显微镜下观察 HMGN2-flag 的细胞定位并拍摄。

1.8 统计学处理 用 SPSS 版本 23.0 进行统计分析,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验<sup>[21]</sup>,检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 HMGN2 过表达慢病毒质粒构建 将获得的 HMGN2 片段与慢病毒过表达质粒(图 1A)连接后进行转化,获得 8 个阳性菌落(图 1B,泳道 5~12);糖凝胶电泳显示成功获得 HMGN2 的基因片段(图 1C),PCR 产物大小为 314 bp。将阳性菌送测序,结果显示序列无误,提取质粒进行慢病毒包装。

2.2 HMGN2 蛋白过表达与纯化 以慢病毒感染的方式在 HEK-293FT 细胞中过表达 HMGN2,以流式分选出阳性细胞后继续培养,荧光显微镜下显

示细胞带绿色荧光(图 2A)。RT-qPCR 结果显示, HMGN2-flag<sup>oe</sup> 组 HMGN2-mRNA 的表达水平显著高于 oeCON 组( $P < 0.001$ ,图 2B)。Western 印记结果显示, HMGN2-flag<sup>oe</sup> 组与 oeCON 组均有 HMGN2 表达, HMGN2-flag<sup>oe</sup> 组 HMGN2 表达大于 oeCON 组, HMGN2-flag<sup>oe</sup> 组 HMGN2 因带标签分子量较 oeCON 组稍大(图 2C); HMGN2-flag<sup>oe</sup> 组和 Flag-BAP 组中有 flag 表达,在 oeCON 组中未检测其表达(图 2D)。

2.3 外源性 HMGN2 转运骨肉瘤细胞及定位 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的纯化 HMGN2-flag 蛋白处理骨肉瘤细胞 24 h 后,免疫细胞化学检测结果显示,外源性 HMGN2 蛋白转入骨肉瘤细胞,主要定位于细胞核(图 3)。

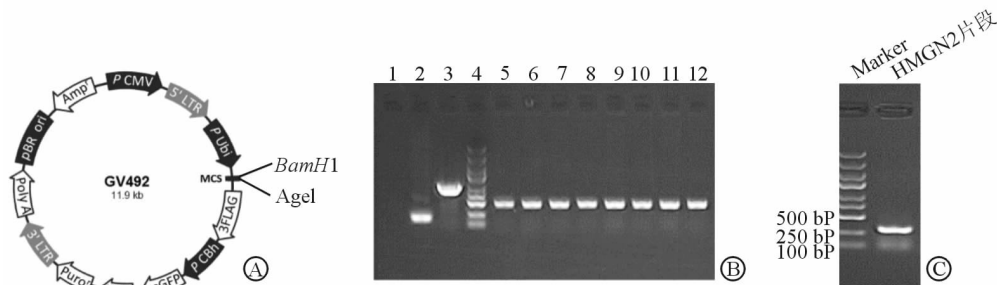


图 1 HMGN2 过表达慢病毒质粒的构建

A: 质粒图谱;B: PCR 扩增凝胶电泳结果;C: 构建好的质粒转化细菌后的菌液 PCR 验证。1: ddH<sub>2</sub>O 空白对照;2: 空载体对照;3: 连接 GAPDH 的对照;4: Marker;5~12: 8 个阳性菌落结果

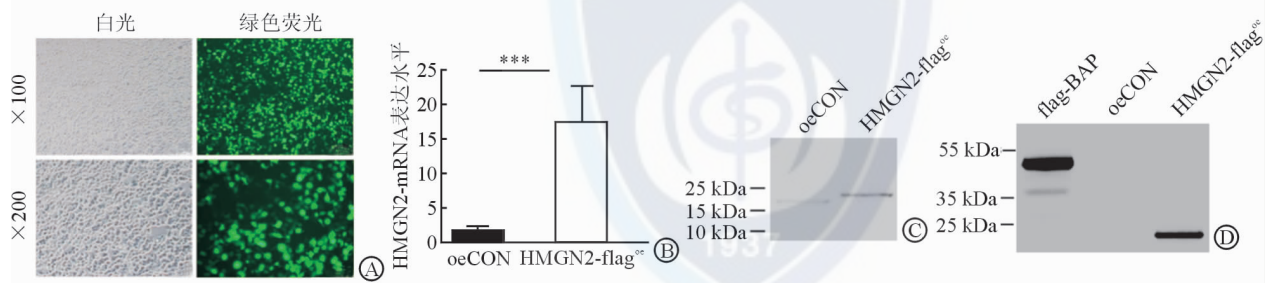


图 2 HMGN2 蛋白过表达与纯化

A: 白光下和绿色荧光下慢病毒感染的骨肉瘤细胞;B: 荧光定量 PCR 检测 HMGN2 过表达效率;C: Western 印记检测纯化 HMGN2 的表达;D: Western 印记检测 flag 的表达。oeCON 组: 空白载体对照;HMGN2-flag<sup>oe</sup>: 带有 flag 标签的 HMGN2 纯化蛋白;flag-BAP: 携带 flag 标签的融合蛋白,大小 49.3 kDa。\*\*\*  $P < 0.001$

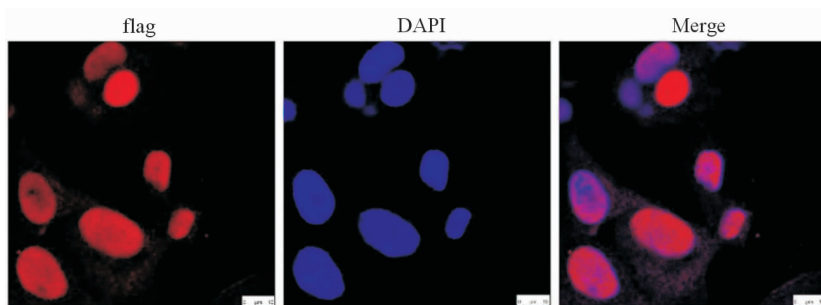


图 3 免疫细胞化学实验检测外源性 HMGN2 细胞定位

Original Magnification:  $\times 1000$

### 3 讨论

骨肉瘤是一类极易在早期转移的恶性肿瘤,约20%的骨肉瘤患者在明确诊断时即发现有转移,而大多数患者即使在初诊时未见转移,也会随着病情发展出现转移<sup>[22]</sup>。骨肉瘤的主要治疗方法是化疗和外科手术,但是目前没有有效的抗骨肉瘤转移的治疗策略,大部分患者仍会发生转移,导致死亡<sup>[23-25]</sup>。因此,抗骨肉瘤转移的研究成为这类肿瘤治疗的重点。

HMGN2是高迁移率族蛋白(HMG)的一员,主要定位于细胞核,且仅在真核生物中表达,具有稳定核小体形态和调节基因转录的功能<sup>[26]</sup>。其是一种非组蛋白核蛋白,在脊椎动物和无脊椎动物的细胞中广泛表达<sup>[27-28]</sup>。HMGN2蛋白含有核小体结合域(NBD),其NBD的N末端与组蛋白结合,而C末端与DNA结合并调节转录<sup>[28]</sup>。HMGN2能增加DNA在核小体上的缠结角度,促进核衣壳结构重塑<sup>[29]</sup>。HMGN2功能缺陷能增加DT40细胞对紫外线的敏感性,使细胞凋亡率增加<sup>[30]</sup>。较多研究<sup>[10-15]</sup>显示,HMGN2的异常表达与多种肿瘤的发生、发展有关联。HMGN2高表达还具有抑癌效果。研究<sup>[16]</sup>表明,HMGN2可抑制口腔鳞状细胞癌细胞系Tca8113的生长并诱导其凋亡。本课题组以往研究<sup>[17]</sup>发现,过表达HMGN2能抑制骨肉瘤细胞的转移。除了直接抑制肿瘤细胞转移外,Porkka等<sup>[19]</sup>还发现,HMGN2与肿瘤血管生成相关。

肿瘤转移抑制和肿瘤靶向肽研究<sup>[31-32]</sup>表明,HMGN2可能是治疗肿瘤转移的潜在靶标。研究人员从牛肝中提取了一种含21个氨基酸的肽,称为侵袭抑制剂2(IIF2),且鉴定显示其与HMGN2的C末端片段一致<sup>[31-32]</sup>。体外研究<sup>[32-34]</sup>显示,该肽能抑制多个肿瘤细胞的转移。而动物研究<sup>[32]</sup>表明,同时将IIF2和肺癌细胞经小鼠尾静脉注射可使肿瘤细胞转移减少50%~60%。IIF2与白蛋白结合可提高其稳定性,并使转移减少86%<sup>[33, 35]</sup>。上述研究表明,HMGN2可作为一类抑癌因子,应用于抗恶性肿瘤转移。

重组慢病毒载体是一种常用且有效的将外源蛋白基因导入细胞的手段<sup>[36]</sup>,但是慢病毒载体的转录“通读”现象可导致其整合位点附近原沉默基因被激活,这可能有潜在的危险性。因此需要寻找更为有效和安全的方式来增加肿瘤细胞内的HMGN2的含量。HMGN2能被某些细胞以外分泌的方式

释放到胞外。白细胞介素2(IL-2)可刺激人外周血单核细胞释放HMGN2<sup>[19-20]</sup>;一些肿瘤细胞的表面抗原也能刺激CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞释放HMGN2<sup>[18]</sup>。这些研究提示,有可能通过外界刺激促使肿瘤旁正常组织或肿瘤附近的免疫细胞释放足量的HMGN2,从而发挥其抗肿瘤作用。而这类外分泌的HMGN2转运入肿瘤细胞是其发挥功能的基础。本研究用纯化HMGN2-flag融合蛋白处理骨肉瘤细胞,免疫细胞化学检测显示该外源性HMGN2能转运入骨肉瘤细胞并定位于细胞核。此外,内源性HMGN2蛋白在细胞核的定位已被多项研究<sup>[37-38]</sup>证实,而外源性HMGN2蛋白入胞是其入核的先决条件,对其机制的深入研究能为未来相关药物的研发提供依据。

综上所述,过表达的HMGN2在人骨肉瘤细胞系中表现出抗肿瘤活性,而本研究成功制备了HMGN2蛋白,并经免疫细胞化学实验证实外源性HMGN2能转运入骨肉瘤细胞,从而为进一步研究其抗肿瘤转移功能及新药研发提供了基础。下一步研究将对外源性HMGN2入胞后的抗肿瘤转移能力和机制进行探索。

### 参考文献

- [1] European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2012,23 Suppl 7:i100-i109.
- [2] JO V Y, FLETCHER C D. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition[J]. *Pathology*, 2014,46(2):95-104.
- [3] GORDON N, KLEINERMAN E S. Aerosol therapy for the treatment of osteosarcoma lung metastases: targeting the Fas/FasL pathway and rationale for the use of gemcitabine [J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010,23(4):189-196.
- [4] ALLISON D C, CARNEY S C, AHLMANN E R, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era[J]. *Sarcoma*, 2012,2012:704872.
- [5] JAFFE N, PURI A, GELDERBLUM H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms [J]. *Sarcoma*, 2013, 2013:203531.
- [6] WITTIG J C, BICKELS J, PRIEBAT D, et al. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment[J]. *Am Fam Physician*, 2002,65(6):1123-1132.
- [7] MEYERS P A, HELLER G, HEALEY J H, et al. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation[J]. *J Clin Oncol*, 1993,11(3):449-453.
- [8] TSUCHIYA H, KANAZAWA Y, ABDEL-WANIS M E, et al. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the Japanese musculoskeletal oncology group study [J]. *J Clin Oncol*,

- 2002,20(16):3470-3477.
- [9] KAGER L, ZOUBEK A, POTSCHGER U, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(10): 2011-2018.
- [10] SRIKANTHA T, LANDSMAN D, BUSTIN M. Retroseuodogenes for human chromosomal protein HMG-17[J]. *J Mol Biol*, 1987,197(3):405-413.
- [11] SPIEKER N, BEITSMA M, VAN SLUIS P, et al. An integrated 5-Mb physical, genetic, and radiation hybrid map of a 1p36.1 region implicated in neuroblastoma pathogenesis[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000,27(2):143-152.
- [12] FIORILLO A A, MEDLER T R, FEENEY Y B, et al. HMGN2 inducibly binds a novel transactivation domain in nuclear PRLr to coordinate Stat5a-mediated transcription[J]. *Mol Endocrinol*, 2011,25(9):1550-1564.
- [13] MEDLER T R, CRAIG J M, FIORILLO A A, et al. HDAC6 deacetylates HMGN2 to regulate Stat5a activity and breast cancer growth[J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(10): 994-1008.
- [14] SCHAUWECKER S M, KIM J J, LICHT J D, et al. Histone H1 and chromosomal protein HMGN2 regulate prolactin-induced STAT5 transcription factor recruitment and function in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(6):2237-2254.
- [15] WEI D, ZHANG P, ZHOU M, et al. HMGN2 protein inhibits the growth of infected T24 cells in vitro[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014,10(2):299-304.
- [16] HU A, DONG X, LIU X, et al. Nucleosome-binding protein HMGN2 exhibits antitumor activity in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014,7(1):115-120.
- [17] LIANG G, XU E, YANG C, et al. Nucleosome-binding protein HMGN2 exhibits antitumor activity in human SaO2 and U2-OS osteosarcoma cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2015,33(3):1300-1306.
- [18] SU L, HU A, LUO Y, et al. HMGN2, a new anti-tumor effector molecule of CD8(+) T cells[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:178.
- [19] PORKKA K, LAAKKONEN P, HOFFMAN J A, et al. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002,99(11):7444-7449.
- [20] FENG Y, HUANG N, WU Q, et al. HMGN2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes? [J]. *J Leukoc Biol*, 2005,78(5):1136-1141.
- [21] 金雪娟, 周俊, 时智英, 等. 临床研究常用统计方法概述[J]. *中国临床医学*, 2005,12(3):557-558.
- [22] ARLT M J, BANKE I J, WALTERS D K, et al. LacZ transgene expression in the subcutaneous Dunn/LM8 osteosarcoma mouse model allows for the identification of micrometastasis[J]. *J Orthop Res*, 2011,29(6):938-946.
- [23] YANG J, ZHANG W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(4):398-406.
- [24] BOTTER S M, NERI D, FUCHS B. Recent advances in osteosarcoma[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014,16:15-23.
- [25] HE J P, HAO Y, WANG X L, et al. Review of the molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014,15(15):5967-5976.
- [26] KATO H, VAN INGEN H, ZHOU B R, et al. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(30):12283-12288.
- [27] POSTNIKOV Y V, HERRERA J E, HOCK R, et al. Clusters of nucleosomes containing chromosomal protein HMG-17 in chromatin[J]. *J Mol Biol*, 1997, 274(4): 454-465.
- [28] BUSTIN M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1999,19(8):5237-5246.
- [29] SHIMAHARA H, HIRANO T, OHYA K, et al. Nucleosome structural changes induced by binding of non-histone chromosomal proteins HMGN1 and HMGN2[J]. *FEBS Open Bio*, 2013,3:184-191.
- [30] SUBRAMANIAN M, GONZALEZ R W, PATIL H, et al. The nucleosome-binding protein HMGN2 modulates global genome repair[J]. *FEBS J*, 2009,276(22):6646-6657.
- [31] ISOAI A, GIGA-HAMA Y, SHINKAI K, et al. Purification and characterization of tumor invasion-inhibiting factors[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990,81(9):909-914.
- [32] ISOAI A, GIGA-HAMA Y, SHINKAI K, et al. Tumor invasion-inhibiting factor 2: primary structure and inhibitory effect on invasion in vitro and pulmonary metastasis of tumor cells[J]. *Cancer Res*, 1992,52(6):1422-1426.
- [33] ISOAI A, GOTO-TSUKAMOTO H, MURAKAMI K, et al. A potent anti-metastatic activity of tumor invasion-inhibiting factor-2 and albumin conjugate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993,192(1):7-14.
- [34] HAN Z G, JIANG W G, HISCOX S, et al. Inhibition of motility and invasion of human lung cancer cells by invasion inhibiting factor 2[J]. *Surg Oncol*, 1996,5(2):77-84.
- [35] ISOAI A, GOTO-TSUKAMOTO H, YAMORI T, et al. Inhibitory effects of tumor invasion-inhibiting factor 2 and its conjugate on disseminating tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1994,54(5):1264-1270.
- [36] 周磊, 陈婕, 徐欣, 等. 利用重组慢病毒载体建立稳定表达绿色荧光蛋白细胞系[J]. *中国临床医学*, 2009,16(2):305-308.
- [37] SU L, HU A, LUO Y, et al. HMGN2, a new anti-tumor effector molecule of CD8(+) T cells[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:178.
- [38] SHIMAHARA H, HIRANO T, OHYA K, et al. Nucleosome structural changes induced by binding of non-histone chromosomal proteins HMGN1 and HMGN2[J]. *FEBS Open Bio*, 2013,3:184-191.