

· 基础研究 ·

HOXA5在原发性肝细胞肝癌发生发展中的作用

王 飞, 孙倍成*

南京医科大学第一附属医院肝移植中心, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨转录因子HOXA5在肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发展中的作用。方法:利用qRT-PCR、蛋白质免疫印迹实验和免疫组化探究HOXA5在HCC组织和对应癌旁组织中的表达水平。构建敲低HOXA5的稳转人肝癌细胞系Hep3B、MHCC97H后应用平板克隆、CCK8、EdU检测细胞增殖能力;流式细胞术检测H₂O₂诱导的HCC细胞凋亡;Transwell实验检测细胞侵袭能力。蛋白质免疫印迹实验检测HOXA5敲低及过表达后对PI3K-AKT信号通路的影响。结果:HCC组织中的HOXA5表达量高于对应癌旁组织,敲低HOXA5后减弱HCC细胞增殖、侵袭以及对凋亡的抵抗能力,减弱PI3K-AKT信号通路的激活,而过表达HOXA5增强PI3K-AKT通路激活。结论:HCC组织中的HOXA5表达水平高于癌旁组织。HCC细胞中HOXA5表达水平改变可以影响其增殖、凋亡、侵袭能力,以及PI3K-AKT信号通路的状态。

[关键词] 肝细胞性肝癌;HOXA5;增殖;凋亡;PI3K-AKT信号通路

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-867-06

doi:10.7655/NYDXBNS20190615

Effects of HOXA5 on carcinogenesis and progression of HCC

Wang Fei, Sun Beicheng*

Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the role of HOXA5 in HCC progression. **Methods:** RT-qPCR, Western blot, IHC were carried out to detect the expression of HOXA5 in HCC tissues and adjacent peritumor tissues. Hep3B and MHCC97H cells were chosen to establish the knockdown model. Colony formation assay, EdU assay, and CCK8 assay were performed to demonstrate the proliferation ability of HCC cells. Transwell assay and FACS technology were used to detect invasion and anti-apoptosis ability of HCC cells separately. Finally, Western blot was carried out to further confirm the possible role that HOXA5 played in PI3K-AKT signal pathway. **Results:** Expression of HOXA5 at mRNA and protein level in HCC tissues were significantly higher than that in adjacent peritumor tissues. Knockdown of HOXA5 could reduce the proliferation, invasion and anti-apoptosis ability of HCC cells. Knockdown of HOXA5 could decrease the expression of phosphorylated PI3K and phosphorylated AKT, while ectopic expression of HOXA5 promoted the activation of this pathway. **Conclusion:** The expression of HOXA5 in HCC tissues is higher than that in adjacent tissues. Manipulation of HOXA5 expression in HCC cells had an impact on their proliferation, anti-apoptosis ability, invasion ability and activation of the PI3K-AKT signaling pathway *in vitro*.

[Key words] hepatocellular carcinoma; HOXA5; proliferation; apoptosis; PI3K-AKT signal pathway

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 867-872]

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是实体肿瘤中恶性程度较高的一种。根据全球范围

内的统计结果,虽然HCC的发病率在东亚地区略有下降,但它仍然位列癌症相关死亡原因的第三位^[1]。HCC的危险因素有很多,主要包括乙型或丙型肝炎病毒感染、酒精性及非酒精性脂肪性肝病等^[2]。

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81430062);国家重点基础研究发展计划(2016YFC09059 00)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sunbc@nju.edu.cn

HCC相较于其他肿瘤而言,对各种治疗手段诸如放化疗均不敏感^[3]。即使在接受了完整的手术切

除后,患者5年内复发的概率依旧高达70%^[4]。虽然一系列分子靶向药物如索拉菲尼的问世,在一定程度上能够使患者的病情得到缓解,然而HCC组织在基因层面上所具有的复杂异质性使得科研工作者和临床医生难以找寻到一个精准的治疗靶点^[5]。因此深入挖掘对HCC发生及发展产生的分子机制显得尤为关键。

HOX蛋白是包含DNA结合模体的高度保守的转录因子家族,主要参与了细胞增殖的调节,以及胚胎发育时期细胞的分化^[6]。HOXA5作为HOX家族中的一员,广泛参与人体正常生理及病理过程的调节,在不同组织来源的恶性肿瘤中,发挥着促癌或抑癌的作用。乳腺癌细胞中HOXA5的缺失可以促使肿瘤细胞向肿瘤干细胞的方向分化,进而促进肿瘤的演进^[7];在食管癌中,HOXA5可以通过影响Wnt/ β -catenin信号通路促进肿瘤细胞的增殖及转移^[8];非小细胞肺癌中的HOXA5则与p53基因协同发挥抑癌作用^[9]。虽有文献报道HOXA5在HCC组织中呈现高表达^[10],但目前关于它在HCC中发挥的作用还鲜有研究证明。本研究旨在揭示HOXA5对HCC发生及发展的影响,为未来探寻肝癌发生机制,以及寻找治疗性的分子靶标提供新的角度。

1 材料和方法

1.1 材料

肝细胞癌和癌旁组织临床标本来源于南京医科大学第一附属医院近5年行肝部分切除术的100例HCC患者。所有提供组织的患者均在术前签署参与本次实验的知情同意书,并由伦理委员会审核通过。所有组织在离体后10 min内置入液氮保存。HCC患者的最终诊断均由病理结果判定。所有研究的开展均与国家相关政策及赫尔辛基宣言相符合。

人肝癌细胞株Hep3B及MHCC97H(中科院上海生命科学研究院细胞资源中心)。DMEM高糖细胞培养基、0.25% Trypsin-EDTA细胞消化液、胎牛血清(FBS,维森特生物技术南京有限公司);细胞转染试剂Lipofectamine 3000、助病毒感染剂聚凝胺(Polybrene)、RNA提取试剂TRIzol(Invitrogen公司,美国);RNA逆转录试剂盒,SYBR[®] Premix Ex Taq[™](南京诺唯赞生物科技有限公司);无水乙醇、95%乙醇、氯仿、异丙醇等化学试剂(上海国药集团化学试剂公司);PVDF膜(罗氏公司,德国);蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、聚丙烯酰胺凝胶配置试剂盒(南通碧云天生物技术有限公司);免疫组

化及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);细胞培养皿、培养板、离心管(Corning公司,美国);其他常规试剂均严格按照相关文献材料方法部分进行配制。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞系Hep3B和MHCC97H在补充有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的培养基中培养。培养箱条件为加湿,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。

1.2.2 细胞转染

利用Lipo3000在对数生长期的293T细胞包装敲低,敲低对照以及过表达,过表达对照病毒,在助转染试剂polybrene的帮助下转染于Hep3B及MHCC97H细胞中。敲低shRNA序列信息:sh1:5'-CCGGGCCAUUAUAGCGCCUGUAUAACUCGAGUUAUACAGGCGCUAUAUUGGCUUUU-3';sh2:5'-CCGGCCGCAGAAGGAGGAUUGAAAUCUCGAGAUUCAAUCCUCCUUCUGCGGUUUU-3'。

1.2.3 RNA提取及逆转录荧光定量PCR(qRT-PCR)

用匀浆机将组织磨匀成悬液,利用TRIzol提取总RNA,利用逆转录试剂盒及荧光定量试剂盒,按照使用说明,配置成相应体系,于荧光定量PCR扩增仪检测(ABI公司,美国)。HOXA5引物序列:上游引物:5'-AACTCATTGTCGGTTCGCTAT-3';下游引物:5'-TCCCTGAATTGCTCGCTCAC-3'。 β -actin引物序列:上游引物:5'-CATGTACGTTGCTATCAGGC-3';下游引物:5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'。

1.2.4 蛋白提取

用配有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液消化细胞或已匀浆的组织,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心20 min后收集上清,BCA测定蛋白浓度后,按比例加入上样缓冲液,煮沸变性,保存于-20 $^{\circ}$ C。

1.2.5 蛋白质免疫印迹实验

准备好的蛋白样品用SDS-PAGE电泳分离后湿转法转至PVDF膜。5%BSA常温封闭后用目标蛋白抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗脱后孵育辣根过氧化物酶标记的二抗,再次洗脱后显影。目标蛋白抗体信息: β -actin(#8457)、PI3K(#4249)、AKT(#4691)、p-AKT(Thr308)(#13038)、p-AKT(Ser473)(#4060)(Cell signaling technology公司,美国)、p-PI3K(Y458/Y199)(BS4605, Bioworld公司,美国),HOXA5(sc-365784,Santa Cruz公司,美国)。所有抗体均参照说

说明书稀释使用。

1.2.6 免疫组化

HCC及癌旁组织的石蜡切片在二甲苯及梯度酒精依次浸泡后脱蜡水化,柠檬酸钠水溶液高温高压抗原修复后按照免疫组化染色试剂盒说明操作阻断内源性过氧化物酶及封闭。目标抗体按照1:200比例稀释后4℃孵育过夜。后续操作依据说明书进行。洗脱后DAB显影。

1.2.7 流式细胞分析

Annexin V-APC/7-AAD凋亡检测试剂盒(南京凯基生物技术股份有限公司)用于检测细胞凋亡。将用于细胞凋亡检测的HCC细胞以每孔 6×10^5 个/mL密度接种到6孔板中,在完全培养基中于37℃培养2d至80%汇合,然后用0.05 mmol/L H_2O_2 处理2h用于刺激细胞凋亡。用非EDTA胰蛋白酶消化后,收获细胞并用细胞凋亡试剂盒染色15 min。最后在配备有BD FACS Diva Software 6.0(BD Biosciences公司,美国)的FACS Calibur流式细胞仪上进行流式细胞术检测。

1.2.8 细胞增殖实验

使用CCK8试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)和Cell-Light EdU Apollo567体外试剂盒(广州RiboBio公司)检测细胞的增殖活力。对于EdU测定,将细胞接种到共聚焦皿(Nest Biotechnology公司,美国),并按照制造商说明书进行处理。最后用共聚焦显微镜拍摄图像。对于CCK8评估,首先将细胞(3×10^3)种植到96孔板的每个孔中。在24、48、72 h后向每个孔中加入10 μ L CCK8试剂并在37℃下孵育2 h。通过酶标仪在450 nm处测量吸光度值(ELX-800,美国)。为了评估克隆形成能力,将300个细胞接种到6孔培养皿中,生长2周。甲醇固定20 min后,将形成的细胞群落用0.1%结晶紫(南通碧云天生物技术有限公司)染色。

1.2.9 侵袭实验

使用Transwell小室(Millcell公司,德国)进行迁移和侵袭测定,其中在膜上方涂覆基质胶(BD公司,美国)。将稳定转染的细胞以 2×10^4 个/mL的浓度重悬于无胎牛血清的培养基中。将500 μ L细胞悬浮液加到上室中,并且用含有10%FBS的培养基填充下室作为化学引诱物。温育48 h后,成功迁移的细胞用4%多聚甲醛固定后0.1%结晶紫染色。在光学显微镜下观察,计算平均细胞数。

1.3 统计学方法

以上所有实验重复3次,采用SPSS19.0统计软件,计量结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析和最小显著性差异法用于检验多组数据的差异。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

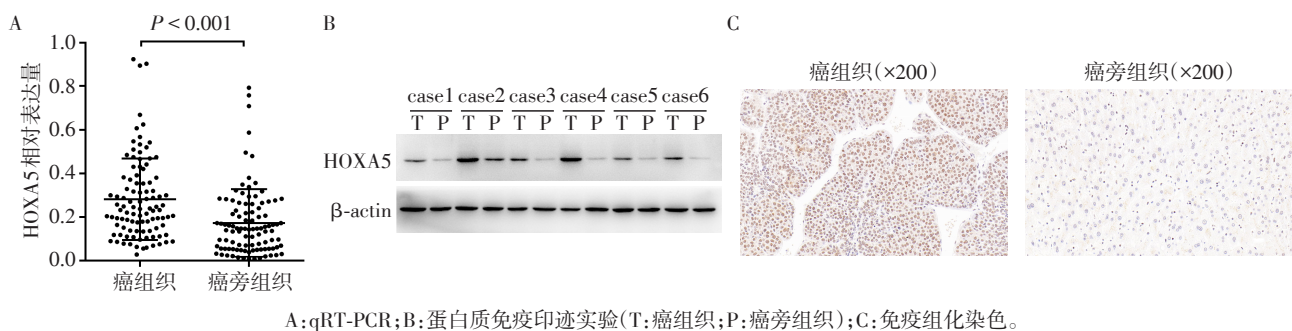
2 结果

2.1 HOXA5在HCC组织中表达水平高于相应癌旁组织

qRT-PCR检测了100对HCC和相应癌旁组织的HOXA5表达水平,结果显示HCC组织中的HOXA5在mRNA水平较癌旁组织明显升高(图1A)。蛋白质免疫印迹实验(图1B)以及免疫组化染色(图1C)均证明HCC组织中的HOXA5在蛋白水平上调明显。

2.2 体外敲低HOXA5表达减弱HCC细胞增殖能力

为研究HOXA5对HCC细胞增殖能力的影响,利用病毒转染Hep3B及MHCC97H细胞建立稳定敲低HOXA5的稳转细胞系,并且利用蛋白质免疫印迹实验检验了敲低效率(图2A)。CCK8(图2B)、平板克隆(图2C)、EdU(图2D)的实验结果证实,体外敲低HOXA5后,肝癌细胞的增殖能力显著受到削弱,提示HOXA5在维持HCC细胞增殖力方面发挥重要作用。



A: qRT-PCR; B: 蛋白质免疫印迹实验(T: 癌组织; P: 癌旁组织); C: 免疫组化染色。

图1 HOXA5在HCC组织中表达水平高于相应癌旁组织

Figure 1 The expression level of HOXA5 in HCC tissues is higher than that of corresponding adjacent tissues

2.3 体外敲低HOXA5表达减弱HCC细胞的抗凋亡及侵袭能力

转染了敲低HOXA5病毒的Hep3B、MHCC97H细胞,在相同浓度和时间H₂O₂刺激条件下发生凋亡的细胞比例明显较对照组增多(图3A)。类似的,在一定时间内穿过Transwell小室的细胞也明显减少(图3B)。这提示HOXA5能增强HCC细胞的抗凋亡以及侵袭能力。

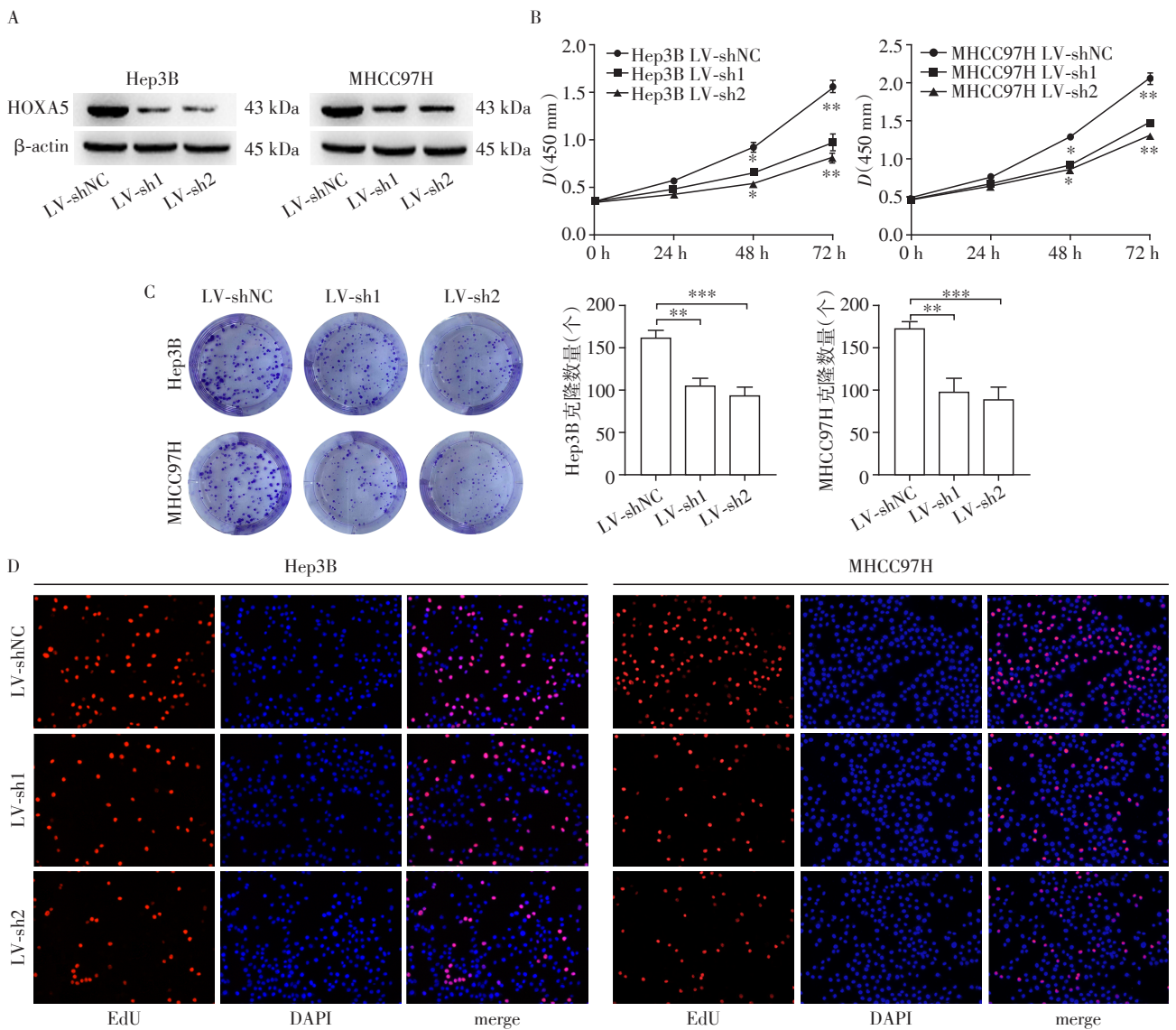
2.4 体外敲低或过表达HOXA5影响PI3K-AKT通路的激活

进一步探究HOXA5是否会影响PI3K-AKT通路的激活。蛋白质免疫印迹实验证明(图4),HOXA5敲低后PI3K及AKT的磷酸化减弱,但是总

PI3K、AKT表达不变。而过表达HOXA5后,PI3K及AKT的磷酸化明显增强。

3 讨论

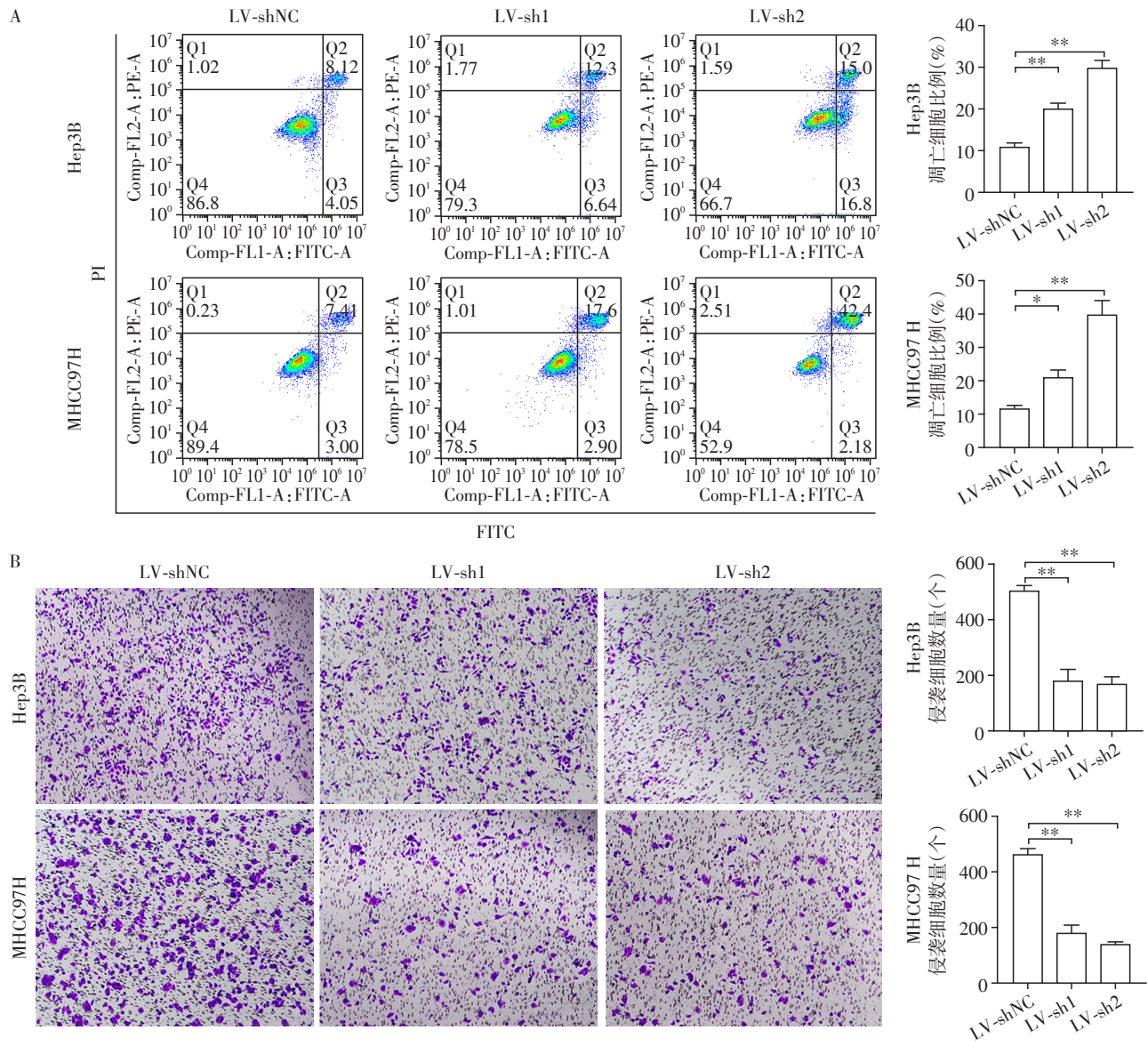
近年来诸多研究证实HOX转录因子在各种实体肿瘤中发挥着不可忽视的作用^[11]。HOXA5作为HOX家族的一员,在食管癌、乳腺癌、肺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中均存在异常高表达或低表达的情况,对肿瘤细胞分化、增殖、转移的影响也不完全相同^[7,9,12-13]。基于其转录因子的本质,HOXA5主要是通过影响下游分子的转录来行使其生物学功能,也有研究证明了一些非编码的单链RNA参与了HOXA5对肿瘤细胞表型的调控^[12-13]。前人的测序结



A: 蛋白质免疫印迹实验检测HOXA5敲低效率;B-D: CCK8实验(B)、平板克隆实验(C)、EdU实验(D)(×200)分别验证细胞增殖活力。与LV-shNC组比较, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

图2 体外敲低HOXA5表达减弱HCC细胞的增殖能力

Figure 2 Knockdown of HOXA5 expression attenuates the proliferative capacity of HCC cells *in vitro*



A: H₂O₂诱导的细胞凋亡模型; B: Transwell实验验证细胞侵袭能力(×100)。与LV-shNC组比较,*P<0.01,**P<0.01。

图3 体外敲低HOXA5表达减弱HCC细胞的侵袭及抗凋亡能力

Figure 3 Knockdown of HOXA5 expression attenuates invasion and anti-apoptotic ability of HCC cells *in vitro*

果表明,HCC组织中的HOXA5表达水平较癌旁组织明显升高^[14]。因此推测它在HCC中发挥了促进肿瘤发展的作用。本实验从临床资料入手,利用qRT-PCR、蛋白质免疫印迹实验以及免疫组化证实了mRNA水平以及蛋白水平的HOXA5在HCC组织中的表达量均高于对应癌旁组织。失控的细胞增殖是恶性肿瘤重要的生物学标志^[15]。本研究利用人肝癌细胞系Hep3B和MHCC97H构建了稳定敲低HOXA5稳转细胞系,开展了包括EdU、CCK8等一系列经典的体外细胞功能试验,证明了HOXA5对于HCC细胞增殖、侵袭及对凋亡的抵抗这几个重要的肿瘤生物学行为有重要的意义。众多研究结果显示,

PI3K-AKT通路的异常激活是HCC发生及发展过程中重要的分子事件^[16]。本实验结果表明,HOXA5的表达虽然不会直接影响AKT的表达水平,但会通过PI3K显著影响该分子的磷酸化,提示HOXA5有可能是通过影响PI3K-AKT信号通路进而改变HCC细胞的生物学行为。

然而本研究也有一定局限性。一方面,除了增殖和侵袭,转移也是肿瘤高复发率及致死率的主要原因,HOXA5在HCC转移过程中发挥的作用还未知。此外,本研究以体外实验为主,不能完全反映人体中在肿瘤免疫微环境条件下HOXA5发挥的真实生物学功能。最后,本实验虽然证明了HOXA5的表达水平

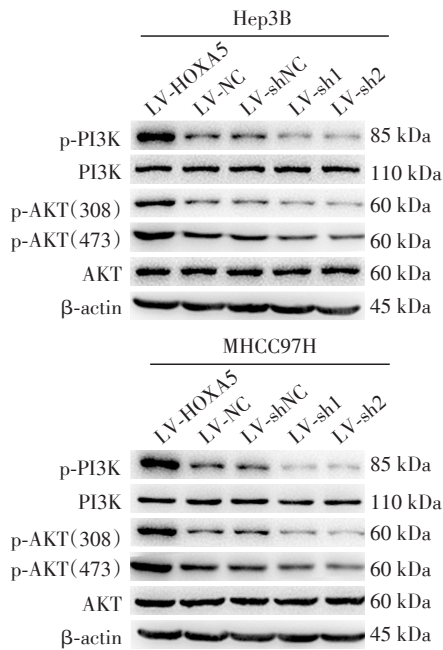


图4 体外敲低或过表达HOXA5影响PI3K-AKT通路的激活
Figure 4 Knockdown or overexpression of HOXA5 expression manipulated activation of the PI3K-AKT pathway *in vitro*

可以影响PI3K-AKT信号通路,但作为核内转录因子,HOXA5具体如何发挥该作用尚不明确。

综上,本研究证明了转录因子HOXA5在HCC组织中高表达,且在调控HCC细胞增殖、凋亡、侵袭过程中发挥着促肿瘤作用。此外它对PI3K-AKT信号通路激活的维持也具有重要功能,为未来深入研究HCC发病机制,寻找治疗新靶点有一定意义。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center Mm, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
 [2] Younes R, Bugianesi E. Should we undertake surveillance for HCC in patients with NAFLD? [J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 326-334
 [3] 余辉, 席玮, 陈世晞, 等. 肝动脉化疗栓塞序贯射频消融对原发性肝癌患者的细胞免疫功能影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(12): 1591-1593
 [4] Nakagawa S, Wei L, Song Wm, et al. Molecular liver cancer prevention in cirrhosis by organ transcriptome analy-

sis and lysophosphatidic acid pathway inhibition [J]. Cancer cell, 2016, 30(6): 879-890
 [5] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma [J]. Cell, 2017, 169(7): 1327-1341
 [6] Ordóñez - Morón P, Dafflon C, Imajo M, et al. HOXA5 counteracts stem cell traits by inhibiting wnt signaling in colorectal cancer [J]. Cancer Cell, 2015, 28(6): 815-829
 [7] Teo WW, Merino VF, Cho S, et al. HOXA5 determines cell fate transition and impedes tumor initiation and progression in breast cancer through regulation of E-cadherin and CD24 [J]. Oncogene, 2016, 35(42): 5539-5551
 [8] Zhang H, Zhao JH, Suo ZM. Knockdown of HOXA5 inhibits the tumorigenesis in esophageal squamous cell cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86(undefiend): 149-154
 [9] Chang CJ, Chen YL, Hsieh CH, et al. HOXA5 and p53 cooperate to suppress lung cancer cell invasion and serve as good prognostic factors in non-small cell lung cancer [J]. J Cancer, 2017, 8(6): 1071-1081
 [10] Kanai M, Hamada J, Takada M, et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas [J]. Oncol Rep, 2010, 23(3): 843-851
 [11] Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers [J]. J Mol Med, 2014, 92(8): 811-823
 [12] Wu Y, Zhou T, Tang Q, et al. HOXA5 inhibits tumor growth of gastric cancer under the regulation of microRNA-196a [J]. Gene, 2019, 681(1): 62-68
 [13] Zhang H, Zhao JH, Suo ZM. Knockdown of HOXA5 inhibits the tumorigenesis in esophageal squamous cell cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86: 149-154
 [14] Shao M, Yang Q, Zhu W, et al. LncHOXA10 drives liver TICs self-renewal and tumorigenesis via HOXA10 transcription activation [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 173-190
 [15] 韩国勇, 张龙, 陈志强, 等. miRNA-873促进肝癌细胞的迁移与侵袭 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(9): 1076-1080
 [16] Samarin J, Laketa V, Malz M, et al. PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology, 2016, 63(3): 813-826

[收稿日期] 2019-02-29