

HOXC6、HOXC8 基因对食管鳞癌细胞凋亡的影响及在接受手术切除食管鳞癌患者中的临床意义

杜雅冰, 靳水玲, 崔 抗, 罗真真, 闫书妹, 李 莉, 朱旭超, 王 帅, 张腾飞, 马 望
(郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052)

摘 要: [目的] 通过靶向敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因, 研究 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达对食管鳞癌细胞增殖水平、克隆形成能力、细胞周期分布及细胞凋亡等生物学特性的影响, 探讨 *HOXC6* 和 *HOXC8* 对食管鳞癌细胞凋亡的调控以及 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达在手术切除的食管鳞癌患者中的临床意义。[方法] 收集 145 例接受手术切除的食管鳞癌患者的癌组织标本进行 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达免疫组化检测, 并和患者的总生存期(overall survival, OS)进行相关性分析。细胞实验中, 构建敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的慢病毒表达载体 (pGLV3-sh*HOXC6* 和 pGLV3-sh*HOXC8*), 转染食管鳞癌细胞株 ECA109, 分别采用 Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因的敲低效率。分别采用 CCK8 法和软琼脂克隆形成实验检测敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因表达后对 ECA109 细胞增殖的影响。采用流式细胞仪检测敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因表达后对 ECA109 细胞周期分布及细胞凋亡的影响。[结果] *HOXC6* 和 *HOXC8* 高表达和低表达患者的预后具有显著差异。*HOXC6* 高表达和低表达患者的中位 OS 分别为 38.5 和 81.3 个月, 差异具有显著的统计学意义 ($P=0.001$)。*HOXC8* 高表达和低表达患者的中位 OS 分别为 34.6 和 114.4 个月, 差异同样具有显著的统计学意义 ($P<0.001$)。另外, 细胞实验表明: 转染 shRNA 可显著下调 ECA109 细胞中 *HOXC6* 和 *HOXC8* mRNA 和蛋白表达水平。CCK8 结果显示干扰组 (*HOXC6* shRNA 或 *HOXC8* shRNA) 的细胞生存率较对照组明显下降 ($P<0.05$); 克隆形成实验显示干扰组细胞克隆形成能力较对照组明显降低; 流式细胞仪检测结果显示干扰组出现明显的 G_1 细胞周期阻滞, 且干扰组细胞凋亡率明显高于对照组。[结论] *HOXC6* 和 *HOXC8* 高表达对食管鳞癌患者预后不良有不良影响。敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因可促进食管鳞癌细胞株 ECA109 凋亡。靶向调控 *HOXC6* 和 *HOXC8* 可能抑制食管鳞癌的发生与发展。

关键词: 食管鳞癌; *HOXC6*; *HOXC8*; 预后; 凋亡

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)07-0535-08

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.07.A011

Effect of *HOXC6* and *HOXC8* Gene Expression on Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Mechanisms

DU Ya-bing, JIN Shui-ling, CUI Kang, LUO Zhen-zhen, YAN Shu-mei, LI Li, ZHU Xu-chao, WANG Shuai, ZHANG Teng-fei, MA Wang

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of *HOXC6* and *HOXC8* expression on prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its mechanism. [Methods] One hundred and forty-five patients with ESCC undergoing surgical resection were enrolled in the study. The expression of *HOXC6* and *HOXC8* in ESCC cancer tissue was detected by immunohistochemistry method. And the association of *HOXC6* and *HOXC8* expression with overall survival (OS) of patients was analyzed. The lentiviral expression vectors pGLV3-sh*HOXC6* and pGLV3-sh*HOXC8* were constructed and transfected into esophageal squamous carcinoma cell line ECA109. Real-time RT-PCR and Western blot methods were employed to evaluate the transfection efficiency. CCK8 assay and soft agar colony formation assay were employed to detect the effects of *HOXC6* and *HOXC8* gene depletion on proliferation of ECA109 cells. Flow cytometry was employed to analyze cell cycle and apoptosis of ECA109 cells. [Results] The median OS of patients with high *HOXC6* expression was significantly lower than that of patients with low expression patients (38.5 months vs 81.3 months, $P=0.001$). And the median OS of patients with high *HOXC8* expression was significantly lower than

收稿日期: 2018-11-10; 修回日期: 2019-01-24

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目 (172102310058)

通信作者: 马 望, E-mail: doctormawang@126.com

张腾飞, E-mail: zhangtengfei84@163.com

that of patients with low expression (34.6 months vs 114.4 months, $P<0.001$). Additionally, cell experiments indicated that transfection of shRNA significantly down-regulated HOXC6 and HOXC8 mRNA and protein expression in ECA109 cells. CCK8 assay showed that the cell proliferation rates of the interference groups (HOXC6 shRNA or HOXC8 shRNA) were significantly decreased, compared with control group ($P<0.05$). The clonogenic assay showed that the cell cloning ability of the interfering groups were also significantly decreased, compared with control group. Flow cytometry showed that the proportion in cell cycle arrest phase and the apoptosis rate in the interference group were significantly increased, compared with control group. [Conclusion] The high expression of HOXC6 or HOXC8 has an adverse influence on prognosis of patients with ESCC. HOXC6 and HOXC8 gene silencing can promote the apoptosis of ESCC ECA109 cells. The targeted regulation of HOXC6 and HOXC8 might inhibit the occurrence and development of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; HOXC6; HOXC8; prognosis; apoptosis

同源异形盒 (*homeobox*, *HOX*) 基因是调控胚胎发育的关键因子, 最初发现于果蝇的发育调控中, 随后发现其也存在于包括人在内的脊椎动物中^[1]。目前已被鉴定有 39 个 *HOX* 基因存在于哺乳类动物中, 根据其在染色体上的位置分为 *HOXA*、*HOXB*、*HOXC*、*HOXD* 4 簇, 人类 *HOX* 基因分别位于第 7 号、17 号、12 号、2 号染色体上, 主要通过转录调控发挥调节哺乳动物胚胎发育和细胞分化的作用^[2]。近年研究发现, *HOX* 基因除调节人和脊椎动物的胚胎发育之外, 也参与多种人类恶性肿瘤的发生与发展。*HOX* 基因的表达在多种肿瘤中存在异常, 如乳腺癌、肺癌、卵巢癌等^[3-5]。*HOXC6*、*HOXC8* 是 C 簇中调控食管发育的关键基因, 先前的研究也发现 *HOXC6*、*HOXC8* 蛋白在食管鳞癌组织呈高表达, 并且 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的高表达与食管鳞癌患者的不良预后相关^[6]。这些结果都提示 *HOXC6* 和 *HOXC8* 在食管癌的发生发展过程中起重要作用。然而, *HOXC6* 和 *HOXC8* 在食管鳞癌中发挥的生物学功能和潜在分子机制尚不明确。

因此, 本研究通过构建针对 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的 shRNA 慢病毒表达载体并转染食管鳞癌细胞 ECA109, 探讨敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的基因对食管鳞癌细胞增殖、克隆形成、细胞周期和凋亡等生物学功能的影响。并通过收集接受手术切除的食管鳞癌患者的癌组织标本进行 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达的测定, 并和患者的总生存期 (overall survival, OS) 进行相关性分析, 从而全面评估 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的临床意义。

1 资料与方法

1.1 实验设计及样本收集

本研究临床部分为回顾性分析, 入组的是从 2003 年 1 月到 2017 年 1 月在郑州大学第一附属医院胸外科和肿瘤科接受手术切除的食管鳞癌患者 145 例。入组标准为: 年龄 ≥ 18 岁; 病理学分期为 I~III 期; ECOG (美国东部肿瘤协作组) 的体能状况评分 0~2 分。排除标准为: 合并其他肿瘤或严重疾病的患者, 失访的患者。收集患者的术后癌组织标本进行 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达的测定, 主要终点为 OS。

1.2 癌组织标本中 HOXC6 和 HOXC8 表达测定

采取免疫组化的方法对 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的表达进行测定。依据免疫组化的强度和程度将 *HOXC6* 和 *HOXC8* 的表达高低进行区分, 具体为: 0 分为 $<10\%$ 的免疫阳性细胞, 1 分为 $10\% \sim 30\%$ 的阳性细胞, 2 分为 $30\% \sim 60\%$ 的阳性细胞, 3 分为 $>60\%$ 的阳性细胞。根据强度和程度进行评分。评分低于 6 分的为低表达组, 评分 6~9 分的为高表达组, 具体见先前研究设计^[7]。

1.3 细胞培养

人食管癌细胞 ECA109 为郑州大学肿瘤中心保存。采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 饱和湿度的恒温孵箱中贴壁培养。针对 *HOXC6* 与 *HOXC8* 的 shRNA 慢病毒载体构建包装由 Genephama 公司完成并提供对照用的病毒载体, 滴度 ($8 \times 10^8 \text{ TU/ml}$), 慢病毒冻存于 -80°C , 避免反复

冻融。shRNA 慢病毒转染时,细胞 MOI 值按 50 进行转染,根据病毒滴度计算所加入病毒液的体积。加入 5 μ g/ml polybrene,放入孵箱中培养,24h 更换新的培养基。转染 72h 后将细胞从 6 孔板传到 10cm 细胞培养皿中,隔夜贴壁后加入 2 μ g/ml 嘌呤霉素筛选稳定转染细胞。

1.4 Real-time PCR

慢病毒载体转染 ECA109 细胞 72h 后收集细胞,用 Trizol RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。Real-time PCR 反应中 *HOXC6*、*HOXC8* 的引物序列如下:*HOXC6* 上游引物 5'-CAC CGC CTA TGA TCC AGT GAG GCA-3',*HOXC6* 下游引物 5'-GCT GGA ACT GAA CAC GAC ATT CTC -3',*HOXC8* 上游引物 5'-CCT ATT ACG ACT GCC GGT TC-3',*HOXC8* 下游引物 5'-TTG GCG GAG GAT TTA CAG TC -3'。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10min,然后 95 $^{\circ}$ C 变性 20s,58 $^{\circ}$ C 退火 20s,70 $^{\circ}$ C 延伸 20s,循环 40 次,最后 70 $^{\circ}$ C 延伸 5min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 Western blot

慢病毒载体转染 ECA109 细胞 72h 后收集细胞,离心后加入 200 μ l 裂解液裂解细胞 30min,14 000r/min 离心 15min,取上清,BCA Protein Assay Kit 测定总蛋白浓度。15 μ g 蛋白经过 SDS-PAGE 电泳分离后,转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭后,加入 *HOXC6*、*HOXC8*、*GAPDH* 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h,加入显色剂曝光获得蛋白条带。

1.6 生长曲线的测定

慢病毒载体转染 ECA109 细胞 72h 后,用 0.25%胰酶消化细胞进行计数。按照每孔细胞 4000 个/100 μ l 的密度加入 96 孔板,培养过夜。分别在培养 24、48、72h 后观察细胞状态,每孔加入 10 μ l CCK8,置摇床上低速振荡 5min。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中继续培养 4h 后酶联免疫检测仪 450nm 测量各孔的吸光值。

1.7 软琼脂克隆形成实验

用蒸馏水分别制备出 1.2%和 0.7%两个浓度的低熔点琼脂糖液高压灭菌。按照 1:1 比例使 1.2%的琼脂糖与 2 $\times$ RPMI1640 培养基混合后,取 3ml 注入 6 孔板的每一个试验孔,冷却凝固后作为底层琼脂

至于 CO₂ 温箱中备用。按照 1:1 比例配置 0.7%的琼脂糖与 2 $\times$ RPMI1640 培养基的混合液,再加入约 2000 个细胞,充分混匀后注入铺有 1.2%琼脂糖底层胶的六孔板的试验孔中,置入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 温箱中培养 10~14d。培养结束后把六孔板放置在倒置显微镜下,观察细胞克隆数目,计算细胞克隆形成率,采用 Spot II 采集图像。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡率

慢病毒载体转染 ECA109 细胞 72h 后,用 0.25%胰酶消化细胞进行计数。收集 20 000 细胞用 PBS 清洗细胞 3 遍后,加入 75%预冷乙醇 (PBS 配置),4 $^{\circ}$ C 固定过夜。固定后用 PBS 清洗,离心收集细胞,加入 300 μ l 的 PI/RNase 工作液,室温孵育 20min,细胞滤器过滤后上机测试细胞周期。检测细胞凋亡时,也收集 20 000 细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次后 1000r/min 离心 5min,收集细胞,加入 200 μ l Annexin V-PE 结合液轻轻重悬细胞。冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测,红色荧光通道检测 Annexin V-PE。

1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件对本实验数据进行分析。所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。在基线临床资料当中,离散型的变量和不同表达组的分布采用 χ^2 检验,当数据较少时用 Fisher 精确检验。连续型变量的比较是用单侧的方差分析或者 Kruskal-Wallis 检验。通过 Stata 14.0 绘制 Kaplan-Meier 曲线比较不同表达患者 OS 的差异,曲线间的差异用对数秩检验进行比较。OS 定义为从手术开始的日期到任何原因引起的死亡。 $P<0.05$ 被认为差异具有显著的统计学意义。

2 结 果

2.1 患者基线临床资料及 *HOXC6* 和 *HOXC8* 对总生存期的影响

145 例患者基线临床资料如表 1 (Table 1) 所示,患者中位年龄是 62.5 岁 (范围:36~84 岁)。男性患者 107 例 (73.79%),ECOG 评分中大部分为 0 分患者 (64.83%)。如表 1 所示,*HOXC6* 和 *HOXC8* 在基线临床资料中分布均衡,除了 TNM 分期,*HOXC6* 和 *HOXC8* 高表达患者出现在较多的 III 期患者中。

Table 1 Comparison of baseline characteristics and expression levels of HOXC6 and HOXC8 in 145 ESCC patients

Characteristics	N(%)	HOXC6 expression level			HOXC8 expression level		
		High(N=58)	Low(N=87)	P	High(N=52)	Low(N=93)	P
Age (years)							
Median	62.5	63	62	0.792	63	62	0.679
Range	36~84	44~77	36~84		44~81	36~84	
Gender							
Male	107 (73.79)	42 (72.41)	65 (74.71)	0.758	36 (69.23)	71 (76.34)	0.350
Female	38 (26.21)	16 (27.59)	22 (25.29)		16 (30.77)	22 (23.66)	
ECOG score							
0	94 (64.83)	37 (63.79)	57 (65.52)	0.831	34 (65.38)	60 (64.52)	0.916
1~2	51 (35.17)	21 (36.21)	30 (34.48)		18 (34.62)	33 (35.48)	
TNM staging							
I	95 (65.52)	28 (48.28)	67 (77.01)	0.001	26 (48.08)	69 (74.19)	0.013
II	31 (21.38)	17 (29.31)	14 (16.09)		16 (30.77)	15 (16.13)	
III	19 (13.10)	13 (22.41)	6 (6.90)		10 (19.23)	9 (9.68)	
R0 resection							
Yes	131 (90.34)	52 (89.66)	79 (90.80)	0.818	47 (90.38)	84 (90.32)	0.990
No	14 (9.66)	6 (10.34)	8 (9.20)		5 (9.62)	9 (9.68)	
Adjuvant chemotherapy							
No	96 (66.21)	38 (65.52)	58 (66.67)	0.886	34 (65.38)	62 (66.67)	0.876
Yes	49 (33.79)	20 (34.48)	29 (33.33)		18 (34.62)	31 (33.33)	

Notes: ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

对不同情况 HOXC6 和 HOXC8 表达患者进行疗效分析发现(Figure 1,2),HOXC6 和 HOXC8 高表达和低表达患者的预后具有显著差异。HOXC6 高表达和低表达患者的中位 OS 分别为 38.5 和 81.3 个月,差异具有显著的统计学意义($P=0.001$)。HOXC8 高表达和低表达患者的中位 OS 分别为 34.6 和 114.4 个月,差异同样具有显著的统计学意义($P<0.001$)。

2.2 shRNA 慢病毒载体转染 ECA109 细胞后 HOXC6 或 HOXC8 的表达

用 PGLV3-shHOXC6、PGLV3-shHOXC8 慢病毒转染食管癌细胞系 ECA109 后,72h 通过共聚焦显

微镜观察可发现细胞内的绿色荧光,转染效率高(Figure 3A)。Real-time PCR 结果显示 ECA109 细胞转染慢病毒后 shHOXC6 和 shHOXC8 组 mRNA 表达水平明显低于 shNC 对照组(Figure 3B)(shHOXC6 vs shNC: 0.36 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $t=20.95$, $P=0.002$; shHOXC8 vs shNC: 0.49 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.00 , $t=11.74$, $P=0.007$)。Western blot 实验也显示转染 shHOXC6 或 shHOXC8 慢病毒后 shHOXC6 和 shHOXC8 蛋白表达水平明显低于 shNC 对照组(Figure 3C)(shHOXC6 vs shNC: 0.24 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.00 , $t=22.35$, $P=0.001$; shHOXC8 vs shNC: 0.43 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00 , $t=13.34$,

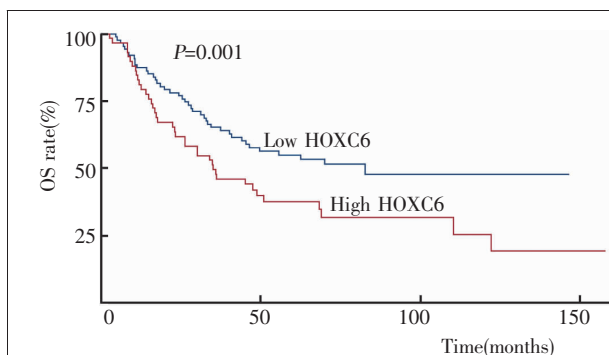


Figure 1 The comparison of OS of 145 ESCC patients with different expression level of HOXC6

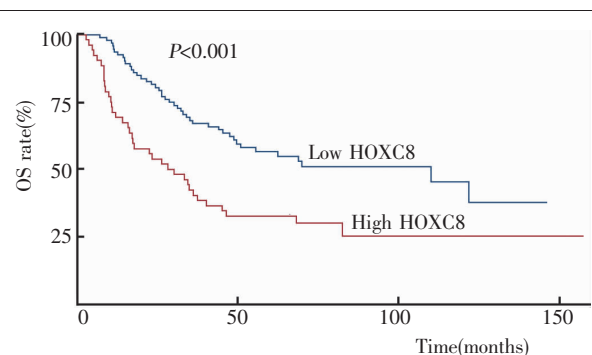


Figure 2 OS of 145 ESCC patients with different expression level of HOXC8

$P=0.004$)。以上结果表明, shRNA 慢病毒转染能够有效敲低靶基因 *HOXC6* 与 *HOXC8* 的 mRNA 和蛋白质的表达水平。

2.3 敲低 *HOXC6* 或 *HOXC8* 抑制 ECA109 细胞增殖

CCK8 实验显示敲低 *HOXC6* 或 *HOXC8* 后 ECA109 细胞的增殖能力明显降低 ($P<0.05$), 并且随着细胞培养时间的延长, 细胞增殖能力降低的程度更明显 (Figure 4A)。软琼脂克隆形成实验结果显示 sh*HOXC6*、sh*HOXC8* 转染组克隆形成率分别为 $7.85\% \pm 2.13\%$ 、 $6.21\% \pm 2.41\%$, 明显低于对照组的克隆形成率 $15.76\% \pm 2.74\%$ ($P<0.05$), 以上结果表明, 敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因可有效抑制 ECA109 细胞体外增殖的能力 (Figure 4B)。

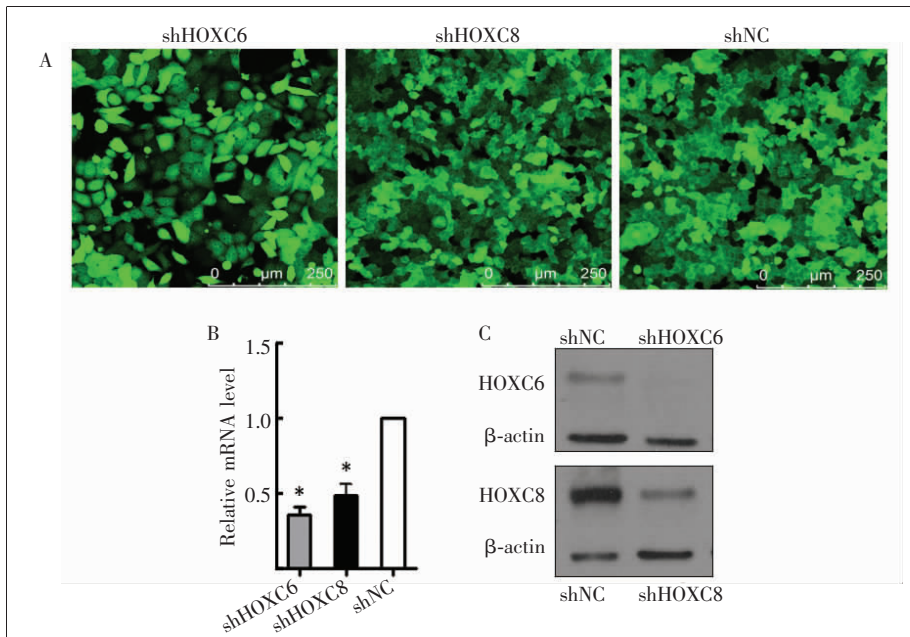
2.4 敲低 *HOXC6* 或 *HOXC8* 促进 ECA109 细胞凋亡

流式细胞仪分析结果显示 sh*HOXC6*、sh*HOXC8* 转染组细胞凋亡率分别为 $25.71\% \pm 0.62\%$ 、 $26.62\% \pm 0.64\%$, 明显高于对照组细胞凋亡率 $9.53\% \pm 0.61\%$ ($P<0.05$) (Figure 5)。以上结果表明, 敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 能够促进 ECA109 细胞凋亡。

2.5 敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 导致 G_1 期细胞周期阻滞

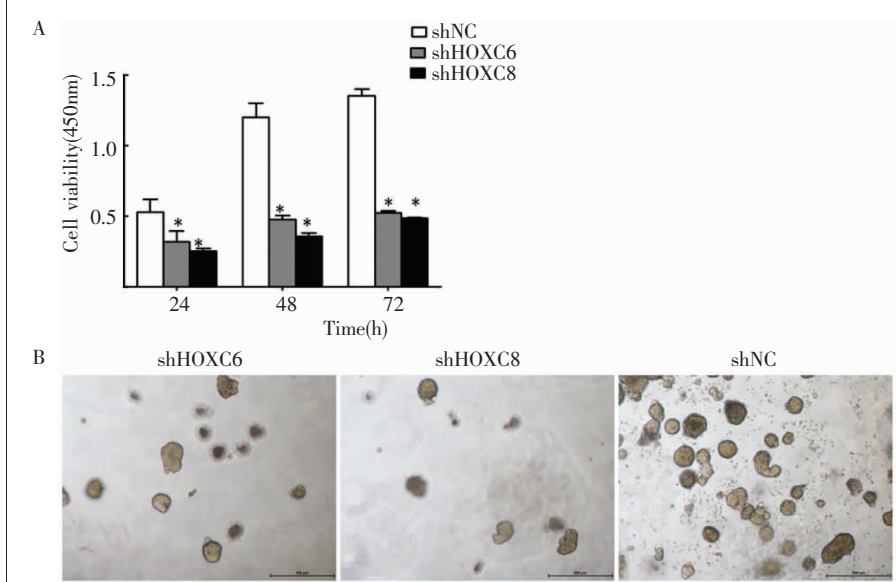
流式细胞仪分析结果显示, 敲低 *HOXC6* 转染组 S+ G_2 期细胞和 G_1 期细胞所占比例分别为 $22.25\% \pm 2.70\%$ 和 $77.75\% \pm 2.70\%$; 敲低 *HOXC8* 转染组 S+ G_2 期细胞和 G_1 期细胞所占比例分别为 $18.53\% \pm 1.70\%$ 和 $81.47\% \pm 1.70\%$; 在对照

组中两类细胞所占比例分别为 $42.23\% \pm 1.70\%$ 和 $57.77\% \pm 1.70\%$ (Figure 6)。相比于对照组, sh*HOXC6* 转染组、sh*HOXC8* 转染组 S+ G_2 期细胞减少 ($P<0.05$), G_1 期细胞增加 ($P<0.05$)。以上结果表明, 敲低 *HOXC6*



A: The green fluorescent protein expression levels of GFP in cells transfected with shRNA for 72h; B: The mRNA expression levels of *HOXC6* and *HOXC8* after shRNA interference; C: The protein expression levels of *HOXC6* and *HOXC8* after shRNA interference.

Figure 3 The expression of *HOXC6* or *HOXC8* in ECA109 cells transfected with shRNA lentivirus



A: The influence of knocking down *HOXC6* or *HOXC8* on cell proliferation; B: The influence of knocking down *HOXC6* or *HOXC8* on the ability of cell cloning.

Figure 4 The influence of *HOXC6* and *HOXC8* knockdown on proliferation and clonal formation ability of ECA109 cells

和 *HOXC8* 导致显著的G₁ 细胞周期阻滞。

3 讨 论

本研究纳入了 145 例接受手术切除的食管鳞癌患者,通过对 *HOXC6* 和 *HOXC8* 表达进行测定进而和患者的预后进行关联性分析,发现 *HOXC6* 和

HOXC8 高表达对食管鳞癌患者预后具有不良影响。并通过细胞实验证实了敲低 *HOXC6* 和 *HOXC8* 基因可促进食管鳞癌细胞株 ECA109 的凋亡。

食管癌是多因素共同作用、多基因共同参与、多阶段发展的复杂性疾病。探讨食管癌发生与发展的分子作用机制对开发新的分子靶向治疗具有重要的意义,也是目前研究的热点。*HOX* 不仅是胚胎发育

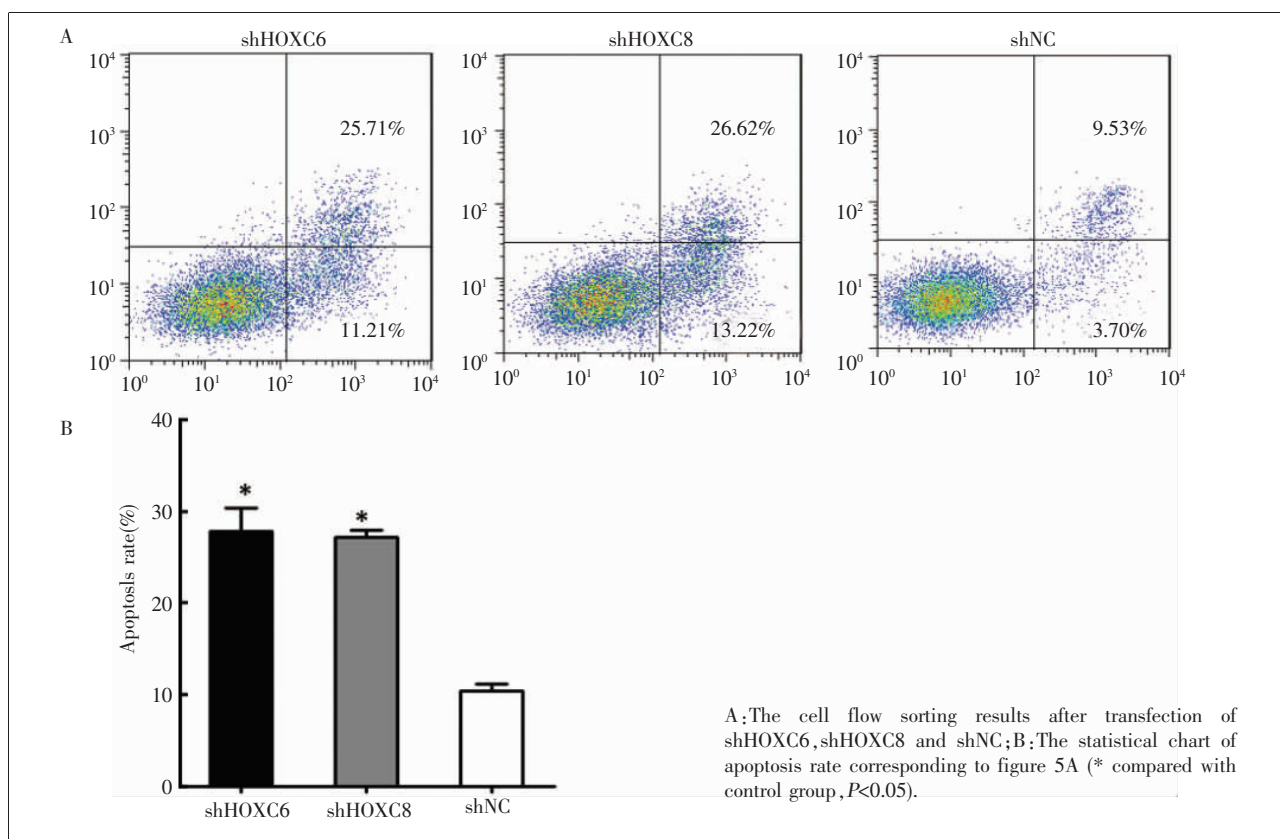


Figure 5 The influence of knocking down *HOXC6* or *HOXC8* on the apoptosis of ECA109 cells

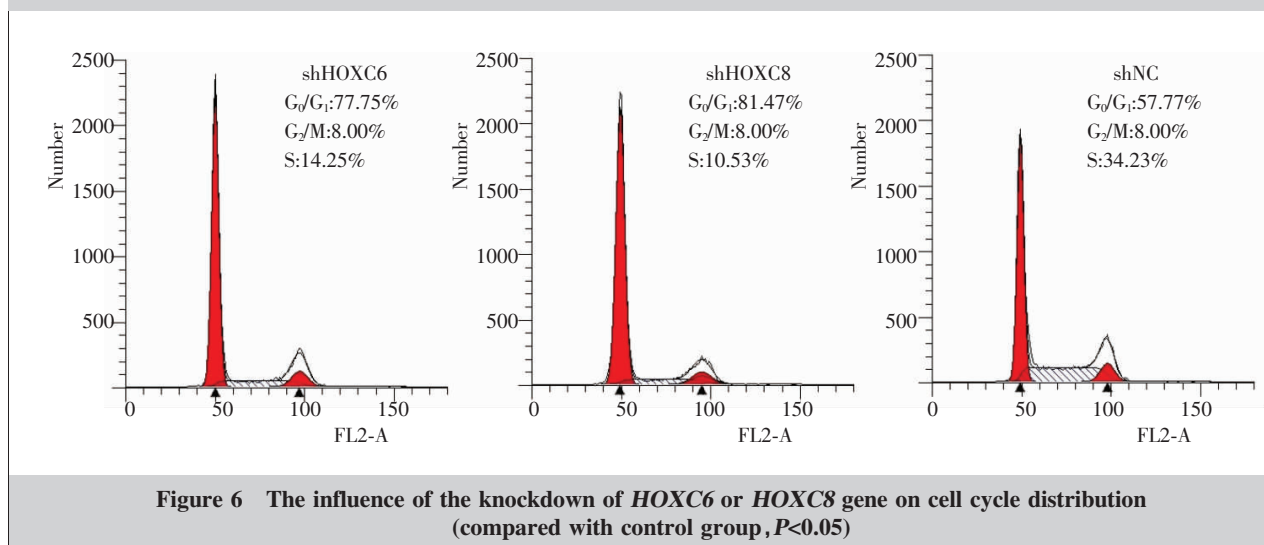


Figure 6 The influence of the knockdown of *HOXC6* or *HOXC8* gene on cell cycle distribution (compared with control group, $P < 0.05$)

的关键因子,而且在细胞关键的分化与增殖过程中起决定作用。越来越多研究表明,*HOX*基因在多种恶性肿瘤中表达均出现异常,因此,*HOX*基因的表达在恶性肿瘤诊断和治疗中可能具有重要作用。*HOXC6*与*HOXC8*基因是调控食管发育的重要基因,也参与食管鳞癌发生与发展,但其具体的生物学功能尚不清楚。在本研究发现*HOXC6*和*HOXC8*在食管鳞癌中发挥癌基因的功能,敲低其表达显著抑制细胞增殖和克隆形成能力,促进细胞凋亡,导致G₁细胞周期阻滞,为进一步研究*HOXC6*和*HOXC8*在食管鳞癌发生发展中的分子机制奠定了基础。

*HOX*基因沿前后轴呈线性排列,如果其家族成员在错误的时间或地点出现错误的表达,致使其调节作用出现紊乱,增生与分化之间的平衡被打破,就很可能导致恶性肿瘤的发生。*HOXC6*基因定位于12号染色体长臂3区(12q13.3),近年来有研究发现多种恶性肿瘤中均存在*HOXC6*的上调的现象,例如胃癌^[8]、乳腺癌^[9]、前列腺癌^[10]肝癌^[11,12]、口腔癌^[13]和卵巢癌^[14],此外,*HOXC6*促进细胞生长和增殖的生物学功能也在结直肠癌^[15]中被报道。*HOXC6*过表达可导致胃癌患者术后有效生存期明显缩短,其可作为胃癌患者术后效果评估的指标。*HOXC6*表达水平也与淋巴结转移相关,其表达增加有促进肿瘤淋巴结转移的倾向,*HOXC6* siRNA 敲除诱导细胞凋亡,*HOXC6*过表达导致细胞增生和凋亡减少。*HOXC6*在尿液中的表达可以作为前列腺癌诊断的分子标志物^[16],以上也为今后研究*HOXC6*在食管鳞癌中的分子标志物的研究提供了新思路。*HOXC8*基因也定位于12号染色体长臂3区(12q13.3),在胚胎发育中主控食管的发育。近年来有些研究发现其在乳腺癌^[17-19]、肺癌^[20]、卵巢癌^[21]、鼻咽癌和肝癌^[22]中表达异常,促进肿瘤细胞的增殖并且是肿瘤预后的不良因子。先前的研究发现*HOXC6*和*HOXC8*蛋白在食管鳞癌组织呈高表达,且*HOXC6*与*HOXC8*蛋白高表达的食管鳞癌患者预后较差,这一现象可能与本研究中发现的*HOXC6*和*HOXC8*抑制凋亡和细胞周期阻滞,促进细胞生长和增殖等生物学功能相关。

*HOXC6*通过调节其生物学靶标起作用,如骨形态发生蛋白7、成纤维细胞生长因子受体2、血小板源性生长因子受体 α 多肽。它也调节磷脂酰肌醇3

一激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶信号通路。目前对于*HOXC6*促进肿瘤进展的具体分子生物学机制尚未完全阐明。激活蛋白1(activating protein-1, AP-1)是调节细胞生长死亡的重要信号通路转录因子,在胃肠道类肿瘤中*HOXC6*能够升高JunD的表达,并且通过与JunD的直接相互作用促进AP-1的转录调控。*MMP9*是AP-1的转录调控靶分子,*HOXC6*也被报道能促进*MMP9*的表达进而促进胃癌细胞的克隆形成和侵袭转移能力^[8]。此外,*HOXC6*在多药耐药的癌细胞中高表达^[13],与*HOXC6*激活多药耐药蛋白MDR-1启动子的活性促进其转录有关。先前研究报道的*HOXC6*蛋白高表达的食管鳞癌患者预后较差可能也与*HOXC6*介导的耐药性相关,但是需要在临床样本中进行验证。*HOXC8*也被报道与细胞增殖、G₁/S细胞周期阻滞以及耐药性相关^[22]。目前关于*HOXC8*在肿瘤进展中的分子生物学机制也较为缺乏。在非小细胞肺癌中^[20],*HOXC8*通过转录上调TGF β 1促进细胞增殖与迁移。在乳腺癌中,*HOXC8*同过下调跨膜糖蛋白embigin促进乳腺癌细胞MCF10A的增殖、锚定非依赖性生长和迁移。在鼻咽癌中,过表达*HOXC8*可抑制鼻咽癌细胞在体内外的生长,调节糖酵解,并调控三羧酸循环相关基因的表达^[22]。此外,*HOXC8*与肿瘤干细胞的功能相关,*HOXC8*水平的增加可降低乳腺癌细胞形成微球的能力及细胞锚定非依赖性生长能力。在非致瘤性乳腺上皮细胞中*HOXC8*的丧失可扩大癌干/祖细胞库,增加干细胞自我更新,阻止视黄酸诱导的细胞分化,并诱导细胞发生表型转化^[18]。

另外,本文临床研究的结果也表明*HOXC6*和*HOXC8*高表达对食管鳞癌患者预后具有不良影响,这和先前Du团队的研究结果基本一致^[7],也再一次从临床角度证实了*HOXC6*和*HOXC8*基因在食管鳞癌的发生发展方面具有重要的意义。

综合以往的研究与本次实验结果,本研究发现*HOXC6*与*HOXC8*基因作为转录调节因子蛋白促进食管癌细胞增殖,敲除*HOXC6*、*HOXC8*基因表达后食管癌细胞周期阻滞在G₁期,细胞凋亡率增加,克隆形成能力下降。但是*HOXC6*与*HOXC8*是通过调节哪些凋亡相关蛋白表达来调控细胞的生命活动,仍需后续更加深入的机制研究来证实。

参考文献:

- [1] Mallo M. Reassessing the role of hox genes during vertebrate development and evolution [J]. Trends Genet, 2017. [Epub ahead of print]
- [2] Lippmann ES, Williams CE, Ruhl DA, et al. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm[J]. Stem Cell Rep, 2015, 4(4):632–644.
- [3] Zhang Y, Zhang K, Luo Z, et al. Circulating long non-coding HOX transcript antisense intergenic ribonucleic acid in plasma as a potential biomarker for diagnosis of breast cancer[J]. Thorac Cancer, 2016, 7(6):627–632.
- [4] Wang R, Yan B, Li Z, et al. Long non-coding RNA HOX transcript antisense RNA promotes expression of 14-3-3sigma in non-small cell lung cancer [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5):4503–4508.
- [5] Kelly Z, Moller-Levet C, McGrath S, et al. The prognostic significance of specific HOX gene expression patterns in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2016, 139(7):1608–1617.
- [6] Shen LY, Fan MY, Dong B, et al. Increased HOXC6 expression predicts chemotherapy sensitivity in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4):4835–4840.
- [7] Du YB, Dong B, Shen LY, et al. The survival predictive significance of HOXC6 and HOXC8 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Surg Res, 2014, 188(2):442–450.
- [8] Chen S W, Zhang Q, Xu ZF, et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4):3261–3268.
- [9] Hussain I, Bhan A, Ansari KI, et al. Bisphenol-A induces expression of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(6):697–708.
- [10] Hamid AR, Hoogland AM, Smit F, et al. The role of HOXC6 in prostate cancer development[J]. Prostate, 2015, 75(16):1868–1876.
- [11] Li PD, Chen P, Peng X, et al. HOXC6 predicts invasion and poor survival in hepatocellular carcinoma by driving epithelial-mesenchymal transition[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(1):115–130.
- [12] Sui CJ, Xu F, Shen WF, et al. MicroRNA-147 suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation migration and chemosensitivity by inhibiting HOXC6[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(12):2787–2798.
- [13] Kim SA, Lee MR, Yoon JH, et al. HOXC6 regulates the antitumor effects of pheophorbide a-based photodynamic therapy in multidrug-resistant oral cancer cells [J]. Int J Oncol, 2016, 49(6):2421–2430.
- [14] Tait DL, Bahrani-Mostafavi Z, Vestal CG, et al. Downregulation of HOXC6 in serous ovarian cancer [J]. Cancer Invest, 2015, 33(7):303–311.
- [15] Ji M, Feng Q, He G, et al. Silencing homeobox C6 inhibits colorectal cancer cell proliferation [J]. Oncotarget, 2016, 7(20):29216–29227.
- [16] Leyten GH, Hessels D, Smit FP, et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(13):3061–3070.
- [17] Chao F, Zhang J, Zhang Y, et al. Embigin, regulated by HOXC8, plays a suppressive role in breast tumorigenesis [J]. Oncotarget, 2015, 6(27):23496–23509.
- [18] Shah M, Cardenas R, Wang B, et al. HOXC8 regulates self-renewal, differentiation and transformation of breast cancer stem cells[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):38.
- [19] Zhang Y, Yang C, Zhang M, et al. Interleukin enhancer-binding factor 3 and HOXC8 co-activate cadherin 11 transcription to promote breast cancer cells proliferation and migration[J]. Oncotarget, 2017, 8(64):107477–107491.
- [20] Liu H, Zhang M, Xu S, et al. HOXC8 promotes proliferation and migration through transcriptional up-regulation of TGFbeta1 in non-small cell lung cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(2):1.
- [21] Lu S, Liu R, Su M, et al. Overexpression of HOXC8 is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. Reprod Sci, 2016, 23(7):944–954.
- [22] Xu P, Zhang X, Ni W, et al. Upregulated HOXC8 expression is associated with poor prognosis and oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma [J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(11):3351–3363.