

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.13.001

· 基础研究 ·

HOXD9 促进肺癌发生发展的生物学作用及初步机制*

孙翊乐¹ 祁钰雯¹ 顾琳萍² 牛晓敏² 陈智伟^{2Δ}

(1 上海交通大学医学院 上海 200025; 2 上海交通大学附属胸科医院 上海 200030)

摘要 目的:探究同源盒基因 HOXD9 在 H3255、H2170 肺癌细胞株中的生物学作用及作用机制。**方法:**构建 HOXD9 过表达稳转 H3255、H2170 肺癌细胞株,通过 CCK-8、克隆形成、小鼠皮下瘤实验检测 HOXD9 对肺癌细胞增殖的影响;利用 transwell、基质胶实验检测 HOXD9 对肺癌细胞迁移及侵袭的影响;采用彗星实验、磷酸化组蛋白 H2AX(γ H2AX)免疫荧光染色检测 HOXD9 对肺癌细胞 DNA 损伤的影响;通过流式细胞术检测 HOXD9 对肺癌细胞凋亡的影响;通过 qRT-PCR、western blot、luciferase、ChIP、rescue 实验探究 HOXD9 在肺癌中促癌的作用机制。**结果:**CCK-8、克隆形成、小鼠皮下瘤实验显示 HOXD9 可促进肺癌细胞增殖;transwell 实验表明 HOXD9 可促进肺癌细胞迁移;基质胶实验显示 HOXD9 可促进肺癌细胞侵袭;彗星实验与 γ H2AX 免疫荧光染色提示 HOXD9 可抑制肺癌细胞 DNA 损伤;流式细胞术显示 HOXD9 可抑制肺癌细胞凋亡。HOXD9 可通过转录上调肺癌细胞中增殖细胞核抗原 PCNA 的表达水平。**结论:**HOXD9 可通过促进 PCNA 的转录介导肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭,抑制肺癌细胞 DNA 损伤及凋亡。

关键词:同源盒基因 D9;肺癌;DNA 损伤;增殖细胞核抗原;转录

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)13-2401-10

Biological Effect and Preliminary Mechanism of HOXD9 on the Development of Lung Cancer*

SUN Yi-le¹, QI Yu-wen¹, GU Lin-ping², NIU Xiao-min², CHEN Zhi-wei^{2Δ}

(1 School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China;

2 Department of Oncology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the biological effect and mechanism of homeobox D9 (HOXD9) in H3255 and H2170 lung cancer cell lines. **Methods:** H3255 and H2170 lung cancer cell lines with HOXD9 stable overexpression were constructed. Effect of HOXD9 on lung cancer cell proliferation was detected by CCK-8, colony formation assay and tumor xenograft experiments. Effect of HOXD9 on lung cancer cell migration and invasion was detected by transwell and matrigel assay. Effect of HOXD9 on lung cancer cell DNA damage was detected by comet assay and γ H2AX immunofluorescence staining. Effect of HOXD9 on lung cancer cell apoptosis was detected by flow cytometry. The mechanism of HOXD9 in lung cancer was investigated by qRT-PCR, western blot, luciferase, ChIP and rescue assay. **Results:** CCK-8, colony formation assay and tumor xenograft experiments showed that HOXD9 promoted the proliferation of lung cancer cells. Transwell assay showed that HOXD9 promoted the migration of lung cancer cells. Matrigel assay showed that HOXD9 promoted the invasion of lung cancer cells. Comet assay and γ H2AX immunofluorescence staining showed HOXD9 inhibited DNA damage of lung cancer cells. Flow cytometry showed HOXD9 inhibited the apoptosis of lung cancer cells. HOXD9 up-regulated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression level in lung cancer cells through transcription regulation. **Conclusion:** HOXD9 promoted the proliferation, migration and invasion while inhibited DNA damage and apoptosis of lung cancer cells by inducing PCNA transcription.

Key words: HOXD9; Lung cancer; DNA damage; PCNA; Transcription

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)13-2401-10

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81572250,81972187);上海申康医院发展中心项目(16CR3071B);

上海市科学技术委员会项目(19ZR1449800;20Y11913700)

作者简介:孙翊乐(1995-),女,博士,主要研究方向:肿瘤学,电话:15800929257,E-mail:sunyile951129@163.com

Δ 通讯作者:陈智伟(1971-),男,博士,博士生导师,教授,主任医师,主要研究方向:胸部肿瘤学,E-mail:drchenzhiwei@163.com

(收稿日期:2022-01-03 接受日期:2022-01-27)

前言

肺癌是全球癌症死亡的首要原因^[1]。在我国,肺癌约占所有恶性肿瘤的 20%,其发病率及死亡率不断上升^[2]。已有研究显示,肺癌的发生发展与某些驱动基因的激活密切相关^[3]。因此,明确肺癌的致病机制,寻找可能的治疗靶标具有重要的意义。

同源盒基因在胚胎发育、组织形成^[4]及 DNA 修复^[5]方面发挥了重要的作用,其家族成员包含一段由 183 个核苷酸组成的高度保守序列,即同源盒(Homeobox)^[6]。该序列编码的同源异型域(Homeo 结构域)以特有的"螺旋-转角-螺旋"结构(HTH 结构)^[7]识别靶基因启动子,调控靶基因的转录^[8]。

HOX 家族包括 HOXA、HOXB、HOXC、HOXD 四个基因簇^[9]。转录因子同源盒 D9(HOXD9)是 HOXD 基因簇的成员,含有 352 个氨基酸,位于人染色体 2q31.1^[9]。HOXD9 可促进前肢及中轴骨骼的发育^[10]、关节滑膜细胞的增殖^[11]及子宫腺体的形成^[12]。此外,HOXD9 还可介导结直肠癌^[6]、子宫颈癌^[13,14]等多种恶性肿瘤的发生。已有研究显示:HOXD9 在肺癌组织中高表达^[5],且 HOXD9 高表达肺癌患者预后较差^[16],提示 HOXD9 或与肺癌的发生发展相关,但目前尚未有研究明确 HOXD9 对于肺癌细胞的生物学作用。

本文通过在 H3255、H2170 肺癌细胞中过表达 HOXD9 检测其对肺癌细胞的生物学作用。此外,还发现了 HOXD9 通过转录调控作用影响增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,揭示了 HOXD9 促进肺癌发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

A549、H3255、H2170、LK2 肺癌细胞及 BEAS-2B 支气管上皮细胞购自中科院上海细胞库。HEK-293T 细胞由上海市肿瘤研究所癌基因与相关基因国家重点实验室提供。实验所需抗体包括:抗 HOXD9 抗体(20560-1-AP, Proteintech 公司,美国)、抗 PCNA 抗体(#13310, Cell Signaling Technology 公司,美国)、抗 tubulin 抗体(#2146, Cell Signaling Technology 公司,美国)及抗 γ H2AX 抗体(#7631, Cell Signaling Technology 公司,美国)。实验所用 PCNA 抑制剂 PCNA-I1 购于 Selleck(美国)公司,Trizol 试剂购于 Takara(日本)公司,transwell 小室、基质胶购于 Corning(美国)公司,同型免疫球蛋白 G(IgG)购于 Cell Signaling Technology(美国)公司,37%的甲醛溶液购于 Sigma-Aldrich(美国)公司。使用试剂盒包括逆转录试剂盒(Takara,日本)、彗星实验试剂盒(#ab238544, Abcam,美国)、细胞凋亡检测试剂盒(#556547, BD,美国)、荧光素酶双报告基因系统检测试剂盒(#E1910, Promega,美国)及 SimpleChIP 酶促 ChIP 试剂盒(#9003, CST,美国)。微量移液器、4 °C 离心机购于德国 Eppendorf 公司,CO₂ 恒温细胞培养箱、实时荧光定量 PCR 仪购于美国 Thermo 公司,水浴锅购于上海蓝豹实验仪器有限公司,酶标仪购于美国伯腾公司,荧光显微镜购于日本尼康公司,流式细胞仪购于美国 BD 公司,PCR 仪、化学发光仪、免疫印迹(western blot)电泳仪、电转仪、DNA 电泳仪购于美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 Kaplan-Meier plotter 数据库分析 Kaplan-Meier plotter 数据库包括来源于 GEO、EGA 和 TCGA 数据库的数据,可分析 14912 例癌症样本中 54 k 基因的表达情况,其中包括 3452 例肺癌样本^[17]。我们分析了 Kaplan-Meier Plotter 数据库中编号为"205604_s_at"的数据,以 HOXD9 基因表达中位数为界将肺癌患者分成了 HOXD9 高表达及 HOXD9 低表达组,绘制了不同表达水平的非小细胞肺癌患者的生存曲线,并记录总生存期(Overall survival, OS)和无进展生存期(Progression free survival, PFS)。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,随后进行 qRT-PCR 反应。反应条件为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 30 s,退火 55 °C 30 s,72 °C 60 s,反应 40 个循环,72 °C 延展 5 min。实验所用引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 实验引物序列

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR assay

Primer name	Sequence(5' to 3')
HOXD9-F	GCAGCAACTTGACCCAAACAA
HOXD9-R	CCAGCTCAAGCGTCTGGTAT
PCNA-F	CCGGTTACTGAGGGCGAGAA
PCNA-R	GACCGGCTGAGACTTGCCTA
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGAA

1.2.3 Western blot 实验 使用 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min 并在 4 °C、15,000 rpm 条件下离心 15 min 收集蛋白上清液。BCA 法测定蛋白浓度。加入上样缓冲液,于 99 °C 条件下加热 10 min 使蛋白变性,制备凝胶。每孔加入 20 μ g 蛋白样品,恒压 110 V 电泳约 1.5 h,将凝胶中分离的蛋白在恒压 80 V 条件下转印至甲醇浸泡过的 PVDF 膜上。使用 5%脱脂牛奶常温封闭 PVDF 膜 1 h。使用一抗稀释液按 1:1000 稀释实验所需抗体,并于 4 °C 孵育 PVDF 膜过夜,PBS 清洗 3 次后加入二抗,室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次后化学发光仪下进行曝光,分析结果。

1.2.4 质粒及慢病毒转染肺癌细胞 以 pCMVPuro05 为载体构建 HOXD9 过表达及对照质粒。用不含血清的培养基分别稀释质粒与 jetPRIME 转染试剂(Polyplus,法国),孵育 10 min 后将二者混合并加入细胞中,培养 6 h 后换液,继续培养 48 h 后即可用于后续实验。进行慢病毒转染前,应先按 1×10^5 密度将 H3255 及 H2170 肺癌细胞接种于 6 孔细胞培养板中,培养 24 h 后每孔加入约 12 μ L 制备好的 HOXD9 过表达慢病毒。24 h 后换液,继续培养 48 h 后加入 4 μ g/mL 的嘌呤霉素进行筛选以获得 HOXD9 过表达稳转细胞株。

1.2.5 小干扰 RNA(siRNA)转染肺癌细胞 设计合成靶向 HOXD9 的小干扰 RNA,其序列为:5'-GGACTCGCTTATAG-GCCAT-3'。用不含血清的培养基分别稀释小干扰 RNA 与 Rfect 转染试剂(常州百代,中国),充分混匀后孵育 5 min。随后将二者混匀,继续孵育 20 min 并加入细胞中。培养 6 h 后换液,

继续培养 48 h 后可用于后续实验。

1.2.6 细胞计数(Cell Counting Kit-8, CCK-8)实验 取状态良好的 H3255 及 H2170 肺癌细胞以每孔 1×10^3 细胞接种于 96 孔培养板中, 分别在第 1、3、5 天时加入使用完全培养基按 1:10 比例稀释的 CCK-8 溶液, 孵育 2 h 后在波长为 450 nm 的条件下检测每孔吸光度。

1.2.7 克隆形成实验 使用 6 孔板每孔接种 100 个 H3255 或 H2170 肺癌细胞并置于培养箱中培养 14 d, 弃去培养基后将细胞用 PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 然后用结晶紫染色 20 min, PBS 清洗 3 次后进行拍照与计数。

1.2.8 Transwell 细胞迁移实验 将 transwell 小室置于 24 孔板中, 向小室下层内加入 600 μ L 完全培养基。将 100 μ L 无血清培养基重悬的 5×10^4 个 H3255 或 H2170 肺癌细胞接种入小室上层。放入培养箱中培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 20 min 并进行拍照, 计数小室下层细胞。

1.2.9 细胞侵袭实验 将 transwell 小室置于 24 孔板中, 向小室上层内加入 100 μ L 按 1:10 的比例用无血清培养基稀释的基质胶, 待其凝固后向小室上层接种 100 μ L 用无血清培养基重悬的肺癌细胞, 并向小室下层内加入 600 μ L 完全培养基。培养 48 h 后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用结晶紫染色 20 min 后拍照, 计数小室下层肺癌细胞。

1.2.10 彗星实验 取 10 μ L 密度为 10^5 个/mL 的细胞悬液, 混匀于 100 μ L 琼脂糖中, 然后均匀涂覆在涂有琼脂糖的载玻片上。将玻片置于 4 $^{\circ}$ C 预冷的裂解液中孵育 1.5 h, 然后在碱性裂解液中孵育 30 min。使用碱性裂解液在水平电泳室恒压 20 V 条件下电泳 25 min。用乙醇固定, 并在室温下使用 Vista Green DNA Dye 染色 30 min。用荧光显微镜拍照并用 Casp 软件进行分析。所有步骤均在避光条件下进行。

1.2.11 免疫荧光染色实验 用 4% 多聚甲醛(PFA)固定细胞 15 min, 用 0.1% TritonX-100 破膜 20 min, 用 1% 山羊血清蛋白(GSA)封闭 1 h 并用 γ H2AX 抗体在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。使用 Cy3 标记荧光二抗室温孵育 1 h, 并用抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)进行封片。使用荧光显微镜拍照并用 Image J 软件进行分析。所有实验均在避光条件下进行。

1.2.12 细胞凋亡实验 使用胰酶消化细胞后用 PBS 清洗 2 遍并转移入流式管中, 每管加入 5 μ L FITC 标记的 Annexin-V 及 5 μ L PI 抗体, 室温避光孵育 15 min 后加入结合缓冲液。通过流式细胞术进行分析, 每次分析约 10^5 个细胞。

1.2.13 小鼠成瘤实验 动物实验获得上海市胸科医院实验动物伦理委员会批准。3 周龄雌性小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司, 饲养于上海市胸科医院 SPF 级动物实验室。所有小鼠均于实验前进行为期 7 天的适应性饲养, 饲养环境湿度控制在 50%~60%, 温度控制在 24 ± 1 $^{\circ}$ C, 维持 12 小时明/暗循环。实验过程中小鼠可自由获取 SPF 级小鼠饲料及饮水。小鼠随机分为 2 组, 每组 5 只。将 10^7 个对照或 HOXD9 过表达病毒转染的 H3255 肺癌细胞注射入小鼠右侧腋窝皮下。从注射后第 7 天开始测量肿瘤大小。注射 35 天后处死小鼠, 切除皮下瘤。计算肿瘤体积公式为: 体积 = (长 \times 宽²)/2^[30]。

1.2.14 荧光素酶报告基因 (luciferase) 实验 使用 jetPRIME 转染试剂将 HOXD9 过表达质粒及 pGL3-PCNA 启动子报告基

因质粒及共转染入 293T 工具细胞, 将小干扰 RNA 及 pGL3-PCNA 质粒共转染入 H3255 及 H2170 肺癌细胞中。用 pRL-SV40 海肾荧光素酶报告载体作为内对照。转染 48 h 后收集细胞提取物, 使用双荧光素酶报告检测系统检测萤火虫荧光素酶信号及海肾荧光素酶信号, 按照萤火虫荧光素酶信号 / 海肾荧光素酶信号比值进行标准化。

1.2.15 染色质免疫沉淀(ChIP)实验 用 37% 的甲醛溶液在室温条件下孵育细胞样品 10 分钟以进行交联, 用甘氨酸孵育细胞样品 5 分钟以终止交联。收集细胞, 用核酸酶消化细胞 DNA 并进行超声处理以获得约 150 bp 大小的 DNA 片段。用抗 HOXD9 抗体或对照同型免疫球蛋白 G(IgG)在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育样品过夜并使用蛋白 G 磁珠收集免疫复合物。通过 PCR 扩增 DNA 片段并通过 DNA 电泳进行检测。实验所用引物序列见表 2。

表 2 ChIP 引物序列

Table 2 Sequences of primers used for ChIP

Primer name	Sequence
F (5' to 3')	GGACTGGCTCACTGGGTAAC
R (5' to 3')	AGGGAACGGAGAGCCTAAGT

1.2.16 统计分析 实验结果用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组间比较采用 t 检验。所有统计学分析均采用双侧检验。将 $P < 0.05$ 定义为差异具有统计学意义。"*" 表示 $P < 0.05$, "***" 表示 $P < 0.01$, "****" 表示 $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 HOXD9 的表达与患者预后相关

首先, 我们利用 Kaplan-Meier plotter 数据库 ([http:// kmplot.com/analysis/](http://kmplot.com/analysis/)) 探究了 HOXD9 mRNA 表达与肺癌患者总生存期(OS)及无进展生存期(PFS)间的关系。结果显示, HOXD9 高表达患者中位总生存期为 54.3 个月, HOXD9 低表达患者中位总生存期为 88.7 个月, 差异具有统计学意义(风险比(HR)=1.42; 95%置信区间(95%CI)=1.25-1.61; $P=5.1e^{-8}$)。HOXD9 高表达患者中位无进展生存期为 14 个月, HOXD9 低表达患者中位无进展生存期为 21.3 个月, 差异具有统计学意义(HR=1.49; 95% CI=1.23-1.81; $P=4.1e^{-5}$) (图 1)。以上研究结果表明 HOXD9 与肺癌患者预后相关。

2.2 HOXD9 在肺癌细胞系中高表达

利用 western blot 实验检测了肺腺癌细胞系(A549、H3255)、肺鳞癌细胞系(H2170、LK2)及支气管上皮细胞系(BEAS-2B)中 HOXD9 的蛋白表达水平。结果显示(图 2), A549、H3255、H2170、LK2 细胞系中 HOXD9 的表达均显著高于肺支气管上皮细胞系 BEAS-2B, 提示 HOXD9 可能与肺癌的发生发展相关。

2.3 过表达 HOXD9 可促进肺癌细胞的增殖

为研究 HOXD9 在肺癌细胞中的生物学作用, 通过慢病毒转染构建了过表达 HOXD9 的 H3255 及 H2170 肺癌细胞株, 并通过 western blot 检测了 HOXD9 的蛋白表达(图 3A)。接着, 通过 CCK-8 实验检测了使用慢病毒过表达 HOXD9 对肺

癌细胞增殖的影响,结果显示:过表达 HOXD9 后,肺癌细胞 H3255 及 H2170 的增殖速率加快,提示 HOXD9 可促进 H3255 及 H2170 肺癌细胞增殖 (图 3B)。此外,克隆形成实验显示:HOXD9 过表达的 H3255 及 H2170 稳转肺癌细胞形成的集落更大,进一步验证了 HOXD9 可促进肺癌细胞增殖(图 3C)。进

一步,用过表达 HOXD9 的 H3255 稳转肺癌细胞进行了小鼠皮下瘤实验,结果显示:过表达 HOXD9 的肺癌细胞生长速度更快,肿瘤体积更大(图 3D),提示过表达 HOXD9 可促进肺癌细胞增殖。

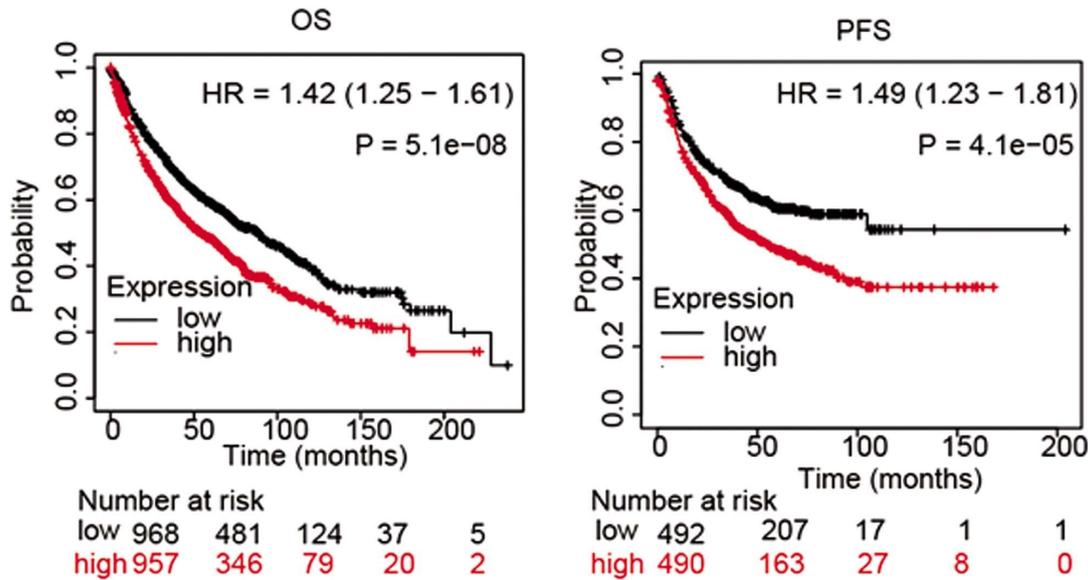


图 1 利用 Kaplan-Meier 数据库分析 HOXD9 mRNA 表达对肺癌患者总生存期及无进展生存期的影响

Fig.1 Effect of HOXD9 mRNA expression on overall survival and progression free survival of lung cancer patients analyzed using Kaplan-Meier plotter

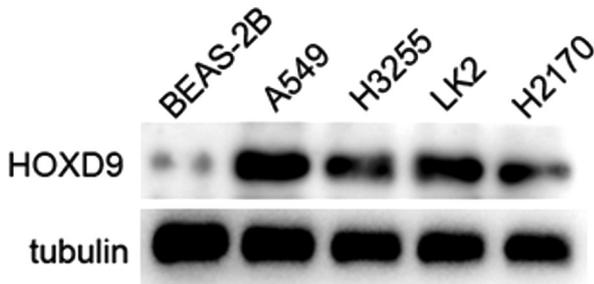


图 2 Western blot 实验检测支气管上皮细胞与肺癌细胞中HOXD9 的表达

Fig.2 HOXD9 expression in bronchial epithelial cells and lung cancer cells tested by western blot

2.4 过表达 HOXD9 可促进肺癌细胞迁移及侵袭

为了进一步探究 HOXD9 在肺癌细胞中的生物学作用,我们还通过 transwell 实验检测了使用慢病毒过表达 HOXD9 对肺癌细胞迁移的影响。结果显示:过表达 HOXD9 的 H3255 及 H2170 肺癌细胞更易于通过小室底膜 (图 4A), 提示 HOXD9 可促进肺癌细胞迁移。此外,我们还进行了基质胶实验以探究通过慢病毒转染过表达 HOXD9 对肺癌细胞 H3255 及 H2170 侵袭能力的影响, 结果显示: 相较于对照组细胞, 小室下层 HOXD9 过表达组细胞数量增加(图 4B), 提示过表达 HOXD9 后,H3255 及 H2170 肺癌细胞侵袭能力显著增强。

2.5 过表达 HOXD9 抑制肺癌细胞 DNA 损伤及细胞凋亡

单细胞凝胶电泳(彗星实验)是一种检测真核细胞 DNA 损伤的灵敏方法^[18]。通过彗星实验探索使用慢病毒过表达 HOXD9 对肺癌细胞 DNA 损伤情况的影响。结果显示:过表达 HOXD9 后,H3255 及 H2170 肺癌细胞的彗星尾长 (tail mo-

ment)及尾部 DNA 含量(relative DNA in tail)均减少(图 5A), 提示过表达 HOXD9 可抑制肺癌细胞 DNA 损伤。此外,利用免疫荧光染色实验检测了 DNA 损伤标志物 γ H2AX 在对照组及 HOXD9 过表达组 H3255 及 H2170 稳转肺癌细胞中的表达情况。结果显示:在 H3255 及 H2170 肺癌细胞中,过表达 HOXD9 可抑制 γ H2AX 的表达(图 5B),进一步证明了 HOXD9 可抑制肺癌细胞 DNA 损伤。

DNA 损伤在细胞内的不断累积最终可导致细胞凋亡^[19]。因此,利用流式细胞术检测了 HOXD9 对细胞凋亡的影响。结果显示:使用慢病毒过表达 HOXD9 后, 肺癌细胞 H3255 及 H2170 凋亡数量显著降低 (图 5C), 提示 HOXD9 可抑制 H3255 及 H2170 肺癌细胞凋亡。

2.6 HOXD9 促进肺癌细胞中 PCNA 的转录

为探究 HOXD9 在肺癌细胞中发挥生物学作用的具体机制,使用 Transfac 数据库预测 HOXD9 的下游靶基因。共计得到了 1553 个可能的靶基因,其中包含增殖细胞核抗原 PCNA。通过 qRT-PCR 及 western blot 实验发现: 使用质粒过表达 HOXD9 可提高 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的 mRNA 及蛋白表达(图 6A,B)。接着,利用小干扰 RNA 敲低了 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 HOXD9 的表达。结果显示: 敲低 HOXD9 表达后,H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的 mRNA 及蛋白表达下调(图 6C,D),提示 HOXD9 可能通过转录调控 PCNA 的表达水平。接着,设计了 pGL3-PCNA 启动子报告基因质粒并进行了荧光素酶报告基因实验。结果显示: 过表达 HOXD9 可上调 PCNA 转录活性(图 6E)。此外,使用小干扰 RNA 敲低 HOXD9 可下调 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 转录活性(图 6F),提示 HOXD9 可调控 PCNA 转录。为进一步

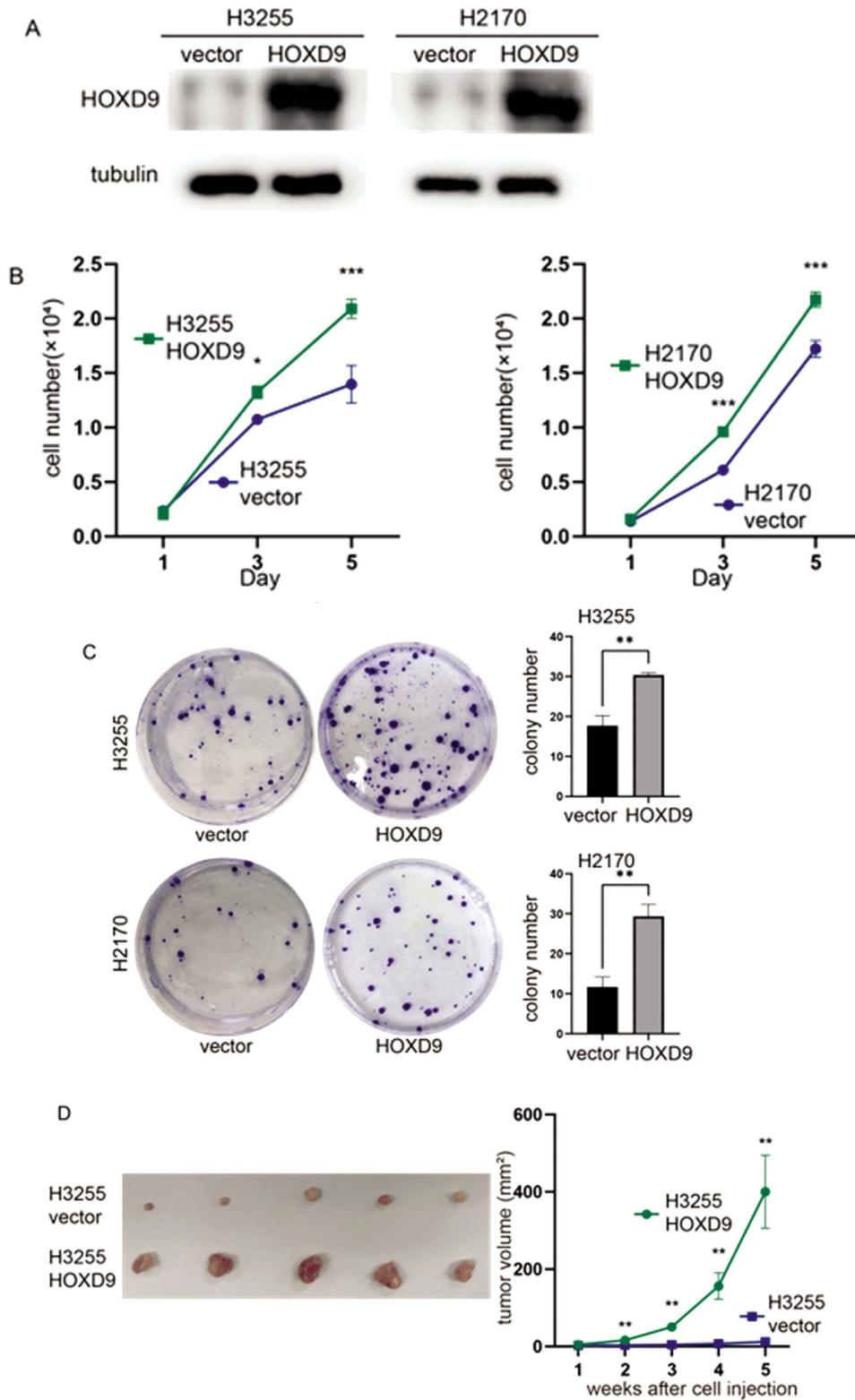


图3 HOXD9 促进 H3255 及 H2170 肺癌细胞的增殖及克隆形成

A. Western blot 检测 HOXD9 过表达 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 HOXD9 的表达水平

B. CCK-8 实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞增殖能力的影响(n=3)

C. 平板克隆实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞克隆形成能力的影响(n=3)

D. 小鼠皮下瘤实验检测过表达 HOXD9 对肺癌细胞体内增殖能力的影响(n=5)

Fig.3 HOXD9 promoted the proliferation and colony formation of H3255 and H2170 lung cancer cells

A. Validation of HOXD9 expression in H3255 and H2170 lung cancer cells with HOXD9 stable overexpression.

B. Effect of HOXD9 overexpression on cell proliferation of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by CCK-8 assay. (n=3)

C. Effect of HOXD9 overexpression on colony formation ability of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by colony formation assay. (n=3)

D. Effect of HOXD9 overexpression on cell proliferation of lung cancer cells in vivo. (n=5)

Compared with the vector group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

探究 HOXD9 是否与 PCNA 启动子结合,进行了 ChIP 实验,结果显示:HOXD9 可直接与 PCNA 启动子结合(图 6G)。最后,使用 PCNA 抑制剂(PCNA-I1)进行了 Rescue 实验(图 6H)。结

果显示:PCNA-I1 可显著抑制 HOXD9 过表达 H3255 及 H2170 稳转肺癌细胞的增殖(图 6I),提示 HOXD9 促进肺癌细胞增殖的作用是通过调控 PCNA 表达产生的。

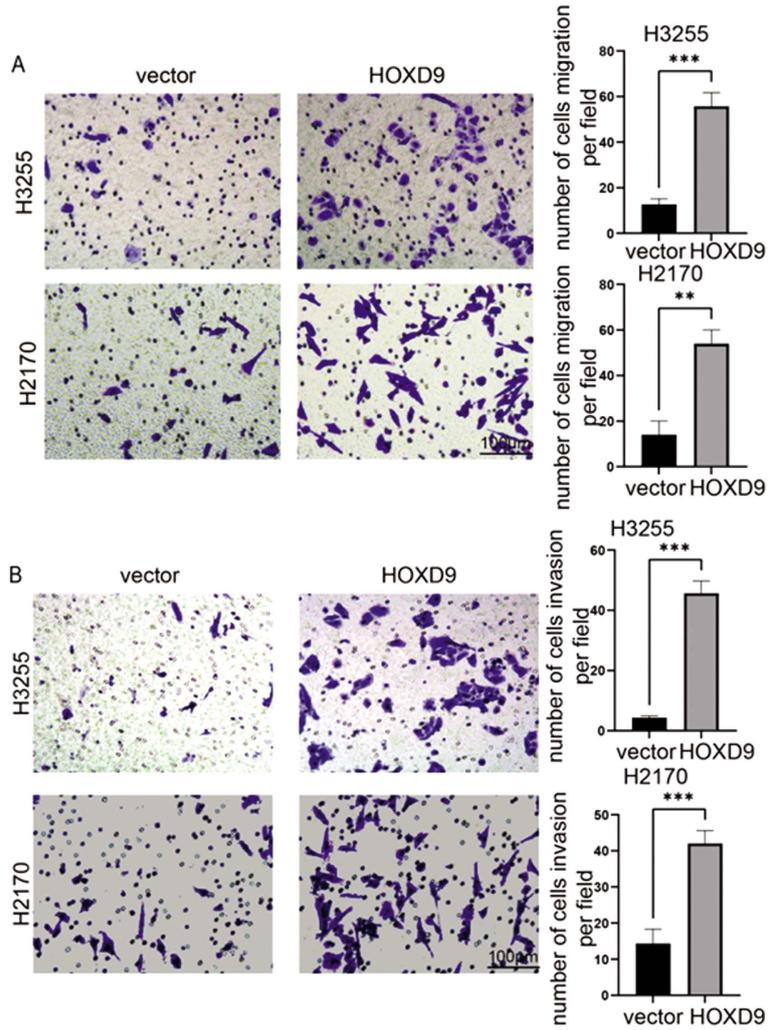


图 4 HOXD9 促进 H3255 及 H2170 肺癌细胞迁移及侵袭

A. transwell 实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞迁移能力的影响(n=3)

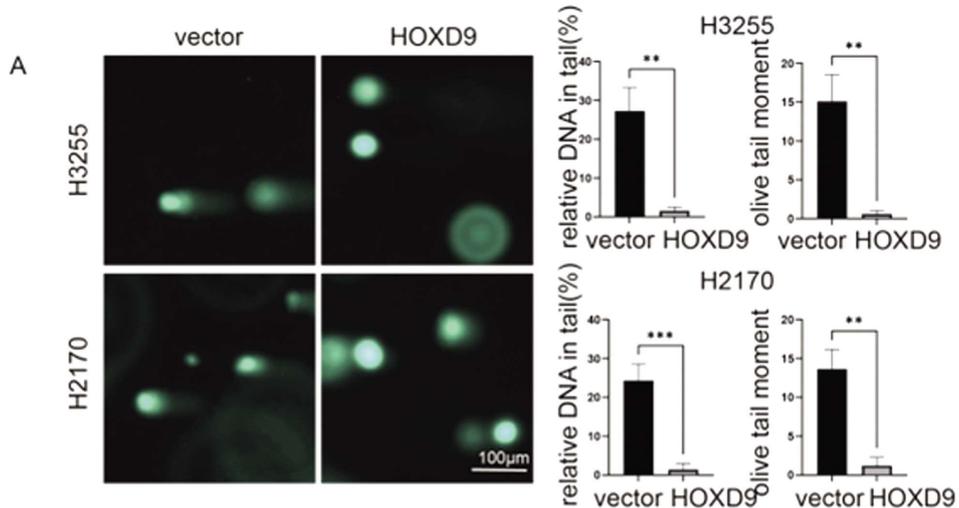
B. 基质胶实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞侵袭能力的影响(n=3)

Fig.4 HOXD9 promoted the migration and invasion of H3255 and H2170 lung cancer cells

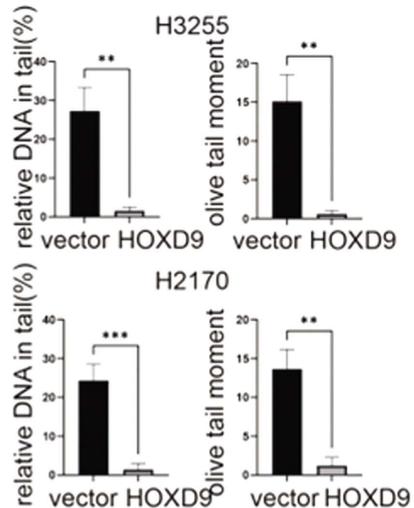
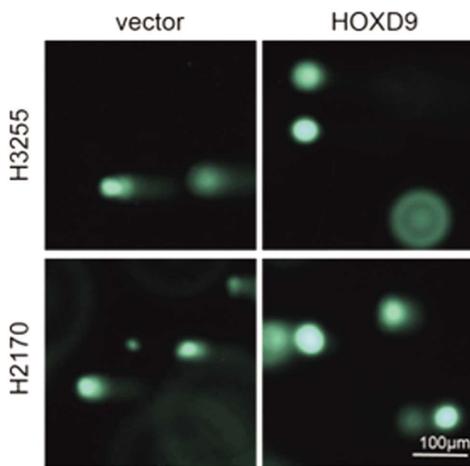
A. Effect of HOXD9 overexpression on cell migration of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by transwell assay. (n=3)

B. Effect of HOXD9 overexpression on cell invasion of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by matrigel assay. (n=3)

Compared with the vector group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



A



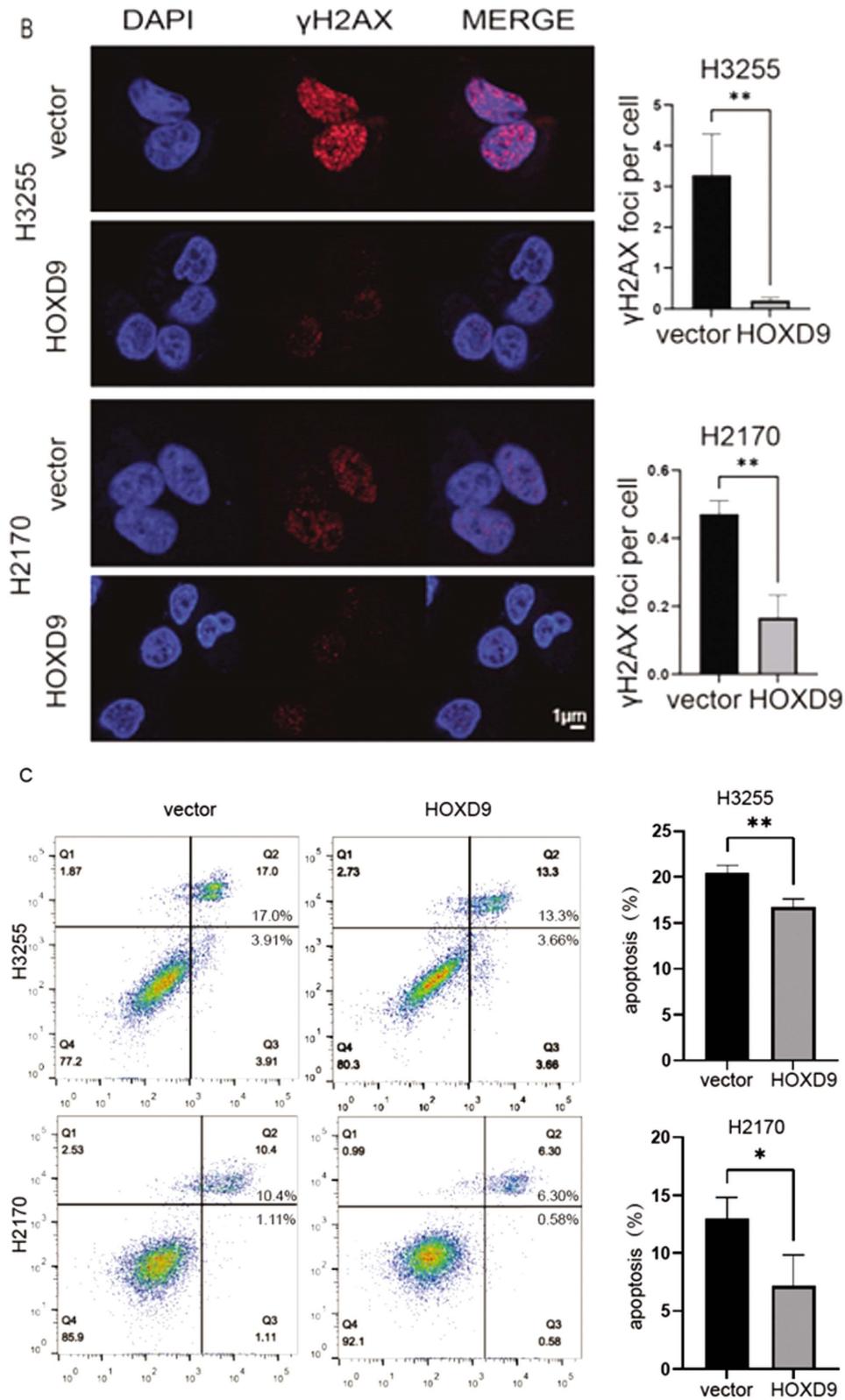


图 5 HOXD9 抑制 H3255 及 H2170 肺癌细胞 DNA 损伤及细胞凋亡

A. 彗星实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞 DNA 损伤的影响(n=3)

B. 免疫荧光染色实验检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞γH2AX 表达的影响(n=3)

C. 流式细胞术检测过表达 HOXD9 对 H3255 及 H2170 肺癌细胞凋亡的影响(n=3)

Fig.5 HOXD9 inhibited DNA damage and cell apoptosis of H3255 and H2170 lung cancer cells

A. Effect of HOXD9 overexpression on DNA damage of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by comet assay. (n=3)

B. Effect of HOXD9 overexpression on γH2AX expression of H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by immunofluorescent staining. (n=3)

C. Effect of HOXD9 overexpression on H3255 and H2170 lung cancer cell apoptosis as detected by flow cytometry. (n=3)

Compared with the vector group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

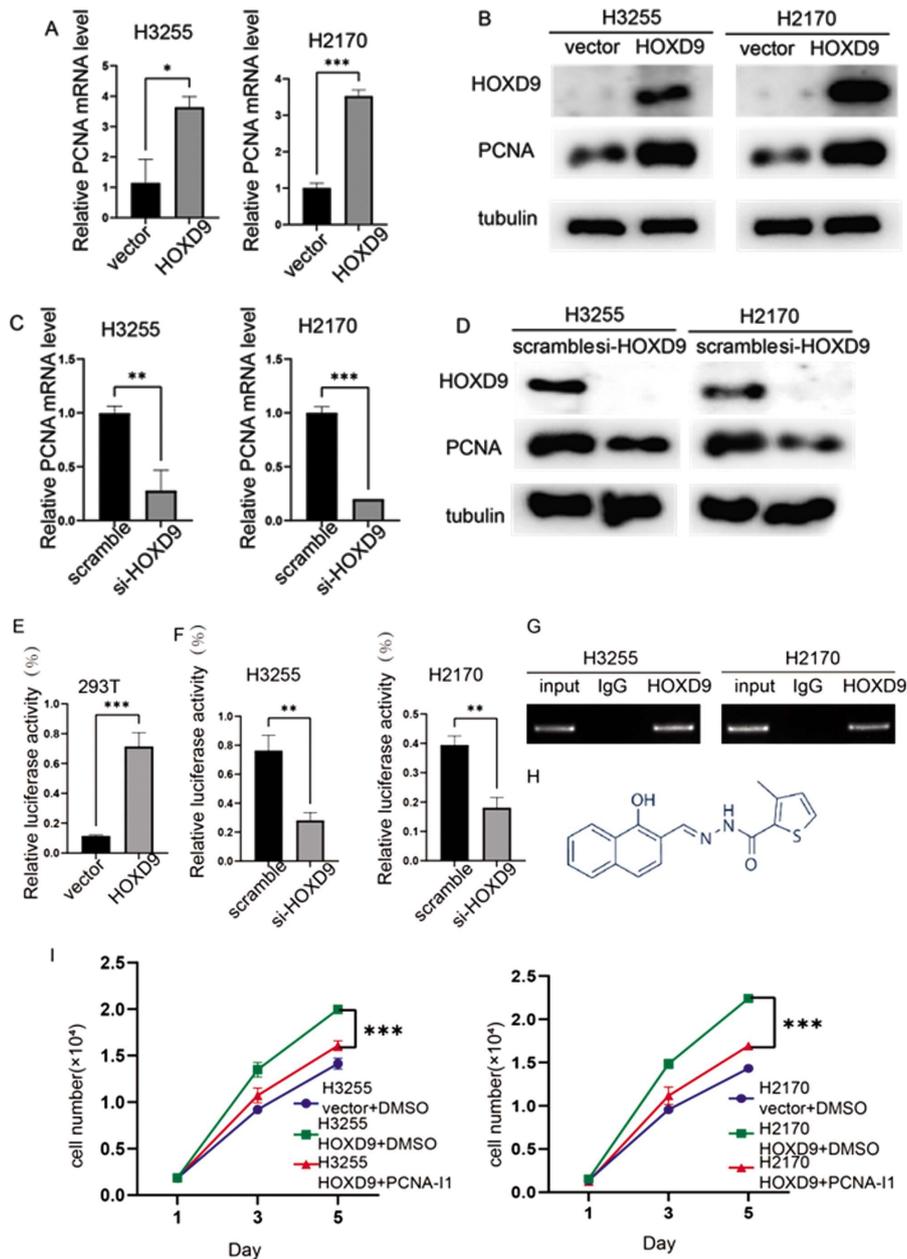


图 6 HOXD9 促进肺癌细胞中 PCNA 的转录

A. qRT-PCR 检测过表达 HOXD9 后 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的 mRNA 变化(n=3)

B. western blot 检测过表达 HOXD9 后 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的蛋白变化

C. qRT-PCR 检测敲低 HOXD9 后 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的 mRNA 变化(n=3)

D. western blot 检测敲低 HOXD9 后 H3255 及 H2170 肺癌细胞中 PCNA 的蛋白变化

E. 荧光素酶报告基因实验检测过表达 HOXD9 对 PCNA 转录的影响(n=3)

F. 荧光素酶报告基因实验检测 H3255 及 H2170 肺癌细胞中,敲低 HOXD9 对 PCNA 转录的影响(n=3)

G. ChIP 实验检测 H3255 及 H2170 肺癌细胞中,HOXD9 在 PCNA 启动子上的结合

H. PCNA 抑制剂(PCNA-I1)的结构式

I.使用 PCNA-I1(1 μ M)处理 HOXD9 过表达 H3255 及 H2170 肺癌细胞,并进行 CCK-8 实验(n=3, *** P <0.001)

Fig.6 HOXD9 promoted the transcription of PCNA in lung cancer cells

A. Effect of HOXD9 overexpression on PCNA mRNA expression in H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by qRT-PCR analysis. (n=3)

B. Effect of HOXD9 overexpression on PCNA protein expression in H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by western blot analysis.

C. Effect of HOXD9 knockdown on PCNA mRNA expression in H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by qRT-PCR analysis. (n=3)

D. Effect of HOXD9 knockdown on PCNA protein expression in H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by western blot analysis.

E. Effect of HOXD9 overexpression on PCNA transcription, as detected by luciferase assay. (n=3)

F. Effect of HOXD9 knockdown on PCNA transcription in H3255 and H2170 lung cancer cells, as detected by luciferase assay. (n=3)

G. Binding of HOXD9 on PCNA promoter, as detected by ChIP assay.

H. The structure of PCNA inhibitor (PCNA-I1).

I. I. H3255 and H2170 lung cancer cells with HOXD9 overexpression were treated with PCNA-I1 (1 μ M) using CCK-8 assay.(n=3, *** P <0.001)

Compared with the vector group, * P <0.05, *** P <0.001

Compared with the scramble group, ** P <0.01, *** P <0.001

3 讨论

HOXD9 是同源盒基因家族的一员^[20]。已有研究显示: HOXD9 可促进结肠癌^[6]、子宫颈癌^[13,14]、胃癌^[21,22]、肝癌^[20]、胰腺癌^[23]、食管鳞癌^[24]及神经胶质瘤^[25]的发生发展。Bao 等人的研究显示在肺癌组织中 HOXD9 的表达上调^[15]。Pernía 等人的研究显示,低表达 HOXD9 的肺癌患者预后更佳^[16],提示 HOXD9 与肺癌发生发展相关。本文通过 CCK-8 实验、克隆形成实验、小鼠皮下瘤实验首次证实了 HOXD9 可促进 H3255 及 H2170 肺癌细胞增殖,明确了 HOXD9 在肺癌发生过程中的促癌作用。

Liu 等人的研究显示,HOXD9 对结直肠癌细胞上皮间质化及细胞迁移至关重要^[6]。Zhu 等人的研究表明,HOXD9 可促进胃癌细胞的迁移与侵袭^[21]。Lv 等人的研究显示,HOXD9 可介导肝癌细胞的上皮间质化与肿瘤转移^[20]。然而,HOXD9 对肺癌细胞迁移及侵袭的影响尚未明确。本研究中,我们通过 Transwell 实验发现 HOXD9 可促进肺癌细胞的迁移,通过基质胶实验发现 HOXD9 可促进肺癌细胞的侵袭,揭示了 HOXD9 可能与肺癌的转移相关。

基因组的不稳定性是肿瘤特异性 DNA 损伤与 DNA 修复异常的综合效应,是恶性肿瘤的普遍特征^[26]。DNA 损伤在细胞内的累积可导致肿瘤细胞的凋亡^[19],抑制肺癌等恶性肿瘤的发生发展^[27]。本文通过彗星实验证实了过表达 HOXD9 可下调 H3255 及 H2170 肺癌细胞彗星尾长及尾部 DNA 含量,通过免疫荧光染色证实了过表达 HOXD9 可下调肺癌细胞中 DNA 损伤标志物 γ H2AX 的表达,提示 HOXD9 可抑制肺癌细胞 DNA 损伤。此外,还通过流式细胞术发现在肺癌细胞中过表达 HOXD9 可抑制细胞凋亡,进一步揭示了 HOXD9 在肺癌发生发展过程中的作用。

在肺恶性肿瘤的诊疗方案中,许多化疗药物以 DNA 为作用靶点^[28]。例如,顺铂等铂类药物通过与 DNA 形成加合物破坏 DNA 结构,抑制 DNA 复制,介导肿瘤细胞的凋亡^[29]。阿霉素可直接作用于肿瘤细胞内的 DNA,通过介导 DNA 碱基错配、链间及链内交联、DNA 双链断裂诱导细胞凋亡^[30]。DNA 损伤的抑制及 DNA 损伤修复通路(DNA damage repair, DDR)的激活可介导肿瘤细胞对化疗药物的耐药,抑制化疗药物的疗效^[31]。已有研究显示:DDR 通路中关键分子(如:CHK1、ATR、PARP)的靶向抑制剂可通过抑制 DNA 修复增强化疗药物的疗效。本文首次揭示了 HOXD9 可抑制肺癌细胞 DNA 损伤,提示 HOXD9 可能与化疗药物敏感性相关。

已有研究表明:HOXD9 可通过调控 HMCN1^[13],RUFY3^[21],SSCN1A^[23]等下游靶基因的转录在多种恶性肿瘤中发挥促癌作用。然而,HOXD9 在肺癌中发挥促癌作用的具体机制尚未明确。本文揭示了 HOXD9 可调控 PCNA 基因的转录,提示了 HOXD9 在肺癌中可能的作用机制。PCNA 在肺癌^[32]、乳腺癌^[33]、卵巢癌^[34]等多种恶性肿瘤中表达上调,与胃癌^[35]、结直肠癌^[36]等恶性肿瘤患者的预后相关。可促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭^[37],并介导 DNA 损伤修复^[38],是临床肿瘤诊断及预后评估的重要标志^[39],可用作抑制肿瘤进展,提高肿瘤放化疗敏感性的潜在靶点^[40]。本研究中,我们发现 HOXD9 可与 PCNA 的启动子直接结合,通过调控 PCNA 转录改变 PCNA 表达,为靶向

HOXD9/PCNA 轴抑制肺恶性肿瘤的发生发展,改善肺癌患者预后提供了一种可能。

总之,本文首次在肺癌中证实了过表达 HOXD9 可促进肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭,抑制肺癌细胞 DNA 损伤及凋亡,揭示了 PCNA 为其下游靶基因,并明确了 HOXD9 可调控 PCNA 转录。研究结果提示了 HOXD9 是一种潜在的肺癌治疗分子靶标,对肺癌的治疗具有重要的意义。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4): 778-789
- [2] Gao S, Li N, Wang S, et al. Lung cancer in people's republic of china [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(10): 1567-1576
- [3] Villalobos P, Wistuba, II. Lung cancer biomarkers [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017, 31(1): 13-29
- [4] Martín-Del-Campo R, Sifuentes-Romero I, García-Gasca A. Hox genes in reptile development, epigenetic regulation, and teratogenesis [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2019, 157(1-2): 34-45
- [5] Feltes BC. Architects meets repairers: The interplay between homeobox genes and DNA repair[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 73: 34-48
- [6] Liu M, Xiao Y, Tang W, et al. Hoxd9 promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal carcinoma [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(11): 3932-3943
- [7] Gehring WJ. Exploring the homeobox [J]. *Gene*, 1993, 135 (1-2): 215-221
- [8] Liu KY, Wang LT, Hsu SH, et al. Homeobox genes and hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(5): 621
- [9] Kelemen LE, Lawrenson K, Tyrer J, et al. Genome-wide significant risk associations for mucinous ovarian carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(8): 888-897
- [10] Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, et al. Specific and redundant functions of the paralogous hoxa-9 and hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning[J]. *Development*, 1996, 122(2): 461-472
- [11] Khoa ND, Nakazawa M, Hasunuma T, et al. Potential role of hoxd9 in synovioocyte proliferation [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44 (5): 1013-1021
- [12] Mucenski ML, Mahoney R, Adam M, et al. Single cell rna-seq study of wild type and hox9,10,11 mutant developing uterus [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4557
- [13] Wen D, Wang L, Tan S, et al. Hoxd9 aggravates the development of cervical cancer by transcriptionally activating hmcn1 [J]. *Panminerva Med*, 2020. May 14
- [14] Hirao N, Iwata T, Tanaka K, et al. Transcription factor homeobox d9 is involved in the malignant phenotype of cervical cancer through direct binding to the human papillomavirus oncogene promoter [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 155(2): 340-348
- [15] Bao L, Zhang Y, Wang J, et al. Variations of chromosome 2 gene expressions among patients with lung cancer or non-cancer [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5): 419-435
- [16] Pernía O, Sastre-Perona A, Rodriguez-Antolín C, et al. A novel role for the tumor suppressor gene itf2 in tumorigenesis and chemotherapy response[J]. *Cancers(Basel)*, 2020, 12(4): 786

- [17] Láneczky A, Györffy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (kmplot): Development and implementation [J]. *J Med Internet Res*, 2021, 23(7): e27633
- [18] Møller P. The comet assay: Ready for 30 more years[J]. *Mutagenesis*, 2018, 33(1): 1-7
- [19] Yuan LQ, Wang C, Lu DF, et al. Induction of apoptosis and ferroptosis by a tumor suppressing magnetic field through ros-mediated DNA damage [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3662-3681
- [20] Lv X, Li L, Lv L, et al. Hoxd9 promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis by zeb1 regulation in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 133
- [21] Zhu H, Dai W, Li J, et al. Hoxd9 promotes the growth, invasion and metastasis of gastric cancer cells by transcriptional activation of rufy3 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 412
- [22] Xiong R, Yin T, Gao JL, et al. Hoxd9 activates the $\text{tgf-}\beta\text{/smad}$ signaling pathway to promote gastric cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2163-2172
- [23] Chang J, Hu X, Nan J, et al. Hoxd9-induced scnn1a upregulation promotes pancreatic cancer cell proliferation, migration and predicts prognosis by regulating epithelial-mesenchymal transformation [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 819
- [24] Liu DB, Gu ZD, Cao XZ, et al. Immunocytochemical detection of hoxd9 and pbx1 homeodomain protein expression in chinese esophageal squamous cell carcinomas [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(10): 1562-1566
- [25] Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, et al. Functional analysis of hoxd9 in human gliomas and glioma cancer stem cells [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 60
- [26] O'Connor MJ. Targeting the DNA damage response in cancer[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 547-560
- [27] Liu T, Zuo L, Guo D, et al. Ginsenoside rg3 regulates DNA damage in non-small cell lung cancer cells by activating vrk1/p53bp1 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109483
- [28] Ali A, Bhattacharya S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(16): 4506-4521
- [29] Woźniak K, Błasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts[J]. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49(3): 583-596
- [30] Wang S, Zou Z, Luo X, et al. Lrh1 enhances cell resistance to chemotherapy by transcriptionally activating mdc1 expression and attenuating DNA damage in human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(24): 3243-3259
- [31] Li L, Zhu T, Gao YF, et al. Targeting DNA damage response in the radio(chemo)therapy of non-small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 839
- [32] Chen X, Sun J, Wang Y. Expressions of cd44, pcna and mrp1 in lung cancer tissues and their effects on proliferation and invasion abilities of lung cancer cell line 95d[J]. *J buon*, 2021, 26(1): 72-78
- [33] Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, et al. Ki67, pcna, and mcm proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(5): 544-552
- [34] Zheng C, Yang R. Rcd24, b7-h4 and pcna expression and clinical significance in ovarian cancer[J]. *J buon*, 2019, 24(2): 715-719
- [35] Hu L, Li HL, Li WF, et al. Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and e-cadherin in gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(20): 3721-3729
- [36] Cai F, Li J, Pan X, et al. Increased expression of pcna-as1 in colorectal cancer and its clinical association [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(11): 1809-1814
- [37] Liao S, Chen H, Liu M, et al. Aquaporin 9 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via wnt/ β -catenin pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(2): 1527-1544
- [38] Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The many roles of pcna in eukaryotic DNA replication[J]. *Enzymes*, 2016, 39: 231-254
- [39] Lv Q, Zhang J, Yi Y, et al. Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: A systematic review[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(9): 6209-6217
- [40] Tang Q, Xie M, Yu S, et al. Periodic oxaliplatin administration in synergy with per2-mediated pcna transcription repression promotes chronochemotherapeutic efficacy of oscc[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(21): 1900667