

# HOXA7促进宫颈癌细胞体外增殖的实验研究

陈 军<sup>1,2,3</sup> 李跃辉<sup>1,2</sup> 刘朝阳<sup>1,2</sup> 李文玲<sup>1,2</sup> 杨小会<sup>4,5\*</sup> 李官成<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中南大学湘雅医院, 卫生部癌变原理重点实验室及教育部癌变与侵袭原理重点实验室, 长沙 410008;

<sup>2</sup>中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; <sup>3</sup>湖南环境生物职业技术学院, 衡阳 421005;

<sup>4</sup>中南大学公共卫生学院, 长沙 410078; <sup>5</sup>中南大学湘雅三医院, 长沙 410013)

**摘要** 该研究敲低同源盒基因A7(homeobox genes A7, *HOXA7*)后, 研究宫颈癌细胞Siha、Caski体外增殖的影响。将*HOXA7*基因的si-RNA稳定转染至Siha、Caski细胞; RNA干扰的效果采用RT-PCR、Western blot进行鉴定; 细胞生长速度采用MTT法、细胞倍增时间实验来进行检测; 平板克隆形成实验检测细胞接种的存活率; 流式细胞术检测细胞周期。RNA干扰结果显示, 敲低*HOXA7*基因后, Siha、Caski细胞中*HOXA7*表达下调。MTT结果显示, 实验组Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*细胞生长速度明显下降。研究发现, 对照组细胞Siha/NC、Caski/NC与实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*的平均倍增时间为分别为5.652±0.352 h、4.650±0.340 h、7.342±0.331 h和6.987±0.330 h; 对照组细胞Siha/NC、Caski/NC与实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*的克隆形成率分别为35.400%±1.429%、31.700%±1.943%、24.200%±1.098%和21.200%±1.838%。分别与对照组细胞Siha/NC、Caski/NC比较, 实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*增殖、倍增时间和克隆形成能力差异极显著( $P<0.01$ )。实验组细胞周期也发生改变: G<sub>1</sub>期细胞增多、S期细胞减少。这说明, *HOXA7*基因可以促进宫颈癌细胞Caski、Siha的增殖, 这为进一步探索*HOXA7*基因的功能及研究宫颈癌的发病机制打下了坚实的基础。

**关键词** RNA干扰; *HOXA7*; 宫颈癌

## The Study of Proliferation of Cervical Carcinoma Promoted by *HOXA7* *in Vitro*

Chen Jun<sup>1,2,3</sup>, Li Yuehui<sup>1,2</sup>, Liu Zhaoyang<sup>1,2</sup>, Li Wenling<sup>1,2</sup>, Yang Xiaohui<sup>4,5\*</sup>, Li Guancheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Carcinogenesis of the Chinese Ministry of Health and the Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of the Chinese Ministry of Education, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

<sup>2</sup>Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China; <sup>3</sup>Hunan University of Environment and Biology, Hengyang 421005, China; <sup>4</sup>Department of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China;

<sup>5</sup>The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract** This study investigated the effect of proliferation of cervical cancer cells Siha and Caski after knockdown *HOXA7* gene *in vitro*. Then *HOXA7* gene si-RNA was stably transfected into Siha and Caski cells, respectively. The effects of RNA interference were identified by RT-PCR and Western blot. The growth rate of Siha and Caski cells was detected by MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and

收稿日期: 2017-10-30 接受日期: 2017-11-29

国家自然科学基金(批准号: 81201903)和湖南省自然科学基金(批准号: 2016JJ2170)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0731-84805443, E-mail: yangxiaohui0924@163.com, libsun@163.com

Received: October 30, 2017 Accepted: November 29, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81201903) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (Grant No.2016JJ2170)

\*Corresponding authors. Tel: +86-731-84805443, E-mail: yangxiaohui0924@163.com, libsun@163.com

网络出版时间: 2018-01-29 17:41:49 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1741.026.html>

cell doubling time test after knockdown of *HOXA7* gene. The clonal formation ability of Siha and Caski cells was detected by plate cloning assay, and the cell cycle of Siha and Caski cells was detected by flow cytometry after knockdown *HOXA7* gene. The survival rate of cell inoculation was detected by a flat clonal formation test, flow cytometry was used to detect cell cycle. The results showed that the expression of *HOXA7* was down regulated in Siha and Caski cells after the knockdown of *HOXA7* gene. MTT results showed that the growth rate of Siha/si-*HOXA7* and Caski/si-*HOXA7* was decreased significantly in the experimental group. It was found that the average doubling times of Siha/NC, Caski/NC, Siha/si-*HOXA7* and Caski/si-*HOXA7* were  $5.652 \pm 0.352$  h,  $4.650 \pm 0.340$  h,  $7.342 \pm 0.331$  h and  $6.987 \pm 0.330$  h, respectively. The clonal formation rates of Siha/NC, Caski/NC, Siha/si-*HOXA7* and Caski/si-*HOXA7* were  $35.400\% \pm 1.429\%$ ,  $31.700\% \pm 1.943\%$ ,  $24.200\% \pm 1.098\%$  and  $21.200\% \pm 1.838\%$ , respectively. The cells difference between the control group and the experimental group was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The cell cycle of the experimental group also changed: phase G<sub>1</sub> cells increased and phase S cells decreased. Results showed that *HOXA7* gene could promote the proliferation of cervical cancer cells Caski and Siha, which laid a solid foundation for further exploring the function of *HOXA7* gene and studying the pathogenesis of cervical cancer.

**Keywords** RNA interference; *HOXA7*; cervical carcinoma

根据世界卫生组织的报告, 宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 每年导致约27.4万例死亡<sup>[1]</sup>。在过去的几十年里, 宫颈癌症发病率分布不均匀, 85%的病例分布在低收入和中等收入国家中<sup>[2]</sup>。*HOX*(homeobox)基因是一个转录因子家族, 在多种肿瘤中异常表达<sup>[3]</sup>。在人类中已经发现了39个*HOX*基因, 分为*HOXA*、*HOXB*、*HOXC*和*HOXD*4簇<sup>[4]</sup>, 分别定位于不同染色体的特定区域, 其中*HOXA*定位于7p15.3<sup>[5]</sup>。该基因表达的蛋白质具有DNA结合及转录因子活性, 通过结合在DNA相应位置并启动相关基因转录, 从而调控胚胎及成体细胞增殖、分化, 异常表达的*HOXA*基因会导致细胞形态和结构异常, 进而导致细胞恶性转化<sup>[6-7]</sup>。本文通过研究*HOXA7*基因在宫颈癌中的功能作用, 从而为进一步研究可能存在的宫颈癌分子标志物及宫颈癌治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

宫颈癌细胞株Caski、Siha购自中南大学细胞中心, 由中南大学基础医学院肿瘤研究所保存。无血清RPMI-1640培养基购自Gibico公司。新生小牛血清购自Biology Industries公司。胰蛋白酶购自厦门研科生物试剂公司。plent-U6-GFP/si-*HOXA7*购自山东维真生物科技有限公司。转染试剂Lipofectamine 2000 Reagent购自上海英维捷基贸易有限公司。MTT、Puromycin、DMSO购自上海鼎国生物技术有限公司。细胞培养板购自上海圣翎生物科技有限

公司。碘化丙啶(PI)和Giemsa染料购自Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 plent-U6-GFP/si-*HOXA7*重组载体构建 从基因Bank中提取*HOXA7*基因序列, 设计、合成*HOXA7*的干扰序列: 5'-TCG CCC ACA CGC TCT GTT T-3', 定向克隆入plent-U6-GFP载体即生成plent-U6-GFP/si-*HOXA7*, 并以空载体plent-U6-GFP(NC)为对照。

1.2.2 细胞转染 转染前1 d用RPMI-1640培养基将待转染细胞Siha、Caski稀释至 $2 \times 10^5$ /mL, 用移液器转移到24孔板, 显微镜下观察细胞密度约70%时进行转染。具体操作如下: 将2  $\mu$ L脂质体2000溶于48  $\mu$ L无血清培养基中, 混匀, 室温温育5 min; 将1  $\mu$ g重组质粒plent-U6-GFP/si-*HOXA7*和1  $\mu$ g对照质粒plent-U6-GFP(NC)分别溶于49  $\mu$ L无血清培养基中, 混匀, 室温温育5 min; 接着将上述两类溶液轻轻混匀形成转染混合液, 室温温育20 min。将转染混合液加入准备好的Siha、Caski细胞中进行转染, 37  $^{\circ}$ C环境中转染4~6 h后, 弃去上清, 加入完全培养基, 继续培养48 h后, 加入到含400 ng/mL嘌呤霉素(puromycin)完全培养基的6孔板中, 筛选阳性克隆。

1.2.3 RT-PCR鉴定干扰效果 按Trizol试剂盒说明书分别抽提实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC的总RNA并测浓度。取总RNA 2  $\mu$ g, 总RNA放置于无RNase的PCR管, 加1  $\mu$ L oligo(dt)<sub>18</sub>引物, 加无RNase的去离子水, 调整反应体积为12  $\mu$ L, 70  $^{\circ}$ C反应5 min; 依次

加入4  $\mu$ L 5 $\times$ 反应缓冲液、1  $\mu$ L核糖核酸酶抑制因子、2  $\mu$ L dNTP mix、1  $\mu$ L RevertAid TMM-MuLV reverse transcriptase, 42  $^{\circ}$ C 60 min, 70  $^{\circ}$ C 10 min, 反应终止后立即进行PCR。PCR反应体系: 2  $\mu$ L Primer Mix、1  $\mu$ L cDNA、10  $\mu$ L PCR mix、7  $\mu$ L双蒸水。PCR条件为: 95  $^{\circ}$ C 1 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 90 s, 循环30次; 70  $^{\circ}$ C 10 min。其中, 人HOXA7引物序列如下所示。正向: 5'-CTT ATA CAA TGT CAA CAG CC-3', 反向: 5'-TCC TTA TGC TCT TTC TTC C-3', 扩增产物为414 bp。GAPDH引物序列如下所示。正向: 5'-AAT CCC ATC A CC ATC TTC CA-3', 反向: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3', 扩增产物为580 bp。

**1.2.4 Western blot鉴定干扰效果** 裂解细胞提实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC的蛋白质后按BCA法测蛋白质浓度。将蛋白质样品进行10% SDS-PAGE分离, 转PVDF膜, 含5%的脱脂奶粉的PBS封闭膜, 4  $^{\circ}$ C过夜。加鼠抗人HOXA7一抗(1:400稀释), 于摇床上室, 室温温育2 h。加入二抗(1:3 000稀释)室温温育1 h, 显影、定影后, 将其结果扫描并分析结果。

**1.2.5 MTT法测定细胞生长曲线** 分别将实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC浓度调整为 $5\times 10^3$ /mL, 接种于96孔板。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养过夜, 然后每孔加入MTT试剂(终浓度为5 g/L)20  $\mu$ L, 再继续培养4 h, 每孔加200  $\mu$ L DMSO, 振荡10 min, 酶标仪检测D<sub>490</sub>值, 每组设6个复孔, 实验连续6 d, 实验重复3次。然后以D值为纵坐标, 时间为横坐标绘制细胞生长曲线, 比较实验组与对照组细胞的生长速度。

**1.2.6 细胞倍增时间测定** 实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC, 分别按1 000/孔的标准接种24孔板。培养24 h后, 分别收集每组细胞并计数。每组均设4个平行孔, 连续5 d, 实验重复3次。计算每组细胞的平均倍增时间。倍增时间按如下公式计算:  $T_D=t[\lg 2/(\lg N_t-\lg N_0)]$ ( $T_D$ 为细胞倍增时间,  $t$ 为培养时间,  $N_0$ 、 $N_t$ 分别代表接种后及培养 $t$ 后的细胞数)。

**1.2.7 平板克隆形成能力测定** 实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC, 1 000个细胞每孔接种到6孔板中。培养2~3周后, 用甲醇固定15 min, 然后用结晶紫染色15 min。每次将细胞数大于50个的计数作为1个细胞克隆。

分别计算每组细胞的克隆形成率, 每个浓度组细胞均设3个平行样进行实验, 重复3次, 计算平均克隆形成数。

**1.2.8 细胞周期的测定** 取对数生长期的实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC, 无血清培养基培养6 h, 胰蛋白酶消化处理后分别加入EP管中, 离心收集各组细胞, 加入预冷的70%乙醇, 4  $^{\circ}$ C固定过夜, PI染色30 min, 用流式细胞术分析细胞周期。

**1.2.9 统计学处理** 各组实验数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )来表示, 用SPSS 13.0统计学软件来进行数据分析处理。多组间比较采用方差分析和 $q$ 检验,  $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

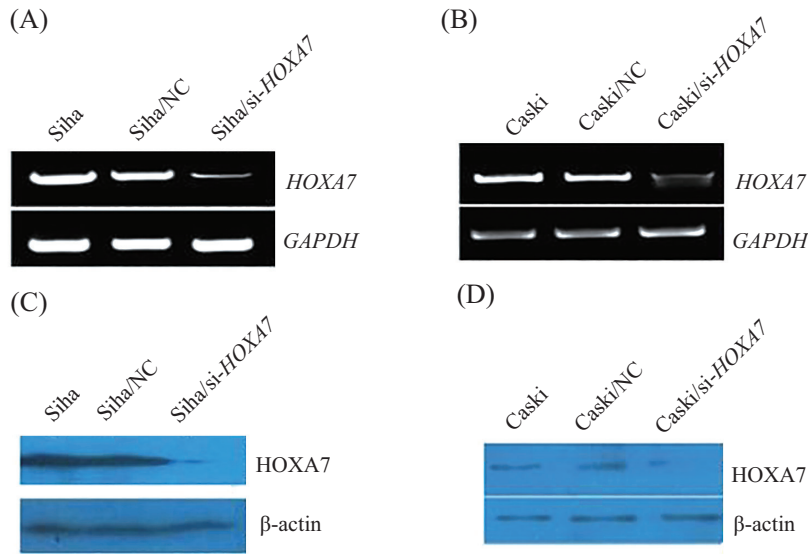
### 2.1 敲低HOXA7基因宫颈癌细胞系的构建

将重组质粒plent-U6-GFP/si-HOXA7和对照质粒plent-U6-GFP用脂质体转染Siha、Caski细胞, 经400 ng/mL嘌呤霉素筛选约2周。采用RT-PCR分别检测Siha/plent-U6-GFP/si-HOXA7、Caski/plent-U6-GFP/si-HOXA7和Siha/plent-U6-GFP、Caski/plent-U6-GFP细胞中的HOXA7 mRNA表达水平。结果显示, Siha/plent-U6-GFP/si-HOXA7、Caski/plent-U6-GFP/si-HOXA7(Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7)细胞中未检测到HOXA7 mRNA的表达, 而Siha/plent-U6-GFP、Caski/plent-U6-GFP(Siha/NC、Caski/NC)细胞的HOXA7 mRNA水平变化不明显(图1A和图1B)。进一步采用Western blot实验分别检测Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和Siha/NC、Caski/NC细胞中HOXA7蛋白质水平, 结果显示, Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7细胞中未检测到HOXA7蛋白质(图1C和图1D), 这一结果与RT-PCR检测结果相一致。这说明, 成功建立Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7细胞系, 可以用于后续实验。

### 2.2 HOXA7对宫颈癌细胞增殖的影响

为了研究HOXA7对宫颈癌细胞体外增殖能力的影响, 敲低HOXA7后, 取实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC来进行MTT实验。实验结果显示, 实验组细胞Siha/si-HOXA7、Caski/si-HOXA7相对于对照组细胞Siha/NC、Caski/NC, 从第3 d开始, 生长速度出



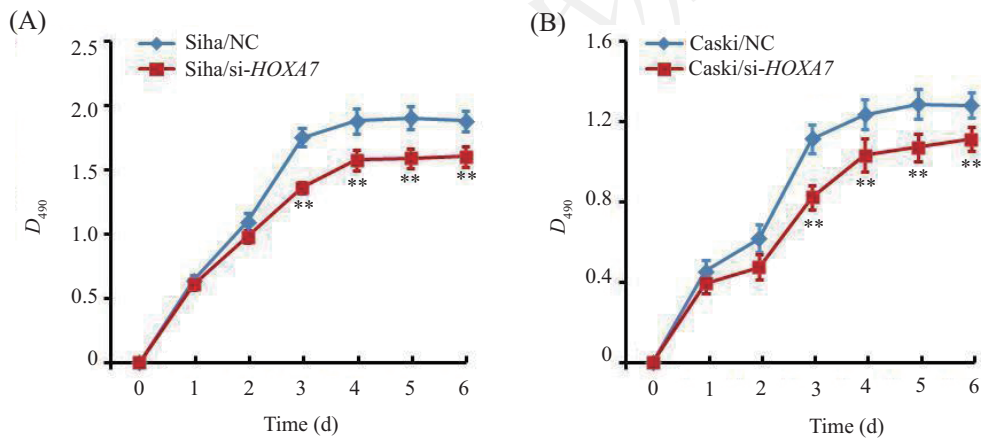


A、B: RT-PCR鉴定干扰效果; C、D: Western blot鉴定干扰效果。

A,B: RT-PCR confirmed the knockdown effect on *HOXA7* expression; C,D: Western blot confirmed the knockdown effect on *HOXA7* expression.

图1 干扰效果检测结果

Fig.1 The results of knockdown effect test



A: *HOXA7*敲低组和对照组Siha细胞的MTT生长曲线, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组(Siha/NC)比较; B: *HOXA7*敲低组和对照组Caski细胞的MTT生长曲线, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组(Caski/NC)比较。

A: MTT assay of Siha with or without *HOXA7* knockdown, \*\* $P < 0.01$  vs Siha/NC group; B: MTT assay of Caski with or without *HOXA7* knockdown, \*\* $P < 0.01$  vs Caski/NC group.

图2 MTT检测细胞生长曲线

Fig.2 The curve of cell growth tested by MTT

现了明显下降( $P < 0.01$ , 图2)。

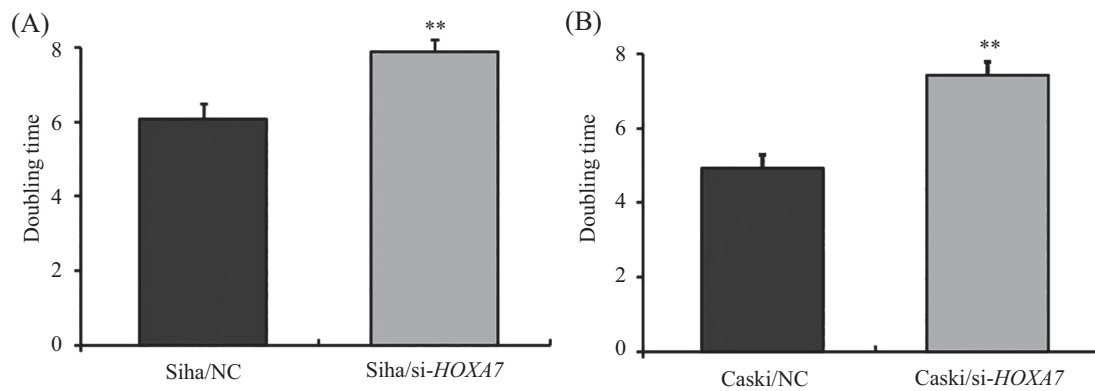
### 2.3 *HOXA7*对宫颈癌细胞倍增时间的影响

为进一步研究*HOXA7*对宫颈癌细胞体外增殖能力的影响, 敲低*HOXA7*后, 取实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*和对照组细胞 Siha/NC、Caski/NC培养后检测分析 Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*、Siha/NC、Caski/NC细胞的平均倍增时间。结果显示, Siha/NC、Siha/si-*HOXA7*、Caski/NC、Caski/si-*HOXA7*细胞细胞倍增时间分别

为 $5.652 \pm 0.352$  h、 $7.342 \pm 0.331$  h、 $4.650 \pm 0.340$  h和 $6.987 \pm 0.330$  h, 与对照组细胞Siha/NC、Caski/NC相比, 实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*平均倍增时间明显延长( $P < 0.01$ , 图3A和图3B)。

### 2.4 *HOXA7*对宫颈癌细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验可反映细胞群体依赖性和增殖能力。为进一步研究*HOXA7*对宫颈癌细胞体外增殖能力和细胞群体依赖性的影响, 敲低*HOXA7*后, 取实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*和对



A: *HOXA7*敲低组和对照组Siha细胞的平均倍增时间,  $**P<0.01$ , 与对照组(Siha/NC)比较; B: *HOXA7*敲低组和对照组Caski细胞的平均倍增时间,  $**P<0.01$ , 与对照组(Caski/NC)比较。

A: the cells doubling time of Siha with or without *HOXA7* knockdown,  $**P<0.01$  vs Siha/NC group; B: the cells doubling time of Caski with or without *HOXA7* knockdown,  $**P<0.01$  vs Caski/NC group.

图3 细胞倍增时间的检测

Fig.3 The results of cell doubling time test

对照组细胞Siha/NC、Caski/NC培养, 检测分析Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*、Siha/NC、Caski/NC细胞的平板克隆形成能力。结果显示, Siha/NC、Siha/si-*HOXA7*、Caski/NC、Caski/si-*HOXA7*细胞克隆形成率分别为 $35.400\% \pm 1.429\%$ 、 $24.200\% \pm 1.098\%$ 、 $31.700\% \pm 1.943\%$ 和 $21.200\% \pm 1.838\%$ 。分别与对照组细胞Siha/NC、Caski/NC相比, 实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*的克隆形成能力明显减弱( $P<0.01$ , 图4A~图4D)。

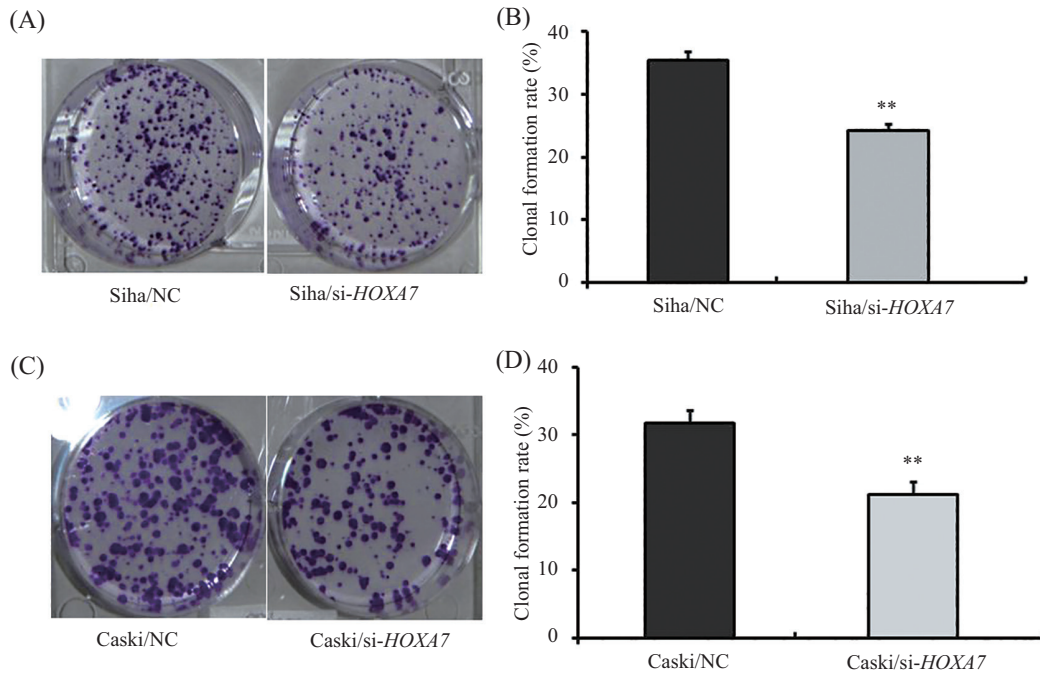
### 2.5 *HOXA7*对宫颈癌细胞细胞周期的影响

MTT实验显示, *HOXA7*可以促进宫颈癌细胞体外增殖。敲低*HOXA7*后, 细胞倍增时间缩短, 且克隆形成能力减弱。为进一步研究*HOXA7*对宫颈癌细胞周期的影响, 取实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*和对照组细胞Siha/NC、Caski/NC进行细胞周期检测。流式细胞术结果表明, 实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7*与对照组细胞Siha/NC、Caski/NC相比, 实验组细胞Siha/si-*HOXA7*、Caski/si-*HOXA7* G<sub>1</sub>期细胞增多, S期细胞减少(图5A~图5D)。

## 3 讨论

*HOX*基因是一个包含转录因子的家族的家族, 最初是由于它们在早期发育中的关键作用而被识别出来的<sup>[8]</sup>。大量的研究表明, 在某些器官中, *HOX*基因具有肿瘤抑制或肿瘤促进作用。据报道, 一些*HOX*基因在胃肠肿瘤都有其特定的作用, 例如食

管鳞状细胞癌表达*HOXA13*, 胃和结肠直肠癌表达*HOXB7*, *HOXD10*在大肠癌中表达上调而在胃癌中表达下降<sup>[9]</sup>。研究发现, *HOXA7*可促进肝癌患者的细胞转移, 在肝癌患者特别是肝转移癌患者中*HOXA7*表达增加。*HOXA7*较高的表达水平与肝癌患者预后较差相关, 过度表达*HOXA7*明显增强了肝癌细胞的体外增殖、迁移、侵袭和转移能力, 敲低*HOXA7*后显著抑制了肝癌细胞的上述能力<sup>[10]</sup>。此外, *HOXA7*在卵巢癌中也异常表达, 尤其是表现出müllerian管样分化的卵巢癌细胞<sup>[11]</sup>。但是, 关于*HOXA7*基因在宫颈癌进展中的作用至今仍不清楚。因此, 本文着重研究了敲低*HOXA7*基因的表达后, 宫颈癌细胞株Siha、Caski生物学表型的改变。结果表明, 敲低*HOXA7*后可较明显抑制宫颈癌细胞株Siha、Caski增殖能力, 其中Siha、Caski细胞株在第2 d时即呈现增殖抑制效应。平板克隆形成实验反映了肿瘤细胞的恶性程度。研究发现, 当沉默*HOXA7*后, Siha、Caski细胞株生长结果均受到了明显抑制, 这表明当*HOXA7*基因在宫颈癌细胞的表达下调后, 细胞的生物学表型随之发生系列变化。现已证实, *HOX*基因的异常表达可引起肿瘤细胞的恶性表型。Zhang等<sup>[12]</sup>研究发现, *HOXA1*过表达可增强乳腺癌细胞的增殖能力。在胃癌中, *HOXA13*对肿瘤发生的作用和侵袭性生物行为的贡献可能与肿瘤转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )的下调以及与Smad3对抗的转录因子3的下游目标有关<sup>[13]</sup>。*HOXB7*基因过表达, 卵巢上皮细胞增殖能力明显增强<sup>[14]</sup>, 但*HOXB7*、

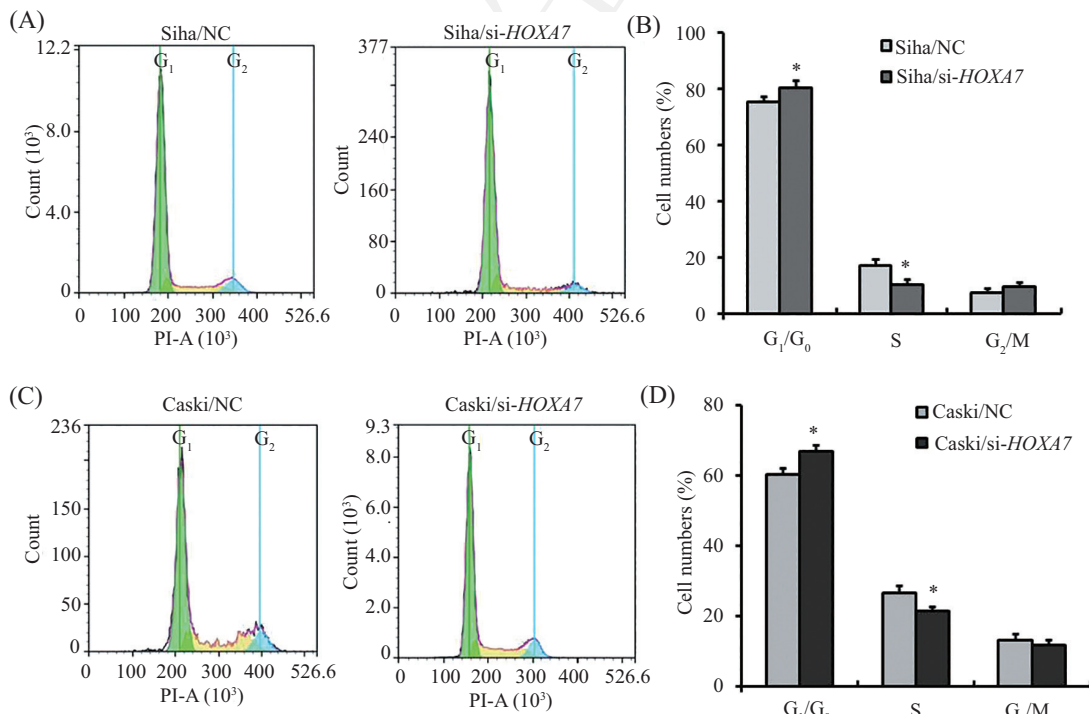


A、B: *HOXA7*敲低组和对照组Siha细胞的克隆形成实验结果, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组(Siha/NC)比较; C、D: *HOXA7*敲低组和对照组Caski细胞的克隆形成实验结果, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组(Caski/NC)比较。

A,B: Clonal formation assay of Siha with or without *HOXA7* knockdown, \*\* $P < 0.01$  vs Siha/NC group; C,D: clonal formation assay of Caski with or without *HOXA7* knockdown, \*\* $P < 0.01$  vs Caski/NC group.

图4 克隆形成实验检测结果

Fig.4 The results of clonal formation experiment test



A、B: *HOXA7*敲低组和对照组Siha细胞的细胞周期检测, \* $P < 0.05$ , 与对照组(Siha/NC)比较; C、D: *HOXA7*敲低组和对照组Caski细胞的细胞周期检测, \* $P < 0.05$ , 与对照组(Caski/NC)比较。

A,B: cells cycle of Siha with or without *HOXA7* knockdown, \* $P < 0.01$  vs Siha/NC group; C,D: cells cycle of Caski with or without *HOXA7* knockdown, \* $P < 0.05$  vs Caski/NC group.

图5 细胞周期检测结果

Fig.5 The results of cells cycle experiment test

*HOXB13*过表达可引起卵巢癌细胞SKOV-3侵袭和转移能力受到抑制<sup>[15]</sup>。

Miyazaki等<sup>[16]</sup>和Ohta等<sup>[17]</sup>研究发现, *HOXD3*基因过表达后, 通过激活整合蛋白 $\alpha v\beta 3$ 和TGF- $\beta$ 信号通路促进肺癌细胞的侵袭和转移能力TGF- $\beta$ 。Li等<sup>[18]</sup>研究发现, 下调*HOXA7*基因的表达可引起肝癌细胞HepG2、QGY-7703增殖减慢, 并显著降低cyclin E1和CDK2蛋白质水平。相反, *HOXA7*基因达表达后, 正常肝细胞QSG-7701增殖加快, cyclin E1和CDK2蛋白上调。这说明, *HOXA7*可促进细胞增殖, 且该变化由cyclin E1和CDK2所介导。本研究显示, 当*HOXA7*基因被敲低后, 宫颈癌Siha、Caski细胞周期中G<sub>1</sub>期细胞增多, S期细胞减少。这表明, *HOXA7*的表达可能有细胞周期依赖性特征, 即在S期表达可维持宫颈癌细胞的有丝分裂正常进行, 具体机制有待于进一步探索。

总之, 敲低*HOXA7*基因可较明显的引起细胞周期阻滞, 继而导致细胞增殖能力和恶性程度的降低, 提示*HOXA7*在宫颈癌的进展中起比较重要的作用, 这为进一步阐明*HOXA7*基因对宫颈癌发病机制研究奠定了坚实的基础。

### 参与文献 (References)

- 1 Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013; 382(9895): 889-99.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 3 Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22(20): 5323-35.
- 4 Platais C, Hakami F, Darda L, Lambert DW, Morgan R, Hunter KD. The role of HOX genes in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2016; 45(4): 239-47.
- 5 Rousseau M, Crutchley JL, Miura H, Suderman M, Blanchette M, Dostie J. Hox in motion: tracking HoxA cluster conformation during differentiation. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(3): 1524-40.
- 6 Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10): 777-85.
- 7 Rao MK, Maiti S, Ananthaswamy HN, Wilkinson MF. A highly active homeobox gene promoter regulated by Ets and Sp1 family members in normal granulosa cells and diverse tumor cell types. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 26036-45.
- 8 Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol* 2010; 344(1): 7-15.
- 9 Joo MK, Park JJ, Chun HJ. Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(37): 8247-56.
- 10 Tang B, Qi G, Sun X, Tang F, Yuan S, Wang Z, et al. HOXA7 plays a critical role in metastasis of liver cancer associated with activation of Snail. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 57.
- 11 Naora H, Montz FJ, Chai CY, Roden RB. Aberrant expression of homeobox gene HOXA7 is associated with müllerian-like differentiation of epithelial ovarian tumors and the generation of a specific autologous antibody response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(26): 15209-14.
- 12 Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 7580-90.
- 13 Han Y, Tu WW, Wen YG, Li DP, Qiu GQ, Tang HM, et al. Identification and validation that up-expression of HOXA13 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer based on immunohistochemistry. *Med Oncol* 2013; 30(2): 564.
- 14 Naora H, Yang YQ, Montz FJ, Seidman JD, Kurman RJ, Roden RB. A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 4060-5.
- 15 Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, et al. Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28(4): 931-8.
- 16 Miyazaki YJ, Hamada J, Tada M, Furuuchi K, Takahashi Y, Kondo S, et al. HOXD3 enhances motility and invasiveness through the TGF-beta-dependent and-independent pathways in A549 cells. *Oncogene* 2002; 21(5): 798-808.
- 17 Ohta H, Hamada J, Tada M, Aoyama T, Furuuchi K, Takahashi Y, et al. HOXD3-overexpression increases integrin  $\alpha v\beta 3$  expression and deprives E-cadherin while it enhances cell motility in A549 cells. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23(7/8): 381-90.
- 18 Li Y, Yang XH, Fang SJ, Qin CF, Sun RL, Liu ZY, et al. HOXA7 stimulates human hepatocellular carcinoma proliferation through cyclin E1/CDK2. *Oncol Rep* 2015; 33(2): 990-6.