.实验研究.

下调HOXA5表达对胶质瘤细胞增殖能力和细胞周期的影响

徐修鹏 季 晶 刘 宁 李海林 路 华

【摘要】**目的** 探讨下调同源异型盒基因A5(HOXA5)表达对胶质瘤细胞增殖能力和细胞周期的影响。**方法** 应用生信分析方法,计算机检索CGGA数据库,下载mRNAseq-693和mRNAseq-325芯片数据,获取低级别胶质瘤(WHO分级Ⅱ级)和高级别胶质瘤(WHO分级Ⅲ、Ⅳ级)HOXA5 mRNA表达及病人生存信息;以HOXA5表达水平的平均值为界限,将高级别胶质瘤分为低表达组和高表达组。体外培养人胶质瘤细胞株U87和U251,使用Lipofectamine 2000法将HOXA5 siRNAs和阴性对照siRNAs分别转染U87和U251细胞;CCK-8和平板克隆形成实验评估胶质瘤细胞的增殖能力;流式细胞仪检测细胞周期;免疫印迹法检测蛋白表达水平。**结果** 生信分析结果显示:高级别胶质瘤HOXA5表达水平均显著高于低级别胶质瘤(P<0.01);HOXA5高表达组高级别胶质瘤病人中位生存时间较低表达组明显缩短(P<0.01)。体外细胞实验结果:敲低HOXA5表达,U87和U251细胞的增殖率和克隆集落数量显著降低(P<0.01),U87和U251细胞G0/G1期细胞百分比显著增高(P<0.01),U87和U251细胞CDK4蛋白表达水平显著降低(P<0.01)。**结论** 胶质瘤HOXA5呈高表达,病理级别越高,表达水平越高,病人生存预后越差。敲低HOXA5表达,明显降低CDK4表达,使细胞周期停滞在G0期,明显抑制胶质瘤细胞的增殖。

【关键词】胶质瘤;HOXA5;细胞增殖;细胞周期;CDK4;基因敲减

【文章编号】1009-153X(2021)11-0857-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Effect of HOXA5 knockdown on proliferation and cell cycle of human glioma cells

XU Xiu-peng, JI Jing, LIU Ning, LI Hai-lin, LU Hua. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【**Abstract**】**Objective** To explore the effect of homeobox A5 (HOXA5) knockdown on the proliferation and cell cycle of glioma cells. **Methods** The CGGA database was searched to download the chip data of mRNAseq-693 and mRNAseq-325, including low-grade glioma (WHO grade Ⅱ) and high-grade glioma (WHO grade Ⅲ~Ⅳ) HOXA5 mRNA expression and patient survival data; the high-grade glioma patients were divided into low-expression group and high-expression group according to the average level of HOXA5 expression. Human glioma cell lines U87 and U251 were cultured in vitro, and HOXA5 siRNAs and negative control siRNAs were transfected into U87 and U251 cells by the Lipofectamine 2000 method, respectively. CCK-8 and clone formation assay were used to evaluate the proliferation ability of glioma cells. Flow cytometry assay was used to detect the cell cycle. Western blotting was used to detect protein expression level of CDK4. **Results** The results of bioinformatics analysis showed: the expression level of HOXA5 in high-grade gliomas was significantly higher than that in low-grade gliomas (P<0.01); the median survival time of patients with high-grade gliomas in high-expression group was significantly shorter than that in the low-expression group (P<0.01). In vitro cell cultured experiment results showed: knockdown of HOXA5 significantly reduced the proliferation rate and the number of clone colonies of U87 and U251 cells (P<0.01), significantly increased the percentage of cells in the G0/G1 phase of U87 and U251 cells (P<0.01), significantly reduced the expression level of CDK4 of U87 and U251 cells (P<0.01). **Conclusions** HOXA5 is highly expressed in gliomas. The higher the pathological grade, the higher the expression level of HOXA5, the worse the patient's survival prognosis. Knockdown of HOXA5 significantly reduce the expression of CDK4, arrest the cell cycle in the G0 phase, and significantly inhibit the proliferation of glioma cells.

【**Key words**】Glioma; HOXA5; Cell proliferation; Cell cycle; CDK4; Gene knockdown

胶质瘤是成人中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,具有多种恶性生物学表型,如恶性增殖能力强、易向周边脑组织侵袭和放化疗抵抗等[1]。近年来,尽管胶质瘤的综合治疗取得了一定程度的进展,但病人中位生存期却未明显延长,部分归因于胶质瘤的

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.11.012

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20201077)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院神经(徐修鹏、季 晶、刘 宁、李海林、路 华)

通讯作者:路 华,E-mail:luhua@njmu.edu.cn

恶性增殖能力[2]。因此，探索胶质瘤恶性增殖能力的分子调控机制，有助于开发更有效的治疗措施。

同源框基因家族在进化上高度保守，参与调控胚胎发育和细胞分化[3]。同源异型盒基因A5（homeobox gene A5，HOXA5）是同源框基因家族中的一员，既往研究显示HOXA5在多种恶性肿瘤中异常表达，与肿瘤的多种恶性生物学表型密切相关[4]。本文探讨HOXA5在胶质瘤中的表达及其对胶质瘤增殖能力和细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 生信分析 计算机检索中国胶质瘤基因组图谱（Chinese Glioma Genome Atlas，CGGA；http://www.cgga.org.cn）。从mRNAseq−693和mRNAseq−325芯片中获取HOXA5 mRNA在低级别胶质瘤（WHO分级Ⅱ级）和高级别胶质瘤（WHO分级Ⅲ、Ⅳ级）中的表达及相应的病人生存信息。在高级别胶质瘤中，以HOXA5表达水平的平均值为界限，分为低表达组和高表达组，Kaplan−Meier法分析HOXA5表达水平与高级别胶质瘤病人预后的关系。

1.2 胶质瘤U87、U251细胞培养、转染及分组 U87和U251细胞（中国科学院细胞库）置于含10%胎牛血清DMEM中培养并传代。取对数生长期胶质瘤细胞种植于6孔板中，待细胞汇合度达到75%左右时，参考Lipofectamine2000（美国Invitrogen公司）说明书转染siRNAs。细胞分组两组：阴性对照组（转染siRNA−ctrl）和敲低组（转染siRNA−HOXA5）。36 h后收集细胞，提取总蛋白，验证干扰效率，并用于后续的生物学实验。

1.3 CCK−8法检测细胞增殖率 取对数生长期细胞接种于96孔板中，每孔1 000个细胞。0、1、2、3、4 d，每个孔加入10 μl CCK−8检测液（日本Dojin do公司），37.3 ℃孵育2 h，酶标仪检测450 nm处吸光度值，计算细胞存活率。各组细胞设置5个副孔。

1.4 平板克隆实验检测细胞克隆集落形成能力 将胶质瘤细胞接种于直径6 cm的培养皿中，每个皿接种300个细胞，并加入4 ml培养基充分混匀，放入37.3 ℃恒温培养箱中培养12 d，弃培养液，4%多聚甲醛固定2 h后用结晶紫染色。回收结晶紫染液，用清水冲洗后晾干、拍照、计数克隆数量，每组重复三次。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期 将胶质瘤细胞接种于6孔板中，每孔约40 000个细胞，培养36 h后，每孔加入1 ml不含EDTA的胰酶溶液消化细胞，至显微镜下细胞变圆，轻震板底约半数细胞飘起时加入2 ml完全培养基终止消化，移液枪将细胞吹打成细胞悬液。离心后获得细胞沉淀，用PBS洗涤一次后再次离心，弃洗涤液，加入−20 ℃冰箱预冷的75%酒精吹打混匀，固定。按照细胞周期检测试剂盒（中国联科生物公司）操作步骤，上机完成细胞周期检测，每组重复三次。

1.6 免疫印迹法检测细胞HOXA5及周期相关蛋白的表达 根据凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取细胞蛋白和组织蛋白，选用凯基BCA试剂盒测定蛋白浓度，并用上样缓冲液配平。蛋白变性后，按每孔20 μl上样，经10% SDS−PAGE电泳后转移至PVDF膜上，含5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭2 h，加入相应一抗，4 ℃摇床孵育过夜，TBST洗涤3次后，加入二抗，室温摇床孵育2 h，洗涤3次后，加入曝光液曝光，拷贝条带，以β−actin为内参，Image J软件行灰度分析。

1.7 统计学分析 采用GraphPad软件进行分析；定量资料采用$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析和t检验；P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胶质瘤HOXA5的表达 CGGA数据库分析结果显示：与低级别胶质瘤相比，高级别胶质瘤HOXA5 mRNA表达水平显著增高（P<0.01，图1）。

2.2 HOXA5表达水平与高级别胶质预后的关系 生存分析结果显示：低表达组高级别胶质瘤病人中位生存时间较高表达组明显延长（P<0.01，图2）。

2.3 敲低HOXA5表达对胶质瘤细胞增殖能力的影响 siRNA−HOXA5组细胞HOXA5蛋白表达水平显著低于siRNA−ctrl组（P<0.01，图3）。与siRNA−ctrl组相比，siRNA−HOXA5组细胞增殖率和克隆形成能力均显著降低（P<0.01，图3）。

2.4 敲低HOXA5表达对细胞周期及细胞周期相关蛋白表达的影响 流式细胞周期检测结果显示：siRNA−HOXA5组细胞G0/G1期细胞百分比较siRNA−ctrl组显著增加（P<0.01，图4）；而且，siRNA−HOXA5组细胞CDK4表达水平较siRNA−ctrl组显著减少（P<0.01，图4）。

3 讨 论

本研究结果显示：胶质瘤HOXA5呈高表达；HOXA5高表达组高级别胶质瘤病人生存预后较低表达组要差。这表明，HOXA5在胶质瘤中可能发挥促癌作用，并有可能成为胶质瘤潜在的诊断标记物

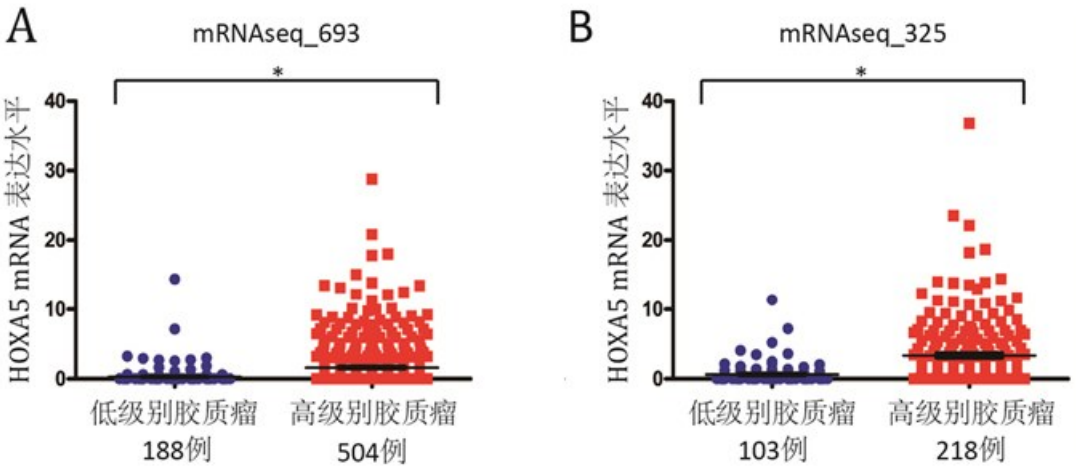

图1 不同病理级别胶质瘤HOXA5表达水平比较

与低级别胶质瘤比，* P<0.01

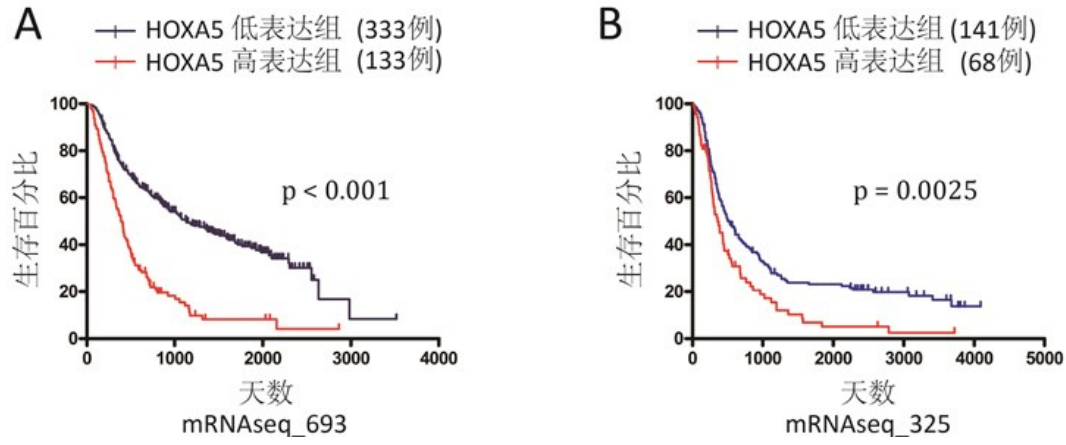

图2 生存曲线分析HOXA5表达水平与高级别胶质瘤病人生存预后的关系

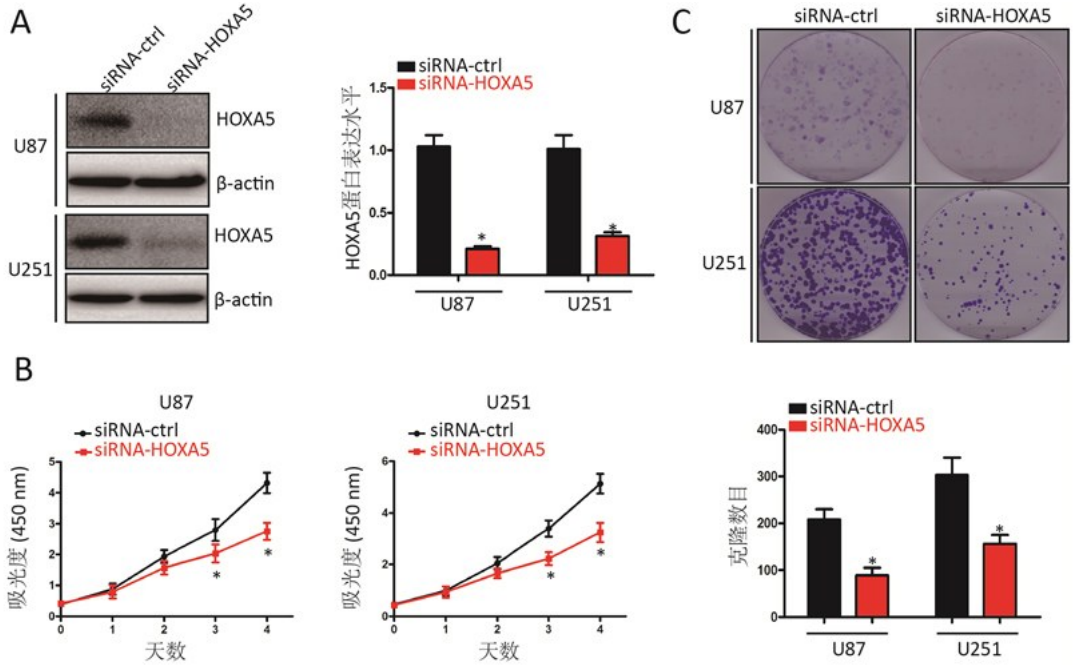

图3 敲低HOXA5表达抑制胶质瘤U87和U251细胞增殖

与siRNA-ctrl组相比，* P<0.01

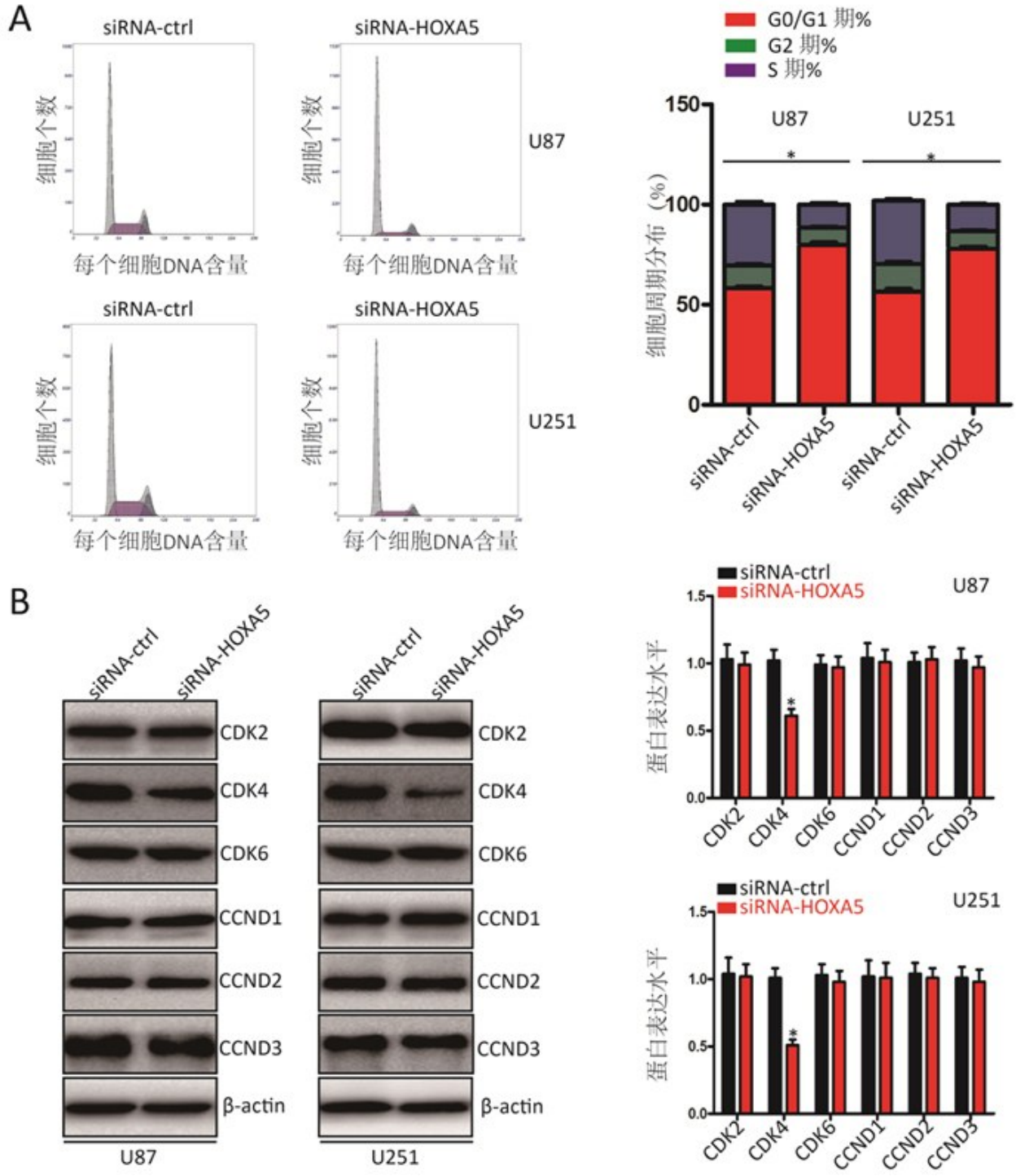

图4 敲低HOXA5表达对胶质瘤U87和U251细胞周期及周期相关蛋白表达的影响
与siRNA-ctrl组相比，* P<0.01

和治疗靶点。

既往研究表明，HOXA5的异常表达与多种肿瘤的发生与发展密切相关，例如，乳腺癌HOXA5表达缺失促进乳腺癌的发生与发展[5-7]。进一步机制研究表明，乳腺癌HOXA5基因表达缺失与其启动子高度甲基化有关[8]。这些研究表明HOXA5在乳腺癌中发挥抑癌基因作用。与之相反的是，HOXA5在食管癌组织中高表达，并且高表达的HOXA5可以通过激活wnt/β-catenin信号通路促进食管癌细胞的上皮间质亚型转换[9]。这些研究结果表明，HOXA5在食管癌中发挥促癌的作用。为了探讨HOXA5对胶质瘤增殖能力的影响，我们使用siRNA敲低胶质瘤细胞

HOXA5的表达水平，结果显示，敲低HOXA5表达可以显著降低胶质瘤细胞体外增殖能力。

细胞周期是调控细胞增殖的基础生命进程，这一进程主要受细胞周期相关蛋白调控[10]。本研究结果显示，敲低胶质瘤细胞HOXA5的表达，明显降低CDK4表达水平，使胶质瘤细胞周期阻滞于G0/G1期。近期有文献报道，HOXA5可以通过激活wnt/β-catenin信号通路促进肿瘤细胞的恶性生物学表型，包括细胞增殖和细胞周期[9]。但是，HOXA5是否可以通过影响活wnt/β-catenin信号通路进而影响胶质瘤细胞增殖和细胞周期，有待进一步研究。

目前，引起胶质瘤HOXA5表达水平升高的机制尚不明确。已有研究表明，microRNA介导的转录后调控机制在调节HOXA5表达中发挥重要作用。例如，microRNA-196a可以通过抑制肺癌HOXA5表达，进而促进肺癌细胞增殖与侵袭[11]。另有文献报道，乳腺癌中视黄酸可以通过泛素化降解c-myc，从而抑制microRNA-130a的表达，进而促进HOXA5的表达[12]。但是，胶质瘤HOXA5高表达是否是由相关microRNA表达异常引起，还需要进一步的验证。另外，有研究表明，HOXA5基因启动子区甲基化与胃癌HOXA5低表达有关[13]。因此，我们推测，胶质瘤高表达的HOXA5可能与其启动子区低甲基化水平有关。

综上所述，靶向抑制胶质瘤HOXA5的表达可以显著降低胶质瘤细胞体外增殖能力，抑制CDK4蛋白的表达，抑制细胞周期从G0/G1期向G2/S期转换。这提示HOXA5在胶质瘤中发挥促进肿瘤增殖和细胞周期的作用，并有望成为胶质瘤分子靶向治疗的新靶点。

【参考文献】

[1] Sampetrean O, Saya H. Modeling phenotypes of malignant gliomas [J]. Cancer Sci, 2018, 109: 6-14

[2] Wang Y, Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management [J]. Cancer Lett, 2013, 331: 139-146.

[3] Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. Role of HOX genes in stem cell differentiation and cancer [J]. Stem Cells Int, 2018,7(22): 1-15.

[4] Jeannotte L, Gotti F, Landry-Truchon K. Hoxa5: a key player in development and disease [J]. J Dev Biol, 2016, 4(2): 1-18.

[5] 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: 5539-5551.

[6] 曾 郁，杨文涛，张瑰红，等. 乳腺癌中同源异型盒基因（HOX）A5表达的研究[J]. 中华病理学杂志，2005，34：569-574.

[7] 张立美，战 军，张宏权，等. 转录因子HOXA5在乳腺癌细胞中的下游信号通路[J]. 解剖学报，2015，46：634-640.

[8] Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J, *et al*. Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients [J]. Life Sci, 2008, 82: 1288-1292.

[9] Zhang H, Zhao JH, Suo ZM. Knockdown of HOXA5 inhibits the tumorigenesis in esophageal squamous cell cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86: 149-154.

[10] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9: 153-166.

[11] Liu XH, Lu KH, Wang KM, *et al*. MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5 [J]. BMC Cancer, 2012, 12(8): 348-359.

[12] Yang F, Miao L, Mei Y, *et al*. Retinoic acid- induced HOXA5 expression is co-regulated by HuR and miR-130a [J]. Cell Signal, 2013, 25: 1476-1485.

[13] 房志学，黄忠诚. 胃癌组织中HOXA5和HOXA10基因启动子甲基化状况及其临床意义[J]. 医学临床研究，2016，33：2321-2325.

（2021-08-08收稿，2021-09-15修回）