

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.003

## 转录因子HOXC13通过上调PCNA表达促进喉鳞状细胞癌AMC-HN-8细胞的恶性生物学行为

兰利利<sup>1</sup>, 牛云峰<sup>2</sup>, 胡国斌<sup>1</sup>, 刘猛<sup>1</sup>, 徐玉茹<sup>1</sup>, 王晶田<sup>1</sup> (1. 河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 石家庄 050011; 2. 联勤保障部队第九八〇医院 病理科, 河北 石家庄 050082)

**[摘要]** **目的:** 本研究旨在探讨转录因子HOXC13在喉鳞状细胞癌(LSCC)中的表达、功能及可能的调控机制。**方法:** 常规培养LSCC细胞, 将其分为sh-NC组、sh-HOXC13组、pcDNA3.1-NC组、pcDNA3.1-HOXC13组、pcDNA3.1-PCNA组和sh-HOXC13+pcDNA3.1-PCNA组, 用转染试剂将相应核酸和质粒转染各组细胞。用数据库数据分析HOXC13 mRNA在LSCC组织中的表达; 收集2019年1月至2022年12月在联勤保障部队第九八〇医院耳鼻咽喉头颈外科手术切除的62对LSCC组织及配对的癌旁组织, 免疫组织化学法检测中国人LSCC组织中HOXC13蛋白的表达, qPCR检测中国人LSCC组织、癌旁组织以及各组细胞中HOXC13和PCNA mRNA的表达, MTS法检测各组AMC-HN-8细胞的增殖能力, 平板克隆实验检测各组AMC-HN-8细胞的克隆形成能力, Transwell小室实验检测各组AMC-HN-8细胞的迁移和侵袭能力, 双萤光素酶报告基因实验和染色质免疫沉淀技术(ChIP)验证HOXC13与PCNA之间的结合关系。**结果:** HOXC13和PCNA在LSCC组织和细胞中均呈高表达( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )且两者的表达水平呈正相关( $P<0.01$ ), HOXC13的表达水平与TNM分期有明显关联( $P<0.01$ )。敲减HOXC13可明显抑制AMC-HN-8细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.01$ ), 过表达HOXC13则促进TU686细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.01$ )。HOXC13可与PCNA启动子区结合并调控其转录。敲低PCNA可部分逆转HOXC13对AMC-HN-8细胞的恶性生物学行为的促进作用(均 $P<0.01$ )。**结论:** HOXC13通过上调PCNA促进LSCC细胞的恶性生物学行为, HOXC13是LSCC临床诊断和治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 转录因子; HOXC13; 喉鳞状细胞癌; AMC-HN-8细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; PCNA

**[中图分类号]** R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)06-0558-08

## Transcription factor HOXC13 promotes malignant biological behaviors of laryngeal squamous cell carcinoma by upregulating PCNA expression

LAN Lili<sup>1</sup>, NIU Yunfeng<sup>2</sup>, HU Guobin<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, XU Yuru<sup>1</sup>, WANG Jingtian<sup>1</sup> (1. Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, No.4 Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Pathology, the 980th Hospital of the Joint Logistics Support Force, Shijiazhuang 050082, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression, function and possible regulatory mechanisms of transcription factor HOXC13 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods:** LSCC cells were routinely cultured and divided into sh-NC group, sh-HOXC13 group, pcDNA3.1-NC group, pcDNA3.1-HOXC13 group, pcDNA3.1-PCNA group, and sh-HOXC13+pcDNA3.1-PCNA group, and the corresponding nucleic acids and plasmids were transfected into each group of cells with transfection reagents. GEO Database data were used to analyze the expression of HOXC13 mRNA in LSCC tissues. Sixty-two pairs of LSCC tissues and paired adjacent tissues that were surgically removed in the 980th Hospital of the Joint Logistics Support Force between January 2019 and December 2022 were collected. The expression of HOXC13 protein in Chinese LSCC tissues were detected by immunohistochemistry. The expressions of HOXC13 and PCNA mRNA in Chinese LSCC tissues, adjacent non-cancerous tissues, and various cell lines were detected by qPCR. The proliferation ability of AMC-HN-8 cells in different groups was detected by the MTS method. Plate cloning assay was used to detect the clone formation ability of transfected AMC-HN-8 cells in each group. The migration and invasion abilities of AMC-HN-8 cells in each group were determined by transwell chamber experiments. The binding relationship between HOXC13 and PCNA was verified by dual luciferase reporter gene assays and chromatin immunoprecipitation (ChIP) techniques. **Results:** HOXC13 and PCNA were highly expressed in LSCC tissues and cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Their expression levels were positively correlated ( $P<0.01$ ), and the expression level of HOXC13 was significantly correlated with TNM stage ( $P<0.01$ ). Knockdown of HOXC13 significantly

**[基金项目]** 河北省卫生健康委医学科学研究课题计划(No. 20230907)

**[作者简介]** 兰利利(1983—), 博士, 主治医师, 主要从事头颈部肿瘤的研究。E-mail: lanlili\_ebh@163.com

**[通信作者]** 牛云峰, E-mail: niuyunfeng0426@163.com

inhibited the proliferation, migration and invasion abilities of AMC-HN-8 cells (all  $P < 0.01$ ), and overexpression of HOXC13 promoted the proliferation, migration and invasion abilities of TU686 cancer cells (all  $P < 0.01$ ). HOXC13 could bind to the promoter region of PCNA and regulate its transcription. Knockdown of PCNA partially reversed the promotion of HOXC13 on the malignant biological behaviors of AMC-HN-8 cells (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** HOXC13 promotes the malignant biological behaviors of LSCC cells by up-regulating PCNA. HOXC13 is a potential target for clinical diagnosis and treatment of LSCC.

**[Key words]** transcription factor; HOXC13; laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC); AMC-HN-8 cell; proliferation; invasion; migration; PCNA

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(6): 558-565. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.003]

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,发病率和病死率都在逐年上升,给患者和医疗体系造成巨大的压力<sup>[1-2]</sup>。由于其恶性程度较高,LSCC的治疗效果往往不理想,患者的生存期较短<sup>[3]</sup>。因此需要更加深入地研究和探索LSCC的发病机制和治疗方法,以便更好地预防和治疗。近年来的研究<sup>[4-5]</sup>发现,癌症的发生发展是一个多步骤的过程,转录因子在其中扮演着重要的角色,可以调控细胞的增殖、存活、代谢、侵袭和迁移等过程。通过对GEO数据库的深入分析发现,同源盒蛋白C13(homeobox C13, HOXC13)在LSCC组织中呈高表达,推测HOXC13是一个潜在的癌基因,其表达失调可能会引起癌症的发生发展。HOXC13作为HOX基因家族的重要成员,已被证实具有转录因子的功能,并在多种肿瘤的发生发展中起关键作用<sup>[6]</sup>。然而,HOXC13在LSCC中的具体作用机制与功能还不甚清楚,亟待深入研究。本研究旨在通过一系列体外实验探究HOXC13在LSCC组织中的表达模式、生物学功能以及调控机制,为这一领域的学术研究提供新实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂与组织标本

人LSCC AMC-HN-8、TU177和TU686细胞均由河北医科大学耳鼻咽喉头颈外科生物样本库提供。TRIzol试剂购自北京索莱宝公司,HOXC13、GAPDH及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)引物购自北京天根生物有限公司。兔抗HOXC13抗体,HRP标记的山羊抗兔单克隆抗体购自英国Abcam公司,sh-HOXC13-1~4、sh-PCNA及相应阴性对照sh-NC,过表达质粒(pcDNA3.1-PCNA、pcDNA3.1-HOXC13及pcDNA3.1-NC)均购自GenePharma公司(中国上海),pGL3-PCNA(-942/+30),pGL3-PCNA(-919/+30)萤光素酶报告基因载体购自南京金斯瑞公司,Lipofectamine2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,MTS溶液购自美国Promega公司,Transwell小室培养板购自美国Corning公司。

收集2019年1月至2022年12月在联勤保障部队第九八〇医院耳鼻咽喉头颈外科手术切除的62对

LSCC组织及配对的癌旁组织。所有患者及家属都充分知情并签署了知情同意书,本实验方案已获得联勤保障部队第九八〇医院伦理委员会的批准(批准文号:2023-KY-130)。

### 1.2 细胞培养、转染及分组

将AMC-HN-8细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,TU177和TU686置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。按说明书步骤,用Lipofectamine2000转染试剂将各质粒转染到喉癌细胞中。sh-NC和sh-HOXC13-1~4质粒转染至AMC-HN-8细胞中,分别标记为对照组(sh-NC组)及敲低组(sh-HOXC13-1~4组);pcDNA3.1-NC和pcDNA3.1-HOXC13质粒转染至TU686细胞中,分别标记为对照组(pcDNA3.1-NC组)及过表达组(pcDNA3.1-HOXC13组);sh-NC、sh-HOXC13和pcDNA3.1-PCNA质粒转染至AMC-HN-8细胞中,分别记为对照组(sh-NC组),HOXC13敲低组(sh-HOXC13组),PCNA过表达组(pcDNA3.1-PCNA组)及共转染组(sh-HOXC13+pcDNA3.1-PCNA组)。

### 1.3 用数据库数据分析HOXC13 mRNA在LSCC组织中的表达

在GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中,系统地搜索并下载LSCC的基因芯片数据,最终选定GSE84957作为研究对象。为准确找出LSCC组织和癌旁组织之间表达差异的mRNA,采用表达差异倍数大于2且P值小于0.01作为筛选标准,以确保分析结果的严谨性和可靠性。用GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)数据库检索HOXC13在人LSCC组织中的表达。

### 1.4 免疫组织化学法检测中国人LSCC组织中HOXC13蛋白的表达

将LSCC组织和癌旁组织进行常规的固定、脱水、透明、包埋、切片,然后进行脱蜡复水和抗原修复,用10%牛血清于室温下处理30 min后加入HOXC13一抗(1:150),4℃下处理过夜,PBS冲洗,加入HRP标记山羊抗兔单克隆抗体(1:1000)于室温下处理1 h,DAB染色液显色、苏木精复染和封片,在显微镜下观察、拍照。为量化HOXC13在肿瘤细胞

中的表达水平,使用 Image J 软件计算阳性细胞百分比,并据此制定评分系统。当阳性细胞比例低于 10% 时评分为 0, 10%~<20% 时评为 1 分, 20%~<50% 时评为 2 分, ≥50% 时评为 3 分。通过染色强度评分来评估 HOXC13 的表达强度,无染色为 0 分,浅棕色弱染色为 1 分,棕色中度染色为 2 分,深棕色强染色为 3 分。上述两项评分相加,0~2 分为阴性,3~6 分为阳性。

### 1.5 qPCR 检测中国人 LSCC 组织、癌旁组织以及各组 LSCC 细胞中 HOXC13 和 PCNA mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取中国人 LSCC 组织、相应癌旁组织及各组细胞中的总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度,使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 后进行 qPCR 检测,PCR 参数:95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。HOXC13 正向引物为 5'-GCGTGCCCTACTACTAAGGTG-3', 反向引物为 5'-GGCGCTTTCGATTTGCTGAC-3'; PCNA 正向引物为 5'-CAACGGTGACTCAGTAT-3', 反向引物为 5'-TGGCATCTTAGAAGCAGTT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3', 反向引物为 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'。以 GAPDH 作为内参基因,用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算 HOXC13 和 PCNA mRNA 的相对表达量。

### 1.6 MTS 法检测各组 AMC-HN-8 细胞的增殖能力

将转染质粒的各组 AMC-HN-8 以每孔  $10^3$  个/100  $\mu$ L 的密度接种于 96 孔板中。每组设置 5 个复孔。在接种后 0、24、48 和 72 h 加入 20  $\mu$ L MTS 溶液,继续培养 2 h 后,用酶标仪测定各孔在 492 nm 处的光密度(D)值,以 D 值代表细胞的活力,并据此绘制生长曲线。

### 1.7 平板克隆实验检测各组 AMC-HN-8 细胞的克隆形成能力

将转染后的各组 AMC-HN-8 细胞按每个孔  $3 \times 10^3$  个细胞接种于六孔板中,轻轻摇动培养皿以确保细胞均匀分布,在恒温条件下培养 2 周。当肉眼观察到细胞团时即可终止培养,去除细胞培养的上清液,用 PBS 清洗细胞 2 次,去除残余的培养基和未贴壁细胞。使用多聚甲醛固定液固定 15 min, 0.4% 结晶紫染色液染色 15 min,显微镜下观察计数克隆数,以评估细胞的增殖能力。

### 1.8 Transwell 实验检测各组 AMC-HN-8 细胞的迁移和侵袭能力

使用涂有 Matrigel 基质胶的小室测试细胞侵袭能力,不涂 Matrigel 基质胶的小室测试细胞迁移能力。各组 AMC-HN-8 细胞中,取 100  $\mu$ L 细胞悬液(含  $1 \times 10^5$  个细胞)加入上室,下室加入 700  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的培养基,培养 48 h 后,多聚甲醛固定细胞,

棉签擦去上室表面的细胞,结晶紫染色,显微镜观察、计数迁移及侵袭的细胞数。

### 1.9 双荧光素酶报告基因实验和染色质免疫沉淀(chromatin immuno-precipitation, ChIP) 实验验证 HOXC13 与 PCNA 之间的结合关系

JASPAR 和 Human DB 数据库分析发现,PCNA 上游潜在的转录因子有 HOXC13。将 AMC-HN-8 细胞以每孔  $10^4$  个细胞接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔,培养 12 h 后进行转染。用 lipo2000 将 pcDNA3.1-NC、pcDNA3.1-HOXC13、pGL3-PCNA(-942/+30) 和 pGL3-PCNA(-919/+30) 荧光素酶报告基因载体共转染细胞,分别记为 pcDNA3.1-NC+pGL3-PCNA(-919/+30) 组, pcDNA3.1-HOXC13+pGL3-PCNA(-919/+30) 组, pcDNA3.1-NC+pGL3-PCNA(-942/+30) 组和 pcDNA3.1-HOXC13+pGL3-PCNA(-942/+30) 组。培养 48 h 后,加入 100  $\mu$ L 溶解的荧光素酶底物,处理 5 min 后用酶标仪检测荧光素酶的活性。

将对数生长期的 AMC-HN-8 细胞用 4% 多聚甲醛于室温下固定 10 min,超声处理 2 min, 4 °C 下以  $15 \times 947 \times g$  离心 5 min,收集上清液。取出上清液的 10% 作为阳性对照,存放于 -80 °C 以备用。对于 ChIP 实验,将 900  $\mu$ L 稀释缓冲液和 100  $\mu$ L 上清液以及 5  $\mu$ g HOXC13 抗体,抗体 Anti-IgG 作为阴性对照,混合后 4 °C 下处理过夜,每份样品中加入 50  $\mu$ L 磁珠并旋转处理 3 h,离心去掉上清液,用 PBS 洗涤非特异性复合物,65 °C 过夜解交联,酚/氯仿抽提纯化回收 DNA 片段。qPCR 分析 HOXC13 对 PCNA 启动子的富集能力。

### 1.10 统计学处理

实验结果由 3 次独立重复实验得出。采用 GraphPad Prism 8 软件和 SPSS 21.0 软件数据分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验。计数资料以百分比(%)表示,组间比较采用卡方检验( $\chi^2$  检验)。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

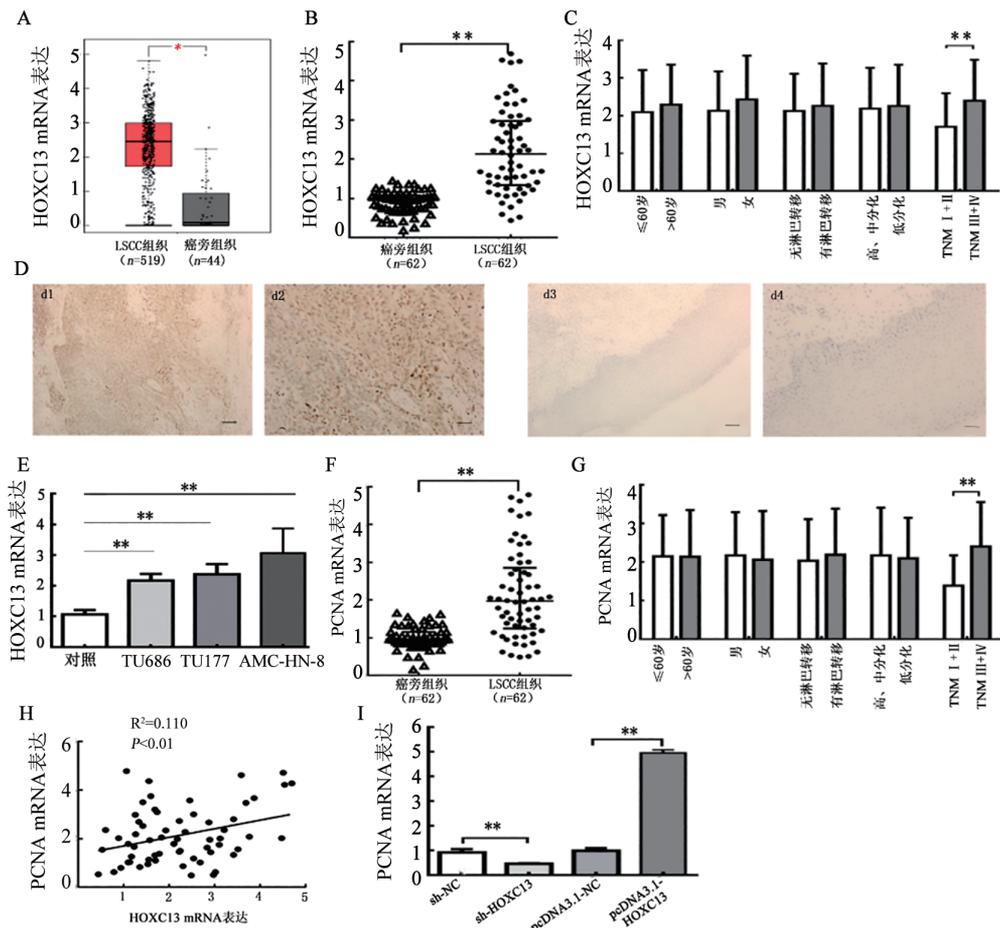
## 2 结果

### 2.1 HOXC13 和 PCNA 在 LSCC 组织和细胞中均呈高表达且两者的表达水平呈正相关

用 GEPIA 数据库数据分析结果(图 1A)显示,与癌旁组织相比,LSCC 组织中 HOXC13 mRNA 呈高表达( $P < 0.05$ )。用 qPCR 法检测 62 对中国人 LSCC 组织和癌旁组织中 HOXC13 mRNA 表达的结果(图 1B)显示,与癌旁组织相比,其在 LSCC 组织中也呈高表达( $P < 0.01$ );HOXC13 的表达水平与 TNM 分期有关联

( $P < 0.01$ , 图1C)。免疫组化法检测结果(图1D)显示, HOXC13免疫反应物主要定位于细胞核中, 分析结果显示, 在62例LSCC样本中, 46例HOXC13蛋白呈高表达、16例呈低表达, 且LSCC组织中HOXC13蛋白的表达水平显著高于癌旁组织(74.2% vs 19.4%,  $P < 0.01$ ); 然而, HOXC13蛋白的表达与患者性别、年龄、TNM分期以及分化程度均无明显关联(均  $P > 0.05$ )。HOXC13在TU686、TU177和AMC-HN-8细胞中的表达水平均显著高于对照组(对照组为10例正常喉组织cDNA的混合液)(图1E, 均  $P < 0.01$ )。HOXC13在AMC-HN-8和

TU686细胞中的差异表达最为明显, 因此选择AMC-HN-8细胞用于敲减实验, TU686用于过表达实验。qPCR检测结果(图1F, G)显示, LSCC组织中PCNA的表达水平显著高于癌旁组织且与TNM分期有关联(均  $P < 0.01$ )。HOXC13与PCNA的表达呈正相关( $P < 0.01$ , 图1H)。在喉癌细胞中敲低HOXC13后, PCNA的表达降低, 过表达HOXC13后, PCNA的表达升高(均  $P < 0.01$ , 图1I)。实验结果说明, HOXC13和PCNA在LSCC组织和细胞中均呈高表达, 且两者表达水平呈正相关关系。



A: GEPIA 数据库数据分析HOXC13 mRNA在LSCC组织中的表达; B: qPCR法检测HOXC13 mRNA在中国人LSCC组织和相应癌旁组织中的表达; C: LSCC组织中HOXC13 mRNA表达与患者临床特征的关系; D: IHC技术检测HOXC13蛋白在LSCC组织(d1~d2)和癌旁组织(d3~d4)中的表达情况(放大倍数: d1、d3为×100, d2、d4为×400); E: qPCR法检测HOXC13 mRNA在TU686、TU177、AMC-HN-8细胞中的表达情况; F: qPCR法检测PCNA mRNA在LSCC组织和癌旁组织中的表达; G: LSCC组织中PCNA mRNA表达与患者临床特征的关系; H: PCNA、HOXC13 mRNA在LSCC组织中表达的相关性; I: 敲减或过表达HOXC13对LSCC细胞中PCNA mRNA表达的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ 。

图1 HOXC13及PCNA在LSCC组织和细胞中的表达

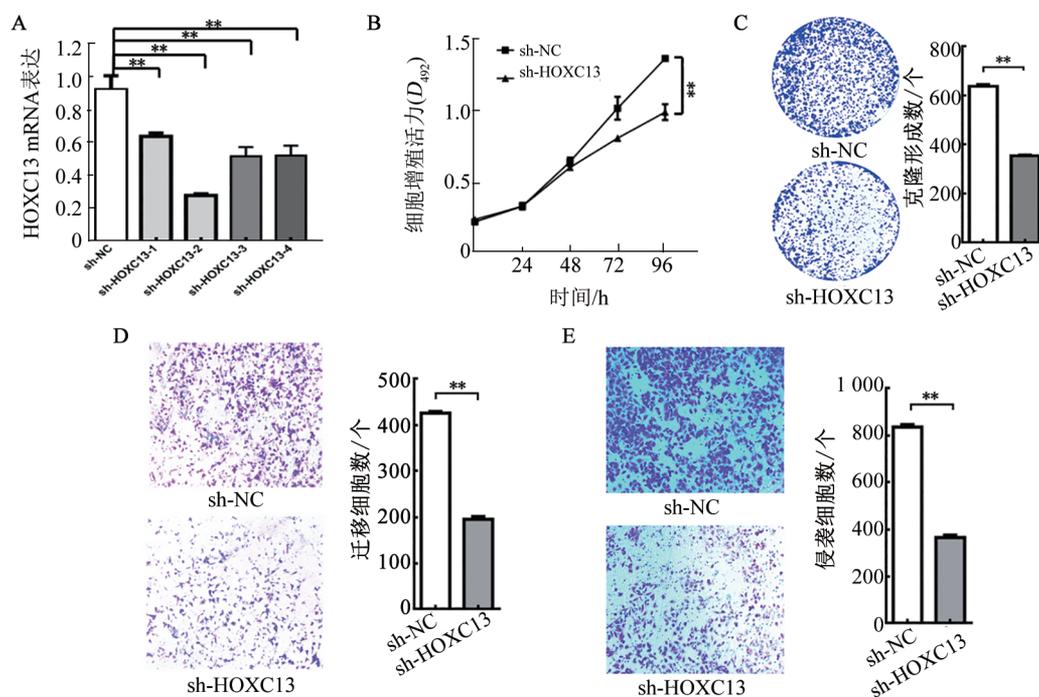
2.2 敲减HOXC13可明显抑制AMC-HN-8细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR法检测结果(图2A)显示: 与sh-NC组相比, sh-HOXC13-1、2、3及4组中HOXC13 mRNA表达水平均明显下降( $P$ 均 $< 0.01$ ), 其中以shHOXC13-2组

最为明显, 所以后续实验选用sh-HOXC13-2序列进行。MTS实验检测结果(图2B)显示, 与sh-NC组比较, sh-HOXC13-2组AMC-HN-8细胞的增殖能力显著降低( $P < 0.01$ )。细胞克隆形成实验检测结果(图2C)显示, 与sh-NC组比较, sh-HOXC13-2组AMC-

HN-8 细胞的克隆能力也明显降低 ( $P < 0.01$ )。Transwell 小室实验检测结果 (图 2D、E) 显示, 与 sh-NC 组比较, sh-HOXC13-2 组 AMC-HN-8 细胞的迁移

和侵袭能力均明显降低 (均  $P < 0.01$ )。实验结果说明, 敲减 HOXC13 可明显抑制 AMC-HN-8 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。



A: qPCR 法检测在 AMC-HN-8 细胞中敲减 HOXC13 mRNA 的效率; B~C: MTS (B)、细胞克隆形成实验 (C,  $\times 50$ ) 检测敲低 HOXC13 对 AMC-HN-8 细胞增殖能力的影响; D、E: Transwell 实验检测敲低 HOXC13 对 AMC-HN-8 细胞的迁移能力和侵袭能力的影响 ( $\times 200$ )。 \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 敲低 HOXC13 抑制 AMC-HN-8 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

### 2.3 过表达 HOXC13 促进 TU686 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 法检测结果 (图 3A) 显示, 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-HOXC13 组 TU686 细胞中 HOXC13 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明在 TU686 细胞中成功地过表达了 HOXC13 mRNA。MTS 实验、细胞克隆形成实验检测结果 (图 3B、C) 显示, 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-HOXC13 组 TU686 细胞的增殖、克隆形成能力均显著升高 (均  $P < 0.01$ ); Transwell 小室实验检测结果 (图 3D、E) 显示, 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-HOXC13 组 TU686 细胞的迁移、侵袭能力均显著升高 (均  $P < 0.01$ )。实验结果表明, 过表达 HOXC13 可明显促进 TU686 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

### 2.4 HOXC13 可结合 PCNA 启动子区并调控其转录

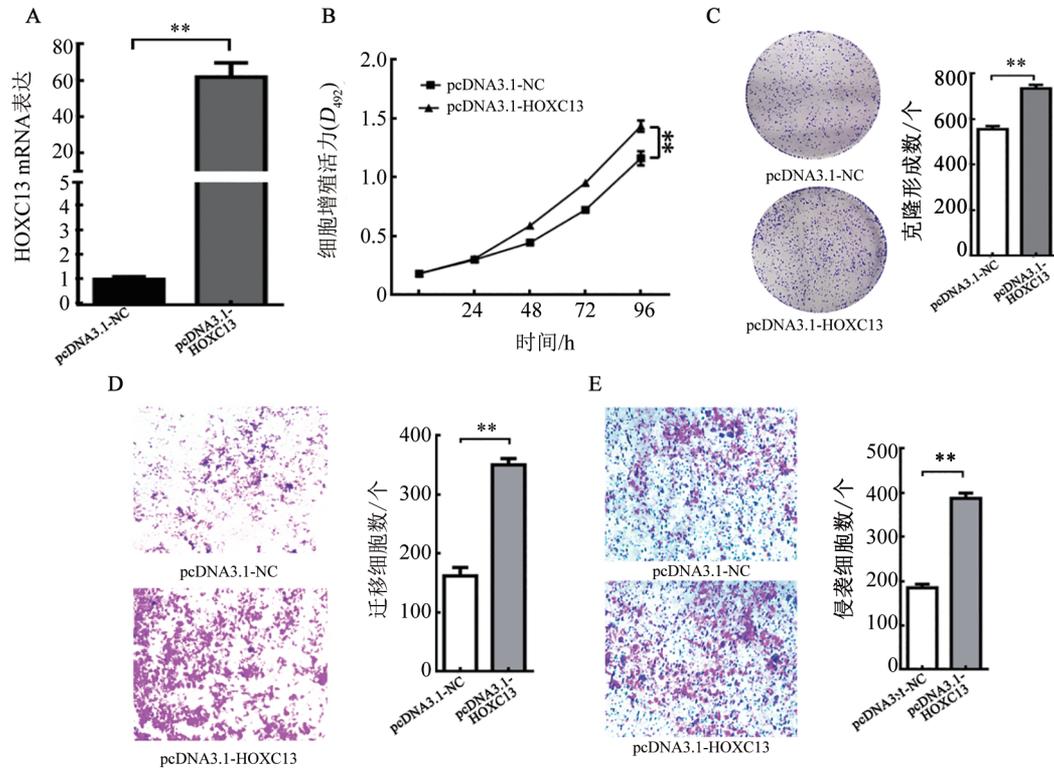
通过 JASPAR 和 Human TFDB 生物信息学网站进行预测分析发现, HOXC13 与 PCNA 启动子之间存在结合位点 (图 4A)。双荧光素酶基因报告实验检测结果 (图 4B) 显示, 与 pcDNA3.1-NC+pGL3-PCNA (-919/+30) 组、pcDNA3.1-HOXC13+pGL3-PCNA (-919/+30) 组及 pcDNA3.1-NC+pGL3-PCNA (-942/+30) 组比较, pcDNA3.1-HOXC13+pGL3-PCNA

(-942/+30) 组 AMC-HN-8 细胞荧光素酶活性明显升高 ( $P < 0.01$ ); ChIP 实验检测结果 (图 4C) 显示, HOXC13 特异性抗体沉淀的复合物中 PCNA 的富集水平显著高于 IgG ( $P < 0.01$ )。实验结果说明, HOXC13 可与 PCNA 启动子区结合, 并作为转录因子调节 PCNA 的转录。

### 2.5 过表达 PCNA 可部分逆转 HOXC13 对 AMC-HN-8 细胞的恶性生物学行为的促进作用

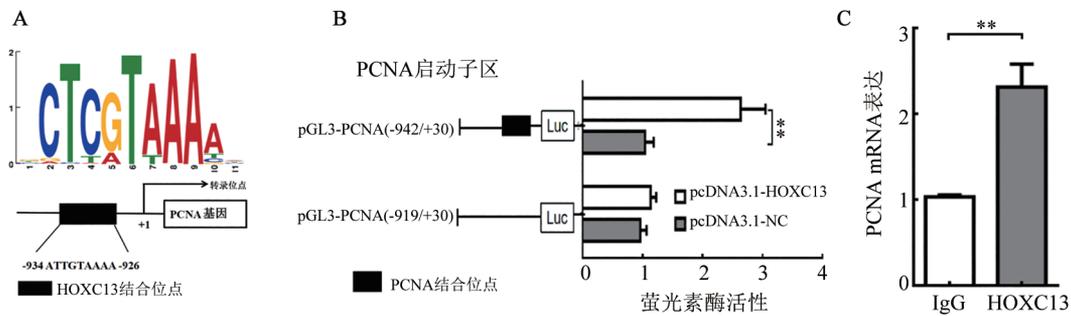
qPCR 法检测结果 (图 5A) 显示, 与 sh-NC 组比较, sh-HOXC13 组 AMC-HN-8 细胞中 PCNA mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), pcDNA3.1-PCNA 组 AMC-HN-8 细胞中 PCNA mRNA 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 然而, 同时敲减 HOXC13 和过表达 PCNA, 则可部分逆转敲减 HOXC13 对 PCNA 表达的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。MTS 实验、克隆形成实验和 Transwell 实验结果 (图 5B~E) 显示, 敲减 HOXC13 均可显著抑制 AMC-HN-8 细胞的增殖、迁移及侵袭能力 (均  $P < 0.01$ ); 过表达 PCNA 均可显著促进 AMC-HN-8 细胞的增殖、迁移及侵袭能力 (均  $P < 0.01$ ); 然而, 同时敲减 HOXC13 和过表达 PCNA 则可部分逆转敲减 HOXC13 对 AMC-HN-8 细胞的抑制作用 (均  $P < 0.01$ )。实验结果进一步

证实了HOXC13和PCNA在AMC-HN-8细胞中的重 要调控作用及其相互关系。



A: 在TU686细胞中验证过表达HOXC13质粒的转染效率;B、C:HOXC13的过表达明显促进了TU686细胞的增殖(B)与克隆形成(C)(×50);D:过表达HOXC13促进TU686细胞的迁移能力(×200);E:过表达HOXC13促进TU686细胞的侵袭能力(×200)。 \*\*P<0.01。

图3 过表达HOXC13促进喉癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力



A:网站预测PCNA与HOXC13的结合位点;B:双荧光素酶报告基因实验验证HOXC13与PCNA启动子区的结合关系; C:ChIP实验验证PCNA与HOXC13的结合关系。 \*\*P<0.01。

图4 双荧光素酶报告基因实验和ChIP实验验证PCNA是HOXC13的直接靶基因

### 3 讨论

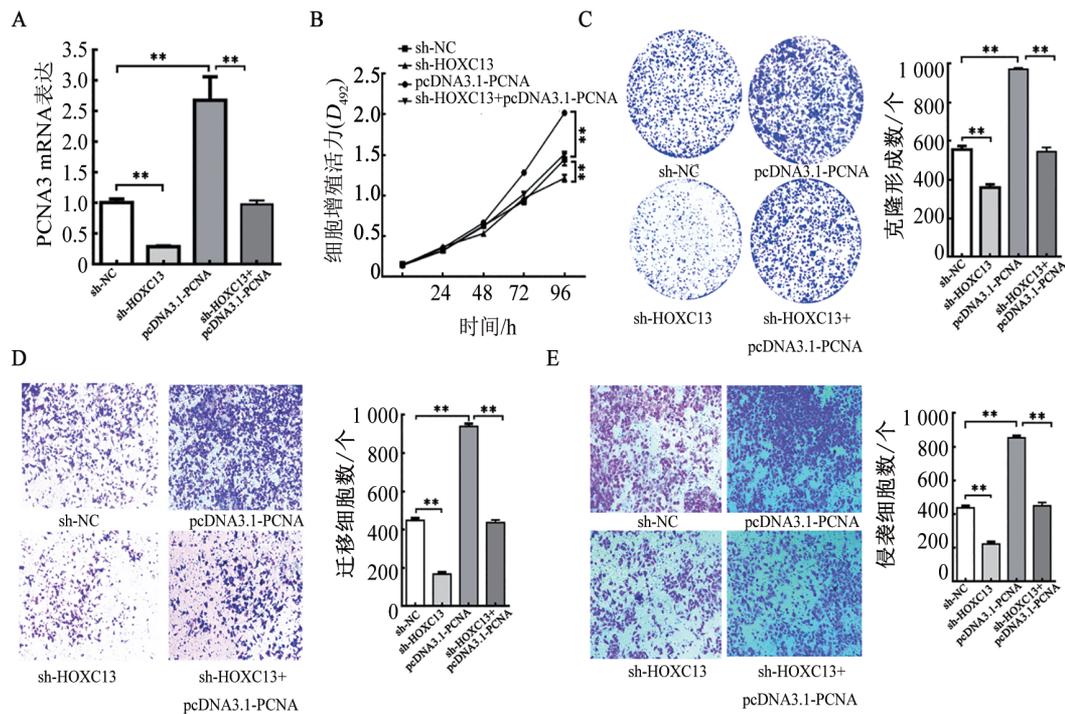
喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,临床上主要分为声门型(占比60.0%)、声门上型及声门下型三种类型,男性发病率稍高于女性,最常见的病理类型是LSCC<sup>[7]</sup>。目前,可采用外科手术、化疗或放疗等方式治疗LSCC,然而这些治疗方法均存在不同的优缺点,总体治疗效果尚不理想,患者远期生存率较低,预后较差<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>表明,LSCC的发生发展与癌基因

和抑癌基因的功能失衡密切相关。因此,当前研究的热点在于积极寻找基因水平上的治疗靶点,以期作为LSCC的治疗提供新的有效手段。

转录因子也被称为特定DNA序列结合蛋白,能够调控DNA的转录<sup>[10]</sup>。这些转录因子拥有模块化的结构,包括DNA结合区、反式激活区和单链区等组成部分<sup>[11]</sup>。其中,DNA结合区能够和靶基因启动子区的特定核苷酸序列结合,从而提高或降低靶基因的转录水平,调控特定的生物学过程<sup>[12]</sup>。据估计,人类

基因组中约包含 2 600 个转录因子,它们确保了基因在特定时间、特定细胞和特定数量下的转录和表达,以维持细胞的正常功能<sup>[13]</sup>。在肿瘤研究领域,转录因子相关的研究非常丰富。HOXC13 是 HOXC 基因家族中的一个转录因子,早期的研究<sup>[14]</sup>主要关注其与头发、指甲和丝状乳头的关系。然而,近年来的研究<sup>[15]</sup>发现,HOXC13 在成釉细胞瘤、牙源性肿瘤、黑色素瘤以及脂肪肉瘤中显著高表达。作为一个转录因子,HOXC13 能够调控许多关键基因的表达,进而影响肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。Zfp521,作为 B 细胞中可导致白血

病的原癌基因,其表达受到 HOXC13 的协同调控<sup>[17]</sup>。此外,在乳腺癌中高表达且能促进乳腺癌恶性表型的关键基因同源盒转录反义 RNA (Homebox transcript antisense RNA, HOXAIR) 也受到 HOXC13 的转录调控<sup>[18]</sup>。最近研究<sup>[19]</sup>还发现,HOXC13 在肺癌中通过上调细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, CCND1) 和细胞周期蛋白 E1 (cyclin E1, CCNE1) 的表达来发挥促癌作用。这些研究表明,HOXC13 在肿瘤领域的研究具有重要价值。然而,关于其在 LSCC 的作用及机制尚少见报道。



A: 敲减 HOXC13 或敲减 HOXC13+过表达 PCNA 对 AMC-HN-8 细胞中 PCNA mRNA 表达的影响, B~E: 敲减 HOXC13 或敲减 HOXC13+过表达 PCNA 对 AMC-HN-8 细胞增殖 (B~C, ×50)、迁移 (D, ×200) 和侵袭 (E, ×200) 能力的影响。\**P*<0.01。

图5 HOXC13和PCNA表达对LSCC细胞生物学行为的影响

本研究从 GEO 数据库中筛选出 LSCC 基因芯片数据集 GSE84957,以表达差异倍数大于 2 且 *P*<0.01 为标准进行差异基因分析。结果发现,HOXC13 基因在 LSCC 组织中的表达水平较癌旁组织显著上调。通过 qPCR 检测了 62 例中国人 LSCC 患者肿瘤组织和癌旁组织中 HOXC13 mRNA 的表达,也验证了数据集分析的结果,发现其与患者的 TNM 分期有关联;同时免疫组化技术检测结果也显示,LSCC 组织中 HOXC13 蛋白的表达也明显高于癌旁组织。本研究结果揭示了 HOXC13 对 LSCC 细胞增殖、侵袭和迁移的促进作用。这些发现与以往的研究结果相一致,进一步验证了 HOXC13 在 LSCC 发生发展中的重要作用。

PCNA 主要在细胞核内发挥其功能<sup>[20]</sup>。它不仅是 DNA 聚合酶 delta 的辅助因子,而且其编码的蛋白质形

成一个同源三聚体,可以增强 DNA 复制过程中前导链的持续合成能力<sup>[21]</sup>。此外,PCNA 还能响应 DNA 损伤,通过被泛素化,参与泛素结合酶 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme E2, UBE2, RAD6 Homolog) 依赖的 DNA 修复途径<sup>[22]</sup>。研究<sup>[23]</sup>表明,PCNA 与细胞的正常生长和异常增殖相关。当 PCNA 出现紊乱时,可能会导致细胞异常增殖甚至肿瘤的发生<sup>[24]</sup>。

本研究通过 JASPAR 和 Human TFDB 网站分析发现,PCNA 启动子区与转录因子 HOXC13 之间存在结合位点。进一步的 ChIP 和萤光素酶报告实验证实 PCNA 是 HOXC13 的下游靶基因。在 LSCC 中,PCNA 呈现高表达,且与患者的 TNM 分期有关联。本研究结果进一步显示,PCNA 与 HOXC13 基因在 LSCC 中的表达呈正相关,且高表达的 HOXC13 可以促进 PCNA 蛋白的表

达。这些结果证实转录因子HOXC13可以通过上调PCNA的转录,进而促进PCNA蛋白的表达。通过回复实验发现,敲低HOXC13可以显著抑制LSCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。然而,当同时过表达PCNA时,这种抑制作用明显减弱,表明HOXC13通过正调控PCNA表达来促进LSCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。本研究还有待进一步完善。首先,由于样本量小,研究结果可能不够具有普遍性。其次,研究在LSCC组织和细胞中进行,需要在动物模型中进一步验证。还需要更深入地探究HOXC13在LSCC中的其他可能靶基因和具体的作用机制,以便更全面地了解其在LSCC中的作用。

综上所述,本研究揭示了在LSCC细胞中,高表达的HOXC13能够与PCNA启动子区的结合,进而调控PCNA转录。HOXC13通过调控PCNA显著促进LSCC细胞的增殖、迁移、侵袭能力,揭示了HOXC13在LSCC发生发展中的重要作用。因此,靶向HOXC13可能为LSCC的治疗提供全新的策略。

#### [参考文献]

- [1] SONG L H, ZHANG S W, YU S Y, *et al.* Cellular heterogeneity landscape in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(10): 2879-2890. DOI: 10.1002/ijc.33192.
- [2] GRÉGOIRE V, GRAU C, LAPEYRE M, *et al.* Target volume selection and delineation (T and N) for primary radiation treatment of oral cavity, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2018, 87: 131-137. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.10.034.
- [3] CAVALIERE M, BISOGNO A, SCARPA A, *et al.* Biomarkers of laryngeal squamous cell carcinoma: a review[J/OL]. *Ann Diagn Pathol*, 2021, 54: 151787[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34242969/>. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2021.151787.
- [4] WANG B, GUO H F, YU H Q, *et al.* The role of the transcription factor EGR1 in cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 642547[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33842351/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.642547.
- [5] TAN A, PRASAD R, LEE C, *et al.* Past, present, and future perspectives of transcription factor EB (TFEB): mechanisms of regulation and association with disease[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(8): 1433-1449. DOI: 10.1038/s41418-022-01028-6.
- [6] LI H R, GAO P C, CHEN H F, *et al.* HOXC13 promotes cell proliferation, metastasis and glycolysis in breast cancer by regulating DNMT3A[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(3): 439[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37614427/>. DOI: 10.3892/etm.2023.12138.
- [7] BRADFORD C R, FERLITO A, DEVANEY K O, *et al.* Prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 2020, 5(1): 74-81. DOI: 10.1002/lio2.353.
- [8] MASTRONIKOLIS N, RAGOS V, FOTIADES P, *et al.* MDM2 oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *J BUON*, 2020, 25(2): 594-596.
- [9] TSIAMBAS E, MASTRONIKOLIS N, FOTIADES P P, *et al.* C-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *J BUON*, 2020, 25(2): 618-620.
- [10] LUO Y, CHEN C S. The roles and regulation of the KLF5 transcription factor in cancers[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(6): 2097-2117. DOI: 10.1111/cas.14910.
- [11] LU F Y, LIONNET T. Transcription factor dynamics[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, 13(11): a040949[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34001530/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a040949.
- [12] KU H C, CHENG C F. Master regulator activating transcription factor 3 (ATF3) in metabolic homeostasis and cancer[J/OL]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 556[2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32922364/>. DOI: 10.3389/fendo.2020.00556.
- [13] ONO M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes [J]. *Immunology*, 2020, 160(1): 24-37. DOI: 10.1111/imm.13178.
- [14] LIN Z M, CHEN Q, SHI L, *et al.* Loss-of-function mutations in HOXC13 cause pure hair and nail ectodermal dysplasia[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(5): 906-911. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.08.029.
- [15] DAI M M, SONG J J, WANG L Y, *et al.* HOXC13 promotes cervical cancer proliferation, invasion and Warburg effect through  $\beta$ -catenin/c-Myc signaling pathway[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53(5): 597-608. DOI: 10.1007/s10863-021-09908-1.
- [16] LUO J, WANG Z Q, HUANG J F, *et al.* HOXC13 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma *via* repressing transcription of CASP3[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(2): 317-329. DOI: 10.1111/cas.13453.
- [17] YU M, AL-DALLAL S, AL-HAJ L, *et al.* Transcriptional regulation of the proto-oncogene Zfp521 by SPI1 (PU. 1) and HOXC13[J]. *genesis*, 2016, 54(10): 519-533. DOI: 10.1002/dvg.22963.
- [18] LI C Y, CUI J W, ZOU L, *et al.* Bioinformatics analysis of the expression of HOXC13 and its role in the prognosis of breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 899-907. DOI: 10.3892/ol.2019.11140.
- [19] YAO Y, LUO J, SUN Q, *et al.* HOXC13 promotes proliferation of lung adenocarcinoma *via* modulation of CCND1 and CCNE1[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(9): 1820-1834.
- [20] GONZÁLEZ-MAGAÑA A, BLANCO F J. Human PCNA structure, function and interactions[J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 570 [2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32276417/>. DOI: 10.3390/biom10040570.
- [21] CARDANO M, TRIBIOLI C, PROSPERI E. Targeting proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, 20(4): 240-252. DOI: 10.2174/1568009620666200115162814.
- [22] ACHARYA N, PATEL S K, SAHU S R, *et al.* 'PIPs' in DNA polymerase: PCNA interaction affairs[J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48(6): 2811-2822. DOI: 10.1042/BST20200678.
- [23] FAN L, BI T H, WANG L X, *et al.* DNA-damage tolerance through PCNA ubiquitination and sumoylation[J]. *Biochem J*, 2020, 477(14): 2655-2677. DOI: 10.1042/BCJ20190579.
- [24] HORSFALL A J, ABELL A D, BRUNING J B. Targeting PCNA with peptide mimetics for therapeutic purposes[J]. *Chembiochem*, 2020, 21(4): 442-450. DOI: 10.1002/cbic.201900275.

[收稿日期] 2024-02-12

[修回日期] 2024-05-04

[本文编辑] 向正华