

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.10.005

HOXC8 通过调控 PDX1 的表达促进非小细胞肺癌的生长与 EMT 过程

陈 荣[#] 史佳璐[#] 杨梦奇 陈 倩 李 勇[△]

(安徽大学生命科学学院 安徽 合肥 230601)

摘要 目的: 探索 HOXC8 与 PDX1 在非小细胞肺癌 (non-small lung cancer, NSCLC) 细胞生长及上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的作用机制。**方法:** 通过转录组测序、荧光定量 PCR 及染色质免疫沉淀等方法筛选并鉴定 HOXC8 调控的靶基因; 通过 Western blot、CCK-8、克隆集落生成及生物信息学等手段分析靶基因 PDX1 在非小细胞肺癌中的作用。**结果:** 实验证明 HOXC8 可结合到 PDX1 基因的启动子上, 并作为转录因子激活 PDX1 的表达。PDX1 的表达促进 NSCLC 细胞的生长与 EMT 过程, 而沉默 PDX1 能显著地抑制 NSCLC 细胞的生长与 EMT 过程, 并诱导细胞的凋亡。通过分析已知的肿瘤数据库, 我们发现在 NSCLC 中 PDX1 的表达显著高于正常组织, 且 PDX1 的高表达与肺癌患者的预后不良呈显著的相关性。**结论:** 本研究发现 HOXC8-PDX1 轴在非小细胞肺癌中起着重要的调节作用, 有望成为非小细胞肺癌治疗的新靶点。

关键词: 非小细胞肺癌; HOXC8; PDX1; 上皮间质转化; 细胞生长

中图分类号: R-33; R734.2; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)10-1829-06

HOXC8 Regulates PDX1 Expression to Promote Growth and EMT of non-small Cell Lung Cancer

CHEN Rong[#], SHI Jia-lu[#], YANG Meng-qi, CHEN Qian, LI Yong[△]

(School of Life Sciences, Anhui University, Hefei, Anhui, 230601, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulation mechanism of HOXC8 and PDX1 in the growth and epithelial mesenchymal transition (EMT) of non-small lung cancer (NSCLC) cells. **Methods:** RNA-sequence analyses, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and Real-time PCR assays were performed to identify HOXC8-targeted genes; Western blot, CCK-8, colony formation and bioinformatics analyses were carried out to examine the roles of PDX1 gene in NSCLC. **Results:** HOXC8 was shown to bind to the promoter of the PDX1 gene and act as a transcription factor to activate the expression of PDX1. PDX1 expression promoted the growth and EMT of NSCLC cells, while silencing PDX1 significantly inhibited the growth and EMT of NSCLC, and induced cell apoptosis. PDX1 expression was significantly higher in NSCLC specimens than that of normal tissues by analyzing public tumor databases, and growth and EMT of NSCLC, and induced cell apoptosis. Analyses of public tumor databases indicated that PDX1 expression was significantly up-regulated in NSCLC specimens in comparison with normal tissues, and high PDX1 expression was significantly correlated with poor survival of lung cancer patients. **Conclusion:** This study showed that HOXC8-PDX1 axis played an important role in the progression of NSCLC and would be a new target for NSCLC treatment.

Key words: NSCLC; HOXC8; PDX1; EMT; Cell growth

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R734.2; Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)10-1829-06

前言

根据 2020 年全球癌症数据评估, 肺癌的致死率在癌症中处于第一位^[1,2], 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 则占据了肺癌发病率的 85% 左右^[3]。虽然针对非小细胞肺癌的诊疗已取得了一系列重要进展, 但转移性非小细胞肺癌患者的生存率仍然低于 5%^[4]。肿瘤转移赋予了肿瘤细胞更强的增殖、迁移和侵袭能力, 因此, 阐明非小细胞肺癌的转移调控

机制, 对非小细胞肺癌的防治具有重要的意义^[5,6]。

本实验室前期研究发现同源盒基因 HOXC8 作为重要因子参与了 NSCLC 的发展进程。其中, HOXC8 基因属于包含了 39 个基因的同源盒 (homeobox, HOX) 家族成员之一, 参与了多种生理与病理的过程^[7,8]。研究表明, HOXC8 表达异常与多种癌症的发生发展相关, 包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌及宫颈癌等^[9-12]。在前期的研究中发现 HOXC8 在 NSCLC 中表达上调, 且 HOXC8 的表达促进了 NSCLC 细胞的增殖与迁移等^[13,14]。

[#] 为共同第一作者

作者简介: 陈荣 (1997-), 硕士, 女, 研究方向: 肿瘤细胞学, E-mail: 2609389459@qq.com;

史佳璐 (1997-), 硕士, 男, 研究方向: 肿瘤细胞学, E-mail: 1285870517@qq.com

[△] 通讯作者: 李勇 (1967-), 男, 博士生导师, 教授, E-mail: liyongahu@163.com

(收稿日期: 2022-10-30 接受日期: 2022-11-27)

胰十二指肠同源盒 1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1), 又称胰岛素启动子因子 1 (IPF-1), 是一种同源结构域转录因子^[15]。在成人机体中, PDX1 调节胰岛素、生长抑素、胰高血糖素和胰岛淀粉样蛋白多肽激素等基因^[16]。据报道, 乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌和肾癌的 PDX1 在肿瘤组织中的表达显著增加^[17,18]。然而, 目前 PDX1 在 NSCLC 中的作用尚无定论。

本研究通过转录组测序等手段发现, 在 NSCLC 细胞中 HOXC8 调控 PDX1 的表达; 抑制 PDX1 能显著地降低了肿瘤细胞的生长及上皮间质转化(epithelia-mesenchymal transition, EMT), 并诱导细胞的凋亡。在肺腺癌与肺鳞癌中, PDX1 的表达比正常组织中显著上升, 且高表达 PDX1 与患者的预后不良显著相关。本研究表明 HOXC8-PDX1 轴参与了 NSCLC 的发生发展过程, 有望为非小细胞肺癌的诊疗提高新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人非小细胞肺癌细胞株 A549 与 H1299 来自于中国科学院上海细胞库; PDX1 抗体购自 Proteintech 生物技术有限公司; E-cadherin 抗体购自 Cell Signaling Technology; β -actin 抗体、N-cadherin 抗体以及 Vimentin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。限制性核酸内切酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、荧光定量 PCR 检测试剂盒均购自 TaKaRa 生物公司。TRIzol RNA 提取试剂盒、Lipofectamine 3000 均购自 Thermo Scientific; 其他化学试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与鉴定 PDX1 的上下游引物 PDX1-F: TTG-GCGCGCCATGAACGGCGAGGAGCAGTA, PDX1-R: CCGCT-CGAGTCATCGTGGTTCCTGCGGC 通过 Primer Primer 5.0 软件设计, shRNA 敲低序列 PDX1 shRNA1: AAAAGCAGCTT TACAAGGACCCATGTTGGATCCAACATGGGTCCTTGTAAGCTGC 和 PDX1 shRNA2: AAAAGCCTTTCCTCATGGATGAAGTCTTGGATCCAAGACTTCATCCATGGGAAAGGC 通过 Invitrogen Block-iT RNAi Designer 网站设计。经由聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)进行扩增, 并连接至慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro(System Biosciences, 美国)以及载体 pLV-RNAi vector(BioSettia, 美国)上。

1.2.2 Western blot 使用蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 用适当浓度的 SDS-PAGE 电泳分离后转印到 PVDF 膜上, 使用 5% (重量百分比)的脱脂牛奶进行 1~3 h 的封闭, 后用相应的抗体进行 4℃过夜孵育。次日孵育相应二抗后, 用 ECL 发光液进行曝光。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 通过 TRIzol RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后进行逆转录, 并将逆转录得到 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR(Real time PCR, RT-PCR)检测(ABI7900 系统), 反应条件为 95℃ 5 min (预变性); 95℃ 10 s、60℃ 40 s (变性、退火、延伸, 循环数为 40); 95℃ 15 s、60℃ 60 s、95℃ 15 s (溶解曲线)。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞活力 在 96 孔细胞培养皿中, 按照每孔约 1×10^3 的细胞量进行铺板, 并设置 6 个平行孔, 分别

在 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 添加 10 μ L CCK-8 溶液, 37℃孵育 2 h, 使用酶标仪检测在 560 nm 波长处吸光度值。

1.2.5 软琼脂克隆形成实验检测细胞非锚定依赖性生长能力 将 1.2% (重量百分比) 琼脂糖均匀铺于六孔板内制备底层胶, 之后将 2×10^4 个细胞与 0.7% (重量百分比) 琼脂糖混匀后铺于底层胶上构成上层胶, 最后加入 1 mL 新鲜培养基, 在细胞培养箱中培养 25 天左右, 加入氯化碘二甲苯胺(INT)溶液对细胞克隆团进行染色, 并于显微镜下计数与拍照。

1.2.6 染色质免疫沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 用 1% 甲醛溶液对细胞进行固定并收集, 用细胞超声破碎仪将收集得到的细胞 DNA 片段破碎至 500 bp, 加入 2 μ g HOXC8 抗体或 IgG (阴性对照)后置于 4℃孵育过夜, 然后加入 40 μ L 蛋白质 G-agarose, 离心沉淀 DNA, 最后用 DNA 作为模板进行实时定量 PCR 分析实验结果。

1.2.7 生物信息学分析与统计学分析 转录组测序结果使用 DAVID 网站 (<https://david.ncicrf.gov>)提供的方法进行 KEGG 通路等分析。使用 cBioPortal (www.cbioportal.org)和 OncoDB (<http://oncodb.org>) 网站对 PDX1 基因表达进行分析。Kaplan-Meier (<http://kmplot.com>)分析 PDX1 表达与患者生存率之间的相关性。统计学分析是从至少 3 个独立实验中收集的数据平均值 $\pm$ 标准差进行分析, t 测试(双尾)用于比较两组数据的差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序显示 HOXC8 调控 PDX1 等基因的表达

为了阐明 HOXC8 在 NSCLC 中的作用机制, 在 A549 细胞中转染了 HOXC8 的表达载体, 并设计进行转录组测序分析。结果表明, 在 A549 细胞中 HOXC8 诱导了 PDX1 的表达(图 1A)。此外, 利用 DAVID 平台^[19]对 HOXC8 调控的基因进行了分析。KEGG 通路分析表明, HOXC8 调控的基因参与了包括乳腺癌、非小细胞肺癌及结肠癌等的调控(图 1B)。进一步分析发现, HOXC8 调控的基因主要参与了转录调控、细胞凋亡、增殖与细胞周期等生物学过程(图 1C)。综上所述, 转录组测序的结果表明 HOXC8 在 NSCLC 的发生发展中发挥着重要的调控作用。

2.2 HOXC8 结合到 PDX1 的启动子上调控 PDX1 的表达

为了验证转录组测序的结果, 在 A549 细胞中过表达 HOXC8 或敲低 HOXC8, 然后进行荧光定量 PCR 实验, 结果显示 HOXC8 的表达促进了 PDX1 的表达(图 2A), 而 HOXC8 的 shRNA 敲低则抑制了 PDX1 的表达(图 2B)。

鉴于所有的 HOX 蛋白均为转录因子^[20], 因此推测 HOXC8 有可能是作为转录因子来调控 PDX1 的转录表达。通过 JASPAR 网站 (<http://jaspar.genereg.net>)对 PDX1 启动子上可能存在的 HOXC8 结合位点进行分析, 结果显示 PDX1 启动子上可能有 3 个 HOXC8 结合位点的存在(图 2C)。因此, 针对这些结合位点设计了相应的 PCR 引物, 然后使用 HOXC8 抗体进行染色质免疫沉淀实验 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)。ChIP 结果显示, HOXC8 结合到 PDX1 启动子上 -368nt 及 -334nt 的位置(图 2D), 说明 HOXC8 可以作为转录因子结合到 PDX1 的启动子上并激活其转录表达。

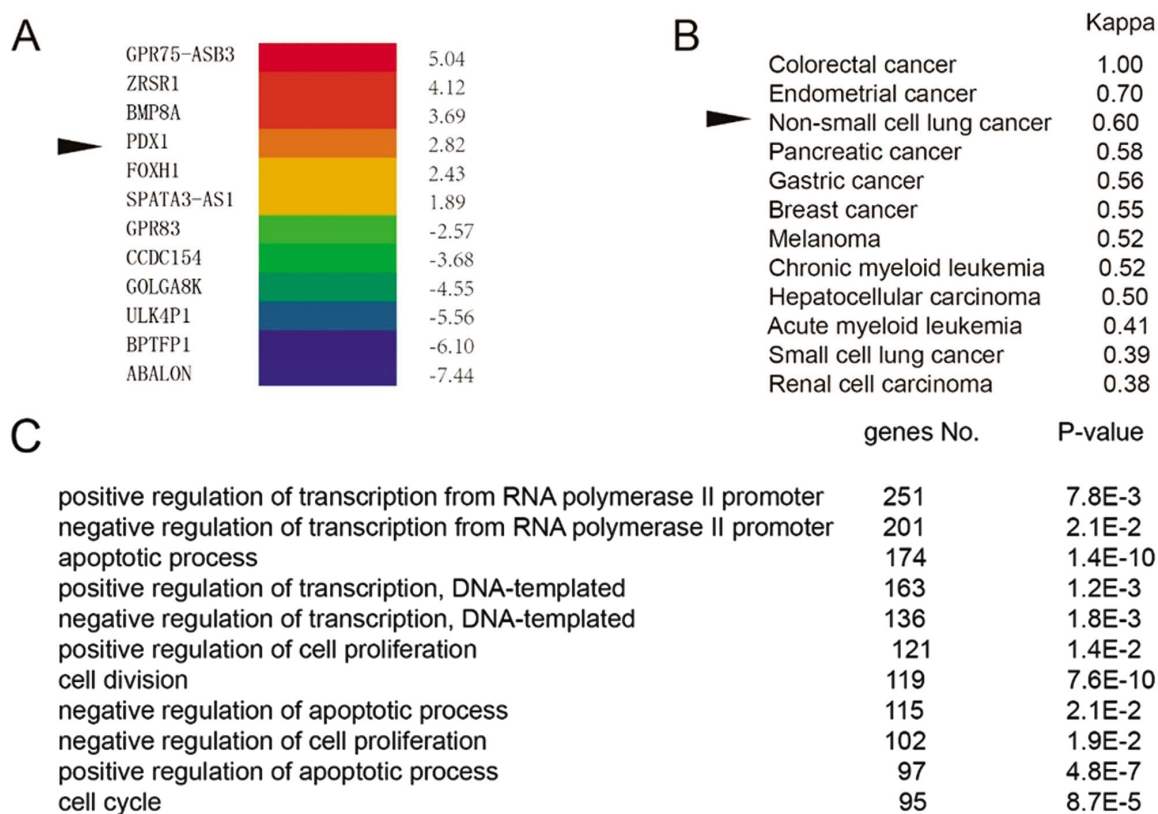


图1 转录组测序发现 HOXC8 诱导 A549 细胞中 PDX1 的表达

Fig.1 RNA seq analyses indicated that HOXC8 induced the expression of PDX1 in A549 cells

(A) A549 细胞中转染 HOXC8 慢病毒表达载体或空载体,提取总 RNA 后进行转录组测序分析。(B)KEGG 通路发现 HOXC8 调控的基因参与了多种肿瘤的发生发展过程。(C)HOXC8 调控的基因参与了细胞内多种生物学过程。

(A) A549 cells were lentivirally transduced with HOXC8 expression vector or empty vector, total RNA was extracted and analyzed by RNA-seq. (B) The KEGG pathway analyses indicates that HOXC8-regulated genes are involved in the development of various cancers. (C) HOXC8 targeted genes HOXC8 are involved in a variety of biological processes.

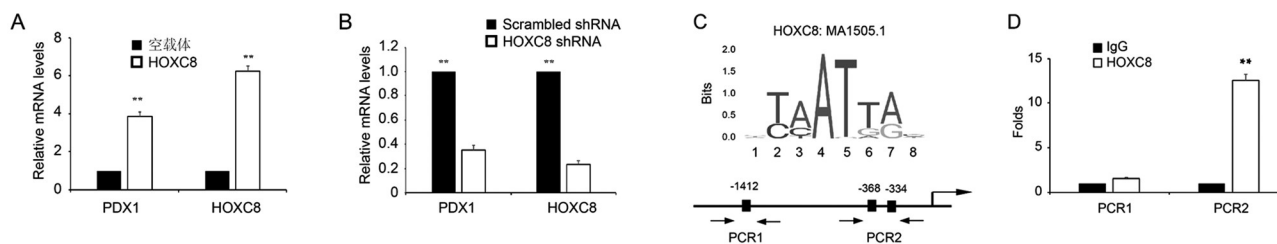


图2 HOXC8 结合到 PDX1 启动子上调控其表达

Fig.2 HOXC8 binds to the promoter of PDX1 promoter to regulate its expression

(A)荧光定量 PCR 检测 HOXC8 表达对 PDX1 mRNA 水平的影响。(B)荧光定量 PCR 检测 HOXC8 shRNA 敲低对 PDX1 mRNA 水平的影响。(C)上图显示为 HOXC8 结合序列示意图(JASPAR, MA1505.1);下图显示为 2kbPDX1 启动子上可能存在的 HOXC8 结合位点。(D)染色质免疫沉淀实验(ChIP)检测 A549 细胞中 HOXC8 在 PDX1 启动子上的结合位点。 ** $P < 0.01$ 。

(A) Real-time PCR to examine the mRNA levels of PDX1 in HOXC8 overexpression A549 cells. (B) Real-time PCR to examine the mRNA levels of PDX1 in HOXC8 knockdown A549 cells. (C) The upper panel shows the the core sequence recognized by HOXC8 by Jaspas website (MA1505.1). The lower panel shows the position of putative HOXC8 binding motif in 2kb promoter of PDX1 found by Jaspas. (D) ChIP assays to examine the binding sites of HOXC8 of PDX1 promoter in A549 cells. ** $P < 0.01$.

2.3 PDX1 参与调控 NSCLC 的 EMT、凋亡及增殖等

上皮间质转化(EMT)是指肿瘤上皮细胞转化为运动能力较强的间充质细胞,是肿瘤转移过程中的重要环节之一^[20,21]。在 Western blot 实验中发现随着 A549 细胞内 PDX1 的表达沉默, E-cadherin 的蛋白表达水平明显上调,而 N-cadherin 和 Vi-

mentin 的蛋白表达水平显著下调(图 3A)。同样,实时荧光定量 PCR 结果表明沉默 PDX1 的表达会导致 E-cadherin mRNA 表达量的升高,同时会导致 N-cadherin、Vimentin、Twist1 及 ZEB1 表达量的降低(图 3B & 3C)。以上结果表明, PDX1 的表达可以促进 NSCLC 细胞的 EMT 过程。

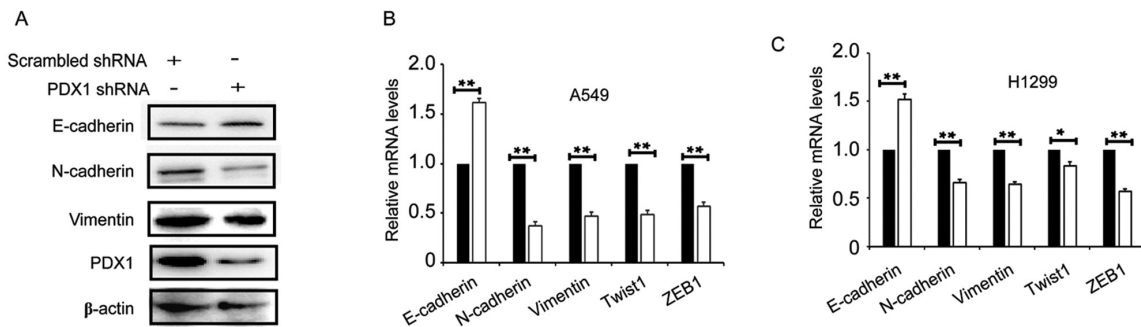


图3 PDX1 促进非小细胞肺癌 EMT 过程

Fig.3 PDX1 expression promotes the EMT of NSCLC

(A) Western Blot 实验检测沉默 PDX1 表达的 A549 细胞内 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达量。(B) 荧光定量 PCR 检测 PDX1 敲低的 A549 细胞内 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Twist1 以及 ZEB1 的 mRNA 表达量。(C) 荧光定量 PCR 检测 PDX1 敲低的 H1299 细胞内 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 以及 ZEB1 的 mRNA 表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(A) Western Blot assay to detect protein levels of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin in PDX1 shRNA knockdown A549 cells. (B) Real Time-PCR to detect the mRNA expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Twist1 and ZEB1 in PDX1 shRNA knockdown A549 cells. (C) Real Time-PCR to detect the mRNA expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Twist1 and ZEB1 in PDX1 shRNA knockdown H1299 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

为了进一步证明 PDX1 在 NSCLC 细胞中的作用, 设计进行了 Western Blot 实验来检测 PDX1 的表达对 NSCLC 细胞的凋亡是否产生影响。实验结果如图 4 所示, 沉默 PDX1 基因的

表达增加了 A549 细胞内 PARP 蛋白的表达量 (图 4A), 而 PDX1 基因的表达降低了 PARP 的蛋白表达水平 (图 4B)。以上结果提示抑制 PDX1 基因的表达可诱导肿瘤细胞的凋亡。

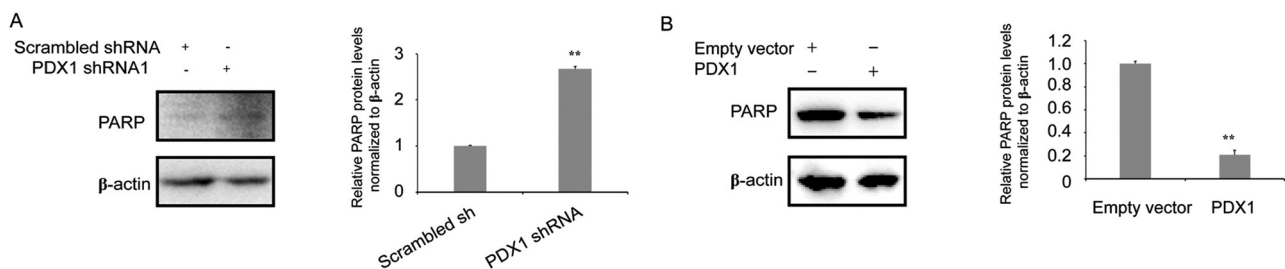


图4 敲低 PDX1 诱导 A549 细胞的凋亡

Fig.4 Knockdown of PDX1 induces A549 cells apoptosis

(A) Western Blot 实验检测沉默 PDX1 基因表达的 A549 细胞内 PARP 蛋白的表达量 (左), 并运用 Image J 软件对图 A 的蛋白条带进行灰度值分析 (右)。(B) Western Blot 实验检测 PDX1 过表达 A549 细胞内 PARP 蛋白的表达量 (左), 并运用 Image J 软件对图 A 的蛋白条带进行灰度值分析 (右)。** $P < 0.01$ 。

(A) Western Blot to detect the expression of PARP protein in A549 cells with silenced PDX1 gene expression (left), grey-scale value analysis of the protein bands using Image J software (right). (B) Western Blot to detect the expression of PARP protein in PDX1 over-expression cells (left), and grey-scale value analysis of the protein bands using Image J software (right). ** $P < 0.01$ 。

此外, CCK-8 实验显示, PDX1 的表达显著增强了 A549 细胞和 H1299 细胞的活力 (图 5A), 而沉默 PDX1 的表达则抑制了 A549 细胞和 H1299 细胞的活力 (图 5B)。在软琼脂克隆形成实验中, PDX1 的表达也显著地增强了细胞的非锚定依赖性生长能力 (图 5C), PDX1 的敲低则明显抑制了细胞的非锚定依赖性生长能力 (图 5D)。上述结果表明 PDX1 的表达促进了 NSCLC 细胞的生长能力。

2.4 高表达的 PDX1 与非小细胞肺癌患者的预后不良显著相关

为了进一步阐明 PDX1 在非小细胞肺癌中的作用, 本课题利用公开的肿瘤数据库对 PDX1 进行了分析。通过分析数据库中总共 7760 个非小细胞肺癌临床样本的数据, 发现 PDX1 基因在非小细胞肺癌中显现出较高的突变与扩增等变化 (图 6A), 且 PDX1 在肺腺癌和肺鳞癌临床癌症标本中的表达水平比其正常组织中显著上调 (图 6B)。此外, Kaplan-Meier 生存曲

线分析显示, PDX1 基因高表达的肺癌患者的无复发生存率显著下降 ($P = 0.012$), 特别是在肺腺癌患者中 ($P = 0.013$) (图 1c)。因此, 临床样本库的数据表明, PDX1 在 NSCLC 中的表达显著上调, 且高表达的 PDX1 与非小细胞肺癌患者的预后不良显著相关。

3 讨论

同源盒基因 (homeobox, HOX) 是广泛存在于真核细胞中, 且不同种属间具有高度保守序列的一类基因家族 [78]。人类 HOX 家族包含 39 个成员, 通常根据其在不同染色体上的分布分为 A、B、C 或 D 四组, 并以其排列顺序按 1~13 进行命名。所有的 HOX 家族成员均作为转录因子参与调控, 在细胞增殖、分化、胚胎生长发育及肿瘤的发生发展等生理病理过程中发挥着重要的调控作用 [78, 23]。HOXC8 作为 HOX 家族成员之一, 在多

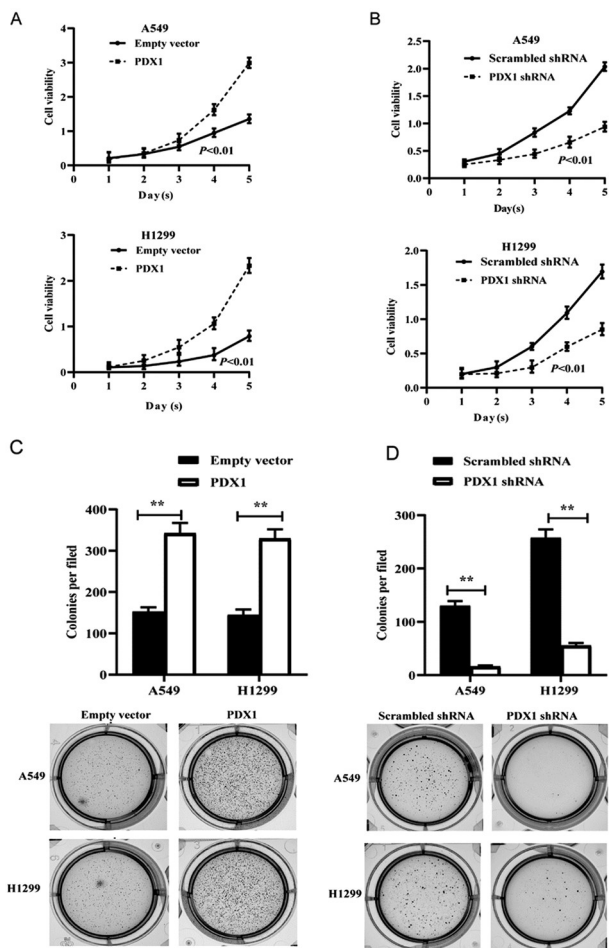


图5 PDX1 的表达促进非小细胞肺癌的增殖和锚定非依赖性生长能力
Fig.5 PDX1 expression promotes proliferation and anchorage independent growth capacity in NSCLC

(A) CCK-8 实验检测 PDX1 外源性表达对 A549 细胞及 H1299 细胞活力的影响; (B) CCK-8 实验检测 PDX1 的表达沉默对 A549 细胞及 H1299 细胞活力的影响。P<0.01; (C) 软琼脂实验检测 PDX1 外源性表达对 A549 细胞及 H129 细胞锚定非依赖性生长的影响; (D) 软琼脂实验检测 PDX1 的表达沉默对 A549 细胞及 H129 细胞非锚定依赖性生长的影响。*P<0.01。

(A) CCK-8 assay to detect the effect of PDX1 exogenous expression on the viability of A549 and H1299 cells; (B) CCK-8 assay to detect the effect of PDX1 expression silencing on the viability of A549 and H1299 cells; P<0.01; (C) Soft agar assay to detect the effect of PDX1 exogenous expression on the anchorage-independent growth of A549 and H129 cells; (D) Soft agar assay to detect the effect of silencing of PDX1 expression on anchorage independent growth of A549 cells and H129 cells. **P<0.01.

种肿瘤的发生发展中发挥着重要的调控作用^[9,10,12,24]。在实验室前期的工作中,报道了 HOXC8 参与了 NSCLC 的细胞增殖及 EMT 等过程^[13,14]。鉴于 HOXC8 通常作为转录因子,通过调控其靶基因来发挥其生物学功能,因此,为了进一步阐明 HOXC8 在 NSCLC 发生发展中的作用机理,在 A549 细胞中对 HOXC8 进行外源性过表达,然后进行转录组测序,来鉴定 HOXC8 调控的靶基因。转录组测序及 ChIP 等实验表明,HOXC8 在 A549 细胞中通过结合到 PDX1 基因的启动子上,作为转录因子激活 PDX1 的转录表达。

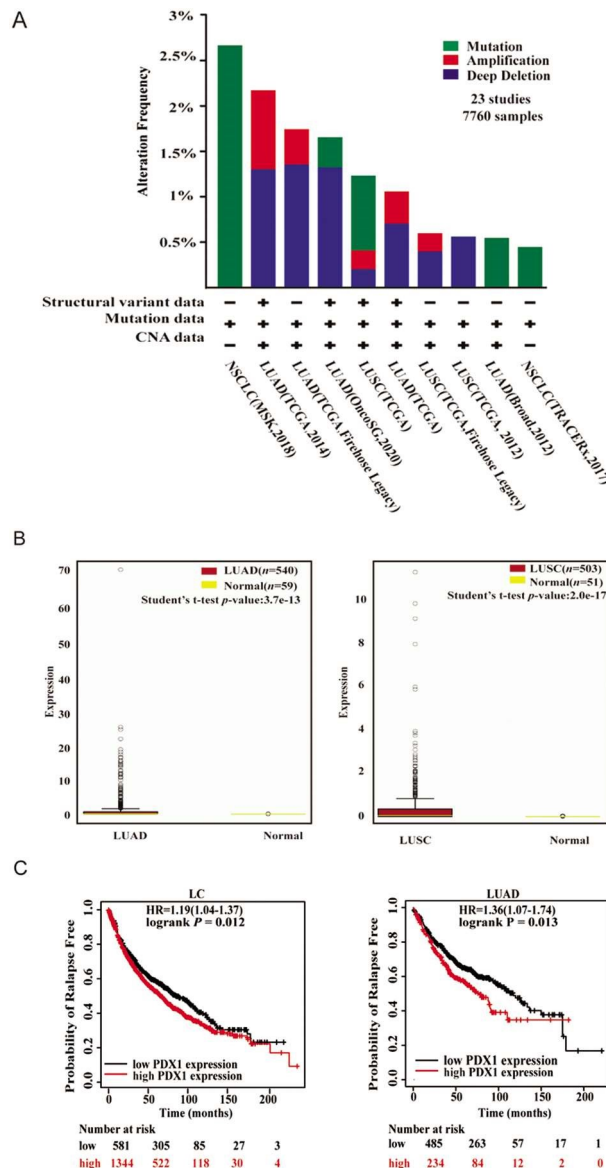


图6 PDX1 在非小细胞肺癌中高表达与患者预后不良显著相关
Fig.6 Higher expression of PDX1 is significantly associated with poor survival in NSCLC aPatients

(A) 用 cBioPorta 网站对 PDX1 基因在 NSCLC 中的突变扩增等进行分析,其中共包括 23 项研究,合计 7760 例 NSCLC 标本; (B) 比较 NSCLC 细胞中 PDX1 与正常组织的 RNA 表达水平的箱线图;肺腺癌 (左),肺鳞癌 (右); (C) Kaplan-Meier 生存分析 PDX1 基因高表达导致肺癌患者的无复发生存率显著下降 (左) 以及肺腺癌患者的无复发生存率显著下降 (右)。

(A) The frequency of PDX1 gene alteration in a variety of NSCLC was analyzed using cBioPortal, which includes 23 studies with a total of 7760 NSCLC specimens; (B) Box plots comparing RNA expression levels of PDX1 in NSCLC cells with normal tissue; lung adenocarcinoma (left), lung squamous carcinoma (right); (C) Kaplan-Meier analyses indicated PDX1 gene overexpression resulted in significantly lower relapsed-free survival in lung cancer patients (left) as well as in lung adenocarcinoma patients (right).

PDX1 又称胰岛素启动子 1 (IPF-1)、生长抑素活化因子 1 (STF-1) 或葡萄糖反应性特异转录因子 (Gsf)^[15,25]。人类 PDX1 基因包括两个外显子,中间有一段 6 kb 间隔序列,定位于 13 号

染色体^[26]。PDX1 蛋白包含 283 个氨基酸,分子量约 31 kDa。PDX1 对于胰腺前体细胞向发育中胰腺 β 细胞的分化和成熟至关重要,同时它也是 β 细胞功能胰岛素基因表达的关键调节因子^[27,28]。PDX1 的异常表达已在许多癌症中检测到,包括胰腺癌、前列腺癌,结直肠癌,胃癌,肾癌^[28-30],但是关于 PDX1 是否对 NSCLC 产生影响目前国内外尚无研究报道。

为了探究 PDX1 在 NSCLC 中所起到的作用,本课题在 A549 细胞或 H1299 细胞中外源性过表达 PDX1,或用 shRNA 沉默 PDX1 的表达,结果表明 PDX1 的表达能够抑制 E-cadherin 的表达,同时促进了 N-cadherin 及 Vimentin 等的表达,提示 PDX1 表达能促进 NSCLC 细胞的 EMT 过程。研究表明,PDX1 作为转录因子参与了多种基因的转录调控。然而,PDX1 在 NSCLC 细胞中调控 EMT 过程中 E-cadherin、N-cadherin 等基因表达,目前尚不清楚 PDX1 是否作为转录因子直接调控其转录表达,有待后续研究的阐明。

本研究同时发现,PDX1 的表达不仅能显著增强了 NSCLC 细胞的活力和非锚定依赖性生长能力,而且也明显抑制了 NSCLC 细胞的凋亡,说明 PDX1 也参与了 NSCLC 细胞的生长与凋亡等过程。此外,利用公开的肿瘤数据库对 PDX1 基因的表达进行了分析,这些数据表明,在 NSCLC 临床标本中 PDX1 表达比其在正常组织中的表达显著上升,且 PDX1 高表达与 NSCLC 患者的预后不良显著相关。以上结果表明,PDX1 的表达促进了 NSCLC 的发生发展过程。

综上所述,本研究表明,在 NSCLC 细胞中 HOXC8 作为转录因子激活 PDX1 基因的转录及表达,而 PDX1 不仅能显著地促进 NSCLC 细胞的生长及 EMT 等过程,同时也抑制了细胞凋亡。重要的是,在临床标本中 PDX1 的表达明显上调,且高表达的 PDX1 与患者的预后不良显著相关。因此,本研究表明了 HOXC8-PDX1 轴有可能成为 NSCLC 诊断和治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] H Sung, J Ferlay, R L Siegel, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249
- [2] S Lu, Y F Yu, Y Yang. Retrospect and Prospect for Lung Cancer in China: Clinical Advances of Immune Checkpoint Inhibitors [J]. *Oncologist*, 2019, 24(Suppl 1): S21-S30
- [3] Z Chen, C M Fillmore, P S Hammerman, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14 (8): 535-546
- [4] S Brown, K Banfill, M C Aznar, et al. The evolving role of radiotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Brit J Radiol*, 2019, 92 (1104): 20190524
- [5] N K Altorki, G J Markowitz, D C Gao, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(1): 9-31
- [6] C A Klein. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20 (11): 681-694
- [7] N Shah, S Sukumar. The Hox genes and their roles in oncogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5): 361-371
- [8] T Svingen, K F Tonissen. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets[J]. *Heredity*, 2006, 97(2): 88-96
- [9] H J Gu, Y J Zhong, J B Liu, et al. The Role of miR-4256/HOXC8 Signaling Axis in the Gastric Cancer Progression: Evidence From lncRNA-miRNA-mRNA Network Analysis[J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 793678
- [10] M Li, J N Cai, X R Han, et al. Downregulation of circNRIP 1 Suppresses the Paclitaxel Resistance of Ovarian Cancer via Regulating the miR-2 I I-5p/HOXC8 Axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 9159-9171
- [11] C Gong, J Zou, M S Zhang, et al. Upregulation of MGP by HOXC8 promotes the proliferation, migration, and EMT processes of triple-negative breast cancer [J]. *Mol Carcinogen*, 2019, 58 (10): 1863-1875
- [12] Y X Huang, L H Chen, A G Guo. Upregulated expression of HOXC8 is associated with poor prognosis of cervical cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7291-7296
- [13] H L Liu, M S Zhang, S S Xu, et al. HOXC8 promotes proliferation and migration through transcriptional upregulation of TGF beta 1 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(2): 1
- [14] J Zhang, M Q Yang, D J Li, et al. Homeobox C8 is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2019, 114: 105557
- [15] Y X Zhu, Q Liu, Z G Zhou, et al. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 240
- [16] M Gannon, E T Ables, L Crawford, et al. Pdx-1 function is specifically required in embryonic cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis[J]. *Dev Biol*, 2008, 314(2): 406-417
- [17] T Gao, B McKenna, CH Li, et al. Pdx1 Maintains beta Cell Identity and Function by Repressing an alpha Cell Program [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(2): 259-271
- [18] Y P Yang, F Thorel, D F Boyer, et al. Context-specific alpha-to-beta-cell reprogramming by forced Pdx1 expression[J]. *Gene Dev*, 2011, 25(16): 1680-1685
- [19] B T Sherman, M Hao, J Qiu, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221
- [20] I Pastushenko, C Blanpain. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29 (3): 212-226
- [21] M Saitoh. Involvement of partial EMT in cancer progression [J]. *J Biochem*, 2018, 164(4): 257-264
- [22] G Y Tang, M S Cho, X W Wang. OncoDB: an interactive online database for analysis of gene expression and viral infection in cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D1334-D1339
- [23] R Morgan, K Hunter, H S Pandha. Downstream of the HOX genes: Explaining conflicting tumour suppressor and oncogenic functions in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2022, 150(12): 1919-1932
- [24] Y Li, M Zhang, H Chen, et al. Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7894-7904
- [25] N S Belaguli, A Sarkar, M Zhang, et al. Regulation of Pdx-1 and insulin gene expression by serum response factor [J]. *Diabetes*, 2008, 57: A454-A454

- establish the postmitotic state of adipocyte development [J]. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(10): 1091-1098
- [14] Tchoukalova Y D, Hausman D B, Dean R G, et al. Enhancing effect of troglitazone on porcine adipocyte differentiation in primary culture: A comparison with dexamethasone[J]. *Obes Res*, 2000, 8(9): 664-672
- [15] Vishwanath D, Srinivasan H, Patil M S, et al. Novel method to differentiate 3t3 l1 cells in vitro to produce highly sensitive adipocytes for a glut4 mediated glucose uptake using fluorescent glucose analog[J]. *J Cell Commun Signal*, 2013, 7(2): 129-140
- [16] Starling S. Obesity phenotypes: Explaining the unexplained [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(12): 717
- [17] Vujovic N, Piron M J, Qian J, et al. Late isocaloric eating increases hunger, decreases energy expenditure, and modifies metabolic pathways in adults with overweight and obesity[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(10): 1486-1498 e1487
- [18] Niemann B, Haufs-Brusberg S, Puetz L, et al. Apoptotic brown adipocytes enhance energy expenditure via extracellular inosine [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 361-368
- [19] Cero C, Lea H J, Zhu K Y, et al. Beta3-adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(11): e139160
- [20] Shamsi F, Piper M, Ho L L, et al. Vascular smooth muscle-derived trpv1 (+) progenitors are a source of cold-induced thermogenic adipocytes[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(4): 485-495
- [21] Song A, Dai W, Jang M J, et al. Low- and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(1): 247-257
- [22] Chen Y T, Yang Q Y, Hu Y, et al. Imprinted lncrna dio3os preprograms intergenerational brown fat development and obesity resistance[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6845
- [23] Maliszewska K, Kretowski A. Brown adipose tissue and its role in insulin and glucose homeostasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1530
- [24] Cui L, Mirza A H, Zhang S, et al. Lipid droplets and mitochondria are anchored during brown adipocyte differentiation [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(12): 921-926
- [25] Takahashi A, Adachi S, Morita M, et al. Post-transcriptional stabilization of ucp1 mRNA protects mice from diet-induced obesity[J]. *Cell Rep*, 2015, 13(12): 2756-2767
- [26] Park S J, Shon D H, Kim J H, et al. Samm50 regulates thermogenesis of beige adipocytes differentiated from human adipose-derived stem cells by balancing mitochondrial dynamics[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6764
- [27] Lagarde D, Jeanson Y, Barreau C, et al. Lactate fluxes mediated by the monocarboxylate transporter-1 are key determinants of the metabolic activity of beige adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100137
- [28] Li H, Shen L, Zhang L, et al. Reduced beige adipogenic potential in subcutaneous adipocytes derived from obese chinese individuals[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 2551-2562
- [29] Wang Q, Pan Y, Zhao B, et al. Mir-33a inhibits the adipogenic differentiation of ovine adipose-derived stromal vascular fraction cells by targeting sirt6[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2021, 74: 106513
- [30] Liu J, Liang Y, Qiao L, et al. Mir-128-1-5p regulates differentiation of ovine stromal vascular fraction by targeting the klf11 5'-utr [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2022, 80: 106711
- [31] Li P, Fan W, Xu J, et al. Adipocyte ncor knockout decreases ppargamma phosphorylation and enhances ppargamma activity and insulin sensitivity[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 815-826
- [32] Pereira M J, Vranic M, Kamble P G, et al. Cdkn2c expression in adipose tissue is reduced in type ii diabetes and central obesity: Impact on adipocyte differentiation and lipid storage?[J]. *Transl Res*, 2022, 242: 105-121
- [33] Ikeda K, Yamada T. Adipose tissue thermogenesis by calcium futile cycling[J]. *J Biochem*, 2022, 172(4): 197-203
- [34] Kajimura S, Seale P, Spiegelman B M. Transcriptional control of brown fat development[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(4): 257-262

(上接第 1834 页)

- [26] M Stoffel, R Stein, C V Wright, et al. Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1[J]. *Genomics*, 1995, 28(1): 125-126
- [27] M A Feanny, S P Fagan, N Ballian, et al. PDX-1 expression is associated with islet proliferation in vitro and in vivo [J]. *J Surg Res*, 2008, 144(1): 8-16
- [28] S Liu, N Ballian, N S Belaguli, et al. PDX-1 acts as a potential molecular target for treatment of human pancreatic cancer [J]. *Pancreas*, 2008, 37(2): 210-220
- [29] J Yu, S H Liu, R Sanchez, et al. PDX1 associated therapy in translational medicine[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(11): 214
- [30] H Sakai, Y Eishi, X L Li, et al. PDX1 homeobox protein expression in pseudopyloric glands and gastric carcinomas [J]. *Gut*, 2004, 53(3): 323-330