

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001684

敲低同源盒 A6 (HOXA6) 抑制 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭

吴莎莎, 姜 政

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨抑制同源盒 A6(homeobox A6, HOXA6)的表达对 HCT116 结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:**构建重组干扰质粒(shRNA1, 2, 3, 4-HOXA6)和阴性对照质粒(shRNA-NC), 脂质体转染, 荧光显微镜、RT-PCR 和 Western blot 检测转染效率和表达情况。CCK-8 法和克隆形成检测增殖, Transwell 检测迁移和侵袭。Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达。**结果:**荧光显微镜显示各组转染效率均为 30% 左右; RT-PCR 和 Western blot 结果显示各干扰组 HOXA6 mRNA ($P=0.003$) 和蛋白 ($P=0.000$) 的表达均低于 shRNA-NC 组, 其中 shRNA1-HOXA6 组最低 ($P=0.000$)。CCK-8 结果显示 shRNA1-HOXA6 组的吸光度值明显低于 shRNA-NC 组 ($P=0.005$); 克隆形成结果显示 shRNA1-HOXA6 组 (132 ± 45) 克隆形成数较 shRNA-NC 组 (353 ± 45) 明显减少 ($P=0.004$); Transwell 迁移和侵袭实验显示 shRNA1-HOXA6 组 [(134 ± 28) 、 (60 ± 4)] 穿出细胞数较 shRNA-NC 组 [(276 ± 94) 、 (168 ± 50)] 明显减少 ($P=0.025$ 、 $P=0.008$)。Western blot 实验显示 shRNA1-HOXA6 组 E-cadherin (0.490 ± 0.025) 的表达较 shRNA-NC 组 (0.326 ± 0.032) 明显升高 ($P=0.003$), 而 N-cadherin (0.112 ± 0.016) 和 Vimentin (0.886 ± 0.033) 较 shRNA-NC 组 [(0.147 ± 0.013) 、 (1.159 ± 0.040)] 明显降低 ($P=0.037$ 、 $P=0.001$)。**结论:**敲低 HOXA6 表达能显著抑制结直肠癌 HCT116 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

【关键词】同源盒 A6; 结直肠癌; 增殖; 迁移; 侵袭

【中图分类号】R735.3; R392-33

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-01

Knockdown of homeobox A6 (HOXA6) inhibits proliferation, migration and invasion of HCT116 cells

Wu Shasha, Jiang Zheng

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of suppressed expression of homeobox A6 (HOXA6) on the proliferation, migration and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. **Methods:** Recombinant plasmids were constructed and transfected via Lipofectamine 2000. Transfection and interference efficiency was detected by fluorescence microscope, RT-PCR and Western blot. Moreover, cell proliferation, migration and invasion were measured by CCK-8, colony formation and Transwell assays. The protein expression of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin was identified by Western blot. **Results:** The transfection efficiency was nearly 30%. The expression of HOXA6 mRNA ($P=0.003$) and protein ($P=0.000$) was significantly lower in all interference groups than in shRNA-NC group, and the most interference efficient plasmid was shRNA1-HOXA6 ($P=0.000$). CCK-8 showed that the A450 values in shRNA1-HOXA6 group were lower than in shRNA-NC group ($P=0.005$). Colony formation revealed that the colonies in shRNA1-HOXA6 group (132 ± 45) were considerably fewer than in shRNA-NC group (353 ± 45) ($P=0.004$). Besides, Transwell assay showed that the number of migration and invasion cells was significantly fewer in shRNA1-HOXA6 group [(134 ± 28) , (60 ± 4)] than in shRNA-NC group [(276 ± 94) , (168 ± 50)] ($P=0.025$, $P=0.008$). Moreover, the protein expression of E-cadherin was higher in shRNA1-HOXA6 group (0.490 ± 0.025) than in shRNA-NC group (0.326 ± 0.032) ($P=0.003$), but N-cadherin (0.112 ± 0.016) and Vimentin (0.886 ± 0.033) expression was lower in shRNA1-HOXA6 group than in shRNA-NC group [(0.147 ± 0.013) , (1.159 ± 0.040)] ($P=0.037$, $P=0.001$).

Conclusion: Knockdown of HOXA6 expression can remarkably suppress the proliferation, migration and invasion of HCT116 colorectal cancer cells.

【Key words】homeobox A6; colorectal cancer; proliferation; migration; invasion

作者介绍: 吴莎莎, Email: wss283165@163.com,

研究方向: 消化道肿瘤的基因检测及治疗。

通信作者: 姜 政, Email: jiangz1753@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180504.1103.006.html>

(2018-05-04)

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均位居世界恶性肿瘤第 3 位,严重威胁人类健康^[1]。结直肠癌的发生和发展是多因素作用的结果,其中基因(如 p53、APC、K-ras、B-raf 及 miRNA 等)的异常改变长期存在^[2],故寻找分子标志物能为提高结直肠癌的诊断和治疗提供依据。

同源盒(homeobox, HOX)基因是一类发育基因,其编码的蛋白是重要的转录调节因子,以单体或多聚体的形式与 DNA 特定序列结合,调控细胞分化、增殖和凋亡。人类 HOX 基因目前已发现 39 个,分 A、B、C、D 四簇,分别位于染色体 7p15、17p21、12p13、2p31 上,每簇含 9~11 个基因,其家族成员均编码一段同源结构域^[3]。近期研究报道,HOX 家族参与人类多种恶性肿瘤的发生发展及预后的调控过程^[3-4],尤其是消化道肿瘤^[5]。现已证实 HOXA9、HOXA13 和 HOXB7 均在食管癌中高表达,促进食管癌细胞的增殖^[6-8]。HOXA1、HOXA10、HOXA13、HOXB7 和 HOXC6 在胃癌组织中的表达量升高,促进增殖和转移,并且与预后相关^[9-15]。在结直肠癌中,HOXB7 也表现为高表达,并能促进癌细胞的增殖,其促肿瘤的作用主要通过 MAPK 和 PI3K/AKT 通路实现^[16]。

HOXA6 是 HOX 家族 A 簇成员之一,定位于人类染色体 7p15.2,全长 2 192 bp。新近研究报道,HOXA6 基因在神经胶质瘤和急性髓系白血病等恶性肿瘤中高表达,并与细胞侵袭性、增殖、克隆形成及对化疗的敏感性相关^[17-18]。因此,具有相似结构的 HOX 家族成员被证实参与肿瘤的调控,并在结直肠癌的发生发展中起重要作用,而 HOXA6 也被发现参与某些恶性肿瘤的调控,那么 HOXA6 对肿瘤的调控作用在结直肠癌中是否同样存在? 该实验旨在通过构建 HOXA6 基因的重组干扰质粒,检测其在转染前后对结直肠癌细胞增殖、迁移及侵袭等生物学功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

HCT116 人结直肠癌细胞株购自重庆医科大学附属第一医院。细胞培养所需 RPMI1640 培养基(Hyclone)、胎牛血清(PAN)、TRIzol(Takara)与 CCK-8(同仁)保存于 4℃;Matrigel 基质胶(BD)、逆转录及 PCR 试剂盒(Promega)保存于-20℃。兔抗人 HOXA6、 β -actin 抗体及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗均购自 Immunoway 公司;兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、Vi-

mentin 抗体均购自 CST 公司;重组质粒由 GeneCopoeia 公司合成,无内毒素质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司;均保存于-20℃。Transwell 小室购自 Corning。

1.2 方法

1.2.1 干扰质粒的构建与测序 HOXA6 基因的干扰序列: shRNA1-HOXA6: CCTTGTCTACCAACAGTCC; shRNA2-HOXA6: CCTCGTGTCTATTCTGATA; shRNA3-HOXA6: GGCGCGCAAATGAGTTCCTAT; shRNA4-HOXA6: GACAAGACGTACACCTCACCT 及阴性对照序列: shRNA-NC: GCTTCGCGCCGTAGTCTTA 由 GeneCopoeia 公司构建重组质粒^[19],测序结果与模板序列比对完全一致。

1.2.2 HCT116 结直肠癌细胞培养、转染及筛选 HCT116 结肠癌细胞用含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 5% CO₂、37℃ 孵箱中培养。隔 2~3 d 换液,待细胞融合度达 80% 左右进行传代,用含 10% DMSO 的胎牛血清冻存液冻存细胞。将结肠癌细胞 HCT116 种至 6 孔板中,培养过夜,待细胞融合度达 50%~70% 进行转染。将 4 μ g 质粒和 5 μ L 脂质体(Lipofectamine 2000)^[20]分别加入 500 μ L 无血清培养基中,室温下孵育 5 min,然后将质粒和脂质体轻轻混匀,室温下孵育 20 min;弃 6 孔板中培养基,每孔加入混合液和 RPMI1640 各 1 mL,转染 6 h 后换液。转染 24 h 后消化细胞,按 10% 密度重新种板,次日加入筛选培养基(含 1 μ g/mL 嘌呤霉素),隔天换液,筛选 2 周左右可见集落形成。

1.2.3 重组质粒干扰效果的筛选

1.2.3.1 RT-PCR 法检测干扰质粒对 HOXA6 mRNA 表达的影响 转染后 48 h 提取各组细胞总 RNA。采用 Promega 逆转录试剂盒将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA。HOXA6 基因上游引物为 5'-TACACGCGTACCAGACAC-3',下游引物为 5'-GCGTGAATTGATGAGCTTGT-3',产物长度 178 bp; β -actin 上游引物为 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3',下游引物为 5'-GAAGCATTGCGGTGGACGAT-3',产物长度 315 bp。经过 HOXA6 基因 32 个循环,内参 23 个循环的 PCR 反应后,得到的产物用电泳分离(120 V、25 min),分离完成进行曝光,通过计算灰度值对 mRNA 表达量进行半定量分析^[21]。

1.2.3.2 Western blot 法检测各干扰组细胞 HOXA6 蛋白的表达 转染 72 h 后,提取细胞总蛋白(RIPA),测蛋白浓度(BCA 法)。取 40 μ g 蛋白上样,用 SDS-PAGE 电泳进行分离,转至 PVDF 膜上(恒流 250 mA)。室温下封闭 2 h,先后加入一抗兔抗人 HOXA6(1:500)、 β -actin(1:1 000)和相对应的 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:1 000),采用 ECL 法进行显影,通过计算灰度值分析蛋白的表达量^[22]。经比较 RT-PCR 和 Western blot 的结果,筛选出干扰效果最好的质粒(shRNA1-HOXA6),与阴性对照质粒(shRNA-NC)共同进行后续实验。

1.2.4 CCK-8 法检测 HCT116 细胞增殖 以只含培养基为空白对照组,shRNA-NC 组细胞为阴性对照组,shRNA1-

HOXA6 组细胞为实验组。细胞转染 48 h 后,按每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,于孵箱中培养。于种板后 24、48、72 h,每孔加入 CCK-8 混合液 110 μL (含 100 μL 完全培养基和 10 μL CCK-8 试剂),培养 2 h,待液体呈橙色时,测定 450 nm 处的吸光度(absorbance, A)值,进行统计分析^[23]。

1.2.5 HCT116 细胞克隆形成能力的检测 取筛选出的稳转 shRNA1-HOXA6 组与 shRNA-NC 组细胞,按 500 个/孔接种于 6 孔板中,每组设 3 个复孔,培养 2 周左右,待长出肉眼可见的克隆(50 个细胞左右),终止培养。吸净培养基,固定、染色各 15 min,洗净晾干、拍照计数。

1.2.6 Transwell 实验检测 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力

1.2.6.1 迁移实验 转染 48 h 后,消化收集细胞,用 RPMI 1640 培养基重悬、计数,小室上室加入 200 μL 细胞悬液(含 5×10^4 个细胞),下室加入 700 μL 完全培养基,培养 48 h 左右,待细胞穿出后取出小室,固定,染色,计数^[24-25]。

1.2.6.2 侵袭实验 按 7:1 比例用 4 $^{\circ}\text{C}$ RPMI1640 培养基稀释基质胶,于上室每孔快速加入 100 μL ,避免产生气泡,孵箱中放置 3~4 h,待其凝固后,加入 100 μL 细胞悬液(含 1×10^5 个细胞)。余下实验步骤同迁移实验。

1.2.7 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达 转染 72 h 后,提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;转膜、封闭后先后加入兔抗人 E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、鼠抗人 Vimentin(1:1 000)和相对应的二抗;余下实验步骤同前。

1.3 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行分析,GraphPad Prism 5 软件绘制统计图。所有实验均进行 3 次重复,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验;多组间

数据比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法;重复测量数据采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒在 HCT116 细胞中的表达情况

各组质粒均带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记基因,故转染后通过观察各组细胞的绿色荧光可以判断质粒在细胞内的表达情况。结果显示各转染组均可见绿色荧光(图 1),说明重组质粒转染后能在 HCT116 细胞中正常表达。以带绿色荧光的细胞数占总细胞数的比例代表转染效率,则各组中带有绿色荧光的细胞均为 30%左右,说明各组转染效率一致。

2.2 干扰质粒有效下调 HCT116 细胞 HOXA6 mRNA 和蛋白的表达水平

转染重组质粒 48、72 h 后,分别提取细胞总 RNA 和蛋白,RT-PCR 和 Western blot 法进行验证。以 β -actin 为内参,通过分析灰度值检测 HOXA6 的表达情况。RT-PCR 结果显示:shRNA1-HOXA6、shRNA2-HOXA6、shRNA3-HOXA6、shRNA4-HOXA6 组 HOXA6 mRNA 相对表达水平分别为 (0.503 ± 0.010) 、 (0.552 ± 0.011) 、 (0.686 ± 0.010) 、 (0.589 ± 0.013) ,均低于阴性对照组 (0.718 ± 0.018) (与 shRNA-NC 组比较,分别为 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.012$ 、 $P=0.000$),差异具有统计学意义($F=152.321$, $P=0.000$)。Western blot 结果显示:shRNA1-HOXA6、shRNA2-HOXA6、shRNA3-HOXA6、shRNA4-HOXA6 组 HOXA6 蛋白表达水平分别为 (0.217 ± 0.029) 、 (0.365 ± 0.040) 、 (0.767 ± 0.054) 、 (0.890 ± 0.036) ,除 shRNA4-HOXA6 组外($P=0.518$)均低于 shRNA-NC 组 (0.912 ± 0.033) (与 shRNA-NC 组比较,分别为 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.001$),具有统计学差异($F=197.735$, $P=0.000$),结果与逆转录 PCR 一致

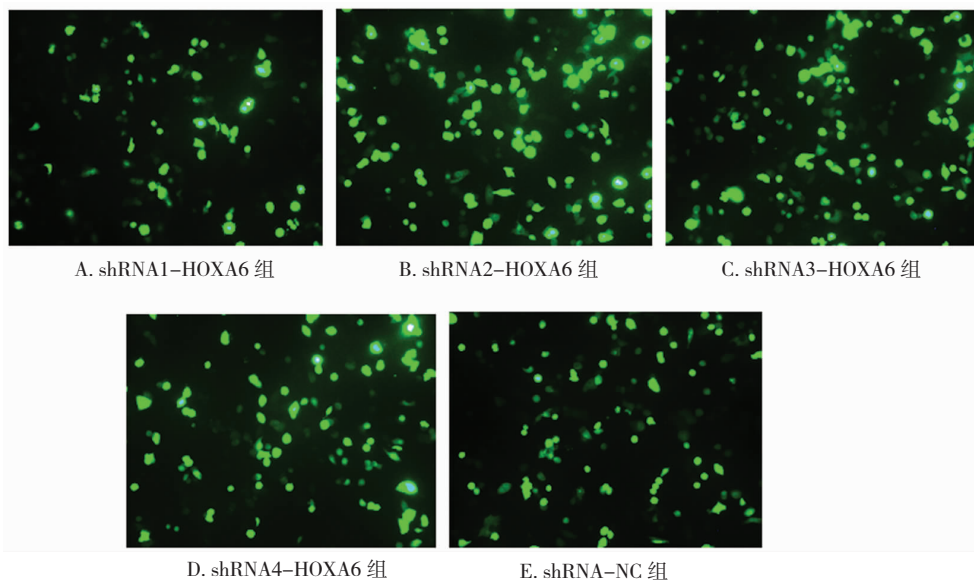
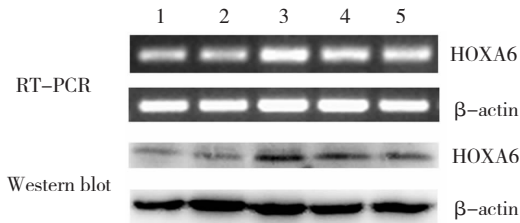


图 1 质粒转染后 HCT116 细胞荧光蛋白表达情况 (200 \times)

Fig.1 GFP expression in transfected HCT116 cells (200 \times)

(图 2)。其中 shRNA1-HOXA6 组 HOXA6 mRNA 和蛋白表达量均最低(与 shRNA2-HOXA6 组比较, $P=0.001$, 与其余各组比较均为 $P=0.000$), 故采用 shRNA1-HOXA6 组干扰质粒进行后续实验。



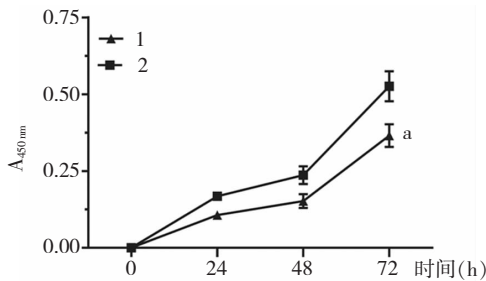
1. shRNA1-HOXA6 组; 2. shRNA2-HOXA6 组; 3. shRNA3-HOXA6 组; 4. shRNA4-HOXA6 组; 5. shRNA-NC 组

图 2 质粒转染后各组细胞 HOXA6 mRNA 和蛋白的表达

Fig.2 HOXA6 mRNA and protein expression in transfected cells

2.3 下调 HOXA6 表达可抑制 HCT116 细胞增殖

转染 HCT116 细胞后, 分别在 24、48、72 h 3 个时间点检测各组细胞 $A_{450\text{nm}}$ 值, 绘制细胞增殖曲线发现 shRNA1-HOXA6 组细胞 A 值明显低于 shRNA-NC 组, 且 2 组间吸光度值差异具有统计学意义 ($F=31.487, P=0.005$, 图 3), 各时间点吸光度值差异具有统计学意义 ($F=177.852, P=0.001$), 而时间和分组的交互作用不具有统计学意义 ($F=5.139, P=0.107$)。说明抑制 HOXA6 的表达可抑制 HCT116 细胞的增殖。



1. shRNA1-HOXA6 组; 2. shRNA-NC 组
a: 与阴性对照组比较, $P=0.005$

图 3 CCK-8 法检测细胞增殖

Fig.3 Cell proliferation detected by CCK-8 assay

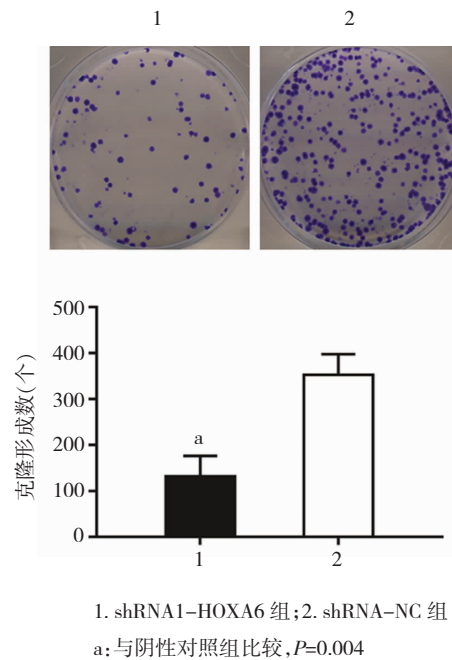
2.4 下调 HOXA6 表达抑制 HCT116 细胞克隆形成

克隆形成实验显示, shRNA1-HOXA6 组 HCT116 细胞的克隆形成数 $[(132 \pm 45)$ 个] 明显低于 shRNA-NC 组 $[(353 \pm 45)$ 个], 差异具有统计学意义 ($t=-6.051, P=0.004$, 图 4)。说明下调 HOXA6 表达可抑制 HCT116 细胞的克隆形成能力。

2.5 下调 HOXA6 表达抑制 HCT116 细胞迁移和侵袭能力

以 shRNA-NC 组为阴性对照, 随机计数 5 个非重复视野, 取平均值代表穿出细胞数。Transwell 迁移实验结果显示, shRNA1-HOXA6 组 HCT116 细胞穿膜数 $[(134 \pm 28)$ 个] 明显少于 shRNA-NC 组 $[(276 \pm 94)$ 个], 差异具有统计学意义 ($t=-3.236, P=0.025$, 图 5)。侵袭实验结果显示, shRNA1-

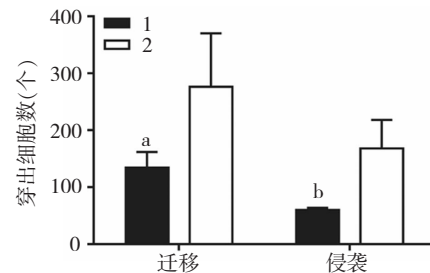
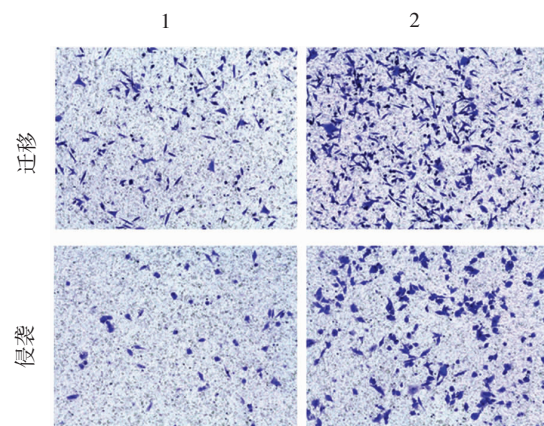
HOXA6 组 HCT116 细胞穿膜数 $[(60 \pm 4)$ 个] 明显少于 shRNA-NC 组 $[(168 \pm 50)$ 个], 差异具有统计学意义 ($t=-4.835, P=0.008$, 图 5)。说明下调 HOXA6 表达可明显抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力。



1. shRNA1-HOXA6 组; 2. shRNA-NC 组
a: 与阴性对照组比较, $P=0.004$

图 4 克隆形成法检测细胞增殖

Fig.4 Cell proliferation detected by colony formation



1. shRNA1-HOXA6 组; 2. shRNA-NC 组

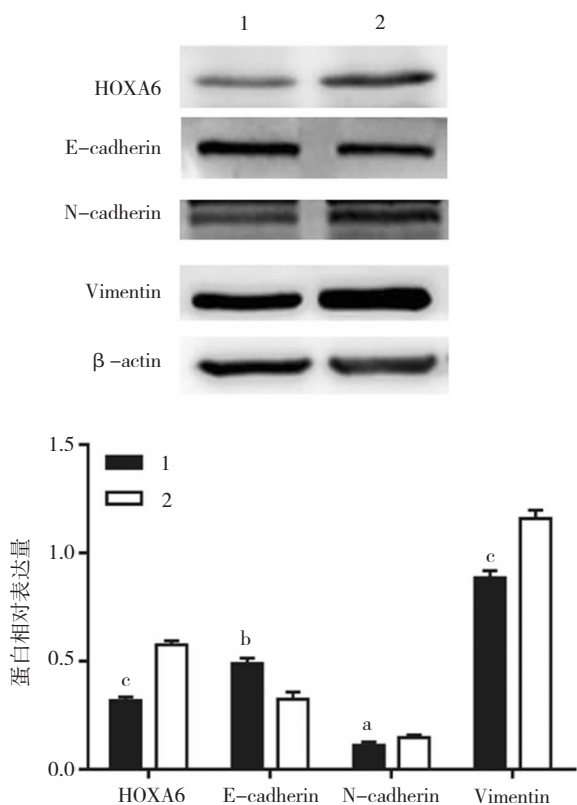
a: 与阴性对照组比较, $P=0.025$; b: 与阴性对照组比较, $P=0.008$

图 5 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力

Fig.5 Cell migration and invasion detected by Transwell assay

2.6 下调 HOXA6 表达增加 HCT116 细胞 E-cadherin 蛋白表达,降低 N-cadherin、Vimentin 的表达水平

以 β -actin 为内参,shRNA-NC 为阴性对照组,通过分析灰度值定量检测蛋白的表达情况。Western blot 检测结果显示,shRNA1-HOXA6 组 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 表达水平分别为(0.490 ± 0.025)、(0.112 ± 0.016)、(0.886 ± 0.033),shRNA-NC 组分别为(0.326 ± 0.032)、(0.147 ± 0.013)、(1.159 ± 0.040)。与 shRNA-NC 组相比,shRNA1-HOXA6 组 E-cadherin 蛋白表达量明显升高($t=7.034, P=0.003$,图 6),N-cadherin 表达量明显降低($t=-3.103, P=0.037$,图 6),Vimentin 表达量也明显降低($t=-9.141, P=0.001$,图 6),差异具有统计学意义。



1. shRNA1-HOXA6 组;2. shRNA-NC 组

a: 与阴性对照组比较, $P=0.037$; b: 与阴性对照组比较, $P=0.003$; c: 与阴性对照组比较, $P=0.000$ (HOXA6)和 $P=0.001$ (Vimentin)

图 6 Western blot 法检测 HCT116 细胞 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin 蛋白表达

Fig.6 E-cadherin, N-cadherin and Vimentin protein expression in HCT116 cells detected by Western blot

3 讨论

肿瘤的发生发展与多种因素有关,包括不良的

生活习惯以及环境的长期作用等。目前研究表明肿瘤的发生是多基因变化的结果,而且这种基因水平上的异常是长期存在的,找到这些发生改变的基因,可以为肿瘤的早期诊断和治疗提供依据。

本研究成功构建了 HOXA6 的重组干扰质粒,并通过 RT-PCR 和 Western blot 实验证实转染干扰质粒能有效下调 HOXA6 的表达水平。在功能实验部分,通过 CCK-8 实验和克隆形成实验证实下调 HOXA6 表达后,细胞的增殖能力明显减弱;Transwell 实验证实敲低 HOXA6 的表达导致细胞迁移和侵袭能力的降低。肿瘤的转移是导致不良预后的主要原因,针对迁移侵袭能力的改变,检测了 EMT 相关蛋白的表达变化。Western blot 实验证实下调 HOXA6 的表达后,E-cadherin 蛋白的表达增加,而 N-cadherin 蛋白和 Vimentin 蛋白的表达降低,抑制了 EMT 过程,从而抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力。

研究发现,HOXA6 在结直肠癌 HCT116 细胞中参与细胞增殖、迁移和侵袭等过程,从现象和机制上证实了 HOXA6 具有调控 HCT116 细胞迁移和侵袭的作用。但该研究尚存不足之处:对细胞增殖的具体作用机制有待更深入的研究;仅采用了一个细胞系,需要在其他结直肠癌细胞系中加以验证;有待进一步在临床组织中加以验证。大量研究证实 Wnt/ β -catenin 信号转导通路在结直肠癌的浸润和转移等过程中发挥重要作用^[26-28]。HOX 家族成员 HOXB5 也被证实通过 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥促癌作用,为进一步研究提供了方向^[29]。此外,HOXA6 作为转录因子,通过调节下游基因的表达发挥作用,后续实验可以通过寻找其作用靶点,以了解其具体作用机制。

综上所述,在结直肠癌 HCT116 细胞中,利用 RNA 干扰技术有效敲减 HOXA6 的表达,可以抑制 HCT116 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,提示 HOXA6 在 HCT116 细胞中发挥致癌的作用,为结直肠癌的诊断和治疗提供了依据。

参 考 文 献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
 [2] 张利飞, 裴海平. 结直肠癌预后预测研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4): 581-588.
 [3] 牛苗苗, 战 军, 张宏权. HOX 基因在肿瘤发生发展过程中的

- 作用[J]. 解剖学报, 2014, 45(3): 430-436.
- [4] 周 薇, 赵龙凤, 徐恩伟. 同源盒基因家族与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(4): 532-535.
- [5] 郭玉霖, 公凤霞, 曹 李, 等. 同源异形基因与消化道肿瘤研究进展[J]. 人民军医, 2016, 59(7): 743-745.
- [6] Takahashi O, Hamada J, Abe M, et al. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(4): 753-760.
- [7] Lv J, Cao XF, Ji L, et al. Association of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9, and Bmi-1 with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1): 151-160.
- [8] Gu ZD, Shen LY, Wang H, et al. HOXA13 promotes cancer cell growth and predicts poor survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 4969-4973.
- [9] Han Y, Lu S, Wen YG, et al. Overexpression of HOXA10 promotes gastric cancer cells proliferation and HOXA10(+)/CD44(+) is potential prognostic biomarker for gastric cancer[J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(12): 642-652.
- [10] Sentani K, Oue N, Naito Y, et al. Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1081-1088.
- [11] He YX, Song XH, Zhao ZY, et al. HOXA13 upregulation in gastric cancer is associated with enhanced cancer cell invasion and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 258-265.
- [12] He X, Liu Z, Xia Y, et al. HOXB7 overexpression promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in gastric cancer patients by inducing expression of both AKT and MARKs[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1247-1261.
- [13] Joo MK, Park JJ, Yoo HS, et al. The roles of HOXB7 in promoting migration, invasion, and anti-apoptosis in gastric cancer[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(10): 1717-1726.
- [14] Chen SW, Zhang Q, Xu ZF, et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3261-3268.
- [15] Zhang Q, Jin XS, Yang ZY, et al. Upregulated Hoxc6 expression is associated with poor survival in gastric cancer patients[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(4): 439-445.
- [16] Liao WT, Jiang D, Yuan J, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): 3569-3578.
- [17] Guo YB, Shao YM, Chen J, et al. Effect of overexpression of HOX genes on its invasive tendency in cerebral glioma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 75-80.
- [18] Dickson GJ, Liberante FG, Kettyle LM, et al. HOXA/PBX3 knock-down impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy[J]. *Haematologica*, 2013, 98(8): 1216-1225.
- [19] Cheng TL, Chang WT. Construction of simple and efficient DNA vector-based short hairpin RNA expression systems for specific gene silencing in mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 408: 223-241.
- [20] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications[J]. *Methods*, 2004, 33(2): 95-103.
- [21] 孙晓东, 王 珺, 龚 坚, 等. 逆转录 PCR(RT-PCR)实验操作要点[J]. 现代医药卫生, 2009, 25(13): 2049.
- [22] Kurien BT, Scofield RH. Western blotting[J]. *Methods*, 2006, 38(4): 283-293.
- [23] 张会鲜, 何琪杨. CCK-8 法检测药物影响肿瘤细胞增殖的优化研究[J]. 药学研究, 2016, 35(2): 63-66.
- [24] 周云飞, 张爱华, 刘文虎. Transwell 模拟生物屏障[J]. 北京生物医学工程, 2009, 28(6): 657-660.
- [25] 高 伟, 陈 强, 牛海涛, 等. 前列腺癌细胞 Transwell 小室体外侵袭模型的建立及应用价值研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(8): 1462-1465.
- [26] Bahrami A, Amerizadeh F, ShahidSales S, et al. Therapeutic potential of targeting Wnt/ β -catenin pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 1979-1983.
- [27] Hseu YC, Chao YH, Lin KY, et al. *Antrodia camphorata* inhibits metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition via the modulation of claudin-1 and Wnt/ β -catenin signaling pathways in human colon cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208: 72-83.
- [28] Ba S, Xuan Y, Long ZW, et al. MicroRNA-27a promotes the proliferation and invasiveness of colon cancer cells by targeting SFRP1 through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5): 1920-1933.
- [29] Hong CS, Jeong O, Piao Z, et al. HOXB5 induces invasion and migration through direct transcriptional up-regulation of β -catenin in human gastric carcinoma[J]. *Biochem J*, 2015, 472(3): 393-403.

(责任编辑: 冉明会)