

HOXB7基因对裸鼠结肠癌肺转移模型的致癌机制研究

王艺, 张晓微, 房爱春

(大连大学附属新华医院普通外科, 辽宁 大连 116021)

【摘要】 目的 探讨HOXB7基因对裸鼠结肠癌肺转移模型的致癌机制。方法 将转染pcDNA6-scramble或pcDNA6-HOXB7基因重组质粒的HT29人结肠癌细胞株,经裸鼠尾静脉注入后建立稳定的结肠癌肺转移模型。模型裸鼠共20只,其中10只HOXB7组(研究组)和10只Scramble组(对照组)。制模8周,观察两组裸鼠肺转移瘤情况及生存情况。结果 两组制模成瘤率为100%(20/20)。研究组肿瘤体质量和肿瘤大小检测值分别为0.093 g和0.960 mm,明显大于对照组的0.069 g和0.720 mm,差异均有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,研究组肿瘤多呈非边缘型、非类圆形、浸润型生长,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组生存曲线分析,发现研究组生存率为50%,明显劣于对照组的90%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 HOXB7基因可促使裸鼠结肠癌肺转移模型的转移形成,且可作为结肠癌肺转移的优良评价指标;HOXB7基因的加入可反馈结肠癌肺转移的模拟演变过程,且可被称为理想的实验小动物模型。

【关键词】 HOXB7基因;裸鼠;结肠癌肺转移;致癌机制

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)20-2816-04

Carcinogenic mechanisms of HOXB7 in the nude mouse models of pulmonary metastases from colon cancer.

WANG Yi, ZHANG Xiao-wei, FANG Ai-chun. Department of General Surgery, the Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, Liaoning, CHINA

【Abstract】 Objective To establish of carcinogenic mechanisms of HOXB7 in the nude mouse model of pulmonary metastases from colon cancer. **Methods** HT29 human colon cancer cells, transfected by pcDNA6-HOXB7 of recombinant vector or pcDNA6-scramble vector, were injected into tail vein of nude mice to establish the nude mouse models of pulmonary metastases from colon cancer. Among the 20 cases who underwent pulmonary metastases from colon cancer model, 10 cases were transfected by recombinant vector pcDNA6-HOXB7 (the study group) and 10 cases were transfected by pcDNA6-scramble vector (the control group). The formation situation of metastatic tumor and the survival status of nude mouse models in the two groups were observed 8 weeks after the establishment of models. **Results** The rates of tumor formation were 100% (20/20) in the two groups. The tumor weight and tumor size of the study group were 0.093 g and 0.960 mm, respectively, which were significantly greater than corresponding 0.069 g and 0.720 mm in the control group ($P<0.05$). Compared to the control group, the tumor in the study group were mostly non-marginal type, non-cycloidal type, and infiltrating type ($P<0.05$). The survival curves showed that the survival rate of the study group was 50%, which was significantly less than 90% in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** HOXB7 gene may be promote the formation of the nude mouse model of pulmonary metastases from colon cancer, and it can be regarded as an indicator for evaluating pulmonary metastases from colon cancer. The addition of HOXB7 gene can feedback the simulated evolution of pulmonary metastases from colon cancer, and serve as an ideal experimental small animal model.

【Key words】 HOXB7 gene; Nude mouse; Pulmonary metastases from colon cancer; Carcinogenic mechanisms

结肠癌肺转移多发生在肝转移后,且手术切除的机会不多^[1]。即使不断尝试结肠癌肺转移的手术切除、放化疗、射频消融等多学科综合治疗模式,也无法提高其生存率^[2-4]。由于阻断肺转移对结肠癌的治疗至关重要,因此探究结肠癌肺转移的特异性早期诊断或靶向治疗已迫在眉睫。在HOX基因的研究初期,作用机制只限制在调控胚胎发育期细胞的增殖与分化;研究后期又发现,HOX基因在恶性肿瘤中的异常表达,并积极参与肿瘤的发展或预后^[5]。近期发现HOXB7基因在多种成体细胞中与上皮细胞间质转化或恶性转化有关,且在恶性肿瘤中调控肿瘤血管生成

及早期转移^[6]。因此,建立理想的结肠癌肺转移模型将对结肠癌转移机制的研究提供强有力的实验依据。本研究首次采用裸鼠结肠癌肺转移模型,探讨HOXB7对模型的致癌机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料 20只18~20 g 7周龄雌性实验裸鼠购于大连医科大学实验动物研究所。转染基因重组质粒pcDNA6-HOXB7和pcDNA6-scramble的HT29人结肠癌细胞株由大连大学附属新华医院中心实验室构建并完成。细胞培养相关试剂及H&E染色相关试剂由大连大学附属新华医院中心实验室

通讯作者:张晓微。E-mail:12348450@qq.com

提供。此实验经大连大学附属新华医院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及混悬液制备 将转染的HT29人结肠癌细胞株分别在摄氏37℃、5% CO₂,含10%胎牛血清RPMI 1640培养液中传代培养,每2~3 d更换1次培养液。培养至80%~90%融合后,采用0.25%胰酶进行消化,1 000 r/min离心3 min,抛弃上清液,加无血清RPMI 1640培养液洗细胞3次,显微镜下计数,用无血清RPMI 1640培养液调整细胞浓度至5×10⁷/mL,共2~3 mL。已制备的细胞混悬液用冰浴保存,在30 min内进行接种。

1.2.2 动物实验设计 制模前实验裸鼠安定期为1周,对实验裸鼠防止一切刺激性操作。模型裸鼠共20只,其中10只HOXB7组(研究组)和10只Scramble组(对照组)。实验裸鼠观察周期为8周。

1.2.3 放大镜辅助下裸鼠异位结肠癌肺转移模型的建立 实验裸鼠选择地氟醚进行全麻。在放大镜辅助下准确选择实验裸鼠尾静脉,采用33号细针头在尾静脉拟皮试型入针约2 mm,缓慢注入已转染的HT29人结肠癌细胞混悬液100 μL(细胞数为5×10⁶),注射完毕后拔针时用棉球轻轻按压3 s。建立模型过程中,应防止穿透实验裸鼠尾静脉及癌细胞的渗漏。

1.2.4 实验裸鼠观察指标及制作生存表 每天观察并记录实验裸鼠一般状态。裸鼠如濒临死亡或观察期满8周予以处死。实验裸鼠处死后完整解剖胸腔内脏器和颈部,包括双侧肺脏、心脏及主气管完整取出;观察并记录肺脏肿瘤大小、肿瘤个数、肿瘤体质

量,整理并制作生存表。

1.2.5 HE染色 4%多聚甲醛充分固定肺脏,以成瘤部位为中心切开并制作组织蜡块,4 μm厚度切片后进行HE染色,并在显微镜下观察肿瘤生长方式。

1.3 统计学方法 应用SPSS20.0统计软件包进行数据分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用*t*检验,计数资料比较采用χ²检验,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组裸鼠制模后形态学改变 两组制模成瘤率为100%(20/20)。裸鼠制模后期两组裸鼠均出现厌食、体型消瘦、皮肤无光泽、活动缓慢、排泄物少等现象。研究组肿瘤体质量和肿瘤大小检测值分别为0.093 g和0.960 mm,明显大于对照组的0.069 g和0.720 mm,差异有统计学意义(*P*<0.05),但两组间肿瘤个数比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1。

表1 两组裸鼠制模后的成瘤情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肿瘤体质量(g)	肺肿瘤大小(mm)	肿瘤个数
对照组	10	0.069±0.024	0.720±0.175	1.400±0.699
研究组	10	0.093±0.022	0.960±0.207	1.500±0.707
<i>t</i> 值		-2.336	-2.803	-0.318
<i>P</i> 值		0.031	0.012	0.754

2.2 两组裸鼠制模后组织学改变 显微镜下观察发现,与对照组相比,研究组肿瘤多呈非边缘型、非类圆形、浸润型生长,差异具有统计学意义(*P*<0.05),见表2。与对照组相比,研究组肿瘤细胞排列更紧密、核膜更清晰、部分出现分裂相、周围血管生成,见图1。

表2 两组裸鼠制模后的肿瘤生长方式比较[只(%)]

组别	例数	肿瘤位置		肿瘤形状		肿瘤侵袭	
		边缘型	非边缘型	类圆形	非类圆形	膨胀型	浸润型
对照组	10	10(100.0)	0(0)	10(100.0)	0(0)	9(90.0)	1(10.0)
研究组	10	3(30.0)	7(70.0)	1(10.0)	9(90.0)	3(30.0)	7(70.0)
χ ² 值		10.769		16.364		7.500	
<i>P</i> 值		<0.01		<0.01		<0.01	

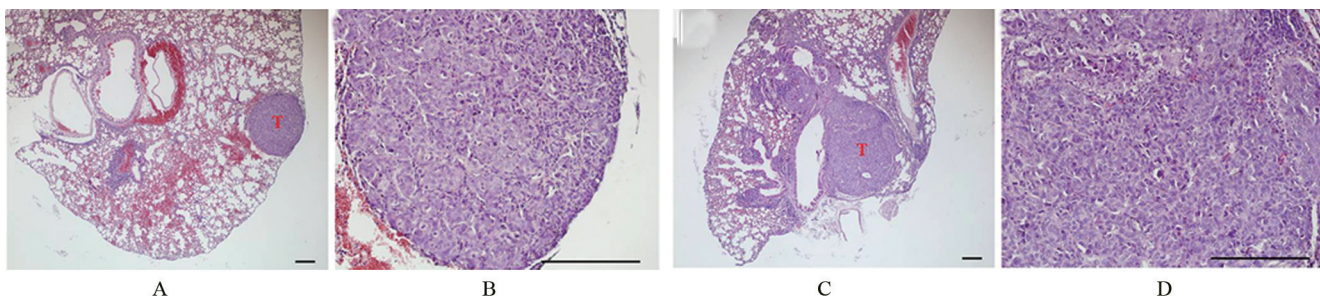


图1 研究组和对照组的显微镜下观察

注:A,对照组显微镜下观察(×40);B,对照组显微镜下观察(×200);C,研究组显微镜下观察(×40);D,研究组显微镜下观察(×200);其刻度标尺为100 μm。

2.3 两组裸鼠的生存情况比较 对照组濒临死亡处死1只,而观察期满8周处死9只,生存率为90%;研究组濒临死亡处死5只,而观察期满8周处死5只,

生存率为50%。两组生存曲线分析发现研究组生存率明显低于对照组,差异具有统计学意义(*P*=0.036),见图2。

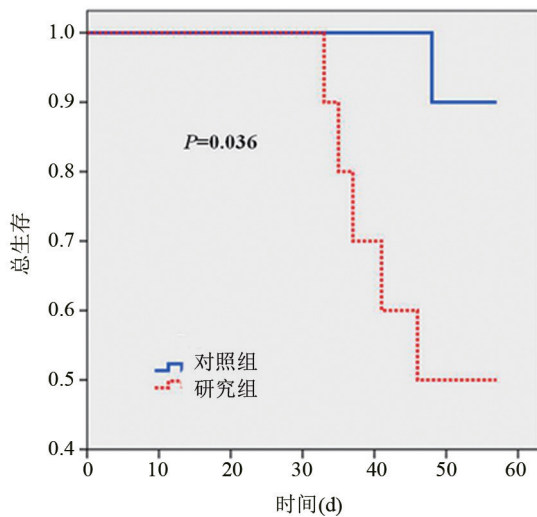


图2 研究组和对照组的总生存曲线比较

3 讨论

结肠癌肺转移途径主要由肿瘤细胞通过血性转移的方式到达宿主肺脏并继续增殖生长,且肺转移灶与原发结肠癌有相同的肿瘤学行为。由于肺循环特性中携有肺动脉及支气管动脉的双重血供,且肺动脉具有较高的凝固纤溶活性,而易发生肺转移^[7]。结肠癌肺转移发病率为1.7%~2.6%,且由于肺转移常发生于肝转移后,少有不伴肝转移的结肠癌肺转移发生,手术切除转移灶的机会也不多^[8],因此能否阻断肺转移对结肠癌治疗至关重要。近期研究发现,HOXB7 mRNA或HOXB7蛋白在肺腺癌细胞株中均表达上调,并HOXB7蛋白在肺腺癌组织中呈高表达,且在肺腺癌中的HOXB7表达与病理分期及临床分期均有明显相关性^[9-10]。另有研究证实,HOXB7高表达是结直肠癌术后复发和转移的独立影响因素^[11-12]。因此,HOXB7高表达为结直肠癌或肺腺癌进展的重要机制,也是结直肠癌或肺腺癌预后的重要指标。目前,在所有结直肠癌肺转移数据中,关于HOXB7的转移机制研究寥寥无几,其临床意义及预后仍有待于进一步探讨^[13]。因此,本研究首次采用裸鼠结肠癌肺转移模型,加以明确了HOXB7在结肠癌肺转移中的地位,也进一步延伸到了能否将其作为肺转移的早期诊断或靶点阻断研究中。

本研究结果证实,研究组肿瘤体质量和肿瘤大小检测值均明显大于对照组,并证实对照组肿瘤呈边缘型、类圆形、膨胀型生长,而研究组肿瘤呈非边缘型、非类圆形、浸润型生长;还发现研究组生存率明显劣于对照组;说明HOXB7在结肠癌肺转移模型中具有较强的致癌并促癌作用。

关于实验方法的选择,目前建立肺转移动物模型的方法比较单一,主要制模途径依然是选用操作方便的腔静脉系^[14]。在肺转移动物模型建立的理论和实践中,总能遇到“肝-肺双重转移”的担忧,或只形成“肝单一转移”的困惑。而且在肺转移动物模型制作过程

中,目前能熟练掌握导致肺转移灶为单个或多个,但比较局限的多个肺转移灶制模技巧仍不太容易。因此诸多研究者仍在寻求如何建立“理想的”肺转移动物模型,并经常遇到一些困难,如:①宿主的选择:目前常选用具有免疫缺陷的裸鼠,但饲养要求比较严格;无法寻求不需要严格无菌要求的“理想宿主”;但针对乳腺癌肺转移者,可采用饲养要求不严格并不具有免疫缺陷的C3H/He小鼠^[15]。②癌细胞的选择:目前常选用外源癌细胞通过尾静脉进行接种,因其富于高转移率或强稳定性;难于寻求不需要外源癌细胞,实验动物即可自发性结肠癌后肺转移之“理想的符合病理演变模型”。本次实验成功的建立了理想的裸鼠结肠癌肺转移模型,规避了以上困难,值得借鉴推广。成功的原因归功于:①充足的预实验;②选择33#细针头及拟皮试型入针方式;③完整解剖胸腔内器官及气管;④显微镜下观察肿瘤位置、形状及侵袭;⑤整理并制作生存表。

总之,HOXB7基因可促使裸鼠结肠癌肺转移模型的转移形成,并可作为结肠癌肺转移的优良评价指标;HOXB7基因的加入可反馈结肠癌肺转移的模拟演变过程,且可称为理想的实验小动物模型。

参考文献

- Nakagiri T, Tokunaga T, Kunoh H, et al. Surgical treatment following chemo-targeted therapy with bevacizumab for lung metastasis from colorectal carcinoma: analysis of safety and histological therapeutic effects in patients treated at a single institution [J]. Case Rep Oncol, 2018, 11(1):98-108.
- Wang Z, Wang X, Yuan J, et al. Survival Benefit of palliative local treatments and efficacy of different pharmacotherapies in colorectal cancer with lung metastasis: results from a large retrospective study [J]. Clin Colorectal Cancer, 2018, 17(2): e233-e235.
- 周逸鸣, 姜格宁, 朱余明. 结直肠癌肺转移瘤的外科治疗进展[J]. 中华外科杂志, 2013, 51(10): 930-932.
- 傅忠, 向世兰, 包忠英, 等. ¹²⁵I放射性粒子在消化系统来源肺转移瘤介入治疗中应用[J]. 海南医学, 2007, 18(10): 87-88.
- Cantile M, Scognamiglio G, La Sala L, et al. Aberrant expression of posterior HOX genes in well differentiated histotypes of thyroid cancers [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 21727-21740.
- Zhuang L, Li WH, Li K, et al. HoxB7 promotes growth and metastasis of lung adenocarcinoma cells through regulation of the TGF- β /SMAD3 signaling [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2015, 29(3): 601-608.
- Iwasaki A, Hamanaka W, Harnada T, et al. Significance of platelet counts in patients who underwent surgical treatment for lung metastasis [J]. Int Surg, 2007, 92(2): 103-109.
- Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, et al. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29765.
- Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, et al. A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair [J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1527-1535.
- Wu X, Chen H, Parker B, et al. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9527-9234.

线粒体分裂因子促进肝癌转移的作用

耿西林,常虎林,张煜,海军,张智勇,郑伟,杜立学
(陕西省人民医院肝胆外科,陕西 西安 710068)

【摘要】 目的 研究线粒体分裂因子(MFF)在肝癌转移中的调控作用。方法 利用免疫组化实验,检测12对原发灶组织与转移灶组织中MFF的表达,以明确肝癌转移过程中MFF的表达变化;下调MFF表达后,用细胞划痕实验检测对肝癌细胞迁移的影响;下调MFF表达后,用Transwell实验检测对肝癌细胞侵袭的影响。结果 肝癌转移灶组织中MFF表达明显高于原发灶[(0.70±0.06) vs (0.43±0.04)],差异有统计学意义($P<0.05$);下调MFF可明显抑制肝癌细胞的迁移[siCtrl vs si-MFF-1 vs si-MFF-2=(77.85±3.65) vs (48.32±1.53) vs (45.32±2.76)],差异有统计学意义($P<0.05$);下调MFF可明显抑制肝癌细胞的侵袭[siCtrl vs si-MFF-1 vs si-MFF-2=(29.31±3.53) vs (18.72±2.86) vs (17.68±2.03)],差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MFF表达在肝癌转移过程中显著升高,促进了肝癌细胞的迁移与侵袭,提示MFF分子是潜在的肝癌治疗靶点。

【关键词】 线粒体分裂;线粒体分裂因子;转移;肝癌

【中图分类号】 R735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)20-2819-04

Effect of mitochondrial fission factor on the metastasis of hepatocellular carcinoma. GENG Xi-lin, CHANG Hu-lin, ZHANG Yu, HAI Jun, ZHANG Zhi-yong, ZHENG Wei, DU Li-xue. Department of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the role of mitochondrial fission factor (MFF) in the regulation of metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** Immunohistochemistry analysis was applied to evaluate the expression levels of MFF in the 12-paired primary and metastatic tissues of HCC; the effect of MFF knockdown on the migration of HCC cells was assessed by the scratch wound healing assay; the effect of MFF knockdown on the invasion of HCC cells was assessed by the transwell invasion assay. **Results** The expression of MFF in the metastatic HCC tissues was significantly higher than that in primary HCC tissues: primary tissues (0.43±0.04) vs metastatic tissues (0.70±0.06), $P<0.05$. The knockdown of MFF significantly suppressed the migration of HCC cells: siCtrl (77.85±3.65) vs si-MFF-1 (48.32±1.53) vs si-MFF-2 (45.32±2.76), $P<0.05$. The knockdown of MFF significantly suppressed the invasion of HCC cells: siCtrl (29.31±3.53) vs si-MFF-1 (18.72±2.86) vs si-MFF-2 (17.68±2.03), $P<0.05$. **Conclusion** The expression of MFF is significantly elevated during the metastasis of HCC, which promotes both the migration and invasion of HCC cells, suggesting MFF could serve as a therapeutic target for the treatment of HCC.

【Key words】 Mitochondrial fission; Mitochondrial fission factor (MFF); Metastasis; Hepatocellular carcinoma (HCC)

线粒体是真核细胞的能量工厂,细胞生命活动所需约80%的能量均由线粒体提供。除调控细胞能量代谢外,线粒体还参与细胞凋亡、氧化应激与钙离子平衡等多个生物学过程的调控^[1-3]。线粒体在细胞中并非以静止和孤立的形式存在,而是通过分裂与融合不断调控着自身的形态与功能^[4],进而保证细胞生理功能的发挥^[5]。近年来,线粒体分裂融合异常被证实

与多种人类疾病,如神经退行性疾病^[6]、心血管疾病^[7]与糖尿病^[8]的发生发展关系密切^[9-10]。同时,人们相继在多种肿瘤中观察到线粒体分裂与融合的异常,尤其以线粒体分裂增强最为常见。线粒体分裂增强被证实可明显促进肿瘤细胞的增殖^[11-13]。

线粒体分裂因子(mitochondrial fission factor, MFF)是参与线粒体分裂调控的关键蛋白之一^[12]。尽

通讯作者:杜立学。E-mail:lixuedu_xa@163.com

- *****
- [11] Bitu CC, Carrera M, Lopes MA, et al. HOXB7 expression is a prognostic factor for oral squamous cell carcinoma [J]. *Histopathology*, 2012, 60(4): 662-665.
- [12] 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.
- [13] Chen H, Lee JS, Liang X, et al. Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression

- and lung metastasis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(10): 3637-3644.
- [14] Chakedis J, Schmidt CR. Surgical treatment of metastatic colorectal cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2018, 27(2): 377-399.
- [15] Berger S, Ronovsky M, Horvath O, et al. Impact of maternal immune activation on maternal care behavior, offspring emotionality and intergenerational transmission in C3H/He mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 70: 131-140.

(收稿日期:2018-05-24)