

RNA 干扰沉默 HOXA2 基因表达对肝癌细胞株行为的影响

胡晓璐¹, 王一成², 欧 伶¹

摘要 目的 研究同源异型盒 A2 (HOXA2) 基因对肝癌细胞生长、细胞周期及凋亡的影响, 探讨其作为潜在肝癌治疗靶点的可行性。方法 采取实时定量 PCR 和逆转录 PCR 检测 HOXA2 基因的表达情况; siRNA 干扰 HOXA2 基因在肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 中表达, 通过 CCK-8 评价肝癌细胞增殖情况, 采用软琼脂克隆形成试验评价锚泊非依赖生长情况, 流式细胞术分析细胞周期及细胞凋亡。结果 实时定量 PCR 和逆转录 PCR 检测结果显示 HOXA2 基因在肝癌组织中表达上调 ($P < 0.05$)。针对 HOXA2 基因设计合成 siRNAs 能够特异性沉默 HOXA2 基因在肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 中的表达, 在干扰了 HOXA2 基因表达后肝癌细胞株的软琼脂克隆形成能力和肝癌细胞增殖能力均受到不同程度的抑制。流式细胞结果表明, 干扰 HOXA2 基因表达能够减缓细胞周期进展, 使肝癌细胞阻滞于 G₁ 期, 并且 S 期减少。Annexin V 和 PI 双染色细胞凋亡实验表明, 干扰 HOXA2 基因能促进肝癌细胞凋亡。结论 HOXA2 基因可以较显著影响肝癌细胞增殖和凋亡。

关键词 RNA 干扰; 同源异型盒基因; 肝癌; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号 Q 291

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0154-06

肝细胞肝癌的发生发展多伴有逐步增加的遗传不稳定性, 包括基因组不稳定性 and 微卫星不稳定性^[1-2]。同源异型盒基因 (homeobox genes, HOX),

在生物发育过程中发挥重要作用, 其异常表达参与人类多种恶性肿瘤的发生、发展及预后^[3-4]。HOX 基因分为 HOX A、HOX B、HOX C 和 HOX D 四簇, 各簇分别定位于不同染色体的特定区域, 其中 HOX A 定位于 7p15.3^[5-6]。该基因表达蛋白具有 DNA 结合及转录因子活性, 通过结合在 DNA 相应位置并启动相关基因转录从而调控胚胎及成体细胞增殖、分化。该基因异常表达会导致异常形态结构的形成, 进而导致细胞恶性转化为肿瘤^[7-8]。该文通过对 HOXA2 基因在肝癌中功能研究, 为进一步研究可能的肝癌分子标志物或肝癌治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2006 年 1 月 ~ 2011 年 11 月无锡市人民医院部分住院肝癌患者手术切取病灶及周围 5 cm 以外的组织分别作为癌组织和相应的癌旁组织, 放入液氮中并移至 -80 °C 冰箱保存。所获取的原发性癌灶及癌旁的诊断均以病理诊断为最终依据。依据埃德曼 (Edmondson) 分级标准, 临床手术获得的肝癌样本大多数为 II ~ III 级。本研究所用的组织样本 (约 1 cm³) 均来源于患者的原发性癌灶和癌旁组织, 共 63 例, 男 52 例, 女 11 例, 年龄 30 ~ 75 (60 ± 8) 岁。每例样本的获得均符合相关的伦理学规定。

1.2 方法

1.2.1 组织 RNA 抽提 首先将匀浆所用器皿进行去除 RNA 酶处理, 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水浸泡数分钟后, 200 °C 烘干 4 h; 待器皿冷却至室温后, 加入液氮预冷。将组织从液氮中迅速取出研磨成粉末

2013-08-08 接收

基金项目: 上海市自然科学基金 (编号: 07ZR14082)

作者单位: ¹ 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

² 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203

作者简介: 胡晓璐, 女, 硕士研究生;

欧 伶, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ouling@ecust.edu.cn

SP600125 remarkably inhibited the activation of JNK1/2 and increased the cell growth inhibitory rate and apoptosis rate in MCF-7 cells induced by high glucose compared with those treated with high glucose only. **Conclusion** High glucose can stimulate the proliferation of MCF-7 cells *in vitro*. Inhibition of JNK signaling pathway in MCF-7 cells can significantly inhibit cell proliferation and promote apoptosis. JNK signaling pathway may play an important role in the high glucose-induced proliferation of MCF-7 cells.

Key words c-jun N-terminal kinase (JNK 1/2); specific JNK inhibitor (SP600125); breast cancer; cell apoptosis; proliferation

并将粉末转移至预先加入适量体积 TRIzol 试剂(1 ml) 的无 RNA 酶 1.5 ml 离心管中 颠倒混匀 室温 5 min 加入氯仿 200 μ l, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 10 min 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 15 min。上层水相(约 500 μ l) 转移至无 RNA 酶 1.5 ml 离心管中, 加入等体积异丙醇 颠倒混匀 6~8 次, 室温放置 10 min 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 10 min, 管底可见白色 RNA 沉淀; 去上清液并加入 75% 乙醇(1 ml) 洗涤 RNA 4 $^{\circ}$ C 8 500 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 吸净残存乙醇, 自然干燥 5~10 min; 适量 DEPC 水溶解 RNA 沉淀; -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2 逆转录 逆转录 cDNA 采用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase, M-MLV RT) 试剂盒, 具体操作如下: 在无 RNA 酶的离心管中加入 2 μ g RNA、0.5 μ l 随机引物、DEPC 水补至 15 μ l, 70 $^{\circ}$ C 放置 5~10 min, 立即置于冰上冷却 10 min 短暂离心; 在上述反应体系中加入 5 倍逆转录反应缓冲液(M-MLV 5 $\times$ 缓冲液) 5 μ l、dNTP(10 mmol 每管) 1.25 μ l、RNA 酶抑制剂 0.625 μ l(25 U)、逆转录酶(M-MLV RT) 1 μ l(200 U), 轻轻混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 70 $^{\circ}$ C 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.3 实时定量 PCR 实时定量 PCR 反应使用 TP800 实时荧光定量 PCR 仪(TaKaRa) 及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa) 进行。内参基因 β -actin 以及目的基因 HOXA2 的引物均由上海英骏(Invitrogen) 公司合成。 β -actin 基因引物序列: 上游引物 5'-AATCGTGCGTGACATTAAGGAG-3', 下游引物 5'-ACTGTGTTGGCGTACAGGTCTT-3', 产物大小为 275 bp; HOXA2 基因引物序列: 上游引物 5'-TTCAGCAAAATGCCCTCTCT-3', 下游引物 5'-TAG-GCCAGCTCCACAGTTCT-3', 产物大小为 176 bp。反应体系加入 SYBR Premix EX Taq 10 μ l、正反向引物(10 μ mol) 各 0.4 μ l、cDNA 模板 2 μ l、ddH₂O 补至 20 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s, 二步法扩增 40 个循环, 溶解曲线反应条件分析采用 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 解离时间为 4 s。

1.2.4 细胞转染 siRNA siRNA 委托上海吉玛公司合成。将合成好的 siRNA 转染 PLC/PRF/5、MHCC-97L 细胞, siRNA 序列如下: HOXA2-si1 上游引物序列为 5'-CCAACUGCUUGUCAACAAUdGdA-3', 下游引物序列为 5'-AUUGUUGACAAGCAGUUGGdT-dC-3'; HOXA2-si2 上游引物序列为 5'-CCCAACU

GCUUGUCAACAAAdTdT-3', 下游引物序列为 5'-UU-GUUGACAAGCAGUUGGGdTdT-3'。

转染前 1 d 在接种(3~5) $\times 10^5$ 个细胞于 35 cm² 细胞培养皿培养过夜, 转染时能够达到 30%~50% 的密度; 在 250 μ l 改良型必需基本培养基(Opti-MEM, Gibco) 中加入 5 μ l 脂质体转染试剂 Lipofectamine[™] 2000(Invitrogen), 轻轻混匀后室温静置 5 min; 250 μ l Opti-MEM 中加入 5 μ l siRNA; 将上述两者混合后室温放置 20 min; 除去细胞培养液, 换成无血清、无抗生素的培养液, 然后慢慢加入 500 μ l 脂质体和 siRNA 转染混合液, 混匀; 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4~6 h 后换成正常培养液。

1.2.5 细胞增殖能力分析 转染 HOXA2 siRNA 和对照 NC 的 PLC/PRF/5 和 MHCC-97L 细胞株培养 48 h 后, 胰酶(1%, Gibco) 消化, 按(1~5) $\times 10^3$ 个/孔细胞密度接种于 96 孔培养板, 并于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养条件下培养过夜。按 1:9 体积比混合 CCK-8(日本同仁化学研究所) 和无血清 DMEM 制成检测液, 将待检测孔的培养基除去, 每孔 100 μ l 制备好的检测液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 1 h。在酶标仪上测定 450 nm 的吸光度值。连续测定 5~7 d, 绘制细胞生长曲线, 所有实验均重复 3 次。

1.2.6 肝癌细胞软琼脂克隆形成能力分析 分别配制 1% 和 2% 低熔点琼脂糖, 高温高压灭菌后于 37 $^{\circ}$ C 保存待用; 配制含 20% 胎牛血清(FBS) 的 2 $\times$ DMEM; 将预温的 2% 琼脂糖和 2 $\times$ DMEM 培养液等体积混合后, 迅速加入 24 孔板中, 每孔 0.5 ml, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 待凝固后作为下层胶; 1% 胰酶消化细胞, 每孔接种 3 000~5 000 个细胞/0.5 ml; 将预温的 1% 琼脂糖和 2 $\times$ DMEM 培养液等体积混合后, 将消化好的细胞悬液加到混合液中, 充分混匀后迅速加到已经铺好下层胶的 24 孔板中, 每孔 0.5 ml, 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 10 min 使其凝固, 这样细胞就悬浮在软琼脂中不会贴壁; 在凝固的软琼脂上加入 0.2 ml 培养液, 防止软琼脂培养基干裂, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 2~3 周; 显微镜下观察每孔克隆的生长情况, 最后通过结晶紫染色后拍照分析。

1.2.7 细胞周期及凋亡分析 细胞周期分析: 1% 的胰酶消化细胞并收集至流式专用管中; 1 000 r/min 离心收集细胞, 弃上清液, 1 $\times$ PBS 洗细胞 2~3 次; 20 μ l 碘化丙啶(PI) 5 μ l RNase (10 mg/ml) 1 μ l 20% NP-40 加入到 1 ml PBS 中配制成上样缓冲液; 每管样品用 1 ml 上样缓冲液重悬后室温避光放置 10 min, 上机检测。

细胞凋亡分析: 1% 胰酶消化细胞并收集至流式专用管中; 1 000 r/min 离心收集细胞, 弃上清液, 1 × PBS 洗细胞 2 ~ 3 次; 20 μl PI, 5 μl AnnexinV, 5 μl RNase (10 mg/ml), 1 μl 20% NP-40 加入 1 ml 的 PBS 中配制成上样缓冲液; 每管样品用 1 ml 上样缓冲液重悬后室温避光放置 10 min, 上机检测, 每次实验均设 PI 单染和 AnnexinV 单染作为对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 实验组与对照组差异性检测采用 *t* 检验, 临床样本特征关联性分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HOXA2 基因在肝细胞肝癌样本中表达 通过荧光定量 PCR 技术, 在 63 例手术获取的肝癌组织及相应癌旁组织标本中, HOXA2 基因表达上调 (双侧 *t* 检验, $P=0.000\ 936$)。通过逆转录 PCR 技术, 在 63 例肝癌样本中有 24 例肝癌样本 HOXA2 基因有较明显的表达上调, 占有所有样本的 38.095%, 提示 HOXA2 基因可能对于肝细胞肝癌的进展有一定的促进作用。见图 1。

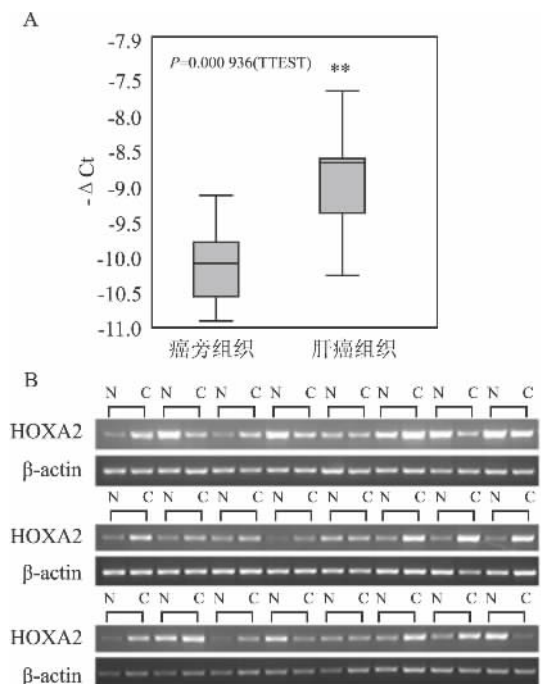


图 1 实时定量 PCR 和逆转录 PCR 评价 HOXA2 基因在肝癌样本中的表达情况

A: 实时定量 PCR 检测 63 例肝癌样本; B: 逆转录 PCR 检测 24 例肝癌样本; N: 癌旁组织; C: 肝癌组织; 与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

2.2 HOXA2 基因与肝细胞肝癌临床特征关联性

分析 如表 1 所示, HOXA2 基因表达上调与性别、年龄、肿瘤大小及是否存在肝硬化无关。但同时本研究发现 HOXA2 基因表达上调的样本中, 甲胎蛋白 (AFP) 阳性 (≥ 20 ng/ml) 的样本多于阴性 (< 20 ng/ml) 的, 而在 HOXA2 基因表达下调和不变的样本中, AFP 阴性的样本多于阳性, 虽然差异无统计学意义, 但提示 HOXA2 基因表达上调与 AFP 的表达有正性相关的趋势。提示 HOXA2 基因可能在 AFP 阳性患者的肝细胞肝癌的进展中发挥一定的作用。

2.3 HOXA2 基因干扰表达抑制肝癌细胞增殖能力 两条特异性针对 HOXA2 基因的 siRNAs (si-1、si-2) 被分别转染至肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 中, 荧光定量 PCR 法检测发现 HOXA2 基因表达显著下调, 说明两条 siRNAs 能够干扰沉默肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 中 HOXA2 的表达 (图 2A)。本研究选取干扰效果较好的 si-1 序列进行进一步实验。随后本研究观察了 RNA 干扰 HOXA2 基因后, 发现在干扰了 HOXA2 基因的表达后, 如图 2B 所示, 两株细胞的增殖都受到了较明显的抑制 (双侧 *t* 验证, $P < 0.05$), 提示 HOXA2 基因在肝癌细胞增殖中发挥重要作用。

表 1 实时定量 PCR 评价 HOXA2 基因表达与肝细胞肝癌临床特征的关联性

项目	病例数	表达上调	表达下调或不变	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别					
男	39	29	10	0.804 1	0.369 9
女	10	6	4		
年龄(岁)					
≤ 50	17	13	4	0.985 3	0.320 9
> 50	32	20	12		
肿瘤大小(cm)					
< 3	13	10	3	0.261 8	0.608 9
≥ 3	36	25	11		
肝硬化					
+	30	21	9	0.525 0	0.468 7
-	12	7	5		
AFP(ng/ml)					
≥ 20	28	22	6	2.594 1	0.107 3
< 20	21	12	9		

2.4 RNA 干扰 HOXA2 基因表达抑制肝癌细胞非贴壁依赖型生长 由图 3 可知, 在普通光学显微镜视野下 PLC/PRF/5、MHCC-97L 细胞在软琼脂中的克隆生成情况, 可以发现与转染阴性对照 siRNA (siNC) 相比, 转染 HOXA2 (si-1)、HOXA2 (si-2) 的细胞在软琼脂中生长形成的克隆数目减少, 形态变小。为了进一步统计分析肝癌细胞 PLC/PRF/5、MHCC-

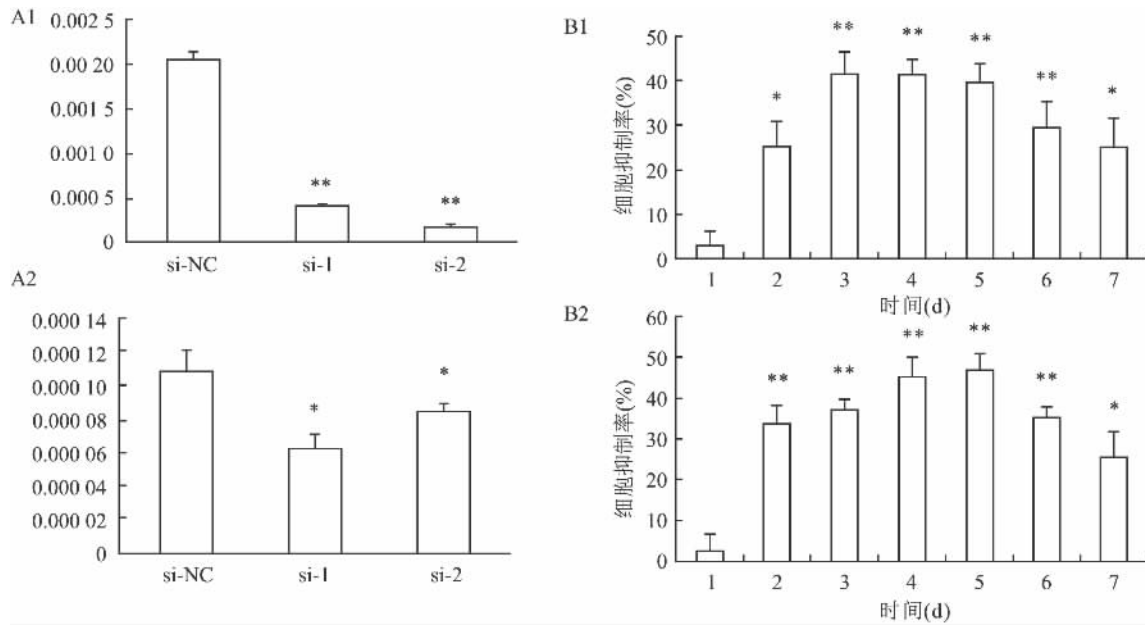


图2 RNA干扰HOXA2基因抑制PLC/PRF/5、MHCC-97L细胞增殖

A: siRNA干扰HOXA2基因表达; B: CCK-8法检测干扰HOXA2基因表达后对肝癌细胞增殖能力的影响; 1: PLC/PRF/5; 2: MHCC-97L; 与对照组(si-NC)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

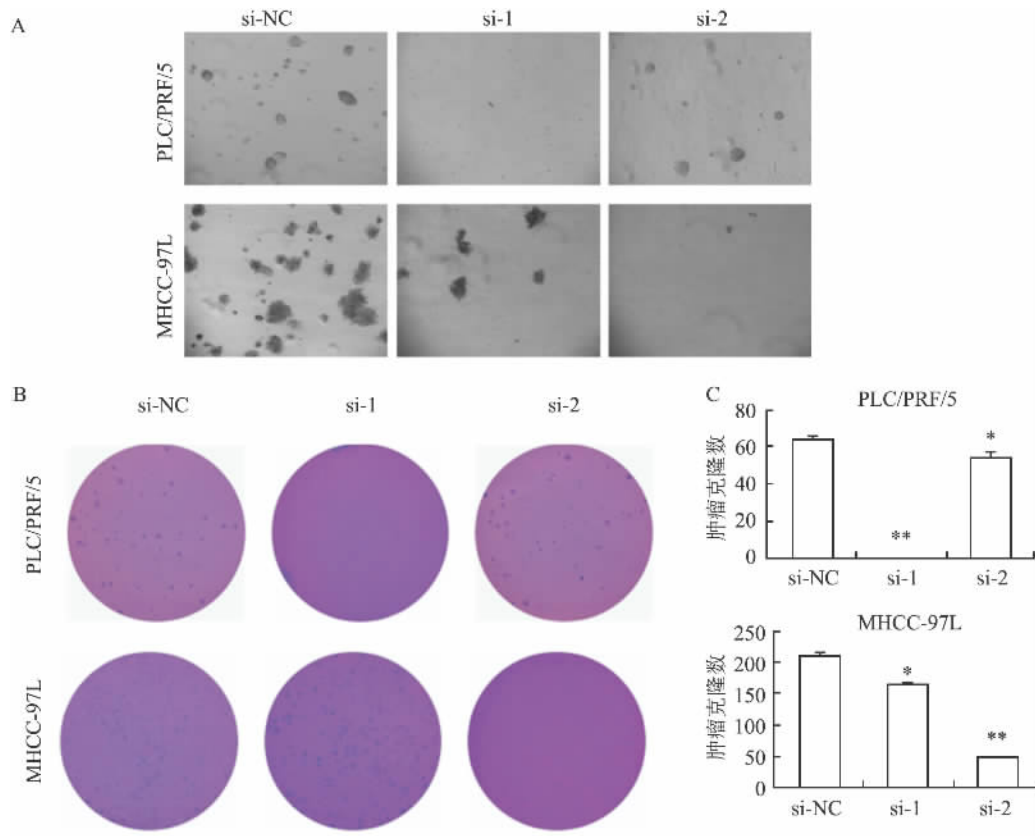


图3 RNA干扰HOXA2基因抑制PLC/PRF/5、MHCC-97L细胞软琼脂克隆的生长

A: 普通光学显微镜视野下PLC/PRF/5、MHCC-97L细胞在软琼脂中的克隆生成情况 $\times 100$; B: 软琼脂中的克隆拍照; C: 克隆计数后进行统计学分析; 与对照组(si-NC)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

97L 在软琼脂中克隆形成的情况,本研究对软琼脂培养基中所形成的细胞克隆进行结晶紫染色并拍照,克隆计数后进行统计学分析,显示在 PLC/PRF/5、MHCC-97L 细胞中干扰沉默 HOXA2 基因,细胞在软琼脂中的克隆生长明显受到抑制 ($P < 0.05$),提示 HOXA2 基因对于肝癌细胞非贴壁依赖型生长有比较重要的影响。

2.5 siRNA 沉默 HOXA2 基因表达影响细胞周期

PLC/PRF/5 分别转染 siNC、HOXA2-si1 后,72 h 消化收集细胞,PI 对细胞 DNA 染色后,利用流式细胞仪对细胞周期进行分析。结果如图 4A 所示,与对照 siNC 相比,siRNA 干扰 HOXA2 表达之后,细胞 G_0/G_1 期增多 (siNC: 51%, HOXA2-si1: 61.5%),S 期减少 (siNC: 31.7%, HOXA2-si1: 28.1%), G_2/M 期减少 (siNC: 17.3%, HOXA2-si1: 10.4%)。这些结果说明干扰 HOXA2 基因表达可导致细胞呈现 G_1 期阻滞,S 期减少。

2.6 siRNA 沉默 HOXA2 基因表达促进细胞凋亡

PLC/PRF/5 分别转染 si-NC、HOXA2-si1 后,72 h 消化收集细胞,PI 和 Annexin V 对细胞 DNA 进行双染色后,利用流式细胞仪对细胞周期进行分析。结果如图 4B 所示,早期凋亡细胞由转染 siNC 的 2.7% 增加为 7.31%,活细胞比例由转染 siNC 的

97.3% 减少为 92.69%,提示干扰 HOXA2 基因的表

3 讨论

HOX 基因不仅调节脊椎类动物和人类胚胎器官发育,而且参与人体多个系统的生长发育,如生殖系统发育^[9]、造血系统发育^[10]及肢体发育^[11]等。近年来研究^[12-14]表明,在乳腺癌、结肠癌、肾癌、胶质细胞瘤、白血病和骨肉瘤等肿瘤中均可检测到 HOX 基因表达异常。但关于 HOXA 家族基因对肝癌发生发展的研究还较少,本文重点研究了 HOXA2 基因对肝癌细胞的细胞学行为的影响。

本研究采用 RNA 干扰技术沉默 HOXA2 基因表达,进一步观察其对肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 增殖能力、锚泊非依赖生长、细胞周期及细胞凋亡的效应。本研究发现,干扰 HOXA2 基因表达后可较明显抑制肝癌细胞株 PLC/PRF/5、MHCC-97L 增殖能力,其中 PLC/PRF/5 细胞株在第 3 天时即呈现增殖抑制效应,MHCC-97L 细胞株在第 4 天也呈现同样的效应。锚泊非依赖生长实验即软琼脂克隆形成试验可以反映肝癌细胞的恶性程度,本研究发现干扰 HOXA2 基因表达后,PLC/PRF/5、MHCC-97L 细胞株锚泊非依赖生长均受到抑制,即可较明显的抑制肝癌细胞的恶性程度,其中在 PLC/PRF/5 细胞株中 si-1 干扰位点的抑制生长的效应较好,而在 MHCC-97L 细胞株中 si-2 干扰位点的抑制生长的效应较好,这可能与所选细胞株的个体差异性有关。由于在 PLC/PRF/5 细胞株中,HOXA2 基因的干扰效果较好,因此在细胞周期和细胞凋亡的实验中本研究选择 PLC/PRF/5 细胞株进行实验。本研究发现干扰 HOXA2 基因表达后,细胞周期阻滞于 G_1 期,S 期和 G_2/M 期细胞比例均明显减少,同时处于早期凋亡 (PI 阴性,Annexin V 阳性) 的细胞比例明显增加,提示细胞凋亡增加。提示 HOXA2 基因的高表达可能与 AFP 阳性患者的肝癌发病有较密切的关系,表中统计学 P 值可能是由于样本数量局限及样本的个体差异引起。

综上所述,干扰 HOXA2 基因表达可较明显的引起细胞周期阻滞和细胞凋亡,继而导致细胞增殖能力和恶性程度的降低,提示 HOXA2 在肝细胞肝癌的进展中起比较重要的作用,并且可能与 AFP 阳性肝细胞肝癌患者有关联性。HOXA2 基因是潜在的治疗肝癌靶点,进一步对 HOXA2 基因在肝癌中涉及的信号通路及相关分子机制的研究将有助于从

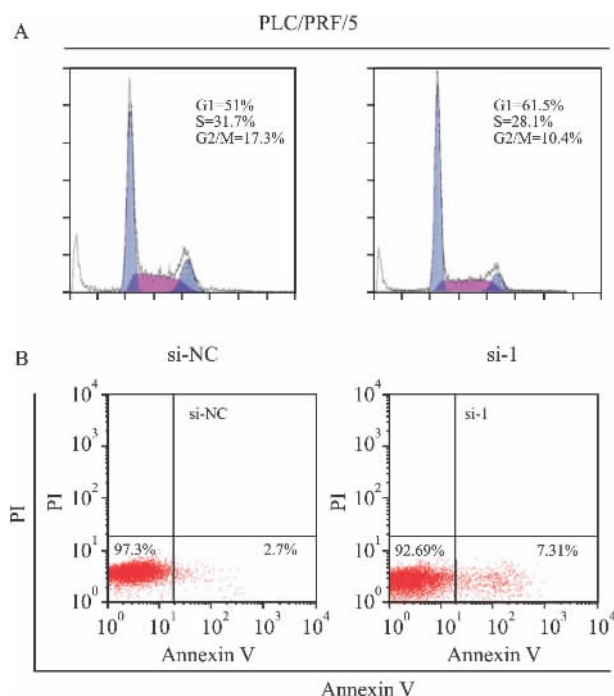


图4 流式细胞仪分析 PLC/PRF/5 细胞中 HOXA2 基因经 siRNA 干扰后细胞周期及凋亡

A: PLC/PRF/5 HOXA2 基因 RNA 干扰后细胞周期分析; B: PLC/PRF/5 HOXA2 基因 RNA 干扰后细胞凋亡分析

理论上阐明其作为药靶的可行性。

参考文献

- [1] Han Z G. Functional genomic studies: insights into the pathogenesis of liver cancer [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2012, 13: 171–205.
- [2] Jia D, Wei L, Guo W, et al. Genome-wide copy number analyses identified novel cancer genes in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1227–36.
- [3] Cantile M, Procino A, D'Armiento M, et al. HOX gene network is involved in the transcriptional regulation of *in vivo* human adipogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(2): 225–36.
- [4] Soubeyran P, Haglund K, Garcia S, et al. Homeobox gene Cdx1 regulates Ras, Rho and PI3 kinase pathways leading to transformation and tumorigenesis of intestinal epithelial cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20(31): 4180–7.
- [5] Ford H L. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? [J]. *Cell Biol Int*, 1998, 22(6): 397–400.
- [6] Maroulakou I G, Spyropoulos D D. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis [J]. *Anti-cancer Res*, 2003, 23(3A): 2101–10.
- [7] Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10): 777–85.
- [8] Rao M K, Maiti S, Ananthaswamy H N, et al. A highly active homeobox gene promoter regulated by Ets and Sp1 family members in normal granulosa cells and diverse tumor cell types [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(29): 26036–45.
- [9] Birk O S, Casiano D E, Wassif C A, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 909–13.
- [10] Taghon T, Thys K, De Smedt M, et al. Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development [J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1157–63.
- [11] Björnsson J M, Larsson N, Brun A C, et al. Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in HOXB3 and HOXB4 [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(11): 3872.
- [12] Jiang X, Russo I H, Russo J. Alternately spliced luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA in human breast epithelial cells [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(4): 735–8.
- [13] Moucadel V, Totaro M S, Dell C D, et al. The homeobox gene *Cdx1* belongs to the p53-p21(WAF)-Bcl-2 network in intestinal epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(3): 607–15.
- [14] Drabkin H A, Parsy C, Ferguson K, et al. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia [J]. *Leukemia*, 2002, 16(2): 186–95.

Effect of homeobox A2 gene RNA interference on HCC cell behavior

Hu Xiaojun¹, Wang Yicheng², Ou Ling¹

(¹College of Bioengineering East China University of Science and Technology, Shanghai 200237;

²Shanghai Research Center for Model Organism, Shanghai 201203)

Abstract Objective To study the role of homeobox A2 (HOXA2) gene in cell growth, cell cycle and apoptosis of hepatoma cells, and discuss the feasibility that HOXA2 gene would be a potential therapy target of hepatoma.

Methods Real-time quantitative polymerase chain reaction and reverse transcriptional polymerase chain reaction were performed to examine HOXA2 expression in tumorous and non-tumorous tissue of patients was matched with liver cancer. siRNAs were chemically synthesized to interfere HOXA2 in PLC/PRF/5 and MHCC-97L cells. Growth curve and soft-agar colony formation assay were performed to evaluate cell growth, and cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results** HOXA2 was upregulated in HCC samples compared with matched non-tumor tissues ($P < 0.05$). Two siRNAs against HOXA2 gene were designed and synthesized to specially knock-down HOXA2 in PLC/PRF/5 and MHCC-97L cells. HOXA2 knockdown inhibited cellular growth and soft-agar colony formation in PLC/PRF/5 and MHCC-97L cells. And flow cytometry analysis revealed that HOXA2 knock-down by RNA interference could result in G₁ arrest and S decrease and promoted cellular apoptosis. **Conclusion** HOXA2 gene has an important role in cell growth of hepatoma cells.

Key words RNAi; homeobox genes; HCC; cell cycle; cell apoptosis