



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.260026
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.260026
China Journal of General Surgery, 2026, 35(5):960-977.

· 基础研究 ·

HOXA11 启动子高甲基化通过激活 TGF- β /Smad-EMT 轴促进肝细胞癌转移

王佳敏¹, 曾慧岚¹, 程洁¹, 崔芳芳², 杨涛宇¹, 黄安琪¹, 莫嘉强¹, 叶青¹, 熊子慧¹, 王秋婷¹, 何佳南³

(1. 广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院/广州中医药大学第二临床医学院 肝胆外科, 广东 广州 510120; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 3. 中山大学医学院, 广东 广州 510080)

摘要

背景与目的: 肝细胞癌 (HCC) 侵袭转移是导致患者预后不良的重要原因。同源框 A11 (HOXA11) 在多种肿瘤中具有组织特异性的生物学功能, 但其在 HCC 中的作用及分子机制尚未明确。本研究探讨 HOXA11 表达失调的表观遗传学机制及其对 HCC 侵袭转移的调控作用。

方法: 收集 11 对 HCC 及癌旁组织, 采用 Western blot、免疫组织化学及重亚硫酸盐测序 (BSP) 检测 HOXA11 表达及启动子甲基化水平。利用地西他滨 (DAC) 进行去甲基化干预, 构建 HOXA11 稳定敲低和过表达细胞系, 通过 CCK-8 和 Transwell 实验检测细胞增殖、迁移及侵袭能力。采用 Western blot 检测 TGF- β /Smad 通路及上皮-间充质转化 (EMT) 相关蛋白表达, 并通过 TGF- β 1 挽救实验验证其调控机制。建立裸小鼠肺转移模型评价 HOXA11 对体内转移能力的影响。

结果: HCC 组织中 HOXA11 表达显著低于癌旁组织, 而其启动子甲基化水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。DAC 处理可降低 HOXA11 启动子甲基化水平并恢复其表达。HOXA11 敲低显著促进 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭, 而过表达则产生相反作用 (均 $P < 0.05$)。机制研究显示, HOXA11 负向调控 TGF- β /Smad 信号通路活性, 抑制 EMT 进程, 表现为 E-cadherin 表达升高以及 Snail、N-cadherin、vimentin 和 fibronectin 表达降低。TGF- β 1 挽救实验进一步证实, HOXA11 过表达能够部分拮抗 TGF- β 1 诱导的 Smad 磷酸化及 EMT 表型转化。临床样本分析显示, HOXA11 低表达与 TGF- β /Smad 通路激活及 EMT 标志物异常表达显著相关。动物实验表明, HOXA11 过表达可显著降低肺转移负荷 ($P < 0.05$)。

结论: HOXA11 在 HCC 中因启动子高甲基化而表达沉默, 其通过负向调控 TGF- β /Smad 信号通路抑制 EMT 进程, 从而抑制 HCC 侵袭和转移。HOXA11 可能成为 HCC 表观遗传治疗及抗转移干预的潜在靶点。

关键词

癌, 肝细胞; 同源框 A11; DNA 甲基化; TGF- β /Smad 信号通路; 上皮-间质转化

中图分类号: R735.7

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2022A1515011632); 广东省中医证候临床研究重点实验室基金资助项目 (KF2023ZH01); 广东省中医院中医药科学技术研究专项基金资助项目 (YN2023WSSQ02, YN2024MS063)。

收稿日期: 2026-01-13; **修订日期:** 2026-05-21。

作者简介: 王佳敏, 广州中医药大学第二临床医学院硕士研究生, 主要从事中医外科肝胆外科方面的研究 (曾慧岚为本文共同第一作者)。

通信作者: 何佳南, Email: hejianan2026@sina.com

Promoter hypermethylation of HOXA11 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through activation of the TGF- β /Smad-EMT axis

WANG Jiamin¹, ZENG Huilan¹, CHENG Jie¹, CUI Fangfang², YANG Taoyu¹, HUANG Anqi¹, MO Jiaqiang¹, YE Qing¹, XIONG Zihui¹, WANG Qiuting¹, HE Jia'nan³

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine/Guangdong Traditional Chinese Medicine Hospital, Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 3. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract

Background and Aims: Invasion and metastasis are major causes of poor prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC). Although homeobox A11 (HOXA11) has been implicated in various malignancies, its biological role and underlying mechanisms in HCC remain unclear. This study investigated the epigenetic regulation of HOXA11 and its effects on HCC progression and metastasis.

Methods: Eleven paired HCC and adjacent non-tumor tissues were collected. HOXA11 expression and promoter methylation were examined using Western blotting, immunohistochemistry, and bisulfite sequencing PCR (BSP). Decitabine (DAC) was used for demethylation treatment. Stable HOXA11 knockdown and overexpression cell lines were established. Cell proliferation, migration, and invasion were assessed by CCK-8 and Transwell assays. Expression of the TGF- β /Smad pathway- and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins was analyzed by Western blotting. TGF- β 1 rescue experiments were performed to verify the underlying mechanism. A nude mouse lung metastasis model was established to evaluate the effect of HOXA11 on metastatic potential in vivo.

Results: HOXA11 expression was significantly decreased in HCC tissues, whereas promoter methylation was significantly increased compared with adjacent tissues (both $P < 0.05$). DAC treatment reduced promoter methylation and restored HOXA11 expression. HOXA11 knockdown significantly enhanced HCC cell proliferation, migration, and invasion, whereas HOXA11 overexpression exerted the opposite effects (all $P < 0.05$). Mechanistically, HOXA11 negatively regulated the TGF- β /Smad signaling pathway and suppressed EMT, as evidenced by increased E-cadherin expression and decreased expression of Snail, N-cadherin, vimentin, and fibronectin. TGF- β 1 rescue experiments further demonstrated that HOXA11 overexpression partially antagonized TGF- β 1-induced Smad phosphorylation and EMT progression. Clinical analyses confirmed significant associations between low HOXA11 expression, activation of the TGF- β /Smad pathway, and EMT-related alterations. In vivo, HOXA11 overexpression significantly reduced pulmonary metastatic burden ($P < 0.05$).

Conclusion: HOXA11 is epigenetically silenced through promoter hypermethylation in HCC. By negatively regulating the TGF- β /Smad signaling pathway and suppressing EMT, HOXA11 inhibits HCC invasion and metastasis. These findings suggest that HOXA11 may serve as a potential therapeutic target for epigenetic and anti-metastatic intervention in HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Homeobox A11; DNA Methylation; TGF- β /Smad Signaling Pathway; Epithelial-Mesenchymal Transition

CLC number: R735.7

原发性肝癌是全球常见恶性肿瘤，其中肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）占比逾75%^[1]。尽管手术切除与局部消融为部分早期患者提供了根治机会，但术后高复发率及肝外播散转移是制约患者长期生存的核心临床障碍^[2-4]。复发与转移高度依赖肿瘤细胞的侵袭迁移能力，而上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）是驱动该能力的关键程序^[5-8]。尽管免疫检查点抑制剂联合方案已成为晚期HCC标准治疗，但客观缓解率仅约20%~30%，多数患者难以持久获益^[4,9]。因此，解析驱动HCC侵袭转移的分子枢纽，挖掘具有转化潜力的新型靶点，已成为改善患者长期预后的迫切需求。

同源框A11（homeobox A11, HOXA11）作为经典发育调控转录因子，主要参与子宫发育与维持女性生育力^[10]。既往研究发现，HOX基因家族在多种肿瘤中失调，与多种恶性肿瘤密切相关^[11]。其中，HOXA11在实体瘤中呈现显著的组织特异性：其在肾癌中多因启动子甲基化沉默而解除对Wnt通路的抑制、促侵袭^[12]；在胃癌中则高表达，通过协同STAT3正反馈环路增强干性与转移能力^[13]。目前，HOXA11在HCC中的表达特征与功能定位尚不明确。鉴于TGF- β /Smad通路是驱动HCC EMT进程及转移的核心机制^[14-16]，为突破现有靶点局限，笔者前期基于HOXA11过表达的Huh-7细胞模型开展RNA测序（RNA sequencing, RNAseq）筛查；基因集富集分析（gene set enrichment analysis, GSEA）分析显示，TGF- β 信号通路在HOXA11上调后整体呈显著抑制趋势（NES=-1.62, $P<0.05$ ），提示HOXA11可能作为上游关键节点负向调控该通路。由此提出科学假说：HOXA11在HCC中发挥特异性抑癌功能，其通过负向调控TGF- β /Smad信号传导，抑制EMT级联反应，从而阻断HCC细胞的迁移侵袭。

目前，HOXA11在HCC中的表达特征、失活机制及其生物学功能尚未完全阐明，其与TGF- β /Smad信号通路及EMT进程之间的关系亦缺乏直接证据。本研究基于HOXA11启动子甲基化可能导致基因沉默并促进肿瘤进展的科学假设，系统分析HCC组织中HOXA11的表达及甲基化状态，并通过体内外实验探讨其对HCC细胞侵袭转移的调控作用及分子机制，以期对HCC转移的表观遗传治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 临床样本与病理评估

从广东省中医院肝胆外科手术病例中采集11对经病理确诊的HCC患者的肿瘤组织及癌旁组织。所有患者术前均未接受放疗或化疗。癌旁组织采集自距肿瘤肉眼边缘 ≥ 2 cm处。组织样本于术中切除后30 min内置于液氮中速冻，并转移至-80℃超低温冰箱保存。本研究方案已获广东省中医院伦理委员会批准（批准号：BE2025-347-01）。为确保对照组织的可靠性，所有癌旁组织均经HE染色切片，由两位研究者独立进行盲法评估。纳入标准包括：(1) 镜下无肿瘤细胞浸润；(2) 无明显肝硬化（纤维化分期 $\leq F1$ ）；(3) 无中度及以上炎症活动（炎症分级 $\leq G1$ ）。符合上述标准的组织纳入后续分析。其中，11对样本均用于免疫组织化学检测；因1例癌旁组织蛋白降解未达质控标准，最终10对样本用于Western blot验证。

1.2 细胞培养与稳定细胞系构建

1.2.1 细胞系与培养条件 本研究选取4株人HCC细胞系以兼顾机制深度与结论普适性：Li-7与Huh-7细胞HOXA11启动子基础甲基化水平较高，适用于地西他滨（decitabine, DAC）去甲基化干预研究；Huh-7作为贯穿整个研究的锚定模型，用于构建稳定过表达/敲低体系及完成主表型验证；PLC/PRF/5与Hep3B分别用于过表达表型与敲低效应的交叉验证（Hep3B本底HOXA11蛋白表达较高，敲低后效应窗口更宽）。Huh-7和PLC/PRF/5均成功构建HOXA11过表达模型，用于TGF- $\beta 1$ 挽救实验。多细胞系平行验证可有效排除单一细胞系的克隆特异性偏差。所有细胞均购自ATCC，经STR鉴定并定期支原体检测阴性，培养于含10%FBS的DMEM培养基，37℃、5% CO₂条件下常规传代。

1.2.2 慢病毒构建与稳定细胞系建立 靶向人HOXA11基因的短发夹RNA（short hairpin RNA, shRNA）慢病毒（shHOXA11#1、shHOXA11#2）、阴性对照慢病毒（sh-NC）、HOXA11过表达慢病毒（HOXA11-OE）及空载对照慢病毒（vector）均由生工生物工程（上海）股份有限公司包装，经测序验证正确。慢病毒载体信息详见补充表1。将处于对数生长期的HCC细胞以感染复数（multiplicity of infection, MOI）=10接种于6孔板，加入含5 μ g/mL Polybrene的完全培养基感染12 h。48 h后，换用含

2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基筛选 2 周, 获得稳定敲低或过表达 HOXA11 的细胞系。

1.3 RNA提取与qRT-PCR

1.3.1 总 RNA 提取 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取细胞总 RNA, 操作参照制造商说明书。简述如下: 弃去培养基, PBS 洗涤后, 每孔加入 1 mL TRIzol 充分裂解细胞。每 1 mL TRIzol 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡后室温静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 15 min。吸取上层水相, 加入等体积异丙醇沉淀 RNA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min。沉淀以 75% 乙醇洗涤, 室温干燥后溶于无 RNase 水。RNA 浓度与纯度使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 测定, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间的样本用于后续实验。

1.3.2 cDNA 合成 使用 PrimeScript RT Master Mix (Takara, 中国) 将总 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系 (10 μL) 包含 500 ng 总 RNA、2 μL 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix, 以无 RNase 水补足。反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 s 灭活反转录酶。

1.3.3 qRT-PCR 使用 2 $\times$ SYBR Green Master Mix (Takara, 中国) 在 CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 系统 (Bio-Rad, 美国) 上进行扩增。反应体系 (10 μL) 包含 5 μL 2 $\times$ Master Mix、0.5 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL cDNA 模板和 3 μL 无 RNase 水。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 随后进行 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s; 最后进行溶解曲线分析。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见补充表 2。

1.4 Western blot分析

细胞总蛋白使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液 (碧云天, 中国) 冰上提取, BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天, 中国) 测定浓度。取等量蛋白 (30 μg) 与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 变性。蛋白样品经 10%SDS-PAGE 电泳分离, 湿转法转移至 PVDF 膜 (Millipore, 美国)。膜经含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1 h 后, 与一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤后, 与 HRP 标记二抗 (1:20 000) 室温孵育 1 h。ECL 试剂盒 (MIKX, 中国) 显影, 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 采集图像。ImageJ 软件分析条带灰度值。磷酸化蛋白水平以其对应的总蛋白进行标准化, 其他蛋白表达

量均以 GAPDH 或 α -tubulin 为内参进行归一化。抗体信息见补充表 3。

1.5 HE染色与免疫组化

1.5.1 HE染色 组织切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后, 行常规苏 HE 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。于正置光学显微镜 (Nikon, 型号 Ci-s) 下观察并采集图像。

1.5.2 免疫组化染色 组织切片室温干燥 30 min, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤后, 以 3% 过氧化氢避光孵育 15 min 阻断内源性过氧化物酶。10% 正常山羊血清室温封闭 30 min 后, 切片与一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤, 与生物素标记二抗室温孵育 30 min, 再与链霉亲和素-过氧化物酶复合物室温孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染核, 脱水透明, 中性树胶封片。免疫组化定量在研究者盲态下进行。于每张切片肿瘤实质区使用 Nikon Ci-s 显微镜 ($\times 200$) 系统选取 5 个非重叠视野采集图像。原始图像导入 ImageJ 软件, 调用 Colour Deconvolution 插件分离 DAB 染色通道, 以 Otsu 自适应阈值法分割阳性棕黄区域, 并以 PBS 替代一抗的阴性对照切片进行本底扣除。定量指标以平均光密度值 (average optical density, AOD) 表示, 计算公式为: $\text{AOD} = \text{阳性区域积分吸光度} (\text{integrated density}) \div \text{阳性区域总面积} (\text{area})$ 。各样本结果为 5 个视野 AOD 均值。抗体信息见补充表 4。

1.6 DNA提取与甲基化分析

1.6.1 基因组 DNA 提取与亚硫酸氢盐测序 使用 Ezup Column 动物基因组 DNA 提取试剂盒 (生工, 货号 B518251, 中国) 从组织样本中提取基因组 DNA。紫外可见分光光度计 (Merinton SMA4000) 测定 DNA 纯度与浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳验证完整性。亚硫酸氢盐转化参照 EZ DNA 甲基化-GoldTM 试剂盒 (天默, 货号 D5005, 中国) 说明书进行。针对 HOXA11 启动子区 CpG 岛设计特异性引物, 序列见补充表 5。PCR 反应采用 Taq Plus DNA 聚合酶 (生工, 货号 B600090, 中国), 程序设置: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 35 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 TA 克隆连接至 pUC18-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆后使用 3730XL 测序仪 (ABI) 测序。QUMA 软件计算各 CpG 位点甲基化率。

1.6.2 甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 为验证 DAC 处理后 HOXA11 启动子甲基化

状态的剂量-效应关系,采用MSP进行检测。基因组DNA提取及亚硫酸氢盐转化步骤同1.6.1。转化后的DNA作为模板,分别使用甲基化特异性(M)和非甲基化特异性(U)引物进行PCR扩增。引物序列详见补充表6。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统采集图像。使用ImageJ软件对甲基化条带(M)与非甲基化条带(U)进行灰度分析。去甲基化率(%)=U条带灰度值/(M条带灰度值+U条带灰度值)×100%。

1.7 细胞功能学实验

1.7.1 细胞增殖检测 将对数生长期的细胞消化、计数后,以 1×10^3 个细胞/孔的密度接种于96孔板,每孔含100 μL 完全培养基。在设定时间点(0、24、48、72、96 h),每孔加入10 μL CCK-8试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。酶标仪于450 nm波长处测定吸光度。以时间为横坐标、相对OD值为纵坐标绘制生长曲线。实验独立重复3次。

1.7.2 Transwell 迁移与侵袭实验 迁移实验:将 1×10^5 个细胞悬浮于200 μL 无血清DMEM中,接种至Transwell小室上室,下室加入600 μL 含10% FBS的DMEM。孵育24 h后,用棉签擦去上室内未迁移细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色20 min。倒置显微镜下随机选取5个视野计数穿膜细胞。侵袭实验:Transwell小室预先包被50 μL Matrigel(1:8稀释,BD Biosciences,美国),37 $^{\circ}\text{C}$ 固化2 h。接种 1×10^5 个细胞至上室,孵育24 h后按迁移实验方法染色计数。实验独立重复3次。比例尺代表300 μm 。

1.8 药物处理与挽救实验

1.8.1 DAC 作用浓度的筛选 将对数生长期的Li-7和Huh-7细胞接种于96孔板(1×10^3 个细胞/孔),贴壁后更换为含系列浓度DAC(0、3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$; Selleck,美国)的培养基,处理72 h。CCK-8法检测细胞活力。使用GraphPad Prism 9.0软件,以药物浓度对数为横坐标、细胞存活率为纵坐标,四参数Logistic模型拟合剂量-效应曲线并计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.8.2 DAC 处理后甲基化与蛋白表达的剂量-效应分析 将Li-7和Huh-7细胞分别以0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ DAC处理72 h。收集细胞后分为两份:一份提取基因组DNA进行MSP检测HOXA11启动子甲基化水平;另一份提取总蛋白进行

Western blot检测HOXA11蛋白表达。综合 IC_{50} 、甲基化状态及蛋白表达结果,50 $\mu\text{mol/L}$ DAC在两种细胞中均已达到去甲基化平台效应且HOXA11蛋白恢复至峰值,同时该浓度显著低于 IC_{50} (Li-7: 167.6 $\mu\text{mol/L}$; Huh-7: 182.9 $\mu\text{mol/L}$),细胞毒性较低。故选择50 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续功能恢复实验的工作浓度。

1.8.3 TGF- β 1 挽救实验 为验证HOXA11是否通过抑制TGF- β /Smad通路发挥功能,对HOXA11稳定过表达(HOXA11-OE)及空载对照(vector)的Huh-7细胞和PLC/PRF/5细胞进行挽救实验。实验设四组:(1) vector+PBS;(2) vector+TGF- β 1(5 ng/mL, PeproTech, 美国);(3) HOXA11-OE+PBS;(4) HOXA11-OE+TGF- β 1(5 ng/mL)。TGF- β 1预处理24 h后,按1.7.2所述方法进行Transwell迁移和侵袭实验,并按1.4所述方法提取蛋白检测EMT标志物变化。

1.9 动物实验

1.9.1 实验动物与伦理 4~6周龄BALB/c雌性裸小鼠购自中山大学实验动物中心,饲养于SPF级独立通风笼具中,维持12 h/12 h光暗周期,自由摄食饮水。动物实验获中山大学实验动物伦理委员会批准(批准号:SYSU-IACUC-2025-002847)。

1.9.2 实验性肺转移模型 取稳定转染空载对照慢病毒(vector)及HOXA11过表达慢病毒(HOXA11-OE)的Huh-7细胞,用无菌PBS重悬至 1×10^7 个细胞/mL。经尾静脉向裸小鼠($n=6$)缓慢注射100 μL 细胞悬液(含 1×10^6 个细胞)。每天观察并记录小鼠体质量及状态。注射后第60天,对所有小鼠实施安乐死,完整摘取肺组织。对新鲜肺组织进行宏观拍照记录。肺组织经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片后行HE染色,病理学确认转移灶。

1.9.3 肺转移灶组织形态计量学分析 为对肺转移灶进行客观定量,采用基于ImageJ软件的图像分析法。在200倍放大倍数下,每组样本随机选取至少5个包含转移灶及周围肺实质的非重叠视野进行图像采集。利用软件的颜色去卷积功能分离苏木素通道,通过设定阈值识别蓝色细胞核区域。以每个视野内肿瘤区域的面积为转移灶面积。

1.10 统计学处理

所有体外实验独立重复3次,体内实验每组样本量为6只。正态性检验:采用Shapiro-Wilk检验评估数据正态性。符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本或

配对样本 *t* 检验;不符合正态分布的数据以中位数(四分位间距) [*M* (*IQR*)] 表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验或 Wilcoxon 符号秩和检验。方差齐性采用 Levene 检验评估。多组比较:采用单因素方差分析,方差齐时以 Tukey 法进行事后多重比较,方差不齐时采用 Welch's ANOVA 与 Games-Howell 检验。相关性分析:采用 Spearman 秩相关,以 $|\rho| > 0.4$ 且 $P < 0.05$ 定义为显著相关。剂量-效应分析:使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行剂量-效应曲线拟合及 IC_{50} 计算。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXA11 在 HCC 组织中蛋白表达下调且启动子呈现高甲基化状态

HE 染色结果显示,癌旁组织肝小叶结构完整,未见肿瘤细胞浸润,纤维化程度轻微,炎症活动度低;HCC 组织呈典型肿瘤细胞形态,细胞异型性明显,排列紊乱(图 1A)。Western blot 检测结果显示,与癌旁组织相比,HCC 组织中 HOXA11 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$) (图 1B)。免疫组织化学染色结果进一步证实,肿瘤组织中 HOXA11 蛋白的低表达 ($P < 0.05$) (图 1C)。与癌旁组织相比,HCC 组织中 HOXA11 启动子区甲基化水平显著升高 ($P < 0.05$) (图 1D)。

2.2 启动子去甲基化恢复 HOXA11 表达

DAC 的表观遗传调控效应需经 DNA 复制与细胞分裂方可充分显现^[17],结合 HCC 细胞系平均代时(约 24~36 h),并参考同类研究常用时间窗^[18],本研究统一采用 72 h 处理节点,覆盖 2~3 个细胞周期,以准确评估其剂量依赖性抑制效应。采用 CCK-8 法检测系列浓度处理 72 h 后 Li-7 和 Huh-7 细胞的活力变化,结果显示,两种细胞活力随 DAC 浓度升高呈剂量依赖性下降, IC_{50} 分别为 167.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 182.9 $\mu\text{mol/L}$ (图 2A)。DAC 处理后,两种细胞系中 HOXA11 蛋白相对表达量与去甲基化水平均在 50 $\mu\text{mol/L}$ DAC 处理时达到峰值[Huh-7:蛋白相对表达量为 4.175 ± 0.240 ,去甲基化率为 $(57.99 \pm 1.25)\%$;Li-7:蛋白相对表达量为 1.868 ± 0.101 ,去甲基化率为 $(67.64 \pm 1.89)\%$],差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且均呈现典型的先升后降双相剂量响应特征。当浓度继续提升至 100 或 200 $\mu\text{mol/L}$

时,两项指标均较 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著回落(均 $P < 0.05$) (图 2B-C)。综合剂量-效应关系,选定 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续 DAC 干预的最适有效浓度。经 50 $\mu\text{mol/L}$ DAC 处理 72 h 后,两种 HCC 细胞系中 HOXA11 的表达均显著上调。在 Li-7 细胞中,HOXA11 的前体 mRNA 及成熟 mRNA 表达水平分别上调至对照组的 5.26 倍和 2.68 倍(均 $P < 0.05$);在 Huh-7 细胞中,则分别上调至对照组的 1.84 倍和 1.26 倍(均 $P < 0.05$) (图 2D)。

2.3 HOXA11 敲低与过表达细胞模型的效率验证

qRT-PCR 检测结果显示,两个独立的 shRNA 序列(shHOXA11#1 与 shHOXA11#2)在 Huh-7 和 Hep3B 细胞中均能有效敲低 HOXA11 mRNA 表达。在 Huh-7 细胞中,HOXA11 mRNA 表达分别降至对照组的 15.06% 和 11.0%;在 Hep3B 细胞中,分别降至 27% 和 28%,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Western blot 检测结果与 mRNA 水平一致。在 Huh-7 细胞中,HOXA11 蛋白表达分别降至对照组的 30.8% (shHOXA11#1) 和 33.8% (shHOXA11#2),在 Hep3B 细胞中分别降至 25% (shHOXA11#1) 和 30% (shHOXA11#2),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 3A)。HOXA11 过表达细胞中,qRT-PCR 检测显示 Huh-7 细胞 HOXA11 mRNA 水平上调至对照组的 2.58 倍,PLC/PRF/5 细胞上调至 6.31 倍(均 $P < 0.05$);Western blot 检测显示 Huh-7 细胞 HOXA11 蛋白水平上调至对照组的 3.19 倍,PLC/PRF/5 细胞上调至 12.79 倍(均 $P < 0.05$) (图 3B)。

2.4 敲低 HOXA11 促进/过表达 HOXA11 抑制 HCC 细胞增殖、迁移与侵袭

CCK-8 实验结果显示,敲低 HOXA11 在 Huh-7 和 Hep3B 细胞中均显著促进增殖,但效应强度存在差异。在 Huh-7 细胞中,两个 shRNA 序列均表现出较强的促增殖效应,从第 1 天起即出现统计学差异,至第 4 天时细胞活力较对照组分别提高 12.9% 和 12.0% (均 $P < 0.05$)。在 Hep3B 细胞中,促增殖效应幅度较弱,至第 4 天时细胞活力较对照组分别提高 3.9% 和 5.7% (均 $P < 0.05$) (图 4A)。Transwell 实验结果显示,敲低 HOXA11 显著增强 HCC 细胞的迁移与侵袭能力。迁移实验显示,在 Huh-7 细胞中,shHOXA11#1 与 shHOXA11#2 组迁移细胞数分别增至对照组的 3.06 倍和 2.80 倍,在 Hep3B 细胞中分别增至 3.51 倍和 4.27 倍(均 $P < 0.05$)。侵袭实验显示,在 Huh-7 细胞中,两组侵袭细胞数分别增至对照组

的 2.32 倍和 2.28 倍，在 Hep3B 细胞中分别增至 2.96 倍和 4.24 倍（均 $P<0.05$ ）（图 4B）。过表达 HOXA11 在 Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中均显著抑制增殖，但抑制程度存在差异。在 Huh-7 细胞中，过表达 HOXA11 使细胞活力在第 1~4 天分别降低 9.7%、19.1%、21.5% 和 16.5%（均 $P<0.01$ ），抑制效应在第 3 天达到峰值。在 PLC/PRF/5 细胞中，抑制效应更为明显，细胞活力在第 2~4 天分别降低 11.9%、

20.8% 和 19.0%（均 $P<0.01$ ）（图 4C）。Transwell 实验结果显示，过表达 HOXA11 显著抑制 HCC 细胞的迁移与侵袭能力。迁移实验显示，在 Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中，过表达组迁移细胞数分别降至对照组的 33.2% 和 18.5%（均 $P<0.05$ ）；侵袭实验显示，两组侵袭细胞数分别降至对照组的 43.3% 和 70.4%（均 $P<0.05$ ）（图 4D）。

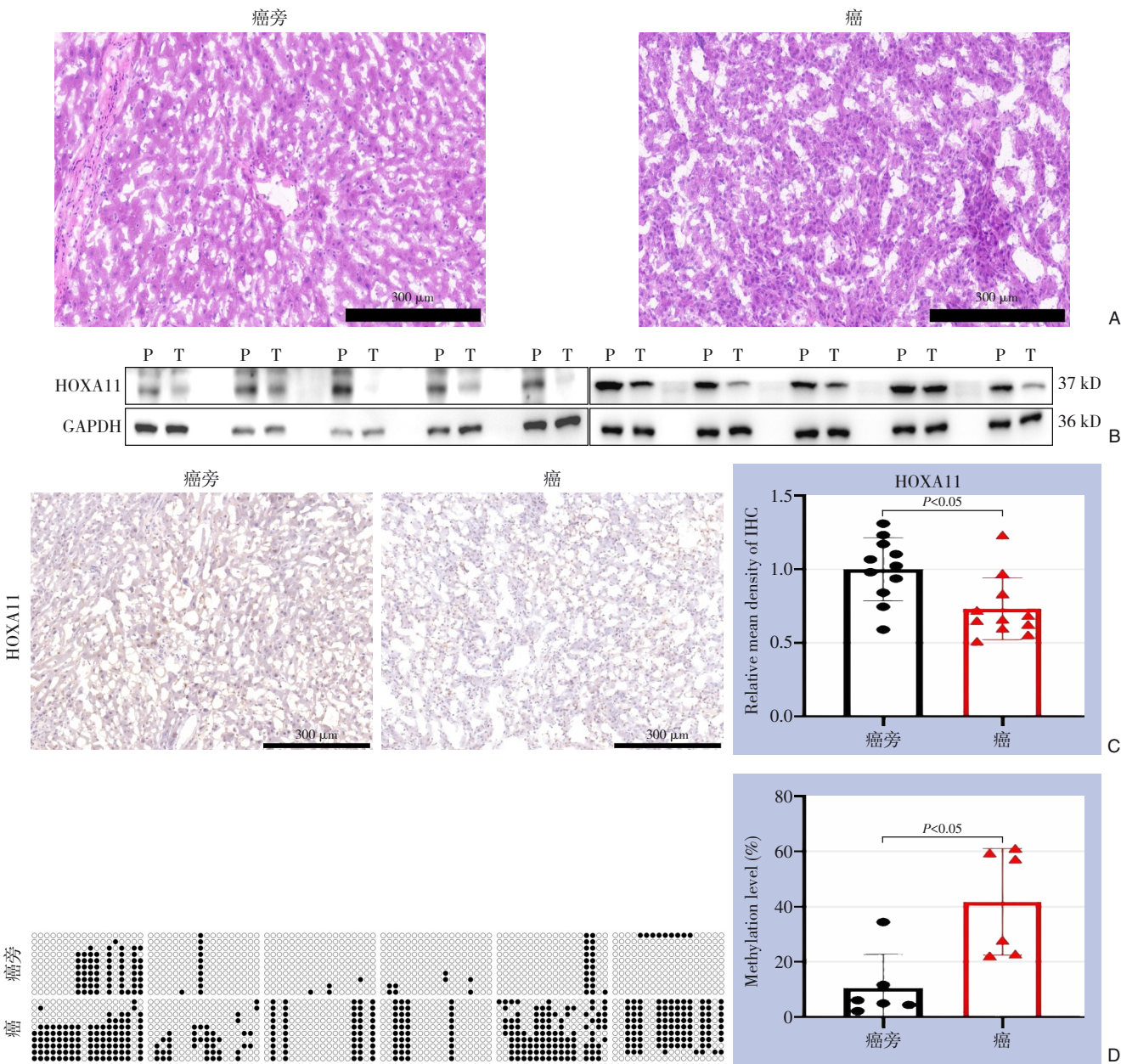


图 1 HOXA11 在 HCC 组织中低表达且启动子呈高甲基化状态 A: HCC 及癌旁组织 HE 染色; B: Western blot 检测 10 对 HCC (T) 及癌旁 (P) 组织中 HOXA11 蛋白表达, 本图为独立重复实验的 Western blot 结果; C: 免疫组化检测 HCC 及癌旁组织中 HOXA11 表达; D: BSP 检测 6 对 HCC 及癌旁组织中 HOXA11 启动子区 18 个 CpG 位点甲基化状态 (实心圆为甲基化, 空心圆为非甲基化, 右为甲基化水平统计)

Figure 1 Low expression and promoter hypermethylation of HOXA11 in HCC tissues A: HE staining of HCC and adjacent tissues; B: Western blot analysis of HOXA11 expression in 10 paired HCC (T) and adjacent tissues (P); C: Immunohistochemical detection of HOXA11 expression in HCC and adjacent tissues; D: BSP analysis of methylation status of 18 CpG sites within the HOXA11 promoter region in 6 paired HCC and adjacent tissues

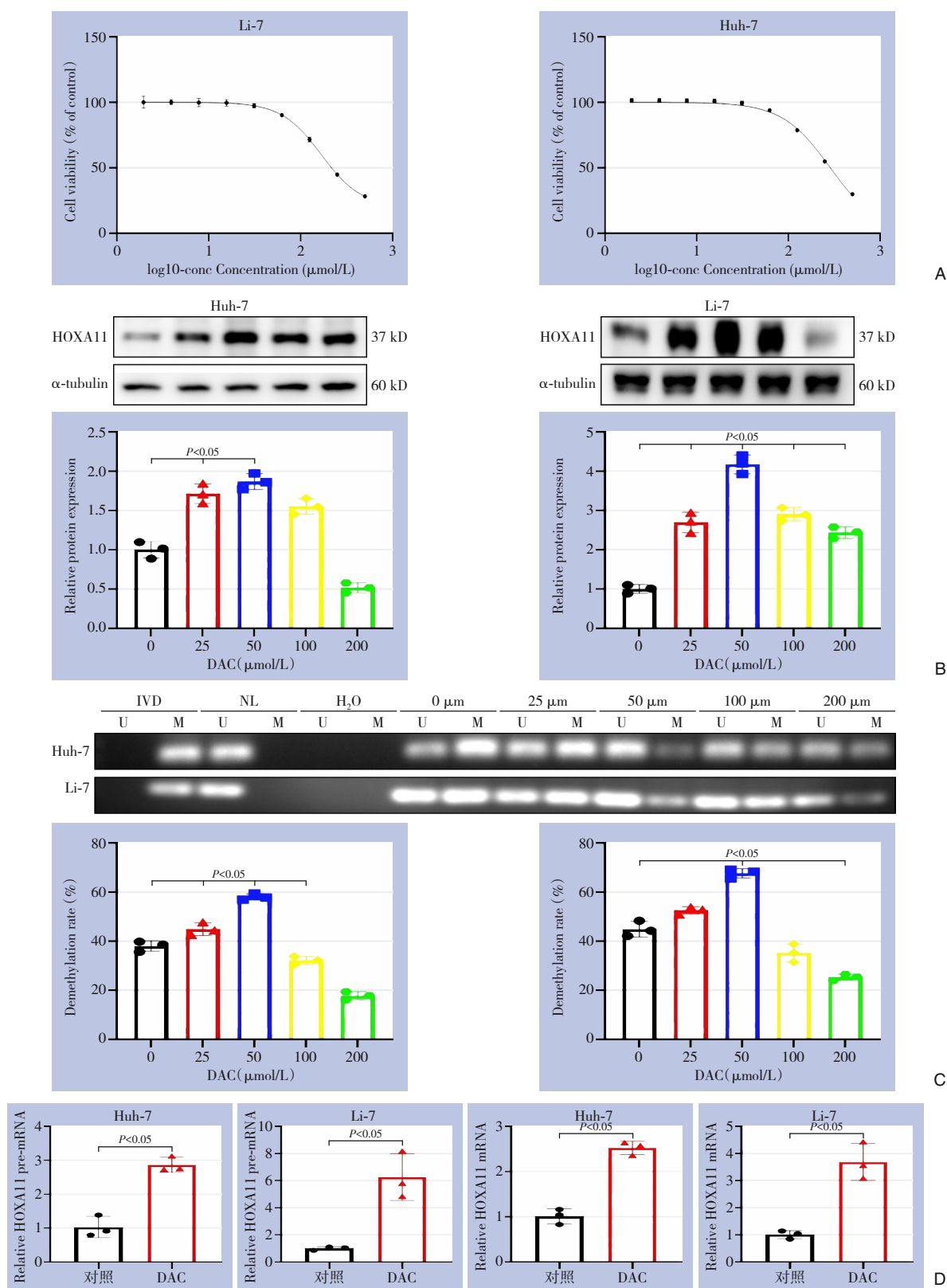


图2 DAC去甲基化恢复HOXA11表达 A: CCK-8检测系列浓度DAC处理72 h后Li-7和Huh-7细胞活力; B: DAC处理对HOXA11蛋白表达的剂量-效应关系; C: DAC处理对HOXA11启动子去甲基化率的剂量-效应关系; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ DAC处理72 h后HOXA11前体mRNA和成熟mRNA表达变化

Figure 2 DAC-mediated demethylation restores HOXA11 expression A: Cell viability of Li-7 and Huh-7 cells following DAC treatment for 72 h; B: Dose-response relationship between DAC treatment and HOXA11 protein expression; C: Dose-response relationship between DAC treatment and HOXA11 promoter demethylation; D: Changes in precursor and mature HOXA11 mRNA expression after treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ DAC for 72 h

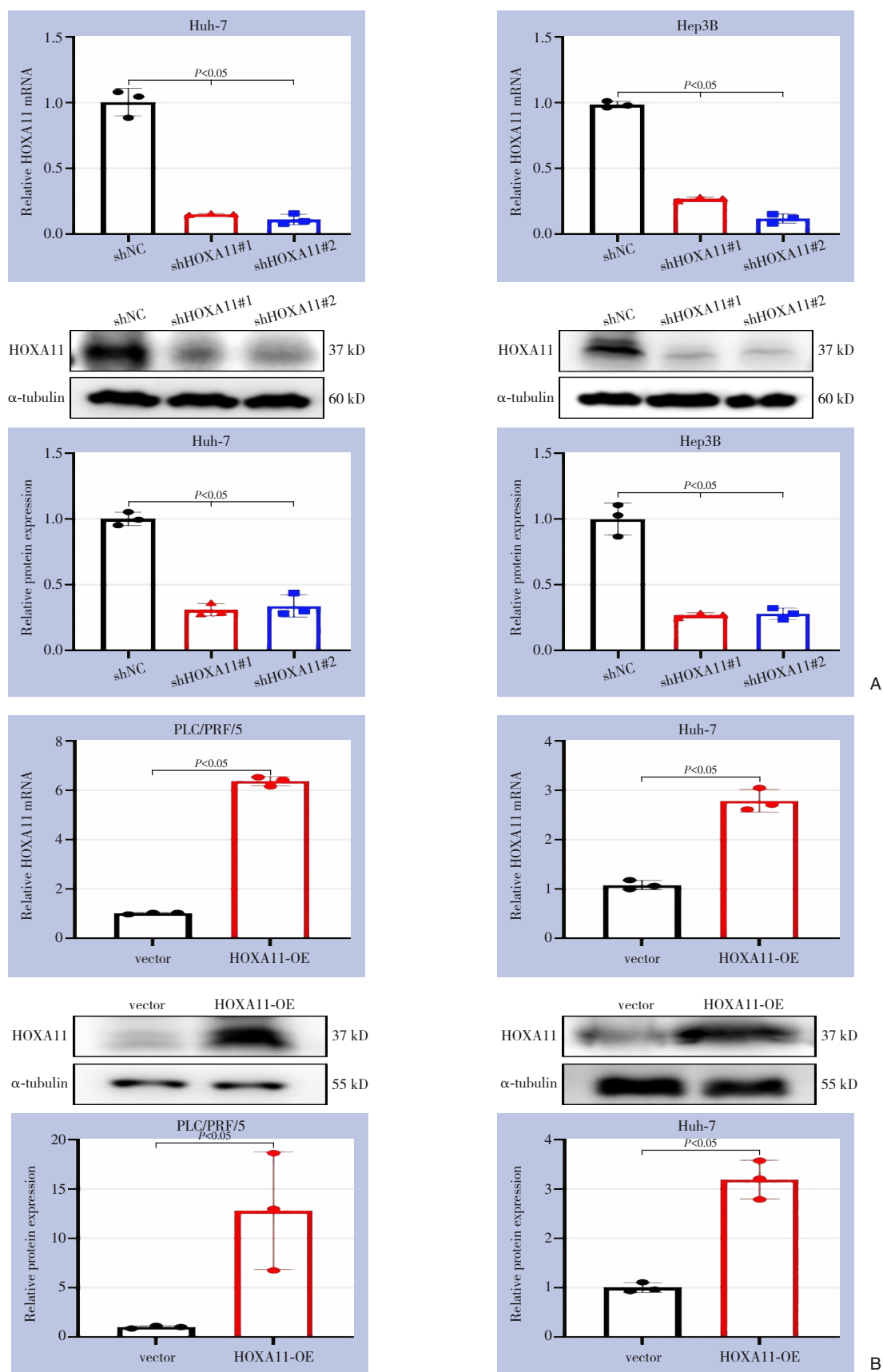


图3 敲低与过表达细胞模型的效率验证 A: qRT-PCR与Western blot验证shHOXA11#1和shHOXA11#2在Huh-7和Hep3B细胞中的敲低效率; B: qRT-PCR与Western blot验证HOXA11在Huh-7和PLC/PRF/5细胞中的过表达效率

Figure 3 Validation of HOXA11 knockdown and overexpression models A: Validation of HOXA11 knockdown efficiency in Huh-7 and Hep3B cells by qRT-PCR and Western blot; B: Validation of HOXA11 overexpression efficiency in Huh-7 and PLC/PRF/5 cells by qRT-PCR and Western blot

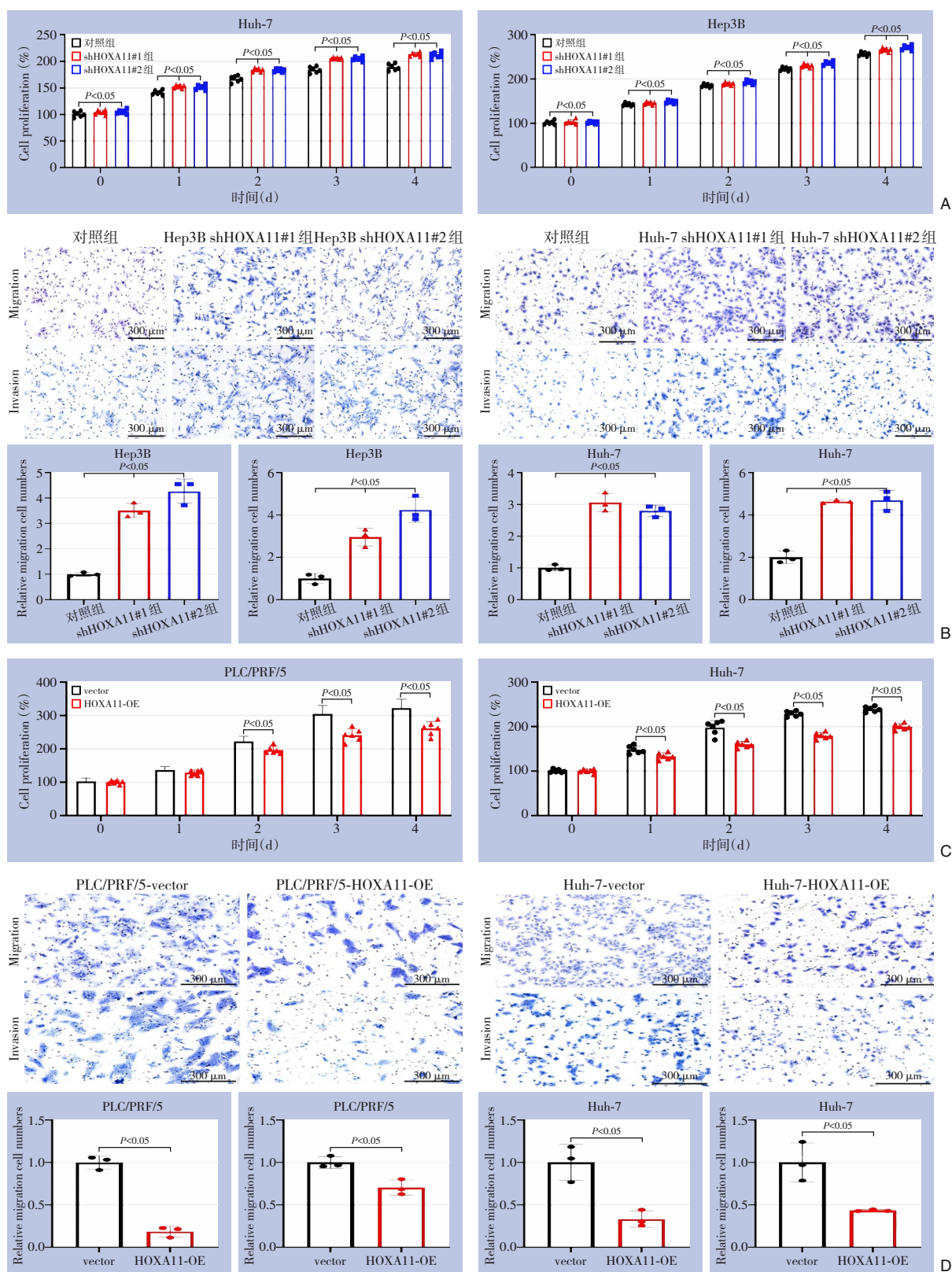


图4 敲低HOXA11促进/过表达HOXA11抑制HCC细胞增殖、迁移与侵袭 A: CCK-8检测敲低HOXA11后Huh-7和Hep3B细胞增殖曲线; B: Transwell检测敲低HOXA11后Huh-7和Hep3B细胞迁移和侵袭能力; C: CCK-8检测过表达HOXA11后Huh-7和PLC/PRF/5细胞增殖曲线; D: Transwell检测过表达HOXA11后Huh-7和PLC/PRF/5细胞迁移和侵袭能力

Figure 4 HOXA11 knockdown promotes whereas HOXA11 overexpression suppresses proliferation, migration, and invasion of HCC cells A: Proliferation curves of Huh-7 and Hep3B cells following HOXA11 knockdown; B: Migration and invasion assays after HOXA11 knockdown; C: Proliferation curves of Huh-7 and PLC/PRF/5 cells following HOXA11 overexpression; D: Migration and invasion assays after HOXA11 overexpression

2.5 HOXA11 对 TGF- β /Smad 信号通路及 EMT 进程的调控作用

以下通过 DAC 干预、shRNA 敲低及过表达三种策略验证 HOXA11 对 TGF- β /Smad 通路及 EMT 的调控作用。Western blot 检测结果显示, DAC 处理后, Li-7 和 Huh-7 细胞中 HOXA11 蛋白表达分别上调至对照组的 6.10 倍和 3.03 倍 (均 $P<0.05$)。同时, TGF- β /Smad 通路相关蛋白表达发生相应变化: 在 Li-7 和 Huh-7 细胞中, TGF- β 1 分别降至对照组的 49% 和 27%, p-Smad2/3 分别降至 49% 和 22% (均 $P<0.05$)。DAC 处理后, Li-7 和 Huh-7 细胞中上皮标志物 E-cadherin 表达分别上调至对照组的 3.14 倍和 2.27 倍 (均 $P<0.05$); 间质标志物 Snail 分别降至对照组的 35% 和 41%, N-cadherin 分别降至 49% 和 48%, 纤连蛋白 (fibronectin, Fn) 分别降至 35% 和 19% (均 $P<0.05$); Li-7 细胞中未检测到 vimentin 表达, Huh-7 细胞中 vimentin 降至 75% ($P<0.05$) (图 5A)。敲低 HOXA11 后, Huh-7 和 Hep3B 细胞中 HOXA11 蛋白表达分别降至对照组的 31% 和 34%、25% 和 30% (均 $P<0.05$); TGF- β 1 增至 2.08 倍和 1.91 倍、1.69 倍和 1.58 倍, p-Smad2/3 增至 1.93 倍和 2.10 倍、2.41 倍和 2.58 倍, Snail 增至 2.69 倍和 2.93 倍、1.65 倍和 1.82 倍 (均 $P<0.05$); E-cadherin 降至 61% 和 39%、67% 和 71% (均 $P<0.05$); N-cadherin 增至 1.74 倍和 1.93 倍、1.67 倍和 1.73 倍, vimentin 增至 1.74 倍和 1.84 倍、1.86 倍和 1.82 倍, Fn 增至 2.30 倍和 1.81 倍、2.52 倍和 2.70 倍 (均 $P<0.05$) (图 5B)。HOXA11 过表达后, Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中 TGF- β 1 分别降至对照组的 45% 和 20%, p-Smad2/3 分别降至 42% 和 28%, Snail 分别降至 57% 和 35% (均 $P<0.05$); EMT 标志物方面, E-cadherin 分别上调至 2.56 倍和 1.78 倍, N-cadherin 分别降至 33% 和 58%, vimentin 分别降至 44% 和 45%, Fn 分别降至 12% 和 29% (均 $P<0.05$) (图 5C)。以上结果表明 HOXA11 过表达可抑制 TGF- β /Smad 通路并维持上皮表型。

2.6 HOXA11 过表达对 TGF- β 1 诱导的 EMT 具有挽救效应

为验证 HOXA11 能否对抗外源 TGF- β 1 诱导的 EMT, 进行了联合 TGF- β 1 刺激的挽救实验。TGF- β 1 浓度梯度处理显著上调 Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中 p-Smad2/3 蛋白水平 (均 $P<0.05$)。2.5、5.0 及 10.0 ng/mL 均可有效激活 Smad 磷酸化, 其中 5.0 ng/mL 组表达达峰值 (Huh-7: 8.691 ± 0.441 ;

PLC/PRF/5: 3.240 ± 0.157), 且细胞形态保持正常; PLC/PRF/5 中 10.0 ng/mL 组较峰值显著下降 ($P<0.05$), 提示高浓度下通路响应出现衰减。基于效力窗口与安全性考量, 确定 5.0 ng/mL 为后续实验的标准刺激浓度 (图 6A)。Western blot 结果表明, HOXA11 过表达对 TGF- β /Smad 信号轴具有显著的负向调控作用。HOXA11-OE 组 HOXA11 蛋白均成功过表达 (均 $P<0.05$)。相较于对照组, HOXA11-OE 组 p-Smad2/3 水平显著下调, Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中分别降至对照组的 11.5% 和 23.5% (均 $P<0.05$)。在 vector 背景下, TGF- β 1 处理使 p-Smad2/3 表达显著升高, Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中分别升至对照组的 1.79 倍和 1.74 倍 (均 $P<0.05$)。HOXA11-OE 联合 TGF- β 1 处理后, 被抑制的 p-Smad2/3 水平大幅回升, 较单用 HOXA11-OE 组分别上调 8.48 倍和 3.40 倍 (均 $P<0.05$), 但仍显著低于 vector+TGF- β 1 组, 分别降至其 45.3% 和 54.1% (均 $P<0.05$)。HOXA11 过表达与 TGF- β 1 处理之间存在显著交互作用 (均 $P<0.05$)。在 EMT 标志物层面, HOXA11-OE 组较 vector 组 E-cadherin 表达上调, Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中分别升至对照组的 1.87 倍和 1.31 倍 (均 $P<0.05$); Snail 分别降至对照组的 13.7% 和 59.3%, N-cadherin 降至 37.2% 和 26.9%, vimentin 降至 37.3% 和 50.5%, Fn 降至 21.9% 和 28.2% (均 $P<0.05$)。联合 TGF- β 1 处理后, 与 HOXA11-OE 组相比, HOXA11-OE+TGF- β 1 组 Snail 分别升至 HOXA11-OE 组的 5.31 倍和 3.41 倍, N-cadherin 升至 3.25 倍和 3.93 倍, vimentin 升至 3.07 倍和 2.30 倍, Fn 升至 6.15 倍和 3.49 倍 (均 $P<0.05$); E-cadherin 分别降至 HOXA11-OE 组的 19.0% 和 19.3% (均 $P<0.05$)。与 vector+TGF- β 1 组相比, HOXA11-OE+TGF- β 1 组在 Huh-7 细胞中 E-cadherin 升至 2.74 倍, Snail 降至 59.6%, N-cadherin 降至 59.4%, Fn 降至 49.3% (均 $P<0.05$); 在 PLC/PRF/5 细胞中 E-cadherin 升至 3.94 倍, N-cadherin 降至 90.3%, Fn 降至 50.0% (均 $P<0.05$), Snail 升至 1.38 倍 ($P<0.05$)。vector 组中 TGF- β 1 对 vimentin 基础表达无显著影响, HOXA11-OE+TGF- β 1 组与 vector+TGF- β 1 组相比, vimentin 在 Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞中分别升至 1.08 倍和 1.14 倍 (均 $P<0.05$) (图 6B)。

2.7 临床样本中 HOXA11 低表达与 TGF- β /Smad 信号通路激活及 EMT 进程的相关性

为验证细胞实验发现的调控轴在临床样本中

的相关性,采用Western blot检测10对配对HCC及癌旁组织中相关蛋白的表达。结果显示,与癌旁组织相比,HCC组织中HOXA11蛋白表达显著降低,降至对照组的24% ($P<0.05$); TGF-β/Smad通路关键分子TGF-β1和p-Smad2/3表达均明显上调,分别升至1.59倍和1.68倍 (均 $P<0.05$); EMT核心转录因子Snail表达亦显著升高,升至1.57倍 ($P<0.05$); HCC组织中EMT标志物表达谱发生典型转换:上皮标志物E-cadherin表达显著降低,降至癌旁组织的51% ($P<0.05$); 间质标志物N-cadherin、vimentin和Fn表达均显著升高,分别升至1.51倍、2.02倍和2.08倍 (均 $P<0.05$) (图7A)。定量分析结果显示,与癌旁组织相比,HCC组织中HOXA11和

E-cadherin蛋白表达均显著降低,分别降至71%和67% (均 $P<0.05$); vimentin、Fn和Snail表达均显著升高,分别升至1.72倍、1.16倍和1.71倍 (均 $P<0.05$) (图7B) (补充表7)。以上结果从蛋白定位层面进一步确认了HOXA11在HCC组织中的低表达及EMT进程的激活。为量化HOXA11与EMT表型的关联程度,基于11对样本的免疫组化定量数据,采用Spearman秩相关进行分析。结果显示,HOXA11表达与E-cadherin呈明显正相关 ($\rho=0.756$, $P<0.05$),与Snail、vimentin、Fn均呈明显负相关 ($\rho=-0.714$ 、 -0.637 、 -0.484 , 均 $P<0.05$) (图7C)。以上结果表明,HCC组织中HOXA11低表达与EMT进程的激活在统计学上高度关联。

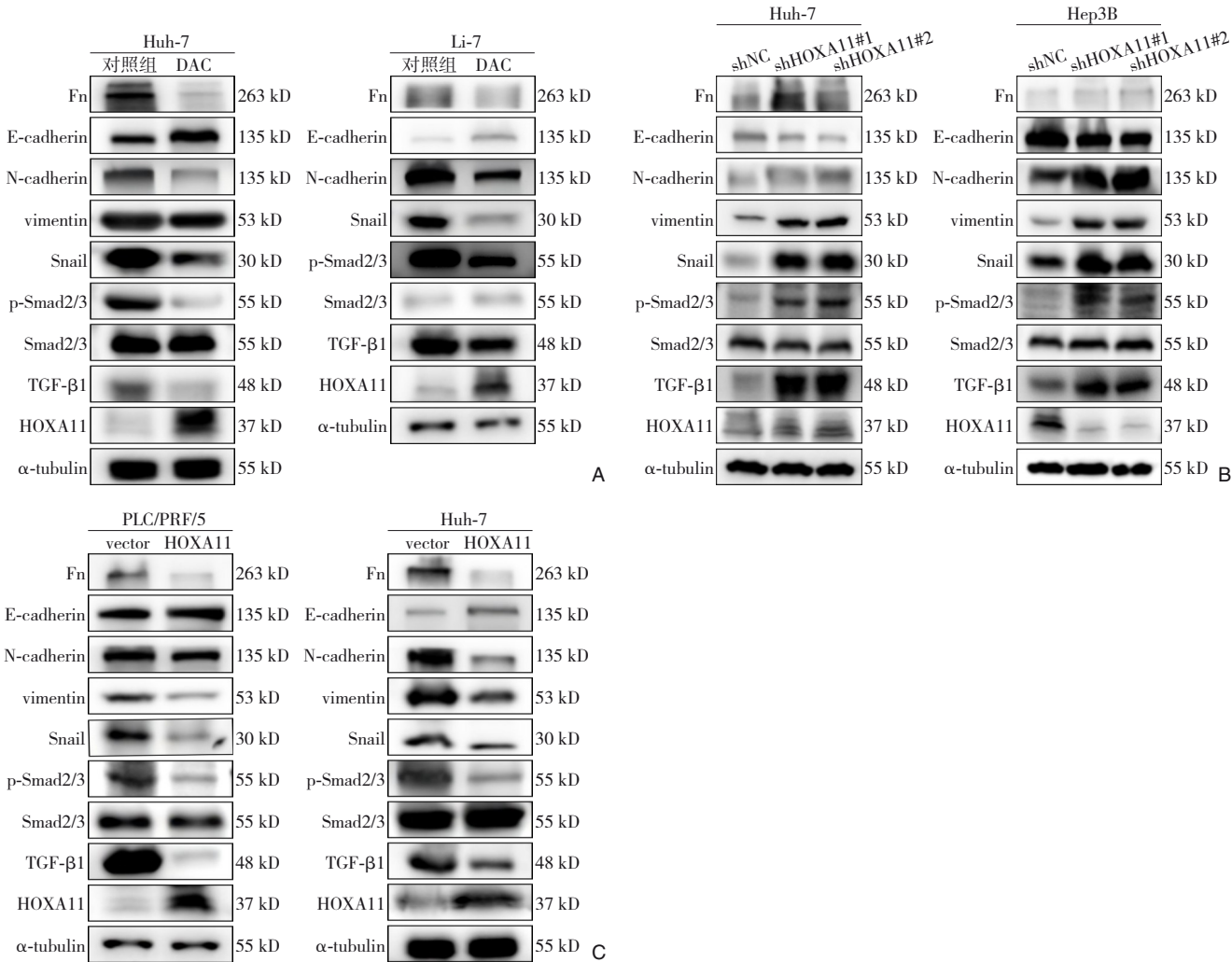


图5 HOXA11通过抑制TGF-β/Smad通路逆转EMT A: DAC处理后Li-7和Huh-7细胞中HOXA11、TGF-β/Smad通路及EMT相关蛋白表达; B: 敲低HOXA11后Huh-7和Hep3B细胞中HOXA11、TGF-β/Smad通路及EMT相关蛋白表达; C: 过表达HOXA11后Huh-7和PLC/PRF/5细胞中HOXA11、TGF-β/Smad通路及EMT相关蛋白表达

Figure 5 HOXA11 reverses EMT through inhibition of the TGF-β/Smad signaling pathway A: Expression of HOXA11, TGF-β/Smad pathway proteins, and EMT markers after DAC treatment; B: Expression changes after HOXA11 knockdown; C: Expression changes after HOXA11 overexpression

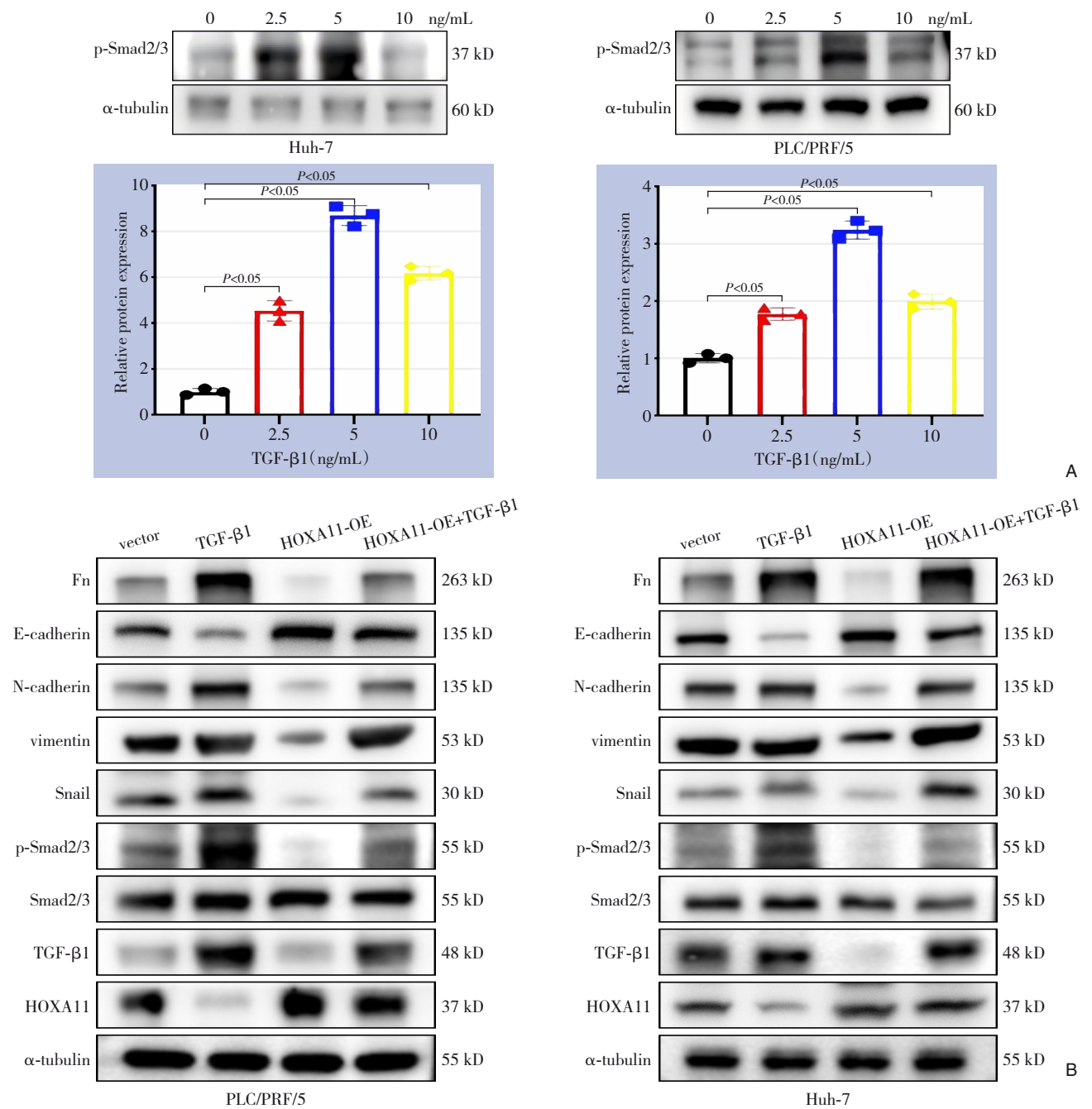


图6 HOXA11 过表达对TGF-β1 诱导EMT 的挽救效应 A: 不同浓度TGF-β1 处理对Huh-7 和PLC/PRF/5 细胞p-Smad2/3 水平的影响; B: 不同处理组Huh-7 和PLC/PRF/5 细胞HOXA11、TGF-β/Smad 通路及EMT 相关蛋白表达

Figure 6 Rescue effect of HOXA11 overexpression on TGF-β1-induced EMT A: Effects of different concentrations of TGF-β 1 on p-Smad2/3 levels in Huh-7 and PLC/PRF/5 cells; B: Expression of HOXA11, TGF-β/Smad pathway proteins, and EMT markers under different treatment conditions

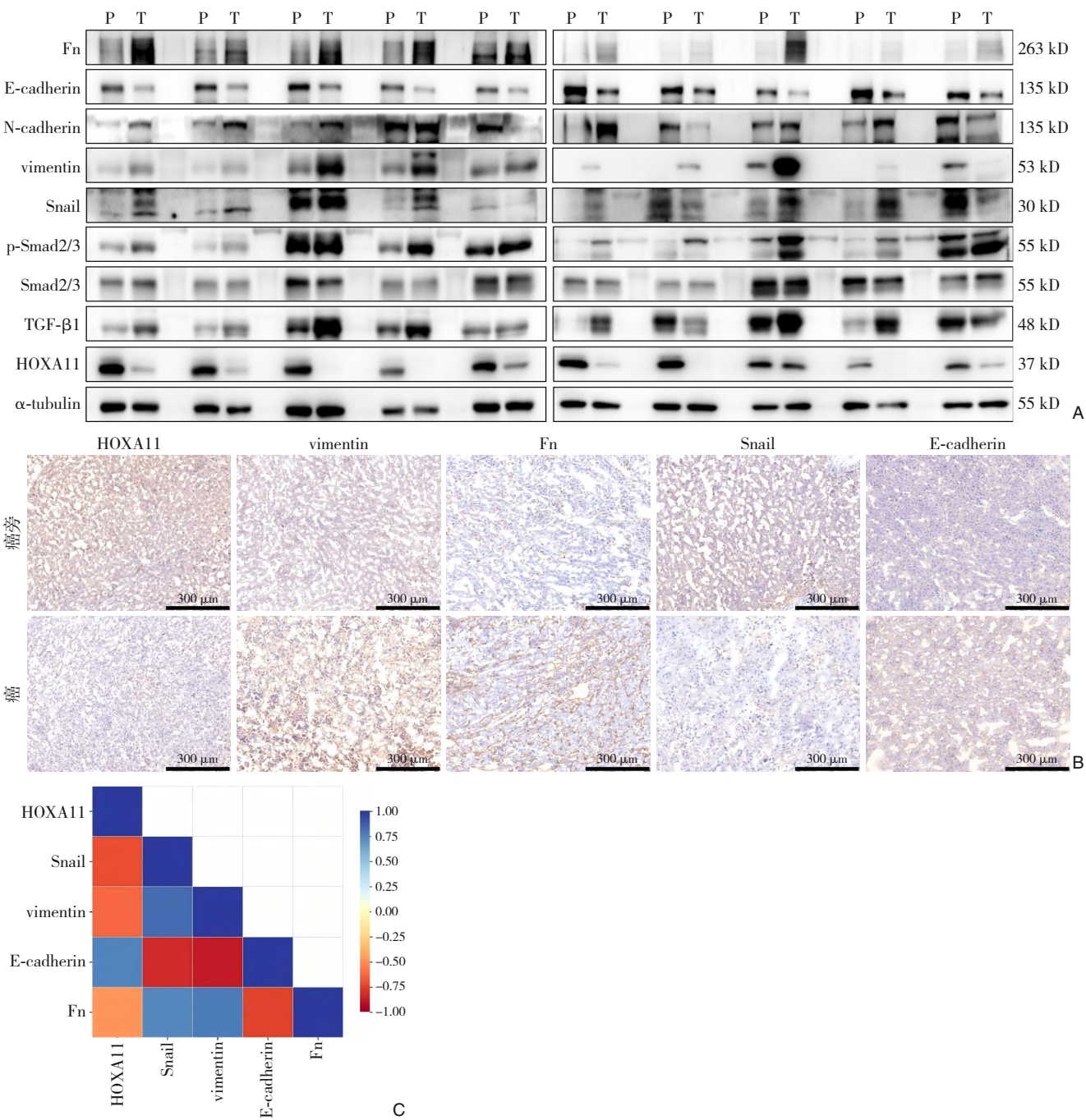


图7 临床HCC组织中HOXA11与EMT标志物的表达及相关性分析 A: Western blot检测10对HCC(T)及癌旁(P)组织中HOXA11、TGF-β/Smad通路及EMT相关蛋白表达; B: 免疫组化检测11对HCC及癌旁组织中HOXA11、vimentin、Fn、Snail、E-cadherin表达; C: HOXA11与EMT标志物的Spearman相关性分析($n=11$)

Figure 7 Expression and correlation analysis of HOXA11 and EMT markers in clinical HCC tissues A: Western blot analysis of HOXA11, TGF-β/Smad pathway proteins, and EMT markers in 10 paired HCC tissues; B: Immunohistochemical staining of HOXA11, vimentin, Fn, Snail, and E-cadherin; C: Spearman correlation analysis between HOXA11 and EMT markers ($n=11$)

2.8 HOXA11过表达抑制HCC细胞体内肺转移

为评估HOXA11对HCC细胞体内远处转移能力的影响,将稳定转染空载对照慢病毒(vector)或HOXA11过表达慢病毒(HOXA11-OE)的Huh-7

细胞,经尾静脉注射至BALB/c裸小鼠体内。注射后第60天取肺组织观察。大体观察显示,vector组小鼠肺叶正常结构严重破坏;HOXA11-OE组小鼠肺组织大体形态基本正常,仅见少量散在微小转

移灶(图8A)。取肺组织切片行HE染色,病理学确认转移灶。镜下观察显示,vector组肺组织内可见大量肿瘤细胞巢,正常肺泡结构被广泛破坏;HOXA11-OE组转移灶数量少、面积小,肺泡结构相对完整。为进一步量化肺转移负荷,对肺组织

切片中肿瘤面积百分比进行图像分析。结果显示,vector组肿瘤面积百分比为 $(26.33 \pm 9.20)\%$,HOXA11-OE组仅为 $(2.48 \pm 1.79)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图8B)。以上体内实验结果表明,HOXA11过表达显著抑制HCC细胞的体内肺转移。

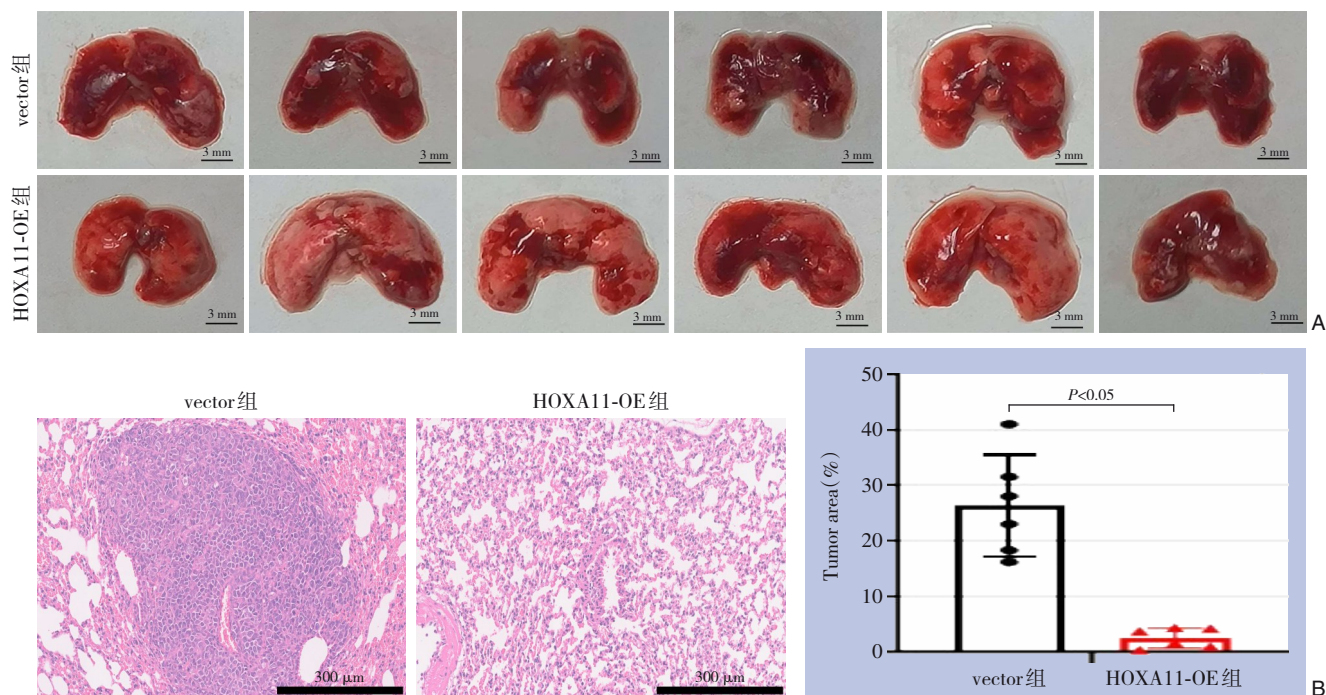


图8 HOXA11过表达抑制HCC细胞体内肺转移 A: vector组与HOXA11-OE组肺转移大体观察; B: 肺组织HE染色及肿瘤面积定量分析

Figure 8 HOXA11 overexpression suppresses pulmonary metastasis of HCC cells in vivo A: Gross appearance of lung metastases in vector and HOXA11-OE groups; B: HE staining and quantitative analysis of metastatic tumor area

3 讨论

本研究表明,HOXA11在HCC中因启动子CpG岛高甲基化致转录沉默,该沉默可被DAC有效逆转。功能上,HOXA11过表达显著抑制HCC细胞增殖、迁移、侵袭及EMT进程,敲低则促进上述恶性表型。机制上,HOXA11通过负向调控TGF- β /Smad信号轴驱动上述效应,确立了DNA高甲基化 $\rightarrow$ HOXA11转录沉默 $\rightarrow$ TGF- β /Smad信号异常活化 $\rightarrow$ EMT程序启动 $\rightarrow$ 驱动远处转移的调控轴。临床配对样本分析独立印证了上述发现,提示该表观遗传失活的可逆性使HOXA11重激活或联合TGF- β /Smad阻断成为潜在抗转移策略,其适用人群与疗效边界有待更大规模队列验证。

HOXA11在不同肿瘤中的作用存在明显差异。既往研究提示,该基因在急性髓系白血病^[19]和胶

质母细胞瘤^[20]中发挥抑癌作用,在肺鳞癌^[21]和胃癌^[22-23]中促进肿瘤干性与侵袭转移。HOXA11在不同恶性肿瘤中的功能分化并非偶然,而是由其靶基因选择的组合调控逻辑所决定:HOX蛋白单体仅能非特异地识别泛AT富集序列,其真正的靶标区分能力必须依赖于PBX/MEIS等TALE辅因子的协同结合才能实现^[24];同时还受到细胞谱系特异性染色质开放区与表观修饰状态的协同约束,从而在不同癌细胞系中驱动差异化的下游信号网络与生物学表型^[25]。这一机制框架为本研究观察到的多细胞系响应异质性提供了直接的分子解释:在过表达及TGF- β 1挽救实验中,PLC/PRF/5细胞对经典Smad通路的抑制较为彻底,但在外源TGF- β 1刺激下,该细胞系更容易激活其他代偿通路。

在挽救实验中,尽管HOXA11过表达显著抑制了p-Smad2/3水平,但Snail蛋白并未被同步压制。

这提示TGF-β信号可能通过非Smad旁路实现了功能性逃逸。已有研究表明,TGF-β可通过PI3K/Akt通路磷酸化GSK-3β并使其失活,从而阻止Snail蛋白的泛素化降解,以非Smad依赖的方式维持Snail的稳定性^[26-27]。相比之下,vimentin在挽救条件下的不降反升则需要从更复杂的平行机制来解释。一方面,TGF-β1已被证实可通过PI3K/Akt通路在转录后水平直接上调vimentin蛋白表达^[28]。另一方面,TGF-β还能通过Rho家族GTP酶调控细胞骨架重塑与转录程序,且该过程完全独立于经典Smad核转位^[29]。值得注意的是,已有研究发现,Src激酶催化产生的p-Tyr42 RhoA能够直接与β-catenin结合并进入细胞核,特异性结合vimentin基因启动子并驱动其转录^[30]。尽管这一机制最初是在Wnt3A刺激条件下被发现的,但大量研究已证实TGF-β与Wnt/β-catenin通路在ROS生成、Src活化及β-catenin稳态调节中存在广泛的交互对话^[31]。因此,有理由推测,本研究中外源TGF-β1刺激下观察到的vimentin反常升高,也有可能部分源于类似的非经典转录调控机制。

在基础培养条件下,HOXA11过表达可协同下调p-Smad2/3、Snail与vimentin,提示经典Smad轴的负向调控占主导;而在外源TGF-β1刺激下,尽管p-Smad2/3仍被显著抑制,Snail和vimentin却未能同步下降,提示TGF-β信号可能动员非Smad旁路以维持间质标志物表达。上述对比反映了TGF-β信号网络的冗余特性,在微环境因子持续高负荷背景下,单纯恢复HOXA11表达或许难以彻底阻断EMT进程,联合靶向PI3K或TGFBR1等关键旁路节点或是提升抗转移策略稳健性的必要方向。

此外,DAC处理呈现50 μmol/L效应达峰、更高浓度回落的双相特征,提示超窗口剂量可能引发非特异性DNA损伤应激,干扰启动子去甲基化后的真实转录输出。该结果为后续实验的DAC工作浓度提供了剂量学依据。

关于HOXA11负向调控TGF-β/Smad通路的具体分子机制,已有研究提供了一些值得讨论的线索,但目前仍缺乏直接证据,相关结论尚需谨慎解读。在胃癌中,HOXA11可直接结合TGF-β1启动子P2区域并转录激活其表达^[23],提示其作为转录因子具有直接调控靶基因启动子的能力。此外,HOXA11也被证实可与Smad1、Smad4及Smad6形成异源复合物,其中Smad6-HOX复合物可抑制Smad1

的转录活性^[32-33]。基于上述发现推测,HOXA11在HCC中可能通过两种方式调控TGF-β通路,即直接结合靶基因启动子或与Smad蛋白形成抑制性复合物。然而,具体机制仍有待进一步明确,例如借助ChIP-seq鉴定全基因组结合位点后方可系统解析。此外,关于非Smad旁路在代偿性维持EMT中的作用,目前主要依赖挽救实验的表型观察及文献间接推断,证据链尚不完整,后续拟联合PI3K或TGFBR1抑制剂予以验证。同时,本研究临床样本量相对有限,后续需在多中心、大样本队列中进一步验证HOXA11的临床意义及预后价值。

综上,本研究揭示了DNA高甲基化→HOXA11转录沉默→TGF-β/Smad信号异常活化→EMT程序启动→驱动远处转移的调控轴,为表观遗传联合TGF-β靶向的抗转移策略提供了新依据与潜在靶点。

作者贡献声明:王佳敏、曾慧岚、程洁、崔芳芳负责实验设计、实验实施、统计分析、文章撰写和修改;杨涛宇、黄安琪、莫嘉强、叶青负责数据分析;熊子慧、王秋婷负责文章审阅;何佳南负责研究设计和指导、文章审阅和经费支持。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

补充材料:<http://www.zpwz.net/zgptwkzz/article/abstract/pw260026>

参考文献

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1):12-49. doi:10.3322/caac.21820.
- [2] Tabrizian P, Jibara G, Shrager B, et al. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis[J]. Ann Surg, 2015, 261(5):947-955. doi:10.1097/sla.0000000000000710.
- [3] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360):1345-1362. doi:10.1016/S0140-6736(22)01200-4.
- [4] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2020, 382(20):1894-1905. doi:10.1056/nejmoa.1915745.
- [5] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3):212-226. doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- [6] Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, et al. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,

- 2016, 65(4):798–808. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.007.
- [7] Alabi FA, Okpalanwaka IF, Oyegbesan A, et al. Transforming growth factor-beta signaling in cancer: therapeutic implications, challenges, and pathways to progress[J]. *MedComm*, 2025, 4(3): e70027. doi:10.1002/mog2.70027.
- [8] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2):69–84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
- [9] Fortuny M, Sanduzzi-Zamparelli M, Reig M. Systemic therapies in hepatocellular carcinoma: a revolution? [J]. *United European Gastroenterol J*, 2024, 12(2):252–260. doi:10.1002/ueg2.12510.
- [10] Kudlay D, Kiselev V, Sukhikh G. HOXA10 and HOXA11 methylation: epigenetic barriers to endometrial receptivity in ART[J]. *Genes*, 2025, 16(10):1230. doi:10.3390/genes16101230.
- [11] Hubert KA, Wellik DM. Hox genes in development and beyond[J]. *Development*, 2023, 150:dev192476. doi:10.1242/dev.192476.
- [12] Wang L, Cui Y, Sheng JD, et al. Epigenetic inactivation ofHOXA11, a novel functional tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with RCC TNM classification[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21861–21870. doi: 10.18632/oncotarget.15668.
- [13] Wang C, Shi M, Ji J, et al. A self-enforcing HOXA11/Stat3 feedback loop promotes stemness properties and peritoneal metastasis in gastric cancer cells[J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7628–7647. doi:10.7150/thno.36277.
- [14] Massagué J. TGF β signalling in context[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10):616–630. doi:10.1038/nrm3434.
- [15] Xin X, Cheng X, Zeng F, et al. The role of TGF- β /SMAD signaling in hepatocellular carcinoma: from mechanism to therapy and prognosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(4):1436–1451. doi:10.7150/ijbs.89568.
- [16] Sun YF, Guo W, Xu Y, et al. Circulating tumor cells from different vascular sites exhibit spatial heterogeneity in epithelial and mesenchymal composition and distinct clinical significance in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(3): 547–559. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-1063.
- [17] Salama BM, Helmy MW, Fouad H, et al. The synergistic antitumor effect of decitabine and vorinostat combination on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line via epigenetic modulation of autophagy-apoptosis molecular crosstalk[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(7):5935–5949. doi:10.3390/cimb45070375.
- [18] Al-Salihi M, Yu M, Burnett DM, et al. The depletion of DNA methyltransferase-1 and the epigenetic effects of 5-aza-2'deoxyctidine (decitabine) are differentially regulated by cell cycle progression[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(8): 1021–1028. doi: 10.4161/epi.6.8.16064.
- [19] Roux B, Picou F, Debeissat C, et al. Aberrant DNA methylation impacts HOX genes expression in bone marrow mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndromes and de novo acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(8): 1263–1275. doi:10.1038/s41417-022-00441-w.
- [20] Se YB, Kim SH, Kim JY, et al. Underexpression of HOXA11 is associated with treatment resistance and poor prognosis in glioblastoma[J]. *Cancer Res Treat*, 2017, 49(2): 387–398. doi: 10.4143/crt.2016.106.
- [21] Zhang R, Zhang TT, Zhai GQ, et al. Evaluation of the HOXA11 level in patients with lung squamous cancer and insights into potential molecular pathways via bioinformatics analysis[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1):109. doi:10.1186/s12957-018-1375-9.
- [22] Li Z, Lu T, Chen Z, et al. HOXA11 promotes lymphatic metastasis of gastric cancer via transcriptional activation of TGF β 1[J]. *iScience*, 2023, 26(8):107346. doi:10.1016/j.isci.2023.107346.
- [23] Wang C, Ji J, Jin Y, et al. Tumor-mesothelium HOXA11-PDGF BB/TGF β 1-miR-181a-5p-Egr1 feedforward amplifier circuitry propels mesothelial fibrosis and peritoneal metastasis of gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2024, 43(3): 171–188. doi: 10.1038/s41388-023-02891-4.
- [24] Merabet S, Mann RS. To be specific or not: the critical relationship between hox and TALE proteins[J]. *Trends Genet*, 2016, 32(6):334–347. doi:10.1016/j.tig.2016.03.004.
- [25] De Kumar B, Darland DC. The Hox protein conundrum: The "specifics" of DNA binding for Hox proteins and their partners[J]. *Dev Biol*, 2021, 477:284–292. doi:10.1016/j.ydbio.2021.06.002.
- [26] 唐纪元, 康新国, 贺纯静. 转化生长因子- β 调控的非 Smad 途径在糖尿病中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2025, 22(11):55–59. doi:10.20047/j.issn1673-7210.2025.11.10.
- Tang JY, Kang XG, He CJ. Research progress on transforming growth factor- β regulated non-Smad pathway in diabetes mellitus[J]. *China Medical Herald*, 2025, 22(11): 55–59. doi: 10.20047/j.issn1673-7210.2025.11.10.
- [27] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition[J]. *Cell Res*, 2009, 19(2): 156–172. doi: 10.1038/cr.2009.5.
- [28] Fortier AM, Van Themsche C, Asselin É, et al. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(5): 984–988. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.045.
- [29] Giarratana AO, Prendergast CM, Salvatore MM, et al. TGF- β signaling: critical nexus of fibrogenesis and cancer[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1):594. doi:10.1186/s12967-024-05411-4.
- [30] Kim JG, Mahmud S, Min JK, et al. RhoA GTPase phosphorylated at tyrosine 42 by src kinase binds to β -catenin and contributes transcriptional regulation of vimentin upon Wnt3A[J]. *Redox Biol*, 2021, 40:101842. doi:10.1016/j.redox.2020.101842.
- [31] Sheikh K, Amjad M, Irfan M, et al. Exploring TGF- β signaling in cancer progression: prospects and therapeutic strategies[J]. *OncoTargets Ther*, 2025, 18:233–262. doi:10.2147/ott.s493643.

[32] Cao X. Novel mechanisms of TGFβ/BMP signaling in bone development[J]. FASEB J, 2006, 20(5): A868. doi: 10.1096/fasebj.20.5.a868-b.

[33] Williams TM. Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(14):4475–4484. doi:10.1093/nar/gki761.

本文引用格式:王佳敏,曾慧岚,程洁,等. HOXA11 启动子高甲基化通过激活 TGF-β/Smad-EMT 轴促进肝细胞癌转移[J]. 中国普通外科杂志, 2026, 35(5):960–977. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.260026

Cite this article as: Wang JM, Zeng HL, Cheng J, et al. Promoter hypermethylation of HOXA11 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through activation of the TGF-β/Smad-EMT axis[J]. Chin J Gen Surg, 2026, 35(5):960–977. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.260026

(本文编辑 宋涛)

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	纤连蛋白	FN
Toll 样受体	TLR	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心电图	ECG
氨基末端激酶	JNK	经内镜逆行胰胆管造影	ERCP	心脏监护病房	CCU
白细胞	WBC	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素II	AngII
白细胞介素	IL	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管内皮生长因子	VEGF
半数抑制浓度	IC ₅₀	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
变异系数	CV	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血红蛋白	Hb
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	磷酸盐缓冲液	PBS	血肌酐	SCr
表皮生长因子	EGF	绿色荧光蛋白	GFP	血小板	PLT
丙氨酸氨基转移酶	ALT	酶联免疫吸附测定	ELISA	血压	BP
丙二醛	MDA	美国食品药品监督管理局	FDA	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	脑电图	EEG	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内毒素/脂多糖	LPS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	尿素氮	BUN	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶时间	TT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	凝血酶原时间	PT	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
谷胱甘肽	GSH	生理氯化钠溶液	NS	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	世界卫生组织	WHO	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	双蒸水	ddH ₂ O	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	四甲基偶氮盐微量酶反应	MTT	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	苏木精-伊红染色	HE	正电子发射计算机断层显像	PET/CT
环氧化酶-2	COX-2	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
活化部分凝血活酶时间	APTT	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活性氧	ROS	天门冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
肌酐	Cr	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
计算机 X 线断层照相技术	CT	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL