

HOXB3 促进骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和抑制细胞凋亡的机制研究

罗 凯, 段华彬, 罗明鼎, 宋世杰 (雅安市雨城区人民医院骨科, 四川雅安 625000)

摘要: **目的** 探究同源异型盒基因 B3 (homeobox genes B3, HOXB3) 对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和凋亡的影响及其潜在分子机制。**方法** 检测 2020 年 1 月 ~ 12 月在雅安市第二人民医院骨科行手术治疗的 30 例骨肉瘤患者病理组织及邻近正常组织中 HOXB3 表达; 通过转染干扰 siRNA 敲低 HOXB3 表达, 验证其转染效率; 采用细胞增殖实验、克隆形成实验、细胞划痕实验及细胞凋亡实验分别探究敲低 HOXB3 对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和凋亡的影响; 分析 CDCA3 在骨肉瘤中的表达特征及与 HOXB3 的相关性, 通过染色质免疫共沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析和荧光素酶报告基因实验验证 HOXB3 和细胞分裂周期相关蛋白 3 (cell division cycle associated protein 3, CDCA3) 结合关系; 验证 HOXB3 和 CDCA3 表达调控对骨肉瘤细胞生物学行为的作用机制。**结果** 30 例骨肉瘤临床组织中 HOXB3 表达 (41.154 ± 8.626) 较邻近正常组织 (22.857 ± 7.512) 显著升高, 差异有统计学意义 ($t=8.975, P<0.001$)。敲低 HOXB3 表达后, 骨肉瘤细胞增殖率、克隆形成率和迁移率明显降低 ($F=37.477 \sim 399.842$, 均 $P<0.001$), 细胞凋亡率显著升高 ($F=10.556, P=0.011$)。骨肉瘤组织中 CDCA3 表达 (38.624 ± 7.736) 明显高于邻近正常组织 (21.875 ± 6.482), 差异有统计学意义 ($t=9.090, P<0.001$); HOXB3 与 CDCA3 表达呈正相关 ($r=0.736, P<0.01$)。CDCA3 是 HOXB3 的靶基因; 敲低 HOXB3 表达显著降低了骨肉瘤细胞中 CDCA3 表达 ($F=694.283, P<0.001$)。HOXB3 可结合 CDCA3 的启动子区域正调控 CDCA3 的表达; 在敲低 HOXB3 表达的细胞中回补 CDCA3, 逆转了 HOXB3 对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移、凋亡的抑制/促进作用。**结论** HOXB3 在骨肉瘤中表达上调, 其可能通过与 CDCA3 启动子区域结合, 正向调控 CDCA3 表达促进了骨肉瘤细胞的增殖、克隆形成及迁移, 抑制了细胞凋亡, 可作为临床骨肉瘤治疗的潜在药物靶点。

关键词: 骨肉瘤; 同源异型盒基因 B3; 染色质免疫共沉淀技术 3; 增殖; 克隆形成; 迁移; 凋亡

中图分类号: R738.1; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 01-136-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.027

Mechanism of HOXB3 Promoting Proliferation, Cloning Formation, Migration and Inhibiting Apoptosis of Osteosarcoma Cells

LUO Kai, DUAN Hua-bin, LUO Ming-ding, SONG Shi-jie

(Department of Orthopedics, the Yucheng District People's Hospital of Ya'an, Sichuan Ya'an 625000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of HOXB3 on proliferation, clone formation, migration and apoptosis of osteosarcoma cells and its potential molecular mechanism. **Methods** HOXB3 expression in pathological tissues and adjacent normal tissues of 30 patients with osteosarcoma who underwent surgical treatment in the Department of Orthopedics of the Second People's Hospital of Ya'an from January 2020 to December 2020 was detected. The expression of HOXB3 was knocked down by interfering siRNA transfection, and the transfection efficiency was verified. The effects of knockdown HOXB3 on proliferation, clone formation, migration and apoptosis of osteosarcoma cells were investigated by cell proliferation assay, clone formation assay, cell scratch assay and apoptosis assay. The expression characteristics of CDCA3 in osteosarcoma and its correlation with HOXB3 were analyzed. The binding relationship between HOXB3 and CDCA3 was verified by Chchip analysis and luciferase reporter assay. To verify the mechanism of HOXB3 and CDCA3 expression regulation on the biological behavior of osteosarcoma cells. **Results** HOXB3 expression in 30 cases of osteosarcoma (41.154 ± 8.626) was significantly higher than that in adjacent normal tissues (22.857 ± 7.512), the difference was statistically significant ($t=8.975, P<0.001$). After knockdown of HOXB3 expression, the proliferation rate, clone formation rate and migration rate of osteosarcoma cells were significantly decreased ($F=37.477 \sim 399.842, P<0.001$), and the apoptosis rate was significantly increased ($F=10.556, P=0.011$). CDCA3 expression in osteosarcoma tissues (38.624 ± 7.736) was significantly higher than that in adjacent normal tissues (21.875 ± 6.482), the difference was statistically significant ($t=9.090, P<0.001$). HOXB3 was positively correlated

作者简介: 罗凯 (1980-), 男, 硕士, 副主任医师, 骨科, 研究方向: 脊柱退行性疾病, E-mail: hh1171989yjr@163.com。

with CDCA3 expression ($r=0.736$, $P < 0.01$). CDCA3 was the target gene of HOXB3. Knocking down HOXB3 expression significantly decreased CDCA3 expression in osteosarcoma cells ($F=694.283$, $P < 0.001$). HOXB3 could bind to the promoter region of CDCA3 to positively regulate the expression of CDCA3. CDCA3 supplementation in the cells that knocked down HOXB3 expression reversed the inhibition/promotion of HOXB3 on proliferation, clone formation, migration and apoptosis of osteosarcoma cells. **Conclusion** HOXB3 expression is up-regulated in osteosarcoma. HOXB3 may positively regulate the expression of CDCA3 by binding to the CDCA3 promoter region to promote the proliferation, clonal formation and migration of osteosarcoma cells, and inhibit cell apoptosis. HOXB3 can be used as a potential drug target for clinical treatment of osteosarcoma.

Keywords: osteosarcoma; HOXB3; CDCA3; proliferation; clonal formation; migration; apoptosis

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性骨肿瘤,仅次于淋巴瘤和脑瘤,是第三大常见癌症^[1]。近年研究发现肿瘤的发生发展机制复杂,遗传分子生物学参与其中,为肿瘤的攻克治疗提供了新的研究方向^[2]。同源异型盒基因(homeobox genes, HOX)编码的蛋白作为重要的转录因子可调节组织细胞的生长过程,影响细胞增殖分化,与恶性肿瘤的发生发展关系密切^[3]。HOXB3是HOXB基因家族成员,研究报道其在包括结直肠癌在内的人类多个肿瘤中异常高表达,与临床分期及不良预后关系密切,是预测肿瘤预后复发的有效生物学标志物^[4-6],表明其在肿瘤发生发展中扮演着重要角色。细胞分裂周期相关蛋白3(cell division cycle associated protein 3, CDCA3)是一种含有F盒基序的蛋白质,是细胞有丝分裂的触发因素,研究证实其通过调控有丝分裂过程可调节细胞周期,导致细胞增殖失控,促使恶性肿瘤发生发展^[7];并指出CDCA3在多种肿瘤中也异常高表达,通过影响细胞周期相关蛋白降解及分子转录,影响G1周期进展,在介导肿瘤细胞生物学行为中发挥重要作用^[7-8]。目前,HOXB3和CDCA3在肿瘤发生发展中的作用已被研究证实,然其在骨肉瘤中的作用机制尚不明确,因此本研究拟探究HOXB3和CDCA3对骨肉瘤细胞生物学行为的影响及相互调控作用,以期为临床研究提供新的研究分子靶标。

1 材料与方法

1.1 实验对象 收集2020年1月~12月在雅安市第二人民医院骨科行手术治疗的30例骨肉瘤患者临床组织及其邻近正常组织标本,均由术中获取经病理确认后制成组织标本置于低温液氮中保存备用。人骨肉瘤细胞(U2OS)购于中国科学院上海细胞库,培养在含10 ml/dl胎牛血清的DMEM培养基中,并加入青霉素100 IU/ml和链霉素100 μ g/ml,置于95%湿度、5 ml/dl CO₂, 37℃培养箱中。

1.2 试剂及仪器 DMEM培养基、链霉素、青霉素购自美国HyClone公司;脂质体lipo2000,胰蛋白酶购自美国Invitrogen公司;实时荧光定量PCR试剂盒、Trizol试剂、逆转录试剂盒购自美国Prome-

ga公司;PCR仪、酶标仪购自美国Bio Rad公司;MTS反应液、细胞克隆试剂盒、流式细胞仪购自美国Corning公司;阴性对照siCTL,2条干扰HOXB3 SiRNA,2条干扰CDCA3 SiRNA由北京擎科生物科技有限公司设计、合成等。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染:取生长密度达80%左右的细胞按照Lipo2000转染试剂盒进行细胞转染,转染2条干扰HOXB3 SiRNA序列细胞设为siHOXB3#1组和siHOXB3#2组,转染阴性对照siCTL序列细胞设为siCTL组,转染2条干扰CDCA3 SiRNA序列细胞设为siCDCA3#1组和siCDCA3#2组,转染siHOXB3+CDCA3设为共转染组。转染后置入95%湿度,5 ml/dl CO₂, 37℃培养箱中常规培养2天,后收集各组细胞用于实验。

1.3.2 实时荧光定量PCR实验(qRT-PCR):取转染后各组细胞采用Trizol试剂盒提取细胞总RNA,经逆转录试剂盒反转录为cDNA,以此为模板配置PCR反应体系行RT-PCR扩增;引物HOXB3 F: 5'-GCAAUGCUUCGAAGUCUCGUAAG-3', R: 5'-CUAGCAAGACUCGAAGACUUGC-3'; CDCA3 F: 5'-AAGACGGTTCGGAGTCAGAC-3', R: 5'-CCAGCAGTAGCTGAAGCGG-3';内参GAPDH F: 5'-GCAGCAGATGGCTCGAAAT-3', R: 5'-GCTGTTCTATACTTGTG-3';反应条件: 94℃ 60 s, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 循环40次;采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因相对表达水平。

1.3.3 细胞增殖实验:取消化后各组细胞以1×10⁵个/孔接种于96孔板,5 ml/dl CO₂, 37℃孵育待细胞贴壁后进行转染,每孔设3个生物复孔;按比例配制MTS反应液,每孔加入MTS反应溶液100 μ l,继续培养48 h后检测490 nm处吸光度(A值),绘制细胞生长曲线。

1.3.4 克隆形成实验:取各组贴壁后细胞进行转染,每孔做3个生物重复,培养至出现肉眼可见的克隆时终止培养,收集细胞,常温PBS洗涤两次,用醋酸:甲醇液(1:3)固定15 min,水洗,室温晾干,吉姆萨染色30 min,测量590 nm处A值。

1.3.5 划痕迁移实验:取消化后各组细胞以 1×10^6 个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁后进行转染,待细胞生长至90%时用枪头在孔板中央垂直划痕,PBS洗一遍,拍照观察各组细胞愈合速率。

1.3.6 细胞凋亡实验:取转染培养后各组细胞于 37°C , 5l ml/dl CO_2 条件培养48 h,以 1×10^6 个/孔密度接种于6孔板,预冷PBS洗涤两次,根据细胞凋亡检测试剂盒说明书采用试剂盒中膜联蛋白V-FITC/PI进行染色,流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况,实验重复3次。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验:取对数生长期各组细胞接种到6孔培养板,待其生长密度达90%时,将含有海肾荧光素酶报告质粒的野生型 CDCA3-WT 和突变型 CDCA3-MUT 转染至细胞中,使用双重荧光素酶测定系统(Promega, Beijing, China)测量荧光素酶活性,根据生产商的说明将其转染48 h后根据海肾荧光素酶活性进行标准化。该测定一式三份进行三个独立的实验。

1.4 统计学分析 采用SPSS 25.0软件进行实验结果分析。数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 t 检验;多组间比较采用 one-way

表1 敲低 HOXB3 对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	SiCTL 组	siHOXB3#1 组	siHOXB3#2 组	F	P
细胞增殖 A 值	0.634 ± 0.043	0.413 ± 0.038	0.398 ± 0.030	37.477	<0.001
克隆形成率 (%)	78.143 ± 1.932	29.246 ± 2.825	27.911 ± 2.594	399.842	<0.001
迁移率 (%)	90.342 ± 5.136	35.164 ± 5.435	37.617 ± 3.192	132.299	<0.001
凋亡率 (%)	6.293 ± 2.014	12.556 ± 3.112	15.007 ± 2.201	10.556	0.011

2.4 CDCA3 在骨肉瘤中的表达特征及与 HOXB3 的相关性 检测显示,30 组骨肉瘤临床组织中 CDCA3 表达 (38.624 ± 7.736) 明显高于邻近正常组织 (21.875 ± 6.482),差异有统计学意义 ($t=9.090$, $P < 0.001$);骨肉瘤组织中 HOXB3 与 CDCA3 表达呈正相关 ($r=0.736$, $P < 0.01$)。

2.5 HOXB3 通过结合 CDCA3 启动子区域正向调控 CDCA3 表达 经检索数据库发现,HOXB3 与 CDCA3 启动子区域存在结合位点,CDCA3 可能是 HOXB3 的潜在靶基因。通过构建包含 HOXB3 结合位点在内的 CDCA3-WT 野生型和 CDCA3-MUT 突变型质粒,经荧光素酶报告基因实验检测显示,转染 siHOXB3 显著抑制了 CDCA3 野生型质粒荧光素酶活性 ($P < 0.05$),而对 CDCA3 突变型质粒荧光素酶活性无影响 ($P > 0.05$),见表2。证实 CDCA3 是 HOXB3 的靶基因。经探究 HOXB3 对 CDCA3 表达的影响发现,siHOXB3#1 组 (0.374 ± 0.028) 和 siHOXB3#2 组 (0.368 ± 0.031) 细胞中 CDCA3 表达与 SiCTL 组 (1.011 ± 0.005)

ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验;骨肉瘤组织及对应癌旁正常组织中基因表达差异比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织中 HOXB3 显著高表达 qRT-PCR 检测显示,30 组骨肉瘤组织中 HOXB3 表达 (41.154 ± 8.626) 较邻近正常组织 (22.857 ± 7.512) 显著升高,差异有统计学意义 ($t=8.975$, $P < 0.001$)。

2.2 siRNA 转染敲低 HOXB3 表达效果验证 qRT-PCR 检测显示,相比 SiCTL 组 (0.971 ± 0.039),转染 siHOXB3#1 组 (0.325 ± 0.037) 和 siHOXB3#2 组 (0.339 ± 0.031) 细胞中 HOXB3 相对表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($F=318.204$, $P < 0.001$)。提示敲低 HOXB3 表达效果转染成功。

2.3 HOXB3 对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及凋亡的影响 细胞实验检测显示,与 SiCTL 组相比,siHOXB3#1 组和 siHOXB3#2 组细胞增殖能力、克隆形成率及迁移率明显降低,细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表1。敲低 HOXB3 明显抑制了骨肉瘤细胞的增殖、克隆形成及迁移,促进细胞凋亡。

表2 HOXB3 与 CDCA3 靶向结合关系验证 ($\bar{x} \pm s$)

项目	siCTL 组	siHOXB3 组	t	P
WT	1.012 ± 0.006	0.465 ± 0.024	38.298	<0.001
MUT	1.010 ± 0.005	0.976 ± 0.019	2.502	0.067

2.6 验证 HOXB3 通过调控 CDCA3 对骨肉瘤细胞发挥作用 见表3。研究转染 CDCA3 干扰序列敲低骨肉瘤细胞中 CDCA3 表达,检测发现与 siCTL 组相比,敲低 CDCA3 表达显著抑制了骨肉瘤细胞的增殖率和克隆形成率 ($P < 0.05$),揭示了 CDCA3 的促癌基因属性。在 siCDCA3 组细胞中回补 CDCA3 后逆转了 HOXB3 对细胞增殖、克隆形成、迁移、凋亡的抑制/促进作用,见表4。提示 HOXB3 可能通过正向调控 CDCA3 表达从而在骨肉瘤中发挥功能。

3 讨论

近年,分子生物学研究显示^[9],肿瘤的发生发

展是多因素综合作用的结果,表明基因分子生物遗传学参与肿瘤恶变进程,为肿瘤的研究及攻克提供了新的研究方向,也是目前肿瘤学研究的热点话题。HOX最初是在对果蝇胚胎发育的研究中被发现,其编码一个高度保守的转录因子在胚胎发育过程中起基本作用^[10]。发现HOX基因在造血中很重要,因其在不同谱系或不同成熟阶段的造血细胞中特异性表达^[11]。目前,人类HOX基因根据序列相似性

及在染色体上位置分为HOX A ~ D 4簇,共有39个基因^[12]。证实HOX 4簇基因在多个人类肿瘤中存在异常表达,通过发挥促癌或抑癌基因作用调控肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等生物学行为,参与多种人类癌症的发生发展及预后^[13-15]。HOXB3是HOXB簇基因一员,最新研究发现,HOXB3作为促癌基因能够促进细胞的增殖、分化及迁移,同时也参与病理生理状态下的血管生成^[2-3]。

表3 CDCA3对骨肉瘤细胞增殖和克隆形成的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	siCTL组	siCDCA3#1组	siCDCA3#2组	F	P
细胞增殖A值	0.597 ± 0.041	0.234 ± 0.035 ^a	0.234 ± 0.035 ^a	92.731	<0.001
细胞克隆形成率(%)	97.568 ± 2.579	64.623 ± 4.106 ^a	60.569 ± 4.217 ^a	89.750	<0.001

注:与siCTL组相比,^aP < 0.01。

表4 HOXB3调控CDCA3对骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移及凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	siCTL组	siHOXB3组	siHOXB3+CDCA3组	F	P
细胞增殖A值	0.697 ± 0.041	0.485 ± 0.028 ^a	0.712 ± 0.030	43.105	<0.001
细胞克隆形成率(%)	96.769 ± 3.759	52.846 ± 4.327 ^a	94.893 ± 4.658	101.761	<0.001
细胞迁移率(%)	88.543 ± 4.521	41.769 ± 3.836 ^a	86.972 ± 3.768	128.675	<0.001
细胞凋亡率(%)	6.197 ± 2.413	14.426 ± 3.057 ^a	5.958 ± 2.638	9.456	0.014

注:与siCTL组相比,^aP < 0.01。

据相关报道,HOXB3在结直肠癌中表达上调,与临床分期及不良预后关系密切^[4,16]。LncRNA-UCA1通过miR-28-5p/HOXB3轴调节结肠癌的进展^[17]。HOXB3缺失与激素受体阴性乳腺癌的发生有关^[5];HOX转录反义RNA降解可引起人卵巢癌细胞凋亡和坏死,HOXB3是高级别浆液性卵巢癌术后复发的生物标志物^[6]。MiR-224通过调控靶基因HOXB3及调节细胞周期相关蛋白的表达,参与大肠癌细胞的增殖与凋亡^[18]。HOXA4/HOXB3基因可作为原发性浆液性卵巢癌术后和一线辅助化疗后复发的生物标志物^[19]。揭示了HOXB3的致癌基因属性,表明其在肿瘤恶变发生中确实发挥着至关重要的作用,促进了肿瘤的发生与发展^[4-5]。而本研究前期检索osteosarcoma R2数据库发现HOXB3在骨肉瘤中呈现高表达预后差特征,检测骨肉瘤临床组织得出同样高表达结果,暗示了HOXB3在骨肉瘤中的重要作用。通过细胞实验验证发现,敲低HOXB3表达后细胞增殖、克隆形成、迁移能力明显抑制,细胞凋亡加速,证实其在骨肉瘤发生发展中扮演促癌基因,故进一步研究其发挥作用的潜在机制意义显著。

细胞的快速生长及分化是恶性细胞的共同特征,细胞周期调节蛋白表达异常是促使肿瘤发生的因素之一^[20]。CDCA3是细胞分裂周期相关蛋白,是细胞标识进入有丝分裂的触发因子,可调节细胞周期进程^[7]。CDCA3作为SCF泛素连接酶(E3)

复合物的组成部分,可调控E3连接酶SCF介导的激酶抑制和有丝分裂的破坏,降解内源性细胞周期抑制剂进而参与调控细胞周期^[21]。近年研究发现,CDCA3在多种肿瘤中表达上调,通过调控细胞周期参与肿瘤的发生^[22-23]。HOXB3/CDCA3调控电路有助于急性髓系白血病的发生^[24]。另于2013年CHEN等^[25]研究表明,HOXB3通过上调CDCA3促进了前列腺癌细胞进展,发现PC-3细胞中HOXB3缺失降低了CDCA3依赖的增殖能力,同时ChIP分析发现HOXB3能够结合CDCA3启动子区域并激活CDCA3表达,表明CDCA3是HOXB3的一个重要靶基因。为进一步明确CDCA3和HOXB3在骨肉瘤中的调控作用,研究发现CDCA3在骨肉瘤组织中同样表达上调,同样存在高表达预后差特征,且CDCA3和HOXB3两者表达呈显著正相关;同时ChIP分析和荧光素报告基因实验证实,HOXB3与CDCA3启动子区域存在结合位点,敲低HOXB3表达可显著降低CDCA3表达,推测两者可能通过某种调控关系参与发挥作用。后期细胞实验证实,敲低CDCA3表达明显抑制了骨肉瘤细胞增殖及克隆形成;细胞回补实验验证发现,回补CDCA3可使原本敲低HOXB3受抑制的细胞增殖率、克隆形成率及细胞迁移率逐渐恢复正常,细胞凋亡率明显降低,表明HOXB3可能通过正向调控CDCA3表达从而在骨肉瘤中发挥功能。本研究从HOXB3表达特征、功能验证及下游靶基因功能

验证对其促进骨肉瘤发生发展的作用进行了初步研究,然而对HOXB3与CDCA3的相互调控作用关系及影响骨肉瘤细胞生物学行为的机制不够深入具体,后期还需进一步探究分析阐明。

综上所述,HOXB3在骨肉瘤中表达上调,其可能通过与CDCA3启动子区域结合,正向调控CDCA3表达促进骨肉瘤细胞的增殖、克隆形成及迁移,抑制细胞凋亡,进而发挥作用。

参考文献:

- [1] GAMBAROTTI M, DEI TOS A P, VANEL D, et al. Osteoblastoma-like osteosarcoma: high-grade or low-grade osteosarcoma[J]. *Histopathology*, 2019, 74(3): 494-503.
- [2] FRANCIS J C, GARDINER J R, RENAUD Y, et al. HOX genes promote cell proliferation and are potential therapeutic targets in adrenocortical tumours[J]. *British Journal of Cancer*, 2021, 124(4): 805-816.
- [3] DE BESSA GARCIA S A, ARAÚJO M, PEREIRA T, et al. HOX genes function in breast cancer development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2020, 1873(2): 188358.
- [4] 林秀欣, 刘森观, 周颖, 等. HOXB3在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(16):2729-2732.
LIN Xiuxin, LIU Senguan, ZHOU Ying, et al. Expression and clinical significance of HOXB3 in colorectal cancer [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2018, 34(16):2729-2732.
- [5] ZHU Lizhe, YU Shibo, JIANG Siyuan, et al. Loss of HOXB3 correlates with the development of hormone receptor negative breast cancer[J]. *Peer J*, 2020, 8(1): e10421.
- [6] SABET M, SHARIFI M, HEIDARI M, et al. Degradation of HOX transcript antisense RNA provoked apoptosis and necrosis in human ovarian cancer cells[J]. *Indian Journal of Gynecologic Oncology*, 2020, 18(2): 41.
- [7] 王芹. CDCA3在肿瘤领域的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2018, 33(6): 1043-1044.
WANG Qin, The role of CDCA3 in the pathogenesis of cancer[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2018, 33(6):1043-1044.
- [8] ZHANG Wei, LU Yanxia, LI Xiaomin, et al. CDCA3 promotes cell proliferation by activating the NF- κ B/cyclin D1 signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 500(2): 196-203.
- [9] CARLA D, FERREIRA J, PAULO S, et al. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 18(4): 457-464.
- [10] PASCUAL-ANAYA J, SATO I, SUGAHARA F, et al. Hagfish and lamprey HOX genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2018, 2(5): 859-866.
- [11] COLLINS E M, THOMPSON A. HOX genes in normal, engineered and malignant hematopoiesis[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2018, 62(11/12): 847-856.
- [12] WU Ying, XIONG Qian, LI Siting, et al. Integrated proteomic and transcriptomic analysis reveals long noncoding RNA HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating Opioid Growth Factor Receptor (OGFr) [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2018, 17(1):146-159.
- [13] 赖冰, 刘锦涛. HOX基因在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. *国际消化病杂志*, 2020, 40(1):23-25, 30.
LAI Bing, LIU Jintao. Expression of HOX gene in colorectal cancer and its clinical significance [J]. *International Journal of Digestive Diseases*, 2020, 40(1):23-25, 30.
- [14] 郭晓波, 蔺京, 史敏, 等. T细胞型急性淋巴细胞白血病患者HOX11L2基因的表达及其临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(5): 9-12.
GUO Xiaobo, LIN Jing, SHI Min, et al. Expression and clinical significance of HOX11L2 gene in patients with T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(5):9-12.
- [15] 毕琦玲, 周立红. HOX基因与妇科肿瘤的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(2):140-143.
BI Qiling, ZHOU Lihong. Research progress of HOX gene and gynecologic tumor[J]. *Practical Oncology Journal*, 2018, 32(2):140-143.
- [16] 白盈盈, 朱光旭, 潘兴华. 长链非编码RNA对结直肠癌潜在诊断价值的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(1):161-164.
BAI Yingying, ZHU Guangxu, PAN Xinghua. The role of long non-coding RNA in the diagnosis of colorectal cancer [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(1):161-164.
- [17] CUI Mingfu, CHEN Mingyan, SHEN Zhaoming, et al. LncRNA-UCA1 modulates progression of colon cancer through regulating the miR-28-5p/HOXB3 axis [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(5): 6926.
- [18] 李青春, 薛军花, 李文革, 等. miR-224通过调控同源异型盒基因B3表达对大肠癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2018, 22(17):5-10, 14.
LI Qingchun, XUE Junhua, LI Wenge, et al. Effect of miR-224 on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by regulating HOXB3 expression[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2018, 22(17):5-10, 14.
- [19] MILLER K R, PATEL J N, ZHANG Qing, et al. HOXA4/HOXB3 gene expression signature as a biomarker of recurrence in patients with high-grade serous ovarian cancer following primary cytoreductive surgery and first-line adjuvant chemotherapy[J]. *Gynecologic Oncology*, 2018, 149(1): 155-162.
- [20] CHAIKOVSKY A C, SAGE J. Beyond the cell cycle: enhancing the immune surveillance of tumors via CDK4/6 inhibition[J]. *Molecular Cancer Research : MCR*, 2018, 16(10): 1454-1457.
- [21] 高鑫, 张淑芳. 细胞分裂周期相关蛋白促肿瘤作用的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40(9):904-906, 封3.
GAO Xin, ZHANG Shufang. Research advances in role of cell cycle division-associated protein in tumors [J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2019, 40(9):904-907, Fooo 3.