



分类号: R735.3

学校代码: 10114

密 级:

学 号: 202100410642

山西医科大学

SHANXI MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

**结直肠癌组织中 miR-140-3p、HOXA9 表达与临床病理特征及
预后的关系**

**Exploring the expression and clinical significance
of the miR-140-3p-HOXA9 axis in colorectal cancer**

研 究 生: 白雪亮

指导教师: 郝彦凤 教授

专业名称: 病理学

研究方向: 肿瘤病理

学位类型: 学术学位

所在学院: 基础医学院

中国 山西

二〇二四年六月十七日

分类号: R735.3

学校代码: 10114

密 级: _____

学 号: 202100410642

结直肠癌组织中 miR-140-3p、HOXA9 表达与临床病理特征及 预后的关系

Exploring the expression and clinical significance of the miR-140-3p-HOXA9 axis in colorectal cancers

研 究 生: 白雪亮
指导教师: 郝彦凤 教授
专业名称: 病理学
研究方向: 肿瘤病理
学位类型: 学术学位
所在学院: 基础医学院

中国 山西

二〇二四年六月十七日

目 录

前言	1
1 材料与方法	3
1.1 生信分析	3
1.2 临床病例资料	3
1.3 组织芯片制备	4
1.4 免疫组织化学染色(IHC)	4
1.5 反转录实时荧光定量 PCR 法(real-time RT-PCR)	6
1.6 扩增阻滞突变系统 PCR(ARMS-PCR)	8
1.7 随访	10
1.8 统计学分析	10
2 结果	11
2.1 生信分析结果(CRC 中 miR-140-3p 低表达, HOXA9 高表达, HOXA9 是 miR-140-3p 潜在靶基因)	11
2.2 免疫组织化学结果	17
2.3 PCR 结果	18
2.4 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者临床病理特征的关系	19
2.5 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者预后的关系	21
3 讨论	23
4 结论	25
4.1 生信分析结果	25
4.2 miR-140-3p、HOXA9 在 CRC 中的表达情况	25
4.3 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 临床病理特征的关系	25
4.4 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者预后的关系	25
参考文献	26
综述 HOXA9 在癌症中的研究进展	29
参考文献	40

结直肠癌组织中 miR-140-3p、HOXA9 表达与临床病理特征及预后的关系

摘 要

目的:

结直肠癌(CRC)是第三大最常见的癌症,全球发病率和死亡率都很高。许多研究表明,高达 50%的 CRC 患者在诊断时已存在远处转移。本研究结合生物信息学和实验验证的方法,探讨 miR-140-3p 和同源盒 A9(HOXA9)在结直肠癌组织(colorectal cancer、CRC)中的表达及其临床意义,以为结直肠癌诊断和治疗的新靶点提供理论基础。

方法:

1. 利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>),筛选结直肠癌与正常组织中差异表达的 miRNA,将 CRC 中 miRNA 表达与正常组织中 miRNA 表达的比值定义为 Fc (fold change),将 $|\text{LogFc}|>1$, $P<0.01$ 定义为差异表达 miRNA;利用 ENCORI 数据库分析 miRNA 的表达水平、预后以及它的潜在靶基因;并对 miRNA 的靶基因进行 GO 分析和 KEGG 分析;利用 TCGA 数据库分析结直肠癌和正常组织中的差异表达 mRNA ($|\text{LogFc}|>1$, $P<0.01$)、miRNA 靶基因的表达水平以及 miRNA 靶基因的诊断 ROC 曲线;利用 TIMER、GEPIA 数据库验证 miRNA 靶基因在结直肠癌和正常组织的表达差异;利用 K-M plotter 分析 miRNA 靶基因与患者预后的关系,运用 TISIDB 数据库分析 miRNA 靶基因与免疫浸润的关系。

2. 选取 2019 年 1 月到 2019 年 6 月于山西省肿瘤医院行手术治疗的结直肠腺癌患者 210 例,收集患者肠癌石蜡组织及癌旁正常石蜡组织。

3. 采用免疫组织化学法检测 CRC 及正常组织 HOXA9 蛋白表达水平;评判 CRC 组织中 MLH1、PMS2、MSH2、MSH6、Ki-67 以及 P53 蛋白表达水平。

4. qRT-PCR 法检测 miR-140-3p、HOXA9 mRNA 表达；探针扩增阻滞突变系统-荧光 PCR(ARMS-PCR)技术用来检测 KRAS 基因的突变情况。

5. 运用统计学软件 SPSS26.0, 对结直肠腺癌中 miR-140-3p、HOXA9 表达情况与患者各项临床病理特征的关系进行统计分析。

6. 采用 Kaplan—Meier 法分析患者生存差异, 利用 COX 比例风险回归模型分析 CRC 患者预后的影响因素。

结果:

1. 生信分析结果: miR-140-3p 在 CRC 组织中低表达, 其低表达与结肠癌患者的预后不良相关; HOXA9 作为 miR-140-3p 的潜在靶基因, 在 CRC 组织中高表达, 且其高表达与预后不良有关; HOXA9 与 miR-140-3p 的表达量呈负相关; HOXA9 的表达情况与 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞以及 B 细胞呈负相关。

2. IHC 结果: HOXA9 蛋白染色结果以细胞质阳性为主, 少部分为细胞核阳性。CRC 组织中 HOXA9 蛋白的高表达率 (63.33%) 明显高于癌旁组织 (45.71%) ($P<0.05$); 在癌组织 HOXA9 高表达组中, KRAS 突变率为 33.83% (45/133), P53 突变型表达为 71.43% (95/133), Ki-67 增殖指数>60%的频率为 84.96% (113/133), 微卫星不稳定 (MSI) 占 3.76% (5/133); 在癌组织 HOXA9 低表达组中, KRAS 突变率为 27.27% (21/77), P53 突变型表达为 64.93% (50/77), Ki-67 增殖指数>60%的为 79.22% (61/77), 微卫星不稳定 (MSI) 占 9.09% (7/77)。

3. PCR 结果: CRC 组织中 miR-140-3p 表达水平低于癌旁组织, HOXA9 表达水平高于癌旁组织 ($P<0.05$)。在癌组织 miR-140-3p 高表达组中, KRAS 突变率为 33.33% (12/36), P53 突变型表达为 69.44% (25/36), Ki-67 增殖指数>60%的频率为 77.78% (28/36), 微卫星不稳定 (MSI) 占 8.33% (3/36); 在癌组织 miR-140-3p 低表达组中, KRAS 突变率为 37.5% (24/64), P53 突变型表达为 68.75% (44/64), Ki-67 增殖指数>60%的频率为 85.94% (55/64), 微卫星不稳定 (MSI) 占 3.13% (2/64)。

4. miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者临床病理特征的联系: CRC 组织 miR-140-3p 低表达与淋巴结转移相关, 差别有统计学意义 ($P<0.05$); 而与性别、年

龄、分化程度、TNM 临床分期、肿瘤直径、大体类型、脉管神经累犯、KRAS 突变、P53 突变、Ki-67 增殖指数以及微卫星状态无关，差别无统计学意义 ($P>0.05$)。HOXA9 高表达与脉管神经累犯和淋巴结转移相关，差别有统计学意义 ($P<0.05$)；而与性别、年龄、分化程度、TNM 分期、肿瘤直径、大体类型、KRAS 突变、P53 突变、Ki-67 增殖指数以及微卫星状态无关，差别无统计学意义 ($P>0.05$)。

5. miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者预后的相关性：Kaplan—Meier 分析显示，miR-140-3p 低表达组、HOXA9 高表达组患者预后较差 ($P<0.05$)。COX 多因素回归分析显示，高 TNM 临床分期与 HOXA9 高表达是影响 CRC 患者预后的独立危险因素。

结论：

CRC 组织中 miR-140-3p 呈低表达，HOXA9 呈高表达，两者与结直肠腺癌患者不良预后相关，HOXA9 高表达和高 TNM 临床分期是影响 CRC 患者预后的独立危险因素。CRC 中可能通过下调 miR-140-3p 来上调 HOXA9 的表达促进 CRC 发生发展。

本课题为国家自然科学基金面上项目“TEADs 调控难治性结直肠癌的功能机制与靶向干预（编号：82172659）”。

关键词：结直肠癌；miR-140-3p；HOXA9；数据库；临床意义

The Relationship of miR-140-3p and HOXA9 in colorectal cancer tissues with clinicopathological features and prognosis

Abstract

Objective:

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer, with high global morbidity and mortality. Many studies have shown that up to 50% of CRC patients have distant metastases at the time of diagnosis. In this study, we combined bioinformatics and experimental validation methods to investigate the expression of miR-140-3p and homology cassette A9 (HOXA9) in colorectal cancer tissues (colorectal cancer, CRC) and their clinical significance, in order to provide a theoretical basis for new targets for colorectal cancer diagnosis and treatment.

Methods:

1. Using GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), the ratio of miRNA expression in CRC to that in normal tissues was defined as Fc (fold change), and $|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.01$ was defined as differentially expressed miRNAs, to screen the differentially expressed miRNAs in colorectal cancer and normal tissues; using ENCORI database to analyse the miRNA expression level and prognosis as well as its potential target genes; and GO analysis and KRNA analysis were performed on the target genes of miRNAs. differentially expressed miRNAs in colorectal cancer and normal tissues; use ENCORI database to analyse the expression level of miRNAs, prognosis and its potential target genes; and perform GO analysis and KEGG analysis on miRNA target genes; use TCGA database to analyse the expression level of differentially expressed mRNAs in colorectal cancer and normal tissues ($|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.01$), the expression level of miRNA target genes and its diagnosis. gene expression level and its diagnostic ROC curve; validate the expression difference of miRNA target genes in colorectal cancer and normal tissues

using TIMER and GEPIA databases; and analyse the prognostic relationship between miRNA target genes and patients using K-M plotter. TISIDB database was used to analyze the relationship between miRNA target genes and immune infiltration.

2. 210 colorectal adenocarcinoma patients who underwent surgical treatment in Shanxi Cancer Hospital from January 2019 to June 2019 were selected, and paraffin tissues of intestinal cancer and normal paraffin tissues next to the cancer were collected from the patients.

3. immunohistochemistry was used to detect HOXA9, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, Ki-67 and P53 protein expression in CRC and normal tissues. qRT-PCR was used to detect the protein expression in CRC and normal tissues.

4. qRT-PCR to detect miR-140-3p, HOXA9 mRNA expression; probe amplification blocking mutation system-fluorescence PCR (ARMS-PCR) technology was used to detect mutations in the KRAS gene.

5. The relationship between the expression of miR-140-3p and HOXA9 in colorectal adenocarcinoma and various clinicopathological characteristics of patients was statistically analysed using the statistical software SPSS26.0.

6. The Kaplan-Meier method was used to analyse the differences in patient survival, and the COX proportional risk regression model was used to analyse the factors affecting the prognosis of CRC patients.

Results:

1. Results of biosignature analysis: miR-140-3p was lowly expressed in CRC tissues, and its low expression was associated with poor prognosis of colon cancer patients; HOXA9, as a potential target gene of miR-140-3p, was highly expressed in CRC tissues, and its high expression was associated with poor prognosis; HOXA9 was negatively correlated with the expression of miR-140-3p; and HOXA9 expression was negatively correlated with CD4⁺ T cells and B cells. was negatively correlated with CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells.

2. IHC results: HOXA9 was predominantly cytoplasmic positive, and to a lesser extent nuclear positive; the high expression rate of HOXA9 protein in CRC tissues (63.33%) was significantly higher than that in paracancerous tissues (45.71%) ($P<0.05$); in the group of high expression of HOXA9 protein in the cancerous tissues, the mutation expression rates of KRAS (45/133) and P53 (71.43%) were 33.83% (95/133) and 71.43% (95/133), respectively. 71.43% (95/133), Ki-67 proliferation index $>60\%$ was 84.96% (113/133), and microsatellite instability (MSI) accounted for 3.76% (5/133); in the cancerous tissue HOXA9 low-expression group, the mutation rate of KRAS was 27.27% (21/77), and the expression of P53 mutant was 64.93% (50/77). Ki-67 proliferation index $>60\%$ was 79.22 % (61/77), and microsatellite instability (MSI) was 9.09% (7/77).

3. PCR results: miR-140-3p expression level in CRC tissues was lower than that in paraneoplastic tissues, and HOXA9 expression level was higher than that in paraneoplastic tissues ($P<0.05$). In the high miR-140-3p expression group, the mutation rate of KRAS was 33.33% (12/36), the expression of P53 mutant was 69.44% (25/36), the proliferation index of Ki-67 $>60\%$ was 77.78% (28/36), and microsatellite instability (MSI) accounted for 8.33% (3/36). low expression group, the KRAS mutation rate was 37.5% (24/64), the expression of P53 mutant was 68.75% (44/64), the Ki-67 proliferation index $>60\%$ was 85.94% (55/64), and microsatellite instability (MSI) was 3.13% (2/64).

4. Association of miR-140-3p and HOXA9 expression with clinicopathological features of CRC: Low miR-140-3p expression in CRC tissues was associated with lymph node metastasis, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The difference was not statistically significant ($P>0.05$), while it was not related to gender, age, differentiation degree, TNM clinical stage, tumour diameter, macroscopic type, choroidal nerve recidivism KRAS mutation, P53 mutation, Ki-67 proliferation index, microsatellite status; high expression of HOXA9 was associated with choroidal invasion and lymph node metastasis, with a statistically significant difference ($P<0.05$). And it was not related to gender, age, differentiation degree, TNM stage, tumour diameter, bulk type, KRAS mutation, P53 mutation, Ki-67 proliferation index, microsatellite status, and the difference

was not statistically significant ($P>0.05$).

5. Correlation between miR-140-3p, HOXA9 expression and prognosis of CRC patients: Kaplan-Meier analysis showed that the prognosis of patients in the miR-140-3p low-expression group and the HOXA9 high-expression group was poorer ($P<0.05$). COX multifactorial regression analysis showed that TNM clinical stage and HOXA9 were the independent risk factors for the prognosis of CRC patients.

Conclusion:

CRC tissues showed low expression of miR-140-3p and high expression of HOXA9, both of which were associated with poor prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. high expression of HOXA9 and high TNM clinical stage were independent risk factors affecting the prognosis of patients with CRC. miR-140-3p may be down-regulated in CRC to up-regulate the expression of HOXA9 to promote the development of CRC.

Key words: Colorectal cancer; miR-140-3p; HOXA9; database; Clinical Significance

常用缩写词中英文对照表

英文缩写	英文名称	中文名称
CRC	Colorectal Cancer	结直肠癌
COAD	Colon Cancer	结肠癌
READ	Rectal Cancer	直肠癌
GEO	Gene Expression Omnibus	基因表达综合数据库
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
ENCORI	The Encyclopedia of RNA Interactomes	RNA 相互作用体百科全书
GEPIA	Gene Expression Profiling Interactive Analysis	基于基因表达水平值的交互式分析平台
TIMER	Tumor Immune Estimation Resource	肿瘤免疫评估资源
TISIDB	an integrated repository portal for tumor-immune system interactions	肿瘤-免疫系统相互作用的综合知识库门户
FFPE	Formalin-Fixed and Paraffin Embedded	福尔马林固定石蜡包埋
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
MS	Microsatellite	微卫星
MSS	Microsatellite stability	微卫星稳定
MSI	Microsatellite Instability	微卫星不稳定
MMR	Mismatch repair	错配修复
pMMR	Mismatch repair proficient	错配修复功能完整
dMMR	Mismatch repair deficiency	错配修复缺陷

KRAS	Kirsten ratsarcoma viral oncogene homolog	Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物
OS	Overall survival	总生存期
PFS	Progression free survival	无进展生存期
SPSS	Statistical Product and Service Solutions	统计产品与服务解决方案

前言

结直肠癌(CRC)是第三大最常见的癌症,全球发病率和死亡率都很高^[1]。目前,对于早期诊断的 CRC 患者其手术治疗是有效的。许多研究表明,高达 50%的 CRC 患者在诊断时已存在远处转移^[2]。近十年来,结直肠癌的诊断和治疗干预取得了一定的进展。然而,晚期结直肠癌的 5 年生存率仍不令人满意。因此,迫切需要深入探究 CRC 的发病机制,开发新的诊疗策略。

microRNA (miRNAs)是由大约 18-24 个核苷酸组成的短链非编码 RNA 分子。它们与靶 mRNA 分子的 3'非翻译区(3'-UTR)结合,引起 mRNA 降解或翻译抑制,在基因表达调控中发挥重要作用。miRNA 对靶基因发挥负调控作用。miRNA 被认为是肿瘤抑制基因和癌基因的关键调节因子^[3] ^[4],并参与各种生物学过程,包括细胞增殖、凋亡和细胞周期调节^[5]。

广泛的研究强调了失调的 miRNAs 与结直肠癌进展之间的强相关性。这些异常表达的 miRNA 有望成为 CRC 治疗的新靶点^[6]。值得注意的是,已经观察到 miR-140-3p 在各种癌症类型中显示出改变的表达模式,包括肺癌、乳腺癌、脊索瘤和肝细胞癌等^[7]。miR-140-3p 作为肿瘤抑制因子在各种细胞调控过程中发挥关键作用并影响信号转导途径。它对肿瘤发展的影响涉及到调节下游靶基因,例如,它靶向非小细胞肺癌中的 ATP8A1 和乳腺癌中的三重基序 28^[8,9]。此外,研究表明,miR-140-3p 可以通过靶向肝细胞癌中的双烯醇酮 X 受体来影响耐药性^[10]。在结直肠癌 (CRC) 中,与健康个体相比,在患者中观察到较低的血浆外泌体 miR-140-3p 水平,这种下调也见于肝转移组织中^[11]。在细胞系中,已证明 miR-140-3p 通过靶向 BCL9 抑制细胞增殖、迁移和侵袭,并通过靶向 BCL2 和 PD-L1 促进细胞凋亡^[11,12]。尽管如此,miR-140-3p 在 CRC 背景下的特异性表达谱、临床意义和信号传导网络仍在很大程度上未被探索。

同源异型盒基因 (HOXA) 家族包括一组具有高度保守序列的转录调节因子。同源异型框 A9 (HOXA9) 是 HOXA 家族的成员之一,已被广泛研究,主要在急性髓细胞白血病 (AML) 中。HOXA9 在促进血细胞增殖、改变细胞分化和驱动恶性肿瘤中发挥关键作用^[13,14]。近年来,人们对 HOXA9 在实体瘤中的作用越来越感兴

趣，其异常表达与患者预后密切相关^[15]。值得注意的是，Watanabe 等人的一项研究显示，结肠直肠癌组织中 HOXA9 过表达与淋巴结转移有关^[16]。

在这项研究中，发现了一种在结直肠癌中显著下调的 miRNA-miR-140-3p，并发现 HOXA9 可能是 miR-140-3p 的新靶点。此外，这项研究提供了在 CRC 背景下 miR-140-3p 和 HOXA9 表达的意义及其潜在的临床应用数据。

1 材料与方法

1.1 生信分析

利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), 将 CRC 中 miRNA 表达量与正常组织中 miRNA 表达量的比值定义为 Fc (fold change), 将 $|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.01$ 定义为差异表达 miRNA, 筛选结直肠癌与正常组织中差异表达的 miRNA; 利用 ENCORI 数据库分析 miRNA 的表达水平、预后以及它的潜在靶基因; 并对 miRNA 的靶基因进行 GO 分析和 KEGG 分析; 利用 TCGA 数据库分析结直肠癌和正常组织中的差异表达 mRNA ($|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.01$)、miRNA 靶基因的表达水平以及它的诊断 ROC 曲线; 利用 TIMER、GEPIA 数据库验证 miRNA 靶基因在结直肠癌和正常组织的表达差异; 利用 K-M plotter 数据库分析 miRNA 靶基因与患者预后的关系, 最后通过 TISIDB 数据库分析 miRNA 靶基因与免疫浸润的关系。

1.2 临床病例资料

对 2019 年 1 月-2019 年 6 月于山西省肿瘤医院行手术切除、病理诊断为结直肠癌患者的石蜡包埋组织及癌旁正常石蜡组织进行回顾性分析, 共 210 例, 在结直肠癌病例中, 男性 109 例, 女性 101 例, 年龄区间在 28-89 岁, 中位年龄 62 岁。其中包含完整随访资料的有 193 例。纳入标准: ①术前未行任何途径的抗肿瘤治疗; ②齐全的临床病历资料; ③通过病理学证实结直肠癌患者的活检组织标本均为腺癌, 癌旁组织标本确认无肿瘤细胞浸润侵犯; ④无干扰病情诊断的其他症状者, 未合并其他严重疾病。排除标准: ①缺乏临床病历资料; ②癌症复发二次手术者; ③术前进行了放疗、化疗以及靶向治疗等其他的抗肿瘤治疗; ④合并其他系统来源的恶性肿瘤或来自其他器官肿瘤的转移癌。山西省肿瘤医院伦理委员会已批准本次实验 (批号: 202112)。

1.3 组织芯片制备

(1) 首先收集 210 例结直肠癌患者的石蜡标本（包括癌组织和癌旁正常组织），同时从标本库房提取出对应的苏木精-伊红染色（HE）切片重新进行镜下观察，在显微镜下重新标记出癌组织的肿瘤中心区域以及癌旁组织的正常腺体区域。

(2) 使用 6×10 孔矩阵的芯片模具仪以及自制 2.0mm 针芯制作空白石蜡芯片，为了防止因边缘的石蜡出现裂隙导致制作出来的芯片出现点阵不齐以及点阵缺损现象，最外围的孔用白蜡填充，中间 4×8 孔的左上角设置两个定位孔，用白蜡填充。

(3) 根据 HE 切片在显微镜下标记肿瘤病变中心区域和正常腺体区域，用穿刺针将对应组织从石蜡组织标本移出并穿至制作好的空白芯片内。

(4) 将填充完毕的石蜡组织芯片放入 56°C 恒温鼓风干燥箱烘烤 7min，取出后室温冷却 7min，循环以上步骤，直到穿入的石蜡组织与空白芯片充分融合，最后对组织芯片常温干燥保存。

1.4 免疫组织化学染色（IHC）

1.4.1 实验用试剂

试剂名称	公司名称
HOXA9 单克隆抗体（MA5-37888）	Thermo Scientific 公司
Ki-67 抗体（ZM-0166）	北京中杉金桥生物科技有限公司
P53 抗体（DO-7）	上海基因科技有限公司
MLH1 抗体（ZM-0154）	北京中杉金桥生物科技有限公司
MSH2 抗体（ZA-0702）	北京中杉金桥生物科技有限公司
PMS2 抗体（EP51）	上海基因科技有限公司
MSH6 抗体（EP49）	上海基因科技有限公司
二抗	上海罗氏诊断产品有限公司

1.4.2 实验用仪器

设备名称	公司名称
------	------

脱水包埋机 (HT-3100)	山东骏腾医疗科技
轮转式石蜡切片机 (RM2235)	德国徕卡
精密鼓风干燥箱 (BPG)	上海一恒
恒温烤片 (HI1220)	德国徕卡
组织摊片机	益迪医疗
全自动免疫组化仪 (BenchMark XT)	上海罗氏有限公司
全自动化封片机 (CV5030)	德国徕卡

1.4.3 实验步骤

(1) 为了便于切片, 组织芯片蜡块需要放冰上冷却 5min 以上, 随后调整切片厚度为 3 μ m, 采用轮转式石蜡切片机进行切片, 组织摊片机设定温度为 60 $^{\circ}$ C, 烘烤时间为 60min。

(2) 在进行免疫组化实验之前, 应先进行预实验, 以确定抗体免疫组化染色的最佳浓度区间。然后, 将抗体稀释到合适的浓度, 并对罗氏全自动免疫组化仪的各项参数进行调整 (包括确定最佳的孵育时间), 以确保非特异性染色少以及染色结果较好。最终, 把贴上标签的切片放入仪器, 每张切片手动滴定 100 μ L 稀释到合适浓度的一抗。免疫组化仪的温度被设定为 36 $^{\circ}$ C, 孵化完成后滴加二抗。

(3) 染色完成后将切片从免疫组化仪取出, 并用温水冲洗, 苏木素浸染 1min 以后, 再次温水冲洗切片, 在分化液中洗涤 6-7 次后静置返蓝 5min。完成以上步骤后用梯度酒精进行脱水, 二甲苯进行透明, 最后采用全自动封片机进行封片。

1.4.4 结果判读

HOXA9 评判: HOXA9 蛋白主要定位于细胞质, 少数定位于细胞核。HOXA9 阳性定义为癌细胞中细胞质或细胞核存在棕黄色颗粒。免疫组化染色结果由 2 位资历丰富的病理科医生通过双盲法在高倍显微镜下进行读片, 如果有差异, 则重新评估建立最终评分。HOXA9 免疫染色的评分系统根据之前文献中发表的方法定义如下^[17]: -, 无或<5%阳性细胞; +, 5%~25%阳性细胞; ++, >25%~50%阳性细胞; +++, >50%的阳性细胞。评分为-或+的组织切片被认定为 HOXA9 低表达, 评分为++和+++的组织切片被认定为 HOXA9 高表达。

MSI 评判: 肿瘤细胞中 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 四种蛋白染色阳性结果

均位于细胞核，阳性定义为核中出现棕黄色颗粒，内对照为正常组织染色。若任何肿瘤细胞的细胞核有染色，则判定为阳性；若所有肿瘤细胞的细胞核均没有染色，而内对照有染色，则判定为阴性。MLH1、PMS2、MSH2 和 MSH6 表达均为阳性判定为 MSS；任意一项及一项以上蛋白表达阴性即判定为 MSI^[18]。

P53 评判：通过观察细胞核的着色状况来判断突变情况，其中无义突变为肿瘤细胞核着色数量 < 5%，错义突变为肿瘤细胞核着色数量 > 60% (错义突变和无义突变统称为突变型)，野生型肿瘤细胞核着色数量为 5%~60%^[19]。

Ki67 评判：细胞核内呈现棕黄色颗粒染色为阳性结果。先在低倍镜下选取背景干净、组织结构良好、阳性细胞最集中的 5 个区域，然后在光学显微镜下对这 5 个区域进行高倍视野的随机观察，每个视野计数 100 个细胞，计算阳性细胞所占百分比^[20]。

1.5 反转录实时荧光定量 PCR 法 (real-time RT-PCR)

1.5.1 实验用试剂

设备名称	公司名称
BIOG 石蜡包埋组织 RNA 提取试剂盒	百代生物科技股份有限公司 (常州)
石蜡包埋组织切片 miRNA 提取试剂盒 (离心柱型)	天根生化科技有限公司 (北京)
MonScript™ RTIII ALL-in-One Mix with dsDNase 试剂盒	莫纳生物医药科技有限公司
MonScript™ miRNA First Strand Cdna Synthesis 试剂盒 (Tailing Reaction)	莫纳生物医药科技有限公司
MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix 试剂盒	莫纳生物医药科技有限公司

1.5.2 实验用仪器

设备名称	公司名称
Applied Biosystems 7500	Applied Biosystems (美国)
Eppendorf 离心机	Eppendorf (中国上海)

振荡器	Eppendorf（中国上海）
核酸蛋白测定仪	艾本德中国有限公司
组织烤片机	Leica（德国）
轮转式石蜡切片机（RM2235）	Leica（德国）

1.5.3 实验步骤

对可获得随访数据的 100 例 CRC 患者癌组织进行 RNA 表达水平的分析，同时挑取 10 例 CRC 患者对应的癌旁组织进行 RNA 表达水平分析。切取适当的蜡块组织标本，用试剂盒分别提取 miRNA 和 mRNA。使用 Bio-Rad T100™ Thermal Cycler PCR 仪按照 MonScript™ miRNA First Strand cDNA Synthesis Kit（Tailing Reaction）试剂盒说明将 RNA 反转录成 cDNA。运用加尾法以 cDNA 作为模板，miR-140-3p 和内参 U6 作为引物配置反应体系，使用 ABI Step One Plus 荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems 美国），依据 MonAmp™ ChemoHS qPCRMix 试剂盒说明进行 PCR 扩增实验。各步骤反应条件设定为：（预变性）95℃ 10min→（变性）95℃ 10s→（退火）60℃ 10s→（延伸）72℃ 30s，共 40 个循环；通过类似方法，将 GAPDH 作为内参，采用 MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNase 逆转录试剂盒、MonAmp™ ChemoHS qPCRMix 试剂盒检测样本中 HOXA9 RNA 的表达量。实验所需引物（序列如下）均由山西博萃生物科技有限公司设计合成，序列如下。实验进行 3 次重复，依据得到的 Ct 值，运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分别计算被检测样本中 miR-140-3p 和 HOXA9 mRNA 的相对表达量。

qRT-PCR 引物序列	
引物名称	引物序列（5' —3' ）
HOXA9 正向引物	CCCTGACTGACTATGCTTGTGGTTC
HOXA9 反向引物	CTTGTCTCCGCCGCTCTCATTC
GAPDH 正向引物	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG
GAPDH 反向引物	GGCAGAGATGATGACCCTTTT
miR-140-3p 正向引物	TACCACAGGGTAGAACCACGG
miR-140-3p 反向引物	GCAGGGTCCGAGGTATTC
U6 正向引物	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 反向引物	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.5.4 实验结果计算（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ）

①. 计算每组内参基因的 Ct 均值

- ②. 计算第一个 ΔCt ，即每组的待检目的基因减去内参基因的 Ct 值
- ③. 计算对照组中 ΔCt 的均值，再用每一个 ΔCt 减去刚刚计算的对照组的 ΔCt 均值，得到 $\Delta\Delta Ct$ 。
- ④. 最后计算目的基因相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

1.6 扩增阻滞突变系统 PCR (ARMS-PCR)

1.6.1 实验用试剂

设备名称	公司名称
FFPE 标本 DNA 提取试剂盒	艾德生物医药科技股份有限公司(厦门)
人类 KRAS 基因突变检测试剂盒	艾德生物医药科技股份有限公司(厦门)

1.6.2 实验用仪器

设备名称	公司名称
轮转式石蜡切片机 (RM2235)	Leica (德国)
组织烤片机	Leica (德国)
振荡器	Eppendorf (中国上海)
Eppendorf 离心机	Eppendorf (中国上海)
核酸蛋白测定仪	艾本德中国有限公司
Applied Biosystems 7500	Applied Biosystems (美国)

1.6.3 ARMS-荧光 PCR 简介

试剂盒的引物是专为 KRAS 突变位点设计的特殊引物。ARMS PCR 对野生型和突变型等位基因进行检测时，需要设计两条 3' 端核苷酸分别为野生型和突变型特异的上游引物，以及一条通用的下游引物，一条通用的探针。在 Taq DNA 聚合酶作用下，与模板不能完全匹配的上游引物将不能完全形成互补碱基对，从而产生错配，链延伸反应因 3' -5' 磷酸二酯键形成障碍而受阻，不能进行延伸，而与模板完全匹配的引物体系则可以持续延伸，从而获得对应的 PCR 产物。通过分析 FAM 探针分子发出的荧光信号，能够实时检测 KRAS 基因的突变情况。

1.6.4 实验步骤

(1) 样本处理：每个蜡块连续切片 5 张，每张厚 $8\mu\text{m}$ ，将切片置于二甲苯 I、II、III 中各 15min 进行脱蜡。在完全脱蜡之后，使用 100%、90%、75% 的乙醇去除二甲苯，接着用蒸馏水进行冲洗，并在常温下让其自然晾干，直到表面不再有反光现象。然后把加工后的切片仔细刮在离心管内。

(2) DNA 提取：根据试剂盒的说明书，完成提取步骤。在核酸蛋白测定仪进行调零之后，将 $60\mu\text{L}$ 的洗脱液 (DTE) 与 $3\mu\text{L}$ 的样本 DNA 混合在一起，然后测定了每个样本 DNA 的浓度和纯度 (OD 值)。之后，将样本稀释到 $2\text{ ng}/\mu\text{L}$ ，并将其存放在 -20°C 以下。

(3) PCR 扩增：对每例样品进行检测分析，设置阴性对照 (NTC，自备纯化水)、阳性对照 (PC)。步骤如下：

- ①. 将室温下解冻的混合酶与阳性对照进行振荡混合，然后离心 15 秒备用；
- ②. 在待测样本的 DNA、PC 和 NTC 中，分别加入 $4.2\mu\text{L}$ 的混合酶，并在涡旋器上混合 15 秒，随后进行 15 秒离心处理；
- ③. 在 PCR 管冰架上放置 12 联 PCR 反应条，开启盖子之前进行离心操作，防止管内粘附液滴；
- ④. 首先对混好的 DNA 样品、PC 和 NTC 分别抽取 $5\mu\text{L}$ ，紧贴着 PCR 管上壁加至反应条中，然后盖上 PCR 反应条的管盖，最后用笔进行标记；
- ⑤. 将 PCR 反应条高速离心 15s，使试剂均处于管底；
- ⑥. 设置好 ABI 7500 PCR 仪器后将 PCR 反应条平行放入仪器中，设置程序如下并进行扩增：在 95°C 下预变性 5 分钟，之后分为两个阶段：首先是 95°C 变性 25s，在 60°C 的情况下退火 20s，在 72°C 下延伸 20s，并循环 15 次；在第二阶段中： 93°C 下退化 25s， 60°C 退火 35s， 72°C 延伸 20s，并循环 31 次。最后 60°C 时，进行 FAM 和 HEX 信号的收集。通过实时 PCR 技术，储存文档，随后对其进行分析与评估。

1.6.5 实验结果判定

根据扩增曲线，确定各样品反应管的突变 Ct 值和阴性对照反应管的 Ct 值，根据得到的突变 Ct 值将样品检测结果分为阴性或阳性。突变 Ct 值 <26 时，样品反应管为突变阳性；突变 Ct 值 >26 且小于阴性临界 Ct 值时，需计算 ΔCt 值，若 ΔCt 值小于对应的 ΔCt Cut-off 值，则样品反应管为突变阳性；否则为阴性。阳性为 KRAS 突

变型，阴性为 KRAS 野生型。 ΔCt 值=突变 Ct 值-阴性对照 Ct 值；PC 需有 FAM 信号，若 NTC 中有 FAM 信号即为无效实验，需重新检测。

1.7 随访

随访过程以手术当天作为随访起点，以患者死亡或 2022 年 6 月 30 日作为随访终点，可获得随访数据的患者为 193 例，计算患者的 3 年总生存期。所有结直肠癌患者术后均以门诊、电话等方式进行随访。将总生存期定义为患者从随访开始至因结直肠癌死亡的时间。

1.8 统计学分析

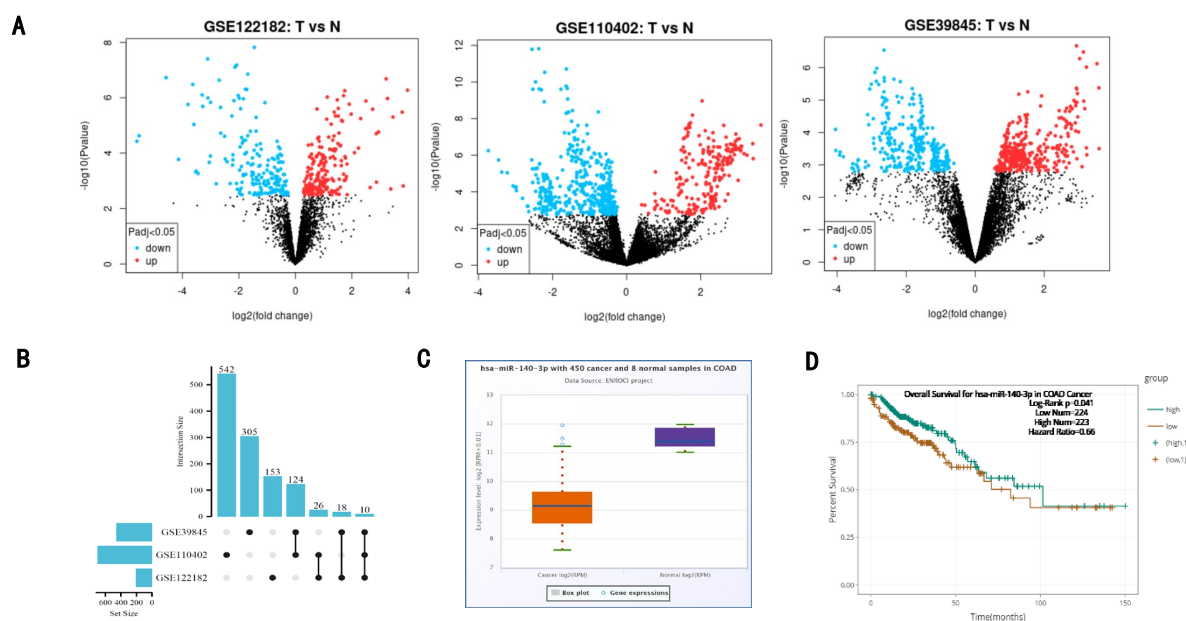
运用 SPSS26.0 软件进行数据分析，计数资料以例表示，计量资料以均数±标准差表示，组间比较采取卡方检验。运用 Kaplan—Meier 法分析 miR-140-3p、HOXA9 表达对结直肠癌患者生存期的影响，运用 COX 风险回归模型进行单因素、多因素预后分析，差异有统计学意义定义为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 生信分析结果(CRC 中 miR-140-3p 低表达, H0XA9 高表达, H0XA9 是 miR-140-3p 潜在靶基因)

2.1.1 CRC 中 miR-140-3p 低表达

通过对 GEO 数据库中 GSE122182, GSE110402, GSE39845 三个数据集进行差异表达 miRNA 分析 (图 1A), 将 3 个数据集中差异表达的 miRNA 取交集, 以得出 3 个数据集共同的差异表达 miRNA, 并作 Upset 图 (图 1B), 共获得 10 个差异表达 miRNA, 分别是 miR-497、miR-139-5p、miR-140-3p、miR-30a-star、miR-29b-2-star、miR-30a、miR-143-star、miR-139-3p、miR-195、miR-133a, 虽然已经在结直肠癌 (CRC) 中对其中几种 miRNA 进行了广泛研究^[21], 但 miR-140-3p 的临床应用和调控网络仍未得到充分研究, miR-140-3p 是最独特的 miRNA 之一, 据报道在细胞水平具有重要的生物学功能。因此, 我们将重点放在 miR-140-3p 上进行进一步的研究。通过 ENCORI 数据库泛癌分析发现 miR-140-3p 在结肠癌组织中低表达, 与正常组织表达相比有显著差异 (图 1C), 在 TCGA 数据库中分析, miR-140-3p 在结直肠癌组织中同样低表达 (图 1D), 且两个数据库都证明 miR-140-3p 低表达与患者预后较差相关 (图 1E、图 1F), 以此推断 miR-140-3p 在结直肠癌中发挥着重要作用。



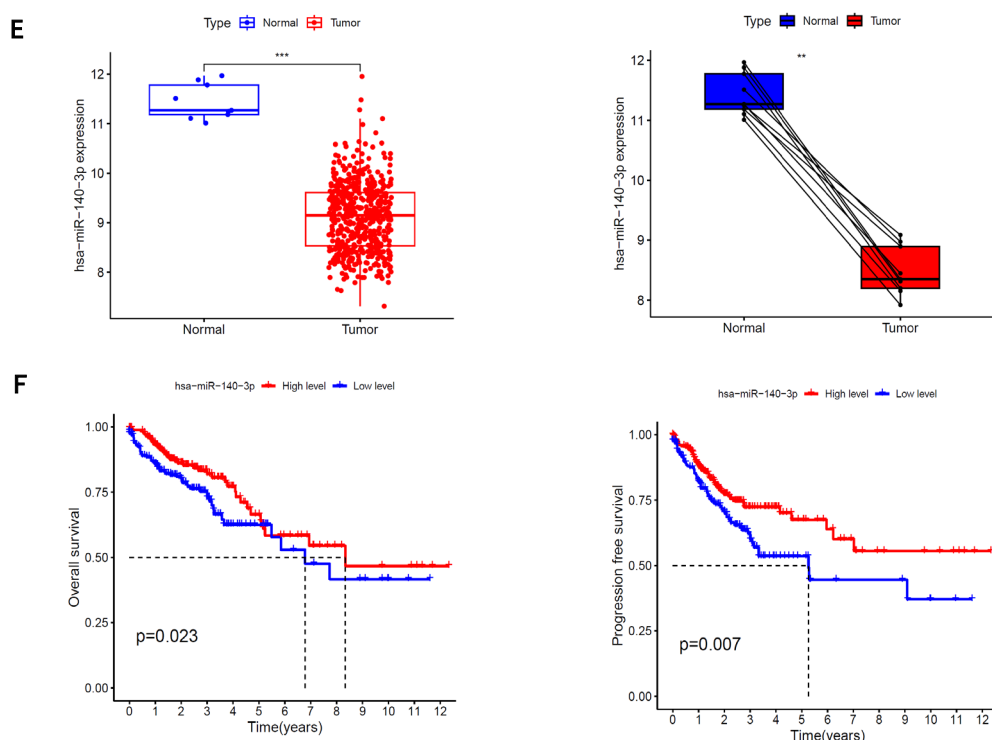


图 1 数据库分析 CRC 中差异表达 miRNA 及其与预后的关系。

图 1A: GEO 数据库结直肠癌与癌旁正常组织三个数据集 (GSE122182、GSE110402、GSE39845) 中的差异表达 miRNA ($|\text{Log FC}| > 1$, $P < 0.01$)。图 1B: GSE122182、GSE110402、GSE39845 三个数据集取交集, 作 UpSet 图。图 1C: 结肠癌组织与正常结肠组织 miR-140-3p 表达谱, 数据通过 ENCORI 生成。图 1D: miR-140-3p 与结肠癌患者预后的关系 (ENCORI 数据库)。图 1E: TCGA 数据库中 miR-140-3p 在 CRC 与正常组织中的差异表达 (左: 非配对样本; 右: 配对样本) (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)。图 1F: miR-140-3p 与结直肠癌患者预后的关系 (TCGA 数据库: 左: OS; 右: PFS)。

2.1.2 miR-140-3p 的 62 个靶基因以及其 GO 分析、KEGG 分析

进一步对 miR-140-3p 的下游靶基因进行了筛选 (CLIP data ≥ 6 、Program number ≥ 3), 得到 62 个目标靶基因, 将 62 个靶基因进行 GO 分析(图 2A)以及 KEGG 分析 (图 2B), 发现在生物进程 (BP) 主要富集于 PI3K 信号通路; 细胞组分 (CC) 主要富集于泛素连接酶复合体; 分子功能 (MF) 主要富集于转录抑制激活以及 mRNA 调控元件的结合; KEGG 主要富集于干细胞调控信号通路、erB 信号通路、癌症中的蛋白聚糖以及人类免疫缺陷病毒 1 感染 (图 2C)。

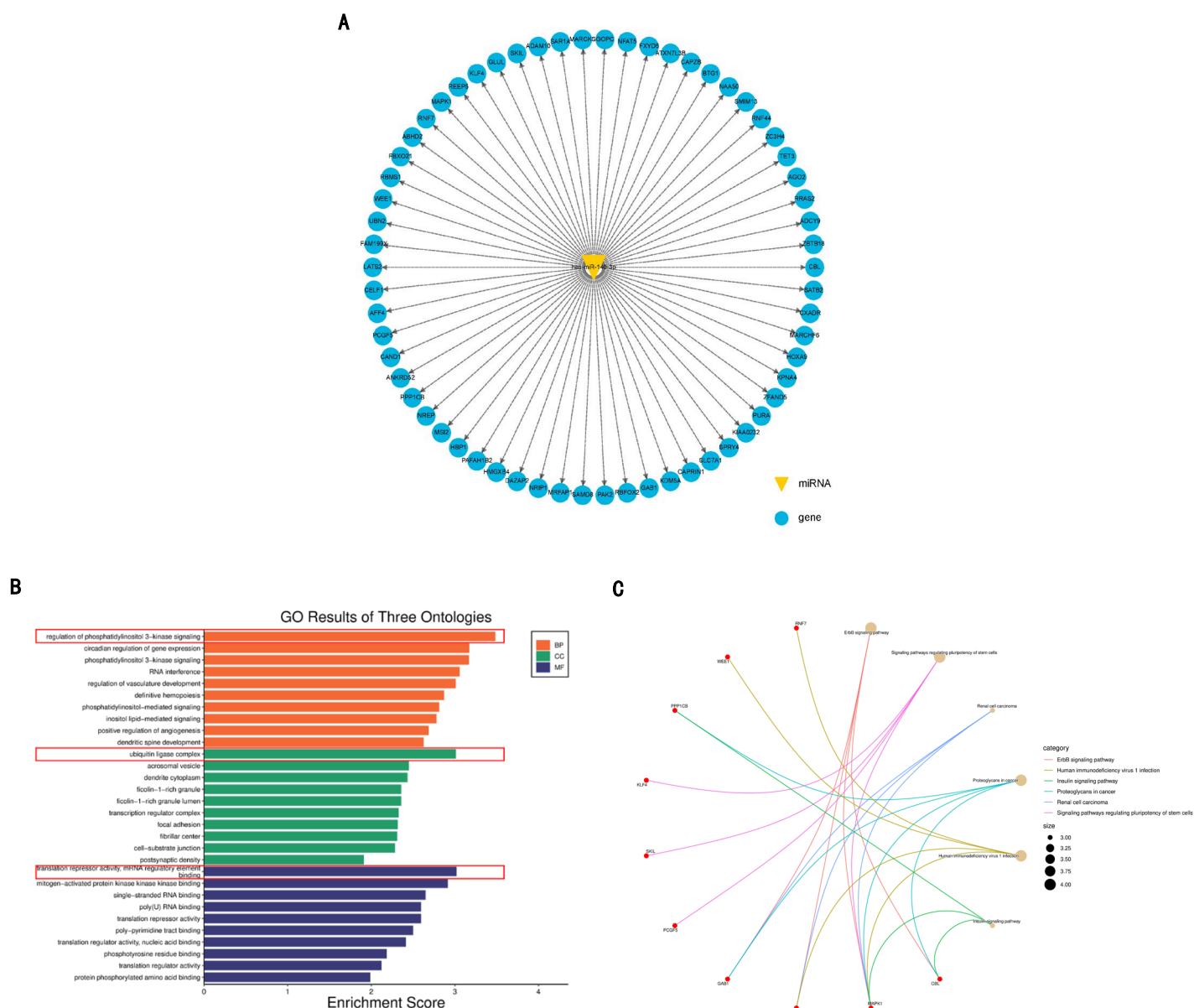


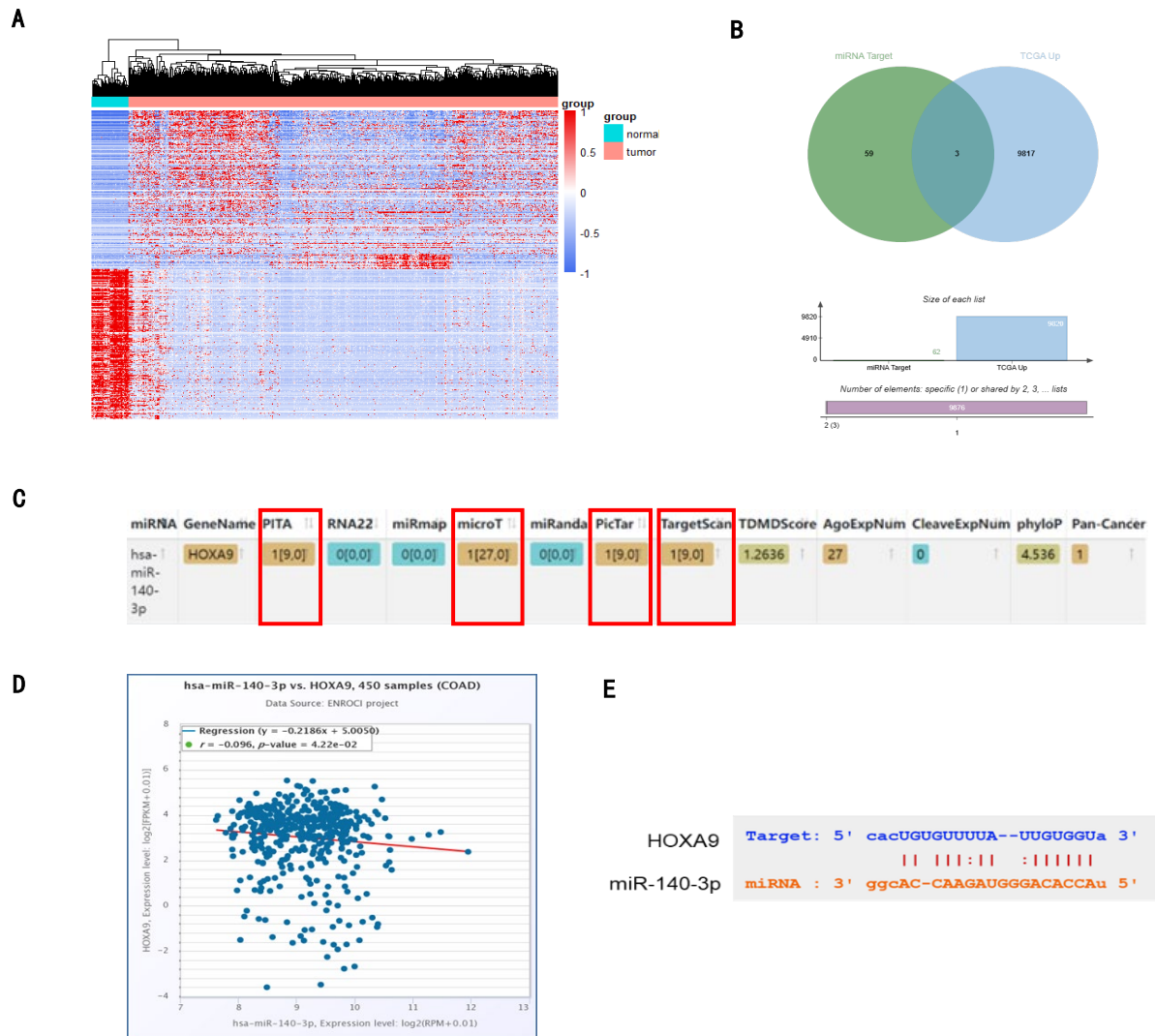
图 2 miR-140-3p 62 个靶基因的富集分析及分子蛋白网络。

图 2A: miR-140-3p 62 个潜在靶基因 (CLIP data $\geq$ 6、Program number $\geq$ 3)。图 2B: miR-140-3p 62 个潜在靶基因的 GO 分析。图 2C: miR-140-3p 62 个潜在靶基因的 KEGG 分析。

2.1.3 CRC 中 H0XA9 高表达, 且作为 miR-140-3p 的靶基因与其呈负相关

从 TCGA 数据库提取结直肠癌转录组数据, 分别用 DESeq2, edgeR, limma 三个包做差异分析后, 整合并绘制热图 (图 3A), 从癌组织中得到 9820 个上调基因, 将 miRNA 靶基因与 TCGA 上调基因 ($|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.05$) 取交集, 得到三个基因, 分

别为 SLC7A1、MSI2、HOXA9（图 3B），筛选发现 HOXA9 在多个 miRNA 靶基因数据库被预测且评分较高（图 3C），进一步通过 ENCORI 数据库分析发现 miR-140-3p 与 HOXA9 在结肠癌组织中呈负相关（图 3D）。通过序列比对，发现 miR-140-3p 与 HOXA9 有很大片段的配对结合区（图 3E），说明 HOXA9 是 miR-140-3p 的潜在结合蛋白。同时在 TIMER 数据库（图 3F）、TCGA 数据库（图 3G）以及 GEPIA2 数据库（图 3H）中分析了 HOXA9 在结肠癌（COAD）和直肠癌（READ）的表达谱，得出 HOXA9 在结直肠癌组织中呈高表达。通过 Kaplan-Meier Plotter 分析发现 HOXA9 高表达与患者的（OS）不良预后相关（图 3I）。并通过 TCGA 数据库绘制了 HOXA9 在结直肠癌组织中的诊断 ROC 曲线，AUC 等于 0.773，具有较好诊断价值（图 3J）。



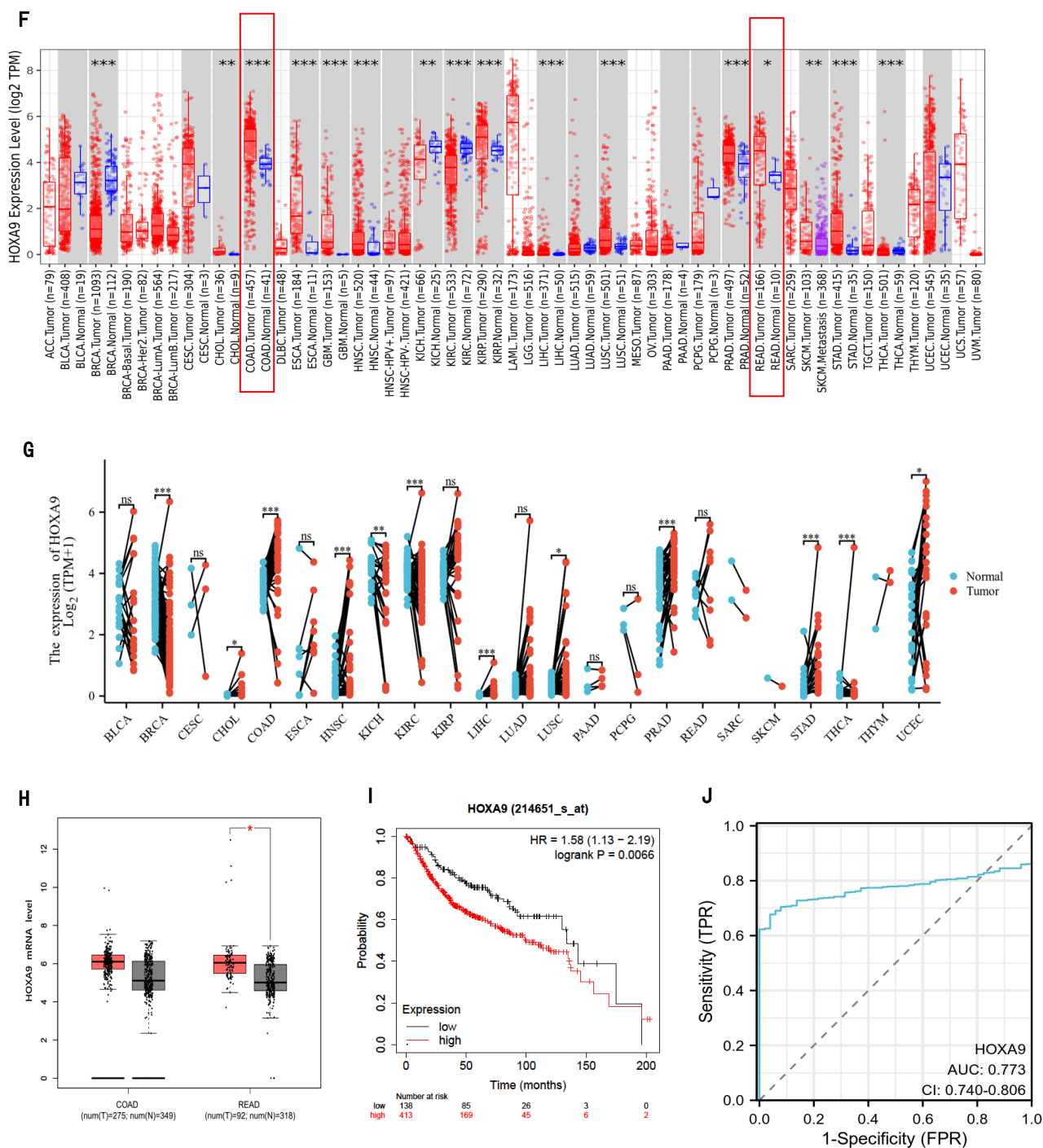


图 3 筛选潜在目标靶基因 HOXA9, 及 HOXA9 的表达谱、预后。

图 3A: TCGA 数据库中结直肠癌转录组数据的差异分析, 绘制热图 ($|\text{LogFc}| > 1$, $P < 0.05$)。图 3B: miR-140-3p 62 个靶基因与 9820 个 TCGA 上调基因取交集, 作 VENN 图, 得到三个基因: SLC7A1、MSI2、HOXA9。图 3C: HOXA9 被多个数据库预测为 miR-140-3p 的潜在靶基因, 数据通过 ENCORI 生成。图 3D: miR-140-3p 与 HOXA9 呈负相关。图 3E: miR-140-3p 作用于 HOXA9 的潜在靶点。数据通过 ENCORI 生成。图 3F、图 3G、图 3H: 结直肠癌

组织与正常组织的 HOXA9 表达谱，数据分别通过 TIMER2、TCGA(配对样本)、GEPIA2 生成

(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)。图 3I: Kaplan-Meier Plotter 分析 HOXA9 表达与患者预后的关系 (OS)。

图 3J: HOXA9 在结直肠癌组织中的诊断 ROC 曲线 (AUC=0.773)。

2.1.4 HOXA9 与免疫浸润的关系

通过 TISIDB 数据库分析了 HOXA9 与免疫浸润的关系 (图 4)，发现 HOXA9 与 CD4⁺ T Cell、CD8⁺ T Cell、B Cell 呈负相关，提示其与免疫浸润有关。

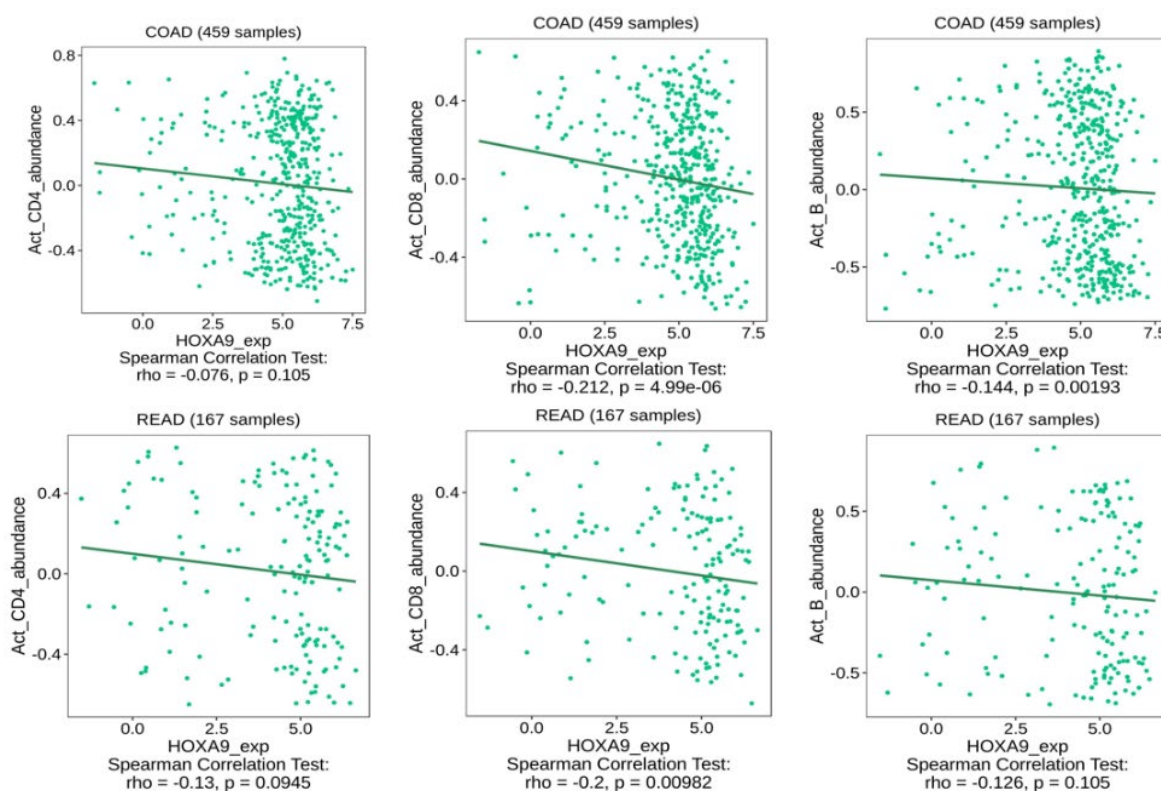


图 4 HOXA9 与 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞以及 B 细胞呈负相关趋势。

2.2 免疫组织化学结果

HOXA9 蛋白主要定位于细胞质中，少部分定位于细胞核（图 5A）。结直肠癌组织中 HOXA9 蛋白的高表达率（63.33%）显著高于癌旁正常组织（45.71%）（ $P<0.05$ ）（表 1）。MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、Ki-67、P53 蛋白免疫组化染色使用的为病理科辅助诊断抗体，阳性部位都定位于细胞核（图 5B）。

表 1: HOXA9 在结直肠癌与癌旁正常组织中的蛋白表达水平差异

组别	低表达	高表达
结直肠癌组织（n=210）	77(36.67%)	133(63.33%)
癌旁正常组织（n=210）	114(54.29%)	96(45.71%)
χ^2 值	13.146	
P 值	<0.001	

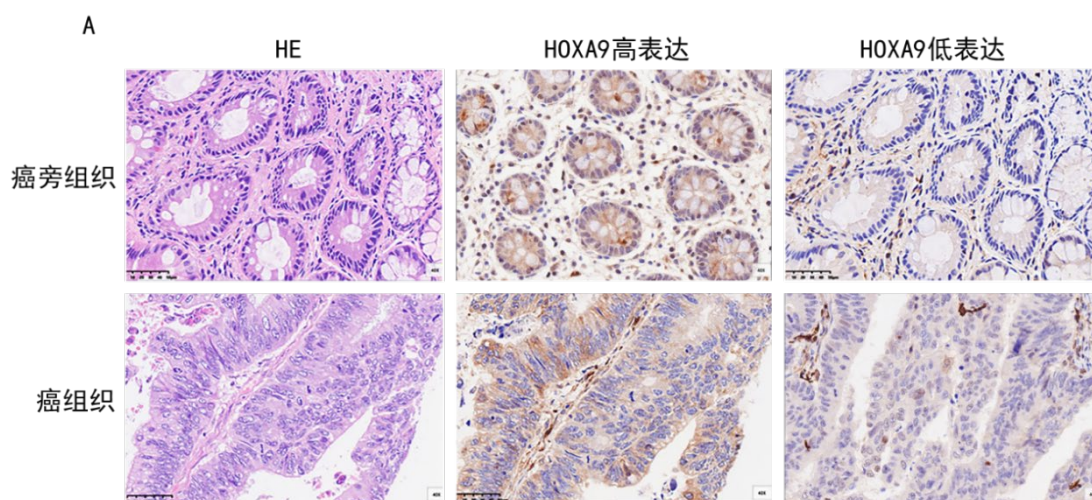


图 5A:癌旁组织和结直肠癌组织 HE 染色及 HOXA9 蛋白的免疫组化表达情况（40X）。

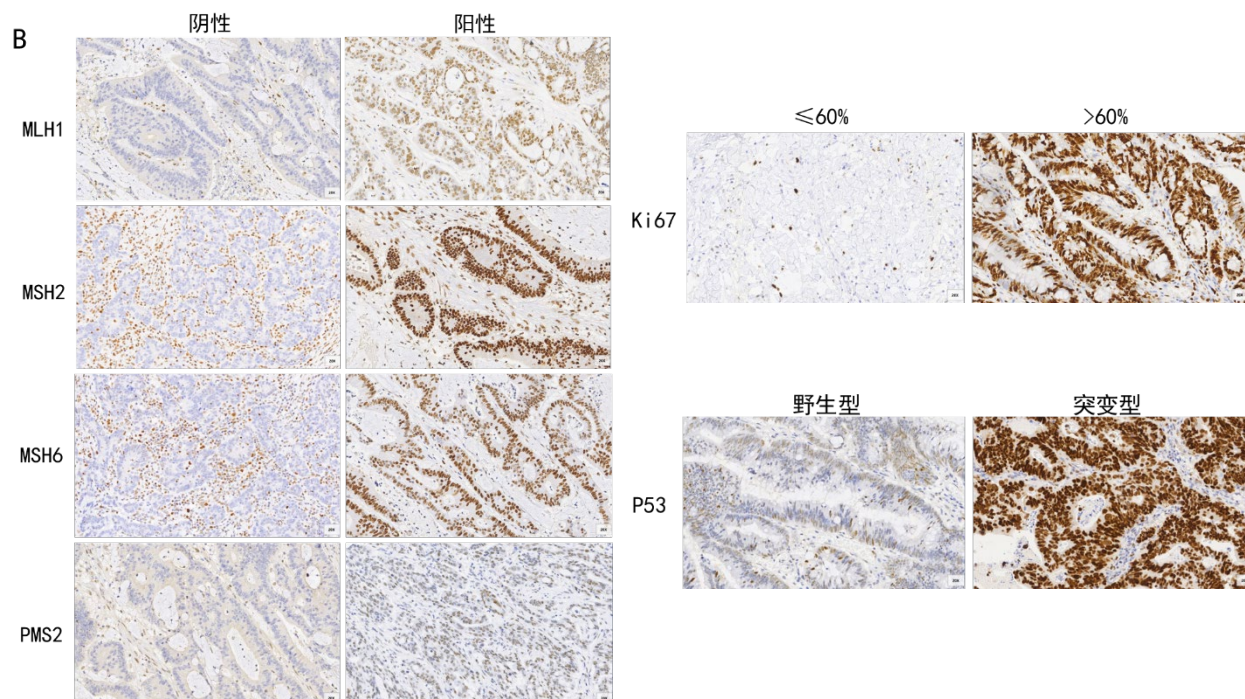


图 5B: 结直肠癌组织中 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 (阴性、阳性); Ki-67 ($\leq 60\%$ 、 $>60\%$); P53 (野生型、突变型) 蛋白免疫组化染色表达情况 (20X)。

2.3 PCR 结果

qRT-PCR 结果显示 miR-140-3p 在癌组织 (n=100) 中的相对表达量为 0.87 ± 0.13 ; HOXA9 mRNA 在癌组织 (n=10) 中的相对表达量为 1.14 ± 0.1 。与癌旁组织相比, 结直肠癌组织中 miR-140-3p 的表达量低于癌旁组织, 而结直肠癌组织 HOXA9 的 mRNA 表达量高于癌旁组织 (图 6A) ($P < 0.05$)。

ARMS-荧光 PCR 结果显示(图 6B): 在 miR-140-3p 高表达组中, KRAS 突变率为 33.33% (12/36), 在 miR-140-3p 低表达组中, KRAS 突变率为 37.5% (24/64); 在 HOXA9 高表达组中, KRAS 突变率为 33.83% (45/133), 在 HOXA9 低表达组中, KRAS 突变率为 27.27% (21/77)。

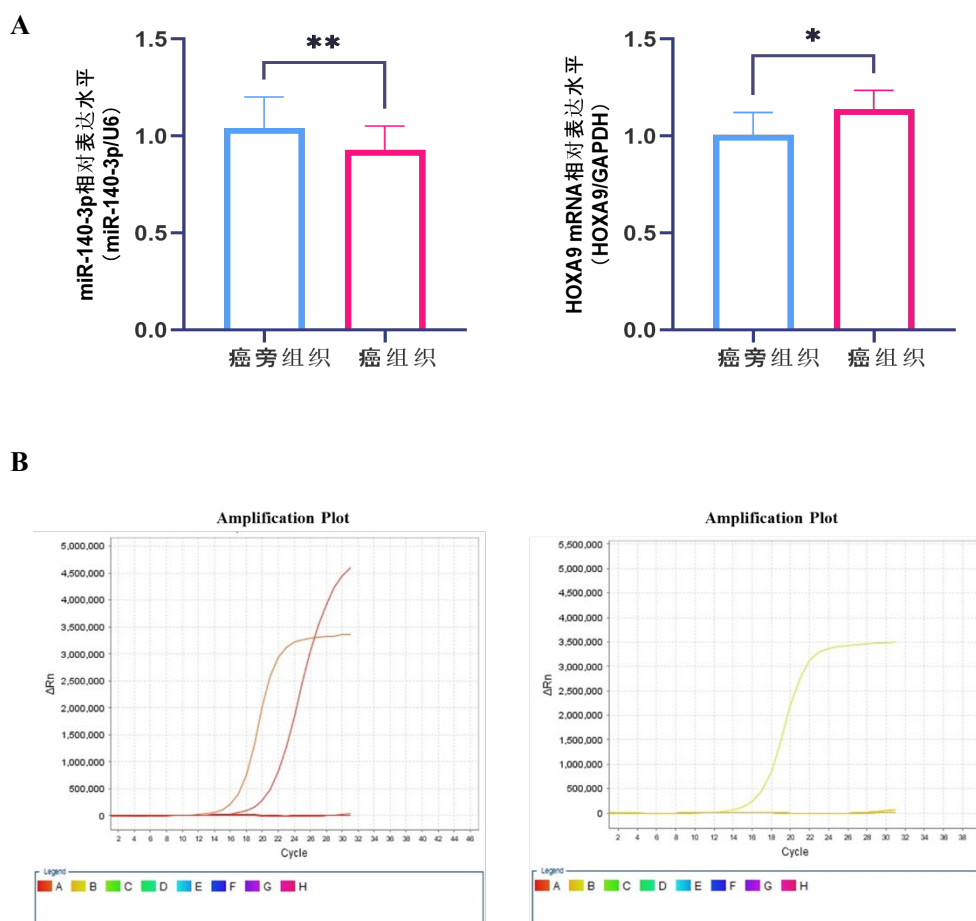


图 6 miR-140-3p、HOXA9 RNA 水平层面的表达情况以及 KRAS 突变情况

图 6A: miR-140-3p (左) 在结直肠癌组织中相对于癌旁组织呈低表达 ($P < 0.05$), HOXA9 (右) 在结直肠癌组织中相对于癌旁组织呈高表达 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$); 图 6B: KRAS 突变型 (左) 和 KRAS 野生型 (右)。

2.4 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者临床病理特征的关系

以 miR-140-3p 表达水平的平均值 0.87 为界, 将结直肠癌患者分为高表达组 36 例和低表达组 64 例; 以免疫组织化学法评判结果, 将结直肠癌患者分为 HOXA9 低表达组 77 例, 高表达组 133 例。分析结直肠癌组织中 miR-140-3p、HOXA9 表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系, 结果显示 (表 2), miR-140-3p 低表达与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), HOXA9 高表达与淋巴结转移和脉管神经累犯有关 ($P < 0.05$), 而 miR-140-3p、HOXA9 表达水平与年龄、性别、分化程度、TNM 分期、肿瘤直径以及大体类型、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、Ki-67、P53 表达情况无关, 差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2: miR-140-3p、HOXA9 表达水平与结直肠癌患者临床病理特征的关系

临床病理特征		miR-140-3p				HOXA9			
		高表达 (n=36)	低表达 (n=64)	χ^2	P	高表达 (n=133)	低表达 (n=77)	χ^2	P
性别				0.425	0.514			0.756	0.385
	男	21	33			66	43		
	女	15	31			67	34		
年龄				1.089	0.4			0.03	0.863
	≤55	13	30			36	20		
	>55	23	34			97	57		
分化程度				0.168	0.682			1.397	0.237
	高分化	15	24			63	30		
	中低分化	21	40			70	47		
脉管神经累犯				7.436	0.006			4.114	0.043
	是	9	34			78	34		
	否	27	30			55	43		
TNM 临床分期				1.29	0.256			2.738	0.098
	I - II	26	39			69	49		
	III-IV	10	25			64	28		
肿瘤直径 (cm)				0.967	0.325			1.904	0.168
	≤4	20	29			77	37		
	>4	16	35			56	40		
肿瘤位置				1.582	0.453			1.857	0.113
	左半结肠	2	6			14	2		
	右半结肠	12	27			32	20		
	乙状结肠/直肠	22	31			87	55		
大体类型				4.278	0.118			1.894	0.388
	隆起型	3	3			14	4		
	溃疡型	31	61			118	72		
	浸润型	2	0			1	1		
淋巴结转移				2.042	0.153			4.187	0.041
	是	7	21			55	21		
	否	29	43			78	56		
KRAS 突变				0.174	0.677			0.974	0.324
	是	12	24			45	21		
	否	24	40			88	56		
P53 突变				0.005	0.943			0.962	0.367
	是	25	44			95	50		
	否	11	20			38	27		
Ki67 增殖指数				3.241	0.078			2.952	0.091
	≤60%	8	9			20	16		
	>60%	28	55			113	61		
微卫星状态				1.316	0.251			2.573	0.109
	MSS	33	62			128	70		
	MSI	3	2			5	7		

2.5 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者预后的关系

2.5.1 miR-140-3p、HOXA9 的三年生存率

采用 Kaplan—Meier 法分析 miR-140-3p (图 7A)、HOXA9(图 7B)表达对结直肠癌患者预后的影响, 绘制生存曲线, 结果显示 miR-140-3p 低表达组 3 年总生存率为 67.2% (43/64), miR-140-3p 高表达组 3 年总生存率为 86.1% (31/36), miR-140-3p 低表达组较高表达组预后差, 差别有统计学意义 ($P<0.05$)。HOXA9 高表达组患者 3 年总生存率为 73% (89/122), HOXA9 低表达组患者 3 年总生存率 87.3% (62/71), HOXA9 高表达组较低表达组预后差, 差别有统计学意义 ($P<0.05$)。

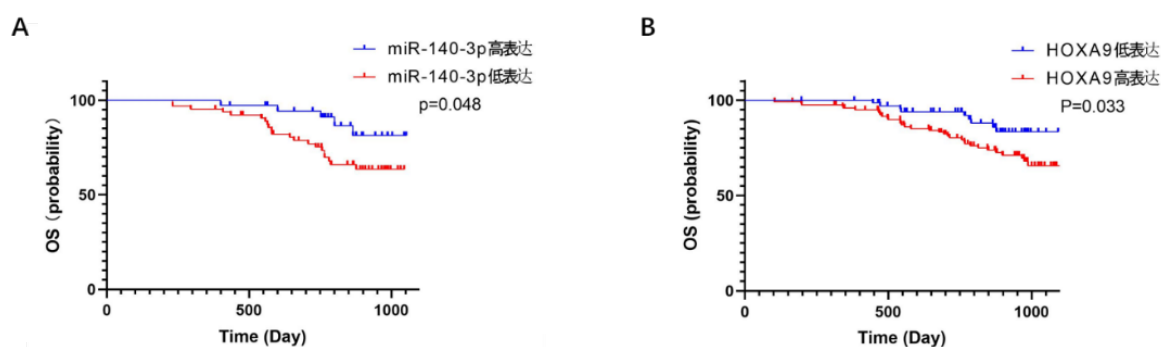


图 7:miR-140-3p、HOXA9 表达与结直肠癌患者预后的关系。

图 7A: 结直肠癌患者中, 相较于 miR-140-3p 高表达组 ($n=36$), miR-140-3p 低表达组 ($n=64$) 与预后不良相关 ($P<0.05$); 图 7B: 结直肠癌患者中, 相较于 HOXA9 低表达组 ($n=71$), HOXA9 高表达组 ($n=122$) 与预后不良相关 ($P<0.05$)。

2.5.2 CRC 患者的 COX 回归分析

通过 Cox 回归分析 (表 3), 单因素 Cox 回归结果显示, 分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、miR-140-3p 及 HOXA9 表达水平是结直肠癌患者预后的影响因素, 继续将上述结果纳入 Cox 多因素回归分析, 在校正可能的混杂因素后, TNM 分期、HOXA9 是结直肠癌患者预后的独立危险因素。

表 3: Cox 回归分析结直肠癌患者预后的影响因素

指标	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
性别	1.175	0.277-1.192	0.137			
年龄	1.002	0.966-1.033	0.95			
分化程度	1.282	1.195-1.881	0.022	1.036	0.971-1.204	0.096
大体类型 (ref=隆起型)			0.553			
溃疡型	1.298	0.051-2.853	0.548			
浸润性	1.363	0.049-2.711	0.324			
肿瘤直径	1.411	0.435-1.783	0.724			
脉管神经累犯	1.289	0.684-2.072	0.26			
TNM 分期	2.503	1.523-2.928	0.001	2.213	1.263-2.576	0.017
淋巴结转移	1.462	1.026-2.547	0.035	1.197	0.323-1.501	0.356
HOXA9	2.191	1.367-2.412	0.04	1.345	1.062-1.973	0.042
miR-140-3p	0.813	0.318-0.925	0.048	0.974	0.286-1.717	0.436

3 讨论

结直肠癌（CRC）是一种重要的恶性肿瘤，尽管在治疗方式上取得了进步，例如手术、放疗、化疗和免疫治疗，由于复发和转移其仍具有高死亡率^[22,23]。生物标志物是 CRC 诊断、分类和预后判断的重要工具。miRNAs 在肿瘤的发病机制、诊断和治疗中发挥着重要作用，这促使我们筛选可作为 CRC 诊断和治疗的标志物和靶点的 miRNAs。在这项研究中，我们鉴定了 miR-140-3p 作为 CRC 发展中的重要 miRNA，并发现 HOXA9 是其新靶点。

miR-140-3p 在其他癌症类型中也有一定程度的研究，通常作为肿瘤抑制因子发挥作用。例如，胃癌患者中的低 miR-140-3p 表达与不良预后和不利的临床病理特征相关。miR-140-3p 过表达抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭^[24]。类似地，在膀胱癌中，miR-140-3p 通过直接靶向 FOXQ1 阻碍癌细胞增殖和侵袭^[25]。然而，miR-140-3p 也可以作为肿瘤促进剂，如在卵巢癌中所证实的，其抑制 NK 细胞募集并减少细胞毒性作用，从而通过 MAPK1 的介导促进卵巢癌细胞生长^[26]。

HOXA9 与其他 AbdB 型 HOXA 基因一起，作为转录因子在造血和白血病发生发展中发挥着至关重要的作用^[27,28]。在乳腺癌中也观察到 HOXA9 表达升高。在卵巢癌中，HOXA9 诱导正常腹膜成纤维细胞表达癌症相关成纤维细胞（CAF）表型，刺激卵巢癌和内皮细胞的生长^[29]。此外，HOXA9 表达在 CRC 中对 5-氟尿嘧啶的化疗耐药性有关^[30]。然而，研究表明 HOXA9 超甲基化促进肝细胞癌的发展^[31]，表明 HOXA9 在不同的癌症类型中可能具有不同的作用。

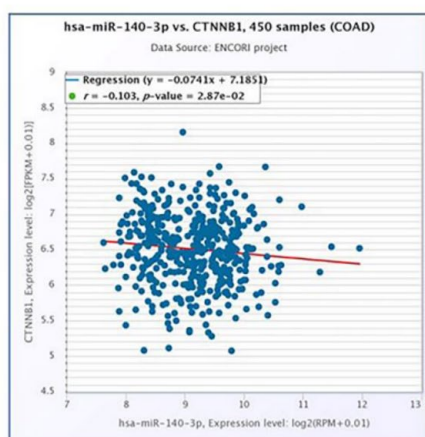
在我们的研究中，生物信息学分析显示 miR-140-3p 在结直肠癌组织中低表达，而 HOXA9 高表达。此外，发现 miR-140-3p 通过与其 mRNA 结合来调节 HOXA9，这一发现通过检测临床样本得到证实。我们的局限性在于没有直接验证它们的相互作用，但这将为它们的联系提供有利的证据。临床数据显示 miR-140-3p 低表达和 HOXA9 高表达与结直肠癌患者的淋巴结转移和不良预后相关。值得注意的是，HOXA9 是结直肠癌患者的独立危险因素。有趣的是，在我们的多变量分析中，miR-140-3p 没有作为独立的风险因素出现。这种不显著性可归因于在 miR-140-3p 和淋巴结转移之间观察到的强相互作用，如表 2 所示，多变量 COX 分析中，在评估一

个变量的显著性时同时考虑其他变量,当考虑到它们与其他协变量的相互作用或依赖性时, miR-140-3p 和淋巴结转移的显著性降低是合理的。因此, 这些因素在多变量 COX 分析中不具有显著性。

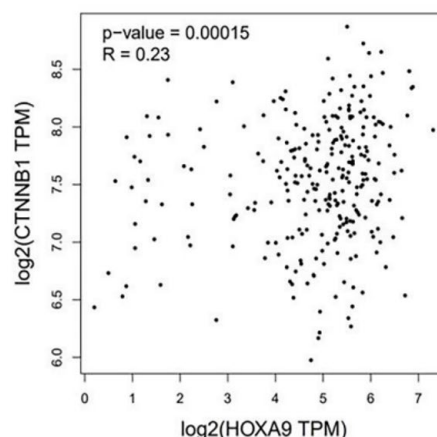
事实上, miR-140-3p 和 HOXA9 表现出很多功能重叠, 并具有共同的靶点。miR-140-3p 和 HOXA9 在癌症干细胞、增殖、凋亡和上皮-间充质转化 (EMT) 中起关键作用。例如, 在乳腺癌中, miRNA-140 的下调通过影响 SOX2 表达促进增殖并抑制凋亡^[32]。有趣的是, HOXA9 协同调节 SOX2 和 BCL2 以抑制细胞凋亡并介导白血病发生^[11]。在结直肠癌 (CRC) 中, BCL2 被认为是 miR-140-3p 的直接靶点^[33]。研究表明, miR-140-3p 调节肿瘤中的 PI3K/AKT、JAK/STAT、mTOR、TGF β /Smad 和 Wnt 通路^[7], 而 HOXA9 影响 PI3K/AKT、JAK/STAT、mTOR、NF- κ B、HIF1 α 和 Wnt 通路的表达水平^[15]。因此, miR-140-3p 和 HOXA9 可能在各种细胞水平上参与串扰。

我们的数据显示 miR-140-3p 和 HOXA9 的表达与淋巴结转移相关, 并且与预后不良有关。先前的研究指出, Wnt 通路是 miR-140-3p 和 HOXA9 的共享信号通路, 在 EMT 过程中发挥关键作用^[34-35]。CRC 中的生物信息学分析揭示了 HOXA9 和 β -连环蛋白 (基因: CTNNB1) 之间的正相关性, 而 miR-140-3p 与其表现出相反的趋势 (补充图 1)。因此, 我们假设 miR-140-3p-HOXA9 轴可能通过 Wnt/ β -catenin 介导的 EMT 过程影响淋巴结转移并导致不良结局, 需要在未来的研究中进一步探索。

A



B



注: 补充图 1A:miR-140-3p 表达与 CTNNB1 呈负相关; 补充图 1B:HOXA9 表达与 CTNNB1 呈正相关。

4 结 论

4.1 生信分析结果

在 CRC 中, miR-140-3p 低表达, 其低表达与患者预后较差相关。HOXA9 高表达, 其高表达与 CRC 患者预后较差相关。HOXA9 与 miR-140-3p 呈负相关。同时 HOXA9 与 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞呈负相关, 其与免疫浸润有关。

4.2 miR-140-3p、HOXA9 在 CRC 中的表达情况

HOXA9 主要定位于细胞质, 少部分定位于细胞核。相比于癌旁组织, miR-140-3p 在癌组织中低表达; HOXA9 在癌组织中高表达。

4.3 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 临床病理特征的关系

miR-140-3p 低表达与淋巴结转移有关, HOXA9 高表达与淋巴结转移和脉管神经累犯有关。

4.4 miR-140-3p、HOXA9 表达与 CRC 患者预后的关系

miR-140-3p 低表达组 CRC 患者相较于高表达组预后差, HOXA9 高表达组 CRC 患者相较于低表达组预后差。多因素 Cox 回归分析显示, 高 TNM 临床分期以及 HOXA9 蛋白高表达是影响 CRC 患者预后的独立危险因素。

参考文献

- [1] Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal & F. Bray (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- [2] Paczek, S., M. Lukaszewicz-Zajac & B. Mroczko (2022) Granzymes-Their Role in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 23.
- [3] Chen, Y., X. Deng, W. Chen, P. Shi, M. Lian, H. Wang, K. Wang, D. Qian, D. Xiao & H. Long (2019b) Silencing of microRNA-708 promotes cell growth and epithelial-to-mesenchymal transition by activating the SPHK2/AKT/beta-catenin pathway in glioma. *Cell Death Dis*, 10, 448.
- [4] Ji, D., Z. Chen, M. Li, T. Zhan, Y. Yao, Z. Zhang, J. Xi, L. Yan & J. Gu (2014) MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Mol Cancer*, 13, 86.
- [5] Chen, X., K. Zeng, M. Xu, X. Liu, X. Hu, T. Xu, B. He, Y. Pan, H. Sun & S. Wang (2019a) P53-induced miR-1249 inhibits tumor growth, metastasis, and angiogenesis by targeting VEGFA and HMGA2. *Cell Death Dis*, 10, 131.
- [6] Ciesla, M., K. Skrzypek, M. Kozakowska, A. Loboda, A. Jozkowicz & J. Dulak (2011) MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem*, 401, 2051-61.
- [7] Taheri, F., S. O. Ebrahimi, R. Heidari, S. N. Pour & S. Reisi (2023) Mechanism and function of miR-140 in human cancers: A review and in silico study. *Pathol Res Pract*, 241, 154265.
- [8] Dong, W., C. Yao, X. Teng, J. Chai, X. Yang & B. Li (2016) MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 37, 2973-85.
- [9] Zhou, Y. Wang, Y. Wang, G. Chen, Q. Lian & H. Wang (2019) miR-140-3p inhibits breast cancer proliferation and migration by directly regulating the expression of tripartite motif 28. *Oncol Lett*, 17, 3835-3841.
- [10] Li, J., J. Zhao, H. Wang, X. Li, A. Liu, Q. Qin & B. Li (2018) MicroRNA-140-3p enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by targeting pregnenolone X receptor. *Onco Targets Ther*, 11, 5885-5894.
- [11] Liu, D., C. Chen, M. Cui & H. Zhang (2021) miR-140-3p inhibits colorectal cancer progression and its liver metastasis by targeting BCL9 and BCL2. *Cancer Med*, 10, 3358-3372.
- [12] Jiang, W., T. Li, J. Wang, R. Jiao, X. Shi, X. Huang & G. Ji (2019) miR-140-3p Suppresses Cell Growth And Induces Apoptosis In Colorectal Cancer By Targeting PD-L1. *Onco Targets Ther*, 12, 10275-10285.
- [13] Li, D. P., Z. Y. Li, W. Sang, H. Cheng, X. Y. Pan & K. L. Xu (2013) HOXA9 gene expression in acute myeloid leukemia. *Cell Biochem Biophys*, 67, 935-8.
- [14] Talarmin, L., M. A. Clarke, D. Shorthouse, L. Cabrera-Cosme, D. G. Kent, J. Fisher & B. A. Hall (2022) HOXA9 has the hallmarks of a biological switch with implications in blood cancers. *Nat Commun*, 13, 5829.
- [15] Tang, L.L., Peng, C. Tan, H. Liu, P. Chen & H. Wang (2022) Role of HOXA9 in solid tumors: mechanistic insights and therapeutic potential. *Cancer Cell Int*, 22, 349.

- [16] Watanabe, Y., M. Saito, K. Saito, Y. Matsumoto, Y. Kanke, H. Onozawa, S. Hayase, W. Sakamoto, T. Ishigame, T. Momma, S. Ohki & S. Takenoshita (2018) Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 15, 2756-2762.
- [17] Yuan, Y., S. Sun, N. Jiao, Y. Shu & Y. Zhang (2018) Upregulation of HOXA10 Protein Expression Predicts Poor Prognosis for Colorectal Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*, 22, 390-397.
- [18] Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives [J]. *Annals of Oncology*, 2005,16(2):189-194.
- [19] 白杨,吴林林,安建多,胡艳萍.结直肠癌组织中 KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA 基因突变与临床病理特征及 MMR 蛋白、p53 蛋白表达的相关性研究[J].*诊断病理学杂志*.2021,28(3):183-188.
- [20] 刘云龙,孙国平.胃癌中 Ki67 的表达及其相关性的研究[J].*世界最新医学*.2019,19 (37) :26-27.
- [21] Pidikova, P., R. Reis & I. Herichova (2020) miRNA Clusters with Down-Regulated Expression in Human Colorectal Cancer and Their Regulation. *Int J Mol Sci*, 21.
- [22] Dekker, E., P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi & M. B. Wallace (2019) Colorectal cancer. *Lancet*, 394, 1467-1480.
- [23] Kennedy, R. D., M. Bylesjo, P. Kerr, T. Davison, J. M. Black, E. W. Kay, R. J. Holt, V. Proutski, M. Ahdesmaki, V. Farztdinov, N. Goffard, P. Hey, F. McDyer, K. Mulligan, J. Mussen, E. O'Brien, G. Oliver, S. M. Walker, J. M. Mulligan, C. Wilson, A. Winter, D. O'Donoghue, H. Mulcahy, J. O'Sullivan, K. Sheahan, J. Hyland, R. Dhir, O. F. Bathe, O. Winqvist, U. Manne, C. Shanmugam, S. Ramaswamy, E. J. Leon, W. I. Smith, Jr., U. McDermott, R. H. Wilson, D. Longley, J. Marshall, R. Cummins, D. J. Sargent, P. G. Johnston & D. P. Harkin (2011) Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol*, 29, 4620-6.
- [24] Wang, Z., K. Chen, D. Li, M. Chen, A. Li & J. Wang (2021) miR-140-3p is involved in the occurrence and metastasis of gastric cancer by regulating the stability of FAM83B. *Cancer Cell Int*, 21, 537.
- [25] Wang, Y., J. Chen, X. Wang & K. Wang (2020b) miR-140-3p inhibits bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting FOXQ1. *Aging (Albany NY)*, 12, 20366-20379.
- [26] Wang, J., M. Zhu, X. Zhou, T. Wang, Y. Xi, Z. Jing & W. Xi (2020a) MiR-140-3p inhibits natural killer cytotoxicity to human ovarian cancer via targeting MAPK1. *J Biosci*, 45.
- [27] Abramovich, C., N. Pineault, H. Ohta & R. K. J. A. o. t. N. Y. A. o. S. Humphries (2005) Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion. 1044, 109-116.
- [28] de Bock, C. E., S. Demeyer, S. Degryse, D. Verbeke, B. Sweron, O. Gielen, R. Vandepoel, C. Vicente, M. Vanden Bempt, A. Dagklis, E. Geerdens, S. Bornschein, R. Gijssbers, J. Soulier, J. P. Meijerink, M. Heinaniemi, S. Teppo, M. Bouvy-Liivrand, O. Lohi, E. Radaelli & J. Cools (2018) HOXA9 Cooperates with Activated JAK/STAT Signaling to Drive Leukemia Development. *Cancer Discov*, 8, 616-631.
- [29] Ko, S. Y., N. Barengo, A. Ladanyi, J. S. Lee, F. Marini, E. Lengyel & H. Naora (2012) HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. *J Clin Invest*, 122,

3603-17.

- [30] Ju, T., H. Jin, R. Ying, Q. Xie, C. Zhou & D. Gao (2017) Overexpression of NAC1 confers drug resistance via HOXA9 in colorectal carcinoma cells. *Mol Med Rep*, 16, 3194-3200.
- [31] Kuo, C. C., C. Y. Lin, Y. L. Shih, C. B. Hsieh, P. Y. Lin, S. B. Guan, M. S. Hsieh, H. C. Lai, C. J. Chen & Y. W. Lin (2014) Frequent methylation of HOXA9 gene in tumor tissues and plasma samples from human hepatocellular carcinomas. *Clin Chem Lab Med*, 52, 1235-45.
- [32] Zhang Y, Eades G, Yao Y, Li Q, Zhou Q (2012) Estrogen receptor α signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2. *J Biol Chem* 287:41514–41522.
- [33] Miyamoto R, Kanai A, Okuda H, Komata Y, Takahashi S, Matsui H, Inaba T, Yokoyama A (2021) HOXA9 promotes MYC-mediated leukemogenesis by maintaining gene expression for multiple anti-apoptotic pathways. *Elife*.
- [34] Xu Q, Zhang Q, Dong M, Yu Y (2021) MicroRNA-638 inhibits the progression of breast cancer through targeting HOXA9 and suppressing Wnt/beta-cadherin pathway. *World J Surg Oncol* 19:247.
- [35] Gonzalez DM, Medici D (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 7:re8.

综述

HOXA9 在癌症中的研究进展

1、HOXA9 的生物学背景

同源异形（homeobox, HOX）基因最早被发现与果蝇的发育调控有关，是一类含有同源框的基因，HOX 基因的表达水平在胚胎发育中对组织和器官的形成具有重要的调控作用。已发现的 HOX 基因产物基本上都是转录因子，它能识别所控制的基因启动子的特异序列，从而在转录水平调控基因表达^[1]。目前，已鉴定出 39 个 HOX 基因，并将其分为 HOXA 簇、HOXB 簇、HOXC 簇和 HOXD 簇^[2]。每个簇位于不同的染色体上^[3]。

HOXA9 是 A 族同源盒（HOX）基因的一员，定位在人的 7 号染色体短臂上（7p15-p14），编码蛋白分子量为 102KD，位于 HOXA 簇的 5'端，其含有两个外显子，外显子 II 是一个特别重要的区域，因为它能够编码 DNA 结合结构域，并且与 3'UTR 一起构成了共享的区域^[4]。HOXA9 基因启动子区域含有丰富的 CPG 岛，编码具有经典的螺旋-转角-螺旋结构的转录调节因子，可特异性识别 TTAGAC 序列^[5]，其可以调节基因的表达、形态发生和分化。该基因在白血病中被广泛研究，近年来 HOXA9 在肺癌、胃肠道肿瘤等实体瘤中的研究越来越受关注，研究发现 HOXA9 在部分癌细胞系中高表达，而在另一些细胞系中低表达。HOXA9 是同一家族中研究最多的基因，故本文对 HOXA9 在目前癌症中的研究进展进行综述，探究其在癌症发生机制及治疗中可能发挥的作用。

2、HOXA9 在恶性肿瘤中的作用

2.1 HOXA9 与白血病

白血病的特点是患者外周血和骨髓中白细胞增多。临床上，白血病主要包括四种常见类型：急性淋巴母细胞白血病(ALL)、慢性淋巴母细胞白血病(CLL)、慢性髓系

白血病(CML)和急性髓细胞白血病 (AML) [6]。血液恶性肿瘤是由造血功能紊乱引起的, 血细胞类型和致癌事件的特定顺序最终决定了癌症的亚型和临床结局。HOXA9 在急性髓系白血病中经常被研究, 其被证明与干细胞的增殖分化和自我更新维持有关[7]。HOXA9 在急性髓系白血病中通常上调, 且上调的 HOXA9 提示预后不良。相关研究表明, HOXA9 可与核基质附着蛋白(SAFB)结合成染色体复合物, HOXA9-SAFB 染色体复合物进而与组蛋白脱乙酰酶和 HP1 γ 相互作用, 从而抑制与细胞分化和凋亡相关基因(包括 NOTCH1、CEBP δ 、S100A8 和 CDKN1A)的表达[8]。HOXA9 具有生物学开关的特征, 可以将 HOXA9 作为药物靶点用于治疗血液癌症[9]。HOXA9 通过增强多种与抗凋亡途径相关的基因表达来推动 MYC 介导的白血病发生。在 MLL 基因融合介导的白血病中, MLL 融合可直接激活 MYC 和 HOXA9 的表达, MYC 和 HOXA9 的联合表达又最终诱导了白血病, 而其中任何一个单基因的转导都不能导致白血病的发生, 这表明 MYC 和 HOXA9 之间存在协同作用[10]。HOXA9 是颗粒蛋白酶的特异性底物, HOXA9 触发了一个复杂的正反馈循环, 驱动了整个 HOXA9 基因座的表达。此外, 它还控制了关键的致癌转录因子 Myc 和 Myb, 并直接诱导细胞周期调节因子 CDK6 和 CyclinD1 以及端粒酶的转录, 促进白血病的发生发展, 致癌转录因子 HOXA9 的异位表达是急性髓性白血病(AML)的主要原因[11]。C/EBP α 是正常骨髓发育所必需的, 在大多数急性髓性白血病病例中, C/EBP α 表达活性明显降低, 人类的 C/EBP α 位点高度保守, 特异性地在造血干细胞和祖细胞以及髓系发育中起关键作用。对表达外源性 HOXA9 或 HOXA9-er 的原代髓系祖细胞的 ChIP-Seq 分析表明, HOXA9 定位于 C/EBP α 增强子的+8kb 和+37kb 区域。凝胶迁移实验表明, HOXA9 与+8kb 增强子中的三个一致位点结合, 但与+37 kb 增强子中的单个一致位点没有亲和力。HOXA9 抑制 C/EBP α 表达, 使正常髓系祖细胞无法成熟, 促使急性髓系白血病的发生发展[12]。研究者发现 HOXA9/HOXA10 和 IRX1 基因的表达显著互斥, 并将这两个亚群命名为 iALL-HOXA9 和 iALL-IRX1, 两个亚群之间存在根本差异。对这两个亚组的转录组研究显示, iALL-IRX1 组相对于 iALL-HOXA9 组具有更强的侵袭性, 即该组患者预后较差, 并且在较年轻时即被诊断出来。这可能反映了 iALL-IRX1 由发育较早的细胞起源。研究进一步分析揭示了两组之间的关键差异可能对治疗策略产生影响[13]。shRNA 慢病毒载体稳定沉默 HOXA9 表达

以后,可显著抑制 U937 细胞增殖并促进其凋亡,同时可下调 c-myc 表达,上调 P27 表达,使细胞周期阻滞于 G0/G1 期^[14]。TIFAB 的强制表达通过下调 RelB 和上调 HOXA9 来逆转 NIK 受损诱导的 AML 发生发展^[15]。

2.2 HOXA9 与卵巢癌

卵巢癌(OC)是女性生殖系统常见的三大癌症之一。2020 年中国人约有 5.5 万名女性被诊断为 OC,约占全球 OC 病例的 17.6%^[16]。卵巢癌术后复发率高,且容易对化疗耐药,其死亡率是妇科恶性肿瘤中最高的。目前,OC 的临床治疗主要以手术和铂类药物联合化疗为主^[17]。HOXA9 在卵巢癌中的研究主要以甲基化检测为主,相关研究表明 DNA 超甲基化已被发现是癌变早期过程中最常见的事件,已成为癌症检测的潜在靶点。在 BRCA 突变的上皮性卵巢癌中,基于 ddPCR 方法实时检测到的 ctDNA HOXA9 启动子甲基化水平的升高与患者的不良预后相关^[18]。在 93% (82/88) 的卵巢癌和 88% (14/16) 的交界性肿瘤中检测到 HOXA9 甲基化。在良性卵巢肿瘤患者中,17% (3/18) 检测到 HOXA9 甲基化。使用 ROC 分析得到 HOXA9 甲基化的诊断准确率为 98%,HOXA9 甲基化具有高度的癌症特异性^[19]。HOXA9 在上皮性卵巢癌中经常发生甲基化,HOXA9 的甲基化与患者年龄、绝经情况显著相关^[20]。有研究证明孕激素对卵巢的影响减少了卵巢暴露于高水平雌激素的时间,从而抑制了雌激素引起的卵巢上皮细胞分化和过度生长的致癌变化^[21]。研究证明,HOXA9 在人卵巢癌细胞系中高表达,在孕激素的刺激下,HOXA9 的表达受到抑制,从而使孕激素发挥抑制细胞增殖、迁移、侵袭以及 EMT 进程等恶性生物学表型的作用^[22]。张盛等人发现 HOXA7、HOXA9、A10 和 A11 等调控米勒管发育的 HOX 基因在正常卵巢中不表达,而在卵巢上皮性癌中均可发现其表达,且特异性的 HOX 基因表达和卵巢癌的病理类型密切相关,HOXA9 的表达与卵巢癌的预后和分级相关^[23]。HOXA9 的表达与 EOC (上皮性卵巢癌)患者和 EOC 小鼠异种移植模型的不良结果密切相关,其在体内促进 EOC 生长,而 HOXA9 在体外不自主刺激肿瘤细胞生长。另一方面,HOXA9 在 EOC 细胞中的表达诱导正常腹膜成纤维细胞表达癌症相关成纤维细胞 (CAF) 的标记物并刺激 EOC 和内皮细胞的生长。同样,HOXA9 在 EOC 细胞中的表达诱导正常脂肪和骨髓来源的间充质干细胞 (MSC) 获得 CAF 的特征。

HOXA9 的这些作用在很大程度上是由于其转录激活编码 TGF- β 2 的基因, 该基因以旁分泌方式作用于腹膜成纤维细胞和 MSC, 以诱导 CXCL12、IL-6 和 VEGF-A 表达。这些结果表明 EOC 细胞中的 HOXA9 表达促进了肿瘤生长的微环境^[24]。HOXA9 在体外和异种移植模型中抑制 EOC 细胞的失巢凋亡。HOXA9 还刺激 EOC 细胞附着到腹膜细胞并增强其迁移能力。HOXA9 结合编码 P-钙粘蛋白的 CDH3 基因的启动子, 诱导 EOC 细胞中的 CDH3 表达, 促进细胞增殖和迁移^[25]。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)表现出抑制抗肿瘤免疫反应的 M2 巨噬细胞表型, 并且通常与癌症患者的不良预后相关。HOXA9 在卵巢癌细胞中的表达刺激了腹腔巨噬细胞的趋化性并诱导巨噬细胞获得 TAM 样特征。这些特征包括诱导 M2 标记物 CD163 和 CD206, 以及免疫抑制细胞因子 IL-10 和趋化因子配体 17, 以及免疫刺激细胞因子 IL-12 的下调。HOXA9 介导的 TAM 主要是由 HOXA9、肿瘤衍生的转化生长因子- β 2 和趋化因子配体 2 水平的组合效应诱导的。卵巢癌临床标本中 HOXA9 的高表达与 TAM、肿瘤内调节 T 细胞的丰度增加以及 CD8+肿瘤浸润淋巴细胞的丰度减少密切相关。高表达 HOXA9 的肿瘤患者腹水中的免疫抑制细胞因子水平升高^[26]。值得注意的是, HOXA9 甲基化水平的升高以及 HOXA9 表达量的升高同时提示着预后不良, 这表明 HOXA9 在卵巢癌复杂的分子网路中可能发挥着不同的作用。

2.3 HOXA9 与乳腺癌

乳腺癌是全球女性中最常见的癌症(占癌症病例总数的 24.2%)。癌转移占乳腺癌相关死亡病例的 90%以上^[27]。有研究表明 HOXA9 通过调节肿瘤抑制因子 BRCA1 的表达来限制乳腺肿瘤的侵袭能力, HOXA9 的缺失促进了乳腺腺上皮细胞的生长和存活, 并扰乱了组织的形态发生。在培养的异种移植瘤小鼠模型中, 恢复 HOXA9 的表达可抑制乳腺癌细胞的生长和增殖, 并抑制其恶性表型。且 HOXA9 表达与临床标本中的 BRCA1 相关, 并且与乳腺组织中缺乏雌激素受体/孕激素受体表达的患者的肿瘤侵袭性有关^[28]。近年来, 越来越多的研究证明 miRNA 功能障碍是导致肿瘤恶性发展的主要原因之一, miR-638 在正常乳腺组织中高表达, 其通过靶向 HOXA9 抑制 EMT 和 Wnt/ β -cadherin 通路从而抑制乳腺癌的恶性进展^[29]。HOXA9 和 HOXA10 启动子甲基化与乳腺癌患者的预后显著相关, 并通过远程染色质相互作用

组成转录调控模块影响乳腺癌进展^[30]。有人利用人类乳腺癌细胞和基因工程小鼠模型鉴定了 TET1 在乳腺癌中的上游激活物和下游效应物，发现 HMGA2 诱导 TET1 表达，TET1 结合自身的启动子和同源盒 A (HOXA) 基因的启动子并使其去甲基化，刺激 HOXA 基因（包括 HOXA7 和 HOXA9）的转录翻译，并通过 HOXA 基因抑制小鼠异种移植乳腺肿瘤的生长和转移^[31]。circRNACDR1as 通过充当 miR-641 的 RNA 海绵来正向调节 NSCLC 细胞中的 HOXA9 表达，并且敲低 circRNACDR1as 增加了 DDP 耐药 NSCLC 细胞的敏感性，这可以通过下调 miR-641 和上调 HOXA9 来逆转。circRNACDR1as 过表达可通过调节 miR-641/HOXA9 轴增加 DDP 敏感 NSCLC 细胞的耐药性^[32]。长链非编码 RNA MIR503HG 通过 miR-224-5p/HOXA9 轴抑制三阴乳腺癌细胞增殖并促进其凋亡，可能成为 TNBC 治疗的新靶点^[33]。

2.4 HOXA9 与肝癌

原发性肝癌具有高侵袭性和高死亡率。肝细胞癌(HCC)和肝内胆管癌(ICC)分别约占原发性肝癌的 85%和 15%^[34]。晚期 HCC 患者的中位生存期可能短至 3 个月^[35]。HOXA9 在肝细胞癌中高甲基化，此外，HOXA9 甲基化在正常人和肝细胞癌患者的血浆样本中有显著差异，同时发现联合分析 HOXA9 甲基化和 AFP 水平在检测肝细胞癌时比单独使用每项检测指标更敏感^[36]。HOXA9 的甲基化与基因表达失活有关^[37]。肝胆管癌患者由于诊断较晚及化疗耐药，预后较差。尽管在临床中常规使用免疫组织化学(IHC)可诊断，但肝内胆管癌(ICC)和继发性肝腺癌之间的区分往往不明确，导致错误的诊断和治疗决策。相关研究表明 HOXA9 在结直肠癌肝转移标本中上调，而在肝内胆管癌中下调，两者存在显著差异，HOXA9 可能是继发性肝腺癌和肝内胆管癌鉴别诊断的潜在分子^[38]。有研究通过 Transwell 迁移侵袭实验证明，相对于对照组，过表达 HOXA9 基因后，侵袭至下室的细胞数量明显减少，HOXA9 基因对 HepG2 肝癌细胞的迁移和侵袭能力有明显的抑制作用^[39]。

2.5 HOXA9 与结直肠癌

结直肠癌(CRC)是第三大最常见的癌症，全球发病率和死亡率都很高。研究表明，高达 50%的 CRC 患者在诊断时已存在远处转移^[40]。晚期结直肠癌的 5 年生存率

仅为 10%。与邻近健康结肠上皮相比, HOXA9 在结肠腺瘤中表达增加, 它的过表达导致了显著的遗传和信号变化, 具体表现为生长因子 IGF1 和 FLT3 的表达增加以及 AKT 信号通路的超活性, 同时加速了癌前病变的进展^[41]。HOXA9 阳性表达与患者较高的 TNM 分期和淋巴结转移阳性显著相关, 且与较差的结直肠癌患者预后相关^[42]。同时相关研究表明 HOXA9 受到 ceRNA 和 miRNA 的调节, 在 CRC 中, has-circ-0079662 上调充当 miRNA 海绵, 解除了 has-miR-324-5p 对靶基因 HOXA9 的抑制作用, 使 HOXA9 表达上调, 促进 CRC 发生发展^[43]。miR-140-3p 与 HOXA9 呈负相关, 且 miR-140-3p 低表达、HOXA9 高表达与淋巴结高转移率有关, 经 COX 回归分析表明 HOXA9 高表达为影响结直肠癌患者的独立危险因素^[44]。HOXA9 晚期结肠癌奥沙利铂化疗耐药可能会促进组织中 HOXA9 蛋白表达, 但这种促进作用主要体现在进展靶病灶中, 而对非进展病灶中 HOXA9 蛋白的表达影响不大^[45]。在结直肠癌组织中 circ-0052184 表达升高可抑制 miR-604 的表达, 致使 miR-604 靶基因 HOXA9 表达的升高, 这揭示了 circ-0052184 可调控 miR-604/HOXA9 轴, 从而促进结直肠癌细胞的恶性进展^[46]。HOX 蛋白是调节干细胞 (SC) 功能的转录因子, HOXA9 的表达及其功能网络在正常结肠 SC 中受视黄酸 (RA) 信号的调节, 当调节失调时, HOXA9 可能导致 CSC 过剩, 从而驱动 CRC 的发生发展^[47]。miR-133b 的过表达显著抑制了结直肠癌细胞在体内和体外的转移能力。HOXA9 被确定为 miR-133b 的直接功能靶标。此外, HOXA9 与 miR-133b 呈负相关, miR-133b 降低 HOXA9 表达, 随后下调 ZEB1 并上调 E-钙粘蛋白表达。较低的 miR-133b 和较高的 HOXA9 表达导致了 CRC 患者的预后较差。多变量分析表明, miR-133b 是 CRC 患者总生存期独立且重要的预测因子。miR-133b 靶向 HOXA9/ZEB1 通路可促进 CRC 肿瘤细胞的转移^[48]。HOXA9 的过表达明显减弱了 PCED1B-AS1 或 miR-633 模拟物敲低在结直肠癌进展中的保护作用。PCED1B-AS1 可以通过海绵化 miR-633 负向调节 HOXA9 的表达, 从而抑制结直肠癌的发生发展^[49]。

2.6 HOXA9 与肺癌

肺癌是世界范围内死亡率最高的恶性肿瘤, 约 25% 的癌症患者死于肺癌。腺癌 (LUAD) 是非小细胞肺癌 (NSCLC) 中最常见的组织类型, 其 5 年总生存率 (OS) 仍低

于 15%^[50]。相关研究表明, HOXA9 甲基化在 LUAD 中显著上调, 且发现 HOXA9、KRTAP8-1、CCND1 和 TULP2 的甲基化对于未确定的肺结节中 LUAD 的早期识别具有很大潜力^[51]。miR-365 可抑制 HOXA9 的表达, 增强肺腺癌细胞的迁移、侵袭、增殖能力, 抑制糖酵解途径的第一限速酶 HK2, 减少中间产物的产生, 影响肿瘤细胞能量供应, 抑制肿瘤细胞的增殖^[52]。有研究表明 NSCLC 中 HOXA9 mRNA 表达量与临床 TNM 分期、淋巴结转移和 EGFR 蛋白表达均呈负相关;而与患者吸烟状况呈正相关^[53]。循环肿瘤 DNA(ctDNA)已被建议作为非小细胞肺癌的生物标志物。血浆中的甲基化 HOXA9 和突变型 KRAS 之间存在高相关性 (Spearman 的相关性为 0.83, $P < 0.001$)。甲基化 HOXA9 存在于无法治愈的肺腺癌组织中, 但不存在于非恶性肺组织中。甲基化的 HOXA9 和突变的 KRAS 在晚期肺腺癌患者中高度一致, 可以用作检测 ctDNA 的方法^[54]。类似地, 同样有研究表明 NSCLC 患者的 HOXA9 甲基化水平明显高于正常患者^[55]。支气管灌洗液中的甲基化 HOXA9 具有作为肺癌辅助诊断工具的潜力, 具有临床相关的敏感性和特异性^[56]。有研究表明 NKA 和甲基化 HOXA9 水平评分的结合可对用 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗周期后的 NSCLC 患者的预后进行分层^[57]。miR-182-5p 表达水平在 NSCLC 组织中上调, miR-182-5p 可能通过调节 HOXA9 靶基因对 NSCLC 产生致癌影响^[58]。miR-19b-3p 的高表达能够抑制 HOXA9 表达从而预测 NSCLC 患者的不良临床预后^[59]。circRNACDR1as 通过充当 miR-641 的 RNA 海绵来正向调节 NSCLC 细胞中的 HOXA9, 并且敲低 circRNACDR1as 增加了 DDP 耐药 NSCLC 细胞的敏感性, 这通过下调 miR-641 和上调 HOXA9 来逆转。circRNACDR1as 过表达可通过调节 miR-641/HOXA9 轴增加 DDP 敏感 NSCLC 细胞的耐药性^[60]。HOXA9 的异位表达会抑制 miR-196b 诱导的细胞侵袭, 并且 HOXA9 过表达增加 E-钙粘蛋白的表达。此外, HOXA9 通过分别调控 NF- κ B 与 SLUG 和 MMP9 基因启动子的结合, 有效减弱蜗牛家族锌指 2(SNAI2/SLUG)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达^[61]。HOXA9 在控制肺癌细胞的侵袭行为中可能起着核心作用。

2.7 HOXA9 与膀胱癌

膀胱癌(BC)在全球最常见的 15 种癌症中占有一席之地。制定每个膀胱癌患者适

当的治疗方案的关键步骤是确定其疾病的初始分期和分级^[62]。疾病分为有无转移的非肌性浸润性膀胱癌(NMIBC)和肌性浸润性膀胱癌(MIBC)，以及低级别与高级别(HG)。高级别非肌肉浸润性膀胱癌(HG-NMIBC)是临床上重要的膀胱移行细胞癌(TCC)亚型，占有 TCC 的 10-15%。相关研究表明，在高度非肌肉浸润性膀胱癌(HG-NMIBC)中，与非复发性肿瘤相比，复发性肿瘤和进展性肿瘤中 ISL1 和 HOXA9 的平均甲基化水平明显更高(分别为 43.3%/20.3%；34.5%/17.6%)。高度非肌肉浸润性膀胱癌中 ISL1/HOXA9 同时甲基化可以有效地预测肿瘤一年内的复发和进展(阳性预测值 91.7%)，并与疾病特异性死亡率(DSM)相关^[63]。有研究表明尿标本中 HOXA9 的高甲基化水平与膀胱癌患者较低的无复发生存时间(RFS)有关，其可成为膀胱癌复发监测的潜在的诊断性生物标志物^[64]。研究显示，沉默 HOXA9 明显减弱了和厚朴酚对 T24 细胞增殖的抑制作用，并能逆转磷酸化 P65 表达水平的下降^[65]。而有研究表明在膀胱尿路上皮癌组织中 HOXA9 基因的表达高于周围正常组织，利用 shRNA 敲低 BTT739 细胞中的 HOXA9 基因以后，细胞增殖、迁移和侵袭能力显著下降，而细胞早期凋亡率却有所上升，G1、G2 期比例下降，S 期升高；此外，EMT 特征因子 E-cadherin 表达增强，Vimentin 和 Snail 的表达下降^[66]。

2.8 HOXA9 与皮肤癌

皮肤鳞状细胞癌(CSCC)是人类第二大常见癌症，占有非黑色素瘤皮肤癌(NMSCs)的近三分之一，与显著的发病率、死亡率相关^[67]。在体外和体内，HOXA9 作为肿瘤抑制因子，通过负调控 HIF-1 α 及其下游糖酵解调节因子 HK2、GLUT1 和 PDK1 的表达，抑制 CSCC 的糖酵解。HOXA9 通过与 CRIP2 相互作用抑制 HIF-1 α 介导的糖酵解，抑制皮肤鳞状细胞癌的发展^[68]。HOXA9 转录调控 NF- κ Bp65 亚基 RELA。HOXA9 在 CSCC 中缺失可显著上调 RELA 表达，从而增强 NF- κ B 通路。RELA 转录不仅可以促进抗凋亡因子 BCL-XL 的表达，还可以促进自噬基因 ATG1、ATG3 和 ATG12 的表达。研究结果表明，由 HOXA9 调控的 NF- κ B 信号通路增强，有助于抑制 CSCC 发展过程中的凋亡和自噬，这可能成为 CSCC 治疗的干预靶点^[69]。有研究表明 circFADS2 在 CSCC 组织和细胞中表达下调。过表达 circFADS2 通过抑制 miR-766-3p 和促

进 HOXA9 表达来抑制 CSCC 细胞的增殖和侵袭。环状 RNA *circFADS2* 通过调节 *miR-766-3p/HOXA9* 轴抑制皮肤鳞状细胞癌的进展^[70]。同时有研究使用 BeadChip 技术对原发性皮肤黑色素瘤和良性黑色素细胞痣进行了全基因组 DNA 甲基化分析, 分析了 14495 个基因。发现 HOXA9 在原发性皮肤黑色素瘤表现为高度甲基化^[71]。

2.9 HOXA9 与其他癌种

HOXA9 在其他癌症中也有研究, ALKBH5 介导的 *KCNQ1OT1* m6A 修饰通过上调 HOXA9 促进喉鳞状细胞癌 (LSCC) 的发生^[72]。HOXA9 可作为 HOTAIR (HOX 转录反义 RNA) 的直接调控因子^[73]。HOXA9 过表达和 HOXA9 沉默的胶质母细胞瘤模型的功能研究表明, HOXA9 促进细胞增殖和侵袭, 并抑制细胞凋亡。此外, HOXA9 在原位体内模型中促进了人永生化星形胶质细胞的恶性转化。HOXA9 还通过上调 BCL2 介导体外和体内对替莫唑胺治疗的耐药性^[74]。HOXA9 被验证为 *miR-647* 的直接靶标, 并且 HOXA9 的过表达逆转了 *miR-647* 过表达对神经胶质瘤细胞行为的抑制作用^[75]。*circMAPK4* 可以通过在神经胶质瘤细胞中海绵化 *miR-622* 来调节 HOXA9 表达, 异丙酚通过体外调节 *circMAPK4/miR-622/HOXA9* 轴来抑制神经胶质瘤的进展^[76]。鼻咽癌患者中, HOXA9 高表达与更高的临床分期和 T 分期显著相关。在多变量 COX 分析中, HOXA9 高表达是与鼻咽癌患者较差生存率相关的独立危险因素^[77]。钙化对甲状腺乳头状癌 (PTC) 的诊断很重要, Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 是一种与成骨分化相关的转录因子, 同源盒家族 A9 (HOXA9) 增强了 RUNX2 启动子活性, HOXA9 作为 RUNX2 的正调节因子, 可以增强 PTC 中的钙化、迁移和侵袭^[78], 与良性甲状腺组织相比, HOXA9 在 ATC 组织中表达增高。与亲本 ATC 细胞系相比, HOXA9 蛋白表达在 DOX 抗性 SW1736 和 CAL62 细胞中显著上调。HOXA9 的敲低导致 DOX 抗性 SW1736 和 CAL62 细胞的生长抑制和凋亡。*miR-381-3p* 表达水平在 DOX 抗性 ATC 组织和细胞系中显著降低。*miR-381-3p* 可能作为肿瘤抑制因子通过抑制 HOXA9 蛋白表达来阻止细胞增殖、迁移和侵袭, 并诱导 DOX 耐药相关 SW1736 和 CAL62 细

胞凋亡^[79]。前列腺癌组织中 miR-647 与 HOXA9 呈负相关, miR-647、HOXA9 表达水平与患者淋巴结有无转移、T 分期、Gleason 评分以及前列腺特异抗原 (PSA)水平有关; miR-647 低表达、HOXA9 高表达的患者 3 年生存率较低^[80]。与黑色素细胞 (ARPE-19)相比, 葡萄膜黑色素瘤细胞系 (MUM-2B、MEL270)中 miR-652 过表达。miR-652 通过抑制葡萄膜黑色素瘤细胞中的 HOXA9 来促进 HIF-1 α 信号传导。HOXA9 的沉默减弱了 miR-652 抑制剂对葡萄膜黑色素瘤细胞生长速率和迁移能力的影响^[81]。同源框基因 HOXA9 被确定为人骨髓瘤中 miR-365 的分子调控靶点, miR-365 的过表达会抑制 HOXA9 表达。HOXA9 的沉默也可以抑制 IM-9 骨髓瘤细胞的生长, 而 HOXA9 的过表达可以消除 miR-365 的肿瘤抑制作用^[82]。DLX6-AS1 作为 ceRNA 通过靶向 miR-641/HOXA9 信号通路抑制骨肉瘤细胞的增殖和转移^[83]。HOXA9 甲基化与晚期胆道癌 (BTC) 患者的生存呈负相关^[84]。下调 LINC01140 通过靶向 miR-139-5p/HOXA9 轴抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和 EMT^[85]。miR-139-5p 可直接抑制 HOXA9, 是 miR-139-5p 抑制口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞增殖、侵袭和迁移的潜在机制^[86]。长链非编码 RNA HOTTIP 在胰腺导管腺癌 (PDAC) 中表达最多, 并促进癌细胞进展和上皮间质转化 (EMT)。HOTTIP 介导 HOXA9 与 PCSC 中的 WDR5 结合来增强 Wnt/ β -catenin 信号通路^[87]。HOXA9 在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞和组织中上调。HOXA9 的敲低抑制了细胞增殖、迁移和侵袭, 促进了 CAL-27 和 KB 细胞的凋亡。HOXA9 还通过靶向 YAP1/ β -连环蛋白来调节 EMT。HOTTIP 或 CTCF 的沉默在 HNSCC 中发挥了类似的肿瘤抑制作用^[88]。ST8SIA6-AS1 靶向 miR-5195-3p 上调 HOXA9 表达促进垂体腺瘤的上皮间充质转化^[89]。

3、小结

HOXA9 在乳腺癌、肝癌、肺癌以及皮肤癌等癌种中表达下调, 在白血病、结直肠癌、胶质瘤中表达上调, 而在膀胱癌和卵巢癌中同时存在高低表达。表明 HOXA9 在人类机体复杂的分子互作网络中发挥着不同作用, 即可充当“癌基因”, 又在某种环境中充当“抑癌基因”, 作为参与胚胎发育和细胞分化的重

要转录因子，这是否与组织特异性相关，又或者是由 **HOXA9** 与其上下游基因的协同作用所导致的，目前还尚不清楚。因此，对 **HOXA9** 调控肿瘤发生发展的机制还需进一步研究，以便为肿瘤的诊断和治疗提供新靶点，最终为临床诊疗服务。

参考文献

- [1] Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan[J]. *Dev Biol*. 2010 Aug 1;344(1):7-15.
- [2] Fang C, Xin Y, Sun T, Monteiro A, Ye Z, Dai F, Lu C, Tong X. The Hox gene Antennapedia is essential for wing development in insects[J]. *Development*. 2022 Jan 15;149(2):dev199841.
- [3] Holland PW, Booth HA, Bruford EA. Classification and nomenclature of all human homeobox genes[J]. *BMC Biol*. 2007 Oct 26;5:47.
- [4] Popovic R, Erfurth F, Zeleznik-Le N. Transcriptional complexity of the HOXA9 locus[J]. *Blood Cells Mol Dis*. 2008 Mar-Apr;40(2):156-9.
- [5] 葛元勋, 巩丽, 张伟. HOXA9 基因与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, (02):0296-0299.
- [6] Sadeghi M, Fathi M, Gholizadeh Navashenaq J, Mohammadi H, Yousefi M, Hojjat-Farsangi M, Namdar A, Movasaghpour Akbari AA, Jadidi-Niaragh F. The prognostic and therapeutic potential of HO-1 in leukemia and MDS. *Cell Commun Signal*[J]. 2023 Mar 13;21(1):57.
- [7] Yoshino S, Yokoyama T, Sunami Y, Takahara T, Nakamura A, Yamazaki Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Nakamura T. Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9. *Blood*[J]. 2021 Jan 7;137(1):75-88.
- [8] Agrawal-Singh S, Bagri J, Giotopoulos G, Azazi DMA, Horton SJ, Lopez CK, Anand S, Bach AS, Stedham F, Antrobus R, Houghton JW, Vassiliou GS, Sasca D, Yun H, Whetton AD, Huntly BJP. HOXA9 forms a repressive complex with nuclear matrix-associated protein SAFB to maintain acute myeloid leukemia[J]. *Blood*. 2023 Apr 6;141(14):1737-1754.
- [9] Talarmin L, Clarke MA, Shorthouse D, Cabrera-Cosme L, Kent DG, Fisher J, Hall BA. HOXA9 has the hallmarks of a biological switch with implications in blood cancers[J]. *Nat Commun*. 2022 Oct 3;13(1):5829.
- [10] Miyamoto R, Kanai A, Okuda H, Komata Y, Takahashi S, Matsui H, Inaba T, Yokoyama A. HOXA9 promotes MYC-mediated leukemogenesis by maintaining gene expression for multiple anti-apoptotic pathways[J]. *Elife*. 2021 Jul 26;10:e64148.
- [11] Zhong X, Prinz A, Steger J, Garcia-Cuellar MP, Radsak M, Bentaher A, Slany RK. HoxA9 transforms murine myeloid cells by a feedback loop driving expression of key oncogenes and cell cycle control genes[J]. *Blood Adv*. 2018 Nov 27;2(22):3137-3148.
- [12] Peng L, Guo H, Ma P, Sun Y, Dennison L, Aplan PD, Hess JL, Friedman AD. HoxA9 binds and represses the Cebpa +8 kb enhancer[J]. *PLoS One*. 2019 May 23;14(5):e0217604.
- [13] Symeonidou V, Ottersbach K. HOXA9/IRX1 expression pattern defines two

- subgroups of infant MLL-AF4-driven acute lymphoblastic leukemia[J]. *Exp Hematol*. 2021 Jan;93:38-43.e5.df
- [14]贾秀红,朱立平,李建厂.靶向 HOXA9 基因 shRNA 慢病毒载体对 U937 细胞增殖与凋亡影响观察[J].*中国肿瘤防治杂志*,2014 ,(3):187-192.
- [15]Zhao J, Xiu Y, Fu L, Dong Q, Borchering N, Wang Y, Li Q, De Silva NS, Klein U, Boyce BF, Zhao C. TIFAB accelerates MLL-AF9-Induced acute myeloid leukemia through upregulation of HOXA9. *iScience*[J]. 2021 Nov 12;24(12):103425.
- [16]Cao W, Chen HD, Yu YW, Li N, Chen WQ. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*. 2021 Mar 17;134(7):783-791.
- [17]Gordon C Jayson, Elise C Kohn, Henry C Kitchener, Jonathan A Ledermann. Ovarian cancer[J]. *Seminars*. 2014.Octomber 11:384(9951):1376-1388
- [18]Rusan M, Andersen RF, Jakobsen A, Steffensen KD. Circulating HOXA9-methylated tumour DNA: A novel biomarker of response to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition in BRCA-mutated epithelial ovarian cancer[J]. *Eur J Cancer*. 2020 Jan;125:121-129.
- [19]Faaborg L, Jakobsen A, Waldstrøm M, Petersen CB, Andersen RF, Steffensen KD. HOXA9-methylated DNA as a diagnostic biomarker of ovarian malignancy[J]. *Biomark Med*. 2021 Oct;15(15):1309-1317.
- [20]Singh A, Gupta S, Badarukhiya JA, Sachan M. Detection of aberrant methylation of HOXA9 and HIC1 through multiplex MethyLight assay in serum DNA for the early detection of epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*. 2020 Sep 15;147(6):1740-1752.
- [21]Hilton HN, Clarke CL, Graham JD. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development[J]. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 May 5;466:2-14.
- [22]杨霄彦,郝春光,张志坚.激素通过 HOXA9 对人卵巢癌细胞增殖和迁移的机制研究[J].*昆明医科大学学报*,2022,(10):35-42.
- [23]张盛,李少儒. 卵巢浆液性肿瘤组织中的 HOXA9 蛋白的表达及其对卵巢癌预后的影响[J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*,2018, (07):988-993.
- [24]Ko SY, Barengo N, Ladanyi A, Lee JS, Marini F, Lengyel E, Naora H. HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts[J]. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3603-17.
- [25]Ko SY, Naora H. HOXA9 promotes homotypic and heterotypic cell interactions that facilitate ovarian cancer dissemination via its induction of P-cadherin[J]. *Mol Cancer*. 2014 Jul 14;13:170.
- [26]Ko SY, Ladanyi A, Lengyel E, Naora H. Expression of the homeobox gene HOXA9 in ovarian cancer induces peritoneal macrophages to acquire an M2 tumor-promoting phenotype[J]. *Am J Pathol*. 2014 Jan;184(1):271-81.
- [27]Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities[J]. *Mol Cancer*. 2020 Nov 24;19(1):165.
- [28]Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbeganon MK, Clemmer VB,

- Benezra M, Licht JD, Boudreau NJ, Tsai KK, Welm AL, Feldman MD, Weber BL, Weaver VM. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype[J]. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1535-50.
- [29] Xu Q, Zhang Q, Dong M, Yu Y. MicroRNA-638 inhibits the progression of breast cancer through targeting HOXA9 and suppressing Wnt/ β -cadherin pathway[J]. *World J Surg Oncol*. 2021 Aug 20;19(1):247.
- [30] Park SM, Choi EY, Bae M, Choi JK, Kim YJ. A long-range interactive DNA methylation marker panel for the promoters of HOXA9 and HOXA10 predicts survival in breast cancer patients[J]. *Clin Epigenetics*. 2017 Jul 24;9:73.
- [31] Sun M, Song CX, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Gomes S, Chen P, Chen J, Chada KK, He C, Rosner MR. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 11;110(24):9920-5.
- [32] Zhao Y, Zheng R, Chen J, Ning D. CircRNA CDR1as/miR-641/HOXA9 pathway regulated stemness contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer Cell Int*. 2020 Jul 6;20:289.
- [33] Wang SM, Pang J, Zhang KJ, Zhou ZY, Chen FY. lncRNA MIR503HG inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in TNBC cells via the miR-224-5p/HOXA9 axis[J]. *Mol Ther Oncolytics*. 2021 Mar 17;21:62-73.
- [34] Josep M. Llovet, Jessica Zucman-Rossi, Eli Pikarsky, Bruno Sangro, Myron Schwartz, Morris Sherman & Gregory Gores. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16018 (2016).
- [35] Chan LK, Tsui YM, Ho DW, Ng IO. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer[J]. *Semin Cancer Biol*. 2022 Jul;82:134-149.
- [36] Kuo CC, Lin CY, Shih YL, Hsieh CB, Lin PY, Guan SB, Hsieh MS, Lai HC, Chen CJ, Lin YW. Frequent methylation of HOXA9 gene in tumor tissues and plasma samples from human hepatocellular carcinomas[J]. *Clin Chem Lab Med*. 2014 Aug;52(8):1235-45.
- [37] Shin SH, Kim BH, Jang JJ, Suh KS, Kang GH. Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array[J]. *J Korean Med Sci*. 2010 Aug;25(8):1152-9.
- [38] Hass HG, Vogel U, Scheurlen M, Jobst J. Use of Gene Expression Analysis for Discrimination of Primary and Secondary Adenocarcinoma of the Liver[J]. *Oncology*. 2018;95(4):211-219.
- [39] 葛元勋, 巩丽, 朱少君, 韩秀娟, 姚丽, 张佳瑞, 兰淼, 彭诗元, 李艳红, 张伟. HOXA9 基因抑制肝癌细胞 HepG2 迁移与侵袭能力的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, (01):0029-0033.
- [40] Pączek S, Łukaszewicz-Zajac M, Mroczko B. Granzymes-Their Role in Colorectal Cancer[J]. *Int J Mol Sci*. 2022 May 9;23(9):5277.
- [41] Janmaat VT, Liu H, da Silva RA, Wisse PHA, Spaander MCW, Ten Hagen TLM, Smits R, Bruno MJ, Fuhler GM, Peppelenbosch MP. HOXA9 mediates and marks premalignant compartment size expansion in colonic adenomas. *Carcinogenesis*[J].

- 2019 Dec 31;40(12):1514-1524.
- [42]Watanabe Y, Saito M, Saito K, Matsumoto Y, Kanke Y, Onozawa H, Hayase S, Sakamoto W, Ishigame T, Momma T, Ohki S, Takenoshita S. Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*. 2018 Mar;15(3):2756-2762.
- [43]Lai M, Liu G, Li R, Bai H, Zhao J, Xiao P, Mei J. Hsa_circ_0079662 induces the resistance mechanism of the chemotherapy drug oxaliplatin through the TNF- α pathway in human colon cancer[J]. *J Cell Mol Med*. 2020 May;24(9):5021-5027.
- [44]Cui W, Bai X, Bai Z, Chen F, Xu J, Bai W, Xi Y. Exploring the expression and clinical significance of the miR-140-3p-HOXA9 axis in colorectal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024 Jan 29;150(2):47.
- [45]赖明芬,梅家转.HOXA9 在结肠癌肝转移含奥沙利铂方案化疗前后的表达及临床意义[硕士学位论文].广东:南方医科大学第二临床医学院,2020:1-76.
- [46]Huang Y, Bai Q, Wang Z, Yu H, Li Y, Lu H, Kang H, Shi X, Feng K. circ_0052184 Promotes Colorectal Cancer Progression via Targeting miR-604/HOXA9 Axis[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2022 Aug 27;2022:8583382.
- [47]Osmond B, Facey COB, Zhang C, Boman BM. HOXA9 Overexpression Contributes to Stem Cell Overpopulation That Drives Development and Growth of Colorectal Cancer[J]. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 18;23(12):6799.
- [48]Wang X, Bu J, Liu X, Wang W, Mai W, Lv B, Zou J, Mo X, Li X, Wang J, Niu B, Fan Y, Hou B. miR-133b suppresses metastasis by targeting HOXA9 in human colorectal cancer[J]. *Oncotarget*. 2017 Jul 12;8(38):63935-63948
- [49]Liu J, Qian J, Mo Q, Tang L, Xu Q. Long non-coding RNA PCED1B-AS1 promotes the proliferation of colorectal adenocarcinoma through regulating the miR-633/HOXA9 axis[J]. *Bioengineered*. 2022 Mar;13(3):5407-5420.
- [50]Lu L, Liu LP, Zhao QQ, Gui R, Zhao QY. Identification of a Ferroptosis-Related LncRNA Signature as a Novel Prognosis Model for Lung Adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*. 2021 Jun 23;11:675545.
- [51]Shen N, Du J, Zhou H, Chen N, Pan Y, Hoheisel JD, Jiang Z, Xiao L, Tao Y, Mo X. A Diagnostic Panel of DNA Methylation Biomarkers for Lung Adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*. 2019 Dec 3;9:1281.
- [52]穆淑坤,马树东. miR-365 在肺癌中通过介导 HOXA9 影响肿瘤细胞糖酵解关键酶表达[硕士学位论文].广东:南方医科大学第一临床医学院,2019:1-57.
- [53]张秀玲,何融泉,何钊钺,党裔武,陈罡.HOXA9 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].*诊断病理学杂志*,2015, (09):522-525.
- [54]Wen SWC, Andersen RF, Petersen LMS, Hager H, Hilberg O, Jakobsen A, Hansen TF. Comparison of Mutated KRAS and Methylated HOXA9 Tumor-Specific DNA in Advanced Lung Adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 11;12(12):3728.
- [55]Abou-Zeid A, Hashad D, Baess A, Mosaad M, Tayae E. HOXA9 gene promotor methylation and copy number variation of SOX2 and HV2 genes in cell free DNA: A potential diagnostic panel for non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*. 2023

- Apr 10;23(1):329.
- [56]Wen SWC, Andersen RF, Rasmussen K, Thomsen CB, Hansen TF, Nederby L, Hager H, Jakobsen A, Hilberg O. Validating Methylated HOXA9 in Bronchial Lavage as a Diagnostic Tool in Patients Suspected of Lung Cancer[J]. *Cancers* (Basel). 2021 Aug 22;13(16):4223.
- [57]Wen SWC, Nederby L, Andersen RF, Hansen TS, Nyhus CH, Hilberg O, Jakobsen A, Hansen TF. NK cell activity and methylated HOXA9 ctDNA as prognostic biomarkers in patients with non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors[J]. *Br J Cancer*. 2023 Jul;129(1):135-142.
- [58]Gao L, Yan SB, Yang J, Kong JL, Shi K, Ma FC, Huang LZ, Luo J, Yin SY, He RQ, Hu XH, Chen G. MiR-182-5p and its target HOXA9 in non-small cell lung cancer: a clinical and in-silico exploration with the combination of RT-qPCR, miRNA-seq and miRNA-chip[J]. *BMC Med Genomics*. 2020 Jan 6;13(1):3.
- [59]Li ZL, Li D, Yin GQ. MiR-19b-3p promotes tumor progression of non-small cell lung cancer via downregulating HOXA9 and predicts poor prognosis in patients[J]. *Histol Histopathol*. 2022 Aug;37(8):779-789.
- [60]Xia Z, Yang C, Yang X, Wu S, Feng Z, Qu L, Chen X, Liu L, Ma Y. miR-652 Promotes Proliferation and Migration of Uveal Melanoma Cells by Targeting HOXA9[J]. *Med Sci Monit*. 2019 Nov 19;25:8722-8732.
- [61]Yu SL, Lee DC, Sohn HA, Lee SY, Jeon HS, Lee JH, Park CG, Lee HY, Yeom YI, Son JW, Yoon YS, Kang J. Homeobox A9 directly targeted by miR-196b regulates aggressiveness through nuclear Factor-kappa B activity in non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Carcinog*. 2016 Dec;55(12):1915-1926.
- [62]Ward Grados DF, Ahmadi H, Griffith TS, Warlick CA. Immunotherapy for Bladder Cancer: Latest Advances and Ongoing Clinical Trials[J]. *Immunol Invest*. 2022 Nov;51(8):2226-2251.
- [63]Kitchen MO, Bryan RT, Haworth KE, Emes RD, Luscombe C, Gommersall L, Cheng KK, Zeegers MP, James ND, Devall AJ, Fryer AA, Farrell WE. Methylation of HOXA9 and ISL1 Predicts Patient Outcome in High-Grade Non-Invasive Bladder Cancer[J]. *PLoS One*. 2015 Sep 2;10(9):e0137003.
- [64]Reinert T, Borre M, Christiansen A, Hermann GG, Ørntoft TF, Dyrskjøl L. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation[J]. *PLoS One*. 2012;7(10):e46297.
- [65]田官强,梁培禾.和厚朴酚通过 HOXA9 抑制膀胱肿瘤细胞增殖的实验研究[硕士学位论文], 重庆:重庆医科大学附属第二医院,2019:1-47.
- [66]冉崇君,张鹏,陈毅,郭江,种袁佳,张克勤,梁培禾.干扰 HOXA9 基因表达对 BTT739 细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J].*免疫学杂志*,2023 (5):388-394.
- [67]Chang MS, Azin M, Demehri S. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: The Frontier of Cancer Immunoprevention[J]. *Annu Rev Pathol*. 2022 Jan 24;17:101-119.
- [68]Zhou L, Wang Y, Zhou M, Zhang Y, Wang P, Li X, Yang J, Wang H, Ding Z.

- HOXA9 inhibits HIF-1 α -mediated glycolysis through interacting with CRIP2 to repress cutaneous squamous cell carcinoma development[J]. *Nat Commun*. 2018 Apr 16;9(1):1480.
- [69] Han S, Li X, Liang X, Zhou L. HOXA9 Transcriptionally Promotes Apoptosis and Represses Autophagy by Targeting NF- κ B in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma[J]. *Cells*. 2019 Oct 31;8(11):1360.
- [70] Zhang Z, Sun H, Hou J, Li L, Wu L. Circular RNA circFADS2 inhibits the progression of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating miR-766-3p/HOXA9 axis[J]. *Histol Histopathol*. 2022 Apr;37(4):335-348.
- [71] Gao L, Smit MA, van den Oord JJ, Goeman JJ, Verdegaal EM, van der Burg SH, Stas M, Beck S, Gruis NA, Tensen CP, Willemze R, Peeper DS, van Doorn R. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 Jul;26(4):542-54.
- [72] Li Y, Yan B, Wang X, Li Q, Kan X, Wang J, Sun Y, Wang P, Tian L, Liu M. ALKBH5-mediated m6A modification of lncRNA KCNQ1OT1 triggers the development of LSCC via upregulation of HOXA9[J]. *J Cell Mol Med*. 2022 Jan;26(2):385-398.
- [73] Xavier-Magalhães A, Gonçalves CS, Fogli A, Lourenço T, Pojo M, Pereira B, Rocha M, Lopes MC, Crespo I, Rebelo O, Tão H, Lima J, Moreira R, Pinto AA, Jones C, Reis RM, Costello JF, Arnaud P, Sousa N, Costa BM. The long non-coding RNA HOTAIR is transcriptionally activated by HOXA9 and is an independent prognostic marker in patients with malignant glioma[J]. *Oncotarget*. 2018 Feb 28;9(21):15740-15756.
- [74] Pojo M, Gonçalves CS, Xavier-Magalhães A, Oliveira AI, Gonçalves T, Correia S, Rodrigues AJ, Costa S, Pinto L, Pinto AA, Lopes JM, Reis RM, Rocha M, Sousa N, Costa BM. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide[J]. *Oncotarget*. 2015 Apr 10;6(10):7657-74.
- [75] Qin K, Tian G, Chen G, Zhou D, Tang K. miR-647 inhibits glioma cell proliferation, colony formation and invasion by regulating HOXA9[J]. *J Gene Med*. 2020 Mar;22(3):e3153.
- [76] Xiao G, Yu L, Tan W, Yang H, Li W, Xia R, Li Y. Propofol inhibits glioma progression by regulating circMAPK4/miR-622/HOXA9 axis[J]. *Metab Brain Dis*. 2023 Jan;38(1):233-244.
- [77] Liu T, Ji C, Sun Y, Bai W. HOXA9 Expression is Associated with Advanced Tumour Stage and Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*. 2021 May 21;13:4147-4154.
- [78] Jin Y, Kim HK, Lee J, Soh EY, Kim JH, Song I, Chung YS, Choi YJ. Transcription Factor HOXA9 is Linked to the Calcification and Invasion of Papillary Thyroid Carcinoma[J]. *Sci Rep*. 2019 May 1;9(1):6773.
- [79] Zhang Y, Li K, Wang W, Han J. miR-381-3p attenuates doxorubicin resistance in

- human anaplastic thyroid carcinoma via targeting homeobox A9[J]. *Int J Exp Pathol*. 2021 Aug;102(4-5):209-217.
- [80] 易秋阳,梁陈,姚超.前列腺癌患者癌组织中 miR-647 和 HOXA9 表达水平及其与预后的关系分析[J].*中国男科学杂志*,2023, (1):41-47
- [81] Xia Z, Yang C, Yang X, Wu S, Feng Z, Qu L, Chen X, Liu L, Ma Y. miR-652 Promotes Proliferation and Migration of Uveal Melanoma Cells by Targeting HOXA9[J]. *Med Sci Monit*. 2019 Nov 19;25:8722-8732.
- [82] Gao Y, Miao Y, Zhang W, Ru X, Hou L. MicroRNA-365 induces apoptosis and inhibits invasion of human myeloma cells by targeting homeobox A9 (HOXA9) [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021 Jul;85:103627.
- [83] Zhang N, Meng X, Mei L, Zhao C, Chen W. LncRNA DLX6-AS1 promotes tumor proliferation and metastasis in osteosarcoma through modulating miR-641/HOXA9 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*. 2019 Jul;120(7):11478-11489.
- [84] Andersen LB, Mahler MSK, Andersen RF, Jensen LH, Raunkilde L. The Clinical Impact of Methylated Homeobox A9 ctDNA in Patients with Non-Resectable Biliary Tract Cancer Treated with Erlotinib and Bevacizumab[J]. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 22;14(19):4598.
- [85] Zhang S, Chen R. LINC01140 regulates osteosarcoma proliferation and invasion by targeting the miR-139-5p/HOXA9 axis[J]. *Biochem Biophys Rep*. 2022 Jun 28;31:101301.
- [86] Wang K, Jin J, Ma T, Zhai H. MiR-139-5p inhibits the tumorigenesis and progression of oral squamous carcinoma cells by targeting HOXA9[J]. *J Cell Mol Med*. 2017 Dec;21(12):3730-3740.
- [87] Fu Z, Chen C, Zhou Q, Wang Y, Zhao Y, Zhao X, Li W, Zheng S, Ye H, Wang L, He Z, Lin Q, Li Z, Chen R. LncRNA HOTTIP modulates cancer stem cell properties in human pancreatic cancer by regulating HOXA9[J]. *Cancer Lett*. 2017 Dec 1;410:68-81.
- [88] Sun Q, Zhang SY, Zhao JF, Han XG, Wang HB, Sun ML. HIF-1 α or HOTTIP/CTCF Promotes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression and Drug Resistance by Targeting HOXA9[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020 Jun 5;20:164-175.
- [89] Li Z, Zhang C, Zong X, Wang Z, Ren R, Wang L, Sun P, Zhu C, Guo M, Guo G, Hu G, Wu Y. ST8SIA6-AS1 Promotes the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Angiogenesis of Pituitary Adenoma[J]. *J Oncol*. 2022 Jun 22;2022:7960261.