

# THAP8 基因可被 HIF-1 $\alpha$ 上调并促进肺癌细胞活力、克隆形成和侵袭

刘顺莲<sup>1,2</sup>, 宁贻崇<sup>1,3</sup>, 刘凯丽<sup>1</sup>, 陈思文<sup>1</sup>, 周琳<sup>1</sup>, 李美玲<sup>1</sup>, 张晴<sup>1</sup>, 周建林<sup>1\*</sup>

(1. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081; 2. 湖南师范大学附属中学 博才实验中学, 中国湖南 长沙 410205; 3. 崇左市人民医院 检验科, 中国广西 崇左 532200)

**摘要:** 死亡相关蛋白(Thanatos-associated proteins, THAP)家族的许多成员已被证实与细胞增殖、凋亡和癌症密切相关, 而 THAP8 的功能尚不清楚。为了探究 THAP8 在癌症中的表达, 对 TCGA 和 Oncomine 数据库进行了分析, 发现 THAP8 mRNA 在肺癌组织的表达显著高于癌旁正常组织; 接着采用荧光定量 PCR 技术分析了 22 对肺癌和癌旁正常组织中 THAP8 的表达差异, 结果与数据库分析一致。为了探讨 THAP8 在肺癌组织中高表达的原因, 用 JASPAR 软件预测 THAP8 启动子上的转录因子结合位点, 发现 THAP8 基因启动子区含有 4 个缺氧诱导元件。荧光素酶活性分析实验证明, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 可以结合到 THAP8 启动子上的缺氧诱导元件并促进 THAP8 基因的转录。在 CoCl<sub>2</sub> 诱导的缺氧模型中, 随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加, HIF-1 $\alpha$  和 THAP8 蛋白的表达水平升高。此外, 在 Beas-2B 细胞中, 过表达 HIF-1 $\alpha$  可以促进 THAP8 的表达。为了进一步研究 THAP8 在肺癌细胞中的功能, 用慢病毒介导的 shRNA 敲低 THAP8 基因, 分析 THAP8 基因沉默对肺癌细胞生物学行为的影响。结果表明: 在 H460 和 H1437 肺癌细胞中, 敲低 THAP8 基因可显著降低细胞的活力、克隆形成和侵袭能力。这些结果说明: THAP8 可以受缺氧诱导, 并促进肺癌细胞的活力、克隆形成和侵袭, 是一个新的癌基因。

**关键词:** 死亡相关蛋白 8 (THAP8); 缺氧诱导因子(HIF); 肺癌; 侵袭; 细胞克隆形成

中图分类号: Q291, R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2021)03-0217-08

## THAP8 is Upregulated by HIF-1 $\alpha$ and Promotes Viability, Colony Formation and Invasion of Lung Cancer Cells

LIU Shun-lian<sup>1,2</sup>, NING Yi-chong<sup>1,3</sup>, LIU Kai-li<sup>1</sup>, CHEN Si-wen<sup>1</sup>, ZHOU Lin<sup>1</sup>,  
LI Mei-ling<sup>1</sup>, ZHANG Qing<sup>1</sup>, ZHOU Jian-lin<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. Bocai Experimental Middle School, the High School Attached to Hunan Normal University, Changsha 410205, Hunan, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Chongzuo, Chongzuo 532200, Guangxi, China)

**Abstract:** Many members of the Thanatos-associated proteins (THAP) family have been proved to be closely related to cell proliferation, apoptosis and cancer, but the function of THAP8 is still unclear. In order to investigate the expression of THAP8 in cancer, the TCGA and Oncomine databases were analyzed and it was found that the expression of THAP8 mRNA in lung cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues adjacent to lung cancer. Real-time quantitative PCR was then performed to analyze differential expressions of THAP8 in 22 pairs of lung cancer and adjacent non-cancerous tissues, and the result was consistent with that of database analysis. To explore the reason for THAP8 overexpression in cancer tissues,

收稿日期: 2021-04-30; 修回日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82070155, 81272318)

作者简介: 刘顺莲(1994—), 女, 湖南邵东人, 硕士; \*通信作者: 周建林(1964—), 男, 湖南东安人, 博士, 二级教授, 主要从事肿瘤分子生物学研究, E-mail: jlzhou@hunnu.edu.cn。

JASPAR software was used to predict the transcription factor binding sites within the *THAP8* promoter, and four hypoxia response elements (HREs) were identified. The luciferase reporter assay demonstrated that the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) can bind to the HREs and promote the transcription of the *THAP8* gene. In the CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia model, with increasing CoCl<sub>2</sub> concentration, expression levels of HIF-1 $\alpha$  and THAP8 proteins increased. Overexpression of HIF-1 $\alpha$  in Beas-2B cells promoted THAP8 expression. In order to study the role of THAP8 in lung cancer cells, lentivirus-mediated shRNA was used to inhibit the expression *THAP8* gene, and the effects of *THAP8* knockdown on the biological behavior of lung cancer cells were analyzed. The results showed that knockdown of *THAP8* gene in both H460 and H1437 cells significantly decreased cell viability, colony formation and invasion. These results indicate that *THAP8* can be induced by hypoxia, promoting the viability, colony formation and invasion of lung cancer cells, and proves a novel oncogene.

**Key words:** Thanatos-associated protein 8 (THAP8); hypoxia-inducible factor (HIF); lung cancer; invasion; cell colony formation

(*Life Science Research*, 2021, 25(3): 217~224)

肺癌是一种常见的恶性肿瘤。按组织学类型,肺癌可以分为非小细胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung carcinoma, SCLC),其中 NSCLC 占 85%,而 NSCLC 又可以分为肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAC)和肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)<sup>[1]</sup>。肺癌是世界上发病率和死亡率最高的一种恶性肿瘤<sup>[2-3]</sup>。据统计,我国 2015 年新发恶性肿瘤 392.9 万例,癌症死亡病例 233.8 万例,其中肺癌的新发病例和死亡病例最高,分别占总的新发恶性肿瘤病例和癌症死亡病例的 20.03% (78.7 万)和 26.99% (63.1 万)<sup>[3]</sup>。近年来,随着分子生物学的发展,靶向药物的研发取得了较大进展,靶向药物治疗显著提高了肺癌患者的生存期和生活质量<sup>[4]</sup>。但是,现有靶向药物仍然存在耐药性和靶点少等问题,因此亟需进一步研究肺癌的发病机制,发掘新的靶点。

死亡相关蛋白(Thanatos-associated proteins, THAP)家族因多肽链的氨基末端都有 1 个在进化上高度保守的 THAP 锌指结构域而得名,该结构域具有 DNA 结合活性<sup>[5]</sup>。另外,THAP 结构域的下游还存在 1 个 coiled coil 结构域,可以介导同源或异源二聚体的形成<sup>[6]</sup>。目前,已发现 12 个 THAP 家族成员(THAP0~11)<sup>[6]</sup>,其中大部分成员与细胞周期、凋亡和癌症相关。例如:THAP5 在黑色素瘤细胞中起促凋亡的作用<sup>[7]</sup>;THAP7 在肺癌组织中高表达,并促进肺癌细胞的增殖<sup>[8]</sup>。THAP8 的功能尚不清楚,目前仅有 1 篇关于 THAP8 的报道,该研究发现 THAP8 在卵巢癌组织中高表达<sup>[9]</sup>。本文旨在探讨 *THAP8* 基因在肺癌组织中的表达、转录调控

和作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

RNA 提取试剂盒购自上海美吉生物医药科技有限公司,反转录试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司,荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司,铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室购自美国 Corning 公司,THAP8 抗体购自美国 Abgent 公司,缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )抗体、ACTB 抗体和二抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,胎牛血清购买自德国 Serana 公司,RPMI1640 和 DMEM 培养基购买自美国 Gibco 公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,其他常规生化试剂购自上海生工生物工程股份有限公司。

### 1.2 临床样本

肺癌组织和癌旁组织的新鲜样本来自中南大学湘雅二医院,样本的临床病理资料参见文献[10]。

### 1.3 细胞系和细胞培养

正常肺细胞系 Beas-2B、6 种人肺癌细胞系(95-D、A549、H446、H358、H460 和 H1437)及正常的人类肾上皮细胞 HEK293 均通过上海钰博生物科技有限公司购自美国 ATCC 公司。细胞培养按 ATCC 公司提供的说明书进行。

### 1.4 质粒

荧光素酶(luc)报告基因载体 pTAL-luc 和  $\beta$ -半乳糖苷酶(lacZ)报告基因载体 pCMV-lacZ 均购

自美国 Clontech 公司。HIF-1 $\alpha$  的表达质粒 HA-HIF1A 为 Kondo 等<sup>[11]</sup>构建(Addgene Plasmid No. 18949)。野生型和突变型(野生型中的 4 个 ACGTG 序列均突变为 AAAAG)启动子序列(192 bp)由上海生工生物工程股份有限公司合成并克隆到 pTAL-luc 中, 构建的质粒分别命名为 THAP8-HRE-luc 和 THAP8-mHRE-luc。

### 1.5 质粒转染和荧光素酶活性分析

HEK293 细胞培养在 24 孔板中, 每个孔分别转染等量的 pCMV-lacZ (0.2  $\mu$ g)、THAP8-HRE-luc/THAP8-mHRE-luc (0.2  $\mu$ g)以及梯度增加的 HA-HIF1A (0  $\mu$ g、0.1  $\mu$ g、0.2  $\mu$ g 和 0.4  $\mu$ g)。每个孔转染的质粒总量为 0.8  $\mu$ g, 不足部分用空载体 pcDNA3.1 质粒补充。重复 3 次。转染 24 h 后收获并裂解细胞, 按文献[12]的方法测定半乳糖苷酶活性和荧光素酶活性, 并计算荧光素酶活性/半乳糖苷酶活性的比值。

### 1.6 细胞功能分析

按照文献[13]的方法进行 MTT 分析、细胞克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 小室侵袭实验, 所有实验均重复 3 次。

### 1.7 RNA 提取、反转录和荧光定量 PCR

RNA 提取和反转录按说明书进行操作。以得到的 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green 试剂盒配制反应体系, 在 ABI 7900 thermocycler (美国 ThermoFisher 公司)上进行 PCR 反应。以 18S 基因作为内参基因, 其引物序列: 5'-CGGCGACGACCC-ATTCGAAC-3'和 5'-GAATCGAACCTGATTCC-CCGTC-3', *THAP8* 基因的引物序列: 5'-CCCT-GCGCCAACTCCTGAGC-3'和 5'-TGTGGCAGGT-GCAGGGTCCT-3'。每组设 4 个平行反应。PCR 程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 40 个循环, 每个循环包括 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s。

### 1.8 蛋白质免疫印迹(Western-blot)

细胞裂解、电泳和 Western-blot 按照文献[13]的方法进行。

### 1.9 慢病毒感染和稳定细胞筛选

THAP8 shRNA (short hairpin RNA)慢病毒和阴性对照慢病毒(negative control, NC)购自广州复能基因有限公司, 其干扰靶点序列见表 1。HIF-1 $\alpha$  过表达慢病毒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。慢病毒感染和稳定细胞株构建按照文献[13]的方法进行。

表 1 THAP8 shRNA 慢病毒和阴性对照慢病毒的干扰靶点序列

Table 1 The target sequence of each THAP8 shRNA lentivirus and negative control lentivirus

Name	Gene	Location	Target sequence
sh31	<i>THAP8</i>	1 649~1 669	gggtgttgggagaatcatac
sh32	<i>THAP8</i>	1 706~1 726	ggtaactgagttcatgatacca
sh33	<i>THAP8</i>	1 764~1 784	gctcattctacttgagtagac
sh34	<i>THAP8</i>	610~630	gccctgtgagcttctacaagt
NC	/	/	gcttcgcgccgtagtctta

### 1.10 统计学分析

利用 Microsoft Excel 2010 和 GraphPad Prism 7 进行数据统计并绘图。用 Student's *t*-检验分析两组间的差异, 用 *P* 值表示显著性水平, “\*”表示  $P \leq 0.05$ , “\*\*”表示  $P \leq 0.01$ 。每组数据都根据 3 个或以上的独立实验获得平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ ), 当  $P < 0.05$  时, 结果才被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 THAP8 在肺癌组织中的表达高于正常肺组织

首先, 我们通过 UALCAN 软件<sup>[14]</sup>(<http://ualcan.path.uab.edu>)分析了 TCGA 数据库中的 RNA-seq 数据, 发现 THAP8 在肺腺癌和肺鳞癌组织中的表达显著高于正常肺组织(图 1A)。然后, 我们进一步分析了 Oncomine 肿瘤芯片数据库<sup>[15]</sup>中的数据, 其结果(图 1B)与 TCGA 数据库的分析结果一致。为了验证数据库分析的结果, 用荧光定量 PCR 技术分析了 22 对人肺癌(其中, 腺癌和鳞癌各 11 对)及癌旁组织样本, 结果表明: 肺癌组织中 THAP8 的 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织(图 1C)。Western-blot 结果表明: THAP8 蛋白在肺癌细胞系中的表达水平明显高于正常肺细胞系 Beas-2B; 在 6 种肺癌细胞系中, H460 和 H1437 的 THAP8 蛋白表达水平最高, 而 A549 细胞系的 THAP8 蛋白表达水平最低(图 1D~G)。

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 调控 THAP8 基因的表达

#### 2.2.1 THAP8 基因启动子上存在 HIF-1 $\alpha$ 的结合位点

JASPAR 软件(<http://jaspar.genereg.net>)分析显示, *THAP8* 基因启动子区含有 4 个缺氧诱导元件(hypoxia response element, HRE; ACGTG) (图 2A), 因此我们推测转录因子 HIF-1 能调控 *THAP8* 基因转录。HIF-1 由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两个亚基组成, 其中 HIF-1 $\alpha$  受缺氧诱导。我们将上述序列及其突变序列(4 个 ACGTG 位点均突变为 AAAAG)

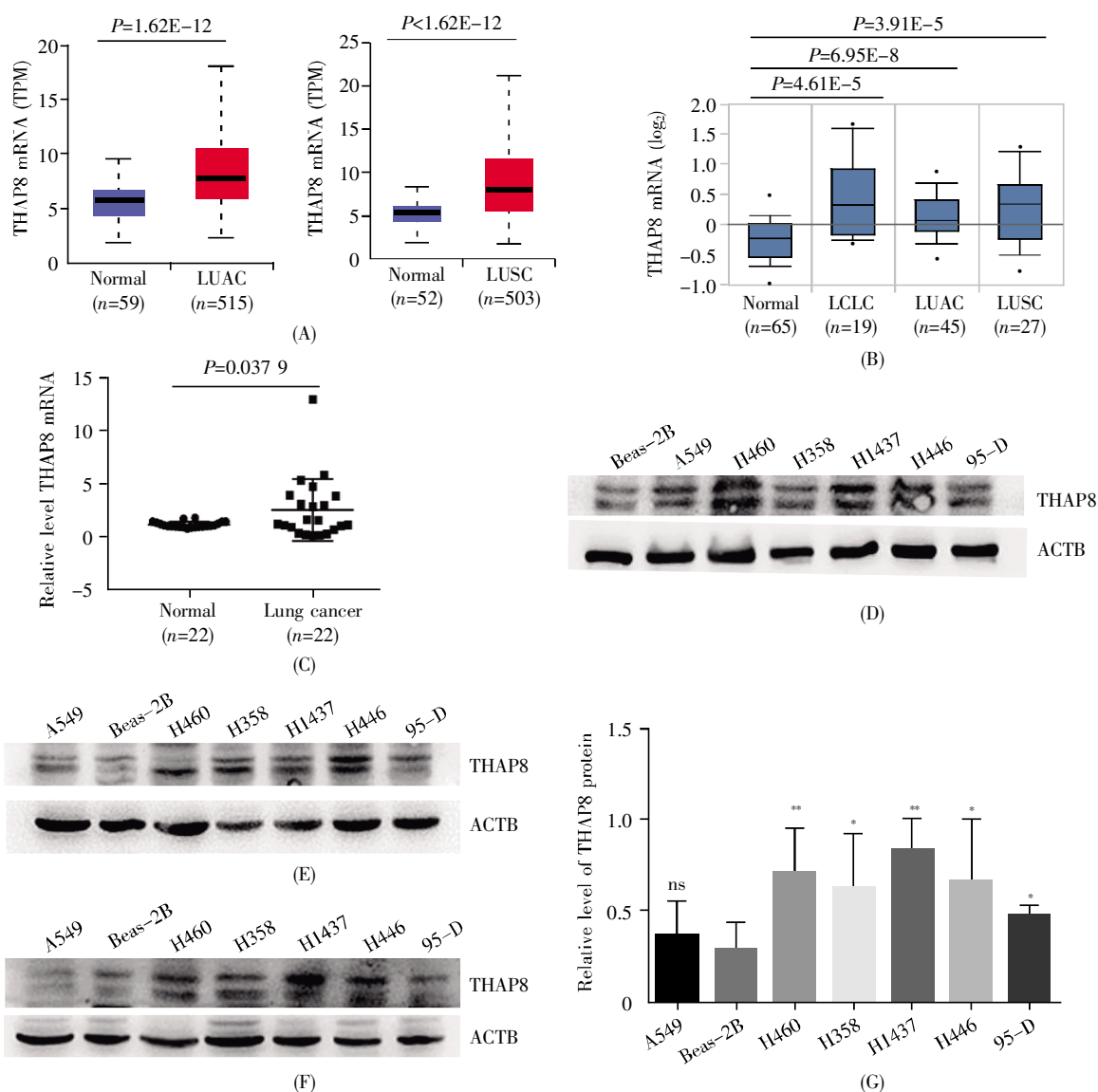


图1 THAP8在肺癌组织中显著高表达

(A~C) 在TCGA数据库(A)、OncoPrint数据库(B)和临床样本(C)中分析THAP8 mRNA水平; (D~F) 3次重复的免疫印迹实验; (G) 3次免疫印迹实验的THAP8条带灰度分析, 与Beas-2B相比, ns表示没有显著性差异, \*表示 $P \leq 0.05$ , \*\*表示 $P \leq 0.01$ 。

### Fig.1 THAP8 is overexpressed in the lung cancer tissues

(A~C) Analysis of THAP8 mRNA levels in TCGA database (A), OncoPrint database (B) and lung cancer and non-cancerous tissues (C); (D~F) Three repeats of Western-blot experiments; (G) The relative band intensity (mean  $\pm$  standard deviation) of THAP8 protein normalized against that of ACTB. ns: Non-significance, \*:  $P \leq 0.05$ , and \*\*:  $P \leq 0.01$  vs. Beas-2B.

分别克隆到荧光素酶报告载体 pTAL-luc, 成功构建 THAP8-HRE-luc 和 THAP8-mHRE-luc 的报告质粒。随后, 将 THAP8-HRE-luc 或 THAP8-mHRE-luc 分别与 HIF-1 $\alpha$  表达质粒 HA-HIF1A 共转染到 HEK293 细胞中, 24 h 后测定荧光素酶活性, 结果表明: 随着 HA-HIF1A 质粒量的增加, THAP8-HRE-luc 荧光素酶活性明显增强, 而 HA-HIF1A 的表达对于突变的 THAP8 基因启动子活性则没有显著的增强作用(图 2B), 这说明: HIF-1 $\alpha$  可通过结合到 THAP8 基因启动子上的 HRE 位点, 促

进 THAP8 基因的转录。

### 2.2.2 HIF-1 $\alpha$ 促进 THAP8 基因的表达

CoCl<sub>2</sub> 可以诱导细胞缺氧从而提高 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达<sup>[16]</sup>。我们按照文献[16]的方法, 用不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理 Beas-2B 细胞 24 h, 发现随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加, HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达水平逐渐升高, 且 THAP8 蛋白的表达水平也升高(图 2C), 说明 HIF-1 $\alpha$  能促进 THAP8 基因的表达。另外, 我们将过表达 HIF-1 $\alpha$  的慢病毒和空载体慢病毒分别感染 Beas-2B 细胞, 72 h 之后进行 Western-

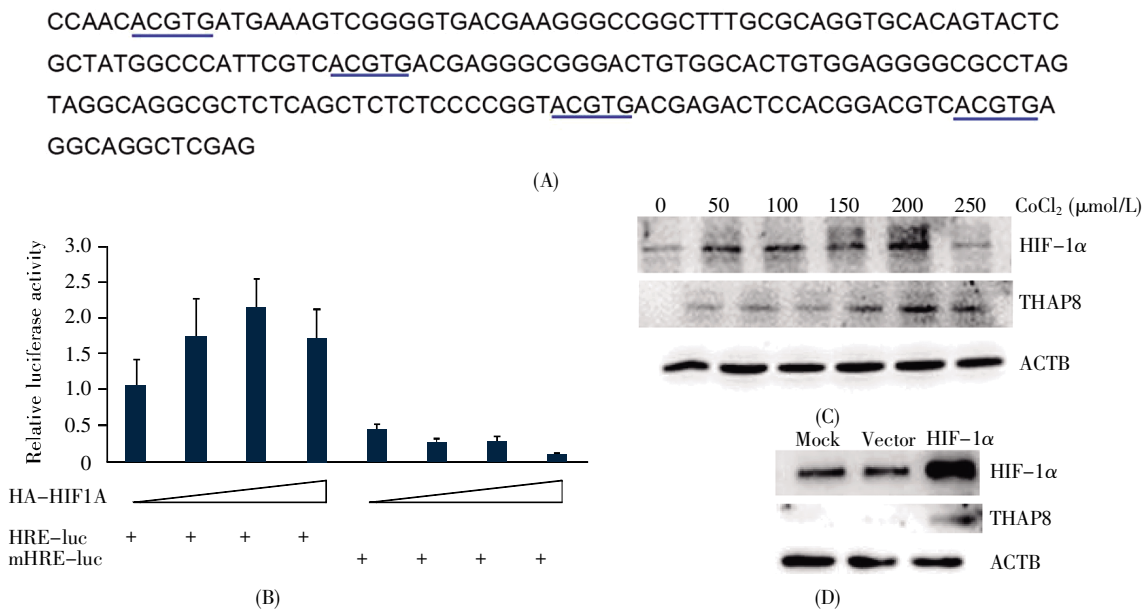


图2 *HIF-1 $\alpha$*  调控 *THAP8* 基因的表达

(A) *THAP8* 启动子序列, 缺氧诱导元件用下划线标注; (B) 将等量的 pCMV-lacZ (0.2 μg) 和 *THAP8*-HRE-luc/*THAP8*-mHRE-luc (0.2 μg) 以及梯度增加的 HA-HIF1A (0 μg、0.1 μg、0.2 μg 和 0.4 μg) 转染 HEK293 细胞, 24 h 后测定荧光素酶/β-半乳糖苷酶的相对活性; (C)  $\text{CoCl}_2$  处理 Beas-2B 细胞增强 *HIF-1 $\alpha$*  和 *THAP8* 的表达; (D) 未感染慢病毒组(mock)、空载体慢病毒感染组(vector)和 *HIF-1 $\alpha$*  过表达慢病毒组(*HIF-1 $\alpha$* )的 Western-blot 分析。

### Fig.2 *HIF-1 $\alpha$* up-regulates the expression of *THAP8* gene

(A) The sequence of *THAP8* promoter. The hypoxia response elements (HREs) are underlined; (B) HEK293 cells were co-transfected with pCMV-lacZ (0.2 μg), *THAP8*-HRE-luc/*THAP8*-mHRE-luc (0.2 μg) and increasing amount of HA-HIF1A (0 μg, 0.1 μg, 0.2 μg and 0.4 μg). At 24 h post-transfection, the cells were lysed to measure the activities of luciferase and β-galactosidase. The relative luciferase activities were normalized according to β-galactosidase activities; (C) Expression of *HIF-1 $\alpha$*  and *THAP8* in Beas-2B induced by  $\text{CoCl}_2$  treatment; (D) Western-blot analysis of mock group (the uninfected Beas-2B cells), vector group (the Beas-2B cells infected with empty vector lentivirus) and *HIF-1 $\alpha$*  group (the Beas-2B cells infected with *HIF-1 $\alpha$* -over-expressing lentivirus).

blot 分析。结果表明: 与未感染慢病毒的细胞 (mock 组) 相比, 感染空载体慢病毒的细胞 (vector 组) 中 *HIF-1 $\alpha$*  和 *THAP8* 蛋白的表达水平都没有明显变化, 而感染 *HIF-1 $\alpha$*  过表达慢病毒 (*HIF-1 $\alpha$*  组) 之后, 细胞中 *HIF-1 $\alpha$*  和 *THAP8* 蛋白的表达水平显著升高 (图 2D), 这进一步说明 *HIF-1 $\alpha$*  促进 *THAP8* 基因的表达。

## 2.3 干扰 *THAP8* 抑制肺癌细胞的增殖、克隆形成和侵袭

### 2.3.1 干扰 *THAP8* 细胞系的构建

我们构建了 4 个 *THAP8* shRNA 的表达载体, 并将其包装成慢病毒颗粒 (表 1); 在 95-D 细胞中进行预实验以检测干扰效果, 结果显示 sh32 和 sh33 这两个慢病毒的干扰效果最佳 (图 3A), 因此在后续实验中采用这两个慢病毒对 *THAP8* 进行干扰。选取 *THAP8* 表达水平相对较高的 H460 和 H1437 细胞系做干扰实验, 并构建稳定细胞株。Western-blot 证实肺癌细胞系 H460 和 H1437 的

干扰细胞株构建成功 (图 3B~C)。

### 2.3.2 干扰 *THAP8* 抑制肺癌细胞活力

在构建了干扰 *THAP8* 的稳定细胞株后, 采用 MTT 法探讨干扰 *THAP8* 对肺癌细胞活力的影响。结果表明: 与阴性对照 NC 组相比, 从 3 d 后开始, 干扰 *THAP8* 的 H460 细胞的活力显著降低 (图 4A), 而在 5 d 后干扰 *THAP8* 的 H1437 细胞的活力才具有显著差异 (图 4B)。这些结果说明: 干扰 *THAP8* 能抑制 H460 和 H1437 的细胞活力, 但其对 H460 细胞活力的影响大于 H1437。

### 2.3.3 干扰 *THAP8* 抑制肺癌细胞的克隆形成能力

细胞克隆形成实验结果表明, 与对照 NC 组相比, 干扰 *THAP8* 的 H460 和 H1437 细胞的群落显著减少 (图 5), 说明 *THAP8* 促进肺癌细胞的克隆形成。

### 2.3.4 干扰 *THAP8* 抑制肺癌细胞的侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果表明, 与对照 NC 组相比, 干扰 *THAP8* 的 H460 和 H1437 的侵袭细胞

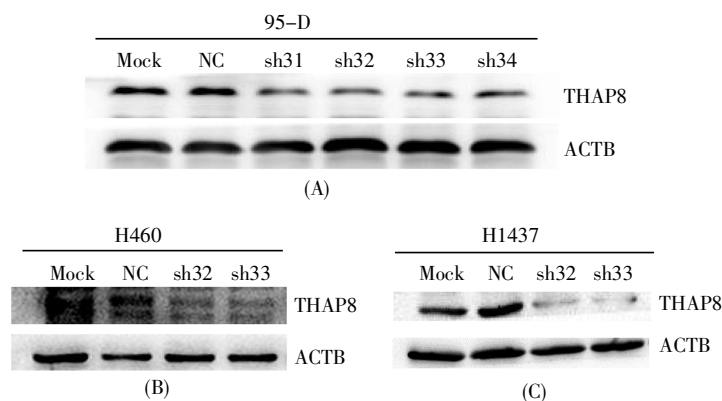


图3 干扰 THAP8 的稳定细胞系的构建

(A) 表达阴性对照 shRNA (NC) 或 THAP8 shRNA (sh31、sh32、sh33 和 sh34) 的慢病毒分别感染 95-D 细胞, 72 h 后收获细胞进行免疫印迹; (B-C) 表达 NC、sh32 和 sh33 的慢病毒分别感染 H460 和 H1437 细胞后经潮霉素筛选获得的稳定细胞株的免疫印迹结果。Mock 表示未感染慢病毒的细胞。

**Fig.3 Generation of cell lines stably expressing THAP8 shRNAs**

(A) The 95-D cells were infected with lentiviral particles expressing scramble shRNA (NC) or THAP8 shRNA (sh31, sh32, sh33, sh34), and were harvested for Western-blot at 72 h after transduction; (B-C) The sh32 and sh33 lentiviral particles were selected to infect H460 and H1437 cells. After infection, the cells were selected for stable cells with hygromycin and subjected for Western-blot. Mock: The cells without lentivirus infection.

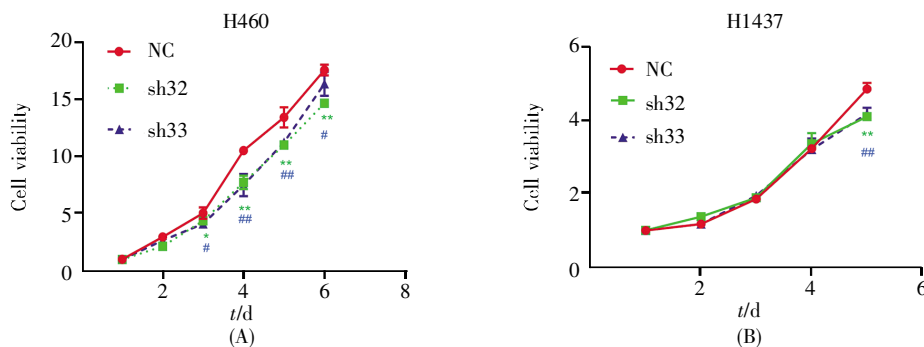


图4 干扰 THAP8 对肺癌细胞 H460 (A) 和 H1437 (B) 活力的影响

sh32 组和 NC 组比较, \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ ; sh33 组和 NC 组比较, #:  $P \leq 0.05$ , ###:  $P \leq 0.01$ 。

**Fig.4 The influence of THAP8 knockdown on viability of lung cancer cells H460 (A) and H1437 (B)**

\*:  $P \leq 0.05$  and \*\*:  $P \leq 0.01$ , sh32 vs. NC; #:  $P \leq 0.05$  and ###:  $P \leq 0.01$ , sh33 vs. NC.

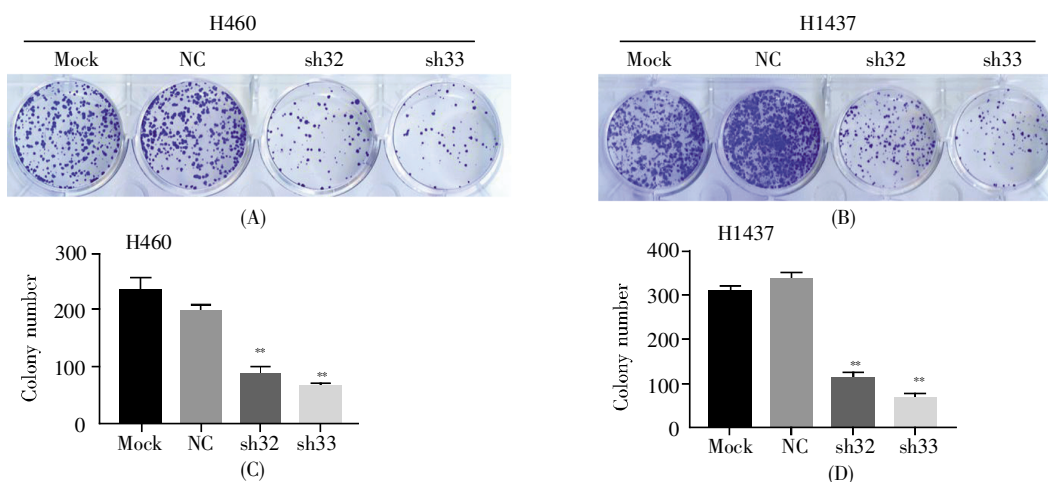


图5 干扰 THAP8 对肺癌细胞克隆形成能力的影响

3 次克隆形成重复实验的代表性图片(A~B)和克隆数的平均值(C~D); \*\* 表示与 NC 组相比, 差异极显著( $P \leq 0.01$ )。

**Fig.5 The influence of THAP8 knockdown on lung cancer cell colony formation**

Representative images of colony (A~B) and the average colony numbers from three repeats of experiments (C~D). \*\*:  $P \leq 0.01$  vs. NC.

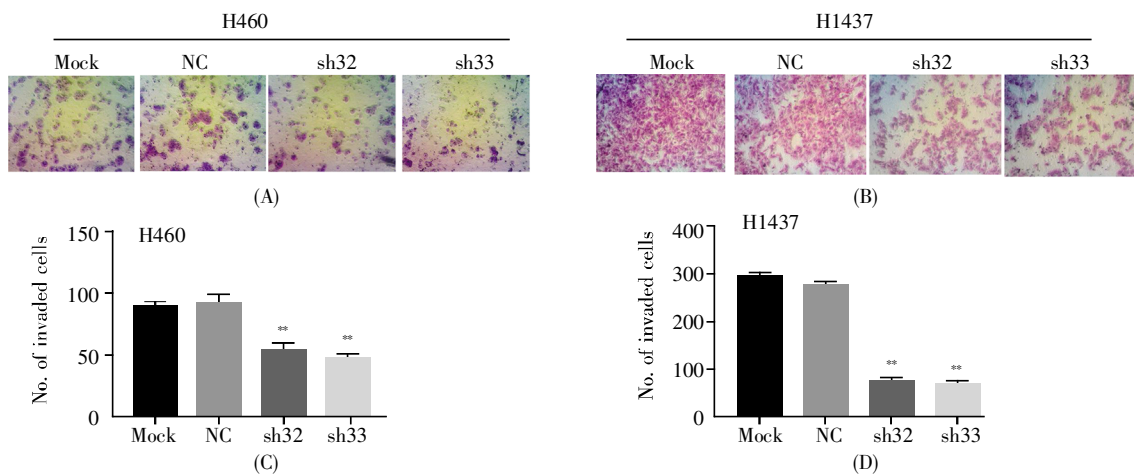


图6 干扰 *THAP8* 对肺癌细胞侵袭能力的影响

3次 Transwell 侵袭重复实验的代表性图片(A~B)和统计分析结果(C~D); \*\*表示与 NC 组相比, 差异极显著( $P \leq 0.01$ )。

**Fig.6 The influence of *THAP8* knockdown on lung cancer cell invasion**

Representative images (A~B) and statistical analysis (C~D) of invaded cells in the Transwell invasion assay. \*\*:  $P \leq 0.01$  vs. NC.

数量显著降低(图6), 说明 *THAP8* 促进肺癌细胞的侵袭。

### 3 讨论

本文通过癌症数据库分析和临床样本分析均发现, *THAP8* 在肺癌组织中异常高表达(图1)。这个结果与王冠等<sup>[9]</sup>的结果类似, 他们发现 *THAP8* 在卵巢癌组织的表达显著高于正常卵巢组织。为了研究 *THAP8* 在肺癌细胞中的功能, 在 H460 和 H1437 细胞中干扰 *THAP8* 基因, 并采用细胞活力实验(MTT法)、划痕实验、克隆形成实验和侵袭实验等探究了 *THAP8* 对肺癌细胞生物学行为的影响。研究结果表明: 干扰 *THAP8* 基因之后, H460 和 H1437 细胞的活力、克隆形成和侵袭能力均显著下降(图4~6), 但其对细胞迁移没有显著影响(结果未显示)。这些结果提示 *THAP8* 可能是一个癌基因。

此外, 本研究发现 *THAP8* 基因启动子上有4个 HRE 位点(图2A), 荧光素酶实验证实 *HIF-1 $\alpha$*  可以增强野生型 *THAP8* 启动子活性, 但对突变的 *THAP8* 启动子(其4个 HRE 位点被突变)没有明显的影响(图2B), 推断 *HIF-1 $\alpha$*  可以结合到 *THAP8* 基因的启动子上, 并促进 *THAP8* 基因的转录。进一步采用  $\text{CoCl}_2$  诱导处理, 使细胞处于缺氧状态, 发现 *HIF-1 $\alpha$*  蛋白能调控 *THAP8* 基因的表达(图2C)。而且, 在 Beas-2B 细胞中过表达 *HIF-1 $\alpha$*  可以促进 *THAP8* 蛋白的表达(图2D)。

缺氧是实体肿瘤中普遍存在的特征, 与肿瘤

的转移密切相关<sup>[17]</sup>。缺氧会激活 *HIF-1 $\alpha$*  的表达, 激活的 *HIF-1 $\alpha$*  作为转录因子发挥作用, 调控血管生成和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等相关基因的表达, 从而促进肿瘤的 EMT 和转移<sup>[17-19]</sup>。*HIF-1 $\alpha$*  已被证实可以用作治疗癌症的一个靶点<sup>[19]</sup>。本文发现 *HIF-1 $\alpha$*  可以促进 *THAP8* 的转录, 而 *THAP8* 可以促进肺癌细胞的转移, 提示 *HIF-1 $\alpha$*  可能通过 *THAP8* 发挥作用。

综上所述, 本研究发现 *THAP8* 是一个新的癌基因, 其可以显著促进肺癌细胞的克隆形成和侵袭, 并且其表达受到 *HIF-1 $\alpha$*  蛋白的调控。这些结果说明 *THAP8* 基因可以作为一个潜在的肺癌治疗靶点和预后标志, 可为癌症的诊断、预后判断和抗肿瘤药物开发提供新思路。

**致谢:** 本文所用的肺癌组织样本由中南大学湘雅二医院胸外科卿蓓博士提供, 在此表示感谢!

### 参考文献(References):

- [1] PIKOR L A, RAMNARINE V R, LAM S, *et al.* Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications[J]. *Lung Cancer*, 2013, 82(2): 179-189.
- [2] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, FITZMAURICE C, ABATE D, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *JAMA Oncology*, 2019, 5(12): 1749-1768.

- [3] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志(ZHENG Rong-shou, SUN Ke-xin, ZHANG Si-wei, *et al.* Report of cancer epidemiology in China, 2015[J]. Chinese Journal of Oncology), 2019, 41(1): 19–28.
- [4] 洪少东, 张力. 肺癌靶向治疗新进展及展望[J]. 中国癌症杂志(HONG Shao-dong, ZHANG Li. Recent advances and prospect in targeted therapy for lung cancer[J]. China Oncology), 2020, 30(10): 733–743.
- [5] ROUSSIGNE M, KOSSIDA S, LAVIGNE A C, *et al.* The THAP domain: a novel protein motif with similarity to the DNA-binding domain of P element transposase[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(2): 66–69.
- [6] SANGHAVI H M, MALLAJOSYULA S S, MAJUMDAR S. Classification of the human THAP protein family identifies an evolutionarily conserved coiled coil region[J]. BMC Structural Biology, 2019, 19: 4.
- [7] BALAKRISHNAN M P, CILENTI L, AMBIVERO C, *et al.* THAP5 is a DNA-binding transcriptional repressor that is regulated in melanoma cells during DNA damage-induced cell death[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 404(1): 195–200.
- [8] CHEN C P, SANG Y, LIU L J, *et al.* THAP7 promotes cell proliferation by regulating the G1/S phase transition via epigenetically silencing p21 in lung adenocarcinoma[J]. OncoTargets and Therapy, 2019, 12: 5651–5660.
- [9] 王冠, 陈黎, 李晨星, 等. THAP8 基因在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志(WANG Guan, CHEN Li, LI Chen-xing, *et al.* Expression and clinical significance of THAP8 gene in ovary cancer[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology), 2011, 46(10): 784–785.
- [10] NING Y C, HUI N, QING B, *et al.* ZCCHC10 suppresses lung cancer progression and cisplatin resistance by attenuating MD-M2-mediated p53 ubiquitination and degradation[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(6): 414.
- [11] KONDO K, KLCO J, NAKAMURA E, *et al.* Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein[J]. Cancer Cell, 2002, 1(3): 237–246.
- [12] WAN Z X, YUAN D M, ZHUO Y M, *et al.* The proteasome activator PA28 $\gamma$ , a negative regulator of p53, is transcriptionally up-regulated by p53[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 2573–2584.
- [13] NING Y C, WANG C Q, LIU X, *et al.* CK2-mediated CCDC-106 phosphorylation is required for p53 degradation in cancer progression[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019, 38: 131.
- [14] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, *et al.* UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. Neoplasia, 2017, 19(8): 649–658.
- [15] RHODES D R, KALYANA-SUNDARAM S, MAHAVISNO V, *et al.* OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles[J]. Neoplasia, 2007, 9(2): 166–180.
- [16] PIRET J P, MOTTET D, RAES M, *et al.* CoCl<sub>2</sub>, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 973(1): 443–447.
- [17] TIRPE A A, GULEI D, CIORTEA S M, *et al.* Hypoxia: overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of HIF genes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6140.
- [18] TAM S Y, WU V W C, LAW H K W. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in cancers: HIF-1 $\alpha$  and beyond[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 486.
- [19] MA Z W, WANG L Z, CHENG J T, *et al.* Targeting hypoxia-inducible factor-1-mediated metastasis for cancer therapy[J/OL]. Antioxidants & Redox Signaling, 2021. DOI: 10.1089/ars. 2019. 7935.