

Sox2 对宫颈鳞癌细胞增殖能力影响的研究*

冀 静, 宁芬茹, 刘海娟, 魏 星, 赵 娟, 王月玲[△]

西安交通大学医学院第一附属医院 妇产科(西安 710061)

【摘要】 目的 探讨干细胞转录因子 Sox2 对宫颈鳞癌细胞增殖能力的影响及其机制。**方法** 将质粒 pIRES-EGFP-Sox2 转染宫颈鳞癌 SiHa 细胞系,采用 G418 筛选构建稳定表达 Sox2 的 SiHa 细胞克隆(SiHa-Sox2),MTT 法检测 Sox2 表达对宫颈鳞癌细胞增殖能力的影响;流式细胞术检测细胞周期的变化;Western blot 检测细胞周期相关蛋白 CyclinD1 表达变化。**结果** pIRES-EGFP-Sox2 转染 SiHa 细胞后(SiHa-Sox2 组),细胞 Sox2 基因和蛋白均高表达(P 均 <0.01);SiHa-Sox2 组细胞增殖速度加快;细胞周期中 S 期细胞比例明显增加;Western blot 检测 CyclinD1 表达上调($P<0.05$)。**结论** Sox2 基因通过上调 CyclinD1 蛋白的表达加速细胞周期进程,促进宫颈鳞癌细胞的增殖,从而促进宫颈鳞癌的发生发展。

【关键词】 宫颈鳞癌 Sox2 基因 细胞增殖 细胞周期

Effect of Sox2 on Proliferation of Cervical Squamous Cancer Cell Line SiHa JI Jing, NING Fen-ru, LIU Hai-juan, WEI Xing, ZHAO Juan, WANG Yue-ling[△]. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

[△] Corresponding author, E-mail: yuelingw@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and its mechanism of stem cell related transcription factor Sox2 on the proliferation of cervical squamous carcinoma cell line SiHa. **Methods** Plasmid pIRES-EGFP-Sox2 or empty plasmid (pIRES-EGFP-empty) was stably transfected into SiHa cells. The expression of Sox2 was detected by both RT-PCR and Western blot. The effects of Sox2 on cellular proliferation and cell cycle were studied by MTT assay and flow cytometry (FCM) respectively. The expression of cell cycle related protein CyclinD1 was detected by Western blot. **Results** Compared to SiHa-EGFP cells, the expression of Sox2 was obviously up-regulated in SiHa-Sox2 cells ($P<0.01$). MTT result showed that SiHa-Sox2 cells grew faster than the control cells. The over-expression of Sox2 increased the proportion of transfected cells in phase S. The increased expression of CyclinD1 was further detected after the successful expression of Sox2 ($P<0.05$). **Conclusion** Sox2 could enhance the proliferation of cervical squamous cancer cells in the manner of up-regulating CyclinD1 expression.

【Key words】 Cervical squamous cancer Sox2 Cell proliferation Cell cycle

干细胞转录因子 Sox2 是人体内转录因子 SOX (SRY-related HMG box) 家族 B1 亚族成员之一,其位于人染色体的 3q26.3-q27,参与维持胚胎干细胞的自我更新和多潜能性^[1-3]。近期研究发现,Sox2 的异常表达与脑恶性胶质瘤^[4]、肺癌^[5]、乳腺癌^[6]、胃癌^[7]等多种肿瘤的发生发展及预后密切相关。目前关于 Sox2 在宫颈鳞癌中的研究尚处于初步阶段。本研究采用基因转染的方法,将外源性 Sox2 基因转入宫颈鳞癌 SiHa 细胞系中,观察其对 SiHa 细胞增殖能力及细胞周期的影响,初步探讨 Sox2 基因在宫颈鳞癌发病中的作用,以进一步探讨宫颈鳞癌发生发展的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

宫颈鳞癌细胞株 SiHa 购自中国科学院上海细胞库。Sox2 基因真核表达载体 pIRES-EGFP-Sox2、对照载体(pIRES-EGFP-empty)由冀静前期构建^[3]。胎牛血清购自 Hyclone 公司,去内毒素质粒 DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司,脂质体 LipfectimineTM 2000 及 Trizol 购自 Invitrogen 公司,G418 购自 Calbiochem 公司,兔抗人 Sox2 单克隆抗体、兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体均购自 Eptomics 公司,HRP-山羊抗兔蛋白抗体购自 PIERCE 公司。DMEM(High Glucose)培养基、PI 及 Rnase、MTT 均购自 Sigma 公司。PCR 引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。

1.2 方 法

* 国家自然科学基金青年基金(No. 81001162)资助

[△] 通讯作者, E-mail: yuelingw@163.com

1.2.1 SiHa 细胞培养 SiHa 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待 SiHa 细胞融合度达 80% 以上时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 构建稳定高表达 Sox2 的单克隆 SiHa 细胞株 在 6 孔板中按每孔 1.5×10^5 个细胞接种 SiHa 细胞, 培养 24 h 后将 pIRES-EGFP-Sox2 及对对照载体 (pIRES-EGFP-empty) 按照 Lipofectamine™ 2000 的说明书进行转染。转染 24 h 后, 将细胞从 6 孔板扩增至 100 mm 平皿, 待细胞贴壁后, 再用含 100 μg/mL G418 DMEM 高糖培养基筛选 3~4 周。挑取在荧光显微镜下标记的绿色荧光单克隆并扩大培养、传代、冻存, 并经 RT-PCR 及 Western blot 验证。

1.2.3 RT-PCR 检测细胞 Sox2 mRNA 表达 按 Trizol 试剂说明书方法从 SiHa-Sox2 和 SiHa-EGFP 细胞中提取总 RNA, 并按试剂盒说明书反转录成 cDNA。反应结束后, 以 2 μL cDNA 为模板, 扩增 335 bp 的 Sox2 片段。上游引物: 5'-GTTGAATTCTACAACATGGAGACGGAG-3'; 下游引物: 5'-GTTGGATCCCGGTATTTATAATCCGGGTGC-3'。以 β-actin (437 bp) 的片段为内参对照, 上游引物: 5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATCC-3'; 下游引物: 5'-CCGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'。反应参数: 95 °C 40 s, 52.8 °C 40 s, 72 °C 40 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 经扫描分析, 以目的基因与 β-actin 的灰度值比值为目的基因的相对表达量。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的各组细胞, 以 5×10^3 /孔细胞密度接种于 24 孔板, 每孔加入 1 mL 培养液, 每组设 4 复孔, 另设空白调

零组, 于接种后 1 d、3 d、5 d、7 d 时分别加入 MTT 溶液 (5 mg/mL), 在 37 °C 培养箱中孵育 4 h 后终止培养, 每孔加入 200 μL 的 DMSO, 震荡混匀 10 min, 在酶联免疫仪 (Bio-rad) 上测 490 nm 波长吸光度值 (A 值)。以时间为横轴, A 值为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期的改变 收集对数生长期的 SiHa-Sox2 及 SiHa-EGFP 细胞, 制成 2×10^5 /mL 的细胞悬液, 冷 PBS 洗涤 2 次后用预冷的 75% 乙醇 4 °C 固定 30 min, 800 r/min 离心 5 min 除去乙醇, 冷 PBS 再次洗涤, 加入 400 μL PI 染液 (50 μg/mL), 室温避光 30 min 后上机测细胞周期 (美国 BD 公司)。

1.2.6 Western blot 检测 Sox 和 CyclinD1 蛋白的表达 SiHa-Sox2 及 SiHa-EGFP 细胞融合度达 80%~90% 时, 每 100 mm 平皿加入 400 μL RIPA 裂解液提取蛋白, 100 g/L SDS/PAGE 胶进行电泳, 半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭后, 采用兔抗人 Sox2 单克隆抗体 (1:200), 兔抗人抗 CyclinD1 蛋白抗体 (1:200) 分别 4 °C 孵育过夜。二抗用 HRP-山羊抗兔 IgG 多抗 (1:2000), 室温孵育 2 h, 最后经 ECL 在凝胶成像仪 (Bio-rad) 上发光显色。以目的蛋白与 β-actin 的灰度值比值为目的蛋白相对表达量。

1.2.7 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异采用配对 *t* 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 稳定转染 Sox2 基因的 SiHa 单克隆细胞株的建立及鉴定

见图 1。转染成功后, 在含有 G418 的 DMEM

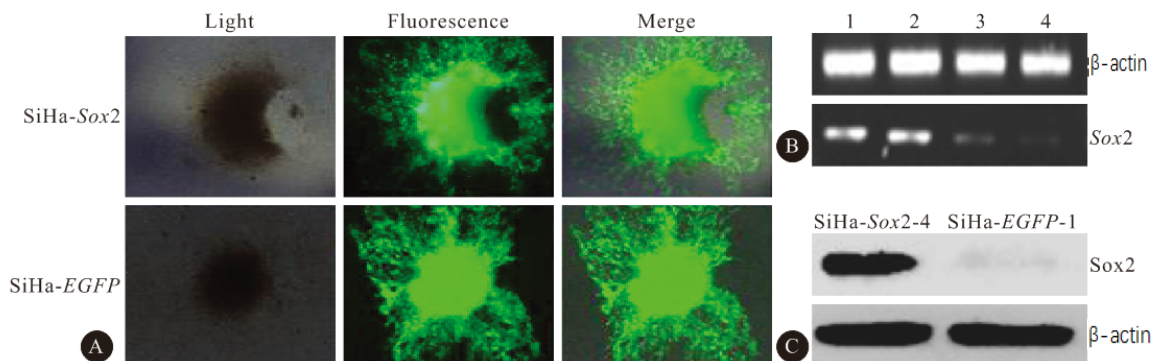


图 1 稳定过表达 Sox2 的 SiHa 细胞克隆株的建立及鉴定

Fig 1 Identified of Sox2 gene over-expression in SiHa cell line

A: The cell clones were obtained by G418 screening for 3 weeks and observed by fluorescence microscopy ($\times 100$); B: RT-PCR of Sox2 in SiHa-Sox2 and the control cells (1 and 2 represented SiHa-Sox2-4 and SiHa-Sox2-9 cell clones; 3 and 4 were SiHa-EGFP-1 and SiHa-EGFP-2 cell clones); C: The expression of Sox2 was detected by Western blot in SiHa-Sox2 cells and the control cells

培养基中筛选 4 周,有少量克隆形成,荧光显微镜下可见含绿色荧光蛋白的单克隆(图 1A)。挑选单克隆后继续用含 G418 的培养基维持选择,扩增培养。

RT-PCR 结果显示,与转染空载体(pIRES-EGFP-empty, SiHa-EGFP 组)相比,稳定转染 pIRES-EGFP-Sox2 质粒组的 SiHa 细胞(SiHa-Sox2)高表达 Sox2 mRNA(图 1B, 0.182 ± 0.007 vs. 0.683 ± 0.018 , $P < 0.01$)。同样,Western blot 结果显示 SiHa-Sox2 组细胞的 Sox2 蛋白表达明显高于对照组(图 1C, 0.998 ± 0.028 vs. 0.046 ± 0.009 , $P < 0.01$),表明建立了稳定高表达 Sox2 蛋白的 SiHa 细胞株。

2.2 Sox2 基因对宫颈鳞癌 SiHa 细胞生长的影响

MTT 结果显示, SiHa-Sox2 组细胞的生长速度快于 SiHa-EGFP 组,表明 Sox2 促进了宫颈癌细胞的增殖,两组细胞 A 值在第 5 d 后的差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 Sox2 基因对宫颈鳞癌 SiHa 细胞周期分布的影响

流式细胞仪分析结果表明, Sox2 高表达后宫颈

癌 SiHa 细胞 S 期细胞比例高于对照组($P < 0.05$)。G₀/G₁ 期细胞、G₂/M 期细胞比例差异均无统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 Sox2 对细胞周期蛋白 CyclinD1 表达的影响

Western blot 结果显示,高表达 Sox2 基因后,细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达明显高于 SiHa-EGFP 组(图 4, 0.992 ± 0.019 vs. 0.356 ± 0.003 , $P < 0.05$)。

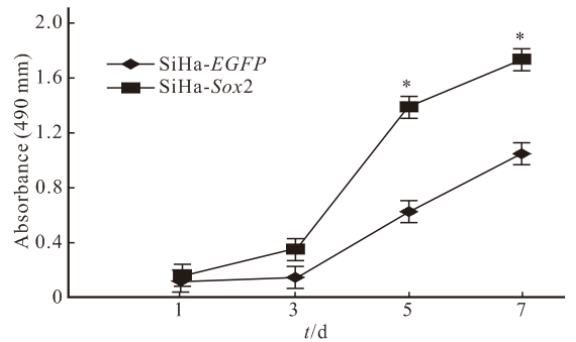


图 2 MTT 法检测 Sox2 高表达后 SiHa 细胞增殖曲线
Fig 2 Cell growth curve measured by MTT in SiHa-Sox2 cells and the control cells

* $P < 0.05$, vs. SiHa-EGFP group at the same time

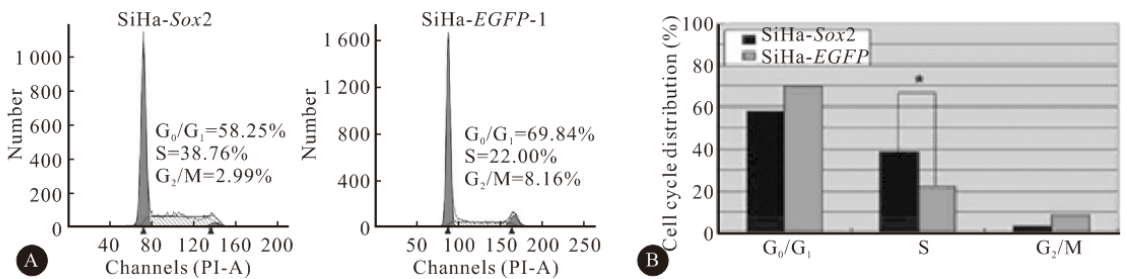


图 3 Sox2 基因对细胞周期的影响

Fig 3 Effect of Sox2 on cell cycle of SiHa cells

A: Cell cycle analysis of SiHa-Sox2 and the control cells by FCM; B: The percentage of cell numbers in G₀/G₁ phase, S phase and G₂/M phase. * $P < 0.05$

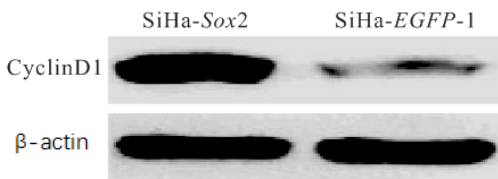


图 4 Western blot 检测 CyclinD1 表达

Fig 4 Western blot of CyclinD1 in SiHa-Sox2 cells and the control cells

3 讨论

肿瘤干细胞学说认为,在肿瘤组织中存在着一个小的细胞亚群,即肿瘤干细胞,其具有维持自我更新、分裂和扩大肿瘤干细胞池的能力,可形成具有原始肿

瘤异质性和多样性的次级肿瘤^[8,9]。肿瘤干细胞与恶性肿瘤的发生发展、复发以及耐药性等密切相关^[4,9]。目前,有关宫颈癌干细胞的研究尚处于初级阶段,了解肿瘤干细胞相关基因在宫颈癌的表达及作用,为进一步探讨宫颈癌发生的分子机制及宫颈癌的基因诊断和靶向治疗提供一定的理论依据。

Sox2 是最早发现的干细胞转录因子,在肿瘤干细胞维持自我更新和增殖分化中起着重要作用。目前已经在多种肿瘤组织中检测到它的异常表达。研究表明,Sox2 的一些靶基因与癌细胞的增殖能力和成瘤性有关,其中包括 CCDN1,后者受 Sox2 的转录调节并介导 Sox2 在促进细胞增殖和成瘤性中的作

用。CCDN1 基因的蛋白产物 CyclinD1 蛋白,是重要的细胞周期调节蛋白,在促使细胞从 G_0/G_1 期进入 S 期这一过程中发挥着关键性的作用^[10,11]。Oppel 等^[4]对人神经胶质瘤细胞的研究发现,将 *Sox2* 基因沉默后,CyclinD1 蛋白表达下调,细胞周期在 S 期发生阻滞。Otsubo 等^[7]则发现 *Sox2* 过表达能诱导胃癌细胞周期 G_1 期停滞进而抑制了细胞增殖,表明 CyclinD1 蛋白表达水平降低和 *Sox2* 的过表达密切相关。

在本研究中,我们通过脂质体转染和 G418 压力筛选,在宫颈鳞癌 SiHa 细胞中成功构建了稳定高表达 *Sox2* 的克隆细胞株 SiHa-*Sox2* 及对照组 SiHa-*EGFP*,经 RT-PCR 及 Western blot 方法检测到 *Sox2* 在 mRNA 和蛋白水平均高表达。MTT 法检测到 *Sox2* 促进了 SiHa 细胞的增殖活性;通过流式细胞术分析发现,相对于对照组 SiHa-*EGFP* 细胞而言,SiHa-*Sox2* 细胞的 S 期比例明显增加, G_0/G_1 期比例减少,因此我们推测干细胞转录因子 *Sox2* 的过表达可能通过加快细胞周期进程促进了宫颈鳞癌 SiHa 细胞的增殖。

细胞周期是多因子参与的高度精确、有组织的时序调控过程;细胞周期素是细胞周期的正性调控因子,促使细胞由 G_1 期进入 S 期,这种作用以 CyclinD1 为代表^[11]。CyclinD1 在 G_1 期的含量是恒定的,当 CyclinD1 表达增加时,可导致 G_1 期缩短,细胞增殖分裂加快。CyclinD1 亦是细胞周期众多因子中与肿瘤关系最密切的癌基因^[10-12]。因此,我们又进一步研究了 SiHa-*Sox2* 及对照组 SiHa-*EGFP* 细胞中 CyclinD1 蛋白的表达差异,结果表明 CyclinD1 蛋白在 SiHa-*Sox2* 细胞中表达明显上调,说明 *Sox2* 可通过上调 CyclinD1 诱导 SiHa 细胞周期加速 $G_0/G_1 \rightarrow S$ 期进程,从而促进 SiHa 细胞的增殖。

综上所述,*Sox2* 基因在宫颈鳞癌 SiHa 细胞中稳定高表达后,SiHa 细胞增殖能力增加,其机制可能通过上调 CyclinD1 蛋白、加速细胞周期 $G_0/G_1 \rightarrow S$ 期转化进程有关。干细胞转录因子 *Sox2* 及细胞周期 CyclinD1 蛋白有望成为宫颈癌基因诊断和靶向治疗的新靶点。

参 考 文 献

- 1 Cao Y. Regulation of germ layer formation by pluripotency factors during embryogenesis. *Cell Biosci*,2013;3(1):15. doi: 10.1186/2045-3701-3-15.
- 2 Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells by functioning as molecular rheostats. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*,2009;1(2):228-236.
- 3 Ji J, Zheng PS. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human Pathology*,2010;41(10):1438-1447.
- 4 Oppel F, Müller N, Schackert G, et al. SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. *Mol Cancer*,2011;9:10:137. doi:10.1186/1476-4598-10-137.
- 5 Singhl S, Trevino J, Bora-Singhal N, et al. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*,2012;25;11:73. doi:10.1186/1476-4598-11-73.
- 6 Chen Y, Shi L, Zhang L, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*,2008;283(26):17969-17978.
- 7 Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, et al. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer*, 2008;98(4):824-831.
- 8 Zahra M, Elmira G, Elham E, et al. Application of stem cells in targeted therapy of breast cancer: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev*,2013;14(5):2789-2800.
- 9 Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells;therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*,2013;34(6):732-740.
- 10 Srivastava V, Patel B, Kumar M, et al. Cyclin D1, retinoblastoma and p16 protein expression in carcinoma of the gallbladder. *Asian Pac J Cancer Prev*,2013;14(5):2711-2715.
- 11 Sun Y, Luo DZ, Liao DJ. CyclinD1 protein plays different roles in modulating chemoresponses in MCF7 and MDA-MB231 cells. *J Carcinog*, 2012; 11: 12. doi: 10.4103/1477-3163.100401. Epub 2012 Aug 30.
- 12 Al-Khalaf HH, Colak D, Al-Saif M, et al. p16INK4A positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1. *PLoS One*, 2011; 6(7): e21111. doi: 10.1371/journal.pone.0021111. Epub 2011 Jul 20.

(2013-12-10 收稿,2014-03-16 修回)

编辑 沈进