

Sox2 在肝癌中的表达及其对细胞生长增殖的作用

李玉萍, 韩海伟, 郭建勇, 李贵俊, 韦君萍

(西宁市城西区西关社区卫生服务中心, 青海 西宁 810000)

摘要: [目的] 明确 Sox2 蛋白在肝癌组织及肝癌细胞系中的表达, 探讨 Sox2 分子对肝癌细胞生长增殖的作用及机制。[方法] 选取临床肝癌组织标本、正常肝细胞系和多种肝癌细胞系为实验对象, 从蛋白水平比较 Sox2 的表达水平; 选取高表达 Sox2 的肝癌细胞系, 利用 RNA 干扰技术降低 Sox2 表达, 运用 BrdU 掺入实验、MTT 实验等技术检测 Sox2 分子对肝癌细胞生长、增殖的影响, 并检测肿瘤相关分子 Wnt/ β -catenin 的表达水平。[结果] Sox2 在肝癌组织及几种肝癌细胞中表达明显升高, 以 HepG2 细胞系最多; MTT 实验显示, 与正常对照组和阴性对照组比较, 从第 3 天开始 Sox2 干扰组 A_{490} 值明显降低 ($P < 0.05$); BrdU 掺入实验显示, Sox2 干扰组细胞 BrdU 掺入率明显减少 ($P < 0.05$); 降低 Sox2 表达后, Wnt/ β -catenin 水平明显降低。[结论] Sox2 在肝癌组织及肝癌细胞中表达升高, 并通过 Wnt/ β -catenin 促进肝癌细胞生长及增殖。

关键词: Sox2; 肝肿瘤; Wnt; 增殖

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)04-0311-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.04.B010

The Expression and Role of Sox2 on Growth and Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cell

LI Yu-ping, HAN Hai-wei, GUO Jian-yong, et al.

(Community Health Service Center of Xining City Chengxi District, Xining 810000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression and effect of Sox2 on growth and proliferation of hepatocellular carcinoma cell and its mechanisms. [Methods] Hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and hepatocellular carcinoma cell lines were used. Sox2 gene expression was suppressed by transfecting siRNA. MTT and BrdU labeling assays were used to detect the role of Sox2 on growth and proliferation of HCC cells. The expression of Sox2, Wnt and β -catenin were detected by Western Blot. [Results] Western Blot showed that Sox2 expression level increased in HCC tissue and cell, compared with that in normal tissue and hepatocellular cell ($P < 0.05$). After suppressing the Sox2 expression in HepG2, the growth and proliferation of HepG2 significantly reduced ($P < 0.05$), while the level of Wnt and β -catenin decreased ($P < 0.05$). [Conclusion] Sox2 promotes the growth and proliferation of hepatocellular carcinoma cells via Wnt/ β -catenin pathway.

Subject words: Sox2; hepatocellular neoplasms; Wnt; proliferation

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 其发病率位居恶性肿瘤第 2 位, 世界每年新增肝癌患者数百万^[1]。由于肝癌的发病机制十分复杂, 目前的研究无法充分阐明其发病机制。早期发现肝癌的措施有限, 即使通过手术治疗, 肝癌患者预后也极不理想, 如何早期诊断及有效治疗是困扰肝癌治疗领域的难

题^[2]。

近年来发现 SOX 与肿瘤的密切相关性而使其备受关注^[3]。SOX (SRY related HMG box) 是指具有 HMG-box 基序保守区的一类 SRY/Sry (sex determination region of Y chromosome) 相关基因家族, 这类基因编码的蛋白质与 Sry 蛋白具有 60% 以上氨基酸序列相似性, 其主要功能是参与胚胎发育和细胞分子调控^[4]。Sox2 是 SOX B 亚家族成员之一, 在多种肿瘤中发现其异常表达, 如乳腺癌、肺癌、胃癌、食管

通讯作者: 韦君萍, 主治医师, 学士; 西宁市城西区西关社区卫生服务中心, 青海省西宁市城西区西关大街 6 号 (810000); E-mail: weijunping75@163.com

收稿日期: 2013-08-16; **修回日期:** 2013-10-15

癌、前列腺癌、卵巢癌等,推测该基因可能在肿瘤的发生发展过程起到重要作用^[5]。目前,国内外关于 Sox2 在肝癌中作用报道较少, Huang 等^[6]报道 Sox2 可以作为肝癌术后预后判断的指标,但未对该分子在肝癌细胞中的作用做更进一步研究。本实验选取临床肝癌组织标本和多种肝癌细胞系,旨在明确 Sox2 分子在肝癌细胞中的表达异常,阐明 Sox2 对肝癌细胞生长、增殖的影响,为寻求检测肝癌新的分子标志物及临床治疗肝癌提供了一条新思路。

1 材料与方法

1.1 肝癌组织标本

临床组织标本包括 30 例肝癌标本及其邻近正常组织。其中男性 25 例,女性 5 例,年龄 35~76 岁,平均(50.14±11.29)岁,均经病理学诊断为肝癌。

1.2 细胞系及培养

正常肝细胞系 L-02、肝癌细胞系 HepG2、MHCC97H、MHCC97L 均由青海大学医学院病理教研室提供;细胞常规培养,培养条件:培养基含 10%胎牛血清(Hyclone)的 DMEM(Hyclone)培养液,37℃、5%CO₂。

1.3 Western Blot

取对数生长期 L-02、HepG2、MHCC97H、MHCC97L 细胞 1×10⁷ 个,细胞裂解液常规提取细胞总蛋白,BCA 法定量总蛋白,加入 SDS 上样缓冲液,煮沸 5min,取 50μg 蛋白上样、电泳、转膜,使用 Bio-Rad 湿转膜仪以恒流 300mA 转膜 2h,待蛋白转至 NC 膜后,膜于 3%BSA 封闭液 37℃封闭 1h,加入一抗(anti-Sox2, 1:1 000, Sigma; anti-Wnt, 1:1 000, Sigma; anti-β-catenin, 1:1 000, Sigma; anti-β-actin, 1:1 000, Santa cruz)中 4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000, 北京中杉),37℃孵育 1h。ECL 发光液显色, Bio-Rad 凝胶成像系统成像 Western Blot 产物电泳条带, Image J 软件测量条带灰度值。

1.4 RNA 干涉

根据 GenBank 上 Sox2 的序列,针对 Sox2 序列 5'-CCA GAA CTA ACG CAT TCA TCA A-3',设计 RNA 短干扰片段为:sense:5'-CCA GAA CUA ACG CAU UCA A-3';antisense:5'-GGU CUU GAU UGC GUA AGU U-3'(上海吉玛公司合成),阴性对照

siRNA 为:sense:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3';antisense:5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。将 HepG2 细胞分为空白对照组(Control)、阴性对照组(negative control, NC)、Sox2 siRNA 干涉组(RNAi),以每组 2.5×10⁴ 个细胞接种于 1cm×1cm 盖玻片上,待细胞培养至盖玻片 80%后,按转染试剂盒 Lipofectamine™2000 (Invitrogen)及 siRNA 说明书操作,siRNA 终浓度为 50mmol/L,Control 组予 DMEM 培养液;NC 组予 DMEM 培养液、阴性 siRNA 片段、Lipofectamine 转染溶液;RNAi 组予 DMEM 培养液、Sox2 siRNA 片段、Lipofectamine 转染溶液。细胞处理 6h,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止转染,继续培养 72h 后行实验。

1.5 MTT 实验

将 HepG2 细胞以每孔 1×10³ 个细胞接种于 96 孔板,24h 转染 Sox2 siRNA 片段,设阴性对照组,每组设 4 个复孔,选取 1~5d 5 个观察时间点。每孔加 MTT 溶液 20μl (5mg/ml, Sigma),37℃孵育 4h,吸干孔内培养液,加入 150μl DMSO,振荡 10min 至结晶充分溶解,酶联检测仪测定 490nm 波长处各孔的吸光度值,数据分析并绘制细胞生长曲线。

1.6 BrdU 掺入试验

HepG2 细胞接种于盖玻片上,转染 Sox2 siRNA 片段并继续培养 72h 后,每孔加入含 1×10⁻⁵μmol/L BrdU 的无血清 DMEM 培养液培养 30min,取出盖玻片,冷丙酮固定 30min,3%H₂O₂ 室温处理 15min,2mol/L HCl 37℃作用 15min,加入一抗(anti-BrdU, 1:200, 武汉博士德),4℃湿盒中过夜,加入 FITC 荧光素化二抗(1:200, 北京中杉),37℃孵育 30min,封片,400 倍荧光显微镜下观察。结果判定:采用单盲、重复等观察方法计算 5 个视野下的阳性细胞数占总细胞数的比例(视野下细胞核带绿色荧光标记的细胞为阳性细胞)。

1.7 统计学处理

实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用成组配对 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析进行统计学处理,组间两两比较采用 Bonferroni's Multiple Comparison Test。P<0.05 为差异有统计学意义。实验所得数据采用 GraphPad prism5 软件进行统计学分析及作图。

2 结果

2.1 Sox2 在肝癌组织及肝癌细胞系中表达均升高

在体水平,Western Blot 结果显示,与正常肝组织比较,肝癌组织中 Sox2 表达明显升高,为正常肝组织的 3.7 倍 ($P<0.05$)。离体水平,正常肝细胞 L-02 及肝癌细胞 HepG2、MHCC97H、MHCC97L 中均有表达,其中 L-02 中表达最少,Sox2 在 MHCC97H、MHCC97L 的表达是 L-02 的 2.5 倍,而在 HepG2 表达最多,是 L-02 细胞的 3.2 倍 ($P<0.05$) (Figure 1)。因为 Sox2 在 HepG2 细胞中表达最高,所以我们选取肝癌细胞系 HepG2 进行如下实验。

2.2 降低 Sox2 分子抑制肝癌细胞 HepG2 的生长

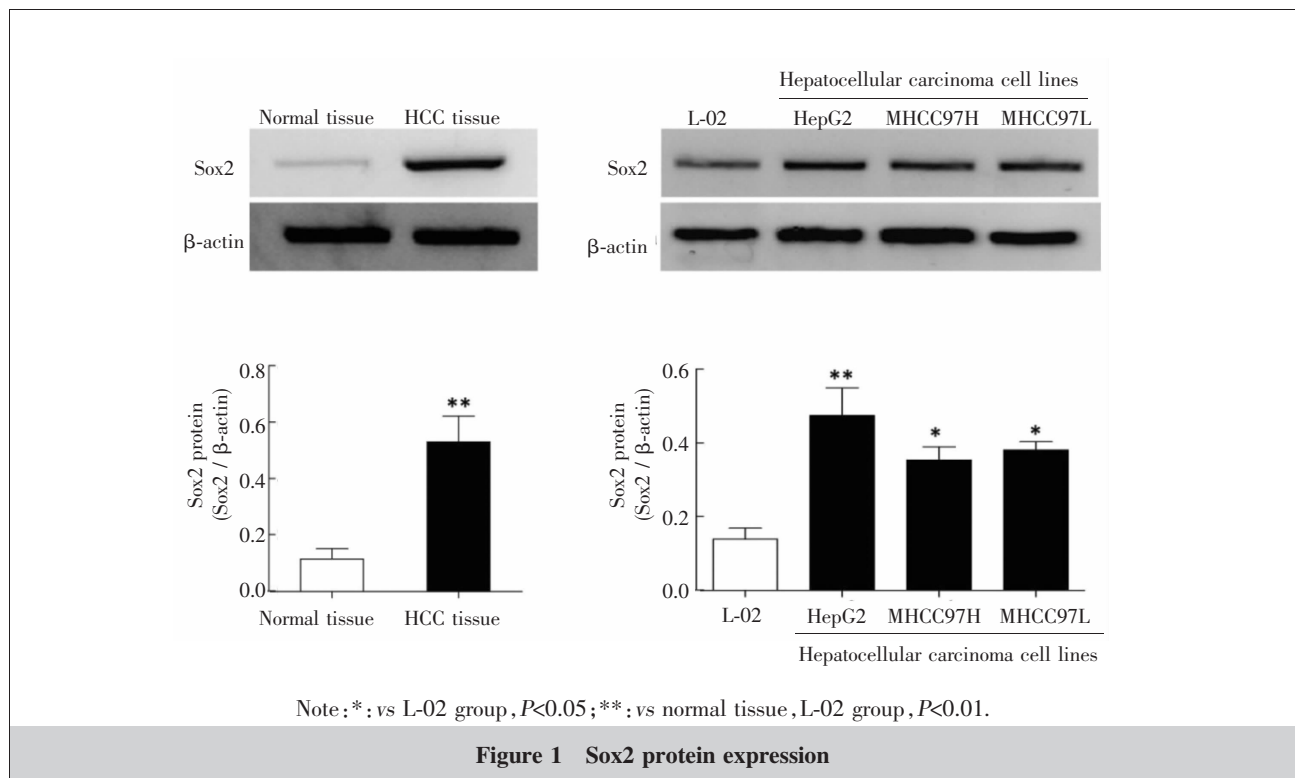
将 HepG2 细胞系 Sox2 基因干涉后,连续 5d 测量细胞生长情况。MTT 结果显示,3~5d 时间点, HepG2 细胞 Sox2 干涉组吸光度 A_{490} 值分别是 0.347 ± 0.031 、 0.403 ± 0.034 、 0.478 ± 0.041 ,均小于相同时间段空白对照组及阴性对照组,且有统计学差异 ($P<0.05$),而空白对照组、阴性对照组吸光度 A_{490} 值比较无统计学差异 ($P>0.05$) (Figure 2)。细胞生长曲线显示,抑制 Sox2 表达能抑制肝癌细胞 HepG2 的生长。

2.3 降低 Sox2 抑制肝癌细胞 HepG2 的 DNA 合成

细胞掺入 BrdU 后,荧光显微镜下观察发现,带有绿色细胞核的细胞即为处于 DNA 合成期,细胞处于增殖期。经统计学分析,我们发现 HepG2 细胞 Sox2 基因被干涉 72h 后,干涉组中细胞 BrdU 掺入率为 $24.0\%\pm4.98\%$,而空白对照组和阴性对照组分别为 $42.0\%\pm4.848\%$ 、 $40.4\%\pm5.225\%$,干涉组 BrdU 掺入率明显降低,有统计学差异 ($P<0.05$) (Figure 3),表示处于增殖期的细胞数目减少。而空白对照组与阴性对照组相比无统计学差异 ($P>0.05$);BrdU 掺入实验显示,抑制 Sox2 水平,能抑制肝癌细胞 HepG2 的 DNA 合成。

2.4 Sox2 基因干涉后能降低 Wnt/ β -catenin 通路活性

我们进一步探讨 Sox2 促进肝癌细胞生长的机制,主要观察 Sox2 对 Wnt/ β -catenin 通路的影响。Western Blot 结果显示,干涉 Sox2 基因后,HepG2 细胞系中 Wnt/ β -catenin 蛋白水平分别为空白对照组的 57.5%、48.7%,Wnt/ β -catenin 蛋白表达明显降低且呈正相关 ($P<0.05$) (Figure 4),而空白对照组与阴性对照组相比无统计学差异 ($P>0.05$)。结果提示 Sox2 促进肝癌细胞生长、增殖的机制可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 通路达成的。



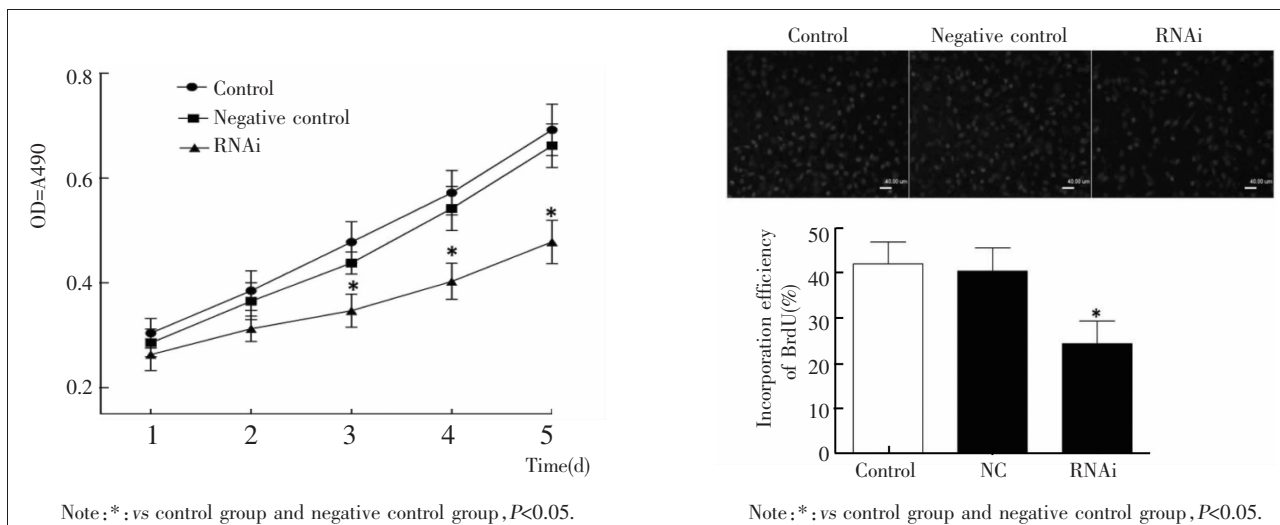
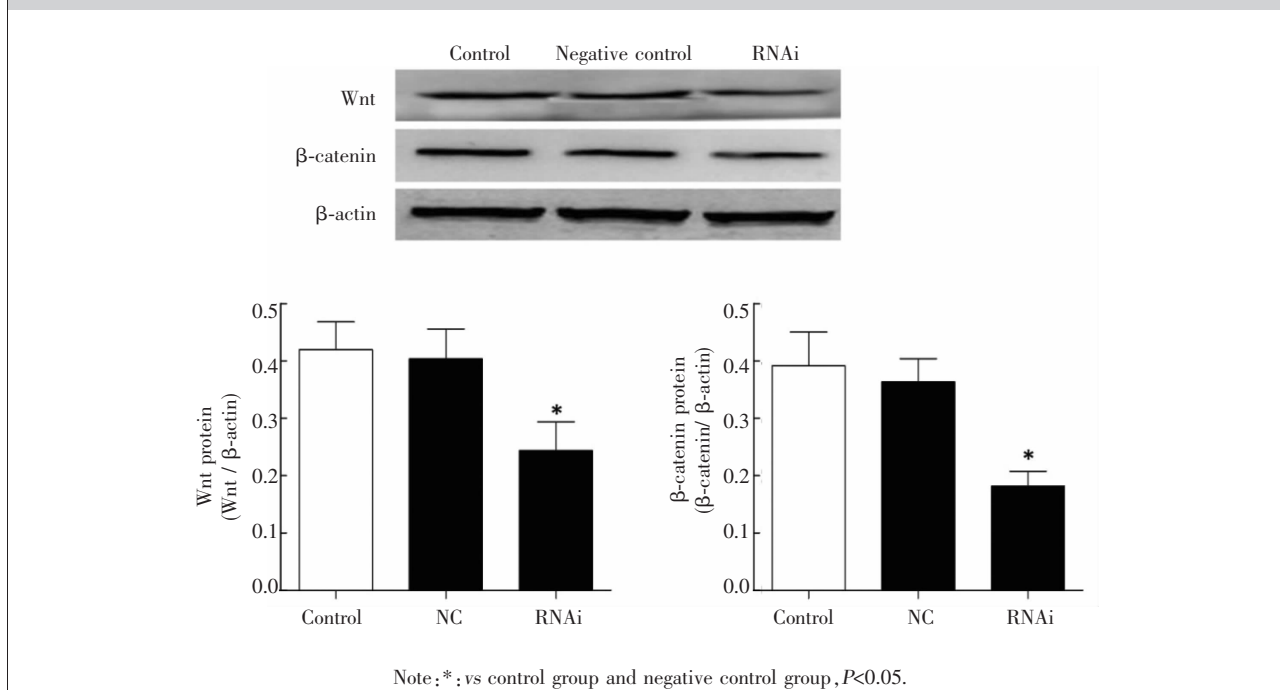


Figure 2 HepG2 cell growth curve

Figure 3 Incorporation efficiency of BrdU on HepG2

Figure 4 Wnt and β -catenin protein expression in HepG2 cell

3 讨论

Sox2 是一个维持胚胎干细胞生长,控制胚胎发育的重要转录因子,在胚胎期是激活状态,在成年期则活化状态减弱^[7]。多项研究发现人类多种肿瘤与 Sox2 有着密切关系。Gen 等^[8]发现 Sox2 在食管鳞癌中高表达,同时还发现在恶性程度不同的食管癌中表达不同,提示 Sox2 可能与患者预后不良有关。在

结肠癌的研究中,Neumann 等^[9]发现 Sox2 在结肠癌患者组织中的表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$),且 Sox2 表达水平与结肠癌的转移程度密切相关。在非小细胞肺癌组织中检出高水平的 Sox2 基因表达^[10],前列腺癌细胞中 Sox2 表达水平也明显高于相应正常细胞^[11]。

本研究结果显示 Sox2 在肝癌细胞中表达较正常肝细胞明显升高。Sox 家族最初是在胚胎干细胞

研究中发现的,在调控胚胎及组织的发育等方面具有重要作用。肝癌中存在干细胞已得到共识,肝癌干细胞是肝癌发生、转移的重要原因。在胚胎期,Sox2参与调控胚胎的重要分子,其在肝癌细胞中的表达增多可能与肝癌干细胞有密切关联,提示 Sox2 在肝癌发生中有重要作用。通过 RNA 干扰技术,我们抑制了 Sox2 基因的表达,将 siRNA 片段转染入 HepG2 细胞后,干扰效率大约为 70%,我们观察干涉 Sox2 基因后能够抑制肝癌细胞的 DNA 合成及细胞的增殖,表明 Sox2 分子具有促进肝癌细胞生长的作用,在干细胞研究中也发现 Sox2 促进了细胞的生长、更新。

我们进一步探讨 Sox2 促进肝癌细胞生长的机制。Wnt 是调控胚胎发育的三大通路之一。胚胎发育期,Wnt 持续激活,并激活下游信号蛋白 β -catenin, β -catenin 进一步激活转录因子 T 细胞转录因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)等,TCF/LEF 调控多种基因转录^[12]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路中的组成部分,调控 Wnt 信号的传递,Wnt 信号通路作为调控胚胎发育的重要通路,一旦在成年哺乳动物体中异常激活,则导致肿瘤的发生、发展^[13],Sox2 对肝癌的发生、增殖作用可能是由于 Wnt 信号激活导致。因此我们选择 Wnt/ β -catenin 信号通路为观察对象。实验结果发现,降低 Sox2 表达后,Wnt/ β -catenin 的水平均降低,该通路信号被抑制。综上所述,我们认为 Sox2 促进肝癌细胞生长、增殖,其机制是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路完成的;更有趣的是也有报道在胃癌中表达下调,Sox2 过度表达则通过抑制细胞周期 Cyclin-D1 表达而抑制肿瘤细胞增殖^[14]。或许在不同组织细胞中 Sox2 的作用机理不同,有待进一步研究。

我们只是初步观察了离体水平 Sox2 对肝癌细胞生长、增殖的作用,我们下步打算寻求降低 Sox2 表达的药物,在体水平进一步观察 Sox2 对肝癌发生、发展的作用。随着 Sox2 研究发展的深入,我们期待出现以 Sox2 为靶向的抗肿瘤药物应用于肝癌及其他肿瘤的治疗。

参考文献:

- [1] Psyrri A, Arkadopoulos N, Vassilakopoulou M, et al. Pathways and targets in hepatocellular carcinoma[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012, 12(10):1347-1357.
- [2] Songdo S, Bae SH. Changes of guidelines diagnosing hepatocellular carcinoma during the last ten-year period [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2012, 18(3):258-267.
- [3] Castillo SD, Sanchez M. The SOX family of genes in cancer development; biological relevance and opportunities for therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(9):903-919.
- [4] Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1):15-30.
- [5] Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 105(2-4):442-447.
- [6] Huang P, Qiu J, Li B, et al. Role of Sox2 and Oct4 in predicting survival of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(8-9):582-589.
- [7] Pei D. Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6):3365-3369.
- [8] Gen Y, Yasui K, Zen Y, et al. SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Gene Cytogenet*, 2010, 202(2):82-93.
- [9] Neumann J, Bahr F, Horst D, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:518.
- [10] Sasaki H, Yokota K, Hikosaka Y, et al. Increased Sox2 copy number in lung squamous cell carcinomas[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(1):44-48.
- [11] Kregel S, Kiriluk KJ, Rosem AM, et al. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53701.
- [12] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryo-genesis-a look outside the nucleus[J]. *Science*, 2000, 287(5458):1606-1609.
- [13] Vacik T, Lemke G. Dominant-negative isoforms of Tcf/Lef proteins in development and disease[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(24):4199-4200.
- [14] 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[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(4):824-831.