

# SOX1 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈冉, 戴立玲, 倪静

(江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

**摘要:** [目的] 探究性别决定区 Y 框蛋白 1 (sex determining region Y-box, SOX1) 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。[方法] 选择稳定表达 SOX1 基因的 HeLa 细胞株为实验组, 同时选择稳定表达空白质粒的 HeLa 细胞株和 HeLa 细胞为对照组。采用二甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 SOX1 对 HeLa 细胞增殖的影响; 通过细胞基质黏附实验、体外细胞迁移实验、体外细胞侵袭实验分别研究 SOX1 对 HeLa 细胞粘附、迁移、侵袭能力的影响; 采用明胶酶谱法检测细胞内相关蛋白的水平。[结果] 在研究第 1 天, 两组的增殖能力比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 实验组在研究第 3 天 ( $0.526\pm0.067$ )、第 5 天 ( $1.169\pm0.148$ )、第 7 天 ( $1.160\pm0.134$ ) 的增殖能力均显著性低于对照组 ( $P<0.05$ )。实验组黏附率 ( $0.754\pm0.041$ ) 显著性低于对照组 ( $0.931\pm0.135$ ) ( $P<0.05$ ); 实验组在 24h ( $5.84\pm1.20$ )、48h ( $10.28\pm3.01$ )、72h ( $14.51\pm2.31$ ) 迁移距离均显著性小于对照组 ( $P<0.05$ ); 实验组侵袭细胞的数量 ( $120.09\pm10.04$  个) 明显较对照组 ( $215.67\pm6.98$  个) 少 ( $P<0.05$ )。实验组基质金属蛋白酶 2 ( $0.981\pm0.199$ )、基质金属蛋白酶 9 ( $0.536\pm0.033$ )、波形纤维蛋白 ( $0.429\pm0.029$ ) 表达水平显著性低于对照组, SOX1、E 钙黏附蛋白水平明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。[结论] SOX1 表达水平升高, 会使宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭抑制, MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白表达水平降低, E-cadherin 表达水平升高。

**关键词:** 宫颈癌; 性别决定区 Y 框蛋白 1; 增殖; 迁移; 侵袭

**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0626-04

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B012

## Effect of SOX1 on Proliferation, Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells

CHEN Ran, DAI Li-ling, NI Jing

(Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research & The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of sex determining region Y-box (SOX1) on the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells. [Methods] HeLa cell line stably expressing SOX1 gene was selected as the study group, while HeLa cell line stably expressing blank plasmid and HeLa cell line as the control group. The effect of SOX1 on HeLa cell proliferation was detected by MTT method, the effect of SOX1 on HeLa cell adhesion, migration and invasion was studied by cell matrix adhesion test, cell migration test and cell invasion test, the level of related proteins in HeLa cell was detected by gelatin zymogram. [Results] There was no significant difference in proliferation rate at d1 of cell culture between study group and control groups ( $P>0.05$ ). The proliferation rate on d3 ( $0.526\pm0.067$ ), d5 ( $1.169\pm0.148$ ) and d7 ( $1.160\pm0.134$ ) in study group was lower than that in control group ( $P<0.05$ ). The adhesion rate in study group was significantly lower than that in control group ( $0.754\pm0.041$  vs  $0.931\pm0.135$ ,  $P<0.05$ ), the migration distance of the study group at 24h ( $5.84\pm1.20$ ), 48h ( $10.28\pm3.01$ ), 72h ( $14.51\pm2.31$ ) was significantly shorter than that of control group ( $P<0.05$ ), the number of invasive cells in the study group was significantly less than that of control group ( $120.09\pm10.04$  vs  $215.67\pm6.98$ ,  $P<0.05$ ). The expression levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) ( $0.981\pm0.199$ ), matrix metalloproteinase-9 (MMP9) ( $0.536\pm0.033$ ), vimentin ( $0.429\pm0.029$ ), and the levels of SOX1 and E-cadherin in the study group were significantly lower than those in control group ( $P<0.05$ ). [Conclusion] High SOX1 expression can inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells, and can decrease the expression of MMP2, MMP9 and vimentin, and increase the expression of E-cadherin.

**Subject words:** cervical cancer; sex determining region Y-box protein 1; proliferation; migration; invasion

宫颈癌的细胞增殖、迁移和侵袭的生物学行为是影响宫颈癌的主要因素之一。宫颈癌发生可能与

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 有关<sup>[1]</sup>, 而性别决定区 Y 框蛋白 (sex determining region Y-box, SOX) 家族在肿瘤干细胞中起着关键作用, SOX1 是最早被证实的转录因子之一, 在细胞胚胎发育、肿瘤的发生与发展中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。研究显示 SOX1

**通信作者:** 戴立玲, 实验师, 学士; 江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院科技处, 江苏省南京市百子亭 42 号 (210009); E-mail: 272444568@qq.com

**收稿日期:** 2019-10-22; **修回日期:** 2019-11-26

是通过抑制  $\beta$ -catenin 表达及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来对肿瘤的发生进行调控的<sup>[4]</sup>。本研究通过观察在宫颈癌患者 SOX1 基因稳定表达来探讨其对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

宫颈癌 HeLa 细胞株由 ATCC 公司提供;SOX1 干扰质粒由美国 Sigma 公司提供;二甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)试剂均由美国 Sigma 公司提供;纤维黏连蛋白(FN)由北京医科大学生物教研室提供;磷酸盐平衡生理盐水(PBS)缓冲液由赛默飞世尔科技有限公司提供;生物牛血清蛋白(BSA)由李记生物科技有限公司提供;DMEM 细胞培养基由 Gibco 公司提供;Transwell 小室由美国 Corning 提供;Matrigel 由美国 BD 公司提供。

### 1.2 实验分组

选择稳定表达 SOX1 基因的 HeLa 细胞株为实验组,同时选择稳定表达空白质粒的 HeLa 细胞株和 HeLa 细胞为对照组。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 检测细胞增殖

两组细胞在 96 孔板(2000 个/孔)的培养箱中进行接种,培养 1、3、5、7 天后,在孔内加 20 $\mu$ l MTT 继续孵育 4h 左右,吸弃培养基,加入 DMSO。每组 5 个复孔,采用酶标仪检测两组细胞在 490nm 波长处的吸光值,然后分析其增殖差异。

#### 1.3.2 检测细胞黏附

用 PBS 将纤维黏连蛋白配成 0.02 $\mu$ g/ $\mu$ l,将其注入到 96 孔板中,每孔 50 $\mu$ l,在 4℃ 中包被过夜;将 5% BSA 与 37℃ 密闭培养 40min,用无血清 DMEM 培养液漂洗 3 次,除去多余纤维黏连蛋白;培养 HeLa 和 HeLa-SOX1 细胞悬液,接种于上述孔中,浓度为  $4 \times 10^5$  个细胞/孔,每个细胞 9 个重复孔,在 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12h;取每组中 6 个重复孔的上清液,离心处理后酶谱分析,490nm 处吸光度;用 PBS 漂洗 6 个重复孔细胞,3 个用于测定总细胞的吸光度;每个孔在加入 MTT 在培养箱中培养 4h,加入 DMSO 200 $\mu$ l,震荡 10min。黏附率=(黏附细胞 A/总细胞 A)×100%。

#### 1.3.3 检测迁移和侵袭

将两组无血清培养基稀释的细胞悬液加入到铺

好 Matrigel 的 Transwell 上室中,在下室加入 10% PBS 培养基,在培养箱中孵育 24h,风干后甲醇固定 30min,苏木素染色 3min,观察并记录迁移的距离。侵袭实验,则是将 Matrigel 加入到小室上层底部,然后依据上述实验步骤进行操作,观察并记录侵袭细胞的数量。

#### 1.3.4 检测相关蛋白的表达

取 20  $\mu$ l 总蛋白,采用明胶酶谱法检测 SOX1、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase, MMP2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP9)、E 钙黏附蛋白(E-cadherin)和波形纤维蛋白(Vimentin)。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 进行数据分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验比较差异;计数资料用百分比表示,采用  $\chi^2$  检验比较组间差异。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞增殖比较

研究第 1 天,两组增殖能力比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );但在第 3 天、第 5 天、第 7 天,实验组增殖能力显著性低于对照组( $P < 0.05$ )(Table 1)。

Table 1 Comparison of cell proliferation in two groups

| Time | Study group       | Control group     | $t$   | $P$   |
|------|-------------------|-------------------|-------|-------|
| d1   | 0.355 $\pm$ 0.046 | 0.367 $\pm$ 0.054 | 1.385 | 0.357 |
| d3   | 0.526 $\pm$ 0.067 | 0.743 $\pm$ 0.092 | 7.294 | 0.034 |
| d5   | 1.169 $\pm$ 0.148 | 1.635 $\pm$ 0.148 | 8.532 | 0.025 |
| d7   | 1.160 $\pm$ 0.134 | 1.641 $\pm$ 0.146 | 7.913 | 0.031 |

### 2.2 细胞黏附比较

实验组黏附率为 0.754 $\pm$ 0.041,对照组黏附率为 0.931 $\pm$ 0.135;实验组黏附率显著性低于对照组( $t=8.657$ ,  $P=0.021$ )。

### 2.3 细胞迁移比较

实验组在 24h、48h、72h 迁移的距离分别为 (5.84 $\pm$ 1.20) $\mu$ m、(10.28 $\pm$ 3.01) $\mu$ m、(14.51 $\pm$ 2.31) $\mu$ m,对照组在这三个时间段的迁移距离分别为 (12.76 $\pm$ 2.61) $\mu$ m、(21.13 $\pm$ 4.17) $\mu$ m、(28.59 $\pm$ 5.64) $\mu$ m;实验组每个时间段迁移距离均小于对照组 ( $P < 0.05$ )(Table 2, Figure 1)。

### 2.4 细胞侵袭比较

实验组侵袭细胞数量为 (120.09 $\pm$ 10.04) 个,对照

组侵袭细胞数量为 $(215.67 \pm 6.98)$ 个;实验组侵袭细胞数量显著性少于对照组( $t=15.709, P<0.001$ )(Figure 2)。

## 2.5 相关蛋白表达比较

实验组 MMP2、MMP9、波形纤维蛋白表达水平显著性低于对照组( $P<0.05$ ), SOX1、E-cadherin 水平明显高于对照组( $P<0.05$ )(Table 3, Figure 3)。

## 3 讨论

细胞增殖、迁移和侵袭等生物行为是影响宫颈癌的发生、发展以及预后的重要因素<sup>[5]</sup>。SOX 家族参与宫颈癌细胞的发生与发展,且 SOX1 自身或通过影响其他因子或通路来抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[6-7]</sup>。

宫颈癌患者的病情发展以及预后与宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关。在本次研究结果中,实验组的增殖能力、黏附率、迁移距离、侵袭细胞数目均显著性低于对照组( $P<0.05$ )。在胡爱萍等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,SOX1 表达组细胞增殖、迁移和侵袭能力较低。本研究结果与之相符。研究表明,实验组宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力较对照组弱,提示当 SOX1 表达越活跃时,宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力越低。因此,在治疗过程中可通过上调 SOX1 的表达,从而达到抑癌的目的。

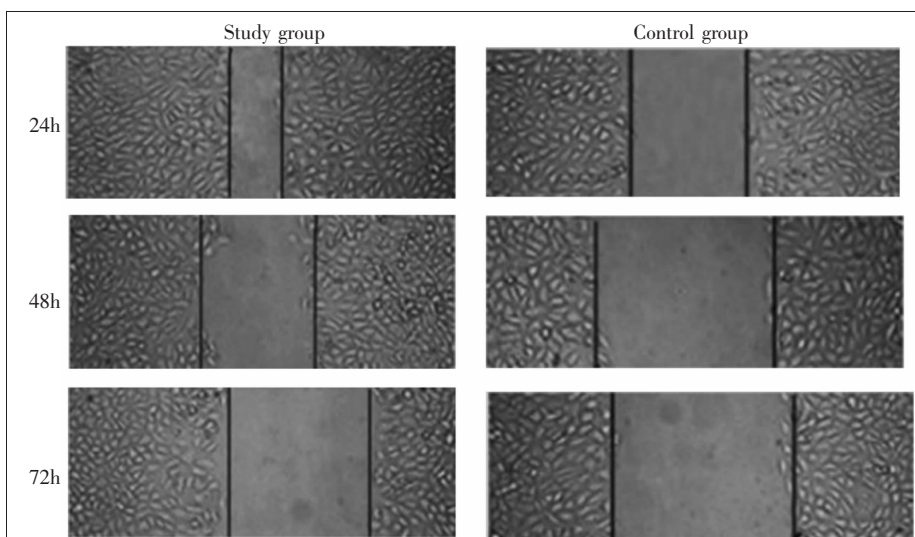
研究报道,SOX 家族可参与肿瘤细胞的发生与发展,SOX1 可通过抑制或促进相关蛋白或通路进而影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。E-cadherin 是上皮标志物,该蛋白的缺失参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭过程<sup>[10]</sup>。实验组的宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力低于对照组,

**Table 2 Comparison of cell migration in two groups( $\mu\text{m}$ )**

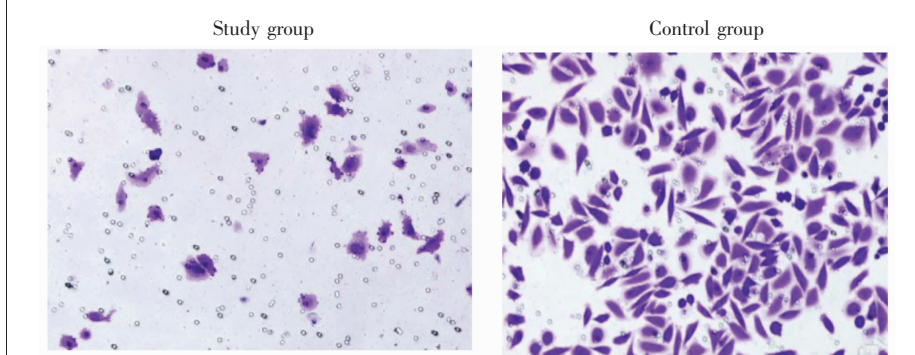
| Time | Study group      | Control group    | <i>t</i> | <i>P</i> |
|------|------------------|------------------|----------|----------|
| 24h  | 5.84 $\pm$ 1.20  | 12.76 $\pm$ 2.61 | 8.269    | 0.029    |
| 48h  | 10.28 $\pm$ 3.01 | 21.13 $\pm$ 4.17 | 8.582    | 0.025    |
| 72h  | 14.51 $\pm$ 2.31 | 28.59 $\pm$ 5.64 | 9.362    | 0.019    |

**Table 3 Comparison of the expression of related proteins in two groups**

| Index      | Study group       | Control group     | <i>t</i> | <i>P</i> |
|------------|-------------------|-------------------|----------|----------|
| SOX1       | 0.981 $\pm$ 0.199 | 0.526 $\pm$ 0.094 | 7.921    | 0.031    |
| MMP2       | 0.536 $\pm$ 0.033 | 1.039 $\pm$ 0.023 | 9.495    | 0.015    |
| MMP9       | 0.429 $\pm$ 0.029 | 0.774 $\pm$ 0.050 | 8.502    | 0.027    |
| E-cadherin | 0.486 $\pm$ 0.044 | 0.299 $\pm$ 0.029 | 9.460    | 0.017    |
| Vimentin   | 1.385 $\pm$ 0.119 | 2.246 $\pm$ 0.034 | 8.649    | 0.022    |



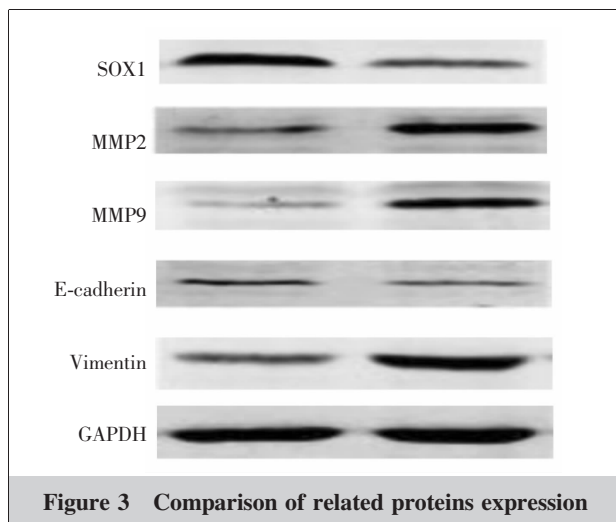
**Figure 1 Comparison of SOX1 effect on cervical cancer cell migration( $\times 40$ )**



**Figure 2 Effect of SOX1 on cell invasion in two groups(crystal violet staining $\times 200$ )**

SOX1 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著性高于对照组( $P<0.05$ )。因此,宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力与 SOX1、E-cadherin 蛋白有关。SOX1、E-cadherin 蛋白表达水平越高,其增殖、迁移和侵袭能力越低,抑癌作用越明显。MMPs 是由肿瘤细胞分泌的





一种参与肿瘤细胞生长、增殖、转移等生物学行为的蛋白酶,有抑癌作用<sup>[11]</sup>。Vimentin 是上皮间质的标志物之一,通过调控其水平,能够达到抑癌或促癌的作用。实验组 MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白的表达水平显著性低于对照组 ( $P<0.05$ )。因此, MMP2、MMP9、Vimentin 与宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭相关<sup>[12]</sup>。MMP2、MMP9、Vimentin 表达水平越高,则宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力越强,癌细胞的扩散加快,病情发展迅速,使疾病恶化进程加快。在陈禹宏等<sup>[13]</sup>的研究中,是通过下调 MARCH8 表达水平来降低宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,从而达到抑癌作用。MMP9、Vimentin 蛋白表达水平降低, E-cadherin 蛋白水平明显升高,与本文的研究结果相符。在本研究中,实验组 SOX1、E-cadherin 蛋白水平较高, MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白水平较低,肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭的能力较弱,抑癌作用明显。因此,可通过调控 SOX1 水平,使宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力降低,起到抑癌作用。

综上所述, SOX1 高表达能够抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制 MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白表达,促进 E-cadherin 蛋白表达,抑制癌症的发生与发展。因此在临床治疗中,可通过上调 SOX1 水平,从而起到抑癌作用。

## 参考文献:

[1] Orsini A, Bonuccelli A, Striano P, et al. Generalized epilepsy and mild intellectual disability associated with 13q34 deletion: a potential role for SOX1 and ARHGEF7 [J]. *Seizure*, 2018, 59(1): 38–40.

[2] Ooft ML, Van Ipenburg J, vanLoo R, et al. Molecular profile of nasopharyngeal carcinoma; analysing tumour suppressor gene promoter hypermethylation by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(4): 351–359.

[3] Yin C. Molecular mechanisms of SOX transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63(1): 68–78.

[4] Huang J, Tan ZR, Yu J, et al. DNA hypermethylated status and gene expression of PAX1/SOX1 in patients with colorectal carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10(1): 4739–4751.

[5] Walker S, Hamilton W. Risk of cervical cancer in symptomatic women aged  $\geq 40$  in primary care: a case-control study using electronic records[J]. *Br J Gen Pract*, 2017, 26(614): E643–E648.

[6] Agam Bansal, Abhijit Pakhare, Neelkamal Kapoor, et al. Knowledge, attitude, and practices related to cervical cancer among adult women: a hospital-based cross-sectional study[J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2018, 6(2): 324–328.

[7] Zhang Z, Wang J, Li J, et al. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4[J]. 2018, 97(1): 511–517.

[8] Hu AP, Wu GK, Wu YJ, et al. SOX1 overexpression inhibits gastric cancer cell proliferation and invasion through  $\beta$ -catenin pathway[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2019, (14): 1722–1727. [胡爱萍, 吴贵恺, 吴艳杰, 等. SOX1 过表达通过  $\beta$ -catenin 通路抑制胃癌细胞增殖和侵袭 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, (14): 1722–1727.]

[9] Li SJ, Yang FX, Wang MY, et al. MIR-378 functions as an onco-miRNA by targeting the ST7L/Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cervical cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1047–1056.

[10] Lorna G, Keenan Kathy Rock, Aini Azmi, et al. An atlas to aid delineation of para-aortic lymph node region in cervical cancer: design and validation of contouring guidelines [J]. *Radiother Oncol*, 2018, 127(3): 65–85.

[11] He Y, Northey JJ, Pelletier A, et al. The Cdc42/Rac1 regulator CdGAP is a novel E-cadherin transcriptional co-repressor with Zeb2 in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(24): 3490–3503.

[12] Chaninya Wongwarangkana, Nasamon Wanlapakorn, Jira Chansaenroj, et al. Retinoic acid receptor beta promoter methylation and risk of cervical cancer[J]. *World J Virol*, 2018, 7(1): 1–9.

[13] Chen YH, Meng Y, Hu LN, et al. The effect of down regulating the expression of March8 gene on the invasion, migration and proliferation of cervical cancer Siha cells[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2018, 34(7): 967–971. [陈禹宏, 孟莹, 胡丽娜, 等. 下调 MARCH8 基因的表达对宫颈癌 Siha 细胞侵袭、迁移与增殖的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(7): 967–971.]