DOI:10.16016/j.1000-5404.201506126

Sox2 下调表达对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 β-catenin 与转录中介因子 γ 的影响

李雄武,张 徽,柳满然 (400016 重庆,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心病理学教研室)

[**摘要**] **目的** 下调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Sox2 基因表达,观察对细胞增殖、侵袭和凋亡的影响以及信号因子 β-catenin 和 TIF1γ 表达的影响。**方法** 将 MDA-MB-231 细胞分为重组质粒转染组(转染 Sox2-shRNA 干扰载体)、阴性对照组(转染 pMafic7.1-shRNA-NC 质粒)、空白对照组(未经处理的 MDA-MB-231 细胞,$n=6$),并将 shRNA-Sox2-1 瞬时转入乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,通过 Western blot 检测乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 Sox2 蛋白表达水平,FCM 检测细胞凋亡的情况,Transwell 检测细胞的侵袭能力,MTS 检测细胞活力和增殖能力。另外,采用 Western blot 和免疫组化检测靶向抑制 Sox2 对信号因子β-catenin 和 TIF1γ 蛋白的表达与分布。**结果** 成功构建重组载体 pMafic7.1-shRNA-Sox2。与空白对照组(未转染组)和阴性对照组(转染 pMafic7.1-shRNA-NC)相比,pMafic7.1-shRNA-Sox2 转染至 MDA-MB-231 细胞后,Sox2 蛋白的表达水平明显下调($P<0.01$),细胞凋亡率明显增加($P<0.05$),细胞的侵袭能力、活力和增殖能力均明显下降($P<0.05$)。与空白对照组(0.79±0.07)和阴性对照组(0.74±0.10)相比,重组质粒转染组 β-catenin(0.15±0.04)蛋白的表达水平明显下调($P<0.05$);同样,与空白对照组(0.74±0.05)和阴性对照组(0.64±0.07)相比,重组质粒转染组 TIF1γ 蛋白(0.11±0.01)的表达水平明显下调($P<0.05$)。**结论** 靶向沉默 Sox2 基因能促进细胞凋亡,抑制细胞的增殖和侵袭,其作用可能与抑制 Wnt/β-catenin 信号通路与 TIF1γ 调控有关。

[**关键词**] 乳腺癌;RNA 干扰;凋亡;侵袭;Sox2;β-catenin;TIF1γ
[**中图法分类号**] R394.3; R730.23; R737.9 [**文献标志码**] A

Effect of targeted Sox2 silencing on expression of β-catenin and TIF1γ in human breast cancer MDA-MB-231 cells

Li Xiongwu, Zhang Hui, Liu Mangran (Department of Pathology, Research Center for Molecular Medicine and Cancer, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of short hairpin RNA-mediated silencing of Sox2 (sex determination region of Y chromosome-related HMG-box 2) on the invasion, proliferation and apoptosis in human breast cancer cells (MDA-MB-231) and on the expression of β-catenin and transcriptional intermediary factor 1γ (TIF1γ). **Methods** Constructed shRNA recombinant vector of targeted Sox2 gene was transfected into MDA-MB-231 cells. The cells transfected with plasmid pMafic7.1-shRNA-NC and those without served as negative and blank control. The protein expression of Sox2 in the 3 groups of cells was detect by Western blotting. The cell apoptosis was measured by flow cytometry. Transwell assay was used to detect the cellular invasiveness and metastasis. Cell vitality and proliferation were tested by MTS assay. The expression and distribution of β-catenin and TIF1γ protein were detected by Western blotting and immunohistochemical staining, respectively. **Results** Recombinant vector of pMafic7.1-shRNA-Sox2 was constructed successfully. When compared with negative and blank control cells, the transfected cells had obviously reduced level of Sox2 protein ($P<0.01$), significantly enhanced apoptotic rate ($P<0.05$), and remarkably reduced invasion, vitality and proliferation capacities ($P<0.05$). The expression level of β-catenin was significantly decreased in the transfected cells (0.15±0.04) than the negative (0.74±0.10) and blank

[**通信作者**] 张 徽, E-mail:zhanghui200157@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.012.html(2015-11-24)

control cells (0.79 ± 0.07, both $P < 0.05$). So was that of TIF1γ (0.11 ± 0.01 *vs* 0.64 ± 0.07 and 0.74 ± 0.05, both $P < 0.05$). **Conclusion** Targeted silencing of Sox2 enhances the apoptosis, and inhibits the proliferation and invasion in breast cancer cells, which may be related in the inhibition of Wnt/β-catenin signal pathway and TIF1γ.

[**Key words**] breast cancer; RNA interference; apoptosis; invasion; Sox2; β-catenin; transcriptional intermediary factor 1γ

Corresponding author: Zhang Wei, E-mail: zhanghui200157@sina.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率为全身恶性肿瘤的7% ~10%。乳腺癌恶性程度高,发病率和病死率逐年上升,严重影响妇女身心健康甚至危及生命。尽管对乳腺癌的研究日趋深入,但其生物学行为尚未完全阐明[1]。性别决定相关基因簇(sex determination region of Y chromosome-related HMG-box 2, Sox)基因家族是一类Y染色体上的性别决定区(sex determination region of Y chromosome,SRY)的相关基因构成的基因家族,编码一系列Sox(SRY-related HMG-box)家族的转录因子,其产物都具有1个HMG基序保守区,因此为一类具有HMG特征性结构的编码转录因子的基因[2]。Sox基因在个体发育过程中广泛参与了早期胚胎发育、神经发育等多种发育过程[2]。其中,转录因子Sox2是Sox基因家族的一个重要成员。Sox2基因作为致癌基因近年来备受关注。有研究发现,Sox2是在胚胎干细胞多能性维持和在肿瘤多个发育过程起重要作用的转录因子[3]。另有研究证实,其在人类许多恶性肿瘤(前列腺癌、肺腺癌和宫颈癌等)中呈过度表达状态,并且Sox2的过表达主要集中在某些癌症低分化亚型,可以作为肿瘤的重要预测因子[4]。通过基因组分析发现,在小细胞肺癌中Sox2是一个常见的扩增基因,与肿瘤的发展与预后有强烈相关性[5]。不管如何,Sox2基因对肿瘤的作用机制尚有待深入探讨。

转录中介因子1γ(transcriptional intermediary factor 1γ,TIF1γ)是一种新型的转化生长因子(transforming growth factor,TGF)-β/Smad信号调控关键因子[6]。有研究结果显示,在非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer,NSCLC)中,TIF1γ是Sox2的1个重要下游靶点[6]。而又有研究表明,TIF1γ在肿瘤抑制TGF-β/Smad信号中起着重要作用[7]。因此,我们推测在乳腺癌发展过程中,Sox2是否调控TIF1γ的表达,从而进一步影响TGF-β/Smad信号。另外,最近的研究揭露了Sox2和WNT信号通路相互之间复杂的作用关系[8]。因此,本研究应用RNA干扰技术,将靶向Sox2的特异性短发夹RNA(shRNA)转染乳腺癌MDA-MB-231细胞,观察其对细胞Sox2 mRNA表达水平和细胞增殖和凋亡以及侵袭能力的影响,并观察Sox2对TIF1γ和WNT信号因子的影响作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌MDA-MB-231细胞由本实验室保存;质粒DNA抽提试剂盒购自德国QIAGEN;Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen;改良1640培养基以及新生小牛血清购自意大利Gibical;反转录试剂盒购自日本TaKaRa;兔抗Sox2、β-catenin多克隆抗体购自美国Santa Cruz;兔抗TIF1γ多克隆抗体购自美国Abcam公司;β-actin购自北京中杉金桥有限公司;Sox2基因引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;Sox2干扰载体由上海生博医学生物工程科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达载体pMafic7.1-shRNA-Sox2的构建和测定根据 GenBank中人Sox2基因序列(NM_003106.3→NP_003097.1)。按照shRNA的设计原则和表达质粒pMafic7.1酶切位点的要求,设计4条靶向Sox2基因的shRNA(分别命名为shRNA-Sox2-1、shRNA-Sox2-2、shRNA-Sox2-3、shRNA-Sox2-4)和1条不针对任何靶基因的非特异性阴性对照shRNA(命名为shRNA-NC),由上海生博生物医药科技有限公司合成。由重庆医科大学生命科学学院进行序列测定。将序列正确的重组载体分别命名为pMafic7.1-shRNA-Sox2-1、pMafic7.1-shRNA-Sox2-2、pMafic7.1-shRNA-Sox2-3、pMafic7.1-shRNA-Sox2-4、pMafic7.1-shRNA-NC。

1.2.2 细胞培养及质粒转染 MDA-MB-231细胞使用含10%新生小牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的改良1640培养基,置于37 ℃、5%体积分数的CO_2饱和湿度培养箱内培养,根据细胞生长状况,每1天换液1次,每3天传代1次。取处于对数生长期的细胞,接种于6孔板中,2×10^5个/孔,用不含抗生素的改良1640培养液培养24 h,待细胞融合度为85% ~90%时,按Lipofectamine 2000转染试剂盒的说明书方法,将构建好的重组载体质粒进行转染,转染时用不含血清和抗生素的改良1640培养基。转染后细胞培养6 h,换成含血清不含抗生素的培养液,继续培养48 h,通过流式细胞仪测定转染效率,重组载体质粒

转染72 h后,在培养液中加入终质量浓度为500 μg/mL(最佳筛选浓度)的G418,每36小时换液1次,经2周左右筛选得到稳定转染的细胞株,收集细胞后进行扩大培养。

1.2.3 实验分组 所有实验分为3组:①重组质粒转染组(转染Sox2-shRNA干扰载体的MDA-MB-231细胞);②阴性对照组(转染pMafic7.1-shRNA-NC质粒的MDA-MB-231细胞);③空白对照组(未经处理的MDA-MB-231细胞,$n=6$)。

1.2.4 qPCR检测Sox2的mRNA表达水平 质粒转染48 h后,移去培养液,加入PBS液清洗2遍后,用细胞刮刀收集细胞于1.5 mL离心管,每个离心管中分别加入1 mL RNAiso Plus,反复吹打,充分裂解,室温静置5 min后于4 ℃低温离心5 min,12 000 r/min;然后将上清液移入EP管中,分别加入200 μL氯仿,剧烈振荡后室温下静置10 min,4 ℃低温离心机离心,12 000 r/min,15 min;再将上清液分别转移入另一EP管中,分别加入约600 μL异丙醇,剧烈震荡后室温下静置10 min,于4 ℃低温离心机中离心10 min,12 000 r/min;小心移去上清液,向EP管中缓慢地加入1 mL 75%的乙醇清洗沉淀后,于低温离心机中离心5 min,7 500 r/min;移去乙醇后于室温下自然干燥,加入20 μL DEPC水溶解RNA沉淀,将提取的RNA按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书要求进行逆转录合成得到cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增,最后用PCR仪测定Sox2的mRNA表达水平。

1.2.5 Western blot检测蛋白表达 将处理后的各组细胞收集,预冷的PBS清洗2~3遍。加入预先准备好的细胞裂解液(含蛋白酶、磷酸酶抑制剂等),冰上充分混匀裂解提取总蛋白,使用Bradford法测定总蛋白浓度。加入1/4体积的5×Buffer SDS上样缓冲液。于沸水中煮10 min以达到变性目的。分装后于-20 ℃或-80 ℃冰箱中保存。配置8% SDS-PAGE聚丙烯凝胶,按照每孔总蛋白为30 μg上样。电泳完毕后将蛋白质转移至二氟化树脂(polyvinylidene difluorede,PVDF)膜上,转印完毕加入5%脱脂奶粉室温下封闭2 h。封闭完毕加入兔抗人Sox2(1∶500)、β-catenin(1∶500)、TIF1γ(1∶500)以及β-actin(1∶1 000)一抗4 ℃过夜;室温复温1 h后TBST洗涤3次;二抗(1∶2 000)室温反应1 h,TBST洗涤3次,加入化学发光显色剂显色。采用Image J图像分析软件,测量Sox2/β-actin、β-catenin/β-actin、TIF1γ/β-actin蛋白灰度值。实验重复3次。

1.2.6 MTS比色法细胞繁殖定量检测试剂盒检测shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞存活率和LDH的影响 将MDA-MB-231细胞接种于96孔板中,调整细胞密度为1×10^4个/mL,培养24 h后,每孔分别加入10 μL MTS试剂,培养2 h后,用酶标仪分别测定各组$D(490)$值,并通过公式[实验组$D(490)$-空白组$D(490)$]/[对照组$D(490)$-空白组$D(490)$]计算出细胞的相对存活率。同样,细胞接种于96孔板,转染后培养,收集各组培养液,按LDH试剂盒说明操作,分别测得各组$D(490)$值后,按照公式计算得出细胞的损伤率。

1.2.7 FCM检测shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞凋亡率的影响 分别收集各实验组细胞,胰酶消化,PBS清洗后制成单细胞悬液,加入培养液使细胞密度约为1×10^6个/mL,PBS液洗涤细胞2次离心,将细胞沉淀送重庆医科大学生命科学学院,BD influx检测细胞凋亡率。

1.2.8 Transwell检测shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响 按Chemicon公司的ECM550系列说明书要求,制备有基质胶的Transwell小室,将各组细胞分别接种200 μL于Transwell小室内,调整密度为5×10^3个/mL,24孔板下室内分别加入700 μL含FBS的培养液,培养24 h后,吸除小室内的培养液,用棉签轻轻擦去小室内的基质胶,用PBS清洗1遍后风干,将小室浸泡于甲醛内20 min后,用PBS清洗1遍后风干,将小室浸泡于结晶紫中染色20 min,染色后,用PBS清洗3遍后风干,于正置显微镜下成像。

1.2.9 细胞免疫组化 细胞经过胰酶消化、离心、计数。取6孔板,放消毒无菌盖玻片后种植细胞,加入培养基。取出细胞爬片后,用PBS洗3遍,然后用多聚甲醛固定10 min。取出后用PBS洗3遍。进行细胞免疫组化时,取出爬片,加入5%正常山羊血清封闭,37 ℃,10 min。甩去血清,加入兔抗TIF1γ多克隆抗体(1∶100,Abcam,美国),37 ℃,1 h。PBS洗3遍,滴加生物素化的二抗,37 ℃,20 min。再用PBS洗3遍,滴加三抗(SAB复合物),37 ℃,20 min。用PBS洗3遍,DAB显色,镜下观察,适时终止。苏木精复染,室温,30 s,自来水冲洗。自来水冲洗返蓝,15 min。80%、95%、100%各5 min梯度酒精脱水。二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各透明5 min。中性树胶封片,光学显微镜采图。

1.3 统计学方法

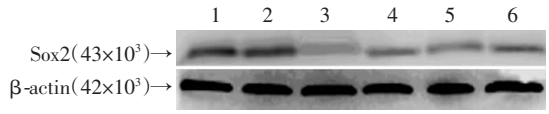
实验数据采用SSPS 19.0统计软件进行统计分析。计量资料均以$\bar{x}\pm s$表示,组间差异采用单因素方差分析(F检验),组间两两比较采用SNK方法(q检验)。$P<0.05$认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞Sox2蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,4组shRNA-Sox2重

组质粒转染组 Sox2 蛋白的表达水平较空白对照组和阴性对照组均明显下降(图 1);qPCR 检测结果同样地显示了 pMafic7.1- shRNA-Sox2-1、pMafic7.1-shRNA-Sox2-2、pMafic7.1- shRNA-Sox2-3、pMafic7.1- shRNA-Sox2-4 组的 Sox2 mRNA 表达水平分别下降了 86.10%、75.44%、63.65%、38.38%($P<0.01$)。通过 mRNA 与蛋白表达结果,我们认为 pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 片段是最有效的片段,后续实验都是用此片段进行;空白对照组和阴性对照组 Sox2 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:pMafic7.1-shRNA-Sox2-1;4:pMafic7.1-shRNA-Sox2-2;5:pMafic7.1-shRNA-Sox2-3;6:pMafic7.1-shRNA-Sox2-4

图 1 shRNA-Sox2-1 对 MDA-MB-231 细胞 Sox2 蛋白表达的影响

2.2 shRNA-Sox2 对 MDA-MB-231 细胞存活率和 LDH 的影响

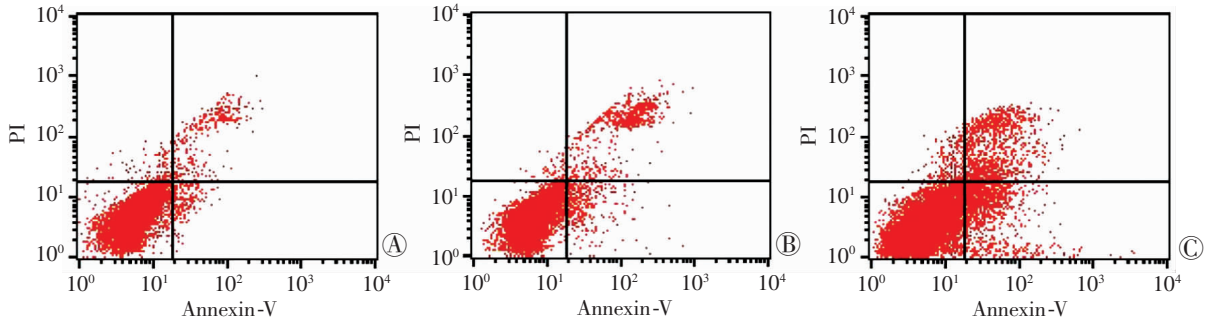
MTS 检测结果显示,重组质粒 pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,经公式[实验组 $D(490)$ - 空白组 $D(490)$]/[对照组 $D(490)$ - 空白组 $D(490)$]计算细胞相对存活率为 49.3%,差异有统计学意义($P<0.05$)。空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。同样,通过测定 LDH 值检测 shRNA-Sox2 对细胞损伤的影响,相对于空白对照组(0.227 ±0.009)和阴性对照组(0.235 ±0.008),LDH 释放率相对升高了 3 倍(0.806 ±0.009)。

2.3 shRNA-Sox2 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

FCM 检测结果显示,重组质粒 pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,细胞凋亡率(14.70%)较空白对照组(3.40%)和阴性对照组(4.61%)明显增加,尤其是早期凋亡细胞增加明显($P<0.05$)。空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 2)。

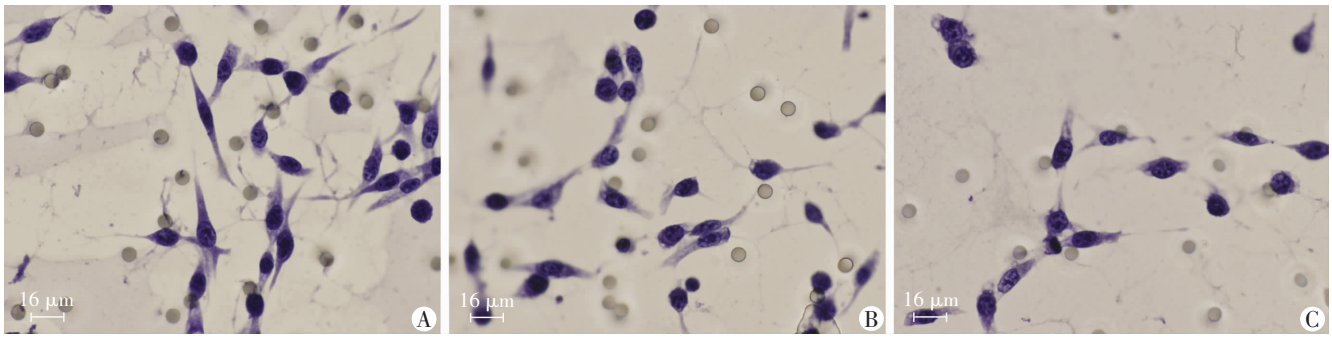
2.4 shRNA-Sox2 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

转染 48 h 后,空白对照组、阴性对照组和重组质粒转染组的侵袭个数分别为(24.5 ±2.4)、(27.5 ±2.8)、(15.0 ±2.0)个。重组质粒转染组穿过基底膜的细胞数目显著低于空白对照组($P<0.05$),空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。这说明下调 Sox2 基因后,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力明显下降。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:重组质粒转染组

图 2 FCM 检测 shRNA-Sox2 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:重组质粒转染组

图 3 Traswell 检测 shRNA-Sox2 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

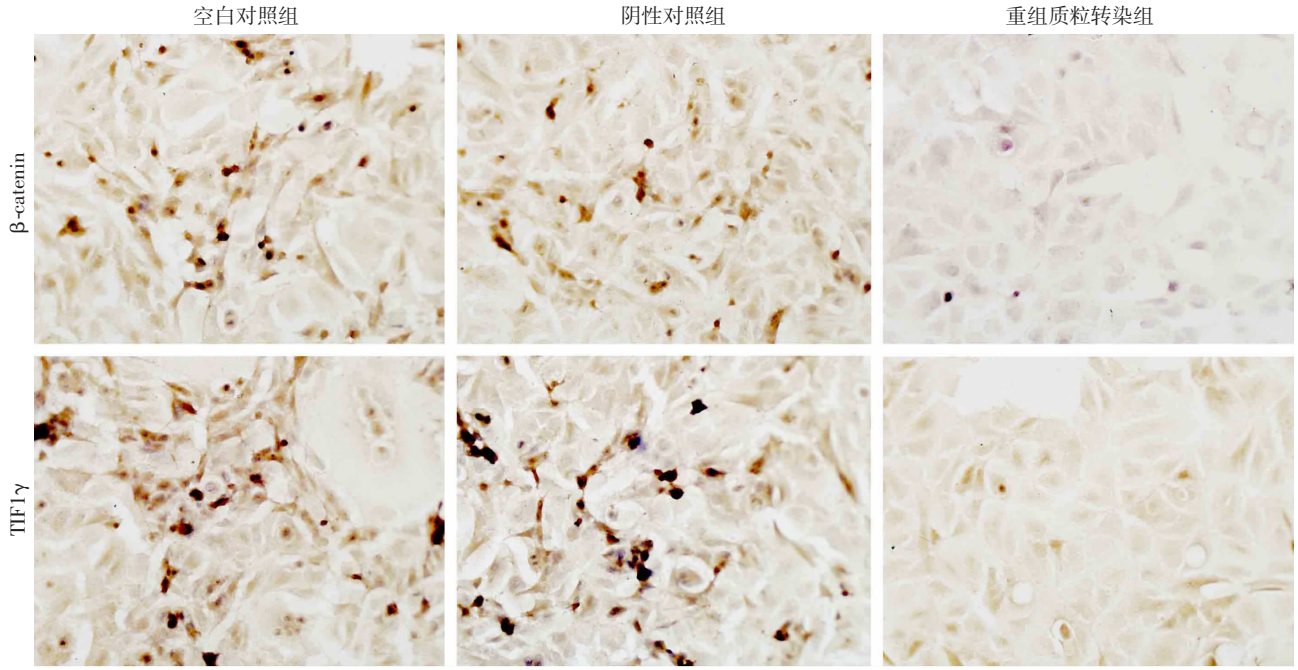


图4　免疫组化检测 shRNA-Sox2 抑制 MDA-MB-231 细胞 β-catenin 及 TIF1γ 的表达　（SABC　×400）

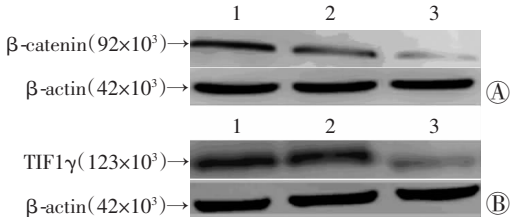
2.5　免疫组化检测 shRNA-Sox2 抑制 MDA-MB-231 细胞 β-catenin 和 TIF1γ 表达与分布

免疫组化检测结果显示,空白对照组和阴性对照组 β-catenin 主要表达于细胞质部位,重组质粒 pMafic 7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,β-catenin 散在表达于个别细胞中,蛋白表达水平明显减少(图4)。另外,免疫组化检测结果显示,空白对照组和阴性对照组 TIF1γ 主要表达于细胞质部位,重组质粒 pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,TIF1γ 散在表达个别细胞中,蛋白表达水平明显减少(图4)。

2.6　Western blot 检测 β-catenin 及 TIF1γ 的表达

Western blot 检测结果显示,重组质粒pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,β-catenin 蛋白的表达水平(0.15±0.04)较空白对照组(0.79±0.07)和阴性对照组(0.74±0.10)明显下调($P<0.05$);而空白对照组和阴性对照组间差异无统计学意义($P>0.05$,图5)。

另外,重组质粒 pMafic7.1-shRNA-Sox2-1 转染 MDA-MB-231 细胞后,TIF1γ 表达水平(0.11±0.01)较空白对照组(0.74±0.05)和阴性对照组(0.64±0.07)明显下调($P<0.05$);而空白对照组和阴性对照组间的差异无统计学意义($P>0.05$,图5)。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:重组质粒转染组

图5　Western blot 检测 shRNA-Sox2 抑制 MDA-MB-231 细胞 β-catenin(A)及 TIF1γ(B)的表达

3　讨论

本研究将靶向 Sox2 的特异性载体 shRNA-Sox2 转染至人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,结果发现 Sox2 mRNA 及蛋白的表达水平较对照组均明显下调,细胞的增殖活性下降,细胞的损伤率和细胞凋亡率增加;Western blot 检测结果显示,靶向沉默 Sox2 基因后,β-catenin 蛋白和 TIF1γ 的表达水平明显下降,故认为 Sox2 基因可能是通过刺激经典的 Wnt/β-catenin 信号通路和 TIF1γ 介导的 TGF-β/Smad 信号通路起作用,从而促进乳腺癌的发生与发展。

Sox2 是相对分子质量约为 34×10^3 的蛋白,位于人类染色体 3q26.3-q27 上,其表达的产物是一个包含有 317 个氨基酸残基的蛋白。Sox2 基因是 SRY 相关基

因家族中的一种,其结构较复杂,能够编码一些转录因子,参与性别决定、神经发育以及多种血细胞生成等多种组织器官发育的调控[9-10]。本研究结果显示,通过对4条片段的筛选,pMafic7.1-shRNA-Sox2-1片段是最有效的片段。通过基因与蛋白表达实验进一步证实了本实验设计的重组转染质粒能够有效敲除Sox2的基因和蛋白表达,为后续实验的研究铺垫良好基础。而shRNA-Sox2转染MDA-MB-231细胞后,表现出明显降低的细胞相对存活率(49.3%)和细胞损伤率(LDH释放率升高了3倍)。这些数据说明shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞具有较好的调控能力,并且转染后的细胞功能均相应改变。

另外,Sox2作为转录因子与多种肿瘤的发生、发展密切相关,尤其是与某些特别的肿瘤亚型密切相关[11],如研究发现Sox2基因参与了卵巢癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的形成和发展[12-14]。Sox2以致癌基因的形式在多种肿瘤(尤其是恶性肿瘤)中呈现高表达状态[15],Sox2基因的高表达不仅与许多恶性肿瘤的形成和发展密切相关,同时与肿瘤的临床治疗和预后不良也密切有关[16-17]。由于肿瘤的发生不仅与细胞的异常增殖和分化有关,也与细胞凋亡的异常有关[18]。因此,本研究进一步观察了干扰乳腺癌细胞Sox2后对细胞凋亡的影响。结果发现shRNA-Sox2转染MDA-MB-231细胞后,细胞凋亡率明显增加,尤其是早期凋亡细胞增加明显。这些数据说明shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞具有较好的凋亡调控能力。细胞凋亡受到阻碍,细胞的有序死亡将受到影响,从而会导致肿瘤的发生,这个过程涉及一系列转录因子的异常调节和表达。有研究发现,在胃癌组织中Sox2基因的表达水平与细胞周期和凋亡也有密切关系,主要表现为当Sox2表达水平下调时,细胞周期将受到阻滞,同时会促进细胞凋亡从而抑制细胞生长[14]。而本研究结果进一步说明Sox2对乳腺癌细胞周期同样具有阻滞作用,从而抑制了肿瘤细胞的生长。

又有研究表明,Sox2在肿瘤细胞侵袭和转移中起着重要作用。比如在胰腺导管癌组织的研究中,Nonaka等[19]发现Sox2的表达水平与胰腺上皮内瘤变级别呈正相关,而且在有神经血管侵犯、分化较差的胰腺导管癌中表达最强,提示Sox2基因在胰腺癌后期的侵袭和转移中起重要作用。最近另有研究表明,肿瘤干细胞比那些分化的癌细胞更易生成肿瘤,而且转录因子Sox2在维持非小细胞肺癌的这一属性上起着至关重要的作用[20]。而我们通过shRNA-Sox2对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响观察发现,下调Sox2基因后,MDA-MB-231细胞的侵袭能力明显下降。TGF-β具有广泛调节细胞行为的能力,包括细胞增殖、细胞凋亡、细胞侵袭和癌症的转移潜能等,从而进一步调控Smad3、Smad4,促进肿瘤的转移[7]。本研究结果提示,干扰Sox2的细胞能够影响到细胞转移能力,同时可以明显调控TIF1γ,说明Sox2抑制细胞侵袭能力可能通过TIF1γ介导的TGF-β/Smad信号起作用。另外,β-catenin是一种具有多种功能的蛋白质,目前已经发现β-catenin在许多的恶性肿瘤中都存在异常蓄积[15],其中包括胃癌、子宫内膜癌、肺癌、肝细胞癌、前列腺癌等。研究表明,经典Wnt信号通路在胚胎发育的各个阶段均有参与,且有着非常重要的作用,然而它的异常激活可导致肿瘤的发生与发展,尤其重要的是,在各种肿瘤中,均发现Wnt/β-catenin信号通路呈现异常激活状态[21]。最近的研究均揭露了Sox2和WNT信号通路之间复杂的相互作用。如文献[16]报道β-catenin的高表达与恶性胶质瘤的各种生物学行为均有关系,包括细胞增殖、侵袭转移和凋亡等。而我们通过进一步的实验观察发现,Sox2转染后的细胞能够较好地调控β-catenin蛋白,说明Sox2抑制细胞侵袭能力可能通过β-catenin信号起作用。

近年来,转录因子与肿瘤发生、发展的关系已成为研究热点,Sox2作为全能型或多能性干细胞标记物,是维持干细胞未分化状态、增殖等方面的关键因子之一[22],同时研究表明,肿瘤干细胞与耐药基因MDR密切相关[23],而耐药性已经成为临床治疗乳腺癌的最大障碍,故Sox2基因的进一步研究为乳腺癌的控制提供了新思路。

参考文献:

[1] Luo H, Tu G, Liu Z, *et al*. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression[J]. Cancer Lett, 2015, 361(2): 155-163. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.018

[2] 曹慧慧, 王昌留. Sox基因家族特点及其功能[J]. 鲁东大学学报: 自然科学版, 2011, 27(1): 58-63. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8020.2011.01.015.

[3] Sholl L M, Barletta J A, Yeap B Y, *et al*. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage Ⅰ lung adenocarcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(8): 1193-1198.

[4] Leow J J, Orsola A, Chang S L, *et al*. A contemporary review of management and prognostic factors of upper tract urothelial carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2015, 41(4): 310-319. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.02.006

[5] Rudin C M, Durinck S, Stawiski E W, *et al*. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer[J]. Nat Genet, 2012, 44(10): 1111-1116.

[6] Wang L, Yang H, Lei Z, *et al*. Repression of TIF1γ by SOX2 promotes TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer[J]. Oncogene, 2015, [Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/ng.2405

[7] Xue J, Lin X, Chiu W T, *et al*. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF-beta-dependent cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(2): 564-579. DOI: 10.1172/JCI71104

[8] Li X, Xu Y, Chen Y, *et al*. SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/beta-catenin signal network[J]. Cancer Lett, 2013, 336(2): 379-389. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.03.027

[9] 汪锐, 程汉华, 郭一清, 等. 脊椎动物SOX基因家族的系统发生分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 990-994.

[10] 袁虎, 王秋菊, 韩东一. SOX家族基因的功能及其研究进展[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2008, 28(6): 332-335.

[11] Darnell J E Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10): 740-749. DOI: 10.1038/nrc906

[12] Ye F, Li Y, Hu Y, *et al*. Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(1): 131-137. DOI: 10.1007/s00432-010-0867-y

[13] Sholl L M, Barletta J A, Yeap B Y, *et al*. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2010, 34(8): 1193-1198.

[14] Lengerke C, Fehm T, Kurth R, *et al*. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 42.

[15] Schmitz M, Temme A, Senner V, *et al*. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy[J]. Br J Cancer, 2007, 96(8): 1293-1301. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603696

[16] Chen Y, Shi L, Zhang L, *et al*. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 17969-17978.

[17] Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, *et al*. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells[J]. Oncogene, 2012, 31(11): 1354-1365.

[18] Zaha D C. Significance of immunohistochemistry in breast cancer[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(3): 382-392. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.382

[19] Nonaka D. Differential expression of SOX2 and SOX17 in testicular germ cell tumors[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(5): 731-736. DOI: 10.1309/AJCP7MNCNBCRN8NO

[20] Chen S, Xu Y, Chen Y, *et al*. SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects and tumorigenesis of human lung cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36326. DOI: 10.1371/journal.pone.0036326

[21] Qiu H B, Zhang L Y, Ren C, *et al*. Targeting CDH17 suppresses tumor progression in gastric cancer by downregulating Wnt/β-catenin signaling[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e56959. DOI: 10.1371/journal.pone.0056959

[22] Zhang Y, Eades G, Yao Y, *et al*. Estrogen receptor alpha signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2[J]. J Biol Chem, 2012, 287(49): 41514-41522. DOI: 10.1074/jbc.M112.404871

[23] Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters[J]. Oncogene, 2007, 26(9): 1357-1360.

(收稿:2015-06-12;修回:2015-08-12)

(编辑 栾 嘉)