

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.006.html>

SOX4 介导的 EMT 在肺癌中的作用及其机制

余 坤^{1,2,3,4,5}, 李鸿生^{2,3,4,5}, 张琳玲⁶, 杜亚茜^{2,3,4,5}, 李 权^{2,3,4,5},
王晓雄^{2,3,4,5}, 蔡静静^{2,3,4,5}, 马露瑶^{2,3,4,5}, 周永春^{2,3,4,5}

摘要 目的 探讨性别决定基因-相关蛋白结构域 4 (SOX4) 调控 Wnt、转化生长因子- β (TGF- β) 等信号通路及胞内外因子对肺癌细胞的影响及可能的分子机制。方法 构建 pEX-2-SOX4 过表达质粒、GFP 空载质粒、shRNA 干扰质粒及 shNC 对照质粒; 采用脂质体法对细胞进行转染, 通过细胞生物学及分子实验验证过表达及沉默 SOX4 基因后上皮细胞-间充质转化 (EMT) 相关基因在转录与翻译水平的变化情况, 以推测 SOX4 介导的 EMT 对细胞增殖、迁移与侵袭的可能机制。结果 细胞功能实验证实了 SOX4 能促进肺癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力, 伴有 EMT 正向调节因子 N-钙黏蛋白 (N-Cad)、纤维连接蛋白 (FN)、波形蛋白 (Vim)、Snail、ADAM28、 β -catenin 的表达增加, EMT 抑制因子 E-Cad 表达的下调, 但过表达 SOX4 的 16HBE、SK-MES-1 细胞主要表现为 EMT 抑制因子 Smad7、TJP1 (ZO-1)、TJP2 (ZO-2)、WIF1 显著上调, 而在沉默组中, 前文所述因子表达水平与 pEX-2-SOX4 组相反。这些因子大都直接或间接通过 Wnt 及 TGF- β

通路参与肺癌 EMT 的调控。结论 SOX4 可通过 Wnt 及 TGF- β 为代表的信号通路介导肿瘤细胞 EMT 的发生, 促进肺癌的增殖、迁移与侵袭。

关键词 SOX4; 肺癌; 上皮细胞-间充质转化; Wnt; 转化生长因子- β

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0182-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.006

肺癌作为当下“头号杀手”, 是全球病死率最高、发展最快的肺原发性恶性肿瘤。2019 年初, 新的癌症统计名单公布, 肺癌依旧独占鳌头^[1-2], 其中, 女性肺癌例数呈逐年递增态势, 防控形势严峻^[3]。有研究^[4]显示, 带有转移灶的晚期肺癌患者, 经治疗后的 5 年生存率不足 10%, 临床肿瘤患者 90% 以上死于肿瘤转移。转移是造成肺癌难以根治的最根本原因。国内外众多研究发现多种因子发挥转录与非转录作用参与肿瘤的生物行为, 其中, 性别决定基因-相关蛋白结构域 4 [sex determining region Y-related (SRY)-type high mobility group (HMG) box4, SOX4] 基因位于 Y 染色体的 6p22.3^[5] 可通过活化 Wnt、TGF- β 、Hedgehog 及 Notch 等通路或经 miRNA 的调节, 参与多癌种的增殖、迁移与侵袭。但到目前为止, 对 SOX4 在肺癌发生发展中的作用机制尚未明确。因此, 该研究通过细胞培养及分子实验探讨 SOX4 与上皮细胞-间充质细胞转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 间的相互关系及其机制, 为精准医疗、临床监

2019-11-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81860513、81460441); 云南省科技计划项目(编号: 2016FB145)

作者单位: ¹ 厦门大学附属第一医院, 厦门 361003

² 昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院), 昆明 650118

³ 教育部高原区域性高发肿瘤国际合作联合实验室, 昆明 650118

⁴ 云南省肺癌研究重点实验室, 昆明 650118

⁵ 云南省癌症中心分子诊断中心, 昆明 650118

⁶ 云南省曲靖市第二人民医院, 曲靖 655000

作者简介: 余 坤, 男, 医师, 硕士;

周永春, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chun-gui7625@163.com

surpassed those in breast cancer tissues and cells. MiR-400 stable knock-down MCF-40A cell line and miR-400 stable over-expression MCF-7 cell line were established and tested. It showed that the proliferation of breast cells was up-regulated after inhibiting its expression. On the contrary, the up-regulation of its expression could inhibit the malignant behavior of breast cancer cells, which was manifested by the decrease of proliferation level. **Conclusion** The expression of miR-400 is negatively correlated with the malignant level of breast cells, and its mechanism may be related to negatively regulated cells proliferation capacity directly, suggesting that miR-400 may be a potential effective target for prevention and treatment of breast cancer.

Key words miR-400; mammary tumor; cell proliferation; malignant transformation

测、预后评估及科研工作提供理论指导,同时,为各类型肺癌的个体化诊疗提供新的生物学标志物和潜在的干预靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人正常上皮细胞(BEAS-2B);肺腺癌细胞(95D、A549、H1299、H23、H292、HCC827、SP-CA-1、XWLC-05);肺鳞癌细胞(H226、SK-MES-1)、大细胞肺癌细胞(H460)由教育部高原区域性高发肿瘤国际合作联合实验室、云南省肺癌研究重点实验室提供;正常支气管上皮细胞16HBE、小细胞肺癌细胞H446、肺腺癌细胞H157由中国科学院昆明动物研究所陈勇斌课题组馈赠。

1.2 主要试剂 质粒由上海吉玛公司构建;DMEM、RPMI 1640、FBS、Opti-MEM、0.25% Trypsin-EDTA (1X) 购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail、PCR 反应试剂盒购自美国 Roche 公司; BD Matrigel Basement Membrane Matrix 购自美国 B. D 公司; 6.5 mm Transwell[®] with 8.0 μ m Pore Polycarbonate 购自美国 Corning 公司; RABBIT anti-SOX4 polyclonal antibody 购自美国 Millipore 公司; Anti-SNAIL antibody (Goat)、Anti-Vimentin antibody (Mouse)、Anti-N-Cadherin antibody (Rabbit) 和 Anti-E-Cadherin antibody (Mouse) 购自美国 Abcam 公司; Anti-Mouse IgG (HRP-Linked) Antibody 和 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 购自美国 CST 公司; Rabbit Anti-Goat IgG (H + L) HRP 购自美国 Affinity 公司。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱(型号: 3311)、生物安全柜(型号: HYCD-282) 购于美国 Thermo Scientific 公司; 荧光定量 PCR 仪(型号: 7500) 购于美国 Life Technologies 公司; 倒置荧光显微镜(型号: DMI4000B) 购于德国 LEICA 公司; 核酸蛋白定量仪(型号: NanoDrop2000)、酶标仪(型号: 1510) 购于美国 Thermo 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 BEAS-2B、SK-MES-1 培养于 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS、1% PS), 余细胞培养于 1640 完全培养基(含 10% FBS、1% PS), 放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中, 细胞贴壁生长至 80% 左右, 用血球计数板与细胞计数仪 MoxiZ_Firmware 计数, 以每孔 1.2×10^5 个细胞进行 6 孔板铺板。参照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒中提供的

操作说明进行转染。设置 Blank 为空白对照组、GFP 为质粒对照组、NC 为 shRNA 对照组; pEX-2-SOX4 为过表达实验组, siRNA803 为沉默实验组。

1.4.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测目的基因表达情况 按 TRIzol 法提取 RNA 试剂盒说明书, 提取各组对数生长期的细胞 RNA。按照 RNA 反转录合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。本研究所用 PCR 引物由云南擎硕科技有限公司合成, 引物序列见表 1。以 cDNA 为模板, RPS18 为内参, 采用两步法行 PCR 检测: 第 1 步预变性 95 $^{\circ}$ C、5 min; 第 2 步变性 95 $^{\circ}$ C、5 s, 退火延伸 60 $^{\circ}$ C、30 s; 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 相对表达水平。

表 1 实时定量 PCR 目的基因的引物

目的基因	引物序列(5'-3')
ADAM28	F: AGAAGTACTGTGGGATGGGA R: GCATTATGGACAAAGCGACC
E-Cad	F: TGAGCACCTGAAGAACAGCA R: TGGCTTGGCTCGTTGTACTG
FN	F: ACCCTTCCACACCCCAATCT R: TGTGCTCCGCTAAACCAT
N-Cad	F: TCAAGAGGCAGAGACTTGCG R: TCACGGCAGGATGGAAATA
RPS18	F: ATTAAGGCTGTGGGCCGAAG R: TGGCTAGGACCTGGCTGTAT
Smad7	F: TACCGTGCAGATCAGCTTTG R: TTTGCATGAAAAGCAAGCAC
Snail	F: AATCGGAAGCCTAACTACAAG R: AGGAAGAGACTGAAGTAGAG
SOX4	F: CTTGACATGATTAGCTGGCATGATT R: CCTGTGCAATATGCCGTGTAGA
TGF- β	F: GGAGGTGATTCCATCTACAAC R: TTCAGGCACTCTGGCTTTT
Twist	F: CCCTCGGACAAGCTGAGCAA R: CTTGCCATCTTGGAGTCCAGC
Vim	F: GCTAACCAACGACAAAGCCC R: GCGTTCAAGGTCAAGACGTG
Wnt2	F: CGTGTGTGCAACCTGACTTC R: ACACCCACACTTGGTCATCC
WIF1	F: ATGGAACCTGCCATGAACCC R: TATGAGGCTGGCTTCGTACC
ZO-1(TJP1)	F: AAGATAGCCCTGCAGCCAAG R: AAGCAGGAAAAGGACGGCTT
ZO-2(TJP2)	F: GGAAGGTGCTGCTATTGTG R: CGGAACTTCTGCCATCAAAC
β -catenin	F: ATGTTTGGCAGGAAGCCGC R: GTCTGTTGCTATGCTAGCTGGC

1.4.3 蛋白质免疫印迹(Western blot, WB) 检测

成功转染目的质粒 48 h 后,在冰上用配好的裂解液进行总蛋白提取。BCA 法进行标准曲线的绘制及蛋白浓度测定,以 40 μg 对应体积上样,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,将蛋白分子湿转到 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 120 min 后加入一抗(*SOX4* 稀释比例为 1 : 500; β -actin 稀释比例为 1 : 1 000; E-钙黏附素(E-Cadherin, E-Cad) 稀释比例为 1 : 500; N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-Cad) 稀释比例为 1 : 500; 波形蛋白(vimentin, Vim) 稀释比例为 1 : 500; Snail 稀释比例为 1 : 500)。4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 12 h,用 TBST 在摇床上漂洗 3 次,每次 15 min 后加入二抗(稀释比例均为 1 : 2 000) 摇床 12 h,用 TBST 在摇床上漂洗 3 次,每次 15 min,用 ECL 通过 GeneSys 曝光成像,用 Image J 对目标条带进行灰度值分析。

1.4.4 CCK8 测定细胞增殖及细胞活性 转染目的质粒 24 h 后,收集细胞,计数,调整细胞悬液浓度至 5×10^3 /ml,接种细胞于 96 孔板,200 μl /孔,每组设置 3 个复孔。完成后将孔板置于培养箱中培养相应时长。吸弃待测孔的培养液后,每孔加入 10 μl CCK8 溶液 + 200 μl 对应完全培养液混合液,继续在温箱中培养 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处各孔的吸光度(OD 值)。每隔 24 h 对下一板重复以上操作,以此类推。

1.4.5 细胞划痕迁移实验 选取铺满 6 孔板状态较佳的目的细胞,用 1 ml 枪头比着消毒过的无菌直尺画九格宫,线条之间相距 0.5 cm, PBS 洗细胞 2 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。放入培养箱继续培养。每隔 24 h 观察细胞迁移情况。

1.4.6 Transwell 细胞迁移与侵袭试验 将冰上融化且配制好的 1 mg/ml Matrigel 100 μl 加入小室上层并凝固成胶状。选取生长态势较佳的目的细胞,按比例稀释至 5×10^4 个/ml,加 200 μl 到上室,而下室加 800 μl 30% FBS 的全培养基继续培养。48 h 后丢弃小室废液, PBS 冲洗及甲醇固定后,用结晶紫(0.1%) 染色 30 min,在清水下用棉棒头小心拭去表面多余细胞,在 40 倍及 100 倍镜下以交叉处为标记选 8 个视野拍照。最后再用 33% 醋酸 1 ml 浸泡每个孔 2 h,洗脱结晶紫后,取 200 μl 至 96 孔板测 OD 值。迁移实验除了铺胶步骤缺省,余步骤一致。

1.4.7 平板细胞克隆形成试验 取生长态势较佳的细胞重悬后以 300 个细胞的梯度密度分别接种 6 孔板培养至细胞克隆成型大于 50 个/克隆集落,4%

多聚甲醛固定 20 min 左右,用结晶紫(0.1%) 染色 30 min。在 100 倍及 200 倍镜下拍照。最后再用 33% 醋酸 1 ml 浸泡每个孔 2 h,洗脱结晶紫后,取 200 μl 至 96 孔板测 OD 值。

1.5 统计学处理 通过 ImageJ、GraphPad Prism 8 进行图像处理、数据整理与统计分析,所有数据经正态性及方差齐性检验,对正态分布和方差齐完全随机设计的两组样本的数据用两样本 *t* 检验,就完全配对或配伍设计的样本用配对 *t* 检验,多组样本比较用 One-way ANOVA 方差分析,对于具有非正态性或方差不齐的数据,使用秩和检验进行统计分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养及转染 对 15 株细胞进行培养,筛选出 *SOX4* 基因最有可能发挥作用的细胞株,即基础表达量较高的各类型细胞株进行目的基因转染(图 1A ~ C),转染效率均大于 60%,且通过细胞形态及分子实验证实成功过表达与沉默目的基因(图 2A ~ C)。

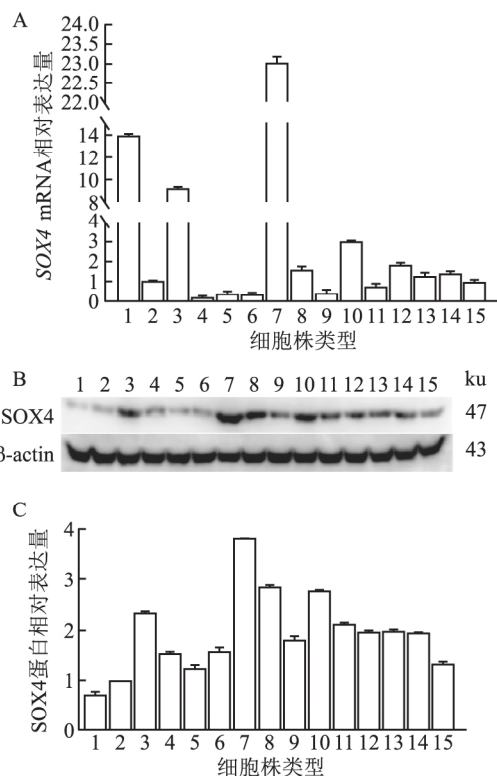


图1 *SOX4* 在各类型细胞中基础表达结果统计图

A、B、C: PCR 及 WB 检测 *SOX4* mRNA 及相应蛋白在细胞中的基础表达量; 1: BEAS-2B; 2: 16HBE; 3: H446; 4: 95D; 5: A549; 6: H1299; 7: H157; 8: H23; 9: H292; 10: HCC827; 11: SPCA-4; 12: XWLC-05; 13: SK-MES-1; 14: H460; 15: H226

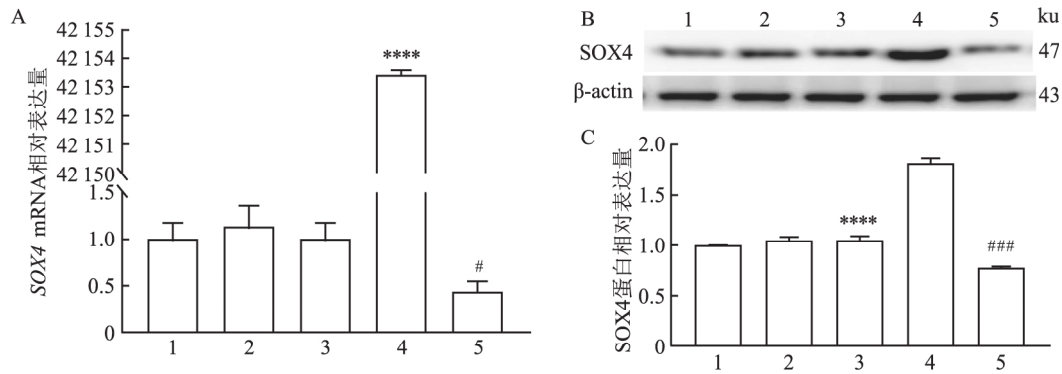


图2 目的基因转染后表达情况统计图

A、B、C: 转染目的质粒 48 h, 验证过表达与沉默 *SOX4* 对 *SOX4* 基因转录与翻译的影响统计图; 与 GFP 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 1: Blank 组; 2: GFP 组; 3: NC 组; 4: pEX-2-*SOX4* 组; 5: siRNA803 组

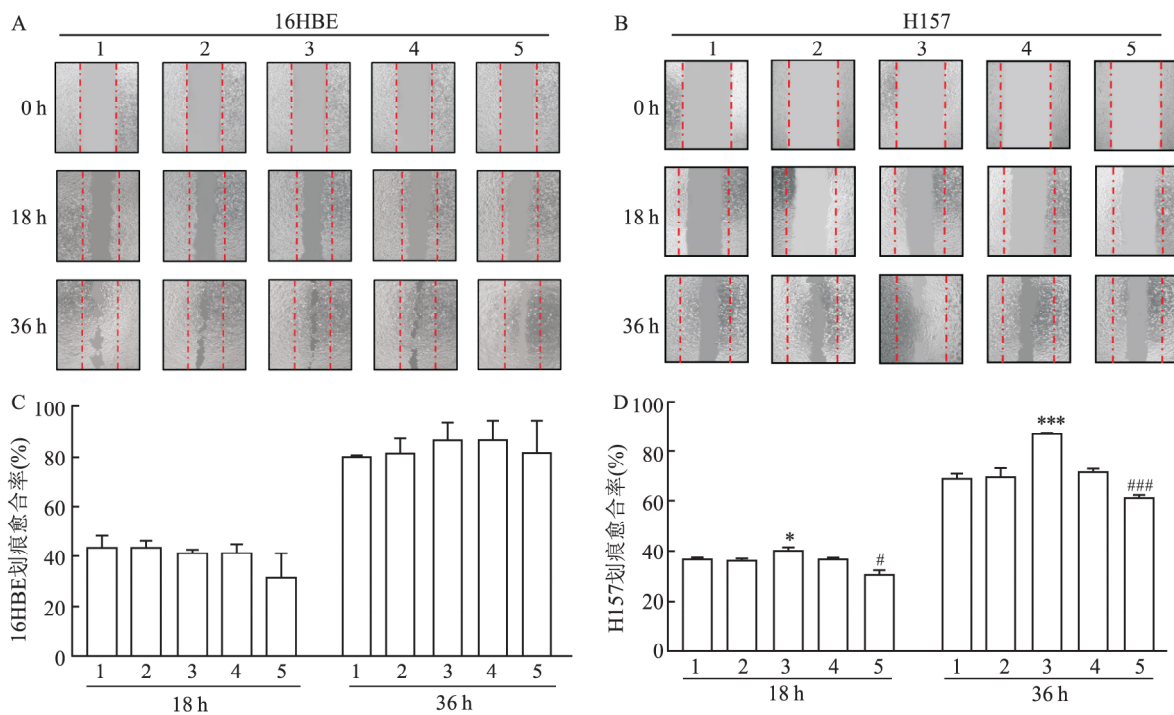


图3 细胞划痕愈合实验结果图与统计图

A、B: 16HBE 及 H157 细胞转染目的质粒后, 划痕实验镜下图 $\times 40$; C: 16HBE 细胞划痕实验结果统计图; D: H157 细胞划痕实验结果统计图; 与 GFP 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 1: Blank 组; 2: GFP 组; 3: NC 组; 4: pEX-2-*SOX4* 组; 5: siRNA803 组

2.2 *SOX4* 对肺癌细胞生物学功能的影响

16HBE、H157 细胞转染目的质粒后, 经细胞划痕实验观察细胞生长状况, H157 细胞 pEX-2-*SOX4* 组的细胞愈合率最高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 3$), 而 16HBE 细胞实验组愈合率与对照组差异无统计学意义 (图 3A ~ D), 且 Transwell 迁移与侵袭实验 48 h 后, 可见对照组细胞迁移与侵袭数量少于 pEX-2-*SOX4* 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 3$) (图 4A ~ F); CCK8 细胞实验测得 48 h 后随着时间的推移 (图 5), pEX-2-*SOX4* 组细胞增殖速率较对照组逐

渐增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 6$); 细胞克隆实验证实 pEX-2-*SOX4* 组细胞克隆形成率较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $n = 3$) (图 6A ~ E)。

2.3 *SOX4* 介导的 EMT 相关因子的机制探究

通过分子实验在转录水平验证 *SOX4* 对肺癌细胞 EMT 表型促进基因及诱导因子的表达影响 (图 7); 利用统计软件对转染目的质粒的各类型细胞株 EMT 相关因子及多通路主要因子进行 PCR 数据整理与统计分析证实 *SOX4* 通过介导 Wnt 为代表的信号通路

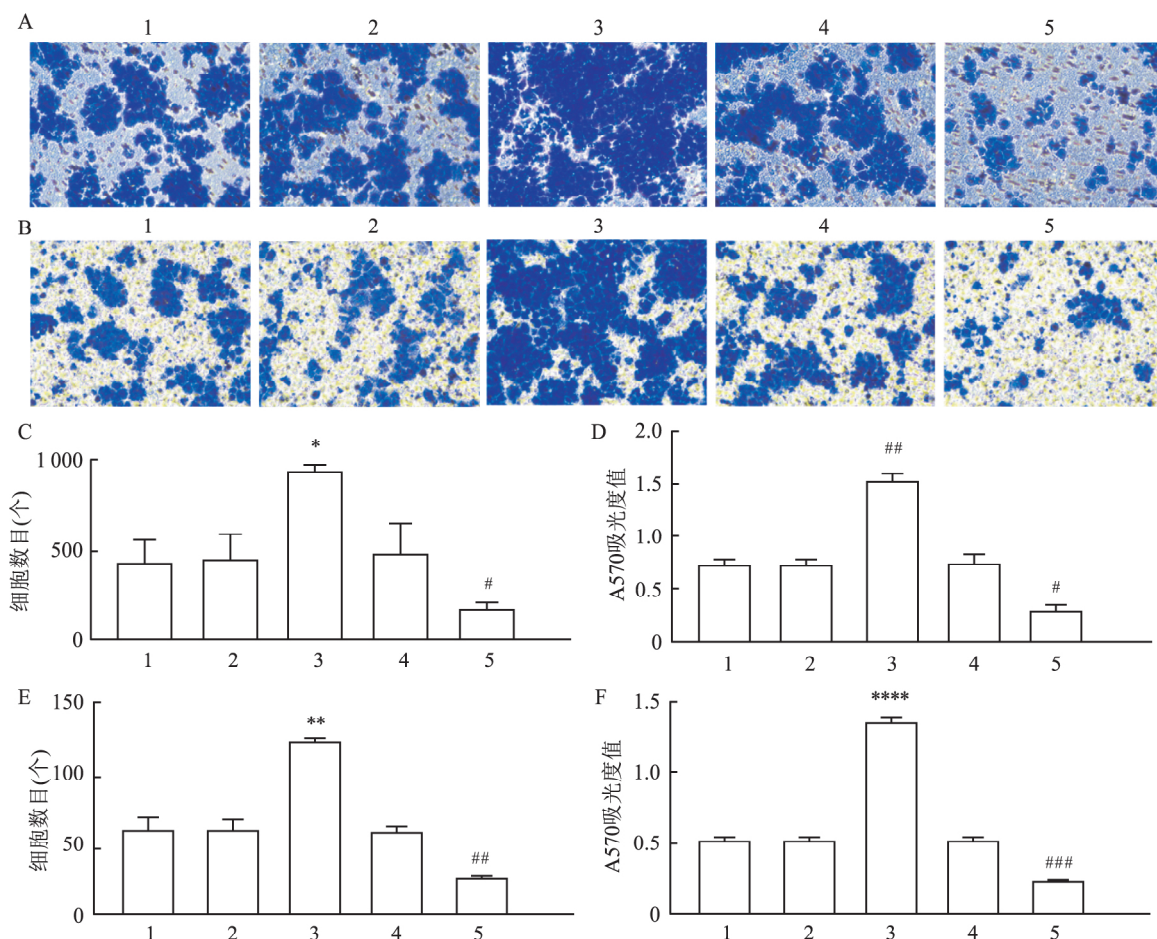


图4 Transwell 细胞迁移及侵袭实验结果图与统计图

A、B: Transwell 细胞迁移及侵袭实验结果图 $\times 100$; C: 细胞迁移实验成功迁移细胞数; D: 细胞侵袭实验中结晶紫 A570 吸光值; E: 细胞侵袭实验成功侵袭细胞数; F: 细胞侵袭实验中结晶紫 A570 吸光值; 与 GFP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 1: Blank 组; 2: GFP 组; 3: NC 组; 4: pEX-2-SOX4 组; 5: siRNA803 组

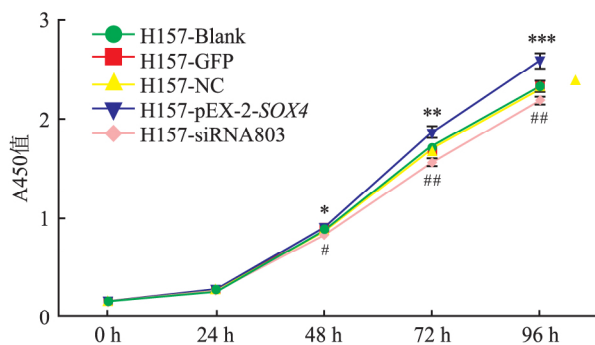


图5 CCK-8 细胞增殖实验结果统计图

与 GFP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

促进 EMT(图 8A ~ C)。

3 讨论

SOX4 参与胚胎发育与细胞命运的调控,可通过 TGF- β 、Wnt 通路调节细胞分化、增殖和转移,并通

过相关因子促发 EMT,是人类肿瘤中普遍存在的具有标志性意义的 64 个基因之一^[8]。本实验成功培养了 15 株肺正常上皮及肺癌细胞,以 SOX4 基础表达量为依据,筛选出 SOX4 表达量最高、作用最为显著的 H157 肺癌细胞进行细胞功能实验。同时,筛选 SOX4 表达最高的五种类型细胞各一株进行后续机制探究。

通过过表达 SOX4,细胞首先从形态上发生了转变,由圆形、椭圆形逐步演化成梭形,由聚集性生长,发展为趋向疏松性生长,镜下多见散在的细胞,由此猜想细胞间的链接变得不再那么紧密。CCK8 及平板克隆检测过表达 SOX4 后细胞的增殖能力也显著增强;侵袭实验分析 SOX4 过表达后细胞侵袭能力也得到了加强。划痕与 Transwell 迁移实验发现,过表达 SOX4 后,细胞的迁移能力呈现不同的增高,过表达 SOX4 能够增强肺癌细胞的增殖、迁移与侵袭的能力,但正常细胞的迁移能力并不受

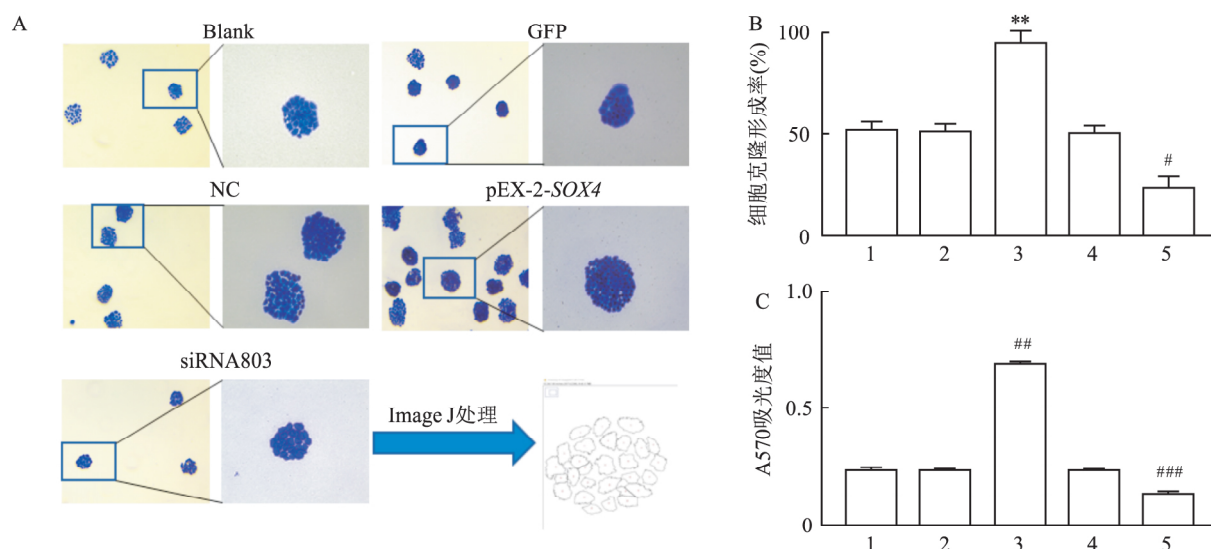


图6 细胞生物学功能实验结果图与统计图

A: 细胞克隆形成实验结果图 $\times 100/200$; B: 细胞克隆形成率; C: 结晶紫 A570 吸光度; 1: Blank 组; 2: GFP 组; 3: NC 组; 4: pEX-2-SOX4 组; 5: siRNA803 组; 与 GFP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

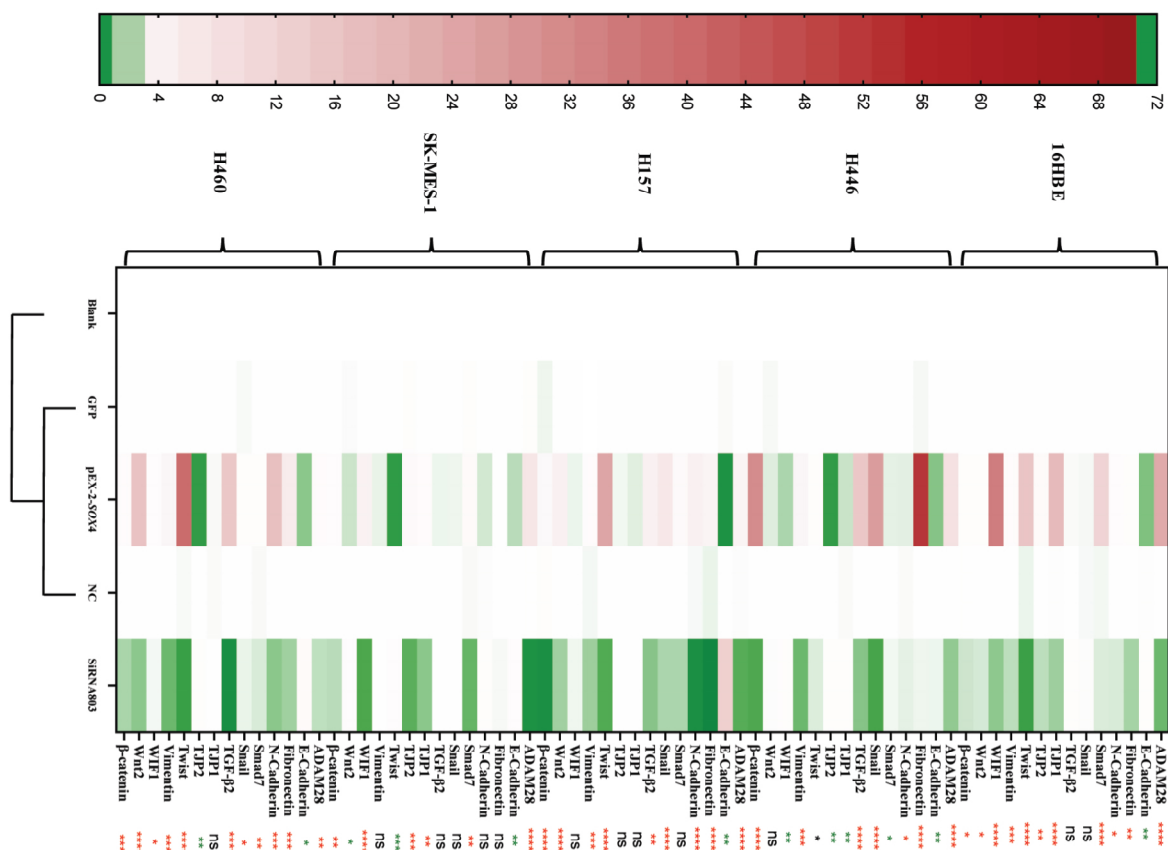


图7 EMT 相关通路主要因子表达热图

A: SOX4 过表达和敲除后 16HBE、H446、H157、SK-MES-1 及 H460 细胞中 EMT 相关通路主要因子的表达热图; 与 GFP 组比较, 正向增加: $^{ns} P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 GFP 组比较, 反向减少: $^{ns} P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

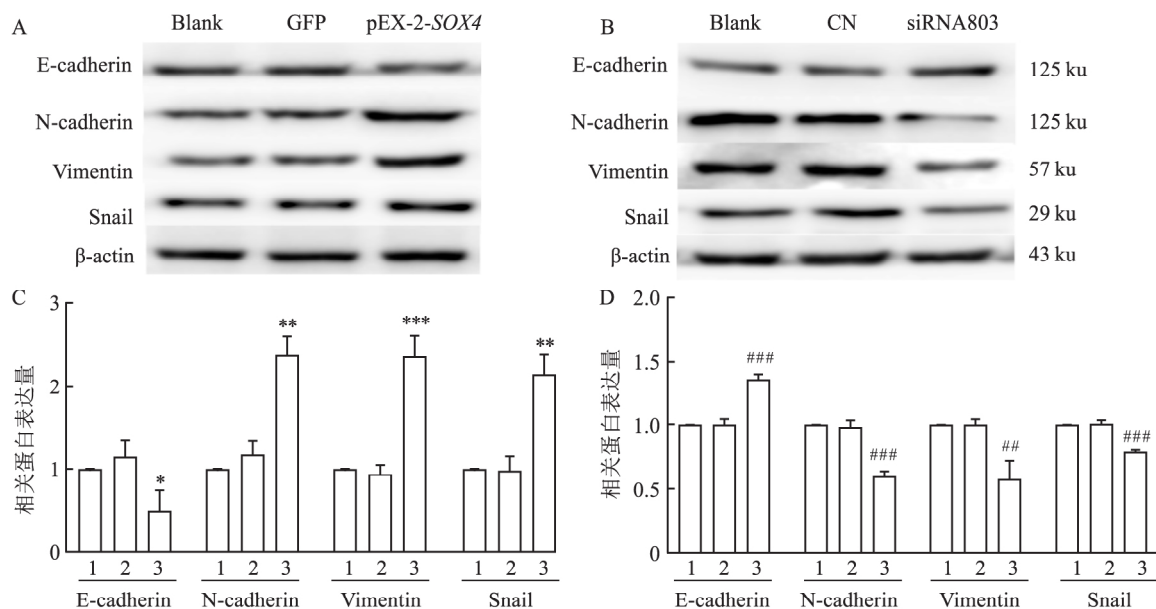


图8 EMT表型相关基因与诱导因子的表达情况

A: WB 分析 EMT 表型相关基因及诱导因子 E-Cad、N-Cad、Vim、Snail 的蛋白表达结果图; B: 根据 EMT 表型相关基因及诱导因子的 WB 结果进行统计绘图; 1: Blank 组; 2: GFP 组; 3: pEX-2-SOX4 组; C: 根据 EMT 表型相关基因及诱导因子的 WB 结果进行统计绘图; 1: Blank 组; 2: NC 组; 3: siRNA803 组; 与 GFP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

SOX4 表达的影响。本课题组在前期实验中发现, *SOX4* 在肿瘤细胞中的表达较正常肺组织显著增高^[4], 在体外实验中也发现 *SOX4* 的沉默, 抑制了肿瘤的生物行为^[8]。本部分实验亦证实 *SOX4* 可通过介导上皮标志物 E-Cad 的缺失及间质标志物 N-Cad、纤维连接蛋白 (Fibronectin, FN) 及 Vim 和 EMT 相关转录因子 (Snail、Twist 及 β -catenin) 的上调, 以促进 EMT 的发生。在探究其具体机制中发现, *SOX4* 在不同类型的肺癌中可通过多条信号通路发挥 EMT 的调控作用, 进而促使肿瘤增殖、转移与侵袭, 具体如下: ① 以 16HBE 为代表的正常肺细胞主要通过 Smad7、TJP-1、TJP-2 和 WIF1 来增强 Wnt 及 TGF- β 负反馈通路拮抗 *SOX4* 介导的 EMT 进程^[9-10]。② 以 H446 为代表的小细胞肺癌细胞主要通过 *SOX4* 促进 ADAM28 加强 ECM 的降解^[11] 及直接或间接增加 β -catenin 的表达而加强并稳定 Wnt/ β -catenin 信号级联^[12], 与 TGF- β 通路协同参与上皮表型缺失, 间质表型上调而介导 EMT 的发生^[13]。③ 以 H157 为代表的肺腺癌细胞机制最为复杂, *SOX4* 促使多种 EMT 促进因子上调, 其中, 以 Twist 抑制 E-Cad 的作用最为显著^[14], 其次, 包括 Notch 和 TGF- β 等在内的多条信号通路都加强了 Wnt/ β -catenin 级联, 促进 EMT 的进展^[15]。④ 以 SK-MES-1 为代表的肺鳞癌细胞主要通过 *SOX4* 介导 ADAM28 等因子促使 ECM 的降解, TGF- β 、Wnt/

β -catenin 信号通路也有作用, 但并不显著, 推测 *SOX4* 的增高负反馈引起 WIF1、Smad7 增多, 进而拮抗了以上通路的作用, *SOX4* 对肺鳞癌 EMT 作用并不显著。⑤ 以 H460 为代表的大细胞肺癌细胞主要通过 *SOX4* 介导 Twist、Snail、Wnt2、TGF- β 的上调, 增强 Wnt 及 TGF- β 等多条信号通路促进 EMT 的进展。

综上, *SOX4* 可通过影响 EMT 相关因子的表达促进肺癌细胞的增殖、迁移与侵袭, Wnt 及 TGF- β 为其主要信号通路。 *SOX4* 有望成为小细胞肺癌、肺腺癌及大细胞肺癌 EMT 的主要标志物与治疗的潜在靶点。

参考文献

- 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, 2019, 41(1): 19-28.
- Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- Jemal A, Miller K D, Ma J, et al. Higher lung cancer incidence in young women than young men in the united states [J]. N Engl J Med, 2018, 378(21): 1999-2009.
- Xu Z Q, Xie L J, Fan W, et al. Risk factors for mediastinal lymph node metastasis in non-small-cell lung cancer by PET/CT [J]. Nucl Med Commun, 2014, 35(5): 466-71.
- Schilham M W, Oosterwegel M A, Moerer P, et al. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4 [J]. Nature (London), 1996, 380(6576):

- 711–4.
- [6] Rhodes D R, Yu J, Shanker K, et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(25): 9309–14.
 - [7] Zhou Y, Chen Y, Huang Y, et al. The expression of Sox4 in female lung cancer patients and its clinical significance [J]. *J Guangxi Med Uni*, 2016, 35(3): 929–33.
 - [8] Zhou Y, Wang X, Huang Y, et al. Down-regulated SOX4 expression suppresses cell proliferation, metastasis and induces apoptosis in Xuanwei female lung cancer patients [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(6): 1007–18.
 - [9] 李肖肖. TGF- β /Smad2/3 信号在肌成纤维细胞增殖期间需要 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017(33): 1474.
 - [10] Queimado L, Lopes C S, Reis A M. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46(3): 215–25.
 - [11] Sasaki A, Abe H, Mochizuki S, et al. SOX4, an epithelial-mesenchymal transition inducer, transactivates ADAM28 gene expression and co-localizes with ADAM28 at the invasive front of human breast and lung carcinomas [J]. *Pathol Int*, 2018, 68(8): 449–58.
 - [12] Zou J, Luo H, Zeng Q, et al. Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 97.
 - [13] Dash S, Sarashetti P M, Rajashekar B, et al. TGF- β 2-induced EMT is dampened by inhibition of autophagy and TNF- α treatment [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(5): 6433–49.
 - [14] De Francesco E M, Maggiolini M, Musti A M. Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in breast cancer EMT [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7), pii: E2011.
 - [15] Chen J, Zhang H, Chen Y, et al. miR-598 inhibits metastasis in colorectal cancer by suppressing JAG1/Notch2 pathway stimulating EMT [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(1): 104–12.

The effect and mechanism of SOX4 in the development of lung cancer

Yu Kun^{1,2,3,4,5}, Li Hongsheng^{2,3,4,5}, Zhang linling⁶, et al

(¹The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003; ²The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Cancer Hospital, Kunming 650118; ³The International Joint Laboratory of High Incident Cancer in Plateau Regional of Ministry of Education, Kunming 650118; ⁴The Key Laboratory of Lung Cancer Research of Yunnan Province, Kunming 650118; ⁵Yunnan Provincial Cancer Center Molecular Diagnostic Center, Kunming 650118; ⁶The Second People's Hospital of Qujing, Qujing 655000)

Abstract Objective To explore the effects of SOX4 on the regulation of Wnt, TGF- β and other intracellular and extracellular factors on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells and the possible molecular mechanisms. **Methods** The pEX-2-SOX4 overexpression plasmid, GFP empty plasmid, shRNA interference plasmid and shNC control plasmid were constructed. The cells were transfected by liposome method, and cell biology experiments were used to verify the effects of overexpression and silencing of SOX4 gene on cell proliferation, migration and invasion ability and the changes of EMT-related genes in transcription and translation. The transcription level of key factors of EMT-related pathways in the target cells was verified by PCR to speculate on the possible mechanism of SOX4-mediated EMT on cell proliferation, migration and invasion. **Results** Cell function experiments confirmed that SOX4 can promote the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells, accompanied by the increase in the expression of EMT positive regulators N-Cad, FN, Vim, Snail, ADAM28 and β -catenin. EMT inhibition was down-regulated by E-Cad expression, but the over expression of SOX4 in 16HBE and SK-MES-1 cells mainly showed the up-regulation of EMT inhibitors Smad7, TJP1 (ZO-1), TJP2 (ZO-2) and WIF1. Whereas in the silent group, the level of factor expression described above was opposite to that of the pEX-2-SOX4 group. Most of these factors directly or indirectly participate in the regulation of lung cancer EMT through Wnt and TGF- β . **Conclusion** SOX4 can mediate the occurrence of EMT in tumor cells through the signaling pathway represented by Wnt and TGF- β , and promote the proliferation, migration and invasion of lung cancer.

Key words SOX4; lung cancer; epithelial-mesenchymal transition; Wnt; TGF- β