

转录因子 SOX4 调控 Beclin1 介导的自噬对小细胞肺癌细胞行为的影响

韩忠诚,马丽丽,苏莹,柳江

(新疆维吾尔自治区人民医院肿瘤科,乌鲁木齐 830000)

摘要 **目的** 探究性别决定区 Y 框转录因子 4(SOX4)调控自噬对小细胞肺癌(SCLC)细胞的影响及机制。**方法** 小干扰 RNA(siRNA)介导敲低人 SCLC 细胞系 NCI-H446 细胞中的 SOX4。RT-qPCR 和 Western blot 检测转染 siRNA 后 NCI-H446 细胞中 SOX4 的表达。细胞实验分为对照组、si-SOX4 组、si-SOX4 + oe-Beclin1 组、oe-Beclin1 组。Western blot 检测各分组细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 的表达之比、Beclin1 及 p62 的表达。荧光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀 PCR(ChIP-PCR)实验检测 SOX4 对 Beclin1 的转录调控作用。CCK-8 法检测各分组细胞增殖能力。流式细胞术检测各分组细胞凋亡率。Transwell 实验检测分组细胞迁移与侵袭能力。**结果** 与对照组或 si-NC 组比较,si-SOX4 组 NCI-H446 细胞中 SOX4 mRNA 和蛋白表达下调($P < 0.05$),LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率和 Beclin1 蛋白表达下降($P < 0.05$),p62 蛋白表达升高($P < 0.05$)。si-SOX4 组的 Beclin1 WT 相对荧光素酶活性低于 si-NC 组($P < 0.05$);Anti-SOX4 组中 Beclin1 启动子相对富集程度高于 Anti-IgG 组($P < 0.05$)。与对照组比较,si-SOX4 组 NCI-H446 细胞增殖活性降低、细胞凋亡率增加、迁移数目和侵袭数目也减少($P < 0.05$);与 si-SOX4 组比较,si-SOX4 + oe-Beclin1 组 NCI-H446 细胞中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率和 Beclin1 蛋白表达升高、p62 蛋白表达下降,同时 NCI-H446 细胞增殖活性升高、细胞凋亡率减少、迁移数目和侵袭数目也增加($P < 0.05$)。**结论** 下调 SOX4 通过抑制 Beclin1 表达来抑制自噬,降低 NCI-H446 细胞增殖活性,抑制细胞迁移与侵袭。

关键词 小细胞肺癌;性别决定区 Y 框转录因子 4;自噬;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0684-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.014

小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)是一种高级别神经内分泌癌,约占所有肺癌的 15%,其特点是生长迅速、容易转移和复发,且放化疗后易产生耐药性^[1]。由于 SCLC 缺乏特异性症状,大部分患者在第一次诊断时已出现远处转移,无法进行根

治性治疗,因此,SCLC 患者的 5 年生存率低于 5%^[2]。因此,迫切需要了解该肿瘤的发病机制,从而寻找诊断及治疗的有效潜在靶点。

性别决定区 Y 框转录因子 4(sex determining region Y-box transcriptim factor 4,SOX4)属于 SOX 家族 C 亚组的成员,参与调节多种细胞生物学过程。SOX4 在乳腺癌、前列腺癌、肝癌、结直肠癌等多种肿瘤中过表达,并与肿瘤进展和转移密切相关^[3]。此外,SOX4 在非小细胞肺癌患者肿瘤组织中表达升高,下调其表达抑制非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭等恶性肿瘤行为^[4-5]。并有研究^[6]表明,SOX4 是

2024-12-18 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(编号:2023D01C67)

作者简介:韩忠诚,男,主任医师;

柳江,男,主任医师,通信作者,E-mail:liujiang@csc.

org.cn

related to inhibiting TNF- α /NF- κ B p65 signaling pathway, reducing neuroinflammation, and improvement of blood-brain barrier permeability.

Key words total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L.; vascular cognitive impairment; network pharmacology; neuroinflammation;TNF- α /NF- κ B p65 signaling pathway

Fund programs Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2024LHMS08004); Scientific Research Project in Higher Education Institutions of Inner Mongolia Autonomous Region (No. NJZY23019); Science and Technology Program of The Joint Fund of Scientific Research for The Public Hospitals of Inner Mongolia Academy of Medical Sciences (Nos. 2023GLLH0191,2024GLLH0565)

Corresponding authors Guo Xia, E-mail:guoxia0424@163.com; Wu Li'e, E-mail:dx6917@163.com

SCLC 肿瘤细胞的代表性标志物。然而,关于 SOX4 在 SCLC 中的具体作用及机制尚不明确。该研究旨在探讨 SOX4 对 SCLC 恶性进展的影响及其调控的机制,以期 SCLC 的靶向治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料 SCLC 细胞系 NCI-H446 购自上海生命科学研究院细胞库,胎牛血清购自澳大利亚 AusGeneX 公司,RPMI-1640 培养基购自深圳中科百抗生物科技有限公司,Lipofectamine 2000 和 TRIzol 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司,2 × BalbScript 1st cDNA Super Mix 和 BalbScript SYBR Two-Step RT-qPCR Kit 购自北京百奥莱博科技有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自北京天根生化科技公司,荧光素酶报告基因检测试剂盒购自苏州近岸蛋白质科技有限公司,细胞染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自江苏凯基生物技术公司,结晶紫染液购自上海经科化学科技有限公司,抗体 SOX4、LC3-II、LC3-I、Beclin1、p62、GAPDH、IgG 等均购自英国 Abcam 公司,siRNA SOX4 (si-SOX4)、siRNA 阴性对照 (si-NC) 及引物序列由上海生工生物工程公司合成,过表达 Beclin1 载体 (oe-Beclin1)、Beclin1 野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 质粒的构建由广州艾迪生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与转染 将 NCI-H446 细胞置于培养箱内培养,条件设为 37 °C、5% CO₂,细胞内添加含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。待细胞生长至 80% 融合度时,PBS 洗涤,按照每孔 1 × 10⁶ 个的密度接种至 6 孔板,首先分为 3 组进行实验,包括对照组、si-NC 组 (转染 si-NC)、si-SOX4 组 (转染 si-SOX4)。再分为 4 组进行实验,包括对照组、si-SOX4 组 (转染 si-SOX4)、si-SOX4 + oe-Beclin1 组 (转染 si-SOX4 和 oe-Beclin1)、oe-Beclin1 组 (转染 oe-Beclin1)。采用 Lipofectamine 2000 进行细胞转染,按照试剂说明书步骤操作。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) TRIzol 法提取不同处理后的 NCI-H446 细胞总 RNA,逆转录法合成 cDNA。根据 BalbScript SYBR Two-Step RT-qPCR Kit 说明书进行荧光定量,以 GAPDH 作为内参基因。在无酶洁净离心管内加入 2 × SYBR qPCR SuperMix

10 μl、上游引物和下游引物各 1 μl、cDNA 1 μl、无酶水补至 20 μl,设置两步法扩增程序:94 °C 5 min,循环 1 次;95 °C 15 s,60 °C 1 min,循环 38 次。2^{-ΔΔC_T} 法分析 SOX4 的 mRNA 相对表达量。SOX4 上游引物序列 5'-CCAGTTCTTGCACGCTGTTT-3',下游引物序列 5'-TGTTCGAAGGTAGGAAGCCA-3'; GAPDH 上游引物序列 5'-GCACCGTCAAGGCTGAG-AAC-3',下游引物序列 5'-ATGGTGGTGAAGACGC-CAGT-3'。

1.2.3 Western blot 实验 收集不同处理后的 NCI-H446 细胞,采用总蛋白提取液分离细胞总蛋白,BCA 法测定其浓度后,加入适量缓冲液,100 °C 煮沸蛋白进行变性,在 10% SDS-PAGE 凝胶孔中加入等量蛋白样品,电泳分离,并将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜,用 5% 脱脂奶粉作为膜封闭液,室温摇床孵育 1 h。在 4 °C 下将膜与稀释后的各一抗 (1 : 1 000) 共孵育过夜,TBST 洗膜,室温下再将膜与稀释后的二抗 (1 : 1 000) 共孵育 2 h,TBST 洗膜,加入 ECL,在凝胶成像系统下检测蛋白条带,通过 Image J 软件分析目的蛋白 SOX4、LC3-II、LC3-I、Beclin1、p62 的灰度值,并计算相对表达量。

1.2.4 荧光素酶报告基因实验 构建 Beclin1 WT 和 Beclin1 MUT 荧光素酶报告基因质粒,将 NCI-H446 细胞按照 2 × 10⁴ 个接种于 24 孔板中,使用 Lipofectamine 2000 试剂,将 si-NC、si-SOX4 分别与待测质粒转染至细胞。转染 48 h 后,按照荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书步骤操作,对各组细胞的荧光素酶活性进行测定。

1.2.5 染色质免疫沉淀 (ChIP)-PCR 实验 采用 1% 甲醛固定 NCI-H446 细胞,超声破碎获取 DNA 片段。设置 Input 组、Anti-IgG 组、Anti-SOX4 组,按照 ChIP 试剂盒说明书操作,使用 IgG 抗体或 SOX4 抗体进行特异性免疫沉淀,去除交联,收集 DNA 片段,进行琼脂糖凝胶电泳,通过 PCR 法检测 Beclin1 的富集程度。

1.2.6 CCK-8 实验 将 NCI-H446 细胞按照 1 × 10⁴ 个接种于 96 孔板中过夜培养,进行对应处理后,弃原液,加入含 10% CCK-8 溶液的完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 环境中孵育 2 h,采用酶标仪检测吸光度 (OD) 值,选择波长为 450 nm,记录实验结果,并绘制细胞增殖活性曲线。

1.2.7 流式细胞术 收集经过不同处理后的 NCI-H446 细胞,PBS 漂洗,加入 400 μl 结合缓冲液悬浮细胞,再与 5 μl Annexin V-FITC 染液混匀,室温下

置于避光环境孵育 15 min,接着加入 10 μl PI,混匀后继续孵育 10 min,经流式细胞仪检测 NCI-H446 细胞凋亡率。

1.2.8 Transwell 小室实验 使用无血清培养液重悬处理后的 NCI-H446 细胞,吸取 200 μL 悬液(5×10^4 个)铺于 Transwell 上室,在下室加 600 μl 完全培养液。将小室置于 37 ℃、5% CO₂ 环境中孵育 24 h 后取出,4% 多聚甲醛固定细胞,再加结晶紫染色后,在光学显微镜下观察迁移结果。侵袭检测中,提前在 Transwell 上室加入 Matrigel 胶进行包被,其余步骤与上述相同。

1.3 统计学处理 所有实验重复 6 次,每次实验设置 3 个生物学重复。应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据进行单因素方差分析,LSD-*t* 法对两组间数据进行进一步比较,

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后 NCI-H446 细胞中 SOX4 表达比较 对转染后的 NCI-H446 细胞进行 RT-qPCR 和 Western blot 检测,以明确 SOX4 转染效果。与对照组、si-NC 组比较,si-SOX4 组中 SOX4 的 mRNA 和蛋白相对表达量均显著下降($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 下调 SOX4 对 NCI-H446 细胞自噬水平的影响 Western blot 检测转染后 NCI-H446 细胞中自噬相关蛋白表达,结果显示,与对照组或 si-NC 组比较,si-SOX4 组中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著下降($P < 0.05$),p62 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 SOX4 对 Beclin1 表达的调控作用 荧光素酶

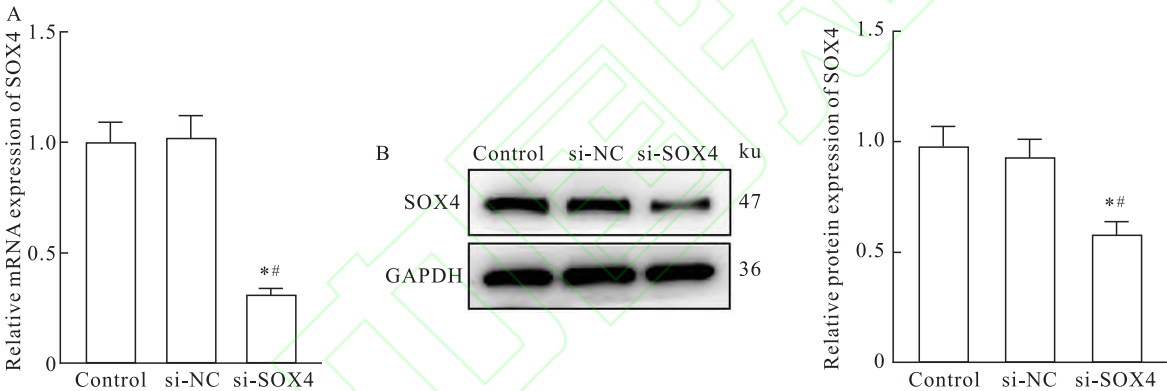


图 1 转染后 NCI-H446 细胞中 SOX4 表达比较

Fig. 1 Comparison of SOX4 expression in NCI-H446 cells after transfection

A: SOX4 mRNA expression in NCI-H446 cells after transfection; B: SOX4 protein expression in NCI-H446 cells after transfection; * $P < 0.05$ vs Control group; ** $P < 0.05$ vs si-NC group.

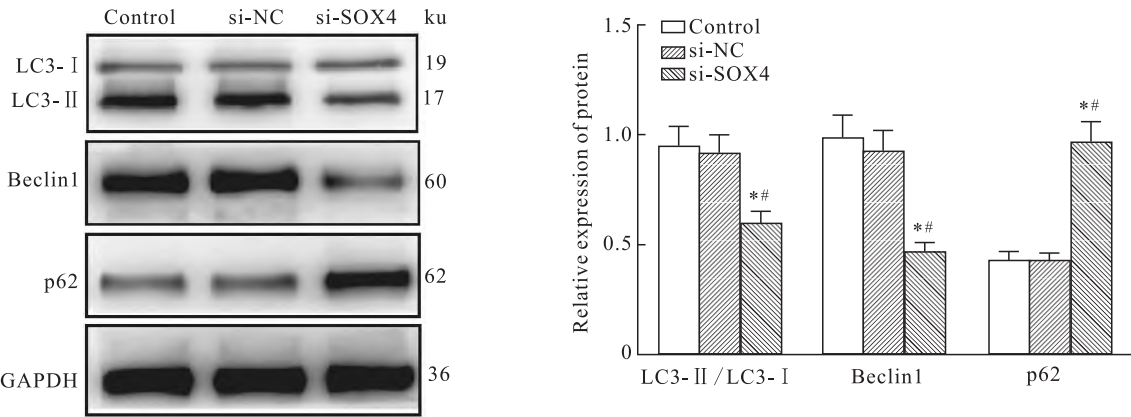


图 2 转染后 NCI-H446 细胞中自噬相关蛋白表达比较

Fig. 2 Comparison of autophagy related protein expression in NCI-H446 cells after transfection

* $P < 0.05$ vs Control group; ** $P < 0.05$ vs si-NC group.

报告基因实验检测结果如图 3A 所示,与 si-NC 组比较,si-SOX4 组 NCI-H446 细胞中 Beclin1 MUT 相对荧光素酶活性无显著变化,但 Beclin1 WT 相对荧光素酶活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

ChIP-PCR 实验结果如图 3B 所示,与阴性对照 Anti-IgG 组比较,在 Anti-SOX4 组 NCI-H446 细胞中 Beclin1 启动子相对富集程度显著升高($P < 0.05$)。

2.4 SOX4 调控 Beclin1 表达影响 NCI-H446 细胞自噬水平 Western blot 检测不同处理下 NCI-H446 细胞中自噬相关蛋白的表达,实验结果显示,与对照组比较,si-SOX4 组 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著下降($P < 0.05$),p62 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$);与 si-SOX4 组比较,si-SOX4 + oe-Beclin1 组 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$),p62 蛋白表达量显著下降($P < 0.05$);与 si-SOX4 + oe-Bec-

lin1 组比较,oe-Beclin1 组 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$),p62 蛋白表达量显著下降($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 SOX4 调控 Beclin1 表达影响 NCI-H446 细胞增殖活性 CCK-8 法检测不同处理下各时间点 NCI-H446 细胞增殖活性,结果如图 5 所示。si-SOX4 组细胞增殖活性显著低于对照组($P < 0.05$); si-SOX4 + oe-Beclin1 组细胞增殖活性显著高于 si-SOX4 组($P < 0.05$);且 oe-Beclin1 组细胞增殖活性显著高于 si-SOX4 + oe-Beclin1 组($P < 0.05$)。

2.6 SOX4 调控 Beclin1 表达影响 NCI-H446 细胞凋亡水平 流式细胞术检测不同处理下 NCI-H446 细胞凋亡率,结果如图 6 所示。与对照组比较,si-SOX4 组细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$);与 si-SOX4 组比较,si-SOX4 + oe-Beclin1 组细胞凋亡率显著减少($P < 0.05$);与 si-SOX4 + oe-Beclin1 组比较,

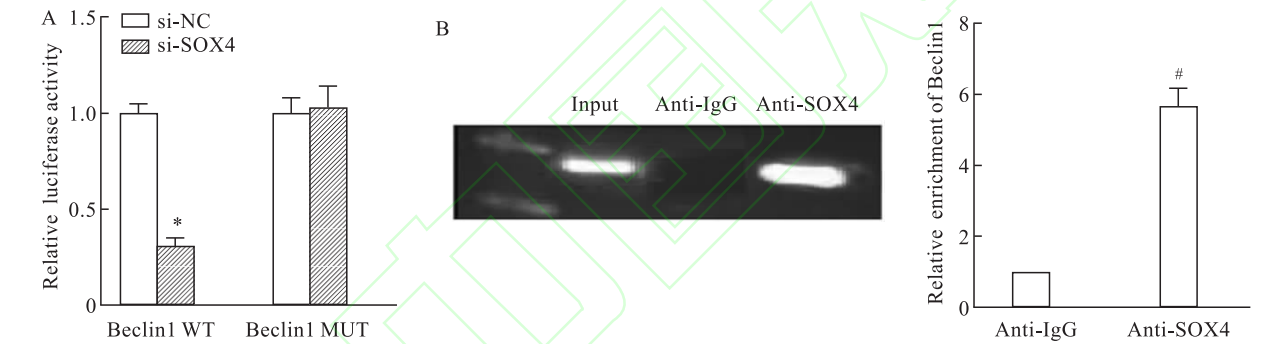


图 3 SOX4 对 Beclin1 表达的调控作用分析

Fig. 3 Analysis of the regulatory effect of SOX4 on Beclin1 expression

A: Relative luciferase activity analysis in NCI-H446 cells; B: Relative enrichment analysis in NCI-H446 cells; * $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs Anti-IgG group.

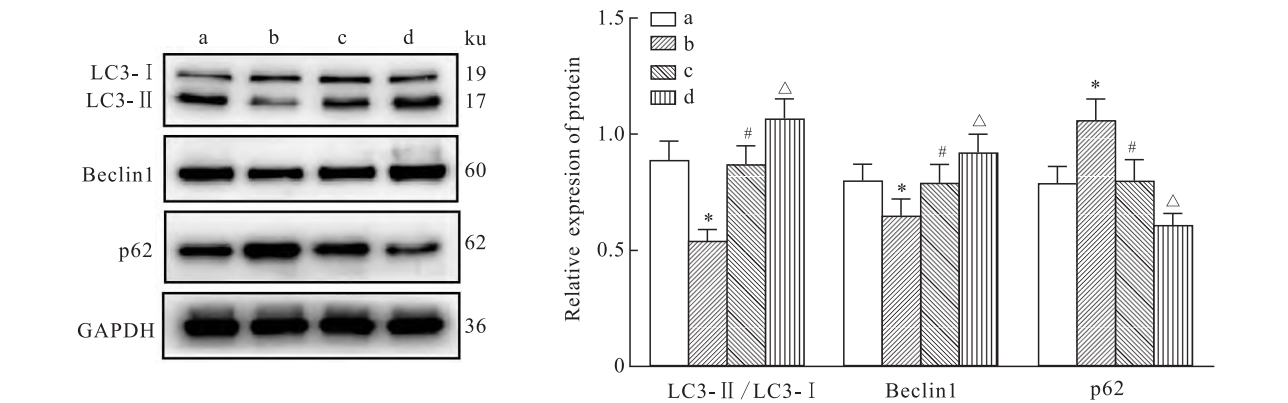


图 4 各组 NCI-H446 细胞中自噬相关蛋白表达比较

Fig. 4 Comparison of autophagy related protein expression in NCI-H446 cells among different groups

a: Control group; b: si-SOX4 group; c: si-SOX4 + oe-Beclin1 group; d: oe-Beclin1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs si-SOX4 group; Δ $P < 0.05$ vs si-SOX4 + oe-Beclin1 group.

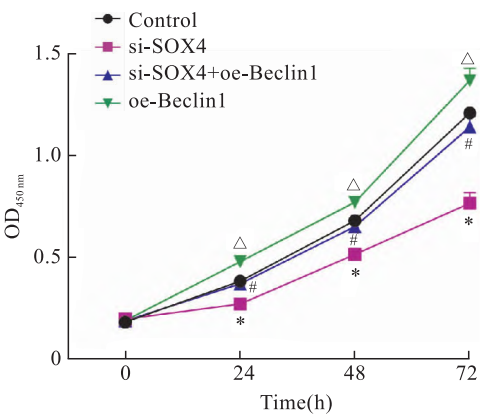


图5 各组 NCI-H446 细胞增殖活性比较

Fig. 5 Comparison of proliferation activity of NCI-H446 cells in different groups

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs si-SOX4 group; $\Delta P < 0.05$ vs si-SOX4 + oe-Beclin1 group.

oe-Beclin1 组细胞凋亡率显著减少 ($P < 0.05$)。

2.7 SOX4 调控 Beclin 1 表达影响 NCI-H446 细胞迁移与侵袭 Transwell 小室实验检测不同处理下 NCI-H446 细胞迁移与侵袭的细胞数目,结果如图 7 所示。与对照组比较,si-SOX4 组细胞迁移和侵袭的细胞数目显著减少 ($P < 0.05$);与 si-SOX4 组比较,si-SOX4 + oe-Beclin1 组细胞迁移和侵袭的细胞数目显著增加 ($P < 0.05$);此外,oe-Beclin1 组细胞迁移和侵袭的细胞数目还要显著多于 si-SOX4 + oe-

Beclin1 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

SCLC 恶性程度高,且缺少有效的治疗方法。近年来,新型免疫疗法为 SCLC 治疗带来了新的曙光。免疫药物或细胞毒性药物的作用靶点主要为程序性死亡受体 (programmed death receptors, PD-1)/程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) 等,以这些靶点的免疫抑制剂虽然在一定程度上提高了 SCLC 患者的生存及预后,但疗效存在局限性,仅有部分患者从中获益^[7]。面对复发率高、受益人群少、生存获益低等问题,当前需要探索更多的关键靶点,从而为 SCLC 提供更精准的治疗策略。

SOX4 作为一种关键的转录调节因子,参与胚胎发育、肿瘤发生及进展,通过直接或间接调节靶基因的表达介导多种生理病理过程^[8]。SOX4 在分化型甲状腺癌中表达上调,并与甲状腺外延伸、淋巴结转移和晚期疾病分期相关,敲低甲状腺癌细胞中 SOX4 表达会抑制肿瘤细胞增殖与肿瘤生长^[9]。SOX4 过表达促进结直肠癌细胞的肿瘤球体形成和自我更新能力,提高肿瘤细胞的干性,进一步机制研究^[10]表明,SOX4 直接与 HDAC1 的启动子结合促进其转录,从而维持结直肠癌细胞的干性。尽管已有

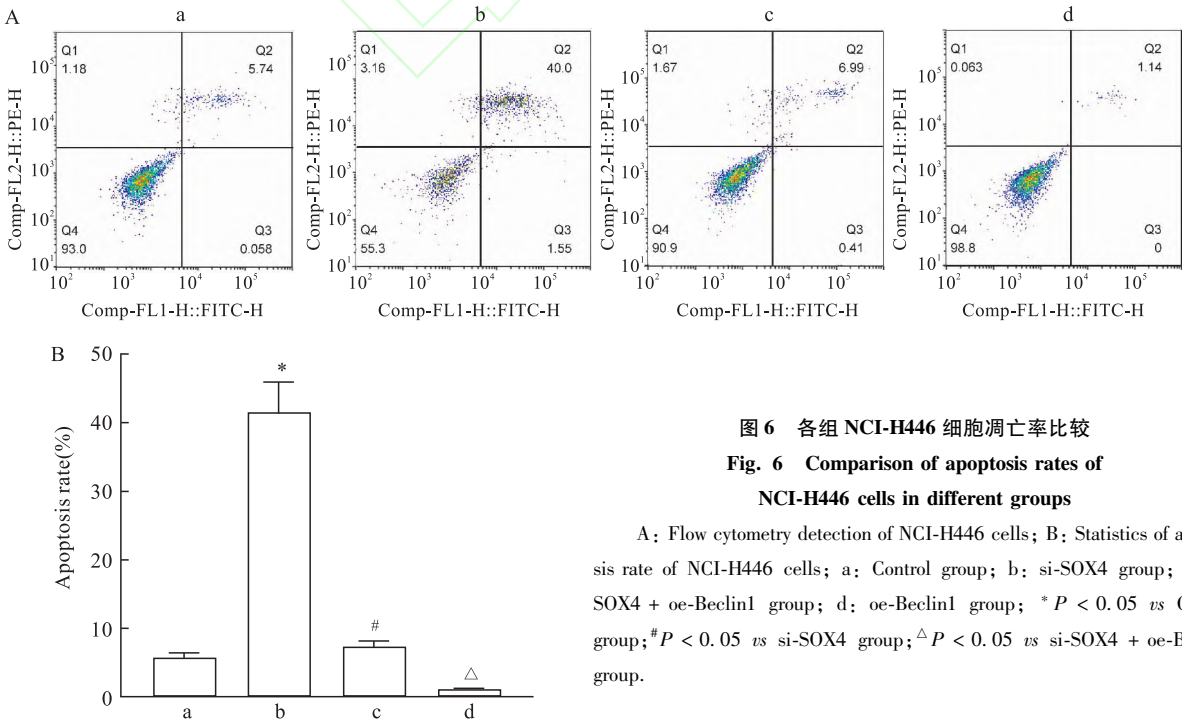


图6 各组 NCI-H446 细胞凋亡率比较

Fig. 6 Comparison of apoptosis rates of NCI-H446 cells in different groups

A: Flow cytometry detection of NCI-H446 cells; B: Statistics of apoptosis rate of NCI-H446 cells; a: Control group; b: si-SOX4 group; c: si-SOX4 + oe-Beclin1 group; d: oe-Beclin1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs si-SOX4 group; $\Delta P < 0.05$ vs si-SOX4 + oe-Beclin1 group.

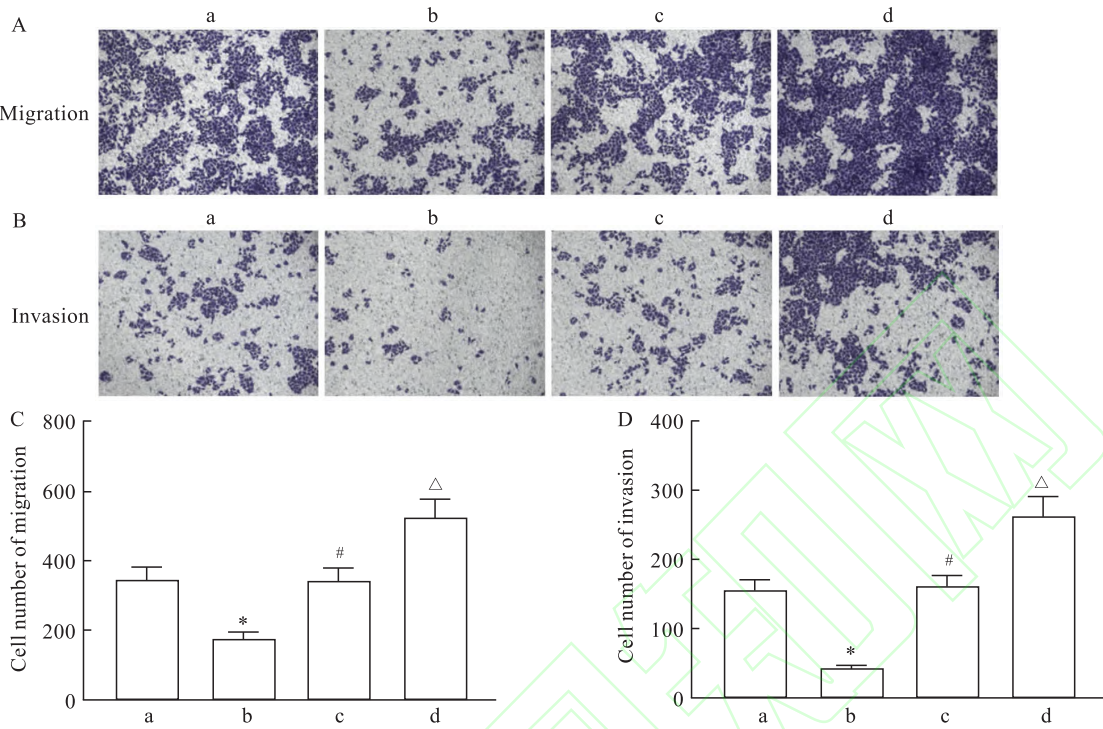


图 7 各组 NCI-H446 细胞迁移与侵袭数目比较

Fig. 7 Comparison of migration and invasion numbers of NCI-H446 cells in each group

A: NCI-H446 cell migration image $\times 40$; B: NCI-H446 cell invasion image $\times 40$; C: NCI-H446 cell migration number statistics; D: NCI-H446 cell invasion number statistics; a: Control group; b: si-SOX4 group; c: si-SOX4 + oe-Beclin1 group; d: oe-Beclin1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs si-SOX4 group; $\Delta P < 0.05$ vs si-SOX4 + oe-Beclin1 group.

大量研究评估了 SOX4 在一些肿瘤中的表达水平和功能,但其在 SCLC 中的具体作用,特别是对人 SCLC 细胞增殖、迁移及侵袭等恶性生物学行为的影响,尚未进行系统的研究与报道。在该研究中,通过将 si-SOX4 转染至人 SCLC 细胞系 NCI-H446 中,检测到 SOX4 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著下降,说明成功下调了 NCI-H446 细胞中 SOX4 表达;进一步检测到,在 NCI-H446 细胞中下调 SOX4 表达后,细胞增殖活性显著降低,细胞凋亡率显著增加,细胞迁移和侵袭的细胞数目显著减少,由此说明,下调 SOX4 表达能够抑制 NCI-H446 细胞增殖、迁移及侵袭,促进细胞凋亡。

自噬是一种细胞内容酶体依赖性降解系统,通常吞噬和消化受损的细胞器和长寿命蛋白质,为细胞存活提供营养或能量,以应对细胞内外应激反应。自噬失调与肿瘤发生、肿瘤-基质相互作用以及肿瘤细胞耐药性有关^[11]。在肿瘤的发生和发展中,大量证据^[12-13]表明自噬具有作为肿瘤抑制或促癌机制的双重作用。在正常细胞中,自噬通过去除致癌蛋白底物、有毒未折叠蛋白和受损细胞器来维持正

常的细胞稳态,这有助于防止慢性细胞损伤以及抑制其向癌细胞的转变。然而,一旦恶性肿瘤发生后,自噬增加有利于肿瘤细胞在肿瘤组织及临近组织中存活,促进肿瘤细胞的耐药表型的获得。Beclin1 作为自噬的关键调节因子,其通过介导自噬来调节有关信号转导或基因表达,从而影响肿瘤进展^[14]。该研究分析了 SOX4 表达与自噬的相关性,检测结果显示,下调 NCI-H446 细胞中 SOX4 表达后,LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著下降,p62 蛋白表达量显著升高,说明下调 SOX4 表达降低了 NCI-H446 细胞内自噬;机制研究结果表明,SOX4 能够结合到 Beclin1 启动子区促进其转录。为了进一步验证 Beclin1 过表达逆转下调 SOX4 对 NCI-H446 细胞生长的抑制作用,该研究在 NCI-H446 细胞中转染 si-SOX4 和 oe-Beclin1,即下调 SOX4 表达的同时提高 Beclin1 表达,检测结果显示,细胞中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率、Beclin1 蛋白表达量显著升高,p62 蛋白表达量显著下降,说明自噬水平升高;此外,细胞增殖活性显著升高,细胞凋亡率显著减少,细胞迁移和侵袭的细胞数目显著

增加。以上结果表明,SOX4 通过靶向调控 Beclin1 表达来增加细胞自噬水平,进而影响 SCLC 进展。

参考文献

[1] Lee J H, Saxena A, Giaccone G. Advancements in small cell lung cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 93: 123 – 8. doi:10.1016/j.semcancer.2023.05.008.

[2] Megyesfalvi Z, Gay C M, Popper H, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(6): 620 – 52. doi:10.3322/caac.21785.

[3] Deng X, Wang Y, Guo H, et al. Pan-cancer analysis and experimental validation of SOX4 as a potential diagnosis, prognosis, and immunotherapy biomarker[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(21): 5235. doi:10.3390/cancers15215235.

[4] Wang D, Hao T, Pan Y, et al. Increased expression of SOX4 is a biomarker for malignant status and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 402(1 – 2): 75 – 82. doi:10.1007/s11010 – 014 – 2315 – 9.

[5] Shen Y, Kang A, Wang M. miR-133a suppressed cell migration and invasion by targeting SOX4 in non-small cell lung cancer[J]. *Panminerva Med*, 2020, 62(4): 271 – 2. doi:10.23736/S0031 – 0808.19.03646 – 2.

[6] Wang S, An J, Hu X, et al. Single-cell RNA sequencing reveals immune microenvironment of small cell lung cancer-associated malignant pleural effusion[J]. *Thorac Cancer*, 2024, 15(1): 98 –

103. doi:10.1111/1759 – 7714.15145.

[7] Carlisle J W, Leal T. Advancing immunotherapy in small cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2023, 129(22): 3525 – 34. doi:10.1002/enr.34977.

[8] Grippa M, Graziano C. Landscape of constitutional SOX4 variation in human disorders[J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(2): 158. doi:10.3390/genes15020158.

[9] Kuo C Y, Hsu Y C, Liu C L, et al. SOX4 is a pivotal regulator of tumorigenesis in differentiated thyroid cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 578: 112062. doi:10.1016/j.mce.2023.112062.

[10] Liu J, Qiu J, Zhang Z, et al. SOX4 maintains the stemness of cancer cells *via* transcriptionally enhancing HDAC1 revealed by comparative proteomics study[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 23. doi:10.1186/s13578 – 021 – 00539 – y.

[11] Piletic K, Alsaleh G, Simon A K. Autophagy orchestrates the crosstalk between cells and organs[J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(9): e57289. doi:10.15252/embr.202357289.

[12] Debnath J, Gammoh N, Ryan K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560 – 75. doi:10.1038/s41580 – 023 – 00585 – z.

[13] Ahmadi-Dehlaghi F, Mohammadi P, Valipour E, et al. Autophagy: a challengeable paradox in cancer treatment[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(10): 11542 – 69. doi:10.1002/cam4.5577.

[14] Kaur S, Changotra H. The beclin 1 interactome; modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders[J]. *Biochimie*, 2020, 175: 34 – 49. doi:10.1016/j.biochi.2020.04.025.

Effect of SOX4 on the behavior of small cell lung cancer cells by regulating Beclin1 mediated autophagy

Han Zhongcheng, Ma Lili, Su Ying, Liu Jiang

(Dept of Oncology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of sex-determining region Y-box transcription factor 4 (SOX4) on autophagy in small cell lung cancer (SCLC) cells. **Methods** Human SCLC cell line NCI-H446 was transfected with small interfering RNA (siRNA) to knockdown SOX4. RT-qPCR and Western blot were used to verify the transfection efficiency. NCI-H446 cells were divided into control group, si-SOX4 group, si-SOX4 + oe-Beclin1 group and oe-Beclin1 group. Western blot analysis was performed to detect the ratio of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II/LC3-I expression and the expression of Beclin1 and p62 in different groups of cells. The transcriptional regulation of Beclin1 by SOX4 was detected by dual luciferase reporter assay and chromatin immunoprecipitation PCR (ChIP-PCR) assay. CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of NCI-H446 cells in different groups. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of NCI-H446 cells in different groups. Transwell assay was performed to determine the cell migration and invasion ability in different groups. **Results** Compared with the control group or the si-NC group, the relative mRNA and protein expression level of SOX4 in si-SOX4 group were down-regulated ($P < 0.05$), and the ratio of LC3-II/LC3-I protein expression and the relative protein expression level of Beclin1 in si-SOX4 group decreased ($P < 0.05$), the relative protein expression of p62 increased ($P < 0.05$). The relative luciferase activity of Beclin1 WT in the si-SOX4 group was lower than that in the si-NC group ($P < 0.05$); the relative enrichment of Beclin1 promoter in the Anti-SOX4

EZH2 甲基化与甲状腺癌 分化相关标志物的关系及治疗价值的研究

荆琳¹, 蒋奇², 顾江宁³, 罗海峰⁴, 郭晓祎⁴, 沈天赐⁴, 戴子豪⁴, 陈丹¹

(大连医科大学附属第一医院¹ 病理科、⁴ 普通外科, 大连 116011;

² 大连大学附属中山医院病理科, 大连 116001; ³ 北部战区总医院内窥镜科, 沈阳 110016)

摘要 **目的** 探讨 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2)-H3 第 27 位赖氨酸三甲基化 (H3K27me3) 轴在甲状腺癌去分化过程的作用及作为甲状腺未分化癌 (ATC) 治疗潜在靶点的临床价值。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 ATC 和甲状腺乳头状癌 (PTC) 及其癌旁正常甲状腺组织中 EZH2、H3K27me3、配对盒基因 8 (PAX8)、甲状腺球蛋白 (TG) 和甲状腺转录因子 1 (TTF1) 的表达。应用基因表达汇编 (GEO) 数据库进一步分析 EZH2 与甲状腺分化标志物 (PAX8、TTF1、TG) 之间的关系。体外培养 ATC 细胞株 8305C 和 BHT-101, 采用实时定量反转录聚合酶链反应 (RT-qPCR) 法检测经 EZH2 抑制剂 (GSK126) 处理后的 ATC 细胞株中甲状腺分化标志物 (TTF1、PAX8) mRNA 的表达变化, 评估 GSK126 在体外潜在的治疗效果。采用细胞增殖实验观察 GSK126 和丝/苏氨酸特异性激酶基因 (BRAF) 抑制剂维罗非尼对 ATC 细胞株增殖的影响。**结果** EZH2 在 ATC 组织中的表达明显高于 PTC 及其癌旁正常甲状腺组织 ($P < 0.05$), H3K27me3 在 ATC 组织中的表达明显低于 PTC 组织 ($P < 0.05$)。EZH2 与 PAX8 和 TG 表达水平呈负相关, 而与 TTF1 表达水平无相关性。在体外实验中, GSK126 可以逆转甲状腺分化标志物 PAX8 和 TTF1 在 ATC 细胞株中的表达, GSK126 联合 BRAF 抑制剂维罗非尼可显著抑制 ATC 细胞株的生长。**结论** EZH2-H3K27me3 轴在调节甲状腺癌去分化过程中起重要作用, EZH2 可能是甲状腺未分化癌的潜在治疗靶点。

关键词 EZH2; H3K27me3; 甲状腺未分化癌; 去分化; 甲基化; GSK126

中图分类号 R 736.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0691-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.015

甲状腺癌是常见的内分泌恶性肿瘤, 在 2022 年全球恶性肿瘤中排名第 11 位^[1], 其中甲状腺乳头状癌 (papillary thyroid carcinoma, PTC) 占甲状腺癌的 80%^[2], 大多预后较好, 免疫表型呈现甲状腺分化

标志物甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, TG)、甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor 1, TTF1)、配对盒基因 8 (paired box gene 8, PAX8) 阳性表达。甲状腺未分化癌 (anaplastic thyroid cancer, ATC) 侵袭性较强, 总生存期仅约 3~5 个月^[3], 甲状腺分化标志物通常阴性表达。关于 ATC 的起源有学者认为 ATC 由 PTC 演变而来, 由此猜测甲状腺癌去分化的机制可能在诱导甲状腺癌的形态转变中起重要作用。

2024-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81902382)

作者简介: 荆琳, 女, 硕士研究生;

陈丹, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: chendan78@dmu.edu.cn

group was higher than that in the Anti-IgG group ($P < 0.05$). Compared with control group, cell proliferation activity decreased, cell apoptosis rate increased, migration number and invasion number decreased in si-SOX4 group ($P < 0.05$). Compared with the si-SOX4 group, the ratio of LC3-II/LC3-I protein expression and the relative protein expression of Beclin1 increased in si-SOX4 + oe-Beclin1 group, while the relative protein expression of p62 decreased, cell proliferation activity increased, apoptosis rate decreased, migration number and invasion number increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Down-regulation of SOX4 can inhibit autophagy, decrease proliferation activity of NCI-H446 cells, and inhibit cell migration and invasion by inhibiting Beclin1 expression.

Key words small cell lung cancer; sex-determining region Y-box transcription factor 4; autophagy; proliferation; migration; invasion

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2023D01C67)

Corresponding author Liu Jiang, E-mail: liujiang@csc.org.cn