

干细胞转录因子 Oct4 及 Sox2 对宫颈癌细胞成瘤、迁移和浸润能力的影响

曼热帕·吐尔逊, 马 蓉, 祖菲娅·艾力 (新疆医科大学第一附属医院妇科中心, 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 探讨 Oct4 和 Sox2 对宫颈癌细胞 (以下简称 HeLa 细胞) 成瘤、迁移和浸润能力的影响。**方法** 复苏并培养 HeLa 细胞, 分别构建 Oct4 及 Sox2 过表达质粒及空载质粒, 采用脂质体方法转染至 HeLa 细胞, 按转染质粒的不同分为 4 组 (正常对照组、Oct4 过表达组、Sox2 过表达组和过表达空载组), 铺至 6 孔板中, 每组一个孔 (细胞量为 1×10^6), 转染后 48h 进行 PCR 验证, 转染成功后采取细胞划痕实验检测细胞迁移能力、Transwell 检测细胞侵袭能力及成球实验检测细胞成瘤能力, 并采用统计学方法对各组间差异进行分析。**结果** PCR 验证结果显示, Oct4 及 Sox2 过表达组 HeLa 细胞中 Oct4 ($5\ 376 \pm 208.7$, $2.429 \pm 0.181\ 6$) 和 Sox2 (133 ± 23.1 , $1\ 991\ 842 \pm 210\ 370$) 表达显著高于空载组 ($2.182 \pm 0.518\ 3$, 69.27 ± 11.94) 及对照组 ($0.858\ 2 \pm 0.157\ 9$, $0.793\ 2 \pm 0.213\ 4$), 差异均有统计学意义 ($F=662.8$, 89.64 , 均 $P < 0.000\ 1$), 表明转染成功; 细胞划痕实验结果显示, HeLa 细胞中 Oct4 过表达组迁移率 (25.00 ± 5.56) 及 Sox2 (27.00 ± 1.73) 低于空载组 (36.67 ± 0.57) 及对照组 (35.67 ± 0.57), 差异有统计学意义 ($F=12.21$, $P < 0.05$); 细胞侵袭实验结果显示, HeLa 细胞中 Oct4 过表达组侵袭数量 (378.3 ± 97.59) 及 Sox2 (374.3 ± 43.89) 表达显著低于空载组 (552.7 ± 41.48) 及对照组 (515.7 ± 57.4), 差异有统计学意义 ($F=6.22$, $P < 0.05$); 成球实验结果显示, HeLa 细胞中 Oct4 过表达组成球数量 (8.667 ± 2.082) 及 Sox2 (8.333 ± 1.155) 低于空载组 (14.67 ± 2.517) 及对照组 (13.67 ± 1.528), 差异有统计学意义 ($F=9.11$, $P < 0.05$)。**结论** Oct4 和 Sox2 作为肿瘤干细胞的转录因子具有抑制宫颈癌细胞的侵袭、转移及生长的作用, 为宫颈癌的早期治疗和预防提供新方向。

关键词: 肿瘤干细胞; Oct4; Sox2; Transwell 侵袭实验; 成球实验

中图分类号: R737.33; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 01-145-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.029

Effects of Stem Cell Transcription Factors Oct4 and Sox2 on the Occurrence, Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells

MANREPA ·Tuerxun, MA Rong, ZUFEIYA·Aili

(Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi 830000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Oct4 and Sox2 on tumorigenesis, migration and infiltration of human cervical cancer cells (hereinafter referred to HeLa cells). **Methods** The HeLa cells were resuscitated and cultured, and the Oct4 and Sox2 overexpression plasmids and empty plasmids were constructed respectively. The transfected cells were transfected into HeLa cells by liposome method and divided into four groups (normal control group, Oct4 overexpression group, Sox2 overexpression group, overexpression no-load group) according to the different transfected plasmids and spread into six-well plates, where the cell volume per group was 1×10^6 . PCR verification was performed 48h after transfection. After successful transfection, cell migration ability was detected by cell scratch test, and cell invasion ability and tumorigenesis ability were detected by Transwell test. The differences between groups were analyzed using statistical methods. **Results** PCR verification results showed that the overexpression of Oct4 and Sox2 in HeLa cells ($5\ 376 \pm 208.7$, $2.429 \pm 0.181\ 6$) and Sox2 (133 ± 23.1 , $1\ 991\ 842 \pm 210\ 370$) were significantly higher than those in the no-load group ($2.182 \pm 0.518\ 3$, 69.27 ± 11.94) and the control group ($0.858\ 2 \pm 0.157\ 9$, $0.793\ 2 \pm 0.213\ 4$), the differences were statistically significant ($F=662.8$, 89.64 , $P < 0.000\ 1$), indicating that the transfection was successful. The HeLa scratch test results showed that the mobility (25.00 ± 5.56) and Sox2 Sox2 (27.00 ± 1.73) of the Oct4 overexpression group were lower than those in the no-load group (36.67 ± 0.57) and the control group (35.67 ± 0.57), the difference was statistically significant ($F=12.21$, $P < 0.05$). The results of HeLa invasion experiments showed that the number of invasions (378.3 ± 97.59) and Sox2 (374.3 ± 43.89) expressions in the Oct4 overexpression group were significantly lower than those in the no-load group (552.7 ± 41.48) and the control

基金项目: 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题青年课题 (SKL-HIDCA-2018-20)。

作者简介: 曼热帕·吐尔逊 (1986-) 女, 硕士研究生, 主治医师, 讲师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: lixue198003@126.com。

通讯作者: 祖菲娅·艾力。

group (515.7 ± 57.4), the difference was statistically significant ($F=6.22$, $P < 0.05$). The number of Oct4 overexpressing constituent spheres (8.667 ± 2.082) and Sox2(8.333 ± 1.155) in HeLa cells in the pelletization experiment were lower than those in the no-load group (14.67 ± 2.517) and the control group (13.67 ± 1.528), the difference was statistically significant ($F=9.11$, $P < 0.05$). **Conclusion** As transcription factors of tumor stem cells, Oct4 and Sox-2 can inhibit the invasion, metastasis and growth of cervical cancer cells, thus providing a new direction for the early treatment and prevention of cervical cancer.

Keywords: tumor stem cell; Oct4; Sox2; Transwell invasion experiment; balling experiment

宫颈癌 (cervical cancer) 是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤, 据统计宫颈癌患者治疗后3年内出现转移和 (或) 复发的发生率高达30% ~ 40%, 虽然放、化疗技术和方案近年来已不断优化, 但晚期宫颈癌患者治愈率未见显著提高, 预后极差^[1-3]。因此, 探讨宫颈癌细胞侵袭转移的作用机制对改善宫颈癌患者预后尤为重要。研究发现宫颈癌侵袭转移的重要原因为肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs), 作为肿瘤体内的肿瘤细胞亚群, 它具有自我更新和分化能力, 能够重建肿瘤团并转移到其他位点, 是肿瘤不断增殖、侵袭、浸润、转移甚至复发的原因^[4]。而CSCs中重要转录因子Oct4和Sox2可调控CSCs和体细胞细胞重编程, 其中Oct4属于POU (Pit-Oct-Unc) 转录因子家族, 是CSCs关键的表面标记物, 研究表明, Oct4介导的致癌性与上皮-间充质转化的调控有关^[5-6]。Sox2是SOX区域Y相关HMG (High Mobility Group, HMG) 蛋白家族的成员, 通过与Oct4等干细胞标记物形成复合物, 在癌症中维持干细胞样特性。研究表明^[7-9], Oct4和Sox2在肿瘤发生和预后中起关键作用, 且宫颈癌细胞中Oct4表达明显高于癌旁细胞。但Oct4, Sox2对宫颈癌细胞的预后意义尚不明确。故本研究拟将外源性Oct4和Sox2转染至HeLa细胞中, 检测其对HeLa细胞成瘤、迁移、浸润能力的影响, 以期对宫颈癌早期诊断及靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源 HeLa细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (货号: CL-0349; 规格: 1×10^6 cells/T25培养瓶)。收到后液氮冻存等待复苏。

HeLa细胞培养: 细胞在DMEM培养液中培养, 含15ml/dl新生牛血清、双抗; 5ml/dlCO₂, 37℃培养箱中培养。

1.2 仪器与试剂 实验所用主要仪器为: 气套式触屏CO₂恒温培养箱 (美国精骐, CI-191X), 生物安全柜 (苏净安泰, BSC-1304 II A2), 倒置生物显微镜及荧光显微镜 (宁波舜宇, ICX41, CX40-RFL), 凝胶成像分析系统 (北京六一, WD-9413B), 荧光定量PCR仪 (杭州朗基, Q2000B); 所用主要试剂为: Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen, 2125361), DMEM基础培

养基 (GIBCO, 8120358), SYBRGreenPCR试剂盒 (北京全式金, AQ601-01), 逆转录试剂盒 (北京全式金, at311-02)。

1.3 方法 构建Oct4过表达质粒、Sox2过表达质粒及空载质粒。取出冻存的HeLa细胞进行复苏后放入5ml/dl CO₂培养箱中进行培养; 显微镜下观察贴壁细胞HeLa密度, 当生长至细胞培养皿面积的90%左右即可传代, 传至4代时进行细胞转染。在转染24h后, 可拍照观察并用于后续试验。

1.3.1 实验分组: HeLa细胞进行复苏、传代及培养, 达到所需细胞量, 按转染质粒的不同分为4组, 铺至6孔板中, 每组1个孔 (细胞量为 1×10^6): 正常对照组 (HeLa细胞进行正常复苏、传代, 不进行任何处理)、Oct4过表达组 (转染Oct4过表达质粒的HeLa细胞)、Sox2过表达组 (转染Sox2过表达质粒的HeLa细胞)、过表达空载组 (转染过表达空载质粒的HeLa细胞)。

1.3.2 荧光定量PCR检测验证转染效率: 设计引物并合成, 引物序列见表3。采取溶液法分别提取各组细胞中的总RNA, 检测其浓度并用凝胶电泳验证RNA完整性; 按照试剂盒法配置逆转录反应体系及荧光定量反应体系, 将提取的RNA逆转录为cDNA, 并进行荧光定量。

表1 引物序列

基因	序列
β-actin	F-CCCCTCTATGAGGGTTACGC
	R-TTTAATGTCACGCACGATTTTC
Oct4	F-CAAAGCAGAAACCCTCGTGC
	R-AACCACACTCGGACCACATC
Sox2	F-AACCAGCGCATGGACAGTTA
	R-GACTTGACCACCGAACCCAT

1.3.3 细胞功能检测

1.3.3.1 细胞划痕实验 用于检测细胞的迁移能力, 具体方法: 提前在6孔板细胞背后均匀划3 ~ 5条横线后加入约 5×10^5 个细胞, 垂至于背后的横线垂直划痕, 用PBS洗细胞3次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养液后放入37℃ 5ml/dl CO₂培养箱按0, 6, 12, 24h拍照。完成实验后, 根据24h内不同的4个时间点, 用软件统计细胞迁移的面积, 用以下公式计算不同组不同时间点的迁移率:

$$\frac{\text{不同时间点的迁移面积} - 0\text{ h 的迁移面积}}{0\text{ h 的迁移面积}} \times 100\%$$

1.3.3.2 Transwell 侵袭实验：用于检测细胞的侵袭能力，具体方法：用 BD 公司的 Matrigel 包被 Transwell 小室底部聚合成凝胶；消化细胞，调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{ml}$ ，加入 Transwell 小室，24 孔板下室一般加入完全培养液；放入 37°C 5ml/dl CO_2 培养箱培养 24h；取出 Transwell 小室 PBS 洗后用多聚甲醛固定 60 min，将小室适当风干后台盼蓝避光染色。400 倍显微镜下随机 4 个视野观察细胞，采取随机的方式选取 3 个视野计数穿过小室基底膜的细胞数。

1.3.3.3 成球实验：用于检测细胞的成球能力，具体方法：将生长状态良好的细胞消化后离心，用 PBS 清洗 2 次，干细胞培养液 (DMEM+1×B27+

20ng/ml bFGF+20ng/ml EGF) 重悬细胞，计数；选择超低吸附细胞培养六孔板，每孔加入细胞 100 个，加 2ml 培养液培养 7 天，观察成球状态。完成实验后，显微镜观察判定细胞成球个数。

1.4 统计学分析 采用 Excel 进行数据录入，采用 prism 7.0 进行统计学分析及制图，多组比较采取方差分析，进一步两组比较采取 LSD-*t* 检验，检验水准 $\alpha=0.05$ ， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 荧光定量验证 见表 2。本研究 F 检验及两两比较 *t* 检验结果显示，Oct4 及 Sox2 表达水平在 Oct4/Sox2 过表达组显著高于正常对照组和空载组，差异均有统计学意义 ($t=51.51, 18.94; 51.48, 18.94$ ，均 $P<0.0001$)，表明转染成功。

表 2 各组细胞转染后表达情况 ($n=3$)

项目	正常对照组	Oct4 过表达组	Sox2 过表达组	空载组	<i>F</i>	<i>P</i>
Oct4	0.8582 ± 0.1579	5376 ± 208.7	2429 ± 0.1816	2182 ± 0.5183	662.8	<0.0001
Sox2	0.7932 ± 0.2143	133 ± 23.1	1991842 ± 210370	69.27 ± 11.94	89.64	<0.0001

2.2 细胞功能检测 本研究 F 检验及两两比较 *t* 检验结果见表 3。Oct4、Sox2 过表达组细胞侵袭数量、迁移率及成球数量均低于过表达空载组，差异有统计学意义 ($t=4.706, 4.814; 5.105, 5.105; 5.49, 5.795$ ，

$P=0.0419, 0.0377; 0.0283, 0.0283; 0.0195, 0.0146$)；Oct4、Sox2 过表达组细胞迁移率及成球数量还低于正常对照组，差异有统计学意义 ($t=4.668, 4.668; 4.575, 4.88$ ， $P=0.0436, 0.0436; 0.0478, 0.0353$)。

表 3 各组细胞功能检测 ($n=3$)

项目	正常对照组	Oct4 过表达组	Sox2 过表达组	空载组	<i>F</i>	<i>P</i>
Transwell (个/镜下)	515.7 ± 57.4	378.3 ± 97.59	374.3 ± 43.89	552.7 ± 41.48	6.22	0.0174
细胞迁移率 (%)	35.67 ± 0.57	25.00 ± 5.56	27.00 ± 1.73	36.67 ± 0.57	12.21	0.0023
成球数目 (个/镜下)	13.67 ± 1.528	8.667 ± 2.082	8.333 ± 1.155	14.67 ± 2.517	9.111	0.0058

3 讨论

虽然癌症干细胞理论已经被证明适用于不同的癌症，但 CSCs 在宫颈癌发生发展中的作用还需要更多的研究。既往研究发现，肿瘤邻近正常组织和肿瘤前组织中 CSC 标记物的表达增加，提示正常肿瘤邻近细胞的早期分子变化，可能是 CSCs 调控处于正常细胞逐步转化为癌细胞^[4,10]。放疗耐药是宫颈癌根治性放疗患者治疗失败和死亡的主要原因。目前研究表明 CSC 比亲代细胞更可能具有抗辐射能力，因此可以通过 CSC 来解释肿瘤辐射抗性。目前已经证实的 CSCs 标志物包括 CD44、Oct3/4、Sox-2、C-Myc 及 Nanog 等。其中，Oct4 和 Sox2 的异常表达可能参与多种癌症的癌变^[11]。现有研究表明^[6,8]，宫颈癌组织分化程度与 Oct4、Sox-2 的表达呈负相关，即宫颈癌组织分化程度越高，Oct4、Sox-2 的表达水平越低。但是关于 Oct4、Sox-2 转录基因在分子水平上调控宫颈癌细胞的相关研究较为少见，故本次研究采用 CSCs 主要的两个表面标

志物对宫颈癌分子水平调控初探，检测 Oct4、Sox2 与宫颈癌细胞发生存在的关系，以期找寻宫颈癌的早期诊断和治疗、减少肿瘤转移和复发、延长患者的生存期的些许线索。

为进一步探讨两者对宫颈癌细胞迁移能力、侵袭能力以及成瘤分子机制的影响，本研究通过建立 Oct4、Sox2 过表达的稳定转染细胞系 (HeLa 细胞系)，Oct4、Sox2 过表达组细胞侵袭数量、迁移率及成球数量均低于过表达空载组，发现外源性 Oct4、Sox-2 表达显著降低了 HeLa 细胞的迁移能力、侵袭能力以及成瘤特性等生物学特性。这为目前关于 Oct4、Sox-2 基因在宫颈癌组织学方面研究结果提供了细胞及分子水平的初步探索思路。在乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌组织中分别存在 Oct4、Sox2 基因表达上调的现象，刺激肿瘤细胞的成瘤特性^[5,12-15]。与此相反，LIU 等^[16]学者发现 Sox2 的高表达与子宫颈癌细胞系 (SiHa 细胞) 的细胞分化缺乏有关，

并有助于细胞迁移和侵袭。考虑形成两种相反结论的原因是由于 Oct4 和 Sox2 在胚胎干细胞中通过 Oct4/ Sox2 复合物协同工作并自我调节,但是在体内恶性病变中 Oct4 和 Sox2 之间的相关性尚未得到明确的解释。Sox2 的过表达抑制了 Oct4 启动子在胚胎癌细胞中的活性^[17]。Oct4 和 Sox2 通过 Oct4/ Sox2 复合物协同作用,但有报道称 Oct4, Sox2 和 Nanog 与核磷素形成单独的复合物来控制干细胞命运决定^[18]。目前已有研究表明,检测癌症组织样本 Oct4 和 Sox2 与患者生存率的相关性尚未定论^[6,19],在宫颈癌少见相关性的报道研究。此外, HU 等^[20]人也报道了 Oct4 和 Sox2 在肺癌组织样本中没有共表达,也显示了不同的生存结果。

本研究结果提示可将 Oct4 和 Sox2 作为宫颈癌的生物标志物,然而肿瘤细胞的侵袭转移过程是多通道、多分子共同调控,需要进一步探究 Oct4, Sox2 两者分别和(或)协同对宫颈癌细胞生物行为学的调控机制,明确主要的调控通路和关键靶点,以期为宫颈癌的早期诊断和靶向治疗提供新思路。

参考文献:

- [1] LI Weili, HE Fangjie, LIU Ping, et al. Uterine corpus invasion in cervical cancer: a multicenter retrospective case-control study[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2021, 303(3): 777-785.
- [2] SHIGETA S, SHIDA M, NAGASE S, et al. Epidemiological guideline influence on the therapeutic trend and patient outcome of uterine cervical cancer in Japan: Japan society of gynecologic oncology guideline evaluation committee project[J]. Gynecologic Oncology, 2020, 159(1): 248-255.
- [3] MATSUMOTO Y, MABUCHI S, ISOHASHI F, et al. Impact of a reduction in follow-up frequency on Life expectancy in uterine cervical cancer patients[J]. International Journal of Clinical Oncology, 2020, 25(6): 1170-1177.
- [4] FAN Wenjie, DING Hao, CHEN Xiangxun, et al. All-Trans retinoic acid potentiates antitumor efficacy of cisplatin by increasing differentiation of cancer Stem-Like cells in cervical cancer[J]. Annals of Clinical and Laboratory Science, 2021, 51(1): 22-29.
- [5] PANAYIOTOU T, MICHAEL S, ZARAVINOS A, et al. Human papillomavirus E7 binds Oct4 and regulates its activity in HPV-associated cervical cancers[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(4): e1008468.
- [6] CHEN Borong, ZHU Zhipeng, LI Lulu, et al. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells[J]. OncoTargets and Therapy, 2019, 12: 4667-4682.
- [7] CHANDIMALI N, SUN Hunan, PARK Y H, et al. BRM270 suppresses cervical cancer stem cell characteristics and progression by inhibiting SOX2[J]. In Vivo (Athens, Greece), 2020, 34(3): 1085-1094.
- [8] KIM B W, CHO H, CHOI C H, et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 1015.
- [9] SHEN Liangfang, HUANG Xinqiong, XIE Xiaoxue, et al. High expression of Sox2 and Oct4 indicates radiation resistance and an independent negative prognosis in cervical squamous cell carcinoma[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2014, 62(7): 499-509.
- [10] CHHABRA R. Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2015, 141(11): 1889-1897.
- [11] ZAMULAEVA I A, SELIVANOVA E I, MATCHUK O N, et al. Quantitative changes in the population of cancer stem cells after radiation exposure in a dose of 10 Gy as a prognostic marker of immediate results of the treatment of squamous cell cervical cancer[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2019, 168(1): 156-159.
- [12] WANG Yueyue, BIBI M, MIN Pengxiang, et al. SOX2 promotes hypoxia-induced breast cancer cell migration by inducing NEDD9 expression and subsequent activation of Rac1/HIF-1 α signaling[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2019, 24: 55.
- [13] CHIU Yufan, WU Chaochang, KUO Minghan, et al. Critical role of SOX2-IGF2 signaling in aggressiveness of bladder cancer[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 8261.
- [14] ROUDI R, BARODABI M, MADJD Z, et al. Expression patterns and clinical significance of the potential cancer stem cell markers OCT4 and NANOG in colorectal cancer patients[J]. Molecular & Cellular Oncology, 2020, 7(5): 1788366.
- [15] 李娜, 赵晓娟, 苏晓明. 乳腺组织中 SMG-1mRNA 和 SOX4mRNA 检测在乳腺癌监测中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 35-39.
LI Na, ZHAO Xiaojuan, SU Xiaoming. Application of detection of SMG-1mRNA and SOX4mRNA in breast tissue in surveillance for breast cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 35-39.
- [16] LIU Xiaofang, YANG Wenting, XU Rui, et al. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87092.
- [17] BIGDELOU Z, MORTAZAVI Y, SALTANATPOUR Z, et al. Role of Oct4-Sox2 complex decoy oligodeoxynucleotides strategy on reverse epithelial to mesenchymal transition (EMT) induction in HT29-ShE encompassing enriched cancer stem-like cells[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(3): 1859-1869.
- [18] YOU Liuping, GUO Xin, HUANG Yuenan. Correlation of cancer Stem-Cell markers OCT4, SOX2, and NANOG with clinicopathological features and prognosis in operative patients with rectal cancer[J]. Yonsei Medical Journal, 2018, 59(1): 35-42.
- [19] ZHANG Jiaming, WEI Kai, JIANG Ming. OCT4 but not SOX2 expression correlates with worse prognosis in surgical patients with triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer, 2018, 25(4): 447-455.
- [20] HU Fang, LI Changhui, ZHENG Xiaoxuan, et al. Lung adenocarcinoma resistance to therapy with EGFR-tyrosine kinase inhibitors is related to increased expression of cancer stem cell markers SOX2, OCT4 and NANOG[J]. Oncology Reports, 2020, 43(2): 727-735.

收稿日期: 2021-06-06

修回日期: 2021-09-23