

· 论 著 ·

SOX2 基因在胶质瘤中的表达及生物学作用

常英男 王 策 赵天书

【摘要】目的 探讨 SOX2 基因在人胶质瘤中的表达水平、甲基化状态以及生物学作用。**方法** 选取人胶质瘤组织标本 108 例,正常脑组织 30 例。采用 PCR 的方法检测 SOX2 基因的表达水平和甲基化状态。MTT 和软琼脂集落形成试验检测 SOX2 对胶质瘤 U87 和 U251 细胞的生物学作用。**结果** SOX2 在正常脑组织中的相对表达水平明显低于胶质瘤组织($P<0.01$)。SOX2 基因启动子区非甲基化比率在胶质瘤中分别为:Ⅰ级 23.5%(4/17),Ⅱ级 34.8%(8/23),Ⅲ级 51.4%(19/37),Ⅳ级 64.5%(20/31),高级别组(57.4%)与低级别组(30.0%)相比具有统计学差异($P<0.01$)。过量表达 SOX2 基因可促进胶质瘤 U87 和 U251 细胞增殖和集落形成能力。**结论** SOX2 基因在胶质瘤组织高表达,其在胶质瘤中的表达水平可能受启动子区域甲基化状态影响,SOX2 基因影响胶质瘤的肿瘤学特性。

【关键词】 胶质瘤;SOX2 基因;甲基化;肿瘤学特性

【文章编号】 1009-153X(2016)05-0270-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression of SOX2 gene and its biological role in human gliomas

CHANG Ying-nan, WANG Ce, ZHAO Tian-shu. Department of Neurosurgery, The Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150006, China

【Abstract】 Objective To explore the expression level, methylation status and biological role of SOX2 in human gliomas. **Methods** The expression levels and the methylation status of SOX2 were determined by PCR technique in 108 specimens of glioma tissues and 30 specimens of normal brain tissues. The roles of SOX2 in the tumor characteristics of glioma cell lines were evaluated by MTT and colony-formation assay. **Results** The expression level (0.49 ± 0.2) of SOX2 was significantly higher in the glioma tissues than that (0.154 ± 0.076) in the normal brain tissues ($P<0.01$). The methylation ratio (42.6%, 29/68) of SOX2 was significantly lower in the high grade (grades Ⅱ ~ Ⅲ) glioma tissues than that (70.0%, 28/40) in the low grade (grades Ⅰ ~ Ⅱ) glioma tissues ($P<0.01$), which was significantly lower than that (100.0%) in the normal brain tissues ($P<0.05$). MTT and colony-formation assay showed that SOX2 could promote glioma cells proliferation and anchorage independent growth capacities ($P<0.05$). **Conclusions** Upregulation of SOX2 expression was found in the human gliomas tissues. The expression of SOX2 was influenced by its promoter methylation status. Overexpression of SOX2 in glioma cell lines can promote glioma cells proliferation.

【Key words】 Glioma; SOX2 gene expression; Methylation; Tumor characteristics

胶质瘤是神经系统的恶性肿瘤,侵袭性强,治愈率低,目前恶性胶质瘤的发病率仍呈上升趋势^[1-4]。Y 染色体性别决定区(sex determination region of Y chromosome, SRY)是性别决定开关。SRY 相关高可变区基因盒(SRY-related high mobility group box, SOX)是一类转录因子。SOX2 是 SOX 基因家族的一个成员^[5],它是神经系统发育的关键因子,同时也是肿瘤干细胞标志性因子之一。SOX2 基因异常与诸多肿瘤发生发展有关^[6]。有报道显示 SOX2 在正常脑

组织中表达极低,然而在胶质瘤中有较高水平的表达^[7],提示 SOX2 可能参与胶质瘤的发生发展。本文探讨 SOX2 基因在脑胶质瘤中的表达水平,及其与甲基化状态的关系,评价了 SOX2 基因在胶质瘤中的生物学作用,为临床对胶质瘤的早期诊断、预后及靶向治疗等提供潜在理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源和细胞系 收集哈尔滨医科大学附属第四医院神经外科自 2012 年 3 月至 2015 年 3 月胶质瘤标本 108 例,其中男 65 例,年龄 6~78 岁,平均 45 岁;女 43 例,年龄 8~72 岁,平均 47.5 岁。所有标本均经病理学确诊,按照 2007 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类制定的病理诊断标准进行分级^[8],其中Ⅰ级 17 例,Ⅱ级 23 例,Ⅲ级 37 例,Ⅳ级 31 例。30 例正常脑

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.05.005

基金项目:黑龙江省科技厅课题(D201140)

作者单位:150006 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第四医院神经外科(常英男、王 策、赵天书)

通讯作者:赵天书, E-mail: 1097976852@qq.com

组织,为颅脑损伤后行内减压术的患者。所有患者均获知情同意。该项研究经哈尔滨医科大学附属第四医院伦理委员会批准。

人胶质瘤细胞系U251和U87为本科室保存,使用含10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养。

1.2 核酸提取和纯化 胶质瘤标本和正常脑组织于取样后迅速冷冻于液氮中。提取时分别取约50 mg冷冻组织,在液氮下研磨成粉末。RNA和DNA的提取分别用天根动物组织总RNA提取试剂盒(货号:DP431)和血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(货号:DP304)进行提取。提取的核酸在紫外分光光度计上检测浓度和纯度,-80℃保存备用。

1.3 SOX2基因启动子甲基化的检测 截取人类SOX2基因转录起始位点前1 kb长度和起始位点后3 kb长度序列,根据文献[9]应用MethPrimer生物信息学软件分析SOX2基因启动子区域的CpG岛情况,针对CpG岛设计甲基化特异性引物:SOX2-M-正义:上游5'-TGTTTATTTATTTTTTCGAAAAGGC G-3'。SOX2-M-反义下游5'-GAACCCAACCTCGC TACCAA-3'。SOX2非甲基化引物:SOX2-U-正义上游5'-TGTTTATTTATTTTTTTTGAAAAGGTG-3'。SOX2-U-反义下游5'-CTCAAACCCAACCTCACTA CCAA-3'。

基因组DNA用亚硫酸氢钠和氢醌进行处理,用Wizard DNA Clean-Up试剂盒(Promega公司)纯化处理后的DNA。

将处理后的DNA用甲基化特异PCR进行扩增,PCR产物用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.4 SOX2基因真核表达载体的构建 根据人SOX2基因序列(NM_003106.3)设计扩增SOX2基因表达序列全长的PCR引物,上游引物:5'-GGATCCATGT ACAACATGATGGAGACGGA-3';下游引物:5'-TC ACATGTGTGAGAGGGCAGAAGCTT-3',上游引物分别加BamH I和XhoI酶切位点,将扩增产物克隆至pCDNA3.1真核表达载体中形成SOX2表达载体pCDNA-SOX2,测序验证序列正确性。

1.5 SOX2过量表达稳定细胞株的建立 将U251和U87细胞扫种至6孔板中,培养24 h后,同时转染pCDNA-SOX2和pCDNA3.1空质粒。待转染48 h后将细胞按1:3传代,同时加入G418(终浓度600 μg/ml)进行筛选。待单个克隆细胞形成后,挑取单个克隆至新的培养皿中扩大培养。随后收取细胞(约1×10⁶个),PBS缓冲液洗2遍后,用Trizol提取细胞总RNA。进行SOX2 mRNA表达水平的检测,确认阳性

克隆。

1.6 组织和细胞中SOX2 mRNA检测 SOX2的mRNA表达采用实时荧光定量PCR方法,取3 μg总RNA用DNase I处理后,用Superscript II反转录试剂盒(Invitrogen公司)合成cDNA。用cDNA产物作为实时荧光定量PCR的模板,进行相对定量检测。

SOX2上游引物:5'-CCCACCTACAGCATGTCC TAC-3';下游引物:5'-GGAGTGGGAGGAAGAGGT AAC-3'^[10],GAPDH作为内参照物。

1.7 MTT试验 将实验组和对照组细胞用含10%胎牛血清DMEM的培养基配成单细胞悬液,以每孔1 000个细胞的浓度将细胞接种至96孔板,放入细胞培养箱进行培养。每24 h进行MTT检测。检测时每孔加MTT溶液(5 mg/ml)10 μl。继续孵育4 h后终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加100 μl DMSO,振荡10 min后,于酶标仪上选择490 nm波长谱,记录吸光度值。以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.8 软琼脂集落形成试验 配制1.2% Argrose下胶和0.7% Argrose上胶,置于42℃水浴锅中备用。按1:1比例使下胶和DMEM培养基混合,6孔板每孔加入1.5 ml混合液,轻轻混匀,室温下静置待其凝固。取实验组和对照组细胞制成混悬液,密度为40×10⁴/ml。将下胶和DMEM培养基各2 ml混匀后迅速加入100 μl细胞悬液,混匀后迅速加入6孔板中,每孔1 ml,待凝固后置于培养箱中培养2~3周。每孔加入1 ml的0.005%结晶紫染色1 h,镜下拍照。

1.9 统计学分析 使用SAS 8.1软件分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异使用 t 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤SOX2基因的mRNA表达水平分析 SOX2在正常脑组织中的平均相对表达水平明显低于胶质瘤组织差异($P<0.01$),图1a。SOX2 mRNA的表达水平随着胶质瘤病理分级的增加呈逐渐升高的趋势($P<0.01$),图1b。将胶质瘤组织按甲基化和非甲基化两种不同状态分为两组,比较两组间SOX2 mRNA的表达水平,结果如图1c所示,甲基化组远低于非甲基化组($P<0.01$)。

2.2 胶质瘤SOX2基因的甲基化检测及其与肿瘤级别的关系 30例正常脑组织SOX2基因均为高甲基化。108例胶质瘤组织中,SOX2基因启动子区非甲基化比率显著高于正常脑组织($P<0.05$)。随着胶质

瘤病理分级的增加,非甲基化率呈上升趋势:Ⅰ级 23.5% (4/17),Ⅱ级 34.8% (8/23),Ⅲ级 51.4% (19/37),Ⅳ级 64.5% (20/31),甲基化状态在高级别组和低级别组之间具有统计学差异($P<0.01$),见表1。

组别		例数	SOX2 甲基化状态	
			甲基化(例)	非甲基化(例)
正常脑组织		30	100%(30)	0
胶质瘤 低级别	Ⅰ级	17	76.5%(13)	23.5%(4)
	Ⅱ级	23	65.2%(15)	34.8%(8)
	总计	40	70.0%(28)*	30.0%(12)
胶质瘤 高级别	Ⅲ级	37	48.6%(18)	51.4%(19)
	Ⅳ级	31	35.5%(11)	64.5%(20)
	总计	68	42.6%(29)*	57.4%(39)

注:与低级别胶质瘤相应值比较,* $P<0.01$

2.3 SOX2对胶质瘤细胞增殖能力的影响 过量表达外源SOX2基因3 d后,U87和U251的生长增殖速度明显增高($P<0.05$)。见图2a、2b。

2.4 SOX2对胶质瘤细胞克隆形成能力的影响 SOX2过表达细胞软琼脂的集落形成数量明显多于对照组见图2c。SOX2可以促进胶质瘤细胞的克隆形成能力。

3 讨论

胶质瘤是最常见的神经系统原发性肿瘤,占颅内原发性发肿瘤的30%~60%。胶质瘤恶性度高、易转移、预后差。目前认为胶质瘤的发生涉及细胞周期调控、发育与分化、信号传导等多种细胞生物学过程,机制异常复杂。癌基因的激活和抑癌基因的失活往往是诱发细胞恶性转化的主要因素。SOX蛋白通过其HMG结构域以转录因子的方式对下游基因进行调控,SOX2生理情况下广泛表达于胚胎干细胞及中枢神经系统中,调控胚胎发育及中枢神经系统的形成^[10]。在神经系统发育成熟以后,SOX2基因逐渐丧失表达^[11],是肿瘤干细胞标志性因子之一。SOX2基因已经发现在食管癌、肺癌等多种组织中表

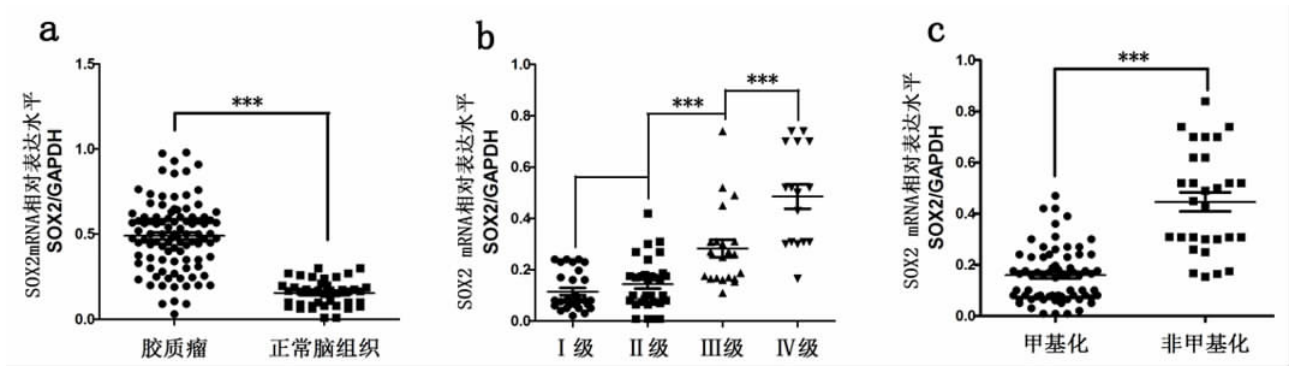


图1 SOX2基因在胶质瘤及正常脑组织中的表达水平及甲基化状态

a. 定量PCR检测胶质瘤组织与正常脑组织中SOX2基因的mRNA表达水平;b. 不同病理级别胶质瘤组织SOX2基因的mRNA表达水平;c. 胶质瘤组织SOX2基因启动因子甲基化对SOX2基因表达水平的影响,*** $P<0.01$

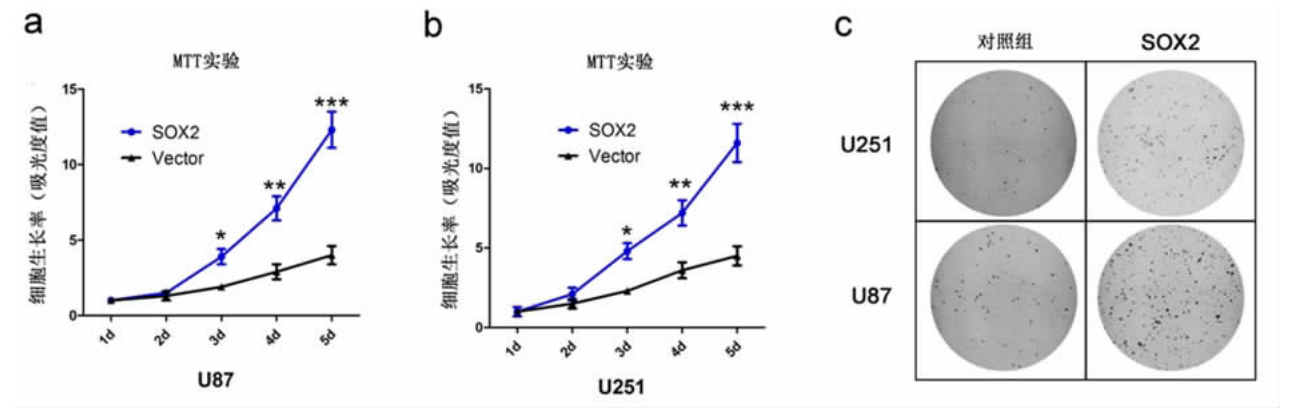


图2 过表达SOX2基因的U87和U251细胞增殖能力影响

a. U87细胞系;b. U251细胞系;c. 软琼脂集落形成实验检测过量表达SOX2基因与野生型对照细胞相比,各组细胞集落形成数量;与Vector相应值比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

达,据推测它可能在多种肿瘤的发生发展中起作用^[12,13]。Schmita 等^[14]发现 SOX2 在胶质瘤中表达升高,并推测其参与了胶质瘤的发生。本研究用荧光定量 PCR 的方法检测了 SOX2 在胶质瘤组织中的表达水平,结果证实胶质瘤组织中确有 SOX2 基因的表达,且随着病理级别的增高,SOX2 表达呈逐渐升高的趋势。

基因表达水平的改变往往跟表观遗传学有密切联系^[15]。我们对 SOX2 基因的甲基化水平进行了研究,结果显示 SOX2 基因在正常脑组织中呈高甲基化状态,而在胶质瘤组织中甲基化水平降低。这提示 SOX2 基因在胶质瘤中的表达受到其启动子区甲基化状态的影响,去甲基化水平的增高可能是诱导 SOX2 基因表达的原因之一。进而,我们用 MTT 和集落形成试验探讨了 SOX2 对胶质瘤细胞增殖能力的影响,结果显示 SOX2 可促进胶质瘤细胞增。这提示 SOX2 基因可能作为癌基因参与了胶质瘤的发生和发展。

综上所述,SOX2 在胶质瘤组织中表达升高;SOX2 在胶质瘤中的表达水平受其启动子区甲基化状态调控;SOX2 基因促进胶质瘤细胞的生长增殖等肿瘤学特性,在胶质瘤的发生中起促进作用。

【参考文献】

[1] 徐国政,袁先厚. 脑胶质瘤靶向治疗新进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2011,16(9):568-572.

[2] 吴越,徐国政. 脑胶质瘤的分子靶向治疗研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2013,18:186-188.

[3] 刘宁,程光. 恶性胶质瘤免疫治疗研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2013,18:251-253.

[4] 林婷婷,李钢. 脑胶质瘤的综合临床治疗的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志,2013,18:316-318.

[5] Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with

partners in the regulation of embryonic development [J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 182-187.

[6] Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, *et al.* Role of the stem-ness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma [J]. J Surg Res, 2012, 174(1): 130-135.

[7] 王博,唐景峰,黄永旺,等. SOX2 和 Oct4 在人脑胶质瘤组织中的表达及意义[J]. 中国当代医药, 2015, 22(9): 18-21.

[8] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. Acta Neuropathol, 2007, 114(2): 97-109.

[9] Li AS, Siu MK, Zhang H, *et al.* Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma [J]. Reprod Sci, 2008, 15(7): 735-744.

[10] 牛海静,陈鑫,王邦茂. 胃黏膜肠化生中 CDX2 及 SOX2 的表达及其甲基化状态[J]. 中华内科杂志, 2011, 50(5): 426-427.

[11] Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(3): 421-424.

[12] 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.

[13] Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, *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.

[14] 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.

[15] 续继军,孟铸,李志鹏,等. 胶质瘤细胞 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平对其基因转录的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015, 20(7): 410-412.

(2015-11-23 收稿, 2016-02-01 修回)