

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.006

SOX9 上调 LINC01503 表达促进喉鳞状细胞癌细胞恶性生物学行为和肿瘤干细胞干性

王晶田^a, 赵岩^a, 刘胜辉^a, 兰利利^a, 吴干勋^a, 沈素朋^b (河北医科大学第四医院 a. 耳鼻喉头颈外科; b. 生物标本库, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探究 SOX9 通过上调长链非编码 RNA LINC01503 的表达对喉鳞状细胞癌(LSCC)细胞的增殖、迁移、侵袭及肿瘤干细胞干性的影响。**方法:** 常规培养人 LSCC 细胞 AMC-HN-8、TU177、TU212 和 TU686, 用转染试剂将敲减序列及其对照核酸 (si-SOX9-NC、si-SOX9#1、si-SOX9#2、si-LINC01503-NC、si-LINC01503#1、si-LINC01503#2) 或过表达质粒及其对照核酸 (pcDNA3.1-SOX-NC、pcDNA3.1-SOX-oe、pcDNA3.1-LINC01503-NC 和 pcDNA3.1-LINC01503-oe) 分别转染至 TU177 细胞或 TU686 细胞, 记为 si-SOX9-NC 组、si-SOX9#1 组、si-SOX9#2 组、si-LINC01503-NC 组、si-LINC01503#1 组、si-LINC01503#2 组; pcDNA3.1-SOX9-NC 组、pcDNA3.1-SOX9-oe 组、pcDNA3.1-LINC01503-NC 组、pcDNA3.1-LINC01503-oe 组、si-SOX9-NC + pcDNA3.1-LINC01503-NC 组和 si-SOX9 + pcDNA3.1-LINC01503-oe 组。qPCR 法检测 SOX9 mRNA 和 LINC01503 在各组细胞中的表达, 生物信息学分析 SOX9 与 LINC01503 启动子区的结合位点, 双萤光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀实验验证 SOX9 与 LINC01503 启动子区是否直接结合, WB 法检测 SOX9 的敲减效率及 LINC01503 对 TU177 和 TU686 细胞干性标志物表达的影响, MTS 法检测各组细胞的增殖活力, 划痕愈合和 Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移能力, 克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力。**结果:** SOX9 在各种 LSCC 细胞中呈高表达 (均 $P < 0.05$), 数据库数据分析显示, 在头颈部鳞状细胞癌中, SOX9 与 LINC01503 表达呈正相关 ($R = 0.12, P = 0.0059$); SOX9 可与 LINC01503 启动子区直接结合并促进其转录表达 (均 $P < 0.05$); 敲减 LINC01503 可明显抑制 TU177 细胞的增殖、迁移、侵袭 (均 $P < 0.05$), 过表达 LINC01503 明显促进 TU686 细胞增殖、迁移、侵袭的能力 (均 $P < 0.05$), 提高 TU686 细胞克隆形成能力和细胞干性标志物分子 CD133、OCT4、SOX2 的 mRNA 和蛋白水平表达 (均 $P < 0.05$), 敲减 LINC01503 则均可抑制 TU686 细胞的克隆形成和细胞干性标志物的表达 (均 $P < 0.05$); 敲减 SOX9 均可明显抑制 TU177 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 降低其干性细胞标志物的表达 (均 $P < 0.05$), 同时过表达 LINC01503 则可部分逆转敲减 SOX9 对 TU177 细胞恶性生物学行为和干性标志物表达的抑制作用 (均 $P < 0.05$)。**结论:** SOX9 和 LINC01503 在 LSCC 细胞中呈高表达, SOX9 可能通过上调 LINC01503 表达提高 LSCC 细胞增殖、转移和侵袭能力和肿瘤干细胞干性。

[关键词] 喉鳞状细胞癌; SOX9; LINC01503; 增殖; 迁移; 侵袭; 肿瘤细胞干性

[中图分类号] R739.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 11-1092-09

Upregulation of LINC01503 expression by SOX9 promotes malignant biological behaviors and tumor stem cell stemness in laryngeal squamous cell carcinoma

WANG Jingtian^a, ZHAO Yan^a, LIU Shenghui^a, LAN Lili^a, WU Ganxun^a, SHEN Supeng^b (a. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, b. Biological Specimen Library, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of SOX9 on the proliferation, migration, invasion, and stemness of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells by upregulating the expression of long non-coding RNA LINC01503. **Methods:** Human LSCC cells AMC-HN-8, TU177, TU212, and TU686 were cultured routinely. Control nucleic acids (NC) and knockdown sequences (si-SOX9-NC, si-SOX9#1, si-SOX9#2, si-LINC01503-NC, si-LINC01503#1, si-LINC01503#2) or overexpression plasmids (pcDNA3.1-SOX-NC, pcDNA3.1-SOX-oe, pcDNA3.1-LINC01503-NC, and pcDNA3.1-LINC01503-oe) were transfected into TU177 cells or TU686 cells. These groups were named as si-SOX9-NC group, si-SOX9#1 group, si-SOX9#2 group, si-LINC01503-NC group, si-LINC01503#1 group, si-LINC01503#2 group; pcDNA3.1-SOX9-NC group, pcDNA3.1-SOX9-oe group, pcDNA3.1-LINC01503-NC group, pcDNA3.1-LINC01503-oe group, si-SOX9-NC + pcDNA3.1-LINC01503-NC group, and si-SOX9 + pcDNA3.1-LINC01503-oe group. The expression of SOX9 mRNA and LINC01503 in each group of cells was detected by qPCR. Bioinformatics tool was employed to

[基金项目] 河北省重点研发计划项目 (No. 20377709D, 22377736D); 河北省自然科学基金项目 (No. H2022206326)

[作者简介] 王晶田 (1985—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事耳鼻喉头颈部肿瘤的基础与临床研究。E-mail: wangjingtian9985@sina.com

[通信作者] 沈素朋, E-mail: shsyssp2012@163.com

identify the binding site of SOX9 to lncRNA LINC01503 promoter region. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and dual luciferase reporter gene experiments were carried out to validate the binding between SOX9 and the LINC01503 promoter. SOX9 knockdown efficiency and the influence of LINC01503 on the expression of stem cell markers in TU177 and TU686 cells were detected by WB assay. MTS assay was used to detect cell proliferation, scratch wound healing, and Transwell assays assessed cell migration, while colony formation assays evaluated the ability of cells to form colonies. **Results:** SOX9 was highly expressed in all LSCC cells ($R = 0.12$, $P < 0.05$). Database analysis showed a positive correlation between SOX9 and LINC01503 expression in head and neck squamous cell carcinoma ($P = 0.0059$). It was proved that SOX9 directly binds with the LINC01503 promoter and promotes its transcriptional expression ($P < 0.05$). Knockdown of LINC01503 significantly suppressed the proliferation, migration, and invasion of TU177 cells (all $P < 0.05$). Overexpression of LINC01503 notably enhanced the proliferation, migration, invasion and colony formation of TU686 cells (all $P < 0.05$), as well as the expression of cell stemness markers CD133, OCT4, and SOX2 at both mRNA and protein levels (all $P < 0.05$). However, knockdown of LINC01503 inhibited colony formation and expression of stem cell markers in TU686 cells ($P < 0.05$). Knockdown of SOX9 significantly suppressed the proliferation, migration, and invasion ability of TU177 cells and reduced the expression of their stem cell markers (all $P < 0.05$). Meanwhile, overexpression of LINC01503 partially reversed the inhibitory effect of SOX9 knockdown on the malignant biological behavior and stem cell marker expression in TU177 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Both SOX9 and LINC01503 are highly expressed in LSCC cells. SOX9 may promote the proliferation, migration, invasion and stemness of laryngeal squamous cell carcinoma by upregulating LINC01503 expression.

[Key words] laryngeal squamous cell carcinoma; SOX9; LINC01503; proliferation; migration; tumor cell stemness

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(11): 1092-1100. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.006]

喉癌是全球范围内头颈癌中最常见的一种恶性肿瘤。据报道^[1], 2021年新增喉癌184 615例, 其中95%的病例为喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC), 其主要特征是局部浸润和淋巴结转移^[2]。目前, 缺乏更有效的局部复发和转移治疗手段, 患者的预后情况不理想。因此, 阐明LSCC发生发展的潜在分子机制, 发现预测LSCC的生物标志物, 制定更合适的治疗策略迫在眉睫。性别决定区Y盒家族转录因子9(sex-determined region Y box family transcription factor 9, SOX9)作为SOX家族的一员, 是参与早期胚胎发育的核转录因子^[3], 并且在调控肿瘤的发生、转移、癌细胞增殖、化学和放射抗性以及干细胞维持的信号传导中起着重要作用^[4]。长链非编码RNA(lncRNA)可以参与包括LSCC在内的多种肿瘤细胞的恶性生物学行为, 可作为可靠的生物标志物和癌症治疗靶点^[5-6]。已有研究^[7-8]证明, LINC01503在多种鳞状细胞癌中发挥促癌作用。XIE等^[8]研究发现, LINC01503在头颈部鳞癌中的表达显著增高, 且其高表达与患者的不良预后有关。此外, 近年来, SOX-lncRNA网络的异常调节对肿瘤进展的影响引起了研究人员的广泛关注^[9]。本研究旨在通过数据库分析作为SOX9下游重要靶点的LINC01503, 检测在LSCC中SOX9介导的LINC01503表达, 以及LINC01503对LSCC细胞增殖、转移、肿瘤干细胞干性的影响, 旨在为筛选LSCC发生发展相关的分子标志物和治疗靶标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人LSCC细胞AMC-HN-8、TU177、TU212和TU686均购自美国ATCC细胞库。RPMI 1640及DMEM培养液均购自美国Gibco公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国BI公司, 逆转录试剂盒购自瑞士Roche公司, Lipofectamine™2000(Lip2000)转染试剂购自Invitrogen公司, MTS试剂均购自美国Promega公司, Transwell小室和Matrigel基质胶均购自美国Corning公司, si-SOX9#1、si-SOX9#2、si-LINC01503#1、si-LINC01503#2、si-SOX9-NC和si-LINC01503-NC均购自苏州吉玛基因有限公司, pcDNA3.1-SOX9-oe、pcDNA3.1-LINC01503-oe、pcDNA3.1-SOX9-NC和pcDNA3.1-LINC01503-NC均由上海生工生物工程有限公司合成或制备, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。兔抗人ACTB(货号380624)、CD133(货号252208)、SOX2(货号D9B8N)、OCT4(货号R381335)抗体均购自成都正能生物有限公司。B27、内皮细胞生长因子(EGF)购自MCE公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

AMC-HN-8细胞用含10% FBS的DMEM培养液培养, TU177、TU212及TU686细胞均用含10% FBS的RPMI 1640培养液培养, 所有细胞均置于37℃、5% CO₂的培养箱中常规培养; 每日更换培养液, 待细胞汇合至80%以上时用0.25%胰酶消化传代。用Lip2000转染试剂将敲减序列(si-SOX9#1、si-SOX9#2、si-LINC01503-NC、si-LINC01503#1、si-LINC01503#2)及敲减对照(si-SOX9-NC)转染TU177细胞, 记为si-SOX9#1组、si-SOX9#2组、si-LINC01503-NC组、si-LINC01503#1组、si-LINC01503#2组和si-SOX9-NC组; 将过表达质粒及

其对照质粒(pcDNA3.1-SOX9-oe、pcDNA3.1-SOX9-NC、pcDNA3.1-LINC01503-NC和pcDNA3.1-LINC01503-oe)转染TU686细胞,记为pcDNA3.1-SOX9-oe组、pcDNA3.1-LINC01503-NC组、pcDNA3.1-LINC01503-oe组、si-SOX9-NC+pcDNA3.1-LINC01503-NC组和si-SOX9+pcDNA3.1-LINC01503-oe组和pcDNA3.1-SOX9-NC组。

1.3 qPCR法检测LSCC细胞中SOX9和LINC01503的表达

用TRIzol试剂从LSCC细胞中提取总RNA。按照Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit说明书操作,合成cDNA。用SYBR qPCR Master Mix在StepOnePlus™实时PCR仪上进行qPCR检测。反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s;60℃ 30 s,72℃ 30 s,共35个循环;72℃ 7 min。以 β -actin作为内参基因,对照组(pools)为随机取10例癌旁组织的cDNA混合。SOX9正向引物:5'-ATGAATCTCCTGGACCCCTTCA-3',反向引物:5'-AGGTCGAGTGAGCTGTGTGTAGAC-3';LINC01503正向引物:5'-GGGACGGAGACAAATGACGG-3',反向引物:5'-GCAGGC TCCTGACACGTA-3'; β -actin正向引物:5'-AAATCGTGCGTGACATTAA-3',反向引物:5'-CTCGTCATCTCCTGCTTG-3'。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。实验重复3次。

1.4 生物信息学分析

通过JASPAR数据库(<http://jaspar.genereg.net>)和动物TFDB 3.0数据库(<https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/8>)预测发现,SOX9可以和LINC01503启动子区结合,SOX9在LINC01503启动子区有3个潜在的结合位点,分别为-473~-487 bp、-646~-654 bp和-754~-762 bp。通过GEPIA在线数据集(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)和UALCAN(<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>)预测SOX9与LINC01503在头颈部鳞癌表达的相关性及LINC01503的表达情况。

1.5 双荧光素酶报告基因实验检测SOX9与LINC01503启动子区的直接结合作用

将LINC01503的启动子区(-780~+31;-392~+31)以及缺乏SOX9在LINC01503的启动子区结合元件的序列(MUT)插入到报告基因质粒(pGL3-Basic Vector),构建重组质粒。根据试剂盒说明书,使用Lipofectamine®2000试剂将2 μ g pGL3-LINC01503-野生型(WT)或pGL3-LINC01503-突变型(MUT)和2 μ g pcDNA3.1或pcDNA3.1-SOX9共转染TU686细胞。实验分为pcDNA3.1+pGL3-LINC01503-野生型(WT)组、pcDNA3.1-SOX9+pGL3-LINC01503-野生

型(WT)组、pcDNA3.1+pGL3-LINC01503-突变型(MUT)组、pcDNA3.1-SOX9+pGL3-LINC01503-突变型(MUT)组,每组设3个复孔,培养48 h后,检测荧光素酶活性。

1.6 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)实验检测SOX9与LINC01503启动子区结合位点

按照文献[10]描述的实验步骤进行。在LSCC细胞中过表达SOX9,待细胞贴壁生长至90%汇合,进行细胞的甲醛交联,超声碎裂DNA,在1.5%琼脂糖凝胶上检测超声破碎的效果。经过免疫沉淀、解交联及DNA样品纯化,最后进行qPCR检测。LINC01503启动子区结合位点1引物序列为F: 5'-TTACAGGTAAGGAGGCTCTG-3', R: 5'-TGAAATAGGTCAGCCTTGTA-3';结合位点2引物序列为F: 5'-AAGAGGGAGGCATATTGATCC-3', R: 5'-TCTCTAAGCCAGGTGCGAAGA-3';结合位点3引物序列为F: 5'-TCTTCGCACCTGGCTTAGAGA-3', R: 5'-GGCTGTGTGCCCTGTAGTAA-3'。

1.7 WB法检测SOX9的干扰效率及LINC01503对细胞干性标志物表达的影响

用高效RIAP组织/细胞裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA蛋白质测定试剂盒进行蛋白质定量。通过10% SDS-PAGE分离蛋白质样品(40 μ g/泳道),并将其转移到PVDF膜上。剪取所需的PVDF膜,放入5%脱脂奶粉溶液中封闭30 min,加入抗ACT单抗(1:5 000稀释)、抗CD133、SOX2、OCT4单抗(均1:1 000稀释)。将PVDF膜放入相应抗体液中4℃下处理过夜,次日用TBST缓冲液在摇床上洗涤3次,加入HRP山羊抗兔二抗(1:10 000稀释)在室温下处理45 min。用TBST缓冲液洗膜后,用ECL发光试剂盒曝光,观察蛋白质条带,并使用ImageJ软件(1.48版)对条带灰度值进行分析。

1.8 MTS法检测转染LINC01503对LSCC细胞增殖能力的影响

将各组TU177细胞和TU686细胞培养24 h后常规消化,悬浮于含10% FBS的培养基中,调整细胞密度,以每孔100 μ L(含有1 000个细胞)接种于96孔板,每组设置6个复孔。分别在细胞贴壁后0、24、48、72和96 h时分别向每孔加入MTS试剂20 μ L,培养箱培养2~4 h后,酶标仪测定490 nm处的光密度(D)值,绘制增殖曲线评估细胞增殖水平。

1.9 划痕愈合实验检测转染LINC01503对LSCC细胞迁移能力的影响

将转染后的细胞以 2×10^5 个细胞/孔接种到6孔板中。细胞汇合度达到90%左右时使用无菌移液吸

头尖端通过刮擦细胞层进行划痕。PBS清洗漂浮细胞后,换无血清培养基进行培养。在0和24 h拍照并测量细胞迁移距离,计算迁移率。

1.10 Transwell小室检测LINC01503对LSCC细胞侵袭能力的影响

用无血清培养基按照1:7的比例稀释Matrigel基质胶,向上层小室中加入20 μ L,迅速晃动24孔板使基质胶均匀铺满小室底面,注意不要产生气泡,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,待基质胶凝固后使用。调整细胞密度并以每室 1×10^5 个细胞接种于上室中,加入无血清培养基补齐200 μ L,下室加600 μ L含10% FBS的完全培养基。常规培养24 h后取出小室,用棉签轻轻擦拭上室内的细胞,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min,显微镜下观察穿膜细胞并计数。

1.11 细胞克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力

将TU686细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种在超低

黏附的6孔板中。然后将细胞置于含有 $1 \times \text{B27}$ 、20 ng/mL EGF、20 ng/mL FGF和4 μ g/mL胰岛素的RPMI 1640培养基中培养7~10 d。培养期结束后,在显微镜下计数克隆形成数量。

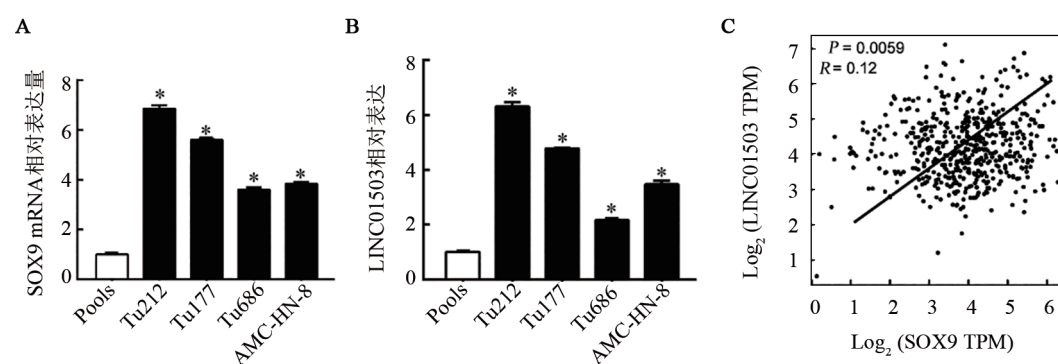
1.12 统计学处理

采用IBM SPSS25.0统计软件进行数据分析。所有实验均独立重复3次,呈正态分布的计量数据采用以 $\bar{x} \pm s$ 差表示。组间数据比较采取两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SOX9在LSCC细胞中呈高表达并与LINC01503表达呈正相关

qPCR法检测结果(图1A、B)显示,与癌旁对照相比,SOX9和LINC01503在LSCC细胞中均呈高表达(均 $P < 0.05$)。GEPIA在线数据库预测结果显示,在头颈部鳞癌中,SOX9和LINC01503表达呈正相关(图1C; $R = 0.12$, $P < 0.05$)。



与癌旁对照相比,* $P < 0.05$

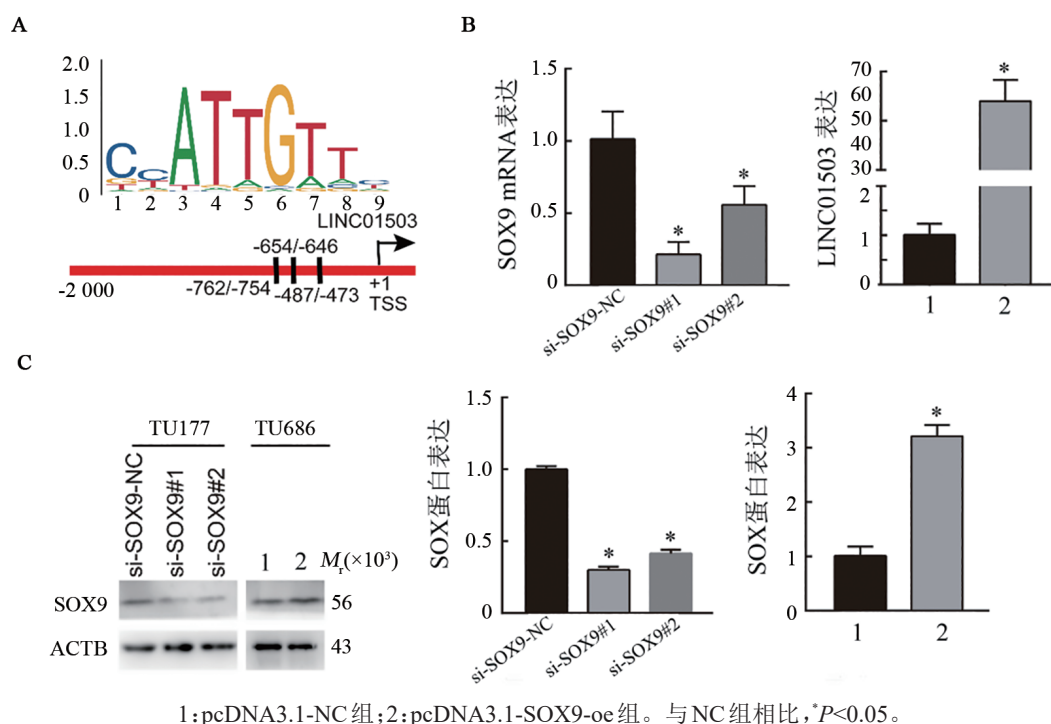
图1 SOX9和LINC01503在LSCC细胞中的表达及相关性

2.2 SOX9与LINC01503的启动子区结合并促进其表达

JASPAR预测结果显示,SOX9在LINC01503启动子区有3个结合区域(位点1:-473~-487 bp、位点2:-646~-654 bp、位点3:-754~-762 bp),结合序列为CCATTGTT(图2A)。qPCR检测结果(图2B)显示,在LSCC细胞中敲减或过表达SOX9后,SOX9的mRNA和LINC01503的表达水平均显著降低或升高(均 $P < 0.05$)。WB法检测结果(图2C)显示,敲减或过表达SOX9后TU77或TU686细胞中SOX9的蛋白水平均显著降低或升高(均 $P < 0.05$)。

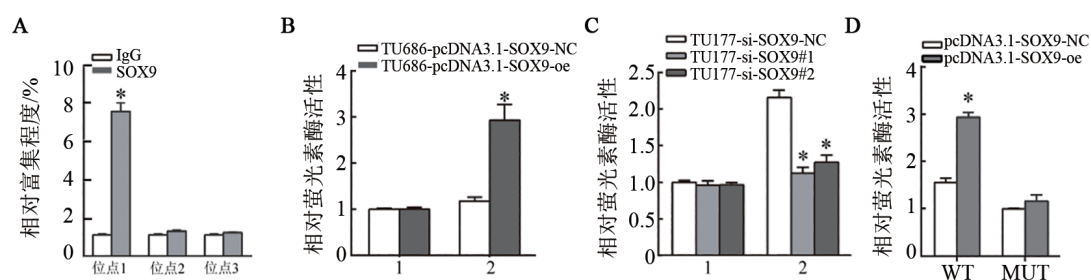
ChIP实验检测结果(图3A)显示,SOX9与LINC01503启动子区(位点1:-473~-487 bp)存在结合关系($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图3B、C)显示,与pcDNA3.1-SOX9-NC组相比,SOX9与不同截短长短质粒共转时,-392~

+31 bp长度的片段组的荧光素酶活性无明显变化,而-780~+31 bp长度的片段组的荧光素酶活性显著增高($P < 0.05$);敲减SOX9表达,-780~+31 bp长度的片段组的荧光素酶活性明显降低($P < 0.05$),提示SOX9在LINC01503启动子区结合位置位于-392 bp下游区域;为了进一步验证SOX9在LINC01503启动子区的具体结合区域,进行双荧光素酶报告基因实验,结果(图3D)显示,与pcDNA3.1-SOX9-NC + LINC01503-WT组比较,pcDNA3.1-SOX9 + LINC01503-WT组细胞中荧光素酶活性显著上调($P < 0.05$);与LINC015033-MUT + pcDNA3.1-SOX9-NC组比较,LINC01503-MUT + pcDNA3.1-SOX9组LSCC细胞中的荧光素酶活性没有明显变化($P > 0.05$)。实验结果说明,SOX9与LINC01503启动子区存在结合关系,具体结合位置为-473~-487 bp。



1: pcDNA3.1-NC 组; 2: pcDNA3.1-SOX9-oe 组。与 NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图2 SOX9对LINC01503表达水平的影响



A: ChIP 实验检测 SOX9 对 LINC01503 启动子区的富集情况; B、C 和 D: 荧光素酶报告基因检测 SOX9 与 LINC01503 的结合关系。1: pGL3-LINC01503(-392/+31) 组; 2: pGL3-LINC01503(-780/+31) 组。与 NC 对照组或 IgG 组相比, * $P < 0.05$ 。

图3 SOX9与LINC01503启动子区的结合情况

2.3 敲减 LINC01503 可明显抑制 LSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 检测结果(图4)显示,与 si-LINC01503-NC 组相比, si-LINC01503 组 TU177 细胞中 LINC01503 表达显著降低($P < 0.05$, 图4A),表明在 LSCC 细胞中成功敲减了 LINC01503,可以进行后续功能实验。MTS、划痕愈合和 Transwell 小室侵袭实验结果(图4B~D)显示,与 si-LINC01503-NC 组相比,敲减 LINC01503 表达后, TU177 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均显著减弱(均 $P < 0.05$)。

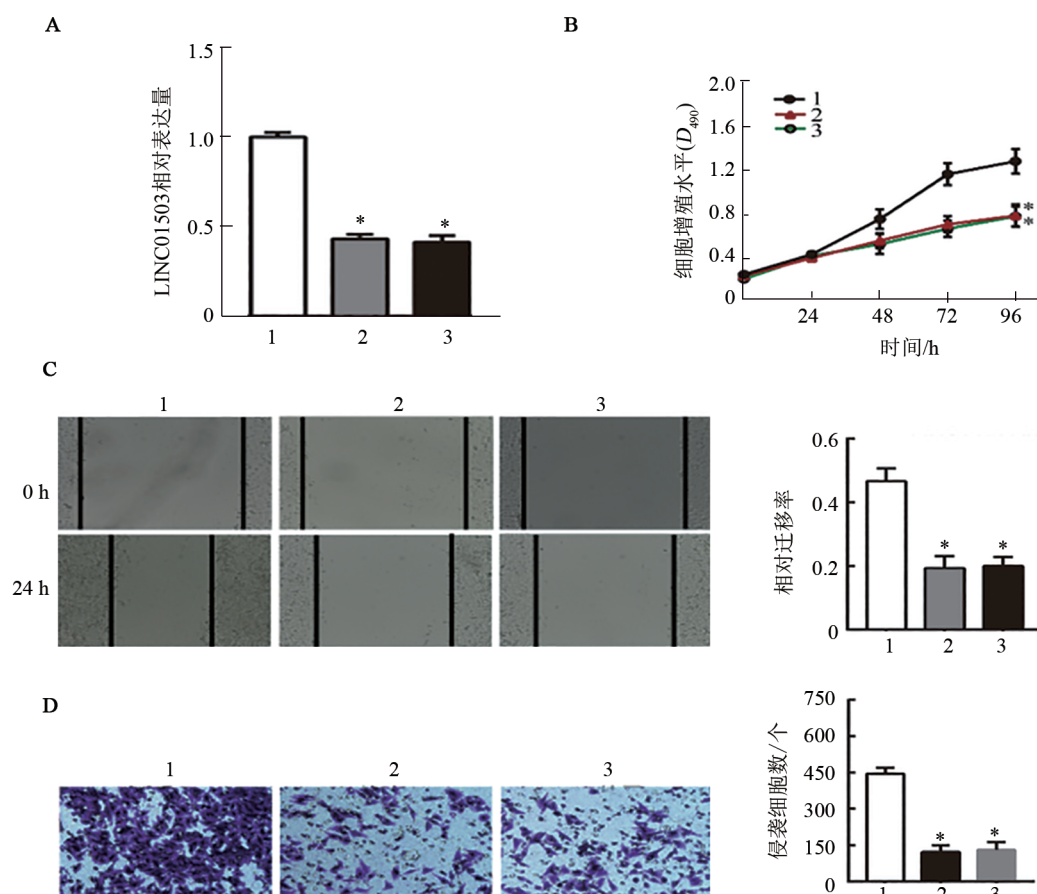
2.4 过表达 LINC01503 可明显促进 TU686 细胞增殖、迁移、侵袭的能力

qPCR 法检测结果(图5)显示,与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-LINC01503-oe 组 TU686 细胞中 LINC01503 的表达显著升高($P < 0.05$),表明在 TU686 细胞中成功过表达了 LINC01503,可以进行后续功能

实验。MTS、划痕愈合和 Transwell 小室侵袭实验结果(图5B~D)显示,与 pcDNA3.1-NC 组相比,过表达 LINC01503, TU686 细胞的增殖、迁移、侵袭能力显著增强(均 $P < 0.05$)。

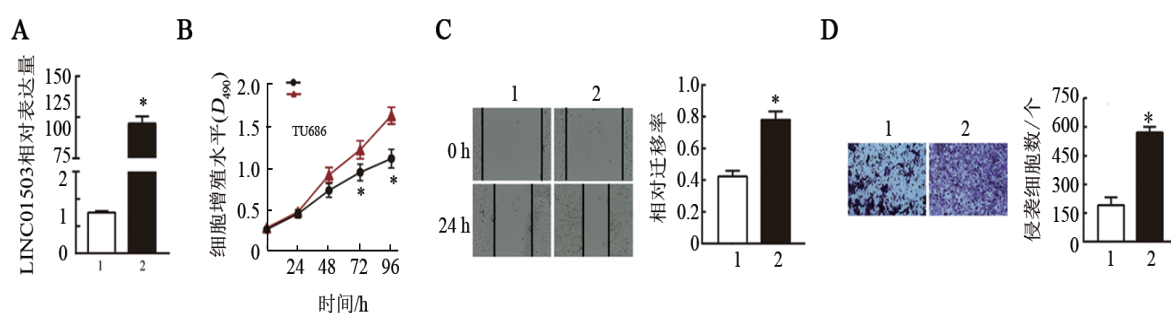
2.5 过表达 LINC01503 可明显促进 TU686 细胞克隆形成能力和细胞干性标志物分子表达

克隆形成实验检测结果(图6A)显示,与 si-LINC01503 组相比,敲减 LINC01503 后, TU177 细胞的克隆形成能力明显减弱($P < 0.05$),而过表达 LINC01503 后, TU177 克隆形成能力明显增强($P < 0.05$)。qPCR、WB 法检测结果(图6B、C)显示,敲减 LINC01503 表达后,肿瘤干细胞标志物 CD133、OCT4、SOX2 的 mRNA 和蛋白水平均明显降低(均 $P < 0.05$),而过表达 LINC01503 后, CD133、OCT4、SOX2 的 mRNA 和蛋白水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。



A: qPCR 检测转染效率; B: MTS 法检测 TU77 细胞的增殖能力; C: 划痕愈合实验检测 TU77 细胞的迁移能力($\times 200$); D: Transwell 小室实验检测 TU77 细胞的侵袭能力($\times 200$)。1: si-LINC01503-NC 组; 2: si-LINC01503#1 组; 3: si-LINC01503#2 组。与 si-LINC01503-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图4 敲减 LINC01503 对 TU177 细胞增殖、迁移和侵袭的影响



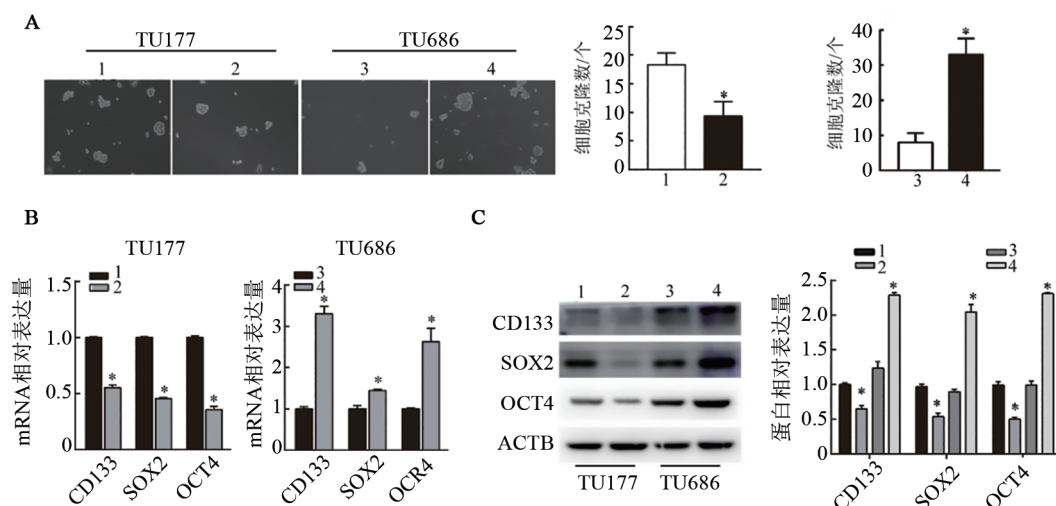
A: qPCR 检测转染效率; B: MTS 法检测 TU686 细胞的增殖能力; C: 划痕愈合实验检测 TU686 细胞的迁移能力($\times 200$); D: Transwell 小室实验检测 TU686 细胞的侵袭能力($\times 200$)。1: pcDNA3.1-LINC01503-NC 组; 2: pcDNA3.1-LINC01503-oe 组。与 pcDNA3.1-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图5 过表达 LINC01503 对 LSCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

2.6 SOX9 通过 LINC01503 调控 TU177 细胞的恶性生物学行为

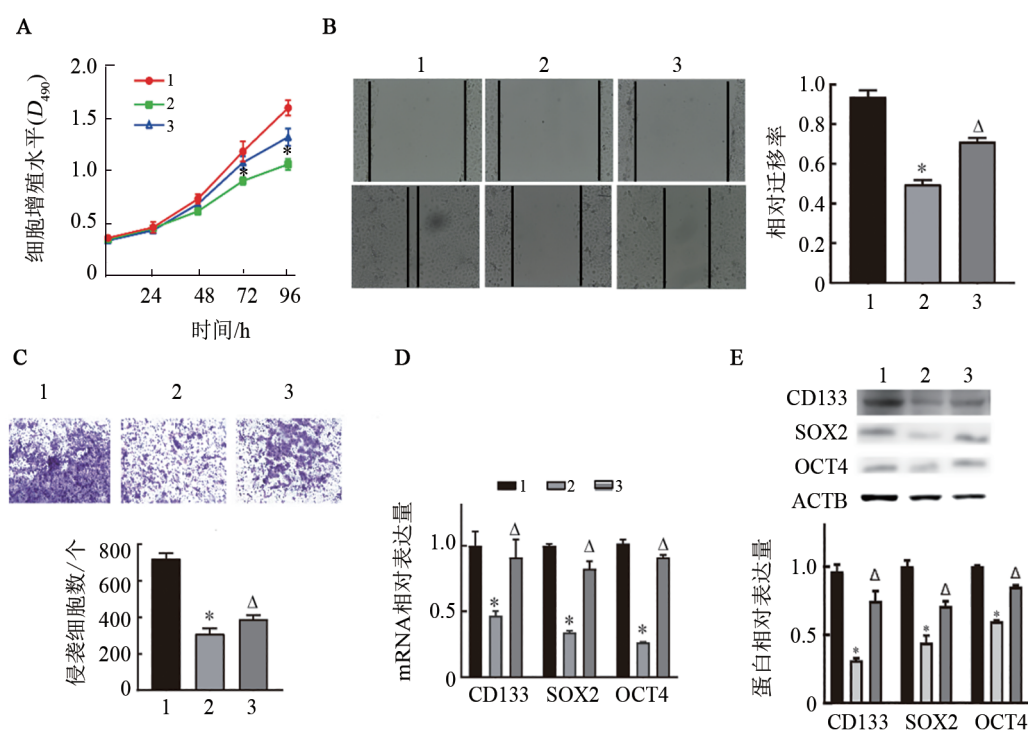
MTS 法检测结果(图 7A)显示,与 si-SOX-NC + pcDNA3.1-LINC01503-NC 组相比,在 TU177 细胞中敲减 SOX9 表达后其增殖能力显著降低,而同时敲减 SOX9 和过表达 LINC01503 后, TU177 细胞的增殖能力显著回升(均 $P < 0.05$)。划痕愈合和 Transwell 侵袭实验结果(图 7B、C)显示,与 si-SOX-NC +

pcDNA3.1-LINC01503-NC 组相比,在 TU77 细胞中敲减 SOX9 表达后其迁移、侵袭能力显著降低,而同时敲减 SOX9 和过表达 LINC01503 后, TU177 细胞的迁移、侵袭能力均明显回升(均 $P < 0.05$)。qPCR 法检测结果(图 7D、E)显示,敲减 SOX9 表达后, CD133、SOX2 和 OCT4 表达显著降低,同时过表达 LINC01503 则可以削弱敲减 SOX9 对 CD133、SOX2 和 OCT4 mRNA 和蛋白表达的抑制作用($P < 0.05$)。



A: 克隆形成实验检测 TU177、TU686 细胞的克隆形成能力($\times 200$); B: qPCR 检测细胞干性标志分子 mRNA 的表达情况; C: WB 法检测细胞干性标志分子的蛋白表达情况。1: si-LINC01503-NC 组; 2: si-LINC01503 组; 3: pcDNA3.1-LINC01503-NC 组; 4: pcDNA3.1-LINC01503-oe 组。与 NC 组比较, $^*P < 0.05$ 。

图6 LINC01503 对 LSCC 细胞成球能力和细胞干性标志物分子表达



A: MTS 法检测 TU177 细胞的增殖能力; B: 划痕愈合实验检测 TU177 细胞的迁移能力($\times 200$); C: Transwell 小室实验检测 TU177 细胞的侵袭能力($\times 200$); D: qPCR 法检测 TU177 细胞干性标志分子 mRNA 的表达; E: WB 法检测 TU177 细胞干性标志蛋白的表达。1: si-SOX9-NC + pcDNA3.1-LINC01503 组; 2: si-SOX9 组; 3: si-SOX9 + pcDNA3.1-LINC01503-oe 组。

与 si-SOX9-NC + pcDNA3.1-LINC01503-NC 组比较, $^*P < 0.05$, 与 si-SOX9 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图7 SOX9 上调 LINC01503 表达对 LSCC 细胞增殖、迁移、侵袭和细胞干性的影响

3 讨论

SOX9 表达失调与肿瘤发生及患者预后密切相关。研究^[11]发现, SOX9 与多种肿瘤晚期转移及化疗耐药有关。在乳腺癌中, SOX9 高表达与乳腺癌细胞的内分泌抵抗有关^[12]。在肺癌中, SOX9 决定肺癌细

胞的可塑性或转移进展^[13]。此外, SOX9 还诱导结直肠癌和黑色素瘤的侵袭和转移^[14-15], 促进前列腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌等多种肿瘤的恶性进展^[3, 16-17]。因此, SOX9 的表达可以用作预后生物标志物, 在控制肿瘤的发生、转移、肿瘤细胞增殖、干细胞维持中发挥重要作用。使用特异性抑制剂或降解剂

对其进行调节或降解可以提供一种新的抗肿瘤治疗的方法。

有研究^[8,18]表明,LINC01503促进鳞状细胞癌的恶性进展,可能在鳞状细胞癌作为一种新型特异性lncRNA,如食管鳞状细胞癌和头颈部鳞状细胞癌。还有研究^[19]表明,LINC01503通过调节LASP112促进非小细胞肺癌的发生发展。在卵巢癌中,LINC01503可通过吸附miR-342-3p上调IGF2R表达水平促进卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭^[20]。在肝癌中,LINC01503通过激活MAPK/ERK途径促肝癌的细胞生长,与患者不良预后有关^[21]。目前,关于LINC01503在LSCC发生发展中的作用和调控LINC01503表达的机制尚少见报道。

本研究首先发现,SOX9和LINC01503均在LSCC细胞中呈高表达,并且敲减或过表达SOX9后发现,LINC01503的表达受SOX9的调控。数据库分析发现,转录因子SOX9在LINC01503启动子区有3个结合位点,ChIP和双荧光素酶实验检测发现SOX9与LINC01503启动子区近转录起始点结合。此外,还发现LINC01503促进了TU177和TU686细胞的增殖、迁移、侵袭和克隆形成能力及细胞干性标志物的表达。并且在TU686和TU177细胞中,SOX9可以与LINC01503启动子区结合,调控LINC01503转录,进而促进TU177和TU686细胞的恶性生物学功能及干性。

总之,本研究阐明了SOX9和LINC01503在LSCC细胞中呈高表达,SOX9通过上调LINC01503表达进而促进其恶性生物学功能和细胞干性。SOX9-LINC01503作用途径可能为LSCC诊断和治疗的潜在生物标志物和靶点,但具体的作用机制有待更深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] YAN L, SONG X L, YANG G, *et al.* Identification and validation of immune infiltration phenotypes in laryngeal squamous cell carcinoma by integrative multi-omics analysis[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 843467[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8907422/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.843467.
- [3] PANDA M, TRIPATHI S K, BISWAL B K. SOX9: an emerging driving factor from cancer progression to drug resistance[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188517[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33524528/>. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188517.
- [4] JANA S, MADHU KRISHNA B, SINGHAL J, *et al.* SOX9: The master regulator of cell fate in breast cancer[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113789[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9048250/>. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113789.
- [5] CHI Y J, WANG D, WANG J P, *et al.* Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(9): 1015[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480503/>. DOI: 10.3390/cells8091015.
- [6] LI N, ZHAN X Q. Identification of clinical trait-related lncRNA and mRNA biomarkers with weighted gene co-expression network analysis as useful tool for personalized medicine in ovarian cancer [J]. *EPMA J*, 2019, 10(3): 273-290. DOI: 10.1007/s13167-019-00175-0.
- [7] FENG J, GAO F Y, LI Y Y, *et al.* Upregulation of LINC01503 promotes cervical cancer progression by targeting the miR-615-3p/CCND1 axis[J]. *J Cancer*, 2021, 12(15): 4552-4560. DOI: 10.7150/jca.54148.
- [8] XIE J J, JIANG Y Y, JIANG Y, *et al.* Super-enhancer-driven long non-coding RNA LINC01503, regulated by TP63, is over-expressed and oncogenic in squamous cell carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(8): 2137-2151. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.02.018.
- [9] GUO C, ZHOU S H, YI W M, *et al.* SOX9/MKLN1-AS axis induces hepatocellular carcinoma proliferation and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(6): 1914-1933. DOI: 10.1007/s10528-022-10196-6.
- [10] LIU T Y, HAN C C, FANG P Q, *et al.* Cancer-associated fibroblast-specific lncRNA LINC01614 enhances glutamine uptake in lung adenocarcinoma[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 141[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9548164/>. DOI: 10.1186/s13045-022-01359-4.
- [11] FAN Y B, LI Y, YAO X D, *et al.* Epithelial SOX9 drives progression and metastases of gastric adenocarcinoma by promoting immunosuppressive tumour microenvironment[J]. *Gut*, 2023, 72(4): 624-637. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-326581.
- [12] JESELSOHN R, CORNWELL M, PUN M, *et al.* Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(22): E4482-E4491 [2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465894/>. DOI: 10.1073/pnas.1620993114.
- [13] ZHONG H, LU W, TANG Y, *et al.* SOX9 drives KRAS-induced lung adenocarcinoma progression and suppresses anti-tumor immunity[J]. *Oncogene*, 2023, 42(27): 2183-2194. DOI: 10.1038/s41388-023-02715-5.
- [14] ZHOU T C, WU L L, MA N, *et al.* SOX9-activated FARSA-AS1 predetermines cell growth, stemness, and metastasis in colorectal cancer through upregulating FARSA and SOX9[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1071[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7736271/>. DOI: 10.1038/s41419-020-03273-4.
- [15] YANG X T, LIANG R, LIU C X, *et al.* SOX9 is a dose-dependent metastatic fate determinant in melanoma[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 17[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6330758/>. DOI: 10.1186/s13046-018-0998-6.
- [16] MESQUITA P, FREIRE A F, LOPES N, *et al.* Expression and clinical relevance of SOX9 in gastric cancer[J/OL]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 8267021[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6589301/>. DOI: 10.1155/2019/8267021.
- [17] KHORANI K, SCHWAERZLER J, BURKART S, *et al.*

- Establishment of a plasticity-associated risk model based on a SOX2- and SOX9-related gene set in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(10): 1676-1687. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0066.
- [18] DENG H X, WEI Z Y, DU J, *et al.* Predicting the prognosis, immune response, and immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma using a novel risk model based on anoikis-related lncRNAs[J/OL]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 548[2024-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10683111/>. DOI: 10.1186/s40001-023-01521-9.
- [19] SHEN Q M, SUN Y B, XU S. LINC01503/miR-342-3p facilitates malignancy in non-small-cell lung cancer cells *via* regulating LASP1[J/OL]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 235[2024-08-10]. pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32938459/. DOI: 10.1186/s12931-020-01464-3.
- [20] 吕微, 王佳丽, 刘天旭, 等. LINC01503 通过 miR-342-3p/IGF2R 轴促进上皮性卵巢癌的进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 9(31): 754-761. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.09.002
- [21] WANG M R, FANG D, DI M P, *et al.* Long non-coding RNA LINC01503 promotes the progression of hepatocellular carcinoma *via* activating MAPK/ERK pathway[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(9): 1224-1234. DOI: 10.7150/ijms.45256.
- [收稿日期] 2024-05-27 [修回日期] 2024-08-12
[本文编辑] 向正华, 黄静怡