

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.003

· 基础研究 ·

表观遗传修饰介导抑制SOSTDC1表达促进宫颈癌细胞的恶性生物学行为

林万松^{1a,2}, 郭爱华^{1b,△}, 陈淑萍^{1a,2}, 汪阳^{1a,2}, 黄天莹³, 冯梅^{1b}, 叶韵斌^{1a,2} (1. 福建医科大学 肿瘤临床医学院 福建省肿瘤医院 a. 肿瘤免疫学研究室; b. 妇科肿瘤科, 福建 福州 350014; 2. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014; 3. 福建医科大学 基础医学院, 福建 福州 350122)

[摘要] **目的:** 探究含硬化蛋白域蛋白1(SOSTDC1)对宫颈癌细胞恶性生物学行为的调控及其分子机制。**方法:** 收集2020年8月至2022年5月间在福建省肿瘤医院活检或手术切除的53例宫颈癌组织和相应的癌旁组织标本, 免疫组化法检测SOSTDC1蛋白在宫颈癌组织及相应癌旁组织中的表达, qPCR法检测正常宫颈细胞、宫颈癌细胞中SOSTDC1 mRNA表达; 将SOSTDC1过表达慢病毒(OE-sostdc1)和对照空病毒(NC)感染宫颈癌细胞SiHa及CaSki, 将其分为SiHa-OE-sostdc1、SiHa-NC、CaSki-OE-sostdc1、CaSki-NC组, 采用WST-1法、细胞集落形成实验、Transwell实验和WB法检测转染各组SiHa及CaSki细胞的增殖、集落形成、迁移和侵袭能力和BMP、Wnt/ β -catenin信号途径相关蛋白及上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白的表达。用DNA甲基化酶抑制剂5-氮杂2'-脱氧胞苷(5'-Aza-CdR)处理宫颈癌细胞后采用qPCR和WB法检测SOSTDC1 mRNA及蛋白的表达变化, 用甲基化特异性PCR(MSP)检测5例配对宫颈癌组织与癌旁组织中SOSTDC1基因启动子区甲基化水平, 同时qPCR检测其SOSTDC1 mRNA水平。**结果:** 与癌旁组织比较, SOSTDC1蛋白在宫颈癌组织中呈低表达($P<0.01$), 且与淋巴结转移与FIGO分期有关联(均 $P<0.05$); 与正常宫颈HUCEC细胞比较, SOSTDC1 mRNA在宫颈癌C33A、HeLa、SiHa、CaSki细胞中均呈低表达(均 $P<0.01$)。过表达SOSTDC1显著抑制SiHa及CaSki细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.05$)。WB法结果检测显示, 过表达SOSTDC1显著抑制SiHa及CaSki细胞中磷酸化Smad、Dvl2/3、 β -catenin、VIM、N-cadherin、Snail蛋白的表达(均 $P<0.05$), 5'-Aza-CdR处理后的SiHa及CaSki细胞中SOSTDC1 mRNA和蛋白水平均显著增加(均 $P<0.05$), MSP检测结果显示, 相较于癌旁组织, 宫颈癌组织中SOSTDC1基因启动子区呈高度甲基化, 且SOSTDC1 mRNA水平降低($P<0.01$)。**结论:** SOSTDC1在宫颈癌组织中呈低表达且与肿瘤的恶性进展关联, 其表达下调与其基因启动子区高度甲基化有关, 过表达SOSTDC1可能通过阻断BMP及Wnt/ β -catenin信号通路从而抑制SiHa、CaSki细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

[关键词] 宫颈癌; SiHa细胞; CaSki细胞; 含硬化蛋白域蛋白1; 启动子区甲基化; 增殖; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R737.33; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)06-0473-09

Epigenetic modification-mediated inhibition of SOSTDC1 expression promotes malignant biological behaviors in cervical cancer cells

LIN Wansong^{1a,2}, GUO Aihua^{1b,△}, CHEN Shuping^{1a,2}, WANG Yang^{1a,2}, HUANG Tianying³, FENG Mei^{1b}, YE Yunbin^{1a,2} (1.a. Laboratory of Immuno-Oncology; b. Department of Gynecologic Oncology, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of sclerostin domain-containing protein 1 (SOSTDC1) in regulating malignant biological behaviors of cervical cancer (CC) cells and its molecular mechanism through *in vitro* experiments. **Methods:** Fifty-three cervical cancer tissues and corresponding paracancerous tissues were collected from biopsy or surgical resection at Fujian Cancer Hospital between August 2020 and May 2022, immunohistochemistry was used to investigate SOSTDC1 expression in CC and adjacent cervical tissue specimens. qPCR was performed to detect SOSTDC1 mRNA expression levels in normal cervical tissues and CC cells. CC cells SiHa and CaSki transfected with SOSTDC1 over-expression lentiviruses (OE-sostdc1) and negative control (NC) viruses were divided into SiHa-OE-sostdc1 group, SiHa-NC group, CaSki-OE-sostdc1 group and CaSki-NC group. WST-1, colony formation, and Transwell assays were used to detect the proliferative, colony-formative, migratory and invasive abilities of SiHa and CaSki cells in all the groups.

[基金项目] 福建省医学创新课题基金(No. 2020CXA013); 福建省科技创新联合资金项目(No. 2018Y9104); 福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(No. 2017-ZQN-14)

[作者简介] 林万松(1982—), 男, 博士, 副主任技师, 主要从事肿瘤病因和肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: linwansong@fjzlhospital.com; 郭爱华(1984—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科恶性肿瘤放疗化疗的研究, E-mail: AihuaGuo@fjzlhospital.com; [△]共同第一作者

[通信作者] 叶韵斌, E-mail: yeyb@fjzlhospital.com

The expressions of proteins related to BMP, Wnt/ β -catenin signaling pathways, and epithelial mesenchymal transition (EMT) were detected by Western blotting. qPCR and WB arrays were performed on CC cells treated with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5'-Aza-CdR) to detect the changes in the expressions of SOSTDC1 mRNA and proteins. Methylation-specific PCR (MSP) assay was performed to analyze the level of gene promoter methylation of SOSTDC1 in 5 pairs of CC and para-cancerous tissue samples, while qPCR was used to detect SOSTDC1 mRNA levels in the tissues. **Results:** The expression of SOSTDC1 protein was significantly reduced in CC tissues compared with para-cancerous tissues ($P<0.01$), and low SOSTDC1 expression was found to be correlated with lymph node metastasis and FIGO staging (all $P<0.05$). The expression levels of SOSTDC1 mRNA were significantly reduced in C33A, HeLa, SiHa and CaSki cells compared with normal cervical HUCEC cells. Over-expression of SOSTDC1 significantly inhibited the proliferative, migratory, and invasive abilities of SiHa and CaSki cells (all $P<0.05$). WB analysis showed that over-expression of SOSTDC1 significantly inhibited the expressions of p-Smad, Dvl2/3, β -catenin, vimentin, N-cadherin and Snail proteins in SiHa and CaSki cells (all $P<0.05$). The levels of SOSTDC1 mRNA and protein in SiHa and CaSki cells treated with 5'-Aza-CdR treatment were significantly increased (all $P<0.05$). MSP analysis showed that compared with in para-cancerous tissues, the SOSTDC1 gene promoter was highly methylated in CC tissues, while the expression of SOSTDC1 mRNA was down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** SOSTDC1 is downregulated in cervical cancer tissues, and low SOSTDC1 expression is correlated with malignant progression of tumors. SOSTDC1 may suppress the proliferative, migratory, and invasive abilities of SiHa and CaSki cells through blocking BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathways.

[Key words] cervical cancer; SiHa cell; CaSki cell; sclerostin domain-containing protein 1 (SOSTDC1); promoter methylation; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(6): 473-481. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.003]

宫颈癌仍然是欠发达国家最常见的妇科恶性肿瘤之一。人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌的发生密切相关,预防性HPV疫苗接种和有组织的宫颈涂片筛查能够有效预防宫颈癌发生^[1]。相较于早期宫颈癌,晚期或复发性宫颈癌的治疗方法有限,且预后不良^[2]。因此,迫切需要进一步阐明宫颈癌发生发展的生物学机制,开发有效的药物靶点,提高患者的生存期。含硬化蛋白域蛋白1(sclerostin domain containing protein 1, SOSTDC1)作为骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)和Wnt信号通路的双重拮抗剂,是细胞分化和增殖的重要调节分子,参与多种生理和病理过程^[3-4]。研究发现, SOSTDC1在乳腺癌^[5]、胃癌^[6]、甲状腺癌^[7]和肾癌^[8]等多种恶性肿瘤组织中表达显著下调或者缺失。SOSTDC1在胃癌^[6]和乳腺癌^[9]中表达沉默,受到表观遗传修饰调控,其启动子区通常呈高度甲基化,与患者的不良预后有关。本课题组前期通过对宫颈癌组织与配对的癌旁组织进行RNA-Seq,观察并验证了SOSTDC1 mRNA在宫颈癌组织中呈低表达,但分子机制尚不清楚^[10]。本研究采用免疫组化方法检测SOSTDC1蛋白在宫颈鳞状细胞癌及其癌旁组织中的表达,并评估其与肿瘤临床病理特征的关系。另外,在宫颈癌细胞中过表达SOSTDC1,观察对其恶性生物学行为的影响,并分析其信号途径;采用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)分析宫颈癌组织中SOSTDC1基因启动子区甲基化水平,阐明调控SOSTDC1表达的

表观遗传机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞与主要试剂

收集2020年8月至2022年5月间在福建省肿瘤医院活检或手术切除的宫颈癌组织和相应的癌旁组织标本53份,患者年龄37~68岁,中位年龄49岁,所有标本经H-E染色证实为宫颈鳞状细胞癌。另收集5对新鲜的宫颈鳞状细胞癌组织和相应的癌旁组织,样本离体后立即置液氮中,随后保存于-80℃冰箱,以备提取基因组DNA和总RNA,用于MSP实验和SOSTDC1 mRNA检测。本研究方案经福建省肿瘤医院伦理学委员会审批通过(No.SQ2020-101-01),所有患者均知情同意并签署了知情同意书。

人宫颈癌细胞C33A、HeLa、SiHa、CaSki及人正常宫颈细胞HUCEC均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM培养液、胰蛋白酶-EDTA(0.05%)、胎牛血清均购自Gibco公司,免疫组化EliVision Super检测试剂盒和DAB显色试剂购自福州迈新公司,WST-1细胞活力检测试剂盒购自美国Roche公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,反转录试剂盒PrimeScript RT Master Mix、荧光定量PCR试剂盒SYBR Master Mix、Taq DNA聚合酶均购自日本TaKaRa公司,过表达SOSTDC1重组慢病毒由上海汉恒生物技术有限公司构建,纤连蛋白和Transwell小室购自Millipore公司,预包被基质胶的Transwell小室购自Corning公司,SOSTDC1兔源多克隆抗体、Smad1/5/9兔源单克隆抗体购自

Abcam公司,p-Smad1/5/9、Dvl2、 β -catenin、p- β -catenin、vimentin(VIM)、N-cadherin、Snail、 β -actin 兔源单克隆抗体、Dvl3 兔源多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 均购自 CST 公司,ECL 化学发光底物购自 ThermoFisher 公司,基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit 和亚硫酸氢盐转化试剂盒 EpiTect Bisulfite Kit 均购自 Qiagen 公司,PCR 引物由福州博尚生物技术有限公司合成。重组人骨形态发生蛋白-4(bone morphogenetic protein-4,BMP-4)和 BMP-7 蛋白冻干粉购自 MCE 公司,蛋白纯度均大于 95%,使用无菌 ddH₂O 配制成 100 μ g/mL 的储存液,工作浓度为 200 ng/mL。5'-氮[杂]-2'-脱氧胞苷(5'-Aza-CdR)购自 Sigma 公司,纯度为 99%,使用 pH6.8 的 PBS 缓冲液配制成 5 mmol/L 的储存液,过滤除菌后分装于-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 免疫组织化学(IHC)法检测宫颈癌组织和相应癌旁组织中 SOSTDC1 蛋白的表达

宫颈癌组织和相应癌旁组织的石蜡组织切片经脱蜡、复水、枸橼酸抗原修复液处理后,用 SOSTDC1 抗体(稀释比例为 1:100)4 $^{\circ}$ C 下处理过夜,使用 EliVision Super 试剂盒中试剂室温处理 1 h,DAB 显色后显微镜下观察并拍照。IHC 染色结果综合染色强度及阳性细胞比例进行评分。按 IHC 染色深浅进行评分:无着色为 0 分,淡染色为 1 分,中强染色为 2 分,强染色为 3 分;按阳性细胞比例评分:<10% 为 0 分,10%~<25% 为 1 分,25%~<50% 为 2 分,50%~<75% 为 3 分, \geq 75% 为 4 分。IHC 染色总评分=染色强度评分 \times 阳性细胞比例评分。IHC 染色总评分 0 分为蛋白无表达,1~3 分为蛋白低表达,4~12 分为蛋白高表达。

1.3 细胞培养、转染、分组与处理

在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件的细胞培养箱内,使用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 完全培养基常规培养 C33A、HeLa、SiHa、CaSki、HUCEC 细胞,待细胞汇合度约 80% 时进行细胞传代。

过表达 SOSTDC1 的慢病毒 pHBLV 载体或空慢病毒载体与辅助质粒共转染 293T 细胞,包装成慢病毒。病毒感染前 1 d 取对数生长期的 SiHa 和 CaSki 细胞接种至 12 孔板中,感染当天细胞汇合度约为 30%,按感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10 加入慢病毒,感染后 72 h 在荧光显微镜下观察到绿荧光,加入终质量浓度为 2 μ g/mL 的嘌呤霉素筛选稳定转染细胞,分别记为 SiHa-OE-sostdc1、SiHa-NC 和 CaSki-OE-sostdc1、CaSki-NC 组。分别提取各组细胞中的总蛋白质,WB 法检测各组细胞中 SOSTDC1 蛋白的表达以验证稳定过表达细胞的建立。

SiHa、CaSki 细胞经浓度为 5、10 μ mol/L 的 5'-Aza-CdR 处理 24 h 后,收集细胞用于 SOSTDC1 mRNA 及其蛋白表达水平的检测。

取重组人 BMP-4 或 BMP-7 分别加入 SiHa-NC、SiHa-OE-sostdc1、CaSki-NC、CaSki-OE-sostdc1 组细胞中,BMP 工作质量浓度为 200 ng/mL,作用 24 h 后,收集细胞用于 WB 法的检测。

1.4 qPCR 法检测宫颈癌组织、癌旁组织和各转染组细胞中 SOSTDC1 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂按说明书提取宫颈癌细胞、宫颈癌组织和相应癌旁组织中的总 RNA,采用 NanoDrop 1000 和 Qubit 4.0 检测 RNA 纯度和浓度。按反转录试剂盒说明书将 1 μ g 总 RNA 反转录为 cDNA。qPCR 反应液按试剂盒说明书配制,含 DNA 模板 1 μ L(约 100 ng)、上下游引物各 1 μ L(终浓度 0.5 μ mol/L),总体积为 20 μ L。在 ABI7500 仪器上进行扩增反应,两步法程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。以 β -actin 做内参照基因,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的基因的相对表达量。PCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
SOSTDC1	F: AAGTGCAAGAGGTACACCCG R: GGCTCTTTTCCGCTCTCTGT
β -actin	F: TGGCACCACACCTTCTACA R: AGCACAGCCTGGATAGCA
甲基化 SOSTDC1	F: TTTTAAATGAATAGCGATGTATTTTC R: TTCATCACTTATCTATAAACCGACG
非甲基化 SOSTDC1	F: TTTTAAATGAATAGTGATGTATTTTGT R: ATCACTTATCTATAAACCAACACA

1.5 WST-1 法检测转染各组宫颈癌细胞的增殖能力

按照试剂盒的操作说明,取生长状态良好的细胞经胰酶消化后重悬细胞,按每孔 2.5 \times 10³ 个细胞接种至 96 孔板中,铺板后 0、24、48、72 h 时在每孔中加入 WST-1 试剂 10 μ L,每组每个时间点设 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 继续培养 2 h,在酶标仪 450 nm 波长处检测其光密度(D)值,以 D 值代表细胞增殖活力,绘制细胞生长曲线。

1.6 集落形成实验检测各组转染宫颈癌细胞的克隆形成能力

取各组生长状态良好的细胞消化后重悬,计数细胞数,按每孔 3 \times 10² 个细胞接种至 6 孔培养板,每组设 3 个复孔。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液常规培养,每 2~3 d 更换培养液。待观察到可见的细胞克隆时(约 10 d)弃培养液,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,

晾干后加入0.1%的结晶紫染色20 min, PBS洗涤后对集落进行观察, 计数大于50个细胞的克隆。

1.7 Transwell 实验检测各组转染宫颈癌细胞的迁移、侵袭能力

迁移实验前取10 μ L 纤连蛋白(1 g/L)均匀涂抹在Transwell下室的膜上, 自然晾干后置于24孔板中。用无血清DMEM培养液调整转染后各组宫颈癌细胞密度至 1×10^6 个/mL, 取100 μ L 细胞悬液加至上室, 下室加600 μ L 含10%胎牛血清DMEM培养液, 设3个复孔。放培养箱内继续培养48 h后, 取出Transwell小室, 用棉签擦去上室膜上未迁移的细胞, PBS洗2次, 甲醇固定30 min, 晾干后加入0.1%的结晶紫染色20 min, PBS洗涤后于光学显微镜下拍摄3个独立视野计数总细胞数, 取其平均值。侵袭实验使用预包被基质胶的Transwell小室, 步骤同迁移实验。

1.8 WB法检测转染各组宫颈癌细胞中BMP/Smad、Wnt/ β -catenin 途径及EMT相关蛋白的表达

用RIPA裂解液提取各组细胞的总蛋白, BCA法定量, 95 $^{\circ}$ C加热10 min使其变性。取25 μ g 总蛋白经SDS-PAGE分离后转印至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入1:1 000~1:3 000稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C下处理过夜, TBST洗膜5 min \times 3次, 加入HRP标记二抗(1:3 000稀释)室温下处理2 h, TBST洗膜后, 加入ECL化学发光底物并置于Bio-Rad ChemiDoc XRS成像系统进行显影及图像分析。

1.9 MSP法检测宫颈癌组织和相应癌旁组织中SOSTDC1基因启动子区甲基化水平

使用试剂盒提取宫颈癌组织和相应癌旁组织的基因组DNA, 按照亚硫酸氢盐转化试剂盒的说明书将基因组DNA进行转化和纯化。SOSTDC1启动子区域(转录起始位点上游约-350~-200 bp)包含一个

甲基化岛, 利用MethPrimer 2.0在线软件设计MSP所使用的甲基化引物对与非甲基引物对(引物序列见表1), 以转化后的DNA为模板, Taq DNA聚合酶进行PCR扩增, 甲基化与非甲基化扩增产物于2%琼脂糖凝胶中电泳, 观察DNA条带并拍照。

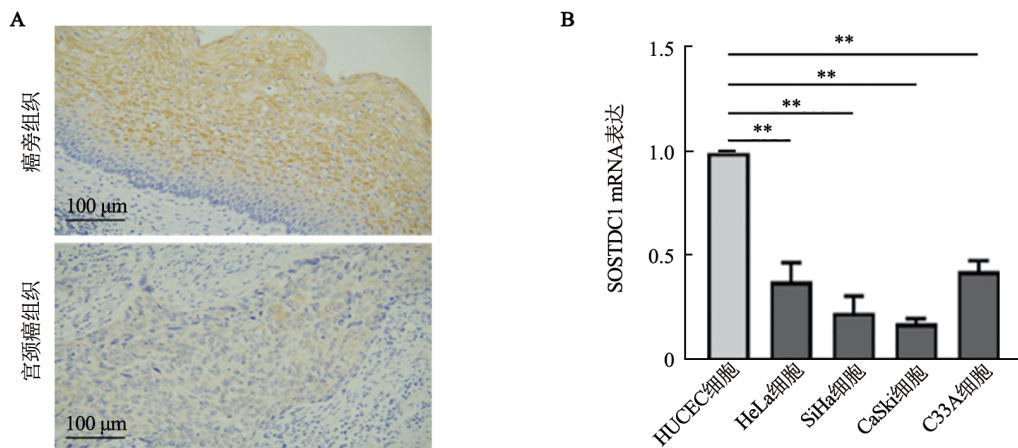
1.10 统计学处理

采用SPSS 27统计软件进行数据处理和统计分析, 相关图表使用GraphPad Prism9软件完成。所有实验均独立重复3次。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 采用卡方检验分析SOSTDC1表达与患者临床病理特征的关系。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SOSTDC1在宫颈癌组织、细胞中呈低表达且与淋巴结转移及FIGO分期密切相关

IHC检测结果(图1A)显示, SOSTDC1蛋白定位于细胞质, 在癌旁组织中呈弥漫性中等至强阳性表达, 高表达率为81.1%(43/53), 在宫颈癌组织中, 观察到8例呈全阴性表达, 其余多数呈局灶弱阳性至中等阳性表达, 高表达率为15.1%(8/53), 宫颈癌组织中SOSTDC1蛋白高表达细胞比例明显低于癌旁组织($P < 0.01$)。SOSTDC1表达与肿瘤临床病理特征的关系评估结果显示, SOSTDC1低表达与淋巴结转移($P = 0.029$)、FIGO分期($P = 0.011$)存在关联, 而与患者年龄、肿瘤大小、病理分级等无明显关联(表2)。qPCR检测结果(图1B)显示, 与HUCEC细胞比较, SOSTDC1 mRNA在宫颈癌C33A、HeLa、SiHa、CaSki细胞中均呈低表达(均 $P < 0.01$, 图1B)。由于SiHa、CaSki细胞中SOSTDC1 mRNA表达较低, 所以将其用于构建过表达SOSTDC1的细胞。



A: IHC检测SOSTDC1蛋白在宫颈癌组织与癌旁组织中的表达;

B: qPCR检测正常宫颈细胞、宫颈癌细胞中SOSTDC1 mRNA表达水平。*** $P < 0.01$ 。

图1 SOSTDC1在宫颈癌组织和细胞中的表达情况

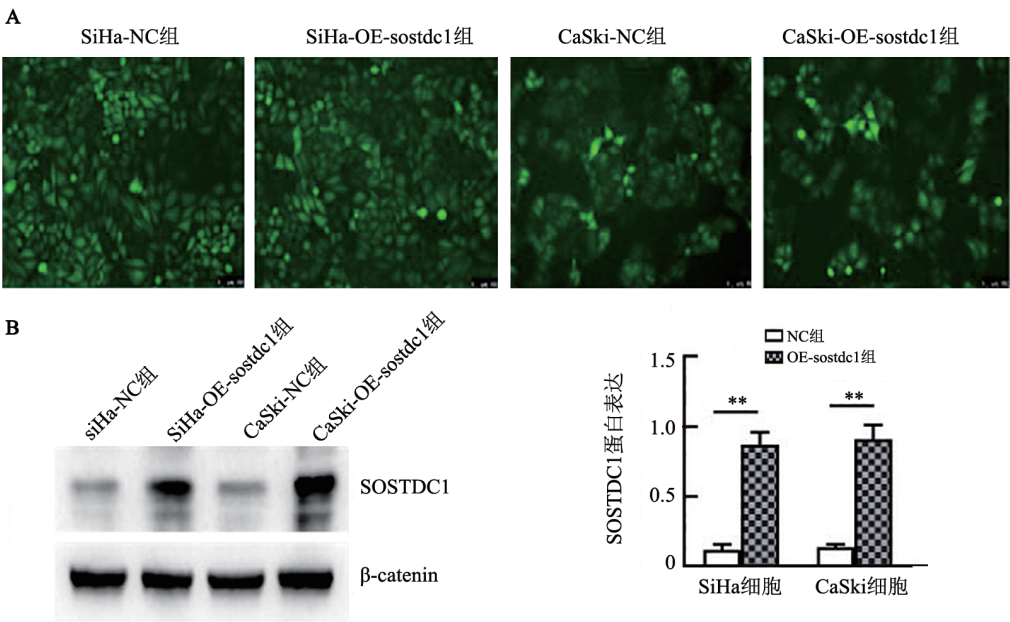
表2 SOSTDC1蛋白表达与宫颈癌临床病理特征的关系

病理特征	分组例数 (N)	SOSTDC1 表达(n)			P 值
		无	低	高	
年龄/岁					0.838
<55	35	5	24	6	
≥55	18	3	13	2	
组织分化					0.233
高/中分化	32	3	25	4	
低分化	21	5	12	4	
肿瘤直径/cm					0.380
≤4	35	5	23	7	
>4	18	3	14	1	
FIGO 分期					0.011
I + II	40	3	29	8	
III	13	5	8	0	
淋巴结转移					0.029
无	43	4	31	8	
有	10	4	6	0	

2.2 在 SiHa、CaSki 细胞中成功地过表达了 SOSTDC1 蛋白

过表达组、阴性对照组 SiHa、CaSki 细胞均表达绿色荧光蛋白(图 2A)。WB 法检测结果(图 2B)显

示,与 SiHa-NC、CaSki-NC 组比较, SiHa-OE-sostdc1、CaSki-OE-sostdc1 组细胞中 SOSTDC1 蛋白均呈明显高表达(均 $P<0.01$)。实验结果说明,在 SiHa、CaSki 细胞中成功地过表达了 SOSTDC1 蛋白。

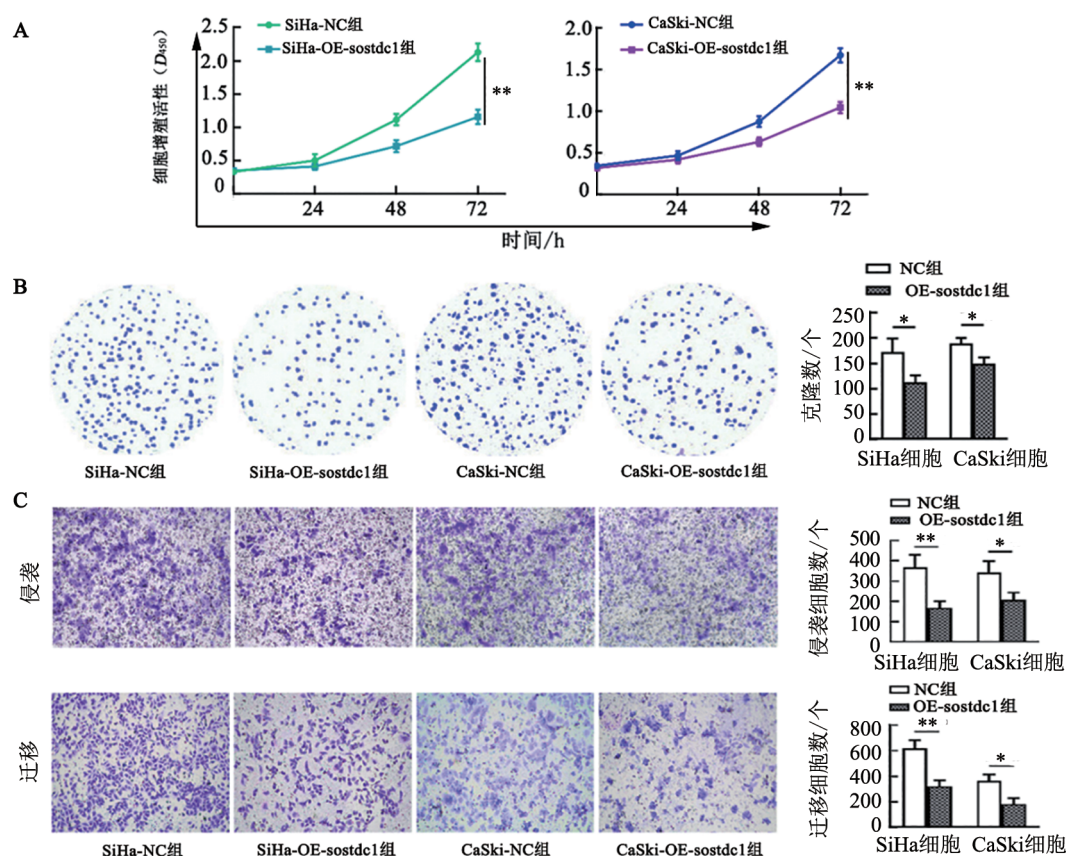


A: 重组慢病毒感染 72 h 后宫颈癌 SiHa、CaSki 细胞中绿色荧光蛋白的表达($\times 200$);
B: WB 法检测过表达组 SiHa、CaSki 细胞中 SOSTDC1 蛋白水平。* $P<0.01$ 。
图2 重组慢病毒感染后 SOSTDC1 在 SiHa、CaSki 细胞中稳定过表达

2.3 过表达 SOSTDC1 抑制 SiHa、CaSki 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

WST-1 法检测结果(图 3A)显示,与各自阴性对照组比较, SiHa-OE-sostdc1 和 CaSki-OE-sostdc1 组的增殖活力均显著下降(均 $P<0.01$)。集落形成实验检

测结果(图 3B)显示,过表达 SOSTDC1 显著抑制 SiHa 和 CaSki 细胞克隆形成能力(均 $P<0.05$)。Transwell 实验检测结果(图 3C)显示,与各自的对照组比较, SiHa-OE-sostdc1 和 CaSki-OE-sostdc1 组细胞的迁移、侵袭细胞数均显著减少(均 $P<0.05$)。



A: WST-1法检测过表达SOSTDC1对SiHa和CaSki细胞增殖影响; B: 克隆形成实验检测过表达SOSTDC1对SiHa和CaSki细胞克隆形成能力的影响($\times 10$); C: Transwell实验检测过表达SOSTDC1对两种细胞侵袭、迁移能力的影响($\times 100$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

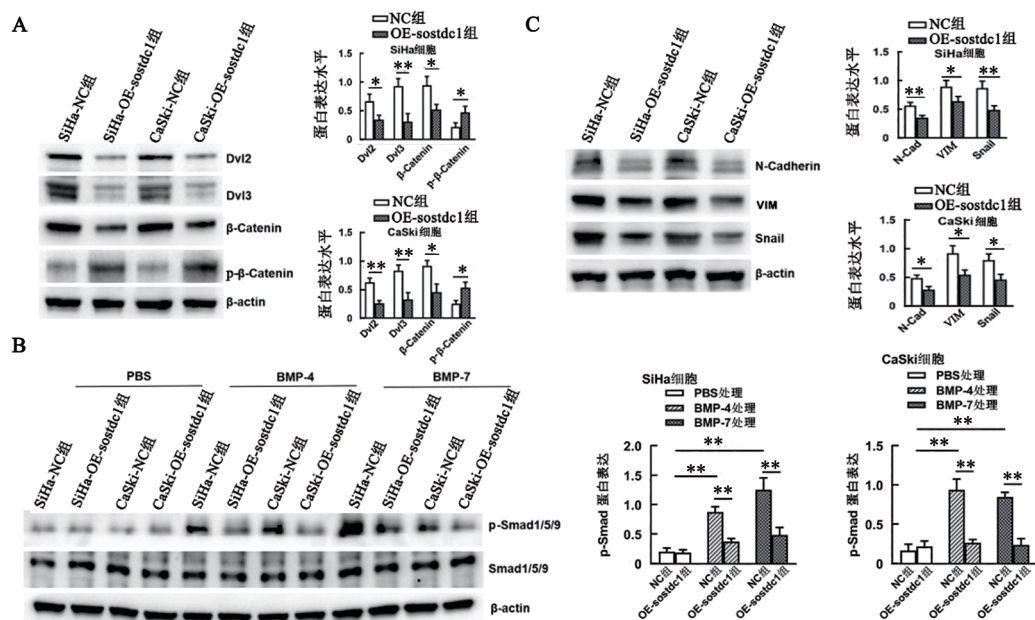
图3 过表达SOSTDC1对SiHa、CaSki细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

2.4 过表达SOSTDC1可抑制SiHa、CaSki细胞内BMP/Smad及Wnt/ β -catenin信号通路和抑制其EMT进程

WB法检测结果(图4)显示,与相应对照细胞比较, SiHa-OE-sostdc1、CaSki-OE-sostdc1组细胞内Wnt通路关键蛋白Dvl2、Dvl3、 β -catenin表达水平呈不同程度降低,而代表失活状态的p- β -catenin表达增加(均 $P < 0.05$,图4A)。与PBS处理的各组细胞比较,经BMP-4或BMP-7处理的对照细胞内p-Smad1/5/9蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.01$);与BMP-4或BMP-7处理对照组比较, BMP-4或BMP-7处理的过表达SOSTDC1组细胞内p-Smad1/5/9蛋白表达水平明显下降(均 $P < 0.01$,图4B), Smad1/5/9蛋白表达水平在两组细胞中未见显著差异。WB法检测EMT相关蛋白表达的结果(图4C)显示,与相应对照组比较, SiHa-OE-sostdc1和CaSki-OE-sostdc1组细胞中的N-cadherin、VIM及转录因子Snail均明显下调(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,过表达SOSTDC1可抑制宫颈癌SiHa、CaSki细胞内BMP/Smad及Wnt/ β -catenin信号通路,同时抑制EMT进程。

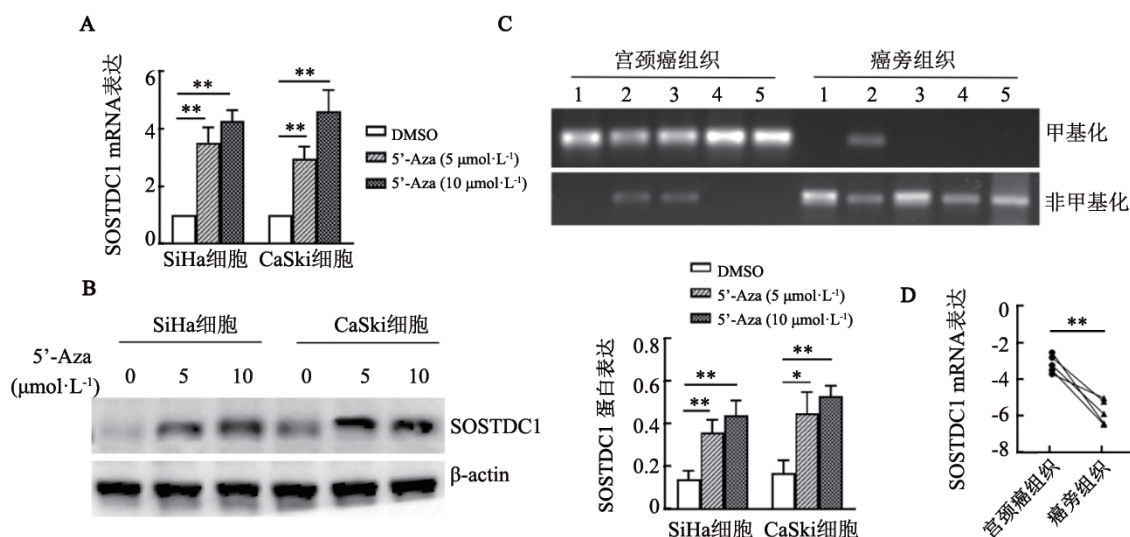
2.5 SOSTDC1基因启动子区高度甲基化可抑制宫颈癌细胞SOSTDC1的表达

与对照组相比, 5'-Aza-CdR处理后SiHa、CaSki细胞中SOSTDC1 mRNA、蛋白表达水平均明显上调(图5A、B, 均 $P < 0.01$), 实验结果提示宫颈癌细胞中SOSTDC1基因启动子区可能存在异常甲基化修饰。进一步采用MSP法分析宫颈癌与相应癌旁组织样本中SOSTDC1基因启动子区甲基化水平, PCR产物电泳结果(图5C)显示, 所有5例宫颈癌组织样本在甲基化引物下均有条带, 且其中3例非甲基化引物下未见条带, 即表现为甲基化占主导, 2例表现为甲基化和非甲基化混合型; 5例癌旁组织样本中有4例在甲基化引物下未见条带, 而非甲基化引物下均有条带, 表现为无甲基化或低甲基化状态, 另有1例表现为甲基化和非甲基化混合型(图5C)。MSP检测结果表明, 相比癌旁组织, 宫颈癌组织中SOSTDC1基因启动子区呈高甲基化状态。对该5份组织样本进行qPCR检测SOSTDC1 mRNA表达水平, 结果(图5D)显示, 与配对癌旁组织相比, 癌组织样本中SOSTDC1 mRNA均呈低表达($P < 0.01$), 癌组织与癌旁组织之间SOSTDC1表达差异与其甲基化程度呈相反的趋势。以上结果表明, SOSTDC1表达调控涉及表观遗传机制, 其在宫颈癌组织中低表达可能与基因启动子区高度甲基化有关。



A: WB法检测过表达SOSTDC1对Wnt/ β -catenin信号通路的影响; B: WB法检测BMP-4或BMP-7处理的SiHa和CaSki细胞中Smad总蛋白以及p-Smad蛋白表达; C: WB法检测过表达SOSTDC1对EMT相关蛋白表达的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 过表达SOSTDC1对BMP/Smad、Wnt/ β -catenin信号途径及EMT相关蛋白表达的影响



A、B: qPCR法和WB法检测5'-Aza-CdR处理前后的SiHa和CaSki细胞中SOSTDC1 mRNA及蛋白表达水平的变化; C: MSP法分析5例配对的宫颈癌组织和癌旁组织中SOSTDC1基因启动子区甲基化水平; D: qPCR比较宫颈癌组织与癌旁组织中SOSTDC1 mRNA的表达差异。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图5 SOSTDC1基因启动子区高度甲基化诱导宫颈癌组织中SOSTDC1基因低表达

3 讨论

SOSTDC1属于BMP抑制剂中的Dan/Cerberus家族成员,是一种广泛参与人体生理学和病理学的细胞信号调节因子。BMP信号转导由BMP与其受体结合触发经典Smad途径以及其他非经典效应物的激活,在正常发育过程中,维持BMP及其拮抗剂表达的平衡是至关重要的,BMP拮抗剂表达失调会诱发恶性肿瘤的形成^[11-12]。研究表明,SOSTDC1在许多癌症中起肿瘤抑制作用,包括乳腺癌^[13]、卵巢癌^[14]、胃

癌^[15]、非小细胞肺癌^[16]、甲状腺癌^[17]、前列腺癌^[18]等。CHEN等^[19]检测了原发性和骨转移肺癌组织中SOSTDC1的表达,发现其在转移性组织中的表达显著下调,与患者存活率降低相关;过表达SOSTDC1则抑制了癌细胞的增殖、迁移、侵袭和破骨细胞生成。在急性髓性白血病患者骨髓中SOSTDC1表达水平降低,与患者不良预后相关;SOSTDC1通过抑制Wnt/ β -catenin通路的活化,抑制急性髓性白血病细胞的增殖、促进其凋亡,抑制肿瘤细胞在小鼠体内的成瘤性^[20]。然而,也有相反结果的报道^[21],SOSTDC1在

转移性结直肠癌细胞中呈高表达, SOSTDC1 通过抑制 BMP4 而维持肠癌细胞的干性, 并且与 ALCAM/CD166 相互作用, 通过激活 Src 和 PI3K-Akt 信号通路促进肠癌肝转移。

本课题组前期通过 RNA-Seq 和 qPCR 方法发现 SOSTDC1 在宫颈癌组织中呈低表达, 在本研究中 IHC 结果同样证实了 SOSTDC1 蛋白在宫颈癌组织中表达显著低于癌旁组织, 其低表达同恶性临床病理特征有关联, 提示 SOSTDC1 表达的抑制可能促进宫颈癌恶性进程。为进一步明确 SOSTDC1 对宫颈癌细胞恶性生物学行为的调控作用, 本研究选择低表达 SOSTDC1 的 SiHa 与 CaSki 细胞作为研究对象, 构建过表达 SOSTDC1 的细胞。通过细胞增殖、集落形成、Transwell 实验等体外细胞学实验, 证实了过表达 SOSTDC1 能够显著抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力, 以上结果提示 SOSTDC1 可能在宫颈癌发生发展过程中发挥重要的作用。

SOSTDC1 发挥抑癌作用的下游信号途径除了经典的 Smad 依赖性 BMP 途径和 Wnt 信号通路, 还包括 PI3K-Akt、MAPK/Erk^[17,22]、c-Jun^[23]、Rb/E2F^[16] 等信号通路, 表明 SOSTDC1 参与了复杂的抑癌机制。为验证 SOSTDC1 抑制宫颈癌恶性进程的潜在信号转导途径, 本研究检测了过表达 SOSTDC1 对宫颈癌细胞内 BMP 和 Wnt 信号相关分子表达的影响, 结果表明, 对照细胞在外源 BMP 因子刺激下细胞内 Smad 总蛋白表达没有变化, 而有活化功能的磷酸化 Smad1/5/9 蛋白表达显著增加, 值得注意的是, 高表达 SOSTDC1 细胞在 BMP 作用后其磷酸化 Smad1/5/9 蛋白表达并未见明显升高, 表明 SOSTDC1 可阻断 BMP 信号转导而抑制下游 Smad 活化。此外, 过表达 SOSTDC1 与阴性对照比较, 细胞内 Wnt 通路关键蛋白 Dvl2、Dvl3、 β -catenin 表达水平呈不同程度下调, 而代表失活状态的磷酸化 β -catenin 表达增加。以上研究结果表明, SOSTDC1 同时参与了对宫颈癌细胞内 BMP 和 Wnt 信号的抑制, SOSTDC1 的过表达会抑制宫颈癌的发生发展。这一结果与之前的报道^[18]类似, 在前列腺癌细胞中, SOSTDC1 同样发挥双信号抑制的功能。

鉴于 BMP/Smad 及 Wnt/ β -catenin 信号转导与肿瘤细胞 EMT 进程密切相关^[24], EMT 在肿瘤侵袭和转移中发挥重要作用^[25]。本研究比较了过表达 SOSTDC1 的宫颈癌细胞中 EMT 标志物的表达改变, 间充质标志物 N-cadherin、VIM 及 Snail 蛋白表达显著下调, 表明过表达 SOSTDC1 可能通过减弱肿瘤细胞的 EMT 进程而抑制其侵袭、迁移的能力。

表观遗传修饰普遍存在于各类恶性肿瘤发生发展的全过程, 启动子区异常甲基化作为最常见的表

观遗传调控机制之一, 广泛参与对癌细胞中各种基因表达的调控。DNA 甲基化多数发生在基因启动子区 CpG 岛上, 在甲基转移酶催化下, 活性的甲基从 S-腺苷甲硫氨酸转移至胞嘧啶 5 位上, 形成 5-甲基胞嘧啶, 基因启动子区的甲基化可导致转录抑制^[26-27]。过往研究在乳腺癌^[13]、胃癌^[6]、前列腺癌^[18]、甲状腺癌^[28]中均观察到 SOSTDC1 基因启动子区存在高度甲基化修饰, 导致蛋白表达下调, 其可作为潜在的预后因素。新近的研究^[29]发现, 检测血浆中 SOSTDC1 甲基化状态可以作为乳腺癌的标志物。本研究利用 CpG 岛在线预测软件获得 SOSTDC1 启动子区在临近转录起始位点区域包含一个 CpG 岛, 分析了 DNA 甲基化酶抑制剂 5'-Aza-CdR 处理的 SiHa 与 CaSki 细胞中 SOSTDC1 表达水平的改变, 5'-Aza-CdR 能够显著增加宫颈癌细胞 SOSTDC1 mRNA 和蛋白的水平, 提示宫颈癌细胞 SOSTDC1 基因启动子区可能存在高度甲基化修饰。通过对癌组织以及配对癌组织旁标本进行 MSP 检测, 结果进一步证实在宫颈癌组织中 SOSTDC1 基因启动子区存在高甲基化现象, 表观遗传机制诱导 SOSTDC1 在宫颈癌中表达抑制。

综上所述, 本研究证明 SOSTDC1 在宫颈癌组织中呈低表达, 其下调涉及表观遗传调控机制, SOSTDC1 可能通过抑制 BMP/SMAD 及 Wnt/ β -catenin 信号通路而抑制宫颈癌细胞在体外的增殖、侵袭和迁移。研究结果初步明确了 SOSTDC1 的生物学功能, 以及其对上下游调控关系, 为探寻新的宫颈癌治疗靶点及预后判断提供了实验基础和依据。

[参考文献]

- [1] WANG R, PAN W, JIN L, *et al.* Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge[J]. *Cancer Lett*, 2020, 471: 88-102. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.11.039.
- [2] GRAU-BEJAR JF, GARCIA-DURAN C, GARCIA-ILLESAS D, *et al.* Advances in immunotherapy for cervical cancer[J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2023, 15: 175883592311638[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1177/17588359231163836>. DOI: 10.1177/17588359231163836.
- [3] TONG X Y, ZHU C Y, LIU L F, *et al.* Role of Sostdc1 in skeletal biology and cancer[J/OL]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1029646[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1029646>. DOI: 10.3389/fphys.2022.1029646.
- [4] CHO S W, KWAK S, WOOLLEY T E, *et al.* Interactions between Shh, Sostdc1 and Wnt signaling and a new feedback loop for spatial patterning of the teeth[J]. *Development*, 2011, 138(9): 1807-1816. DOI: 10.1242/dev.056051.
- [5] CLAUSEN K A, BLISH K R, BIRSE C E, *et al.* SOSTDC1 differentially modulates Smad and beta-catenin activation and is down-regulated in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 129(3): 737-746. DOI: 10.1007/s10549-010-1261-9.
- [6] GOPAL G, RAJA UM, SHIRLEY S, *et al.* SOSTDC1 down-regulation

- of expression involves CpG methylation and is a potential prognostic marker in gastric cancer[J]. *Cancer Genet*, 2013, 206(5): 174-182. DOI: 10.1016/j.cancergen.2013.04.005.
- [7] LIANG W W, GUAN H Y, HE X Y, *et al.* Down-regulation of SOSTDC1 promotes thyroid cancer cell proliferation *via* regulating cyclin A2 and cyclin E2[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31780-31791. DOI: 10.18632/oncotarget.5566.
- [8] BLISH K R, WANG W, WILLINGHAM M C, *et al.* A human bone morphogenetic protein antagonist is down-regulated in renal cancer [J]. *MBoC*, 2008, 19(2): 457-464. DOI: 10.1091/mbc.e07-05-0433.
- [9] XIAO B, CHEN L D, KE Y L, *et al.* Identification of methylation sites and signature genes with prognostic value for luminal breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12885-018-4314-9.
- [10] LIN W S, FENG M, LI X H, *et al.* Transcriptome profiling of cancer and normal tissues from cervical squamous cancer patients by deep sequencing[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 2075-2088. DOI: 10.3892/mmr.2017.6855.
- [11] TODD G M, GAO Z C, HYVÖNEN M, *et al.* Secreted BMP antagonists and their role in cancer and bone metastases[J/OL]. *Bone*, 2020, 137: 115455[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115455>. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115455.
- [12] CORRENS A, ZIMMERMANN L M A, BALDOCK C, *et al.* BMP antagonists in tissue development and disease[J/OL]. *Matrix Biol Plus*, 2021, 11: 100071[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100071>. DOI: 10.1016/j.mbplus.2021.100071.
- [13] RAWAT A, GOPISETTY G, THANGARAJAN R. E4BP4 is a repressor of epigenetically regulated SOSTDC1 expression in breast cancer cells[J]. *Cell Oncol*, 2014, 37(6): 409-419. DOI: 10.1007/s13402-014-0204-6.
- [14] ZHAO Q, DONG D D, CHU H H, *et al.* lncRNA CDKN2A-AS1 facilitates tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer *via* modulating the SOSTDC1-mediated BMP-SMAD signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(12): 1147-1162. DOI: 10.1080/15384101.2021.1924947.
- [15] LIU C, YANG J, ZHU F C, *et al.* Exosomal circ_0001190 regulates the progression of gastric cancer *via* miR-586/SOSTDC1 axis[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(6): 1895-1913. DOI: 10.1007/s10528-021-10180-6.
- [16] LIU L, WU S S, YANG Y, *et al.* SOSTDC1 is down-regulated in non-small cell lung cancer and contributes to cancer cell proliferation[J]. *Cell Biosci*, 2016, 6(1): 1-10. DOI: 10.1186/s13578-016-0091-9.
- [17] 刘妙妙, 邓豪余, 赵雅洁, 等. 微RNA-21-5p靶向调控含硬化蛋白域蛋白1对甲状腺癌细胞生长的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2021, 46(10): 1054-1062. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200764.
- [18] TESFAY L, CLAUSEN K A, KIM J W, *et al.* Hecpudin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2254-2263. DOI: 10.1158/0008-5472.can-14-2465.
- [19] CHEN G H, GONG H Y, WANG T, *et al.* SOSTDC1 inhibits bone metastasis in non-small cell lung cancer and may serve as a clinical therapeutic target[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(16): 3424-3436. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3926.
- [20] LI C L, WANG M J, SHI Y P, *et al.* SOSTDC1 acts as a tumor inhibitor in acute myeloid leukemia by downregulating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(8): 1934-1943. DOI: 10.1002/tox.23540.
- [21] BARTOLOMÉ R A, PINTADO-BERNINCHES L, JAÉN M, *et al.* SOSTDC1 promotes invasion and liver metastasis in colorectal cancer *via* interaction with ALCAM/CD166[J]. *Oncogene*, 2020, 39(38): 6085-6098. DOI: 10.1038/s41388-020-01419-4.
- [22] ZHOU Q Y, CHEN J, FENG J L, *et al.* SOSTDC1 inhibits follicular thyroid cancer cell proliferation, migration, and EMT *via* suppressing PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 435(1/2): 87-95. DOI: 10.1007/s11010-017-3059-0.
- [23] CUI Y Z, ZHANG F F, JIA Y X, *et al.* The BMP antagonist, SOSTDC1, restrains gastric cancer progression *via* inactivation of c-Jun signaling[J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(11): 2331-2348.
- [24] JAYACHANDRAN J, SRINIVASAN H, MANI K P. Molecular mechanism involved in epithelial to mesenchymal transition[J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 710: 108984[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108984>. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108984.
- [25] JONCKHEERE S, ADAMS J, DE GROOTE D, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a therapeutic target[J]. *Cells Tissues Organs*, 2022, 211(2): 157-182. DOI: 10.1159/000512218.
- [26] ZHU H M, ZHU H, TIAN M, *et al.* DNA methylation and hydroxymethylation in cervical cancer: diagnosis, prognosis and treatment[J/OL]. *Front Genet*, 2020, 11: 347[2023-02-10]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00347>. DOI: 10.3389/fgene.2020.00347.
- [27] CHEN J F, YAN Q. The roles of epigenetics in cancer progression and metastasis[J]. *Biochem J*, 2021, 478(17): 3373-3393. DOI: 10.1042/bcj20210084.
- [28] ZHOU Q Y, CHEN J, FENG J L, *et al.* E4BP4 promotes thyroid cancer proliferation by modulating iron homeostasis through repression of hepcidin[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 987[2023-02-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-1001-3>. DOI: 10.1038/s41419-018-1001-3.
- [29] RAJKUMAR T, AMRITHA S, SRIDEVI V, *et al.* Identification and validation of plasma biomarkers for diagnosis of breast cancer in South Asian women[J/OL]. *Sci Rep*, 2022, 12: 100[2023-02-10]. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04176-w>. DOI: 10.1038/s41598-021-04176-w.

[收稿日期] 2023-04-06

[修回日期] 2023-05-27

[本文编辑] 向正华, 沈志超