

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.14.005

miR-204 靶向 SOX4 抑制皮肤鳞状细胞癌的发展*

胡新红¹ 曹天宇¹ 蔺建革¹ 吕雅洁¹ 周芳^{2Δ}

(1 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院皮肤科 陕西 西安 710038;

2 西安医学院第二附属医院皮肤科 陕西 西安 710005)

摘要 目的:探究 miR-204 和 SRY 相关 HMG 盒转录因子 4(SOX4)在皮肤鳞状细胞癌(CSCC)中的功能以及可能的分子作用机制。**方法:**选择 2019 年 5 月至 2022 年 3 月于空军军医大学第二附属医院皮肤科确诊并接受手术治疗的皮肤鳞状细胞癌患者共 70 例,分别收集患者的 CSCC 组织和相应癌旁组织,采用 qRT-PCR 检测组织标本中 miR-204 和 SOX4 mRNA 的水平,Western blot 和免疫组织化学染色检测组织标本中 SOX4 水平。将 CSCC 细胞系 SCL-1 分为对照组、miR-NC 组、miR-204 组、miR-204+pcDNA 组和 miR-204+SOX4 组,采用 Lipofectamine 2000TM 转染试剂分别将 miR-NC、miR-204 模拟物、miR-204 模拟物和 pcDNA3.1 空载体、miR-204 模拟物和 pcDNA3.1+SOX4 载体分别转染至 miR-NC 组、miR-204 组、miR-204+pcDNA 组和 miR-204+SOX4 组,对照组细胞不转染。双荧光素酶报告基因实验检测 miR-204 与 SOX4 靶向关系。采用 CCK-8 法检测 SCL-1 细胞增殖,克隆形成实验检测 SCL-1 细胞克隆形成,流式细胞术实验检测 SCL-1 细胞凋亡,Transwell 实验检测检测 SCL-1 细胞迁移和侵袭,Western blot 检测 SOX4、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平。**结果:**CSCC 组织中 miR-204 低表达,SOX4 的 mRNA 和蛋白均高表达。TargetScan 软件在线分析结果显示 miR-204 的 5' 端与 SOX4 的 3' 端存在结合位点。与对照组或 NC 组比较,miR-204 组 SCL-1 细胞相对增殖活力、克隆形成数量、迁移和侵袭数量均降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$);SCL-1 细胞中 SOX4、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平均降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白水平升高($P<0.05$)。与 miR-204 组或 miR-204+pcDNA 组比较,miR-204+SOX4 组 SCL-1 细胞相对增殖活力、克隆形成数量、迁移和侵袭数量均升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$);SCL-1 细胞中 SOX4、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平均升高($P<0.05$),E-cadherin 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论:**miR-204 通过靶向 SOX4 抑制 CSCC 细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化过程,并促进细胞凋亡,进而缓解 CSCC 的发展。**关键词:**皮肤鳞状细胞癌;miR-204;SRY 相关 HMG 盒转录因子 4(SOX4);增殖和凋亡;迁移和侵袭;上皮间质转化
中图分类号:R739.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)14-2626-08

miR-204 Targets SOX4 to Inhibit the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*

HU Xin-hong¹, CAO Tian-yu¹, LIN Jian-ping¹, LÜ Ya-jie¹, ZHOU Fang^{2Δ}

(1 Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710005, China)

ABSTRACT Objective: To explore the function and possible molecular mechanism of miR-204 and SOX4 in cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC). **Methods:** A total of 70 patients with CSCC who were diagnosed and underwent surgical treatment in the dermatology department of the Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University from May 2019 to March 2022 were selected. CSCC tissues and corresponding paracancer tissues of the patients were collected, and the mRNA levels of miR-204 and SOX4 in the tissue samples were detected by qRT-PCR. The protein level of SOX4 in tissue samples were detected by Western blot and immunohistochemical staining. The CSCC cell line SCL-1 was divided into control group, miR-NC group, miR-204 group, miR-204+pcDNA group and miR-204+SOX4 group. miR-NC, miR-204 mimics, miR-204 mimics and pcDNA3.1 empty vector, miR-204 mimics and pcDNA3.1+SOX4 vector were transfected into miR-NC group, miR-204 group, miR-204+pcDNA group and miR-204+SOX4 group by Lipofectamine 2000TM transfection reagents, respectively. And control group cells were not transfected. The targeting relationship between miR-204 and SOX4 was analyzed by dual luciferase reporter gene experiment. SCL-1 cell proliferation was detected by CCK-8 assay, cell cloning was detected by clonogenesis assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry assay, and cell migration and invasion were detected by Transwell assay. The protein expression levels of SOX4, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. **Results:** The expression of miR-204 was low in CSCC, and the expression of SOX4 mRNA and protein was high. The online analysis results of TargetScan software showed that binding sites existed at 5' of miR-204 and 3' of SOX4. Compared with the control

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81703119)

作者简介:胡新红(1980-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:皮肤病理,E-mail: huxinhongxiao@126.com

Δ 通讯作者:周芳(1986-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:皮肤癌,E-mail: 1239656922@qq.com

(收稿日期:2024-01-29 接受日期:2024-02-27)

group or the NC group, the relative proliferation activity, number of clone formation, migration and invasion of SCL-1 cells in miR-204 group were decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was increased ($P<0.05$). The protein levels of SOX4, N-cadherin and Vimentin in SCL-1 cells were decreased ($P<0.05$), while the protein level of E-cadherin was increased ($P<0.05$). Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, the relative proliferation activity, number of clone formation, migration and invasion of SCL-1 cells in miR-204+SOX4 group were increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was decreased ($P<0.05$). The protein levels of SOX4, N-cadherin and Vimentin in SCL-1 cells were increased ($P<0.05$), while the protein level of E-cadherin was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-204 inhibits the proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transformation of CSCC cells by targeting SOX4, and promotes cell apoptosis, thus alleviating the development of CSCC.

Key words: Cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC); miR-204; SRY-box transcription factor-4 (SOX4); Proliferation and apoptosis; Migration and invasion; Epithelial mesenchymal transformation (EMT)

Chinese Library Classification (CLC): R739.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)14-2626-08

前言

皮肤鳞状细胞癌 (Cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC) 是一种常见的皮肤恶性肿瘤,其发病与持续暴露在阳光下和高突变负荷有关,目前死亡率较高,临床治疗困难,特别是对于具有高危 CSCC 特征的患者预后极差^[1]。CSCC 作为突变率最高的癌症之一,目前的研究显示最常见的突变基因涉及细胞周期调节、凋亡、衰老、分化和有丝分裂/存活信号的途径^[2]。手术切除是 CSCC 的传统临床治疗方法,随着基因靶向治疗的发展以及对 CSCC 致病机制的广泛研究,已确定了多个药物靶点,如免疫检查点抑制剂(PD-1 和 Cemiplimab)和表皮生长因子受体抑制剂等^[3]。目前,有相关文献报道了与 CSCC 相关的诊疗和预后标志物,包括肌醇多磷酸 5-磷酸酶、p300、端粒酶逆转录酶、CD133、胸苷激酶 1、MYB 相关蛋白 B 和长链非编码 RNA 等^[4-6]。

MicroRNAs(miRNAs)作为一类参与调控多种生物过程的非编码小分子 RNA,已被研究报道与 CSCC 的发生和进展密切相关,包括促进 CSCC 发生的 miRNA-21、miRNA-205 和 miRNA-365 等,以及抑制 CSCC 进展的 miR-34a、microRNA-125b 和 miR-199a 等^[7]。miR-204 在肿瘤中发挥双重作用,如在乳腺癌、结直肠癌和胃癌中通过抑制癌细胞增殖、侵袭、转移、上皮间质转化(Epithelial mesenchymal transformation, EMT)和血管生成进而抑制癌症发展^[8-10],而在神经内分泌前列腺癌细胞系 PC-3 和 CL1 中却是作为肿瘤促进因子^[11],Toll 等^[12]研究显示 miR-204 在 CSCC 组织中低表达,可能发挥抑制 CSCC 作用。SRY 相关 HMG 盒转录因子 4 (SRY-box transcription factor-4, SOX4)已被证明在肺癌、卵巢癌和肝癌等多种肿瘤中高表达,促进 EMT 发生、细胞转移和肿瘤耐药性产生^[13,14],但在 CSCC 中 SOX4 的作用角色目前还鲜有文献报道。通过前期生信分析发现 miR-204 与 SOX4 存在靶向结合关系,因此本研究意在通过细胞研究层面探究 miR-204 和 SOX4 在 CSCC 中的角色以及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1%结晶紫染色液(BES22104KB)购自上海博尔森生物科技有限公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG028)、BCA

蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)和 CCK-8 试剂盒(C0037)购自上海碧云天生物技术有限公司。Lipofectamine 2000™ 转染试剂(11668027)购自美国 Invitrogen 公司。TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒(RR820A)购自日本 TaKaRa 公司。细胞凋亡检测试剂盒(HY-K1071)和特超敏 ECL 发光液(HY-K1005)购自美国 MCE 公司。一抗 SOX4 (ab70598)、E-cadherin(ab231303)、N-cadherin(ab245117)和 Vimentin(ab137321)购自美国 Abcam 公司。SOX4 野生型载体(WT-SOX4)和突变体型载体(MUT-SOX4)委托上海吉玛制药技术有限公司构建并鉴定。

1.2 方法

1.2.1 CSCC 组织标本的收集和处理 选择 2019 年 5 月中 2022 年 3 月间于空军军医大学第二附属医院皮肤科确诊并接受手术治疗的皮肤鳞状细胞癌患者共 70 例,其中男性 38 例,女性 32 例,平均年龄(57.36 ± 5.72)岁。分别收集患者的 CSCC 组织和相应癌旁组织,取部分组织制作石蜡切片标本,其余组织标本均于 -80°C 保存。采用 qRT-PCR 检测组织标本中 miR-204 和 SOX4 mRNA 的水平,Western blot 和免疫组织化学染色检测组织标本中 SOX4 水平。本研究已经过空军军医大学第二附属医院医学伦理委员会审查批准(伦理审批号:201801180023),且所有患者均已知情同意。

1.2.2 实验细胞及培养 CSCC 细胞系 SCL-1 和人类永生表皮细胞 HaCaT 购自美国 ATCC 公司。采用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清)培养,细胞经过复苏培养后,按照细胞悬液和培养基 1:2~1:4 的比例进行正常传代培养,2~3 天更换 1 次新鲜培养基,细胞培养环境温度 37°C 以及 5% CO_2 。采用 qRT-PCR 检测细胞中 miR-204 或 SOX4 mRNA 表达水平,Western blot 检测细胞中 SOX4 蛋白表达水平。

1.2.3 SCL-1 细胞分组和转染处理 将 SCL-1 细胞分为对照组、miR-NC 组、miR-204 组、miR-204+pcDNA 组和 miR-204+SOX4 组,后续实验每组均设置 3 个重复。取对数生长期的 SCL-1 细胞,胰酶消化处理后,转接至 6 孔板(1×10^5 个细胞/孔),采用 Lipofectamine 2000™ 转染试剂分别将 miR-NC、miR-204 模拟物、miR-204 模拟物和 pcDNA3.1 空载体、miR-204 模拟物和 pcDNA3.1+SOX4 载体分别转染至 miR-NC 组、miR-204 组、miR-204+pcDNA 组和 miR-204+SOX4 组,对照组细胞不转染。培养 48 h 后,收集细胞,采用 qRT-PCR 检测转染效率。

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-204 与 SOX4 靶向关系 采用 TargetScan 软件在线分析 miR-204 与 SOX4 靶向关系,结果显示 miR-204 的 5' 端与 SOX4 的 3' 端存在结合位点。构建 SOX4 野生型载体 (WT-SOX4) 和突变型载体 (MUT-SOX4), 采用 Lipofectamine 2000TM 转染试剂将 WT-SOX4 或 MUT-SOX4 分别与 miR-204 或 miR-NC 共转染至 SCL-1 细胞,48 h 后收集细胞, 并采用检测试剂盒分析荧光素酶相对活性。

1.2.5 免疫组织化学染色实验检测 SOX4 表达 取方法 1.2.1 已制备的组织石蜡切片, 依次经过二甲苯和乙醇处理脱蜡, 再加入抗原修复液煮沸处理修复抗原, 加入 3%过氧化氢溶液避光处理 30 min 后再加入 5%的 BSA 封闭处理 1 h。加入一抗 SOX4(1:100)后 4℃ 孵育过夜, PBS 洗片后再加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, DAB 显示、苏木素复染和脱水后中性树脂封片, 显微镜下拍照, 并采用 Image J 软件分析蛋白阳性染色强度。

1.2.6 CCK-8 法检测 SCL-1 细胞增殖 取转染后培养处于对数生长期的 SCL-1 细胞, 转接至 96 孔板 (5×10^3 个细胞 / 孔), 细胞培养箱内培养 24 h, 每孔加入 10 μ L 的 CKK-8 溶液后继续孵育 2 h, 采用酶标仪检测吸光度值 (A450nm), 并以对照组 A 值为参照计算细胞相对增殖活力 (%)。

1.2.7 克隆形成实验检测 SCL-1 细胞克隆形成 取转染后培养处于对数生长期的 SCL-1 细胞, 转接至 6 孔板 (1×10^4 个细胞 / 孔), 细胞培养箱中培养 2 周, 去除培养基后加入 4%多聚甲醛固定, 1%结晶紫染色, 光学显微镜下拍照并克隆形成计数。

1.2.8 流式细胞术实验检测 SCL-1 细胞凋亡 收集转染后培养 48 h 的 SCL-1 细胞, 胰酶消化后制备单细胞悬液, 离心收集细胞后加入预冷的 PBS 溶液重悬细胞, 再次离心收集细胞, 重复 2 次后加入预冷的 70%乙醇并混匀细胞, 于 4℃ 下固定处理 12 h。再加入预冷的 PBS 溶液洗涤细胞, 如细胞凋亡检测试剂盒所述加入 0.5 mL 配置好的 PI 染色工作液重悬细胞, 于 37℃ 下避光处理 30 min, 然后流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.9 Transwell 实验检测检测 SCL-1 细胞迁移和侵袭 采用不含血清的培养基稀释 Matrigel 基质胶 (1:8 比例稀释) 并包被 Transwell 小室上室, 待凝固后用于细胞侵袭实验中。取转染后培养 48 h 的 SCL-1 细胞, 经过胰酶消化, 采用不含血清的培养基重悬细胞并调整浓度至 5×10^5 个 / mL, 然后取 200 μ L 细胞悬液加至 Transwell 小室上室 (侵袭实验采用 Matrigel 基质胶包被的小室), 另取 600 μ L 含 10%胎牛血清的细胞培养基至 Transwell 小室下室, 于细胞培养箱中培养 24 h。取出小室, 分别采用 4%多聚甲醛固定和 0.1%结晶紫染色 30 min, 然后于光学显微镜下观察拍照并对迁移和侵袭细胞计数。

1.2.10 qRT-PCR 检测 miR-204 与 SOX4 的表达 分别取 CSCC 组织、癌旁组织和各组处理后的 SCL-1 细胞, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 以总 RNA 为模板逆转录获的 cDNA, 按照 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒方法进行 qRT-PCR 反应, 条件为: 95℃ 45 s, [95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s] 共 40 个循环。U6 和 GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行基因相对表达量分析。引物信息如下: miR-204, F: 5'-GCCAGATCTGGAA-

GAAGATGGTGGTTAGT-3', R: 5'-GGCGAATTCACAGTTGC-CTACAGTATTCA-3'; U6, F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', R: 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; SOX4, F: 5'-AGCGA-CAAGATCCCTTTCATTC-3', R: 5'-CGTTGCCGGACTTCACCTT-3'; GAPDH, 5'-TGTGGGCATCAATGGATTGG-3', 5'-ACCACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'。

1.2.11 Western blot 检测 SOX4、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达 分别取 CSCC 组织、癌旁组织和各组处理后的 SCL-1 细胞, 采用 RIPA 裂解液处理后按照试剂盒方法提取总蛋白, BCA 法进行定量分析。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后电转移至 PVDF 膜, 封闭处理结束后分别加入 1:1000 比例稀释后的一抗 SOX4、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 GAPDH, 4℃ 缓慢震荡孵育过夜, TBST 洗膜后加入稀释后的 HRP 标记的二抗室温下孵育 2 h, 采用 ECL 发光液处理显影, 成像后拍照并采用 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.3 统计学分析

本研究所有数据表示为平均值 \pm 标准差, 采用 SPSS Statistics 22 软件进行数据统计学分析, GraphPad Prism 8 软件制图。多组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-204 和 SOX4 在 CSCC 组织和细胞中的表达

与癌旁组织比较, CSCC 组织中 miR-204 水平降低 ($P < 0.05$), SOX4 的 mRNA 和蛋白水平均升高 ($P < 0.05$), SOX 蛋白呈阳性表达。与 HaCaT 细胞比较, SCL-1 细胞中 miR-204 水平降低 ($P < 0.05$), SOX4 的 mRNA 和蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 1 和图 2。

2.2 miR-204 与 SOX4 的靶向调控关系

TargetScan 软件在线分析结果显示 miR-204 的 5' 端与 SOX4 的 3' 端存在结合位点。与 miR-NC 组比较, miR-204 与 WT-SOX4 共转染的 SCL-1 细胞中荧光素酶相对活性降低 ($P < 0.05$), 进一步验证了 miR-204 与 SOX4 存在靶向结合关系。与对照组或 NC 组比较, miR-204 组 SCL-1 细胞中 SOX4 的 mRNA 和蛋白水平均降低 ($P < 0.05$); 与 miR-204 组或 miR-204+pcDNA 组比较, miR-204+SOX4 组 SCL-1 细胞中 SOX4 的 mRNA 和蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.3 过表达 miR-204 对 CSCC 细胞增殖和凋亡的影响

与对照组或 NC 组比较, miR-204 组 SCL-1 细胞相对增殖活力和克隆形成数量均降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 miR-204 组或 miR-204+pcDNA 组比较, miR-204+SOX4 组 SCL-1 细胞相对增殖活力和克隆形成数量均升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 4 和图 5。

2.4 过表达 miR-204 对 CSCC 细胞迁移和侵袭的影响

与对照组或 NC 组比较, miR-204 组 SCL-1 细胞迁移和侵袭数量均降低 ($P < 0.05$); 与 miR-204 组或 miR-204+pcDNA 组比较, miR-204+SOX4 组 SCL-1 细胞迁移和侵袭数量均升高 ($P < 0.05$)。见图 6。

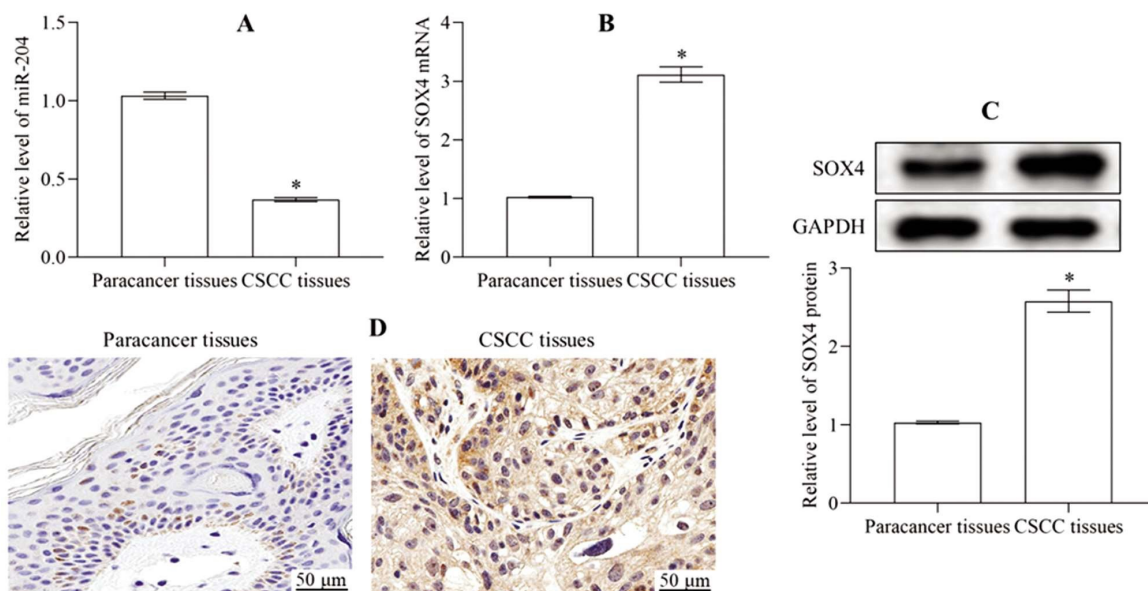


图 1 miR-204 和 SOX4 在 CSCC 组织和细胞中的表达

Fig.1 Expression of miR-204 and SOX4 in CSCC tissues and cells

Note: A: Expression level of miR-204 in CSCC tissues; B and C: SOX4 mRNA and protein levels in CSCC tissues; D: The expression of SOX4 in CSCC tissues was detected by immunohistochemical staining. Compared with paracancer tissues, * $P < 0.05$.

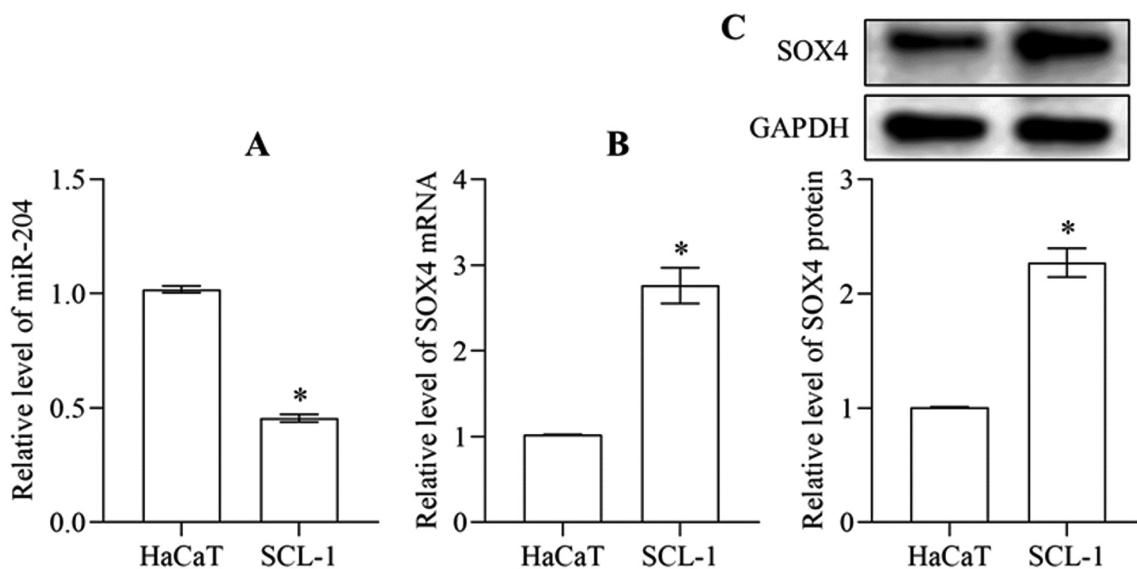


图 2 miR-204 和 SOX4 在 SCL-1 细胞中的表达

Fig.2 Expression of miR-204 and SOX4 in SCL-1 cells

Note: A: Expression level of miR-204 in SCL-1 cells; B and C: SOX4 mRNA and protein levels in SCL-1 cells. Compared with HaCaT cells, * $P < 0.05$.

2.5 过表达 miR-204 对 CSCC 细胞上皮间质转化的影响

与对照组或 NC 组比较, miR-204 组 SCL-1 细胞的 E-cadherin 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$); 与 miR-204 组或 miR-204+pcDNA 组比较, miR-204+SOX4 组 SCL-1 细胞的 E-cadherin 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

皮肤鳞状细胞癌 (CSCC) 是第二常见的皮肤癌, 占角化细胞癌的 20%, 早期的 CSCC 可通过手术和免疫治疗等方式取得较好的治疗效果, 但高危的 CSCC 可能通过恶性进展和转移进

而导致患者死亡^[15,16]。因此, CSCC 的早期诊断和治疗对于抑制 CSCC 的恶性发展非常关键和重要。近三十年来, 随着分子生物学研究发展以及手术和放射治疗新技术的实施, 催生了新的诊断标志物和治疗靶点, 显著提高了对 CSCC 局部发展的控制能力和患者的生存的机会^[17]。目前的研究显示 TP53 和 NOTCH 信号通路基因以及 RAS 家族基因与 CSCC 进展有关, CDKN2A 与 CSCC 的侵袭性相关, 而 VEGF-C 与 CSCC 的转移过程相关^[18]。此外, 越来越多的 miRNAs 被研究报道与 CSCC 的发生和进展密切相关^[7,19]。

CSCC 在发生和发展中存在的基因突变概率相较于其他癌症要高^[20], 而 miRNAs 作为非编码小 RNA, 主要参与转录后水平的基因表达调控, 其在 CSCC 的发生和恶化进展过程中的

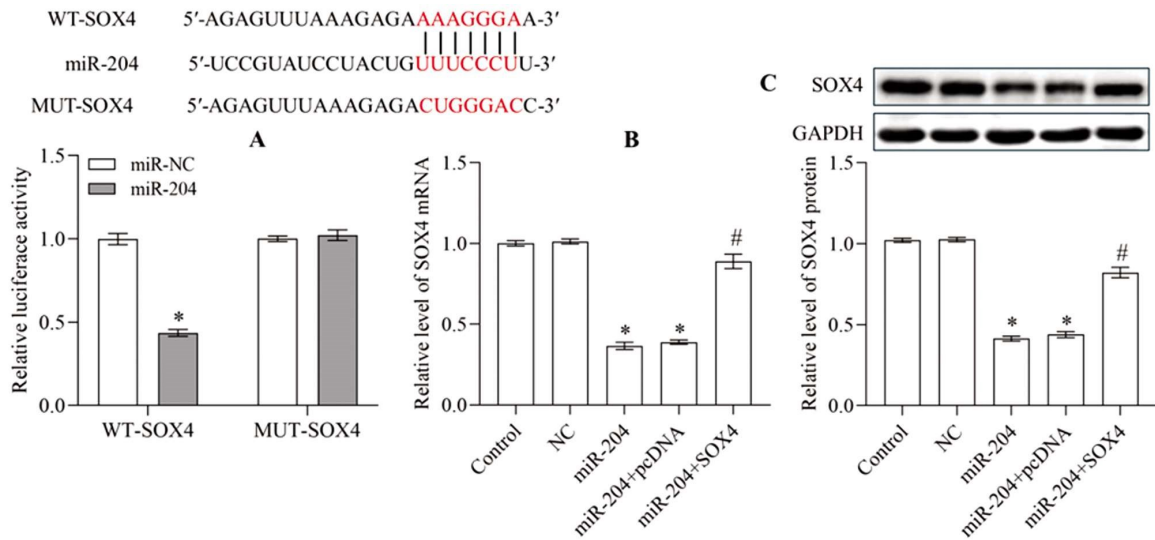


图3 miR-204与SOX4靶向调控关系分析

Fig.3 Analysis of the regulatory relationship between miR-204 and SOX4 targeting

Note: A: TargetScan software online analysis results and double luciferase reporter gene experiment results; B and C: SOX4 mRNA and protein levels in SCL-1 cells. Compared with control group or NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, * $P < 0.05$.

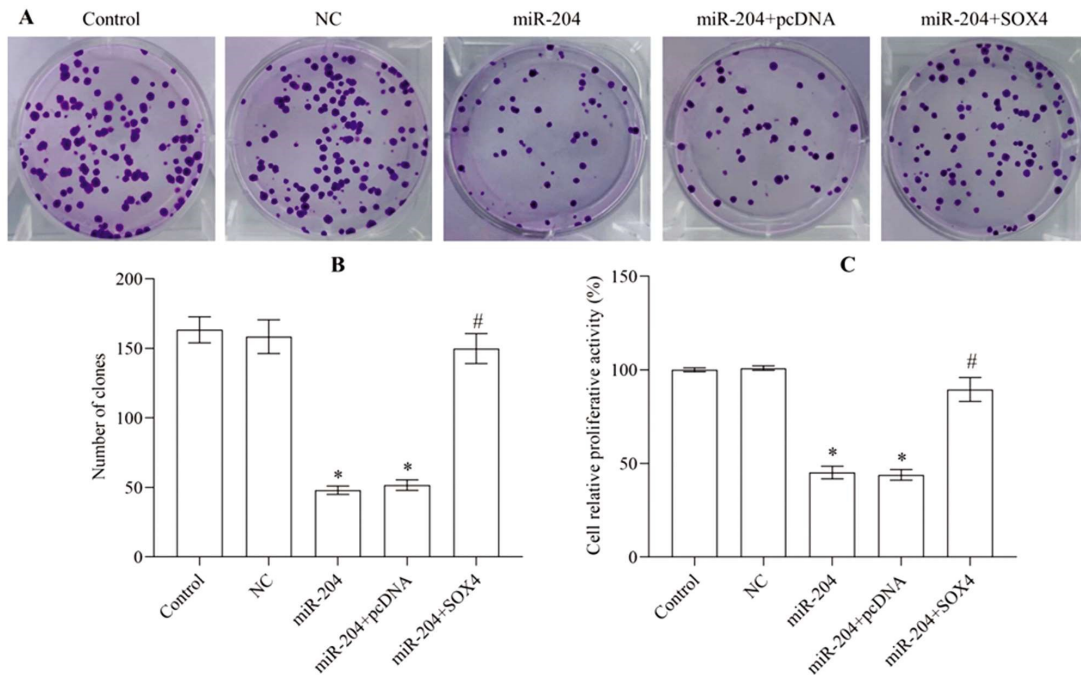


图4 过表达 miR-204 对 SCL-1 细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of overexpression of miR-204 on proliferation of SCL-1 cells

Note: A and B: Results of clone formation experiment and the statistics of clone formation number; C: Cell proliferation was detected by CKK-8 assay. Compared with control group or NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, * $P < 0.05$.

角色很复杂，可以作为致癌 miRNAs，促进 CSCC 发生 (oncomiR)，亦可以作为抑癌 miRNAs，预防或者遏制 CSCC 发生和进展^[7]。Li 等^[21]发现 MicroRNA-486-3p 通过抑制 flotillin-2 促进 CSCC 细胞的增殖和转移；而 Tian 等^[22]研究发现，MicroRNA-125b 通过靶向 STAT3 通路在皮肤鳞状细胞癌中发挥抗肿瘤功能；因此 miRNAs 在 CSCC 中的具体功能仍需要根据 miRNAs 的种类以及所在组织或者细胞的微环境决定。miR-204 已被证明在肿瘤中发挥双重作用，如在乳腺癌、结肠癌和胃癌中通过抑制癌细胞增殖、侵袭、转移、EMT 和血管生成进而抑制癌症发展^[8-10]，而在神经内分泌前列腺癌细胞系

PC-3 和 CL1 中却是作为肿瘤促进因子^[11]。Toll 等^[12]研究显示 miR-204 在 CSCC 组织中低表达，而郑晶等^[23]发现 miR-204-5p 通过负调控溴结构域蛋白 4 进而抑制舌鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究发现 CSCC 组织中 miR-204 水平显著低于正常皮肤组织，且在 CSCC 细胞系 SCL-1 中也是处于低表达状态。通过在 SCL-1 细胞中过表达 miR-204，结果显示 SCL-1 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 等肿瘤细胞的恶性生物行为均受到抑制，且细胞凋亡率增加，该结果表明 miR-204 在 CSCC 的发展中是抑制作用角色，这也与目前所报道的 miR-204 主要发挥肿瘤抑制作用结果一致^[24]。

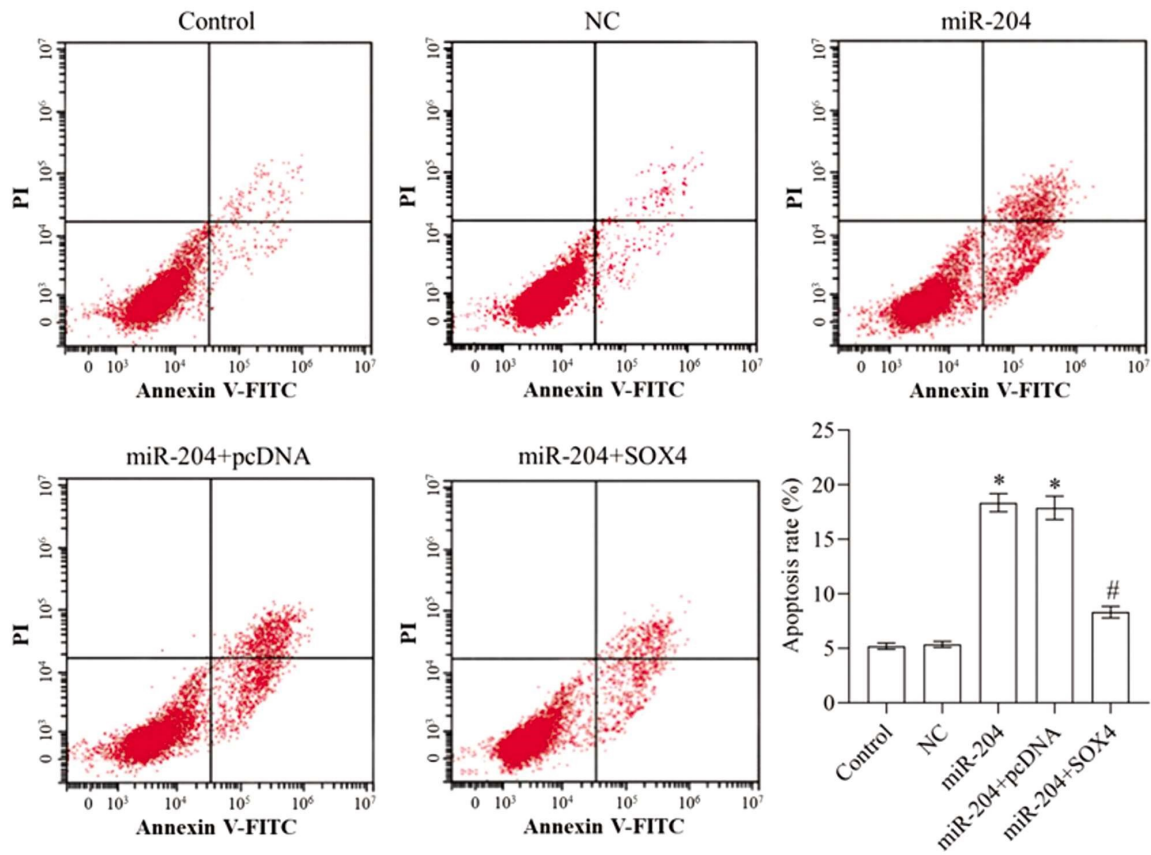


图 5 过表达 miR-204 对 SCL-1 细胞凋亡的影响

Fig.5 Effect of overexpression of miR-204 on apoptosis of SCL-1 cells

Note: Compared with control group or NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, * $P < 0.05$.

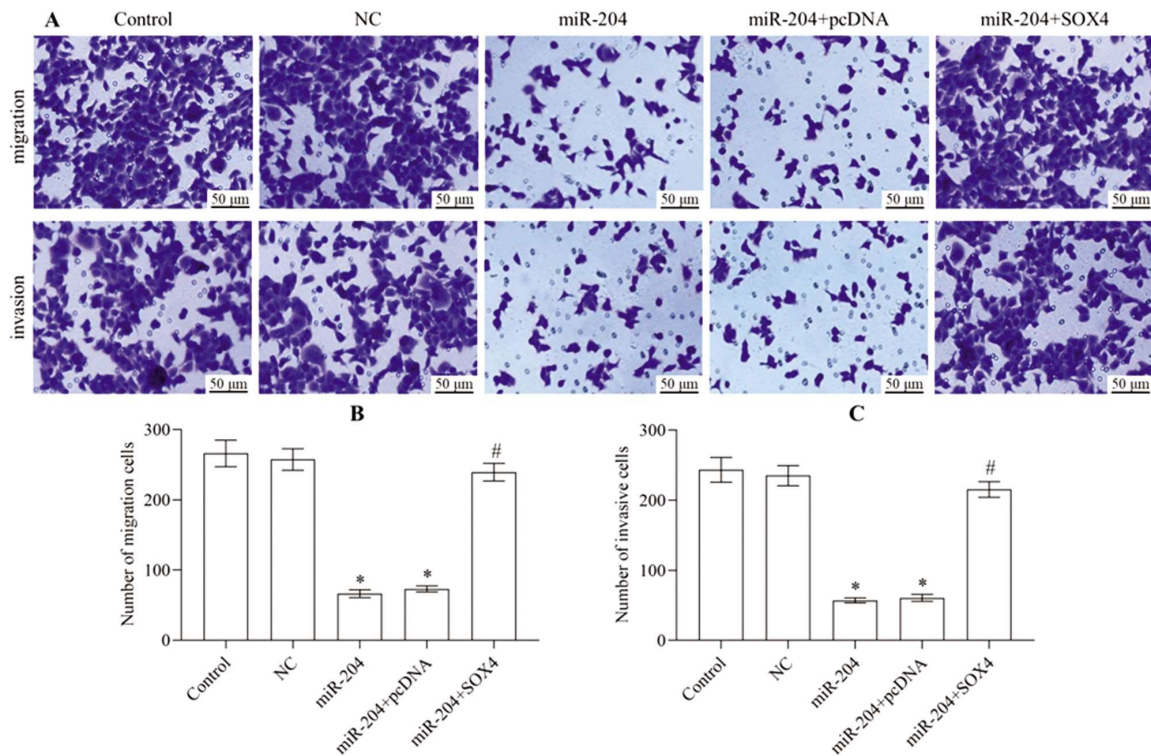


图 6 过表达 miR-204 对 SCL-1 细胞迁移和侵袭的影响

Fig.6 Effect of overexpression of miR-204 on migration and invasion of SCL-1 cells

Note: A: SCL-1 cells migration and invasion were detected by Transwell assay; B: SCL-1 cells migration and invasion count; Compared with control group or NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, * $P < 0.05$.

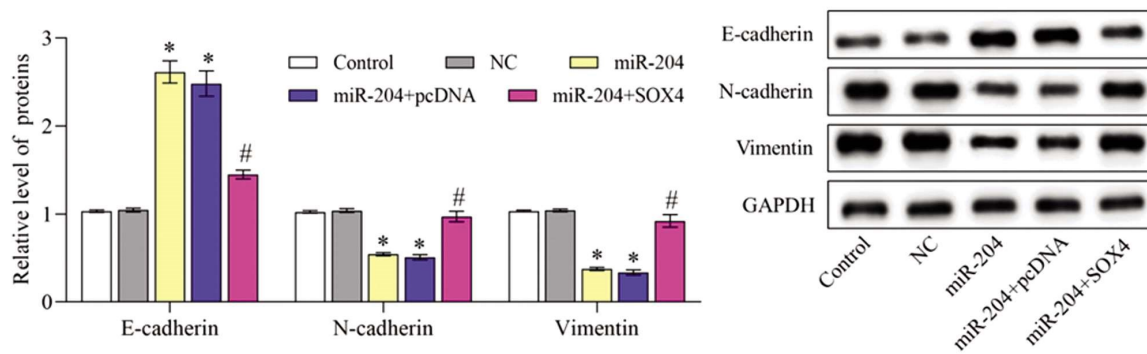


图7 过表达 miR-204 对 SCL-1 细胞的 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of overexpression of miR-204 on expression of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in SCL-1 cells

Note: Compared with control group or NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-204 group or miR-204+pcDNA group, # $P < 0.05$.

miR-204 作为一种重要的肿瘤抑制因子,主要通过抑制数十个靶基因以及 PI3K/AKT 信号通路来调节肿瘤细胞增殖、转移、侵袭、自噬、凋亡、EMT 和化疗耐药性^[24,25]。SOX4 是一种重要的发育转录因子,主要调节细胞分化和发育,其在 20 多种恶性肿瘤中被报道均处于高表达状态,多种证据支持 SOX4 是致癌基因的观点^[13]。已报道的文献表明,SOX4 的致癌作用主要体现在促进癌细胞存活、EMT、细胞迁移、血管生成和肿瘤转移。Kuo 等^[26]研究认为 SOX4 是分化型甲状腺癌肿瘤发生的关键促进因子;Zhang 等研究结果显示,SOX4 在体外增加乳腺癌细胞的活力,促进细胞迁移和侵袭,并在体内增强肿瘤的生长和转移^[27]。在本研究中,发现 SOX4 在 CSCC 组织和 SCL-1 细胞中均处于高表达状态。而 SOX4 作为 miR-204 的靶基因之一,已被报道在多种肿瘤中受到 miR-204 的调控而影响癌症的发展。Lu 等研究显示,miR-204 通过靶向 SOX4 而抑制结肠癌细胞增殖和迁移^[28];闫玉兰等发现 miR-204 通过靶向调控 SOX4 进而抑制急性淋巴细胞白血病 CEM/C1 细胞增殖和侵袭。本研究通过 TargetScan 软件在线分析发现 miR-204 靶向负调控 SOX4,在 SCL-1 细胞中过表达 miR-204 会导致 SOX4 水平的降低,同时 SCL-1 细胞的恶性生物行为均受到抑制。而且,在过表达 miR-204 的 SCL-1 细胞中同时过表达 SOX4 可以很大程度上抵消 miR-204 对 SCL-1 细胞恶性生物行为的抑制作用。该结果表明,SOX4 在 CSCC 中是致癌因子角色,且 miR-204 通过抑制 SOX4 而发挥对 CSCC 发展的缓解作用。

综上所述,miR-204 是 CSCC 发展的抑制因子,SOX4 在 CSCC 中是致癌因子,miR-204 通过靶向 SOX4 抑制 CSCC 细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化过程,并促进细胞凋亡,进而缓解 CSCC 的发展。

参考文献(References)

- Halim AS, Ramasenderan N. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC): Challenges and emerging therapies [J]. Asian J Surg, 2023, 46(1): 47-51.
- Corchado-Cobos R, García-Sancha N, González-Sarmiento R, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma: from biology to therapy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2956.
- Chang MS, Azin M, Demehri S. Cutaneous squamous cell carcinoma: the frontier of cancer immunoprevention [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 101-119.
- Cumsky HJL, Costello CM, Zhang N, et al. The prognostic value of inositol polyphosphate 5-phosphatase in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 80(3): 626-632.
- Piipponen M, Nissinen L, Kähäri VM. Long non-coding RNAs in cutaneous biology and keratinocyte carcinomas[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(22): 4601-4614.
- Qiu CG, Shen B, Sun XQ. Significant biomarkers identification associated with cutaneous squamous cell carcinoma progression [J]. Int J Gen Med, 2022, 15: 2347-2360.
- García-Sancha N, Corchado-Cobos R, Pérez-Losada J, et al. MicroRNA dysregulation in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2181.
- Zeng J, Li G, Xia Y, et al. miR-204/COX5A axis contributes to invasion and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancers[J]. Cancer Lett, 2020, 492: 185-196.
- Lu C, Xie T, Guo X, et al. LncRNA DSCAM-AS1 promotes colon cancer cells proliferation and migration via regulating the miR-204/SOX4 axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 4347-4356.
- Zhang J, Xing L, Xu H, et al. miR-204-5p suppress lymph node metastasis via regulating CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer [J]. J Cancer, 2020, 11(11): 3199-3206.
- Ding M, Lin B, Li T, et al. A dual yet opposite growth-regulating function of miR-204 and its target XRN1 in prostate adenocarcinoma cells and neuroendocrine-like prostate cancer cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(10): 7686-700.
- Toll A, Salgado R, Espinet B, et al. MiR-204 silencing in intraepithelial to invasive cutaneous squamous cell carcinoma progression[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 53.
- Moreno CS. SOX4: The unappreciated oncogene [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 67(1): 57-64.
- 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.
- Stratigos AJ, Garbe C, Dessinioti C, et al. European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 1. epidemiology, diagnostics and prevention [J]. Eur J Cancer, 2020, 128: 60-82.
- Dessinioti C, Stratigos AJ. Recent advances in the diagnosis and management of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma [J].

- Cancers (Basel), 2022, 14(14): 3556.
- [17] Combalia A, Carrera C. Squamous cell carcinoma: an update on diagnosis and treatment [J]. *Dermatol Pract Concept*, 2020, 10(3): e2020066.
- [18] García-Foncillas J, Tejera-Vaquerizo A, Sanmartín O, et al. Update on management recommendations for advanced cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(3): 629.
- [19] Wei Y, Yang X, Gao L, et al. Identification of potential immune-related circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(10): 4826-4843.
- [20] Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, et al. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6582-6592.
- [21] Li X, Yuan Y, Wang Y, et al. MicroRNA-486-3p promotes the proliferation and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma by suppressing flotillin-2[J]. *J Dermatol Sci*, 2022, 105(1): 18-26.
- [22] Tian K, Liu W, Zhang J, et al. MicroRNA-125b exerts antitumor functions in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting the STAT3 pathway[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25: 12.
- [23] 郑晶, 张雨温, 李天睿, 等. miR-204-5p 靶向溴结构域蛋白 4 对舌鳞状细胞癌细胞 SCC25 增殖和迁移侵袭的影响研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2020, 38(2): 185-192.
- [24] Yang F, Bian Z, Xu P, et al. MicroRNA-204-5p: A pivotal tumor suppressor[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(3): 3185-3200.
- [25] Fan X, Fang X, Liu G, et al. MicroRNA-204 inhibits the proliferation and metastasis of breast cancer cells by targeting PI3K/AKT pathway [J]. *J BUON*, 2019, 24(3): 1054-1059.
- [26] Kuo CY, Hsu YC, Liu CL, et al. SOX4 is a pivotal regulator of tumorigenesis in differentiated thyroid cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 578: 112062.
- [27] Zhang J, Xiao C, Feng Z, et al. SOX4 promotes the growth and metastasis of breast cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 468.
- [28] Lu C, Xie T, Guo X, et al. LncRNA DSCAM-AS1 promotes colon cancer cells proliferation and migration via regulating the miR-204/SOX4 axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 4347-4356.
- [29] 闫玉兰, 符婷婷, 韩蕾, 等. miR-204 通过靶向调控 SOX4 抑制急性淋巴细胞白血病 CEM/C1 细胞增殖、侵袭的体外实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(10): 1826-1832.

(上接第 2618 页)

- [22] SUTHERLAND L, HITTESDORF E, YOH N, et al. Acute kidney injury after cardiac surgery: A comparison of different definitions[J]. *Nephrology (Carlton, Vic)*, 2020, 25(3): 212-218.
- [23] BASILE D P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(2): 151-156.
- [24] THAKAR C V, ARRIGAIN S, WORLEY S, et al. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(1): 162-168.
- [25] ARONSON S, FONTES M L, MIAO Y, et al. Risk index for perioperative renal dysfunction/failure: critical dependence on pulse pressure hypertension[J]. *Circulation*, 2007, 115(6): 733-742.
- [26] JIANG W, TENG J, XU J, et al. Dynamic Predictive Scores for Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury [J]. *Journal of the American Heart Association*, 2016, 5(8): e003754.