

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.07.0891

· 论 著 ·

模拟低氧对舌鳞癌 SCC-15 细胞系中 SOX2 和 OCT4 表达的影响

王开*, 荆得宝, 于素平, 唐唯, 刘雪阳

第二军医大学附属公利医院口腔科, 上海 200135

[摘要] **目的** 研究模拟低氧条件对舌鳞癌 SCC-15 细胞增殖、周期、凋亡的影响, 及 SOX2 和 OCT4 蛋白、mRNA 的表达变化。**方法** 体外培养舌鳞癌 SCC-15 细胞, 加入模拟低氧物去铁胺(desferrioxamine, DFO) 模拟低氧环境, 为模拟低氧组, 同时设置不加 DFO 的常氧组为对照, 采用 CCK-8 法检测 SCC-15 细胞的增殖率; 流式细胞技术检测 SCC-15 细胞的周期和细胞凋亡率; 蛋白质印迹法检测常氧组和模拟低氧组 SCC-15 细胞中低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、SOX2 及 OCT4 蛋白的表达; qPCR 检测常氧组和模拟低氧组 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2 及 OCT4 mRNA 的表达。**结果** 与常氧组相比, 模拟低氧组 SCC-15 细胞的增殖受到抑制($P < 0.05$), G₁ 期细胞所占比例上升, S+G₂ 期细胞所占比例下降($P < 0.05$), 细胞凋亡率未见明显变化($P > 0.05$); 蛋白质印迹法结果显示, 与常氧组比较, 模拟低氧组 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 蛋白的表达均升高, 且 HIF-1 α 、OCT4 蛋白的升高幅度大于 SOX2 蛋白, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); qPCR 结果显示, 两组 SCC-15 细胞中 HIF-1 α mRNA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 而模拟低氧组 SCC-15 细胞中 SOX2、OCT4 mRNA 的表达水平高于常氧组($P < 0.05$)。**结论** DFO 可以有效模拟低氧环境, 促进 SOX2 和 OCT4 的蛋白和 mRNA 表达水平升高。

[关键词] 舌肿瘤; 细胞低氧; 去铁胺; SCC-15 细胞; 肿瘤干细胞; 转录因子

[中图分类号] R 739.86 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)07-0891-06

Effect of simulated hypoxia on expression SOX2 and OCT4 of tongue squamous cell carcinoma SCC-15 cells

WANG Kai*, JING De-bao, YU Su-ping, TANG Wei, LIU Xue-yang

Department of Stomatology, Gongli Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200135, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of simulated hypoxic environment on proliferation, cell cycle, apoptosis and the protein and mRNA expressions of SOX2 and OCT4 in tongue squamous cell carcinoma SCC-15 cells. **Methods** SCC-15 cells was cultured *in vitro*, and the hypoxia mimetic agent desferrioxamine (DFO) was added to simulate hypoxic condition (simulated hypoxia group, HOX group) and normoxia was designed as control group (NOX group). CCK-8 assay was performed to measure the proliferation ability of the SCC-15 cells; flow cytometry was used to measure the apoptosis rate and cell cycle of the SCC-15 cells; Western blotting was applied to measure the expressions of HIF-1 α , SOX2 and OCT4 protein in NOX and HOX groups; qPCR was used to measure the expressions of HIF-1 α , SOX2 and OCT4 mRNA in NOX and HOX groups. **Results** DFO effectively simulated the hypoxic condition. Compared with the NOX group, the proliferation ability of the cells in HOX group was significantly inhibited by DFO ($P < 0.05$), the proportion in G₁ cells was increased and that in S+G₂ was decreased; while no significant difference was found in the apoptosis rate of SCC-15 cells; the expressions of HIF-1 α , SOX2 and OCT4 proteins were significantly increased in HOX group, and the expressions of HIF-1 α and OCT4 proteins were significantly higher than SOX2 ($P < 0.05$). There was no significant difference of mRNA expression of HIF-1 α in NOX and HOX groups ($P > 0.05$); the mRNA expressions of SOX2 and OCT4 in HOX group were significantly higher than those in NOX group ($P < 0.05$). **Conclusion** DFO can effectively simulate hypoxic environment, and hypoxia can promote the expressions of SOX2 and OCT4 proteins and mRNA.

[收稿日期] 2016-12-05 **[接受日期]** 2017-02-27

[基金项目] 上海市浦东新区卫生和计划生育委员会青年科技基金项目(PW2014B-24), 第二军医大学附属公利医院院级优秀青年基金项目资助(GL2014Q-19). Supported by Youth Science and Technology Project of Shanghai Pudong New District Commission of Health and Family Planning (PW2014B-24) and Excellent Young Project of Second Military Medical University Affiliated Gongli Hospital (GL2014Q-19).

[作者简介] 王开, 硕士, 主治医师.

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-58855118, E-mail: wang_kai123@aliyun.com

[Key words] tongue neoplasms; cell hypoxia; deferoxamine; SCC-15 cells; neoplastic stem cells; transcription factors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(7): 891-896]

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔癌中发病率最高的恶性肿瘤之一,具有恶性程度高、浸润性生长及早期发生颈淋巴结转移的特点。大量研究表明,缺氧微环境可以促进肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移和血管生成等^[1-3],而 TSCC 与肿瘤干细胞中多种分子的异常调节机制密切相关。作为肿瘤干细胞的转录因子,SOX2 (SRY-like HMG box 2)和 OCT4(octamer binding factor 4)在干细胞构建及生物学特性方面具有重要作用,两者可以作为共同的干性基因参与恶性肿瘤的发生和转移^[4-5]。因此,以 SOX2 和 OCT4 为生物学标志物来监测 TSCC 的发生、侵袭,以及评估肿瘤的预后及治疗效果具有一定的应用前景。本研究选取化学药物去铁胺(desferrioxamine, DFO)为模拟低氧物,研究低氧状态下舌鳞癌 SCC-15 细胞系中 SOX2 和 OCT4 的表达情况,初步探讨干细胞转录因子 SOX2 和 OCT4 在 TSCC 的预后评估中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 人口腔舌鳞癌 SCC-15 细胞株由首都医科大学附属北京口腔医院馈赠。无支原体胎牛血清、青霉素/链霉素、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、DFO、焦碳酸乙二酯(DEPC)购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;PrimeScript™反转录试剂盒、Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 购自日本 TaKaRa 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养与分组 SCC-15 细胞培养于含有 10%胎牛血清的 α -MEM(美国 Gibco 公司)低糖培养液中,置于 37 °C、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,每隔 1 d 冲洗换液 1 次,细胞传代 2 次。待细胞生长至培养皿的 70%时取对数生长期 SCC-15 细胞,用于后续实验。实验分为 2 组,常氧组细胞不加 DFO,模拟低氧组每孔加入 100 μ mol/L DFO 100 μ L,每组设 5 个复孔。

1.3 CCK-8 法检测细胞的增殖情况 取处于对数生长期的 SCC-15 细胞,0.25%胰酶消化后使用完

全培养液重悬成细胞悬液,1 000 r/min (离心半径 5 cm)离心 5 min 后重悬于 α -MEM 低糖培养液中,用血球计数板计数细胞,配制成细胞密度为 2×10^4 /mL 的单细胞悬液。将细胞悬液加入 96 孔板中,调整细胞密度为 2×10^3 /孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱继续培养。在加药后 24、48、72、96、120 h 时行 CCK-8 检测。检测前每孔加入 10 μ L CCK-8 液,避光放置 4 h 后振荡器振荡 10 min,用酶标仪(450 nm)检测各孔的光密度(D)值。实验重复 3 次取平均值,绘制细胞生长曲线。

1.4 细胞周期分析 细胞培养 24 h 后,消化收集 DFO 处理过的 SCC-15 细胞,PBS 洗涤细胞,2 000 r/min(离心半径 5 cm)离心 5 min,并调整细胞密度为 1×10^6 /mL;制备的单细胞悬液用体积分数为 70%乙醇固定 12 h,4 °C 保存,染色前 1 000 r/min (离心半径 5 cm)离心 5 min,弃去固定液,PBS 清洗 3 次,重悬于 200 μ L PBS 中。加入 1 mg/mL 的 RNase 100 μ L,37 °C 水浴 30 min;再加入 400 μ L PI 染色混匀,4 °C 避光 30 min 后上流式细胞仪检测并分析结果。

1.5 细胞凋亡分析 用不含 EDTA 的胰酶消化后,2 000 r/min (离心半径 5 cm)、4 °C 离心 5 min 收集细胞;用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,2 000 r/min (离心半径 5 cm)、4 °C 离心 5 min。收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 细胞,加入 100 μ L $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞,然后加入 5 μ L Annexin V-EGFP 和 5 μ L PI,轻轻混匀,避光、室温反应 10 min,上流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测,记录并分析激发波长为 488 nm 时的红色荧光。

1.6 蛋白质印迹法检测 SCC-15 细胞中低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)、SOX2、OCT4 蛋白的表达 收集 SCC-15 细胞,加入 DFO 药物作用 24 h,用预冷 PBS 冲洗 2 次,然后加入 50 μ L 细胞裂解液,振荡器震荡数次,充分裂解后在冰上放置 20 min,离心半径 5 cm、12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液行定量分析。取已定量的总蛋白行 12%SDS-PAGE,电转移至硝酸纤维素膜上,放入 5% BSA 室温封闭过夜。取出膜,于摇床上用

TBST 洗膜 5 min×3 次,每次 10 min,加入 TBST 稀释的 HIF-1 α (Boster 公司, 1 : 200)、OCT4 (Abcam 公司, 1 : 1 000) 或 SOX2 (Abcam 公司, 1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min×3 次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (Jackson 公司, 1 : 2 000) 和 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (Jackson 公司, 1 : 2 000) 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 10 min×3 次。将膜置于化学发光检测试剂 (试剂 A : 试剂 B=1 : 1) 中反应 2 min, 取出膜, 甩去多余液体, 保鲜膜包好后在暗室中用 X 线胶片感光、显影、定影, 凝胶分析系统分析蛋白的表达。

1.7 qRT-PCR 检测 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 mRNA 的表达 取未加药和加药 24 h 后的细胞, 按照 TRIzol 试剂说明书要求提取细胞总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书要求采用特异性下游引物法反转录生成 cDNA。HIF-1 α 上游引物: 5'-CAC CAC AGG ACA GTA CAG GAT-3', 下游引物: 5'-CGT GCT GAA TAA TAC CAC TCA CA-3'; SOX2 上游引物: 5'-TGG ACA GTT ACG CGC ACA T-3', 下游引物: 5'-CGA GTA GGA CAT GCT GTA GGT-3'; OCT4 上游引物: 5'-CTG GGT TGA TCC TCG GAC CT-3', 下游引物: 5'-CCA TCG GAG TTG CTC TCC A-3'; 管家基因 GAPDH 上游引物: 5'-GAT GCC CCC ATG TTC GTC AT-3', 下游引物: 5'-TCT TCT GGG TGG CAG TGA TG-3'。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 60 s; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。检测 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 的扩增效率, 实验重复 3 次取均值。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算各 mRNA 的相对表达量。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 所有计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异比较采

用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验。组间比较采用 Student's *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 模拟低氧对 SCC-15 细胞增殖的影响 应用 CCK-8 法检测两组细胞在常氧和模拟低氧状态下的细胞增殖率。结果发现, 常氧状态下细胞的增殖率随着时间推移而逐渐增高, 在第 4 天时达到最高; 而模拟低氧状态抑制了细胞的增殖率, 在 DFO 处理后第 4~5 天, 模拟低氧组细胞增殖率均低于常氧组, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$; 图 1)。

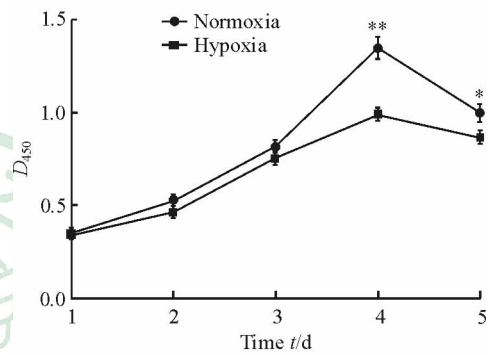


图 1 常氧和模拟低氧条件下 SCC-15 细胞的增殖曲线

Fig 1 Proliferation of SCC-15 cells in normoxia and hypoxia groups

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs hypoxia group. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.2 模拟低氧对 SCC-15 细胞周期变化的影响 应用流式细胞仪观察两组 SCC-15 细胞的细胞周期变化。结果显示, 加药培养 24 h 后, 与常氧组相比, 模拟低氧组 SCC-15 细胞周期的再分布发生变化, G₁ 期细胞所占比例上升 [(70.28±2.56)% vs (58.19±1.86)%], S+G₂ 期细胞所占比例下降 [(28.37±1.23)% vs (37.16±1.36)%], 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。表明低氧阻滞了细胞 G₁ 期, 使 S+G₂ 期细胞占比降低 (图 2)。

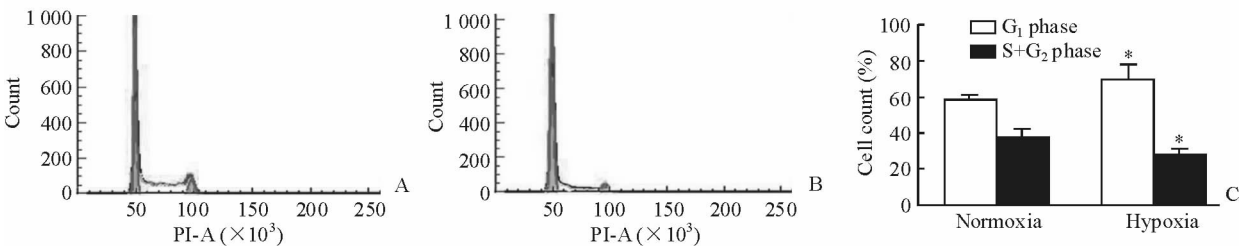


图 2 常氧和模拟低氧条件下 SCC-15 细胞的周期变化

Fig 2 Cell cycle of SCC-15 cells in normoxia and hypoxia groups

A: Normoxia group; B: Hypoxia group; C: Statistical chart of the SCC-15 cells proportion in G₁ phase and S+G₂ phase. PI: Propidium iodide.

* $P<0.05$ vs normoxia group. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.3 模拟低氧对 SCC-15 细胞凋亡的影响 培养 24 h后,常氧组与模拟低氧组中 SCC-15 细胞的凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。

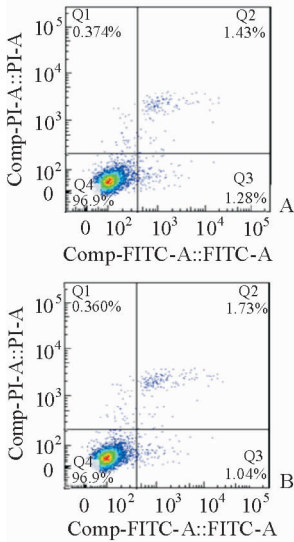


图 3 常氧(A)和模拟低氧(B)条件下 SCC-15 细胞的凋亡情况

Fig 3 Apoptosis rate of SCC-15 cells in normoxia (A) and hypoxia (B) groups

PI: Propidium iodide; FITC: Flurescein isothiocyanate

2.4 模拟低氧条件下 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 蛋白的表达变化 蛋白质印迹法检测结果显示,加药作用 24 h 后与常氧组比较,模拟低氧组 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 蛋白的表达均升高,且 HIF-1 α (0.383 ± 0.003)、OCT4(0.603 ± 0.003)蛋白的升高幅度大于 SOX2(0.228 ± 0.003)蛋白,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$;图 4)。

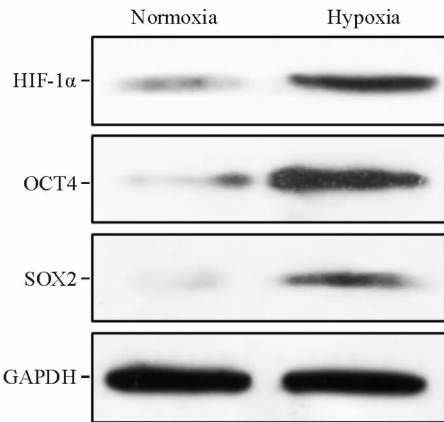


图 4 常氧和模拟低氧条件下 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2 及 OCT4 的蛋白表达

Fig 4 Expressions of HIF-1 α , SOX2 and OCT4 of SCC-15 cells in normoxia and hypoxia groups

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α ; SOX2: Sry-like hmg box-2; OCT4: Octamer binding factor-4

2.5 模拟低氧条件下 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 mRNA 的表达变化 qRT-PCR 结果显示,加药作用 24 h 后常氧组与模拟低氧组 SCC-15 细胞中 HIF-1 α mRNA 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),而模拟低氧组 SOX2、OCT4 mRNA 的表达水平均高于常氧组($P<0.01$,图 5)。

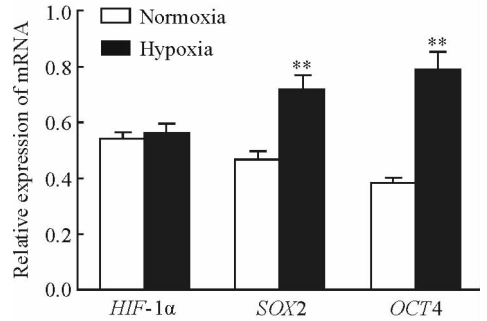


图 5 常氧和低氧条件下 SCC-15 细胞中 HIF-1 α 、SOX2 及 OCT4 mRNA 表达

Fig 5 Expressions of HIF-1 α , SOX2 and OCT4 mRNA of SCC-15 cells in normoxia and hypoxia groups

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α ; SOX2: Sry-like hmg box-2; OCT4: Octamer binding factor-4. ** $P<0.01$ vs normoxia group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

低氧在实体肿瘤中普遍存在,低氧环境为肿瘤呈现其恶性表型创造了所必需的条件,被认为是肿瘤进展及预后差的独立因素。研究表明低氧具有调控癌细胞分化的能力,可通过促进肿瘤干细胞生成和表观遗传修饰增强肿瘤恶性潜能^[6]。低氧诱导的信号通路主要由 HIF-1 α 调节,HIF-1 α 在细胞生长、分化、迁移、血管生成及能量代谢等方面均发挥重要作用^[7]。DFO 作为模拟低氧物可有效模拟细胞低氧微环境,并且对细胞的生物学特性无不良作用,在细胞实验中广泛使用^[8]。在低氧微环境中,肿瘤组织的新生血管紊乱、血液供应能力下降、氧气消耗增加,肿瘤细胞的生物学功能产生了重要变化^[9]。低氧的相关作用机制主要表现为促进肿瘤新生血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、影响细胞周期、促进肿瘤侵袭和远处转移等^[10-11]。本实验使用 DFO 模拟低氧环境,检测低氧条件下舌鳞癌 SCC-15 细胞的生物学行为及相关因子的表达情况,为 HIF-1 α 用于 TSCC 治疗进一步提供理论基础。

本实验分别使用 qRT-PCR 和蛋白质印迹法检

测 HIF-1 α mRNA 和蛋白的表达情况,从而确定 DFO 的低氧模拟效果,结果发现使用 DFO 模拟低氧后,HIF-1 α 蛋白的表达升高,但其 mRNA 的表达未见显著变化,提示 DFO 可能是通过抑制 HIF-1 α 在蛋白水平的降解来模拟低氧。细胞的增殖、周期及凋亡是评价细胞生物学行为的重要指标,本实验使用 CCK-8 法检测细胞的增殖情况,流式细胞仪检测细胞的周期及凋亡情况。结果发现模拟低氧组 SCC-15 细胞的增殖率低于常氧组,说明低氧抑制了细胞的增殖能力。此外,低氧条件下 G₁ 期细胞所占比例上升,S+G₂ 期细胞所占比例下降,表明低氧引起了 G₁ 期细胞的阻滞,导致 S+G₂ 期细胞占比下降。相比常氧条件,在 24 h 的低氧条件下舌鳞癌 SCC-15 细胞的凋亡未见明显增加。上述发现与 Zhou 等^[12]的研究结果一致。

SOX2 和 OCT4 作为干细胞的转录因子,在维持细胞自我更新和多向分化过程中具有决定性作用。恶性肿瘤的发生、发展与 SOX2 及 OCT4 关系密切。研究发现,在多种实体恶性肿瘤细胞中,SOX2 和 OCT4 均高度表达,且 OCT4 与 SOX2 可以联合应用作为预后判断指标,其表达程度越高,肿瘤恶性程度越高^[13-16]。Chiou 等^[17]报道在口腔鳞癌中 OCT4 的高表达与患者的预后成反比,即 OCT4 表达越高,预后越差。本研究发现低氧条件下 HIF-1 α 、SOX2、OCT4 蛋白的表达均升高,而且 HIF-1 α 、OCT4 蛋白的升高幅度大于 SOX2 蛋白,可能与其恶性程度增高密切相关。作为 TSCC 肿瘤的载体,舌体组织的血管系统非常丰富,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在促进内皮细胞分裂、增殖和提高血管通透性方面具有重要作用。本课题组前期研究发现,HIF-1 α 介导上调 VEGF mRNA 和蛋白的水平^[18],即低氧促进 TSCC 中 VEGF 的高表达,调控 TSCC 的血管生成,进而促进 TSCC 的发展,但其是否和干细胞转录因子 SOX2 和 OCT4 相关,还有待进一步证实。

口腔癌的发生和发展与肿瘤低氧微环境密切相关^[19]。低氧促进 SOX2 和 OCT4 的高表达,进而影响癌细胞的自我更新和分化潜能,导致在生物学特性上具有更高的恶性程度。胡鑫^[20]研究发现 SOX2 和 OCT4 在维持肿瘤干细胞增殖过程中具有重要作

用,使用 RNA 干扰 SOX2 和 OCT4 可以抑制肿瘤干细胞富集的胃癌细胞的增殖,其凋亡亦可受到影响,但确切的生物学分子机制还有待进一步明确。

综上,本研究表明 TSCC 中干细胞转录因子 SOX2 和 OCT4 在低氧微环境中可高表达;抑制 HIF-1 α 在蛋白水平的降解可以抑制干细胞增殖,同时 SOX2 和 OCT4 的作用也可能受到影响。目前,尚未有大量文献报道干细胞转录因子 SOX2 和 OCT4 在 TSCC 中的高表达与 TSCC 临床病例分期、分化程度及预后生存率方面的相关性。SOX2 和 OCT4 的阳性表达是否也可以作为 TSCC 患者预后的标志,还需要更有力的证据支持。

[参考文献]

- [1] ELLIS L M, HICKLIN D J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 579-591.
- [2] QIANG L, WU T, ZHANG H W, LU N, HU R, WANG Y J, et al. HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19: 284-294.
- [3] WICKRAMASINGHE N S, BANERJEE K, NAGARAJ N S, VIGNESWARAN N, ZACHARIAS W. Hypoxia alters cathepsin B/inhibitor profiles in oral carcinoma cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25: 2841-2849.
- [4] CHUANG W Y, CHANG Y S, CHAO Y K, YEH C J, LIU Y H, TSENG C K, et al. High sex determining region Y-box 2 (SOX2) expression correlates with absence of nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 9248-9255.
- [5] BOTQUIN V, HESS H, FUHRMANN G, ANASTASSIADIS C, GROSS M K, VRIEND G, et al. New POU dimer configuration enhancer by Oct-4 and Sox-2 [J]. *Genes Dev*, 1998, 12: 2073-2090.
- [6] BRAHIMI HORN M C, BELLOT G, POUYSSEGUR J. Hypoxia and energetic tumor metabolism [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 21: 67-72.
- [7] FRAGA A, RIBEIRO R, MEDEIROS R. Tumor hypoxia: the role of HIF [J]. *Actas Urol Esp*, 2009, 33: 941-951.

- [8] HIRSILA M, KOIVUNEN P, XU L, SEELEY T, KIVIRIKKO K I, MYLLYHARJU J, et al. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway[J]. *FASEB J*, 2005, 10: 1308-1310.
- [9] TREDAN O, GALMARINI C M, PATEL K, TANNOCK I F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment[J]. *J Nat Cancer Inst*, 2007, 99: 1441-1454.
- [10] CHAN D A, GIACCIA A J. Hypoxia, gene expression, and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26: 333-339.
- [11] MELILLO G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26: 341-352.
- [12] ZHOU X, HUANG D, XUE Z, XU X, WANG K, SUN Y, et al. Effect of HIF-1 α on biological activation of human tongue squamous cell carcinoma SCC-15 cells *in vitro*[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46: 2346-2354.
- [13] SHOLL L M, LONG K B, HORNICK J L. Sox2 expression in pulmonary non-small cell and neuroendocrine carcinomas [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010, 18: 55-61.
- [14] GANGEMI R M, GRIFFERO F, MARUBBI D, PERERA M, CAPRA M C, MALATESTA P, et al. Sox2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity [J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 40-48.
- [15] CHEN Y C, HSU H S, CHEN Y W, TSAI T H, HOW C K, WANG C Y, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem like propeaies in lung cancer-derived CD133-positive cells[J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3: e2637. doi: 10.1371/journal.pone.0002637.
- [16] GE N, LIN H X, XIAO X S, GUO L, XU H M, WANG X, et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *J Trnsl Med*, 2010, 8: 94.
- [17] CHIOU S H, YU C C, HUANG C Y, LIN S C, LIU C J, TSAI T H, et al. Positive correlations of Oct4 and Nanog in oral cancer stem like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 4085-4095.
- [18] 闵睿, 康非吾, 王开, 吴滑, 朱炎. 低氧诱导下 Tca8113 细胞 HIF-1 α 与 VEGF 的表达及血管生成相关性研究 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2009, 4: 234-238.
- [19] RYU M H, PARK H M, CHUNG J, LEE C H, PARK H R. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin[J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2010, 393: 11-15.
- [20] 胡鑫. siRNA 干扰转录因子 SOX2 和 OCT4 对胃癌干 细胞增殖的影响[D]. 大连: 大连医科大学, 2011.

[本文编辑] 曾奇峰