

· 基础研究 ·

## 下调性别决定区Y框蛋白9对口腔鳞癌细胞 上皮间质转化及克隆能力的影响

杨文丽 孙明磊 张朋 余炜伟 周海霞 孙强  
郑州大学第一附属医院口腔科, 郑州 450052

**[摘要]** **目的** 探讨下调性别决定区Y框蛋白9 (SOX9) 对口腔鳞癌 (OSCC) 细胞上皮间质转化 (EMT) 及克隆能力的影响。**方法** OSCC BcaCD885细胞中转染siRNA control、SOX9 siRNA, 同时以不做任何转染的细胞作为control组。实时定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 和Western blot筛选干扰效果较好的SOX9 siRNA1做后续研究。细胞克隆实验测定细胞克隆形成能力, 免疫荧光检测上皮钙黏附素 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 表达, Western blot检测E-cadherin、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、Vimentin、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达, Transwell小室检测细胞侵袭和迁移。**结果** SOX9 siRNA组细胞中SOX9 mRNA和蛋白水平均明显低于control组 ( $P<0.05$ )。SOX9 siRNA1细胞克隆形成数目、细胞侵袭和迁移数目明显降低, 并且细胞中MMP-2、MMP-9蛋白水平也明显降低, 与control组相比, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。SOX9 siRNA1组细胞中Vimentin表达水平降低, 而E-cadherin表达水平升高, 细胞EMT受到抑制, 与control组相比, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。**结论** 下调SOX9可抑制OSCC细胞EMT和克隆形成, 以及细胞侵袭和迁移。

**[关键词]** 性别决定区Y框蛋白9; 口腔鳞癌; 上皮间质转化; 细胞克隆

**[中图分类号]** Q 785 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.01.003

**Effect of down-regulation of sex determining region Y-box 9 on epithelial mesenchymal transition and cloning of oral squamous carcinoma cells** Yang Wenli, Sun Minglei, Zhang Peng, Yu Weiwei, Zhou Haixia, Sun Qiang. (Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Supported by: Henan Education Department Key Scientific and Technological Research Projects (14A320022). Correspondence: Yang Wenli, E-mail: wenbowuw@163.com.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of sex determining region Y-box 9 (SOX9) on epithelial mesenchymal transition (EMT) and cloning of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** siRNA control, SOX9 siRNA were transfected into BcaCD885 cells in OSCC. Simultaneously, cells that did not undergo transfection were used as the control. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to select SOX9 siRNA1 with enhanced interference effect. A cell cloning assay was used to determine the cell's clone formation ability. E-cadherin and Vimentin expressions were detected by immunofluorescence. The expressions of E-cadherin, matrix metalloprotease 2 (MMP-2), Vimentin and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) were detected by Western blot. Cell invasion and migration were detected in the Transwell compartment. **Results** The levels of SOX9 mRNA and protein in SOX9 siRNA cells were significantly lower than those of the control ( $P<0.05$ ). An increase in the number of SOX9 siRNA1 cell clones led to the considerable decrease of the number of cell invasion and migration. In addition, levels of MMP-2 and MMP-9 proteins in cells decreased significantly compared with the control ( $P<0.05$ ). The level of Vimentin expression in SOX9 siRNA1 cells decreased, and expression level

of E-cadherin was elevated. Cell EMT was inhibited compared with the control, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Down-regulation of SOX9 inhibited EMT, clonogenic formation, cell invasion and OSCC migration.

**[Key words]** sex determining region Y-box 9; oral squa-

**[收稿日期]** 2018-02-18; **[修回日期]** 2018-11-03

**[基金项目]** 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14A320022)

**[作者简介]** 杨文丽, 副主任医师, 硕士, E-mail: wenbowuw@163.com

**[通信作者]** 杨文丽, 副主任医师, 硕士, E-mail: wenbowuw@163.com

mous cell carcinoma; epithelial mesenchymal transition; cell clones

手术治疗、免疫治疗、放疗和化疗等是常见的治疗口腔鳞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 的方法。随着人们对肿瘤发病机制的不断研究, 基因靶向治疗已成为目前治疗肿瘤的新方法<sup>[1]</sup>。肿瘤转移是肿瘤致死的重要原因, 上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤转移的基础, 也是肿瘤细胞获得转移性的重要原因<sup>[2]</sup>。性别决定区Y框蛋白9 (sex determining region Y-box 9, SOX9) 在肿瘤中的作用受到广泛关注, 在各种癌症中发现其呈强阳性, 并且表达水平的高低与肿瘤的生长和转移有关<sup>[3-5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>显示, SOX9在口腔癌癌化过程中表达上升, 并且与肿瘤的转移有关。目前, SOX9对OSCC细胞侵袭迁移及EMT的作用尚不明确。本实验以BcaCD885细胞为对象, 研究下调SOX9对OSCC细胞侵袭、迁移及EMT的影响, 为以后靶向SOX9治疗口腔癌提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

OSCC BcaCD885细胞 (ATCC公司, 美国); cDNA合成试剂盒、实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); SOX9抗体 (Santa Cruz Biotechnology公司, 美国); 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、波形蛋白 (Vimentin) 抗体、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloprotease 2, MMP-2) 抗体、上皮钙黏附素 (E-cadherin) 抗体、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotease 9, MMP-9) 抗体 (Bioworld公司, 美国); 10%山羊血清 (武汉博士德生物工程有限公司); siRNA control、SOX9 siRNA1、SOX9 siRNA2 (上海吉玛制药技术有限公司)。

### 1.2 细胞转染

BcaCD885细胞中转染SOX9小干扰RNA, 分别为SOX9 siRNA1、SOX9 siRNA2, 同时转染siRNA control作为阴性对照, 以不做转染的BcaCD885细胞作为control组, 转染的具体操作方法参照Lipofectamine 2000脂质体转染试剂。细胞在转染后48 h, 用qRT-PCR和Western blot测定SOX9水平。细胞以含有10%胎牛血清的DMEM培养, 用0.25%的胰蛋白酶消化。培养参数为37 °C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱。

### 1.3 qRT-PCR测定SOX9水平

control、siRNA control、SOX9 siRNA1、SOX9

siRNA2组细胞培养48 h以后, 采用TRIZOL试剂提取细胞的总RNA。使用分光光度计测定其OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>为1.8~2.0。取RNA合成cDNA以后进行qRT-PCR扩增。程序为: 95 °C, 3 min; 95 °C, 60 s; 60 °C, 60 s。引物序列如下。SOX9上游引物序列为: 5'-AATGGGGGATCCATGAATCTCCTGGAC-3', 下游引物序列为: 5'-ATTGACCGAATTTCGATCAAGGTCGAGTGAGC-3'。GAPDH上游引物序列为: 5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3', 下游引物序列为: 5'-TGAAGGGGTCATTGATGGCA-3'。

### 1.4 Western blot测定SOX9水平

control、siRNA control、SOX9 siRNA1、SOX9 siRNA2组细胞培养48 h以后, 提取细胞蛋白, 按照BCA蛋白定量试剂盒对各组蛋白样品进行定量检测。蛋白变性: 蛋白样品中加入5×上样缓冲液, 混合后, 在100 °C煮沸5 min。每个上样孔加40 μg蛋白样品, 以10%的分离胶、5%的浓缩胶, 在90 V恒压条件下电泳。电泳3 h以后, 观察染料移动到电泳槽的底部后, 停止电泳。转膜: 将聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜在转移缓冲液中浸泡, 200 mA置于冰浴中转膜2 h。封闭: 把膜放在5%牛血清白蛋白中, 在37 °C中孵育2 h。抗体孵育: PVDF膜放在一抗 (SOX9抗体以1:600稀释) 中, 置于4 °C过夜, 取出PVDF膜, 放在1:2 000稀释的IgG二抗中, 在室温孵育2 h。电化学发光后, Bio-Rad摄取图像, 以Quantity One定量分析。

### 1.5 克隆实验测定细胞克隆能力

control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞用培养液悬浮后, 调整细胞浓度, 接种在10 mL的培养皿中, 每个培养皿中添加200个细胞。继续培养14 d, 吸除细胞培养液, 用4%的多聚甲醛固定各组细胞, 吉姆萨染色20 min。在室温中干燥, 然后观察细胞克隆形成数目。

### 1.6 免疫荧光检测E-cadherin、Vimentin表达

control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞培养48 h后, 弃上清溶液。在细胞中添加冰预冷的PBS洗涤2次, 加入4%的多聚甲醛固定30 min。吸除固定液, PBS洗涤2次。用0.5%的Triton X-100覆盖玻片, 室温孵育10 min, PBS洗涤5次, 用10%羊血清封闭1 h, 再用1%的血清封闭液洗涤3次。分别滴加E-cadherin、Vimentin抗体稀释液, 稀释比为1:50, 在湿盒中, 4 °C过夜。用1%的血清封闭液洗涤6次, 加入含有1:100稀释的FITC荧光标记的二抗,

放在避光的环境中孵育1 h。用PBS洗涤6次。滴加DAPI, 在室温避光孵育5 min后, PBS洗涤3次, 加入荧光封片剂, 荧光显微镜下进行观察。

### 1.7 Transwell小室测定细胞侵袭和迁移

将基质胶4 ℃溶解后, 用DMEM稀释, 平铺在8 μm聚碳酸酯膜上, 37 ℃孵育30 min。取control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞, 以不含血清的培养液悬浮细胞, 并以密度为每毫升 $5 \times 10^5$ 个细胞接种到Transwell小室的上室中(每孔400 μL), 在下室中添加含有血清的培养液。48 h后, 用棉签擦掉没有穿过膜的细胞, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 选取5个视野, 计算穿过膜的细胞数目即为侵袭细胞数目。迁移细胞数目测定在实验前不用基质胶湿化, 其他步骤同侵袭实验。

### 1.8 Western blot测定细胞中E-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9蛋白水平

control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞培养48 h后, 采用Western blot法测定各组细胞中E-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9蛋白水平, 具体步骤同1.4。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件对实验数据进行分析, 两组数据用独立样本t检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

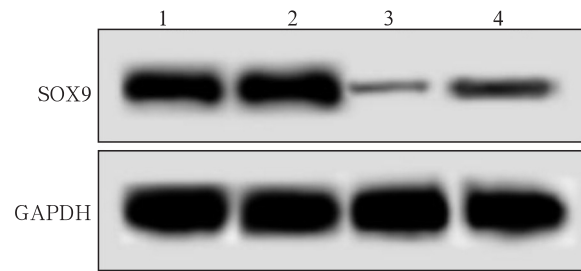
## 2 结果

### 2.1 SOX9 siRNA下调OSCC细胞中SOX9的表达

siRNA control组细胞中SOX9 mRNA和蛋白水平没有明显变化, 与control组相比, 差异无统计学意义。SOX9 siRNA1、SOX9 siRNA2组细胞中SOX9 mRNA和蛋白水平均明显低于control组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。SOX9 siRNA2组细胞中SOX9 mRNA和蛋白水平均明显高于SOX9 siRNA1组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。SOX9 siRNA1和SOX9 siRNA2成功下调了OSCC细胞中SOX9的转录和表达, 并且前者干扰效果优于后者, 所以选用SOX9 siRNA1做后续实验(图1和表1)。

### 2.2 SOX9 siRNA抑制OSCC细胞克隆形成能力

control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞克隆形成数分别为(95.32±9.63)、(96.94±10.87)、(64.25±7.65)个。siRNA control组细胞克隆形成数与control组相比, 差异无统计学意义; SOX9 siRNA1组细胞克隆形成数明显低于control组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果可见, 下调SOX9可以降低OSCC细胞的克隆形成能力(图2)。



1: control组; 2: siRNA control组; 3: SOX9 siRNA1组; 4: SOX9 siRNA2组。

图1 Western blot测定SOX9 siRNA转染后OSCC细胞中SOX9蛋白的表达

Fig 1 Western blot was used to determine the expression of SOX9 protein in OSCC cells transfected with SOX9 siRNA

表1 各组OSCC细胞中SOX9的表达

组别	SOX9 mRNA	SOX9蛋白
control	1.00	0.84±0.06
siRNA control	1.02±0.09 <sup>#</sup>	0.86±0.07 <sup>#</sup>
SOX9 siRNA1	0.21±0.05 <sup>*</sup>	0.15±0.02 <sup>*</sup>
SOX9 siRNA2	0.36±0.02 <sup>**</sup>	0.29±0.05 <sup>**</sup>

注: 与control组比较, <sup>#</sup> $P > 0.05$ ; 与control组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与SOX9 siRNA1组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 SOX9 siRNA抑制OSCC细胞EMT

Western blot检测结果可见, SOX9 siRNA1组E-cadherin在细胞膜上的表达升高, Vimentin在细胞浆中的表达降低, 说明control、siRNA control组有部分细胞已经发生了EMT, 其细胞形态从多边形逐渐转化为梭形, 而SOX9 siRNA1组细胞形态变化很少, 呈现多边形。siRNA control组细胞中E-cadherin、Vimentin蛋白水平与control组相比, 差异无统计学意义。SOX9 siRNA1组细胞中E-cadherin蛋白水平明显高于control, Vimentin蛋白水平明显低于control组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果可见, 下调SOX9可抑制OSCC细胞EMT(图3和表2)。

### 2.4 SOX9 siRNA抑制OSCC细胞迁移

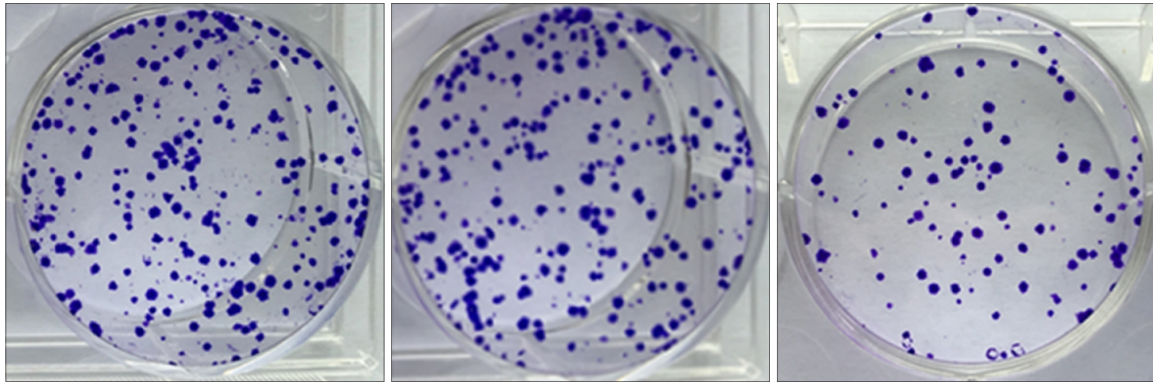
control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞迁移数目分别为(135.64±13.87)、(136.26±10.92)、(95.27±8.22)个。siRNA control组细胞迁移数目与control组相比, 差异无统计学意义。SOX9 siRNA1组细胞迁移数目明显低于control组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果可见, 下调SOX9可抑制OSCC细胞迁移(图4)。

### 2.5 SOX9 siRNA抑制OSCC细胞侵袭

control、siRNA control、SOX9 siRNA1组细胞侵袭数目分别为(104.21±11.08)、(102.95±13.49)、

(76.91±10.76)个。siRNA control组细胞侵袭数目与control组相比,差异无统计学意义。SOX9 siRNA1组细胞侵袭数目明显低于control组,差异有统计学

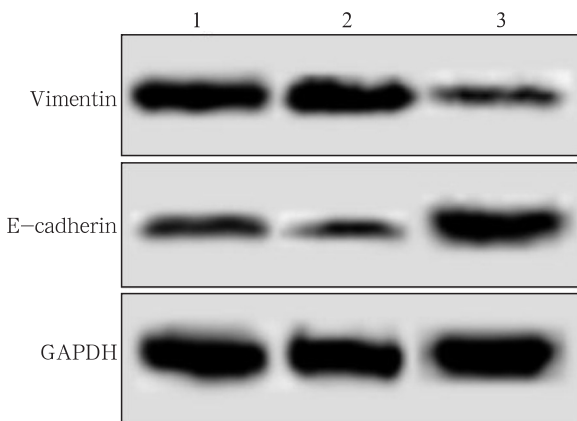
意义 ( $P<0.05$ )。结果可见,下调SOX9可抑制OSCC细胞侵袭(图5)。



从左至右依次为control、siRNA control、SOX9 siRNA1组。

图2 克隆形成实验测定下调SOX9后OSCC细胞克隆形成数目

Fig 2 Clonal formation assay was performed to determine the number of OSCC cells clonal formation after down-regulation of SOX9



1: control组; 2: siRNA control组; 3: SOX9 siRNA1组。

图3 Western blot测定下调SOX9后OSCC细胞中E-cadherin、Vimentin蛋白水平

Fig 3 Western blot was used to determine the protein levels of E-cadherin and Vimentin in OSCC cells after SOX9 down-regulation

表2 各组细胞中E-cadherin、Vimentin蛋白表达

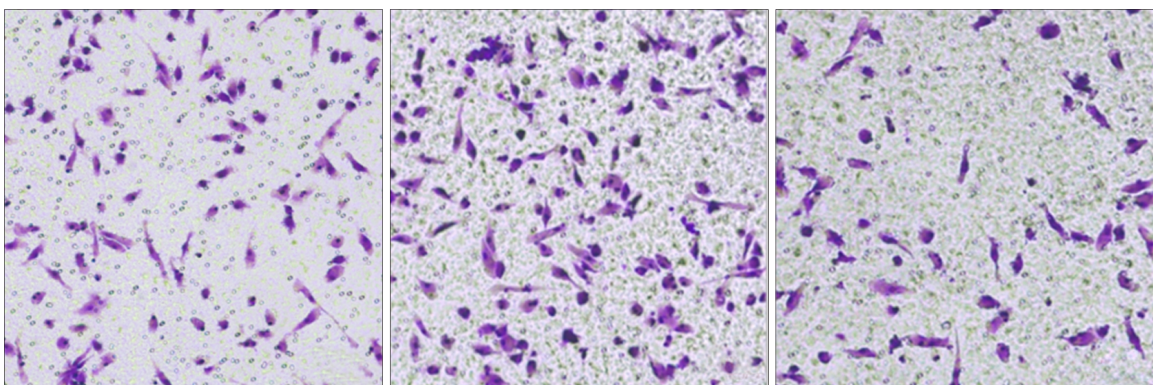
Tab 2 Expression of E-cadherin and Vimentin proteins in cells of each group

组别	E-cadherin	Vimentin
control	0.25±0.06	0.82±0.09
siRNA control	0.22±0.04 <sup>#</sup>	0.84±0.10 <sup>#</sup>
SOX9 siRNA1	0.79±0.05 <sup>*</sup>	0.28±0.06 <sup>*</sup>

注:与control组比较,<sup>#</sup> $P>0.05$ ;与control组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

### 2.6 SOX9 siRNA抑制OSCC细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达

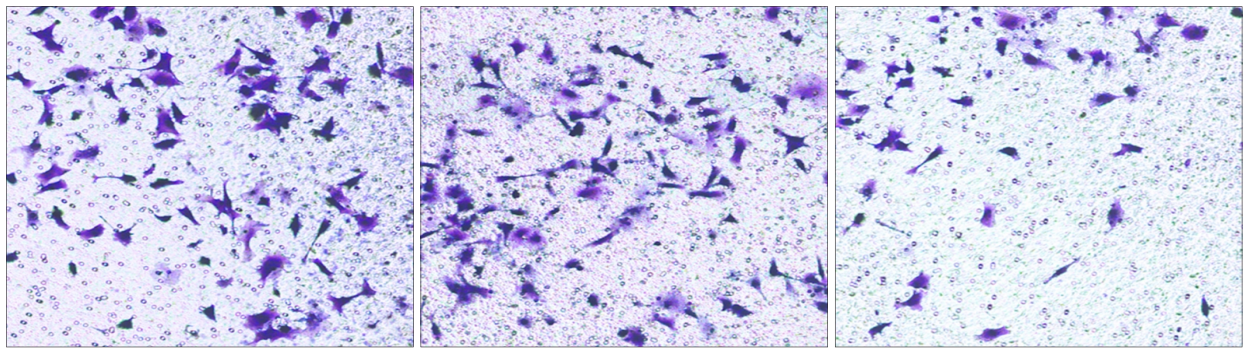
siRNA control组细胞中MMP-2、MMP-9蛋白水平与control组相比,差异无统计学意义。SOX9 siRNA1组细胞中MMP-2、MMP-9蛋白水平明显低于control组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结果可见,下调SOX9可抑制OSCC细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达(图6和表3)。



从左至右依次为control、siRNA control、SOX9 siRNA1组。

图4 Transwell小室测定下调SOX9后OSCC细胞迁移能力 结晶紫染色 ×200

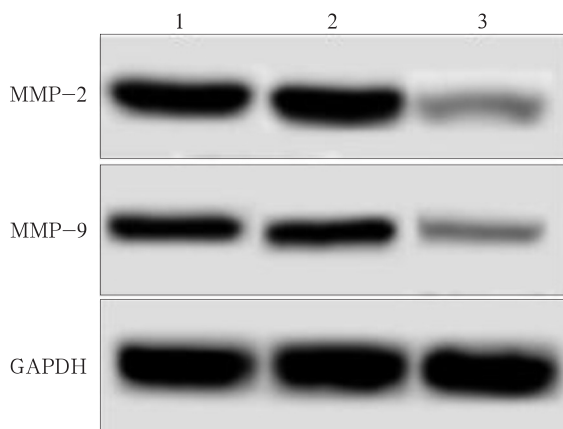
Fig 4 Transwell assay was performed to determine the migration ability of OSCC cells after down-regulation of SOX9 crystal violet dyeing ×200



从左至右依次为control、siRNA control、SOX9 siRNA1组。

图 5 Transwell小室测定下调SOX9后OSCC细胞侵袭能力 结晶紫染色 ×200

Fig 5 Transwell assay was performed to determine the invasion ability of OSCC cells after down-regulation of SOX9 crystal violet dyeing ×200



1: control组; 2: siRNA control组; 3: SOX9 siRNA1组。

图 6 Western blot测定下调SOX9后OSCC细胞中MMP-2、MMP-9水平

Fig 6 Western blot was used to determine the MMP-2 and MMP-9 levels in OSCC cells after down-regulation of SOX9

表 3 各组细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达

Tab 3 Expression of MMP-2 and MMP-9 proteins in cells of each group  $\bar{x} \pm s$

组别	MMP-2	MMP-9
control	0.81±0.09	0.48±0.04
siRNA control	0.80±0.11 <sup>#</sup>	0.49±0.06 <sup>#</sup>
SOX9 siRNA1	0.35±0.04 <sup>*</sup>	0.30±0.05 <sup>*</sup>

注: 与control组比较, <sup>#</sup> $P>0.05$ ; 与control组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

SOX9基因有3个保守的转录因子区域, 定位在染色体17q24, 其可以弯曲并结合DNA高迁移率区域, 是SOX转录因子家族中的一员, 在生命机体的发育中具有调控作用<sup>[7]</sup>。SOX9发现于性别反转的疾病中, 与性腺的发育有关, 在早期的胚胎发育、细

胞的分化中有重要作用, 在软骨的形成、神经系统发育、性别分化、心脏发育等中具有不可或缺的生理功能<sup>[8-10]</sup>。SOX9异常表达与人类的多种疾病发生有关, 在诸多肿瘤如肺癌、黑色素瘤等中表达, 并且与肿瘤的病理变化有关<sup>[11]</sup>。多个研究<sup>[12-14]</sup>报道显示, SOX9的表达与肿瘤细胞的生长有关, 是一个重要的肿瘤生长调控因子, 其表达水平降低后, 可以抑制肿瘤细胞皮下移植瘤的生长, 并且可以在体外降低直肠癌、宫颈癌等癌细胞的增殖能力。本实验结果显示, SOX9表达下调后OSCC细胞的克隆形成能力降低, 说明SOX9下调可以抑制OSCC细胞的生长。

肿瘤的转移是肿瘤引起死亡的重要原因, 其浸润和转移程度往往与预后有关, 是一个极为复杂的过程。肿瘤的转移与肿瘤细胞的EMT有关, EMT过程与上皮标志物E-cadherin表达下调和间质标志物Vimentin表达上调有关<sup>[15-16]</sup>。研究<sup>[17-18]</sup>显示, E-cadherin在肿瘤组织中表达下调, 而Vimentin在肿瘤组织中过度表达, 二者表达水平的高低可间接反应肿瘤细胞EMT水平。在胶质瘤细胞中过表达SOX9后, 细胞中E-cadherin表达水平下降, Vimentin表达水平升高, 细胞的迁移能力升高<sup>[19]</sup>。本实验显示, 下调SOX9后OSCC细胞呈现多边形, 并且细胞中E-cadherin表达增多, Vimentin表达降低, 表明下调SOX9可以抑制OSCC细胞EMT, SOX9可能参与肿瘤侵袭过程。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是一个多步骤、多因素共同参与的复杂过程, 肿瘤细胞可通过产生蛋白酶分解细胞外基质, 使肿瘤细胞突破组织屏障, 进入到淋巴管和微血管中, 转移至邻近组织和器官<sup>[20]</sup>。MMPs可以降解细胞外基质的几乎所有成分, 是一种重要的肿瘤转移相关蛋白酶家族, 其含有多个蛋白成员, 其中MMP-2和MMP-9是研究较为深入的与肿瘤转移有关的蛋白酶, 在肿瘤组织中高表达, 表

达水平升高可以促进肿瘤细胞的侵袭和迁移<sup>[21]</sup>。本实验结果显示,下调SOX9后OSCC细胞的侵袭和迁移能力均降低,并且细胞中MMP-2、MMP-9蛋白水平降低,表明下调SOX9后可以通过降低MMP-2和MMP-9的表达抑制OSCC细胞的迁移和侵袭。

综上所述,本实验结果表明SOX9下调可以减弱OSCC细胞侵袭、迁移和克隆形成能力,抑制细胞EMT,SOX9是一种癌基因,参与肿瘤的转移,对于其在信号通路转导中的作用还需要进一步探讨。本实验为靶向基因治疗OSCC提供了思路,对于研究SOX9在肿瘤中的作用具有重要意义。

### [参考文献]

- [1] Sahu A, Nandakumar N, Sawant S, et al. Recurrence prediction in oral cancers: a serum Raman spectroscopy study [J]. *Analyst*, 2015, 140(7): 2294-2301.
- [2] Zhang H, Cai K, Wang J, et al. MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway[J]. *Stem Cells*, 2015, 32(11): 2858-2868.
- [3] Sun L, Mathews LA, Cabarcas SM, et al. Epigenetic regulation of SOX9 by the NF- $\kappa$ B signaling pathway in pancreatic cancer stem cells[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(8): 1454-1466.
- [4] Chen W, Zhao W, Zhang L, et al. MALAT1-miR-101-SOX9 feedback loop modulates the chemo-resistance of lung cancer cell to DDP via Wnt signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 94317-94329.
- [5] Wang H, Leav I, Ibaragi S, et al. SOX9 is expressed in human fetal prostate epithelium and enhances prostate cancer invasion[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6):1625-1630.
- [6] Nantajit D, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(10): 1697-1713.
- [7] Kim GJ, Sock E, Buchberger A, et al. Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development [J]. *J Med Genet*, 2015, 52(4): 240-247.
- [8] Xia S, Feng Z, Qi X, et al. Clinical implication of Sox9 and activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1): 358.
- [9] Liu N, Zhang L, Wang Z, et al. MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion of human glioblastoma by targeting SOX9[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19244-19254.
- [10] Vetro A, Dehghani MR, Kraoua L, et al. Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3[J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(8): 1025-1032.
- [11] Li Z, Li B, Niu L, et al. miR-592 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SOX9[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 297-304.
- [12] Wu JH, Liang XA, Wu YM, et al. Identification of DNA methylation of SOX9 in cervical cancer using methylated-CpG island recovery array[J]. *Oncol Rep*, 2013, 19(1): 125-132.
- [13] 吴珊. SOX9基因沉默对大肠癌细胞系生物学行为的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.  
Wu S. Effects of SOX9 gene silencing on biological behavior of colorectal cancer cell lines[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [14] Res C. Correction: miR145 targets the SOX9/ADAM17 axis to inhibit tumor-initiating cells and IL6-mediated paracrine effects in head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(13): 2761.
- [15] Attramadal CG, Kumar S, Boysen ME, et al. Tumor budding, EMT and cancer stem cells in T1-2/N0 oral squamous cell carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(11): 6111-6120.
- [16] Natsuzaka M, Whelan KA, Kagawa S, et al. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1758.
- [17] Lu MH, Huang CC, Pan MR, et al. Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(23): 6416-6425.
- [18] Palen K, Weber J, Dwinell MB, et al. E-cadherin re-expression shows *in vivo* evidence for mesenchymal to epithelial transition in clonal metastatic breast tumor cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43363-43375.
- [19] Liu H, Liu Z, Jiang B, et al. SOX9 overexpression promotes glioma metastasis via Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(1): 205-212.
- [20] Wu SH, Hsiao YT, Kuo CL, et al. Bufalin inhibits NCI-H460 human lung cancer cell metastasis *in vitro* by inhibiting MAPKs, MMPs, and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(6): 1247-1264.
- [21] Li W, Li S, Deng L, et al. Decreased MT1-MMP in gastric cancer suppressed cell migration and invasion via regulating MMPs and EMT[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(9): 6883-6889.