

. 实验研究 .

FOXC2 过表达通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进胶质瘤 U87 细胞增殖、迁移

潘 轲 向春晖 周 龙 汪 遼 王国堰

【摘要】目的 探讨 FOXC2 过表达对胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭、迁移的影响及其机制。**方法** 体外培养人脑胶质瘤 U87 细胞和人脑胶质细胞 HEB。U87 细胞随机分为空白组(未转染任何质粒)、空载体组(转染 pcDNA3.1 空载体质粒)、FOXC2 过表达组(转染 pcDNA3.1-FOXC2 过表达质粒)、FOXC2+抑制剂组[转染 pcDNA3.1-FOXC2 质粒+Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 FH535 (20 μ mol/L)]。采用 qRT-PCR 和免疫印迹法检测 mRNA 和蛋白表达;CCK-8 法检测细胞增殖活性,克隆形成实验分析细胞克隆形成能力;Transwell 小室实验检测细胞侵袭和迁移能力。**结果** 与 HEB 细胞比较,U87 细胞 FOXC2 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$)。FOXC2 过表达,显著促进 U87 细胞增殖、侵袭、迁移($P < 0.05$),显著增加 Vimentin、Wnt1、 β -catenin 蛋白表达水平以及细胞克隆形成率($P < 0.05$),显著降低 E-cadherin 蛋白表达水平($P < 0.05$)。抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,显著抑制 FOXC2 过表达对 U87 细胞的作用($P < 0.05$)。**结论** FOXC2 过表达可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 U87 细胞发生上皮间质转化,从而增加胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭、迁移能力。

【关键词】 胶质瘤;U87 细胞;FOXC2;细胞增殖;细胞侵袭;细胞迁移;Wnt/ β -catenin 信号通路

【文章编号】 1009-153X(2021)04-0266-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

FOXC2 overexpression promotes proliferation, invasion and migration of glioma U87 cells via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway

PAN Ke, XIANG Chun-hui, ZHOU Long, WANG Wei, WANG Guo-zhen. Department of Neurosurgery, Enshi Tujia And Miao National Center Hospital, Enshi 445000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of FOXC2 overexpression on the proliferation, invasion and migration of glioma U87 cells. **Methods** The human glial cells HEB and glioma U87 cells were cultured in vitro. The U87 cells were randomly divided into four groups, i.e., blank group (without transfection of plasmid), FOXC2-NC group (transfection of pcDNA3.1-FOXC2 negative plasmid), FOXC2-overexpression group (transfection of pcDNA3.1-FOXC2 mimics), inhibition group (transfection of pcDNA3.1-FOXC2 mimics+inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling pathway). The mRNA and protein expression levels were detected by qRT-PCR and western blotting, respectively. CCK-8 method, clone formation experiment, and Transwell cell experiment were used to detect cell proliferation, invasion, and migration abilities. **Results** Compared with HEB cells, the mRNA expression level of FOXC2 in U87 cells significantly increased ($P < 0.05$). FOXC2 overexpression significantly promoted the abilities of U87 cell proliferation, invasion and migration ($P < 0.05$), significantly increased the protein expression level of Vimentin, Wnt1, and β -catenin, and the cell clone formation rate ($P < 0.05$), and significantly reduced E-cadherin protein expression levels ($P < 0.05$). Inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway significantly inhibited the effect of FOXC2 overexpression on the U87 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Overexpression of FOXC2 can promote epithelial-mesenchymal transition in the glioma U87 cells through the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway, thereby increasing the proliferation, invasion and migration abilities of glioma U87 cells.

【Key words】 Glioma; U87 cell; FOXC2; Proliferation; Migration; Wnt/ β -catenin signaling pathway

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,即使采用手术联合放化疗等综合治疗,预后仍不理想^[1,2]。随着分子生物学和基因组学的发展,胶质瘤靶向治疗已成为研究的热点。叉头框(forkhead box,

FOX)基因家族是细胞内重要的转录因子,与肿瘤的发生、发展密切相关^[3,4]。FOXC2是FOX基因家族成员,在肿瘤细胞生长和转移过程中发挥着重要作用^[5,6]。近年来,FOXC2被证实胶质瘤组织中异常高表达,且在胶质瘤细胞增殖和侵袭过程中发挥着重要的促进作用^[7],但机制尚不明确。本研究探讨 FOXC2 对 U87 细胞增殖、侵袭、迁移、上皮间质转化等影响及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、分组与转染 将人脑胶质瘤 U87 细胞(中科院上海细胞库)与人胶质细胞 HEB 细胞(美国 ATCC 公司)接种至含 10% 胎牛血清的 1 640 培养基(美国 Gibco 公司)培养。将 U87 细胞分为空白组(未转染任何质粒)、空载体组(转染 pcDNA3.1 空载体质粒)、FOXC2 过表达组(转染 pcDNA3.1-FOXC2 过表达质粒, 维真生物公司)、FOXC2+抑制剂组[转染 pcDNA3.1-FOXC2 质粒后给予浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ FH535(上海翊圣生物科技有限公司)处理 24 h]。取对数生长期 U87 细胞培养至 75% 融合度时, 参照脂质体 2000 说明书(美国 Invitrogen 公司), 将 pcDNA3.1-FOXC2 过表达质粒及 pcDNA3.1 空载体质粒分别转染至 FOXC2 过表达组和空载体组细胞中, 转染 48 h 后, 收集各组细胞进行后续实验。

1.2 qRT-PCR 检测 FOXC2 mRNA 的表达 加入 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA, 参照 RNA 逆转录试剂盒说明书(美国 Invitrogen 公司)进行逆转录, 将逆转录产物 cDNA 作为模板, 根据上海生工生物公司合成的 FOXC2 引物(正向 5'-TGAGCCCCAGA ACTGAGAAG-3', 反向 5'-GCGC-TACTACTGACATT GGAG-3')、内参 GAPDH 引物(正向 5'-CTCCTGGAAG ATGGTGATGGG-3', 反向 5'-GTCAACGGATTTGG TCGTATTG-3')进行扩增(美国罗氏公司)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 FOXC2 mRNA 的表达水平。实验重复 3 次。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力 收集各组细胞悬液, 每孔 100 μl (浓度为 3×10^5 个/ml) 接种至 96 孔板, 每组设 3 个复孔。培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 试剂(上海碧云天公司) 10 μl 培养 4 h, 使用酶标仪检测 490 nm 吸光度值。细胞存活率(%)=(实验孔吸光度值/对照孔吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.4 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 收集各组细胞, 消化制成浓度为 10^5 个/ml 单细胞悬液, 并以每孔 100 μl 接种至 6 孔板培养 12~14 d。待出现肉眼可见克隆时, 停止培养。弃上清后, 使用磷酸缓冲液洗涤细胞。采用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 加入 0.1% 结晶紫染色 10 min, 空气干燥。低倍镜下统计大于 15 个细胞的有效克隆数。克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 小室实验检测细胞侵袭和迁移能力 将 Matrigel 基质胶(美国 BD 公司)包被(侵袭)或不包被(迁移)的 Transwell 小室放至 24 孔细胞板中, 上室

内加入含 10^5 个细胞的细胞液, 每组设置 3 个复孔; 下室内加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 1 640 培养液。培养 24 h 后, 将小室取出。经磷酸缓冲液洗涤细胞后, 使用棉签小心拭去滤膜上残留的细胞, 分别加入 4% 多聚甲醛和 0.5% 结晶紫进行固定与染色, 时间均为 15 min。显微镜下随机选取 3 个视野观察穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.6 免疫印迹法检测 FOXC2、E-cadherin、Vimentin、Wnt1 和 β -catenin 蛋白的表达 以 RIPA 蛋白裂解液裂解(上海碧云天公司)各组细胞总蛋白, 参照 BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司)说明书进行定量。将蛋白样品与 2 \times Loading buffer 等体积混匀后, 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中煮沸 5 min。将蛋白样品按照每孔 50 μg 上样至 12% SDS-PAGE 凝胶孔中进行电泳分离。待分离结束后, 转至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。使用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温下封膜 1 h 后, 加入 FOXC2 (1:500; 美国 Santa Cruz 公司)、E-cadherin (1:800; 美国 Abcam 公司)、Vimentin (1:1 000; 美国 Abcam 公司)、Wnt1 (1:1 000; 美国 Abcam 公司)、 β -catenin (1:1 000; 美国 Abcam 公司)和 GAPDH (1:1 000; 美国 Santa Cruz 公司)一抗工作液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。加入辣根过氧化物酶标记的二抗工作液 (1:2 000; 北京中杉金桥生物公司)室温孵育 1 h。参照 ECL 发光试剂盒(美国 Millipore 公司)说明书显影曝光后, 采用凝胶成像系统以 GAPDH 为内参分析目的蛋白的表达量。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件分析; 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析和 SNK-q、t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤 U87 细胞 FOXC2 的表达量 胶质瘤 U87 细胞 FOXC2 mRNA 表达量 (2.36 ± 0.32) 明显高于 HEB 细胞 (1.00 ± 0.02 ; $P < 0.001$)。

2.2 转染效果 与空白组相比, FOXC2 过表达组细胞 FOXC2 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 而空载体组 FOXC2 mRNA 和蛋白表达水平无明显变化 ($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

2.3 FOXC2 过表达对胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 与空白组相比, FOXC2 过表达组 U87 细胞存活率、克隆形成率、侵袭和迁移细胞数均明显升高 ($P < 0.05$), 而空载体组与空白组均无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 FOXC2 过表达对胶质瘤 U87 细胞上皮间质转化

的影响 与空白组相比,FOXC2 过表达组 E-cadherin 表达水平明显降低, Vimentin 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。而空载体组与空白组均无统计学差异($P>0.05$)。见图 2。

2.5 FOXC2 过表达对胶质瘤 U87 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 与空白组相比,FOXC2 过表达组细胞 Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。而空载体组与空白组均无统计学差异($P>0.05$)。见图 3。

2.6 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对 FOXC2 过表达胶质瘤 U87 细胞增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化的影响 与空白组相比,FOXC2 过表达组 U87 细胞存活率、克隆形成率、侵袭细胞数、迁移细胞数和 Vimentin 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),而 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与 FOXC2 过表达组相比,FOXC2+抑制剂组 U87 细胞存活率、克隆形成率、侵袭细胞数、迁移细胞数和 Vimentin 蛋白表达水平均明显降低,而 Wnt1、 β -catenin 和 E-cadherin 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)。见图 4、表 3。

3 讨论

FOXC2 定位于染色体 16q24.1 上,调控细胞上皮间质转化、细胞代谢和胚胎发育等过程,其突变或异常表达是导致肿瘤形成的重要机制之一^[8]。Gozo 等^[9]发现 FOXC2 可通过调控下游靶基因 CXCR4 表达,增强骨肉瘤细胞增殖和侵袭。He 等^[10]发现,FOXC2 可通过激活 AKT/GSK3 β 信号通路促进非小细胞肺癌细胞上皮间质转化,增强肿瘤细胞对顺铂的抵抗性。饶习敏等^[11]报道上调 FOXC2 表达可促进肺腺癌 A549 细胞的恶性增殖、侵袭与迁移。本研究发现,U87 细胞 FOXC2 过表达后细胞增殖、侵袭能力明显增强。这与 Li 等^[7]研究结果相吻合。此外,本研究还发现,FOXC2 过表达的 U87 细胞克隆形成能力、迁移能力以及间充质标志物 Vimentin 蛋白表达水平均明显升高,而上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低。这表明,FOXC2 过表达可促进胶质瘤 U87 细胞增殖、迁移和上皮间质转化。

Wnt1 和 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的信号分子和关键因子,分别在胞内和胞外信号传导中发挥重要作用^[12]。Wnt/ β -catenin 信号通路与胶质瘤的发生、发展密切相关^[13]。Liu 等^[14]报道,Wnt/ β -catenin 信号通路是在胶质瘤中异常激活,Wnt1 在胶质瘤组织中高表达,且与 Cyclin D1 蛋白的表达水平

表 1 FOXC2 过表达对 U87 细胞 FOXC2 mRNA 表达的影响

组别	FOXC2 mRNA
对照组	1.00±0.11
空载体组	0.97±0.09
FOXC2 过表达组	4.76±0.48*

注:与对照组和空载体组相比,* $P<0.05$

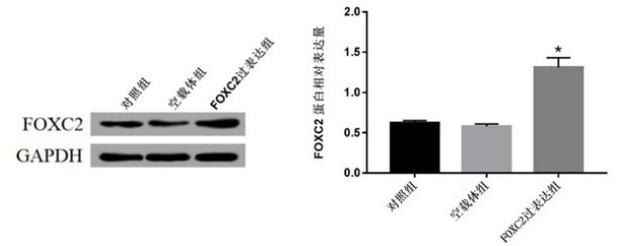


图 1 FOXC2 过表达对 U87 细胞 FOXC2 蛋白表达的影响 与对照组和空载体组相比,* $P<0.05$

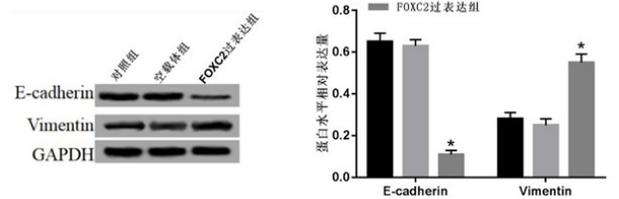


图 2 FOXC2 过表达对 U87 细胞上皮间质转化标志蛋白表达的影响

与对照组和空载体组相比,* $P<0.05$

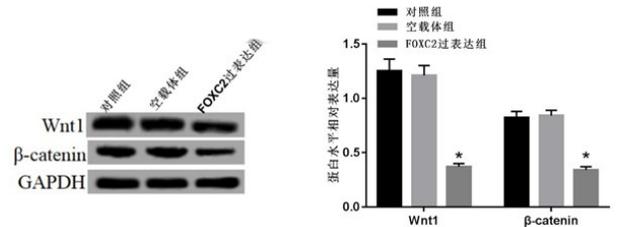


图 3 FOXC2 过表达对 U87 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达的影响

与对照组和空载体组相比,* $P<0.05$

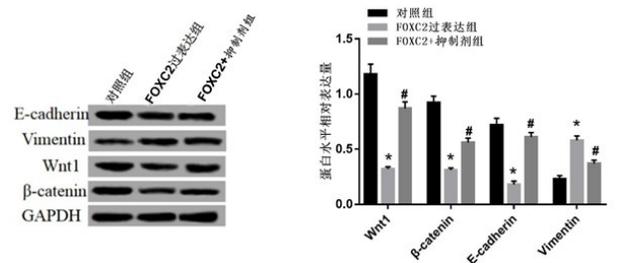


图 4 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对 U87 细胞 FOXC2 过表达的影响

与对照组相比,* $P<0.05$;与过表达组相比,# $P<0.05$

表 2 各组细胞增殖率、克隆形成率、侵袭细胞数、迁移细胞数比较

组别	细胞增殖率(%)	克隆形成率(%)	侵袭细胞数(个)	迁移细胞数(个)
对照组	96.46±5.02	28.25±2.12	82.65±5.16	122.36±7.25
空载体组	98.25±5.54	26.58±2.36	85.32±5.50	119.85±6.68
FOXC2 过表达组	128.68±7.35*	42.05±3.51*	116.28±7.12*	142.64±8.75*
FOXC2+抑制剂组	116.38±6.15*#	33.36±2.53*#	102.48±5.52*#	127.48±6.02*#

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与过表达组相比,# $P<0.05$

显著相关, β -catenin 在细胞质中积累,并且在大多数侵袭性胶质瘤中明显核表达。赵贤军等^[15]研究发现,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可抑制脑胶质瘤 U251 细胞增殖和迁移。Cui 等^[16]研究指出,胰腺导管癌中上调的 FOXC2 可通过激活 β -catenin/TCF 信号来促进肿瘤细胞生长和迁移。尤武林等^[17]研究指出,过表达 FOXC2 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进人骨髓间充质干细胞成骨分化。本研究发现,FOXC2 过表达的 U87 细胞 Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达水平均明显升高。同时,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,FOXC2 过表达对 U87 细胞增殖、克隆形成、侵袭、迁移和上皮间质转化的促进作用均得到部分逆转。这提示,FOXC2 可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进胶质瘤细胞增殖和转移。

综上所述,FOXC2 在胶质瘤细胞增殖和转移过程中发挥着重要的促进作用,而 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活是其致瘤的重要机制之一。

【参考文献】

- [1] Bush NAO, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma [J]. *Neurosurg Rev*, 2017, 40(1): 1-14.
- [2] 刘艳,许路. miRNA 在神经胶质瘤中作用的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(11): 105-109.
- [3] 李晞璠,陈吉. 叉头框(FOX)基因家族的概述及进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(52): 79-80.
- [4] Wang J, Li W, Zhao Y, et al. Members of FOX family could be drug targets of cancers [J]. *Pharmac Therap*, 2018, 181: 183-196.
- [5] Agnihotri NS, Astekar M. The role of novel prognostic markers PROX1 and FOXC2 in carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Therap Oncol*, 2018, 12: 171.
- [6] Wang J, Yue X. Role and importance of the expression of transcription factor FOXC2 in cervical cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6627-6631.
- [7] Li W, Fu X, Liu R, et al. FOXC2 often overexpressed in glioblastoma enhances proliferation and invasion in glioblastoma cells [J]. *Oncol Res Feat Preclin Clin Cancer Therap*, 2013, 21(2): 111-120.
- [8] Wang T, Zheng L, Wang Q, et al. Emerging roles and mechanisms of FOXC2 in cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 479: 84-93.
- [9] Gozo MC, Jia D, Aspuria PJ, et al. FOXC2 augments tumor propagation and metastasis in osteosarcoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(42): 68792.
- [10] He Y, Xie H, Yu P, et al. FOXC2 promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Chemotherap Pharmacol*, 2018, 82(6): 1049-1059.
- [11] 饶习敏,邢时云,欧阳瑶. FOXC2 对肺腺癌细胞恶性增殖及侵袭迁移能力的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6033-6035.
- [12] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169: 985.
- [13] Tan Z, Song L, Wu W, et al. TRIM14 promotes chemoresistance in gliomas by activating Wnt/ β -catenin signaling via stabilizing Dvl2 [J]. *Oncogene*, 2018, 37(40): 5403-5415.
- [14] Liu C, Tu Y, Sun X, et al. Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations [J]. *Clin Exp Med*, 2011, 11(2): 105-112.
- [15] 赵贤军,康 暉,袁国强,等. Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂对脑胶质瘤细胞迁移的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(18): 4474-4476.
- [16] Cui L, Dang S, Qu J, et al. FOXC2 is up-regulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(7): 8579-8585.
- [17] 尤武林,王建伟,黄桂成,等. 过表达插头框转录因子 C2 经 Wnt 信号通路调节 BMSCs 成骨分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(10): 1276-1281.

(2019-09-29 收稿, 2020-07-11 修回)