

. 实验研究 .

# FOXC2 过表达通过激活 Wnt/ $\beta$ -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 逵 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/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制剂 FH535 (20  $\mu$ 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、 $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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  $\beta$ -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/ $\beta$ -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/ $\beta$ -catenin signaling pathway, thereby increasing the proliferation, invasion and migration abilities of glioma U87 cells.

**【Key words】** Glioma; U87 cell; FOXC2; Proliferation; Migration; Wnt/ $\beta$ -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<sup>[1,2]</sup>。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<sup>[3,4]</sup>。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<sup>[5,6]</sup>。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<sup>[7]</sup>,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-TACACTGACATT 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  $\mu\text{l}$  (浓度为  $3\times 10^5$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\beta$ -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  $\mu\text{g}$  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)、 $\beta$ -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 ( $2.36\pm 0.32$ ) 明显高于 HEB 细胞 ( $1.00\pm 0.02$ ;  $P<0.001$ )。

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/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响 与空白组相比,FOXC2 过表达组细胞 Wnt1 和  $\beta$ -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/ $\beta$ -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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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<sup>[8]</sup>。Gozo 等<sup>[9]</sup>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<sup>[10]</sup>发现,FOXC2 可通过激活 AKT/GSK3 $\beta$  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<sup>[11]</sup>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<sup>[7]</sup>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  $\beta$ -catenin 是 Wnt/ $\beta$ -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<sup>[12]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与胶质瘤的发生、发展密切相关<sup>[13]</sup>。Liu 等<sup>[14]</sup>报道,Wnt/ $\beta$ -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,\* $P<0.05$

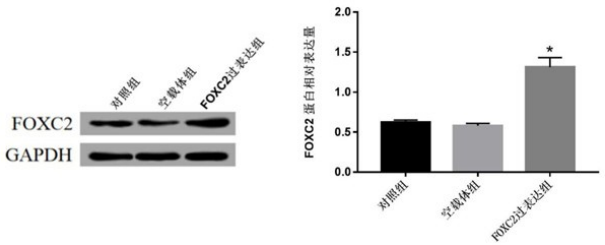


图 1 FOXC2 过表达对 U87 细胞 FOXC2 蛋白表达的影响 与对照组和空载体组相比,\* $P<0.05$

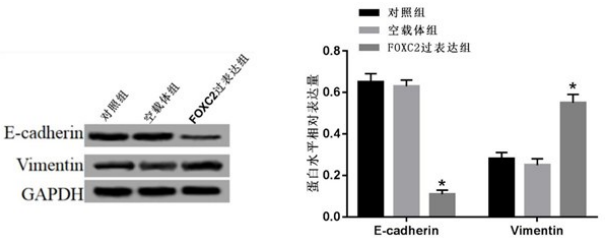


图 2 FOXC2 过表达对 U87 细胞上皮间质转化标志蛋白表达的影响 与对照组和空载体组相比,\* $P<0.05$

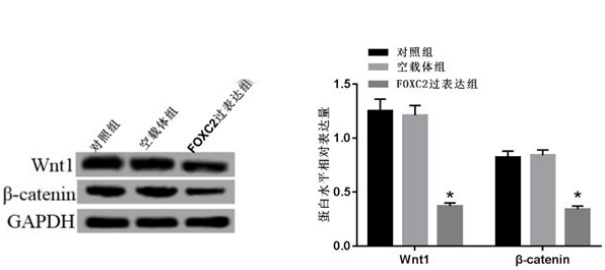


图 3 FOXC2 过表达对 U87 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白表达的影响 与对照组和空载体组相比,\* $P<0.05$

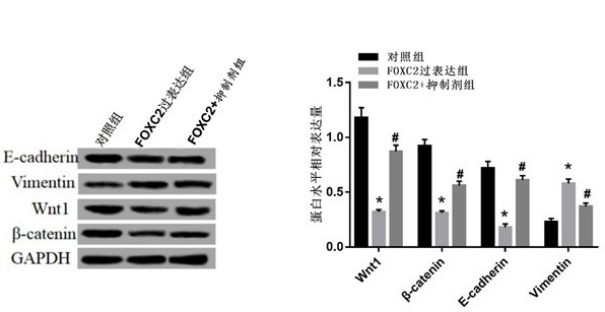


图 4 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对 U87 细胞 FOXC2 过表达的影响 与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与过表达组相比,# $P<0.05$

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<sup>[15]</sup>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<sup>[16]</sup>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<sup>[17]</sup>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癌的重要机制之一。

【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 晔,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)