

FOXP2 调控 PI3K/Akt 信号通路抑制胶质瘤的侵袭

徐 然,仇文进,陈正新,冯 爽,蔡小敏,王慧博,刘 宁*

(南京医科大学第一附属医院神经外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨叉头框 P2 基因(FOXP2)对胶质细胞瘤细胞侵袭的影响。方法:采用荧光定量 PCR 技术与 Western blot 分别检测 FOXP2 在正常星型胶质细胞与胶质瘤细胞中的核糖核酸与蛋白表达水平。用携带 FOXP2 基因慢病毒质粒转染胶质瘤细胞 U87 和 U251 细胞系,通过划痕实验、Transwell 侵袭实验和 Western blot 观察其对胶质瘤细胞侵袭性以及 PI3K、Akt 蛋白的影响。结果:FOXP2 的表达在胶质瘤细胞 U87 和 U251 中明显低于正常星型胶质细胞。上调 FOXP2 后,胶质瘤细胞 U87 和 U251 细胞侵袭性明显降低,Akt 与 PI3K 表达明显降低。结论:FOXP2 通过调控 PI3K/Akt 通路可以在一定程度上抑制胶质瘤细胞的侵袭能力,从而延缓胶质瘤的发生发展。

[关键词] 胶质瘤;FOXP2;PI3K/Akt;侵袭;迁移

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-0559-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170508

FOXP2 inhibits GBM cell invasion and migration through regulating PI3K/Akt pathway

Xu Ran, Qiu Wenjin, Chen Zhengxin, Feng Shuang, Cai Xiaomin, Wang Huibo, Liu Ning

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore Forkhead box P2 (FOXP2) expression in GBM cell and its effect on invasion and migration of U87 and U251 GBM cells. **Methods:** RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of FOXP2 in NHA and GBM cells. pEGFP-FOXP2 was constructed according to the manufacturer's instructions and transfected into U87 and U251 cells. Wound healing assay and Transwell assay were used to test the invasion and migration ability of GBM cells. The changes of PI3K, Akt proteins was detected by Western blot. **Results:** The expression of FOXP2 was decreased in GBM cells both in mRNA and protein levels. The overexpression of FOXP2 significantly decreased the ability of invasion and migration of GBM cells and reduced the expression of PI3K and Akt proteins. **Conclusion:** FOXP2 is reduced in GBM cells and upregulating FOXP2 could increase invasion and migration of GBM cells through PI3K/Akt pathway, indicating that FOXP2 may serve as a tumor suppresser, which inhibits invasion of tumor cells during the development of GBM.

[Key words] GBM; FOXP2; PI3K/Akt; invasion; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):559-563]

胶质瘤是成人脑肿瘤中常见并且致命的肿瘤^[1-2],尽管近年来手术切除、术后放化疗的治疗手段不断进步,患者的生存率仍然较低,寻找胶质瘤基因机制及新的治疗方法一直备受关注^[3]。叉头框 P2 基因(FOXP2)是叉头框基因家族成员之一,与其他叉头框基因拥有一个共同的 DNA 结合蛋白序列^[4]。FOXP2 基因在语言发展和神经发展方面起到重要作用^[5],过去研究表明了 FOXP2 基因在结肠癌、卵

巢、肝脏、肠和大脑中高表达^[6],最近发现 FOXP2 在前列腺癌发生发展中发挥重要作用^[7],但是在胶质瘤中却未见报道。本研究以胶质母细胞瘤为研究对象,利用 FOXP2 调控其靶点 PI3K/Akt 信号通路,观察其对胶质瘤细胞侵袭与迁移能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人脑胶质瘤细胞系 U87 和 U251(上海中科院细胞库),正常星型胶质细胞 NHA(北京神经外科研究所),DMEM 高糖培养基(南京凯基公司),胎牛血清(Science cell 公司,美国)。RNA 提取试剂 TRIzol,转染试剂 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司,美国),

[基金项目]国家自然科学基金(81201978);江苏省科技厅基础研究计划(BK2012483)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:hbwang@njmu.edu.cn

pCMV-VSV-G 慢病毒载体 (上海吉满公司), Transwell 小室 (Corning 公司, 美国), Matrigel (BD 公司, 美国), DMSO (Sigma 公司, 美国), 蛋白提取试剂盒, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, Western blot 凝胶配制试剂盒 (上海碧云天公司), α -tubulin 一抗, FOXP2 一抗, Akt 一抗, PI3K 一抗 (CST 公司, 美国), 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗 (北京中山金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-FOXP2 质粒构建

慢病毒质粒 (pCMV-VSV-G) 由上海吉满公司提供。按照说明书用 RT-PCR 扩增 FOXP2 序列, PCR 引物设计: FOXP2 mRNA 的序列设计, 上游 5'-CACGCATTGGATGACCGAAG-3', 下游 5'-A-GACGTTCCGCTTCTTTAGAAA-3', 纯化 FOXP2 cDNA 并克隆到 pEGFP-C1 载体中获得 pEGFP-FOXP2 的重组质粒, 空载质粒为 VE-FOXP2。

1.2.2 细胞培养和转染

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 U87 和 U251 细胞系, 培养箱温度 37°C, CO₂ 浓度 5%, 每 3 d 传代 1 次, 在细胞对数生长期进行实验, 在 6 孔板中以每孔 3×10⁵ 个细胞接种。将 pEGFP-FOXP2 质粒组和 VE-FOXP2 空载组分别与 Lipofectamine2000 混合于 Opti-MEM 中, 得到转染物处理组混合物和对照组混合物, 24 h 后换用含 400 mg/L G418 的完全培养基筛选, 3 周后选出抗性克隆株继续扩大培养, 用蛋白提取试剂盒提取蛋白, Western blot 检测 FOXP2 蛋白表达水平。

1.2.3 RNA 提取与 qPCR 分析

获取胶质瘤组织与正常脑组织, 用 TRIzol 试剂提取法按照说明书分别提取 RNA, 再利用分光光度计检测 RNA 的浓度和质量, 逆转录 mRNA 为 cDNA, 逆转录后加入 FOXP2 及内参 β -actin 引物, 引物设计如下: 人 β -actin 上游 5'-TGGAGAAAATCTGGCACCAC-3', 下游 5'-GATGATGCCTCGTTCTAC-3'; FOXP2 上游 5'-AATCTGCGACAGAGACA-ATAAGC-3', 下游 5'-TCCACTTGTGCTGCTGTA-3'。置于 ABI7300 梯度 PCR 仪中进行序列扩增, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 FOXP2 的相对表达量, 每个样品均重复实验 3 次。

1.2.4 Western blot

根据蛋白提取试剂盒说明书, 用 RIPA 蛋白裂解液提取对照组与转染物处理组的 U87 和 U251 细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后加入上样缓冲液并煮沸 5 min, 配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 每孔蛋白上

样量为 30 μ g, 120 V 恒压电分离蛋白, 300 mA 恒流 2 h 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 37°C 条件下封闭 2 h, 4°C 一抗孵育过夜, 常温下二抗孵育 2 h, 化学发光法曝光显影。

1.2.5 划痕实验

6 孔板中每孔种植 3×10⁵ 个细胞, 用枪头尖端在培养皿细胞层划痕, PBS 洗 3 次, 取出划下的细胞, 加入无血清培养基。将 6 孔板放入 37°C、5% CO₂ 培养箱培养, 分别按 0、48 h 取样, 拍照, 实验均独立重复 3 次。

1.2.6 Transwell 小室侵袭实验

将 Transwell 培养板直接放入 37°C 培养箱, 或铺基质胶后放入 37°C 培养箱预热 1 h, 用胰蛋白酶消化液消化处理组和对照组的 U87 和 U251 细胞, 用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 再用无血清培养基重悬细胞并计数。在每个 Transwell 室内铺 2×10⁴ 个细胞, 并用无血清培养基补齐每小室至总体积 200 μ L。24 孔板下室加入 500 μ L 含 10% FBS 的培养基。37°C 培养箱中培养 24 h。取出小室, 10% 甲醛固定 20 min, 结晶紫染色 20 min, 显微镜下观察、计数, 每个样本随机计数 10 个视野, 并计算平均值。实验均独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 进行统计学数据分析, 计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXP2 在胶质瘤细胞系中低表达

通过 5 例正常脑组织与 74 例胶质母细胞瘤 RT-qPCR 发现, 胶质细胞瘤的 FOXP2 表达明显低于正常脑组织 ($P<0.01$, 图 1A)。与正常星型胶质细胞 NHA 相比, 胶质瘤细胞系 U87 与 U251 中的 FOXP2 表达量在 RNA 水平 (图 1B) 与蛋白水平 (图 1C、D) 都明显降低 ($P<0.01$)。

2.2 过表达 FOXP2 抑制胶质瘤的细胞迁移能力

胶质瘤细胞 U87 和 U251 细胞系分别过表达 FOXP2 后与对照组提取蛋白, Western blot 检测转染效率, 结果显示过表达 FOXP2 组 FOXP2 表达水平较对照组明显升高, 转染效率明显 ($P<0.01$, 图 2A)。划痕实验结果显示, 在 U87 和 U251 细胞中, 过表达 FOXP2 能够显著抑制胶质瘤细胞 U87 和 U251 细胞的迁移能力 (图 2B、C, $P<0.01$)。

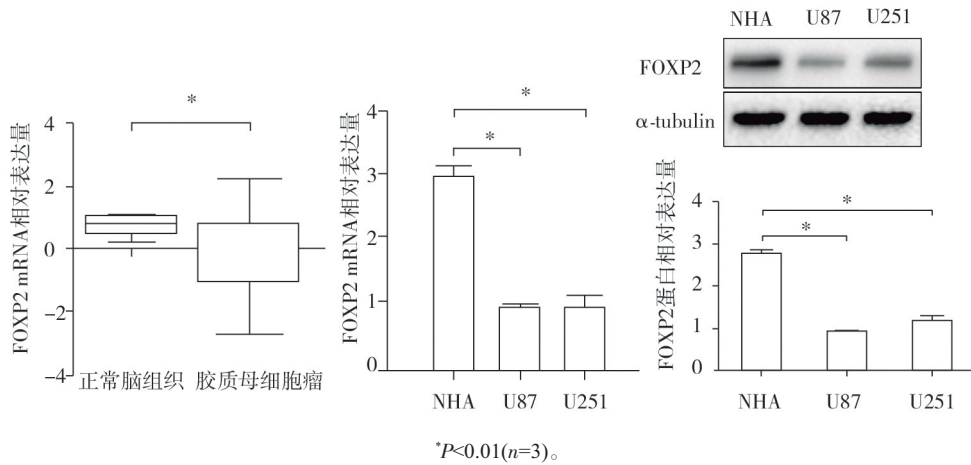
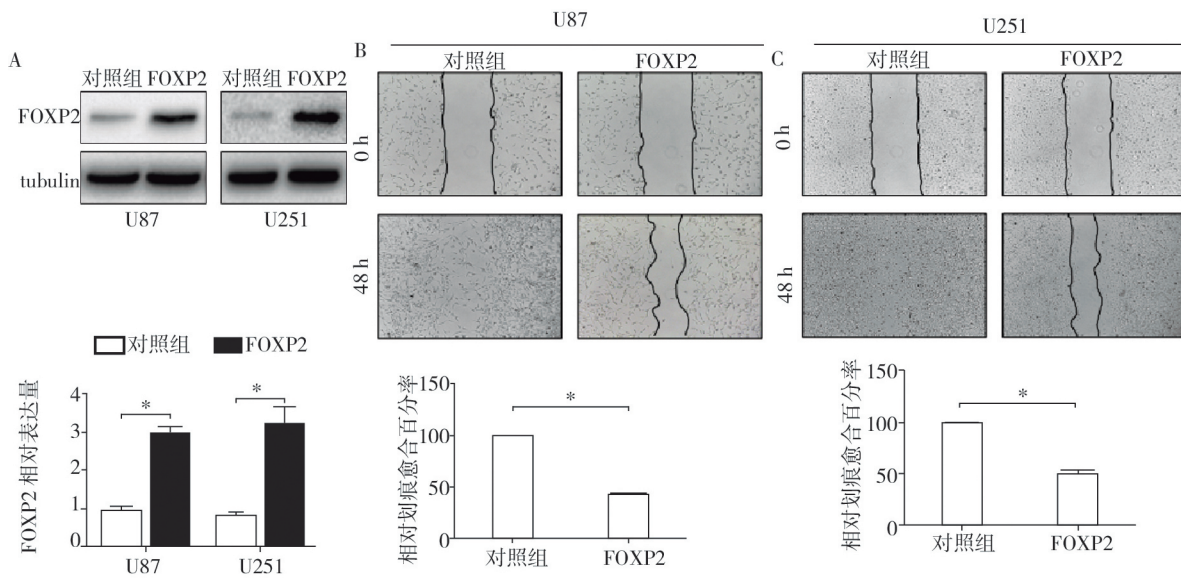


图 1 qPCR 与 Western blot 检测 FOXP2 在胶质瘤组织与细胞中的表达

Figure 1 The expression of FOXP2 in glioma tissues and glioma cells by qPCR and Western blot



A: Western blot 检测 FOXP2 过表达效率;B,C:过表达 FOXP2 后胶质瘤细胞 U87 及 U251 细胞划痕实验; * $P < 0.01(n=3)$ 。

图 2 FOXP2 抑制 U87 和 U251 细胞迁移

Figure 2 FOXP2 inhibits migration in U87 and U251 cells

2.3 过表达 FOXP2 抑制胶质瘤的细胞侵袭能力

过表达 FOXP2 后,Transwell 小室侵袭实验结果显示,在胶质瘤 U87(图 3A,B)和 U251 细胞(图 3C,D)过表达 FOXP2 后,细胞侵袭与迁移能力较对照组均明显下降($P < 0.01$)。

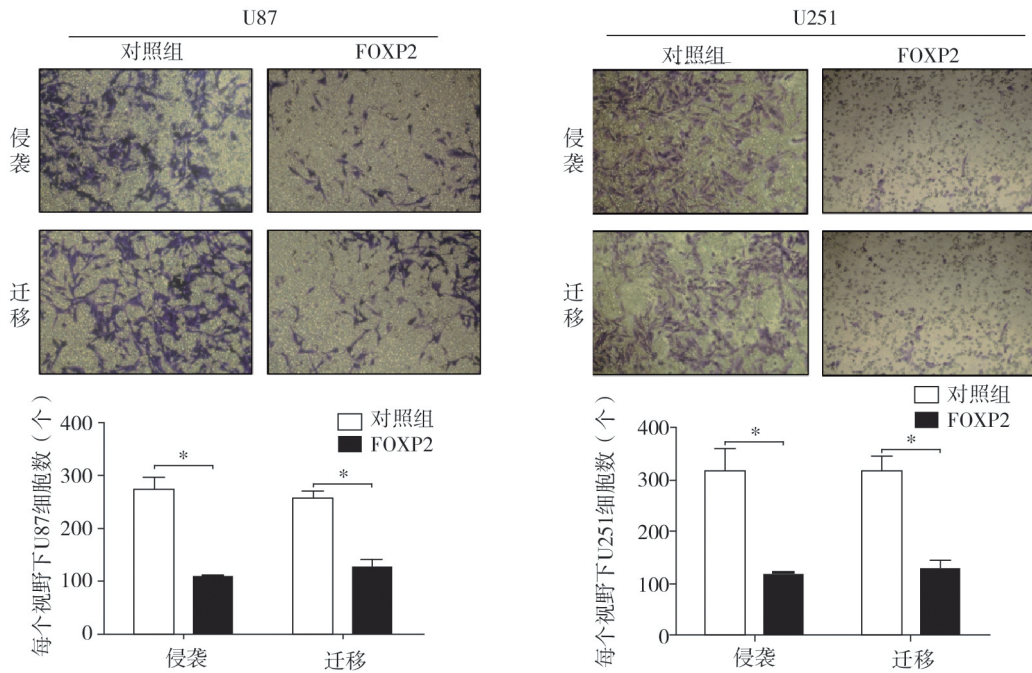
2.4 FOXP2 调控 PI3K/Akt 信号通路

在胶质瘤 U87 和 U251 细胞过表达 FOXP2,Western blot 显示 FOXP2 蛋白水平明显升高(图 4A、B)。结果表明,升高 FOXP2 后,PI3K 和 Akt 蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.01$),提示 FOXP2 通过调控

PI3K/Akt 信号通路影响胶质瘤细胞侵袭与迁移。

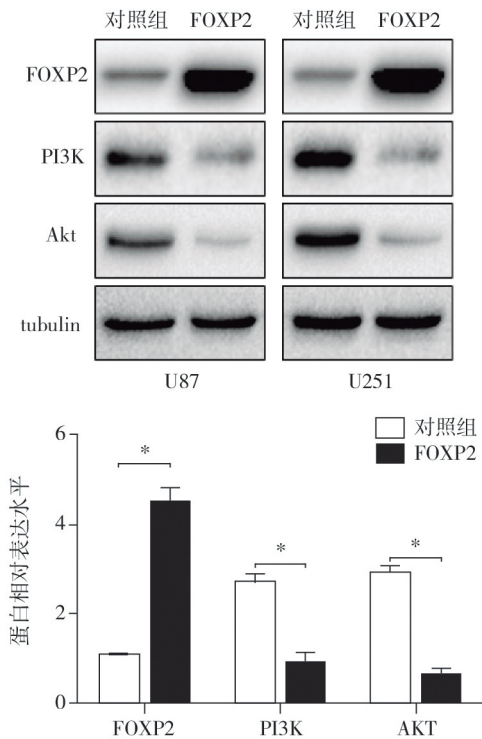
3 讨论

过往研究表明,叉头框基因家族已经成为一种癌症治疗的有效靶点。叉头框基因与多种癌症的侵袭转移关系密切,研究报道 FOXC1 可以抑制肺癌细胞侵袭并且抑制肺癌肿瘤的转移^[8],FOXF1 可以促进多种肿瘤细胞侵袭^[9],下调 FOXM1 能够抑制胰腺癌细胞和骨肉瘤细胞的侵袭能力^[10],过表达 FOXP3 可以抑制卵巢癌细胞的侵袭^[11],FOXP4 在多种乳腺癌细胞中因异位而失活^[12],在肾癌中呈低表达。FOXP2



* $P < 0.01$ ($n=3$).

图 3 Transwell 侵袭实验检测 FOXP2 抑制 U87 和 U251 细胞侵袭
Figure 3 FOXP2 inhibits invasion in U87 and U251 cells by Transwell



* $P < 0.01$ ($n=3$).

图 4 Western blot 检测 FOXP2 靶向调控 PI3K/Akt 信号通路
Figure 4 FOXP2 regulates PI3K/Akt signaling pathway by Western blot

基因是语言发展和神经发展方面至关重要的因素^[13], 相关研究表明 FOXP2 基因在结肠癌、卵巢、肝脏、肠和大脑中高表达^[6], 且最近研究报道, FOXP2 在前列腺癌与乳腺癌的发生发展中起到了重要作用^[7]。敲除 FOXP2 基因能够促进乳腺癌的起始与转移, 并且 FOXP2 低表达与乳腺癌患者低生存率密切相关^[14]。但是, FOXP2 在胶质瘤中的作用却仍然未知。

本研究观察了 FOXP2 基因在胶质瘤组织与胶质瘤细胞中的表达水平, qPCR 与 Western blot 实验结果显示 FOXP2 在胶质瘤组织与细胞中明显降低, 因此推测 FOXP2 在胶质瘤发生发展中起到重要作用。在胶质瘤细胞 U87 和 U251 细胞系过表达 FOXP2 后, 划痕实验与 Transwell 侵袭实验表明, 侵袭能力和迁移能力明显减弱, 说明 FOXP2 能够抑制胶质瘤的侵袭。这些结果都表明 FOXP2 是一潜在的具有抑癌功能的基因, 是诊断与治疗胶质瘤的新靶点。

PI3K/Akt 是一信号转导通路, 不仅在胰岛素调节和糖代谢中发挥重要作用, 还能促进细胞的存活和抗凋亡, 调节细胞的变形和运动^[15]。近几年来研究发现, PI3K/Akt 信号通路在多数人类肿瘤中能够调节肿瘤细胞增殖和凋亡, 在肿瘤侵袭、转移及化疗与放疗抵抗中也有重要作用^[16]。Akt 激活后在细胞内重新定位, 磷酸化相关底物蛋白, 能够有效调

节肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移^[16]。胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,具有极强的增殖、侵袭能力,PI3K/Akt 为胶质瘤侵袭相关重要途径。本研究探讨 FOXP2 在胶质瘤中表达、生物学功能及相关分子机制,结果显示 FOXP2 在胶质瘤中表达降低,利用慢病毒载体转染技术使 FOXP2 在胶质瘤细胞中表达增高后,PI3K 和 Akt 的表达明显降低,提示 FOXP2 可能通过 PI3K/Akt 信号通路调节胶质瘤细胞的生物学行为,为胶质瘤的治疗提供新的思路和理论依据。

[参考文献]

- [1] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. *Genes Dev*,2007,21(21):2683-2710
- [2] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, et al. Primary brain tumours in adults[J]. *Lancet*,2003,361(9354):323-331
- [3] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *N Engl J Med*,2005,352(10):987-996
- [4] Li S, Weidenfeld J, Morrisey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions[J]. *Mol Cell Biol*,2004,24(2):809-822
- [5] Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, et al. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder [J]. *Nature*,2001,413(6855):519-523
- [6] Campbell AJ, Lyne L, Brown PJ, et al. Aberrant expression of the neuronal transcription factor FOXP2 in neoplastic plasma cells[J]. *Br J Haematol*,2010,149(2):221-230
- [7] Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, et al. Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers[J]. *Clini Pathol*, 2013,66(7):563-568
- [8] Du J, Li L, Ou Z, et al. FOXC1, a target of polycomb, inhibits metastasis of breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*,2012,131(1):65-73
- [9] Malin D, Kim I M, Boetticher E, et al. Forkhead box F1 is essential for migration of mesenchymal cells and directly induces integrin-beta3 expression[J]. *Mol Cell Biol*,2007,27(7):2486-2498
- [10] Wang IC, Chen YJ, Hughes DE, et al. FoxM1 regulates transcription of JNK1 to promote the G1/S transition and tumor cell invasiveness[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(30):20770-20778
- [11] Zhang HY, Sun H. Up-regulation of Foxp3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Lett*, 2010,287(1):91-97
- [12] Howarth KD, Blood KA, Ng BL, et al. Array painting re-reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes[J]. *Oncogene*, 2007,27(23):3345-3359
- [13] Teufel A, Wong EA, Mukhopadhyay M, et al. FoxP4, a novel forkhead transcription factor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003,1627(2-3):147-152
- [14] Cuijffo BG, Campagne A, Bell GW, et al. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis[J]. *Cell Stem Cell*, 2014,15(6):762-774
- [15] Liao YJ, Lee TS, Twu YC, et al. Glycine N-methyltransferase deficiency in female mice impairs insulin signaling and promotes gluconeogenesis by modulating the PI3K/Akt pathway in the liver[J]. *J Biomed Sci*, 2016,23(1):69
- [16] Vara JF, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2004,30(2):193-204

[收稿日期] 2017-01-13

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。