

## 转录因子 FOXC1 促进胶质瘤细胞系 U87 的侵袭能力

仇文进,徐 然,陈正新,冯 爽,蔡小敏,刘 宁,王慧博\*

(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:探讨转录因子 FOXC1 对人脑胶质瘤细胞系 U87 侵袭的促进作用。方法:qPCR、Western blot 检测胶质瘤细胞系 U87、U251 及正常星型胶质细胞中 FOXC1 mRNA 和蛋白表达水平。将 FOXC1-siRNA 转染至 U87 细胞中,分别用 qPCR、Western blot 检测 FOXC1-siRNA 的转染效率。细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 后对细胞侵袭能力的影响,利用 Western blot 检测 U87 细胞上皮间质化相关通路蛋白(Snail1、 $\beta$ -catenin、Twist1)、标记蛋白(N-cadherin、Vimentin、E-cadherin)表达水平。结果:U87 细胞下调 FOXC1 表达后侵袭能力明显减弱,上皮间质化相关通路蛋白(Snail1、 $\beta$ -catenin、Twist1)表达水平下降,上皮细胞标记蛋白表达水平 E-cadherin 表达水平升高、间质细胞标记蛋白 N-cadherin、Vimentin 表达水平降低。结论:转录因子 FOXC1 通过上皮间质化促进胶质瘤细胞的侵袭。

**[关键词]** 胶质瘤;FOXC1;侵袭

**[中图分类号]** R739.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)05-0564-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170509

## Effects of FOXC1 on invasion of glioblastoma U87 cells

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

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

**[Abstract]** **Objective:** To explore the promotive effect of FOXC1 on the invasion of glioblastoma U87 cells. **Methods:** The mRNA and protein expression levels of endogenous FOXC1 was examined in U87 and U251 cells as well as NHAs via qPCR and Western blot, respectively. The FOXC1-siRNA was transfected into U87 cells. The transfection efficacy of FOXC1-siRNA was examined using qPCR and Western blot. The wound healing assay and Transwell invasion assay were carried out to investigate the role of FOXC1 on glioma cell invasion. The changes of epithelial-mesenchymal transition(EMT)-related signaling pathway proteins and marker proteins in glioma cells were identified with Western blot. **Results:** Downregulating the expression of FOXC1 reduced the invasive ability of glioma cells, reduced the EMT-related signaling pathway proteins of glioma cells, increased the epithelial biomarker E-cadherin and decreased the mesenchymal biomarkers N-cadherin and Vimentin. **Conclusion:** The FOXC1 could effectively promote the invasion of glioma cells by inducing EMT.

**[Key words]** glioma; FOXC1; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):564-568]

胶质瘤是成人中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤,肿瘤细胞快速侵袭临近的正常脑组织是其治疗失败的一个主要原因。尽管经过手术治疗,术后辅以放疗化疗,胶质瘤患者的预后依然不佳,其平均生存期不足 1 年,复发率及致死率极高<sup>[1]</sup>。因此急需寻找新的治疗方法来改善胶质瘤患者的预后。转

录因子 Forkhead box C1(FOXC1)是叉头框转录因子基因家族(FOX 家族)的一员,FOXC1 高表达与恶性肿瘤,如鼻咽癌<sup>[2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>、黑色素瘤<sup>[4]</sup>等的发生有关。FOXC1 可以促进癌细胞的增殖、侵袭及迁移,且促进癌细胞侵袭及迁移的作用可能是通过参与上皮-间质转化(EMT),从而导致 EMT 相关的分子标记表达变化<sup>[5]</sup>。但目前为止,FOXC1 蛋白在胶质瘤中的表达及临床意义尚无实验研究报道。本研究通过在胶质瘤细胞系 U87 中下调 FOXC1 的表达探讨 FOXC1 对肿瘤细胞侵袭能力的影响。

**[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

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人脑胶质瘤细胞系 U87 (上海中科院细胞库), DMEM 高糖培养基、新生胎牛血清(Hyclone 公司, 美国), 转染用培养基 Opti-MEM (Gibco 公司, 美国), RNA 抽提试剂 TRIzol、转染试剂 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司, 美国), 总蛋白提取试剂盒(南京凯基公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒、FOXC1 引物、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物 (TaKaRa 公司, 日本), FOXC1 小干扰序列(FOXC1-siRNA)及无意义序列(上海吉玛生物公司), FOXC1-siRNA 序列: 正义链 5'-GGGAAUAGUAGCU GUCAAATT-3', 反义链 5'-UUUGACAGCUACUAU-UCCCTT-3'; 无意义序列: 正义链 5'-UUCUCC-GAACGUGUCACGUTT-3', 反义链 5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAAT-3'。Western blot 凝胶配置试剂盒(上海碧云天公司), FOXC1、Snail1、 $\beta$ -catenin、Twist1、N-cadherin 一抗 (Abcam 公司, 美国), Vimentin、E-cadherin 一抗(CST 公司, 美国),  $\beta$ -actin 一抗(Bioworld 公司, ), 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养和转染

胶质瘤细胞系 U87 置于含 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基中培养, 培养箱设置为 37℃、5% CO<sub>2</sub>, 每隔 2 d 传代 1 次。按照上海吉玛公司和 Invitrogen 公司说明书的方法在 U87 细胞系中进行 FOXC1-siRNA 和无意义序列的转染。

#### 1.2.2 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测

在细胞中使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。FOXC1 上游引物 5'-GGCGAGCAGAGCTACTACC-3', FOXC1 下游引物 5'-TGCGAGTACACGCTCATGG-3'; GAPDH 上游引物 5'-CCGTC-TAGAAAAACCTGCC-3', GAPDH 下游引物 5'-GCCAAATTCGTTGTCATACC-3'。按照说明书方法进行 qPCR 反应, 反应条件为: 50℃ 2 min, 95℃ 2 min, 95℃ 退火 15 s, 60℃ 延伸 1 min, 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。利用 ABI7300 System SDS Software 软件进行分析, 使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算 FOXC1 的相对表达量, 每个样品均重复实验 3 次。

#### 1.2.3 侵袭实验

使用 24 孔板铺有基质胶的 Transwell 小室进行

体外侵袭实验的检测。每孔上室加入 2×10<sup>4</sup> 个细胞和 200  $\mu$ L 无血清的 DMEM 培养基, 每孔下室加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基刺激细胞侵袭。置于培养箱培养 24 h 后, 使用棉签擦去上室未侵袭的细胞, 100%甲醛固定, 0.1%结晶紫染色, 分别 3 个独立视野拍照计数, 并计算平均值。实验独立重复 3 次。

#### 1.2.4 细胞划痕实验

使用 6 孔板, 每孔铺 3×10<sup>5</sup> 个细胞, 在 6 孔板中心区域划 1 条人造的划痕伤口, 显微镜分别在划痕后 0、24 h 进行拍照。实验独立重复 3 次。

#### 1.2.5 Western blot 实验

按照总蛋白提取试剂盒说明书提取 U87 细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后加入上样缓冲液并煮沸 10 min。配制 10%SDS-PAGE 凝胶, 每孔 40  $\mu$ g 蛋白, 80 V 电泳分离蛋白, 恒流 280 mA、120 min 湿转至 PVDF 膜, 室温 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 4℃孵育一抗过夜, 常温孵育二抗 2 h, 最后曝光显影。 $\beta$ -actin 作为内参。实验独立重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据统计分析, 各实验计量数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较行单因素方差分析。P $\leq$ 0.05 为差异有统计学意义。

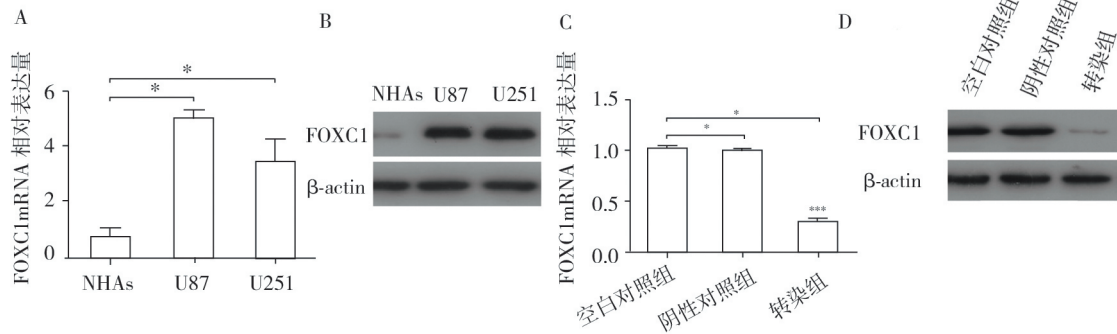
## 2 结果

### 2.1 FOXC1 在胶质瘤细胞系中表达情况及 U87 中 FOXC1-siRNA 转染效率

通过 qPCR 和 Western blot 实验在胶质瘤细胞系 U87、U251 及正常星型胶质细胞(NHAs)中分别检测 FOXC1 的 mRNA 和蛋白表达水平, U87 和 U251 中 FOXC1 的 mRNA 和蛋白表达与 NHAs 相比均明显升高(P<0.01, 图 1A、B)。胶质瘤 U87 细胞系中转染 FOXC1-siRNA 和无意义序列后, 通过 qPCR 和 Western blot 实验发现转染组 FOXC1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均较空白对照组和阴性对照组明显降低 (P<0.01, 图 1C、D), 提示 FOXC1-siRNA 在胶质瘤细胞中转染效率明显, FOXC1 敲低效果显著。

### 2.2 FOXC1 对 U87 细胞侵袭能力的影响

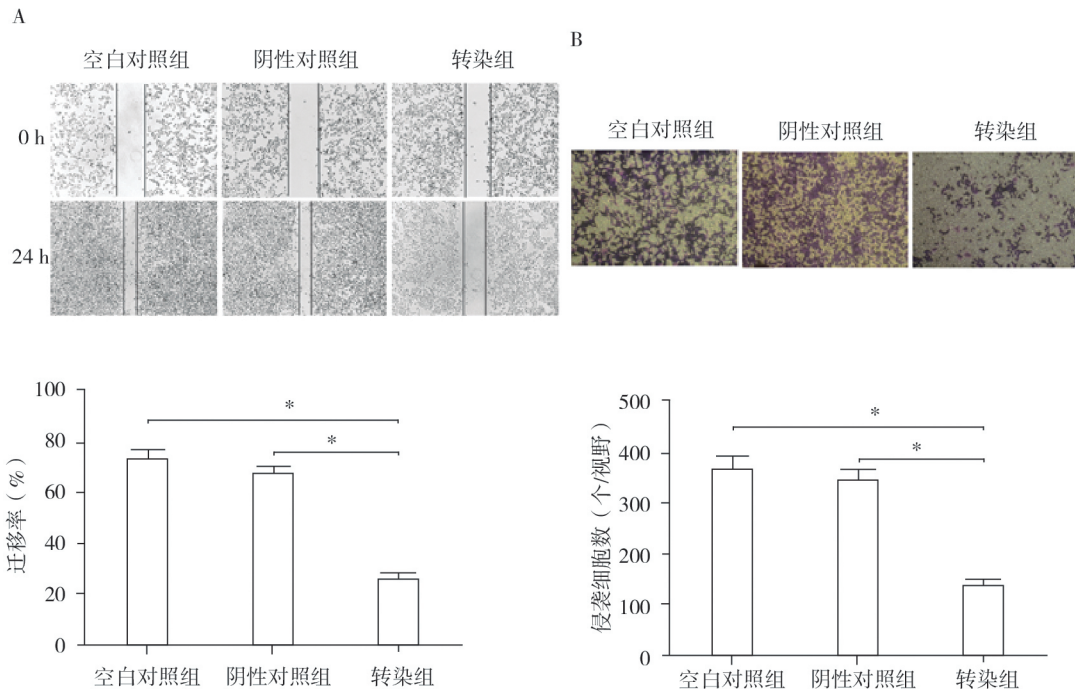
在 U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 后, 通过细胞划痕实验和 Transwell 实验发现转染组与空白对照组和阴性对照组相比侵袭能力明显减弱(P<0.01, 图 2), 说明 FOXC1 与肿瘤细胞侵袭能力密切相关。



A,B:qPCR 和 Western blot 验证 FOXC1 在 NHAs,U87 及 U251 中 mRNA 表达水平(\* $P<0.01$ , $n=3$ );C,D:qPCR 和 Western blot 验证 FOXC1 在 U87 细胞中敲低效率(\* $P<0.01$ , $n=3$ )。

图 1 FOXC1 在胶质瘤细胞系中表达情况及 U87 中 FOXC1-siRNA 转染效率

Figure 1 The expression level of endogenous FOXC1 and the transfection efficacy of FOXC1-siRNA were examined via qPCR and Western blot



A:敲低 FOXC1 后细胞划痕实验(\* $P<0.01$ , $n=3$ );B:敲低 FOXC1 后 Transwell 实验(\* $P<0.01$ , $n=3$ )。

图 2 FOXC1 促进胶质瘤细胞系 U87 的侵袭能力

Figure 2 FOXC1 promote the invasion of glioma U87 cells

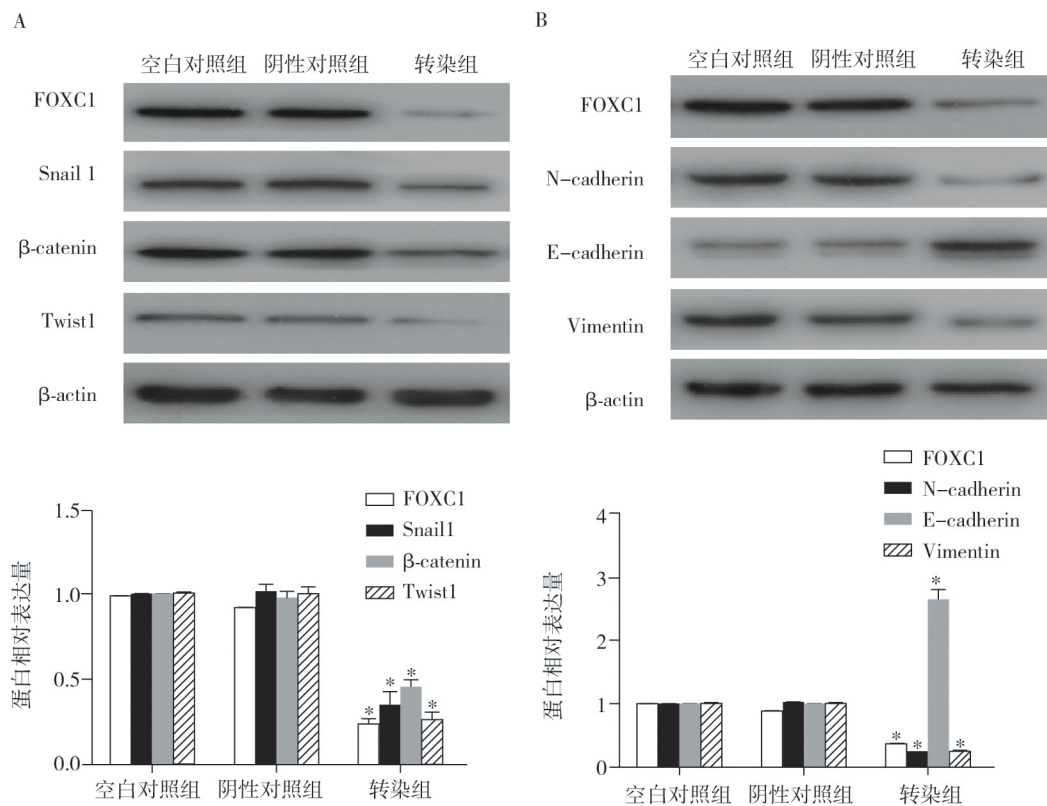
### 2.3 FOXC1 影响 EMT 相关通路蛋白和标记蛋白的表达促进 U87 细胞的侵袭能力

在 U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 48 h 后,提取细胞总蛋白进行 Western blot 实验显示,转染组与空白对照组和阴性对照组相比,上皮间质化相关通路蛋白(Snail1、 $\beta$ -catenin、Twist1)表达水平明显降低( $P<0.01$ ,图 3A),间质标记蛋白 N-cadherin 和 Vi-

mentin 降低明显( $P<0.01$ ),而上皮标记蛋白 E-cadherin 表达上升( $P<0.01$ ,图 3B),进一步证明 FOXC1 能够促进胶质瘤细胞侵袭能力。

### 3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,其治疗方式以手术为主,辅以放化疗,术后复发率较



A:U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 后 EMT 相关通路蛋白变化变化,与其他组比较,\* $P<0.01$ ( $n=3$ );B:U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 后 EMT 相关标记蛋白变化,与其他组比较,\* $P<0.01$ ( $n=3$ )。

图 3 U87 细胞转染 FOXC1-siRNA 后 EMT 相关蛋白检测

Figure 3 The changes of EMT-related signaling pathway proteins, marker proteins in glioma U87 cells were identified with Western blot after FOXC1-siRNA transfection.

高,治疗效果远没有达到预期临床效果,胶质瘤患者的中位生存率依然很低,因此寻找新的治疗方法迫在眉睫。

FOX 家族蛋白是一类具有叉头和螺旋翼状结构的 DNA 结合区域的蛋白,可以调控基因的表达,涉及广泛的细胞生长过程,在细胞的周期、增殖、分化、迁移、新陈代谢、DNA 的损伤应答<sup>[6]</sup>以及肿瘤的发生进展中发挥着作用<sup>[7]</sup>。FOXC1 属于 FOX 家族的一员,是由 100 个氨基酸残基组成的长度为 1.6 kb 的外显基因,位于人染色体 6p25 基因编码区<sup>[8]</sup>,编码的蛋白质共 553 个氨基酸残基<sup>[9]</sup>。目前为止,FOXC1 蛋白的功能还没有完全被阐明,已有文献报道此基因突变与动物胚胎发育、胎心发育及人类 Axenfeld-Rieger 畸形存在密切联系<sup>[10]</sup>。FOXC1 基因突变与肿瘤的发生、进展密切相关,可以通过诱导 EMT 促使肿瘤细胞侵袭周围组织以及肿瘤的转移<sup>[11]</sup>。近年来 EMT 逐渐成为肿瘤侵袭转移机制研究领域的热点,研究表明上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞可以通过 EMT 过程向间质细胞特性转化,从而获得迁

移和侵袭能力<sup>[12]</sup>。EMT 过程的主要特征是 E-cadherin 等黏附分子减少,转变为以 Vimentin 为主要细胞骨架的间充质细胞。发生 EMT 的细胞不仅在细胞形态上向间质细胞转变,而且细胞 EMT 过程中蛋白标记 N-cadherin、Vimentin 的升高及 E-cadherin 的降低会促使上皮细胞功能发生变化,如细胞间黏附力下降、细胞运动能力增强、细胞侵袭力增加等<sup>[13]</sup>。E-cadherin 是经典的上皮黏附分子,对肿瘤侵袭、迁移起到抑制作用,目前已有较多研究发现 E-cadherin 蛋白的表达缺失与肺癌<sup>[14]</sup>、胃癌<sup>[15]</sup>、前列腺癌<sup>[16]</sup>、乳腺癌<sup>[17]</sup>等的发生、发展密切相关。

FOXC1 基因突变通过诱导黏附分子尤其是 E-cadherin 表达下降导致细胞间黏附能力下降,从而诱导其他肿瘤发生 EMT,增强肿瘤细胞的侵袭和迁移能力,促进肿瘤进展,参与促进肿瘤细胞发生上皮-间质转化<sup>[2]</sup>。鼻咽癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌发生发展均与 FOXC1 的异常表达存在密切关系,FOXC1 可能在肿瘤恶化及预后判断中存在重要价值,更有望为肿瘤的靶向治疗提供新靶

点。迄今为止,FOXC1 是否在胶质瘤 EMT 过程中发挥作用仍然没有报道,为此通过检测胶质瘤细胞系中 FOXC1 表达水平,发现在胶质瘤细胞系 U87 和 U251 中,与 NHAs 相比,FOXC1 mRNA 和蛋白表达水平均升高,随后选取胶质瘤 U87 细胞系在其中转染 FOXC1-siRNA 后,发现转染组与空白对照组和阴性对照组相比,侵袭能力显著下降,由此可推论 FOXC1 在胶质瘤侵袭的发生发展中起着重要作用。为了进一步研究 FOXC1 是否在胶质瘤 EMT 过程中发挥重要作用,本研究通过 Western blot 检测蛋白水平检测 EMT 相关通路蛋白发现,转染 FOXC1-siRNA 后转染组 Snail1、 $\beta$ -catenin、Twist1 蛋白表达水平明显降低。Snail1 是含有锌指结构的结合蛋白,在肿瘤中高表达,可以抑制 E-cadherin 同时升高 Vimentin 的表达水平促进 EMT 过程。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 通路中重要的蛋白,促进肿瘤的侵袭和增殖能力,参与肿瘤的发生进展,影响患者的愈后。Twist1 高表达可以促使肿瘤细胞增强侵袭与转移能力,在 EMT 过程中发挥重要作用。转染组 N-cadherin、Vimentin 较空白对照组和阴性对照组下降,E-cadherin 的表达升高,说明 FOXC1 确实影响 EMT 相关标记蛋白的表达水平促进 EMT,进而参与脑胶质瘤侵袭,在肿瘤进展过程中发挥重要作用。但是 FOXC1 具体是通过何种机制影响胶质瘤 EMT 过程,还有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5): 492-507
- [2] Ouyang L, Xiao SJ, Liu P, et al. Forkhead box C1 induces epithelial-mesenchymal transition and is a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6): 8003-8009
- [3] Lo PK, Ji SL, Liang X, et al. The dual role of FOXF2 in regulation of DNA replication and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(10): 1502-1519
- [4] Wang J, Li L, Liu S, et al. FOXC1 promotes melanoma by activating MST1R/PI3K/AKT[J]. *Oncotarget*, 2014, 7(51): 84375-84387
- [5] Xu ZY, Ding SM, Zhou L, et al. FOXC1 contributes to microvascular invasion in primary hepatocellular carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition.[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 8(8): 1130-1141
- [6] Zhang YL, Sun FT, Zhang Z, et al. Comprehensive expression analysis suggests functional overlapping of human FOX transcription factors in cancer. [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2014, 15 (23): 10475-10481
- [7] Zhu H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease.[J]. *Life Sci*, 2015, 144: 194-201
- [8] Nishimura DY, Swiderski RE, Alward WLM, et al. The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25[J]. *Nat Genet*, 1998, 19(2): 140-147
- [9] Gould DB, Mears AJ, Pearce WG, et al. Autosomal Dominant Axenfeld-Rieger Anomaly Maps to 6p25[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61(3): 765-718
- [10] Smith RS, Zabaleta A, Kume T, et al. Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development.[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9 (7): 1021-1032
- [11] Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107 (35): 15449-15454
- [12] He J, Shen S, Lu W, et al. HDAC1 promoted migration and invasion binding with TCF12 by promoting EMT progress in gallbladder cancer. [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (22): 32745-32764
- [13] Yu JM, Sun W, Hua F, et al. BCL6 induces EMT by promoting the ZEB1-mediated transcription repression of E-cadherin in breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365 (2): 190-200
- [14] Sun C, Li S, Li D. MicroRNA-346 facilitates cell growth and metastasis, and suppresses cell apoptosis in human non-small cell lung cancer by regulation of XPC/ERK/Snail/E-cadherin pathway[J]. *Aging*, 2016, 8(10): 2509-2524
- [15] Xie R, Wang X, Qi G, et al. DDR1 enhances invasion and metastasis of gastric cancer via epithelial-mesenchymal transition[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(9): 1-11
- [16] Ma B, Wheeler SE, Clark AM, et al. Liver protects metastatic prostate cancer from induced death by activating E-cadherin signaling[J]. *Hepatology*, 2016, 64(5): 1725-1742
- [17] Tang D, Xu S, Zhang Q, et al. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2011, 29(2): 526-533

[收稿日期] 2017-01-13