

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.11.002

FOXC2 对结直肠癌细胞上皮-间质转化及侵袭能力的影响*

蔡娟娟, 崔艳梅, 丁彦青, 廖雯婷[△]

(南方医科大学基础医学院病理系, 广州 510515)

[摘要] **目的** 明确叉头框 C2 (FOXC2) 在结直肠癌细胞侵袭迁移中的作用。**方法** 采用逆转录病毒感染的方法建立 FOXC2 稳定过表达的结直肠癌细胞株 (SW480/FOXC2) 及空载体对照细胞株 (SW480/pBabe), 显微镜下观察结直肠癌细胞形态改变。Western blot 及免疫荧光法检测 FOXC2 过表达细胞株及对照细胞株中 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 的表达情况; Transwell 侵袭小室实验检测结直肠癌细胞迁移能力的改变。**结果** 过表达后 SW480 细胞的形态发生了明显的变化, 从原来典型的上皮细胞形状变成长梭形, 类似于成纤维细胞的形态; Western Blot 及免疫荧光检测结果显示, FOXC2 过表达后上皮分子标志物 E-cadherin 表达明显下调, 而间质分子标志物 Vimentin 及 N-cadherin 表达显著上调; Transwell 侵袭实验结果显示, FOXC2 过表达后结直肠癌细胞侵袭潜能明显增强。**结论** FOXC2 过表达能诱导结直肠癌细胞 SW480 发生上皮-间质转化并增强其侵袭能力。

[关键词] 结直肠肿瘤; 叉头框 C2; 上皮-间质转化; 侵袭

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)11-1444-04

Effect of FOXC2 on epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer cells*

Cai Juanjuan, Cui Yanmei, Ding Yanqing, Liao Wenting[△]

(Department of Pathological, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To identify the role of FOXC2 in the invasion and migration of colorectal cancer cells. **Methods** Stable cell lines expressing FOXC2 (SW480/FOXC2) or vector (SW480/pBabe) were established using retroviral infection method. The morphology alterations of SW480 cells were observed using a microscope. Western blot analysis and immunofluorescence staining assays were performed to detect the expression of E-cadherin, Vimentin and N-cadherin. The invasive and migratory abilities of colorectal cancer cells evaluated using Transwell invasion chamber experiment detection. **Results** The morphology of SW480 cells was significantly changed after overexpression. From the original shape typical of epithelial cells became spindle shaped growth, similar to the morphology of fibroblasts. Western blot analysis and immunofluorescence staining displayed that overexpression of FOXC2 led to significant downregulation of the epithelial marker E-cadherin, but upregulation of the mesenchymal markers Vimentin and N-cadherin. Transwell assay reveals that overexpression of FOXC2 strongly enhanced the migratory and invasive ability of SW480 cells. **Conclusion** FOXC2 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes the invasive ability of colorectal cancer cells.

[Key words] colorectal neoplasms; FOXC2; epithelial-mesenchymal transition; invasion

结直肠癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一, 全球每年新发病例已增至 100 万, 其发病率以 4.2% 的速度螺旋递增^[1-2]。转移是导致结直肠癌治愈率低、死亡率高的主要原因^[3-4]。上皮-间质转化是肿瘤转移的重要步骤, 使细胞失去上皮细胞表型获得间皮细胞表型, 促使细胞转移至邻近组织和远端器官, 引起细胞的侵袭转移^[5-6]。叉头框 C2 (forkhead box C2, FOXC2) 又名间充质叉头框 1 (mesenchyme forkhead 1, MHF1), 属于叉头框转录因子超家族成员, 最初发现于小鼠脑组织^[7]。人类 FOXC2 基因定位于 16q24.3, 其编码的蛋白参与调节包细胞分化、代谢、发育、增殖和凋亡等不同的细胞过程^[8]。近年来的研究表明, FOXC2 在乳腺癌、胃癌、非小细胞癌和食管癌中高表达, 其异常高表达与肿瘤的生长、侵袭和转移能力密切相关^[9-14]。然而, FOXC2 在结直肠癌侵袭转移中的作用及分子机制尚未研究清楚。本研究旨在探讨 FOXC2 对结直肠癌细胞上皮-间质转化及侵袭迁移潜能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人结肠癌细胞株 SW480, 人胚肾细胞株 293Ft 为南方医科大学病理学实验室自存。

1.1.2 实验试剂 胎牛血清、RPMI-1640 购自美国 Gibico 公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, Transwell 小室购自美国 BD 公司, E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 抗体购自美国 Bioworld 公司, 兔二抗及鼠二抗购自美国 Thermo 公司, α -Tubulin 购自北京锐抗公司。

1.2 方法

1.2.1 构建稳定细胞株 (1) 培养并传代病毒细胞 293Ft 细胞, 转染前 24 h, 取对数生长期细胞, 胰酶消化后, 按每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中。当细胞生长成 80% 时进行转染。(2) 将重组质粒及阴性对照质粒各 25 μ g, 慢病毒包装质粒 25 μ g 分别加入 EP 管中, 依次加入 Gibico H₂O 至 150 μ L, 加入

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1201226, 81472710, 81172055); 广州市珠江科技新星专项项目 (2012J2200052, 2012J2200044)。

作者简介: 蔡娟娟 (1986—), 在读硕士, 主要从事肿瘤研究。 [△] 通讯作者, E-mail: liaowt2002@gmail.com。

CaCl₂ 250 μL, 最后加入 200 μL 缓冲液 (2×HBS, pH 7.0), 室温静置 25 min 后加入 293Ft 细胞中, 随后加入氯喹 30 μL。 (3) 24 h 后, 收集细胞培养上清液, 用 0.45 μm 孔径的滤器 (Millipore 公司产品) 过滤, 收集滤液, 按 4 μg/mL 加入 polybrene, 混匀后, 加至提前 1 d 接种于 6 孔细胞培养板中的待转染细胞 (4×10⁵ 个/孔) 上, 每隔 4 h 收集一次病毒上清液并加入待转染细胞中, 连续感染 3 次。 (4) 感染结束后 24~48 h, 用含 1 μg/mL 嘌呤霉素的培养基筛选阳性克隆, 连续筛选 3 d, 每天换液。 (5) 收集以上细胞株的 RNA 和蛋白, 用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法鉴定。

1.2.2 Western blot 蛋白用 10.5% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 湿法转印至 PVDF 膜上, 转膜结束后兔抗人 FOXC2 抗体, E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 单克隆抗体孵育过夜, 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 于室温孵育 45 min 后, 洗脱抗体, 常规显色发光。

1.2.3 免疫荧光实验 细胞转染后 24 h 消化计数, 爬片, 漂洗, 固定, 再漂洗, 加一抗过夜, 次日加入带荧光二抗, 避光反应 1 h, 漂洗, 染色, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 Transwell 迁移实验 细胞转染后 24 h 消化计数, 加入放置了 Transwell 小室的 24 孔板中, 上层小室加入含 5% 胎牛血清的培养基, 下层小室加入含 20% 胎牛血清的培养基, 孵育 48 h, 取出, 固定, 染色, 显微镜下随机选取视野拍照计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析, 两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FOXC2 过表达后结直肠癌细胞形态变化 FOXC2 稳定过表达后, SW480 细胞的形态发生了明显的变化, 从原来典型的上皮细胞形状变成长梭形, 类似于成纤维细胞的形态。见图 1。

2.2 FOXC2 过表达后上皮-间质转化标志物的变化 Western blot 实验显示, 与对照组相比, FOXC2 过表达后, 上皮标记物 E-cadherin 的表达下调, 而间质标记物 Vimentin、N-cadherin 表达上调 (图 2)。免疫荧光实验显示, 与对照组相比, FOXC2 过表达后, 上皮标记物 E-cadherin 的表达强度下调, 而

间质标记物 Vimentin、N-cadherin 表达强度上调 (图 3)。

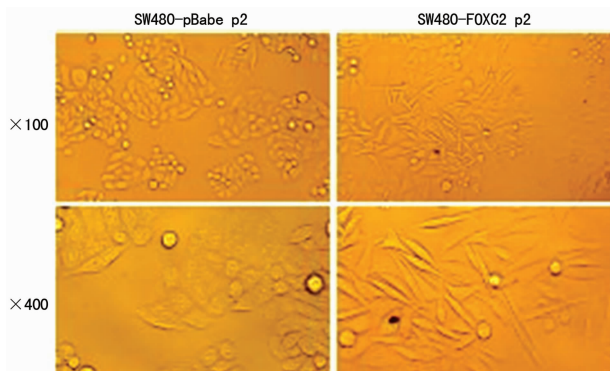


图 1 FOXC2 过表达 SW480 的形态学变化

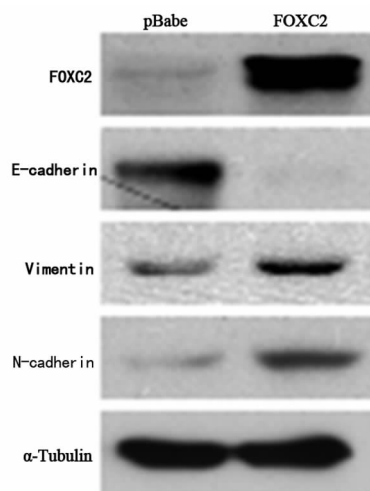


图 2 Western blot 检测 FOXC2 过表达细胞株与对照细胞株中上皮-间质转化标志物的表达

2.3 FOXC2 过表达后结直肠癌细胞侵袭迁移潜能的变化 Transwell 迁移实验结果显示, 与对照组相比, 结直肠癌 SW480 细胞 FOXC2 过表达后迁移的细胞明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4。

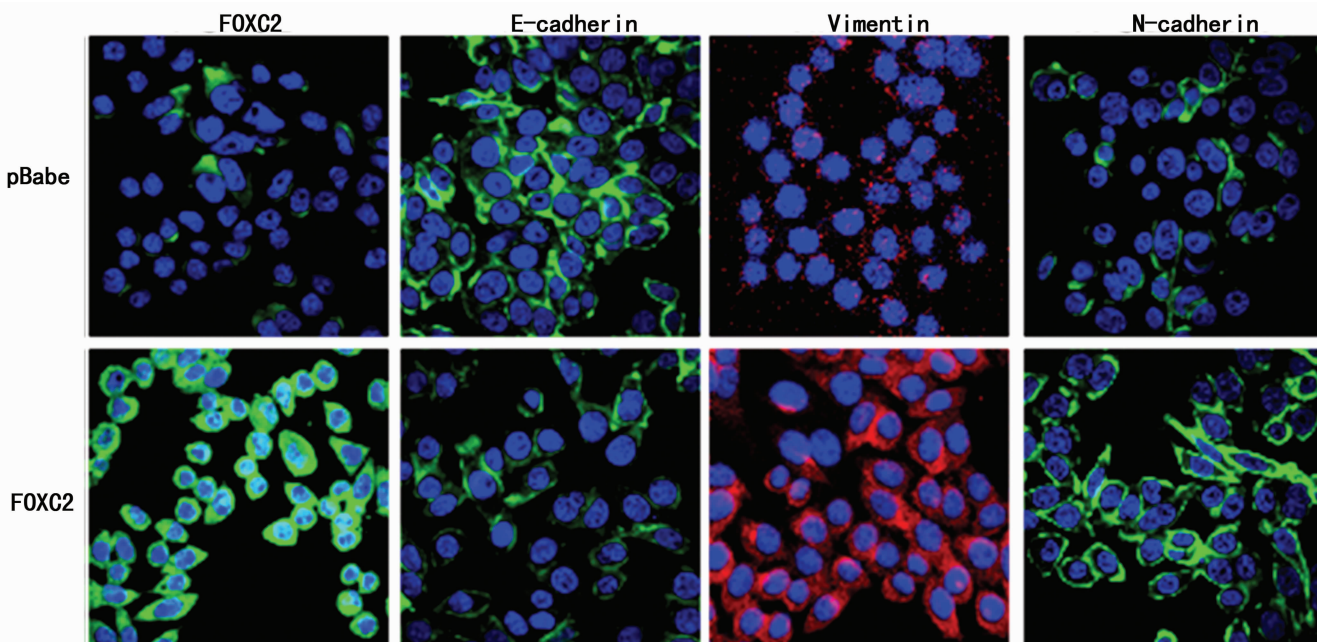


图 3 免疫荧光法检测 FOXC2 过表达细胞株及对照细胞株中 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 的表达情况 (×60)

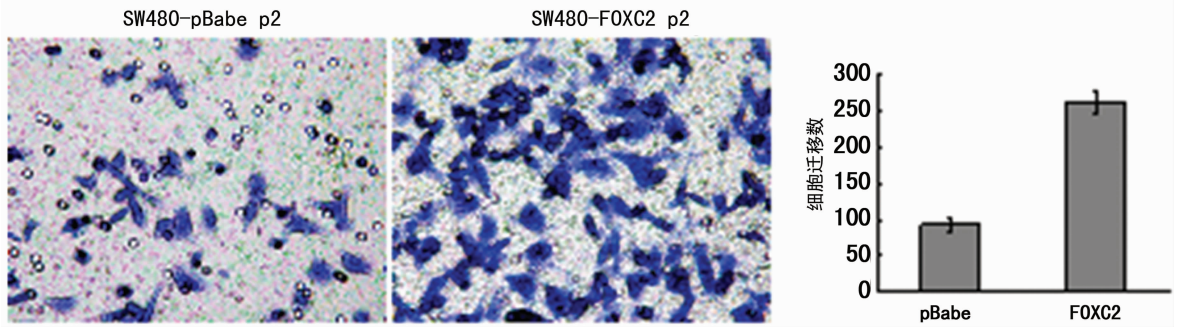


图 4 Transwell 侵袭小室实验检测结肠癌细胞迁移能力的改变(×20)

3 讨 论

肿瘤转移是一个多步骤、多阶段的复杂过程,包括肿瘤微环境的改变、细胞迁移、细胞运动及肿瘤血管形成等过程^[15-16]。近年来发现,上皮-间质转化的异常激活存在于多种病理性过程中,包括上皮来源的肿瘤的纤维化和转移性扩散^[17]。在肿瘤中,上皮-间质转化使得上皮细胞从原发肿瘤脱落下来,侵袭到周围基质中,因此,肿瘤性的上皮-间质转化是转移进展最初阶段的重要步骤之一^[18]。在侵袭性肿瘤中,有多种信号通路和 EMT 诱导基因的异常激活,包括 TGF- α 、Wnt/ β -catenin 信号通路、Snail/Slug 转录因子家族、Twist 转录因子家族等^[19]。

叉头框家族蛋白是在进化过程中高度保守的转录因子家族,该转录因子家族成员共包含了 17 个亚家族(FOXA-R),目前在人类发现至少有 40 多个成员。FOX 蛋白家族成员在多种生物学进程包括代谢、发育、分化、增殖、凋亡、转移、侵袭和寿命中都起着重要的作用。因此,FOX 功能的失调可改变细胞的命运和促进肿瘤的发生。大量的体内实验证明,FOX 家族蛋白在发育和维持组织稳态中起着重要作用^[20]。研究表明,FOXC2 在胚胎发育、机体代谢调节、脉管系统的发育及肿瘤血管生成中起着重要的作用^[21-23]。近年来,越来越多的研究表明,FOXC2 在肿瘤发生及转移过程中起不可忽略的作用。研究显示,FOXC2 通过直接诱导趋化因子 4 受体和整合素 3,从而促进肿瘤血管及淋巴管形成^[24]。有研究表明 FOXC2 过表达促进间叶细胞的分化,诱导基质金属蛋白酶-2(MMP2)和基质金属蛋白酶-9(MMP9)的表达^[25]。有研究显示 P120-catenin 是肿瘤上皮细胞中稳定 E-cadherin 的一种调节蛋白,FOXC2 能下调 P120-catenin 表达,从而间接抑制上皮标志物 E-cadherin 表达,导致肿瘤发生上皮-间质转化^[26]。在乳腺癌中,FOXC2 的表达与上皮-间质转化和干细胞特性相关,干扰 FOXC2 表达能抑制细胞的间质表型和相关的侵袭行为及干细胞特性,而 FOXC2 过表达又能诱导肿瘤干细胞特性及乳腺癌细胞的转移^[27]。本研究的实验结果提示,FOXC2 过表达促使结肠癌 SW480 细胞发生显著的上皮-间质转化形态学改变。同时,FOXC2 过表达后,SW480 细胞中上皮细胞标志物 E-cadherin 表达下调,而间质标志物 Vimentin、N-cadherin 表达上调。此外,FOXC2 过表达后,SW480 细胞的侵袭迁移能力增强。这些研究结果表明,FOXC2 在结肠癌中的过表达能诱导上皮-间质转化发生,并增强结肠癌细胞的侵袭迁移能力。

综上所述,本研究提示 FOXC2 过表达可能参与结肠癌侵袭转移的早期步骤,更为 FOXC2 作为新的结肠癌转移分子标志物提供科学依据,对于结肠癌转移的临床干预治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Weitz J, Koch M, Debus J, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2005, 365(9454): 153-165.
- [2] Sung JJ, Lau JY, Goh KL, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(11): 871-876.
- [3] Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A, et al. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment[J]. Ann Oncol, 2010, 21 Suppl 5: 93-97.
- [4] 王永川,魏丽娟,刘俊田,等. 发达与发展中国家癌症发病率与死亡率的比较与分析[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(10): 679-682.
- [5] Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(7): 601-608.
- [6] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829.
- [7] 刘珉,刘伟. FOXC2 的研究进展[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 30(7): 757-760.
- [8] Cui YM, Jiang D, Zhang SH, et al. FOXC2 promotes colorectal cancer proliferation through inhibition of FOXO3a and activation of MAPK and AKT signaling pathways[J]. Cancer Lett, 2014, 353(1): 87-94.
- [9] 姜云瀚,黄青云,张霓. FoxC2 与肿瘤[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 20(5): 452-455.
- [10] Jiang W, Pang XG, Wang Q, et al. Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection[J]. Clin Lung Cancer, 2012, 13(4): 280-287.
- [11] Mani SA. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(24): 10069-10074.
- [12] Mani SA, Yang J, Brooks M, et al. FOXC2 is a novel prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(2): 535-542.
- [13] Ren YH, Liu KJ, Wang M, et al. De-SUMOylation of FOXC2 by SENP3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. Oncotarget, 2014, 5

- (16):7093-7104.
- [14] Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal-epithelial transition in epithelial response to injury; the role of Foxc2[J]. *Oncogene*, 2010, 29(7):1031-1040.
- [15] Imai K, Itoh F, Hinoda Y. Regulation of integrin function in the metastasis of colorectal cancer[J]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 1998, 99(7):415-418.
- [16] Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(6):1688-1694.
- [17] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):442-454.
- [18] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology[J]. *Pathology*, 2007, 39(3):305-318.
- [19] Micalizzi DS, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer[J]. *Future Oncol*, 2009, 5(8):1129-1143.
- [20] Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism[J]. *Dev Biol*, 2002, 250(1):1-23.
- [21] Seo S, Fujita H, Nakano A, et al. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development[J]. *Dev Biol*, 2006, 294(2):458-470.
- [22] Hayashi H, Sano H, Seo S, et al. The Foxc2 transcription factor regulates angiogenesis via induction of integrin beta3 expression[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(35):23791-23800.
- [23] Hayashi H, Kume T. Forkhead transcription factors regulate expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells and CXCL12-induced cell migration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(3):584-589.
- [24] Li D, Yan D, Liu W, et al. Foxc2 overexpression enhances benefit of endothelial progenitor cells for inhibiting neointimal formation by promoting CXCR4-dependent homing[J]. *J Vasc Surg*, 2011, 53(6):1668-1678.
- [25] Watanabe A, Suzuki H, Yokobori T, et al. Forkhead box protein C2 contributes to invasion and metastasis of extrahepatic cholangiocarcinoma, resulting in a poor prognosis[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(11):1427-1432.
- [26] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4):704-715.
- [27] Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, et al. FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6):1981-1992.

(收稿日期:2015-10-11 修回日期:2015-12-20)

(上接第 1443 页)

- mechanism of cancer immunoediting[J]. *Nature*, 2012, 482(7385):400-404.
- [7] Kallinikova VD, Borisova EN, Pakhorukova LV, et al. Immunization against *Trypanosoma cruzi* and tumor growth in mice[J]. *Med Parazitol (Mosk)*, 2006, 30(4):9-12.
- [8] Darani HY, Shirzad H, Mansoori F, et al. Effects of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model[J]. *Korean J Parasitol*, 2009, 47(2):175-177.
- [9] Miyahara K, Yokoo N, Sakurai H, et al. Antitumor activity of *Toxoplasma lysate* antigen against methylcholanthrene-induced tumor-bearing rats[J]. *J Vet Med Sci*, 1992, 54(2):221-228.
- [10] Chen L, He Z, Qin L, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24407.
- [11] Vaughan AM, Wang R, Kappe SH. Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria[J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(1):107-113.
- [12] Chen L, He Z, Qin L, et al. Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24407.
- [13] Zenina AV, Kravtsov EG, Tsetsegsaikhan B, et al. The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2008, 145(3):352-354.
- [14] Seder RA, Chang LJ, Enama ME, et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine[J]. *Science*, 2013, 341(6152):1359-1365.
- [15] Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses[J]. *Science*, 2004, 305(5681):200-205.
- [16] Hibbs JJ, Lambert LJ, Remington JS. Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*[J]. *J Infect Dis*, 1971, 124(6):587-592.
- [17] Van den Heuvel MM, Burgers SA, van Zandwijk N. Immunotherapy in non-small-cell lung carcinoma: from inflammation to vaccination[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(2):99-105.
- [18] Cockburn IA, Zavala F. T cell memory in malaria[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(4):424-429.

(收稿日期:2015-10-28 修回日期:2016-01-03)