

FBXO22 对结肠癌细胞侵袭迁移的影响及相关机制

宋 虎,张亚飞,徐 为,徐溢新,宋 军*

(徐州医科大学附属医院胃肠外科,江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的:探讨结肠癌细胞 FBXO22 基因表达沉默后对细胞侵袭迁移的影响及其相关分子机制。方法:利用 siRNA-Ctrl 和 siRNA-FBXO22 小干扰片段转染结肠癌 SW620 和 HCT116 细胞,干扰 FBXO22 基因表达,Western blot 检测细胞转染效率,Transwell 细胞迁移实验分析干扰 FBXO22 对细胞侵袭迁移的影响,Western blot 检测细胞侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 MDM2 水平的变化。结果:转染 FBXO22 siRNA 后,结肠癌 SW620 和 HCT116 细胞 FBXO22 的表达量明显下降,细胞侵袭转移能力降低,MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低,而 MDM2 蛋白表达水平上调。结论:FBXO22 与结肠癌细胞侵袭迁移相关,其机制可能通过调节 MMP-2 和 MMP-9 表达而实现。

[关键词] FBXO22 基因;结肠癌;侵袭;迁移

[中图分类号] R735.35

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1553-04

doi:10.7655/NYDXBNS20171203

Effect of silencing FBXO22 gene on invasion and migration and related molecular mechanism in colon cancer cells

Song Hu, Zhang Yafei, Xu Wei, Xu Yixin, Song Jun*

(Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of FBXO22 silencing by small interfering RNA (siRNA) on invasion and migration of colon cancer cells, and further to investigate its related molecular mechanism. **Methods:** The siRNA-Ctrl and siRNA-FBXO22 fragments were transfected into SW620 and HCT116 cells, and the level of FBXO22 was detected by Western bolt. The effects of interfering FBXO22 on cell invasion and migration were analyzed by Transwell assay, and the expression levels of FBXO22, MMP-2, MMP-9 and MDM2 were detected by Western bolt. **Results:** After transfection with FBXO22 siRNA, the levels of FBXO22 in SW620 and HCT116 cells were significantly decreased, and the abilities of cell invasion and migration were decreased. Meanwhile, silencing of FBXO22 decreased expression of MMP-2, MMP-9, and increased expression of MDM2. **Conclusion:** FBXO22 can affect cell invasion and migration in colon cancer cells, and the mechanism may be related to the expression of MMP-2 and MMP-9.

[Key words] FBXO22; colon cancer; invasion; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12): 1553-1556]

泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)是蛋白选择性降解的主要通路^[1]。F-box 是 SCF(Skp1-Cul-F-box protein)E3 泛素连接酶复合体的主要组成部分,其异常表达可致泛素连接酶功能障碍,影响细胞周期、信号转导和转录相关蛋白表达,导致不正常的细胞增殖和分化,在肿瘤发生

发展中起着重要作用^[2]。FBXO22(F-box only protein 22)作为 F-box 蛋白中的一种,其突变亦可促进或抑制肿瘤的发生。已有文献报道 FBXO22 的上调可促进原发性肝癌的发生^[3]。目前尚无研究证实其在结肠癌细胞中的作用。本研究拟探讨结肠癌细胞 FBXO22 基因沉默后对细胞侵袭迁移能力的影响,并初步探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SW620 细胞株及 HCT116 细胞株(中国科学院

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(2014-WSW-032);江苏省“科教强卫工程”青年医学人才项目资助(QNRC2016790)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: songhurex@126.com

上海生物化学及细胞生物研究所)。DMEM、RPMI 1640 培养基及胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 胰酶 (Sigma 公司, 美国), 磷酸盐缓冲液 (PBS, 北京中杉公司), siRNA-FBXO22 及对照 siRNA (Control siRNA) (苏州吉玛公司), SiLent Fect Lipid Reagent 转染试剂 (Bio-Rad 公司, 美国), Transwell 试剂盒 (南京凯基生物公司), FBXO22、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 和 MDM2 抗体 (Protein tech 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 SW620 细胞, 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 HCT116 细胞, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染

转染前 1 d 取对数生长期 SW620 及 HCT116 细胞, 按每孔 1×10^6 个细胞分别接种在小皿中, 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞长至密度为 30%~50% 时, 按照 SiLentFect Lipid Reagent 转染试剂说明书进行转染, 使用相应的培养基将 siRNA 5 μ L 和 SiLentFect Lipid Reagent 10 μ L 分别稀释至 250 μ L, 混匀后室温放置 5 min, 然后将二者混匀, 室温放置 20 min 后加入小皿中, 37 °C 5% CO₂ 继续培养, 24 h 内换新鲜完全培养基。蛋白免疫印迹法检测转染效率。

1.2.3 细胞侵袭迁移实验

细胞培养、接种培养板及转染同前。提前 12 h 在小室底部添加 50 μ L 稀释好的 Matrigel 胶。胰酶消化已转染过的结肠癌细胞, 用 PBS 和无血清培养基各洗涤 1 次, 用无血清培养基悬浮细胞, 调整浓度为 1×10^6 个/mL; 在 24 孔板底部加入 600 μ L 含有 10% 血清的培养基, 上室加入 200 μ L 的细胞悬液, 继续在培养箱中培养 24 h; 24 h 后, 用镊子小心取出小室, 吸干上室液体, 移到事先加入 800 μ L 甲醇的 24 孔板孔中, 室温固定 30 min; 取出小室, 吸干上室液体, 移入事先加入 800 μ L 结晶紫的孔中, 室温染色 30 min; 用 PBS 轻轻冲洗数次, 取出上室, 吸干上室液体, 用湿棉签小心擦去上室底部膜表面上的细胞; 显微镜下随机取 5 个视野计数, 统计结果。

1.2.4 Western blot

Western blot 检测 FBXO22、MMP-2、MMP-9 和 MDM2 蛋白表达水平。收集转染 48 h 后的各组细胞, 裂解液后提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后, 分别取 100 μ g 蛋白, 变性后经 SDS-PAGE 电泳分

离, 经湿转仪湿转 120 min, 将蛋白转于 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 4 °C 过夜, 次日 37 °C 复温 30 min, 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗常温孵育 2 h 后缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min。电化学发光 (ECL) 液显色后拍照, 选用 GAPDH 为内参。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测细胞转染效率

蛋白免疫印迹法检测 SW620 及 HCT116 细胞的 FBXO22-siRNA 转染效率。与 Control siRNA 相比, siRNA 转染后 FBXO22 的蛋白表达量明显下降。提示 FBXO22-siRNA 可以下调结肠癌 SW620 及 HCT116 细胞中 FBXO22 的表达 (图 1)。

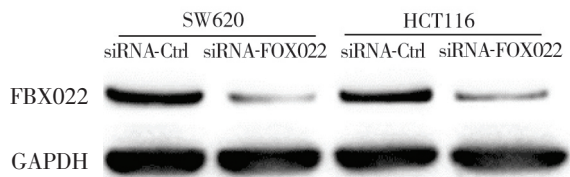


图 1 Western blot 检测转染后结肠癌 FBXO22 的表达水平
Figure 1 Western blot showed expression levels of FBXO22 after transfection of colon cells

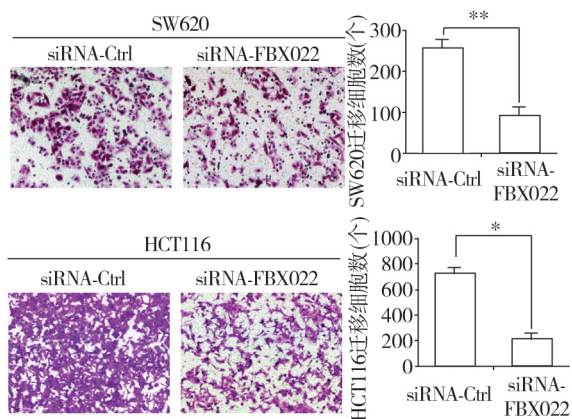
2.2 沉默 FBXO22 基因对结肠癌细胞侵袭迁移能力的影响

Transwell 细胞迁移实验显示: 在 2 种结肠癌 SW620 和 HCT116 细胞中 siRNA-FBXO22 组穿过 Transwell 小室的细胞数目分别减少了 64% 和 72%, 两组比较差异具有显著的统计学意义 ($P < 0.05$), 提示沉默 FBXO22 基因后结肠癌细胞的迁移能力减弱 (图 2)。

细胞侵袭实验也得到了相似结果: 与 siRNA-Ctrl 组相比, 2 种结肠癌细胞 siRNA-FBXO22 组穿过 Transwell 小室的细胞的数目分别减少了 52% 和 76%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明干扰 FBXO22 基因后能抑制结肠癌细胞的侵袭 (图 3)。

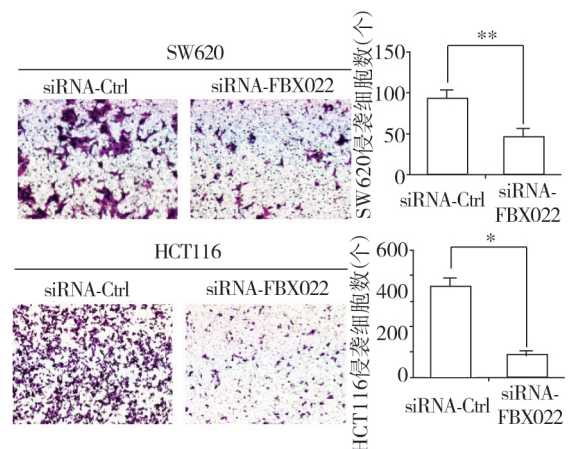
2.3 干扰 FBXO22 基因对 MMP-2、MMP-9 和 MDM2 蛋白表达的影响

Western Blot 实验检测与细胞迁移侵袭能力相关的蛋白变化, 结果显示, FBXO22 表达降低后, 2 种结肠癌细胞 MMP-2、MMP-9 的表达量下降, MDM2 表达上调 (图 4)。



与对照组比较,干扰组穿过的细胞数明显减少,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 2 干扰 FBXO22 对 2 种结肠癌细胞迁移能力的影响($\times 400$)
Figure 2 Influence of migration ability of colon cancer cells after interference of FBXO22($\times 400$)

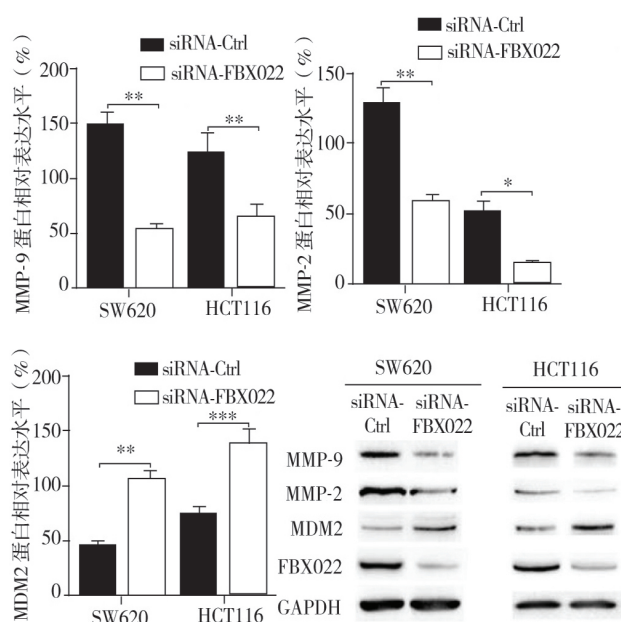


与对照组比较,干扰组穿过的细胞数明显减少,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 干扰 FBXO22 对 2 种结肠癌细胞侵袭能力的影响($\times 400$)
Figure 3 Influence of invasion ability of colon cancer cells after interference of FBXO22 ($\times 400$)

3 讨论

目前普遍观点认为,F-box 在泛素-蛋白酶体降解系统中发挥重要作用^[4-5];作为 SCF E3 泛素连接酶复合物的主要支架,通过对其底物的泛素化调节,参与细胞周期、信号转导等多种生物学反应,影响肿瘤细胞的生物学行为^[6]。FBXO22 作为 F-box 蛋白的一种,定位于人类染色体 15q24.2,至今其作用机制还未能被明确阐述^[7]。FBXO22 第 1 次被人们所认识是作为 P53 的靶向基因^[8],而后又有研究发现 FBXO22 可与组蛋白脱甲基酶 (KDM4) 形成复合物发挥其生物学效应^[9]。有文献报道,FBXO22-KDM4 复合物作为 1 种 E3 泛素连接酶,可以与甲基化的 P53 形成三元复合体减缓细胞增殖^[7]。亦有研究报道 SCF 可调控细胞周期相关蛋白及细胞中期调控因子



两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 2 种结肠癌细胞中基质金属蛋白酶表达的灰度分析和 Western blot 检测
Figure 4 Gray scale analysis and western blot of MMPs of colon cancer cells

p21、p27,参与细胞周期的进行^[10-11]。FBXO22 作为 SCFFBXO22 中的底物识别成分,可能在肾癌细胞的迁移、侵袭中发挥作用^[12]。本研究也证实,干扰 FBXO22 基因的表达后结肠癌细胞迁移、侵袭能力明显下降。

肿瘤细胞的转移需要穿透基底膜和细胞外基质,MMPs 是降解上皮细胞基底膜(BM)和细胞外基质(ECM)的主要酶类之一,可以降解细胞外基质中的蛋白成分,破坏组织学屏障,对肿瘤转移具有重要影响^[13];体外实验表明抑制结肠癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达后可有效抑制细胞转移能力^[14];同时,MMP-2 和 MMP-9 在结肠癌组织中表达增高,两者的表达水平与 TNM 分期和淋巴结转移相关,可以作为判断肿瘤分化程度和临床分期的重要指标,并为判断预后和个体化治疗提供参考依据^[15-16]。本研究证实,干扰 FBXO22 基因后 2 种结肠癌细胞的 MMP-2 和 MMP-9 的表达量减少,FBXO22 对结肠癌细胞迁移、侵袭能力的影响是通过 MMP-2 和 MMP-9 而实现的。

研究报道,MDM2 作为一种与恶性肿瘤密切相关的癌基因,在许多肿瘤中处于过表达状态,它能与 p53 蛋白结合,调节 MDM2-p53 负反馈循环^[17],MDM2 可以通过诱导 MMPs 的分泌,从而促进肿瘤细胞的迁移、侵袭^[18]。但在本研究中 MDM2 的表达

量上升,因此本文推断:FBXO22 对结肠癌细胞迁移、侵袭能力的影响与 MDM2 无关。FBXO22、MDM2、MMPs 以及其他细胞因子在结肠癌中的相互联系及调控机制,仍有待深入研究。

综上所述,沉默 FBXO22 基因表达后可抑制结肠癌细胞侵袭和迁移,其作用可能通过 MMP-2 和 MMP-9 而实现,该基因有可能成为肿瘤生物治疗的重要靶点。

[参考文献]

- [1] Fang S, Lorick KL, Jensen JP, et al. RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2003, 13(1):5-14
- [2] Chen J, Shen BY, Deng XX, et al. SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated DRG2 degradation facilitated chemotherapeutic drugs induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(3):651-655
- [3] Tian X, Dai S, Sun J, et al. F-box protein FBXO22 mediates polyubiquitination and degradation of KLF4 to promote hepatocellular carcinoma progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22767-22775
- [4] Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(9): 739-751
- [5] Ho MS, Ou C, Chan YR, et al. The utility F-box for protein destruction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(13):1977-2000
- [6] Bochis OV, Fetica B, Vlad C, et al. The importance of ubiquitin E3 ligases, SCF and APC/C, in human cancers [J]. *Clujul Medical*, 2015;88(1):9-14
- [7] Johmura Y, Sun J, Kitagawa K, et al. SCF (Fbxo22) KDM4A targets methylated p53 for degradation and regulates senescence[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:10574
- [8] Vrba L, Junk DJ, Novak P, et al. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 86
- [9] Huang X, Dixit VM. Cross talk between ubiquitination and demethylation[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(18):3682-3683
- [10] Burrows AC, Prokop J, Summers MK. Skp1-Cull1-F-box ubiquitin ligase (SCF β TrCP)-mediated destruction of the ubiquitin-specific protease USP37 during G2-phase promotes mitotic entry [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (46): 39021-39029
- [11] Kanatsu-Shinohara M, Onoyama I, Nakayama KI, et al. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(24):8826-8831
- [12] 高亮, 白津, 郑骏年, 等. FBXO22 基因在肾癌细胞侵袭中的作用及相关机制研究[J]. *徐州医学院学报*, 2016, 36(3):141-145
- [13] Joaquín A. Matrix metalloproteases and tumor invasion [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(19):2020-2021
- [14] Hsu HH, Kuo WW, Day CH, et al. Taiwanin E inhibits cell migration in human LoVo colon cancer cells by suppressing MMP-2/9 expression via p38 MAPK pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(8):2021-2031
- [15] 秦冰, 瞿峰. TIMP-1、MMP-2、MMP-9 在大肠癌组织中表达的临床意义[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2008, 17(11):890-892
- [16] 王文辉, 齐元玲, 徐谦, 等. 肿瘤转移抑制基因 KISS-1 蛋白、基质金属蛋白酶-2 和血管内皮生长因子在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(3):415-417
- [17] Turbin DA, Cheang MC, Bajdik CD, et al. MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(1):69-74
- [18] Xiaofeng C, Jinrong Q, Dapeng Y, et al. MDM2 promotes invasion and metastasis in invasive ductal breast carcinoma by inducing matrix metalloproteinase-9[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):78794

[收稿日期] 2017-05-13

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!