

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.04.002

❖ 基础研究 ❖

# FBXO22 对宫颈癌细胞增殖、侵袭的影响及作用机制

秦业强, 王春晓, 窦晓梦, 高福贤

(沧州市人民医院颐和院区妇科, 河北 沧州 061000)

**【摘要】目的:** 分析 FBXO22 对宫颈癌细胞增殖、侵袭的影响, 并探讨其作用机制。**方法:** 对宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞各进行 siRNA-Ctrl, siRNA-FBXO22 转染, 采用 Western blot 检测转染后宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞中 F-box 蛋白 22 (FBXO22) 表达水平, CCK-8 实验检测宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞增殖情况, Transwell 细胞迁移实验检测宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞侵袭情况, Western blot 检测细胞侵袭相关蛋白基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、MMP-9 和细胞外信号调节激酶 (ERK) 的表达水平。**结果:** siRNA-FBXO22 组转染后的宫颈癌细胞 FBXO22 蛋白表达水平低于 siRNA-Ctrl 组 ( $P < 0.05$ ); 宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 组细胞增殖率均低于 siRNA-Ctrl 组 ( $P < 0.05$ ); 宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 组穿过 Transwell 小室的细胞数目均低于 siRNA-Ctrl 组 ( $P < 0.05$ ); Western blot 实验结果显示, FBXO22 表达降低后, 宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞增殖侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 ERK 的表达量均明显下降 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 下调 FBXO22 表达可以抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭, 其作用机制可能是通过调节 MMPs/ERK 信号通路实现。

**【关键词】** 宫颈癌; FBXO22; 增殖; 侵袭; 机制

**【中图分类号】** R737.33 **【文献标志码】** A

## The effect and mechanism of FBXO22 on the proliferation and invasion of cervical cancer cells

QIN Ye-qiang, WANG Chun-xiao, DOU Xiao-meng, GAO Fu-xian

(Department of Gynecology, Yihe District of Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China)

**【Abstract】Objective:** To analyze the effect of FBXO22 on the proliferation and invasion of cervical cancer cells and explore its mechanism of action. **Methods:** Transfection of siRNA-Ctrl, siRNA-FBXO22 in cervical cancer HeLa and SiHa cells, and the protein expression levels of FBXO22 proteins in cervical cancer HeLa and SiHa cells after transfection were determined by Western blot, CCK-8 assay was used to detect the proliferation of cervical cancer HeLa and SiHa cells, Transwell cell migration assay was used to detect the invasion of cervical cancer HeLa and SiHa cells, and Western blot was used to detect the invasion related protein matrix metalloproteinase-2, the expression levels of MMP-9 and extracellular signal-regulated kinase (ERK). **Results:** The expression level of FBXO22 protein in the siRNA FBXO22 group after transfection was significantly lower than that in the siRNA Ctrl group ( $P < 0.05$ ). The proliferation rate of cervical cancer HeLa and SiHa cells in the siRNA FBXO22 group was lower than that in the siRNA Ctrl group ( $P < 0.05$ ). The number of cells passing through Transwell compartments in the siRNA FBXO22 group of cervical cancer HeLa and SiHa cells was lower than that in the siRNA Ctrl group ( $P < 0.05$ ). The results of Western Blot experiments showed that after the decrease of FBXO22 expression, the expression levels of MMP-2, MMP-9, and ERK related to proliferation and invasion of cervical cancer HeLa and SiHa cells were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Downregulation of FBXO22 expression can inhibit the proliferation and invasion of cervical cancer cells, and its mechanism of action may be achieved by regulating the MMPs/ERK signaling pathway.

**【Key words】** Cervical cancer; FBXO22; Proliferation; Invasion; Mechanism

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 对女性生殖系统、生活质量、身心健康均造成极大危害, 原发性宫颈癌患者 5 年生存率为 49% ~ 52.5%<sup>[1]</sup>。宫颈癌细胞恶性增殖和侵袭是导致患者病情加重的主要原因, 研究<sup>[2]</sup>显示, 大部分宫颈癌相关死亡多是因肿瘤发生远处转移所致。为控制宫颈癌进展, 改

善患者预后, 了解宫颈癌增殖和侵袭的关键因子显得尤为重要。泛素-蛋白酶体功能对细胞生长及分化起到了重要作用, 与恶性肿瘤发生和发展存在密切关联<sup>[3]</sup>。而 F-box 蛋白是组成 SCF E3 泛素连接酶复合体的重要成分, 对维持泛素连接酶功能具有重要作用, 若其表达异常, 容易影响细胞信号通路传

导,继而引起细胞增殖和分化异常<sup>[4]</sup>。F-box 蛋白 22 (FBXO22)属于 F-box 蛋白之一,其生物学功能仍处于探索中,但报道<sup>[5]</sup>指出,其可通过介导泛素依赖性降解肿瘤抑制因子 KLF4 来影响肿瘤细胞。目前 FBXO22 与宫颈癌细胞恶性生物学行为的关系尚不清楚。因此,本研究拟通过细胞实验分析 FBXO22 对宫颈癌细胞增殖和侵袭的影响,并探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞(中国科学院上海生物化学及细胞生物研究所),FBXO22-siRNA(上海吉玛公司),FBXO22 抗体、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)抗体、MMP-9 抗体、细胞外信号调节激酶(ERK)抗体及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 BD 公司),DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司),DYCP-44P 型凝胶电泳仪(广州深华生物技术有限公司),磷酸盐缓冲液(上海源叶生物科技有限公司),Silent Fect Lipid Reagent 转染试剂(上海烜雅生物科技有限公司),Transwell 试剂盒(上海纪宁生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清,分别进行宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞培养,培养箱环境:37 °C,5% CO<sub>2</sub>。

1.2.2 细胞转染 取对数生长的宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞,以在 6 孔板中铺 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞/孔接种于小皿中,置于培养箱(37 °C,5% CO<sub>2</sub>)中培养,当细胞生长至密度达到 60% ~ 70% 时,进行转染。Ctrl-siRNA 上游引物为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游引物为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGATT-3'; FBXO22-siRNA 上游引物为 5'-GGUGGGAGCCAGUAAUUAUTT-3',下游引物为 5'-AUAUUAC UGGCUCCACCTT-3'。将 siRNA、Silent Fect Lipid Reagent 转染试剂稀释到 250 μL,室温静置 5 min,之后将两者混匀,室温下静置 20 min,再将复合物加入小皿中,培养箱(37 °C,5% CO<sub>2</sub>)中培养,24 h 内更换新鲜的完全培养基继续培养,检测宫颈癌细胞中 FBXO22 蛋白表达水平以评估转染效率。后续实验中将宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞各分成 siRNA-Ctrl 组和 siRNA-FBXO22 组。

1.2.3 CCK-8 实验 以 6 × 10<sup>3</sup> 个细胞/孔的浓度在 96 孔板中接种宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞,再于培养箱中孵育 24 h,加入 CCK-8 溶液,10 μL/每孔,孵

育 2 h 后去上清,加入 DMSO 150 μL/孔,采用低速振荡 5 min,波长在 450 nm 处吸光度(OD 值),计算宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞的增殖率。各组设 6 个复孔,独立重复实验 3 次。

1.2.4 Transwell 实验 将 -20 °C 的基质胶在 4 °C 环境中液化,通过培养基以 9:1 的比例稀释基质胶,培养基:基质胶 = 9:1,Transwell 小室内铺上 40 μL 稀释的基质胶,置于培养箱(37 °C,5% CO<sub>2</sub>)中过夜。使用胰酶对转染过的宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞进行消化,无血清培养基重悬细胞,并将其浓度调整为 4 × 10<sup>8</sup> 个/L;上室、下室分别加入 200 μL 的细胞悬液、700 μL 含 15% 血清的培养基,培养,显示有细胞穿出便可终止实验。使用 PBS 冲洗 3 次,再利用 90% 的甲醛固定,结晶紫溶液染色,显微镜下随机选取 5 个视野计数和拍照。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot) 向转染后的宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞中加入 RIPA 裂解液,提取细胞总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度,取 50 μg 总蛋白予以凝胶电泳,将凝胶置于 PVDF 膜上湿转仪中湿转 120 min,脱脂奶粉封闭 2 h,根据 Mark 对应位置剪出所需条带,加入一抗后在 4 °C 环境中孵育过夜,洗膜,二抗在 37 °C 水浴箱中孵育 1 h 后,TBST 液洗涤 3 次,加入显色液,通过凝胶成像系统检测蛋白条带表达情况,内参半定量分析宫颈癌细胞增殖侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 ERK 的蛋白表达水平,以 GAPDH 为内参。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析。计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 转染后宫颈癌细胞中 FBXO22 蛋白表达水平 宫颈癌 HeLa 及 SiHa 细胞的 siRNA-FBXO22 组转染后 FBXO22 蛋白表达水平均低于 siRNA-Ctrl 组 (*P* < 0.05)。见图 1-图 3。

2.2 siRNA-FBXO22 干扰对宫颈癌细胞增殖的影响 宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 组细胞增殖率均低于 siRNA-Ctrl 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 4-图 5。

2.3 siRNA-FBXO22 干扰对宫颈癌细胞侵袭的影响 宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 组穿过 Transwell 小室的细胞的数目均低于 siRNA-Ctrl 组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。见图 6。

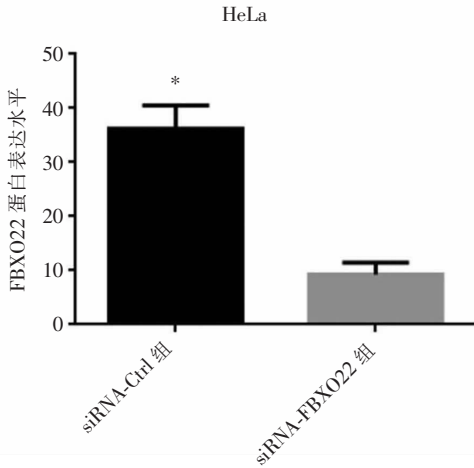


图1 宫颈癌 HeLa 细胞 siRNA-Ctrl 组与 siRNA-FBXO22 组转染后 FBXO22 蛋白表达水平  
\* $P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

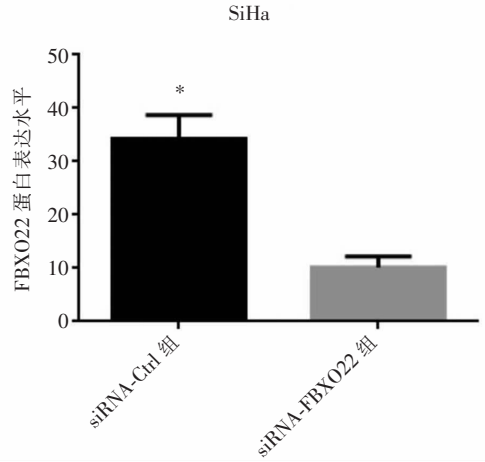


图2 宫颈癌 SiHa 细胞 siRNA-Ctrl 组与 siRNA-FBXO22 组转染后 FBXO22 蛋白表达水平  
\* $P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

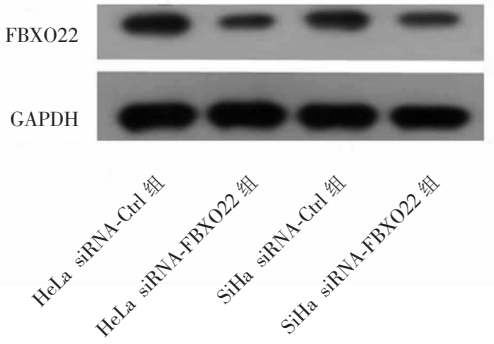


图3 转染后宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞中 FBXO22 蛋白条带图

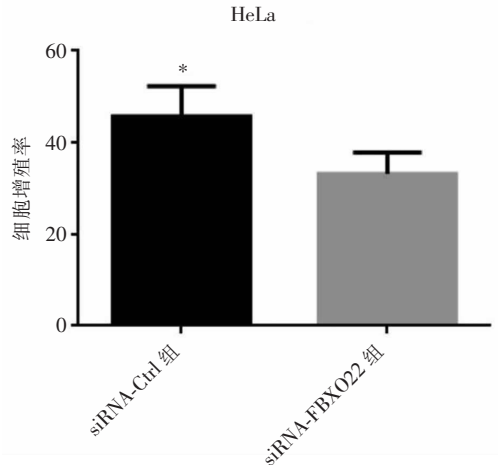


图4 siRNA-FBXO22 干扰对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响  
\* $P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

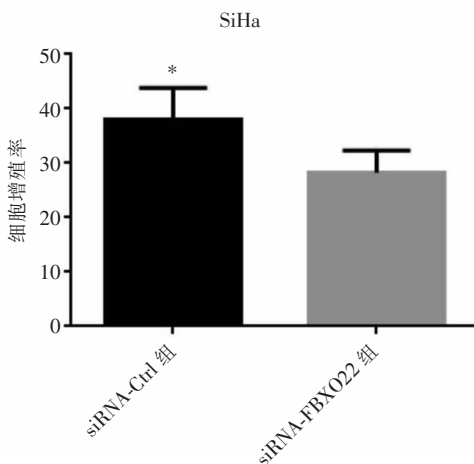


图5 siRNA-FBXO22 干扰对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响  
\* $P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

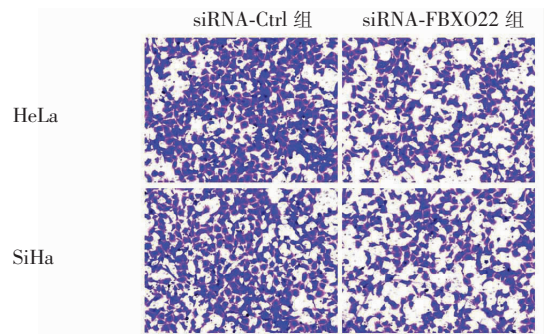


图6 siRNA-FBXO22 对宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞侵袭的影响 (400×)

## 2.4 siRNA-FBXO22 干扰对 MMP-2、MMP-9 和 ERK 蛋白表达水平的影响

FBXO22 表达降低后,宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞增殖侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 ERK 的表达水平明显下降( $P < 0.05$ )。见图 7-图 9。

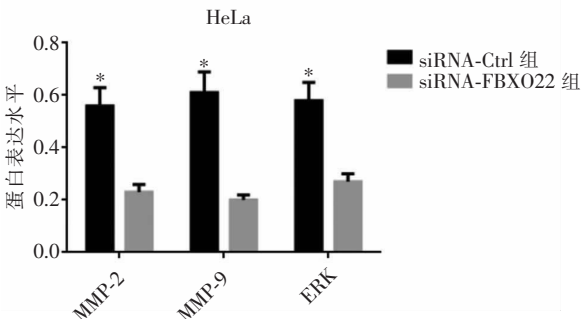


图 7 Western blot 检测宫颈癌 HeLa 细胞 siRNA-FBXO22 干扰后 MMP-2、MMP-9 和 ERK 蛋白表达水平  
 $*P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

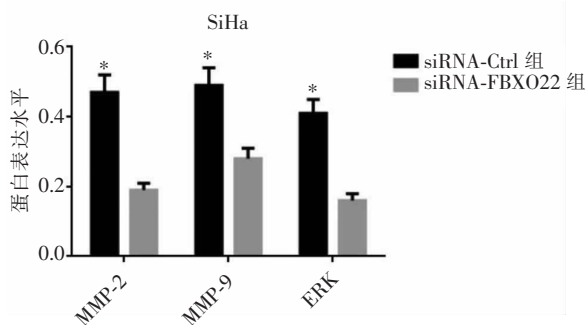


图 8 Western blot 检测宫颈癌 SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 干扰后 MMP-2、MMP-9 和 ERK 蛋白表达水平  
 $*P < 0.05$ , 与 siRNA-FBXO22 组比较。

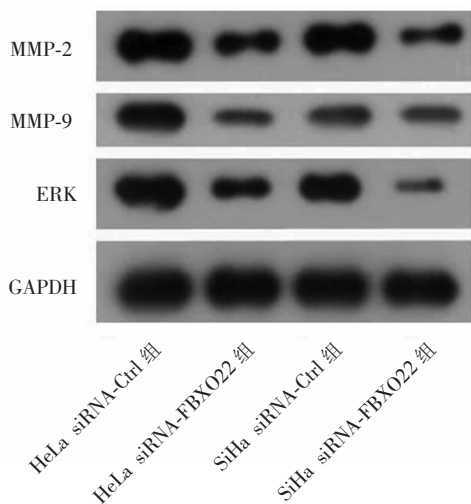


图 9 Western blot 检测 siRNA-FBXO22 干扰后 MMP-2、MMP-9 和 ERK 蛋白表达水平

## 3 讨论

F-box 蛋白包括 Fbws、Fbls 和 Fbxs。FBXO22 蛋白属于 Fbxs,该基因位于人类染色体 15q24.2 上,人们对 FBXO22 生物学功能的了解程度尚较浅,其首次被认识是因能够降解甲基化 p53 的衰老相关 E3 连接酶,后来国内外相关研究<sup>[6]</sup>发现,FBXO22 与恶性肿瘤也存在一定关联。Bai 等<sup>[7]</sup>研究显示,FBXO22 可以靶向降解 HDM2 并调节乳腺癌细胞侵袭和转移。实验<sup>[8]</sup>发现,敲除 FBXO22 能够抑制裸鼠体外细胞生长和肿瘤形成,而过表达 FBXO22 会增加细胞活力。刘滕迪等<sup>[9]</sup>研究显示,敲低 FBXO22 能够促进结肠癌细胞凋亡,过表达 FBXO22 则可以抑制结肠癌细胞凋亡。还有研究<sup>[10]</sup>发现,FBXO22 可以通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 途径抑制黑色素瘤细胞迁移、侵袭等生物学行为,同时还可以抑制肿瘤内血管生成。高亮等<sup>[11]</sup>研究显示,FBXO22 能够通过抑制 MMP-9 表达来抑制肾细胞癌转移。有研究<sup>[12]</sup>表示,FBXO22 可通过 MAPK/ERK 通路促进上皮性卵巢癌生长和转移,还能抑制肿瘤细胞自噬。以上研究表明,FBXO22 与多种恶性肿瘤的增殖、迁移、侵袭、凋亡等行为密切相关。但 FBXO22 是否会影响宫颈癌细胞的增殖、侵袭等行为还未知晓,癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析发现,FBXO22 在宫颈癌患者中呈高表达状态,可认为 FBXO22 可能与宫颈癌有关。

本研究通过 siRNA 转染宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞下调 FBXO22 表达水平,结果显示,siRNA-FBXO22 组转染后 FBXO22 蛋白表达水平显著低于 siRNA-Ctrl 组( $P < 0.05$ ),提示 siRNA-FBXO22 能够下调宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞中 FBXO22 的表达水平。而细胞增殖和侵袭实验显示,宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞 siRNA-FBXO22 组细胞增殖率以及穿过 Transwell 小室的细胞的数目均低于 siRNA-Ctrl 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明干扰 FBXO22 基因表达能抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭。ERK 信号转导通路可以降低细胞外的刺激信号传导到细胞内,并促使下游底物磷酸化,在细胞增殖和分化中具有重要作用<sup>[13-14]</sup>。MMPs 在肿瘤细胞侵袭过程中通过降解细胞外基质(ECM)的蛋白成分,促使肿瘤细胞穿透基底膜和 ECM。ECM 是细胞外的结构支架,包含许多蛋白质如胶原蛋白,纤维连接蛋白和蛋白多糖等。MMPs 具有针对这些蛋白质的降解活性,能够分解 ECM 的结构,从而打开肿瘤细胞侵袭

的通道,由于 ECM 结构破坏,肿瘤细胞可以更容易地穿过基底膜和 ECM 并侵入周围组织或进入血液或淋巴系统,从而实现远处转移<sup>[15-17]</sup>。细胞实验<sup>[18]</sup>显示,宫颈癌细胞中 MMPs 呈高表达水平。临床研究<sup>[19-20]</sup>也显示,宫颈癌患者血清中 MMP-9 表达水平升高。本研究中 Western blot 实验结果显示,FBXO22 表达降低后,宫颈癌 HeLa、SiHa 细胞增殖侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 ERK 的表达水平明显下降( $P < 0.05$ ),即 FBXO22 表达降低与细胞增殖侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 和 ERK 有关,FBXO22 可能是通过影响 MMPs/ERK 信号通路来促进宫颈癌细胞增殖和侵袭。

综上,FBXO22 与宫颈癌细胞增殖、侵袭有关,下调 FBXO22 表达可以抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭,其作用机制可能是通过调节 MMPs/ERK 信号通路实现,可将 FBXO22 作为宫颈癌治疗的潜在靶点。

#### 参考文献

- [1] 张灿,张国楠. 盆腔廓清术在原发及复发性宫颈癌中应用的系统评价[J]. 现代妇产科进展,2020,29(2):92-97.
- [2] 颜文娟,朱慧婷. 宫颈癌患者根治性手术辅助化疗后复发的早期死亡影响因素分析[J]. 医学研究生学报,2021,34(10):1073-1076.
- [3] 王玉秀,闵凌峰. 泛素-蛋白酶体系统在非小细胞肺癌中作用机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2020,40(4):297-301.
- [4] 张梦园,潘锐,谭乐勇,等. 稻瘟病菌 F-box 蛋白 MoFbr7 生物学功能分析[J]. 植物保护,2019,45(1):19-24,43.
- [5] Ge MK, Zhang N, Xia L, et al. FBXO22 degrades nuclear PTEN to promote tumorigenesis[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1720.
- [6] Johmura Y, Maeda I, Suzuki N, et al. Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(12):5603-5619.
- [7] Bai J, Wu K, Cao MH, et al. SCF<sup>FBXO22</sup> targets HDM2 for degradation and modulates breast cancer cell invasion and metastasis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(24):11754-11763.
- [8] 张辉林,朱晓娜,杨烁,等. Fbxo22 基因敲除小鼠模型的建立和表型研究[J]. 上海交通大学学报(医学版),2019,39(4):353-357.
- [9] 刘朦迪,潘漪莲,朱晓娜,等. FBXO22 调控凋亡诱导因子的分子机制及其在肿瘤细胞凋亡中的作用[J]. 上海交通大学学报(医学版),2021,41(4):427-433.
- [10] Zheng Y, Chen H, Zhao Y, et al. Knockdown of FBXO22 inhibits melanoma cell migration, invasion and angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway[J]. Investigational New Drugs, 2020, 38(1): 20-28.
- [11] 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.
- [12] Li M, Zhao X, Yong H, et al. FBXO22 promotes growth and metastasis and inhibits autophagy in epithelial ovarian cancers via the MAPK/ERK pathway [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 778698.
- [13] 赵慧,杨敏,苏牧,等. ERK 信号通路在 TGF- $\beta$ 1 介导人成骨样细胞增殖、分化中的作用[J]. 军事医学,2020,44(11):827-831.
- [14] 陈政,徐大勇,杨科. ERK-VEG FMMP-9 信号通路 with 直肠癌细胞增殖和血管新生的关联[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(12):5828-5835.
- [15] 徐恩伟,杨洁,张玲. TSTA3 基因通过 MAPK-ERK 通路及下游基质金属蛋白酶 2.9 促进食管癌侵袭的实验研究[J]. 中华病理学杂志,2022,51(1):50-52.
- [16] 刘婧婷,隆建萍,刘倩,等. MicroRNAs 调控基质金属蛋白酶与乳腺癌发生发展和转移的生物信息学分析[J]. 重庆医科大学学报,2021,46(10):1228-1233.
- [17] 潘成云,刘萍,王季石. 基质金属蛋白酶 14 在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学,2023,52(15):2357-2361.
- [18] 许娟秀,吴海根. 沉默 HBXIP 通过抑制 miR-135a 调控宫颈癌 CaSki 细胞的 SCAI 表达、上皮-间充质转化和糖酵解[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(8):1423-1431.
- [19] 杨碧锋,周晓明. 血清炎症因子、肿瘤标志物、血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 表达在宫颈癌中的临床价值研究[J]. 中国妇幼保健,2019,34(1):70-72.
- [20] 张亚军,王丹凤. 宫颈癌患者的临床病理特点及 P16 基质细胞衍生因子-1 基质金属蛋白酶-9 血管内皮生长因子-C 表达分析[J]. 中国药物与临床,2021,21(23):3892-3894.

(收稿日期:2023-10-09

修回日期:2023-12-08)