

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.08.005

❖ 基础医学研究 ❖

FBXO28 调控 HIF-1 α 表达水平及其对下游氧化应激相关指标影响在肝癌侵袭的作用机制

梁梓辉^{1,2}, 段小鹏³, 向国安^{1,3}

(1. 南方医科大学第二临床医学院普通外科, 广东 广州 510515; 2. 广州市番禺区第二人民医院外科, 广东 广州 511400; 3. 广东省第二人民医院胃肠外科, 广东 广州 510317)

【摘要】目的: 探讨 F-box 蛋白家族成员 28 (FBXO28) 通过调控缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 及下游氧化应激相关基因的表达影响肝癌侵袭的作用与机制。**方法:** 培养肝细胞系 THLE-2 和肝细胞癌细胞系 MHCC-LM3。采用 MHCC-LM3 构建 FBXO28 过表达组 (oe-FBXO28 组)、FBXO28 敲低组 (si-FBXO28 组) 及相应对照组 (NC-oe 组、NC-si 组)。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证转染效率。利用 CCK-8 和 EdU 染色实验检测细胞的增殖活性; 采用流式细胞术分析凋亡与周期; 采用 Transwell 评估迁移和侵袭能力; 采用 Western blot 检测上皮间充质转化 (EMT) 相关蛋白上皮钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 通路及 HIF-1 α 、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (KEAP1)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 (NQO1)、谷胱甘肽过氧化物酶 2 (GPX2) 蛋白的表达。在裸鼠皮下分别注射 oe-FBXO28 组、si-FBXO28 组、NC-oe 组、NC-si 组的 MHCC-LM3 细胞建立荷瘤小鼠模型, 观察各组小鼠体内肿瘤的生长。利用苏木精-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织的病理学改变。并利用免疫组织化学法检测肿瘤组织中 HIF-1 α 、KEAP1、PI3K 的表达情况。**结果:** 与 THLE-2 相比, MHCC-LM3 中 FBXO28 的 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)。与 NC-oe 组比, oe-FBXO28 组的细胞增殖活性、迁移/侵袭细胞数、N-cadherin、Vimentin、p-PI3K、p-AKT、HIF-1 α 及氧化应激标志物 (KEAP1、NQO1、GPX2) 水平均显著下降 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 E-cadherin 的表达均显著上升 ($P < 0.05$), si-FBXO28 组的上述指标均呈现相反趋势 ($P < 0.05$)。此外, oe-FBXO28 组荷瘤小鼠的肿瘤体积及质量均减少 ($P < 0.05$), HIF-1 α 、KEAP1、PI3K 的表达均下调 ($P < 0.05$); si-FBXO28 组的上述指标均呈现相反趋势 ($P < 0.05$)。**结论:** FBXO28 通过抑制 HIF-1 α 及氧化应激反应, 下调 EMT 进程, 进而抑制肝癌细胞侵袭, 为肝癌治疗提供潜在靶点。

【关键词】 F-box 蛋白家族成员 28; 缺氧诱导因子 1 α ; 氧化应激; 肝细胞癌; 侵袭

【中图分类号】 R735.7 **【文献标志码】** A

Mechanism of FBXO28 in regulating HIF-1 α expression and its impact on downstream oxidative stress-related indicators in liver cancer invasion

LIANG Zi-hui^{1,2}, DUAN Xiao-peng³, XIANG Guo-an^{1,3}

(1. Department of General Surgery, the Second Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou 510515; 2. Department of Surgery, the Second People's Hospital of Panyu Guangzhou, Guangzhou 511400; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong, China)

【Abstract】Objective: To investigate the role and mechanism of F-box protein 28 (FBXO28) in regulating hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) expression and downstream oxidative stress-related genes in hepatocellular carcinoma (HCC) invasion. **Methods:** Human liver cell line THLE-2 and HCC cell line MHCC-LM3 were cultured. MHCC-LM3 cells were transfected to establish FBXO28 overexpression (oe-FBXO28 group), FBXO28 knockdown (si-FBXO28 group), and corresponding control groups (NC-oe group, NC-si group). Transfection efficiency was validated via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Cell proliferation was assessed using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining. Apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Migration and invasion were evaluated using Transwell assays. Western blot was performed to detect epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin), PI3K/AKT pathway activity, and expression of HIF-1 α , Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), and glutathione peroxidase 2 (GPX2). Tumor-bearing nude mice models were established by subcutaneous injection of oe-FBXO28, si-FBXO28, NC-oe, or NC-si

基金项目: 广东省广州市科技计划项目 (2022-01-02-05-0047)

作者简介: 梁梓辉 (1993-), 男, 主治医师。E-mail: 13668954154@163.com

通讯作者: 向国安, 博士。E-mail: guoan_66@163.com

MHCC-LM3 cells to monitor tumor growth. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for histopathological analysis, and immunohistochemistry was applied to assess HIF-1 α , KEAP1, and PI3K expression in tumor tissues. **Results:** FBXO28 mRNA was significantly downregulated in MHCC-LM3 compared to THLE-2 ($P < 0.05$). In the oe-FBXO28 group, CCK-8 absorbance, EdU-positive rate, migrating/invasive cell counts, N-cadherin, Vimentin, phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT), HIF-1 α , and the levels of oxidative stress markers (KEAP1, NQO1, GPX2) were significantly reduced ($P < 0.05$), while apoptosis rate and E-cadherin expression were increased compared to the NC-oe group ($P < 0.05$). Conversely, the si-FBXO28 group showed opposite trends ($P < 0.05$). Tumor volume and weight decreased in oe-FBXO28 group mice, with downregulated HIF-1 α , KEAP1, and PI3K expression ($P < 0.05$), whereas si-FBXO28 group mice exhibited the opposite ($P < 0.05$). **Conclusion:** FBXO28 inhibits HCC cell invasion by suppressing HIF-1 α and oxidative stress, thereby downregulating EMT progression, and represents a potential therapeutic target for HCC treatment.

【Key words】 F-box protein 28; Hypoxia-inducible factor 1 α ; Oxidative stress; Hepatocellular carcinoma; Invasion

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球癌症相关死亡的第三大原因, 其发病率与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、酒精性肝病及代谢相关脂肪性肝病 (metabolically associated fatty liver disease, MAFLD) 等危险因素密切相关^[1]。尽管手术切除、靶向治疗 (如索拉非尼) 和免疫检查点抑制剂的应用改善了部分患者预后, 但晚期 HCC 的 5 年生存率仍不足 20%^[2]。目前临床治疗中面临高效特异性治疗靶点的缺乏, 导致药物耐药性频发^[3]。肿瘤微环境中氧化应激与缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 通路的异常激活, 可促进上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及转移^[4], 但相关调控机制尚未完全阐明。因此, 挖掘新型分子靶点以抑制肝癌细胞增殖、迁移并诱导凋亡, 成为突破治疗困境的关键方向。

F-box 蛋白家族成员 28 (F-box protein 28, FBXO28) 是 F-box 蛋白家族成员, 可通过介导底物泛素化降解参与细胞周期、DNA 损伤修复及氧化应激调控^[5]。近年研究^[5-7] 发现, FBXO28 在肿瘤中具有“双刃剑”作用: 在胰腺癌和卵巢癌中通过稳定 c-Myc 蛋白促进肿瘤增殖, 而在肝细胞癌中可以抑制增殖和侵袭, 但其具体机制存在争议^[7]。另外, 缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 为缺氧响应核心转录因子, 可通过调控糖酵解和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 代谢重塑肿瘤微环境, 但其与 FBXO28 的交互作用在 HCC 中未见报道。此外, FBXO28 是否通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/HIF-1 α 轴影响肝癌细胞 EMT 进程及氧化应激状态, 仍属未知领域。

本研究旨在揭示 FBXO28 在 HCC 中对氧化应激的调控作用和分子机制, 重点探索其对 HIF-1 α 介导的氧化应激和 PI3K/AKT 信号通路的调控作用。通过体内外实验阐明 FBXO28 抑制肝癌增殖、迁移

并诱导凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人永生肝细胞 THLE-2 以及肝细胞癌细胞系 HepG2、Huh7、Hep3B、MHCC-LM3、BEGM 完全培养基和 DMEM 基础培养基均购于武汉普诺赛公司。TRIzol RNA 提取试剂购于美国 Invitrogen 公司。Opti-MEM 减血清培养基购于美国 Gibco 公司。PrimeScript RT 试剂盒和 SYBR Green Premix Ex Taq II 购于日本 Takara 公司。抗上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (neurocadherin, N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、PI3K、AKT、HIF-1 α 、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1, NQO1]、谷胱甘肽过氧化物酶 2 (glutathione Peroxidase 2, GPX2)、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、磷酸化 AKT (p-AKT)、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的一抗以及对应的二抗均购于英国 Abcam 公司。Transwell 小室购于美国 Corning 公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡/周期检测试剂盒购于美国 BD Biosciences 公司。CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司。EdU 检测试剂盒购于广州 RiboBio 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养体系 THLE-2 细胞接种于包被 0.01 mg/mL 人胎盘胶原 (Sigma) 的 25 cm² 培养瓶, 使用 BEGM 完全培养基 (含 52 μ g/mL 牛垂体提取物、5 μ g/mL 胰岛素、10 ng/mL 表皮生长因子), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。HepG2、Huh7、Hep3B、MHCC-LM3 细胞均采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 每 2 天更换 1 次培养基, 细胞密度达 85% 时以 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化传代。

1.2.2 MHCC-LM3 细胞分组与处理 MHCC-LM3

细胞分组与处理:选取生长状态良好的 MHCC-LM3 细胞,分为 4 组。NC-oe 组:转染空载质粒 pcDNA3.1,培养 48 h。oe-FBXO28 组:转染 pcDNA3.1-FBXO28 过表达质粒,培养 48 h。NC-si 组:转染阴性对照 siRNA(广州锐博生物,序列:5'-UUCUCCGAACGU-GUCACGU-3'),培养 48 h。si-FBXO28 组:转染靶向 FBXO28 的 siRNA(锐博生物,序列#1:5'-GGAUC-UACUACGAGCUCAATT-3';序列#2:5'-GCAU-CAAGUUCUACGGAAATT-3';序列#3:5'-GCUGAAGAUUCCAGAAUATT-3'),培养 48 h。各组细胞经 PBS 清洗 3 次后,以预冷 RIPA 裂解液(含 1% 蛋白酶抑制剂)裂解 30 min,离心(12 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)后取上清,分装保存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.2.3 细胞转染方法 将 MHCC-LM3 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板,24 h 后达到 70% 融合度。按每孔 2 μ g 质粒 DNA 与 5 μ L Lipofectamine 3000 分别稀释于 250 μ L Opti-MEM,室温静置 5 min 后混合,孵育 15 min 形成复合物。将复合物逐滴加入孔中,6 h 后更换为完全培养基,继续培养 48 h。siRNA 转染:按每孔 50 nmol/L siRNA 与 7.5 μ L Lipofectamine 3000 分别稀释于 250 μ L Opti-MEM,后续步骤同质粒转染。转染效率验证:转染 48 h 后,收集细胞提取 RNA,通过 RT-qPCR 检测 FBXO28 mRNA 表达水平。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(quantitative Real-Time PCR, RT-qPCR)检测 FBXO28 mRNA 的表达 使用 TRIzol 法提取总 RNA,按每 10^6 个细胞用 1 mL 的 TRIzol 进行裂解,加入 200 μ L 氯仿震荡混匀,4 $^{\circ}$ C 离心(12 000 r/min, 15 min)。取上层水相,500 μ L 异丙醇沉淀 RNA,75% 乙醇洗涤后溶解于 DEPC 水。采用 PrimeScript RT 试剂盒合成 cDNA:20 μ L 反应体系含 4 μ L $5 \times$ 缓冲液、1 μ L RT 酶、1 μ g RNA 模板,42 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,85 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。qPCR 反应体系:SYBR Green Premix Ex Taq II 10 μ L,引物各 0.8 μ L(终浓度 0.4 μ mol/L),cDNA 2 μ L,ddH₂O 补至 20 μ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;熔解曲线分析(65 ~ 95 $^{\circ}$ C,每 0.5 $^{\circ}$ C 升温,持续 5 s),以 GAPDH 为内参基因。最后采用 2- $\Delta\Delta Ct$ 方法计算相对表达量。引物序列如下:FBXO28-正向:5'-CAGCAACTTCGAGGACCTCA-3',反向:5'-TGGTCCAGGTCCATGTTGAT-3';GAPDH-正向:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',反向:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖 将各组 MHCC-LM3 细胞以 3×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板,每孔

体积 100 μ L,每组设 6 个复孔。分别于转染后 24、48、72 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h。使用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(OD 值)。以空白孔(仅培养基 + CCK-8)调零,并记录各时间点 OD 值。

1.2.6 EdU 实验检测细胞 DNA 合成 将细胞接种于 24 孔板(5×10^4 /孔),转染 48 h 加入 10 μ mol/L EdU 工作液(RiboBio 试剂盒),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。弃培养基,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 透化 10 min。加入 Click 反应液(含 Alexa Fluor 594 标记物)避光反应 30 min,DAPI 染核 5 min。荧光显微镜下随机选取 5 个视野,计算 EdU 阳性细胞占比。

1.2.7 流式细胞术检测凋亡与周期 收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次, $1 \times$ 结合缓冲液至 1×10^6 /mL。加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染色液,避光孵育 15 min。流式细胞仪(BD FACSCanto II)检测,分析早期(Annexin V⁺/PI⁻)和晚期(Annexin V⁺/PI⁺)凋亡细胞比例。70% 预冷乙醇固定细胞(4 $^{\circ}$ C,过夜),PBS 洗涤后加入 500 μ L PI/RNase 染色液(含 50 μ g/mL PI、100 μ g/mL RNase A),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。流式细胞仪检测细胞的周期,用 ModFit 软件分析 G1、S、G2/M 期细胞比例。

1.2.8 Transwell 检测细胞的迁移与侵袭 将 2×10^4 细胞重悬于 200 μ L 无血清培养基,加入 Transwell 上室(8 μ m 孔径,未包被基质胶),下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的培养基。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,棉签擦除上室未迁移细胞,采用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 15 min。显微镜下随机选取 5 个视野计数迁移细胞数。检测细胞侵袭:提前以 50 μ L 基质胶(1:8 稀释于无血清 DMEM)包被 Transwell 上室,37 $^{\circ}$ C 固化 4 h。后续步骤同迁移实验,但细胞量为 4×10^4 /孔,培养时间延长至 48 h。

1.2.9 Western blot 检测蛋白表达 抽提细胞中的总蛋白,BCA 法测定浓度,调整至等量上样(30 μ g/孔)。10% SDS-PAGE 电泳(80 V 30 min,120 V 60 min),湿转法转至 PVDF 膜(300 mA,90 min)。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,用 E-cadherin(1:600)、N-cadherin(1:800)、Vimentin(1:900)、PI3K(1:500)、AKT(1:1 000)、HIF-1 α (1:1 000)、KEAP1(1:800)、NQO1(1:500)、GPX2(1:800)、p-PI3K(1:500)、p-AKT(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)的一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min。HRP 标记二抗(1:2 500)室温孵育 1 h,ECL 化学发光显影,ImageJ 软件分析条带灰度值。以目标蛋白灰度值除以

GAPDH 的灰度值,得到标准化后的相对表达水平。

1.2.10 荷瘤小鼠模型建立 SPF 级别 6~8 周龄的雄性裸鼠购自广东省医学实验动物中心[实验动物许可证号:SCXK(粤)2022-0002]。所有实验动物适应性饲养 1 周后开始正式实验。收集对数生长期的 5×10^6 个 MHCC-LM3 细胞(NC-oe 组、NC-si 组、oe-FBXO28 组、si-FBXO28 组)重悬于 1 mL PBS 中。每只小鼠右肩胛骨皮下注射 100 μ L 细胞悬液,每组各 5 只。每日观察小鼠,记录肿瘤形成时间。

1.2.11 肿瘤体积与体质量监测 细胞接种后 0、3、7、14、21、28 d 用游标卡尺测量肿瘤长径(L)和短径(W),按公式 $(L \times W^2)/2$ 计算体积。并于同一时间点称量小鼠体质量,通过肿瘤体积与体质量的动态变化来评估治疗毒性。

1.2.12 肿瘤组织的 HE 染色 处死小鼠后完整剥离肿瘤组织,测量肿瘤质量后,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋。切片机制备 4 μ m 厚切片,60 $^{\circ}$ C 烘片 2 h。苏木素染色 5 min,盐酸酒精分化,伊红染色 2 min,中性树胶封片。光学显微镜观察组织病理学变化。

1.2.13 免疫组织化学 石蜡切片经二甲苯梯度脱蜡及乙醇梯度水化处理,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 10 min,抗原修复(pH 6.0 柠檬酸钠缓冲液,95 $^{\circ}$ C 20 min)。5% BSA 封闭 30 min,滴加 HIF-1 α 和 PI3K 一抗(1:200 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。HRP 标记二抗(1:500)室温孵育 1 h,DAB 显色,苏木素复染,脱水封片。ImageJ 软件分析阳性染色区域积分光密度(IOD),以阴性对照切片校正背景。

1.3 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件对数据进行统计分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件用于绘图。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐性检验通过 Levene 法,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝永生化细胞和 HCC 细胞系中 FBXO28 mRNA 水平比较

与 THLE-2 比,HepG2、Huh7、Hep3B、MHCC-LM3 中的 FBXO28 mRNA 相对表达量均显著下调($P < 0.05$)。其中 MHCC-LM3 中的 FBXO28 mRNA 相对表达量的下调幅度最大($P < 0.05$),故选择 MHCC-LM3 用于后续研究。见图 1。

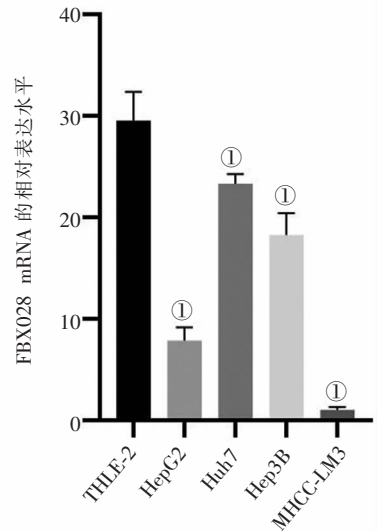


图 1 THLE-2、HepG2、Huh7、Hep3B、MHCC-LM3 中 FBXO28 mRNA 表达的比较($n=3$)
① $P < 0.05$,与 THLE-2 相比。

2.2 FBXO28 过表达与敲低效果验证

与 NC-oe 组相比,oe-FBXO28 组的 FBXO28 mRNA 表达量显著上调($P < 0.05$)。与 NC-si 组相比,si-FBXO28#1、si-FBXO28#2、si-FBXO28#3 组的 FBXO28 mRNA 表达量均显著下调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中 si-FBXO28#3 对 FBXO28 mRNA 表达量的下调效果最优($P < 0.05$),故选择 si-FBXO28#3 用于后续研究。见图 2。

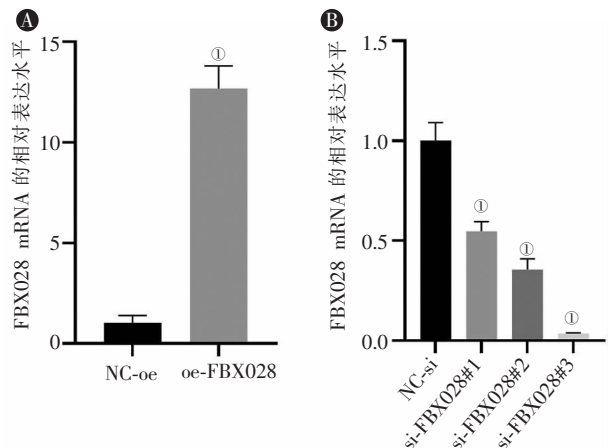
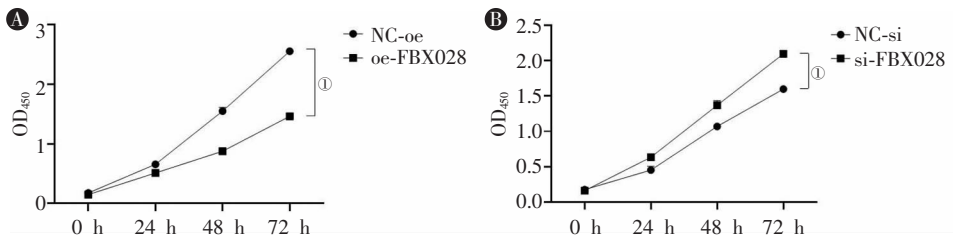


图 2 FBXO28 过表达与敲低效果验证($n=3$)

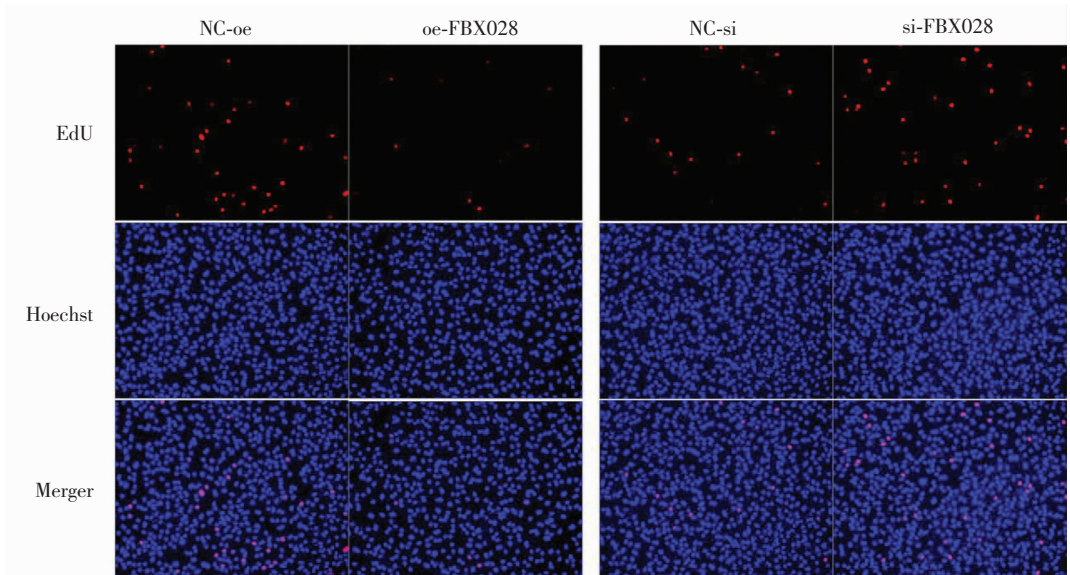
A. NC-oe 组和 oe-FBXO28 组中 FBXO28 mRNA 的表达,① $P < 0.05$,与 NC-oe 组比;B. NC-si 组和 si-FBXO28#1、si-FBXO28#2、si-FBXO28#3 组中 FBXO28 mRNA 的表达水平,① $P < 0.05$,与 NC-si 组比。

2.3 FBXO28 对肝癌细胞增殖能力的影响

与 NC-oe 组相比,oe-FBXO28 组的 CCK-8 吸光度值显著降低($P < 0.05$),EdU 阳性率也降低($P < 0.05$)。与 NC-si 组相比,si-FBXO28 组的 CCK-8 吸光度值增加($P < 0.05$),EdU 阳性率也增加($P < 0.05$)。见图 3、图 4 及表 1。

图3 FBXO28 过表达与敲低对细胞增殖的调控效果 ($n=3$)

A. NC-oe 组和 oe-FBXO28 组细胞的增殖活性变化; B. NC-si 组和 si-FBXO28 组中细胞的增殖活性变化。① $P<0.05$ 。

图4 FBXO28 过表达与敲低对细胞 EdU 染色的调控效果 ($\times 100$)

红色荧光:EdU;蓝色荧光:Hoechst 标记的细胞核。

表1 FBXO28 过表达或沉默对细胞 EdU 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

形式	EdU 阳性率
过表达	
NC-oe 组	35.67 \pm 3.20
oe-FBXO28 组	18.92 \pm 2.15
t 值	21.273
P 值	<0.001
沉默	
NC-si 组	9.85 \pm 1.12
si-FBXO28 组	20.13 \pm 2.05
t 值	16.155
P 值	<0.001

比例显著增加,而 G2 期细胞比例显著减少 ($P < 0.05$)。见图 5 及表 2。

表2 FBXO28 过表达或沉默对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

形式	凋亡率
过表达	
NC-oe 组	6.23 \pm 0.62
oe-FBXO28 组	21.45 \pm 1.25
t 值	21.389
P 值	<0.001
沉默	
NC-si 组	10.79 \pm 2.12
si-FBXO28 组	4.62 \pm 0.51
t 值	16.972
P 值	<0.001

2.4 FBXO28 对肝癌细胞凋亡和周期影响

流式细胞术显示,与 NC-oe 组相比,oe-FBXO28 组的凋亡率显著增加 ($P < 0.05$);与 NC-si 组相比,si-FBXO28 组的凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。此外,与 NC-oe 组相比,oe-FBXO28 组的 G1/S 期细胞比例显著减少,而 G2 期细胞比例显著增加 ($P < 0.05$);与 NC-si 组相比,si-FBXO28 组 G1/S 期细胞

2.5 FBXO28 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 实验显示,与 NC-oe 组相比,oe-FBXO28 组的迁移细胞数显著减少 ($P < 0.05$);与 NC-si 组相比,si-FBXO28 组的迁移细胞数显著增加 ($P < 0.05$)。另外,Transwell 实验显示,与 NC-oe 组

相比, oe-FBXO28 组的侵袭细胞数显著减少 ($P < 0.05$); 与 NC-si 组相比, si-FBXO28 组的侵袭细胞数

显著增加 ($P < 0.05$)。见图 6 及表 3。

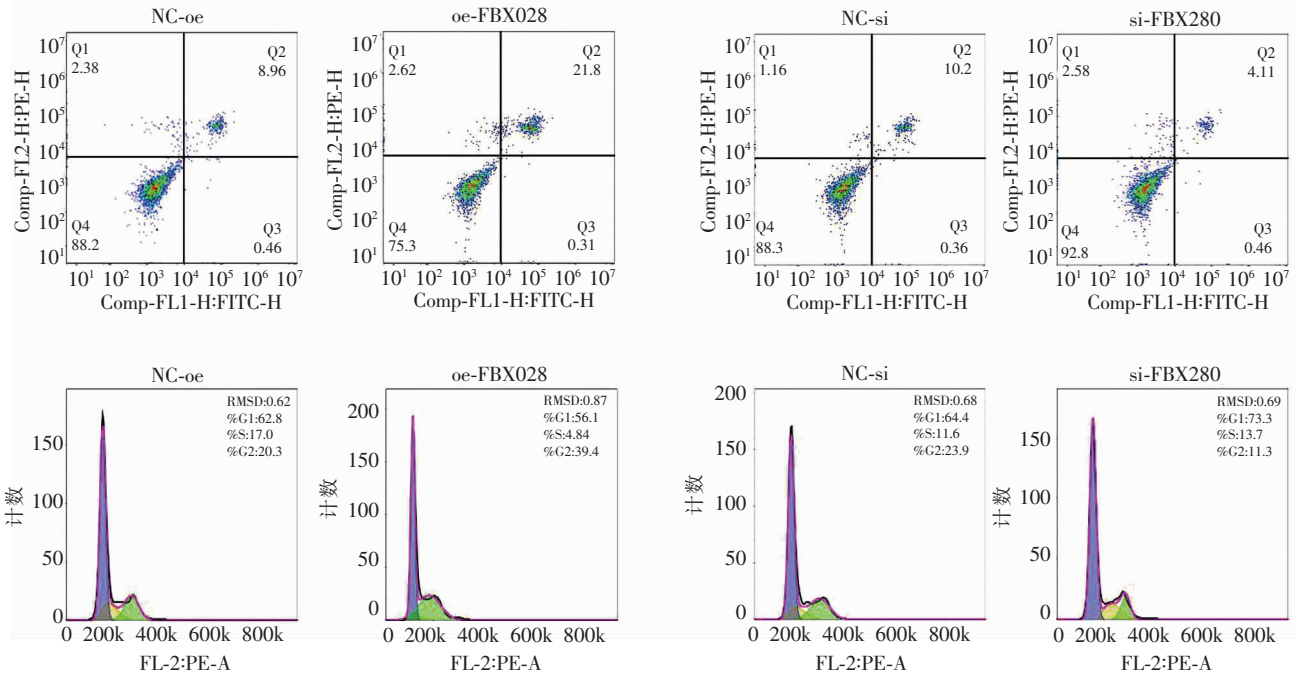


图 5 FBXO28 过表达与敲低对细胞凋亡和细胞周期的调控效果 ($n=3$)

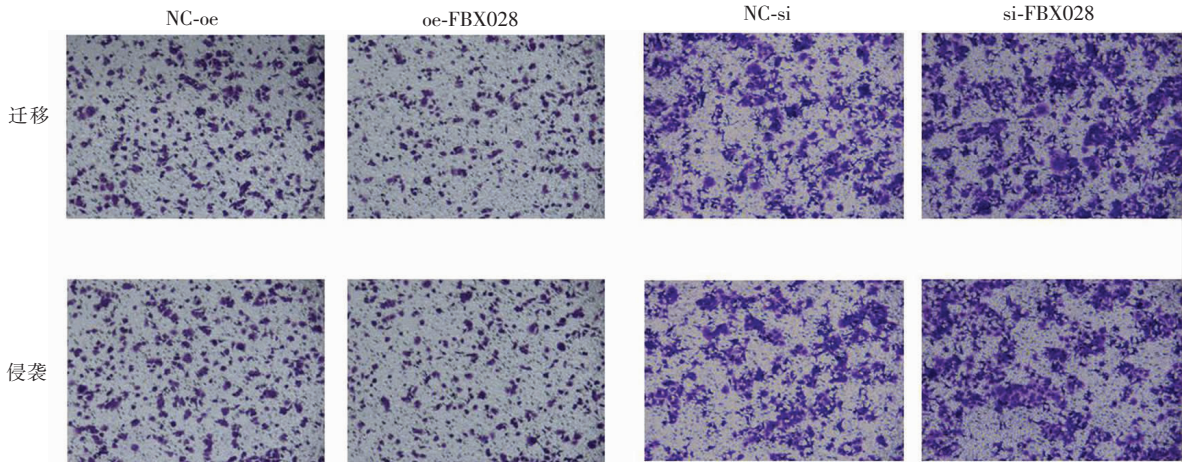


图 6 Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭 (结晶紫染色 $\times 100$, $n=3$)

表 3 FBXO28 过表达或沉默对细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

形式	迁移细胞数	侵袭细胞数
过表达		
NC-oe 组	213.20 \pm 22.87	128.45 \pm 12.35
oe-FBXO28 组	116.33 \pm 7.87	60.12 \pm 5.21
<i>t</i> 值	20.086	15.603
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001
沉默		
NC-si 组	225.89 \pm 6.89	52.67 \pm 3.15
si-FBXO28 组	316.28 \pm 12.06	162.89 \pm 5.42
<i>t</i> 值	15.027	14.188
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.6 FBXO28 对 EMT 相关蛋白的调控

Western blot 结果显示, 与 NC-oe 组相比, oe-FBXO28 组的 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 表达均下调 ($P < 0.05$)。si-FBXO28 组则呈相反趋势, 与 NC-si 组相比, si-FBXO28 组的 E-cadherin 表达下调 ($P < 0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 表达均上调 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.7 FBXO28 对 PI3K/AKT 和 HIF-1 α 表达的调控

与 NC-oe 组相比, oe-FBXO28 组的 PI3K、p-PI3K、p-AKT 和 HIF-1 α 的表达均显著下调 ($P < 0.05$)。与 NC-si 组相比, si-FBXO28 组的 p-PI3K、p-AKT 和 HIF-1 α 的表达均显著上调 ($P < 0.05$)。见图 8。

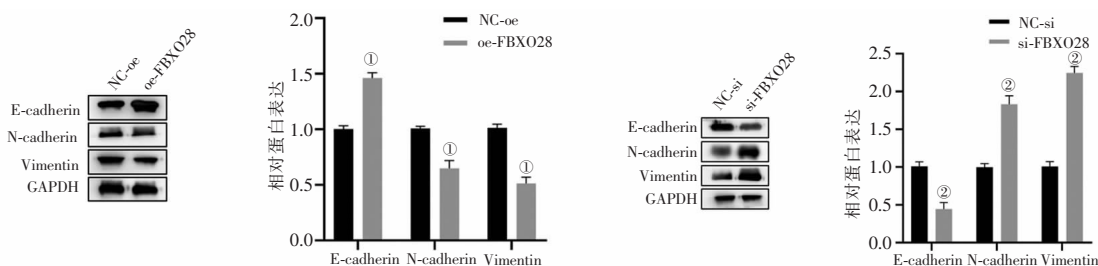


图7 FBXO28 过表达与敲低对细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响 (n=3)

①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

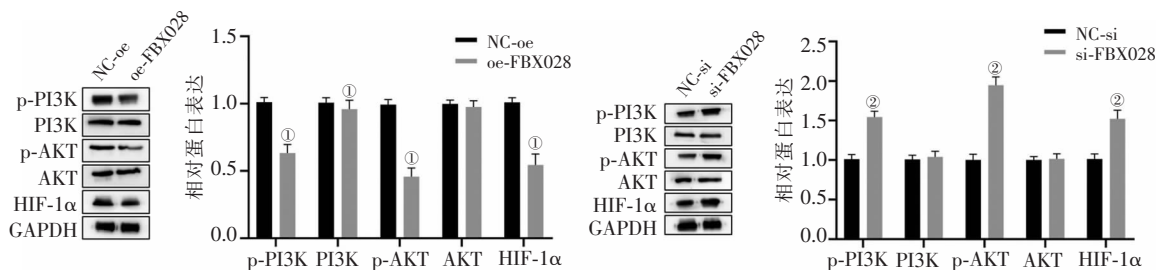


图8 FBXO28 过表达与敲低对细胞中 PI3K/AKT 信号蛋白表达的影响 (n=3)

①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

2.8 FBXO28 对氧化应激相关指标的影响

与 NC-oe 组相比, oe-FBXO28 组的 KEAP1、NQO1 和 GPX2 的表达均下调 (P < 0.05)。与 NC-si

组相比, si-FBXO28 组的 KEAP1、NQO1 和 GPX2 的表达均上调 (P < 0.05)。见图 9。

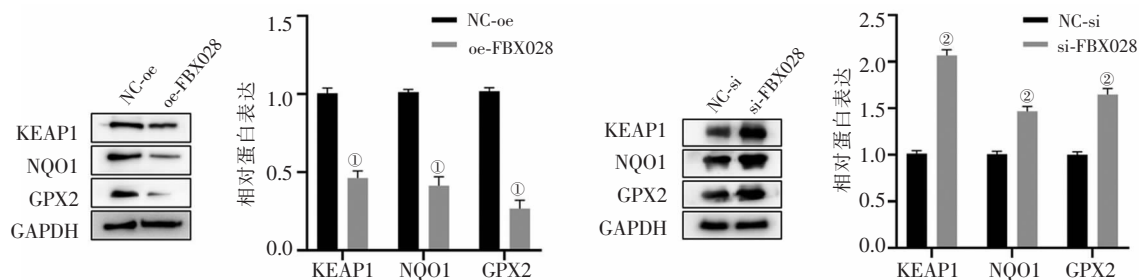


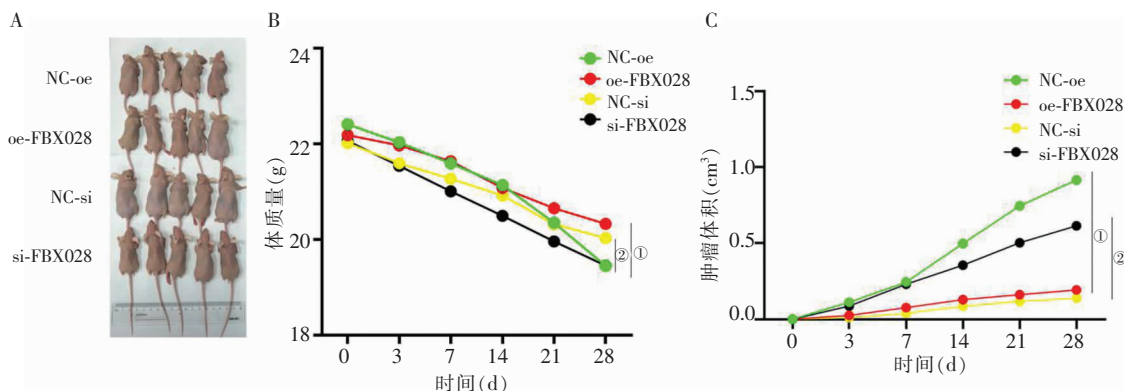
图9 FBXO28 过表达与敲低对细胞中氧化应激相关蛋白表达的影响 (n=3)

①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

2.9 FBXO28 过表达与敲低荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

与 NC-oe 组相比, oe-FBXO28 组的肿瘤体积和质量均显著减少 (P < 0.05); 而与 NC-si 组比, si-FBXO28 组的肿瘤体积和质量显著增加。HE 染色

显示与 NC-oe 组相比, oe-FBXO28 组坏死区域减少, 免疫组化显示 HIF-1 α 、KEAP1 和 PI3K 的表达均下调 (P < 0.05), 而与 NC-si 组比, si-FBXO28 组的上述变化均被逆转 (P < 0.05)。见图 10、11 及表 4。



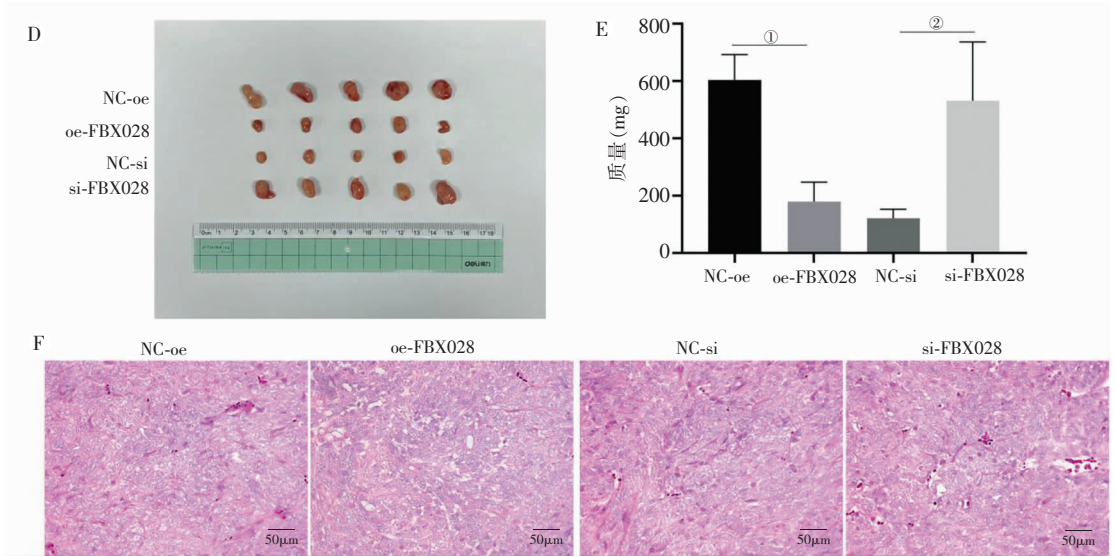


图 10 FBXO28 过表达与敲低对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响(HE×200, n=3)

①P<0.05, 与 NC-oe 组相比;②P<0.05, 与 NC-si 组相比。

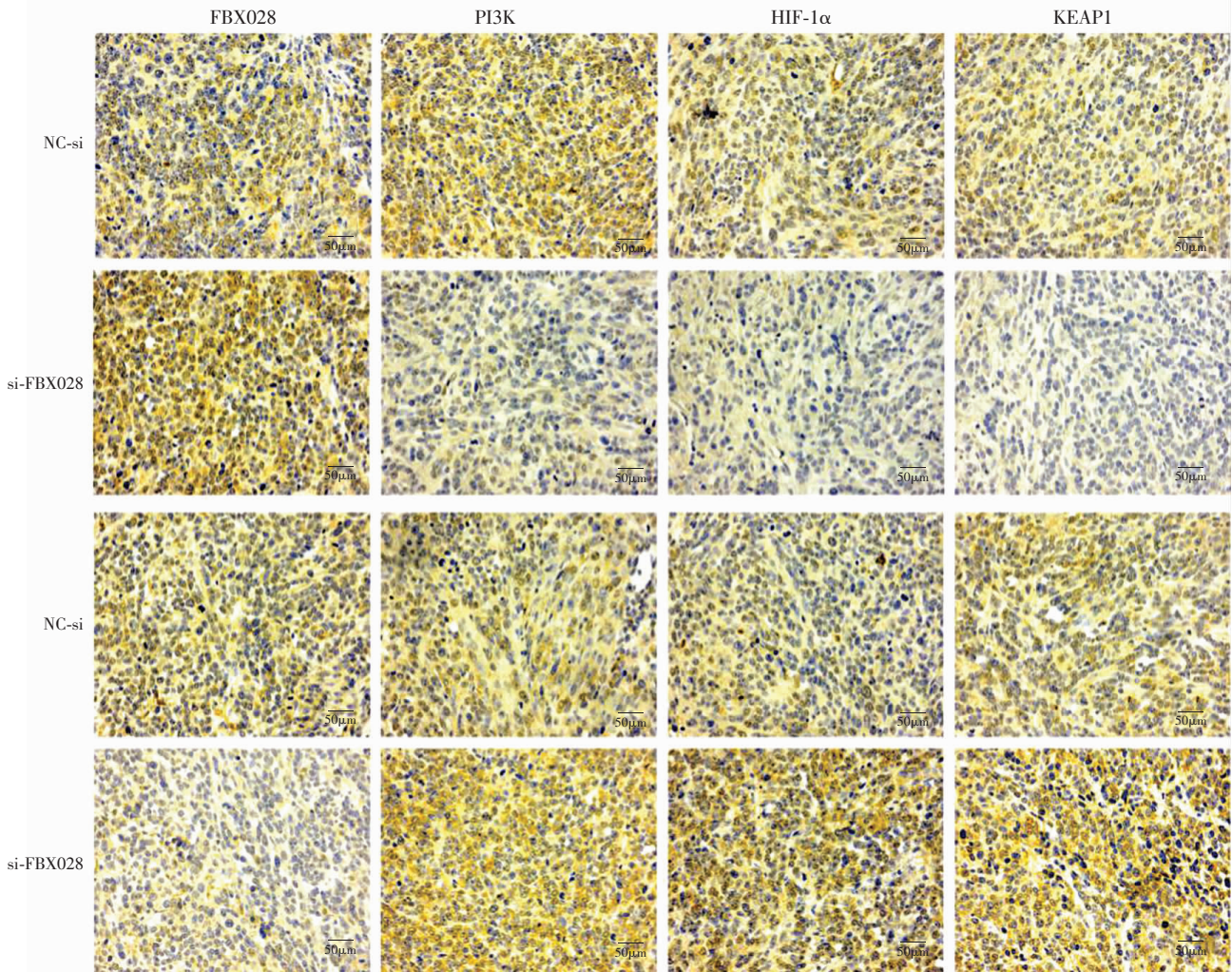


图 11 FBXO28 过表达与敲低对荷瘤小鼠肿瘤中 FBXO28、PI3K、HIF-1α、KEAP1 的表达影响

(免疫组织化学染色×200, n=5)

表 4 各组肿瘤中 FBXO28、PI3K、HIF-1 α 、KEAP1 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

形式	FBXO28	PI3K	HIF-1 α	KEAP1
过表达				
NC-oe 组	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.02	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.09
oe-FBXO28 组	5.58 \pm 0.42	0.22 \pm 0.06	0.37 \pm 0.04	0.15 \pm 0.02
t 值	24.052	27.577	11.137	20.616
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
沉默				
NC-si 组	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.12
si-FBXO28 组	0.19 \pm 0.03	2.88 \pm 0.19	4.10 \pm 0.58	5.08 \pm 0.72
t 值	15.885	21.651	11.923	12.499
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

本研究通过对比永生生化肝细胞 THLE-2 与多种 HCC 细胞系,发现 FBXO28 在 HCC 中呈现显著下调,尤其是高转移性 MHCC-LM3 细胞,提示其可能作为肿瘤抑制因子参与 HCC 进展。这一发现与既往报道描述的高表达 FBXO28 抑制 HCC 细胞迁移和侵袭一致^[7]。

本研究中,FBXO28 对 HCC 细胞增殖与凋亡的调控。过表达 FBXO28 显著抑制 HCC 细胞增殖 (CCK-8 吸光度值降低、EdU 阳性率下降),同时诱导细胞凋亡 (凋亡率升高) 和 G2/M 期阻滞。这一现象表明了 FBXO28 很可能通过泛素化降解了促癌蛋白^[8]。例如,FBXO28 在不同的细胞背景下,通过靶向泛素化 MYC^[9] 和 HIF-1 α ^[10] 来发挥肿瘤抑制功能。本研究进一步发现其可能通过调控 PI3K/AKT 通路发挥作用。过表达 FBXO28 显著下调 p-PI3K 和 p-AKT 水平,而 PI3K/AKT 通路的活化已被证实可促进细胞周期进程并抑制凋亡^[11-12]。并且,本研究体内实验中发现过表达 FBXO28 显著抑制了肿瘤生长,这与体外结果一致,提示了在肿瘤微环境中过表达 FBXO28 发挥了抑癌作用。

本研究还发现 FBXO28 过表达对 HCC 细胞的转移具有明显抑制作用,而敲低 FBXO28 则产生相反效应。在机制方面,FBXO28 通过上调 E-cadherin、下调 N-cadherin 和 Vimentin 抑制 HCC 细胞的 EMT 进程。本研究发现 FBXO28 还通过抑制 HIF-1 α 表达干扰肿瘤缺氧适应,而 PI3K/Akt/HIF-1 α 轴已被证实可通过激活 TWIST1 等转录因子驱动 EMT^[13],尤其是在 HCC 细胞中发现 PI3K/Akt/HIF-1 α 轴可以显著激活 EMT 的发展^[14]。此外,FBXO28 对 KEAP1/NQO1/GPX2 等氧化应激相关蛋白的调控可能通过红系衍生的核因子 2 相关因子通路影响肿瘤细胞侵袭性^[15-16],但具体机制仍需进一步证实。

步证实。

本研究发现 FBXO28 过表达可同时抑制 PI3K/AKT 通路活性和 HIF-1 α 蛋白水平,提示其可能通过双重途径发挥抗转移作用。PI3K/AKT 通路的抑制可阻断 GSK3 β 介导的 SNAIL 蛋白磷酸化降解^[17],从而减少 EMT 相关转录因子活性^[18];而且 HIF-1 α 的下调可能通过降低 VEGF 等促血管生成因子表达限制转移灶形成^[19]。另外,体内实验中 FBXO28 过表达组的 HIF-1 α 和 PI3K 表达显著下调。研究^[10]表明 FBXO28 发挥泛素连接酶活性促进了 HIF-1 α 发生泛素化从而促进 HIF-1 α 蛋白的降解。然而 FBXO28 对 PI3K 的抑制作用是否通过调节其泛素化仍需要进一步研究。这些研究均提示 FBXO28 在体外和体内都可以通过抑制 HIF-1 α 和 PI3K 的表达从而发挥抑癌作用。

本研究表明 FBXO28 在 HCC 中的表达下调可能通过激活 HIF-1 α 轴促进肿瘤进展,这为开发靶向 FBXO28 的分子疗法提供了理论依据。然而,FBXO28 在体内外实验中仍然可能存在功能差异,如 FBXO28 在体内的抗转移的功能和机制尚未明确探究。此外,FBXO28 对氧化应激的调控机制尚未完全阐明,需通过基因编辑动物模型进一步验证。

综上,本研究阐明了 FBXO28 通过抑制 HIF-1 α 的表达及 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而对 HCC 细胞的 EMT 进程和转移发挥抑制作用。

参考文献

- [1] McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2021, 73 (Suppl 1): 4-13.
- [2] Pahari H, Raj A, Sawant A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in India: are we ready for 2040? [J]. *World Journal of Transplantation*, 2024, 14 (1): 88833.
- [3] Xian L, Zhao P, Chen X, et al. Heterogeneity, inherent and acquired drug resistance in patient-derived organoid models of primary liver cancer [J]. *Cellular Oncology (Dordrecht, Netherlands)*, 2022, 45 (5): 1019-1036.
- [4] Chen T, Wang L, Chen C, et al. HIF-1 α -activated TMEM237 promotes hepatocellular carcinoma progression via the NPHP1/Pyk2/ERK pathway [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2023, 80 (5): 120.
- [5] Song G, Sun Z, Chu M, et al. FBXO28 promotes cell proliferation, migration and invasion via upregulation of the TGF-beta1/SMAD2/3 signaling pathway in ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24 (1): 122.

(下转第 1005 页)