

FBXO31基因促进顺铂诱导的肝癌细胞凋亡

何惠娟¹, 黄海丽¹, 王镇南², 杨拉维¹, 陈婷¹, 吴平¹ (广东医科大学附属医院, 1. 临床医学研究中心; 2. 肿瘤科, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 探讨FBXO31基因对顺铂诱导肝癌细胞凋亡的影响。方法 通过脂质体转染法将FBXO31基因表达质粒转染至肝癌HepG2细胞, 再用2 mg/L顺铂处理, 分别用MTT、流式细胞术、免疫印迹检测细胞活性、凋亡、FBXO31蛋白表达。结果 与pcDNA组比较, FBXO31组细胞活力显著降低, 细胞凋亡明显增多, FBXO31蛋白表达显著升高($P<0.01$ 或 0.05)。结论 上调FBXO31基因表达促进顺铂诱导的肝癌细胞凋亡。

关键词: 肝癌; FBXO31; 顺铂; 细胞凋亡

中图分类号: R 730.52

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0350-05

FBXO31 promotes cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma

HE Hui-juan¹, HUANG Hai-li¹, WANG Zhen-nan², YANG La-wei¹, CHEN Ting¹, WU Ping¹ (1. Clinical Medical Research Center; 2. Department of Oncology; Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of FBXO31 on cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. **Methods** FBXO31 expression plasmids were transfected into HepG2 cells using lipofection. After treated with 2 mg/L cisplatin, the viability, apoptosis, and FBXO31 protein expression of HepG2 cells were determined by MTT, flow cytometry, and Western blot, respectively. **Results** Compared with pcDNA group, cell viability was decreased, while apoptosis and FBXO31 expression were increased in FBXO31 group ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** Overexpression of FBXO31 gene promotes cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; FBXO31; cisplatin; apoptosis

FBXO31基因编码的蛋白属于F-box蛋白家族的成员^[1], 其结构含有1个F-box结构域, 可与Skp1、Cul2蛋白结合形成SCF复合体, 参与泛素蛋白酶体降解通路^[1]。FBXO31基因参与DNA损伤反应^[2-4]、细胞周期调控^[3, 5]、脑部神经元形态发育^[6]等多种生理病理过程。我们的前期研究表明, FBXO31在肝癌组织和细胞中低表达^[7]。上调FBXO31表达可抑制肝癌hepG2(hepatoma cells hep-g2, HepG2)细胞的细胞活力和克隆形成能力。因此, 我们推测FBXO31具有抑癌基因的功能, 具有成为癌症治疗的靶点。本研究旨在探讨FBXO31对顺铂诱导的肝癌细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2细胞购自上海细胞典藏委员会。胰酶、胎牛血清、1640培养基、转染试剂LIPOFACTA-MINE2 000和OPTI-MEM培养基购自Invitrogen中国(英潍捷基)公司。FBXO31抗体购自Cell Signaling Technology公司。MTT检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, 细胞培养耗材和其他常规生化试剂购自东莞科贸生物科技有限公司, FBXO31表达质粒和pcDNA质粒来自本实验室。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 将 5×10^4 个细胞种植于六孔板, 培养过夜。转染前将六孔板中的细胞培养基吸干, 加入1 mL OPTI-MEM培养基, 放入CO₂培养箱内培

基金项目: 国家自然科学基金(No.81600484), 广东医科大学附属医院博士启动项目(No.BK201202), 广东医科大学科研基金立项资助项目(No.M2016009)

收稿日期: 2017-03-07; **修订日期:** 2017-05-28

作者简介: 何惠娟(1975-), 女, 本科, 技师。

通信作者: 黄海丽(1982-), 女, 博士, E-mail:793869691@qq.com。

养。按照如下体系配置FBXO31或pcDNA质粒的转染液：(1)1.5 mL EP管内加入2 μg FBXO31质粒或pcDNA质粒和100 μL OPTI-MEM培养基，混匀后静置5 min；(2)另取新的1.5 mL EP管内加入3 μL转染试剂LIPO-FACTAMINE 2 000和100 μL OPTI-MEM培养基，混匀后静置5 min；(3)将(2)管中溶液加入(1)管，混匀后静置20 min，此为FBXO31或pcDNA质粒的转染液。将转染液加入六孔板中，摇匀后放入CO₂培养箱内培养。6 h后取出六孔板，吸干板中液体，加入含有10%胎牛血清的1640培养基，放入CO₂培养箱内培养。转染24 h后细胞用于MTT检测和顺铂药物处理的实验。

1.2.2 MTT实验 将5 000个转染后的细胞种植于96孔板，培养24 h后吸干每孔的培养基，用培养基配制顺铂药物每孔2 mg/L，每个时间段12个复孔，分别在顺铂处理24、48、72 h后进行MTT检测。具体步骤如下：将培养基吸出，加入200 μL含有MTT的1640培养基，放入CO₂培养箱内孵育4 h。然后吸干培养基，加入100 μL DMSO溶解板底的紫色结晶。彻底溶解混匀后上酶标仪检测波长490 nm的OD值。

1.2.3 细胞凋亡检测 顺铂处理转染后的HepG2细胞36 h，将培养上清收集到15 mL离心管。PBS洗细胞1次，去掉上清。胰酶消化细胞，将细胞收集到15 mL离心管(前面提到的收集培养上清的离心管)，1 000 r/min离心5 min，去掉上清，加入200 μL Binding SuLution重悬细胞，将细胞悬液转移至1.5 mL EP管。加入5 μL Annexin V染色液，混匀，避光孵育5 min。加入5 μL PI染色液，混匀，避光孵育15 min。加入200 μL Binding SuLution，混匀后使用流式细胞仪进行检测。

1.2.4 免疫印迹 顺铂处理转染后的HepG2细胞36 h，去掉上清。6 cm皿中加入200 μL RIPA裂解液，冰上裂解20 min。用细胞刮将蛋白收集到1.5 mL EP管，12 000 r/min，4 ℃离心5 min。取上清，弃沉淀。BCA法进行蛋白定量。取30 μg总蛋白进行蛋白电泳，100 V电压转膜2 h。5%脱脂奶粉室温封闭1 h。一抗4 ℃孵育过夜。TBST洗膜4次。HRP标记的二抗室温孵育1 h。TBST洗膜4次。使用化学发光试剂盒进行成像。

1.3 统计学处理

以上每个实验重复3次，采用 *t* 检验对数据进行统计分析，以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达FBXO31增强顺铂诱导的HepG2细胞增殖抑制

顺铂处理24、48、72 h后，FBXO31组HepG2细胞增殖明显低于pcDNA组(*P* < 0.01)(表1)。

表1 FBXO31对顺铂处理后HepG2细胞增殖的影响 (OD₄₉₀值)

分组	24 h	48 h	72 h
pcDNA	0.707±0.009	0.72±0.006	0.71±0.006
FBXO31	0.61±0.006 ^a	0.57±0.006 ^a	0.56±0.006 ^a

两组比较：^a*P* < 0.01。

2.2 过表达FBXO31促进顺铂诱导的HepG2细胞凋亡

流式细胞仪检测结果如图1所示，与pcDNA组相比，FBXO31组的凋亡率显著升高[(13.9±0.7) vs (35.8±0.7)，*P* < 0.05]。

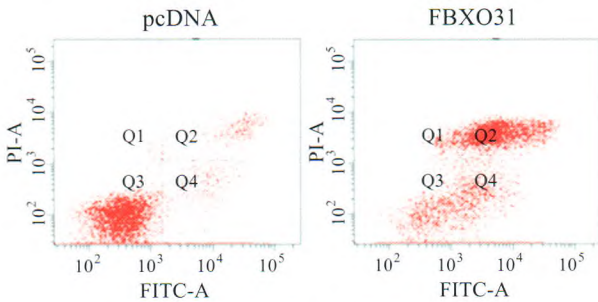


图1 凋亡检测结果图

2.3 HepG2细胞中FBXO31蛋白表达检测

免疫印迹结果如图2所示，与pcDNA组相比，FBXO31组的FBXO31蛋白表达显著上调[(0.996±0.027) vs (2.267±0.120)，*P* < 0.05]。

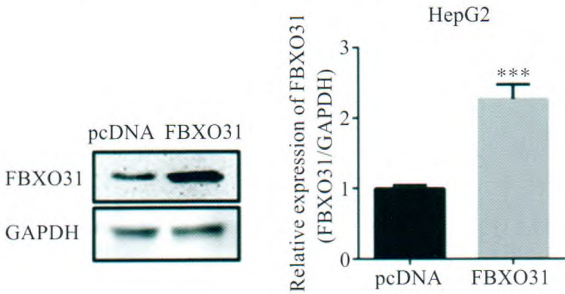


图2 免疫印迹结果图

3 讨论

FBXO31是F-box蛋白家族的成员，可通过F-box结构域与Skp1、Cul2蛋白结合形成SCF复合体，参与泛素蛋白酶体降解通路^[1]。FBXO31参与很多细胞生理和病理过程且均与泛素蛋白降解通路有关。

Shiloh等^[2-4]以及其研究团队报道FBXO31参与DNA损伤反应。他们发现,DNA损伤诱导剂处理细胞后可导致FBXO31蛋白在细胞中累积。FBXO31蛋白与细胞周期素D1结合并促进其被泛素蛋白酶体降解,这直接导致细胞周期阻滞与G1期^[2-4]。Malonia等^[8]的研究指出DNA损伤反应过程中,FBXO31通过促进P53负调控因子MDM2蛋白降解增强P53的蛋白表达。Johansson等^[5]的研究表明FBXO31通过调控DNA复制因子Cdt1的蛋白降解过程影响细胞周期G2期的DNA复制。Vadhvani等^[6]的研究指出FBXO31通过促进极性蛋白Par6c的降解过程参与调控神经元形态发生和迁移。

近年来的研究认为FBXO31基因在肿瘤发生发展中发挥抑癌基因的作用^[1,7,9]。Kumar等^[1]在乳腺癌中的研究证实,FBXO31基因在细胞系和原发性乳腺癌组织中表达极低。上调FBXO31基因表达可抑制乳腺癌MCF-7细胞的细胞活力和克隆形成能力。另外,上调FBXO31基因表达可促进乳腺癌细胞衰老。这些研究结果均指示FBXO31在乳腺癌中发挥抑癌基因的作用^[1]。本研究团队在肝癌领域的研究也证实,FBXO31可抑制肝癌HepG2细胞的细胞活力和克隆形成能力^[7]。不同癌症领域的研究证明了FBXO31具有成为癌症治疗靶点的潜力。

本研究旨在探讨FBXO31对顺铂诱导的肝癌细胞凋亡的影响。我们将FBXO31表达质粒或pcDNA31空载体转染至HepG2。我们通过MTT实验研究FBXO31对肝癌细胞活力的影响。MTT结果如表1所示,24、48、72 h FBXO31组OD490值均低于对照组,这说明FBXO31组细胞活力显著降低。同时说明,FBXO31可促进顺铂诱导的HepG2细胞增殖抑制。我们通过流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡率。流式细胞仪检测结果如图2所示,与pcDNA组(13.9 ± 0.7)相比,FBXO31组(35.8 ± 0.7)的凋亡率显著升高。转染36 h后收集细胞总蛋白,通过免疫印迹检测FBXO31的蛋白表达,从而验证转染效率。免疫印迹结果如图3所示,与pcDNA组相比,FBXO31组的FBXO31蛋白表达显著上调,这说明转染效率可

以满足实验要求,FBXO31可促进顺铂诱导的肝癌细胞凋亡。

综上所述,上调FBXO31表达可以调高顺铂对肝癌细胞的杀伤能力,它可以成为化疗的分子靶点。

参考文献:

- [1] Kumar R, Neilsen P M, Crawford J, et al. FBXO31 is the chromosome 16q24.3 senescence gene, a candidate breast tumor suppressor, and a component of an SCF complex [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11304-11313.
- [2] Shiloh Y. FBXO31 a new player in the ever-expanding DNA damage response orchestra [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(96): pe73.
- [3] Santra M K, Wajapeyee N, Green M R, et al. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage [J]. *Nature*, 2009, 459(7247): 722-725.
- [4] Jia L, Sun Y. F-box proteins FBXO31 and FBX4 in regulation of cyclin D1 degradation upon DNA damage [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22(5): 518-519.
- [5] Johansson P, Jeffery J, Al-Ejeh F, et al. SCF-FBXO31 E3 ligase targets DNA replication factor Cdt1 for proteolysis in the G2 phase of cell cycle to prevent re-replication [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(26): 18514-18525.
- [6] Vadhvani M, Schwedhelm-Domeyer N, Mukherjee C, et al. The centrosomal E3 ubiquitin ligase FBXO31-SCF regulates neuronal morphogenesis and migration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57530.
- [7] Huang H L, Zheng W L, Zhao R, et al. FBXO31 is down-regulated and may function as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(3): 715-720.
- [8] Malonia S K, Dutta P, Santra M K, et al. F-box protein FBXO31 directs degradation of MDM2 to facilitate p53-mediated growth arrest following genotoxic stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112(28): 8632-8637.
- [9] Zhang X, Kong Y, Xu X, et al. F-box protein FBXO31 is down-regulated in gastric cancer and negatively regulated by miR-17 and miR-20a [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15): 6178-6190.