

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

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

人永生化肝细胞 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-CAAGUUCUACGAAATT-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 ℃)后取上清,分装保存于 -80 ℃。

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 ℃ 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 ℃ 孵育 30 min,85 ℃ 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 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环;熔解曲线分析(65 ~ 95 ℃,每 0.5 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃,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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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。

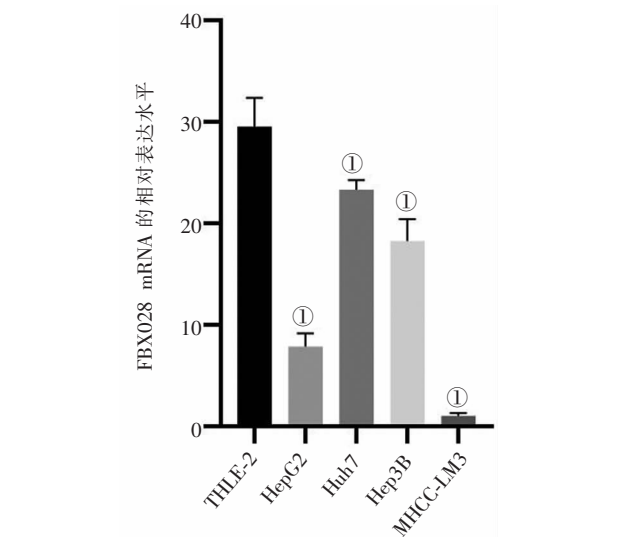


图 1 THLE-2、HepG2、Huh7、Hep3B、MHCC-LM3 中 FBXO28 mRNA 表达的比较($n=3$)
① $P < 0.05$,与 THLE-2 相比。

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。

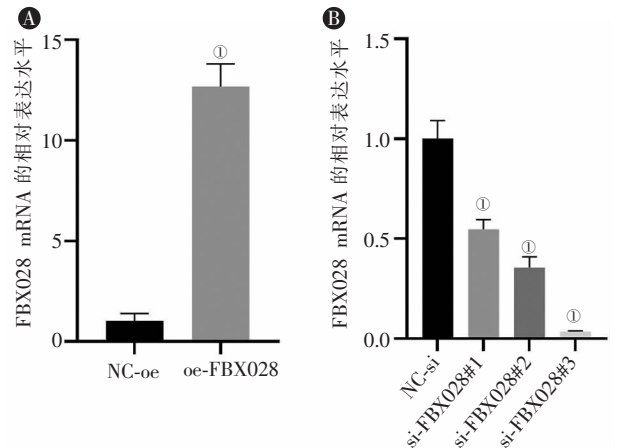


图 2 FBXO28 过表达与敲低效果验证($n=3$)
A. NC-oe 组和 oe-FBXO28 组中 FBXO28 mRNA 的表达,① $P < 0.05$,与 NC-oe 组比;B. NC-si 组和 si-FBXO28#1、si-FBXO28#2、si-FBXO28#3 组中 FBXO28 mRNA 的表达水平,① $P < 0.05$,与 NC-si 组比。

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。

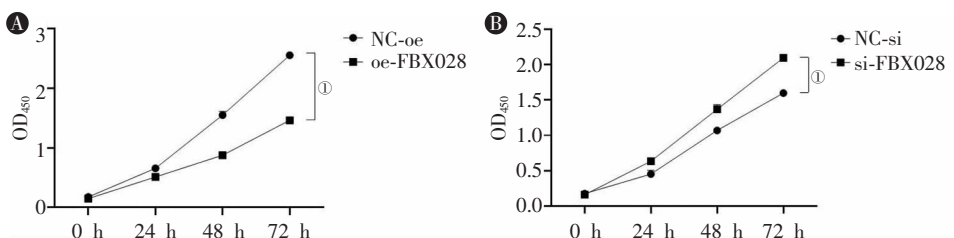


图 3 FBXO28 过表达与敲低对细胞增殖的调控效果 (n=3)
A. NC-oe 组和 oe-FBXO28 组细胞的增殖活性变化;B. NC-si 组和 si-FBXO28 组中细胞的增殖活性变化。①P<0.05。

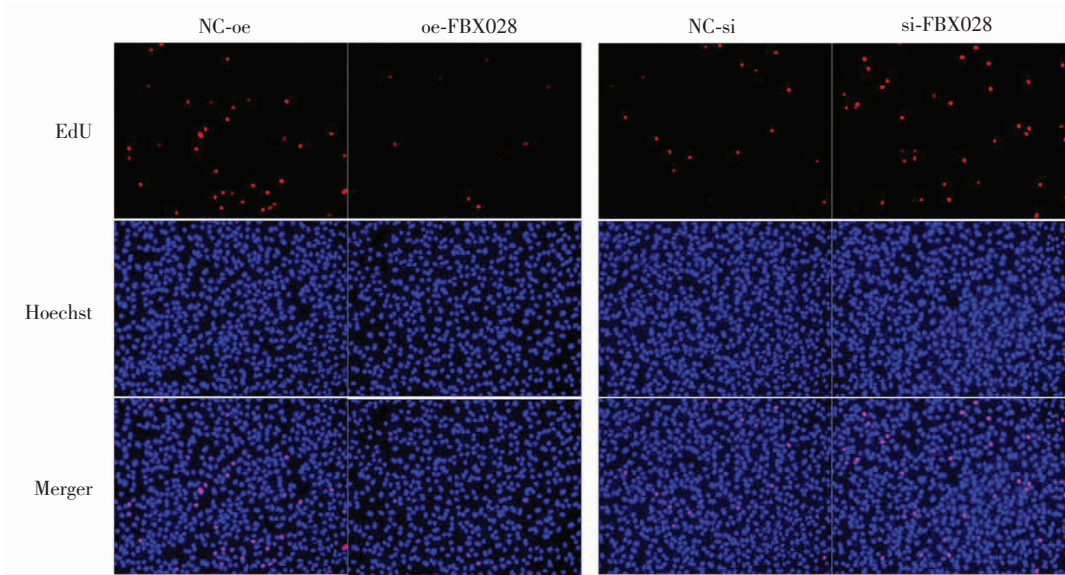


图 4 FBXO28 过表达与敲低对细胞 EdU 染色的调控效果(×100)
红色荧光:EdU;蓝色荧光:Hoechst 标记的细胞核。

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 ± 3.20
oe-FBXO28 组	18.92 ± 2.15
t 值	21.273
P 值	<0.001
沉默	
NC-si 组	9.85 ± 1.12
si-FBXO28 组	20.13 ± 2.05
t 值	16.155
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

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 ± 0.62
oe-FBXO28 组	21.45 ± 1.25
t 值	21.389
P 值	<0.001
沉默	
NC-si 组	10.79 ± 2.12
si-FBXO28 组	4.62 ± 0.51
t 值	16.972
P 值	<0.001

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-FBX028 组的侵袭细胞数显著减少 ($P < 0.05$); 与 NC-si 组相比, si-FBX028 组的侵袭细胞数

显著增加 ($P < 0.05$)。见图 6 及表 3。

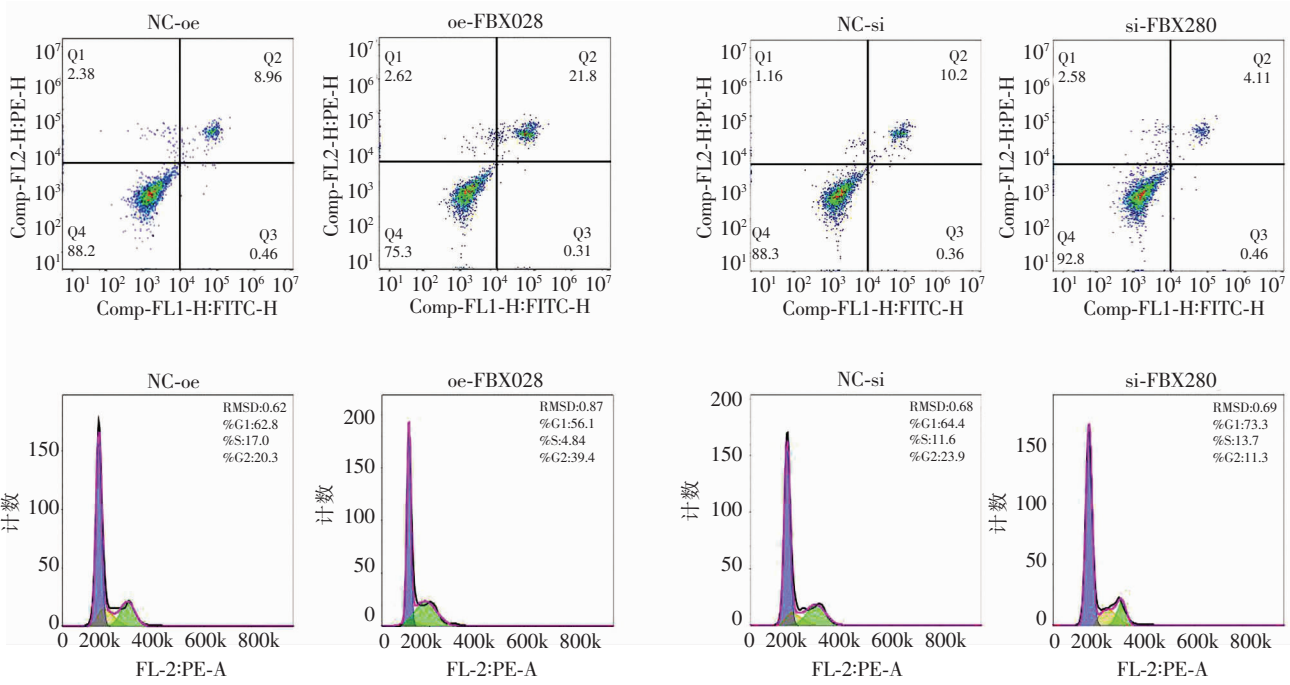


图 5 FBX028 过表达与敲低对细胞凋亡和细胞周期的调控效果 (n=3)

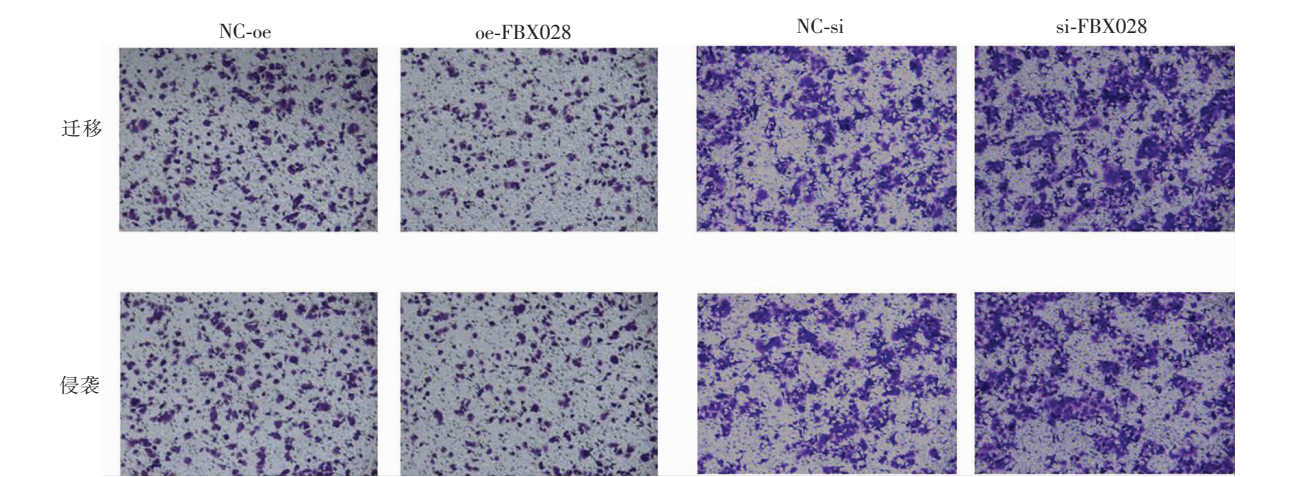


图 6 Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭 (结晶紫染色×100,n=3)

表 3 FBX028 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 ± 22.87	128.45 ± 12.35
oe-FBX028 组	116.33 ± 7.87	60.12 ± 5.21
t 值	20.086	15.603
P 值	<0.001	<0.001
沉默		
NC-si 组	225.89 ± 6.89	52.67 ± 3.15
si-FBX028 组	316.28 ± 12.06	162.89 ± 5.42
t 值	15.027	14.188
P 值	<0.001	<0.001

2.6 FBX028 对 EMT 相关蛋白的调控

Western blot 结果显示, 与 NC-oe 组相比, oe-FBX028 组的 E-cadherin 表达上调 ($P < 0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 表达均下调 ($P < 0.05$)。si-FBX028 组则呈相反趋势, 与 NC-si 组相比, si-FBX028 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 FBX028 对 PI3K/AKT 和 HIF-1α 表达的调控

与 NC-oe 组相比, oe-FBX028 组的 PI3K、p-PI3K、p-AKT 和 HIF-1α 的表达均显著下调 ($P < 0.05$)。与 NC-si 组相比, si-FBX028 组的 p-PI3K、p-AKT 和 HIF-1α 的表达均显著上调 ($P < 0.05$)。见图 8。

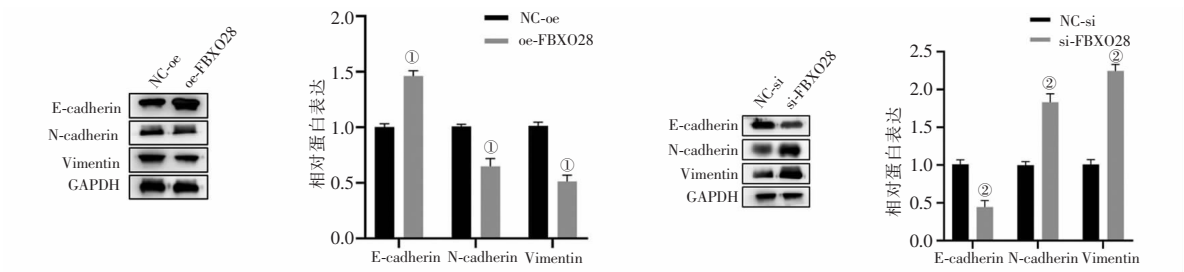


图 7 FBXO28 过表达与敲低对细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响 (n=3)
①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

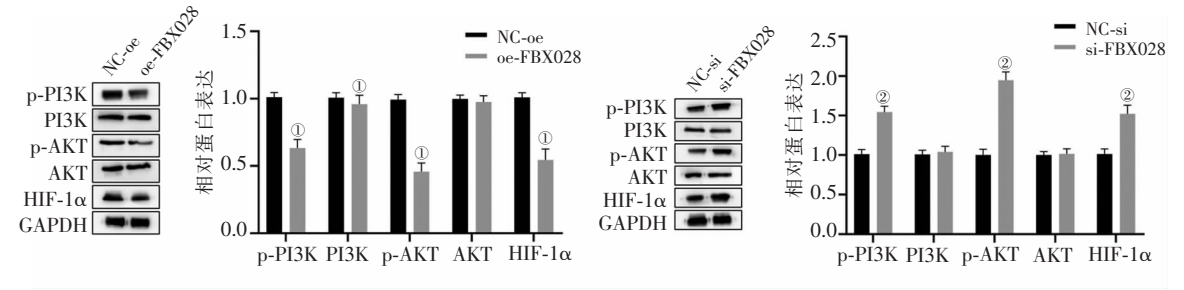


图 8 FBXO28 过表达与敲低对细胞中 PI3K/AKT 信号蛋白表达的影响 (n=3)
①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

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。

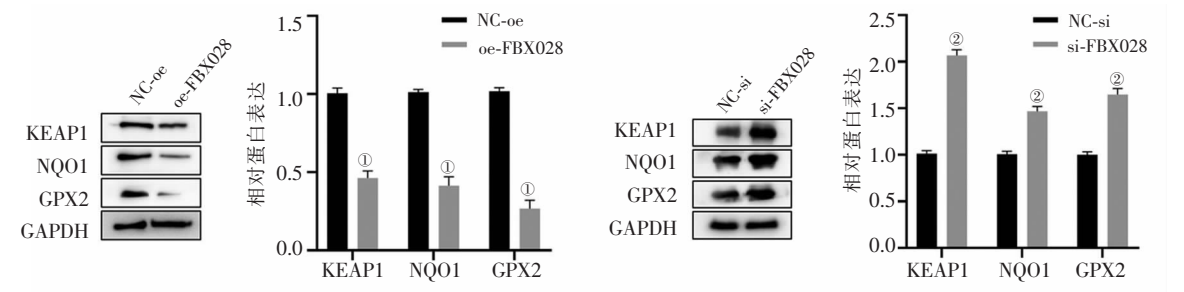
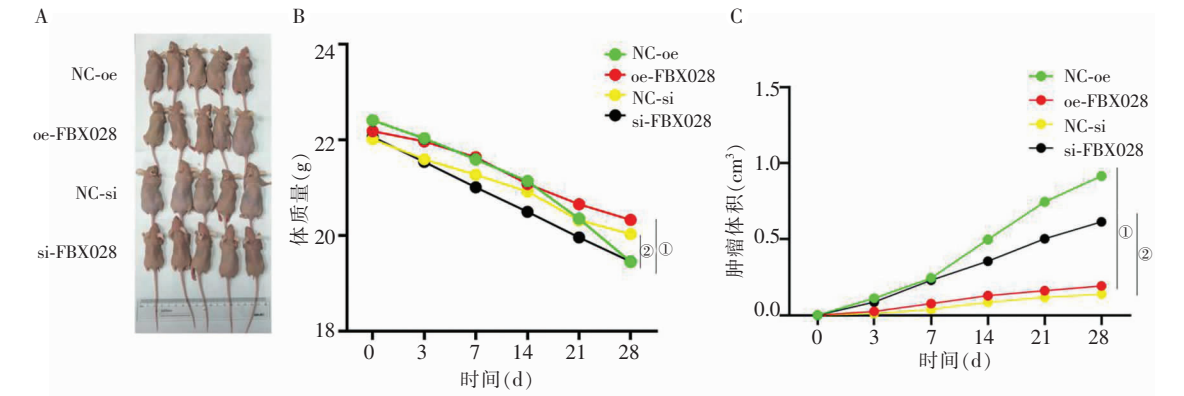


图 9 FBXO28 过表达与敲低对细胞中氧化应激相关蛋白表达的影响 (n=3)
①P<0.05,与 NC-oe 组相比;②P<0.05,与 NC-si 组相比。

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-1α、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。



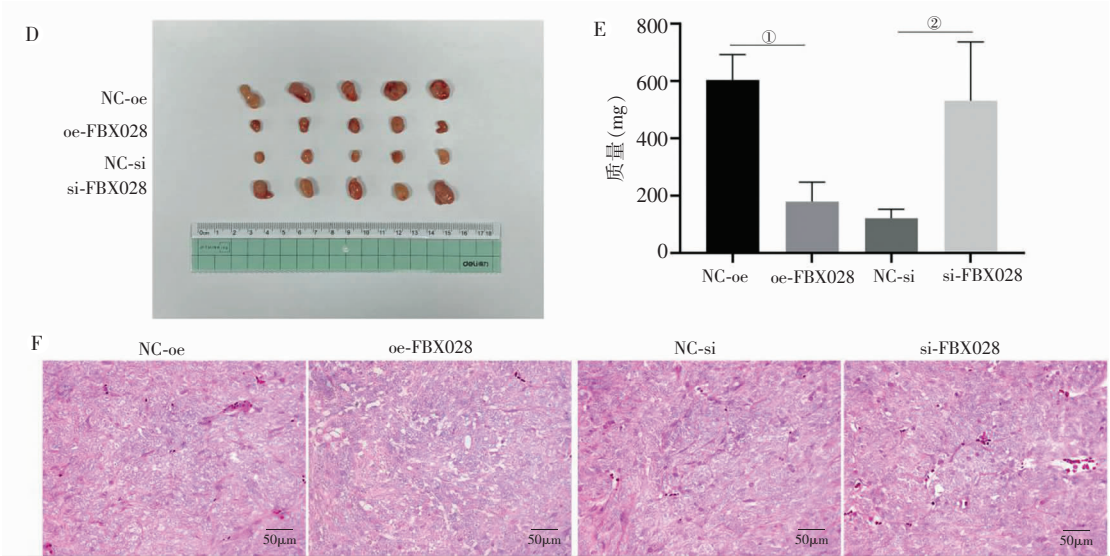


图 10 FBXO28 过表达与敲低对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响(HE×200,n=3)
① $P<0.05$,与 NC-oe 组相比;② $P<0.05$,与 NC-si 组相比。

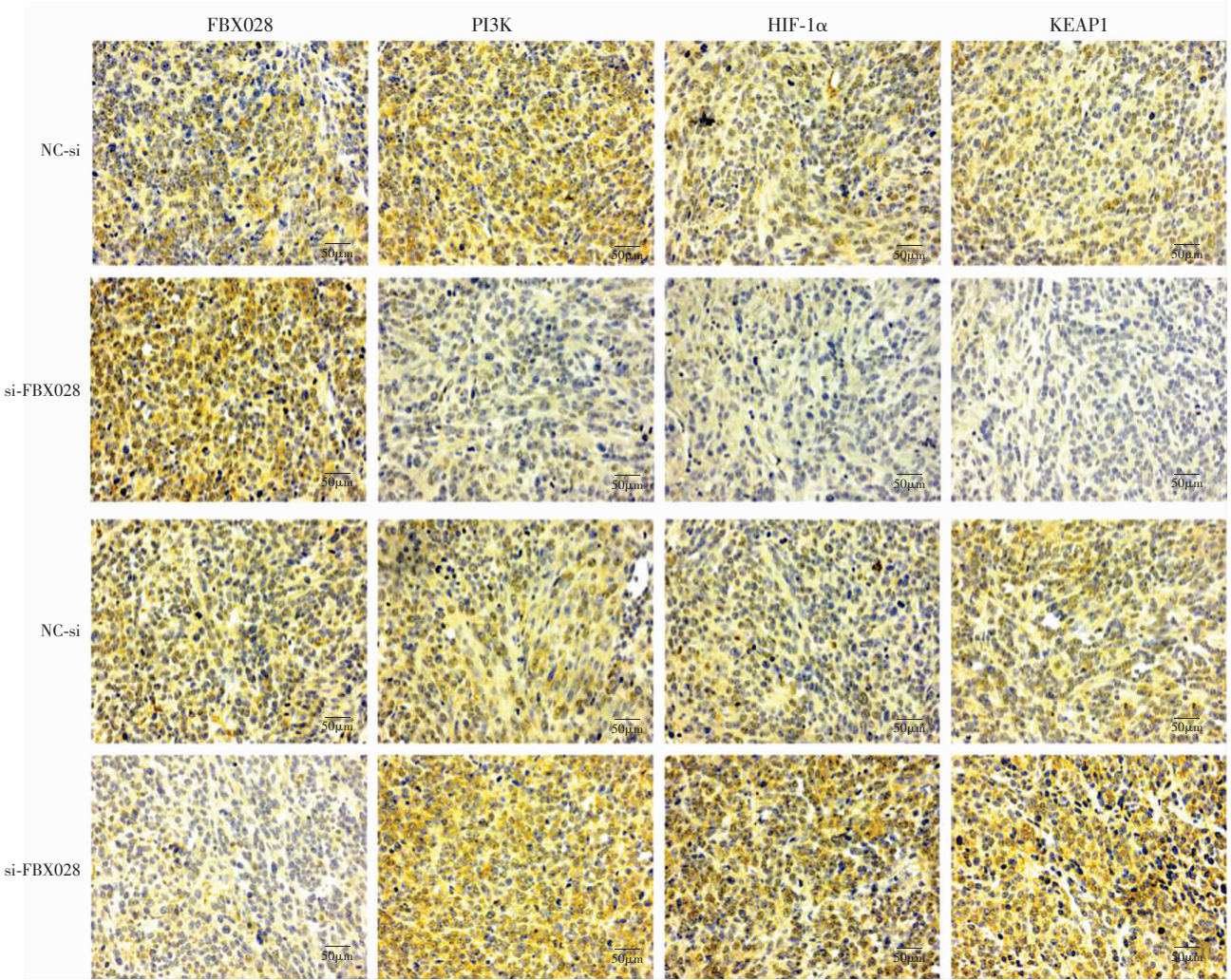


图 11 FBXO28 过表达与敲低对荷瘤小鼠肿瘤中 FBXO28、PI3K、HIF-1α、KEAP1 的表达影响
(免疫组织化学染色×200,n=5)

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

形式	FBXO28	PI3K	HIF-1α	KEAP1
过表达				
NC-oe 组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.09
oe-FBXO28 组	5.58 ± 0.42	0.22 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.15 ± 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 ± 0.11	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.12
si-FBXO28 组	0.19 ± 0.03	2.88 ± 0.19	4.10 ± 0.58	5.08 ± 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-1α^[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-1α 表达干扰肿瘤缺氧适应,而 PI3K/Akt/HIF-1α 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-1α 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。

本研究发现 FBXO28 过表达可同时抑制 PI3K/AKT 通路活性和 HIF-1α 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 GSK3β 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-1α 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-1α 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-1α 发生泛素化从而促进 HIF-1α 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-1α 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-1α 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-1α 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-1α-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-β1/SMAD2/3 signaling pathway in ovarian cancer[J]. BMC Cancer,2024,24 (1):122.

(下转第 1005 页)

ology to treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(12): 6661.

[11] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.

[12] Paraskevaidis I, Xanthopoulos A, Tsougos E, et al. Human gut microbiota in heart failure; trying to unmask an emerging organ[J]. Biomedicines, 2023, 11(9): 2574.

[13] 陈丽娜, 李森浩, 周军, 等. 益生菌对心力衰竭患者再入院率及肠道菌群代谢产物氧化三甲胺的干预效果研究[J]. 心电与循环, 2023, 42(6): 515-519.

[14] Karmazyn M, Gan XT. Probiotics as potential treatments to reduce myocardial remodelling and heart failure *via* the gut-heart axis; State-of-the-art review[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2023, 478(11): 2539-2551.

[15] Chen AT, Zhang J, Zhang Y. Gut microbiota in heart failure and related interventions[J]. iMeta, 2023, 2(3): e125.

[16] Pourrajab B, Naderi N, Janani L, et al. The impact of probiotic yogurt versus ordinary yogurt on serum sTWEAK, sCD163, ADMA, LCAT and BUN in patients with chronic heart failure: a randomized, triple-blind, controlled trial[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(13): 6024-6035.

[17] 赵颂歌, 张晓俞, 杨艳玮, 等. 益生菌联合孟鲁司特在肺炎支原体肺炎合并心肌损伤患儿中的治疗效果[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(24): 48-52.

[18] 赵乐恒, 孙洪涛. 益生菌辅助临床常规治疗心衰的效果及免疫指标变化的研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2020, 20(66): 83-84.

[19] Yu X, Chen Q, Lou IX. Dietary strategies and nutritional supplements in the management of heart failure: a systematic review[J]. Frontiers in Nutrition, 2024, 11: 1428010.

[20] 范瑀轩, 刘惊今, 范志清, 等. 有氧运动对心力衰竭患者心脏康复的作用与机制研究[J]. 中华心血管病杂志, 2025, 53(1): 96-100.

[21] 朱亚男, 朱娇, 卜素. 老年慢性心力衰竭患者负面情绪及自我感受负担与生活质量的相关性[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2024, 23(10): 729-733.

[22] Karim A, Muhammad T, Shah I, et al. A multistrain probiotic reduces sarcopenia by modulating Wnt signaling biomarkers in patients with chronic heart failure[J]. Journal of Cardiology, 2022, 80(5): 449-455.

[23] 张媛, 杨翔, 吴宁, 等. 益生菌治疗改善高龄慢性心力衰竭患者心功能和生活质量的临床研究[J]. 中华保健医学杂志, 2017, 19(3): 210-212.

(收稿日期: 2025-02-07 修回日期: 2025-04-24)

(上接第 985 页)

[6] Liu S, Liu P, Zhu C, et al. FBXO28 promotes proliferation, invasion, and metastasis of pancreatic cancer cells through regulation of SMARCC2 ubiquitination [J]. Aging, 2023, 15(12): 5381-5398.

[7] Qiao X, Lin J, Shen J, et al. FBXO28 suppresses liver cancer invasion and metastasis by promoting PKA-dependent SNAI2 degradation[J]. Oncogene, 2023, 42(39): 2878-2891.

[8] Cai L, Liu L, Li L, et al. SCFFBXO28-mediated self-ubiquitination of FBXO28 promotes its degradation [J]. Cellular Signalling, 2020, 65: 109440.

[9] Cepeda D, Ng HF, Sharifi HR, et al. CDK-mediated activation of the SCF (FBXO) (28) ubiquitin ligase promotes MYC-driven transcription and tumorigenesis and predicts poor survival in breast cancer [J]. EMBO Molecular Medicine, 2013, 5(7): 1067-1086.

[10] Phillips E, Balss J, Bethke F, et al. PFKFB4 interacts with FBXO28 to promote HIF-1 α signaling in glioblastoma [J]. Oncogenesis, 2022, 11(1): 57.

[11] Tian LY, Smit DJ, Jücker M. The role of PI3K/AKT/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma metabolism [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2652.

[12] He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 425.

[13] Peng PH, Lai JC, Chang JS, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by hypoxia-induced lncRNA RP11-367G18.1 through regulating the histone 4 lysine 16 acetylation (H4K16Ac) mark [J]. American Journal of Cancer Research, 2021, 11(6): 2618-2636.

[14] Xiao T, Bao J, Tian J, et al. Flavokawain A suppresses the vasculogenic mimicry of HCC by inhibiting CXCL12 mediated EMT [J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154687.

[15] Milholli LA, Dalbó J, Couto CS, et al. Effects of the *juçara* fruit (*Euterpe edulis* Martius) pulp and lyophilized extract on NRF2, KEAP1, SOD1, and GPX2 expression in human colorectal cancer cell lines [J]. Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas, 2023, 56: e12558.

[16] Li T, Jiang D, Wu K. p62 promotes bladder cancer cell growth by activating KEAP1/NRF2-dependent antioxidative response [J]. Cancer Science, 2020, 111(4): 1156-1164.

[17] Peng B, Wang L, Pan S, et al. Metformin attenuates partial epithelial-mesenchymal transition in salivary gland inflammation via PI3K/Akt/GSK3 β /snail signaling axis [J]. Inflammation, 2025, 48(3): 1527-1537.

[18] Lee S, Choi EJ, Cho EJ, et al. Inhibition of PI3K/Akt signaling suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through the Snail/GSK-3/ β -catenin pathway [J]. Clinical and Molecular Hepatology, 2020, 26(4): 529-539.

[19] Zheng Y, Ji H, Yi W, et al. PRMT5 facilitates angiogenesis and EMT via HIF-1 α /VEGFR/Akt signaling axis in lung cancer [J]. Aging, 2023, 15(13): 6163-6178.

(收稿日期: 2025-04-09 修回日期: 2025-05-19)