

论著·基础研究

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

刘滕迪^{1,2*}, 潘漪莲^{3*}, 朱晓娜¹, 杨 烁¹, 杨 茜¹, 余 韵¹

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院分子医学中心, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院生殖遗传科, 上海 200030; 3. 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院产科, 上海 200030

[摘要] 目的·挖掘 F-box 蛋白 22 (F-box only protein 22, FBXO22) 的底物并明确其作用机制, 进一步探讨 FBXO22 在肿瘤细胞凋亡中的作用。方法·利用免疫沉淀联合质谱分析寻找并验证 FBXO22 的相互作用蛋白凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF)。采用变性条件下泛素化修饰实验检测 FBXO22 对 AIF 泛素化修饰的影响。通过短发夹 RNA 敲低 FBXO22、过表达 FBXO22 检测 AIF 的表达水平。利用流式细胞仪检测 FBXO22 敲低或过表达对结肠癌细胞凋亡的影响。结果·免疫沉淀联合质谱分析显示 FBXO22 可与 AIF 结合, 变性条件下泛素化修饰实验显示 FBXO22 可介导 AIF 的泛素化修饰。敲低 FBXO22 可上调 AIF 水平, 过表达 FBXO22 可下调 AIF 水平。流式细胞术结果显示, 敲低 FBXO22 可促进由甲基硝基亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 等诱导的结肠癌细胞凋亡, 过表达 FBXO22 则可抑制 MNNG 等诱导的结肠癌细胞凋亡。结论·FBXO22 通过泛素化修饰降解 AIF 进而调控由 AIF 介导的结肠癌细胞凋亡。

[关键词] F-box 蛋白 22; 凋亡诱导因子; 泛素化修饰; 细胞凋亡**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.04.003 **[中图分类号]** R363.1⁴ **[文献标志码]** A

Molecular mechanism of apoptosis-inducing factor regulated by FBXO22 and its role in cancer cell apoptosis

LIU Meng-di^{1,2*}, PAN Yi-lian^{2*}, ZHU Xiao-na¹, YANG Shuo¹, YANG Qian¹, YU Yun¹

1. Molecular Medicine Center, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Reproductive Genetics, International Peace Maternity & Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 3. Department of Obstetrics, International Peace Maternity & Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] **Objective**·To explore the substrate of F-box only protein 22 (FBXO22) and its mechanism, and further study the role of FBXO22 in cancer cell apoptosis. **Methods**·The interaction protein of FBXO22, namely apoptosis-inducing factor (AIF), was searched and identified by immunoprecipitation (IP)-coupled liquid chromatograph mass spectrometer/mass spectrometer (LC-MS/MS) technology. The effect of FBXO22 on ubiquitination of AIF was detected by ubiquitin modification assay under denatured conditions. Short hairpin RNA (shRNA) knockdown FBXO22 and overexpression FBXO22 were used to detect the expression of AIF. The effect of FBXO22 knockdown or overexpression on apoptosis of colon cancer cells was detected by flow cytometry. **Results**·IP-coupled LC-MS/MS technology showed that FBXO22 could interact with AIF, and ubiquitin modification assay under denaturing conditions showed that FBXO22 could mediate ubiquitination of AIF. Knockdown of FBXO22 could up-regulate the level of AIF, while overexpression of FBXO22 could down-regulate the level of AIF. The results of flow cytometry showed that knockdown of FBXO22 could promote the apoptosis of colon cancer cells induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), while overexpression of FBXO22 could inhibit the apoptosis of colon cancer cells induced by MNNG. **Conclusion**·FBXO22 regulates AIF-mediated apoptosis of colon cancer cells by ubiquitination and degradation of AIF.

[Key words] F-box only protein 22 (FBXO22); apoptosis-inducing factor (AIF); ubiquitination modification; cell apoptosis

泛素化是一种由激活酶 E1、结合酶 E2 和连接酶 E3 构成的酶促级联反应, 可与蛋白酶体组成泛素-蛋白酶体系统介导真核细胞内约 80% 的蛋白质降解或功能改变, 其中连接酶 E3 负责特异性识别及结合底物^[1-2]。SKP1-

CUL1-F-box (SCF) 复合体是真核细胞中研究最多的 E3 连接酶, 由支架蛋白 CUL1、RING 型锌指蛋白、衔接蛋白 S-期激酶关联蛋白 1 (S-phase kinase associated protein 1, SKP1) 和底物招募蛋白 F-box 组成^[3]。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81772936); 上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院院级科研基金 (GFY5809, YN201805); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180800)。

[作者简介] 刘滕迪 (1989—), 女, 初级技师, 硕士生; 电子邮箱: panda8979@163.com。潘漪莲 (1985—), 女, 住院医师, 硕士; 电子邮箱: panyilotus@163.com。
*为共同第一作者。

[通信作者] 余 韵, 电子邮箱: yy@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81772936); Foundation of International Peace Maternity & Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (GFY5809, YN201805); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZDCX20180800)。

[Corresponding Author] YU Yun, E-mail: yy@shsmu.edu.cn。



F-box蛋白有2个重要的结构域,即F-box结构域和底物结合结构域;F-box蛋白可通过F-box结构域与SKP1相连,进而与CUL1、RING等结合形成SCF复合体。72个F-box家族成员根据底物结合结构域的特征被分为W、L和O共3个亚家族^[4]。F-box蛋白22(F-box only protein 22, FBXO22)作为O亚家族的成员之一,其基因最早被发现是抑癌基因*TP53*的靶基因^[5];同时,FBXO22可与甲基化P53、去甲基化酶4A形成三元复合体以调控细胞衰老^[6]。近年来围绕FBXO22在肿瘤中作用的研究表明:FBXO22可通过降解类Krüppel因子4(Krüppel-like factor 4, KLF4)促进肝癌细胞增殖^[7];通过调控不同底物,促进乳腺癌的生长或抑制其转移^[8-9];通过抑制基质金属蛋白酶9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)的活性,降解转录因子BACH1(BTB and CNC homology 1),抑制肾癌细胞、肺癌细胞的转移^[10-11];且本实验室前期研究发现,FBXO22可分别通过肝激酶B1(liver kinase B1, LKB1)^[12]、抑癌蛋白PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)^[13]促进肺癌细胞、结直肠癌细胞的增殖。综上所述,FBXO22能够在多种肿瘤的发生与发展中发挥促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞转移等作用,具有重要的临床研究意义。

凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是位于线粒体内外膜间隙的一类黄素蛋白,可在烷化剂甲基硝基亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)损伤、氧化应激下激活多聚ADP-核糖聚合酶PARP-1,导致多聚ADP-核糖PAR累积,进而促进AIF从线粒体释放入核,并引起染色质凝集和DNA大片段化,从而诱导细胞凋亡^[14-18]。

目前相关研究^[19-20]显示,E3连接酶X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)仅能够影响AIF的活性,不能调控AIF水平。基于此,本研究通过挖掘FBXO22的新底物,探讨其调控底物的分子作用机制,并研究该调控在结肠肿瘤细胞凋亡过程中的作用,以期对肿瘤的临床治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

HEK293T细胞,肺癌细胞株A549,结肠癌细胞株SW480、SW620,结直肠癌细胞株HCT116以及前列腺癌细胞株PC3(购自中国科学院上海细胞库),*Fbxo22*野生型(*Fbxo22*^{+/+})和敲除型(*Fbxo22*^{-/-})小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEF)(由本课题组前期构

建并保存)。FBXO22抗体(Proteintech Group,美国),AIF抗体(Abcam,美国),CUL1抗体、SKP1抗体、XIAP抗体、 β 肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶标记的鼠源或兔源免疫球蛋白抗体(CST,美国),血凝素(hemagglutinin, HA)标签抗体、偶联Flag抗体的M2亲和琼脂糖珠(Sigma-Aldrich,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),DMEM培养基、RPMI-1640培养基(Gibco,美国),凋亡试剂盒(eBioscience,美国),Lipo2000(Invitrogen,美国),KOD DNA聚合酶(Toyobo,日本),T4连接酶(Promega,美国)。电泳仪、PCR仪(Bio-Rad,美国),流式细胞仪(Becton Dickinson,美国)。

1.2 细胞培养

HEK293T细胞、A549细胞、PC3细胞和MEF细胞使用含10%FBS的DMEM培养基进行培养,SW480细胞、SW620细胞和HCT116细胞使用含10%FBS的RPMI-1640培养基进行培养。培养条件为37℃、5%CO₂。

1.3 表达型质粒及短发卡RNA质粒的构建和细胞转染

表达型质粒构建:将扩增的*FBXO22*全长和缺失F-box结构域(Δ F)的编码序列(coding sequence, CDS)分别插入PBABE-Flag载体构建带标签的PBABE-Flag-*FBXO22*和PBABE-Flag-*FBXO22*- Δ F表达质粒,再将其二者分别插入PLVX-ZSGreen载体构建无标签的PLVX-ZSGreen-*FBXO22*和PLVX-ZSGreen-*FBXO22*- Δ F表达质粒;将扩增的*AIF*、*CUL1*的全长CDS序列分别插入PBABE-Flag载体,构建带标签的PBABE-Flag-*AIF*和PBABE-Flag-*CUL1*表达质粒;将*AIF*的全长CDS序列插入PCDNA3.0载体,构建PCDNA3.0-*AIF*表达质粒;将扩增的ubiquitin的全长CDS序列插入PCDNA3.0-HA载体构建PCDNA3.0-HA-ubiquitin表达质粒。未插入CDS的PBABE-Flag为空载体(empty vector, EV),记为PBABE-Flag-EV。

短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒构建:分别将特异靶向*FBXO22*或*XIAP*的shRNA片段与线性化pSIREN Retro-Q载体连接,构建沉默特定基因的敲除质粒(具体步骤参照T4连接酶说明书)。特异靶向shRNA片段的序列包括:shFBXO22#1, GTGTGGTCCTTGTCTTTGGTT; shFBXO22#2, CGCATCTTACCACATACAGTT; shFBXO22#3, CCCAAACAATGCCAAGTCCTT; shXIAP, AGATATCTGGGAGCAACTATA。同时,使用无靶向效应的序列插入到pSIREN Retro-Q载体构建阴性对照shNC。

向培养皿中接种处于对数生长期的HEK293T细胞,

待其生长融合度达50%~60%时行转染实验,具体步骤参照Lipo2000转染试剂说明书进行。

1.4 免疫沉淀联合质谱分析

分别向HEK293T细胞转染带标签的PBABE-Flag-EV(Control组)和PBABE-Flag-FBXO22表达质粒(FBXO22组)24 h,收集HEK293T细胞并向其中加入1×RIPA细胞裂解液(含50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1% NP40、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟、1×蛋白酶抑制剂的混合液)进行裂解,而后于4℃、17 000×g离心10 min去除细胞碎片,获得全细胞裂解液。将其与M2琼脂糖珠孵育行免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)。随后,使用PBST缓冲液[含0.1%吐温的1×磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)]洗涤M2珠3次。收集M2珠,并向其中加入1×SDS裂解液,于100℃下变性分离免疫沉淀复合物与M2珠。最后,将获得的免疫复合物经SDS-PAGE凝胶电泳后,使用考马斯亮蓝染色液进行染色,扫描仪成像后送至质谱平台对上述2组的差异条带进行鉴定分析,寻找FBXO22的相互作用蛋白。以检测到过表达组中FBXO22自身的肽段数目,及已知的与FBXO22相互作用蛋白SKP1、CUL1和RBX1的肽段数目作为判断IP的成败标准。

1.5 变性条件下泛素化修饰实验

分别向HEK293T细胞转染Flag-AIF、FBXO22、FBXO22-ΔF以及HA-ubiquitin表达质粒24 h后,收取细胞沉淀。向其中加入适量1×SDS裂解液进行细胞裂解,并于100℃进行蛋白变性以去除蛋白与蛋白间的非特异性结合。经17 000×g离心10 min去除不溶沉淀后,取上清液并向其中加入1×RIPA细胞裂解液,以稀释至SDS终浓度为0.1%后与M2珠孵育行后续IP,检测过表达FBXO22或FBXO22-ΔF对AIF泛素化水平的影响。

1.6 蛋白质印迹检测

向HEK293T细胞转染FBXO22或FBXO22-ΔF构建FBXO22过表达细胞株(PLVX-ZSGreen-FBXO22/ΔF为实验组,PLVX-ZSGreen-EV为对照组),分别向HEK293T细胞、MFE细胞、SW620细胞、HCT116细胞和PC3细胞转染shFBXO22#1、shFBXO22#2、shFBXO22#3构建FBXO22敲低的细胞株(shFBXO22#1、shFBXO22#2、shFBXO22#3为实验组,shNC为对照组),分别向A549细胞转染shFBXO22#1、shXIAP构建FBXO22、XIAP敲低的细胞株(shFBXO22#1、shXIAP为实验组,shNC为对照组)。培养并收集上述构建好的细胞,向其中加入1×

SDS裂解液进行细胞裂解,于100℃进行蛋白变性,经SDS-PAGE后采用湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素膜,封闭1 h后加入FBXO22和AIF抗体于4℃过夜。次日,经PBS洗涤后,向其中加入相应辣根过氧化物酶标记的鼠源或兔源免疫球蛋白抗,室温孵育1 h。洗膜后进行化学发光显影,检测过表达或敲低FBXO22对AIF蛋白水平的影响。

1.7 细胞凋亡检测

向SW480细胞分别转染shNC、shFBXO22#1和shFBXO22#2构建FBXO22敲低的细胞株(shFBXO22#1、shFBXO22#2为实验组,shNC为对照组);分别向SW480、SW620细胞转染PLVX-ZSGreen-FBXO22或PLVX-ZSGreen-EV,构建FBXO22过表达的细胞株(其中PLVX-ZSGreen-FBXO22为实验组、PLVX-ZSGreen-EV为对照组)。将构建完成的SW480细胞或SW620细胞分别按照 2×10^5 个或 5×10^5 个接种于12孔板中,培养24 h后加入500 μmol/L MNNG处理15 min,而后换正常的完全培养基继续培养24 h(记为MNNG处理组);或加入1 mmol/L H₂O₂继续培养12 h(记为H₂O₂处理组);或加入PBS后同MNNG、H₂O₂步骤处理(记为PBS组)。待观察到处理组细胞出现明显凋亡时收集所有细胞,于2 000×g离心5 min收集细胞沉淀,按照凋亡试剂盒说明书进行标记处理,制备好待测样品后于0.5 h内使用BD LSRII Fortessa流式细胞仪进行细胞凋亡的检测与分析。

1.8 统计学方法

采用SPSS 16.0软件对实验数据进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较使用Student's *t*检验。*P* < 0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FBXO22相互作用蛋白的鉴定

本研究采用IP联合质谱分析技术寻找与FBXO22相互作用的蛋白,结果(图1)显示免疫沉淀复合物中Flag-FBXO22被明显富集。将Control组和FBXO22组进一步行质谱鉴定分析差异蛋白,结果(表1)显示过表达组中检测到的与FBXO22相互作用的SKP1、CUL1及RBX1蛋白(已报道的)匹配的肽段数分别为327、76和11个,对照组中均为0,提示IP成功;过表达组检测到的AIF的肽段数为9,对照组为0,提示FBXO22与AIF存在特异性结合。

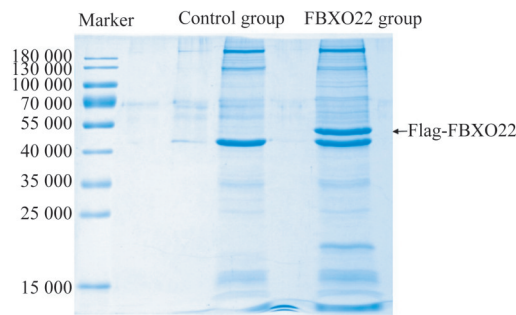


图 1 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色检测 2 组免疫沉淀复合物
Fig 1 Immunoprecipitation complexes of the two groups detected by SDS-PAGE and Coomassie bright blue staining

表 1 质谱鉴定 2 组差异蛋白的肽段数

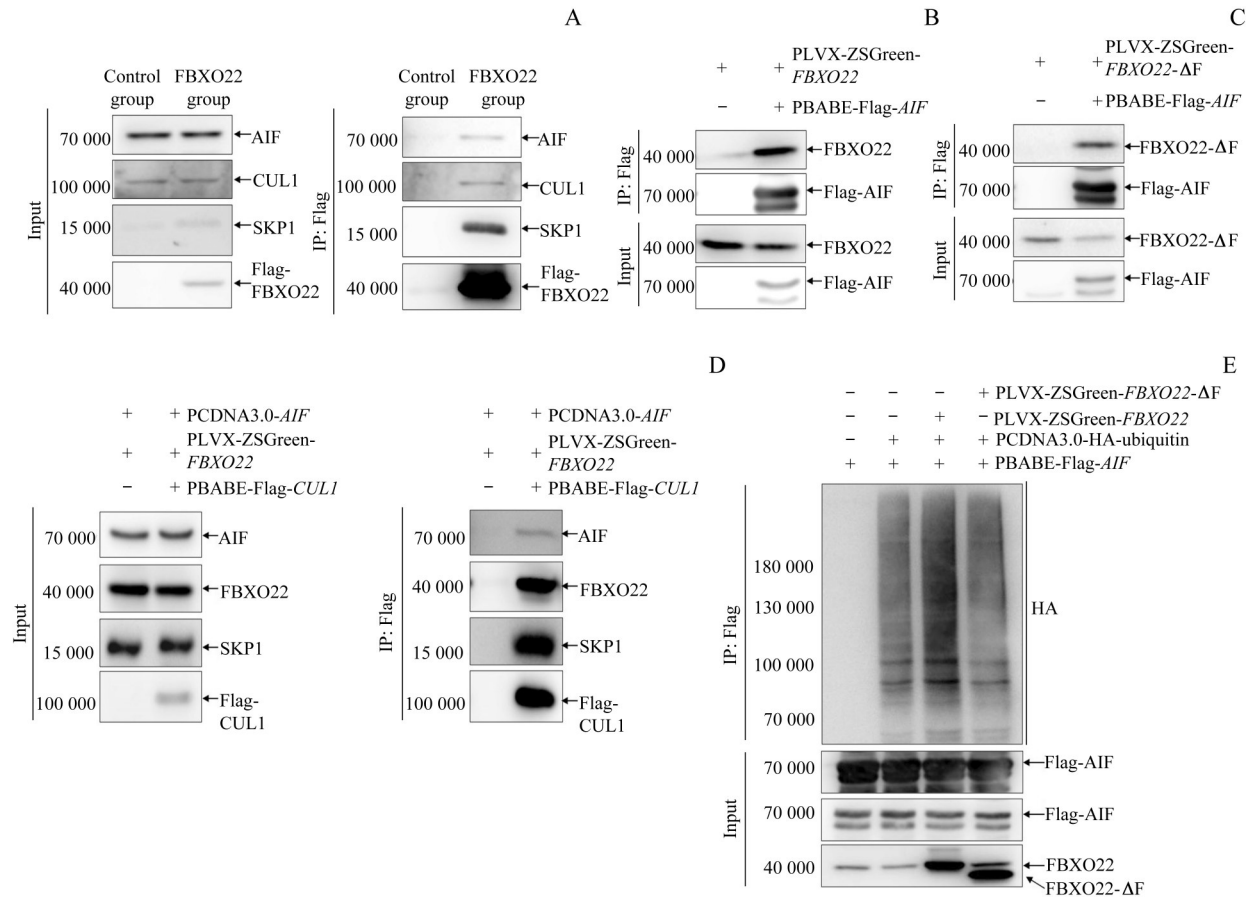
Tab 1 Different protein peptide number of the two groups detected by IP/MS technology

Gene	Protein Name	Peptide (FBXO22 group/Control group)
<i>FBXO22</i>	F-box only protein 22	933/1
<i>SKP1</i>	S-phase kinase-associated protein 1	327/0
<i>CUL1</i>	Cullin-1	76/0
<i>RBX1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1	11/0
<i>AIF</i>	Apoptosis-inducing factor 1	9/0

2.2 IP 检测 FBXO22 与 AIF 的相互作用及其对 AIF 泛素化水平的影响

本研究向 HEK293T 细胞转染相应质粒 24 h 后, 收集细胞沉淀进行 IP, 结果 (图 2A) 显示 Flag-FBXO22 与内源性 AIF 存在相互作用。共表达 Flag-AIF 与 FBXO22/FBXO22-ΔF 的双外源 IP 实验 (图 2B、2C) 显示, Flag-AIF 与 FBXO22、FBXO22-ΔF 均存在相互作用, 提示 AIF 与 FBXO22 存在相互作用且该作用不依赖 FBXO22 的 F-box 结构域。随后, 为验证 AIF 是否通过 FBXO22 与 SCF 复合体连接, 在 HEK293T 细胞中转染 PBABE-Flag-CUL1/PBABE-Flag-EV、PCDNA3.0-AIF 及 PLVX-ZSGreen-FBXO22 进行 IP, 结果 (图 2D) 显示 Flag-CUL1 成功沉淀 SKP1、FBXO22 的同时也将 AIF 沉淀下来, 证明 AIF 通过 FBXO22 与 SCF 复合体相结合。

本研究通过变性条件泛素化 IP 实验分析 AIF 的泛素化水平, 结果 (图 2E) 显示过表达 FBXO22 可显著增强 AIF 的泛素化修饰水平, 而过表达 FBXO22-ΔF 对 AIF 的泛素化修饰水平没有明显影响。



Note: A. Validation of interaction between exogenous Flag-FBXO22 and endogenous AIF. B/C. Validation of interaction between exogenous Flag-AIF and FBXO22 (B) or FBXO22-ΔF (C). D. Validation of interaction between AIF and SCF complex. E. Effect of FBXO22 or FBXO22-ΔF on ubiquitination of AIF. IP:Flag represents the immune complexes obtained by immunoprecipitation with M2 beads; Input stands for whole cell protein extract.

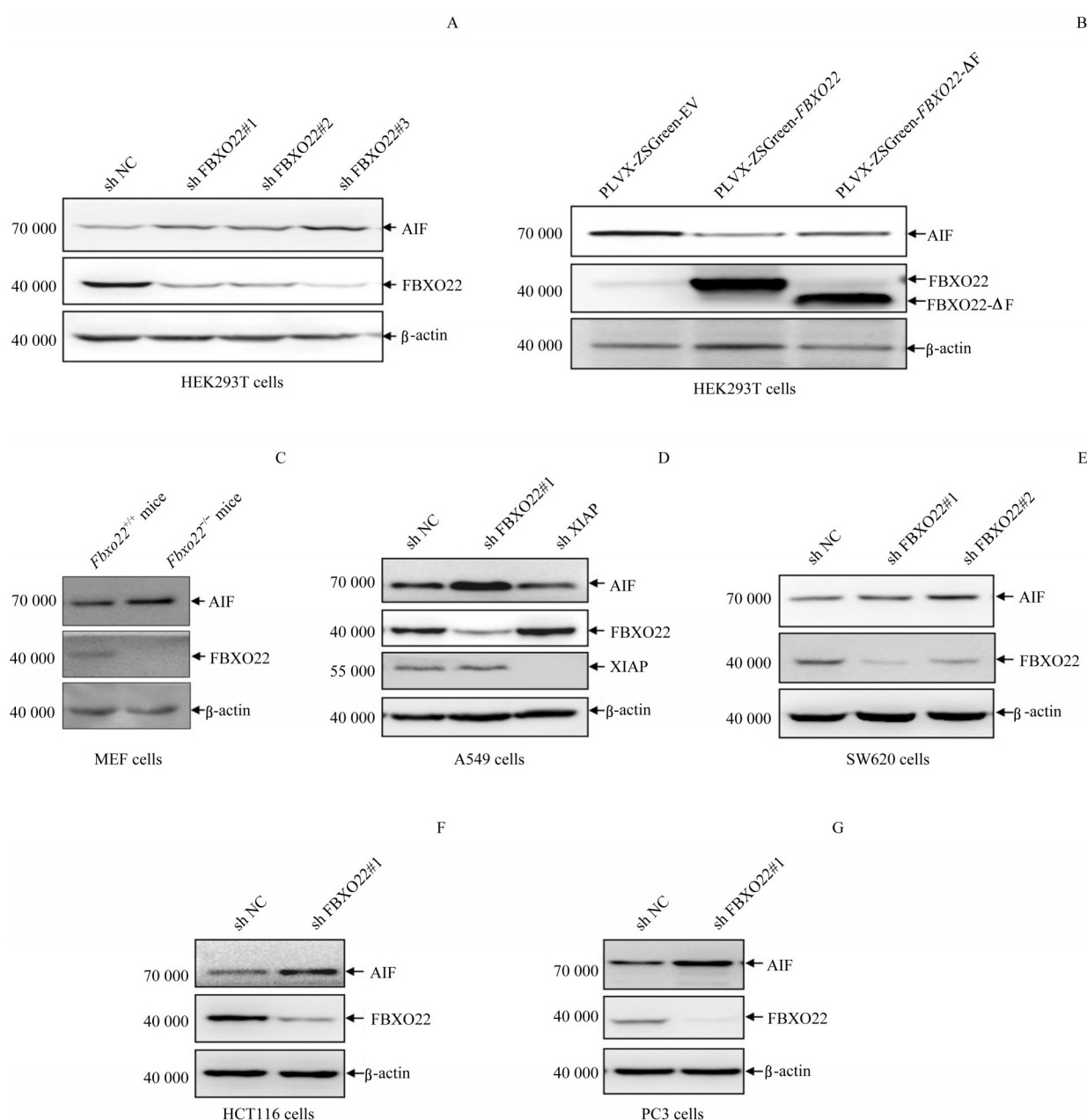
图 2 IP 检测 FBXO22 与 AIF 的相互作用及其对 AIF 泛素化水平的影响

Fig 2 IP detection of the interaction between FBXO22 and AIF and its effect on the ubiquitination level of AIF

2.3 FBXO22 对 AIF 蛋白表达水平的影响

采用蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 HEK293T 细胞中敲低 FBXO22 对 AIF 蛋白水平的影响, 结果 (图 3A) 显示与 shNC 组相比, shFBXO22#1、shFBXO22#2、shFBXO22#3 组的 AIF 水平有明显增加。反之, 本研究在 HEK293T 细胞中转染过表达 FBXO22 及 FBXO22-ΔF 质粒, 结果 (图 3B) 显示, 与 PLVX-ZSGreen-EV 组相比, 过表达 FBXO22 可显著下调 AIF 水平, 而过表达 FBXO22-ΔF 却没有此作用。

此外, 通过 Western blotting 检测 *Fbxo22*^{+/+} 和 *Fbxo22*^{-/-} 型 MEF 细胞中 AIF 水平, 结果 (图 3C) 显示 *Fbxo22* 缺失可显著上调 AIF 的表达水平。通过 Western blotting 检测敲低 FBXO22 或 XIAP 对 A549 细胞中 AIF 水平的影响, 结果 (图 3D) 显示敲低 FBXO22 可显著上调 AIF 水平, 但敲低 XIAP 对 AIF 水平无较大影响。随后的结果 (图 3E~G) 显示在 SW620 细胞、HCT116 细胞以及 PC3 细胞中敲低 FBXO22 均可显著上调 AIF 水平。以上结果均表明, FBXO22 可负调控 AIF 的表达水平。



Note: A. Effect of FBXO22 knockdown on AIF level. B. Effect of FBXO22 or FBXO22-ΔF overexpression on AIF level. C. Expression of AIF in MEF of *Fbxo22*^{+/+} and *Fbxo22*^{-/-} mice. D. Effect of FBXO22 or XIAP knockdown on AIF level in A549 cells. E-G. Effect of FBXO22 knockdown on AIF level in SW620 cells (E), HCT116 cells (F) and PC3 cells (G).

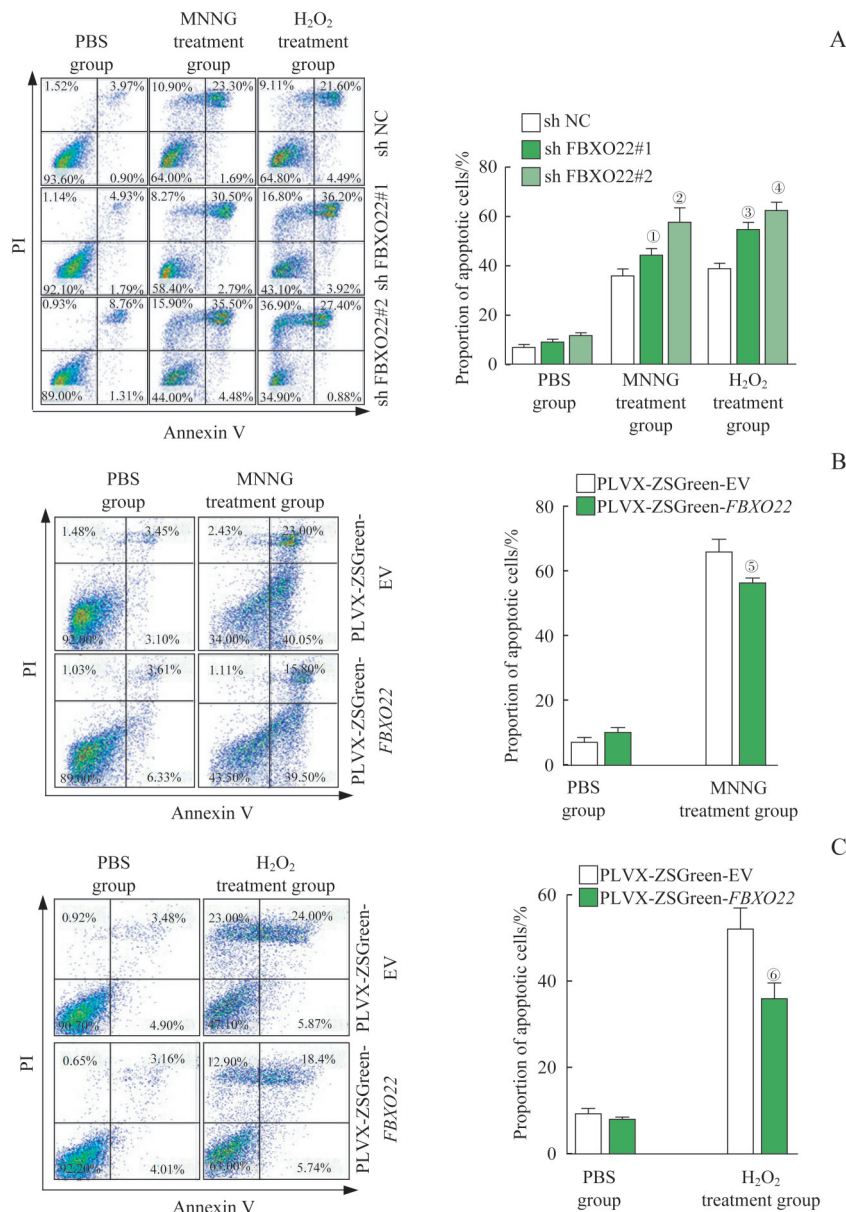
图3 Western blotting 检测 FBXO22 对 AIF 水平的影响

Fig 3 Effect of FBXO22 on AIF level by Western blotting

2.4 FBXO22对AIF介导的肿瘤细胞凋亡水平的影响

采用流式细胞术对经药物处理后的细胞进行分析, 结果显示: ①SW480细胞(*FBXO22*敲低细胞株)经MNNG、 H_2O_2 处理后, 结果显示, 与shNC组相比, shFBXO22#1实验组和shFBXO22#2实验组中凋亡细胞的占比均较高(图4A)。②经MNNG诱导的SW620细胞(*FBXO22*过表达细胞株)中, PLVX-ZSGreen-*FBXO22*实

验组的凋亡细胞比例较PLVX-ZSGreen-EV组有明显减少(图4B); 且在经 H_2O_2 诱导的SW480细胞(*FBXO22*过表达细胞株)中, PLVX-ZSGreen-*FBXO22*实验组的凋亡细胞比例较PLVX-ZSGreen-EV组亦有明显减少(图4C)。上述结果均表明, *FBXO22*可抑制由AIF介导的结肠肿瘤细胞凋亡。



Note: A. Apoptosis analysis of SW480 cells (knockdown *FBXO22*) induced by MNNG and H_2O_2 . B. Apoptosis analysis of SW620 cells (overexpressing *FBXO22*) induced by MNNG. C. Apoptosis analysis of SW480 cells (overexpressing *FBXO22*) induced by H_2O_2 . ① $P=0.013$, ② $P=0.004$, ③ $P=0.001$, ④ $P=0.0003$, compared with shNC; ⑤ $P=0.023$, ⑥ $P=0.009$, compared with PLVX-ZSGreen-EV.

图4 FBXO22对AIF介导的肿瘤细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of FBXO22 on cancer cell apoptosis mediated by AIF

3 讨论

本课题组前期研究发现, *FBXO22*可分别通过

LKB1^[12]和PTEN^[13]促进肺癌细胞、结直肠癌细胞的增殖; 且越来越多的研究^[7-11]表明*FBXO22*在多种肿瘤中表现为促进肿瘤细胞生长、抑制肿瘤细胞转移的双重作

用,具有重要的临床研究意义。本研究利用免疫沉淀技术挖掘 FBXO22 的相互作用蛋白,经质谱鉴定显示在其相互作用表达谱中存在 AIF;随后通过体外转染和免疫共沉淀实验证实,FBXO22 与 AIF 存在相互作用。目前,关于 AIF 表达调控的研究十分有限。本课题组前期研究发现,凋亡相关因子酸性亮氨酸核磷酸蛋白 32B^[21] 和 CCAAT 增强子结合蛋白^[22] 仅调控 AIF 的转录水平。有报道显示, P53 可在不依赖 DNA 损伤应激的情况下促进 AIF 转录^[23]。在蛋白水平上,仅发现 XIAP 能泛素化 AIF 但不能降解 AIF,即仅影响 AIF 的酶活性^[19-20]。本研究发现 FBXO22 可调控 AIF 的泛素化水平,即敲低 FBXO22 可使 AIF 水平上调、过表达 FBXO22 可使 AIF 水平下调;因此, FBXO22 是目前首个可以在蛋白水平上调控 AIF 的 E3 连接酶。

AIF 在烷化剂损伤、氧化应激等刺激下可引起染色体凝集和 DNA 大片段化,介导细胞凋亡^[17-18]。研究^[14-16]

显示, MNNG 是一种被公认的可通过 AIF 诱发细胞凋亡的烷化剂。本研究发现,敲低 FBXO22 可上调 AIF 的水平,进而增加在 MNNG 诱导下结肠癌细胞的凋亡比例;反之,过表达 FBXO22 则可下调 AIF 水平,减少在 MNNG 诱导下的凋亡比例;继而提示, FBXO22 可抑制由 AIF 介导的结肠癌细胞凋亡,具有促肿瘤效应,与现有报道一致。

除了能够诱导细胞凋亡外, AIF 还能与 CHCHD4 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix-domain-containing protein 4) 结合共同调节线粒体的氧化呼吸链,维持其正常功能,为细胞存活提供能量保障^[24-26]。另有研究^[27] 发现, AIF 可以维持 PTEN 的脂质磷酸酶的活性,抑制蛋白激酶 B 活化,进而抑制 β -catenin 信号通路,阻止上皮细胞-间充质转化和远处转移。然而, FBXO22 是否能通过调控 AIF 的蛋白水平对 AIF 介导的线粒体氧化呼吸功能和癌细胞转移功能产生影响,有待进一步探讨。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, et al. The ubiquitin-proteasome system[J]. J Biosci, 2006, 31(1): 137-155.
- [2] Tang Q, Wu P, Chen H, et al. Pleiotropic roles of the ubiquitin-proteasome system during viral propagation[J]. Life Sci, 2018, 207: 350-354.
- [3] Kitagawa K, Kitagawa M. The SCF-type E3 ubiquitin ligases as cancer targets[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2016, 16(2): 119-129.
- [4] Jin J, Cardozo T, Lovering RC, et al. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins[J]. Genes Dev, 2004, 18(21): 2573-2580.
- [5] Vrba L, Junk DJ, Novak P, et al. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 486.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Sun R, Xie HY, Qian JX, et al. FBXO22 possesses both protumorigenic and antimetastatic roles in breast cancer progression[J]. Cancer Res, 2018, 78(18): 5274-5286.
- [9] Bai J, Wu K, Cao M, et al. SCF FBXO22 targets HDM2 for degradation and modulates breast cancer cell invasion and metastasis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(10):201820990.
- [10] Guo F, Liu J, Han X, et al. FBXO22 suppresses metastasis in human renal cell carcinoma via inhibiting MMP-9-mediated migration and invasion and VEGF-mediated angiogenesis[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(3): 647-656.
- [11] Lignitto L, LeBoeuf SE, Homer H, et al. Nrf2 activation promotes lung cancer metastasis by inhibiting the degradation of Bach1[J]. Cell, 2019, 178(2): 316-329. e18.
- [12] Zhu XN, He P, Zhang L, et al. FBXO22 mediates polyubiquitination and inactivation of LKB1 to promote lung cancer cell growth[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 486.
- [13] Ge MK, Zhang N, Xia L, et al. FBXO22 degrades nuclear PTEN to promote tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1720.
- [14] Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, et al. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(13): 4844-4862.
- [15] Yang H, Xie Y, Yang D, et al. Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25310-25322.
- [16] Jang KH, Do YJ, Son D, et al. AIF-independent parthanatos in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(1): e2526.
- [17] Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, et al. AIF: not just an apoptosis-inducing factor[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 2-11.
- [18] Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(12): 2545-2579.
- [19] Lewis EM, Wilkinson AS, Davis NY, et al. Nondegradative ubiquitination of apoptosis inducing factor (AIF) by X-linked inhibitor of apoptosis at a residue critical for AIF-mediated chromatin degradation[J]. Biochemistry, 2011, 50(51): 11084-11096.
- [20] Wilkinson JC, Wilkinson AS, Galbán S, et al. Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1): 237-247.
- [21] Shen SM, Yu Y, Wu YL, et al. Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 419-426.
- [22] Shen SM, Yu Y, Wu ZX, et al. Apoptosis-inducing factor is a target gene of C/EBP α and participates in adipocyte differentiation[J]. FEBS Lett, 2011, 585(14): 2307-2312.
- [23] Stambolsky P, Weisz L, Shats I, et al. Regulation of AIF expression by p53[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(12): 2140-2149.
- [24] Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, et al. Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes[J]. Cell, 2007, 131(3): 476-491.
- [25] Vahsen N, Candé C, Brière JJ, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation[J]. EMBO J, 2004, 23(23): 4679-4689.
- [26] Hangen E, Féraud O, Lachkar S, et al. Interaction between AIF and CHCHD4 regulates respiratory chain biogenesis[J]. Mol Cell, 2015, 58(6): 1001-1014.
- [27] Shen SM, Guo M, Xiong Z, et al. AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation[J]. EMBO Rep, 2015, 16(11): 1563-1580.

[收稿日期] 2020-07-13

[本文编辑] 邢宇洋

