

创新团队成果专栏

FBXO38 通过 PI3K-Akt 信号通路调控眼部黑色素瘤增殖

吴以加, 房 燕, 沈菲洋, 黄 蕊, 沈键锋[#], 范先群[#]

上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科, 上海市眼眶病眼肿瘤重点实验室, 上海 200011

[摘要] **目的** · 研究 F-box 蛋白 38 (F-box only protein 38, FBXO38) 对眼部黑色素瘤增殖的作用以及潜在的调控通路。**方法** · 使用 *FBXO38* 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 和 *FBXO38* 过表达质粒构建 *FBXO38* 敲低以及过表达的人皮肤黑色素瘤 A375 和葡萄膜黑色素瘤 OMM2.3 细胞系, 并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和 Western blotting 在转录和蛋白水平验证 *FBXO38* 的敲低和过表达效率。通过克隆形成实验、BrdU 免疫荧光染色和 CCK8 细胞增殖实验, 探究 *FBXO38* 对黑色素瘤细胞增殖的影响。使用肿瘤基因组图谱计划数据库 (The Cancer Genome Atlas, TCGA), 分析 *FBXO38* 高表达和低表达组中的差异表达基因, 并进行京都基因与基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集, 揭示与 *FBXO38* 相关的信号通路。进一步通过 CCK8 细胞增殖实验检测信号通路抑制剂对不同 *FBXO38* 表达量细胞的抑制率。同时通过 qRT-PCR 和 Western blotting, 验证在敲低 *FBXO38* 之后该通路是否激活。**结果** · qRT-PCR 和 Western blotting 验证 A375 和 OMM2.3 细胞系中的 *FBXO38* 的 mRNA 及蛋白质表达水平, 发现与对照组相比敲低组的 *FBXO38* 表达水平下降, 与野生型相比过表达组的 *FBXO38* 的表达水平提高 ($P < 0.05$)。克隆形成实验、BrdU 免疫荧光染色和 CCK8 细胞增殖实验显示, 敲低 *FBXO38* 显著增强 A375 和 OMM2.3 细胞的增殖能力 ($P < 0.05$), 反之过表达 *FBXO38* 抑制 A375 和 OMM2.3 细胞增殖 ($P < 0.05$)。KEGG 通路富集分析显示, 在皮肤黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤中, *FBXO38* 的表达影响磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt) 通路激活。与对照组相比, PI3K 抑制剂 LY294002 和 mTOR1 抑制剂 Everolimus 对 *FBXO38* 敲低组的抑制率显著提升 ($P < 0.05$), 对 *FBXO38* 过表达组的抑制率则显著下降 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 敲低 *FBXO38* 之后, 与 PI3K-Akt 通路相关的 PTEN、P21 和 P53 蛋白水平下降, 而 MDM2 蛋白水平上升。qRT-PCR 结果显示在 *FBXO38* 敲低细胞中 *P53* 转录水平显著下降 ($P < 0.05$), 而 *MDM2* 转录水平显著上升 ($P < 0.05$)。**结论** · *FBXO38* 通过 PI3K-Akt 信号通路参与调控眼部黑色素瘤细胞的增殖。

[关键词] F-box 蛋白 38 (FBXO38); 眼部黑色素瘤; PI3K-Akt 信号通路; 肿瘤增殖

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.12.002 **[中图分类号]** R739.7 **[文献标志码]** A

FBXO38 regulates ocular melanoma proliferation through the PI3K-Akt signaling pathway

WU Yijia, FANG Yan, SHEN Feiyang, HUANG Rui, SHEN Jianfeng[#], FAN Xianqun[#]

Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Orbital Diseases and Ocular Oncology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective** · To investigate the effect of F-box only protein 38 (FBXO38) on the ocular melanoma proliferation and the potential regulatory pathway. **Methods** · Human skin cutaneous melanoma A375 and human uveal melanoma OMM2.3 cell lines with *FBXO38* knockdown and overexpression were constructed by *FBXO38* short hairpin RNA (shRNA) and *FBXO38* overexpression plasmids respectively. Knockdown and overexpression efficiency of FBXO38 at transcription and protein levels were verified by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting. The effects of *FBXO38* on melanoma cell proliferation were detected through clonal formation assay, BrdU immunofluorescence staining and CCK8 cell proliferation assay. By using The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, differentially expressed genes were analyzed in the high and low expression groups of *FBXO38*. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment was performed to reveal the signaling pathways associated with *FBXO38*. CCK8 cell proliferation assay was used to detect the inhibition rates of the signaling pathway inhibitors on cells with different FBXO38 expression levels. qRT-PCR and Western blotting were used to detect whether

[基金项目] 国家自然科学基金 (81972667)。

[作者简介] 吴以加 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: wyj_med@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 沈键锋, 电子信箱: jfshen@shsmu.edu.cn。范先群, 电子信箱: fanxq@sjtu.edu.cn。[#]为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81972667)。

[Corresponding Author] SHEN Jianfeng, E-mail: jfshen@shsmu.edu.cn. FAN Xianqun, E-mail: fanxq@sjtu.edu.cn. [#]Co-corresponding authors.

the signaling pathway was activated after knocking down *FBXO38*. **Results** qRT-PCR and Western blotting verified that mRNA and protein expression levels of FBXO38 in *FBXO38* knockdown A375 and OMM2.3 cell lines decreased compared with the control group, while the expression levels of FBXO38 in the overexpression cell lines increased compared with wild type group ($P < 0.05$). Clonal formation assay, BrdU immunofluorescence staining and CCK8 cell proliferation assay showed that *FBXO38* knockdown significantly enhanced the proliferation of A375 and OMM2.3 cells ($P < 0.05$), while overexpression of *FBXO38* inhibited melanoma cell proliferation ($P < 0.05$). Enrichment analysis showed that in skin cutaneous melanoma and uveal melanoma, *FBXO38* expression influenced the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) pathway activation. Compared with those in the control group, the inhibition rates of PI3K inhibitor LY294002 and mTOR1 inhibitor Everolimus in the *FBXO38* knockdown group significantly improved ($P < 0.05$), while their inhibition rates of the overexpression group significantly decreased compared with those of control cells ($P < 0.05$). Western blotting results showed that after knocking down *FBXO38*, expression levels of PTEN, P21 and P53 proteins decreased, while expression level of MDM2 protein increased. The qRT-PCR results showed a significant decrease in *P53* transcription level ($P < 0.05$) and a significant increase in *MDM2* transcription level in *FBXO38* knockdown cells ($P < 0.05$). **Conclusion** *FBXO38* plays a role in regulating the proliferation of ocular melanoma, and this regulatory effect is related to the PI3K-Akt signaling pathway.

[Key words] F-box only protein 38 (FBXO38); ocular melanoma; PI3K-Akt signaling pathway; tumor proliferation

E3泛素连接酶在人类恶性肿瘤的发生和发展中起关键作用。在SCF (SKP1-cullin 1-F-box) 蛋白E3泛素连接酶复合物中, F-box蛋白充当底物识别亚基主要通过泛素化途径识别并降解靶蛋白^[1]。F-box蛋白38 (F-box only protein 38, FBXO38) 属于SCF蛋白家族, 最初被发现是作为Krüppel样因子7 (Krüppel-like transcription factor 7, KLF7) 的相互作用蛋白, 共同调节神经发生和细胞周期进程^[2-3]。MENG等^[4]报道FBXO38可介导T细胞中程序性死亡受体1 (programmed death 1, PD-1) 的Lys48位点泛素化和蛋白酶体降解。该研究^[4]表明, *FBXO38*参与PD-1表达的调控, 揭示了FBXO38对维持T细胞的抗肿瘤活性至关重要。探究FBXO38在肿瘤增殖中的作用, 可为其作为肿瘤新的治疗靶点提供进一步的理论依据。然而, FBXO38对于肿瘤的增殖调控作用尚不清楚。

眼部黑色素瘤是一种眼部恶性肿瘤, 主要发生在眼睑、结膜以及葡萄膜等部位。眼部黑色素瘤主要包括葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 和结膜黑色素瘤 (conjunctival melanoma, CM)。UM为常见的眼部黑色素瘤^[5], 也是成人常见的眼内恶性肿瘤。UM对抗PD-1治疗反应较差^[6]。且转移后的UM对化学治疗或靶向治疗反应不佳, 患者通常在症状出现1年后死亡^[7]。而在CM中, 缺少关于PD-1治疗的效果评估和机制研究^[8]。FBXO38对于眼部黑色素瘤抗PD-1治疗抗性的缓解提供了新的可能性^[9]。本研究拟探究FBXO38在眼部黑色素瘤中对于肿瘤增殖的影响, 以期改善眼部黑色素瘤的治疗提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器 CO₂培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 离心机 (Eppendorf, 德国), 酶标仪、蛋白及DNA电泳装置 (Bio-Tek, 美国), Odyssey红外成像系统 (LI-COR, 美国), Realtime-qPCR仪、PCR扩增仪 (Applied Biosystems, 美国)、Pannoramic MIDI病理扫描仪 (丹吉尔电子有限公司)。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、双抗 (青霉素/链霉素) 溶液、0.25%胰蛋白酶 (Gibco, 美国), 支原体抑制剂 (深圳欣博盛生物科技有限公司), 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (Sigma, 美国), 5% BSA封闭液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 0.22 μm PVDF膜 (Merck millipore, 德国), RNA抽提试剂盒 (EZBioscience, 美国), 限制性内切酶 *EcoR* I、*Age* I (NEB, 美国), qPCR反转录试剂盒、Applied Biosystems™ SYBR™ Green预混液、T4连接酶、重组酶 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), DH5a感受态细胞 (北京擎科生物科技股份有限公司), 质粒小提中量试剂盒 (天根生化科技有限公司), Polyjet、聚凝胺 (polybrene)、嘌呤霉素 (puromycin) (SigmaGen, 德国), anti-FBXO38抗体 (A302-378A, BETHYL, 美国), anti-p-PI3K抗体 (AP0854)、anti-p-Akt抗体 (AP0637)、anti-p-mTOR抗体 (AP0115)、anti-PTEN抗体 (A19104)、anti-MDM2抗体 (A23388)、anti-P53抗体 (A0263)、

anti-P21 抗体 (A1483) (爱博泰克生物), StarBright Blue 520 鼠源 IgG 二抗 (Bio-Rad, 美国), Alexa Fluor Plus 800 兔源 IgG 二抗、Alexa Fluor 594 Plus 兔源 IgG 二抗 (Invitrogen, 美国), anti-BrdU 的单克隆大鼠一抗 (Abcam, 美国), DAPI (上海碧云天生物技术有限公司), 2-吗啉代-8-苯基色酮 (LY294002)、依维莫司 (Everolimus) (MedChemExpress, 美国)。

1.1.3 细胞和质粒 人UM细胞 OMM2.3 由荷兰莱顿大学医学中心 John F. Marshall 教授惠赠, 人皮肤黑色素瘤 (skin cutaneous melanoma, SKCM) 细胞 A375 和人胚肾细胞 293FT 细胞从中国科学院细胞库购买。所有细胞系的支原体污染检测均为阴性。A375 和 293FT 细胞采用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, OMM2.3 细胞采用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。培养基中均常规加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。细胞均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO_2 培养箱中培养。载体质粒 PLKO.1 和 PLVX 以及病毒包装质粒 PMD2.D、PSPAX2 均为上海市眼眶病眼肿瘤重点实验室库存。

1.2 实验方法

1.2.1 稳转细胞系构建

(1) sh*FBXO38* 质粒构建。靶向人 *FBXO38* 的外显子序列分别设计并合成 2 条 shRNA 编码序列 (GACTTCCTTTGTATCAGCTTA 和 GCAAGACTCCACTTCGAAAGA)。对退火后的引物和载体质粒 PLKO.1, 使用限制性内切酶 *Age* I 和 *Eco*R I 进行酶切, 使用 T4 连接酶进行重组, 经测序正确后使用。*FBXO38*-shRNA 质粒用于后续 *FBXO38* 敲低稳转细胞系构建, 空载质粒用于对照稳转细胞系构建。

(2) 过表达质粒构建。参照 NCBI 官网信息, 获取 *FBXO38* 的编码序列 (coding sequence, CDS) 后

合成 CDS。使用重组酶连接目的序列和 PLVX 质粒, 经质粒全长测序正确后使用。使用未经人工干预或基因改造的野生型细胞作为对照细胞系。

(3) 慢病毒包装。按照如下比例将质粒加入到 500 μL 不含血清的 DMEM 培养基中: 5 μg 含有目的序列的质粒+10 μg PSPAX2+5 μg PMD2.D。另外准备一管 500 μL 不含血清的 DMEM 培养基, 加入 60 μL polyjet。2 管同时室温静置 10 min 之后, 将含有 polyjet 的培养基滴至含质粒的培养基中, 再次静置 10 min。待 293FT 细胞密度达到 90% 时, 将质粒盒脂质体混合物滴入含有 293FT 细胞的培养皿中, 再次置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度的细胞培养箱中继续培养 48 h。收集慢病毒液, 经 0.22 μm 滤头过滤后用于细胞感染。

(4) 质粒转染。取处于对数生长期且细胞状态良好的 A375 和 OMM2.3 细胞, 待其生长密度达到 20%~30% 时, 弃培养基, 将慢病毒液与新鲜培养基按照 1:1 的体积比例缓慢加入细胞培养皿中, 并以 1:1 000 的比例加入 polybrene, 轻柔混匀。培养 24 h 之后换液, 并使用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin 进行筛选。筛选 1 周后使用 Western blotting 或实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证 *FBXO38* 的敲低和过表达效率。

1.2.2 qRT-PCR 将消化后的细胞离心取沉淀, 用 PBS 冲洗 3 次, 使用 RNA 抽提试剂盒提取 RNA。将得到的产物使用反转录试剂盒进行反转录, 得到 cDNA 原液。将 cDNA 原液使用去离子水稀释 20 倍, 并按照说明书, 使用 Applied Biosystems™ SYBR™ Green 预混液配制 10 μL PCR 反应体系。用 Realtime-qPCR 仪进行 qRT-PCR, 并使用配套软件进行 C_t 值计算。以 β -actin 作为对照计算 RNA 的相对表达量。用于 qRT-PCR 检测的相关基因引物序列见表 1。

表 1 用于 qRT-PCR 检测的引物序列

Tab 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>FBXO38</i>	AACGGTACTCGGCGTTACTC	TGTTTTGGTACTTCTGACAATTC
<i>ACTIN</i>	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC
<i>MDM2</i>	AGGAGATTGTTTGGCGTGC	TGAGTCCGATGATTCTGCTG
<i>TP53</i>	AAGTCTAGAGCCACCGTCCA	CAGTCTGGCTGCCAATCCA

Note: *FBXO38*—F-box only protein 38; *MDM2*—murine double minute 2; *TP53*—tumor protein p53.

1.2.3 Western blotting 将细胞沉淀和肿瘤样品用蛋白裂解液 RIPA 于冰上裂解, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\times g$ 离

心收集蛋白质上清液。样品定量后取 60 μg 总蛋白上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 80 V

电泳2 h。待蛋白条带分离充分,将蛋白质转膜至PVDF膜上。在室温下用5% BSA封闭1 h后,将膜与相应浓度的一抗在4 °C下孵育过夜。使用的一抗包括:anti-FBXO38抗体、anti-p-PI3K抗体、anti-p-Akt抗体、anti-PTEN抗体、anti-MDM2抗体、anti-P53抗体、anti-P21抗体和anti-ACTIN抗体,稀释比例均为1:1 000。待一抗孵育结束后,使用1×TBST溶液室温摇床清洗膜3次,每次5 min。将膜与荧光二抗于室温下共同孵育1 h。使用的二抗包括StarBright Blue 520鼠源IgG二抗和Alexa Fluor Plus 800兔源IgG二抗,稀释比例均为1:10 000。再次使用1×TBST溶液重复清洗膜3次。将膜置于Odyssey红外成像系统中进行显像。

1.2.4 克隆形成实验 取对数生长期的各组细胞,用胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞悬液后计数。将FBXO38敲低组、FBXO38过表达组以及对照组同时以等量个数的细胞,接种于含2 mL 37 °C预热培养液的六孔板中,置于细胞培养箱中培养。培养至14 d,当六孔板中细胞群落有所粘连时,终止培养。每孔中加入4%多聚甲醛1 mL,低速摇床上固定细胞5 min。弃固定液,加入10%结晶紫溶液1 mL染色30 min。轻柔地洗净平板,置于室温下自然干燥。使用扫描仪获取细胞克隆照片,ImageJ软件进行计数并统计每个孔板中细胞群落的个数。

1.2.5 BrdU免疫荧光染色 将细胞提前接种至爬片上,使用10 µg/mL 5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU; 1:1 000)染色1 h。PBS清洗爬片2次后,使用甲醇固定30 min。用1 mol/L HCl处理细胞,并用10%胎牛血清封闭1 h,然后使用anti-BrdU的单克隆大鼠一抗(1:200)以及Alexa Fluor 594 Plus兔源IgG二抗(1:1 000)分别孵育1 h。最后加入DAPI用于核染色。荧光图像由Pannoramic MIDI病理扫描仪获得,使用ImageJ软件计算BrdU阳性细胞率。

1.2.6 CCK8检测细胞增殖和药物抑制率 在96孔板中接种细胞悬液,并在培养箱中预培养24 h。待细胞贴壁之后,弃上清液,加入不同浓度的待测药物,再次培养24 h。每孔中加入10 µL CCK8溶液,共培养4 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。利用对照孔、实验孔和空白孔的吸光度计算药物抑制率。

1.2.7 数据库分析 下载肿瘤基因组图谱计划数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中TCGA_

SKCM($n=470$)和TCGA_UM($n=80$)数据集。依据中分位数将样本分为FBXO38高表达组和FBXO38低表达组,用DESeq2 R软件包(1.16.1)进行差异表达基因分析。筛选条件为: $|\log_2[\text{差异倍数(fold change)}]| \leq 2$,错误发现率(false discovery rate, FDR) <0.05 。通过clusterProfiler R包进行差异表达基因的京都基因与基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。

1.3 统计学分析

用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用非配对 t 检验比较2组之间的差异。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

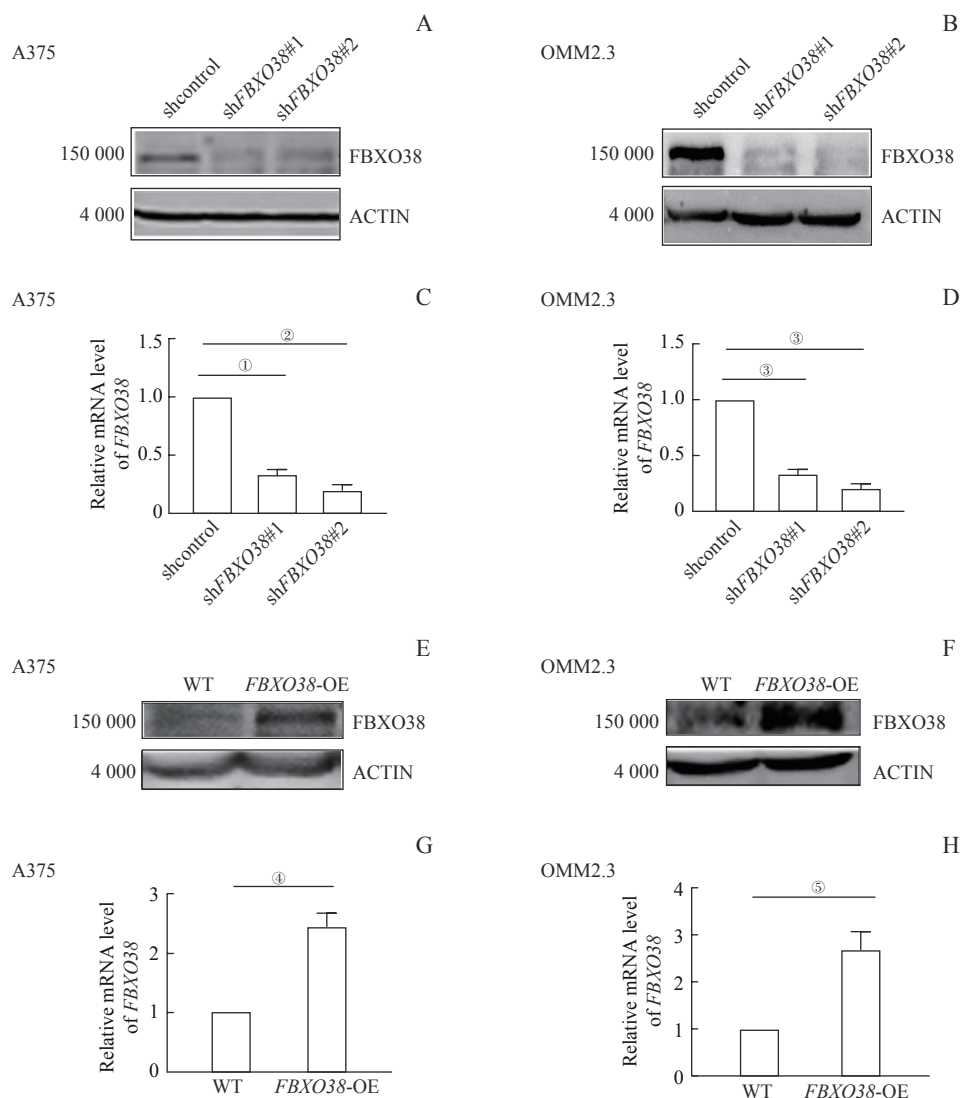
2.1 FBXO38敲低和过表达细胞系的建立及验证

结合FBXO38在黑色素瘤细胞系中的实际表达量,选取人SKCM细胞系A375和人UM细胞系OMM2.3作为研究对象,并基于这些细胞构建FBXO38敲低稳转细胞系以及对照细胞系。Western blotting验证FBXO38蛋白在2个细胞系中的表达均得到了有效的抑制(图1A、B)。qRT-PCR检测结果也显示shFBXO38组中FBXO38的转录水平相较于对照组显著降低(图1C、D,均 $P<0.05$)。随后构建FBXO38过表达细胞系,Western blotting(图1E、F)和qRT-PCR(图1G、H,均 $P<0.05$)结果均显示过表达FBXO38组中FBXO38的蛋白表达水平和转录水平相较于野生型细胞显著提高。

2.2 FBXO38的表达对黑色素瘤细胞增殖的影响

为探究FBXO38表达对眼部黑色素瘤细胞增殖的影响,对FBXO38敲低和过表达A375和OMM2.3细胞系进行克隆形成实验。结果显示,敲低FBXO38之后,A375和OMM2.3细胞的克隆形成能力显著提高(图2A~D,均 $P<0.05$);反之对比对照组,过表达FBXO38后A375和OMM2.3细胞的克隆形成能力显著下降(图2A~D,均 $P<0.05$)。

为进一步证实FBXO38表达对眼部黑色素瘤细胞增殖的影响,使用BrdU染料对细胞系进行免疫荧光染色,并统计BrdU阳性细胞比例(图2E、F)。结果



Note: A/B. Expression of FBXO38 in control and FBXO38-knockdown A375 cell line (A) and OMM2.3 cell line (B) detected by Western blotting. C/D. Transcription level of FBXO38 in FBXO38-knockdown groups compared with control A375 cell line (C) and OMM2.3 cell line (D) detected by qRT-PCR. E/F. Expression of FBXO38 in wild type and FBXO38 overexpression A375 cell line (E) and OMM2.3 cell line (F) detected by Western blotting. G/H. Transcription level of FBXO38 in FBXO38 overexpression compared with wild type A375 cell line (G) and OMM2.3 cell line (H) detected by qRT-PCR. ^① $P=0.013$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.001$, ^④ $P=0.008$, ^⑤ $P=0.016$.

图1 FBXO38敲低和过表达细胞系构建

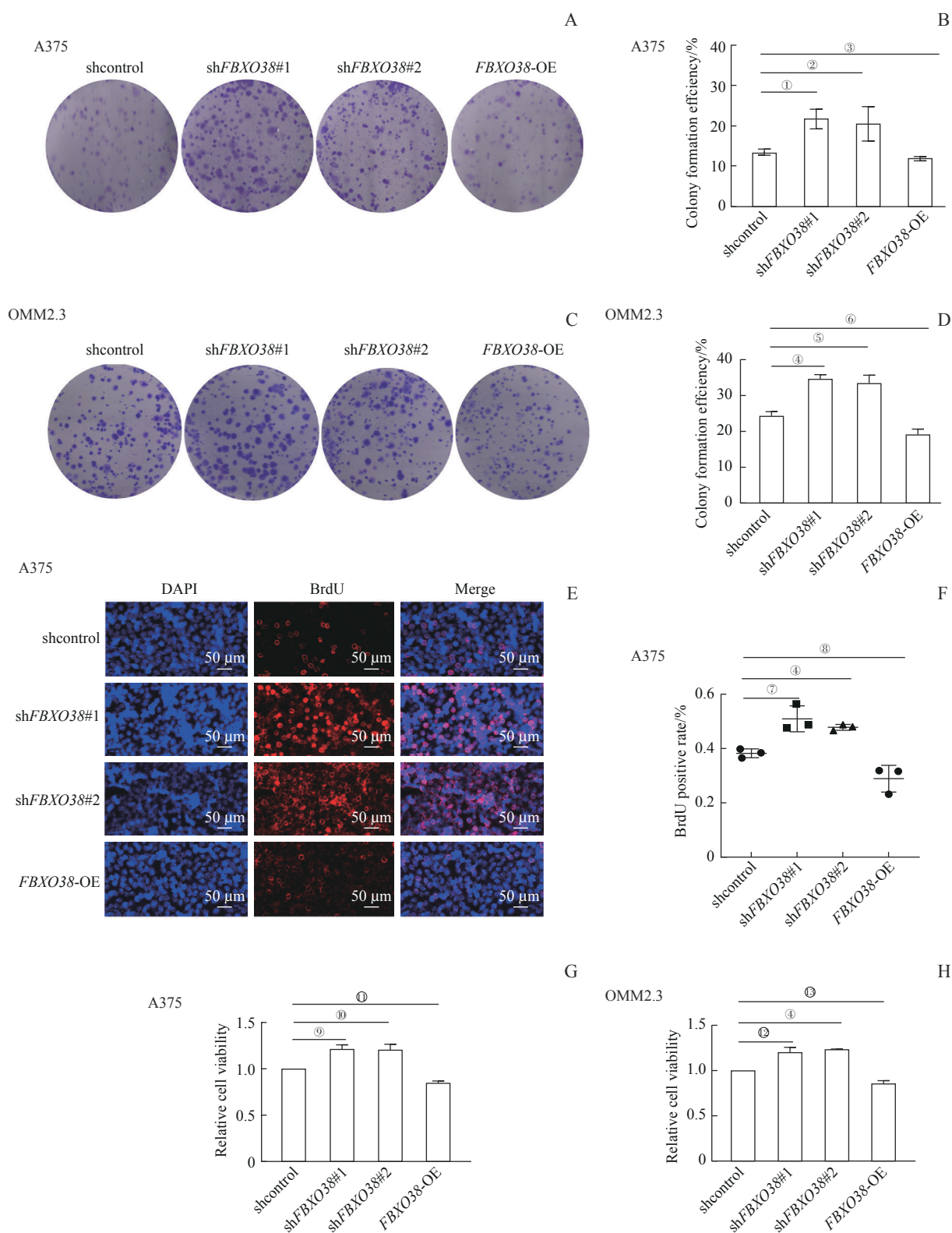
Fig 1 Construction of FBXO38 knockdown and overexpression cell lines

显示, 在 A375 细胞系中, 相较于对照组, FBXO38 敲低细胞系中 BrdU 阳性细胞率显著上升 (均 $P<0.05$); 同时, 过表达 FBXO38 细胞系中 BrdU 阳性细胞率相比对照组显著下降 (均 $P<0.05$)。

接着, 使用 CCK8 试剂盒检测细胞系增殖能力。结果显示, 在 A375 细胞系 (图 2G) 和 OMM2.3 细胞系 (图 2H) 中, FBXO38 敲低细胞系的增殖能力显著上升 (均 $P<0.05$); 反之对比对照组, FBXO38 过表达使细胞增殖能力显著下降 (均 $P<0.05$)。以上结果表明, 敲低 FBXO38 促进黑色素瘤细胞增殖, 反之过表达 FBXO38 抑制黑色素瘤细胞增殖。

2.3 FBXO38 表达有关的基因的信号通路富集分析

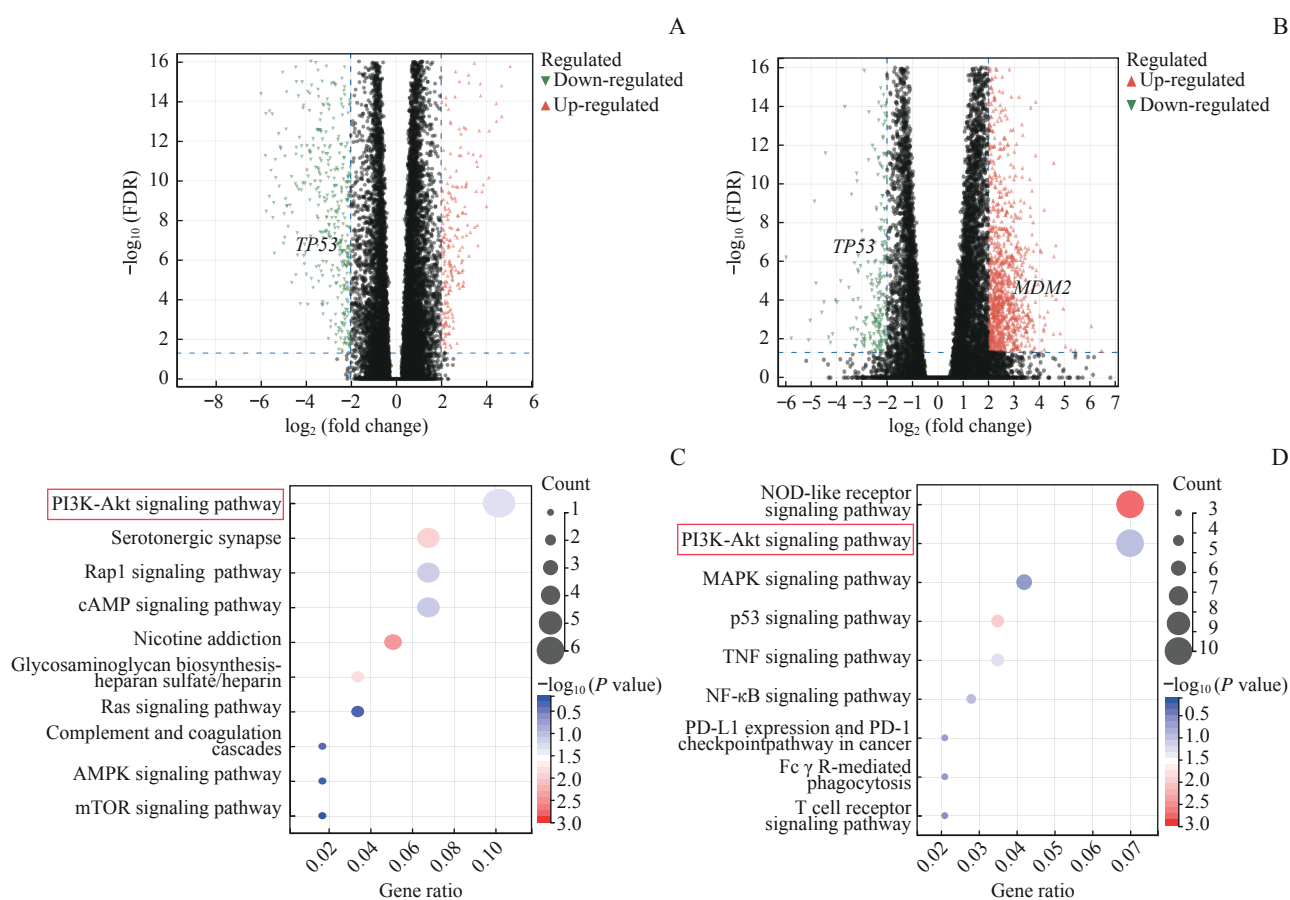
为探究 FBXO38 的表达影响肿瘤细胞增殖的可能机制, 对 TCGA 数据库中 SKCM 和 UM 基因表达谱进行分析。在 SKCM 中, 212 个基因在 FBXO38 高表达组中上调, 448 个基因在 FBXO38 低表达组中上调 (图 3A)。而在葡萄膜黑色素瘤中, 1 074 个基因在 FBXO38 高表达组中上调, 228 个基因在 FBXO38 低表达组中上调 (图 3B)。KEGG 分析结果显示, SKCM 和 UM 中的差异表达基因均富集于磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路 (图 3C、D)。



Note: A. Representative images of colony formation in *FBXO38* knockdown and overexpression A375 cells. B. Colony formation efficiency of A375 cell lines after 7-d incubation. C. Representative images of colony formation on *FBXO38* knockdown and overexpression OMM2.3 cells. D. Colony formation efficiency of OMM2.3 cell lines after 7-d incubation. E. Immunofluorescence staining of BrdU in *FBXO38* knockdown and overexpression A375 cells. Scale bars, 50 μ m. F. The percentage of BrdU positive A375 cells. G/H. Cell viability of *FBXO38* knockdown and overexpression A375 cells (G) and OMM2.3 cells (H) detected by CCK8 assay. ^① $P=0.046$, ^② $P=0.048$, ^③ $P=0.039$, ^④ $P=0.001$, ^⑤ $P=0.003$, ^⑥ $P=0.010$, ^⑦ $P=0.012$, ^⑧ $P=0.036$, ^⑨ $P=0.024$, ^⑩ $P=0.033$, ^⑪ $P=0.005$, ^⑫ $P=0.016$, ^⑬ $P=0.017$.

图2 *FBXO38* 敲低或者过表达对黑色素瘤细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of *FBXO38* knockdown or overexpression on the proliferation of melanoma cells



Note: A/B. Volcano plot of differentially expressed genes between different *FBXO38* expression groups in TCGA SKCM (A) and UM (B). C/D. KEGG analysis of differentially expressed genes between different *FBXO38* expression groups in SKCM (C) and UM (D) in TCGA datasets.

图3 与 *FBXO38* 相关的差异表达基因富集分析

Fig 3 Enrichment analysis of differentially expressed genes associated with *FBXO38*

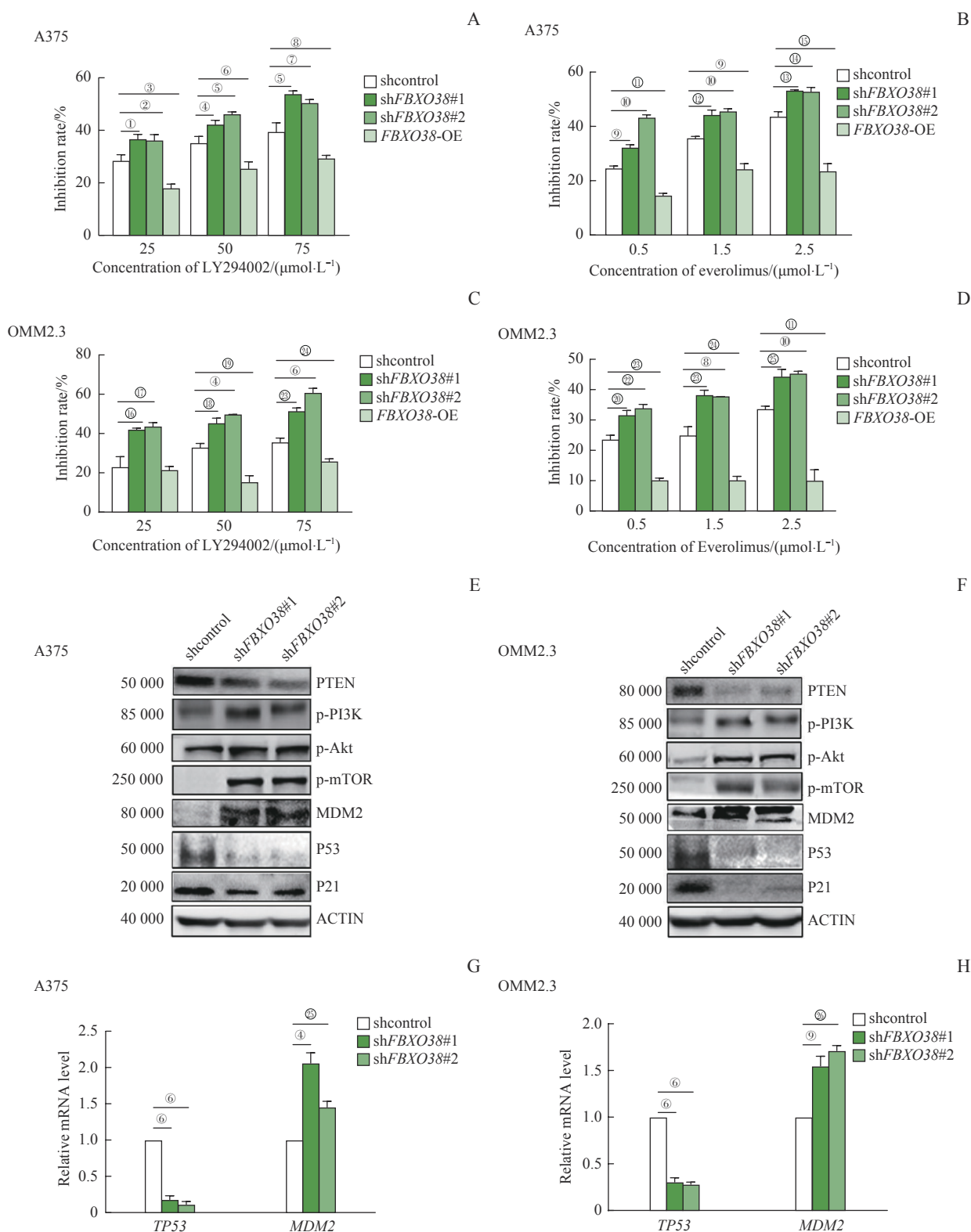
2.4 *FBXO38* 与 PI3K-Akt 信号通路相关性的体外实验验证

为探究 *FBXO38* 表达与 PI3K-Akt 信号通路的相关性, 使用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 mTOR1 抑制剂 Everolimus 对构建的 *FBXO38* 敲低或者过表达细胞系进行处理; 在共培养 24 h 后, 使用 CCK8 试剂盒检测细胞增殖水平并计算药物抑制率。与对照组相比, 2 种药物对 *FBXO38* 敲低组的抑制率显著提高 (图 4A~D, 均 $P < 0.05$), 对过表达 *FBXO38* 组的抑制率显著降低 (均 $P < 0.05$)。

PI3K-Akt 信号通路的活化方式主要依赖于磷酸化 PI3K、AKT 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)。使用 Western blotting 检测 *FBXO38* 敲低 A375 和 OMM2.3 细胞系中相关磷酸化蛋白的水平, 结果显示, PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平上升 (图 4E、F)。

说明敲低 *FBXO38* 可激活 PI3K-Akt 信号通路。

为了探究 *FBXO38* 表达对肿瘤细胞增殖的影响是否与 PI3K-Akt 信号通路的启动和下游分子 MDM2、P53 以及 P21 的表达相关, 使用 Western blotting 检测 *FBXO38* 敲低 A375 和 OMM2.3 细胞系中相关蛋白水平。对比对照组, 在 *FBXO38* 敲低的肿瘤细胞中, PTEN、P53 和 P21 蛋白水平显著下降, 同时 MDM2 蛋白水平显著上升 (图 4E、F)。同时, 使用 qRT-PCR 检测 *FBXO38* 敲低 A375 (图 4G) 和 OMM2.3 (图 4H) 细胞系中 *P53* 和 *MDM2* 的转录水平。结果显示, 对比对照组, 在 *FBXO38* 敲低细胞中 *TP53* 的转录水平显著下降 (均 $P < 0.05$), 而 *MDM2* 的转录水平显著上升 (均 $P < 0.05$)。这说明 *FBXO38* 缺陷可激活 PI3K-Akt 信号通路, 进而通过影响 *MDM2* 以及细胞周期蛋白 *P53* 和 *P21* 的转录和蛋白水平, 促进黑色素瘤细胞的增殖。



Note: A/B. Detection of inhibition rate of different concentration of LY294002 (A) or Everolimus (B) on A375 cells after 24 h of treatment by using CCK8 assay. C/D. Detection of inhibition rate of different concentration of LY294002 (C) or Everolimus (D) on OMM2.3 cells after 24 h of treatment by using CCK8 assay. E/F. Expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, PTEN, MDM2, P53 and P21 in *FBXO38* knockdown and control A375 cells (E) and OMM2.3 cells (F) detected by Western blotting. G/H. Transcription level of *TP53* and *MDM2* in *FBXO38* knockdown and control A375 cells (G) and OMM2.3 cells (H) detected by qRT-PCR. ① $P=0.003$, ② $P=0.030$, ③ $P=0.044$, ④ $P=0.006$, ⑤ $P=0.013$, ⑥ $P=0.001$, ⑦ $P=0.041$, ⑧ $P=0.017$, ⑨ $P=0.012$, ⑩ $P=0.004$, ⑪ $P=0.011$, ⑫ $P=0.027$, ⑬ $P=0.015$, ⑭ $P=0.006$, ⑮ $P=0.014$, ⑯ $P=0.033$, ⑰ $P=0.040$, ⑱ $P=0.048$, ⑲ $P=0.005$, ⑳ $P=0.020$, ㉑ $P=0.042$, ㉒ $P=0.024$, ㉓ $P=0.008$, ㉔ $P=0.023$, ㉕ $P=0.010$, ㉖ $P=0.002$.

图4 *FBXO38*对PI3K-Akt信号通路和下游分子的调节

Fig 4 Regulation of *FBXO38* on the PI3K-Akt signaling pathway and downstream molecular

3 讨论

作为 SCF 蛋白 E3 泛素连接酶复合物的成员, FBXO38 可以通过泛素化和蛋白酶体降解参与多个细胞过程^[10]。针对 *FBXO38* 的研究较少, 既往的文献主要集中于 *FBXO38* 对于细胞动力学、染色体稳定性以及细胞周期中的作用。GEORGES 等^[11] 的研究表明 *FBXO38* 可以独立于 SCF 复合物来稳定驱动蛋白家族成员 20B (kinesin family member 20B, KIF20B), *FBXO38* 的缺失可以表现为胃癌 AGS 细胞的动力学缺陷。DIBUS 等^[12] 发现 *FBXO38* 可以通过泛素化和蛋白酶体依赖性降解控制 X 连锁锌指蛋白复制 B (zinc finger X-linked duplicated B, ZXDB) 蛋白的稳定性, 进而调节丝粒染色体的稳定性。此外, 据报道^[13], 低表达 *Fbxo38* 的 C57BL/6N 小鼠表现出较弱的全反式维甲酸染色, 精原细胞数目明显减少, 并伴随着精子产量的显著下降和生育能力的降低, 提示 *FBXO38* 在生殖系统中维持生殖细胞稳定性的作用。AKÇIMEN 等^[14] 则报道 *FBXO38* 突变可导致早发性远端遗传性运动神经元病的发生。但是, *FBXO38* 在眼部黑色素瘤中的作用未有报道, 且 *FBXO38* 对于肿瘤细胞增殖相关通路的影响尚不清楚。

本研究选取人 SKCM 细胞系 A375 和 UM 细胞系 OMM2.3 作为研究对象。由于缺乏成熟的 CM 细胞系, 且既往文献在对 CM 进行 RNA-seq 测序后, 认为 TCGA 数据库 SKCM 的基因组分类可很好地适用于 CM^[15], 故本研究使用 SKCM 细胞系 A375 代替 CM 细胞系探索 *FBXO38* 在 CM 中的功能。通过构建 *FBXO38* 敲低肿瘤细胞系, 并进行克隆形成、BrdU 荧光染色和 CCK8 细胞增殖实验, 发现在 2 种黑色素瘤细胞中, *FBXO38* 缺陷均能促进肿瘤细胞增殖和克隆形成能力。文献^[12] 证实, 使用空载质粒为基础的慢病毒载体构建对照细胞 (shCtrl), 与野生型细胞的表型没有差异。本实验使用的慢病毒载体体系, 可降低启动子插入并激活其余致癌基因的风险, 有较高的生物安全性^[16]。本研究中, 验证 *FBXO38* 过表达细胞的增殖能力时采用 shCtrl 作为对照, 发现对比对照组, 过表达 *FBXO38* 能抑制细胞增殖能力。

为进一步揭示 *FBXO38* 敲减促进黑色素瘤细胞增殖的原因, 使用 TCGA 数据库挖掘与 *FBXO38* 相关的差异基因和通路, 发现在 SKCM 和 UM 中, *FBXO38*

的不同表达量可影响 PI3K-Akt 信号通路的激活与否。经典的 PI3K-Akt 途径与多种生理活动的调节有关, 包括细胞增殖、分化、凋亡、血管生成和蛋白质合成^[17-18]。既往文献^[19] 报道, 上游分子 PTEN 的表达下调, 可以诱导 PI3K-Akt 途径的过度和持续激活, 导致黑色素瘤细胞增殖。同时, PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活被证实与 UM 细胞的增殖密切相关^[20]。本研究中, 使用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 mTOR1 抑制剂 Everolimus 分别与细胞在体外共培养检测药物抑制率, 对比对照组发现在 *FBXO38* 敲低组药物的抑制率显著上升, 反之在过表达组药物抑制率显著下降。说明 *FBXO38* 的表达可影响 2 种 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂的肿瘤抑制效果。

文献^[21] 报道, PTEN 是一种肿瘤抑制因子, 可将质膜内源蛋白 3 (plasma membrane intrinsic protein 3, PIP3) 转化为质膜内源蛋白 2 (plasma membrane intrinsic protein 2, PIP2), 并负调控 PI3K-Akt 信号通路。当 PTEN 突变或转化为失活形式时, PI3K 可磷酸化膜结合蛋白 PIP2, 从而生成 PIP3, 进而磷酸化下游的 Akt 蛋白, 启动 PI3K-Akt 信号通路^[21]。激活的 PI3K-Akt 信号通路可激活下游启动子 *MDM2*, 抑制肿瘤抑制因子 P53 蛋白^[22] 和细胞周期蛋白 P21^[23], 进而推动细胞周期进行。*MDM2* 是诱导肿瘤发生的癌基因, 其转录水平受到 P53 蛋白水平和 DNA 损伤调控^[24]; 同时, 在激活的 PI3K-Akt 信号通路的影响下, 核易位后的 *MDM2* 可与 P53 结合, 从而抑制 *P53* 的转录^[25-26]。此外, 在蛋白水平, *MDM2* 可与 P53 结合, 并通过蛋白酶体促进其降解^[27-28]。在本研究中, 我们检测了下游细胞周期蛋白 P53 和启动子基因 *MDM2* 的转录和蛋白水平, 发现在 *FBXO38* 敲低的黑色素瘤细胞中, P53 的表达显著下降, *MDM2* 的表达显著上升, 符合 *FBXO38* 敲低后可促进肿瘤增殖的结论, 说明 *FBXO38* 可通过 PI3K-Akt 信号通路调控肿瘤细胞增殖。

综上所述, *FBXO38* 参与眼部黑色素瘤的增殖调控, 并且这种作用与 PI3K-Akt 信号通路密切相关。该研究为眼部黑色素瘤的靶向治疗提供了潜在的靶点, 但相关作用机制仍需进行更深入的探索。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

吴以加、房燕、沈菲洋负责生物学实验操作,黄蕊负责生物信息学分析;吴以加、沈键锋负责实验设计;吴以加、沈键锋、范先群负责论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The biological experiment was completed by WU Yijia, FANG Yan, and SHEN Feiyang. Bioinformatics analysis was performed by

HUANG Rui. The study was designed by WU Yijia and SHEN Jianfeng. The manuscript was drafted and revised by WU Yijia, SHEN Jianfeng and FAN Xianqun. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-08-13
- Accepted: 2023-10-25
- Published online: 2023-12-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] TEKCHAM D S, CHEN D, LIU Y, et al. F-box proteins and cancer: an update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects[J]. *Theranostics*, 2020, 10(9): 4150-4167.
- [2] SMALDONE S, LAUB F, ELSE C, et al. Identification of MoKA, a novel F-box protein that modulates Krüppel-like transcription factor 7 activity[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(3): 1058-1069.
- [3] SMALDONE S, RAMIREZ F. Multiple pathways regulate intracellular shuttling of MoKA, a co-activator of transcription factor KLF7[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): 5060-5068.
- [4] MENG X B, LIU X W, GUO X D, et al. FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells[J]. *Nature*, 2018, 564(7734): 130-135.
- [5] CHAR D H. Ocular melanoma[J]. *Surg Clin N Am*, 2003, 83(2): 253-274.
- [6] KIRCHBERGER M C, MOREIRA A, ERDMANN M, et al. Real world experience in low-dose ipilimumab in combination with PD-1 blockade in advanced melanoma patients[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(48): 28903-28909.
- [7] JAGER M J, SHIELDS C L, CEBULLA C M, et al. Uveal melanoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 24.
- [8] GRIMES J M, SHAH N V, SAMIE F H, et al. Conjunctival melanoma: current treatments and future options[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2020, 21(3): 371-381.
- [9] LI X, ZHAI J, SHEN Y K, et al. Tumor-derived IL-8 facilitates lymph node metastasis of gastric cancer via PD-1 up-regulation in CD8⁺ T cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(12): 3057-3070.
- [10] WANG Z, LIU P, INUZUKA H, et al. Roles of F-box proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(4): 233-247.
- [11] GEORGES A, COYAUD E, MARCON E, et al. USP7 regulates cytokinesis through FBXO38 and KIF20B[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2724.
- [12] DIBUS N, KORINEK V, CERMAK L. FBXO38 ubiquitin ligase controls centromere integrity via ZXDA/B stability[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 929288.
- [13] DIBUS N, ZOBALOVA E, MONLEON M A M, et al. FBXO38 ubiquitin ligase controls sertoli cell maturation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 914053.
- [14] AKÇIMEN F, VURAL A, DURMUŞ H, et al. A novel homozygous FBXO38 variant causes an early-onset distal hereditary motor neuropathy type IID[J]. *J Hum Genet*, 2019, 64(11): 1141-1144.
- [15] CISAROVA K, FOLCHER M, EL ZAOU I, et al. Genomic and transcriptomic landscape of conjunctival melanoma[J]. *PLoS Genet*, 2020, 16(12): e1009201.
- [16] VIGNA E, NALDINI L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy[J]. *J Gene Med*, 2000, 2(5): 308-316.
- [17] LIANG J Y, SLINGERLAND J M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 339-345.
- [18] WESTIN J R. Status of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in lymphoma[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014, 14(5): 335-342.
- [19] DONG Y, RICHARDS J A, GUPTA R, et al. PTEN functions as a melanoma tumor suppressor by promoting host immune response[J]. *Oncogene*, 2014, 33(38): 4632-4642.
- [20] WANG R, TAHIRI H, YANG C, et al. MiR-181a-5p inhibits uveal melanoma development by targeting GNAQ and AKT3[J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(1): 293-306.
- [21] NUNNERY S E, MAYER I A. Management of toxicity to isoform α -specific PI3K inhibitors[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30: x21-x26.
- [22] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [23] YIP P Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(2): 165-176.
- [24] ACCILI D, ARDEN K C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation[J]. *Cell*, 2004, 117(4): 421-426.
- [25] VECINO R, BURGUETE M C, JOVER-MENGUAL T, et al. The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1610.
- [26] MAYO L D, DONNER D B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11598-11603.
- [27] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [28] KATSO R, OKKENHAUG K, AHMADI K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 615-675.

[本文编辑] 崔黎明

