



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.04.011  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.04.011  
China Journal of General Surgery, 2024, 33(4):612-623.

· 基础研究 ·

## FBXO43在胃癌中的表达及其生物学功能与作用机制

杨娟<sup>1</sup>, 刘春梅<sup>1</sup>, 吴涵<sup>1</sup>, 赵路<sup>2</sup>, 卢珊珊<sup>3, 4</sup>

(1.河南省漯河市中心医院 病理科, 河南 漯河 462300; 2.漯河医学高等专科学校第二附属医院 病理科, 河南 漯河 462300; 中南大学湘雅医院 3. 癌变机理与靶向治疗研究中心; 4. 肿瘤蛋白质转化医学湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410008)

### 摘要

**背景与目的:** F-BOX 蛋白 (FBP) 家族成员 F-box only protein 43 (FBXO43) 在肝癌和结直肠癌等消化系统肿瘤中高表达, 促进肿瘤恶性进展, 且研究显示, FBXO43 促进 p53 降解, 发挥促癌功能。为此本研究进一步探讨 FBXO43 在胃癌中的表达及其在胃癌恶性进展中的功能与相关机制。

**方法:** 基于 TCGA、GTEX 和 Kaplan-Meier Plotter 等在线数据库, 分析 FBXO43 在胃癌组织中的表达及其与胃癌患者预后的相关性。用 Western blot 和 qPCR 检测 FBXO43 在胃癌细胞与正常胃黏膜上皮细胞中的表达水平; 用免疫组化检测在胃癌组织与癌旁组织中 FBXO43 的蛋白水平。利用脂质体转染特异性靶向 FBXO43 和 p53 的小分子干扰 RNA 分子 (siFBXO43 和 sip53), 分别或同时敲低 HGC27 和 MGC803 细胞中的 FBXO43 和 p53 的表达, 利用 CCK8、平板克隆形成、Transwell 侵袭和迁移等实验, 检测细胞生长、增殖、迁移和侵袭能力的影响; 利用免疫共沉淀 (Co-IP) 检测 FBXO43 和 p53 的相互作用情况, 以及敲低 FBXO43 后, p53 的总泛素化水平。

**结果:** TCGA 和 GTEX 数据显示, FBXO43 在胃癌中表达水平明显上调 (均  $P < 0.05$ ); Kaplan-Meier Plotter 数据显示, FBXO43 高表达的胃癌患者总生存期 ( $HR=1.39$ , 95%  $CI=1.09\sim 1.78$ ,  $P=0.0076$ )、无进展生存期 ( $HR=1.35$ , 95%  $CI=1.04\sim 1.76$ ,  $P=0.023$ )、进展后生存期 ( $HR=1.6$ , 95%  $CI=1.18\sim 2.17$ ,  $P=0.0021$ ) 均显著缩短。Western blot、qPCR 和免疫组化结果显示, FBXO43 在胃癌细胞和组织中上调, FBXO43 蛋白水平与胃癌患者肿瘤大小、远处转移、TNM 分期明显有关 (均  $P < 0.05$ )。CCK8、平板克隆形成、Transwell 侵袭和迁移结果显示, 敲低 FBXO43 表达, 胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显减弱 (均  $P < 0.05$ )。敲低 FBXO43 表达, 上调 p53 蛋白的水平。Co-IP 结果显示, FBXO43 与 p53 可以相互共沉淀, 敲低 FBXO43, p53 的总泛素化水平显著增加。功能实验结果显示, 同时敲低 p53, FBXO43 敲低对胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力的抑制作用被拮抗, 回复胃癌细胞的体外恶性表型 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** FBXO43 在胃癌中高表达, 与胃癌患者预后不良密切相关; FBXO43 的作用机制可能是与 p53 相互作用, 促进 p53 泛素化和降解, 进而发挥促进胃癌细胞恶性进展, FBXO43 有望成为胃癌治疗的靶点。

### 关键词

胃肿瘤; F 框蛋白质类; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.2

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金资助项目 (82103638); 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ40805)。

**收稿日期:** 2024-03-15; **修订日期:** 2024-04-17。

**作者简介:** 杨娟, 河南省漯河市中心医院副主任医师, 主要从事妇乳及消化肿瘤方面的研究。

**通信作者:** 卢珊珊, Email: susan880102@163.com

## Expression of FBXO43 in gastric cancer and its biological function and mechanisms of action

YANG Juan<sup>1</sup>, LIU Chunmei<sup>1</sup>, WU Han<sup>1</sup>, ZHAO Lu<sup>2</sup>, LU Shanshan<sup>3,4</sup>

(1. Department of Pathology, Luohe Central Hospital, Luohe, Henan 462300, China; 2. Luohe Medical College Second Affiliated Hospital, Luohe, Henan 462300, China; 3. Research Center of Carcinogenesis and Targeted Therapy, 4. Higher Educational Key Laboratory for Cancer Proteomics and Translational Medicine of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

### Abstract

**Background and Aims:** F-box protein (FBP) family member F-box only protein 43 (FBXO43) is highly expressed in digestive system tumors such as liver cancer and colorectal cancer, promoting malignant progression of tumors. Research has shown that FBXO43 promotes the degradation of p53, exerting oncogenic functions. Therefore, this study was conducted to further explore the expression of FBXO43 in gastric cancer and its role and related mechanisms in the malignant progression of gastric cancer.

**Methods:** Based on online databases such as TCGA, GTEx, and Kaplan-Meier Plotter, the expression of FBXO43 in gastric cancer tissues and its correlation with the prognosis of gastric cancer patients were analyzed. Western blot and qPCR were used to detect the expression levels of FBXO43 in gastric cancer cells and normal gastric mucosal epithelial cells. Immunohistochemical staining was performed to detect the protein levels of FBXO43 in gastric cancer and adjacent tissues. Specific small interfering RNA molecules targeting FBXO43 and p53 (siFBXO43 and sip53) were transfected into HGC27 and MGC803 cells to knock down the expression of FBXO43 and p53 alone or simultaneously. Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay, colony formation assay, Transwell invasion and migration assays were used to detect the effects of FBXO43 knockdown on the proliferation, invasion, and migration abilities of gastric cancer cells. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to detect the interaction between FBXO43 and p53, as well as the total ubiquitination level of p53 after FBXO43 knockdown.

**Results:** TCGA and GTEx data showed that the expression level of FBXO43 was significantly upregulated in gastric cancer (both  $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier Plotter data showed that high expression of FBXO43 was significantly associated with shortened overall survival ( $HR=1.39$ , 95%  $CI=1.09-1.78$ ,  $P=0.0076$ ), progression-free survival ( $HR=1.35$ , 95%  $CI=1.04-1.76$ ,  $P=0.023$ ), and post-progression survival ( $HR=1.6$ , 95%  $CI=1.18-2.17$ ,  $P=0.0021$ ) of gastric cancer patients. Western blot, qPCR, and immunohistochemistry results showed that FBXO43 was upregulated in gastric cancer cells and tissues, and the protein level of FBXO43 was significantly associated with tumor size, distant metastasis, and TNM stage of gastric cancer patients (all  $P < 0.05$ ). CCK8 assay, colony formation assay, Transwell invasion, and migration assays showed that knockdown of FBXO43 expression significantly inhibited the proliferation, invasion, and migration abilities of gastric cancer cells (all  $P < 0.05$ ). Knockdown of FBXO43 expression upregulated the protein level of p53. Co-IP results showed that FBXO43 and p53 could co-immunoprecipitate with each other, and knockdown of FBXO43 significantly increased the total ubiquitination level of p53. Functional experiments showed that simultaneous knockdown of p53 antagonized the inhibitory effects of FBXO43 knockdown on the proliferation, invasion, and migration abilities of gastric cancer cells, restoring the malignant phenotype of gastric cancer cells in vitro (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** FBXO43 is highly expressed in gastric cancer and is closely associated with poor

prognosis in gastric cancer patients. The mechanism of action of FBXO43 may involve interaction with p53, promoting p53 ubiquitination and degradation, thereby promoting the malignant progression of gastric cancer. FBXO43 is expected to become a therapeutic target for gastric cancer.

**Key words**

Stomach Neoplasms; F-Box Proteins; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

**CLC number:** R735.2

胃癌是常见的恶性肿瘤，其发病率位居全球第五，病死率位居全球第三，严重影响全人类健康<sup>[1-2]</sup>。尤其在中国和东南亚等人口密集和经济发展相对落后的地区，胃癌的总体发病人数和死亡人数均呈高位水平<sup>[3-4]</sup>。由于早期症状不显著，多数胃癌患者确诊在中晚期，临床治疗疗效和5年生存率均不理想<sup>[5]</sup>。根据日本和韩国的胃癌早期筛查经验，早期筛查可以显著提高胃癌患者的早诊率，有效提高患者的治疗效果和预后<sup>[6-7]</sup>。由于人口基数和经济发展等诸多原因，早期筛查在包括我国在内的一些地区推广有限，因此，开展胃癌关键致瘤因子的筛查和鉴定研究，是开发胃癌诊疗新靶点、提高胃癌治疗和预后水平的有效途径。

F-BOX 蛋白 (FBP) 是一类含有 F-box 基序 (motif) 的泛素连接酶 (E3)，通过介导底物蛋白的泛素化修饰，调控底物蛋白的稳定性、活性和亚细胞定位等特性，发挥其生物学功能<sup>[6-7]</sup>。FBP 蛋白家族的异常表达在肿瘤发生发展中发挥了重要作用，是肿瘤诊断和治疗的理想靶点<sup>[8-9]</sup>。研究<sup>[10-14]</sup>表明，FBP 家族成员 (F-box only protein 43, FBXO43)，也称为内源性减数分裂抑制剂 2 (EMI2)，在肝癌、结直肠癌和乳腺癌等肿瘤中高表达，与患者预后不良和治疗抵抗呈负相关。功能上，FBXO43 通过促进抑癌基因 p53 的降解而促进肿瘤增殖和侵袭<sup>[15]</sup>。基于全基因组测序数据 (GWAS) 和表达数量性状位点 (expression quantitative trait locus, eQTL) 的整合分析发现<sup>[16]</sup>，FBXO43 基因的多态性是胃癌的高风险基因，且 FBXO43 多态性与 p53, MAPK 和 TGF- $\beta$  等肿瘤相关通路的基因存在共表达，提示 FBXO43 在胃癌发生发展中发挥作用<sup>[15]</sup>。因此，本研究分析了 FBXO43 在胃癌中的表达水平、临床相关性和预后价值，并初步探讨了 FBXO43 在胃癌中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞株和培养

胃癌细胞 HGC-27、MGC803 和正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 均购买自武汉普诺赛生物有限公司，由中南大学湘雅医院癌变机理与靶向治疗研究中心培养和保存。所有细胞均采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (VivaCell, 上海)，37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱进行培养。

### 1.2 公共数据库资源

利用 UCSC XENA (<https://xenabrowser.net/datapages>) 获取经 Toil 流程统一处理的 The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov>) 和 Genotype-Tissue Expression (GTEx, <https://gtexportal.org>) 的 TPM 格式的 RNAseq 数据，提取 (胃腺癌) 对应 TCGA 的数据和 GTEx 中对应的正常组织数据，基于 R 软件 (版本: 4.2.1)，利用 ggplot2<sup>[3.3.6]</sup>、stats<sup>[4.2.1]</sup>、car<sup>[3.1-0]</sup> 等 R 包进行统计 FBXO43 差异分析、临床相关性分析和可视化。基于 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<http://kmpplot.com/analysis>)<sup>[17-19]</sup>，利用其收录和整合的胃癌组织高通量数据集，分析 FBXO43 与胃癌患者总体生存期 (overall survival, OS)、无进展生存期 (progression free survival, PFS) 和进展后生存期 (post-progression survival, PPS) 的相关性。

### 1.3 Western blot 和 qRT-PCR 实验

通过 Western blot 和 qRT-PCR 分别检测 FBXO43 在胃癌细胞与正常胃黏膜上皮细胞中的蛋白和 mRNA 表达水平。如笔者<sup>[20]</sup>之前方法：分别用蛋白裂解液 RIPA (P0013B, 碧云天, 中国) 和 TRIZOL (15596026, Invitrogen, 美国) 提取蛋白质和 RNA，再分别测定蛋白浓度和 RNA 浓度。Western blot 步骤简述如下：取 30  $\mu$ g 蛋白，按比例加入 5 $\times$  上样缓冲液，100 °C 变性 8 min。冰上冷却后，以 30  $\mu$ g/孔依次上样，进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗一抗、二抗孵育、洗二抗、发光。

qRT-PCR 步骤简述如下: 取 1  $\mu\text{g}$  RNA 通过逆转录试剂盒 (QP007, GeneCopoeia) 配制逆转录体系, 进行逆转录。采用 mRNA qPCR mix 试剂 (QP003, GeneCopoeia), 配制 qPCR 体系, 在 PCR System 9700 (ABI Gene Amp) 上进行 cDNA 的扩增, 利用 PCR  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行实时定量, 每个样本设置 3 个复孔。anti-FBXO43 抗体购自 Proteintech (#55176-1-AP, 稀释比: 1:1 000), anti-p53 抗体购买自 Proteintech (#60283-2-Ig, 1:1 000), anti-Tubulin 抗体购自 Elabscience (#E-AB-20036, 1:2 000), 用于扩增的 FBXO43 引物如下: 正义引物 5'-GGA AAG TAA GCA GAA ATT GGC GTG-3', 反义引物 5'-ACA TGC AAC ATA AAC TGG AC CC-3' (擎科生物, 中国)。用于扩增的 GAPDH 引物: 正义引物 5'-CAG CAA GAG CAC AAG AGG AA-3', 反义引物 5'-ATG GTA CAT GAC AAG GTG CGG-3' (擎科生物, 中国)。

#### 1.4 siRNA 瞬时转染

将对数生长期的细胞提前 1 d 铺板 (6 孔板), 使转染当天细胞融合度为 30%~50%, 根据说明书, 使用 Lipofectamine™2000 (Invitrogen) 分别将 50 nmol/L siFBXO43, sip53 和 si 阴性对照组序列 (siNC) 转染到胃癌细胞<sup>[21]</sup>。转染 4~6 h 后, 换成含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基。FBXO43 siRNA 序列为 5'-CGT GAA ATT GTT GTT CAA GAT-3' (擎科生物, 中国); p53 siRNA 序列: 5'-CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT-3' (擎科生物, 中国)。

#### 1.5 细胞迁移和侵袭实验

Transwell 迁移和侵袭实验如前所述<sup>[22]</sup>, 在装有 Transwell 小室 (预铺好 Matrigel 和未铺 Matrigel) 的 24 孔板和小室中同时加入 0.5 mL 无血清 RPMI-1640, 水化小室 (37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱, 2 h)。将对数生长期的细胞消化离心重悬, 调整细胞密度为 60 000/mL。在弃培养液后的 24 孔板和小室中分别加入 0.75 mL 含 10%FBS 的 RPMI-1640 和 0.5 mL 已经重悬好的细胞悬液, 放置培养箱继续培养 48 h。取出小室, PBS 清洗、甲醇固定、0.2% 结晶紫染色 (碧云天)、PBS 清洗、晾干, 在显微镜下拍照并计数。

#### 1.6 平板克隆形成和 CCK8 检测

平板克隆: 如前所述<sup>[23]</sup>, 对数生长期的细胞进行铺板 (6 孔板), 每个孔加 2 mL 单细胞悬液 (每孔 1 000 个细胞), 每个样品 3 个复孔, 细胞培养箱连续培养 10 d 左右, 进行甲醇固定, 0.2% 结晶紫染色液 (碧云天) 染色, 自来水轻柔冲洗,

晾干后拍照, 计数并分析结果。试验进行 3 次, 每个重复。CCK8 检测: 如前所述<sup>[24]</sup>, 将对数生长期的细胞进行铺板 (96 孔板), 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  单细胞悬液 (每孔 1 000 个细胞), 每个样品每天设置 3 个复孔, 共 6 d, 并设置不含细胞的纯培养基作为零孔。细胞贴壁后, 每隔 24 h, 在当天的样品孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液 (碧云天), 细胞培养箱中培养 2 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光值, 记录数据, 绘制生长曲线。

#### 1.7 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP)

方法如前所述<sup>[25]</sup>, 采用 Co-IP 检测蛋白相互作用和 p53 泛素化。简而言之, 用琼脂糖珠子 A/G-sepharose 4B (Thermo, 101242) 预处理全细胞裂解物, 与指定抗体和蛋白 G/A-sepharose 4B 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜。用 RIPA 缓冲液洗涤 5 次后, 用 2 $\times$ SDSPAGE 上样缓冲液煮沸 5 min, 洗脱蛋白复合物, 随后进行 SDS-PAGE 分离, 用特异性抗体进行免疫印迹。

#### 1.8 临床标本及免疫组化检测

从 2019 年 9 月—2020 年 1 月漯河市中心医院收集 75 例的胃腺癌和配对癌旁组织。所有标本均于福尔马林固定、石蜡包埋, 用于免疫组化。研究得到了漯河市中心医院伦理委员会的批准 (批件号: 2019110601)。

根据通用 SP 试剂盒 (小鼠/兔链霉亲和素检测系统, SP-9000, ZSBIO) 对福尔马林固定和石蜡包埋组织切片进行免疫组化。将组织切片脱蜡, 然后进行抗原修复, 并添加内源性过氧化物酶阻断剂以阻断内源性过氧化物酶活性。阻断抗原后, 组织切片用 FBXO43 抗体 (55176-1-AP, Proteintech) 在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 然后在室温下用生物素标记的山羊抗鼠/兔 IgG 聚合物孵育 15 min。随后加入辣根酶标记链霉亲和素工作液促进抗原抗体结合。最后采用 DAB 显色试剂盒 (ZLI-9018, ZSBIO) 和苏木精染色液 (BA4097, Baso) 染色检测免疫反应细胞。2 名不了解临床参数的独立病理学家对染色强度和阳性细胞比例进行评分。经协商得分如下, 染色强度: 不染色 0 分, 淡黄色 1 分 (弱), 棕色 2 分 (中), 棕褐色 3 分 (强)。显色比 (阳性细胞比) 分为 0 不着色, <30% 着色为 1, 30%~60% 着色为 2, >60% 着色为 3。将染色强度和着色比两项评分 (范围 0~6) 相加, 评分  $\leq 3$  为 FBXO43 低表达, >3 为 FBXO43 高表达。



### 1.9 统计学处理

采用SPSS 20.0和GraphPad Prism 7.0进行统计分析和统计图表制作。平均OD值、平均克隆数、平均细胞数等计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组数据间比较采用t检验;计数资料比较利用Fisher精确检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FBXO43基因上调与胃癌患者预后不良相关

从TCGA下载表达阵列数据(包含375个胃癌

组织和35个对照组织),同时整合TCGA数据库与GTEX数据库,得到一个新的表达阵列数据(共包含414个胃癌组织和210个对照组织)。分析FBXO43在胃癌和正常组织中的表达情况。结果显示FBXO43在胃癌中高表达(均 $P < 0.001$ ) (图1A-B)。接下来,通过Kaplan-Meier Plotter评估TCGA数据库中FBXO43对胃癌的预后价值。并证实FBXO43高表达的胃癌患者OS( $HR=1.39$ ,  $95\% CI=1.09\sim 1.78$ ,  $P=0.0076$ )、PFS( $HR=1.35$ ,  $95\% CI=1.04\sim 1.76$ ,  $P=0.023$ )、PPS( $HR=1.6$ ,  $95\% CI=1.18\sim 2.17$ ,  $P=0.0021$ )均较差(图2)。这些结果提示,FBXO43可能作为癌基因影响胃癌患者的生存。

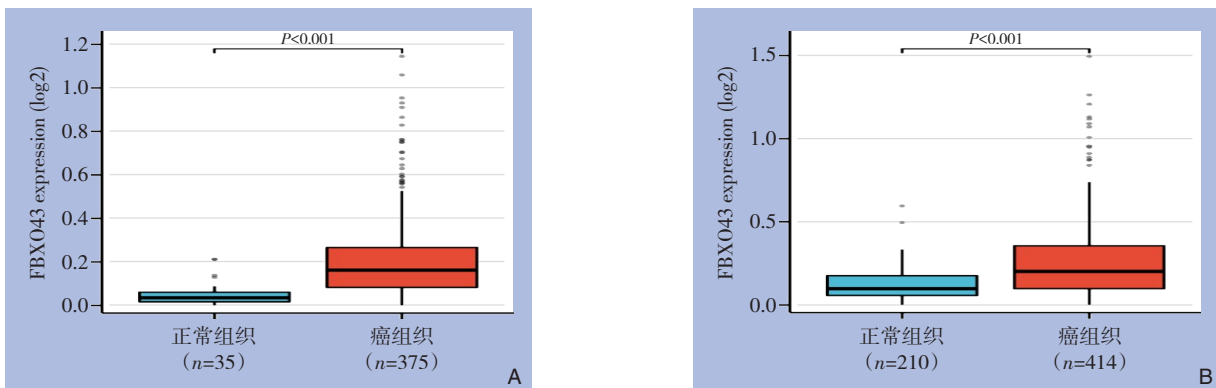


图1 在线数据库分析FBXO43基因在胃癌中的表达 A: TCGA数据库中FBXO43 mRNA在胃癌中表达上调; B: TCGA和GTEX数据库中FBXO43 mRNA在胃癌中的表达上调

Figure 1 Analysis of FBXO43 gene expression in gastric cancer in online databases A: Upregulation of FBXO43 mRNA expression in gastric cancer in TCGA database; B: Upregulation of FBXO43 mRNA expression in gastric cancer in TCGA and GTEX databases

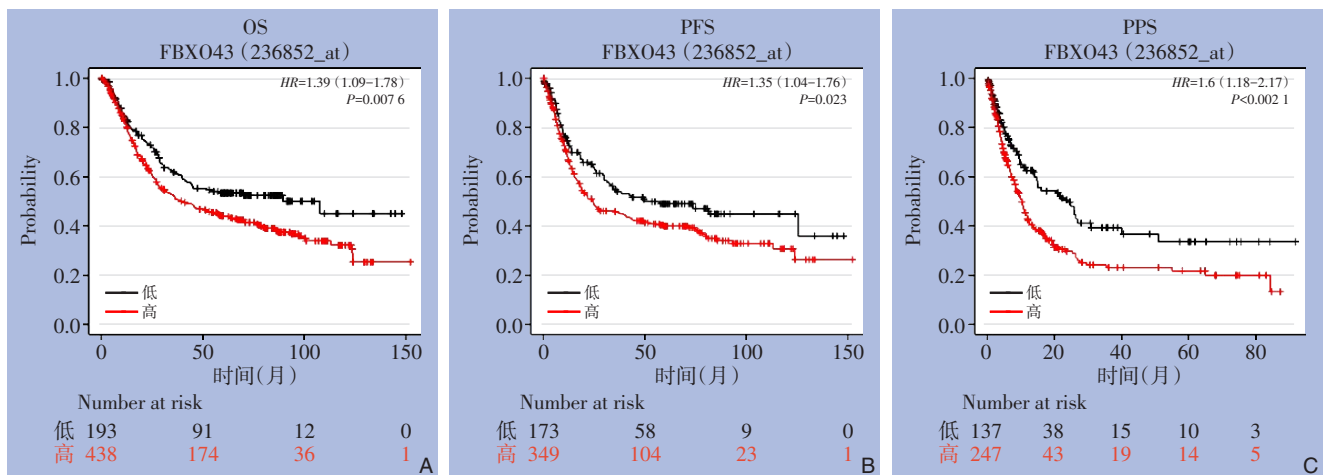


图2 Kaplan-Meier Plotter分析FBXO43 mRNA与胃癌患者预后的关系(高/低mRNA表达通过最佳截断值进行区分) A: OS曲线(n=631); B: PFS曲线(n=522); C: PPS曲线(n=384)

Figure 2 Kaplan-Meier Plotter analysis of the relationship between FBXO43 mRNA expression and prognosis of gastric cancer patients (high/low mRNA expression distinguished by optimal cutoff value) A: OS curve (n=631); B: PFS curve (n=522); C: PPS curve (n=384)

2.2 FBXO43在胃癌组织和细胞中的表达

为了验证TCGA数据库中的相关结果,利用Western blot、qPCR、免疫组化技术比较胃癌细胞与正常胃黏膜上皮细胞,及胃癌组织与癌旁组织中FBXO43的表达水平。结果显示,与正常胃黏膜上皮细胞GES1相比,FBXO43的蛋白水平和mRNA表达水平在MGC803、HGC27、AGS胃癌细胞中均明显上调(均 $P<0.01$ )(图3A-B);同时,与癌旁

组织相比,FBXO43的蛋白水平在胃癌组织中也明显上调。并且有转移胃癌组织中的FBXO43蛋白表达明显高于无转移胃癌组织(图3C)(均 $P<0.05$ )。FBXO43表达水平与胃癌临床病理特征的关系分析的结果显示,FBXO43表达水平与肿瘤大小( $P<0.01$ )、远处转移( $P<0.01$ )和TNM分期( $P<0.05$ )明显有关(表1)。上述结果提示,FBXO43高表达与胃癌患者的不良临床病理特征有关。

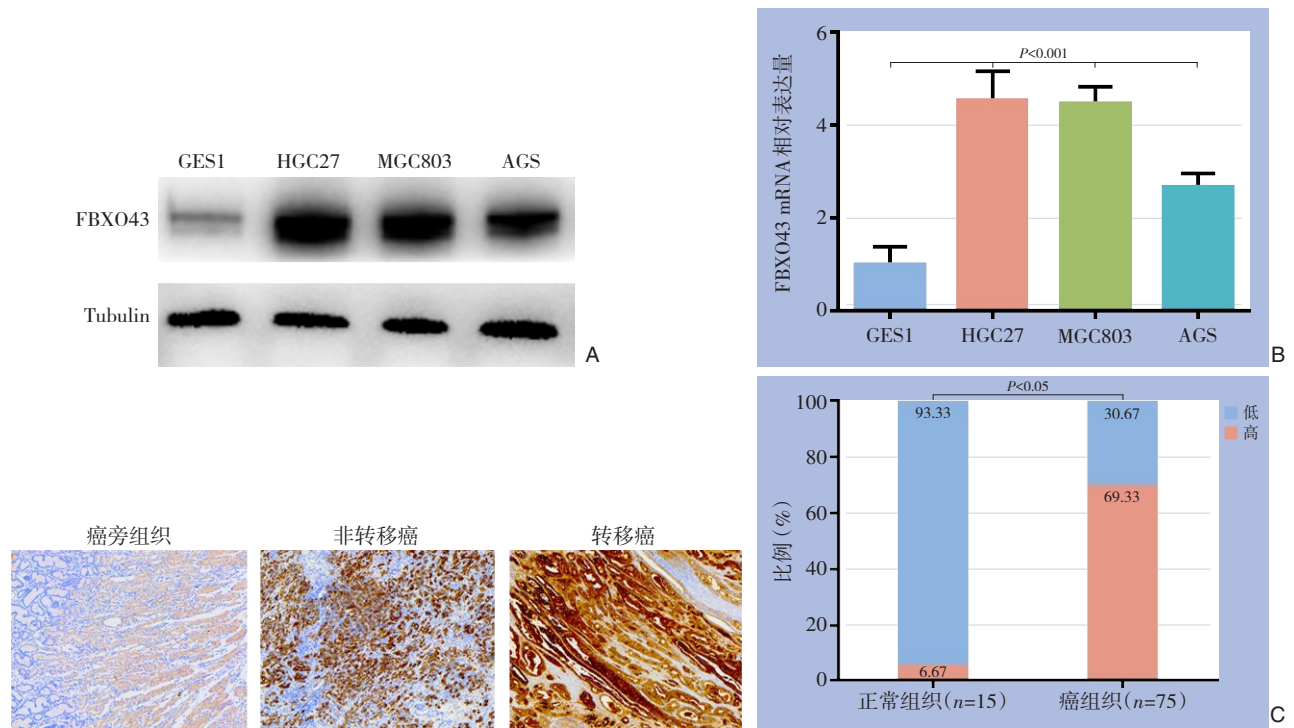


图3 FBXO43在胃癌细胞和组织中的表达 A: Western blot检测FBXO43在胃癌细胞和正常胃黏膜上皮细胞中的蛋白表达水平; B: qPCR检测胃癌细胞和正常胃黏膜上皮细胞中FBXO43 mRNA的表达水平; C: 免疫组化检测胃癌组织及癌旁组织中FBXO43蛋白水平(比例尺=100 μm)

Figure 3 Expression of FBXO43 in gastric cancer cells and tissues A: Western blot detection of protein expression levels of FBXO43 in gastric cancer cells and normal gastric mucosal epithelial cells; B: qPCR detection of mRNA expression levels of FBXO43 in gastric cancer cells and normal gastric mucosal epithelial cells; C: Immunohistochemical detection of FBXO43 protein levels in gastric cancer and adjacent tissues (scale bar=100 μm)

表1 FBXO43在胃癌中的表达与临床病理特征的关系[n (%) ]

Table 1 The relationship between the expression of FBXO43 and the clinicopathologic features of gastric cancer [n (%) ]

特征	低表达(n=23)	高表达(n=52)	P	特征	低表达(n=23)	高表达(n=52)	P
性别				分化程度			
男	19(82.6)	35(67.3)	0.174	中高分化	8(34.8)	26(50.0)	0.222
女	4(17.4)	17(32.7)		低分化	15(65.2)	26(50.0)	
年龄(岁)				远处转移			
≤50	6(26.1)	11(21.2)	0.638	有	5(21.7)	29(55.8)	0.006
>50	17(73.9)	41(78.8)		无	18(78.3)	23(44.2)	
肿瘤大小(cm)				TNM分期			
≤3	11(47.8)	9(17.3)	0.006	I-II	10(43.5)	9(17.3)	0.016
>3	12(52.2)	43(82.7)		III-IV	13(56.5)	43(82.7)	

### 2.3 敲低FBXO43表达抑制胃癌细胞的生长和增殖

为了研究FBXO43在胃癌中的功能，选择FBXO43表达较高的MGC803、HGC27两株胃癌细胞进行后续研究。将FBXO43 siRNA转染到MGC803和HGC27细胞中（MGC803-siFBXO43，HGC27-siFBXO43），以敲低FBXO43的表达。Western blot、qPCR结果显示，MGC803-siFBXO43和

HGC27-siFBXO43中FBXO43的表达明显下调（均 $P<0.05$ ）（图4A-B）。随后分析敲低FBXO43对MGC803和HGC27细胞生长、增殖的影响。平板克隆形成实验和CCK8检测实验表明，与对照细胞相比，敲低FBXO43表达明显抑制MGC803和HGC27细胞的生长和增殖（均 $P<0.05$ ）（图4C-D）。

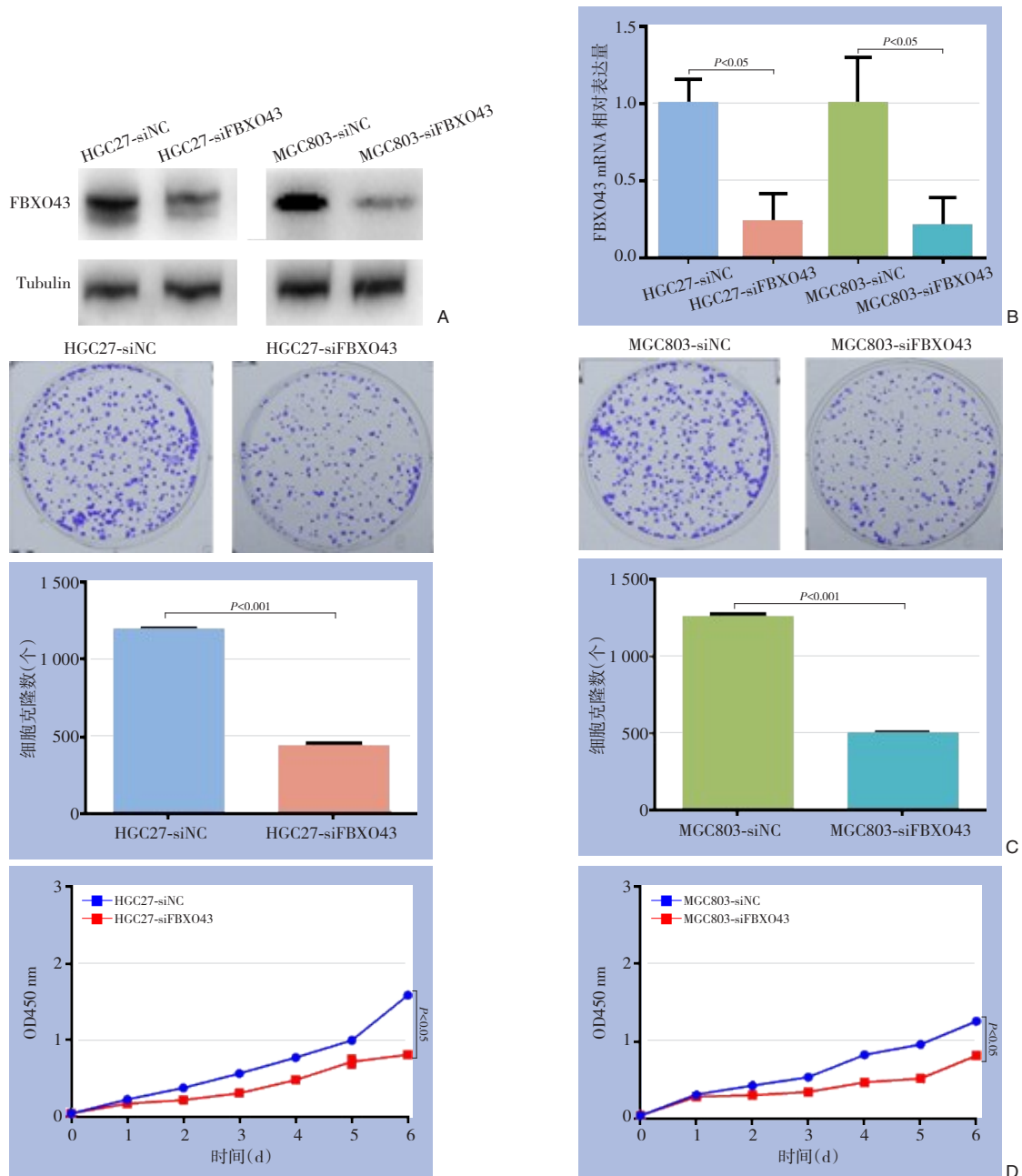


图4 FBXO43促进胃癌细胞的生长和增殖 A-B: Western blot与qPCR显示HGC27和MGC803细胞中FBXO43的表达被siRNA敲低; C: 平板克隆形成实验检测敲低FBXO43表达对胃癌细胞增殖的影响; D: CCK8实验检测敲低FBXO43表达对胃癌细胞生长的影响

**Figure 4 FBXO43 promotes the growth and proliferation of gastric cancer cells** A-B: Western blot and qPCR show downregulation of FBXO43 expression in HGC27 and MGC803 cells by siRNA; C: Plate colony formation experiment detects the effect of downregulating FBXO43 expression on the proliferation of gastric cancer cells; D: CCK8 experiment detects the effect of downregulating FBXO43 expression on the growth of gastric cancer cells

### 2.4 敲低FBXO43表达抑制胃癌细胞的侵袭和迁移

免疫组化结果显示FBXO43高表达与临床胃癌转移和预后不良有关,故进一步探讨了敲低FBXO43表达对胃癌细胞体外侵袭和迁移中的影响。

Transwell侵袭和迁移结果显示,与对照细胞相比,在MGC803、HGC27细胞中敲低FBXO43表达显著抑制其细胞的侵袭和迁移(均 $P<0.05$ )(图5A-B)。

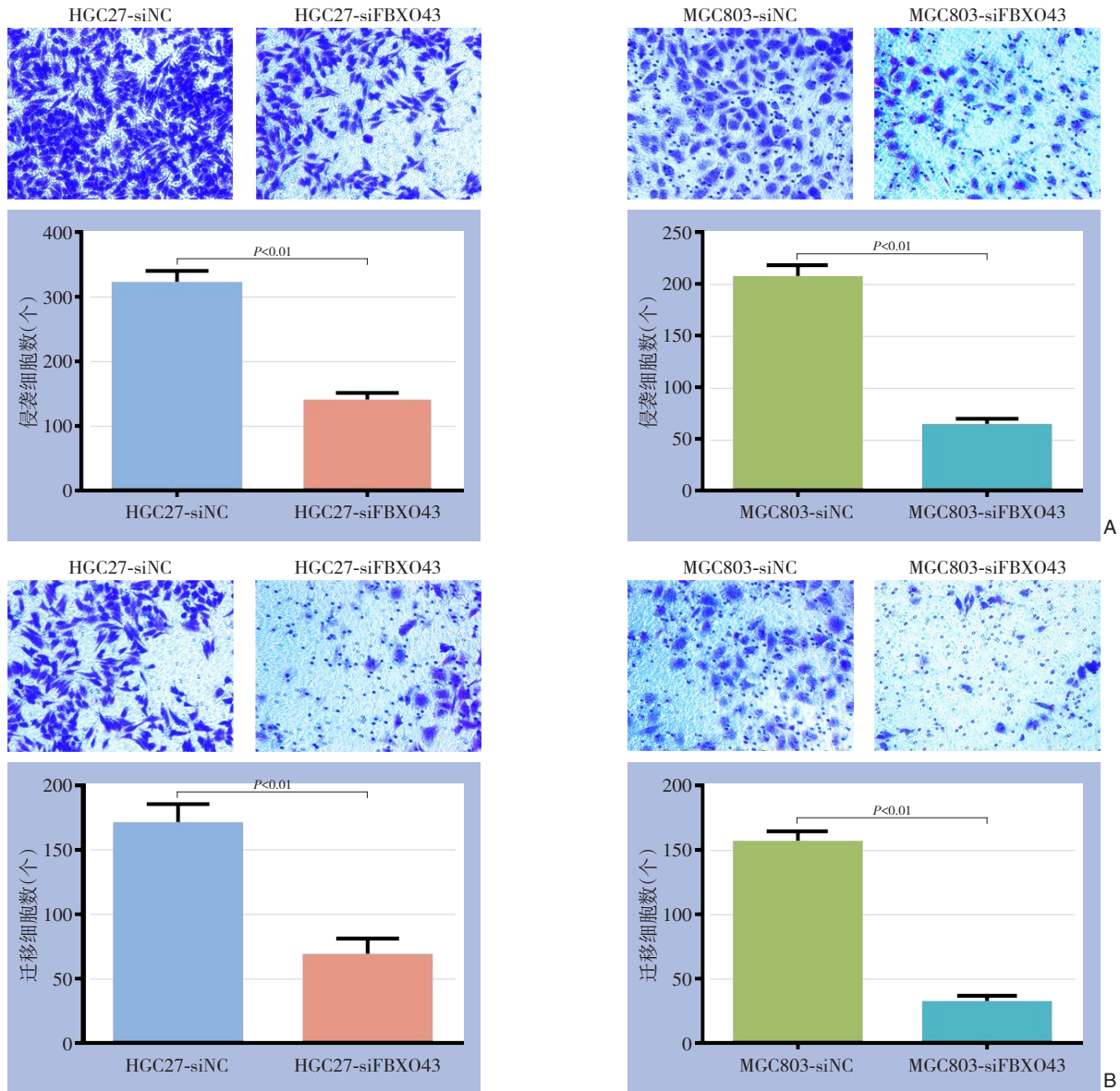


图5 FBXO43促进胃癌细胞的迁移和侵袭 A: Transwell侵袭实验检测敲低FBXO43表达对胃癌细胞侵袭的影响; B: Transwell迁移实验检测敲低FBXO43表达对胃癌细胞迁移的影响

Figure 5 FBXO43 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells A: Transwell invasion assay detects the effect of downregulating FBXO43 expression on the invasion of gastric cancer cells; B: Transwell migration assay detects the effect of downregulating FBXO43 expression on the migration of gastric cancer cells

### 2.5 FBXO43与p53相互作用,促进p53降解

既往研究<sup>[12]</sup>显示,FBXO43促进p53降解,发挥促癌功能。为此本研究检测了敲低FBXO43对胃癌细胞中p53的影响。Western blot结果显示,敲低FBXO43可以明显上调HGC27和MGC803细胞中p53

的蛋白水平(图6A)。Co-IP实验证实,FBXO43与p53在HGC27和MGC803细胞中存在相互作用(图6B)。FBXO43促进蛋白质的泛素化降解,故本研究分析了FBXO43对p53泛素化的影响。结果显示,敲低FBXO43明显降低了HGC27和MGC803



细胞中 p53 的多聚泛素化 (图 6C)。以上结果提示 FBXO43 通过促进 p53 的泛素化降解下调 p53 表达,

从而抑制 p53 发挥促进胃癌细胞恶性进展的功能。

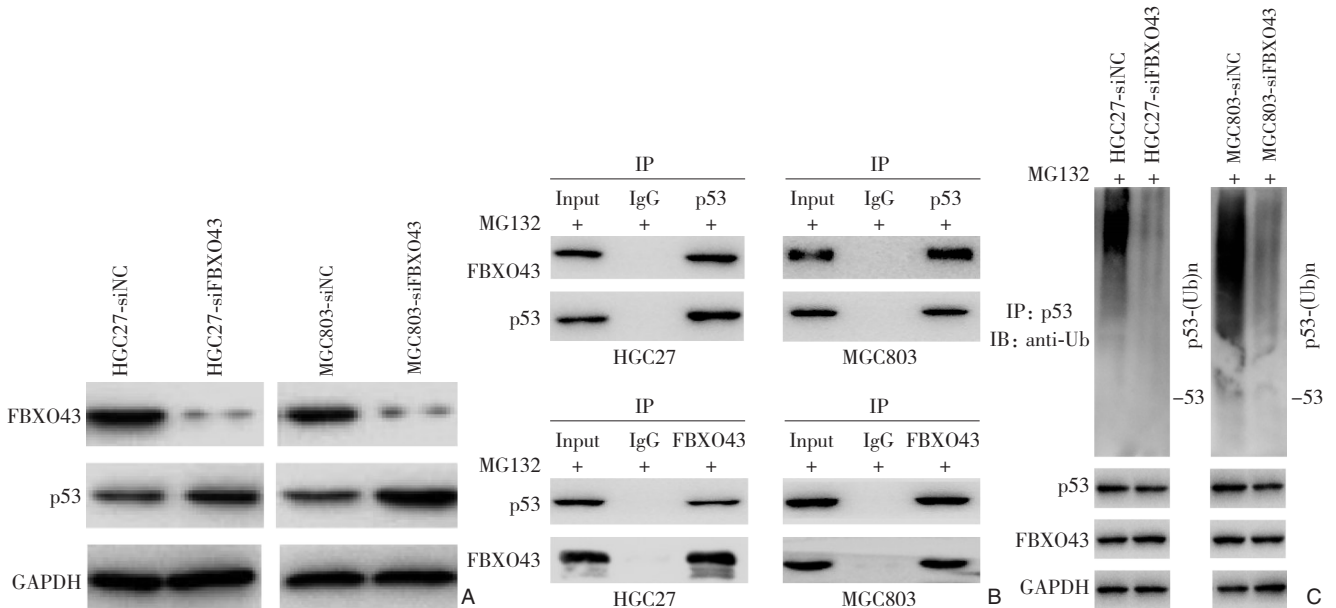


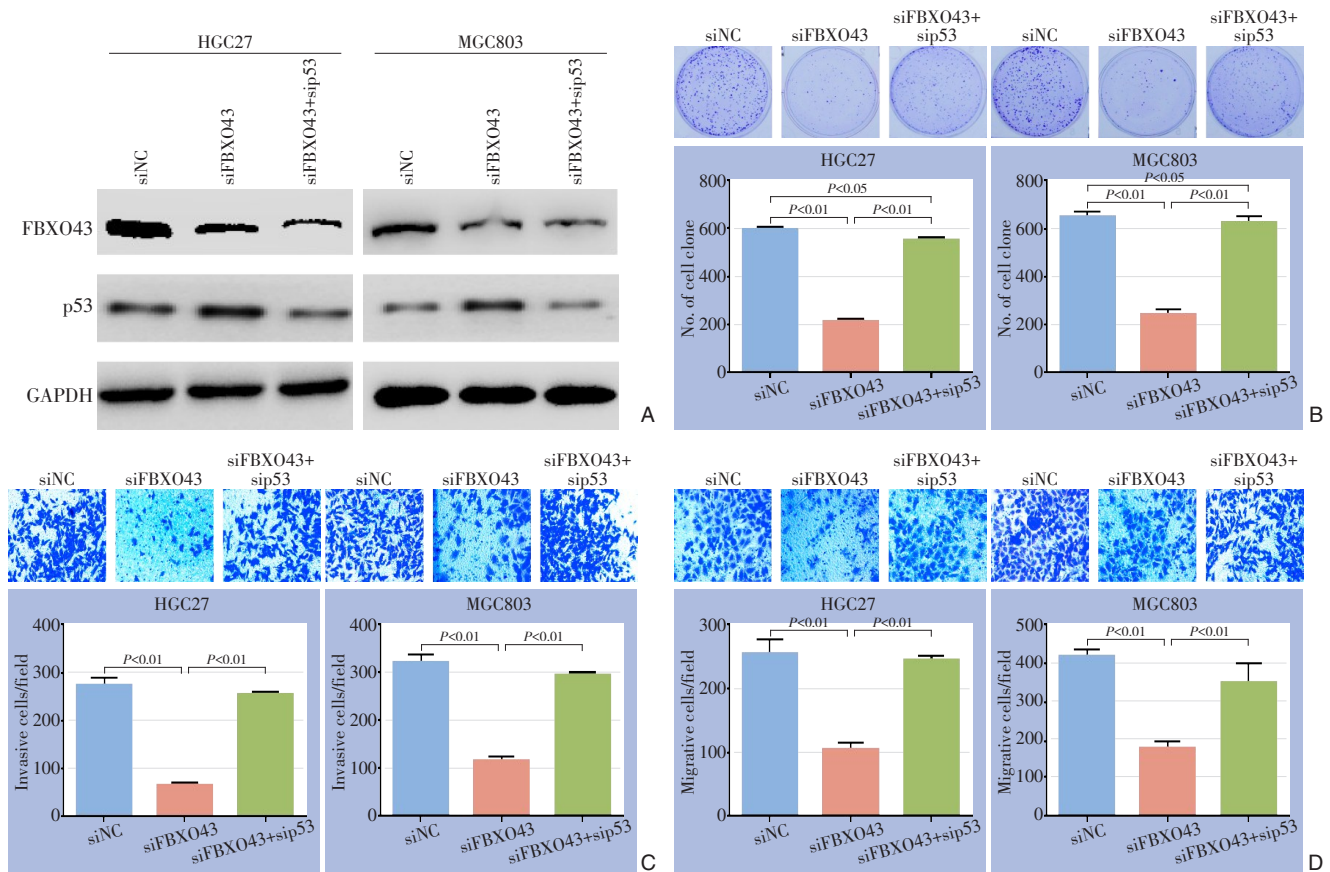
图 6 胃癌细胞中 FBXO43 与 p53 结合通过泛素蛋白酶体途径增加 p53 的稳定性 A: Western blot 检测敲低 FBXO43 后, HGC27 和 MGC803 细胞中 p53 的蛋白水平; B: 采用 10 μmol/L MG132 处理细胞 12 h 后, Co-IP 结果显示, HGC27 和 MGC803 细胞中, 内源性 FBXO43 与 p53 之间存在相互作用; C: Co-IP 检测 HGC27 和 MGC803 细胞中, 敲低 FBXO43 显著抑制 p53 的泛素化水平

Figure 6 FBXO43 in gastric cancer cells binds to p53 and increases the stability of p53 through the ubiquitin-proteasome pathway A: Western blot detects the protein levels of p53 in HGC27 and MGC803 cells after downregulating FBXO43; B: Co-IP results show that endogenous FBXO43 interacts with p53 in HGC27 and MGC803 cells after treatment with 10 μmol/L MG132 for 12 h; C: Co-IP detects that downregulating FBXO43 significantly inhibits the ubiquitination level of p53 in HGC27 and MGC803 cells

### 2.6 FBXO43 抑制 p53 促进胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移

前面的结果提示 FBXO43 通过促进 p53 的泛素化降解, 从而抑制 p53 发挥促进胃癌细胞恶性进展的功能, 故进一步探讨了同时敲低 FBXO43 和 p53 表达, 对胃癌细胞体外增殖、迁移和侵袭的影响。Western blot 结果显示, 在 MGC803、HGC27 细胞中, 敲低 FBXO43 表达, 上调 p53 蛋白的水平。同时敲

低 FBXO43 和 p53 表达, 可以回复 p53 的蛋白水平 (图 7A)。平板克隆形成实验结果显示, 敲低 FBXO43 表达, 抑制 MGC803、HGC27 细胞的增殖, 同时敲低 FBXO43 和 p53 表达恢复了其细胞增殖能力 (图 7B)。Transwell 迁移和侵袭结果显示, 敲低 FBXO43 表达, 抑制 MGC803、HGC27 细胞的侵袭、迁移, 同时敲低 FBXO43 和 p53 表达恢复了其细胞的侵袭和迁移能力 ( $P < 0.01$ ) (图 7C-D)。



**图7** FBXO43抑制p53促进胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移 A: Western blot检测敲低FBXO43和p53表达, HGC27和MGC803细胞中FBXO43和p53的蛋白水平; B: 平板克隆形成实验检测同时敲低FBXO43和p53表达对胃癌细胞增殖的影响; C: Transwell侵袭实验检测同时敲低FBXO43和p53表达对胃癌细胞侵袭的影响; D: Transwell迁移实验检测同时敲低FBXO43和p53表达对胃癌细胞迁移的影响

**Figure 7** FBXO43 inhibits p53 to promote the proliferation, invasion, and migration of gastric cancer cells A: Western blot detects the protein levels of FBXO43 and p53 in HGC27 and MGC803 cells after downregulating FBXO43 and p53 expression; B: Plate colony formation experiment detects the effect of simultaneous downregulation of FBXO43 and p53 expression on the proliferation of gastric cancer cells; C: Transwell invasion assay detects the effect of simultaneous downregulation of FBXO43 and p53 expression on the invasion of gastric cancer cells; D: Transwell migration assay detects the effect of simultaneous downregulation of FBXO43 and p53 expression on the migration of gastric cancer cells

### 3 讨论

胃癌的高发病率和高致死率是继续深入推动胃癌关键驱动因子和促瘤分子机制研究的最好驱动力<sup>[26]</sup>。本研究初步证实FBXO43在胃癌中高表达,与患者恶性程度和不良预后呈正相关;FBXO43高表达可能通过抑制p53水平,促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究提示,FBXO43是胃癌恶性进展的关键因子,是胃癌治疗的潜在靶点,为深入开展FBXO43在胃癌中发挥促瘤作用的机制研究和转化研究提供了理论支撑。

FBXO43是细胞抑制因子的关键组成部分,其可通过抑制后期促进复合物/细胞周期体(APC/C)

稳定cyclin B,在细胞周期调控中发挥重要作用,是维持胚胎早期正常发育的关键因子<sup>[27-28]</sup>。鉴于cyclin B在多种癌症中过表达,也提示了FBXO43在肿瘤中的具有关键作用<sup>[29]</sup>。比如,在乳腺癌中,FBXO43表达显著上调,其表达水平与肿瘤分期、大小和淋巴结转移呈正相关;FBXO43高表达的患者的PFS和OS显著降低<sup>[30]</sup>。在结直肠癌中FBXO43同样呈高表达,与患者恶性程度、化疗耐药和更短的PFS和OS显著正相关<sup>[31]</sup>。在肝癌中,FBXO43高表达与患者的TNM分期、肿瘤体积、淋巴侵袭、远处转移、术后更短复发时间和更短的OS正相关<sup>[10]</sup>,是肝癌患者预后不良的独立生物标志物<sup>[12,15]</sup>。与上述研究一致,本研究证实FBXO43在

胃癌中高表达,且FBXO43高表达与胃癌患者的恶性病理程度和不良预后呈正相关,进一步证实了FBXO43在肿瘤中的异常活化,具备成为肿瘤诊疗和预后广谱标志物的潜力。

FBXO43在肿瘤高表达得到了相对充分的研究,但其在肿瘤中的功能和机制研究相对较少。比如,敲低EMI2可以抑制胆管癌生长、迁移和侵袭;机制上,EMI敲低可以抑制PI3K/Akt信号通路活性,提示活化PI3K/Akt是FBXO43发挥促瘤功能的机制之一<sup>[32]</sup>。同时,在肝癌中,FBXO43同样可以促进细胞生长、迁移和侵袭,且敲低FBXO43可以抑制p53的泛素化水平,上调p53蛋白水平;在敲低FBXO43的同时敲低p53可以显著恢复肝癌细胞的恶性表型,表明抑制p53水平是FBXO43促进肝癌恶性进展的主要机制<sup>[11]</sup>。同样在肝癌中,FBXO43还可以直接介导CCND1的K63型泛素化,促进其在肝癌细胞中的稳定,促进肝癌细胞增殖和侵袭<sup>[33]</sup>。在乳腺癌中,FBXO43则可以同PCNA互作,促进乳腺癌细胞生长,但其是否通过介导PCNA的泛素化修饰仍待揭示<sup>[14]</sup>。本研究证实,敲低FBXO43同样可以显著抑制细胞生长、迁移和侵袭,进一步证实了FBXO43的促瘤作用。机制上同样证实,FBXO43通过促进p53泛素化降解,发挥抑制胃癌生长和侵袭的生物学功能。笔者团队的研究进一步证实负调控p53水平是FBXO43促进肿瘤恶性进展的机制普遍之一,提示靶向FBXO43是一种潜在可行的恢复p53水平和抑制肿瘤进展的手段,为相关抑制剂的开发提供了科学依据。

综上,本研究初步证实了FBXO43在胃癌中高表达,且与胃癌恶性进展和不良预后密切相关;FBXO43高表达促进p53泛素化降解而发挥胃癌细胞恶性表型。FBXO43有望成为胃癌治疗的靶点,为靶向FBXO43的肿瘤治疗转化的新策略提供了理论支撑。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:杨娟和卢珊珊负责选题构思、文章撰写;杨娟、刘春梅、吴涵和卢珊珊负责实验方法及对文章进行修正;刘春梅、吴涵、赵路负责资料收集。所有作者都对文章做出了贡献,并批准了提交的版本。

## 参考文献

- [1] 赵馨旭,黄林生,刘佳玲,等. Bcl-2转录抑制因子1在胃癌中的表达及其生物学功能[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(4):481-489. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.04.010.
- Zhao XX, Huang LS, Liu JL, et al. Expression of Bcl-2 transcription inhibitor 1 in gastric cancer and its biological function[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(4): 481-489. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.04.010.
- [2] 覃一晋,单汉国,陈茂良,等. Ezrin/YAP信号轴促进胃癌细胞增殖的作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(10):1617-1623. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.021.
- Qin YJ, Shan HG, Chen ML, et al. Role of Ezrin/YAP signaling axis in promoting gastric cancer cell proliferation[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(10): 1617-1623. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.021.
- [3] Jia WZ, Yu T, Cao XL, et al. Clinical effect of DAPK promoter methylation in gastric cancer: a systematic meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(43): e5040. doi: 10.1097/MD.0000000000005040.
- [4] 曾德余,罗嘉,陶一明,等. 腺苷酸基琥珀酸裂解酶在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(9):1433-1438. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019.
- Zeng DY, Luo J, Tao YM, et al. Expression of adenylosuccinate lyase in gastric cancer and its clinical significance[J]. *China Journal of General Surgery*, 2023, 32(9): 1433-1438. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.09.019.
- [5] 陈瑛,章汝楠,李楠,等. EB病毒相关性胃癌PD-1和PD-L1信号通路表达水平及意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(17):2642-2646. doi:10.11816/cn.ni.2022-211818.
- Chen Y, Zhang RN, Li N, et al. Expression levels of PD-1 and PD-L1 signaling pathways in patients with EB virus-associated gastric cancer and significance[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2022, 32(17):2642-2646. doi:10.11816/cn.ni.2022-211818.
- [6] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251):635-648. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
- [7] Correa P. Gastric cancer: overview[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013, 42(2):211-217. doi:10.1016/j.gtc.2013.01.002.
- [8] Kim S, Chien YH, Ryan A, et al. Emi2 enables centriole amplification during multiciliated cell differentiation[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(13):eabm7538. doi:10.1126/sciadv.abm7538.
- [9] Chang SC, Hung CS, Zhang BX, et al. A novel signature of CCNF-associated E3 ligases collaborate and counter each other in breast cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(12): 2873. doi: 10.3390/cancers13122873.
- [10] Wu SH, Qin L, Yang JQ, et al. Association between F-box-only protein 43 overexpression and hepatocellular carcinoma pathogenesis and prognosis[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(8): 10062-10076. doi:10.1002/cam4.5660.
- [11] Tischer T, Hörmanseder E, Mayer TU. The APC/C inhibitor XErp1/

- Emi2 is essential for *Xenopus* early embryonic divisions[J]. *Science*, 2012, 338(6106):520–524. doi:10.1126/science.1228394.
- [12] Xu B, Lv W, Li X, et al. Prognostic genes of hepatocellular carcinoma based on gene coexpression network analysis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7):11616–11623. doi:10.1002/jcb.28441.
- [13] 孟磊. FBXO43在乳腺癌中的作用与机制研究[D]. 西安: 西北大学, 2022. doi:10.27405/d.cnki.gxbdu.2022.001174.
- Meng L. Study of the role and mechanism of FBXO43 in breast cancer[D]. Xi'an: Northwest University, 2022. doi: 110.27405/d.cnki.gxbdu.2022.001174.
- [14] Ma RL, Zhu K, Yuan DW, et al. Downregulation of the FBXO43 gene inhibits tumor growth in human breast cancer by limiting its interaction with PCNA[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 425. doi: 10.1186/s12967-021-03100-0.
- [15] Zhou H, Zeng C, Liu J, et al. F-Box Protein 43, Stabilized by N6-Methyladenosine Methylation, Enhances Hepatocellular Carcinoma Cell Growth and Invasion via Promoting p53 Degradation in a Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C-Dependent Manner[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(3):957. doi:10.3390/cancers15030957.
- [16] Ni J, Deng B, Zhu M, et al. Integration of GWAS and eQTL analysis to identify risk loci and susceptibility genes for gastric cancer[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 679. doi: 10.3389/fgene.2020.00679.
- [17] Vivian J, Rao AA, Nothhaft FA, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4):314–316. doi:10.1038/nbt.3772.
- [18] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517):202–209. doi:10.1038/nature13480.
- [19] Posta M, Györfy B. Analysis of a large cohort of pancreatic cancer transcriptomic profiles to reveal the strongest prognostic factors[J]. *Clin Transl Sci*, 2023, 16(8):1479–1491. doi:10.1111/cts.13563.
- [20] Li QG, Xiao T, Zhu W, et al. HDAC7 promotes the oncogenicity of nasopharyngeal carcinoma cells by miR-4465-EphA2 signaling axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5):322. doi:10.1038/s41419-020-2521-1.
- [21] Xiao D, Zeng T, Zhu W, et al. ANXA1 promotes tumor immune evasion by binding PARP1 and upregulating Stat3-induced expression of PD-L1 in multiple cancers[J]. *Cancer Immunol Res*, 2023, 11(10):1367–1383. doi:10.1158/2326-6066.CIR-22-0896.
- [22] Lu SS, Cai SL, Peng XZ, et al. Integrative transcriptomic, proteomic and functional analysis reveals ATP1B3 as a diagnostic and potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:636614. doi:10.3389/fimmu.2021.636614.
- [23] Lu SS, Yu ZZ, Xiao ZQ, et al. Gene signatures and prognostic values of m6A genes in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:875. doi:10.3389/fonc.2020.00875.
- [24] Feng J, Lu SS, Xiao T, et al. ANXA1 binds and stabilizes EphA2 to promote nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(20): 4386–4398. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0560.
- [25] Yu ZZ, Liu YY, Zhu W, et al. ANXA1-derived peptide for targeting PD-L1 degradation inhibits tumor immune evasion in multiple cancers[J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(3): e006345. doi: 10.1136/jitc-2022-006345.
- [26] 张瑞, 彭涛, 阴建, 等. 胃癌患者血清中 DKK1 的表达及其意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2022, 49(7): 692–697. doi: 10.3971/j.issn.1000-8578.2022.21.1212.
- Zhang R, Peng T, Yin J, et al. Expression and significance of serum DKK1 in gastric cancer patients[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2022, 49(7): 692–697. doi: 10.3971/j.issn.1000-8578.2022.21.1212.
- [27] Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II : MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor[J]. *Cell Div*, 2007, 2:4. doi:10.1186/1747-1028-2-4.
- [28] Jang SH, Kim AR, Park NH, et al. DRG2 regulates G2/M progression via the cyclin B1-Cdk1 complex[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(9):699–704. doi:10.14348/molcells.2016.0149.
- [29] Sun X, Zhangyuan GY, Shi L, et al. Prognostic and clinicopathological significance of cyclin B expression in patients with breast cancer: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(19):e6860. doi:10.1097/MD.0000000000006860.
- [30] Vadhan A, Wang YY, Yuan SF, et al. EMI2 expression as a poor prognostic factor in patients with breast cancer[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(8):640–648. doi:10.1002/kjm2.12208.
- [31] Liu JY, Yang X, Li M, et al. High expression of F-box protein 43 is associated with poor prognosis and adjuvant chemotherapy resistance in colorectal cancer[J]. *World J Oncol*, 2023, 14(4):246–254. doi:10.14740/wjon1642.
- [32] Zhou S, Qu KL, Li JA, et al. YY1 activates EMI2 and promotes the progression of cholangiocarcinoma through the PI3K/Akt signaling axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):699. doi:10.1186/s12935-021-02328-6.
- [33] Li CM, Zhang J, Wu W, et al. FBXO43 increases CCND1 stability to promote hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1138348. doi: 10.3389/fonc.2023.1138348.

( 本文编辑 熊杨 )

本文引用格式:杨娟,刘春梅,吴涵,等. FBXO43在胃癌中的表达及其生物学功能与作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(4):612–623. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.04.011

Cite this article as: Yang J, Liu CM, Wu H, et al. Expression of FBXO43 in gastric cancer and its biological function and mechanisms of action[J]. *Chin J Gen Surg*, 2024, 33(4): 612–623. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.04.011