

## 研究论文

# 沉默FBI-1基因对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖和凋亡的影响

陈茂剑<sup>1</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 杨伟萍<sup>1</sup>, 覃庆洪<sup>1</sup>, 谭启杏<sup>1</sup>, 练斌<sup>1</sup>, 韦长元<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科, 南宁 530021; <sup>2</sup>柳州市人民医院乳腺外科, 柳州 545006

**摘要:** 本研究旨在观察短发夹状RNA (short hairpin RNA, shRNA)介导的人类免疫缺陷病毒短转录诱导物连接因子1 (FBI-1) 基因沉默对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖和凋亡的影响。用qRT-PCR和Western blot分别检测FBI-1、Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase 3和Survivin的mRNA和/或蛋白的表达水平; 采用shRNA干扰技术沉默MDA-MB-231细胞中FBI-1基因的表达; 用CCK-8法以及克隆形成实验检测细胞增殖; 用流式细胞术检测细胞凋亡; 用裸鼠皮下成瘤实验检测细胞的成瘤能力。结果显示, MDA-MB-231细胞的FBI-1 mRNA和蛋白的表达水平明显高于正常乳腺上皮细胞MCF-10A; 经shRNA靶向沉默FBI-1基因表达后, 细胞增殖能力明显降低, 细胞凋亡率显著增高, 伴随Bcl-2和Survivin蛋白表达明显下调、Bax蛋白表达显著上调和Caspase 3活化, MDA-MB-231细胞的裸鼠皮下成瘤能力受抑制。以上结果提示, 靶向沉默FBI-1基因表达可以抑制MDA-MB-231细胞增殖, 诱导细胞凋亡并抑制细胞的裸鼠皮下成瘤能力。

**关键词:** FBI-1; 短发夹状RNA; 三阴性乳腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R737.9

## Effects of FBI-1 silencing on proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231

CHEN Mao-Jian<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, YANG Wei-Ping<sup>1</sup>, QIN Qing-Hong<sup>1</sup>, TAN Qi-Xing<sup>1</sup>, LIAN Bin<sup>1</sup>, WEI Chang-Yuan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Breast Surgery, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; <sup>2</sup>Department of Breast Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, China

**Abstract:** This work aimed to observe the effects of short hairpin RNA (shRNA)-silenced FBI-1 (factor that binds to the inducer of short transcripts of human immunodeficiency virus-1) on proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. qRT-PCR and Western blot analysis were applied to detect the mRNA and/or protein expression of FBI-1, Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase 3 and Survivin. RNA interference method was used to silence FBI-1 expression in MDA-MB-231 cells. CCK-8 and colony formation assay were employed to detect the cell proliferation. Flow cytometry was employed for examining cell apoptosis. *In vivo* tumorigenicity of MDA-MB-231 cells was detected by tumor transplantation in nude mice. The results showed that the mRNA and protein expressions of FBI-1 were higher in MDA-MB-231 cells compared with those in normal human mammary epithelial cells MCF-10A. FBI-1 gene silencing inhibited proliferation and induced apoptosis of MDA-MB-231 cells *in vitro*, together with decreased Bcl-2 and Survivin protein expression, increased Bax protein expression and activated Caspase 3. Moreover, FBI-1 gene silencing inhibited the tumorigenesis of MDA-MB-231 cells *in vivo*. These results suggest that silencing of FBI-1 gene inhibits proliferation, induces apoptosis and suppresses the tumorigenesis of MDA-MB-231 cells.

**Key words:** FBI-1; short hairpin RNA; triple-negative breast cancer; cell proliferation; cell apoptosis

Received 2018-02-01 Accepted 2018-06-19

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 2015GXNS-FAA139204), the Innovation Project of Guangxi Zhuang Autonomous Regional Graduate Education, China (No. YCSW2017108) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81360396).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-771-5332606; E-mail: weicy63@aliyun.com

乳腺癌是世界范围内严重威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,其发病率目前已跃居我国女性恶性肿瘤首位,且发病率呈逐年上升以及渐趋年轻化<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌是指雌激素受体、孕酮受体和人表皮生长因子受体2均为阴性的乳腺癌类型,约占乳腺癌的15%~20%,具有发病年龄较早、恶性程度高、侵袭性强、进展快、易转移和复发、生存时间短等临床特点<sup>[2]</sup>。由于缺乏有效的治疗手段,探索针对三阴性乳腺癌治疗的新靶点具有重要的现实意义。人类免疫缺陷病毒短转录诱导物连接因子1 (factor that binds to the inducer of short transcripts of human immunodeficiency virus-1, FBI-1) 即 POK 红系髓性致癌因子,也被称为 Pokemon、LRF、OCZF、TIP、ZBTB7,它是 POK 转录抑制物家族成员之一<sup>[3]</sup>。FBI-1 作为具有原癌基因活性的转录抑制因子,可调节多种下游基因编码蛋白的表达,不仅与胚胎发育和细胞分化密切相关,而且在肿瘤的发生和发展过程中起着关键作用<sup>[4]</sup>。有研究显示, FBI-1 在乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、膀胱癌、前列腺癌和肝癌等多种肿瘤中有异常高表达<sup>[5,6]</sup>。有报道显示, FBI-1 基因敲除小鼠均在胚胎期死亡<sup>[7]</sup>,敲除 FBI-1 的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblasts, MEFs) 失去了转化和癌变的能力,而过表达 FBI-1 的 MEFs 则转化能力增强,癌变速度加快<sup>[7]</sup>。Lin 等<sup>[8]</sup>的体内外实验研究显示,沉默 FBI-1 明显减弱肝癌细胞的增殖。Yuan 等<sup>[9]</sup>研究显示,给肺癌小鼠 grp 170-FBI-1 复合体处理,其肿瘤的生长受到明显的抑制,并且小鼠的存活时间明显延长。然而 FBI-1 在乳腺癌中的作用及机制尚不明确。本研究组前期研究显示 FBI-1 参与非三阴性乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖:在乳腺癌 MCF-7 细胞中, FBI-1 表达较正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞增高,而沉默 FBI-1 能抑制 MCF-7 细胞增殖<sup>[4]</sup>。为进一步探讨 FBI-1 在三阴性乳腺癌中的作用及分子生物学机制,本研究以人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,通过短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰技术沉默 FBI-1 基因,检测细胞增殖与细胞凋亡情况,检测 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase 3 和 Survivin 的蛋白表达水平,并检测细胞的裸鼠皮下成瘤能力,以期寻找针对三阴性乳腺癌治疗的新靶点提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株和动物** 人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 购自德国微生物菌种保藏中心;人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。SPF 级 BALB/c 裸鼠,雌性,5 周龄,体重 16~18 g,由广西医科大学动物实验中心提供[合格证号:SCXK(桂)2014-0002]。所有实验动物的处理均经过广西医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准。

**1.1.2 药品及试剂** 乳腺上皮细胞培养基 (mammary epithelial cell medium, MEpiCM) 和乳腺上皮细胞生长因子 (mammary epithelial cell growth supplement, MEpiCGS) (100×) 购自 ScienCell 公司;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DMEM 培养基购自以色列 Bioind 公司;青霉素-链霉素溶液 (100×) 购自 Hyclone 公司;CCK-8 试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒和 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。实验所用引物由广州艾基生物技术有限公司合成;Bcl-2 和 Bax 抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;cleaved-Caspase 3 和 Survivin 抗体购自 CST 公司;FBI-1 和 GAPDH 抗体购于美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自美国 EarthOx 公司;结晶紫染色液、RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** MCF-10A 用含 1% MEpiCGS、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 MEpiCM 培养基,MDA-MB-231 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

**1.2.2 慢病毒构建** FBI-1 沉默重组慢病毒颗粒及阴性对照慢病毒颗粒由苏州吉玛基因股份有限公司构建, Polybrene 由苏州吉玛基因股份有限公司提供。FBI-1 shRNA 序列分别为: Lv-shFBI-1-1: GCTGCAGCAGATGATGTCATC, Lv-shFBI-1-2: GCAGCTGGACCTTGATGATCA, Lv-shFBI-1-3: GCGT-CATGGACTACTACCTGA;阴性对照 (Lv-shCon) 序列为: TTCTCCGAACGTGTCACGT。

**1.2.3 细胞转染** 细胞转染步骤参考本研究组前

期发表的文献<sup>[4]</sup>, 转染成功后收集细胞进行后续实验。转染 FBI-1 shRNA 的细胞命名为 Lv-shFBI-1-1 组, Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shFBI-1-3 组; 转染阴性对照 Lv-shCon 的细胞命名为 Lv-shCon 组; 空白对照组命名为 MDA-MB-231 组。

**1.2.4 CCK-8 法检测细胞活性** 将 Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shCon 组对数生长期的细胞以每孔  $2 \times 10^3$  个/100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 分别培养 24、48、72 和 96 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂继续培养, 1 h 后用酶标仪检测各孔 450 nm 波长吸光度 ( $A$ ) 值。

**1.2.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力** 将 Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shCon 组对数生长期的细胞以每孔 500 个接种于 6 孔板中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中静置培养 14 d。PBS 小心洗涤细胞 2 次, 100% 的甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫液染色 15 min, 流水缓慢洗去染色液, 在空气中自然干燥。镜下计数大于 50 个细胞的克隆数, 然后计算克隆形成率。克隆形成率 (%) = (克隆数 / 接种细胞数)  $\times$  100%。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 分别收集 Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shCon 组细胞及培养基, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 取适量结合缓冲液重悬细胞, 调节细胞密度至  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 分别取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液置于流式管中, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-PE 和 5  $\mu\text{L}$  7-AAD, 混合均匀, 室温避光孵育 15 min, 加入 400  $\mu\text{L}$  结合缓冲液, 300 目尼龙网过滤后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.2.7 qRT-PCR 检测 mRNA 的表达** 分别收集 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞, 用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 并测定浓度。严格按照 TaKaRa 试剂盒说明进行逆转录和 qRT-PCR。FBI-1 和 GAPDH 的引物和反应条件参考文献<sup>[4]</sup>。以 GAPDH 作为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

**1.2.8 Western blot 检测蛋白的表达** 分别收集 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞, 充分裂解后提取总蛋白, 取 25  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜, 用封闭液 (5% BSA/TBST) 封闭 1 h, 加入抗 FBI-1 (1:10 000 稀释)、Bcl-2 (1:500 稀释)、Bax (1:500 稀释)、cleaved-Caspase 3 (1:1 000 稀释)、Survivin (1:1 000 稀释) 和 GAPDH (1:10 000 稀释) 一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:10 000 稀释) 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 系统显影。以 GAPDH 作为内参, ImageJ

软件采集条带灰度值, 取目的条带灰度值与内参条带灰度值比值作为相对表达量。

**1.2.9 细胞皮下成瘤实验** 将 Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shCon 组对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 在无菌条件下用 1 mL 注射器分别在对应组裸鼠的右侧前腿外侧以每只裸鼠  $1 \times 10^7$  个/200  $\mu\text{L}$  进行皮下接种, 每组 3 只, 细胞生长 4 周后, 获取肿瘤进行拍照和重量统计。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 各项检测结果以 mean  $\pm$  SD 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FBI-1 mRNA 及蛋白在 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞中的表达水平

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, FBI-1 mRNA (图 1A) 和蛋白 (图 1B) 在三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的表达水平明显高于正常乳腺上皮细胞 MCF-10A ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 特异性 shRNA 对 MDA-MB-231 细胞 FBI-1 mRNA 和蛋白表达的影响

分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测慢病毒转染 MDA-MB-231 细胞后 FBI-1 mRNA 和蛋白的表达。结果显示, 与 Lv-shCon 组及 MDA-MB-231 组比较, Lv-shFBI-1-1 组、Lv-shFBI-1-2 组和 Lv-shFBI-1-3 组 FBI-1 mRNA (图 2A) 和蛋白 (图 2B) 的表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 其中 Lv-shFBI-1-2 组抑制率最高, 提示沉默效果最好。因此选取 Lv-shFBI-1-2 组进行后续实验。

### 2.3 沉默 FBI-1 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

CCK-8 法结果显示, 与 Lv-shCon 组比较, Lv-shFBI-1-2 组 MDA-MB-231 细胞活性在培养 72 h 和 96 h 时显著降低 ( $P < 0.05$  或 0.01, 图 3A)。克隆形成实验结果显示, Lv-shFBI-1-2 组细胞克隆形成能力较 Lv-shCon 组明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 3B)。

### 2.4 沉默 FBI-1 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示, 与 Lv-shCon 组比较, Lv-shFBI-1-2 组 MDA-MB-231 细胞早期和晚期细胞凋亡率均显著增加 ( $P < 0.01$ , 图 4)。

### 2.5 沉默 FBI-1 对 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase 3 和 Survivin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与 Lv-shCon 组比较,

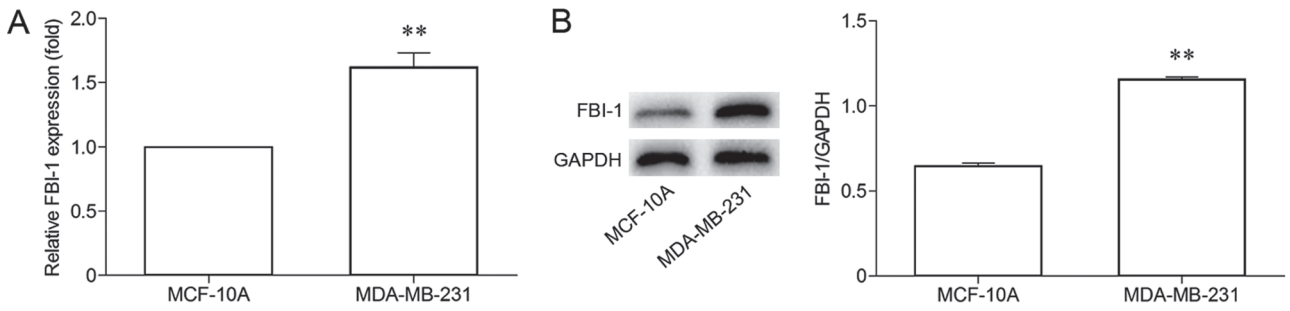


图 1. MCF-10A和MDA-MB-231细胞中FBI-1 mRNA和蛋白表达水平

Fig. 1. Expression of FBI-1 mRNA (A) and protein (B) in MCF-10A and MDA-MB-231 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs MCF-10A.

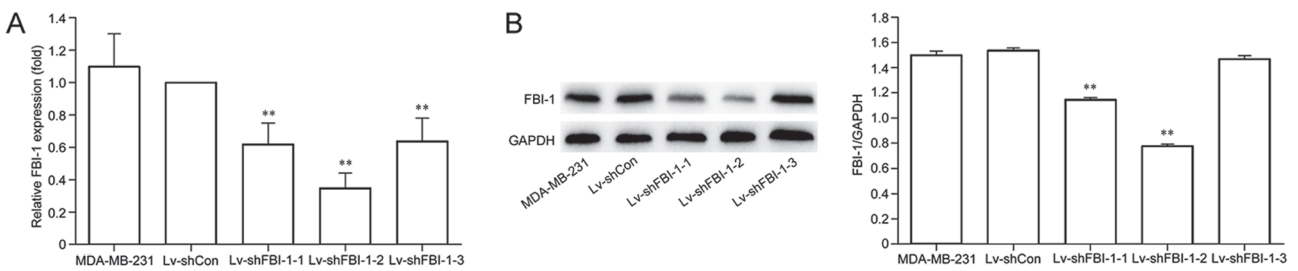


图 2. 特异性shRNA对MDA-MB-231细胞FBI-1 mRNA及蛋白表达的影响

Fig. 2. The effect of specific shRNA on the FBI-1 mRNA (A) and protein (B) expression in MDA-MB-231 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs Lv-shCon.

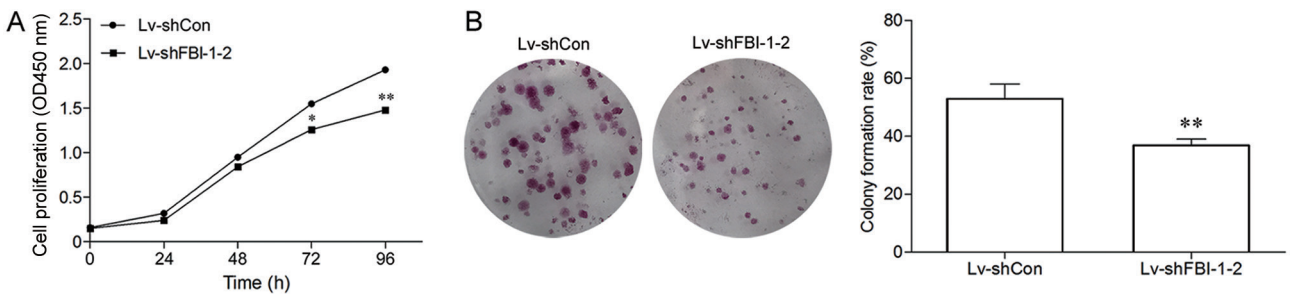


图 3. 沉默FBI-1对MDA-MB-231细胞增殖的影响

Fig. 3. The effect of FBI-1 silencing on the proliferation of MDA-MB-231 cells. A: CCK-8 results. B: Colony formation assay results. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Lv-shCon.

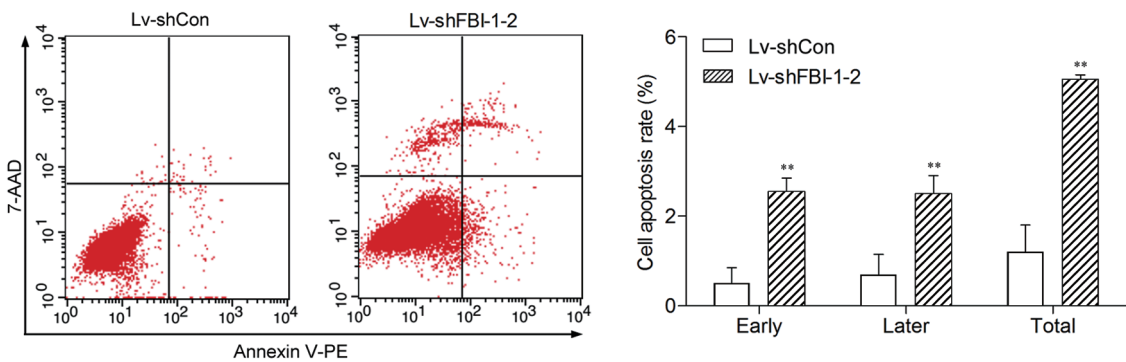


图 4. 沉默FBI-1对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Fig. 4. The effect of FBI-1 silencing on the apoptosis of MDA-MB-231 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs Lv-shCon.

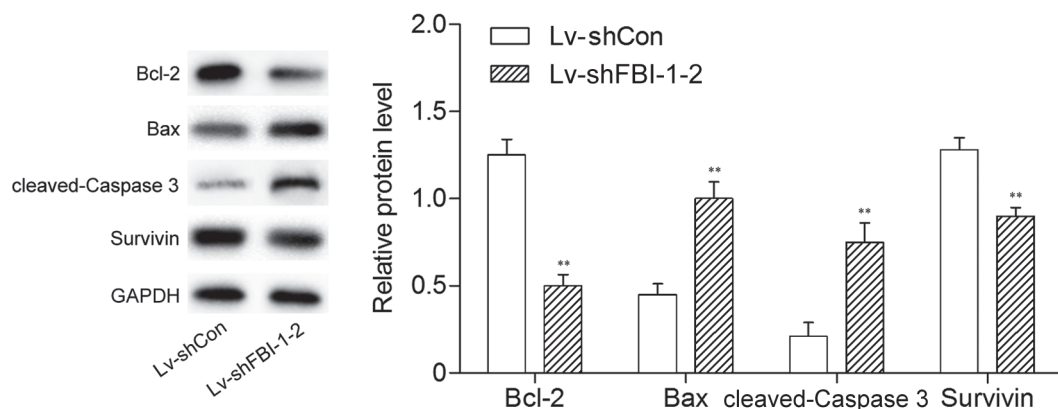


图 5. 沉默FBI-1对MDA-MB-231细胞Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase 3和Survivin蛋白表达的影响

Fig. 5. The effect of FBI-1 silencing on the protein expression of Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase 3 and Survivin in MDA-MB-231 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs Lv-shCon.

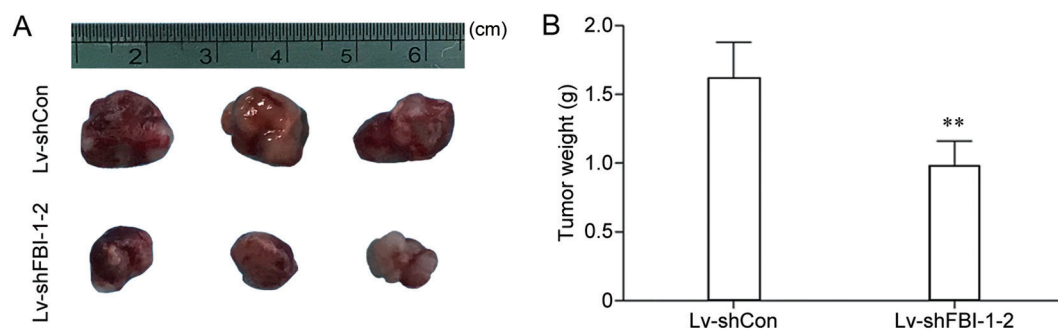


图 6. 沉默FBI-1对MDA-MB-231细胞荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

Fig. 6. The effect of FBI-1 silencing on the tumorigenesis of MDA-MB-231 cells *in vivo*. A: Formed tumors were obtained and photographed 4 weeks after inoculation. B: Tumor weight was measured. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  vs Lv-shCon.

Lv-shFBI-1-2 组 MDA-MB-231 细胞中 Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 5), 而 Bax、cleaved-Caspase 3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ , 图 5)。

## 2.6 沉默FBI-1对MDA-MB-231细胞荷瘤裸鼠肿瘤生长的影响

细胞皮下成瘤实验结果显示, 与 Lv-shCon 组比较, Lv-shFBI-1-2 组 MDA-MB-231 细胞形成的肿瘤体积明显减小 (图 6A), 肿瘤的重量显著减轻 ( $P < 0.01$ , 图 6B)。

## 3 讨论

FBI-1 由位于人类第 19 号染色体短臂 1 区 3 带中第 3 亚带 (19p13.3) 的 *ZBTB7* 基因编码, 其产物蛋白是一种具有原癌基因活性的转录抑制因子。FBI-1 位于多种肿瘤抑制基因和原癌基因的上游, 调控多种原癌基因的转录过程, 被称为“肿瘤的总开关”<sup>[4]</sup>。

近年来多项研究表明, FBI-1 在乳腺癌、淋巴瘤、肺癌、前列腺癌、肝癌和大肠癌等多种肿瘤中高表达, 在肿瘤的发生和发展中起着至关重要的作用<sup>[10, 11]</sup>。乳腺癌组织中 FBI-1 的表达较正常乳腺组织和乳腺增生组织明显增高, 且在腋窝淋巴结转移的乳腺癌组织中, FBI-1 表达更高<sup>[12, 13]</sup>。与此相似的是, 本研究结果显示, FBI-1 mRNA 和蛋白在三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的表达水平明显高于正常乳腺上皮细胞 MCF-10A, 提示 FBI-1 在三阴性乳腺癌的发生和发展中可能起着重要作用。

细胞凋亡抑制和细胞无限增殖是导致肿瘤发生和发展的重要原因, 寻找调控肿瘤细胞增殖和凋亡的靶基因可能成为抗肿瘤的有效靶点<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 沉默 FBI-1 基因的表达后, 三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外细胞活性明显降低, 克隆形成能力显著下降, 细胞凋亡率明显增高, 且体内成瘤能力显著降低, 表明 FBI-1 参与三阴性乳

癌细胞的增殖并抑制细胞凋亡, FBI-1 可能成为治疗三阴性乳腺癌的潜在靶点。

Bcl-2 蛋白家族在调控细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用, *Bcl-2* 和 *Bax* 是 Bcl-2 家族中最有代表性的凋亡相关基因<sup>[15]</sup>。*Bcl-2* 是抑制凋亡的蛋白, 主要通过在线粒体外膜发挥作用, 以维持膜的完整性, 从而阻断细胞色素 C 的释放, 抑制细胞凋亡<sup>[16]</sup>。*Bax* 是促进凋亡的蛋白, 主要是增加线粒体外膜的通透性, 促使细胞色素 C、凋亡诱导因子和凋亡蛋白酶激活因子等释放, 进而激活 Caspase 系统, 促进细胞凋亡。*Bax/Bcl-2* 比值决定细胞对凋亡刺激的敏感性, 并与肿瘤发生和发展密切相关<sup>[17–19]</sup>。本研究结果显示, 沉默 FBI-1 基因的表达后, *Bcl-2* 蛋白的表达明显下调, *Bax* 蛋白的表达显著上调, *Bax/Bcl-2* 值显著提高, 与 Zhao 等<sup>[5]</sup> 和 Zhang 等<sup>[20]</sup> 在人肝癌细胞的研究结果相一致, 表明 FBI-1 基因沉默诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的分子机制可能与下调 *Bcl-2* 表达和上调 *Bax* 表达相关。

Caspase 蛋白酶家族是细胞凋亡过程的启动和执行者, 其中 Caspase-3 是引发凋亡的蛋白酶级联反应中的核心蛋白酶, 被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者<sup>[21]</sup>。正常情况下, Caspase-3 以无活性的酶原形式存在。在多种凋亡信号刺激下, 酶原被切割而激活, 活化后的 Caspase-3 具有在天冬氨酸残基后切断肽键的能力, 可以使细胞质、细胞核、细胞骨架的重要蛋白降解失活, 从而引起细胞核固缩、碎裂等复杂变化, 使细胞降解为凋亡小体<sup>[22]</sup>。因此, Caspase-3 活性增加是细胞凋亡的重要机制。凋亡抑制蛋白家族 (inhibition of apoptosis protein, IAP) 是抑制细胞凋亡的重要成分, 主要作用是抑制 Caspases 级联激活<sup>[23]</sup>。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族中作用最强的凋亡蛋白抑制因子, 主要在凋亡通路的下游通过直接抑制凋亡核心 Caspase-3 发挥抗凋亡的效应, 其过度表达与肿瘤发生、发展及预后不良密切相关<sup>[24]</sup>。有报道显示, 在肝癌细胞中沉默 FBI-1 表达后, Caspase-3 被激活, 促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>。Zu 等<sup>[13]</sup> 研究显示, Survivin 是 FBI-1 的靶基因之一, FBI-1 可通过上调 Survivin 的表达促进乳腺癌进展。本研究结果显示, 沉默 FBI-1 基因的表达后, Caspase-3 活化显著增加, Survivin 蛋白表达明显降低, 这可能是 FBI-1 基因沉默诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的原因之一。

综上所述, FBI-1 在三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中呈高表达, 靶向沉默 FBI-1 基因表达可

以抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 诱导细胞凋亡并抑制细胞的裸鼠皮下成瘤能力, 其机制可能与下调 *Bcl-2* 和 Survivin 蛋白表达、上调 *Bax* 蛋白表达以及激活 Caspase 3 有关。本研究结果提示, 通过靶向抑制 FBI-1 的表达可能成为治疗三阴性乳腺癌的新策略。

### 参考文献

- 1 Chen WQ (陈万青), Zheng RS. Incidence, mortality and survival analysis of breast cancer in China. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床) 2015; 42(13): 668–674 (in Chinese with English abstract).
- 2 Eldehna WM, El-Naggar DH, Hamed AR, Ibrahim HS, Ghabbour HA, Abdel-Aziz HA. One-pot three-component synthesis of novel spirooxindoles with potential cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018; 33(1): 309–318.
- 3 Stogios PJ, Chen L, Prive GG. Crystal structure of the BTB domain from the LRF/ZBTB7 transcriptional regulator. *Protein Sci* 2007; 16(2): 336–342.
- 4 Wang L (王丽), Qin QH, Tan QX, Lian B, Yang WP, Wei CY. Effect of downregulation of FBI-1 on proliferation of human breast carcinoma cell line and its mechanism. *Chin Oncol* (中国癌症杂志) 2017; 27(4): 262–267 (in Chinese with English abstract).
- 5 Zhao X, Ning Q, Sun X, Tian D. Pokemon reduces Bcl-2 expression through NF-kappa Bp65: A possible mechanism of hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 4(6): 492–497.
- 6 Guo C, Xiong D, Yang B, Zhang H, Gu W, Liu M, Yao X, Zheng J, Peng B. The expression and clinical significance of ZBTB7 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett* 2017; 14(4): 4857–4862.
- 7 Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Res* 2005; 65(19): 8575–8578.
- 8 Lin CC, Zhou JP, Liu YP, Liu JJ, Yang XN, Jazag A, Zhang ZP, Guleng B, Ren JL. The silencing of Pokemon attenuates the proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the PI3K/Akt pathway. *PLoS One* 2012; 7(12): e51916.
- 9 Yuan B, Xian R, Wu X, Jing J, Chen K, Liu G, Zhou Z. Endoplasmic reticulum chaperone glucose regulated protein 170-Pokemon complexes elicit a robust antitumor immune response *in vivo*. *Immunobiology* 2012; 217(7): 738–742.
- 10 Zhu M, Li M, Wang T, Linghu E, Wu B. MicroRNA-137 represses FBI-1 to inhibit proliferation and *in vitro* invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Tumour*

- Biol 2016; 37(10): 13995–14008.
- 11 Liu XY (刘鑫远), Yu L, Zhang J, Wang L. Progress on the research of pokemon and its function in tumors. *Prog Mod Biomed (现代生物医学进展)* 2014; 14(3): 575–577 (in Chinese with English abstract).
  - 12 Qu H, Qu D, Chen F, Zhang Z, Liu B, Liu H. ZBTB7 over-expression contributes to malignancy in breast cancer. *Cancer Invest* 2010; 28(6): 672–678.
  - 13 Zu X, Ma J, Liu H, Liu F, Tan C, Yu L, Wang J, Xie Z, Cao D, Jiang Y. Pro-oncogene Pokemon promotes breast cancer progression by upregulating survivin expression. *Breast Cancer Res* 2011; 13(2): R26.
  - 14 Gui Q (归倩), Zhang LH. The effect and mechanism of NGAL gene expression inhibited on proliferation and apoptosis of cervical cancer. *Chin J Clin Obstet Gynecol (中国妇产科临床杂志)* 2018; 19(1): 20–22 (in Chinese with English abstract).
  - 15 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74(4): 609–619.
  - 16 Chen MJ (陈茂剑), Xiao CC, Wang L, Yang WP, Qin QH, Wei CY. Effects and the mechanism of triptolide on proliferation and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells. *J Pract Med (实用医学杂志)* 2017; 33(23): 3867–3870 (in Chinese with English abstract).
  - 17 Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7254–7263.
  - 18 Birkinshaw RW, Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 72: 152–162.
  - 19 Xu L (徐丽), Jin QD, Gong X, Liu H, Zhou RX. Anti-gastric cancer effect of melatonin and Bcl-2, Bax, p21 and p53 expression changes. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2014; 66(6): 723–729 (in Chinese with English abstract).
  - 20 Zhang YQ, Xiao CX, Lin BY, Shi Y, Liu YP, Liu JJ, Guleng B, Ren JL. Silencing of Pokemon enhances caspase-dependent apoptosis via fas- and mitochondria-mediated pathways in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2013; 8(7): e68981.
  - 21 Xie X, Xiao Y, Huang X. Homeobox C10 knockdown suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis in osteosarcoma cells through regulating caspase 3. *Oncotargets Ther* 2018; 11: 473–482.
  - 22 Oliveira AR, Beyer G, Chugh R, Skube SJ, Majumder K, Banerjee S, Sangwan V, Li L, Dawra RK, Subramanian S, Saluja AK, Dudeja V. Triptolide abrogates growth of colon cancer and induces cell cycle arrest by inhibiting transcriptional activation of E2F. *Lab Invest* 2015; 95(6): 648–659.
  - 23 Saleem M, Qadir MI, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, Ahmad B. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem Biol Drug Des* 2013; 82(3): 243–251.
  - 24 Zhuo W, Zhang L, Zhu Y, Zhu B, Chen Z. Fisetin, a dietary bioflavonoid, reverses acquired Cisplatin-resistance of lung adenocarcinoma cells through MAPK/Survivin/Caspase pathway. *Am J Transl Res* 2015; 7(10): 2045–2052.