

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.009

· 基础研究 ·

FBXW7 基因点突变对结直肠癌 HCT-116 细胞的增殖、迁移、侵袭和抗凋亡能力的影响

张百川¹, 程勇¹, 王祥峰², 唐康¹, 王五艺¹ (1. 重庆医科大学附属第一医院 胃肠外科, 重庆 400016; 2. 第三军医大学附属大坪医院 普外科, 重庆 400016)

[摘要] **目的:** 探讨 *FBXW7* 基因点突变对结直肠癌细胞株 HCT-116 增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法:** 通过构建 *FBXW7* 基因野生型及突变型过表达的重组载体, 并将其转染 HCT-116 细胞, 应用 Western blotting 检测转染后 *FBXW7* 蛋白表达情况。CCK-8 检测细胞增殖能力, 平板细胞克隆形成实验 (HTCA) 检测肿瘤细胞克隆形成能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 划痕及 Transwell 细胞迁移实验检测细胞迁移和侵袭能力。**结果:** 转染野生型 *FBXW7* 基因的 HCT-116 细胞中 *FBXW7* 蛋白表达水平高于对照组 (转染突变型 *FBXW7* 基因的 HCT-116 细胞)、阴性对照组 (转染空质粒载体 pEZ-M90 的 HCT-116 细胞) 及空白对照组 (未进行任何特殊处理的 HCT-116 细胞) (均 $P < 0.05$)。转染野生型 *FBXW7* 的 HCT-116 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力相较于其余各组均显著下降 (均 $P < 0.05$), 且细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:** *FBXW7* 基因点突变可使其蛋白表达水平降低, 从而促进结直肠癌 HCT-116 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并抑制其凋亡。

[关键词] *FBXW7* 基因; 基因突变; 结直肠癌; HCT-116 细胞; 泛素蛋白酶体系统

[中图分类号] R735.3; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0263-07

The effect of *FBXW7* gene point mutation to colorectal cancer HCT-116 cells' proliferation, migration, invasion, and its apoptosis resistance

ZHANG Baichuan¹, CHENG Yong¹, WANG Xiangfeng², TANG Kang¹, WANG Wuyi¹ (1. Department of Gastrointestinal Surgery, the 1st Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of General Surgery, Daping Hospital and the Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impact of *FBXW7* gene mutation on cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion processes of colorectal cancer HCT-116 cell line. **Methods:** Recombinant plasmids carrying wild-type and mutant-type *FBXW7* SNP were constructed and transfected into HCT-116 cell line; the *FBXW7* protein expression level in HCT-116 strains after transfection was detected by Western blotting. Subsequently, cell proliferation capacity was tested by CCK-8 assay; tumor cell colony formation ability was tested by HTCA; cell apoptosis function was tested by FCM; cell migration and invasion were tested by scratch assay and Transwell assay, respectively. **Results:** Higher *FBXW7* protein expression level was detected in HCT-116 strain transfected with wild-type *FBXW7* in comparison to the control group (strains transfected with mutant-type *FBXW7*), negative-control (strains transfected with empty plasmids), and blank-control (strains untransfected) (all $P < 0.05$). Compared with the other groups, strains transfected with wild-type *FBXW7* exhibited significantly reduced proliferation, colony formation, migration and invasion ability (all $P < 0.05$), but obviously increased apoptosis rate ($P < 0.05$). **Conclusion:** *FBXW7* gene mutation can down-regulate its protein expression, and further promote the proliferation, migration and invasion as well as inhibit the apoptosis of HCT-116 cells.

[Key words] *FBXW7* gene; gene mutation; colorectal cancer; HCT-116 cell; ubiquitin-proteasome system

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 263-269. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.009]

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金项目 (No. cstc2012jjA10038)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Science and Technology Commission (No. cstc2012jjA10038)

[作者简介] 张百川 (1988 -), 男, 硕士生, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: alex880601@126.com

[通信作者] 程勇 (CHENG Yong, corresponding author), 教授, 硕士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: chengyongcq@aliyun.com

结直肠癌是临床常见的肿瘤之一。全球范围内,它在肿瘤中的发病率高居第三,病死率也占第四位^[1]。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是真核生物细胞内选择性降解蛋白质的主要途径,这一系统参与了包括基因转录、凋亡分化、信号转导在内的多种细胞进程调控,其体系内的基因突变或蛋白表达改变常会导致肿瘤的发生与进展^[2-4]。作为F-box蛋白家族的重要成员之一,FBXW7(F-box and WD repeat domain containing 7)已被证实参与结直肠癌、胃癌、卵巢癌等肿瘤中识别并参与多种原癌蛋白的泛素化及降解,起着抑制肿瘤细胞生物学功能的作用^[5-9]。因此,FBXW7基因的突变常常会导致肿瘤的发生及进展。统计数据显示,在人类肿瘤中,约有6%的FBXW7基因发生了突变,其中结直肠癌的突变率约为9%^[10-12]。在前期研究中,本课题组与第三军医大学大坪医院的王祥峰博士一起,收集重庆医科大学附属第一医院及重庆第三军医大学大坪医院20例多源发结直肠癌患者的肿瘤病灶及正常组织,使用Illumina(HiSeq 2000/2500)测序平台进行全基因组测序,从其中2例患者的肿瘤样本中发现了相同的FBXW7基因突变位点:GRCh37.p13(GCF_000001405.25)上的153,249,385号外显子位点发生了非同义单核苷酸变异(nonsynonymous SNV),该位点的鸟嘌呤突变为腺嘌呤,从而导致其347号氨基酸由精氨酸变成了半胱氨酸,本研究拟探索此位点突变对结直肠癌细胞的生物学功能影响,以期从中发现结直肠癌诊断治疗及预后评估的新靶点。

1 材料与方法

1.1 组织来源

在重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学实验室组织库中提取到了FBXW7发生位点突变的2例患者原发灶及正常组织的冰冻样本。其中1例患者(Patient 1)为中年女性,其直肠癌组织(tumor 1)及正常组织(normal)为FBXW7野生型,乙状结肠癌组织(tumor 2)为FBXW7突变型;另1例患者(Patient 2)为老年男性,其升结肠癌组织(tumor 1)及正常组织(normal)为FBXW7野生型,直肠癌组织(tumor 2)为FBXW7突变型。本研究方案已经过单位伦理委员会批准,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 主要材料及试剂

人结直肠癌细胞株HCT116由重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学实验室惠赠,相对于其他结直肠癌细胞株,此细胞株FBXW7基因表达量更低同时更加常用^[13]。Lipofectamine[®] 2000购自美国Invitrogen公司,携带FBXW7基因野生型基因质粒(货号EX-T3614-M90,后文简称EX-FBXW7)、

FBXW7基因突变型基因质粒(货号CS-T3614-M90-01,后文简称CS-FBXW7)以及pEZ-M90空白载体(后文简称M90)均购于美国GeneCopoeia公司,质粒提取试剂盒E.Z.N.A[®] plasmid mini kit II购于美国OMEGA公司,胎牛血清购自德国PAN公司,RMPI 1640购自美国Hyclone公司,胰酶、青-链霉素溶液、RIPA裂解液、PMSF(蛋白酶抑制剂)、BCA蛋白浓度试剂盒、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒及PVDF膜均购自上海碧云天公司,CCK-8试剂购自日本同仁化学研究所,Transwell小室购自美国Corning公司,Matrigel基质胶购自美国BD公司,兔抗人FBXW7基因单克隆抗体购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(二抗)、兔抗人GAPDH单克隆抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司。

1.3 Western blotting 检测癌组织中FBXW7蛋白的表达情况

将提取的标本组织置于液氮下研磨,同时把RIPA裂解液与PMSF以100:1混匀后加入研磨好的组织中提取各样本总蛋白。BCA法测定蛋白浓度。取各组蛋白样品约40 μg置入10%SDS-PAGE体系。再将蛋白转到0.45 μm孔径的PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,再以1:1 000比例稀释的兔抗人FBXW7基因单克隆抗体及兔抗人GAPDH单克隆抗体4℃孵育过夜。加入以1:3 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(二抗)室温反应2 h。ECL发光液显影,化学发光凝胶成像系统中观察并拍照,以Quantity-One软件分析蛋白条带各泳道灰度值,目的蛋白的相对表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参GAPDH条带灰度值。实验重复3次。

1.4 Western blotting 检测癌细胞中FBXW7蛋白的表达情况

同上述使用RIPA裂解液提取细胞株总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,然后分析各细胞株中FBXW7基因蛋白表达情况,以Quantity-One软件分析蛋白条带各泳道灰度值,目的蛋白的相对表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参GAPDH条带灰度值。实验重复3次。

1.5 质粒的扩增

将低温保存的各组质粒与激活态大肠杆菌取出,以20 ng质粒:100 μl菌液的比例混合并以热激法转化。每管细菌加入400 μl LB培养基于37℃摇床200×g摇动45 min,取适量体积用接种环均匀涂布于加入氨苄青霉素的LB平板上。静置待菌液不再流动后倒置于37℃恒温环境培养16 h,挑出数个单克隆阳性菌落,放入10 ml含氨苄青霉素的LB培养基中,以37℃,200×g的条件摇床振荡16 h,然后按照质粒提取试剂盒E.Z.N.A[®] plasmid mini kit II的操作说

明提取质粒并使用核酸蛋白分析仪检测各组质粒的浓度及重组质粒比值,放于 -30°C 冰箱待用。

1.6 转染HCT-116细胞

将处于对数生长期,状态良好的HCT-116细胞均匀接种于6孔板内,待细胞汇合度约为60%时,将培养液换为无血清的RMPI 1640培养液培养2 h。将提取的各组质粒取4 ng分别与500 μl 无血清的RMPI 1640培养液混合,再取Lipofectamine[®] 2000 10 μl 同样与500 μl 无血清的RMPI 1640培养液混合,静置5 min后两两混合,再静置20 min后分别加入各孔,并添加无血清RMPI 1640培养液至2 ml/孔,培养6 h后换为含10%胎牛血清的RMPI 1640培养液继续培养48 h即可进行下一步实验。

实验分4个组:处理组(EX-FBXW7)转染野生型FBXW7基因的细胞,对照组(CS-FBXW7)转染突变型FBXW7基因的细胞,阴性对照组(M90)转染空质粒载体pEZ-M90的细胞,空白对照组(Contral)未进行任何特殊处理的细胞。

1.7 CCK-8实验检测FBXW7基因突变对HCT-116细胞增殖能力的影响

将转染48 h后的各组HCT-116细胞分别以 5×10^3 个/孔接种于96孔板内,设置5个复孔。放回孵箱中继续培养。在培养0、12、24、48、72 h后分别更换培养基并加入10 μl CCK-8试剂,继续培养2 h后使用酶标仪检测450 nm波长下的各孔光密度(D)值。实验重复3次。

1.8 划痕实验检测FBXW7基因突变对HCT-116细胞迁移能力的影响

将转染完成并处于对数生长期的HCT-116细胞按组别接种于6孔板中,待细胞贴壁并铺满单层后,使用中号枪头垂直划痕,分别于12、24、48 h显微镜下拍照,使用Image J软件分析划痕宽度,细胞相对迁移距离=[处理组迁移距离-对照组迁移距离]/2。实验重复3次。

1.9 Transwell侵袭实验检测FBXW7基因突变对HCT-116细胞侵袭能力的影响

将Matrigel基质胶以50 μl /孔加入Transwell小室内,将各组转染结束并呈对数生长的细胞计数出 5×10^4 个细胞,以100 μl 无血清的RMPI 1640培养液重悬后均匀接种于基质胶上。在下室中加入含10%胎牛血清的RMPI 1640培养液。孵箱中孵育48 h后取出,多聚甲醛固定,结晶紫染色。显微镜下随机选取5个视野拍照,计数穿膜的细胞数。实验重复3次。

1.10 平板细胞克隆形成实验检测FBXW7基因突变对HCT-116细胞克隆形成能力的影响

将已转染完成呈对数生长的HCT-116细胞按组

种于6孔板中,每孔种 5×10^2 个细胞,放回孵箱中培养2周左右,至6孔板中出现肉眼可见的细胞克隆时终止培养。多聚甲醛固定15 min,结晶紫溶液染色15 min,显微镜下计数大于50个细胞的克隆数纳入计数。实验重复3次。

1.11 流式细胞术检测FBXW7基因点突变对HCT-116细胞凋亡能力的影响

用胰酶将转染结束的各组HCT-116细胞由6孔板中消化下来并离心重悬后,每组取1 ml细胞悬液,立即送流式细胞仪检测,收集数据并分析。本实验重复3次。

1.12 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间均数比较采用F检验及单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间均数比较采用t检验,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FBXW7基因突变的结直肠癌组织FBXW7蛋白表达量减少

Western blotting检测结果(图1)提示,发生FBXW7基因突变的肿瘤组织(图中均为tumor 2)中FBXW7蛋白的表达水平相对于未发生突变的肿瘤组织(tumor 1)及正常组织(normal)有明显的降低($P<0.05$)。

对转染重组质粒的HCT-116细胞株进行Western blotting检测结果(图2)提示,相对于阴性对照组、对照组和空白对照组细胞,处理组细胞FBXW7基因蛋白表达量有明显上升($P<0.05$),提示该位点突变可能是导致FBXW7蛋白表达下降的直接原因。

2.2 FBXW7基因突变影响结直肠癌HCT-116细胞的增殖与凋亡

平板细胞克隆形成实验检测结果(图3)显示,与阴性对照组和空白对照组细胞相比,处理组细胞的肿瘤细胞克隆形成能力受到抑制($P<0.05$)。而对照组没有明显改变($P>0.05$),提示FBXW7基因的突变影响了其对肿瘤克隆形成能力的抑制作用。

CCK-8实验检测转染后的各组HCT-116细胞增殖能力,结果(图4)显示,与阴性对照组和空白对照组对照,处理组的肿瘤细胞的增殖能力有明显的抑制($P<0.01$)。而对照组的肿瘤细胞增殖的抑制并不明显($P>0.05$),提示该位点突变影响了FBXW7基因对肿瘤细胞增殖的抑制作用。

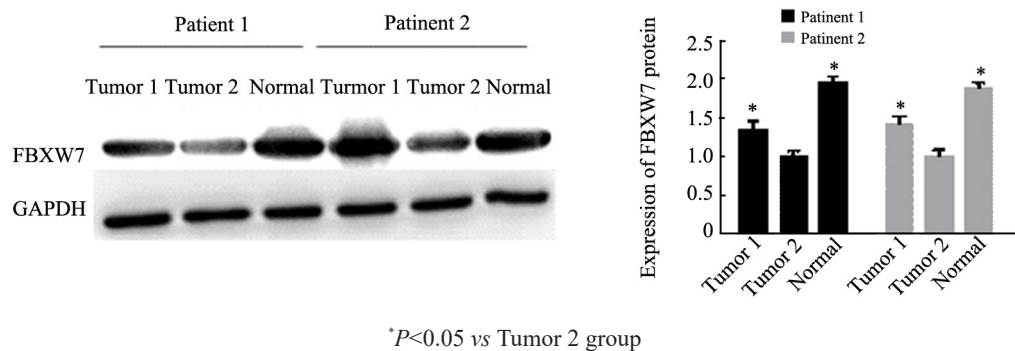


图1 *FBXW7*突变的肿瘤组织蛋白表达量减少

Fig.1 Expressions of FBXW7 proteins reduced in the tumor tissue with *FBXW7* mutation

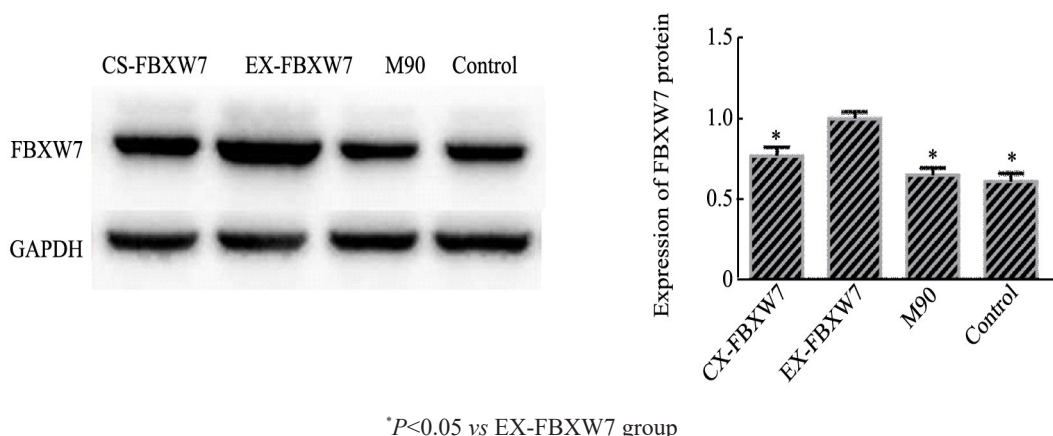


图2 转染后HCT-116细胞中FBXW7蛋白表达增多

Fig.2 Expressions of FBXW7 protein increased in HCT-116 cells after transfection

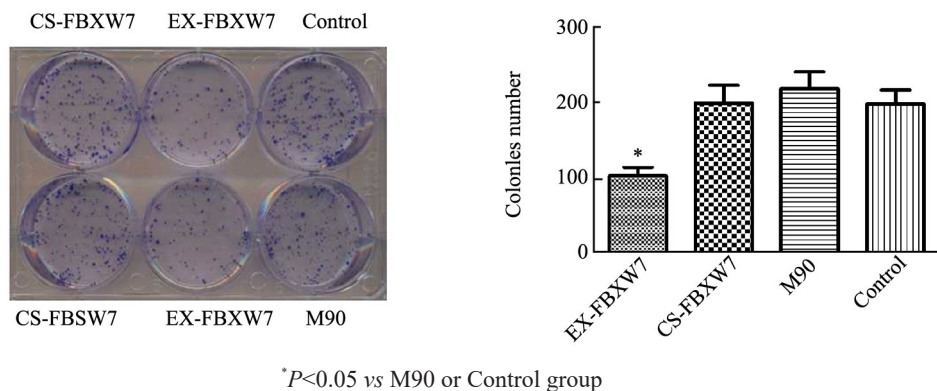


图3 平板克隆形成实验检测*FBXW7*突变对结直肠癌细胞克隆形成能力的影响

Fig. 3 Effect of FBXW7 mutation on the proliferation of colorectal cancer HCT-116 cells detected by plate colony formation assay

流式细胞术检测结果(图5)显示,与阴性对照组及空白对照组的HCT-116细胞比较,处理组的肿瘤细胞凋亡加速($P < 0.05$),而对照组的细胞凋亡情况并无明显改变($P > 0.05$)。这一结果提示*FBXW7*基因的突变影响了其对肿瘤细胞凋亡的促进作用。

划痕与Transwell侵袭实验结果显示,与对照组、阴性对照组、空白对照组相比,处理组的细胞相对迁移距离(图6)和穿过Transwell膜细胞数量(图7)均有明显减少($P < 0.05$),表明*FBXW7*基因的突变影响了*FBXW7*基

因基因对肿瘤细胞迁移与侵袭的抑制作用。

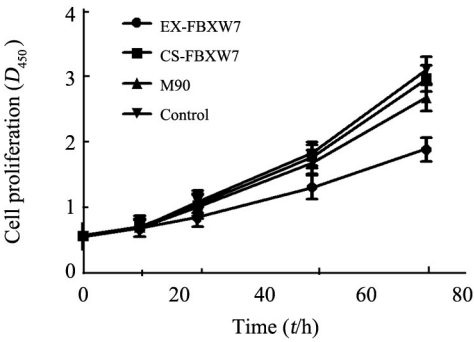
3 讨论

作为SCF(SKP1-CUL1-F-box)型泛素连接酶的靶蛋白识别成分,*FBXW7*基因能降解含有保守磷酸化氨基酸的靶蛋白。这种靶蛋白被称为CDC4磷酸-降解决定子(CDP),它可以与*FBXW7*基因中的WD40重复结构域结合,从而使泛素连接酶识别底物并进一步降解底物^[14-15]。有研究^[16]表明,*FBXW7*基因突变与

缺失能导致癌细胞增殖相关的 Myc、Cyclin E 和 Aurora-A 异常蓄积产生和加速。

本实验将构建的 *FBXW7* 基因突变型与野生型的表达载体转染进入 HCT-116 结肠癌细胞株, 通过 Western blotting 结果显示, 相对于 *FBXW7* 基因突变型高表达的结肠癌细胞, *FBXW7* 基因野生型高表达的细胞 *FBXW7* 蛋白表达量有明显增多, 提示该位点突变可能是导致 *FBXW7* 蛋白表达下降的直接原因。Rajagopalan 等^[17] 通过研究发现, 在体外敲除大肠癌细胞株的 *FBXW7* 基因, 将导致 cyclin E 的增加以及肿瘤细胞功能的改变。Li 等^[18] 研究发现, 高表达的 *FBXW7* 基因可通过抑制 cyclin E 及 c-Myc 的表达而抑制骨肉瘤 U2OS 和 MG-63 细胞的增殖并促进其凋亡, 从而起抑制肿瘤生长的作用, cyclin E 的表达增加可引起染色体不稳定, 从而加速肿瘤发生及进展。通过流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 结果显示, 相对于突变型 *FBXW7* 基因高表达的细胞, 野生型

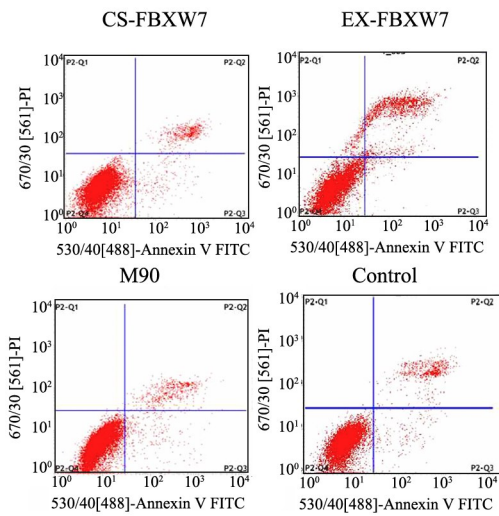
FBXW7 基因高表达的 HCT-116 细胞凋亡率明显增高, 可能是由于高表达的 *FBXW7* 蛋白降低了 c-Myc 和 cyclin E 蛋白表达水平, 导致细胞凋亡率升高。



* $P < 0.05$ vs the M90 or Control group

图 4 *FBXW7* 突变对结直肠癌细胞增殖的影响

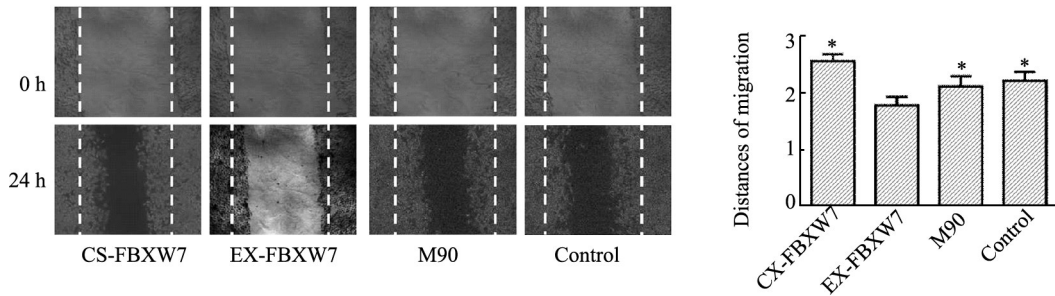
Fig. 4 Effect of *FBXW7* mutation on the proliferation of colorectal cancer HCT-116 cell detected by CCK-8 assay



* $P < 0.05$ vs EX-FBXW7 or Control group

图 5 *FBXW7* 基因突变对结直肠癌 HCT-116 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of *FBXW7* mutation on the apoptosis of colorectal cancer HCT-116 cells



* $P < 0.05$ vs EX-FBXW7 group

图 6 *FBXW7* 基因突变对结直肠癌 HCT-116 细胞迁移的影响($\times 200$)

Fig. 6 Effect of *FBXW7* mutation on the migration of colorectal cancer HCT-116 cells($\times 200$)

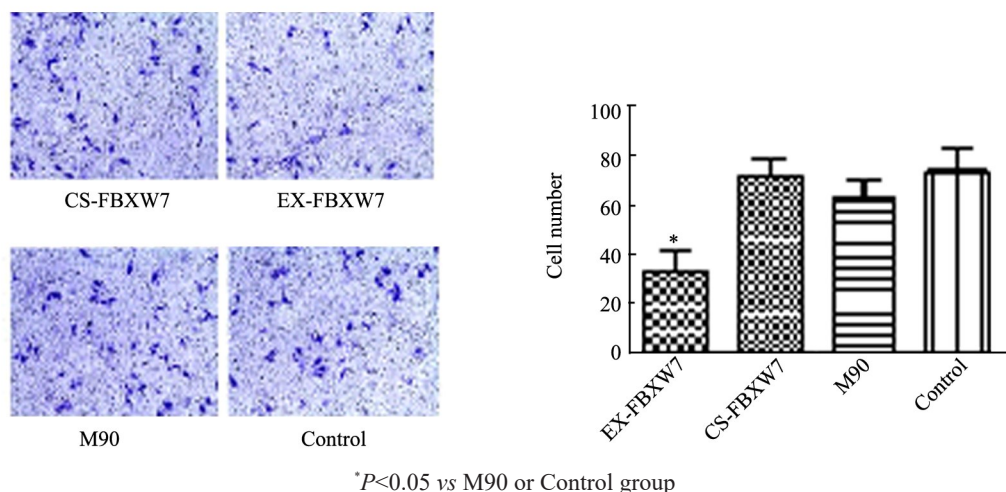


图7 *FBXW7*基因突变对结直肠癌 HCT-116细胞侵袭的影响(×200)

Fig.7 Effect of *FBXW7* mutation on the invasion of colorectal cancer HCT-116 cells(×200)

结直肠癌恶化的主要原因是癌灶的浸润与转移, Gong等^[19]通过研究证实, miR-25可下调*FBXW7*基因表达,从而促进胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移。Wang等^[20]探讨了*FBXW7*基因与mTOR信号通路的关系,提示*FBXW7*基因缺失可以引起结直肠癌细胞的侵袭和迁移。本研究进行了CCK-8、平板克隆、划痕、Transwell一系列实验结果表明,*FBXW7*基因突变型的过表达并不能和其野生型一样,抑制结肠癌HCT-116细胞的增殖、迁移和侵袭,其机制尚不明确。

Rajagopalan等^[17]在研究190例结直肠癌中发现22例突变(11.58%), 58例腺瘤中发现4例突变(6.90%)。而Kemp等^[21]采用了荧光单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP)检测了244例结直肠癌和40种结直肠癌细胞系中*FBXW7*基因的表达情况,结果发现6.34%(18/284)的肿瘤有*FBXW7*基因突变。两者的结论基本相似。本实验通过对新发现的突变位点进行研究,确定了此位点突变会导致*FBXW7*蛋白表达的缺失,从而可能进一步导致结直肠癌的发生与进展。

Mayakannan等^[22]通过实验发现,*FBXW7*基因的点突变,如rs4399968会通过3'端非翻译区上microRNA创建结合位点从而使肿瘤发生及进展,本研究中所涉及位点的作用方式是否与该作用方式有关,尚需进一步实验验证。

综上所述,当*FBXW7*基因在GRCh37.p13(GCF_000001405.25)上的153,249,385号碱基由鸟嘌呤突变为腺嘌呤时,会导致*FBXW7*蛋白表达缺失,从而促使结直肠肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭,抑制其凋亡,导致结直肠癌的发生与进展。其具体作用机制仍有待实验论证。需要进一步探究这一突变过

程中涉及的具体细胞内信号通路以及建立小鼠结直肠癌模型实验来更加全面具体的评估这一位点突变对结直肠癌的影响,以期探究结直肠肿瘤发生发展机制提供新的线索,为检测疾病发生、预估疾病预后、指导治疗用药开拓新的思路。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] FINLEY D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome[J/OL]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 477-513[2017-11-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431160/>. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.
- [3] GLICKMAN M H, CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 373-428. DOI: 10.1152/physrev.00027.2001
- [4] CRUSIO K M, KING B, REAVIE L B, et al. The ubiquitous nature of cancer: the role of the SCF(Fbw7) complex in development and transformation[J]. Oncogene, 2010, 29(35): 4865-4873. DOI: 10.1038/onc.2010.222.
- [5] TAKEISHI S, NAKAYAMA K I. Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells[J]. Br J Cancer, 2014, 111(6): 1054-1059. DOI: 10.1038/bjc.2014.259.
- [6] DAVIS R J, WELCKER M, CLURMAN B E. Tumor suppression by the Fbw7 ubiquitin ligase: mechanisms and opportunities[J]. Cancer Cell, 2014, 26(4): 455-464. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.09.013.
- [7] BAILEY M L, SINGH T, MERO P, et al. Dependence of human colorectal cells lacking the FBW7 tumor suppressor on the spindle assembly checkpoint[J]. Genetics, 2015, 201(3): 885-895. DOI: 10.1534/genetics.115.180653.
- [8] LI H, WANG Z, ZHANG W, et al. Fbxw7 regulates tumor apoptosis, growth arrest and the epithelial-to-mesenchymal transition in part through the RhoA signaling pathway in gastric cancer[J]. Cancer

- Lett, 2016, 370(1): 39-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.006.
- [9] SGAMBATO A, CITTADINI A, MASCIULLO V, et al. Low frequency of hCDC4 mutations in human primary ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2007, 105(2): 553-555. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.01.026.
- [10] GERBER J M, QIN L, KOWALSKI J, et al. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells[J]. Am J Hematol, 2011, 86(1): 31-37. DOI: 10.1002/ajh.21915.
- [11] STAAL F J, CLEVERS H C. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(1): 21-30. DOI: 10.1038/nri1529.
- [12] HUNTLY B J, GILLILAND D G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 311-321. DOI: 10.1038/nrc1592.
- [13] LI N, LORENZI F, KALAKOUTI E, et al. FBXW7-mutated colorectal cancer cells exhibit aberrant expression of phosphorylated-p53 at Serine-15[J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 9240-9256. DOI: 10.18632/oncotarget.3284.
- [14] ZHANG W, KOEPP D M. Fbw7 isoform interaction contributes to cyclin E proteolysis[J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(12): 935-943. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0253.
- [15] TANG X, ORLICKY S, LIN Z, et al. Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination[J]. Cell, 2007, 129(6): 1165-1176. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.042.
- [16] FUJII Y, YADA M, NISHIYAMA M, et al. Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation[J]. Cancer Sci, 2006, 97(8): 729-736. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00239.x.
- [17] RAJAGOPALAN H, JALLEPALLI P V, RAGO C, et al. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability[J]. Nature, 2004, 428(6978): 77-81. DOI: 10.1038/nature02313.
- [18] LI Z, XIAO J, HU K, et al. FBXW7 acts as an independent prognostic marker and inhibits tumor growth in human osteosarcoma[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2): 2294-2306. DOI: 10.3390/ijms16022294.
- [19] GONG J, CUI Z, LI L, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer proliferation, invasion, and migration by directly targeting F-box and WD-40 Domain Protein 7, FBXW7[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10): 7831-7840. DOI: 10.1007/s13277-015-3510-3.
- [20] WANG Y, LIU Y, LU J, et al. Rapamycin inhibits FBXW7 loss-induced epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like characteristics in colorectal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(2): 352-356. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.077.
- [21] KEMP Z, ROWAN A, CHAMBERS W, et al. CDC4 mutations occur in a subset of colorectal cancers but are not predicted to cause loss of function and are not associated with chromosomal instability [J]. Cancer Res, 2005, 65(24): 11361-11366. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2565.
- [22] MANIKANDAN M, RAKSHA G, MUNIRAJAN A K. Haploinsufficiency of tumor suppressor genes is driven by the cumulative effect of microRNAs, microRNA binding site polymorphisms and microRNA polymorphisms: an In silico approach[J]. Cancer Inform, 2012, 11: 157-171. DOI: 10.4137/CIN.S10176.

[收稿日期] 2017-11-17

[修回日期] 2018-01-09

[本文编辑] 韩丹