

FAM134B 在肝癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系

袁 野, 马丹丹, 张建新, 钟蓝海, 萧正康, 张智勇

摘要 目的 检测 42 例肝癌组织中 134 序列相似的家庭成员 B (FAM134B) 的表达水平, 结合临床病例资料分析 FAM134B 表达量与肝癌患者临床病理特征的关系。方法 收集接受手术治疗的 42 例肝癌患者的组织标本及临床病例资料。标本包括切除的肝癌组织和配对的癌旁肝组织, 均经本院病理科病理组织学确诊。分别采用免疫组化(IHC)、荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)及免疫印迹(Western blot)检测 FAM134B 在肝癌组织和细胞中的表达量, 并分析 FAM134B 表达量与肝癌患者临床病理特征的关系。结果 免疫组化检测结果显示 FAM134B 在肝癌组织及癌旁组织阳性表达率分别为 83% (35/42) 和 33% (14/42), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 12.343$, $P < 0.05$)。Real-time PCR 检测结果显示 FAM134B 在肝癌组织中的 mRNA 表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。并且 FAM134B 在 HepG2 细胞中的 mRNA 表达高于 L02 细胞 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示: 与癌旁组织比较, FAM134B 在肝癌组织中高表达, 与 L02 细胞相比, FAM134B 在 HepG2 细胞中高表达。且 FAM134B 蛋白表达量与肿瘤大小、血清甲胎蛋白(AFP)、门静脉癌栓、肝外转移、邻近器官侵犯和分化程度显著相关性 ($P < 0.05$), 即 FAM134B 表达量增高时, 肿瘤更大、AFP 更高、邻近器官侵犯更多、分化程度更低。然而与性别、年龄、乙肝、肝硬化、淋巴结侵犯无明显相关 ($P > 0.05$)。结论 FAM134B 在肝癌中高表达, 可能在肝癌的发生发展、侵袭转移中发挥作用。关键词 134 序列相似的家庭成员 B; 肝细胞癌; 临床意义中图分类号 R 735.7 文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)07-1088-04 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.017

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)简称肝癌, 是高度恶性的肿瘤^[1]。据国际癌症研究机构统计, 肝癌发病率在全球位居男性癌症第 5 位, 女性癌症第 7 位, 死亡率在癌症相关死因中位列第三^[2-3]。肝癌 5 年生存率在过去 10 年没有显著提升, 仅为 10%^[4]。大量增殖和侵袭转移是肝癌患者

病死率高及临床疗效差的关键, 机制不明^[5-6]。因此, 探究肝癌发生发展机制对改善预后以及寻找肝癌诊疗靶点至关重要。Tang et al^[7]报道 134 序列相似的家庭成员 B (family with sequence similarity 134, member B, FAM134B) 最早在食管鳞状上皮癌中被发现, 且与该肿瘤恶性表型有关。但关于 FAM134B 在肝癌中的作用和机制研究未见报道。该研究将以肝癌临床标本及相应病例资料为基础, 探讨 FAM134B 在肝癌中的表达及临床意义, 以期寻找肝癌新的临床诊疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2016 年 1 月~2017 年 12 月在中国人民解放军中部战区总医院接受手术治疗的 42 例肝癌患者的组织标本及临床病理资料。本研究获得该院伦理委员会批准, 患者及家属均签署知情同意书。手术切除病变肝癌组织标本及癌旁组织标本后, 立即置入液氮中保存。42 例患者的临床病理资料包括: 性别、年龄、肿瘤数目、乙肝、肝硬化、血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、肿瘤大小、肿瘤包膜完整情况、卫星灶、邻近组织侵犯、门静脉癌栓、肝外转移、Child 分级、BCLC 分期等。

1.2 主要试剂 FAM134B 和 GAPDH 一抗及二抗均购自英国 Abcam 公司; TRIzol 试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒均购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司; 总蛋白抽提试剂盒、蛋白浓度检测试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; 细胞培养基、血清、胰酶均购自日本 Sigma 公司; 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物公司; HepG2 细胞与 L02 细胞均保存于本院中心实验室液氮罐。

1.3 Real-time PCR 检测 FAM134B mRNA 表达 运用 TRIzol 试剂盒提取 mRNA、逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA, 低温保存备用。Real-time PCR 总反应体系为 20 μ l, 其中 SYBR Green mix 缓冲液 10 μ l, 上下游引物各 0.6 μ l (浓度为 10 μ mol/L), cDNA 2 μ l。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环。FAM134B 与 GAPDH 引物见表 1。

2019-03-25 接收

基金项目: 湖北省自然科学基金(编号: 2012FFB06805); 湖北省卫生健康委科研联合项目(编号: WJ2019H104)

作者单位: 中国人民解放军中部战区总医院普通外科, 武汉 430070

作者简介: 袁 野, 男, 主治医师;

张智勇, 男, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail: pt-wkzzy@163.com

表1 Real-time PCR 引物的基因序列

基因	引物序列(5'-3')
FAM134B	F: AGAGGTTTTTTAGGAATTTAGACTTTTT R: CCATCTTCAACTATACTTCCAAACAAA
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG

1.4 免疫组织化学染色及结果判定 免疫组织化学染色按试剂盒实验步骤操作。制作石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,抗原修复,FAM134B 抗体(1:1 000 稀释)孵育,二氨基联苯氨(DAB)显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片固定。免疫组织化学染色结果判定标准:未见阳性细胞或阳性细胞率<5%判定为阴性(-),阳性细胞率5%~25%定为弱阳性(+),25%~50%为中度阳性(++),>50%为强阳性(+++)。中度阳性及强阳性均判定为阳性表达。

1.5 Western blot 检测 FAM134B 蛋白表达 肝癌组织和癌旁组织分别称重并切成小块置于 EP 管(eppendorf 管)中,EP 管中加入含蛋白酶抑制剂的蛋白质抽提试剂,反复研磨组织,冰上裂解 30 min,使组织尽可能完全裂解,得到裂解液;小心刮下 L02 细胞及 HepG2 细胞,并转移至 EP 管中,加入含蛋白酶抑制剂的蛋白质抽提试剂,得到裂解液。将裂解液离心取上清液即得到蛋白样品。二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。根据目的蛋白的分子量选择相应的分离胶和浓缩胶,以恒定电压 80 V 行 SDS-PAGE 电泳分离。蛋白电转移至 PVDF 膜,FAM134B 及 GAPDH 孵育一抗(1:1 000 稀释)4℃过夜,用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。孵育二抗(1:3 000 稀释),室温摇床 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光法曝光检测。免疫印迹条带的灰度值经灰度扫描仪分析后获得。

1.6 统计学处理 运用 Prism Graphpad5.0 软件作图,采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异比较采用独立样本 t 检验,相关率的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IHC 检测 FAM134B 蛋白表达 FAM134B 在 42 例肝癌组织及癌旁组织均有表达,详见图 1。依据判定标准,FAM134B 在癌旁组织中为阴性、弱阳性或中度阳性,但在肝癌组织中为弱阳性、中度阳性或强阳性。经统计得 FAM134B 在肝癌组织及癌旁

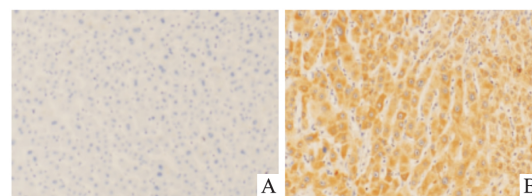


图1 FAM134B 在癌旁组织及肝癌组织中的表达 DAB 染色 $\times 200$
A: 癌旁组织; B: 肝癌组织

组织阳性表达率分别为 83% (35/42) 和 33% (14/42),差异有统计学意义($\chi^2 = 12.343$, $P < 0.05$)。

2.2 Real-time PCR 检测 FAM134B 基因表达结果 FAM134B 在肝癌组织中的 mRNA 表达高于癌旁组织($t = 22.084$, $P < 0.05$)。并且 FAM134B 在 HepG2 细胞中的 mRNA 表达高于 L02 细胞($t = 19.985$, $P < 0.05$)见图 2。

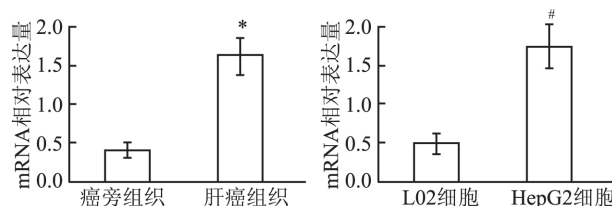


图2 Real-time PCR 检测 FAM134B 的 mRNA 表达
与癌旁组织比较: * $P < 0.05$; 与 L02 细胞比较: # $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测 FAM134B 蛋白表达结果

FAM134B 蛋白在 HepG2 细胞中的表达高于 L02 细胞,FAM134B 在肝癌组织中的蛋白表达同样低于癌旁组织。见图 3。

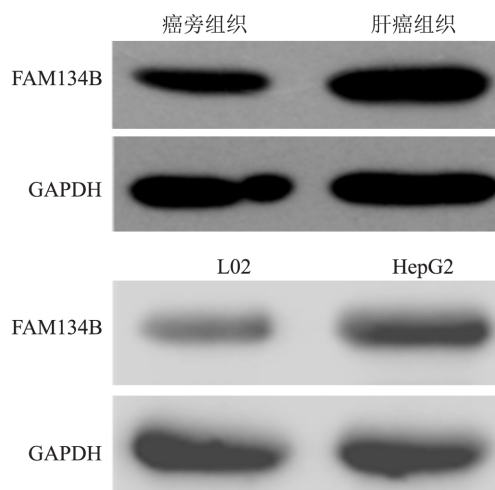


图3 Western blot 检测 FAM134B 的蛋白表达

2.4 FAM134B 蛋白表达水平与肝癌临床病理特

征之间的关系 FAM134B 蛋白表达量与肿瘤大小 ($t = 1.089, P < 0.05$)、血清 AFP ($t = -7.273, P < 0.05$)、门静脉癌栓 ($t = 6.309, P < 0.05$)、肝外转移 ($t = 6.640, P < 0.05$)、邻近器官侵犯 ($t = 7.959, P < 0.05$) 和分化程度 ($t = 6.115, P < 0.05$) 显著相关, 即 FAM134B 表达量增高时, 肿瘤更大、AFP 更高、邻近器官侵犯更多、分化程度更低, 且存在门静脉癌栓和肝外转移。然而与性别、年龄、乙肝、肝硬化、淋巴结侵犯无明显相关性 ($P > 0.05$)。FAM134B 在 AFP 表达水平正常的肝癌标本中部分 (42.86%, 12/28) 高表达。见表 2。

表 2 FAM134B 蛋白表达量与肝癌临床病理特征之间的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	表达量	t 值	P 值
性别				
男	38	1.67 ± 0.32	0.217	0.831
女	4	1.65 ± 0.09		
年龄(岁)				
≤55	31	1.65 ± 0.34	-0.540	0.593
>55	11	1.70 ± 0.18		
乙肝				
阳性	33	1.68 ± 0.33	0.426	0.672
阴性	9	1.63 ± 0.20		
肝硬化				
有	26	1.71 ± 0.32	1.089	0.283
无	16	1.60 ± 0.29		
肿瘤大小(cm)				
≤5	17	1.37 ± 0.16	-8.438	<0.05
>5	25	1.87 ± 0.21		
血清 AFP(ng/ml)				
≤400	28	1.50 ± 0.21	-7.273	<0.05
>400	14	1.99 ± 0.19		
门静脉癌栓				
有	8	2.11 ± 0.18	6.309	<0.05
无	34	1.56 ± 0.23		
肝外转移				
阳性	10	2.06 ± 0.19	6.640	<0.05
阴性	32	1.54 ± 0.22		
邻近器官侵犯				
有	18	1.94 ± 0.19	7.959	<0.05
无	24	1.46 ± 0.19		
淋巴结侵犯				
有	7	1.73 ± 0.25	0.585	0.562
无	35	1.65 ± 0.32		
分化程度				
高分化	7	2.14 ± 0.17	6.115	<0.05
低分化	35	1.57 ± 0.23		

3 讨论

FAM134B 是一个相对较新的分子, 目前国内外关于 FAM134B 在人类疾病中的作用研究较少。2007 年, Tang et al^[7] 发现 FAM134B 在食管鳞状细胞癌

中促进癌细胞生长和增殖, 表现为癌基因的特性。相反在 2014 年, 相关研究^[8-9] 显示 FAM134B 在结肠癌中抑制癌细胞生长增殖和侵袭转移, 表现为抑癌基因的特性。FAM134B 在不同的肿瘤中发挥不同的作用激发了笔者极大的研究兴趣。鉴于 FAM134B 在肝癌中发挥的作用及机制研究目前是空白的, 且研究^[10-11] 表明 FAM134B 突变与癌症患者临床病理特征密切相关。因此本研究致力于研究 FAM134B 与肝癌患者临床病理特征的关系, 探讨其临床意义。

癌症是由信号通路中的促进细胞生长和增殖的原癌基因与调节细胞分裂和存活的抑癌基因失调而发展的细胞疾病^[12]。原癌基因的异常表达或抑癌基因被抑制将导致癌症进展^[13]。本研究中免疫组化检测结果显示 FAM134B 在肝癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁组织。Real-time PCR 和 Western blot 检测结果均显示 FAM134B 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织, 且在 HepG2 细胞中的表达显著高于 L02 细胞。可见 FAM134B 在肝癌中呈高表达, 发挥癌基因特性。本研究结果与 Tang et al^[7] 的报道一致, 与 Kasem et al^[8] 及 Islam et al^[9] 的报道相反。

本研究通过统计分析 FAM134B 蛋白表达与 42 例肝癌患者临床病理特征之间的关系得出: FAM134B 在肝癌组织中高表达与肝癌患者的性别、年龄、乙肝、肝硬化与淋巴结侵犯无明显相关。但 FAM134B 表达量增高时, 肿瘤更大、AFP 更高、邻近器官侵犯更多、分化程度更低。且存在门静脉癌栓和肝外转移的患者 FAM134B 表达量更高。结果提示 FAM134B 可能在肝癌发生发展、侵袭转移中发挥一定的促进作用。肝癌患者的预后与早发现、早诊断、早治疗有直接关系^[3]。目前, AFP 有助于筛查和早期诊断肝癌^[14], 但 AFP 也有其局限性, 即只有 40%~60% 的肝癌患者 AFP 增高, 尚有部分肝癌患者的血清 AFP 水平并没有显著升高。如果这部分肝癌患者仅用 AFP 这一生化检测指标来筛查和早期诊断肝癌, 则容易造成漏诊。因此探索更多生物学指标来增强肝癌早期诊断的精确性、灵敏度和特异度具有较大的临床意义。本研究中, FAM134B 在 AFP 表达水平正常的肝癌标本中高表达, 达 42.86%。因此, 本研究结果提示 FAM134B 可能是 AFP 阴性肝癌的潜在早期诊断指标。

参考文献

- [1] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协

- 作专业委员会,中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(6): 403-10.
- [2] El-serag H B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(6): 1264-73. e1.
- [3] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet* 2018, 391(10127): 1301-14.
- [4] Coleman M P. Cancer survival: global surveillance will stimulate health policy and improve equity[J]. *Lancet*, 2014, 383(9916): 546-73.
- [5] Reeves H L, Aisen A M. hepatocellular carcinoma: optimal staging impacts survival[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(7): 1274-6.
- [6] Allemani C, Weir H K, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676, 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet*, 2015, 385(9972): 977-1010.
- [7] Tang W K, Chui C H, Fatima S, et al. Oncogenic properties of a novel gene JK-4 located in chromosome 5p and its overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 19(6): 915-23.
- [8] Kasem K, Sullivan E, Gopalan V, et al. JK1(FAM134B) represses cell migration in colon cancer: a functional study of a novel gene[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(1): 99-104.
- [9] Islam F, Gopalan V, Wahab R, et al. Stage dependent expression and tumor suppressive function of FAM134B(JK1) in colon cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(1): 238-49.
- [10] Hague M H, Gopalan V, Chan K W, et al. Identification of novel FAM134B(JK1) mutations in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29173.
- [11] Islam F, Gopalan V, Vider J, et al. MicroRNA-186-5p overexpression modulates colon cancer growth by repressing the expression of the FAM134B tumour inhibitor[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(2): 260-70.
- [12] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.
- [13] Croce C M. Oncogenes and cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(5): 502-11.
- [14] Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein[J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(25): 1802-6.

Expression of FAM134B in hepatocellular carcinoma and its relationship with clinicopathological features

Yuan Ye, Ma Dandan, Zhang Jianxin, et al

(Dept of General Surgery, Central Theater General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070)

Abstract Objective To investigate the expression of family with sequence similarity 134, member B (FAM134B) in 42 cases of hepatocellular carcinoma and explore the relationship between FAM134B expression and clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. **Methods** A total of 42 paired specimens of tumor and adjacent non-tumor tissues and clinical data were collected from 42 cases of hepatocellular carcinoma patients and all the specimens were confirmed by histopathology. Immunohistochemistry (IHC), Real-time PCR and Western blot were used to examine the expression and distribution of FAM134B in hepatocellular carcinoma tissues and cells. In addition, the correlation between the expression of FAM134B and clinicopathological features of hepatocellular carcinoma was analyzed. **Results** IHC showed that the positive expression rate of FAM134B in tumor tissues and adjacent non-tumor tissues were 83% (35/42) and 33% (14/42), the difference was statistically significant ($\chi^2 = 12.343$, $P < 0.05$). Real-time PCR showed that FAM134B mRNA levels was significantly increased in liver tissues than in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$) and in HepG2 cells than in L02 cells ($P < 0.05$). While Western blot showed that FAM134B protein expression levels was higher in liver tissues compared with adjacent non-tumor tissues and higher in HepG2 cells compared with L02 cells. Moreover, the expression difference of FAM134B was correlated with tumor size, serum alpha fetoprotein (AFP), portal vein tumor thrombosis, extrahepatic metastasis, adjacent organ invasion, differentiation grade ($P < 0.05$), but not with gender, age, hepatitis B virus, cirrhosis and lymphatic invasion ($P > 0.05$). In other words, when the expression level of FAM134B increased, it had larger tumor size, higher AFP, deeper tumor adjacent tissues and lower differentiation grade. **Conclusion** FAM134B is highly expressed in hepatocellular carcinoma. And FAM134B may plays an important role in the development, invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma.

Key words family with sequence similarity 134, member B; hepatocellular carcinoma; clinicopathological features