

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.013.html>

FAM96A 在结肠癌组织中的表达差异及其对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

孙康¹, 钟蓝海², 张杨², 马丹丹², 蔡逊², 田俊³

摘要 目的 观察 FAM96A 在 60 例结肠癌组织中的表达, 分析其表达差异与结肠癌生物学特征的关系, 并探讨 FAM96A 对结肠癌细胞系 HCT116 细胞增殖及凋亡的影响。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)和 Western blot 法检测 FAM96A 蛋白在 60 例结肠癌组织及配对癌旁组织中的表达, 并统计分析 FAM96A 蛋白表达差异与结肠癌临床病理特征之间的相关性。采用脂质体转染法将含人 FAM96A 全长序列的 pcDNA3.1-myc-FAM96A 重组质粒转染至 HCT116 细胞中, 分别采用 MTT 法及流式细胞技术检测 FAM96A 过表达对 HCT116 增殖和凋亡的影响。结果

Western blot 结果显示 FAM96A 蛋白在癌旁组织中的表达水平显著高于结肠癌组织($t = 16.328$, $P < 0.05$)。FAM96A 蛋白表达差异与本研究 60 例结肠癌患者的淋巴结转移、浸润深度、TNM 分期及是否发生远处转移之间差异有统计学意义($P < 0.05$), 与患者性别、年龄、肿瘤大小及分化程度之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。MTT 法及流式细胞技术检测结果显示: FAM96A 组吸光度(A)值显著低于对照组($P < 0.05$)。FAM96A 组的细胞凋亡率高于对照组($t = 30.015$, $P < 0.05$)。结论 FAM96A 在人结肠癌组织中表达显著下降, 其表达水平与结肠癌的发生发展、侵袭转移密切相关。过表达 FAM96A 可抑制结肠癌细胞增殖且诱导其凋亡。

关键词 96 序列相似的家庭成员 A; 结肠癌; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.35

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)07-1053-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.013

结肠癌发生发展、侵袭转移与众多基因、分子异

常表达密切相关^[1]。研究^[2]显示, 96 序列相似的家庭成员 A (family with sequence similarity 96, member A, FAM96A) 在胃肠道间质瘤中表达显著降低, 过表达 FAM96A 于间质瘤细胞中, 抑制细胞增殖, 增加凋亡敏感性诱导细胞凋亡, 减少致瘤性, 且对 FAM96A 功能的研究有助于开发新型间质瘤疗法。目前国内外关于 FAM96A 在结肠癌发生发展中作用的研究报道甚少。该研究主要观察 FAM96A 在结肠癌组织中的表达差异, 并分析其表达差异与结肠癌淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期等临床病理特征的关系, 并探讨其对结肠癌细胞系 HCT116 细胞增殖、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集中国人民解放军武汉总医院普通外科 2015 年 7 月~2016 年 7 月 60 例结肠癌组织标本及距肿瘤边缘 > 5 cm 处为对照的癌旁组织标本, 离体后液氮灌暂时存放并运送至 -80℃ 超低温冰箱中长期保存备用。

1.2 主要试剂 FAM96A、 β -actin 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、质粒提取试剂盒、Lipofectamine 2000 转染试剂盒、ECL 化学发光试剂盒及蛋白浓度检测试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司; 培养基、胎牛血清、胰酶、MTT 均购自日本 Sigma 公司。人肝癌细胞系 HepG2 细胞、人正常胎肝 L02 细胞均保存于本院中心实验室。 β -actin F: 5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3', R: 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'; FAM96A F: 5'-GCAAAGCAGCTGGAAGT-3', R: 5'-GGCCGAGACAAGCCTAAA-3'均由上海英骏生物工程技术服务公司设计并合成。本研究所需 pcDNA3.1-myc-FAM96A 重组质粒由华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系田俊教授惠赠。

1.3 Real-time PCR 检测 FAM96A 基因表达 提

2018-02-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81350006)

作者单位: ¹ 武汉科技大学医学院, 武汉 430081

² 中国人民解放军武汉总医院普通外科, 武汉 430070

³ 华中科技大学同济医学院基础医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430030

作者简介: 孙康, 男, 硕士研究生;

张杨, 男, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: ptwkhero@163.com

蔡逊, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caiwenqian@sina.com

取 60 例结肠癌组织及配对癌旁组织的总 mRNA(参照 TRIzol 试剂盒操作说明书)。按照逆转录试剂盒操作说明书将 mRNA 逆转录成 cDNA, -20°C 低温保存备用。Real-time PCR 总反应体系为 $20\ \mu\text{l}$: $2\times$ SYBR Green mix 缓冲液 $10\ \mu\text{l}$ + 上下游引物各 $0.6\ \mu\text{l}$ (浓度为: $10\ \mu\text{mol/L}$) + cDNA $2\ \mu\text{l}$ + DEPC 水 $6.8\ \mu\text{l}$ 。反应条件为变性、退火及延伸。本实验中, 肝癌组织和细胞所用 FAM96A 和 β -actin 引物、Real-time PCR 总反应体系和设定的反应条件均相同, 由 Real-time PCR 仪自动生成数据。

1.4 Western blot 法检测 FAM96A 蛋白表达 分别称取 $0.08\sim 0.10\ \text{g}$ 结肠癌组织和配对癌旁组织, 提取蛋白并定量。各组取 $120\ \mu\text{g}$ 上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。PVDF 膜转移蛋白, 封闭一抗, 标记二抗, 化学发光法显影检测。

1.5 MTT 法检测 HCT116 细胞活性 取对数生长期细胞接种于 96 孔板, $24\ \text{h}$ 后采用脂质体转染法瞬时转染。分为 FAM96A 组(转染 pcDNA3.1-myc-FAM96A 质粒) 和对照组(转染 pcDNA3.1-vector 空白质粒)。酶标仪检测各孔吸光度(absorbance, A) 值, 绘制细胞生长曲线, 其中横纵坐标分别为时间和 A 值。

1.6 流式细胞仪检测 HCT116 细胞凋亡 将细胞收集后, 按照说明书加 $5\ \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $5\ \mu\text{l}$ PI 混匀, 用流式细胞仪检测并分析细胞凋亡率。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 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, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAM96A 在结肠癌中的表达 Real-time PCR 检测结果显示: FAM96A mRNA 在 60 例新鲜结肠癌组织和癌旁组织中均有表达, 表达量分别为(0.376 ± 0.169)、(1.009 ± 0.248) , 差异有统计学意义($t = 16.328$, $P < 0.05$) , 即 FAM96A mRNA 在结肠癌组织中的表达显著低于癌旁组织。Western blot 检测结果表明: 结肠癌组织及癌旁组织中均可检测到 FAM96A 蛋白表达, 且 FAM96A 在结肠癌组织中的蛋白表达同样低于癌旁组织。见图 1。

2.2 FAM96A 蛋白表达水平与结肠癌临床病理特征之间的关系 FAM96A 蛋白表达差异与本研究 60 例结肠癌患者的浸润深度、淋巴结转移、是否发生远处转移及 TNM 分期之间差异有统计学意义($P < 0.05$) , 与患者性别、年龄、肿瘤大小及分化程度

之间差异无统计学意义($P > 0.05$) 。见表 1。

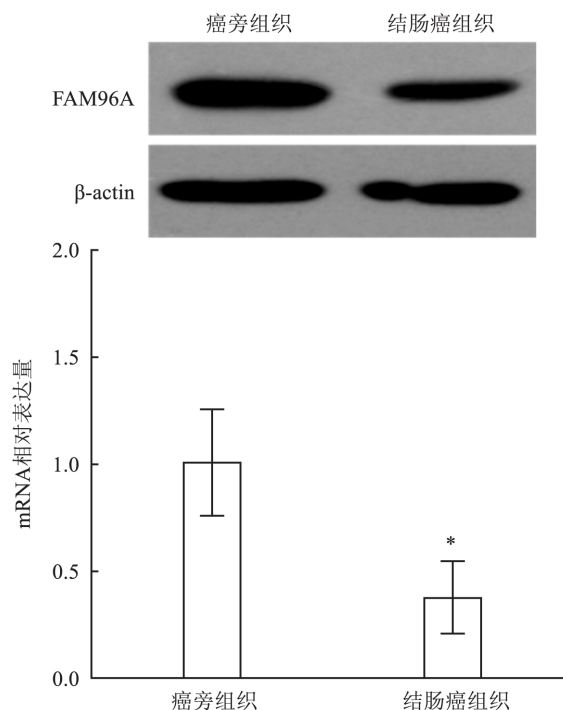


图 1 FAM96A 在结肠癌及癌旁组织中的表达
与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

表 1 FAM96A 蛋白表达量与结肠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	32	0.383 ± 0.182	0.332	0.741
女	28	0.368 ± 0.156		
年龄(岁)				
<60	27	0.400 ± 0.185	0.996	0.323
≥60	33	0.356 ± 0.156		
肿瘤大小(cm)				
<5	26	0.394 ± 0.180	0.729	0.469
≥5	34	0.362 ± 0.161		
分化程度				
高中	29	0.415 ± 0.188	1.770	<0.05
低	31	0.339 ± 0.142		
浸润深度				
未及浆膜	25	0.546 ± 0.093	12.869	<0.05
侵及浆膜	35	0.254 ± 0.082		
淋巴结转移				
阴性	30	0.518 ± 0.107	12.214	<0.05
阳性	30	0.234 ± 0.070		
远处转移				
阴性	50	0.420 ± 0.149	5.497	<0.05
阳性	10	0.157 ± 0.035		
TNM 分期				
I ~ II 期	28	0.530 ± 0.101	12.768	<0.05
III ~ IV 期	32	0.242 ± 0.070		

2.3 MTT 法检测 HCT116 细胞活性 实验结果表明: FAM96A 组 A 值显著低于对照组($P < 0.05$) , 即过表达 FAM96A 可显著抑制 HCT116 细胞增殖, 见图 2。

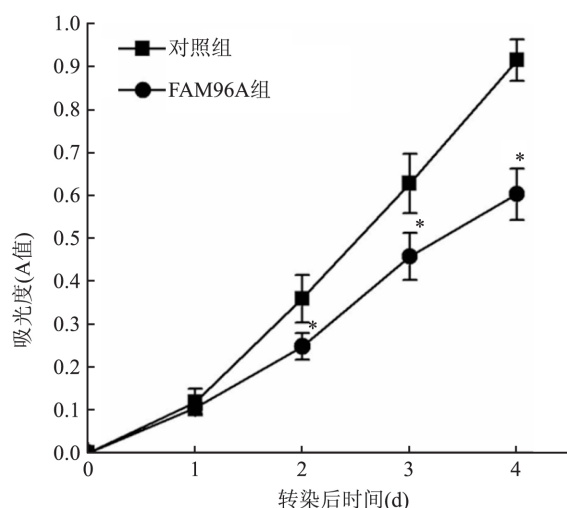


图2 HCT116 细胞生长曲线
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 流式细胞仪检测 HCT116 细胞凋亡率 过表达 FAM96A 组的细胞凋亡率显著高于对照组 [(38.44 ± 3.38) % vs (4.16 ± 0.56) % , $t = 30.015$, $P < 0.05$] , 即过表达 FAM96A 可诱导 HCT116 细胞凋亡。见图 3。

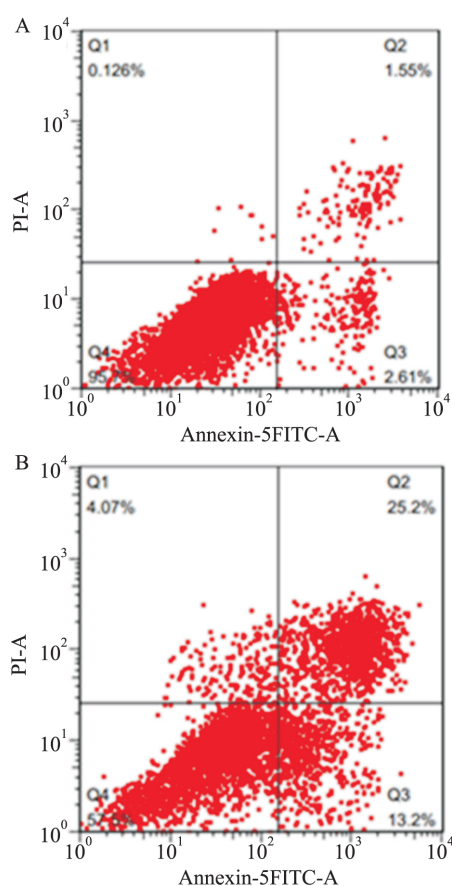


图3 过表达 FAM96A 对 HCT116 细胞凋亡的影响
A: 对照组; B: FAM96A 组

3 讨论

FAM96A 与 FAM96B 属同源蛋白,均含有 DUF59 结构域,具有 50% 的序列同一性,不同的是 FAM96A 具有预测的信号序列而 FAM96B 没有,均为分子量 18 ku 的小分子蛋白,均通过相互作用蛋白发挥功能,具体机制不明确。研究^[3]表明 FAM96A 与 CIA2A 组成蛋白复合物 CIA2A-FAM96A 维持细胞铁稳态。目前国内外研究^[4-6]显示: FAM96B 在结肠癌组织中低表达且抑制结肠癌细胞 HCT-116 增殖并促进凋亡,然而关于 FAM96A 在结肠癌中的功能研究报道甚少。因此,本研究旨在探索 FAM96A 在结肠癌组织中的表达差异及细胞生物学功能,以期对结肠癌诊断和治疗提供新的靶点和思路。

分析基因与肿瘤关系的基础是观察肿瘤组织及配对癌旁正常组织的差异性表达,异常表达的基因可认为是潜在的新一类控制细胞增殖和凋亡的癌基因或抑癌基因,并在肿瘤的发生发展中发挥关键作用^[7]。本研究中收集 60 例结肠癌组织及相应配对癌旁组织标本,分别采用 Real-time PCR 和 Western blot 技术检测 FAM96A 在基因和蛋白水平的表达差异。检测结果表明: FAM96A 在结肠癌组织中的基因和蛋白表达水平均显著低于癌旁组织。由此可见, FAM96A 在结肠癌发生发展过程中具有抑癌基因特性,抑制结肠癌的发生发展。Schwamb et al^[2]认为 FAM96A 作为新的抑癌基因,在胃肠道间质瘤发生发展中发挥重要的肿瘤抑制作用。本实验结果与其研究结论基本一致。

目前结肠癌在我国的发生率和死亡率呈逐年上升趋势,严重威胁人类健康与生命财产安全^[8]。导致结肠癌低生存率的关键因素在于肿瘤的侵袭和转移^[9],其中肝脏转移是最常见的远处转移^[10]。因此,如能阻断结肠癌转移途径,则能大大提高结肠癌患者的生存率。本研究通过对 FAM96A 蛋白表达与结肠癌临床病理特征之间的相关性进行分析,得出 FAM96A 在结肠癌组织中低表达,与结肠癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关。提示 FAM96A 可能是一个与结肠癌浸润、转移相关的分子指标,在结肠癌发展、浸润及转移中起到关键的抑制作用。

为进一步明确 FAM96A 在结肠癌发生发展中的功能,本研究采用脂质体瞬时转染法将 FAM96A 质粒转染至结肠癌细胞系 HCT116 细胞中,观察

FAM96A 基因过表达对结肠癌细胞生物学功能的影响。Schwamb et al^[2]报道 FAM96A 是胞质铁硫蛋白簇聚集系统成员之一,在调节铁稳态方面起到关键作用。通过线粒体凋亡途径对间质瘤发挥促凋亡作用。过表达 FAM96A 可增强间质瘤细胞 GIST882 凋亡敏感性,并在体内和体外抑制肿瘤生长, FAM96A 低表达或表达沉默将导致间质瘤的发生。同时, Ito et al^[4]报道 FAM96B 与 MMS19、Ciao 1、XPD 等组成蛋白复合物 MMXD,定位于纺锤体,在有丝分裂染色体正常分离中发挥关键作用, FAM96B 基因沉默可导致结肠癌细胞系 HCT116 细胞不能正常有丝分裂,异型细胞核堆积,细胞凋亡,是癌症潜在的诊断和治疗靶点。本研究中 MTT 及流式细胞仪检测结果提示:过表达 FAM96A 可抑制结肠癌细胞系 HCT116 细胞增殖,并显著诱导其凋亡。证实 FAM96A 促进结肠癌细胞系 HCT116 凋亡,但具体作用机制尚待进一步阐明,与国外文献报道基本一致。

参考文献

- [1] Provenzale D, Jaspersen K, Ahnen D J, et al. Colorectal cancer screening, version 1. 2015 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2015, 13(8): 959–68.
- [2] Schwamb B, Pick R, Fernandez S B, et al. FAM96A is a novel pro-apoptotic tumor suppressor in gastrointestinal stromal tumors [J]. Int J Cancer, 2015, 137(6): 1318–29.
- [3] Stehling O, Mascarenhas J, Vashisht A A, et al. Human CIA2A–FAM96A and CIA2B–FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins [J]. Cell Metal, 2013, 18(2): 187–98.
- [4] Ito S, Tan L J, Andoh D, et al. MMXD, a TFIIF-independent XPD–MMS19 protein complex involved in chromosome segregation [J]. Mol Cell, 2010, 39(4): 632–40.
- [5] 蔡 逊, 马丹丹, 田 俊, 等. FAM96B 基因在结肠癌组织中低表达且抑制癌细胞增殖并诱导其凋亡 [J]. 华中科技大学学报(医学版) 2016, 45(2): 132–5.
- [6] 蔡 逊, 马丹丹, 张智勇, 等. 96 序列相似的家庭成员 B 基因在结肠癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志 2016, 33(3): 567–70.
- [7] Si M L, Zhu S, Wu H, et al. MiR-21-mediated tumor growth [J]. Oncogene, 2007, 26(19): 2799–803.
- [8] Kin B N, Yamamoto H, Ikeda K, et al. Methylation and expression of P16NK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues [J]. Int J Oncol, 2005, 26(5): 1217–26.
- [9] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74–108.
- [10] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57–70.

Expression differences of FAM96A in colon cancer tissues and its effect on proliferation and apoptosis of colon cancer cells

Sun Kang¹, Zhong Lanhai², Zhang Yang², et al

(¹Wuhan University of Science and Technology Medical School, Wuhan 430081;

²Dept of General Surgery, Wuhan General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070)

Abstract Objective To investigate the expression of family with sequence similarity 96, member A (FAM96A) in 60 cases of colon cancer tissues and explore the correlation between FAM96A expression differences and clinical biological characteristics of colon cancer, then to evaluate the proliferation and apoptosis effect of FAM96A overexpression on human colon carcinoma cell line HCT116. **Methods** Real-time PCR and Western blot were employed to detect FAM96A expression in 60 cases of colon cancer tissues and its adjacent normal tissues. In addition, the correlation between FAM96A expression levels and clinicopathological characteristics of colon cancer was analyzed. Moreover, the recombinant plasmid of pcDNA3.1-myc-FAM96A containing the whole sequence of human FAM96A gene was constructed and transfected into HCT116 cells. MTT assay was used to evaluate the proliferation of transfected cells, and apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** Real-time PCR results confirmed that FAM96A mRNA expression levels was markedly decreased in tumor tissues than that in adjacent normal tissues in the 60 cases colon cancer ($t = 16.328$, $P < 0.05$), in line with qPCR results, Western blot results showed that FAM96A protein expression levels was significantly decreased in colon cancer tissues than in the adjacent normal tissues ($P < 0.05$). And the FAM96A protein expression was tightly correlated with depth of infiltration, lymph nodes metastasis, distant metastasis and TNM stage ($P < 0.05$), but not with gender, age, tumor size and his-

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.014.html>

miR-30b-5p 抑制胆固醇合成和结直肠癌细胞增殖

张亚珍¹, 何贵省¹, 吴晓明¹, 宋杰峰², 吴煌福¹

摘要 目的 探索 miR-30b-5p 在结直肠癌中的作用及机制。方法 收集结直肠癌患者的癌及癌旁组织、患者及正常人血清, 提取 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-30b-5p 表达。将 miR-30b-5p 的 inhibitors 转入 HT-29 细胞中; 将 miR-30b-5p 的 mimics 转入 HCT-116 细胞中; CCK-8 试剂盒检测细胞活力; 胆固醇试剂盒检测细胞中胆固醇含量; 实时荧光定量 PCR 检测低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的表达, Western blot 检测 LDLR 蛋白表达; 在转入 miR-30b-5p inhibitors 的 HT-29 细胞中应用 siRNA 敲低 LDLR, 检测 LDLR 蛋白表达、细胞胆固醇含量及细胞增殖。结果 与正常人相比, miR-30b-5p 在结直肠癌患者组织及血清中表达降低, 且其在结直肠癌细胞系 HT-29、Caco-2 及 HCT-116 中的表达量低于正常结直肠细胞系 NCM460; 在 HT-29 细胞中转入 miR-30b-5p 的 inhibitors, 细胞增殖加快, 胆固醇含量增加, LDLR 表达上调; 在 HCT-116 细胞中转入 miR-30b-5p 的 mimics, 细胞增殖减慢, 胆固醇降低, LDLR 表达被抑制; 此外, 在 miR-30b-5p 沉默的 HT-29 细胞中敲低 LDLR, 胆固醇含量减少, 细胞增殖减慢。结论 miR-30b-5p 在结直肠癌中是一种抑癌 microRNA, 它通过抑制 LDLR 和胆固醇合成抑制结直肠癌细胞增殖。

关键词 结直肠癌; miR-30b-5p; LDLR; 胆固醇; 增殖

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1057-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.014

2018-04-16 接收

基金项目: 海南省卫生厅科研立项课题(编号: 琼卫 2011-73); 海南省科学技术厅重点研发计划(编号: ZDYF2017087)

作者单位: 海南医学院第二附属医院¹ 肿瘤外科、² 放射科, 海口 570311

作者简介: 张亚珍, 女, 主治医师;

吴煌福, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wu-huangfu2017@sina.com

结直肠癌是最常见和致死率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。研究^[3-4]显示 microRNA 在结直肠癌中扮演着抑癌或致癌作用。胆固醇代谢在近年来受到了广泛关注, 它对结直肠癌的发生发展十分关键^[5]。低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 是调节胆固醇代谢的重要分子, 在肿瘤中的作用也被广泛报道^[6-7]。该研究首先检测结直肠癌组织及患者血清中 miR-30b-5p 的表达量, 通过过表达或敲低 miR-30b-5p 判定其在结直肠癌中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 结直肠癌细胞系 Caco-2、HT-29 及 HCT-116 均购自 ATCC (American Type Culture Collection); 人正常结肠上皮细胞 NCM460 购自上海盖宁生物公司。12 对结直肠癌组织和癌旁组织及 11 个结直肠癌患者血液样本和正常人血液样本均来自于海南医学院第二附属医院, 并获得知情同意书。

1.1.2 试剂 Cholesteryl Ester Quantitation 试剂盒、 β -actin 抗体 (英国 Abcam 公司); LDLR 抗体 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基及胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); TRIzol、LipofectamineTM 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); ReverTra Ace qPCR RT Kit (日本 TOYOBO 公司); TransStart SYBR Green qPCR SuperMix (中国全式金公司); RNA 酶抑制剂和 RNA 酶 free water (美国 Promega 公司)。

1.1.3 RNA 试剂 miR-30b-5p mimics 和 mimics

topathological differentiation ($P > 0.05$)。The MTT assay showed that the A value in FAM96A overexpression group was significantly lower than in control group ($P < 0.05$)。FACS analysis indicated that the cell apoptotic rate was increased in FAM96A group than that in the control group ($t = 30.015$, $P < 0.05$)。 **Conclusion** The FAM96A expression is significantly decreased in colon cancer tissues in comparison with its adjacent normal tissues. Additionally, FAM96A may be a good marker to evaluate the development, invasion and metastasis of colon cancer. Overexpression of FAM96A can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HCT116 cells.

Key words family with sequence similarity 96, member A (FAM96A); colon cancer; proliferation; apoptosis