

# FAM96A 在人肝癌组织中的表达 及其与临床病理特征的关系

廖宇圣<sup>1</sup>, 张 姮<sup>1</sup>, 黄曼玲<sup>1</sup>, 田 俊<sup>2</sup>

**摘要** 目的 检测 96 序列相似的家庭成员 A (FAM96A) 在人肝癌组织中的表达及其与肝癌生物学特征的关系。方法

采用实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time PCR) 及 Western blot 法检测 FAM96A 蛋白在肝癌组织和癌旁组织、HepG2 细胞和 L02 细胞中的 mRNA 及蛋白表达量, 比较其差异, 并分析 FAM96A 蛋白表达差异与肝癌临床病理特征之间的关系。结果 Real-time PCR 检测结果显示, FAM96A 在肝癌组织中的 mRNA 表达低于癌旁组织 ( $t = 21.773, P < 0.001$ ), 在 HepG2 细胞中的表达低于 L02 细胞 ( $t = 26.153, P < 0.001$ )。同时, Western blot 检测结果证实: 与癌旁组织相比, FAM96A 在肝癌组织中的蛋白表达显著降低 ( $t = 15.582, P < 0.001$ ), 在 HepG2 细胞中的表达同样低于 L02 细胞 ( $t = 14.478, P < 0.001$ )。且 FAM96A 蛋白表达差异与本研究 48 例肝癌患者肿瘤大小、是否合并门静脉癌栓、是否发生肝外转移、Child 分级、巴塞罗那肝癌分期之间存在相关性 ( $P < 0.001$ )。然而与患者的性别、年龄、肿瘤个数、是否合并乙肝、是否合并肝硬化、血清甲胎蛋白无明显相关 ( $P > 0.05$ )。结论 FAM96A 在人肝癌组织中表达显著下降, 其表达水平与肝癌的发生发展、侵袭转移密切相关。

**关键词** 96 序列相似的家庭成员 A; 肝癌; 表达; 侵袭转移;

临床意义

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0630-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.028

96 序列相似的家庭成员 A (family with sequence similarity 96, member A, FAM96A) 是普遍存在、高度保守、与凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1) 相互作用的促肿瘤细胞凋亡的抑癌基因, 功能未知<sup>[1]</sup>。关于 FAM96A 在肝癌发生发展中功能未见报道。因此, 本研究旨在通过检测肝癌组织和细胞中 FAM96A 表达, 并统计分析 FAM96A 在肝癌组织和配对癌旁组织中的表达差异与肝癌临床病理特征及预后的关系, 初步探讨 FAM96A 在肝癌中的临床意义。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 在通过华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院医学伦理委员会批准并获得患者本人及家属同意的情况下, 本次研究选择本院 2015 年 1 月~2016 年 12 月收治的 48 例肝癌患者为研究对象。肝癌组织标本和距肿瘤边缘 > 2 cm 处癌旁组织标本均置于 -80 °C 保存备用。

**1.2 主要试剂** FAM96A、 $\beta$ -actin 一抗及二抗均购自英国 Abcam 公司; RNA 提取、逆转录及 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 总蛋白抽提试剂盒、电化学发光试剂盒均购自美

2018-01-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81350006)

作者单位: <sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院消化内科, 武汉 430014

<sup>2</sup> 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: 廖宇圣, 男, 副主任医师, 硕士;

张 姮, 女, 主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: 653262549@qq.com

and WC + BP showed higher diagnostic weighting (area under the curve or AUC value) than other combinations of risk factors for MS ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Parents suffering from MS their children suffering from increased risk of MS, the sick father of their children affected more than the sick mother. Individuals with simultaneous abnormalities of any two of WC, BP and TG may be considered as high-risk individuals for MS. Accordingly, we propose for the first time a concept of "pre-warning status of MS", which may serve as a strategy to screen high-risk individuals for MS.

**Key words** metabolic syndrome; obesity; Xinjiang; rural communities; Uyghur ethnicity; familial aggregation

国 Invitrogen 公司; 细胞培养基、胎牛血清、胰酶均购自日本 Sigma 公司。

### 1.3 Real-time PCR 法检测 FAM96A mRNA 表达

提取组织标本和细胞中的总 mRNA, 取 4  $\mu\text{g}$  mRNA 按照逆转录试剂盒的使用说明合成 cDNA, 逆转录获取的 cDNA 置  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用, 其余 RNA 置  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。Real-time PCR 总反应体系 20  $\mu\text{l}$ : SYBR Green 10  $\mu\text{l}$ , 上下游引物浓各 0.6  $\mu\text{l}$  (浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ ), cDNA 2  $\mu\text{l}$ , DEPC (diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯) 水补齐至 20  $\mu\text{l}$ 。反应条件为变性、退火及延伸, 设定 35 个循环。本实验中, 肝癌组织和细胞所用 FAM96A 和  $\beta$ -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。引物序列如下。FAM96A F: 5'-GCAAAGCACGCTGGAAGT-3', R: 5'-GGCCGAGACAAGCCTAAA-3';  $\beta$ -actin F: 5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3', R: 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'。

**1.4 Western blot 法检测 FAM96A 蛋白表达** 分别称取 0.08 g 肝癌组织和癌旁组织, 待细胞生长至 80% ~ 90% 汇片时收集细胞, 提取蛋白并定量。各组取 120  $\mu\text{g}$  蛋白样品上样于浓度为 5% 的浓缩胶和 15% 的分离胶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳条件设定为: 浓缩胶 80 V, 分离胶 100 V。PVDF 膜转移蛋白, 封闭一抗, 标记二抗, 电化学发光法显影。

**1.5 统计学处理** 所有的数据均通过 SPSS 18.0 软件完成统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间

数据比较采用独立样本 t 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 FAM96A 在组织中的表达** Real-time PCR 检测结果显示, FAM96A 在肝癌组织中的 mRNA 表达低于癌旁组织 ( $0.447 \pm 0.117$  vs  $1.526 \pm 0.323$ ,  $t = 21.773$ ,  $P < 0.001$ )。Western blot 检测结果显示: 与癌旁组织比较, FAM96A 在肝癌组织中的蛋白表达显著降低 ( $0.701 \pm 0.207$  vs  $1.452 \pm 0.262$ ,  $t = 15.582$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 2。

**2.2 FAM96A 在细胞中的表达** 与 L02 细胞相比, FAM96A 在 HepG2 细胞中 mRNA 表达显著降低 ( $0.500 \pm 0.111$  vs  $1.654 \pm 0.285$ ,  $t = 26.153$ ,  $P < 0.001$ ), FAM96A 在 HepG2 细胞中蛋白表达同样降低 ( $0.612 \pm 0.245$  vs  $1.375 \pm 0.271$ ,  $t = 14.478$ ,  $P < 0.001$ )。

**2.3 FAM96A 蛋白表达水平与肝癌临床病理特征之间的关系** FAM96A 蛋白表达差异与本研究中 48 例肝癌患者肿瘤大小、是否合并门静脉癌栓、是否发生肝外转移、Child 分级、巴塞罗那肝癌分期 (Barcelona clinical liver cancer staging system, BCLC) 之间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 然而与患者的性别、年龄、肿瘤个数、是否合并乙肝、是否合并肝硬化、血清甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

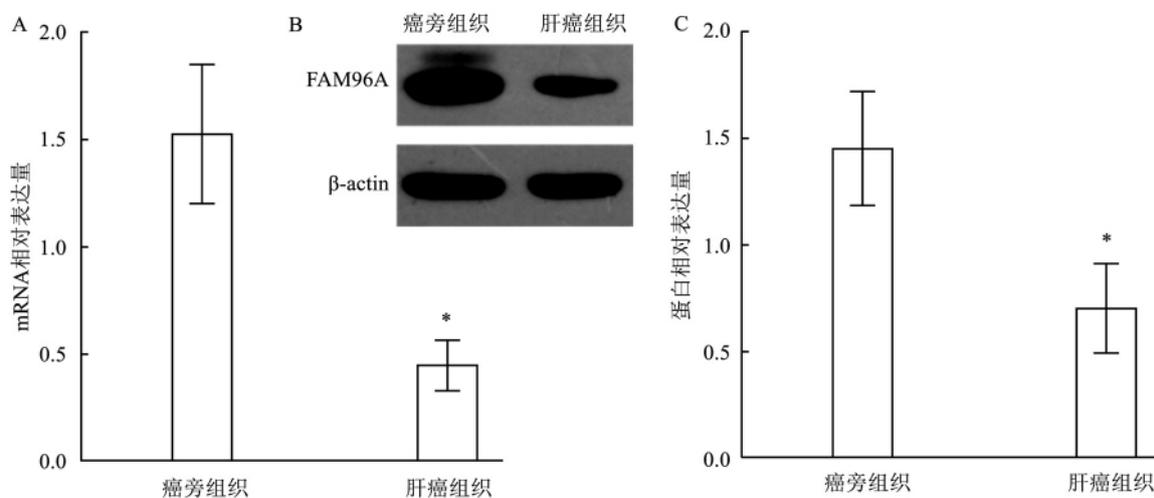


图1 肝癌组织及癌旁组织中 FAM96A 的 mRNA 和蛋白表达

A: mRNA 表达; B: 蛋白表达; 与癌旁组织比较: \*  $P < 0.05$

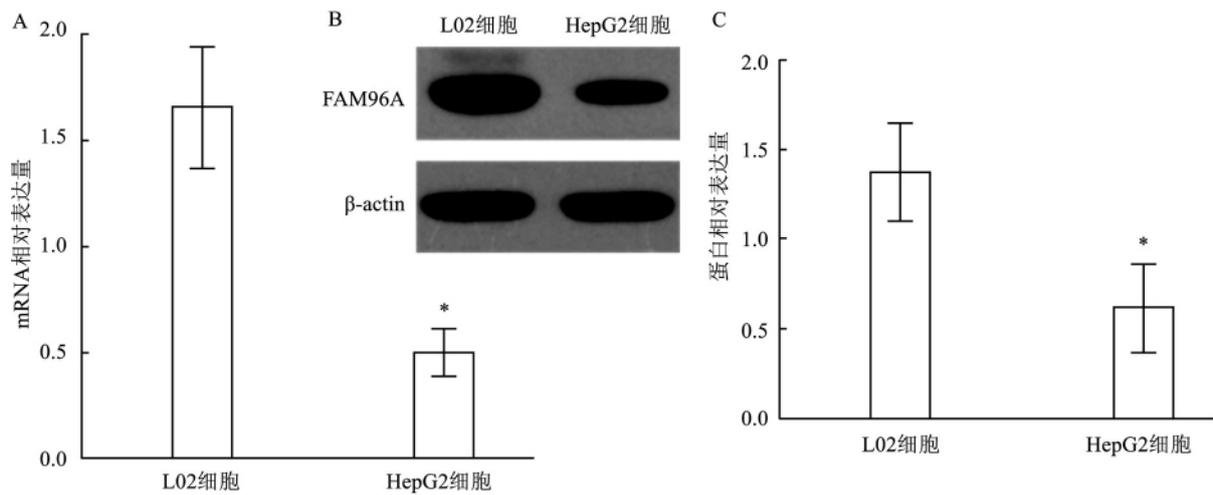


图2 HepG2 细胞和 L02 细胞中 FAM96A 的 mRNA 和蛋白表达

A: mRNA 表达; B: 蛋白表达; 与癌旁组织比较: \*  $P < 0.05$

表1 FAM96A 蛋白表达差异与肝癌临床病理特征之间的相关性 ( $\bar{x} \pm s$ )

临床病理特征	例数	表达量	t 值	P 值
性别				
男	34	0.617 ± 0.234	0.323	0.748
女	14	0.591 ± 0.287		
年龄(岁)				
≤50	30	0.613 ± 0.243	0.035	0.972
>50	18	0.610 ± 0.256		
肿瘤大小(cm)				
≤5	18	0.853 ± 0.181	8.190	0.000
>5	30	0.467 ± 0.143		
肿瘤数目				
单发	31	0.605 ± 0.211	-0.879	0.384
多发	17	0.614 ± 0.316		
乙肝				
阳性	41	0.618 ± 0.253	0.402	0.689
阴性	7	0.577 ± 0.201		
肝硬化				
有	38	0.605 ± 0.240	-0.461	0.647
无	10	0.645 ± 0.275		
血清 AFP(ng/ml)				
≤20	15	0.681 ± 0.233	1.320	0.193
>20	33	0.581 ± 0.247		
门静脉癌栓				
有	13	0.328 ± 0.070	-6.934	0.000
无	35	0.717 ± 0.197		
肝外转移				
阳性	8	0.281 ± 0.034	-5.225	0.000
阴性	40	0.678 ± 0.212		
Child 分级				
A	39	0.686 ± 0.208	5.655	0.000
B	9	0.289 ± 0.040		
BCLC 分期				
A	28	0.772 ± 0.182	8.529	0.000
B + C	20	0.388 ± 0.101		

### 3 讨论

原发性肝细胞性肝癌(primary carcinoma, HCC)简称肝癌,是恶性程度极高、预后极差的较为常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康与生命财产安全<sup>[2]</sup>。最新流行病学资料显示,我国肝癌的发病率位列世界第一,死亡率在癌症相关死因中排列第四,5年生存率仅为10%,复发和转移是导致生存率低的主要原因。一般认为肝癌的发生与乙型肝炎病毒感染和黄曲霉毒素摄入有关,但机制不明<sup>[3-4]</sup>。因此,深入研究肝癌发生机制对于肝癌预后具有重大临床意义。

研究表明 HCC 的发生发展是包括病毒或化学物质的作用导致癌基因激活和/或抑癌基因失活在内的多阶段多步骤过程<sup>[5]</sup>。FAM96A 与 FAM96B 属于同源蛋白,均通过相互作用蛋白发挥功能,具体机制不明确。目前国内外对 FAM96B 的功能研究已取得突破性进展,研究结果证实 FAM96B 与甲基磺酸敏感性基因 19、着色性干皮病基因 D 组成蛋白复合物发挥功能。在人肝癌、结肠癌组织中低表达,参与肿瘤的发生发展,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 基因沉默可导致肿瘤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<sup>[6-9]</sup>。但国内外关于 FAM96A 的研究报道却很少,最新研究<sup>[1]</sup>表明, FAM96A 与 CIA2A 组成蛋白复合物 CIA2A-FAM96A 维持细胞铁稳态。目前未见 FAM96A 在人肝癌中的功能研究报道。因此,本研

究旨在探索 FAM96A 在肝癌组织中的表达差异及临床意义,以期为肝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,异常表达的基因被认为是潜在的新的调控细胞增殖与凋亡的癌基因和/或抑癌基因,极有可能在肿瘤的恶性进展中扮演重要角色<sup>[10]</sup>。本研究团队分别采用 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:与癌旁组织比较,FAM96A 在肝癌组织中的蛋白和 mRNA 表达均显著降低,同时,与人正常胎肝细胞系 L02 相比,FAM96A 在人肝癌细胞系 HepG2 中的蛋白和 mRNA 表达均明显降低。本研究分别从人体组织标本及人肝癌细胞系两方面证实 FAM96A 在肝癌发生发展中发挥一定作用。FAM96A 可能是一种潜在抑癌基因直接或间接抑制肝癌和其他肿瘤的发生发展。Zhang et al<sup>[11]</sup>通过建立 H22 荷瘤裸鼠模型探索外源性 FAM96A 在动物体内对肿瘤的作用,研究结果证实 FAM96A 抑制裸鼠肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡、降低死亡率。Schwamb et al<sup>[12]</sup>报道 FAM96A 与凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic peptidase activating factor 1, APAF1) 相互作用,通过线粒体凋亡途径对间质瘤发挥促凋亡作用。过表达 FAM96A 可促进间质瘤细胞系 GIST882 凋亡,并在体内和体外抑制间质瘤生长。FAM96A 低表达或基因沉默将导致间质瘤的发生。本研究结果与国外文献报道基本一致。

笔者通过统计分析 FAM96A 蛋白表达差异与肝癌临床病理特征之间的相关性得出:FAM96A 蛋白在肝癌组织与癌旁组织中的蛋白表达差异与 48 例肝癌患者的性别、年龄、肿瘤个数、是否合并乙肝、肝硬化、AFP 无明显相关。目前,肝癌筛查、早期诊断、预后评价较为实用的诊断方法是血清 AFP 检测。但并非所有肝癌细胞都分泌 AFP,且部分患者 AFP 值并不升高。因此 AFP 用来诊断肝癌容易造成漏诊<sup>[13]</sup>。本研究结果中 FAM96A 在肝癌组织中的表达与 AFP 无关,即 FAM96A 有可能成为不依赖 AFP 的肝癌标记物。肿瘤细胞与正常细胞区别的重要生物学特征是肿瘤细胞会无限侵袭和转移,肿瘤细胞脱离原发灶,侵犯周围组织、血管及淋巴管,进入循环系统并向远处组织侵袭扩散形成新的转移

灶,转移灶在血供充分的情况下即增殖形成转移瘤<sup>[14-15]</sup>。本研究结果显示 FAM96A 在肝癌组织中低表达与与肿瘤大小、门静脉癌栓、远处转移、Child 分级、BCLC 分期密切相关。本研究结果有力地证实 FAM96A 可能是一个与肝癌恶性进展相关的分子生物学标志物,极有可能在肝癌恶性进展中起到直接或间接的抑制作用。

综上所述,笔者从新鲜肝癌组织标本、肝癌细胞株等方面对 FAM96A 的功能进行研究,发现 FAM96A 可能是一种新的抑癌基因,在肝癌恶性进展中发挥关键作用。提示 FAM96A 可能成为一个新的肝癌生物学标志物,为寻找肝癌基因靶点提供有利证据。本研究虽然对 FAM96A 在肝癌发生发展中的功能研究取得了初步进展,但仍有许多未知领域需要科研工作者不断探索,如:FAM96A 在除肝癌外的其他肿瘤组织中的表达差异,FAM96A 过表达或基因沉默对肿瘤细胞增殖凋亡和侵袭转移等生物学功能、细胞有丝分裂的影响及机制,外源性 FAM96A 对裸鼠移植瘤生长抑制、凋亡和转移的影响等。相信随着不断探索与创新,FAM96A 的细胞生物学功能研究将得到突破性进展,FAM96A 抑制肿瘤细胞恶性进展的作用将被裸鼠移植瘤模型的体内实验所证实,为进一步的临床应用提供可靠数据。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [4] Altekruse S F, McGlynn K A, Reichman M E. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(9): 1485-91.
- [5] Sakai T, Sowa Y. Molecular-targeting therapies against quantitative abnormalities in gene expression with malignant tumors[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(4): 570-3.
- [6] 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.

- [7] Yang W, Itoh F, Ohya H, et al. Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2 [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(10): 1808-14.
- [8] 张智勇, 蔡 逊, 马丹丹, 等. 96 序列相似的家庭成员 B 在肝癌中的表达变化及功能研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(7): 1489-91.
- [9] 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.
- [10] Si M L, Zhu S, Wu H, et al. MiR-21 mediated tumor growth [J]. *Oncogene*, 2007, 26(19): 2799-803.
- [11] Zhang M Y, Wang J P. A multi-target protein of hTERTR-FAM96A presents significant anticancer potent in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(4): 1-10.
- [12] 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.
- [13] Braillon A. Is the American Association for the Study of Liver Diseases recommendation for hepatocellular carcinoma screening a *cul-de-sac*? [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(21): 3369-70.
- [14] Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 453-8.
- [15] Kitamura T, Taketo M M. Keeping out the bad guys: gateway to cellular target therapy [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10099-102.

## Expression of FAM96A in human liver cancer tissues and its correlation with clinicopathological characteristics

Liao Yusheng, Zhang Heng, Huang Manling, et al

(Dept of Gastroenterology, The Central Hospital of Wuhan, Tong Ji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

**Abstract Objective** To investigate the expression difference of family with sequence similarity 96, member A (FAM96A) in 48 cases of liver cancer and explore the relation between FAM96A expression and clinicopathological characteristics of liver cancer. **Methods** Real-time PCR and Western blot were used to examine the expression and distribution of FAM96A in liver cancer tissues and their adjacent tissues, HepG2 cells and L02 cells. Furthermore, the correlation between the expression difference of FAM96A and clinicopathological characteristics of liver cancer was analyzed. **Results** FAM96A mRNA levels was significantly decreased in liver tissues than in adjacent tissues ( $t = 21.773$ ,  $P < 0.001$ ) and in HepG2 cells and L02 cells ( $t = 26.153$ ,  $P < 0.001$ ), while FAM96A protein expression levels was lower in liver tissues compared with adjacent tissues ( $t = 15.582$ ,  $P < 0.001$ ) and lower in HepG2 cells and in L02 cells ( $t = 14.478$ ,  $P < 0.001$ ). Moreover, the expression difference was correlated with tumor size, portal vein tumor thrombosis, Child-Turcotte-Pugh, extrahepatic metastasis, Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) classification ( $P < 0.001$ ), but not with gender, age, tumor number, hepatitis B virus, cirrhosis of the liver and serum AFP of patients. **Conclusion** The FAM96A protein expression is significantly decreased in 48 cases of liver cancer tissues than in adjacent normal tissues. In addition, FAM96A may be a good biomarker to evaluate the development, invasion and metastasis of liver cancer.

**Key words** family with sequence similarity 96, member A (FAM96A); liver cancer; expression; invasion and metastasis; clinical significance