网络出版时间:2018 - 3 - 16 9:32 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.007.html

FAM96B 在胃癌组织中的表达及其对胃癌细胞增殖凋亡和侵袭转移的影响

叶家欣[1],王世杰[1],马丹丹[1],蔡 逊[1],张智勇[1],张建新[1],田 俊[2]

摘要 目的 观察 96 序列相似的家庭成员 B(FAM96B)在 80 例胃癌组织中的表达,分析表达差异与胃癌生物学特征的关系,并探讨 FAM96B 对胃癌细胞系 SGC7901 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 采用 Western blot 法检测 FAM96B 蛋白在 80 例胃癌组织及配对癌旁组织中的表达,并统计分析 FAM96B 蛋白表达差异与胃癌临床病理特征之间的相关性。采用脂质体转染法将含人 FAM96B 全长序列的 pcDNA3.1-myc-FAM96B 重组质粒转染至 SGC7901 细胞中,分别采用 MTT 法及流式细胞术检测 FAM96B 过表达对 SGC7901 增殖和凋亡的影响。**结果** Western blot 结果显示 FAM96B 在癌旁组织中的蛋白表达水平显著高于胃癌组织($t=25.218$, $P<0.05$)。胃癌组织中 FAM96B 表达水平与胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关($P<0.05$),然而与患者性别、年龄、肿瘤大小无关。MTT 细胞实验结果表明:FAM96B 组吸光度值显著低于对照组($P<0.05$)。细胞凋亡检测结果示:过表达 FAM96B 组的细胞凋亡率高于对照组($t=85.585$, $P<0.05$)。**结论** FAM96B 在人胃癌组织中表达显著下降,其表达水平与胃癌的发生发展、侵袭转移有密切相关。过表达 FAM96B 可抑制胃癌细胞增殖且诱导其凋亡。

关键词 96 序列相似的家庭成员 B;胃癌;表达;增殖;凋亡;侵袭转移

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2018)03 - 0364 - 04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.03.007

胃癌的形成和转移涉及到癌基因的激活、抑癌基因的失活及由此引起的各种细胞生物学行为的改变[1-2]。96 序列相似的家庭成员 B(family with sequence similarity 96, member B, FAM96B)是分子量为 18×10^3 的小分子蛋白,其生物学功能尚不明确[3]。目前研究[4-5]显示,FAM96B 作为潜在抑癌基因参与肿瘤的发生发展、侵袭转移及血管形成。FAM96B 在人肝癌、结肠癌组织中低表达,成为癌症潜在的诊断和治疗靶点[6-9]。但是 FAM96B 在胃癌发生发展中的功能尚未见报道。该研究旨在观察

2017 - 11 - 17 接收

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2012FFB06805);国家自然科学基金(编号:81350006)

作者单位:[1]中国人民解放军武汉总医院普通外科,武汉 430070

[2]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:叶家欣,男,主治医师,硕士研究生;

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

cancer tissues and cells, to evaluate its significance for hypoxia tolerance in lung cancer and to explore its mechanism of apoptosis of lung cancer. ***Methods*** Data of 20 patients with hypoxic lung cancer and normoxia lung cancer tissue microarray were downloaded through the GEO database, GCBI was used to screen the differential genes for GO and KEGG pathway analysis. *In vitro* culture of A549 cells was cultured and transfected with siGEB1 for knock down or GBE1 for overexpression. After hypoxia treatment, cell viability was analyzed using MTT assay. Western blot and real-time PCR were used to detect the expression of apoptosis-related genes. ***Results*** The data from 20 cases of lung cancer specimens showed that 206 genes displayed differences, and the GBE1 was the most significant, GO and KEGG pathway analysis found that the differential gene involved in cell cycle, cell metabolism and other multiple access. The expression of GBE1 in A549 cells after hypoxia treatment was significantly increased, and GBE1 could significantly enhance the expression of apoptosis-related genes in A549 cells after hypoxia treatment. Over-expression of GBE1 could inhibit the expression of apoptosis-related genes. ***Conclusion*** GBE1 may be a potential marker of hypoxia tolerance in lung cancer, this study provide a reference for further study of hypoxia tolerance mechanism of lung cancer.

Key words lung cancer; hypoxia; GBE1; gene chip

FAM96B 在 80 例胃癌组织中的表达水平，分析其表达差异与临床病理特征的关系，并探讨其对胃癌细胞系 SGC7901 细胞增殖、凋亡及侵袭转移的影响。

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 月的 80 例人胃癌组织及配对癌旁组织标本，均置入液氮中保存备用。

1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒及总蛋白抽提试剂盒购自北京 Tiangen 公司；DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶及 MTT 均购自日本 Sigma 公司；FAM96B 及 β-actin 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司；RNA 提取、逆转录试剂盒及细胞转染试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司；细胞凋亡及周期检测试剂盒购自南京凯基生物公司；人胃癌细胞系 SGC7901 与 pcDNA3.1-myc-FAM96B 质粒保存于本院中心实验室。

1.3 Western blot 检测 FAM96B 蛋白表达 全蛋白提取液提取蛋白，Bradford 法蛋白定量。SDS-PAGE 电泳分离。PVDF 膜转移蛋白电化学发光法显影检测。

1.4 MTT 法检测 SGC7901 细胞活性 取对数生长期的 SGC7901 细胞接种于 96 孔板，每孔约 100 μl，24 h 后转染，分为 FAM96B 组和对照组。DMEM 培养基培养 1～4 d，每孔加 MTT 和 DMSO 溶液，酶标仪检测各孔吸光度值，绘制细胞生长曲线。

1.5 流式细胞仪检测 SGC7901 细胞凋亡 将细胞收集后，按照说明书加 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混匀，用流式细胞仪检测异硫氰基荧光素，利用 CellQuest 软件获取并分析细胞凋亡率。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析，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 Western blot 检测结果 FAM96B 蛋白在 80 例新鲜癌旁组织和胃癌组织中的表达量分别为 (1.71±0.29) *vs* (0.28±0.08)，差异有统计学意义 ($t=25.218$, $P<0.05$)。FAM96B 蛋白在癌旁组织中的表达显著高于胃癌组织。见图 1。

2.2 FAM96B 蛋白表达水平与胃癌临床病理特征之间的关系 FAM96B 蛋白在胃癌组织中的表达量以胃癌组织 FAM96B 条带的灰度值与对应的 β-actin 的灰度值之比来表示。通过统计分析得：FAM96B 蛋白表达量与胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关 ($P<0.05$)，然而与性别、年龄、肿瘤大小无明显相关。见表 1。

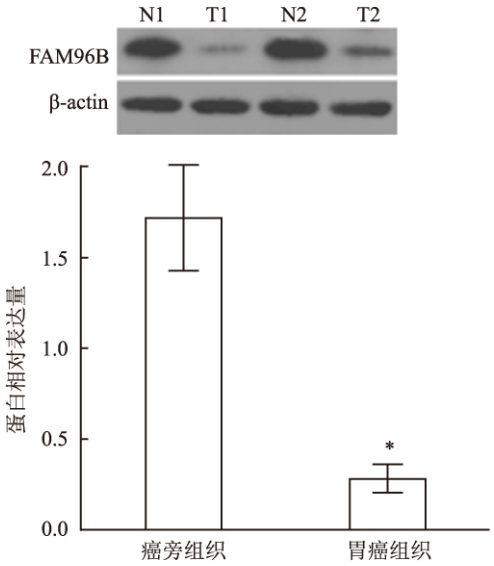

图 1 Western blot 检测 FAM96B 在胃癌及癌旁组织中的蛋白表达

N: 癌旁组织; T: 胃癌组织; 1: 泳道 1; 2: 泳道 2; 与癌旁组织比较: * $P<0.05$

表 1 FAM96B 蛋白表达量与胃癌临床病理特征之间的关系

临床病理特征	n	表达量($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
性别				
男	47	0.52±0.21	0.701	0.542
女	33	0.50±0.20		
年龄(岁)				
<60	34	0.53±0.19	0.782	0.584
≥60	46	0.50±0.21		
肿瘤大小(cm)				
<5	48	0.49±0.20	−0.512	0.621
≥5	32	0.52±0.19		
浸润深度				
未及浆膜	26	0.68±0.09	10.115	<0.05
侵及浆膜	54	0.33±0.11		
淋巴结转移				
阴性	30	0.57±0.11	7.060	<0.05
阳性	50	0.37±0.10		
远处转移				
阴性	60	0.68±0.12	13.973	<0.05
阳性	20	0.28±0.09		
TNM 分期				
Ⅰ～Ⅱ期	31	0.59±0.13	7.867	<0.05
Ⅲ～Ⅳ期	49	0.34±0.11		

2.3 MTT 法检测 SGC7901 细胞活性 FAM96B 组吸光度显著低于对照组 ($P<0.05$)，即过表达 FAM96B 可抑制 SGC7901 细胞增殖，见图 2。

2.4 流式细胞仪检测 SGC7901 细胞凋亡率 过表

达 FAM96B 组的细胞凋亡率显著高于对照组[(38.46 ± 1.14) % *vs*(3.70 ± 0.65) %, t = 85.585, P < 0.05],即过表达 FAM96B 可诱导 SGC7901 细胞凋亡。见图 3。

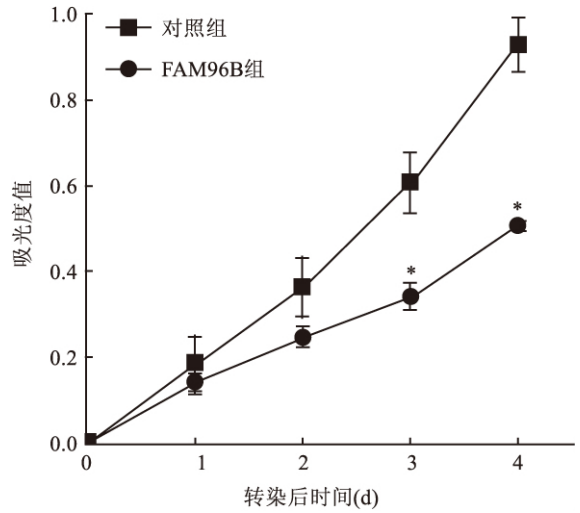

图 2 SGC7901 细胞生长曲线

与对照组比较: * P < 0.05

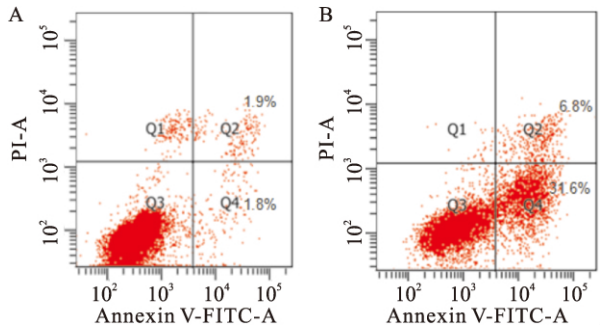

图 3 过表达 FAM96B 对 SGC7901 细胞凋亡的影响

A: 对照组; B: FAM96B 组; Q1: 机械性损伤; Q2: 晚期凋亡或坏死细胞; Q3: 正常细胞; Q4: 早期凋亡细胞

3 讨论

胃癌是常见恶性肿瘤之一,5 年相对生存率不足 20%。因此探讨胃癌发生发展、侵袭转移的病理生理机制对于胃癌的防治具有重要的现实意义。越来越多的证据显示: FAM96B 可能在血管内皮细胞增殖、侵袭转移中扮演重要角色,并参与细胞有丝分裂和凋亡,且与某些肿瘤的发生发展密切相关[10-11]。但 FAM96B 与胃癌发生发展、侵袭转移的关系国内外未见报道。

在肿瘤组织及其相应邻近正常组织中异常表达的基因可认为是潜在的控制细胞增殖和凋亡的癌基因和抑癌基因。本研究中 Western blot 检测结果证实 FAM96B 在胃癌组织中的蛋白表达显著低于癌旁组织。可见, FAM96B 在具有抑癌基因特性,在胃癌发生发展过程中扮演重要角色。与张智勇等[6]、蔡逊 等[7-9]的研究结果相一致。

肿瘤侵袭转移是导致癌症患者死亡的主要原因之一,肿瘤细胞离开原发灶并侵入周围组织和(或)侵袭血管与淋巴管进入循环系统向远处组织扩散形成新的转移灶,在血供充分的情况下增殖形成转移瘤。本研究通过对 FAM96B 蛋白表达与胃癌临床病理特征之间关系的分析,得出 FAM96B 在胃癌组织中表达下降与胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关。提示 FAM96B 可能是一个与胃癌浸润及转移相关的分子指标,在胃癌发展、浸润及转移中起到一定的抑制作用。

目前,基因克隆、基因转染是明确基因功能的主要方法。为进一步研究 FAM96B 在胃癌发生发展中的功能,本研究将 FAM96B 质粒通过脂质体转染法转染至 SGC7901 细胞中,观察 FAM96B 基因过表达对胃癌细胞生物学功能的影响。本研究中,MTT 实验结果提示过表达 FAM96B 可抑制胃癌细胞系 SGC7901 增殖。Ito et al[3] 报道 FAM96B 定位于纺锤体,在染色体正常分离中发挥作用,FAM96B 沉默导致结肠癌细胞系 HCT-116 细胞不能正常有丝分裂,致使异型细胞核堆积。染色体反复获得、缺失或错误分离率增加可引起异常的有丝分裂,多核细胞产生,进而导致细胞凋亡[12]。上述国外研究[3]有力地证实 FAM96B 与细胞凋亡密切相关。本研究中,流式细胞仪检测结果显示过表达 FAM96B 可显著诱导 SGC7901 细胞凋亡,与国外文献报道基本一致。

本研究结果证实: FAM96B 作为抑癌基因能够抑制胃癌发生发展及侵袭转移,并诱导胃癌细胞凋亡。可能成为胃癌诊断和治疗的潜在靶点之一。

参考文献

[1] Liang Q L, Wang B R, Li Z Y, et al. Effect of TSLC1 gene on growth and apoptosis in human esophageal carcinoma Eca109 cells [J]. Arch Med Sci, 2012, 8(6): 987 - 92.

[2] 李彩苹, 房太勇. 尾侧型同源转录因子-2, P53 和 Ki67 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 中华消化杂志, 2015, 35(5): 340 - 3.

[3] Ito S, Tan L J, Andoh D, et al. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation [J]. Mol Cell, 2010, 39(4): 632 - 40.

[4] 荆 霞,熊兴东,岑锦明,等. FAM96B 基因 rs3890213-A > G 多态性与冠心病的关系[J]. 广东医学, 2013,34(3):368 -70.
[5] 马丹丹,张智勇,蔡 逊. 96 序列相似的家庭成员 B 功能的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(5):791 -3.
[6] 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.
[7] 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.
[8] 蔡 逊,马丹丹,张智勇,等. FAM96B 基因在结肠癌组织中的低表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志,2016,33(3):567 -70.
[9] 蔡 逊,马丹丹,张智勇,等. 96 序列相似的家庭成员 B 在凋亡素特异性诱导 HepG2 细胞凋亡中的作用[J]. 中华实验外科杂志,2016,33(10):2317 -9.
[10] 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.
[11] Xiong X D, Wang J, Zheng H, et al. Identification of FAM96B as a novel prelamin A binding parter[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(1):20 -4.
[12] Pedersen R T, Kruse T, Nilsson J, et al. TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells[J]. J Cell Biol, 2015, 210(4):565 -82.

Expression of FAM96B in gastric carcinoma and its effect on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

Ye Jiaxin, Wang Shijie, Ma Dandan, et al
(*Dept 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 B (FAM96B) in 80 cases of gastric cancer and explore the correlation between FAM96B expression and its clinical biological characteristics of gastric cancer. Then to evaluate the proliferation and apoptosis effect of FAM96B overxpression on human gastric carcinoma cell line SGC7901. ***Methods*** Western blot was employed to detect FAM96B expression in 80 cases of gastric cancer tissues and its adjacent normal tissues. Furthermore, the correlation between FAM96B expression levels and clinicopathological characteristics of ganstric cancer was analyzed. Moreover, the recombinant plasmid of pcDNA3.1-myc-FAM96B containing the whole sequence of human FAM96B gene was constructed and transfected into SGC7901 cells. MTT essay was used to evaluate the proliferation of transfected cells, and apoptosis was detected by flow cytometry. ***Results*** Western blot results showed that FAM96B protein expression levels was significantly higher in the adjacent normal tissues than in gastric cancer tissues ($t = 25.218$, $P < 0.05$). And the FAM96B 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. The MTT assay showed that the a value in FAM96B overexpression group was significantly lower than in control group ($P < 0.05$). FACS analysis indicated that the cell apoptotic rate was increased in FAM96B group than in the control group($t = 85.585$, $P < 0.05$). ***Conclusion*** The FAM96B protein expression is significantly decreased in gastric cancer tissues as compared with its adjacent normal tissues. In addition, FAM96B may be a good biomarker to evaluate the development, invasion and metastasis of gastric cancer. Overexpression of FAM96B can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SGC7901 cells.

Key words family with sequence similarity 96, member B; gastric cancer; expression; proliferation; apoptosis; invasion and metastasis