

• 论 著 •

FAM83A 对肺癌诊断的临床意义及其对肺癌细胞增殖和迁移的影响*

黄 雯¹, 仰丽丽², 吴付兵^{3△}

(1. 南京医科大学第四附属医院肿瘤科, 江苏南京 210000; 2. 南京市第二医院肿瘤科, 江苏南京 210000;
3. 南京医科大学附属逸夫医院肿瘤科, 江苏南京 210000)

摘 要:目的 探讨序列相似性为 83 的家族 A 成员(FAM83A)对肺癌诊断的临床意义及其对肺癌细胞增殖和迁移的影响。方法 “GEPIA”网站分析 FAM83A 在肺癌组织和正常组织中的表达。然后采用荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肺癌血清样本中 FAM83A mRNA 相对表达水平, ROC 曲线分析 FAM83A mRNA 在肺癌诊断中的作用, 进一步分析其与肺癌患者临床特征的关系。最后在肺癌细胞 A549 和 SK-MES-1 中采用 Lipofectamine 2000 转染 si-FAM83A, qRT-PCR 和 Western blot 分别检测转染 si-FAM83A 后肺癌细胞中 FAM83A mRNA 和蛋白表达水平。MTT 和 Transwell 实验分别检测干扰 FAM83A 后肺癌细胞的增殖和迁移侵袭。结果 “GEPIA”分析结果表明 FAM83A 在肺癌组织中的相对表达水平显著高于正常组织。进一步检测表明在肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 相对表达水平显著高于体检健康者。采用血清中 FAM83A mRNA 表达水平诊断肺癌的受试者工作特征曲线下面积为 0.927, 最佳诊断值为 2.12。肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 相对表达水平与患者年龄无关, 但与肿瘤大小、TNM 分期以及淋巴结转移显著相关。在肺癌细胞 A549 和 SK-MES-1 中转染 si-FAM83A 能有效干扰细胞中 FAM83A mRNA 和蛋白的表达。干扰 FAM83A 表达能显著抑制 A549 和 SK-MES-1 细胞的增殖、迁移和侵袭。结论 血清中 FAM83A mRNA 表达水平在肺癌诊断中具有一定的临床意义, 干扰 FAM83A 表达能显著抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词:肺癌; FAM83A; 诊断; 增殖; 迁移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.11.016

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2020)11-1347-06

文献标识码:A

Clinical significance of FAM83A in the diagnosis of lung cancer and its effect on lung cancer cell proliferation and migration*

HUANG Wen¹, YANG Lili², WU Fubing^{3△}

(1. Department of Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 2. Department of Oncology, Nanjing Second Hospital, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 3. Department of Oncology, Yifu Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of family member 83 (FAM83A) with sequence similarity 83 in the diagnosis of lung cancer and its effect on the proliferation and migration of lung cancer cells. **Methods** The "GEPIA" website was used to analyze the expression of FAM83A in lung cancer tissues and normal tissues. Then qRT-PCR was used to detect the relative expression level of FAM83A mRNA in serum samples of lung cancer, and the role of FAM83A mRNA in the diagnosis of lung cancer was analyzed by ROC curve, and its relationship with clinical characteristics of lung cancer patients was further analyzed. Finally, si-FAM83A was transfected with Lipofectamine 2000 in lung cancer cells A549 and SK-MES-1. The expression levels of FAM83A mRNA and protein in lung cancer cells were detected by qRT-PCR and Western blot. MTT and Transwell experiments detect the proliferation and migration of lung cancer cells after interference with FAM83A, respectively. **Results** The results of "GEPIA" analysis showed that the relative expression level of FAM83A in lung cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues. Fur-

* 基金项目: 北京卫健康公益基金项目(YWJKJHKYJJ-F2252E); 北京市希思科临床肿瘤学研究基金项目(Y-HS2019-35); 2019 年度天晴科研基金项目(YFHX2019-003)。

作者简介: 黄雯, 女, 主治医师, 主要从事肿瘤内科肺癌消化道肿瘤方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wfb_wkx@163.com。

本文引用格式: 黄雯, 仰丽丽, 吴付兵, FAM83A 对肺癌诊断的临床意义及其对肺癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(11): 1347-1351.

ther testing showed that the relative expression level of FAM83A mRNA in the serum of lung cancer patients was significantly higher than that in healthy physical examination. The area under the ROC curve for diagnosing lung cancer using FAM83A mRNA expression in serum was 0.927, and the best diagnostic value was 2.12. The relative expression level of FAM83A mRNA in the serum of lung cancer patients was not related to the patient's age, but was significantly related to tumor size, TNM stage, and lymph node metastasis. Transfection of si-FAM83A in lung cancer cells A549 and SK-MES-1 could effectively interfere with FAM83A mRNA and protein expression in cells. Interfering with FAM83A expression could significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of A549 and SK-MES-1 cells. **Conclusion** The serum FAM83A mRNA expression level has certain clinical significance in the diagnosis of lung cancer. Interfering with FAM83A expression significantly inhibits the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells.

Key words: lung cancer; FAM83A; diagnose; proliferation; migration

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均逐年上升,每年至少有 160 万的新增病例被确诊为肺癌,严重威胁着人类的健康^[1-2]。近年来,虽然大多数癌症的生存率稳步上升,但肺癌的生存率进展缓慢,由于其发病过程隐匿,多数患者在确诊时已经发生局部浸润或转移,而发生远处转移的患者 5 年生存率仅为 5.0%^[3-5]。因此,了解肺癌发生发展机制,探索新的诊断或治疗靶点成为肺癌领域研究的热门课题。序列相似性为 83 的家族 A 成员(FAM83A),又称为 BJ-TSA-9,位于染色体 8q24 上^[6]。最近一些研究发现,FAM83A 在肺癌^[7-8]、乳腺癌^[9]和胰腺癌^[10]中异常高表达,很有可能成为这些肿瘤诊断或治疗的潜在生物标志物。但 FAM83A 在肺癌中的临床意义,以及在肺癌细胞中的生物学作用仍不清楚。本研究旨在探讨肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 的表达水平及临床意义,进一步分析干扰 FAM83A 表达对肺癌细胞增殖、转移和侵袭能力的影响,为肺癌的诊断提供新的标志物,也为肺癌的靶向治疗提供潜在的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 8 月至 2019 年 8 月在南京医科大学附属逸夫医院医院确诊为原发性肺癌的患者 102 例为研究对象,其中男 58 例,女 44 例,在入组前患者均未接受放疗、化疗等治疗。患者的诊断和临床病理特征包括肿瘤大小、TNM 分期和淋巴结转移均经过两位以上病理学医生确认。选取同期在医院进行体检的健康人员 98 例作为对照组,其中男 45 例,女 53 例。所有入组人员均签署知情同意书。所有参与者抽取静脉血 5 mL 用于分离血清检测 FAM83A。

1.2 仪器与试剂 MTT 检测试剂盒购自上海碧云天公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒和定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司;Transwell 小室和 Matrigel 胶购自美国 BD 公司;FAM83A 和 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;ABI PRISM 7500 定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析 FAM83A 在肺癌组织中的表达 利用生物信息学在线工具“GEPIA”(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>)分析 FAM83A 在肺癌组织和正常组织中的表达。

1.3.2 细胞培养与转染 培养肺癌细胞 A549 和 SK-MES-1,取对数生长期的细胞按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书转染 si-FAM83A。在转染中设置 siRNA-NC (si-NC) 对照组, si-FAM83A-1 组, si-FAM83A-2 组,荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)确定转染效率。siRNA 序列如下, si-FAM83A-1: 5'-GCA CAA CAA CAT CAG AGA CCT-3'; si-FAM83A-2: 5'-GAC TGG AGA TTT GTC CTG TCT-3'; si-NC: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3'。

1.3.3 qRT-PCR 检测 FAM83A mRNA 的表达 Trizol 试剂提取各组细胞标本中的总 RNA。将 RNA 逆转录成 cDNA 并进行 qRT-PCR 检测。扩增引物序列如下: FAM83A 上游引物为 5'-CCC ATC TCA GTC ACT GGC ATT-3',下游引物为 5'-CCG CCA ACA TCT CCT TGT TC-3'; GAPDH 上游引物为 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3',下游引物为 5'-AAG GTG AAG GTC GGA GTC AA-3'。以 GAPDH 作为内参,结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量表示。实验重复 3 次。

1.3.4 Western blot 检测 FAM83A 蛋白的表达 提取各组细胞中的总蛋白,BCA 法定量蛋白浓度,然后对蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭,随后加入一抗(FAM83A 按 1:1 000 稀释,或 GAPDH 按 1:3 000 稀释)4 ℃ 反应过夜。TBST 漂洗膜 3 次后加入 HRP 标记二抗,室温条件下反应 2 h。然后 TBST 漂洗膜 3 次,最后用 ECL 化学发光试剂盒进行蛋白显影,化学发光成像系统成像检测蛋白质印迹条带。

1.3.5 MTT 法检测细胞增殖 将转染 si-FAM83A 或 si-NC 的肺癌细胞 A549 和 SK-MES-1 细胞接种至 96 孔板中,随后按 MTT 检测试剂盒说明书检测培养

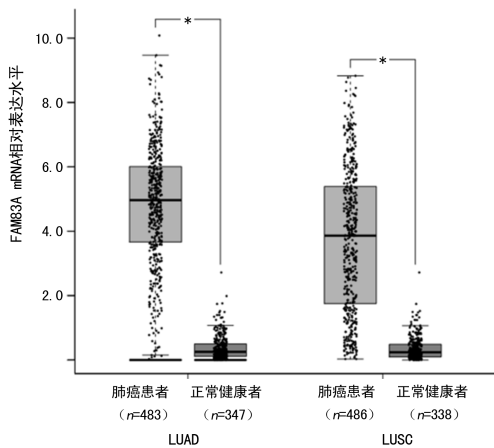
0、24、48、72 h 后细胞在 570 nm 波长下的吸光度,绘制细胞增殖曲线。

1.3.6 Transwell 实验检测肺癌细胞转移侵袭 转移实验:将 Transwell 小室放置于 24 孔板内,将转染 si-FAM83A 或 si-NC 的肺癌细胞 A549 或 SK-MES-1 细胞接种于上室。培养 48 h 后用 4.0% 多聚甲醛溶液对小室膜下面的细胞进行固定,然后用 0.1% 结晶紫染色。各组随机选取 6 个视野显微镜下观察拍照并计数。侵袭实验:取 100 μ L Matrigel 胶包被 Transwell 小室底部膜的上室,其余同转移实验。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间均数比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学分析 FAM83A 在肺癌组织中的表达 生物信息学“GEPIA”分析结果显示,与正常组织相比,肺癌组织中的 FAM83A 相对表达水平明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:与肺癌组织比较,* $P < 0.05$ 。

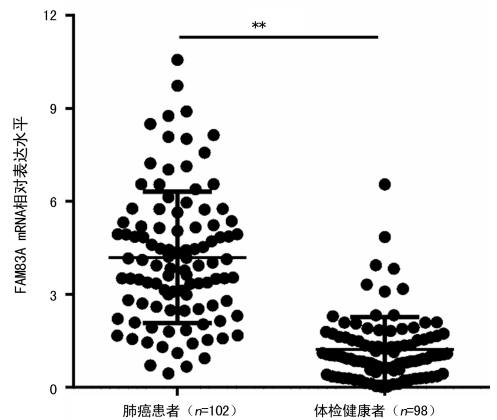
图 1 “GEPIA”分析 FAM83A 在肺癌组织和正常肺组织中的相对表达水平

2.2 肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 的表达 qRT-PCR 结果显示,肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 相对表达水平明显高于体检健康者,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 血清中 FAM83A mRNA 表达水平在肺癌患者

中的诊断作用 以血清中 FAM83A mRNA 表达水平参数模型作为检验指标,绘制诊断肺癌的 ROC 曲线。FAM83A mRNA 表达水平的 ROC 曲线下的面积分别为 0.927 (95.0% CI: 0.892 ~ 0.962)。其中 FAM83A mRNA 表达水平诊断肺癌的截断值为 2.12 时,灵敏度为 82.0%,特异度为 90.0%。见图 3。

2.4 肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 表达水平与化学、临床病理特征之间的关系 肺癌患者血清中 FAM83A mRNA 表达水平与年龄之间无明显相关性,但与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移呈显著相关($P < 0.001$)。见图 4。



注:与肺癌患者比较,** $P < 0.01$ 。

图 2 qRT-PCR 检测肺癌患者和体检健康者血清中 FAM83A mRNA 表达水平

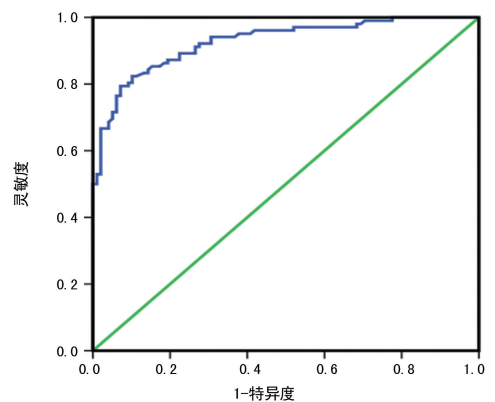


图 3 血清中 FAM83A mRNA 表达水平诊断肺癌的 ROC 曲线

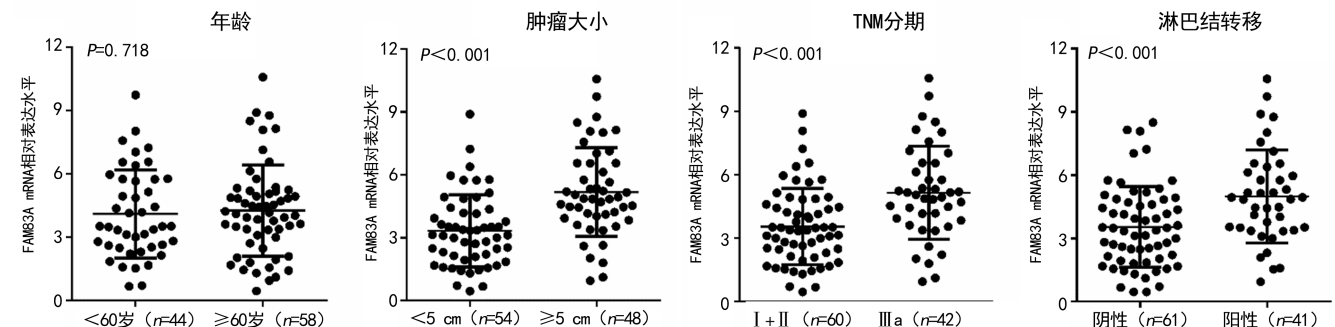
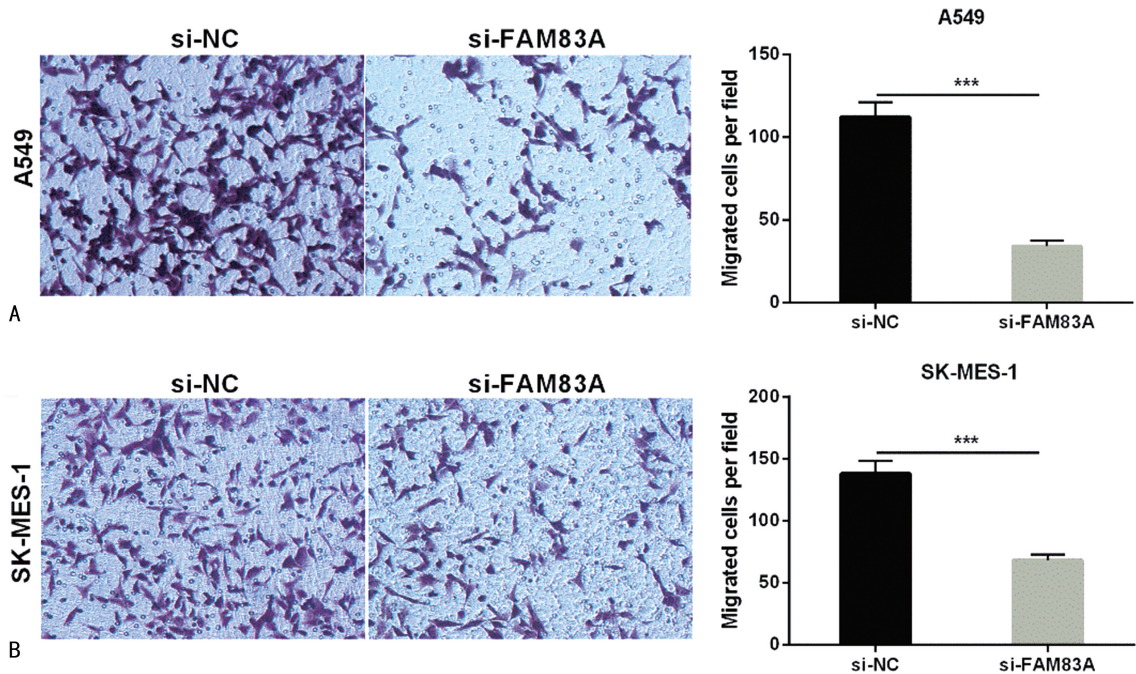


图 4 患者血清中 FAM83A mRNA 表达水平与临床病理特征之间的关系

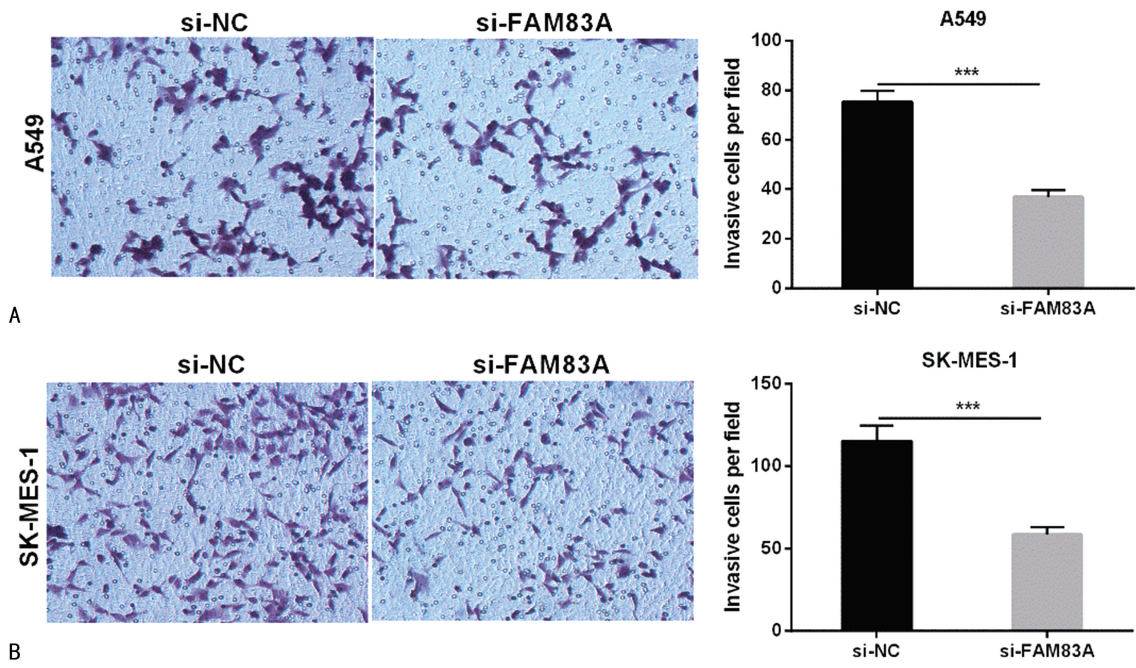
2.5 转染 si-FAM83A 对肺癌细胞 FAM83A mRNA 和蛋白表达的影响 将 si-FAM83A 或 si-NC 转染 A549 和 SK-MES-1 细胞 24 h 后, qRT-PCR 结果显示, 与 si-NC 组相比, si-FAM83A 组的 A549 和 SK-MES-1 细胞中 FAM83A mRNA 相对表达水平显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 si-FAM83A-1 在 A549 和 SK-MES-1 细胞中干扰

FAM83A mRNA 表达效率高于 si-FAM83A-2。Western blot 结果显示与 si-NC 组相比, si-FAM83A 组的 A549 和 SK-MES-1 细胞中 FAM83A 蛋白相对表达水平显著降低, 且 si-FAM83A-1 在 A549 和 SK-MES-1 细胞中干扰 FAM83A 蛋白表达效率高于 si-FAM83A-2。因此, 选用 si-FAM83A-1 (si-FAM83A) 转染细胞进行下一步实验。



注: A 和 B 分别表示 Transwell 转移实验检测干扰 FAM83A 表达对 A549 和 SK-MES-1 细胞转移能力的影响。*** $P < 0.001$ 。

图 5 干扰 FAM83A 表达抑制肺癌细胞转移



注: A 和 B 分别表示 Transwell 侵袭实验检测干扰 FAM83A 表达对 A549 和 SK-MES-1 细胞侵袭的影响。*** $P < 0.001$ 。

图 6 干扰 FAM83A 表达抑制肺癌细胞侵袭

2.6 干扰 FAM83A 表达对肺癌细胞增殖的影响 MTT 实验结果表明, 细胞培养 24、48、72 h 这 3 个时

间点时, 与 si-NC 组相比, 转染 si-FAM83A 组细胞的吸光度值随时间延长而逐渐下降, 且幅度逐渐增大,

- (2):73-77.
- [5] 杜传书. 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症研究 40 年的回顾和展望[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(4):174-175.
 - [6] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中国新生儿胆红素脑病研究协作组. 中国新生儿胆红素脑病的多中心流行病学调查研究[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(5):331-335.
 - [7] 张序. 我国育龄夫妇 G6PD 缺乏症的筛查现状[J]. 中国计划生育学杂志, 2017, 25(8):563-565.
 - [8] PENG Q, LI S, MA K, et al. Large cohort screening of G6PD deficiency and the mutational spectrum in the Dongguan District in Southern China [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120683.
 - [9] 王霞, 江帆, 唐盈, 等. 广州地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷症基因突变的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(7):17-18.
 - [10] 潘小莉, 庄丹燕, 陈怡博, 等. 宁波地区 273 例 G6PD 缺乏症基因突变类型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2017, 25(5):37-39.
 - [11] JIANG J, LI B, CAO W, et al. Screening and prevention of neonatal glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in Guangzhou, China[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2):4272-4279.
 - [12] LIN F, LOU Z Y, XING S Y, et al. The gene spectrum of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Guangdong province, China[J]. Gene, 2018, 678:312-317.
 - [13] MINUCCI A, MORADKHANI K, HWANG M J, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations[J]. Blood Cells Mol Dis, 2012, 48(3):154-165.
 - [14] YAN J B, XU H P, XIONG C, et al. Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(3):305-311.
 - [15] RAHIMI Z, VAISI-RAYGANI A, NAGEL RL, et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Kurdish population of Western Iran[J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 37(2):91-94.
 - [16] JIANG W, YU G, LIU P, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population[J]. Hum Genet, 2006, 119(5):463-478.
 - [17] MENZILETOGLU Y, YUZBASIOGLU A K, TAHIROGLU M, et al. Detection of 1311 polymorphism in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by microarray technique[J]. Arch Med Sci, 2011, 7(4):586-591.
 - [18] 陈嵘, 陈桂兰, 屈艳霞, 等. G6PD 缺乏症合并地中海贫血患者 G6PD 活性和基因突变类型分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(6):26-27.
 - [19] HAN L, SU H, WU H, et al. Molecular Epidemiological Survey of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Thalassemia in Uygur and Kazak Ethnic Groups in Xinjiang, Northwest China[J]. Hemoglobin, 2016, 40(3):179-86.
 - [20] 于国龙, 蒋玮莹, 杜传书, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 eDNA1311C→T 复合 11 内含子 93T→C 突变[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(10):610-612.
 - [21] MINUCCI A, GIARDINA B, ZUPPI C, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why? [J]. IUBMB Life, 2009, 61(1):27-34.
 - [22] JIANG W Y, ZHOU B Y, YU G L, et al. G6PD genotype and its associated enzymatic activity in a Chinese population[J]. Biochem Genet, 2012, 50(1-2):34-44.
 - [23] YAN T, CAI R, MO O, et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations[J]. Haematologica, 2006, 91(10):1321-1328.

(收稿日期:2019-09-23 修回日期:2020-02-12)

(上接第 1351 页)

- Fam83a confers egfr-tyk resistance in breast cancer cells and in mice[J]. J Clin Invest, 2012, 122(9):3211-3220.
- [10] CHEN S, HUANG J, LIU Z, et al. Fam83a is amplified and promotes cancer stem cell-like traits and chemoresistance in pancreatic cancer[J]. Oncogenesis, 2017, 6(3):e300.
 - [11] DU X, ZHANG J, WANG J, et al. Role of mirna in lung cancer-potential biomarkers and therapies[J]. Curr Pharm Des, 2018, 23(39):5997-6010.
 - [12] MAO Y, YANG D, HE J, et al. Epidemiology of lung cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2016, 25(3):439-445.
 - [13] 陈天翔, 杨运海. CircRNA 在肺癌诊断与发生发展及对药中的作用进展[J]. 中华肺癌杂志, 2019, 22(8):532-536.
 - [14] SNIJDERS A M, LEE S Y, HANG B, et al. Fam83 family oncogenes are broadly involved in human cancers: An integrative multi-omics approach[J]. Mol Oncol, 2017, 11(2):167-179.
 - [15] WANG Y, LU T, WO Y, et al. Identification of a putative competitive endogenous rna network for lung adenocarcinoma using tcga datasets[J]. Peer J, 2019, 7:e6809.
 - [16] BARTEL C A, JACKSON M W. Her2-positive breast cancer cells expressing elevated fam83a are sensitive to fam83a loss[J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0176778.
 - [17] SHI R, JIAO Z, YU A, et al. Long noncoding antisense rna fam83a-as1 promotes lung cancer cell progression by increasing fam83a [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6):10505-10512.

(收稿日期:2019-09-01 修回日期:2020-01-12)