

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.20.006  
文章编号: 1005-8982 (2022) 20-0033-08

实验研究·论著

## FAM83B对肝癌细胞的作用及机制研究\*

李鲜丽<sup>1</sup>, 范晶华<sup>1</sup>, 晁春梅<sup>1</sup>, 迟晓伟<sup>1</sup>, 杨春霞<sup>1</sup>, 陈昕婷<sup>1</sup>, 韦嘉<sup>2</sup>

[1. 昆明医科大学第一附属医院 感染与肝病科, 云南 昆明, 650032; 2. 昆明医科大学第四附属医院(云南省第二人民医院) 肝脏疾病研究中心, 云南 昆明 650021]

**摘要: 目的** 探讨具有序列相似性的家族83成员B(FAM83B)对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及其机制。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)、Western blotting、免疫组织化学法检测肝癌组织、癌旁正常组织、人类肝癌细胞系(HepG2、Hep3B)、正常人类肝细胞系(LO2)中FAM83B mRNA和蛋白的表达。采用靶向siRNA敲低HepG2细胞系中FAM83B作为si-FAM83B组, HepG2细胞转染si-NC慢病毒载体作为si-NC组。分别用PBS、40 ng/mL胰岛素样生长因子1(IGF-1)处理si-FAM83B组细胞48 h, 并将细胞分为si-FAM83B+PBS组和si-FAM83B+IGF-1组, 分析敲低FAM83B对肝癌细胞增殖、侵袭、细胞周期和凋亡的影响, 并研究敲低FAM83B对磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素哺乳动物靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路的影响。**结果** 肝癌组织FAM83B mRNA和蛋白相对表达量高于癌旁正常组织( $P < 0.05$ )。HepG2、Hep3B细胞FAM83B mRNA和蛋白相对表达量高于LO2细胞( $P < 0.05$ )。si-FAM83B组FAM83B mRNA和蛋白相对表达量低于si-NC组( $P < 0.05$ )。si-NC组与si-FAM83B组24 h、48 h、72 h、96 h的OD值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点OD值有差异( $F = 773.510, P = 0.001$ ); ②si-NC组与si-FAM83B组的OD值有差异( $F = 516.980, P = 0.000$ ), si-FAM83B组OD值较低; ③两组OD值变化趋势有差异( $F = 820.782, P = 0.000$ )。si-FAM83B组细胞凋亡率高于si-NC组, 侵袭细胞数低于si-NC组( $P < 0.05$ )。si-FAM83B组PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白相对表达量低于si-NC组( $P < 0.05$ ), LC3-II高于si-NC组( $P < 0.05$ )。si-NC组与si-FAM83B组Akt、mTOR蛋白相对表达量比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。si-FAM83B+IGF-1组PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量高于si-FAM83B+PBS组( $P < 0.05$ ), LC3-II低于si-FAM83B+PBS组( $P < 0.05$ )。si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组Akt、mTOR蛋白相对表达量比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组24 h、48 h、72 h、96 h的OD值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点OD值有差异( $F = 5211.626, P = 0.000$ ); ②si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组OD值有差异( $F = 453.499, P = 0.000$ ), si-FAM83B+IGF-1组OD值较高; ③两组OD值变化趋势有差异( $F = 384.347, P = 0.000$ )。si-FAM83B+IGF-1组细胞凋亡率低于si-FAM83B+PBS组( $P < 0.05$ ), 侵袭细胞数高于si-FAM83B+PBS组( $P < 0.05$ )。**结论** 敲低FAM83B可通过沉默PI3K/Akt/mTOR通路抑制肝癌细胞生长, 并促进肿瘤细胞自噬。

**关键词:** 肝癌细胞; FAM83B; PI3K/Akt/mTOR信号通路; 增殖; 侵袭; 凋亡

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

## Effect of FAM83B on hepatocellular carcinoma cells and its mechanism\*

Xian-li Li<sup>1</sup>, Jing-hua Fan<sup>1</sup>, Chun-mei Chao<sup>1</sup>, Xiao-wei Chi<sup>1</sup>, Chun-xia Yang<sup>1</sup>, Xin-ting Chen<sup>1</sup>, Jia Wei<sup>2</sup>  
[1. Department of Infection and Hepatology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Liver Disease Research Center, The Fourth Affiliated Hospital of

收稿日期: 2022-04-13

\* 基金项目: 云南省科技厅应用基础研究联合专项(No:202001AY070001-037); 云南省创新团队计划项目(No:2015HC019)

[通信作者] 韦嘉, E-mail: wejia@aliyun.com; Tel: 13888229825

Kunming Medical University (The Second People's Hospital of Yunnan Province),  
Kunming, Yunnan 650021, China]

**Abstract: Objective** To explore the effect of family with sequence similarity 83 member B (FAM83B) on the proliferation and invasion of liver cancer cells and its underlying mechanisms. **Methods** The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the mRNA and protein expressions of FAM83B in liver cancerous tissues and adjacent tissues, as well as in liver cancer cell lines (HepG2, Hep3B) and normal human hepatocyte cell line (LO2). The targeted knockdown of the expression of FAM83B in liver cancer cell line HepG2 was achieved via small interfering RNA (siRNA), which was set as the si-FAM83B group. The HepG2 cells transfected with control lentiviral vectors were set as the si-NC group. The cells in the si-FAM83B group were treated with PBS and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) at a concentration of 40 ng/mL for 48 h, and were set as si-FAM83B + PBS group and si-FAM83B + IGF-1 group, respectively. The effects of the knockdown of the expression of FAM83B on the proliferation, invasion, cell cycle and apoptosis of liver cancer cells, and on the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/ Akt/ mTOR) signaling pathway were analyzed. **Results** The relative mRNA and protein expressions of FAM83B in liver cancer tissues were significantly higher than those in the adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the HepG2 and Hep3B cells, the relative mRNA and protein expressions of FAM83B were lower in the LO2 cells ( $P < 0.05$ ). Besides, the relative mRNA and protein expressions of FAM83B were lower in the si-FAM83B group than those in the si-NC group ( $P < 0.05$ ). The optical density (OD) values at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h in the si-FAM83B and si-NC groups were compared via repeated measures ANOVA, and the results demonstrated that the OD values were different among the time points ( $F = 773.510$ ,  $P = 0.001$ ) and between the groups ( $F = 516.980$ ,  $P = 0.000$ ). Specifically, the OD values were lower in the si-FAM83B group. Besides, there were differences in the change trends of OD values between the two groups ( $F = 820.782$ ,  $P = 0.000$ ). The apoptosis rate was higher but the number of invasive cells was lower in the si-FAM83B group than in the si-NC group ( $P < 0.05$ ). Compared with the si-NC group, the protein expressions of PI3K, p-Akt and p-mTOR were lower, while the protein expression of LC3-II was higher in the si-FAM83B group ( $P < 0.05$ ). There was no difference in the relative protein expressions of Akt and mTOR between the si-FAM83B + IGF-1 group and the si-FAM83B + PBS group ( $P > 0.05$ ). The OD values at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h in the si-FAM83B + IGF-1 and si-FAM83B + PBS groups were compared via repeated measures ANOVA, and the results demonstrated that the OD values were different among the time points ( $F = 5211.626$ ,  $P = 0.000$ ) and between the groups ( $F = 453.499$ ,  $P = 0.000$ ), where the OD values in the si-FAM83B + IGF-1 group were higher. The change trends of the OD values were also different between the two groups ( $F = 384.347$ ,  $P = 0.000$ ). The apoptosis rate in the si-FAM83B + IGF-1 group was lower than that in the si-FAM83B + PBS group ( $P < 0.05$ ), whereas the number of invasive cells in the si-FAM83B + IGF-1 group was higher than that in the si-FAM83B+PBS group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Knockdown of FAM83B can suppress the growth of liver cancer cells and promote their autophagy by silencing the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

**Keywords:** liver cancer cells; FAM83B; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; proliferation; invasion; apoptosis

肝细胞癌是全球第6大最常见的癌症,具有生存率低、复发率高等特点,严重威胁患者生命<sup>[1-2]</sup>。肝细胞癌通常是由基础疾病引起,例如乙型肝炎,丙型肝炎和肝纤维化<sup>[3-4]</sup>。目前仍然没有有效的治疗方法。自噬是一种常见的细胞内自降解过程,其中细胞蛋白或细胞器被双膜自噬体包裹,并最终与溶酶体融合<sup>[5-6]</sup>。在肿瘤的发病机制中,自噬具有双重作用<sup>[7-8]</sup>:早期可抑制肿瘤的形成,在肿瘤的发展阶段可促进肿瘤细胞生长。自噬相关蛋白微管相

关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)与磷脂酰乙醇胺结合形成LC3-II并定位在自噬膜上,这是目前使用最广泛的自噬标志物,因此LC3-II的数量反映了自噬体和自噬相关结构的数量<sup>[6-7]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素哺乳动物靶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)通路是调节细胞转录、迁移、代谢、增殖和存活的关键信号通路<sup>[9]</sup>,对乳腺癌、结肠癌、卵巢

癌等的发生、发展起关键作用<sup>[10]</sup>。因此,笔者推测 PI3K/Akt/mTOR 通路和肿瘤细胞自噬作用在肝癌的发生中同样起着至关重要的作用。

具有序列相似性的家族 83 成员 B (family with sequence similarity 83 member B, FAM83B) 是 FAM83 蛋白家族的成员, FAM83B 被证实通过 EGFR/RAS/MAPK 通路参与乳腺癌的发生、发展<sup>[11]</sup>。此外, FAM83B 可以激活肿瘤细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路, 促进乳腺癌细胞的增殖、非贴壁生长, 提高致瘤性<sup>[11]</sup>。越来越多的证据表明, FAM83B 在多种肿瘤中高表达, 包括肺鳞状细胞癌和胰腺癌<sup>[12-13]</sup>。然而, FAM83B 在肝癌中的作用仍然未知。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本与细胞

组织标本源于 2017 年 3 月—2019 年 3 月在昆明医科大学第一附属医院行肝癌切除的 62 例患者的肝癌组织和癌旁正常组织, 所有组织标本经病理检查和免疫组织化学法确诊。所有新鲜标本通过液氮和甲醛分别保存, 本研究经医院医学伦理委员会批准, 患者及家属签署知情同意书。人类肝癌细胞系 (HepG2、Hep3B) 和正常人类肝细胞系 (LO2) 购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司), Lipofectamine 2000 Reagent 试剂盒、TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen Life Technologies 公司), FAM83B 的 siRNA (si-FAM83B) 和无序 siRNA (si-NC) 慢病毒载体 (上海吉玛制药技术有限公司), PrimeScript RT 试剂盒、SYBR Premix ExTaq II 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), CCK-8 试剂盒 (日本 Dojindo Laboratories 公司), 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司)。

**1.2.2 主要仪器** 7500 型实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), 流式细胞仪、Transwell 室 (美

国 BD Biosciences 公司), 光学显微镜 (日本 Olympus 株式会社)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 将 HepG2、Hep3B、LO2 细胞置于 DMEM 中, 补充 10% FBS、100 μg/mL 链霉素、100 u/mL 青霉素, 然后于 37℃ 和 5% 二氧化碳细胞培养箱中培养。

**1.3.2 慢病毒的包装和转染** 采用靶向 siRNA 敲低 HepG2 细胞系中 FAM83B 作为 si-FAM83B 组, HepG2 细胞转染 si-NC 慢病毒载体作为 si-NC 组。分别用 PBS、40 ng/mL 胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 处理 si-FAM83B 组细胞 48 h, 并将细胞分为 si-FAM83B+PBS 组和 si-FAM83B+IGF-1 组。

**1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 FAM38B mRNA 的表达** 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 用 Prime Script RT 试剂盒将其逆转录为 cDNA。使用 SYBR Premix ExTaq II 试剂盒在 7500 型 qRT-PCR 仪上进行 qRT-PCR, 反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环。qRT-PCR 引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 FAM38B mRNA 相对表达量, 所有实验重复 2 次。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
FAM83B	正向: 5'-AAAGCTCACCTCAGCATGGTT-3'	21
	反向: 5'-AGCAAATGAACTAGGGACAC-3'	20
GAPDH	正向: 5'-GCTCATTTGCAGGGGGGAG-3'	19
	反向: 5'-GTTGGTGTGCAGGAGGCA-3'	19

**1.3.4 Western blotting 检测 FAM38B 蛋白的表达** 用 RIPA 裂解液裂解组织和细胞, 提取总蛋白, BCA 测蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液 100℃ 水浴煮沸 5 min。SDS-PAGE 电泳分离后, 用湿转法转 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 加入一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h, TBST 洗涤后, 加入发光液, 采用凝胶电泳成像系统进行分析, 实验重复 3 次。GAPDH 作为内参蛋白, 将目的蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值作为蛋白相对

表达量。

**1.3.5 免疫组织化学法检测 FAM83B 蛋白的表达** 肝癌组织及癌旁正常组织经 4% 甲醛固定,石蜡包埋,切 4  $\mu\text{m}$  厚的切片。脱蜡、水化、3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,柠檬酸抗原修复,封闭液封闭非特异性结合位点,一抗 FAM83B 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭孵育过夜,加入二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,DAB 染色,苏木精复染,脱水,透明,中性树脂封片。

**1.3.6 CCK-8 法检测细胞增殖** 用含 10% FBS 的培养液制备单细胞悬液,将细胞按  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种在 96 孔板中。用酶标仪在 450 nm 波长处检测每个孔的光密度(optical density, OD)值。

**1.3.7 流式细胞仪检测细胞周期** 采用细胞周期检测试剂盒分析细胞周期。按  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度收集细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次,在 500  $\mu\text{L}$  70% 乙醇、25 $^{\circ}\text{C}$  条件下固定 2 h。细胞 PBS 洗涤 2 次,在 400  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(propidium iodide, PI)、100  $\mu\text{L}$  RNase、37 $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下孵育 30 min。采用流式细胞仪检测 PI 信号,所有实验重复 3 遍。

**1.3.8 流式细胞仪检测细胞凋亡** 采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。按  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度收集细胞,PBS 洗涤 2 次,重悬于 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液中,5  $\mu\text{L}$  膜联蛋白 V-FITC、5  $\mu\text{L}$  PI 在 37 $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下孵育 15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,所有实验重复 3 遍。

**1.3.9 Transwell 实验检测细胞侵袭** 采用 BD 24 孔 Transwell 室进行细胞侵袭实验。按  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度收集细胞,置于基底胶包被的 Transwell 上室中,并添加无血清培养基。下室添加含 10% FBS 的完全培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱孵育 48 h 后,将侵袭到下室的细胞用甲醇固定 30 min,然后结晶紫染色 15 min。在光学显微镜下,随机选择 3 个高倍视野测量细胞数,所有实验重复 3 次。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 Graphpad 5.0 和 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用  $t$  检验或单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用 LSD- $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异

有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FAM83B 在肝癌组织中高表达

肝癌组织与癌旁正常组织 FAM83B mRNA 和蛋白相对表达量比较,经  $t$  检验,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),肝癌组织高于癌旁正常组织。见表 2 和图 1。

表 2 癌旁正常组织与肝癌组织 FAM38B mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组织	FAM38B mRNA	FAM38B 蛋白
癌旁正常组织	1.000 $\pm$ 0.530	1.000 $\pm$ 0.230
肝癌组织	2.254 $\pm$ 1.195	2.675 $\pm$ 0.562
$t$ 值	7.553	21.719
$P$ 值	0.000	0.000

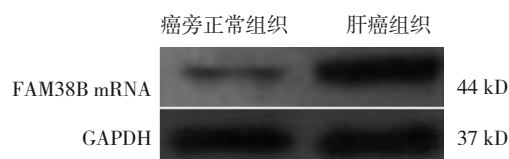


图 1 FAM83B 蛋白在肝癌组织和癌旁正常组织中的表达

免疫组织化学染色结果显示,FAM38B 主要表达于细胞核,少量表达于细胞质。阳性染色细胞为褐色或黑色。见图 2。

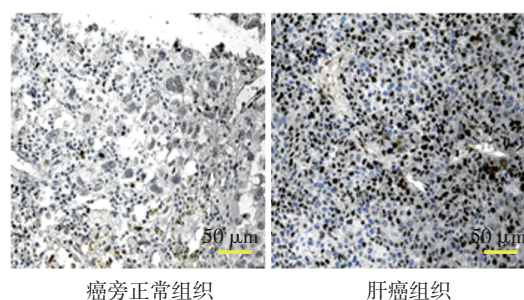


图 2 肝癌组织和癌旁正常组织 FAM83B 的表达 (免疫组织化学法  $\times 400$ )

### 2.2 FAM83B 在肝癌细胞系中高表达

LO2、HepG2、Hep3B 细胞 FAM83B mRNA 和蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 LO2 细胞比较,HepG2、Hep3B 细胞 FAM83B mRNA 和蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 3。

表 3 3 种细胞 FAM38B mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

细胞	FAM38B mRNA	FAM38B 蛋白
LO2	1.000 ± 0.130	1.000 ± 0.130
Hep3B	1.933 ± 0.251	2.081 ± 0.271
HepG2	2.352 ± 0.306	2.763 ± 0.359
F 值	24.842	32.446
P 值	0.000	0.000

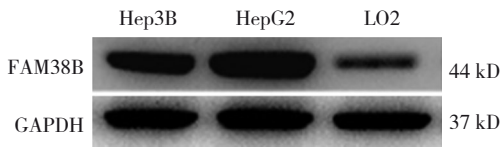


图 3 FAM38B 蛋白在 LO2、HepG2、Hep3B 细胞中的表达

### 2.3 敲低 FAM38B 可抑制肝癌细胞增殖、侵袭并促进凋亡

si-NC 组与 si-FAM83B 组 FAM38B mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), si-FAM83B 组低于 si-NC 组。见表 4 和图 4。

表 4 si-NC 组与 si-FAM83B 组 FAM38B mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	FAM38B mRNA	FAM38B 蛋白
si-NC 组	1.000 ± 0.110	1.000 ± 0.080
si-FAM83B 组	0.237 ± 0.019	0.273 ± 0.022
<i>t</i> 值	11.839	15.177
<i>P</i> 值	0.000	0.000

表 5 si-NC 组与 si-FAM83B 组不同时间点 OD 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
si-NC 组	0.231 ± 0.014	0.378 ± 0.010	0.790 ± 0.069	1.219 ± 0.057
si-FAM83B 组	0.201 ± 0.001	0.243 ± 0.010	0.559 ± 0.009	0.727 ± 0.028

表 6 si-NC 组与 si-FAM83B 组的细胞凋亡率、侵袭细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率/%	侵袭细胞数/(个/HP)
si-NC 组	11.010 ± 0.661	80.436 ± 4.826
si-FAM83B 组	29.306 ± 3.517	41.443 ± 4.973
<i>t</i> 值	8.855	9.746
<i>P</i> 值	0.000	0.000

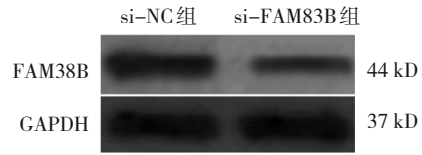


图 4 FAM38B 蛋白在 si-FAM83B 组和 si-NC 组 HepG2 细胞中的表达

si-NC 组与 si-FAM83B 组 24 h、48 h、72 h、96 h 的 OD 值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点 OD 值有差异 ( $F = 773.510, P = 0.001$ )。②si-NC 组与 si-FAM83B 组的 OD 值有差异 ( $F = 516.980, P = 0.000$ ), si-FAM83B 组 OD 值较低, 细胞活力降低。③两组 OD 值变化趋势有差异 ( $F = 820.782, P = 0.000$ )。见表 5。

si-NC 组与 si-FAM83B 组细胞凋亡率、侵袭细胞数比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), si-FAM83B 组细胞凋亡率高于 si-NC 组, 侵袭细胞数少于 si-NC 组。见表 6 和图 5、6。

### 2.4 敲低 FAM38B 可沉默 PI3K/Akt/mTOR 通路并促进细胞自噬

si-NC 组与 si-FAM83B 组 PI3K、p-Akt、p-mTOR、LC3-II 蛋白相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), si-FAM83B 组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白相对表达量低于 si-NC 组, LC3-II 蛋白相对表达量高于 si-NC 组。si-NC 组与 si-FAM83B 组 Akt、mTOR 蛋白相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 7 和图 7。

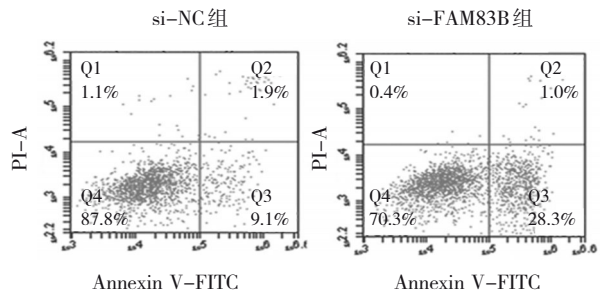


图 5 si-NC 组与 si-FAM83B 组 HepG2 细胞的流式细胞图

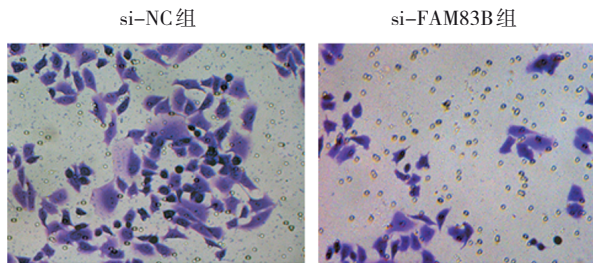
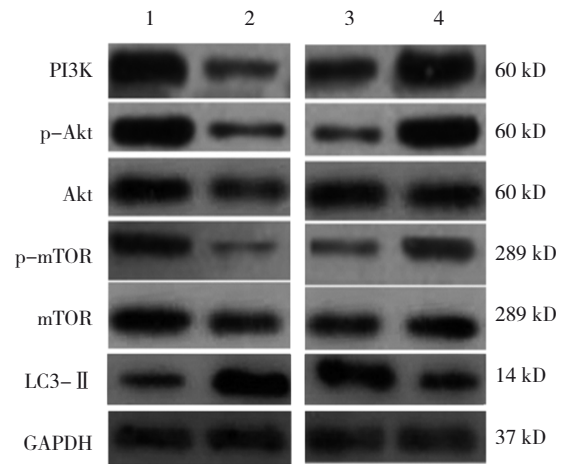


图6 si-NC组与si-FAM83B组HepG2细胞侵袭能力 (×400)

si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组PI3K、p-Akt、p-mTOR、LC3-II蛋白相对表达量的比较,经*t*检验,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), si-FAM83B+IGF-1组PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量高于si-FAM83B+PBS组,LC3-II低于si-FAM83B+PBS组。si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组Akt、mTOR蛋白相对表达量比较,经*t*检验,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表8和图7。

2.5 激活PI3K/Akt/mTOR通路可逆转FAM83B敲低诱导的细胞自噬

si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组24 h、48 h、72 h、96 h的OD值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点OD值有差异( $F = 5211.626, P = 0.000$ )。②si-FAM83B+PBS组与si-



1: si-NC组; 2: si-FAM83B组; 3: si-FAM83B+PBS组; 4: si-FAM83B+IGF-1组。

图7 各组细胞PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR和LC3-II蛋白的表达

FAM83B+IGF-1组OD值有差异( $F = 453.499, P = 0.000$ ), si-FAM83B+IGF-1组OD值较高,细胞活力升高。③两组OD值变化趋势有差异( $F = 384.347, P = 0.000$ )。见表9。

si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组细胞凋亡率、侵袭细胞数比较,经*t*检验,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), si-FAM83B+IGF-1组细胞凋亡率低于si-FAM83B+PBS组,侵袭细胞数高于si-

表7 si-NC组与si-FAM83B组PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、LC3-II蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PI3K蛋白	p-Akt蛋白	Akt蛋白	p-mTOR蛋白	mTOR蛋白	LC3-II蛋白
si-NC组	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05
si-FAM83B组	0.42 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.97 ± 0.07	0.15 ± 0.01	0.94 ± 0.05	8.65 ± 0.41
<i>t</i> 值	19.855	20.509	0.475	20.419	1.329	32.402
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.659	0.000	0.255	0.000

表8 si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、LC3-II蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PI3K蛋白	p-Akt蛋白	Akt蛋白	p-mTOR蛋白	mTOR蛋白	LC3-II蛋白
si-FAM83B+PBS组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05
si-FAM83B+IGF-1组	4.77 ± 0.22	5.37 ± 0.29	1.07 ± 0.07	3.07 ± 0.22	1.06 ± 0.06	0.29 ± 0.01
<i>t</i> 值	28.856	25.682	1.221	15.538	1.203	24.834
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.289	0.000	0.295	0.000

表9 si-FAM83B+PBS组与si-FAM83B+IGF-1组不同时间点的OD值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
si-FAM83B+PBS组	0.227 ± 0.020	0.241 ± 0.007	0.552 ± 0.049	0.688 ± 0.049
si-FAM83B+IGF-1组	0.243 ± 0.006	0.396 ± 0.007	0.810 ± 0.031	1.254 ± 0.071

FAM83B+ PBS 组 ( $P < 0.05$ )。见表 10 和图 8、9。

表 10 si-FAM83B+PBS 组与 si-FAM83B+IGF-1 组的细胞凋亡率、侵袭细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率/%	侵袭细胞数/(个/HP)
si-FAM83B+PBS 组	30.005 ± 1.800	38.570 ± 2.314
si-FAM83B+IGF-1 组	10.906 ± 1.309	76.459 ± 9.175
t 值	14.863	6.936
P 值	0.000	0.002

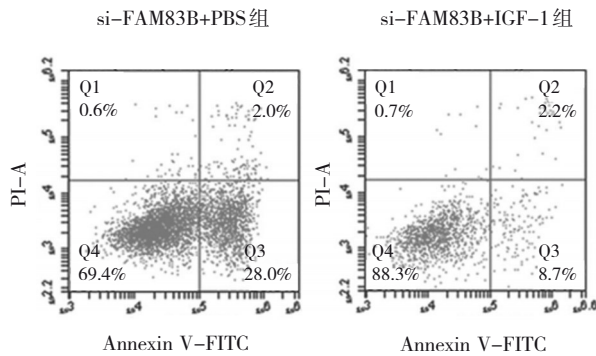


图 8 si-FAM83B+PBS 组与 si-FAM83B+IGF-1 组 HepG2 细胞的流式细胞图

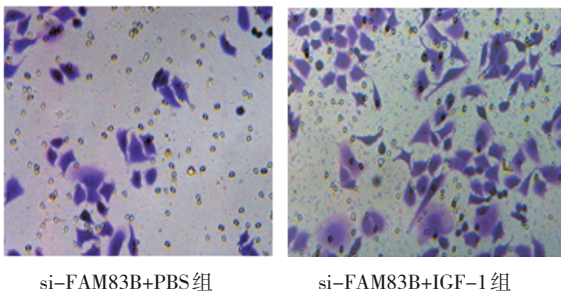


图 9 si-FAM83B+PBS 组与 si-FAM83B+IGF-1 组 HepG2 细胞侵袭能力 ( $\times 400$ )

### 3 讨论

目前关于 FAM83B 参与肿瘤细胞增殖、侵袭的机制依然存在争议, 多项研究证实 FAM83B 在多种肿瘤组织中高表达, 并且是潜在的癌基因<sup>[12-14]</sup>。例如, FAM83B 在肺鳞状细胞癌中表达上调, 可作为肺鳞状细胞癌潜在诊断和预后生物标志物<sup>[12]</sup>; 还有研究发现胃癌组织中 FAM83B 表达水平高于癌旁正常组织<sup>[14]</sup>, 与本研究结果一致。FAM83B 的致癌机制可能与其结构中一个功能未知的高度保守域 DUF1669 有关, 这一保守域在 FAM83B 蛋白介导的致瘤转化中具有至关重要的作用, 并且该功能域可激活多种

信号通路, 参与肿瘤的发生<sup>[15]</sup>。

多种肿瘤的发生与 PI3K/Akt/mTOR 通路激活有关。有研究证实, FAM83B 蛋白结合 PI3K 蛋白后直接激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 导致乳腺癌的发生<sup>[11]</sup>。FAM83B 蛋白可与 p85 $\alpha$ 、p110 $\alpha$ 、Akt 结合, 其中 p85 $\alpha$  和 p110 $\alpha$  是 PI3K 的重要亚单位, 从而促进 p110 $\alpha$  和 Akt 的膜定位, 由此激活下游的 PI3K/Akt 信号通路<sup>[16]</sup>。此外, FAM83B 还可与表皮生长因子受体结合, 促进表皮生长因子的磷酸化和磷脂酶 D 形成<sup>[17]</sup>, 磷脂酶 D 可以促进卵磷脂水解为磷脂酸, 而磷脂酸是 mTOR 信号通路中重要的组成部分。笔者进一步研究了 FAM83B 介导肝癌细胞增殖、侵袭的相关信号通路。Western blotting 检测结果表明, 敲低 FAM83B 降低了 HepG2 细胞中 PI3K、p-Akt、p-mTOR 的表达, 表明敲低 FAM83B 可以沉默肝癌细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路, 进一步证实上述研究结论。自噬是由多个复杂的信号级联触发的, 其中包括 PI3K/Akt/mTOR 通路<sup>[18]</sup>。自噬过程中, LC3-II 是重要的自噬相关蛋白, 参与自噬体的形成<sup>[19]</sup>。本研究结果表明, 敲低肝癌细胞中 FAM83B 可以抑制 LC3-II 的表达, 敲低 FAM83B 可以抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路并促进肝癌细胞的自噬。众所周知, IGF-1 与 IGF-1 受体结合后可激活 PI3K/Akt 信号通路。为进一步证实 PI3K/Akt/mTOR 通路在敲低 FAM83B 诱导的自噬过程中的作用, 本实验用 IGF-1 处理 si-FAM83B 转染的 HepG2 细胞, 结果显示, 经 IGF-1 处理后, si-FAM83B 转染的 HepG2 细胞 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白相对表达量升高。此外, 与 PBS 处理的细胞比较, 用 IGF-1 处理后, si-FAM83B 转染的 HepG2 细胞中 LC3-II 表达降低。本研究结果进一步表明, 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路可以逆转敲低 FAM83B 介导的自噬作用, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制其增殖和侵袭。

综上所述, 本研究首次证明了 FAM83B 在肝癌组织中表达上调, 而敲低 FAM83B 可以通过沉默 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制肝癌细胞增殖、侵袭, 从而促进肝癌细胞的自噬。这些发现有助于更好地了解 FAM83B 在肝癌中的作用, 并且 FAM83B 也可能成为肝癌治疗的潜在靶标。

#### 参 考 文 献 :

[1] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in

- liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 1883-14.
- [2] LI X, RAMADORI P, PFISTER D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(9): 541-557.
- [3] XU F, JIN T Q, ZHU Y W, et al. Immune checkpoint therapy in liver cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 110.
- [4] YUEN V W H, WONG C C L. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5052-5062.
- [5] AMARAVADI R K, KIMMELMAN A C, DEBNATH J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(9): 1167-1181.
- [6] FERRO F, SERVAIS S, BESSON P, et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 129-138.
- [7] KOCATURK N M, AKKOC Y, KIG C, et al. Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 116-137.
- [8] LI X H, HE S K, MA B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [9] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, et al. The PI3K-Akt-mTOR pathway and prostate cancer: at the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4507.
- [10] ALZHRANI A S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 29: 125-132.
- [11] CIPRIANO R, GRAHAM J, MISKIMEN K L S, et al. FAM83B mediates EGFR- and RAS-driven oncogenic transformation[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3197-3210.
- [12] OKABE N, EZAKI J, YAMAURA T, et al. FAM83B is a novel biomarker for diagnosis and prognosis of lung squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 999-1006.
- [13] SHEN C Q, YAN T T, LIU W, et al. High expression of FAM83B predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and correlates with cell cycle and cell proliferation[J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3154-3165.
- [14] XIANG X J, ZHONG R Y, TU Q, et al. Increased expression of FAM83B predicts poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(12): 12492-12501.
- [15] GRANT S. FAM83A and FAM83B: candidate oncogenes and TKI resistance mediators[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3048-3051.
- [16] CIPRIANO R, BRYSON B L, MISKIMEN K L S, et al. Hyperactivation of EGFR and downstream effector phospholipase D1 by oncogenic FAM83B[J]. *Oncogene*, 2014, 33(25): 3298-3306.
- [17] HORNBERGER T A, CHU W K, MAK Y W, et al. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(12): 4741-4746.
- [18] SHAO X H, LAI D, ZHANG L, et al. Induction of autophagy and apoptosis via PI3K/Akt/TOR pathways by azadirachtin A in *Spodoptera litura* cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35482.
- [19] ZHANG B C, ZHANG C W, WANG C, et al. Luteolin attenuates foam cell formation and apoptosis in Ox-LDL-stimulated macrophages by enhancing autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(5): 2065-2076.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 李鲜丽, 范晶华, 晁春梅, 等. FAM83B 对肝癌细胞的作用及机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(20): 33-40.

Cite this article as: LI X L, FAN J H, CHAO C M, et al. Effect of FAM83B on hepatocellular carcinoma cells and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(20): 33-40.