



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.013  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.013  
China Journal of General Surgery, 2024, 33(10):1667-1678.

· 基础研究 ·

# FAM49B在胃癌中的表达及临床意义的生物信息学分析与实验验证

刘坤健, 陈浩

(长江大学附属荆州医院 胃肠外科, 湖北 荆州 434021)

## 摘要

**背景与目的:** 胃癌是一种在全球范围内极为普遍的恶性肿瘤, 其发生率之高使其成为全球癌症死亡的一个重要因素。研究发现, 序列相似性家族49成员B (FAM49B) 在包括胃癌在内的大多数肿瘤中显著上调, 但FAM49B在胃癌发生和发展中的角色, 目前仍然知之甚少。因此, 本研究探讨FAM49B在胃癌中的作用及机制, 以期胃癌的治疗提供新的途径。

**方法:** 基于TCGA和GEO数据库, 进行FAM49B的表达、生存分析、免疫浸润评估、基因集富集及蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析。收集胃癌临床样本, 采用免疫组化、qRT-PCR和Western blot检测FAM49B的表达水平, 并分析其表达与患者临床病理因素的关系。体外实验分析FAM49B在胃癌细胞系中的表达, 并采用CCK-8、EdU、Transwell和流式细胞术分析FAM49B对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及细胞周期的影响。

**结果:** 生物信息学分析显示, FAM49B基因在胃癌的肿瘤组织中呈明显高表达, 同时FAM49B的高表达与M1/M2巨噬细胞极化过程密切相关, FAM49B高表达的胃癌患者预后更好; 富集分析显示, FAM49B高表达组富集于p53信号通路, 而低表达组富集于ERBB信号通路, PPI网络分析显示, FAM49B与FAM49A、ACTN1、THSD4、RAC3、EGFR等蛋白有高度相互作用。在胃癌组织和细胞系中, FAM49B的mRNA和蛋白表达均明显上调 (均 $P<0.05$ ); FAM49B的表达与肿瘤大小及胃癌的浸润深度呈反向关系 (均 $P<0.05$ )。敲除FAM49B基因后, 胃癌细胞的增殖和转移能力明显增强, 而过表达FAM49B后则成反向变化 (均 $P<0.05$ ); 敲除FAM49B的胃癌细胞G<sub>1</sub>期比例明显降低, S期升高, 伴随cyclin E1和cyclin D1蛋白表达下调, 而过表达FAM49B的胃癌细胞G<sub>1</sub>期百分比升高, S期和G<sub>2</sub>期百分比降低, 伴随cyclin E1和cyclin D1蛋白表达上调 (均 $P<0.05$ )。此外, 敲除FAM49B后, 胃癌细胞中N-cadherin、vimentin及c-myc表达上调, p53表达下调, 而过表达FAM49B后, 胃癌细胞中这些蛋白的表达呈反向变化。

**结论:** FAM49B在胃癌中呈现高表达, 但其发挥了抑癌作用。其作用机制可能与调控巨噬细胞极化、上皮-间充质转化以及p53通路有关。

## 关键词

胃肿瘤; FAM49B; 基因, 肿瘤抑制; 计算生物学

中图分类号: R735.2

**基金项目:** 湖北省疾控和医药院校科研专项基金资助项目 (WJ2016-Y-20); 湖北省荆州市医疗卫生科技计划基金资助项目 (2016103)。

**收稿日期:** 2024-08-08; **修订日期:** 2024-10-11。

**作者简介:** 刘坤健, 长江大学附属荆州医院住院医师, 主要从事胃癌诊疗方面的研究。

**通信作者:** 陈浩, Email: chen hao@yangtzeu.edu.cn

## Bioinformatic analysis and experimental validation of FAM49B expression and its clinical significance in gastric cancer

LIU Kunjian, CHEN Hao

(Department of Gastrointestinal Surgery, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434021, China)

### Abstract

**Background and Aims:** Gastric cancer is a highly prevalent malignant tumor worldwide, with a high incidence rate that makes it a significant contributor to global cancer mortality. Studies have found that FAM49B is significantly upregulated in most tumors, including gastric cancer. However, the role of FAM49B in the occurrence and development of gastric cancer remains largely unknown. Therefore, this study explores the role and mechanisms of FAM49B in gastric cancer, aiming to provide new avenues for gastric cancer treatment.

**Methods:** Based on TCGA and GEO databases, the analyses of FAM49B expression, survival, immune infiltration, gene set enrichment, and protein-protein interaction (PPI) networks were conducted. Gastric cancer clinical samples were collected, and immunohistochemistry, qRT-PCR, and Western blot were used to assess FAM49B expression levels and analyze their relationship with patients' clinicopathological factors. In vitro experiments analyzed FAM49B expression in gastric cancer cell lines, using CCK-8, EdU, Transwell, and flow cytometry assays to examine the effects of FAM49B on gastric cancer cell proliferation, migration, invasion, and cell cycle process.

**Results:** Bioinformatic analysis showed that FAM49B was significantly overexpressed in gastric cancer tumor tissues, with high FAM49B expression closely related to M1/M2 macrophage polarization, and patients with high FAM49B expression in gastric cancer had better prognosis. Enrichment analysis revealed that the high FAM49B expression group was enriched in the p53 signaling pathway, while the low FAM49B expression group was enriched in the ERBB signaling pathway. PPI network analysis indicated a strong interaction between FAM49B and proteins such as FAM49A, ACTN1, THSD4, RAC3, and EGFR. In both gastric cancer tissues and cell lines, FAM49B mRNA and protein expression were significantly upregulated (both  $P < 0.05$ ). FAM49B expression showed an inverse correlation with tumor size and gastric cancer invasion depth (both  $P < 0.05$ ). After FAM49B knockdown, gastric cancer cell proliferation and migration abilities significantly increased, while FAM49B overexpression had the opposite effect (both  $P < 0.05$ ). Knockdown of FAM49B reduced the percentage of cells in G<sub>1</sub> phase and increased the percentage in S phase, accompanied by downregulated expression of cyclin E1 and cyclin D1, while FAM49B overexpression led to an increase in G<sub>1</sub> phase cells and a decrease in S and G<sub>2</sub> phase cells, with upregulation of cyclin E1 and cyclin D1 (both  $P < 0.05$ ). Additionally, after FAM49B knockdown, N-cadherin, vimentin, and c-myc expression increased, while p53 expression decreased, whereas FAM49B overexpression produced the opposite effect on these proteins in gastric cancer cells.

**Conclusions:** FAM49B is highly expressed in gastric cancer but exhibits tumor-suppressing effects. Its mechanisms may be related to the regulation of macrophage polarization, epithelial-mesenchymal transition, and the p53 pathway.

### Key words

Stomach Neoplasms; FAM49B; Genes, Tumor Suppressor; Computational Biology

**CLC number:** R735.2

胃癌是消化道系统中一类常见的恶性肿瘤，其全球范围内的发病率与致死率均居高不下，据统

计<sup>[1-2]</sup>，该疾病已成为全球范围内导致癌症患者死亡的四大主要原因之一，其严重性不容忽视。早期胃

癌患者往往缺乏显著的临床表现,若忽视其早期发现与及时干预,极易发展至肿瘤晚期。众所周知,晚期胃癌的预后普遍较差,其病情复杂且治疗难度较大,往往给患者及家庭带来沉重的心理负担和经济压力。据文献<sup>[3]</sup>报道,胃癌根治术后的复发率可超过40%。因此,迫切需要探索更为高效的靶向性肿瘤标志物,以期为胃癌的治疗开辟新的途径。

序列相似性家族49(FAM49)成员B(FAM49B)基因是FAM49基因家族的一员,广泛存在于脊椎动物中<sup>[3]</sup>。FAM49基因家族拥有DUF1394的转换域,前期研究发现FAM49B与CYFIP蛋白相关,可直接与RAC1蛋白相互作用,对RAC1信号通路产生负调控<sup>[4-5]</sup>。因此,FAM49B也更为与CYFIP相关的RAC1 interactor B(CYRI-B),以便显示FAM49B的主要功能。然而,关于FAM49B在肿瘤中的作用少有研究。泛癌分析表明,FAM49B在包括胃癌在内的大多数肿瘤中显著上调<sup>[6]</sup>。Li等<sup>[4]</sup>表明,FAM49B在乳腺癌中过表达,并通过调控Rab10/TL4信号通路促进乳腺癌细胞增殖和转移。在胆囊癌中,FAM49B经由TASP1的激活作用,上调PI3K/Akt信号通路,进而促进肿瘤细胞的增殖与转移<sup>[7]</sup>。在胰腺导管腺癌的研究中,Zhang等<sup>[8]</sup>揭示了FAM49B在肿瘤细胞内的表达受肿瘤微环境的调控,他们发现,当FAM49B被敲除时,会显著增加细胞内的氧化应激水平,这一变化加速了肿瘤的进展,这一结果表明,FAM49B在肿瘤中的高表达可能与肿瘤的进展无正相关关系。此外,笔者观察到FAM49B在胃癌组织及细胞系中存在过表达现象,然而其生物特异性功能仍不明确。

本研究通过生物信息学方法与体外实验分析FAM49B在胃癌中的表达与作用,并探讨可能的机制,以期为胃癌的治疗提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据下载与分析

胃癌中FAM49B的mRNA表达数据从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载。从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)中获取相关的数据集,包括GSE29272、GSE884433以及GSE884437。基于GPL96平台([HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array),分析GSE29272数据集,该数据集涵盖了134例胃癌组织及其对应的癌旁组织样本。使用Kaplan-Meier数据

库(<https://kmplot.com/analysis>)评估FAM49B mRNA表达在胃癌患者中的预后价值,并分析患者的总生存(OS)时间。同时,通过TCGA数据库分析FAM49B表达与泛癌之间的关联性。此外,运用了R包“GSVA”和“immunedeconv”进一步分析FAM49B与M1/M2巨噬细胞在胃癌组织中的相互作用。

### 1.2 临床样本

收集2019—2020年期间在长江大学附属荆州区医院接受胃癌根治术治疗患者的胃癌组织及其配对的癌旁非肿瘤组织样本,共计40对。所有样本均保存在-80℃的冰箱中。样本的采集工作均已经过荆州市中心医院伦理委员会的正式批准(批准号:2023-113-01),并且在采集样本前已获得每例患者的知情同意。患者的基本临床信息见表1。

表1 40例胃癌患者的临床病理特征[n(%)]  
Table 1 Clinicopathological characteristics of 40 gastric cancer patients [n(%)]

特征	数值
性别	
男	23(57.5)
女	17(42.5)
年龄(岁)	
≥60	23(57.5)
<60	17(42.5)
肿瘤大小(cm)	
<5	30(75.0)
≥5	10(25.0)
侵入深度	
T1~T2	17(42.5)
T3~T4	23(57.5)
淋巴结转移	
N0	26(65.0)
N1~N3	14(35.0)
TNM分期	
I~II	29(72.5)
III	11(27.5)
CEA(ng/mL)	
<5	32(80.0)
≥5	8(20.0)
AFP(μg/L)	
<25	37(92.5)
≥25	3(7.5)
CA125(U/mL)	
<35	35(87.5)
≥35	5(12.5)
CA19-9(U/mL)	
<37	34(85.0)
≥37	6(15.0)

### 1.3 方法

**1.3.1 基因集富集分析(GSEA)** 使用GSEA软件(v4.3.2)对GSE884433和GSE884437数据集中的433例胃癌患者进行了GSEA分析以及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,以了解FAM49B高表达组和低表达组中显著富集的基因以及相关信号通路。使用规范途径基因集(C2.CP.kegg\_legacy.v2023.2.hs.symbols.GMT)分析1 000次,以获得标准化富集分数(normalized enrichment score, NES),以NES>1、P<0.05作为筛选阈值。

**1.3.2 蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建** 使用STRING数据库预测PPI并构建PPI网络<sup>[9]</sup>。PPI网络可以以图片的形式直接下载。置信度设定为0.400,并设置10个关联因子作为筛选的阈值。

**1.3.3 免疫组化** 将胃癌组织及其配对的癌旁组织固定于4%聚甲醛溶液中,石蜡包埋处理,将包埋后的组织样本精确切割成5 μm的薄片,以备后续分析使用。以1:100稀释的FAM49B一抗(Santacruz, sc-390478)孵育切片,随后用HRP标记的山羊抗小鼠抗体(Abcam, ab6789)孵育。将染色的载玻片扫描入计算机,用CaseViewer软件(v2.4.0)查看和分析。结果判断标准根据着色强度(0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为褐色,黑色)与阳性细胞比例(阳性细胞数目所占比例<5%为0分,阳性细胞所占比例5%~25%为1分,阳性细胞数>25%~50%为2分,阳性细胞数>50%~75%为3分,阳性细胞数所占比例>75%为4分),两种积分之和总分≤3分为阴性,>3分为阳性。

**1.3.4 细胞培养和瞬时转染** 人细胞系AGS和HGC27购自中国科学院细胞库,GES-1、MKN28和MKN45由南京医科大学第二附属医院中心实验室提供。将GES-1、AGS和HGC27细胞系保存在含有10%胎牛血清(Vazyme)的RPMI 1640培养基(Gibco)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱中进行培养。在含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基(Gibco)中以相同条件培养MKN28和MKN45细胞系。细胞每2~3天传代1次,培养基更换的频率为每2天更换1次。特异性靶向FAM49B(si-FAM49B)的小干扰RNA(siRNA)、阴性对照siRNA(si-NC)以及过表达FAM49B的质粒均购自

南京普诺恩生物技术有限公司。当细胞密度生长至50%~70%时,使用Lipofectamine 3000(Invitrogen)将指定量的RNA或质粒转染入细胞。每个细胞实验都经过3次重复实验,以确保结果稳定。si-FAM49B序列(5'→3'):GCA GCU AAU UAU GCA UUG CAU TT;si-NC序列(5'→3'):UUC UCC GAA CGU GUC CGU TT。

**1.3.5 总RNA提取及qRT-PCR** 使用TRIzol试剂(Invitrogen)和SteadyPure RNA提取试剂盒(Quantity Biology, #AG21024),从各组织样本和细胞样本中各取30 mg提取总RNA。使用One Drop OD-1 000分光光度计检测RNA的浓度和质量,A<sub>260/280</sub>比值在1.8~2.0范围内。然后,使用Hiscript III逆转录酶(Vazyme)在20 μL反应混合物中将1 000 ng RNA转化为cDNA。逆转录反应程序设定为50℃15 min,85℃5 s。使用LightCycler 480实时PCR检测系统(Roche)和ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)进行qRT-PCR。无模板对照(NTC)扩增无Cq值。表2中所列的基因特异性引物的扩增子长度设计为约100 bp,并使用NCBI blast进行确认。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法以β-actin或GAPDH为内参计算FAM49B的相对表达量。保留了每次qPCR检测值,有效率为90%~110%,R<sup>2</sup>≥0.99。每个样本都经过2~3次重复实验,以确保结果稳定。

表2 qRT-PCR引物  
Table 2 qRT-PCR primers

引物	序列(5'→3')
β-actin	
正向	ATC GTG CGT GAC ATT AAG GAG AAC
反向	AGG AAG GAA GGC TGG AAG ACT G
GAPDH	
正向	TCA ACG GAT TTG GTC GTA TTG
反向	TGG GTG GAA TCA TAT TGG AAC
FAM49B	
正向	CTC AAG ATG ACA AAT CCT GC
反向	CCG GTA CAT TGT TAA TCC TC

**1.3.6 Western blot分析** 总蛋白用含1%PMSF的RIPA裂解缓冲液从胃癌细胞或组织中提取。然后使用BCA试剂盒(Vazyme)测定蛋白浓度。用10%~12.5%SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad)分离出10~20 μg的蛋白质样本,并转移到聚偏二氟乙烯膜(Millipore)上。室温下用5%非脂乳或5%BSA封闭

2 h, 在4 °C下与下列主要抗体孵育过夜; 然后, 将膜与山羊抗兔IgG (SAB, #L3012, 1:5 000) 或山羊抗小鼠IgG (SAB, #L3032, 1:5 000) 在室温下孵育1 h, 用TBST洗涤3次, 每次30 min。最后, 使用Superemto ECL化学发光试剂盒 (Vazyme) 和Image J软件对蛋白条带进行成像和分析。一抗 $\beta$ -actin (适马, #5441, 1:5 000)、GAPDH (Abcam, ab8245, 1:5 000)、FAM49B (Santacruz, sc-390478, 1:1 000)、c-myc (Abcam, ab32072, 1:1 000)、p53 (Proteintech, 1 048)。

**1.3.7 CCK-8测定** 胃癌细胞转染48 h后, 采用无血清培养基或含有1%血清的培养基来制备细胞悬液。随后, 将每孔以 $2 \times 10^3$ 个细胞接种至96孔板中, 确保细胞分布均匀。培养24 h后, 改用含有10%血清的培养基进行培养。随后, 在0、24、48、72、96 h的时间点, 向每孔中加入10  $\mu$ L CCK-8试剂 (Vazyme)。使用酶标仪 (BioTek) 在450 nm的波长下测量细胞吸光度。每个样本都经过3次重复实验, 以确保结果稳定。

**1.3.8 EdU测定** 将无血清培养基的细胞悬液以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞接种至48孔板内。培养24 h后, 用含10%血清的培养基替换每孔的培养基。当细胞密度达到80%时, 向每孔中加入EdU并孵育2 h。随后, 使用4%的聚甲醛在室温条件下对细胞进行30 min的固定处理。利用含有0.3% Triton X-100的PBS溶液对细胞进行15 min的破膜操作。制备Edu反应溶液, 并在黑暗中孵育细胞30 min。最后, 用Hoechst工作液对细胞核染色10 min, 然后用荧光显微镜观测。

**1.3.9 流式细胞术检测** 使用0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液收集转染后的细胞, 使用低温PBS进行洗涤处理。然后用预冷的75%乙醇溶液在4 °C下固定细胞过夜。使用PBS洗涤细胞2次后, 取适量的碘化丙锭染色 (PI) 溶液在黑暗中孵育细胞30 min。通过流式细胞术 (BD Biosciences) 评估细胞周期。每个样本都经过2~3次重复实验, 以确保结果稳定。

**1.3.10 Transwell 细胞迁移和侵袭实验** 对于Transwell迁移实验, 将转染后的胃癌细胞收集在无血清培养基中, 并以 $2.5 \times 10^5$ /mL的密度接种至上室 (Corning); 将0.75 mL含有10%血清的培养基注入下室, 约24 h后, 将下室中的细胞用4%聚甲醛

室温固定30 min, 然后用0.1%结晶紫在暗处染色20 min。接下来, 用纯水洗涤下室并干燥后进行成像。为了评估细胞的侵袭能力, 在收集并处理细胞之前, 将上室的底部均匀地涂抹一层经过适当稀释的基质胶。后续操作步骤均按上述流程继续进行。每个样本都经过2~3次重复实验, 以确保结果稳定。

## 1.4 统计学处理

统计分析使用SPSS 23.0和GraphPad Prism 8.0进行。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较 *t* 检验; 计数资料以例数 (百分比) [*n* (%)]表示, 组间比较采用 $\chi^2$ 检验。用Kaplan-Meier法绘制OS曲线, R语言软件用于绘制相关图表。*P*<0.05为差异有统计学意义。

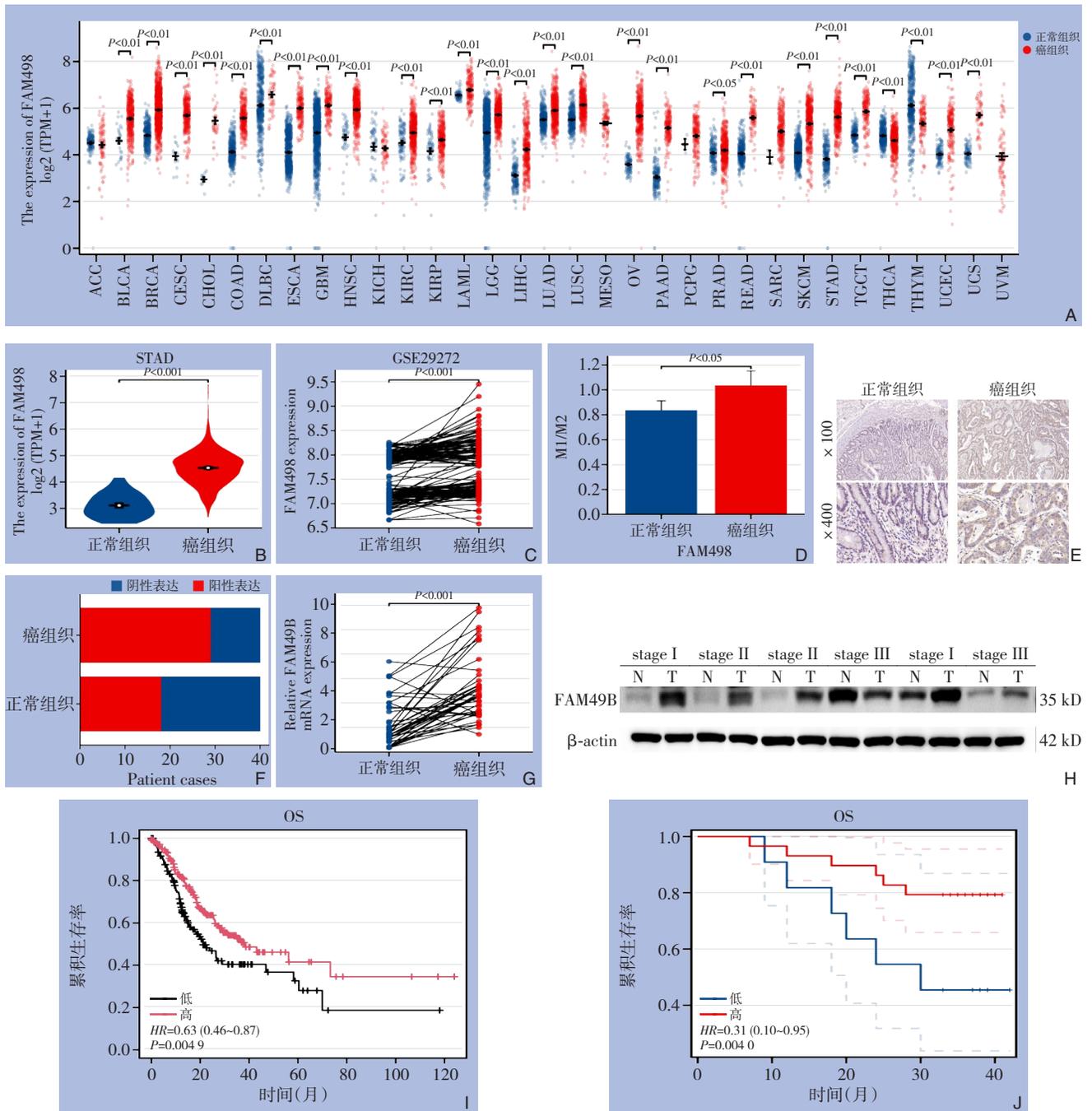
## 2 结果

### 2.1 胃癌中FAM49B表达与预后相关

利用TCGA和GSE29272数据库评估了FAM49B在胃癌中的表达, 发现其在胃癌组织中明显上调 (均 *P*<0.05) (图1A-C)。免疫浸润分析显示, FAM49B高表达可能促进M2型巨噬细胞向M1型极化, 具有潜在的抗肿瘤作用 (图1D)。40对临床标本的qRT-PCR、Western blot和免疫组化结果显示, FAM49B在胃癌组织中高表达 (图1E-G)。进一步的Kaplan-Meier生存分析和TCGA数据表明, FAM49B高表达的胃癌患者预后更好 (图1H-J)。临床病理因素分析结果显示, FAM49B表达与肿瘤大小和浸润深度呈反向关系 (均 *P*<0.05) (表3)。

### 2.2 FAM49B在胃癌中的潜在作用机制预测

基于FAM49B在Kaplan-Meier数据库中对胃癌患者预后具有统计学意义, 因此对GSE884433和GSE884437数据集进行了GSEA分析。结果显示, FAM49B高表达组富集于p53信号通路 (NES=-1.43, *P*<0.05) (图2A), 而低表达组富集于ERBB信号通路 (NES=1.60, *P*<0.05) (图2B)。利用STRING数据库的PPI网络分析, 发现FAM49B与FAM49A、ACTN1、THSD4、RAC3、EGFR等蛋白有高度相互作用 (图2C)。其中, EGFR在ERBB信号通路中发挥关键作用, 进一步验证了FAM49B在胃癌发展过程中具有负调控作用。



**图 1 FAM49B在胃癌中的表达及意义** A: TCGA 数据库分析FAM49B在不同肿瘤类型中的表达水平; B: TCGA 数据库中 FAM49B在胃癌组织和癌旁组织中的表达; C: GEO 数据库中GSE29272数据集配对分析FAM49B在胃癌组织及癌旁组织中的表达; D: TCGA 数据库中FAM49B高低表达与M1/M2之间的关系; E-F: 免疫组化分析FAM49B在临床样本中的表达; G: qRT-PCR 检测FAM49B在胃癌组织及癌旁组织中的表达; H: Western blot 检测FAM49B在不同病理分期患者中蛋白表达水平; I: Kaplan-Meier 数据库分析FAM49B表达与患者预后的关系; J: TCGA 数据库分析FAM49B表达与患者预后的关系

**Figure 1 Expression and significance of FAM49B in gastric cancer** A: Analysis of FAM49B expression levels across various tumor types in the TCGA database; B: Expression of FAM49B in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues in the TCGA database; C: Paired analysis of FAM49B expression in gastric cancer and adjacent tissues using the GSE29272 dataset from the GEO database; D: Relationship between high and low FAM49B expression and M1/M2 macrophage polarization in the TCGA database; E-F: Immunohistochemical analysis of FAM49B expression in clinical samples; G: qRT-PCR analysis of FAM49B expression in gastric cancer and adjacent tissues; H: Western blot analysis of FAM49B protein expression levels in patients with different pathological stages; I: Kaplan-Meier database analysis of the relationship between FAM49B expression and patient prognosis; J: TCGA database analysis of the relationship between FAM49B expression and patient prognosis

表 3 FAM49B与临床病理特征的关系[n (%) ]

Table 3 Relationship between FAM49B and clinicopathological characteristics [n (%)]

临床病理特征	阳性(n=29)	阴性(n=11)	P	临床病理特征	阳性(n=29)	阴性(n=11)	P
性别				CEA(ng/mL)			
男	18(62.1)	5(45.5)	0.555	<5	23(79.3)	9(81.8)	1.000
女	11(37.9)	6(54.5)		≥5	6(20.7)	2(18.2)	
年龄(岁)				AFP(μg/L)			
≥60	16(55.2)	7(63.6)	0.900	<25	28(96.6)	9(81.8)	0.178
<60	13(44.8)	4(36.4)		≥25	1(3.4)	2(18.2)	
肿瘤大小(cm)				CA125(U/mL)			
<5	25(86.2)	5(45.5)	0.025	<35	26(89.7)	9(81.8)	0.894
≥5	4(13.8)	6(54.5)		≥35	3(10.3)	2(18.2)	
侵入深度				CA19-9(U/mL)			
T1~T2	16(55.2)	1(9.1)	0.023	<37	27(93.1)	7(63.6)	0.067
T3~T4	13(44.8)	10(90.9)		≥37	2(6.9)	4(36.4)	
淋巴结转移				根治性手术后复发			
N0	20(69.0)	6(54.5)	0.629	无复发	23(79.3)	5(45.5)	0.089
N1~N3	9(31.0)	5(45.5)		复发	6(20.7)	6(54.5)	
TNM分期							
I~II	23(79.3)	6(54.5)	0.321				
III	6(20.7)	5(45.5)					

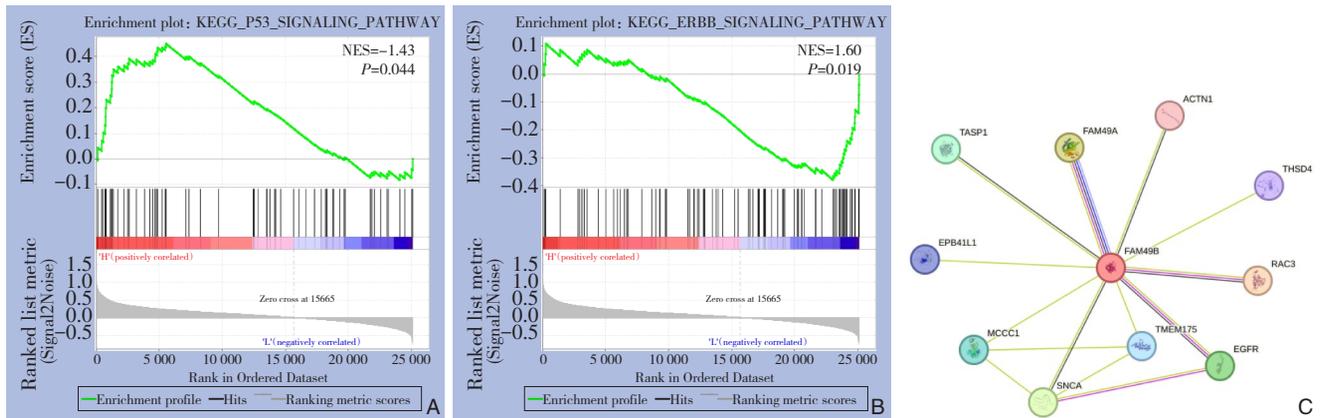


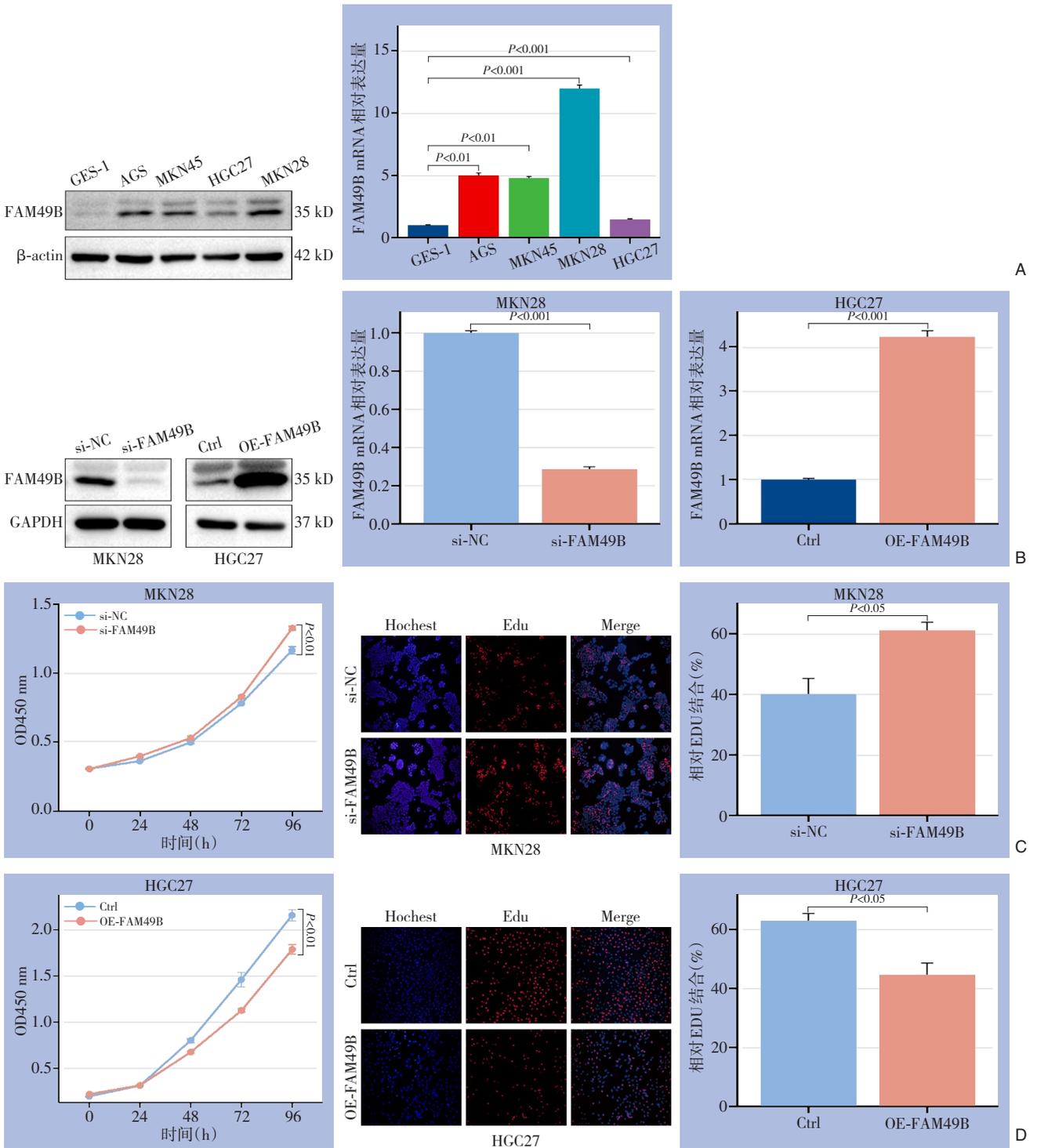
图 2 GSE884433 与 GSE884437 数据集预测 FAM49B 在胃癌中的潜在机制 A: 在 FAM49B 高表达组中调控靶点为 p53 信号通路; B: 在 FAM49B 低表达组中调控靶点为 ERBB 信号通路; C: FAM49B 的 PPI 网络

Figure 2 Predicted potential mechanisms of FAM49B in gastric cancer using GSE884433 and GSE884437 datasets A: Regulatory target in the high FAM49B expression group is the p53 signaling pathway; B: Regulatory target in the low FAM49B expression group is the ERBB signaling pathway; C: PPI network of FAM49B

### 2.3 FAM49B 对于胃癌细胞增殖能力的影响

检测 FAM49B 在多种胃癌细胞系中的表达, 发现其在 AGS、MKN45、HGC27 和 MKN28 细胞系中明显上调, 其中 MKN28 表达最高, HGC27 最低 (图 3A)。因此, 选择 MKN28 和 HGC27 细胞进行功能实验。通过在 MKN28 细胞中使用 siRNA 抑制

FAM49B 表达, 在 HGC27 细胞中过表达 FAM49B (图 3B), 并利用 CCK-8 和 EdU 分析评估细胞增殖。结果显示, 敲除 FAM49B 增强了 MKN28 细胞的增殖能力 (图 3C), 而过表达 FAM49B 明显抑制了 HGC27 细胞的增殖 (图 3D) (均  $P < 0.05$ )。



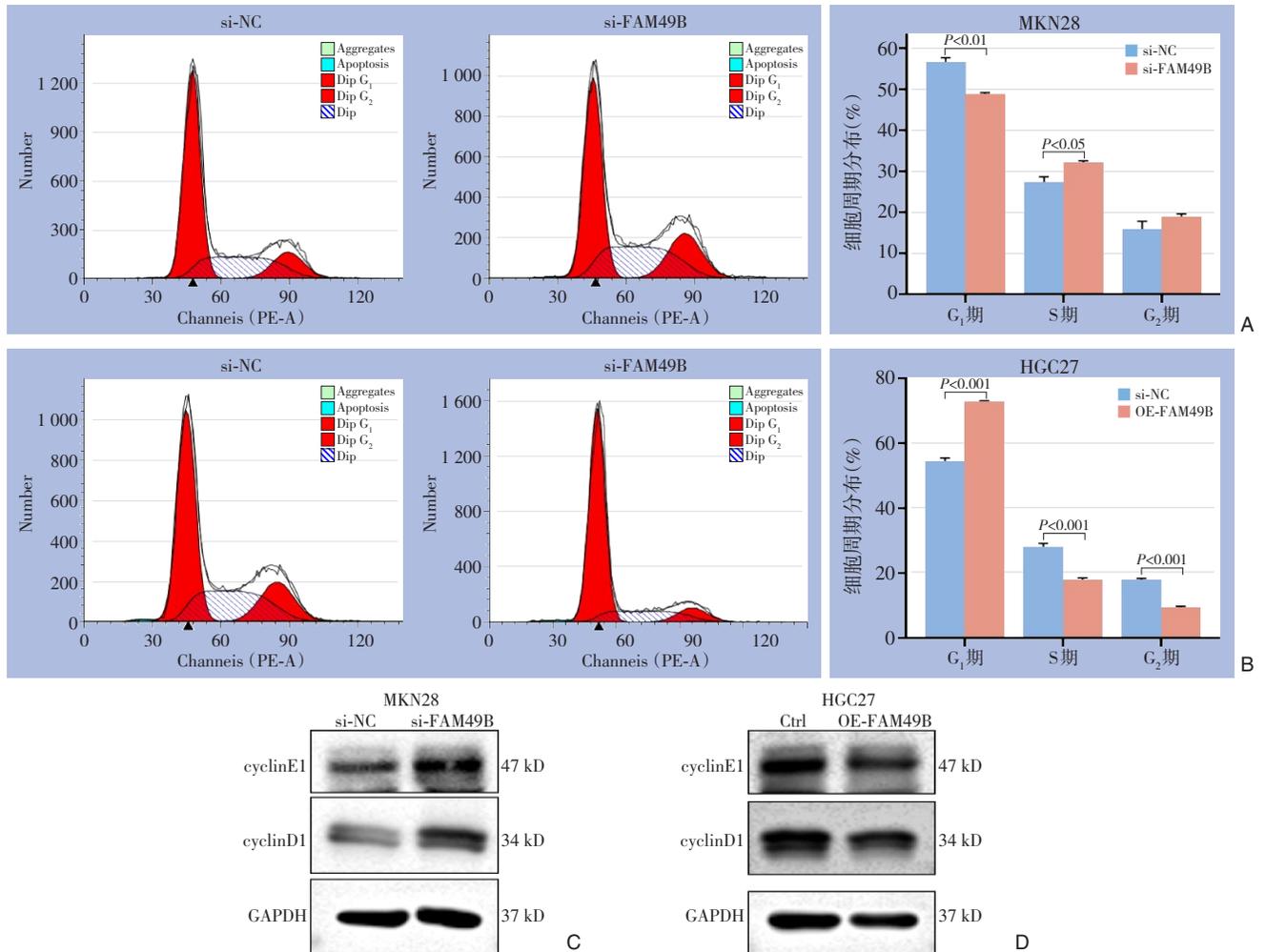
**图3 FAM49B在胃癌细胞系的表达以及与胃癌细胞增殖的关系** A: 正常胃黏膜细胞系GES-1和胃癌细胞系中FAM49B蛋白与mRNA的表达情况; B: FAM49B蛋白与mRNA在MKN28细胞中的敲除效率和在HGC27细胞中的过表达效率; C: FAM49B敲除后, MKN28细胞增殖能力的变化; D: 过表达FAM49B后, HGC27细胞增殖能力的变化

**Figure 3 Expression of FAM49B in gastric cancer cell lines and its relationship with gastric cancer cell proliferation** A: Expression levels of FAM49B protein and mRNA in the normal gastric mucosal cell line GES-1 and gastric cancer cell lines; B: Knockdown efficiency of FAM49B protein and mRNA in MKN28 cells and overexpression efficiency in HGC27 cells; C: Changes in proliferation ability of MKN28 cells after FAM49B knockdown; D: Changes in proliferation ability of HGC27 cells after FAM49B overexpression

### 2.4 FAM49B与细胞周期进程的关系

流式细胞术结果显示, 敲除 FAM49B 使 MKN28 细胞 G<sub>1</sub> 期比例明显降低, S 期升高 (图 4A); 相反, 过表达 FAM49B 明显增加了 G<sub>1</sub> 期 HGC27 细胞的百分比, 而降低了 S 期和 G<sub>2</sub> 期的百分比 (图 4B) (均

$P < 0.05$ )。这表明敲除 FAM49B 促进细胞周期进程, 过表达则导致 G<sub>1</sub>/S 期停滞。Western blot 分析进一步证实, 敲除 FAM49B 后, cyclin E1 和 cyclin D1 的表达水平升高; 过表达 FAM49B 则使这些蛋白的表达下降 (图 4C-D), 支持了流式细胞术的结果。



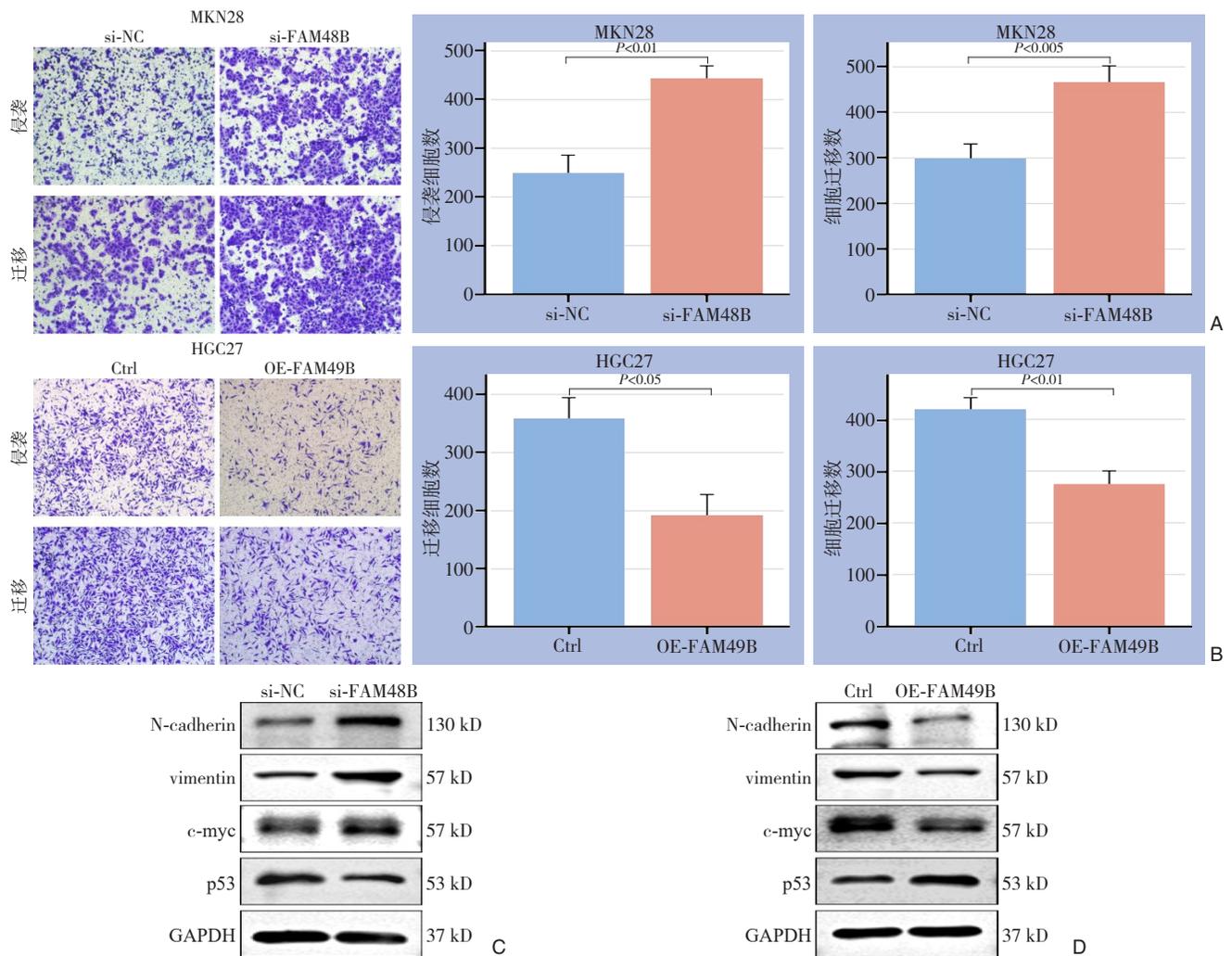
**图 4 FAM49B与细胞周期进程的关系** A: 敲低 FAM49B 促进 MKN28 细胞的细胞周期; B: 过表达 FAM49B 抑制 HGC27 细胞的细胞周期; C: FAM49B 敲低下调 MKN28 细胞中 cyclin E1 和 cyclin D1 蛋白表达水平; D: 过表达 FAM49B 上调 HGC27 细胞中 cyclin E1 和 cyclin D1 蛋白表达水平

**Figure 4 Relationship between FAM49B and cell cycle progression** A: FAM49B knockdown promotes cell cycle progression in MKN28 cells; B: FAM49B overexpression inhibits cell cycle progression in HGC27 cells; C: FAM49B knockdown downregulates cyclin E1 and cyclin D1 protein expression levels in MKN28 cells; D: FAM49B overexpression upregulates cyclin E1 and cyclin D1 protein expression levels in HGC27 cells

### 2.5 FAM49B与胃癌细胞的迁移和侵袭以及上皮-间充质转化(EMT)与p53通路的关系

采用 Transwell 法评估了 FAM49B 对胃癌细胞迁移和侵袭能力, 结果显示, 在敲除 FAM49B 后, MKN28 细胞的迁移和侵袭能力明显增强, 而过表达 FAM49B 后, HGC27 细胞的迁移和侵袭能力明显减弱 (均  $P < 0.05$ ) (图 5A-B)。鉴于 EMT 在肿瘤转移中的关键作用, 以及 GSEA 富集分析显示, 在

FAM49B 高表达组中, p53 信号通路可能被激活。因此, 本研究继续分析了 FAM49B 与 EMT 以及 p53 信号通路蛋白的关系。结果显示, 敲除 FAM49B 后, MKN28 细胞中 N-cadherin 和 vimentin 的表达明显增加, 同时 c-myc 表达上调, p53 表达下调; 相反, 过表达 FAM49B 使 HGC27 细胞中这些蛋白的表达呈反向变化 (图 5C-D)。



**图5 FAM49B与胃癌细胞的迁移、侵袭以及EMT与p53通路的关系** A: 敲低FAM49B后, MKN28细胞迁移和侵袭能力的变化; B: 过表达FAM49B后, HGC27细胞迁移和侵袭能力的变化; C: 敲低FAM49B后, MKN28细胞中EMT相关蛋白与p53通路蛋白表达的变化; D: 过表达FAM49B后, HGC27细胞中EMT相关蛋白与p53通路蛋白表达的变化

**Figure 5 Relationship between FAM49B and migration, invasion, EMT, and p53 pathway in gastric cancer cells** A: Changes in migration and invasion abilities of MKN28 cells after FAM49B knockdown; B: Changes in migration and invasion abilities of HGC27 cells after FAM49B overexpression; C: Changes in expression of EMT-related proteins and p53 pathway proteins in MKN28 cells after FAM49B knockdown; D: Changes in expression of EMT-related proteins and p53 pathway proteins in HGC27 cells after FAM49B overexpression

### 3 讨论

本研究发现, FAM49B在胃癌组织中高表达,且其高表达与肿瘤浸润深度、肿瘤大小及预后密切相关。这一发现与以往关于FAM49B在其他肿瘤中的研究结果一致<sup>[6,10]</sup>。尽管FAM49B在乳腺癌、胆囊癌等肿瘤中被证实具有促癌作用<sup>[4,8]</sup>,但在胃癌中却呈现出抑癌基因的特征。公共数据库的泛癌分析显示, FAM49B在大部分消化道恶性肿瘤中表现出显著过表达的现象<sup>[6,11]</sup>。然而, FAM49B在不同类型的肿瘤中展现出的功能可能会存在显著的

差异性。已有研究发现FAM49B在乳腺癌、胆囊癌和肝细胞癌的进程中发挥了促进作用<sup>[4,8,12]</sup>,却在胰腺癌中展现出肿瘤抑制效应<sup>[3]</sup>。Yuki等<sup>[7]</sup>进一步揭示了FAM49B的缺失能够引发HeLa细胞的细胞骨架发生重组,同时加速并扰乱中性粒细胞的迁移模式。Chen等<sup>[10]</sup>发现,敲除FAM49B通过下调cyclin D1表达来抑制HEK293T细胞增殖。近期研究发现,在胃癌中FAM49B的表达上调与中分化和高分化的肿瘤类型有关<sup>[13-14]</sup>。

在GEO数据库方面,本研究尝试使用多个胃癌数据集对FAM49B的临床预后进行分析,最终发

现FAM49B的表达跟胃癌预后呈负相关。以往关于FAM49B作用机制的研究主要集中在Rac1信号通路和肌动蛋白动力学方面<sup>[7,15-17]</sup>,但最近的研究发现FAM49B可通过调节线粒体氧化应激来影响肿瘤的发生和发展<sup>[3,12]</sup>。在Yoon队列(GSE84433和GSE84437)中对FAM49B进行了GSEA分析,结果显示FAM49B在胃癌中的功能包括p53信号通路和ERBB信号通路。随后,利用STRING数据库筛选了与FAM49B相互作用的关键蛋白,结果显示,ERBB受体家族中的成员EGFR可能是FAM49B的一个重要交互因子。HER-2(即ERBB2)作为胃癌靶向治疗的关键靶点之一,同样属于ERBB受体家族的重要成员<sup>[18-19]</sup>。因此,FAM49B与ERBB信号通路的关系是今后研究关注的重点。

FAM49B的表达对胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭具有显著影响。敲除FAM49B显著增强了胃癌细胞的增殖和迁移能力,而过表达FAM49B则有效抑制了这些过程,这与Liu等<sup>[20]</sup>体现的FAM49B通过激活Rac1-STAT3通路促进胃癌细胞迁移和侵袭的机制类似,进一步表明FAM49B在胃癌中发挥了抑制细胞增殖和迁移的作用。说明FAM49B在胃癌中发挥了抑制细胞增殖和迁移的作用,这与先前研究发现FAM49B可以通过抑制细胞周期相关蛋白cyclin E1和cyclin D1的表达来阻止细胞进入S期的结果相一致<sup>[10,21]</sup>。进一步说明FAM49B在胃癌中可能通过调控细胞周期相关基因来限制肿瘤细胞的增殖。基于这些发现,笔者推测FAM49B不仅在细胞迁移和侵袭过程中发挥抑制作用,还可能通过调控细胞周期途径在胃癌中阻止细胞过度增殖。这种多层面的调控作用凸显了FAM49B作为潜在的肿瘤抑制因子的研究价值,并为进一步探索其在胃癌治疗中的应用前景提供了重要依据。

GSEA分析显示,FAM49B的高表达与p53信号通路的激活相关,而低表达则与ERBB信号通路相关联。这表明FAM49B可能通过调控p53信号来发挥其抑癌作用。此外,Western blot分析结果进一步证实,FAM49B的高表达能够上调p53的表达水平,并抑制c-myc的表达,这表明FAM49B在胃癌中的作用可能与这些关键信号通路密切相关。p53是一个重要的肿瘤抑制因子,其上调通常伴随着肿瘤细胞的生长抑制和凋亡增加<sup>[22-23]</sup>,而c-myc则是公认的致癌基因,其过表达与胃癌细胞的快速增殖和恶性表型密切相关<sup>[24-25]</sup>。

本研究还发现,FAM49B的高表达与M1型巨噬细胞的增加密切相关,而M1型巨噬细胞具有抗肿瘤作用<sup>[26-27]</sup>。FAM49B可能通过调控巨噬细胞极化,进而影响肿瘤免疫微环境的变化。免疫微环境在肿瘤发生和发展的过程中扮演着越来越重要的角色<sup>[28]</sup>,调控肿瘤免疫微环境能够显著影响肿瘤的治疗反应和预后<sup>[29-30]</sup>。因此,FAM49B在肿瘤免疫中的作用值得进一步研究。

综上所述,通过综合应用生物信息学分析与体外实验,本研究揭示了FAM49B可能为抑癌基因,该基因在胃癌患者的预后评估中展现出重要的潜在价值。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:刘坤健负责实验实施,生物信息学分析,做图,文稿撰写;陈浩负责课题设计、指导,文稿校对。

#### 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1):7-33. doi:10.3322/caac.21654.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [3] Agnes A, Biondi A, Persiani R, et al. Development of the PERI-Gastric (Peritoneal Recurrence Index) and PERI-Gram (Peritoneal Recurrence Index NomoGRAM) for predicting the risk of metachronous peritoneal carcinomatosis after gastrectomy with curative intent for gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25(3):629-639. doi:10.1007/s10120-021-01268-4.
- [4] Li Y, Xiong Y, Wang Z, et al. FAM49B promotes breast cancer proliferation, metastasis, and chemoresistance by stabilizing ELAVL1 protein and regulating downstream Rab10/TLR4 pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):534. doi:10.1186/s12935-021-02244-9.
- [5] Sisario D, Spindler M, Ermer KJ, et al. Differential role of the RAC1-binding proteins FAM49b (CYRI-B) and CYFIP1 in platelets[J]. *Cells*, 2024, 13(4):299. doi:10.3390/cells13040299.
- [6] Xu F, Chen J, Huang D. Pan-cancer analysis identifies FAM49B as an immune-related prognostic maker for hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2022, 13(1):278-289. doi:10.7150/jca.65421.
- [7] Yuki KE, Marei H, Fiskin E, et al. CYRI/FAM49B negatively

- regulates RAC1-driven cytoskeletal remodelling and protects against bacterial infection[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(9): 1516–1531. doi:10.1038/s41564-019-0484-8.
- [8] Zhang Y, Du P, Li Y, et al. TASP1 promotes gallbladder cancer cell proliferation and metastasis by up-regulating FAM49B via PI3K/AKT pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5):739–751. doi:10.7150/ijbs.40516.
- [9] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638–D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000.
- [10] Chen Y, Jiang Y, Lao J, et al. Characterization and functional study of FAM49B reveals its effect on cell proliferation in HEK293T cells[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(2): 388. doi: 10.3390/genes13020388.
- [11] Xi Y, Zhang TG, Sun W, et al. GOLM1 and FAM49B: potential biomarkers in HNSCC based on bioinformatics and immunohistochemical analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15433. doi:10.3390/ijms232315433.
- [12] Huang H, Tsui YM, Ho DWH, et al. LANCL1, a cell surface protein, promotes liver tumor initiation through FAM49B-Rac1 axis to suppress oxidative stress[J]. *Hepatology*, 2024, 79(2):323–340. doi:10.1097/HEP.0000000000000523.
- [13] Pereira BS, Wisnieski F, Calcagno DQ, et al. Genetic and transcriptional analysis of 8q24.21 cluster in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2022, 42(9): 4381–4394. doi: 10.21873/anticancer.15938.
- [14] Chattaragada MS, Riganti C, Sassoe M, et al. FAM49B, a novel regulator of mitochondrial function and integrity that suppresses tumor metastasis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(6):697–709. doi:10.1038/onc.2017.358.
- [15] Yelland T, Le AH, Nikolaou S, et al. Structural basis of CYRI-B direct competition with scar/WAVE complex for Rac1[J]. *Structure*, 2021, 29(3):226–237. doi:10.1016/j.str.2020.11.003.
- [16] Shang W, Jiang Y, Boettcher M, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies FAM49B as a key regulator of actin dynamics and T cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(17): E4051–E4060. doi:10.1073/pnas.1801340115.
- [17] Huang Z, Pu J, Luo Y, et al. FAM49B, restrained by miR-22, relieved hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting TRAF6/IKK signaling pathway in a Rac1-dependent manner[J]. *Mol Immunol*, 2022, 143:135–146. doi:10.1016/j.molimm.2022.01.015.
- [18] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 264–279. doi: 10.3322/caac.21657.
- [19] Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Epidermal growth factor receptor family and its role in gastric cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9:1308. doi:10.3389/fonc.2019.01308.
- [20] Liu G, Xia Y, Wang H, et al. Downregulation of CYRI-B promotes migration, invasion and EMT by activating the Rac1-STAT3 pathway in gastric cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2023, 423(1): 113453. doi:10.1016/j.yexcr.2022.113453.
- [21] Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J]. *Cells*, 2020, 9(12):2648. doi:10.3390/cells9122648.
- [22] Marei HE, Althani A, Afifi N, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):703. doi: 10.1186/s12935-021-02396-8.
- [23] Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(23):5001–5007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0563.
- [24] Zhang L, Hou Y, Ashktorab H, et al. The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 344(1/2):125–135. doi:10.1007/s11010-010-0536-0.
- [25] de Souza CR, Leal MF, Calcagno DQ, et al. MYC deregulation in gastric cancer and its clinicopathological implications[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64420. doi:10.1371/journal.pone.0064420.
- [26] Zhou W, Yang F, Zhang XZ. Roles of M1 macrophages and their extracellular vesicles in cancer therapy[J]. *Cells*, 2024, 13(17): 1428. doi:10.3390/cells13171428.
- [27] Liu J, Geng X, Hou J, et al. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):389. doi:10.1186/s12935-021-02089-2.
- [28] Du Q, An Q, Zhang J, et al. Unravelling immune microenvironment features underlying tumor progression in the single-cell era[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 143. doi: 10.1186/s12935-024-03335-z.
- [29] Xu K, Yu DS, Zhang SW, et al. Deciphering the immune microenvironment at the forefront of tumor aggressiveness by constructing a regulatory network with single-cell and spatial transcriptomic data[J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(1): 100. doi: 10.3390/genes15010100.
- [30] Zhou Z, Wang J, Wang J, et al. Deciphering the tumor immune microenvironment from a multidimensional omics perspective: insight into next-generation CAR-T cell immunotherapy and beyond[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1):131. doi:10.1186/s12943-024-02047-2.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 刘坤健, 陈浩. FAM49B在胃癌中的表达及临床意义的生物信息学分析与实验验证[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(10): 1667–1678. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.013

Cite this article as: Liu KJ, Chen H. Bioinformatic analysis and experimental validation of FAM49B expression and its clinical significance in gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2024, 33(10):1667–1678. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.10.013