

FAM83D 激活 Wnt/ β -catenin 通路对三阴性乳腺癌细胞自噬、迁移和侵袭能力的影响及其作用机制

刘新利¹, 刘改琴², 杨晔¹, 梁茵¹, 孟瑾³

¹北京大学未来技术学院, 北京 100871; ²子洲县中医院检验科, 陕西榆林 718408; ³解放军总医院第八医学中心药剂科, 北京 100091

[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1602.2025.0911

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘新利, 刘改琴, 杨晔, 等. FAM83D 激活 Wnt/ β -catenin 通路对三阴性乳腺癌细胞自噬、迁移和侵袭能力的影响及其作用机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(2): 241-249.

[收稿日期] 2024-10-16 [录用日期] 2025-03-10 [上线日期] 2025-09-11

[摘要] 目的 探讨序列相似性 83 蛋白质家族成员 D(FAM83D) 激活 Wnt/ β -catenin 通路对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞自噬、迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。方法 (1) 基于癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析 TNBC 癌组织中 FAM83D 的表达情况, 及其与患者病理分期和预后的相关性。(2) 采用 qRT-PCR 检测 FAM83D 在 TNBC 细胞系(MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 BT549 细胞)中的表达情况。(3) 取 MDA-MB-231 细胞, 设置 NC 组(转染 NC RNA)、pcDNA 3.1(+)组[转染 pcDNA 3.1(+)-FAM83D 重组质粒]、siRNA 组(转染 FAM83D siRNA), 采用 MDC 法观察细胞自噬情况, Western blotting 检测细胞内自噬相关分子[Beclin1、自噬相关蛋白 5(ATG5)和微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3(LC3)]及 Wnt/ β -catenin 信号通路标志分子[无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3a(Wnt3a)、 β -catenin]的表达, CCK-8 法检测细胞的增殖活力, 划痕愈合实验和 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力。结果 FAM83D 在 TNBC 癌组织和细胞系中的表达水平较癌旁组织和人正常乳腺上皮细胞均明显升高($P < 0.001$), 且在中晚期患者癌组织中的表达水平高于早期患者($P < 0.001$), 并与患者预后呈负相关($P < 0.05$)。FAM83D 基因过表达可明显促进 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬($P < 0.05$), 同时可上调细胞内 Beclin1、ATG5、Wnt3a、 β -catenin 蛋白的表达, 并促进 LC3-I 向 LC3-II 转化($P < 0.05$), 而敲减 FAM83D 基因则可明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬($P < 0.05$), 并降低细胞内 Beclin1、ATG5、Wnt3a、 β -catenin 蛋白的表达, 抑制 LC3-I 向 LC3-II 转化($P < 0.05$)。结论 FAM83D 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 TNBC 细胞的自噬、迁移和侵袭。

[关键词] 三阴性乳腺癌; 序列相似性 83 蛋白质家族成员 D; 自噬; Wnt/ β -catenin 通路; 迁移和侵袭

Effects and underlying mechanisms of FAM83D on autophagy, migration, and invasion of triple-negative breast cancer cells *via* activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway

Liu Xin-Li¹, Liu Gai-Qin², Yang Ye¹, Liang Yin¹, Meng Jin³

¹College of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China

²Department of Clinical Laboratory, Zizhou County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yulin, Shaanxi 718408, China

³Department of Pharmacy, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100891, China

This work was supported by the Innovation Foundation for Doctor Dissertation of Northwestern Polytechnical University (CX2021096)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects and underlying mechanisms of family with sequence similarity 83, member D (FAM83D) on autophagy, migration, and invasion of triple-negative breast cancer (TNBC) cells *via* activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** (1) At the tissue level, the expression of FAM83D in TNBC tissues was analyzed based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and its correlation with patients' pathological stages and prognosis was evaluated. (2) At the cellular level, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of FAM83D in TNBC cell lines

[基金项目] 西北工业大学博士论文创新基金(CX2021096)

[作者简介] 刘新利, 博士研究生, 主要从事肿瘤转移与免疫逃逸机制及其靶向纳米递药系统构建方面的研究

(MDA-MB-231, MDA-MB-468, and BT549 cells). (3) MDA-MB-231 cells were divided into three groups: NC group (transfected with NC RNA), pcDNA 3.1(+) group [transfected with pcDNA 3.1(+)-FAM83D recombinant plasmid], and siRNA group (transfected with FAM83D siRNA). Cell autophagy was observed by monodansylcadaverin (MDC) staining. Western blotting was performed to detect the protein expression of autophagy-related molecules [Beclin1, autophagy-related protein 5 (ATG5), and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)], as well as biomarker molecules of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [Wingless-type MMTV integration site family member 3a (Wnt3a), β -catenin]. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to measure cell proliferation activity. Wound healing assay and Transwell assay were conducted to detect cell migration and invasion abilities. **Results** The expression levels of FAM83D in TNBC tissues and cell lines were significantly higher than those in adjacent non-tumor tissues and normal human breast epithelial cells ($P<0.001$). Moreover, the expression of FAM83D in TNBC tissues from patients with middle and advanced stages was higher than that from patients with early stages ($P<0.001$), and it was negatively correlated with patients' prognosis ($P<0.05$). Overexpression of FAM83D significantly promoted the proliferation, migration, invasion, and autophagy of MDA-MB-231 cells ($P<0.05$), and simultaneously upregulated the protein expression of Beclin1, ATG5, Wnt3a, β -catenin, and also promoted the conversion of LC3-I to LC3-II ($P<0.05$). In contrast, knockdown of FAM83D significantly inhibited the proliferation, migration, invasion, and autophagy of MDA-MB-231 cells ($P<0.05$), reduced the protein expression levels of Beclin1, ATG5, Wnt3a, and β -catenin, and suppressed the conversion of LC3-I to LC3-II ($P<0.05$). **Conclusion** FAM83D may promote autophagy, migration, and invasion of TNBC cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] triple-negative breast cancer; family with sequence similarity 83, member D; autophagy; Wnt/ β -catenin signaling pathway; migration and invasion

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是恶性程度最高的乳腺癌亚型, 具有侵袭性强、复发率高和预后差等特征^[1-2]。临床上该类患者仍以手术联合化疗为主要治疗手段, 但由于存在手术切除病灶局限、化疗耐药等原因, 治疗效果欠佳^[3-4]。近年来研究发现, 基因治疗具有特异性强、效果显著且基本不损伤正常组织和细胞等优势, 成为恶性肿瘤最有前景的治疗策略之一^[5-6]。此外, 研究表明癌基因的异常活化和抑癌基因失活是导致肿瘤发生发展的重要原因^[7]。因此, 深入探究诱导 TNBC 发生发展的分子机制, 寻找有效的新基因治疗靶标, 为其诊治提供科学依据具有重大意义。原癌基因序列相似性 83 蛋白质家族成员 D (family with sequence similarity 83, member D, FAM83D) 被证实在多种恶性肿瘤中表达上调, 并与癌症患者的不良预后密切相关^[8]。Wnt/ β -catenin 信号通路在 FAM83D 介导的肿瘤恶性进程中发挥着重要作用^[9]。研究发现, FAM83D 表达增加可通过激活蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/Wnt/ β -catenin 信号通路促进胶质母细胞瘤的发生、发展^[10]; 在胰腺癌中, FAM83D 高表达可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肿瘤的发展和吉西他滨耐药^[11]; 而胃癌中 FAM83D 的表达上调则可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肿瘤细胞的增殖和转移, 因此 FAM83D 有望作为胃癌患者预后的新型诊断分子之一^[12]。然而, 在 TNBC 的发生发展中, FAM83D 是否参与肿瘤进程, 其机制是否涉及 Wnt/ β -catenin 信号通路, 目前仍未明确。基于此, 本研究通过组织学和细胞学实验深入探究 FAM83D 对 TNBC 恶性进程的影响, 并阐明其潜在

分子机制, 以期为 TNBC 的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 TNBC 细胞系 (MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 BT549 细胞)、人正常乳腺上皮细胞系 (MCF-10A 细胞) 购自中科院上海生物细胞所。其中, MDA-MB-231、MDA-MB-468 细胞采用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)+1% 青霉素-链霉素溶液的杜氏培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 培养; BT549 细胞采用含 10% FBS+10 μ g/ml 胰岛素+1% 青霉素-链霉素溶液的 RPMI-1640 培养基培养; MCF-10A 细胞采用专用培养基 (CM-0525) 培养。TNBC 癌组织和癌旁组织样本均由吉林大学第一附属医院提供, 并于 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。所有患者术前均未接受任何放、化疗。

高糖 DMEM 培养基 (SH30243.01)、青霉素-链霉素溶液 (CA0075)、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffersaline, PBS; P917808) 购自北京绿源伯德生物科技有限公司; FBS (10100147)、0.25% 胰酶 (15050-065) 购自美国 Gibco 公司; Lipo fectamineTM 3000 转染试剂 (L3000015)、Trizol 裂解液 (15596026) 购自美国 Thermo Fisher 公司; FAM83D 过表达 pcDNA 3.1(+) 重组质粒、siRNA 及其空载对照序列由北京擎科生物科技有限公司合成; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8; 10100147)、细胞自噬染色检测试剂盒 (MDC 法; C3018M) 购自北京昌平生物科技有限公司; Transwell 小室 (3422) 购自美国 Corning 公司; Premix 型反转录试剂 (RR036A)、一步法 RT-PCR 试剂盒 (RR096A) 购自日本 TaKaRa 公司; 十二烷基硫酸

钠-聚丙烯酰胺 (sodium salt-polyacrylamide, SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒 (P1200) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; FAM83D 抗体 (ab236882)、Beclin1 抗体 (ab62557)、自噬相关蛋白 5 (autophagy-related protein 5, ATG5) 抗体 (ab199560)、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 抗体 (ab150367)、无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3a (wingless type MMTV integration site family, member 3a, Wnt3a) 抗体 (ab81614)、 β -catenin 抗体 (ab68183)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH) 抗体 (ab8245) 购自英国 Abcam 公司; XAV939 (S1180) 购自美国 Selleck 公司。

1.2 癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中 FAM83D 的表达分析 从 TCGA 数据库 (<http://gdac.broadinstitute.org>)^[13] 中下载 TNBC 患者癌组织和癌旁组织样本的基因表达数据, 采用 R-studio 软件分析 FAM83D 的表达水平。

1.3 免疫组化染色检测 FAM83D 的表达情况 将 1.1 中收集的 TNBC 癌组织和癌旁组织石蜡样本切片后, 依次经二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化、抗原修复后, 滴加 FAM83D 抗体 (1:100) 室温孵育 1 h, 随后滴加适量辣根过氧化物酶标记二抗 (1:1000) 室温孵育 30 min, 滴加 DAB 显色液室温孵育 1~5 min, 苏木精复染、脱水、透明和封片, 显微镜下观察 FAM83D 的表达情况并拍照。

1.4 qRT-PCR 检测 FAM83D mRNA 的表达 收集对数生长期的 TNBC 细胞系及其对照 MCF-10A 细胞系, 加入 Trizol 提取总 RNA, 采用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度, 按照 Premix 型反转录试剂说明书反转录为 cDNA, 并按照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增, 扩增体系为 20 μ l: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 45 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因定量。引物序列: FAM83D, 正向 5'-AGAGCG-GCAATTCCTTCG-3', 反向 5'-TGCCAGAATGAA-GGCCAAGG-3'; GAPDH, 正向 5'-GCCGCATCTTC-TTTTTCGTCGC-3', 反向 5'-TCCCGTTCTCAGCCT-TGACGGT-3'。

1.5 细胞分组和处理 (1) 取 2×10^5 个对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 ml 高糖 DMEM 完全培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 待细胞密度接近 60% 时, 分为 NC 组、pcDNA 3.1(+) 组、siRNA 组, 采用 Lipo fectamineTM 3000 分别转染 NC RNA、pcDNA 3.1(+)-FAM83D 重组质粒、FAM83D siRNA, 转染 8 h 后更换为新鲜完全培养基, 继续培养 24 或 48 h 后收集细胞, 进行后续

实验; (2) 设置 NC 组、pcDNA 3.1(+) 组、siRNA 组以及 pcDNA 3.1(+) + XAV939 组, 提取总蛋白进行 Western blotting 检测; (3) 取 1×10^6 个对数生长期的 pcDNA 3.1(+) 组 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 ml 高糖 DMEM 完全培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养过夜, 将细胞分为两组, 分别给予 10 μ mol/L XAV939 及等体积 DMSO 处理 24 h, 进行后续实验。

1.5.1 CCK-8 法检测细胞增殖活力 将转染后的各组对数生长期 MDA-MB-231 细胞 (1×10^3 个) 接种到 96 孔板中, 每孔加入 200 μ l 高糖 DMEM 完全培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 接种后 24、48、72、96 和 120 h 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值, 计算细胞增殖活力, 并绘制增殖曲线。

1.5.2 划痕愈合实验检测细胞迁移能力 将转染后的各组对数生长期 MDA-MB-231 细胞 (1×10^6 个) 接种到 6 孔板中, 每孔加入 2 ml 高糖 DMEM 完全培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 待细胞密度达 90% 时, 用 200 μ l 无菌枪头倾斜 45 $^{\circ}$ 划痕并计时为 0 h, 分别于划痕后 0、24 和 36 h 显微镜下拍照记录各组细胞的划痕愈合情况, 并计算细胞划痕愈合率, 以代表细胞的迁移能力。细胞划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h/36 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 \times 100%。

1.5.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 取基质胶: DMEM 基础培养基 = 1:9 的 BD MatrigelTM 基质胶稀释液 40 μ l 加入 Transwell 小室上室中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h。取 200 μ l 转染后的各组 MDA-MB-231 细胞的基础高糖 DMEM 细胞悬液接种于含基质胶的 Transwell 小室中, 下室加入 600 μ l 高糖 DMEM 完全培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 分别加入 600 μ l 4% 多聚甲醛溶液室温固定、0.1% 结晶紫溶液室温染色小室 15 min, 用棉签轻轻擦去小室内未侵袭的细胞, 在倒置显微镜下观察细胞的侵袭情况并拍照记录, 随后加入 600 μ l 33% 冰乙酸洗脱小室 10 min, 采用酶标仪检测各组细胞 570 nm 处的 OD 值, 以代表各组细胞的侵袭能力。

1.5.4 MDC 法检测细胞自噬水平 将转染后的各组对数生长期 MDA-MB-231 细胞 (1×10^5 个) 接种于 6 孔板内的盖玻片上, 每孔加入 2 ml 高糖 DMEM 完全培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养过夜, 每孔加入 100 μ l 37 $^{\circ}$ C 预热的含 MDC 探针的工作液室温避光孵育 1 h, PBS 清洗后每孔加入 1 ml 新鲜的高糖 DMEM 完全培养基, 倒置荧光显微镜下检测细胞的荧光强度, 以评估细胞的自噬水平。

1.5.5 Western blotting 检测自噬和 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的表达 收集各组细胞, 用含 1% 蛋白酶抑

制剂的RIPA裂解液提取总蛋白,BCA试剂盒定量后,加入5×上样缓冲液沸水浴煮10 min获得蛋白样品。取30 μg蛋白样品进行SDS-PAGE电泳后转至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,随后加入FAM83D抗体(1:1000)、Bedin1抗体(1:1000)、ATG5抗体(1:1000)、LC3抗体(1:2000)、Wnt3a抗体(1:1000)、β-catenin抗体(1:500)和GAPDH抗体(1:2000)4℃孵育过夜。PBS清洗后加入HRP标记山羊抗兔和抗小鼠二抗(1:3000)室温孵育1 h,用ECL化学发光试剂显色后成像,采用ImageJ软件进行灰度分析,并计算目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用SPSS 22.0软件和Origin8软件进行统计分析和制图。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表

示,两组间比较采用Student's *t*检验,多组间比较采用One-way ANOVA分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。采用Kaplan-Meier法进行生存分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAM83D在TNBC患者中的表达情况及其与预后的关系 TCGA数据库中,FAM83D在TNBC癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$,图1A),且其中晚期患者癌组织中的表达水平明显高于早期患者($P<0.001$,图1B);此外,Kaplan-Meier生存分析结果显示,FAM83D的表达水平与TNBC患者的总生存率($P<0.001$,图1C)和无进展生存率($P=0.036$,图1D)均呈负相关。

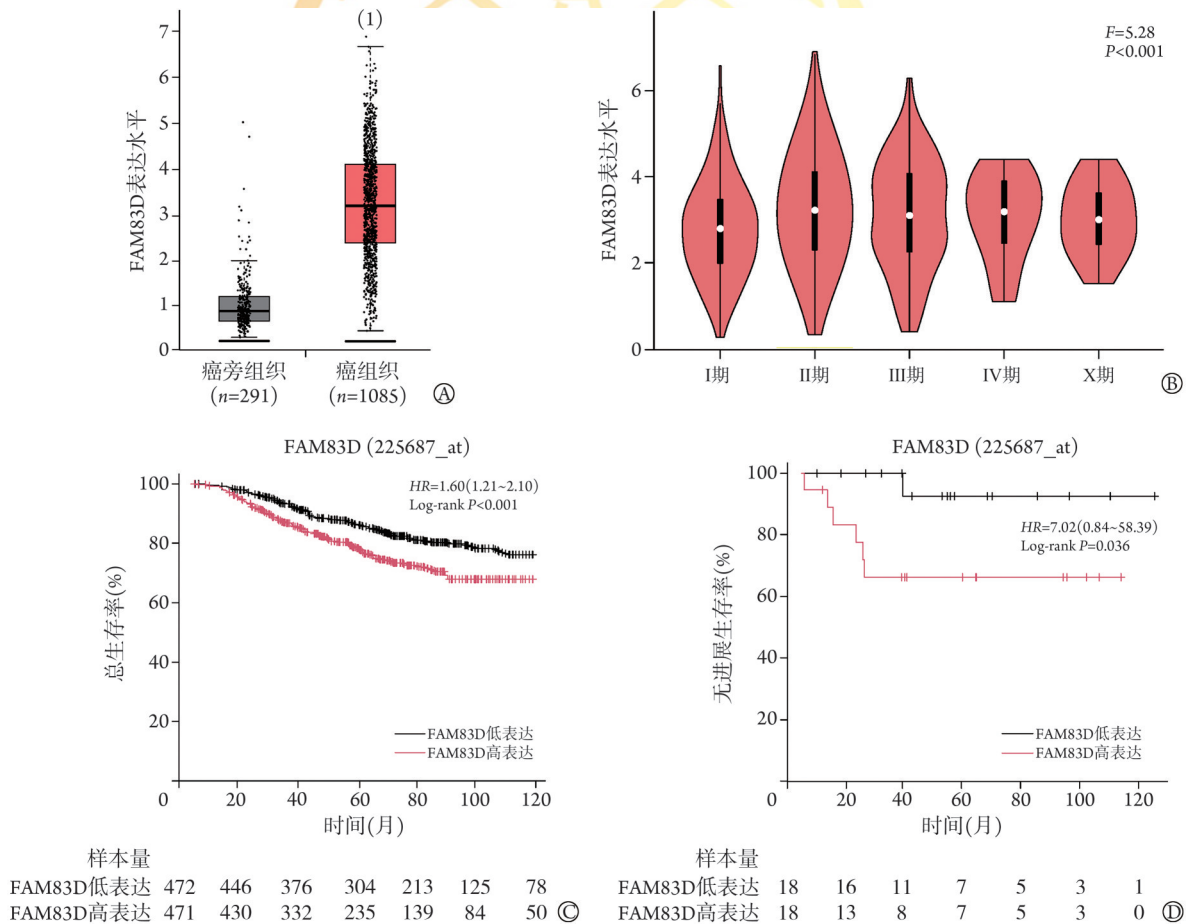


图1 FAM83D在TNBC患者中的表达水平及其与预后的相关性

Fig.1 Expression levels of FAM83D in TNBC patients and its correlation with prognosis

A. 癌症基因组图谱(TCGA)数据库中三阴性乳腺癌(TNBC)患者癌组织和癌旁组织中序列相似性83蛋白质家族成员D(FAM83D)的表达水平; B. TCGA数据库不同临床病理分期TNBC患者中FAM83D的表达水平; C. FAM83D表达水平与TNBC患者总生存率的相关性; D. FAM83D表达水平与TNBC患者无进展生存率的相关性。与癌旁组织相比,(1) $P<0.05$

2.2 FAM83D在TNBC癌组织和细胞系中的表达情况 免疫组化染色结果显示,FAM83D在TNBC癌组织中的阳性率较癌旁组织中升高4.31倍(88.52% vs. 16.67%, $P<0.001$,图2A);qRT-PCR检测结果显示,

FAM83D mRNA相对表达量在MDA-MB-231、MDA-MB-468和BT549细胞中分别为 10.52 ± 0.12 、 7.83 ± 0.13 和 8.13 ± 0.25 ,较正常乳腺上皮细胞系MCF-10A细胞分别升高9.52倍($P<0.001$)、6.83倍($P<0.001$)和7.13倍

($P<0.001$)(图2B)。此外,由于FAM83D在MDA-MB-231细胞中的表达上调尤为显著,为了进一步揭示其生物学功能,选择MDA-MB-231细胞进行后续实验。

Western blotting 检测结果显示,与NC组比较,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞中FAM83D蛋白表

达增加1.07倍($P<0.01$),而siRNA组MDA-MB-231细胞中FAM83D蛋白表达降低84.95%($P<0.001$)(图2C),表明FAM83D基因过表达和FAM83D基因敲减的MDA-MB-231细胞系均构建成功。

2.3 FAM83D不同表达水平对MDA-MB-231细胞自

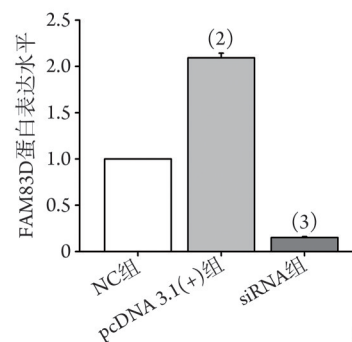
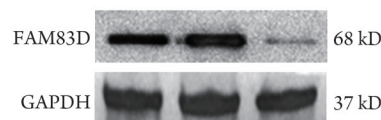
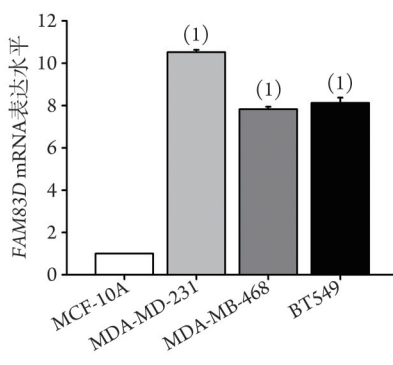
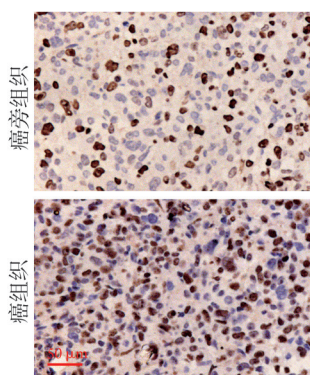


图2 TNBC癌组织和细胞系中FAM83D的表达情况

Fig.2 Expression of FAM83D in tumor tissues and cell lines of TNBC

A. 免疫组化染色法观察TNBC癌组织和癌旁组织中FAM83D的阳性表达率($n=6$); B. qRT-PCR检测TNBC细胞系中FAM83D mRNA表达水平($n=3$); C. Western blotting验证FAM83D过表达和敲减MDA-MB-231细胞系的构建情况($n=3$)。与MCF-10A细胞相比, (1) $P<0.001$;与NC组相比, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.001$ 。FAM83D. 序列相似性83蛋白质家族成员D; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; TNBC. 三阴性乳腺癌

噬的影响 MDC染色结果显示, pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞的荧光强度(1029.37 ± 25.48)较NC组(482.03 ± 6.44)增强1.14倍($P<0.001$),而siRNA组MDA-MB-231细胞的荧光强度(121.27 ± 3.42)较NC组降低74.84%($P<0.001$,图3A)。此外,Western blotting检测结果显示,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞中自噬标志分子Beclin1和ATG5的蛋白表达水平及LC3-I/LC3-II比值较NC组明显升高($P<0.05$),而siRNA组MDA-MB-231细胞中Beclin1和ATG5的蛋白表达水平及LC3-I/LC3-II比值较NC组明显降低($P<0.01$,图3B)。

2.4 FAM83D不同表达水平对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 CCK-8法检测结果显示,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞第5天的增殖能力(1.55 ± 0.03)较NC组(0.75 ± 0.04)上调1.07倍($P<0.001$),而siRNA组MDA-MB-231细胞的增殖能力(0.41 ± 0.02)较NC组降低45.33%($P<0.01$);划痕愈合实验检测结果显示,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞24、36h划痕愈合率(分别为 $81.33\pm 1.30\%$ 和 $98.47\pm 1.50\%$)较NC组(分别为 $57.30\pm 1.65\%$ 和 $76.42\pm 1.07\%$)增加41.94%($P<0.001$)和28.85%($P<0.01$),而siRNA组MDA-MB-231细胞24、36h划痕愈合率(分别为 $40.09\pm 1.16\%$ 和 $60.26\pm 1.34\%$)较NC组降低30.03%($P<0.01$)和21.15%($P<0.01$);Transwell侵袭实

验检测结果显示,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞侵袭能力(0.98 ± 0.02)较NC组(0.48 ± 0.01)上调1.04倍($P<0.001$),而siRNA组MDA-MB-231细胞侵袭能力(0.21 ± 0.01)较NC组降低56.25%($P<0.001$)(图4)。

2.5 FAM83D不同表达水平对Wnt/ β -catenin信号通路活性和自噬的影响 Western blotting检测结果显示,pcDNA 3.1(+)组MDA-MB-231细胞中Wnt/ β -catenin信号通路标志分子Wnt3a、 β -catenin和自噬标志分子Beclin1和ATG5的蛋白表达水平及LC3-I/LC3-II比值较NC组均明显上调($P<0.05$),而siRNA组或采用XAV939处理组MDA-MB-231细胞中Wnt/ β -catenin信号通路标志分子Wnt3a、 β -catenin和自噬标志分子Beclin1和ATG5的蛋白表达水平及LC3-I/LC3-II比值较NC组均明显降低($P<0.05$)(图5)。

2.6 XAV939处理能够逆转FAM83D过表达对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力的促进作用 细胞实验检测结果显示,pcDNA 3.1(+)+XAV939组pcDNA 3.1(+)MDA-MB-231细胞第5天的增殖能力(图6A)、36h后的划痕愈合率(图6B)和侵袭能力(图6C)(分别为 0.61 ± 0.03 、 $25.17\pm 1.67\%$ 、 0.27 ± 0.01)较pcDNA 3.1(+)+DMSO组(分别为 1.54 ± 0.02 、 $79.67\pm 1.44\%$ 、 0.99 ± 0.02)降低60.39%($P<0.001$)、68.41%($P<0.001$)、72.73%($P<0.001$)。

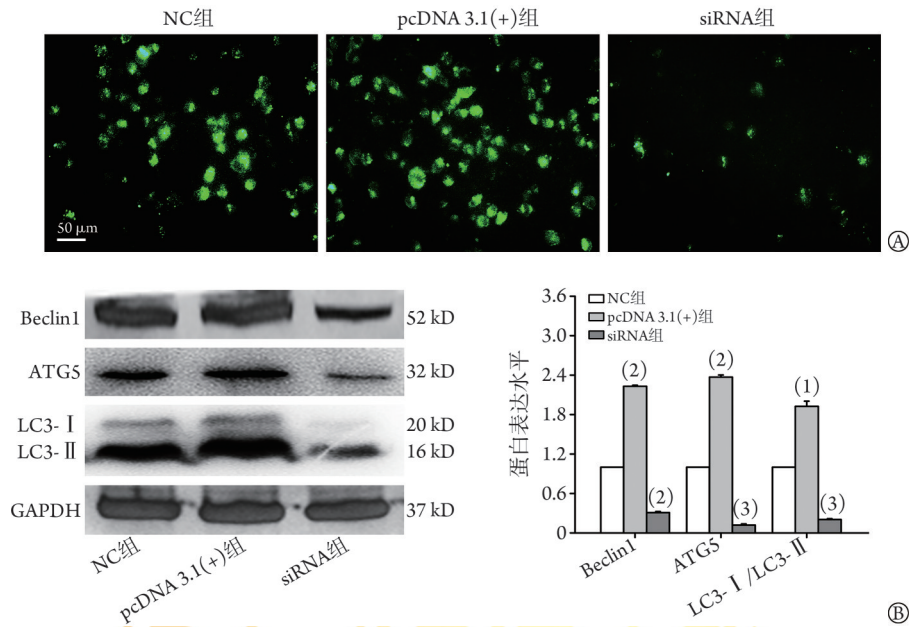


图3 FAM83D过表达和敲减对MDA-MB-231细胞自噬的影响

Fig.3 Effects of FAM83D overexpression and knockdown on autophagy of MDA-MB-231 cells

A. MDC染色法检测MDA-MB-231细胞的自噬水平($n=3$); B. Western blotting检测MDA-MB-231细胞中自噬标志蛋白表达水平($n=3$)。与NC组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.001$ 。FAM83D, 序列相似性83蛋白质家族成员D; Beclin1, B细胞淋巴瘤-2蛋白相互作用中心卷曲螺旋蛋白1; ATG5, 自噬相关基因5; LC3, 微管相关蛋白1轻链3; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

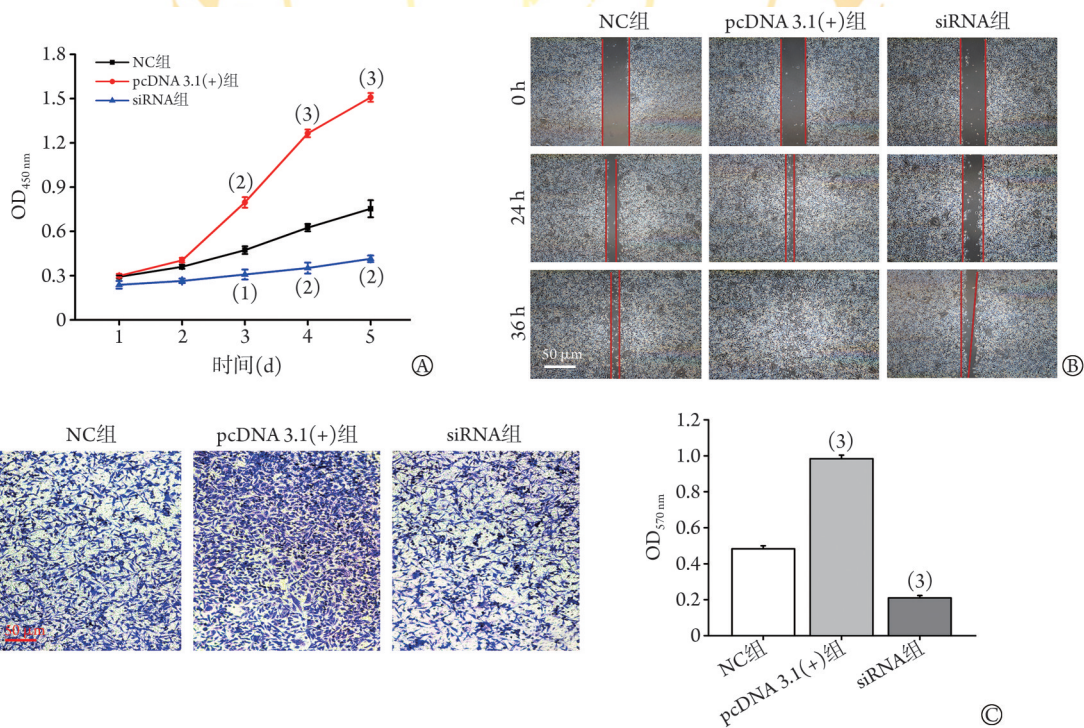


图4 FAM83D过表达和敲减对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of FAM83D overexpression and knockdown on proliferation, migration, and invasion of MDA-MB-231 cells

A. CCK-8法检测MDA-MB-231细胞的增殖能力($n=6$); B. 划痕愈合实验检测MDA-MB-231细胞的迁移能力($n=3$); C. Transwell实验检测MDA-MB-231细胞的侵袭能力($n=3$)。与NC组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.001$ 。FAM83D, 序列相似性83蛋白质家族成员D

3 讨论

TNBC是恶性程度高、治疗效果差且预后不佳的乳腺癌亚型。由于缺乏有效的内分泌治疗或针对

HER2的靶向治疗药物, 化疗仍是TNBC患者的首选治疗手段, 而耐药性的出现导致化疗对该类患者的疗效显著降低^[14-15]。此外, 研究发现, 现有的非选择性化疗方案通常伴随较高的复发率和不可忽视的

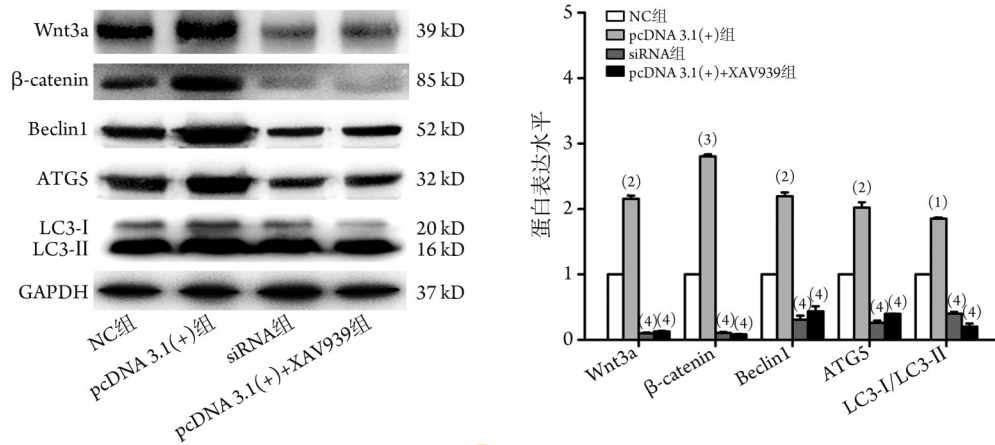


图5 FAM83D过表达和敲减对Wnt/ β -catenin信号通路活性和细胞自噬的影响

Fig.5 Effects of FAM83D overexpression and knockdown on Wnt/ β -catenin signaling pathway activity and cell autophagy

与NC组相比, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$, (3) $P < 0.001$; 与pcDNA 3.1(+)组相比, (4) $P < 0.001$ 。Wnt3a. 无翅型MMTV整合位点家族蛋白3a; β -catenin. β -连环蛋白; FAM83D. 序列相似性83蛋白质家族成员D; Beclin1. B细胞淋巴瘤-2蛋白相互作用中心卷曲螺旋蛋白1; ATG5. 自噬相关基因5; LC3. 微管相关蛋白1轻链3; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

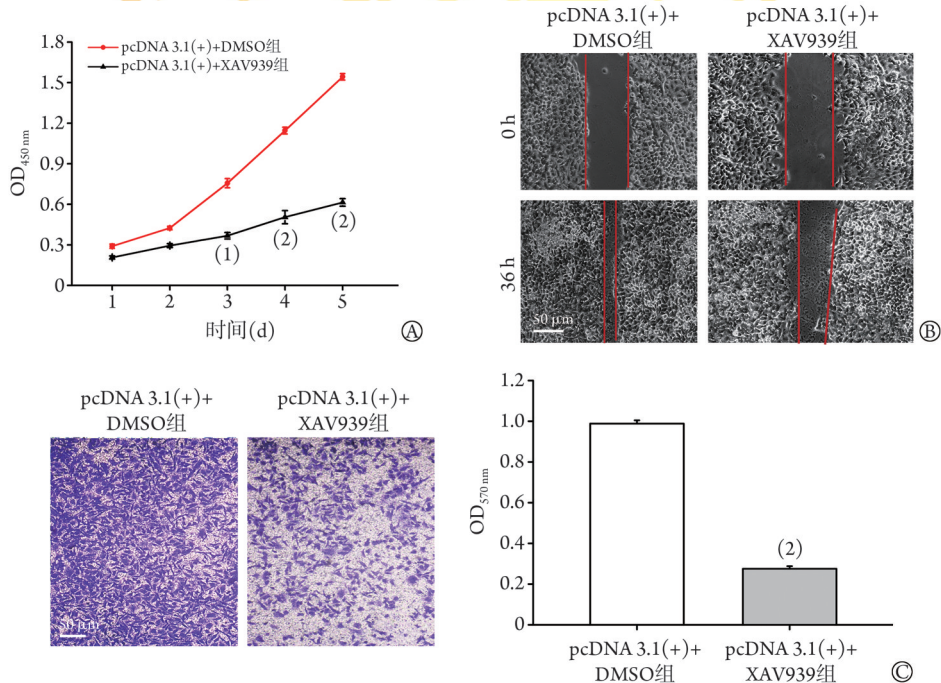


图6 XAV939对FAM83D过表达促进MDA-MB-231细胞恶性生物学行为的影响

Fig.6 Effects of XAV939 on the malignant biological behavior of MDA-MB-231 cells enhanced by FAM83D overexpression

A. CCK-8法检测细胞的增殖能力($n=6$); B. 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力($n=3$); C. Transwell实验检测细胞的侵袭能力($n=3$)。与pcDNA 3.1(+) + DMSO组相比, (1) $P < 0.01$, (2) $P < 0.001$ 。FAM83D. 序列相似性83蛋白质家族成员D; DMSO. 二甲基亚砜; XAV939. 端锚聚合酶抑制剂

心脏、神经系统毒性和骨髓抑制等不良反应,严重影响患者的生活质量^[16]。近年来,随着基因检测技术的不断革新和新型靶向药物的成功研发,针对TNBC患者的个性化精准治疗策略已成为当前研究热点^[17]。寻找新的TNBC预后标志物和治疗靶点对其治疗策略的制定与优化,以及潜在治疗方法的探索至关重要。

FAM83D是新报道的一种原癌基因,位于癌症

易感染色体20q,与恶性肿瘤进展和不良预后密切相关^[18]。FAM83D编码的FAM83蛋白为纺锤体蛋白,主要定位于有丝分裂的纺锤体内,是纺锤体定位、染色体重组、细胞分裂的必需蛋白,参与调控肿瘤发生发展的多条信号通路。临床研究表明,FAM83D在多种恶性肿瘤中高表达,并参与肿瘤的发生、发展和侵袭等进程^[13]。FAM83D高表达可通过负调控泛素连接酶F-box和WD重复结构域7

(recombinant F-box and WD repeat domain containing protein7, FBXW7)的表达抑制食管癌细胞凋亡,进而促进肿瘤进展^[19]。FAM83D表达上调能够激活Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路,促进肺癌和卵巢癌细胞的侵袭和转移,并诱导化疗耐药^[20-21]。FAM83D表达上调可通过抑制FBXW7/髓样细胞白血病蛋白1(myeloid cell leukemia-1, MCL1)信号通路活性,促进肝癌细胞的增殖和转移^[22]。本研究发现,FAM83D在TNBC癌组织和细胞系中的表达水平较癌旁组织和正常乳腺上皮细胞中均明显升高,且其中晚期患者癌组织中的表达水平明显高于早期患者($P<0.001$),并与患者的总生存率($P=0.000$)和无进展生存率($P=0.036$)均呈负相关,提示FAM83D高表达与TNBC患者的不良预后有关,有望成为TNBC预后的潜在生物标志物。此外,本研究还深入探究了FAM83D不同表达水平对TNBC细胞恶性生物学行为的影响,结果显示,FAM83D过表达能够显著促进MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭,而敲减FAM83D则明显抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭;提示FAM83D高表达与TNBC细胞的恶性进展密切相关。

自噬作为肿瘤细胞自我更新和失巢凋亡抵抗的重要途径^[23],以及诱导化疗耐药的重要机制,在肿瘤恶性进程中发挥重要作用^[24]。近年来,Wnt/ β -catenin信号通路已被证实广泛参与多种肿瘤细胞的自噬调控,进而参与肿瘤进展^[25-26],提示靶向肿瘤细胞自噬及其关键信号通路有望为恶性肿瘤治疗提供新思路 and 潜在作用靶点。基于此,为揭示FAM83D高表达促进TNBC细胞的恶性进程是否通过激活Wnt/ β -catenin信号通路诱导肿瘤细胞自噬实现,本研究检测了FAM83D不同表达水平对MDA-MB-231内Wnt/ β -catenin信号通路活性和细胞自噬的影响,并进一步采用Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂XAV939加以验证;结果显示,FAM83D过表达能够明显上调MDA-MB-231细胞内Wnt3a、 β -catenin、Beclin1和ATG5蛋白表达水平,并促进LC3-I向LC3-II转化,而敲减FAM83D或采用XAV939处理则能够明显降低MDA-MB-231细胞内Wnt3a、 β -catenin、Beclin1和ATG5的蛋白表达水平,并抑制LC3-I向LC3-II转化;同时,XAV939处理还可有效逆转FAM83D过表达介导的MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭;提示FAM83D对TNBC细胞恶性进展的促进作用是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路诱导肿瘤细胞自噬实现。

综上所述,FAM83D在MDA-MB-231细胞中高表达,可通过激活Wnt/ β -catenin信号通路促进肿瘤

细胞的保护性自噬,进而增强细胞的增殖、迁移和侵袭,提示FAM83D可作为TNBC预后判断的重要检测指标,也为TNBC的治疗提供了潜在作用靶点。然而本研究仍存在一定的局限:患者间存在较大的个体差异及肿瘤组织本身具备高度异质性,而本研究中TNBC癌组织和癌旁组织样本有限,所以后续研究有必要进一步扩大样本量加以验证。关于FAM83D的体内试验及其在临床诊断中的作用仍有待深入研究,从而为临床诊疗提供更可靠的理论依据。

【参考文献】

- [1] Liu XL, Zhang G, Yu TY, et al. Exosomes deliver lncRNA DARS-AS1 siRNA to inhibit chronic unpredictable mild stress-induced TNBC metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2022, 543: 215781.
- [2] 杨忠云, 吴婷, 李雪森, 黄卡瓦胡椒素B下调雌激素受体对三阴性乳腺癌增殖和迁移的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(8): 930-938.
- [3] Liu J, Zhao G, Liu XL, et al. Progress of non-coding RNAs in triple-negative breast cancer[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119238.
- [4] 赵阳, 肖迎聪, 巨艳, 等. 自动乳腺超声特征联合Ki-67对三阴性乳腺癌新辅助化疗后病理完全缓解的预测价值[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(6): 695-702.
- [5] Lowdell MW. Considerations for manufacturing of cell and gene medicines for clinical development[J]. *Cytotherapy*, 2024, S1465-3249(24)00941-1.
- [6] 朱紫嘉, 陈霞, 崔曼, 等. 基于红景天苷对三阴性乳腺癌关键差异基因作用机制的生物信息学和分子对接技术分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(3): 759-769.
- [7] Rahimi-Farsi N, Bostanian F, Shahbazi T, et al. Novel oncogenes and tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma: carcinogenesis, progression, and therapeutic targets[J]. *Gene*, 2025, 941: 149229.
- [8] Jiang XY, Wang YL, Guo LL, et al. The FBXW7-binding sites on FAM83D are potential targets for cancer therapy[J]. *Breast Cancer Res*, 2024, 26(1): 37-50.
- [9] Yu XD, Li YX, Kong FS, et al. METTL3 regulates FAM83D m⁶A modification to accelerate tumorigenesis of triple-negative breast cancer via the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Toxicol In Vitro*, 2024, 95: 105746.
- [10] Wang JB, Quan Y, Lv J, et al. Inhibition of FAM83D displays antitumor effects in glioblastoma via down-regulation of the Akt/Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(6): 1343-1356.
- [11] Hua YQ, Zhang K, Sheng J, et al. Fam83D promotes tumorigenesis and gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 287: 119205.
- [12] Wang FR, Zhang SG, Wei YC, et al. Upregulation of family with sequence similarity 83 member D expression enhances cell proliferation and motility via activation of Wnt/ β -catenin signaling and predicts poor prognosis in gastric cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6775-6791.
- [13] Geng Y, Liu J, Wang ZC, et al. Systematic analysis of the oncogenic role of FAM83D across cancers based on data mining[J]. *Cell*

- Cycle, 2023, 22(8): 1005-1019.
- [14] Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176-198.
- [15] 杨柳, 季福庆, 张明坤, 等. 三阴性乳腺癌新辅助化疗后病理完全缓解的影响因素及预测模型构建[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(8): 855-860.
- [16] Bianchini G, de Angelis C, Licata L, *et al.* Treatment landscape of triple-negative breast cancer - expanded options, evolving needs[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(2): 91-113.
- [17] Weng L, Zhou J, Guo S, *et al.* The molecular subtyping and precision medicine in triple-negative breast cancer--based on Fudan TNBC classification[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1):120-130.
- [18] Yu HY, Chen QH, Wang ZM, *et al.* Pan-cancer and single-cell analysis reveals FAM83D expression as a cancer prognostic biomarker[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1009325.
- [19] Li JJ, Tian JB, Ma M, *et al.* FAM83D promotes the progression of 4NQO-induced esophageal carcinoma *via* inhibiting FBWX7[J]. *Exp Cell Res*, 2024, 442(2): 114252.
- [20] Yin CL, Lin XY, Wang YG, *et al.* FAM83D promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and cisplatin resistance through regulating the Akt/mTOR pathway in non-small-cell lung cancer [J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(3): 395-407.
- [21] Zhu HT, Diao S, Lim V, *et al.* FAM83D inhibits autophagy and promotes proliferation and invasion of ovarian cancer cells *via* PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2019, 51(5): 509-516.
- [22] Nie J, Lu L, Du C, *et al.* FAM83D promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the FBXW7/MCL1 pathway[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(10): 3790-3802.
- [23] 曹睿, 王达利. 自噬对调控皮肤炎症和凋亡诱导的干细胞活化的重要作用[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2024, 40(5): 424.
- [24] Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560-575.
- [25] Zhou CF, Yi CH, Yi YX, *et al.* LncRNA PVT1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer *via* activating Wnt/ β -catenin and autophagy pathway through modulating the miR-619-5p/Pygo2 and miR-619-5p/ATG14 axes[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 118-141.
- [26] Zhao H, Ming TQ, Tang S, *et al.* Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144-177.
- [27] 武鹏立, 李凤玉, 刘博, 等. 沉默 DDX39A 基因对食管癌 TE-1 细胞增殖、迁移和侵袭的作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2025, 51(1): 115-123.

(责任编辑: 纪方方)



解放军医学杂志®