

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220585

· 论 著 ·

翻译控制肿瘤蛋白 1 调控肾细胞癌细胞增殖迁移的机制

王庆卿¹, 黄新忠^{2*}, 胡峯钰³, 曹 洁³

1. 南通大学医学院, 南通 226001

2. 南通大学附属医院肾内科, 南通 226001

3. 南通市第六人民医院肾内科, 南通 226000

[摘要] **目的** 检测翻译控制肿瘤蛋白 1 (TPT1) 在肾细胞癌 (RCC) 中的表达, 并探讨其在 RCC 中的作用。**方法** 从基因表达综合数据库下载微阵列数据集 GSE15641 (包括 23 例正常肾脏组织样本数据和 32 例 RCC 组织样本数据), 并使用 R 4.3.0 软件筛选 RCC 组织和正常肾脏组织之间的差异表达基因。采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测 90 例在南通大学附属医院确诊并接受治疗的 RCC 患者的 RCC 组织和癌旁正常组织, 以及人 RCC 细胞 (769-P、786-O、ACHN 和 Caki-1) 和人正常胚肾 293 细胞 (HEK293) 中 TPT1 的表达。通过 χ^2 检验分析 TPT1 表达与 RCC 患者临床病理特征之间的关系。从癌症基因组图谱数据库获得 522 例 RCC 患者的临床信息, 采用 ROC 曲线和 Kaplan-Meier 生存曲线分析 TPT1 表达与患者预后的相关性。体外转染 TPT1 siRNA 和 siRNA 阴性对照 (NC) 至 786-O 和 Caki-1 细胞后, 采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测细胞中 TPT1 的表达, 分别应用 CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验检测细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并采用蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白的表达。**结果** 与正常肾脏组织和 HEK293 细胞相比, TPT1 在 RCC 组织和 RCC 细胞中的表达均上调 (均 $P < 0.05$)。TPT1 表达水平低的 RCC 患者肿瘤大小及转移发生率均低于 TPT1 表达水平高的患者 (均 $P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果提示, TPT1 对 RCC 具有较高的诊断价值 ($AUC = 0.8569$, 95% CI 0.8045~0.9093, $P < 0.001$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析结果显示, 低 TPT1 表达组 RCC 患者的总生存期长于高 TPT1 表达组 ($P = 0.0184$)。在细胞实验中, 与 siRNA NC 组相比, 转染 TPT1 siRNA 后 786-O 和 Caki-1 细胞的增殖活性、划痕愈合率和侵袭穿膜细胞数均下降 (均 $P < 0.01$), 凋亡相关蛋白 Bcl-2 和基质金属蛋白酶 9 表达降低、Bcl-2 相关 X 蛋白表达增加 (均 $P < 0.05$)。**结论** TPT1 参与了 RCC 的进展, 可能是 RCC 治疗的潜在靶点。

[关键词] 肾细胞癌; 翻译控制肿瘤蛋白 1; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡

[引用本文] 王庆卿, 黄新忠, 胡峯钰, 等. 翻译控制肿瘤蛋白 1 调控肾细胞癌细胞增殖迁移的机制 [J]. 海军军医大学学报, 2024, 45 (12): 1521-1528. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220585.

Mechanism of translationally-controlled tumor protein 1 in regulating proliferation and migration of renal cell carcinoma cells

WANG Qingqing¹, HUANG Xinzong^{2*}, HU Yinyu³, CAO Jie³

1. Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

3. Department of Nephrology, The Six People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To detect the expression of translationally-controlled tumor protein 1 (TPT1) in renal cell carcinoma (RCC) and to explore its role in RCC. **Methods** Microarray dataset GSE15641 (including 23 normal kidney tissue samples and 32 RCC tissue samples) was downloaded from the Gene Expression Omnibus, and differentially expressed genes between RCC tissue and normal kidney tissue were screened using R 4.3.0 software. The TPT1 expression in RCC tissue and adjacent non-tumor tissue of 90 patients diagnosed and treated at Affiliated Hospital of Nantong University, as well as in human RCC cells (769-P, 786-O, ACHN, and Caki-1) and human embryonic kidney 293 cell (HEK293) was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting. The relationship between TPT1 expression and clinical pathological characteristics of RCC patients was analyzed by χ^2 test. The clinical data of 522 RCC patients were derived from The Cancer Genome Atlas, and the correlation between TPT1 expression and prognosis of RCC patients was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve and Kaplan-Meier survival curve. After *in vitro* transfection of TPT1 small interfering RNA (siRNA) and its negative control (NC) into 786-O and Caki-1 cells, the TPT1 expression was detected by

[收稿日期] 2022-07-13

[接受日期] 2022-12-12

[作者简介] 王庆卿, 硕士, 主治医师. E-mail: 191977909@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0513-85052256, E-mail: huangxz421@126.com

qPCR and Western blotting; the proliferation, migration, and invasion were detected by cell counting kit 8 assay, scratch assay, and Transwell assay, respectively; and the expression of apoptosis-related proteins was detected by Western blotting. **Results** TPT1 expression was significantly upregulated in the RCC tissue and cells compared with the normal kidney tissue and HEK293 cells (all $P < 0.05$). The RCC patients with low TPT1 expression levels had significantly smaller tumor size and lower metastasis rate than those with high TPT1 expression levels (both $P < 0.05$). The ROC curve analysis results indicated that TPT1 had high diagnostic value for RCC (area under curve was 0.856 9, 95% confidence interval was 0.804 5-0.909 3, $P < 0.001$). The Kaplan-Meier survival analysis results showed that the overall survival of RCC patients in the low TPT1 expression group was significantly longer than that in the high TPT1 expression group ($P = 0.018$ 4). In the cell experiment, compared with the siRNA NC group, the proliferation activity, scratch healing rate, and invading transmembrane cell number of 786-O and Caki-1 cells were significantly decreased after transfection with TPT1 siRNA (all $P < 0.01$); the expression levels of B-lymphoma gene 2 (Bcl-2) and matrix metalloproteinase-9 were significantly decreased, while the expression of Bcl-2 associated X protein was significantly increased (all $P < 0.05$). **Conclusion** TPT1 is involved in the progression of RCC and may be a potential therapeutic target for RCC.

[**Key words**] renal cell carcinoma; translationally-controlled tumor protein 1; cell proliferation; cell migration; apoptosis

[**Citation**] WANG Q, HUANG X, HU Y, et al. Mechanism of translationally-controlled tumor protein 1 in regulating proliferation and migration of renal cell carcinoma cells[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(12): 1521-1528. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220585.

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是起源于肾实质上皮系统的恶性肿瘤^[1-2]。RCC 在组织学上分为多种亚型, 其中以透明细胞 RCC 最为常见^[3-4]。RCC 具有高复发率和高转移率等特点, 给社会 and 患者家庭带来了巨大的负担^[4]。RCC 的治疗方法主要有手术、放疗和化疗, 但多数患者起病隐匿、症状出现较晚, 给治疗带来很大困难^[5]。我国国家癌症中心发布的中国恶性肿瘤疾病负担报告显示, 2022 年我国有 7.37 万例新发 RCC 病例, 有 2.4 万例患者因 RCC 死亡^[6]。约 30% 的 RCC 患者在肿瘤切除后会发生远处转移, 5 年生存率低于 20%^[7-8]。因此, 寻找 RCC 早期诊断和预后评估的分子指标是及早治疗、提高患者生存率的重要方法之一。

翻译控制肿瘤蛋白 1 (translationally-controlled tumor protein 1, TPT1) 是一种高度保守的蛋白质, 在多种人类肿瘤中异常表达, 参与肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的调控^[9-11]。例如, miRNA-216a-5p 通过靶向 TPT1/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 1 轴抑制胰腺癌的进展^[12]; lncRNA TPT1-反义 RNA1 通过上调 TPT1 表达促进上皮性卵巢癌的发生^[13]。然而, TPT1 在 RCC 中的作用在很大程度上仍不清楚。

本研究探讨了 TPT1 在 RCC 组织中的表达水平及其临床意义, 还通过功能缺失实验验证了 TPT1 在人 RCC 细胞中的生物学功能, 旨在为 RCC 的诊断和治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 差异表达基因的筛选 从基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 下载微阵列数据集 GSE15641 (包括 23 例正常肾脏组织样本数据和 32 例 RCC 组织样本数据), 用 R 4.3.0 软件的 preprocessCore 包和 limma 包分别进行数据标准化处理和去除批次效应。采用箱线图评估数据标准化情况, 通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 方法评估数据批次效应情况。使用 R 4.3.0 软件的 limma 包分析 TPT1 的差异表达情况, 筛选条件为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(FC)| > 1$ (FC 为差异倍数)。

1.2 RCC 患者数据下载及分组 从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA; <https://cancergenome.nih.gov/>) 数据库下载 RCC 患者的临床信息和 TPT1 表达数据, 共获得 522 例 RCC 患者数据。按照 TPT1 表达中位数 (1.495) 将患者分为 TPT1 高表达组 (TPT1 表达水平 ≥ 1.495) 和 TPT1 低表达组 (TPT1 表达水平 < 1.495), 每组 261 例。采用在线工具 OncoLnc (<http://www.oncolnc.org/>) 进行数据分析。

1.3 实验试剂 RCC 细胞 (人肾细胞腺癌细胞 769-P、人肾透明细胞腺癌细胞 786-O、人肾细胞腺癌细胞 ACHN 和人肾透明细胞癌皮肤转移细胞 Caki-1) 和人正常胚肾 293 细胞 (HEK293) 均购自美国 ATCC。TPT1 抑制剂 (TPT1 siRNA-1、TPT1

siRNA-2)、siRNA 阴性对照(negative control, NC)购自上海吉玛生物科技有限公司;转染试剂 Lipofectamine[®] 2000、TRIzol 试剂、Maxima[™] SYBR Green qPCR 预混液均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司。RPMI 1640 培养基(适用 769-P、786-O 细胞)、DMEM(适用 ACHN、HEK293 细胞)、McCoy's 5a 培养基(适用 Caki-1 细胞)、FBS 及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素混合溶液购自美国 Sigma 公司;PrimeScript[™] 反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;GAPDH、TPT1、Bcl-2、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)抗体及 HRP 标记的二抗均购自英国 Abcam 公司;CCK-8 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 组织样本的获取 取 2013 年 9 月至 2022 年 1 月在南通大学附属医院确诊并接受治疗的 90 例 RCC 患者的 RCC 组织及癌旁正常组织(距离肿瘤病灶 2 cm),保存在 -80 °C 备用。本研究通过南通大学附属医院伦理委员会审批(2022-K138-01)。

1.5 细胞培养和转染 RCC 细胞和 HEK293 细胞用含有 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素-链霉素的培养基于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养,待细胞密度达约 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。将细胞接种于 6 孔板内,待细胞密度达 50%~60% 时更换成无血清培养基,分别将 TPT1 siRNA-1、TPT1 siRNA-2 和 siRNA NC 转染到细胞中,同时设置空白对照。TPT1 siRNA-1 正义链序列为 5'-UGUUCAAGGUCUAUCAGUGGA-3',反义链序列为 5'-CACUGAUAGACCUUGAACAAU-3';TPT1 siRNA-2 正义链序列为 5'-AUUGUUCAGGUCUAUCAGUG-3',反义链序列为 5'-CUGAUAGACCUUGAACAAUUU-3';siRNA NC 正义链序列为 5'-GACUUCAUAAGGCGCAUGCUU-3',反义链序列为 5'-GCAUGCGCCUUAUGAAGUCUU-3'。

1.6 qPCR 实验 使用 TRIzol 试剂分别从 RCC 组织和细胞中提取总 RNA,用 PrimeScript[™] 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,采用 Maxima[™] SYBR Green qPCR 预混液进行 PCR 扩增。反应体系:2×qPCR 预混液 12.5 μL、7.5 μmol/L 正义和反义引物各 1.0 μL、cDNA 2.5 μL、

ddH₂O 8.0 μL。反应条件:95 °C 15 min;94 °C 15 s(变性)、55 °C 30 s(退火)、70 °C 30 s(延伸),共 40 个循环。TPT1 正向引物序列为 5'-AGCC-ACAGTGAGATGTTCTCT-3',反向引物序列为 5'-CAGCCCGTCTGCAATTTTCCT-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-TGTGGGCATCAATGGATTGG-3',反向引物序列为 5'-ACACCATGTATTCCGGTCAAT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行半定量分析。

1.7 蛋白质印迹法分析 细胞转染后,向每孔细胞中加入蛋白质裂解液提取总蛋白质,并经沸水煮 10 min 变性。蛋白质样品通过 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜,用 5% 牛血清白蛋白溶液封闭 2 h,用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次后过夜孵育一抗(稀释比例均为 1:1 000),然后用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次后室温孵育相应二抗(稀释比例均为 1:5 000)。于避光环境中进行 ECL 显影并拍照,利用 ImageJ 软件进行光密度分析,最终结果表示为目的蛋白质条带与内参条带的光密度比值。

1.8 CCK-8 检测 将转染后的细胞按照每孔 1×10⁴ 个的密度接种到 96 孔板中培养,在 0、24、48、72 h 时分别取样并加入 CCK-8 试剂,继续培养 4 h,使用酶标仪测定波长 450 nm 处的光密度值。

1.9 划痕实验 细胞常规培养至形成单层细胞,用灭菌的 100 μL 黄色 Tip 枪头划一条直线,形成无细胞生长区域(即划痕),并记录划痕区面积。随后将细胞置于恒温培养箱中培养,分别在 0、24 h 时用 PBS 洗去划落的细胞,于倒置显微镜下观察并拍照。

1.10 Transwell 实验 将 100 μL 的 Matrigel 稀释液均匀涂于 Transwell 包被小室底部基底膜,往小室外加入含 10% FBS 的培养基 900 μL,每个小室内接种细胞数约为 1×10⁵ 个,常规培养 24 h。取出 Transwell 小室,用 PBS 洗涤,加入 4% 多聚甲醛溶液固定。然后用结晶紫染液染色,在光学显微镜下观察、拍照,每组随机选取 5 个视野计数细胞。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料若呈正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若呈偏态分布则以中位数表示,两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。计数资料以例数和百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。应用在线工具 OncoLnc,采用 ROC 曲线分析 TPT1 在 RCC 诊断中的价值,采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析

TPT1 在 RCC 预后预测中的价值。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 生物信息学分析 差异表达基因分析结果表明, 与正常肾脏组织相比, TPT1 在 RCC 组织中

表达上调 ($P < 0.000\ 1$, $\log_2(\text{FC})$ 为 5 438.821, 图 1)。京都基因与基因组百科全书通路富集分析结果显示, TPT1 在 MAPK 信号通路和神经活性配体-受体相互作用中显著富集。基因本体功能富集分析结果表明, TPT1 在小分子分解代谢过程中显著富集。

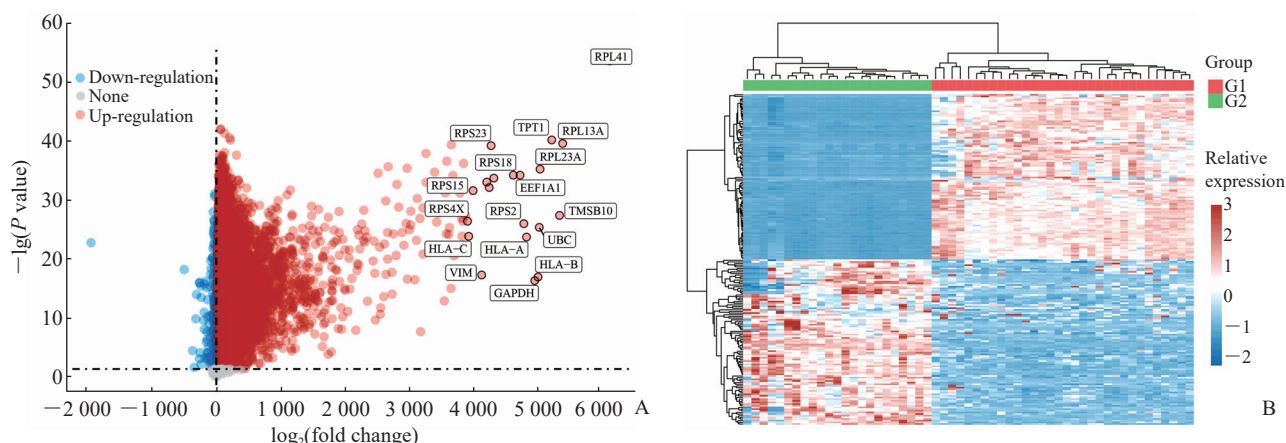


图 1 微阵列数据集 GSE15641 中 RCC 与正常肾脏组织的差异表达基因分析

Fig 1 Differential expression gene analysis between RCC and normal kidney tissue from microarray dataset GSE15641

A: The volcano plot of differential expression gene analysis; B: The heatmap of differential expression gene analysis. RPL41/S23/L13A/S18/L23A/S15/S4X/S2: Ribosomal protein L41/S23/L13A/S18/L23A/S15/S4X/S2; TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; EEF1A1: Eukaryotic translation elongation factor 1 α 1; TMSB10: Thymosin β 10; UBC: Ubiquitin C; HLA-A/B/C: Human leukocyte antigen-A/B/C; VIM: Vimentin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G1: RCC tissue; G2: Normal kidney tissue.

2.2 TPT1 在 RCC 组织中的表达及其与 RCC 患者临床病理特征的关系 对南通大学附属医院的 90 例 RCC 患者组织样本的 qPCR 检测结果显示, 与癌旁正常组织相比, RCC 组织中 *TPT1* mRNA 表达增高 ($P < 0.01$, 图 2A)。蛋白质印迹法检测结果显示, TPT1 在 RCC 组织中的表达量为 1.474 ± 0.094 , 在癌旁正常组织中的表达量为 0.910 ± 0.088 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2B)。根据 TPT1 蛋白表达平均值将 RCC 患者分为 TPT1 高表达 (TPT1 蛋白表达水平 ≥ 1.474 , 39 例) 与低表达 (< 1.474 , 51 例) 组, 采用 χ^2 检验分析 TPT1 表达与 RCC 患者临床病理特征的关系, 结果显示, TPT1 表达水平与 RCC 患者年龄、性别、肿瘤分化程度无关, 但 TPT1 表达水平低的 RCC 患者肿瘤大小及转移发生率均低于 TPT1 表达水平高的患者 ($P = 0.048$ 、 0.017)。见表 1。

2.3 TPT1 在 RCC 诊断及预后中的价值 对 TCGA 数据库中 522 例 RCC 患者的临床信息及 TPT1 表达情况进行 ROC 曲线分析, 结果显示, TPT1 对 RCC 具有较高的诊断价值 ($\text{AUC} = 0.856\ 9$, $95\% \text{ CI } 0.804\ 5 \sim$

$0.909\ 3$, $P < 0.001$, 图 3A)。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 TPT1 在 RCC 中的预后价值, 结果表明低 TPT1 表达组 RCC 患者的总生存期长于高 TPT1 表达组 ($P = 0.018\ 4$, 图 3B)。

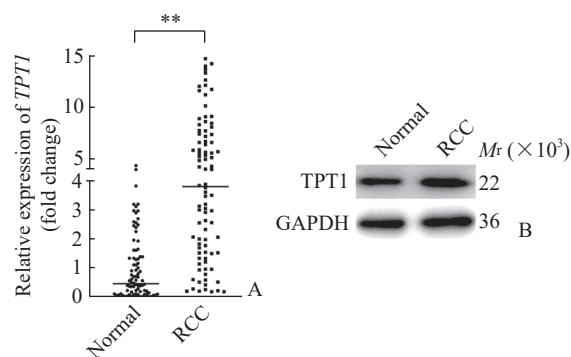


图 2 TPT1 在 RCC 组织中的表达情况

Fig 2 Expression of TPT1 in RCC tissue

A: Quantitative polymerase chain reaction analysis of *TPT1* mRNA expression in 90 pairs of RCC tissue and adjacent normal tissue ($**P < 0.01$, $n = 90$, median); B: Western blotting of TPT1 expression in RCC tissue and adjacent normal tissue. TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

表 1 不同 TPT1 表达水平 RCC 患者的临床病理特征分析

Tab 1 Clinical and pathological characteristics of RCC patients with different TPT1 expression levels

Characteristic	Low TPT1 <i>N</i> =51	High TPT1 <i>N</i> =39	χ^2 value	<i>n</i> (%) <i>P</i> value
Age			0.019	0.889
<50 years	15 (29.4)	12 (30.8)		
≥50 years	36 (70.6)	27 (69.2)		
Gender			0.222	0.637
Male	37 (72.5)	30 (76.9)		
Female	14 (27.5)	9 (23.1)		
Tumor maximum diameter			3.893	0.048
<3 cm	29 (56.9)	14 (35.9)		
≥3 cm	22 (43.1)	25 (64.1)		
Differentiation of tumor			0.407	0.523
Well-moderate	27 (52.9)	18 (46.2)		
Poor	24 (47.1)	21 (53.8)		
Metastasis			5.679	0.017
No	35 (68.6)	17 (43.6)		
Yes	16 (31.4)	22 (56.4)		

TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma.

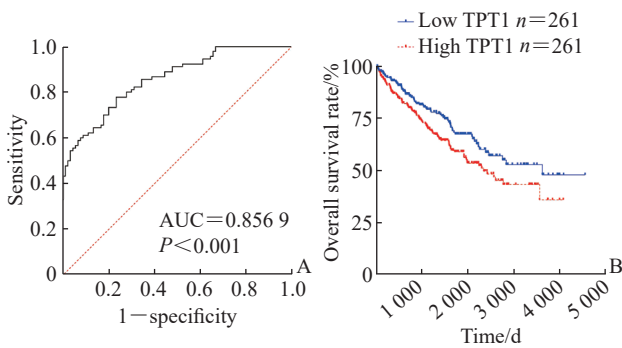


图 3 TPT1 在 RCC 诊断及预后评估中的价值

Fig 3 Value of TPT1 in diagnosis and prognosis evaluation of RCC

A: Receiver operating characteristic curve of TPT1 in diagnosing RCC; B: Kaplan-Meier survival analysis of TPT1 in evaluating prognosis of RCC. TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; AUC: Area under curve.

2.4 TPT1 在 RCC 细胞中表达上调 qPCR 检测结果显示, 与 HEK293 相比, RCC 细胞株 769-P、786-O、ACHN 和 Caki-1 细胞中 *TPT1* mRNA 的表达均上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 4。

2.5 TPT1 siRNA 转染效率的验证 qPCR 检测结果显示, 空白对照组和 siRNA NC 组 HEK293 细胞中 *TPT1* mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 siRNA NC 组相比, HEK293 细胞转染 TPT1 siRNA-1 和 TPT1 siRNA-2 后 *TPT1* mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 5A), 说明 TPT1 siRNA-1 和 TPT1 siRNA-2 均转染成功。两者相比 TPT1 siRNA-2 对 TPT1 表达的干扰效果更好, 因此选择

TPT1 siRNA-2 进行后续实验。与 siRNA NC 组相比, 将 TPT1 siRNA-2 转染到 786-O 和 Caki-1 细胞后 *TPT1* mRNA 表达量分别降低 (64.89 ± 6.14) %、(63.90 ± 5.41) %, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。蛋白质印迹法检测结果显示, TPT1 siRNA-2 和 siRNA NC 组 786-O 细胞中 TPT1 蛋白的表达量分别为 0.835 ± 0.038 和 1.032 ± 0.004 , Caki-1 细胞中 TPT1 蛋白的表达量分别为 1.190 ± 0.040 和 1.461 ± 0.031 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$, 图 5B)。

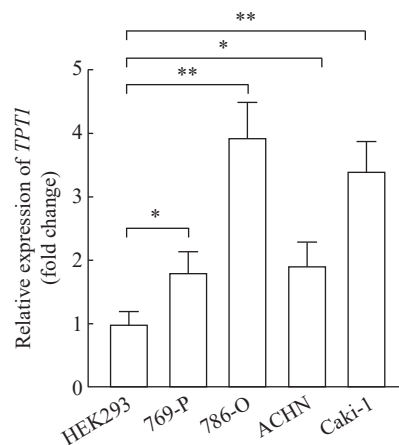


图 4 TPT1 在正常人胚肾细胞 HEK293 和 RCC 细胞 (769-P、786-O、ACHN 和 Caki-1) 中的表达

Fig 4 Expression of TPT1 in normal embryonic kidney cell HEK293 and RCC cells (769-P, 786-O, ACHN, and Caki-1) Quantitative polymerase chain reaction analysis results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma.

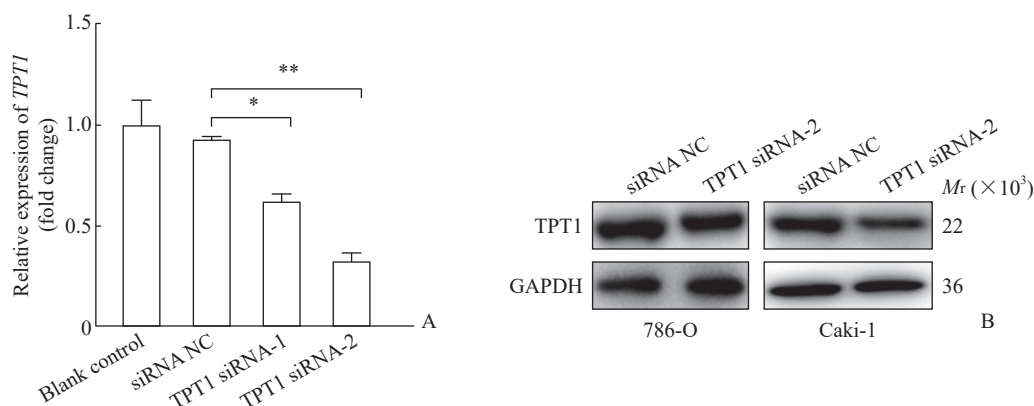


图5 TPT1 干扰效率验证结果

Fig 5 Verification results of TPT1 interference efficiency

A: Expression of *TPT1* mRNA in normal embryonic kidney cell HEK293 after transfection detected by quantitative polymerase chain reaction; B: Expression of TPT1 protein in renal cell carcinoma cells 786-O and Caki-1 after transfection detected by Western blotting. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; siRNA: Small interfering RNA; NC: Negative control.

2.6 TPT1 对 RCC 细胞增殖的影响 CCK-8 实验结果显示, 与 siRNA NC 组相比, 在 TPT1 siRNA-2 转染 48 h 和 72 h 后 786-O 和 Caki-1 细胞的增殖活

力均降低 (均 $P < 0.01$, 图 6), 表明抑制 TPT1 表达能降低 RCC 细胞的增殖能力。

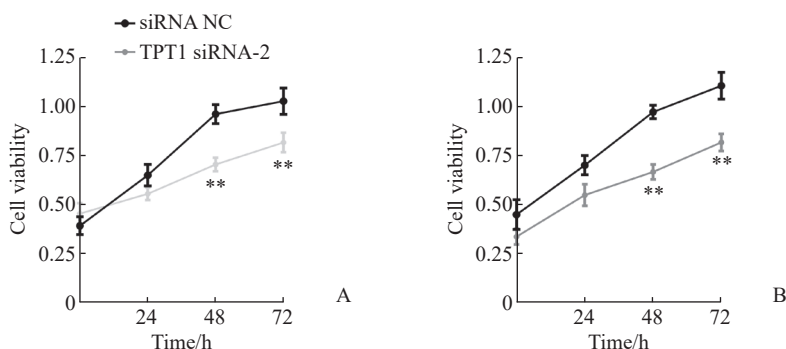


图6 CCK-8 法分析 TPT1 对 RCC 细胞 786-O (A) 和 Caki-1 (B) 增殖活力的影响

Fig 6 Effects of TPT1 on proliferation of RCC cells 786-O (A) and Caki-1 (B) detected by CCK-8 assay

** $P < 0.01$ vs siRNA NC group at the same time point. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. CCK-8: Cell counting kit 8; TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; siRNA: Small interfering RNA; NC: Negative control.

2.7 TPT1 对 RCC 细胞迁移的影响 划痕实验结果显示, siRNA NC 组 786-O 细胞在 24 h 后划痕面积缩小到原来的 $(26.52 \pm 1.98)\%$, TPT1 siRNA-2 组划痕面积缩小到原来的 $(55.41 \pm 0.29)\%$; siRNA NC 组 Caki-1 细胞在 24 h 后划痕面积缩小到原来的 $(56.72 \pm 5.28)\%$, TPT1 siRNA-2 组划痕面积缩小到原来的 $(72.81 \pm 0.39)\%$ 。与 siRNA NC 组相比, 转染 TPT1 siRNA-2 后 786-O 及 Caki-1 细胞的迁移能力均降低 (P 均 < 0.01)。见图 7。

2.8 TPT1 对 RCC 细胞侵袭的影响 Transwell 实验结果显示, TPT1 siRNA-2 组 786-O 细胞的侵袭细胞数为 (114 ± 5) 个, 少于 siRNA NC 组的

(417 ± 4) 个 ($P < 0.01$); TPT1 siRNA-2 组 Caki-1 细胞的侵袭细胞数为 (99 ± 4) 个, 少于 siRNA NC 组的 (412 ± 3) 个 ($P < 0.01$), 表明转染 TPT1 siRNA-2 后 786-O 及 Caki-1 细胞的侵袭能力均降低。见图 8。

2.9 TPT1 对 RCC 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果显示, siRNA NC 组 786-O 细胞 Bcl-2、Bax、MMP9 的表达量分别为 0.998 ± 0.002 、 0.402 ± 0.019 和 1.339 ± 0.054 , TPT1 siRNA-2 组分别为 0.923 ± 0.028 、 0.678 ± 0.016 和 0.795 ± 0.015 ; siRNA NC 组 Caki-1 细胞 Bcl-2、Bax、MMP9 的表达量分别为 1.230 ± 0.044 、 0.288 ± 0.014 和 0.842 ± 0.022 , TPT1 siRNA-2 组分别为

0.952±0.017、1.043±0.006 和 0.663±0.026。与 siRNA NC 组相比, 转染 TPT1 siRNA-2 后 786-O 及 Caki-1 细胞中 Bcl-2、MMP9 蛋白表达均降低, 而 Bax 蛋白表达均增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 说明抑制 TPT1 表达能增强 RCC 细胞的凋亡能力。见图 9。

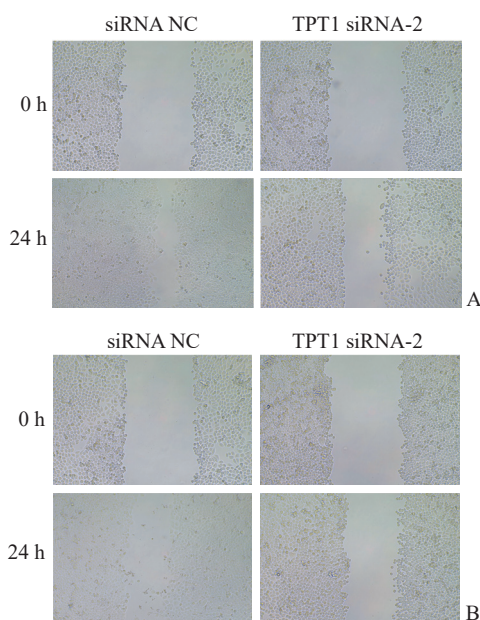


图 7 划痕实验验证抑制 TPT1 表达后 RCC 细胞 786-O (A) 及 Caki-1 (B) 迁移能力的变化 (200×)

Fig 7 Migration ability of RCC cells 786-O (A) and Caki-1 (B) after inhibiting TPT1 detected by scratch test (200×)

TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; siRNA: Small interfering RNA; NC: Negative control.

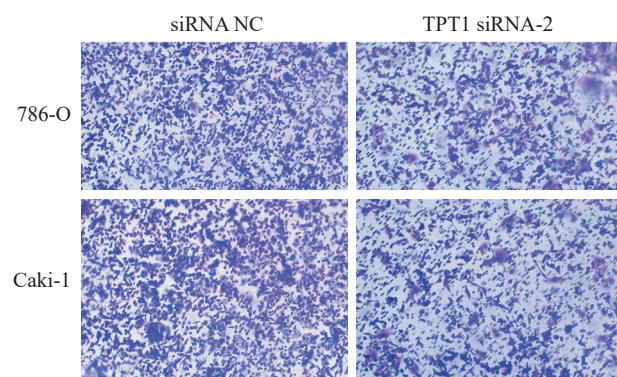


图 8 Transwell 实验验证 TPT1 对 RCC 细胞 786-O 及 Caki-1 侵袭能力的影响 (200×)

Fig 8 Effects of TPT1 on migration of RCC cells 786-O and Caki-1 detected by Transwell assay (200×)

TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; siRNA: Small interfering RNA; NC: Negative control.

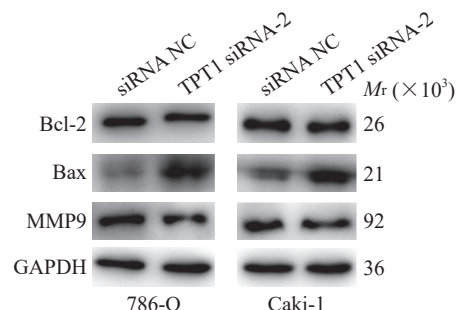


图 9 蛋白质印迹法检测抑制 TPT1 表达后 RCC 细胞 786-O 和 Caki-1 中的 Bcl-2、Bax、MMP9 蛋白表达情况

Fig 9 Expression of Bcl-2, Bax, and MMP9 in RCC cells 786-O and Caki-1 after inhibiting TPT1 detected by Western blotting

TPT1: Translationally-controlled tumor protein 1; RCC: Renal cell carcinoma; Bcl-2: B-cell lymphoma gene 2; Bax: Bcl-2 associated X protein; MMP9: Matrix metalloproteinase-9; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; siRNA: Small interfering RNA; NC: Negative control.

3 讨论

RCC 是全世界的重要公共卫生问题之一^[14]。近年来, TPT1 的临床价值得到了越来越多的关注, 在一些肿瘤中 TPT1 过表达被认为是一个潜在预后因素^[15-16], 但人们对其在 RCC 进展中的作用仍然缺乏认识。

RCC 的病因包括遗传改变、染色体不稳定性及生长因子通路激活等^[1]。为了明确 TPT1 在 RCC 中的病理作用, 本研究评估了 TPT1 在 RCC 组织和细胞中的表达情况。本研究结果显示在 RCC 组织中 TPT1 表达上调, TPT1 表达水平低的 RCC 患者总生存期比 TPT1 表达水平高的 RCC 患者长, 而且肿瘤大小和转移发生率均低于 TPT1 表达水平高的患者, 说明 TPT1 可能在 RCC 中发挥促肿瘤作用。

本研究结果与以往在多种肿瘤中的研究结果一致, 即 TPT1 表现为促肿瘤基因, 如 Sun 等^[17]报道 TPT1 在结直肠癌中能够促进肿瘤细胞增殖和细胞分裂, Zhu 等^[18]研究报道 TPT1 表达增强与宫颈癌进展相关。本研究结果显示, TPT1 在 RCC 组织和细胞中表达上调, 干扰 TPT1 表达可抑制 RCC 细胞的体外增殖、迁移和侵袭, 并增强其凋亡, 表明 TPT1 可能是 RCC 潜在的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] POWLES T, ALBIGES L, BEX A, et al. Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(8): 692-706. DOI: 10.1016/j.annonc.2024.05.537.
- [2] WANG Y, ZHANG X, WANG S, et al. Predicting first-line VEGFR-TKI resistance and survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma using a clinical-radiomic nomogram[J]. *Cancer Imaging*, 2024, 24(1): 151. DOI: 10.1186/s40644-024-00792-7.
- [3] JONASCH E, WALKER C L, RATHMELL W K. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4): 245-261. DOI: 10.1038/s41581-020-00359-2.
- [4] TSIMAFYEY I. Management of non-clear cell renal cell carcinoma: current approaches[J]. *Urol Oncol*, 2017, 35(1): 5-13. DOI: 10.1016/j.urolonc.2016.07.011.
- [5] WANG J, ZOU Y, DU B, et al. SNP-mediated lncRNA-ENTPD3-AS1 upregulation suppresses renal cell carcinoma via miR-155/HIF-1 α signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 672. DOI: 10.1038/s41419-021-03958-4.
- [6] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53. DOI: 10.1016/j.jncc.2024.01.006.
- [7] ROSSI E, BERSANELLI M, GELIBTER A J, et al. Combination therapy in renal cell carcinoma: the best choice for every patient?[J]. *Curr Oncol Rep*, 2021, 23(12): 147. DOI: 10.1007/s11912-021-01140-9.
- [8] PAL S K, FIGLIN R A. Targeted therapies for renal cell carcinoma: understanding their impact on survival[J]. *Target Oncol*, 2010, 5(2): 131-138. DOI: 10.1007/s11523-010-0145-6.
- [9] LI R, ZHU H, YANG D, et al. Long noncoding RNA lncBRM promotes proliferation and invasion of colorectal cancer by sponging miR-204-3p and upregulating TPT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(4): 1259-1263. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.053.
- [10] WANG N, YANG Y, JIA G Z, et al. Long non-coding RNA Down syndrome cell adhesion molecule-antisense 1 promotes gastric carcinoma cell proliferation and migration by regulating the miR-204/TPT1 axis[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(12_suppl): S187-S195. DOI: 10.1177/09603271211036037.
- [11] ZHANG L, WANG Q, WANG F, et al. LncRNA LINC01446 promotes glioblastoma progression by modulating miR-489-3p/TPT1 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1484-1490. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.067.
- [12] ZHANG J, GAO S, ZHANG Y, et al. MiR-216a-5p inhibits tumorigenesis in pancreatic cancer by targeting TPT1/mTORC1 and is mediated by LINC01133[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2612-2627. DOI: 10.7150/ijbs.46822.
- [13] WU W, GAO H, LI X, et al. LncRNA TPT1-AS1 promotes tumorigenesis and metastasis in epithelial ovarian cancer by inducing TPT1 expression[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(5): 1587-1598. DOI: 10.1111/cas.14009.
- [14] WOLF M M, KIMRYN RATHMELL W, BECKERMANN K E. Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications[J]. *Oncogene*, 2020, 39(17): 3413-3426. DOI: 10.1038/s41388-020-1234-3.
- [15] JIAN M, DU Q, ZHU D, et al. Tumor suppressor miR-145-5p sensitizes prolactinoma to bromocriptine by downregulating TPT1[J]. *J Endocrinol Invest*, 2019, 42(6): 639-652. DOI: 10.1007/s40618-018-0963-4.
- [16] WANG W, YANG F, ZHANG L, et al. LncRNA profile study reveals four-lncRNA signature associated with the prognosis of patients with anaplastic gliomas[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 77225-77236. DOI: 10.18632/oncotarget.12624.
- [17] SUN Y, WANG Y, YANG H, et al. MiR-455-3p functions as a tumor suppressor in colorectal cancer and inhibits cell proliferation by targeting TPT1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2522-2529.
- [18] ZHU X, REN J, XU D, et al. Upregulation of translationally controlled tumor protein is associated with cervical cancer progression[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 686718. DOI: 10.3389/fmolb.2021.686718.

[本文编辑] 尹 茶