

## CYFIP2在肾透明细胞癌细胞增殖及迁移中的作用

安哲昆<sup>1,2</sup>, 李修彬<sup>2</sup>, 蔺晨雨<sup>2</sup>, 郭欣鑫<sup>2</sup>, 成晓龙<sup>1\*</sup>, 蔡明<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>山西医科大学基础医学院, 太原 030001; <sup>2</sup>解放军总医院第八医学中心呼吸学部研究所, 北京 100091; <sup>3</sup>浙江大学医学院附属第二医院泌尿外科, 杭州 310009; <sup>4</sup>解放军总医院第三医学中心泌尿外科学部, 北京 100143

[中图分类号] R737.11

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.01.0026

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

安哲昆, 李修彬, 蔺晨雨, 等. CYFIP2在肾透明细胞癌细胞增殖及迁移中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(1): 26-32.

[收稿日期] 2021-08-12

[录用日期] 2021-10-29

[上线日期] 2021-12-15

**[摘要]** **目的** 探讨CYFIP2基因在肾透明细胞癌(KIRC)增殖及迁移中的作用。**方法** 利用TCGA数据库分析CYFIP2基因在KIRC中的表达及与临床病理因素的相关性。将KIRC细胞系786-O转染siRNA-CYFIP2对CYFIP2基因进行敲低, 并利用携带有CYFIP2基因的病毒颗粒感染786-O细胞构建CYFIP2基因稳定过表达体系。将CYFIP2基因敲低后的786-O细胞作为敲低组(siRNA-CYFIP2, si-CYFIP2), 并设置相应的对照组si-NC; CYFIP2基因过表达后的786-O细胞作为过表达组(over expression-CYFIP2, OE-CYFIP2), 并设置相应的对照组OE-NC。采用细胞增殖实验及Transwell实验分析敲低或过表达CYFIP2基因后786-O细胞增殖活性及迁移能力的差异。**结果** TCGA数据库中CYFIP2在KIRC中的表达明显降低( $P<0.0001$ ), 且随肿瘤分期分级进展而降低( $P<0.05$ ); 发生淋巴结转移和远处转移后, CYFIP2基因亦呈低水平表达( $P_N<0.05$ ,  $P_M<0.01$ ); CYFIP2高表达组患者5年生存率较低表达组明显升高( $P<0.05$ )。细胞增殖活性实验及Transwell实验结果显示, 与si-NC组比较, si-CYFIP2组增殖活性明显增强( $P<0.0001$ ), 细胞迁移数目明显增多( $P<0.0001$ ), 而OE-CYFIP2组的增殖活性及迁移能力与OE-NC组比较均明显降低( $P<0.001$ )。**结论** CYFIP2基因对KIRC细胞的增殖及迁移能力具有明显的抑制作用, 可能具有潜在的抑癌作用, 可作为后续KIRC临床诊疗的候选基因之一。

**[关键词]** 肾透明细胞癌; CYFIP2; 细胞增殖; 细胞迁移

### Role of CYFIP2 in proliferation and migration of renal clear cell carcinoma cells

An Zhe-Kun<sup>1,2</sup>, Li Xiu-Bin<sup>2</sup>, Lin Chen-Yu<sup>2</sup>, Guo Xin-Xin<sup>2</sup>, Cheng Xiao-Long<sup>1\*</sup>, Cai Ming<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medical, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

<sup>2</sup>Institute of Respiratory Sciences, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

<sup>3</sup>Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

<sup>4</sup>Department of Urology, the Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100143, China

\*Corresponding author. Cheng Xiao-Long, E-mail: chengxl@sxmu.edu.cn; Cai Ming, E-mail: caiming309@gmail.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81802804), the Incubation Program of Military Medical Science and Technology Youth Cultivation Plan (19QNP060), and the Special Project for Cultivating "Excellent Youth" of Chinese PLA General Hospital (2020-YQPY-006)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of CYFIP2 gene in proliferation and migration of renal clear cell carcinoma (KIRC). **Methods** The TCGA database was used to analyze the expression of CYFIP2 gene in KIRC and the correlation between the expression and clinicopathological factors. The KIRC cell line 786-O was transfected with siRNA-CYFIP2 to knockdown the CYFIP2 gene, and the CYFIP2 gene stable overexpression system was constructed by infecting 786-O cells with viral particles carrying the CYFIP2 gene. The 786-O cells were used as the knockdown group (siRNA-CYFIP2, si-CYFIP2) after the CYFIP2

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金(81802804); 军队医学科技青年培育计划孵化项目(19QNP060); 解放军总医院“优青”培育专项(2020-YQPY-006)

**[作者简介]** 安哲昆, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

**[通信作者]** 成晓龙, E-mail: chengxl@sxmu.edu.cn; 蔡明, E-mail: caiming309@gmail.com

gene was knockdown, and set the corresponding control group si-NC; the 786-O cells were used as the overexpression group (Over Expression-CYFIP2, OE-CYFIP2) after performing CYFIP2 gene overexpression, and set the corresponding control group OE-NC. Subsequently, cell proliferation assays and Transwell assays were performed to analyze the differences in proliferative activity and migration ability of 786-O cells after knockdown or overexpression of CYFIP2 gene. **Results** The expression of CYFIP2 in KIRC was significantly lower ( $P<0.0001$ ) in the TCGA database and decreased with the progression of tumor staging ( $P<0.05$ ); CYFIP2 gene was also expressed at a low level after the occurrence of lymph node metastasis and distal metastasis ( $P_N<0.05$ ,  $P_M<0.01$ ); the 5-year survival rate of patients was significantly higher in the group with high CYFIP2 expression than that in the group with low expression ( $P<0.05$ ). The cell proliferation activity assay showed that the proliferation activity was significantly enhanced in si-CYFIP2 group than that in si-NC group ( $P<0.0001$ ) and the number of cell migration was significantly increased ( $P<0.0001$ ), while the proliferation activity and migration ability of OE-CYFIP2 group were significantly inhibited ( $P<0.001$ ) compared with that of OE-NC group. **Conclusion** The CYFIP2 gene had a significant inhibitory effect on the proliferation and migratory ability of KIRC cells and may have a potential antitumor effect, which can be one of the candidate genes for the subsequent clinical diagnosis and treatment of KIRC.

**[Key words]** renal clear cell carcinoma; CYFIP2; cell proliferation; cell migration

肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)是肾癌最常见的病理类型<sup>[1]</sup>, 占全部肾癌的80%~85%<sup>[2-3]</sup>, 虽然其恶性程度较低, 但由于肾脏属于代偿功能较强的实质性器官, 因此常起病隐匿<sup>[4]</sup>, 其中20%~25%的患者在确诊时已出现远处转移<sup>[5]</sup>。在临床上, KIRC常与颗粒细胞癌及梭形细胞癌混合存在, 肿瘤分级较困难, 现有的治疗手段主要为肾癌根治性切除和对症、支持治疗, 靶向治疗手段较为局限。因此, 寻找新的有效生物标志物和治疗靶点具有十分重要的现实意义。FMR1-相互作用蛋白-2(CYFIP2)基因的编码产物主要定位在胞质及质膜, 是一种新型的p53介导的促凋亡蛋白(又称p53诱导蛋白121)<sup>[6]</sup>, 胃癌患者的CYFIP2转录水平明显低于癌旁组织<sup>[3,7]</sup>。目前绝大多数研究立足于CYFIP2基因的生物學功能, 而其在细胞增殖活性及迁移方面的作用研究较少, 在KIRC中的研究亦相对匮乏。本研究分析了CYFIP2基因在KIRC组织中的表达水平及与患者预后的关系, 并检测敲低及过表达CYFIP2基因后786-O细胞增殖活性及迁移能力的变化, 旨在探讨CYFIP2基因对KIRC生物学特性的影响, 并为进一步探索KIRC新的诊疗靶点提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** KIRC细胞系786-O细胞由中国科学院北京基因组研究所刘江课题组赠送。RPMI 1640培养基、PBS、胎牛血清(FBS)购自以色列BI公司, 青霉素-链霉素-新霉素抗生素混合试剂(Psn)购自美国Gibco公司; CYFIP2-靶特异性siRNA(si-CYFIP2)及阴性对照siRNA-NC由赛默飞世尔科技中国有限公司合成, 为避免脱靶, 本实验共设计3条CYFIP2基因干扰RNA序列, 即siRNA1: GAGUAGAGAUCUAUGAGAAdTdT, siRNA2:

GCAAGUUCAUCAACAUGUdTdT, siRNA3: GAGAAUAAAUCUUAGCAAAdTdT。阴性对照病毒CON335(Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin)、CYFIP2基因过表达病毒LV-CYFIP2、嘌呤霉素(puromycin)及HitransG病毒感染试剂均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; iTaq Universal SYBR Green Supermix试剂盒及iScript cDNA Synthesis试剂盒均购自美国Bio-Rad公司, JET PRIME转染试剂盒购自法国Poly Plus公司, Cell Count Kit 8(CCK-8)试剂盒购自北京兰博利德商贸有限公司, Trizol细胞裂解液购自美国Ambion公司, 12孔板、96孔板、培养皿及离心管等耗材均购自美国康宁公司。

**1.2 CYFIP2基因相关预后数据的获取及分析** 检索TCGA-RNA Sequencing数据库及GEPIA信息库(<http://gepia.cancer-pku.cn>)并提取CYFIP2基因在KIRC组织及正常组织的表达信息, 共获取529例KIRC患者的KIRC组织的CYFIP2基因表达信息, 另取此529例KIRC患者中71例的癌旁组织作为对照。利用ALCA数据库分析CYFIP2基因表达量与临床特征及预后的关系。然后, 以TCGA数据库和GEPIA信息库构建UALCAN可视化平台, 在此平台中以TCGA-RNA Sequencing数据集检索CYFIP2, 数据库选项选择肾透明细胞癌; 分别对肿瘤分级、TNM分期、淋巴转移及远处转移等临床特征分组及预后情况进行分析。最后利用GEPIA数据库合并TCGA数据集, 应用survival选项分析CYFIP2表达水平差异与患者生存时间的Kaplan-Meier曲线。

**1.3 786-O细胞分组情况** 将786-O细胞分别转染si-CYFIP2-1、si-CYFIP2-2、si-CYFIP2-3三种siRNA进行敲低效率检测, 选择敲低效果最好的siRNA进行后续实验(下文称si-CYFIP2)。实验分组: 将CYFIP2基因敲低后的786-O细胞作为敲低组

(si-CYFIP2)组并设置相应对照组si-NC;另将进行CYFIP2基因过表达后的786-O细胞作为过表达组(OE-CYFIP2),并设置相应对照组OE-NC。

**1.4 786-O细胞转染构建敲低体系** 取对数生长期的786-O细胞,以 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于12孔板,在 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下,于RPMI 1640培养基中培养至融合度达70%,弃去培养基,PBS洗1次;依照JET PRIME转染试剂盒说明书加入转染体系100  $\mu\text{l}$ /孔(配比为94  $\mu\text{l}$  Buffer、2.3  $\mu\text{l}$  si-RNA、3.7  $\mu\text{l}$  JET试剂),24h后换液,干扰表达效果可维持3~5 d。

**1.5 慢病毒感染786-O细胞构建过表达体系** 向6孔板中加入RPMI 1640完全培养基(4% Hitrans GA、10%FBS),取对数生长期的786-O细胞,以 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板,待融合度达20%~40%后换液,以感染复数(MOI)=5的比例分别加入阴性对照病毒CON335及LV-CYFIP2病毒,8~16 h弃去培养基,PBS洗1次;加入无病毒及增强剂的RPIM 1640完全培养基,24 h后观察细胞状态;每毫升培养基加入1  $\mu\text{g}$ 嘌呤霉素,3~5 d持续观察细胞状态,根据细胞生长状态每2 d换液1次。

**1.6 细胞增殖-毒性实验检测786-O细胞增殖活性** 将786-O细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔板培养,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养,待融合度达50%左右时,培养24~72 h后弃去培养基,PBS洗1次,加入新培养基后,每孔分别加入CCK-8试剂10  $\mu\text{l}$ ,轻轻混匀后于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中孵育2 h,采用酶标仪检测各孔在450 nm处的吸光度(OD)值。

**1.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析786-O细胞CYFIP2基因表达水平** 取对数生长期的786-O细胞,以 $5 \times 10^4$ 个/孔接种于12孔板,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养24~36 h,待融合度达40%~70%时,弃去培养基,PBS洗1次;采用Trizol裂解液充分裂解细胞后提取总RNA,使用iScript cDNA Synthesis试剂盒及iTaq Universal SYBR Green Supermix试剂盒对提取的RNA进行反转录。利用Primer Bank数据库查询并设计CYFIP2引物,上游引物5'-TCCAACGTGGACCTGCTT-3',下游引物5'-GGACTGTAGCCTGCTCAATG-3';内参照GAPDH上游引物5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3',下游引物5'-GATGGAGGGATGATGTTC-3'。然后利用qRT-PCR分析786-O细胞CYFIP2基因敲低及过表达水平。

**1.8 细胞克隆形成实验分析786-O细胞增殖活性** 取处理后的786-O对数生长期细胞,以500个/孔接种于6孔板,于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中孵育8~10 d,待出现肉眼可观测到直径100  $\mu\text{m}$ 左右的单

细胞克隆时弃去培养基,PBS洗2次;然后于甲醇溶液中固定细胞15 min,弃去甲醇溶液,每孔加入300  $\mu\text{l}$  0.5%结晶紫溶液对细胞克隆染色10 min,弃去染液,PBS清洗2次,进行细胞克隆计数并分析。

**1.9 Transwell细胞迁移实验分析786-O细胞迁移能力** 用0.25%胰酶溶液消化经血清饥饿24 h的786-O对数生长期细胞,制备单细胞悬液,以1000 r/min(离心半径为7.59 cm)离心5 min后,用无FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞并计数,取Transwell小室置于24孔板,加入200  $\mu\text{l}$ 细胞密度为 $1.25 \times 10^5$ 个/ml的细胞悬液,然后将小室分别置于700  $\mu\text{l}$ 含10%胎牛血清的RPIM 1640完全培养基的24孔板中, $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱培养24及48 h后取出Transwell小室,用甲醇固定细胞,0.1%结晶紫染色。显微镜下采集图像,以Photoshop软件对迁移细胞进行计数。

**1.10 统计学处理** 采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合方差齐性,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,进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验;计数资料以例(%)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 CYFIP2基因在KIRC中的表达及其对生存预后的影响** 从TCGA-RNA Sequencing数据库获取的529例KIRC患者的临床病理信息见表1。生物信息学分析显示,与癌旁组织比较,KIRC组织中的CYFIP2 mRNA表达水平明显下调( $t=26.96$ ,  $P < 0.01$ ,图1A)。进一步分析在肿瘤不同分期和分级中CYFIP2 mRNA表达水平的差异,结果显示,随肾癌病理分级及分期进展,CYFIP2基因表达水平逐渐降低( $F_{\text{分级}}=7.979$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{分期}}=6.883$ ,  $P < 0.01$ ,图1B、C);随原发肿瘤浸润程度加深(T分期进展),CYFIP2基因表达水平也呈降低趋势( $F=6.378$ ,  $P < 0.01$ ,图1D);发生淋巴结转移患者的KIRC样本中CYFIP2基因表达丰度明显低于未发生淋巴结转移者( $t=2.212$ ,  $P < 0.05$ ,图1E);发生远处转移患者的KIRC样本中CYFIP2表达水平明显低于未发生转移者的样本( $t=2.965$ ,  $P < 0.01$ ,图1F)。Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,CYFIP2高表达的患者生存期长、存活率高( $P < 0.01$ ),5年存活率为75%,而CYFIP2低表达的患者5年存活率不足60%(图1G)。

**2.2 CYFIP2基因敲低及过表达后786-O细胞CYFIP2基因表达水平的变化** RT-PCR结果显示,在敲低CYFIP2基因后,786-O细胞中CYFIP2基因的表达水平降至30%左右( $t_1=4.308$ ,  $P < 0.01$ ;

表1 KIRC患者临床病理信息(n=529)

Tab.1 Clinicopathological information of patients with renal clear cell carcinoma (n=529)

临床特点	例(%)	临床特点	例(%)
肿瘤分级		T分期	
G <sub>1</sub>	14(2.6)	T <sub>1</sub>	270(51.1)
G <sub>2</sub>	226(42.7)	T <sub>2</sub>	69(13.0)
G <sub>3</sub>	206(38.9)	T <sub>3</sub>	179(33.8)
G <sub>4</sub>	75(14.2)	T <sub>4</sub>	11(2.1)
G <sub>x</sub>	5(1.0)	淋巴转移	
数据缺失	3(0.6)	N <sub>0</sub>	238(45.0)
肿瘤分期		N <sub>1</sub>	16(3.0)
I	264(49.9)	N <sub>x</sub>	275(52.0)
II	57(10.8)	远处转移	
III	123(23.3)	M <sub>0</sub>	419(79.2)
IV	82(15.5)	M <sub>1</sub>	78(14.7)
数据缺失	3(0.5)	M <sub>x</sub>	30(5.7)
		数据缺失	2(0.4)

KIRC. 肾透明细胞癌

$t_2=5.183, P<0.01; t_3=5.024, P<0.01$ , 图2A), 其中si-CYFIP2-2的敲低效果最佳, 因此, 后续采用siRNA-CYFIP2-2进行实验(下文称si-CYFIP2)。慢病毒感染786-O细胞(MOI=5)过表达CYFIP2基因后, 经puromycin筛选后得到OE-NC组和OE-CYFIP2组的细胞(图2B); OE-CYFIP2组786-O细胞的CYFIP2

基因表达水平明显上调, 较OE-NC组约提高12倍( $t=17.10, P<0.01$ , 图2C)。

**2.3 CYFIP2基因表达水平改变后对786-O细胞增殖活性及克隆形成能力的影响** 与si-NC组比较, si-CYFIP2组48 h和72 h时786-O细胞增殖活性明显升高( $t_{48h}=9.143, P<0.0001; t_{72h}=-219.951, P<0.0001$ , 图3A); 与OE-NC组比较, OE-CYFIP2组的增殖活性在24 h、48 h和72 h时明显降低, 差异有统计学意义( $t_{24h}=31.44, P<0.01; t_{48h}=16.540, P<0.0001; t_{72h}=47.59, P<0.0001$ , 图3B)。细胞克隆形成实验表明, 与si-NC组比较, si-CYFIP2组786-O细胞的克隆形成能力明显增强, 细胞克隆形成集落明显增多, 差异有统计学意义[( $59.5 \pm 7.8$ )个/视野 vs. ( $31.5 \pm 0.7$ )个/视野,  $t=-5.07, P<0.0001$ ]; 与OE-NC组比较, OE-CYFIP2组克隆形成集落数明显减少, 克隆形成能力明显减弱[( $22.0 \pm 0.8$ )个/视野 vs. ( $43.5 \pm 1.3$ )个/视野,  $t=-5.07, P<0.0001$ ] (图3C、D)。

**2.4 CYFIP2基因表达水平改变对786-O细胞体外迁移能力的影响** Transwell实验结果显示, 786-O细胞敲低CYFIP2基因后, 与si-NC组比较, si-CYFIP2组24 h和48 h的细胞迁移数目均明显增多, 迁移能力明显增强[( $66.8 \pm 2.21$ )个/视野 vs. ( $43.0 \pm 2.6$ )个/视野,  $t_{24h}=13.96, P<0.0001; (187.3 \pm 22.3)$ 个/视野 vs. ( $108.7 \pm 10.8$ )个/视野,  $t_{48h}=5.505, P<0.01$ ,

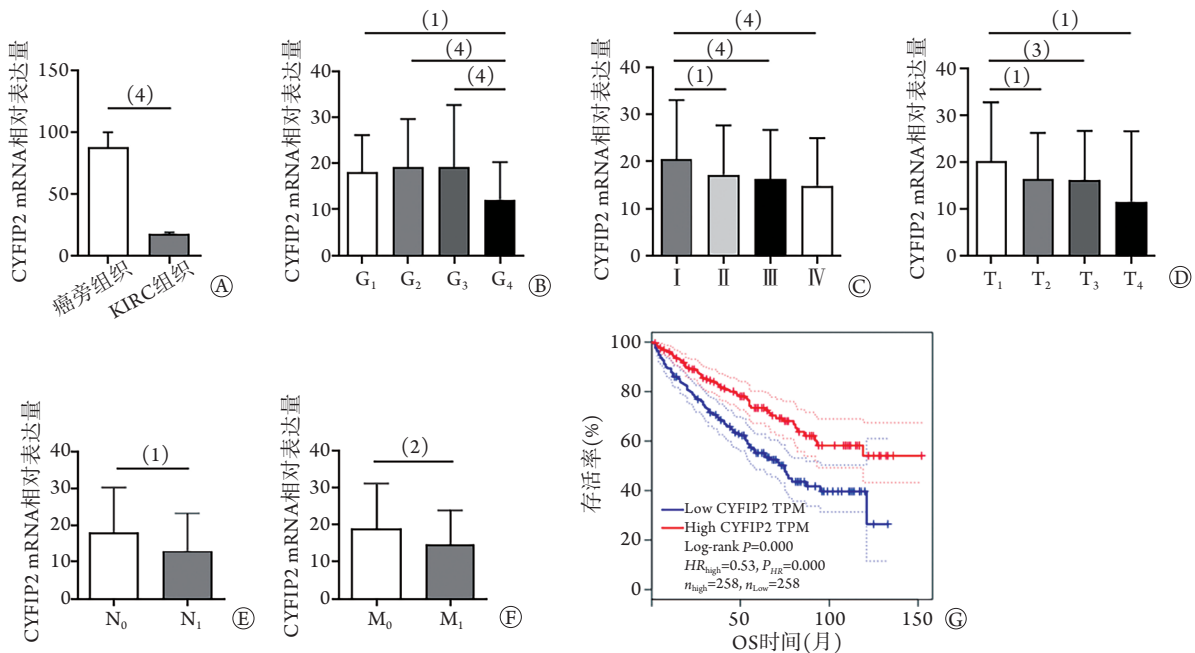


图1 CYFIP2基因在KIRC中的表达及其对预后的影响

Fig.1 Effect of CYFIP2 gene expression in KIRC and on the prognosis of KIRC

A. KIRC组织与癌旁组织CYFIP2基因表达水平的差异; B. 不同分级KIRC样本CYFIP2基因表达水平变化; C. 不同KIRC分期进展患者样本CYFIP2基因表达水平变化; D. 不同T分期进展患者样本CYFIP2基因表达水平变化; E. KIRC发生淋巴结转移与未发生转移患者样本CYFIP2基因表达水平的差异; F. 是否发生远处转移患者样本CYFIP2基因表达水平的差异; G. CYFIP2基因低表达患者组与高表达患者组总生存曲线; (1) $P<0.05$ 、(2) $P<0.01$ 、(3) $P<0.001$ 、(4) $P<0.0001$

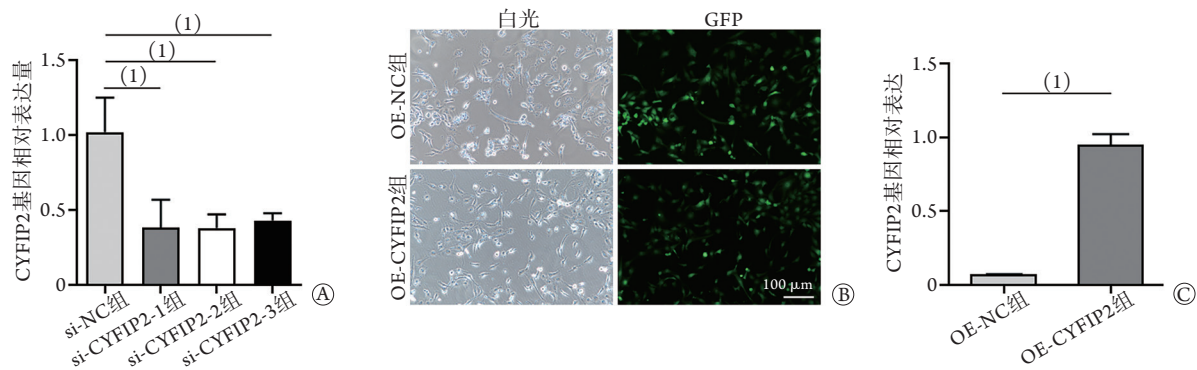


图2 CYFIP2基因表达水平改变情况及慢病毒感染情况

Fig.2 Altered CYFIP2 gene expression levels and lentivirus infection

A. 786-O细胞中CYFIP2基因敲低后的表达水平; B. 慢病毒感染786-O细胞后在白光及绿色荧光(GFP)激发条件下的细胞状态; C. 786-O细胞中CYFIP2基因过表达后的表达水平; (1) $P < 0.01$

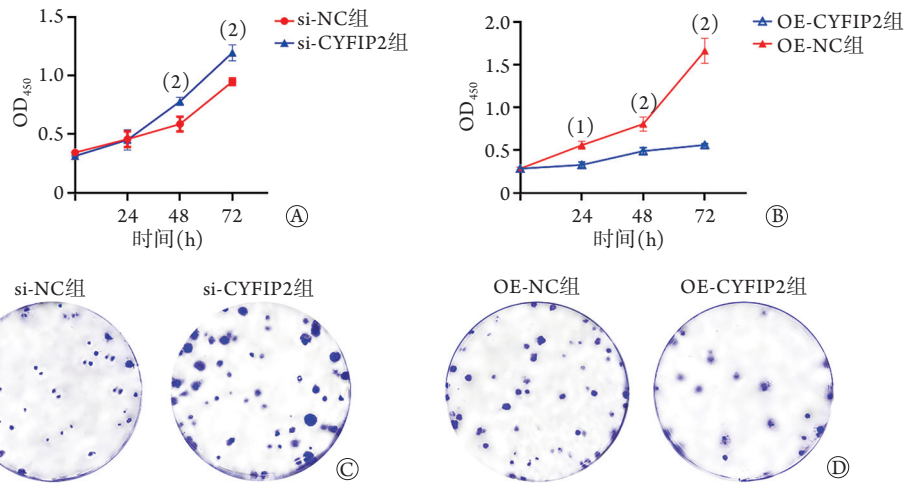


图3 CYFIP2基因敲低及过表达后786-O细胞增殖活性及克隆形成情况

Fig.3 Proliferation viability and clone formation of 786-O cells after CYFIP2 gene knockdown and overexpression

A. 786-O细胞敲低CYFIP2基因后450 nm波长处OD值(CCK-8法); B. 786-O细胞过表达CYFIP2基因后450 nm波长处OD值(CCK-8法); C. 786-O细胞敲低CYFIP2基因后细胞克隆形成情况; D. 786-O细胞过表达CYFIP2基因后细胞克隆形成情况; (1) $P < 0.01$ , (2) $P < 0.0001$

图4A]; 786-O细胞过表达CYFIP2基因后, 与OE-NC组比较, OE-CYFIP2组24 h和48 h时细胞迁移数目明显减少, 迁移能力明显降低[(38.7 ± 1.5)个/视野 vs. (60.3 ± 2.5)个/视野,  $t_{24h} = 12.75$ ,  $P < 0.001$ ; (129.7 ± 2.5)个/视野 vs. (201.0 ± 5.3)个/视

野,  $t_{48h} = 21.09$ ,  $P < 0.0001$ , 图4B]。

### 3 讨论

关于CYFIP2基因的现有研究不仅揭示了其对神经发育及线粒体生物学功能的重要影响<sup>[8]</sup>, 同

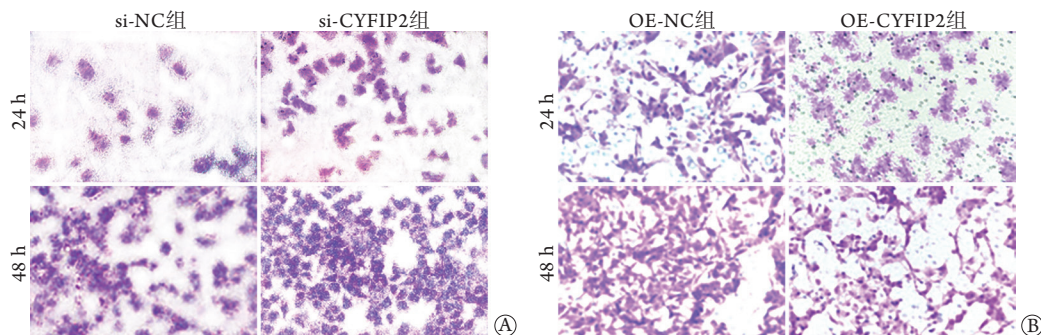


图4 CYFIP2基因敲低(A)及过表达(B)对786-O细胞体外迁移能力的影响(Transwell × 20)

Fig.4 Changes of migration ability *in vitro* of 786-O cells 24 h and 48 h after CYFIP2 knockdown or overexpression (Transwell × 20)

时显示了其在肿瘤生物学特性方面的重要功能。CYFIP2与CYFIP1为同源基因，但与后者不同的是，前者可与3个脆性X智力低下蛋白(FMRP)发生相互作用<sup>[9]</sup>。CYFIP2基因在肺癌细胞中作为p53的候选靶基因发挥协同作用，与Akt竞争性结合膜脂，从而抑制Akt的活化<sup>[10-11]</sup>，进一步增强肺癌细胞的凋亡。但CYFIP2并不能直接诱导和激活肺癌细胞凋亡，而是通过发挥p53依赖的协同作用实现的<sup>[12-13]</sup>。值得注意的是，在体外研究中利用siRNA对CYFIP2进行敲低后未能阻断p53依赖的细胞凋亡<sup>[14]</sup>；而在胃癌细胞中，NDRG1作为p53的另一个靶基因，在CYFIP2基因表达受到抑制后，可继续间接介导细胞凋亡<sup>[15]</sup>；提示在p53依赖的细胞凋亡通路中CYFIP2并非唯一的调节因素<sup>[16-17]</sup>。在结直肠癌细胞中，CYFIP2同样可作为促凋亡蛋白直接增加细胞凋亡，过表达CYFIP2后caspase-3及其下游PARP生物信号增强<sup>[13]</sup>。还有体外实验发现，抑制BGC-823胃癌细胞CYFIP2基因的表达可缓解5-氟尿嘧啶介导的Akt信号抑制效应<sup>[16]</sup>，但尚无明确证据提示在胃癌发生发展过程中CYFIP2与Akt之间存在直接的功能交互作用。

在肿瘤细胞增殖活性方面，敲低CYFIP2基因后胃癌细胞的增殖活性明显增强<sup>[10]</sup>，但对肿瘤发生发展过程中该基因的具体作用机制尚不明确。MGC-803及SGC-7901胃癌细胞系敲低CYFIP2基因后，其恶性增殖能力及成瘤性明显增强。此外，CYFIP2基因表达水平低下时，结肠癌细胞K-Ras的表达增强<sup>[18]</sup>。K-Ras作为一种致癌蛋白，在肿瘤的生成、增殖迁移及血管生成方面均具有重要的生物学效应，可影响癌症的进展<sup>[19-20]</sup>。研究发现，在小鼠模型中K-Ras可条件性激活胃鳞状上皮细胞增殖，进一步诱导胃癌前病变<sup>[21-22]</sup>，提示CYFIP2基因敲低诱导的胃癌细胞增殖可能与K-Ras表达增强有关。

CYFIP2基因与肌动蛋白(WASP)动力学和突触前线粒体活性调节相关<sup>[23-24]</sup>。一项针对脆性X综合征(fragile X syndrome, FXS)患者的研究发现，其核糖体蛋白S6激酶1(S6K1)的水平升高，且作为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)调节因子的磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶(pAkt)和CYFIP2的表达水平也升高，进而出现肌动蛋白WASP家族Verprolin同源蛋白(WAVE)的活性上调<sup>[25]</sup>，而WAVE复合物已被证实于乳腺癌及胰腺癌的肿瘤细胞迁移中发挥着重要作用<sup>[26-27]</sup>。

本研究通过si-RNA转染及慢病毒感染改变CYFIP2基因的表达水平后，通过RT-PCR等实验证实了786-O细胞中的CYFIP2基因敲低后其表达水

平降至30%，而过表达后CYFIP2基因的表达水平则提高了12倍。进一步结合临床预后数据分析对CYFIP2基因在KIRC细胞系中的生物学效应作出假设，且在后续的体外实验中利用CCK-8及细胞克隆形成实验证实，干扰786-O细胞CYFIP2基因表达后，肿瘤细胞的增殖活性及克隆形成能力明显提高，但过表达CYFIP2基因后，786-O细胞的增殖活性及克隆形成能力明显受到抑制。笔者推测该基因对于KIRC增殖活性的调节作用可能与其参与胞内能量代谢活动有关，其机制可能与调控Akt-mTOR信号通路活性相关<sup>[9-10]</sup>。此外，本研究Transwell实验结果显示，CYFIP2基因表达降低可促进786-O细胞迁移，而在786-O细胞中过表达CYFIP2基因后细胞迁移能力明显降低，其机制可能由CYFIP2基因调节相关分子磷酸化水平来实现，但CYFIP2在KIRC中的具体作用机制仍需进一步探讨。

综上所述，本研究结果显示，CYFIP2基因参与了肿瘤细胞的增殖及迁移等生物学进程，在KIRC患者肿瘤组织中CYFIP2基因的表达水平低于癌旁组织，随KIRC病理分级和分期进展CYFIP2表达水平明显降低，CYFIP2高表达的患者具有高的生存率及长的存活期。本研究丰富了CYFIP2基因及KIRC的相关基础研究，为后续研究提供了新的线索和思路，但数据及分析仅表明CYFIP2基因参与了KIRC的增殖及转移，且与患者预后存在潜在关联，而其具体作用靶点及机制仍有待进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Tang Y, Xin H, Pan YF. Research progress on the tumor suppressor gene PBRM1 in renal cell carcinoma[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(7): 724-730. [唐余, 辛慧, 潘有福. 抑癌基因PBRM1在肾细胞癌中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(7): 724-730.]
- [2] Randall JM, Millard F, Kurzrock R. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art[J]. Cancer Metastasis Rev, 2014, 33(4): 1109-1124.
- [3] Lipworth L, Morgans AK, Edwards TL, et al. Renal cell cancer histological subtype distribution differs by race and sex[J]. BJU Int, 2016, 117(2): 260-265.
- [4] Liu Q, He JJ, Han MK, et al. Renal clear cell carcinoma in nasal cavity and paranasal sinuses: 5 cases report and literature review[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(12): 1227-1231. [刘穹, 贺敬敬, 韩明鲲, 等. 鼻腔鼻窦肾透明细胞癌5例报告并文献复习[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(12): 1227-1231.]
- [5] Wang Q, Gu L, Zheng H, et al. Report of three cases of metastatic renal clear cell carcinoma of the breast[J]. Tianjin Med, 2017, 45(11): 1205-1207. [王琼, 顾林, 郑红, 等. 乳腺转移性肾透明细胞癌三例报告[J]. 天津医药, 2017, 45(11): 1205-1207.]
- [6] Schenck A, Bardoni B, Moro A, et al. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein

- (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8844-8849.
- [7] Cheng AS, Li MS, Kang W, *et al.* Helicobacter pylori causes epigenetic dysregulation of FOXD3 to promote gastric carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(1): 122-133.
- [8] Begemann A, Sticht H, Begtrup A, *et al.* New insights into the clinical and molecular spectrum of the novel CYFIP2-related neurodevelopmental disorder and impairment of the WRC-mediated actin dynamics[J]. *Genet Med*, 2021, 23(3): 543-554.
- [9] Hoeffler CA, Sanchez E, Hagerman RJ, *et al.* Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome[J]. *Genes Brain Behav*, 2012, 11(3): 332-341.
- [10] Jiao SH, Li N, Cai S, *et al.* Inhibition of CYFIP2 promotes gastric cancer cell proliferation and chemoresistance to 5-fluorouracil through activation of the Akt signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2133-2140.
- [11] Kawase T, Ohki R, Shibata T, *et al.* pH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt[J]. *Cell*, 2009, 136(3): 535-550.
- [12] Saller E, Tom E, Brunori M, *et al.* Increased apoptosis induction by 121F mutant p53[J]. *EMBO J*, 1999, 18(16): 4424-4437.
- [13] Jackson RS 2nd, Cho YJ, Stein S, *et al.* CYFIP2, a direct p53 target, is leptomycin-B sensitive[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(1): 95-103.
- [14] Lassus P, Roux P, Zugasti O, *et al.* Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 2000, 19(20): 2377-2385.
- [15] Stein S, Thomas EK, Herzog B, *et al.* NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48930-48940.
- [16] Li B, Wang L, Chi B. Upregulation of periostin prevents P53-mediated apoptosis in SGC-7901 gastric cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 1677-1683.
- [17] Hong SW, Jung KH, Park BH, *et al.* KRC-408, a novel c-Met inhibitor, suppresses cell proliferation and angiogenesis of gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(1): 74-82.
- [18] Mongroo PS, Noubissi FK, Cuatrecasas M, *et al.* IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2172-2182.
- [19] Park MT, Kim MJ, Suh Y, *et al.* Novel signaling axis for ROS generation during K-Ras-induced cellular transformation[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(8): 1185-1197.
- [20] Song IS, Oh NS, Kim HT, *et al.* Human ZNF312b promotes the progression of gastric cancer by transcriptional activation of the K-ras gene[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 3131-3139.
- [21] Matkar SS, Durham A, Brice A, *et al.* Systemic activation of K-ras rapidly induces gastric hyperplasia and Metaplasia in mice[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4): 432-445.
- [22] Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, *et al.* Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2006, 125(2): 301-313.
- [23] Lee Y, Zhang YH, Kang H, *et al.* Epilepsy- and intellectual disability-associated CYFIP2 interacts with both actin regulators and RNA-binding proteins in the neonatal mouse forebrain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(1): 1-6.
- [24] Kim GH, Zhang YH, Kang HR, *et al.* Altered presynaptic function and number of mitochondria in the medial prefrontal cortex of adult Cyfip2 heterozygous mice[J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 123.
- [25] Derivery E, Gautreau A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines[J]. *Bioessays*, 2010, 32(2): 119-131.
- [26] Juin A, Spence HJ, Martin KJ, *et al.* N-WASP control of LPAR1 trafficking establishes response to self-generated LPA gradients to promote pancreatic cancer cell metastasis[J]. *Dev Cell*, 2019, 51(4): 431-445.e7.
- [27] Frugtniet B, Jiang WG, Martin TA. Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis[J]. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2015, 7: 99-109.

(责任编辑: 张小利)