DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0087　　**文章编号** 1671-8852(2025)01-0036-05

PRC1靶向调控Hippo通路促进肾癌细胞增殖和迁移能力

万梓宇　王　霞　郑张节　王　豪　阿尔斯·马旦也提　彭建平
武汉大学中南医院泌尿外科　湖北　武汉　430071

摘要　目的：研究胞质分裂蛋白1(PRC1)对肾癌细胞的增殖和迁移能力的影响并探讨其在肾癌中的作用。方法：使用Gepia2数据库分析PRC1在肾癌中的差异表达和预后。在Caki-1细胞系中使用CRISPR/Cas9技术敲低PRC1的表达。设置对照组和PRC1敲低组(KO1#、KO2#)，通过CCK-8增殖实验、平板克隆实验、Transwell实验分别观察PRC1对肾癌细胞增殖、迁移能力的影响。通过皮下荷瘤实验评估PRC1在体内的致瘤能力。对PRC1敲除的Caki-1细胞进行RNA-seq测序分析PRC1在肾癌中潜在的致癌机制。结果：PRC1在肾癌组织的表达明显高于癌旁组织($P<0.05$)。PRC1高表达的肾癌患者预后更差($P<0.05$)，在敲低PRC1后，CCK-8结果显示，PRC1敲低后肾癌细胞增殖能力明显下降($P<0.05$)。平板克隆形成实验结果显示，PRC1敲低后细胞集落形成能力显著下降($P<0.05$)。Transwell实验显示，PRC1敲低后细胞迁移能力显著下降($P<0.05$)。此外，敲低PRC1的表达抑制了体内荷瘤的致瘤能力。通过对敲除PRC1的Caki-1细胞进行RNA测序，我们发现了Hippo通路是PRC1在肾癌中潜在的作用靶点。结论：PRC1在肾癌组织中表达显著增加，显示出与肾癌不良预后的关联。PRC1通过调控Hippo通路来促进肾癌细胞的增殖和迁移。

关键词　肾癌；PRC1；Hippo通路
中图分类号　R69
文献标识码　A
开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

PRC1 promotes the proliferation and migration of renal cancer cells by targeting Hippo signaling pathway

WAN Ziyu, WANG Xia, ZHENG Zhangjie, WANG Hao, Aersi Madanyeti, PENG Jianping
Dept. of Urology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effect of protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1) on the proliferation and migration of renal carcinoma and the role of PRC1 in renal carcinoma. **Methods:** The differential expression and prognosis of PRC1 in renal carcinoma were analyzed using the Gepia2 database, and CRISPR/Cas9 technology was subsequently used to knock down PRC1 expression in Caki-1 cells. The control group and PRC1 knockdown groups (KO1# and KO2#) were established to observe the effects of PRC1 on cell proliferation and migration abilities through CCK-8 proliferation assay, plate colony formation assay, and Transwell assay. A subcutaneous tumor experiment was conducted to evaluate the tumorigenic ability *in vivo*. RNA sequencing analysis was performed on PRC1 knockout Caki-1 cells to explore the potential carcinogenic mechanisms of PRC1 in renal carcinoma. **Results:** PRC1 expression was significantly higher in renal carcinoma tissues than in adjacent tissues ($P<0.05$). High ex-

课题来源：武汉市中青年医学骨干人才培养工程(编号：YL1400000018)
作者简介：万梓宇，男，1998—，医学硕士生，主要从事泌尿系肿瘤等方面的研究，E-mail：592135672@qq.com
通信作者：彭建平，男，1983—，医学博士，副主任医师，副教授，硕士生导师，主要从事泌尿系肿瘤、肾脏纤维化等方面的研究，E-mail：pengjianping@whu.edu.cn

pression of PRC1 was significantly associated with a poorer prognosis in patients with renal carcinoma ($P<0.05$). Knockdown of PRC1 led to a significant decrease in cell proliferation ability ($P<0.05$) as observed through CCK-8 assay. Plate colony formation assay demonstrated a significant decrease in colony formation ability after PRC1 knockdown ($P<0.05$). Transwell assay showed a significant reduction in cell migration ability after PRC1 knockdown ($P<0.05$). Furthermore, knocking down PRC1 expression inhibited tumorigenic ability *in vivo*. RNA sequencing analysis of PRC1 knockout Caki-1 cells revealed the Hippo pathway as a potential target of PRC1 in renal carcinoma. **Conclusion:** PRC1 is significantly upregulated in renal carcinoma tissues, indicating an association with poor prognosis. PRC1 promotes the proliferation and migration abilities of renal carcinoma cells through the regulation of Hippo pathway.

Key Words　Renal Carcinoma; PRC1; Hippo Pathway

胞质分裂蛋白 1(protein regulator of cytokinesis 1,PRC1)是参与胞质分裂调控的关键蛋白,为交联极间微管(interpolar microtubules,iMTs)提供了必要的结构支持,并动态调节它们的连接,以确保有丝分裂纺锤体的稳定性[1,2]。PRC1 的失调可导致细胞胞质分裂缺陷,从而促进肿瘤的发生发展。大量报道强调了 PRC1 在肝癌[3]、卵巢癌[4]、胃癌[5]、乳腺癌[6]、肺腺癌[7]、前列腺癌[8]、结肠癌[9]、食管癌[10]中的致瘤作用。然而目前还未见关于 PRC1 在肾癌中的报道。本研究旨在探究 PRC1 在肾癌中的表达变化及对肾癌细胞增殖、迁移能力的影响,并探究 PRC1 在肾癌中潜在的作用机制。

1　材料与方法

1.1　细胞培养　Caki-1 和 HEK293T 细胞由中国科学院(上海)细胞库提供。HEK293T 细胞在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养和维持。Caki-1 细胞在添加 10% 胎牛血清的 McCoy′s 5A medium 培养基中培养和维持。所有细胞均在 37 ℃、5% 的 CO_2 和 95% 的空气中孵育培养。

1.2　主要试剂　兔抗人 PRC1(Cat. 15617-1-AP)抗体及兔抗人 GAPDH(Cat. 60004-1-Ig)抗体均购自武汉 Proteintech 公司,RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸化酶抑制剂购自上海碧云天公司。

1.3　Gepia2 网站数据分析　通过 Gepia2 网站(gepia2.cancer-pku.cn/)分析 PRC1 在肾癌中的表达差异及相关生存分析研究。

1.4　Caki-1 细胞中的 PRC1 敲除　使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 Caki-1 细胞中敲除了 PRC1,由天一汇源生物技术公司(中国武汉)合成了靶向 PRC1 外显子 1 和 2 的小导向 RNA(small guide RNA,sgRNA)序列(sgRNA1 和 sgRNA2)。将制备的 sgRNA 寡核苷酸连接到 lentiCRISPRv2 质粒上。重组 lentiCRISPRv2-sgRNAs 在 293T 细胞中包装和扩增。将获得的慢病毒与 Caki-1 细胞孵育 48 h,最后用 1 μg/mL 嘌呤霉素浓度筛选感染细胞。连续培养 5 d 后获得稳定的混合单克隆细胞,然后使用有限稀释法获得克隆细胞。通过蛋白免疫印迹实验筛选单克隆细胞以获得准确的 PRC1 敲除细胞。PRC1 sgRNA 序列(5′—3′):正义链,CACCGGAGCTAATTGGGATTCCAG;反义链,AAACCTGGAATCCCAATTAGCTCC。将已验证敲除 PRC1 的 Caki-1 单克隆细胞命名为 KO1#、KO2#。

1.5　CCK-8 实验　将各组细胞按照每孔 2 000 个细胞种植于 96 孔板里,在之后的 1～4 d,每天每孔添加 CCK-8 试剂 10 μL 并于 37 ℃孵育 2 h,然后于酶标仪上读取读数并作图。

1.6　克隆形成实验　将各组细胞按照每孔 1 000 个细胞种植于 6 孔板里,然后在 37 ℃的细胞培养箱内孵育 2 周,后 PBS 洗净每孔,用 4% 的多聚甲醛固定 30 min,0.2% 结晶紫染色 30 min,清水洗净晾干,拍照后统计各组克隆数并作图。

1.7　Transwell 实验　我们将含有 20%FBS 的 500 μL 培养基铺进 24 孔板,然后将各组细胞按照 5×10^4 个细胞/孔与 200 μL 无血清培养基混合后种植于 Transwell 小室(美国 Thermo Fisher 公司)中,经过 1 d 的培养,用 PBS 洗净每孔,4% 的多聚甲醛固定 30 min,0.2% 结晶紫染色 30 min,清水洗净晾干,显微镜下拍照并统计各组迁移数目作图。

1.8　蛋白免疫印迹实验　使用含有蛋白酶抑制剂、磷酸化酶抑制剂的 RIPA 缓冲液充分裂解细胞,然后将 20 μg 蛋白经 10%～12.5% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,并转移到

聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(Millipore, cat. IPVH00010,中国,上海)。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,用一抗在4 ℃下处理过夜,加入二抗在室温下孵育2 h。使用化学发光显影液在化学发光图像分析系统(中国Tanon公司)上显影成像。

1.9 皮下荷瘤实验 5~6周龄裸鼠购自武汉大学实验动物中心(中国武汉)。动物伦理通过武汉大学批准,在裸鼠背部皮肤皮下注射4×10^6个细胞,31 d后,采用CO_2窒息法安乐死小鼠,切除植入的肿瘤,测量其体质量和体积。

1.10 统计学分析 使用Graphpad Prism 8.0软件来评估所有数据的统计学意义。所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用t检验进行统计学分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRC1在肾癌中高表达且与不良预后相关 基于TCGA数据库信息,利用Gepia2网站分析PRC1在肾癌及正常肾脏组织的表达情况,可见PRC1在肾癌中的表达明显高于正常组织($P<0.05$)(图1A),以PRC1基因表达量的25%作为截断值,绘制总生存期(overall survival, OS)曲线,提示高表达PRC1的肾癌患者总体生存预后不良($P<0.05$)(图1B)。

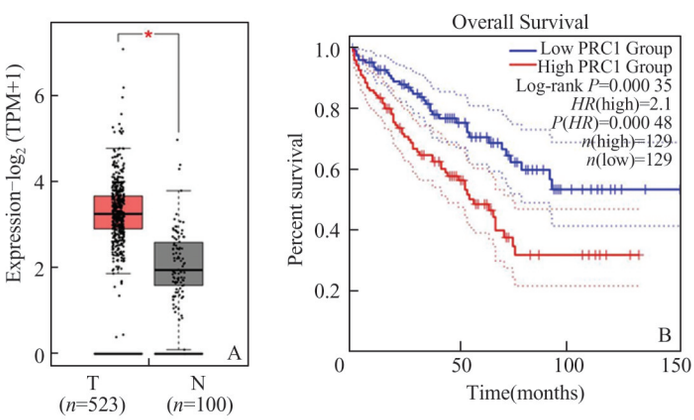


图1 PRC1在肾癌中的表达及生存分析

A. 使用Gepia2分析PRC1在肾癌及正常组织的表达,T:肾癌,N:正常组织,*$P<0.05$;B. 使用Gepia2作PRC1在肾癌中的生存分析曲线

2.2 敲低PRC1抑制了肾癌细胞的增殖和迁移能力 为了了解PRC1的生物学功能,我们通过CRISPR/Cas9基因编辑技术将PRC1从Caki-1肾癌细胞中敲除。通过蛋白免疫印迹实验分析显示,Caki-1细胞中PRC1蛋白的表达被消除(图2A)。CCK-8实验及克隆形成实验显示,敲除PRC1抑制了Caki-1肾癌细胞的增殖能力(图2B和2C),transwell迁移实验显示,敲除PRC1抑制了Caki-1肾癌细胞的迁移能力(图2D)。

2.3 敲除PRC1抑制了肾癌细胞在体内的致瘤能力 通过皮下注射PRC1缺失的Caki-1细胞和野生型Caki-1细胞建立了裸鼠体内异种移植模型,收集的皮下肿瘤组织显示,PRC1敲除组的肿瘤大小和体质量远小于NC肿瘤组(图3A、3B)。整个实验期间我们测量了3个组肿瘤体积的变化,显然,敲除PRC1抑制了裸鼠体内肿瘤的生长(图3C)。

2.4 PRC1靶向调控Hippo通路促进肾癌的发生和发展 通过对PRC1敲除的Caki-1细胞及野生型Caki-1细胞进行RNA-seq测序,我们发现Hippo通路是PRC1可靠的下游靶点(图4A和图4B),这表明PRC1可能通过调控Hippo通路来促进肾癌细胞的增殖和迁移。

3 讨论

PRC1作为一种细胞分裂所必需的蛋白,其失调会加剧染色体不稳定性(chromosomal instability, CIN),导致肿瘤异质性。有研究表明,PRC1的失调在多种癌症类型中发挥其促癌作用。PRC1在小细胞肺癌和肝癌中通过解除Wnt信号通路来影响肿瘤过程[3,7];PRC1通过影响纺锤体的形成来影响乳腺癌的进展[6];在卵巢癌和结肠癌中,敲除PRC1可使肿瘤细胞阻滞于细胞周期的G_2/M期来抑制肿瘤细胞的增殖[4,9]。在本研究中,我们探讨了PRC1在肾癌进展中的作用及其相关的分子机制。通过对TCGA数据库的分析,我们发现PRC1在肾癌中高表达,并与较差的生存预后相关。进一步的研究发现,PRC1的缺失可以抑制体外肾癌细胞的增殖

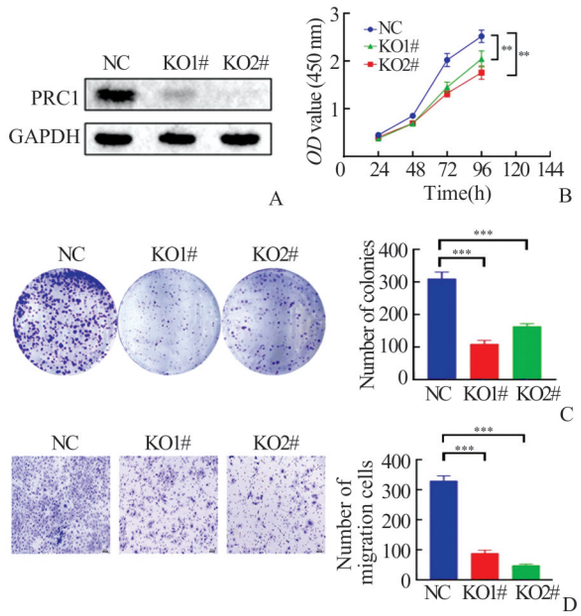


图 2　敲除 PRC1 抑制了肾癌细胞的增殖和迁移能力

A. 蛋白免疫印迹实验验证 Caki-1 细胞中 PRC1 的敲除；B. CCK-8 检测各组的增殖情况；C. 各组代表性的克隆形成图像及其量化分析；D. 各组代表性的 Transwell 迁移图像及其量化分析。$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

和迁移，体内荷瘤实验也证实了同样的结果，因此，PRC1 促进了肾癌细胞的增殖和迁移能力。

为了进一步探究 PRC1 在肾癌细胞增殖和迁移中作用的机制，本研究通过对 PRC1 敲低的 Caki-1 肾癌细胞及 NC Caki-1 细胞进行 RNA-seq 测序，我们发现了 Hippo 通路是 PRC1 可靠的下游靶点，Hippo 通路是一条重要的信号传导通路，对细胞增殖、细胞命运决定和组织生长调控起着重要作用[11]。该通路最早在果蝇中被发现，并以其控制器官大小和组织形态的作用而得名。Hippo 通路的异常活化或抑制与细胞的肿瘤特性密切相关[12]。有研究表明，Hippo 通路下游靶点 YAP 和 TAZ 的过度活化促进了肿瘤的增殖、浸润和转移。因此，Hippo 通路被认为是肿瘤治疗和预防的潜在靶点，通过干预 Hippo 通路的活性，可能有助于抑制肿瘤细胞的生长和扩散[13]。本研究中证实了 Hippo 通路是 PRC1 促进肾癌细胞增殖和迁移的潜在靶点。

综上所述，PRC1 促进了肾癌细胞的增殖和迁移，Hippo 通路是 PRC1 促进肾癌细胞增殖和迁移的潜在靶点。这为肾癌的治疗提供了新的靶点和策略。进一步研究 PRC1 和 Hippo 通路的相互作用机制，可能有助于开发新的治疗方法，提高肾癌患者的治疗效果和生存预后。

参考文献

[1] Li J, Dallmayer M, Kirchner T, et al. PRC1: Linking cytokinesis, chromosomal instability, and cancer evolution[J]. Trends Cancer, 2018, 4(1): 59-73.

[2] Li SJ, Motiño O, Lambertucci F, et al. Protein regulator of cytokinesis 1: A potential oncogenic driver[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 128.

[3] Chen JX, Rajasekaran M, Xia HP, et al. The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/β-catenin signalling pathway[J]. Gut, 2016, 65(9): 1522-1534.

[4] Bu HL, Li YW, Jin CJ, et al. Overexpression of PRC1 indicates a poor prognosis in ovarian cancer[J]. Int J Oncol, 2020, 56(3): 685-696.

[5] Zhang B, Shi XT, Xu GF, et al. Elevated PRC1 in gastric carcinoma exerts oncogenic function and is targeted by piperlongumine in a p53-dependent manner[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(7): 1329-1341.

[6] Li X, Li JP, Xu LM, et al. CDK16 promotes the progression and metastasis of triple-negative breast cancer by phosphorylating PRC1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 149.

[7] Shi JJ, Hao SY, Liu XT, et al. Feiyiliu Mixture sensitizes $EGFR^{Del19/T790M/C797S}$ mutant non-small cell lung cancer to osimertinib by attenuating the PRC1/Wnt/EGFR pathway[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1093017.

[8] Luo HW, Chen QB, Wan YP, et al. Protein regulator

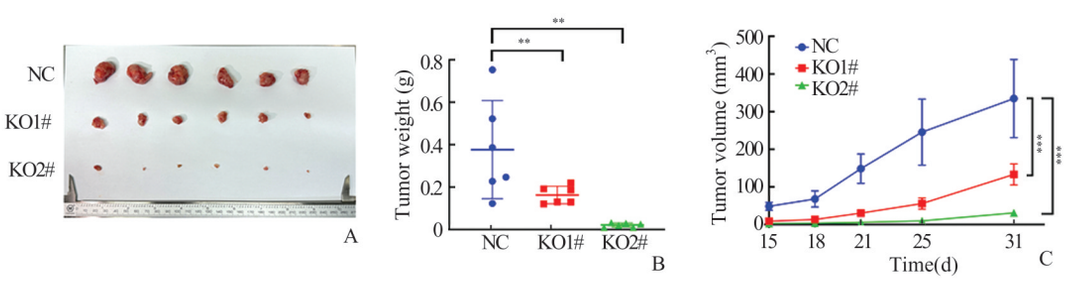


图 3　敲除 PRC1 抑制了肾癌细胞在体内的致瘤能力

A. 三组（NC、KO1#、KO2#）裸鼠皮下肿瘤图像；B. 三组收集到的裸鼠肿瘤质量的结果比较；C. 三组裸鼠肿瘤体积生长曲线。$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$

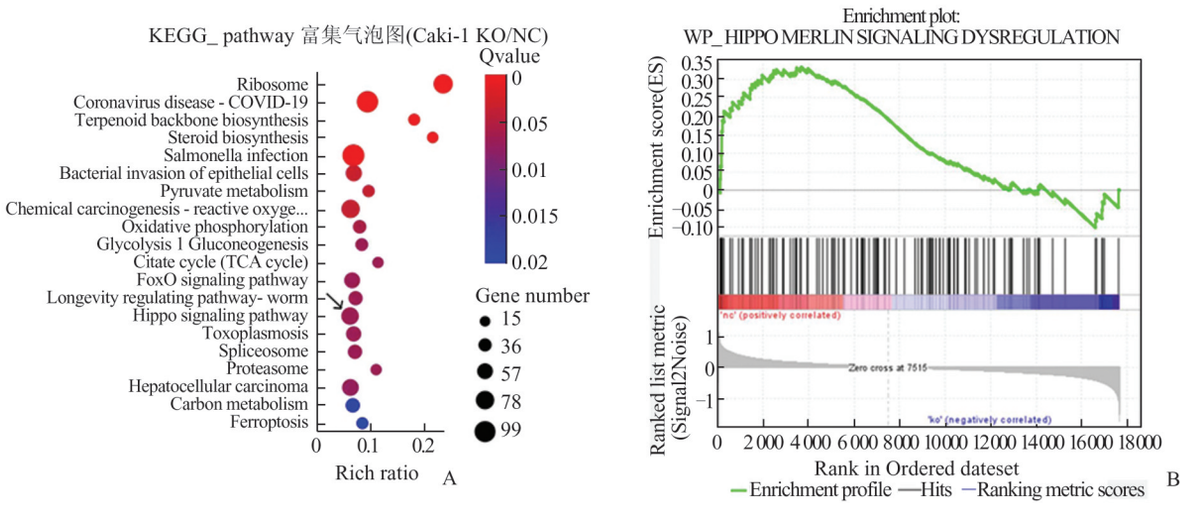


图 4 PRC1 靶向调控 Hippo 通路促进肾癌的发生和发展

A. KEGG 通路富集分析气泡图用于评估包含 NC Control 和 KO PRC1 Caki-1 细胞的 RNA-Seq 数据；B. GSEA 分析 Hippo 通路所包含基因的富集情况

of cytokinesis 1 overexpression predicts biochemical recurrence in men with prostate cancer[J]. Biomedecine Pharmacother, 2016, 78: 116-120.

[9] Xu TX, Wang XX, Jia XD, et al. Overexpression of protein regulator of cytokinesis 1 facilitates tumor growth and indicates unfavorable prognosis of patients with colon cancer[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 528.

[10] Cai S, Weng Y, Miao F. MicroRNA-194 inhibits PRC1 activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway to prevent tumorigenesis by elevating self-renewal of non-side population cells and side population cells in esophageal cancer stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2021, 384(2): 353-366.

[11] Fu MY, Hu Y, Lan TX, et al. Correction: The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 5.

[12] 王明珠, 周阳, 何凯桐, 等. Hippo通路在肿瘤发生发展中作用机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(16): 3061-3064.
Wang MZ, Zhou Y, He KT, et al. Research progress on the mechanism of Hippo pathway in tumorigenesis and development[J]. J Mod Oncol, 2022, 30(16): 3061-3064.

[13] 杨懿人, 王林辉, 甘欣欣. YAP/TAZ在肾细胞癌发生发展中作用及其机制的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(12): 1105-1109.
Yang YR, Wang LH, Gan XX. Research progress in role and mechanism of YAP/TAZ in the development of renal cell carcinoma[J]. Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12): 1105-1109.

(2024-02-01 收稿)
编辑 张 峻