·论　著·

N6-甲基腺苷甲基化相关基因 IGF2BP3 在肾透明细胞癌的作用研究*

王咸钟[1],王　忠[1],何大鹏[1△],赖亚明[1],安文亚[1],孙祖刚[1],谢习颂[1],吴春香[2]
1. 广元市中心医院泌尿外科,四川广元 628000;2. 武汉大学公共卫生学院,湖北武汉 430070

摘　要:目的　筛选肾透明细胞癌(ccRCC)中的关键 N6-甲基腺苷(m^6A)甲基化相关基因,并研究其与 ccRCC 预后、ccRCC 细胞的迁移和侵袭的关系。**方法**　从癌症基因组图谱(TCGA)和基因型组织表达(GTEx)数据库中下载 ccRCC 和癌旁组织的 RNA 测序数据和临床数据,采用 R4.1.1 分析表达谱和预后,并筛选关键基因。收集 10 例 ccRCC 手术临床标本,采用定量 PCR(qPCR)和免疫组织化学法分别检测基因 mRNA 和蛋白表达。在人 ccRCC 细胞系 RCC23 中,通过 SiRNA 敲减关键基因,并用 CCK-8 检测细胞的存活率,采用划痕试验和 Transwell 试验分别检测细胞的迁移和侵袭。**结果**　19 个 m^6A 甲基化相关基因中仅有胰岛素样生长因子Ⅱ mRNA 结合蛋白 3(IGF2BP3)在 ccRCC 组织中高表达,且 IGF2BP3 高表达与 ccRCC 患者预后不良呈正相关。通过 qPCR 和免疫组织化学法在临床标本中验证了 IGF2BP3 的高表达。通过小干扰 RNA(siRNA)将 IGF2BP3 敲减后发现,RCC23 细胞的存活率明显下降,且细胞的迁移和侵袭能力下降。**结论**　IGF2BP3 可能是预测 ccRCC 患者预后的生物标志物和潜在的药物治疗靶点。

关键词:肾透明细胞癌;　N6-甲基腺苷甲基化;　胰岛素样生长因子Ⅱ mRNA 结合蛋白 3;　迁移;　侵袭
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.01.007　　**中图法分类号:**R737.11
文章编号:1673-4130(2025)01-0027-05　　**文献标志码:**A

Role of N6-methyladenosine methylation related gene IGF2BP3 in renal clear cell carcinoma*

WANG Xianzhong[1],*WANG Zhong*[1],*HE Dapeng*[1△],*LAI Yaming*[1],*AN Wenya*[1],
SUN Zugang[1],*XIE Xisong*[1],*WU Chunxiang*[2]
1. *Department of Urology*,*Guangyuan Central Hospital*,*Guangyuan*,*Sichuan* 628000,*China*;
2. *School of Public Health*,*Wuhan University*,*Wuhan*,*Hubei* 430070,*China*

Abstract:Objective　To screen the key N6-methyladenosine (m^6A) methylation related genes in renal clear cell carcinoma (ccRCC),and to study their expression and relationship with the prognosis,migration and invasion of renal clear cell carcinoma. **Methods**　The RNA sequencing data and clinical data of ccRCC and adjacent tissues were downloaded from the Cancer Genome Atlas (TCGA) and GTEx (Genotype-Tissue Expression). The expression profile and prognosis were analyzed with R 4.1.1,and the key genes were screened. Clinical specimens of 10 patients with ccRCC were collected. The mRNA and protein expressions were detected by RT-qPCR and immunohistochemistry,respectively. In human ccRCC cell line RCC23,siRNA was used to knock down key genes,and CCK-8 was used to detect the survival rate of cells. Scratch test and Trans well test were used to detect the migration and invasion of cells,respectively. **Results**　Among the 19 m^6A methylation related genes,only insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) was highly expressed in cancer tissues,and the high expression was significantly positively correlated with poor prognosis. The high expression of IGF2BP3 was verified in clinical specimens by RT-qPCR and immunohistochemistry. After knockdown of IGF2BP3 by siRNA,the survival rate of RCC23 cells decreased significantly,and the migration and invasion ability of cut cells decreased. **Conclusion**　These results suggest that IGF2BP3 may be an effective biomarker and potential drug target for predicting the prognosis of patients with ccRCC.

Key words:renal clear cell carcinoma;　N6-methyladenosine;　insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3;　migration;　invasion

肾细胞癌(RCC)是全球发病率排前十的癌症之一,该病分别占男性和女性所有新发癌症病例的 5% 和 3%。根据世界卫生组织的统计,每年有超过 140 000 例 RCC 相关死亡[1-2]。在肾癌亚型中,肾透明细

* **基金项目:**广元市市级科技项目(20ZDYF0021)。
作者简介:王咸钟,男,主治医师,主要从事泌尿外科临床和基础研究。　△ **通信作者**,E-mail:13808127402@163.com。

胞癌(ccRCC)是最常见的一种,占肾癌死亡人数的60%～85%[3-5]。因此,寻找可靠的预后工具预测临床结果,并帮助医生做出有关观察、手术、药物治疗和保守治疗的决定至关重要的。

N6-甲基腺苷(m^6A)甲基化修饰是真核生物中常见的一种内部化学修饰,是指在腺苷的 N6 位点加上一个甲基基团[6]。m^6A 甲基化由一组被称为"写入器""擦除器"和"读取器"的蛋白质组成,可影响 RNA 代谢的多个方面,包括 mRNA 剪接、稳定性、定位和翻译[7]。"写入器""擦除器"和"读取器"基因协同控制 m^6A 的可逆修饰,从而在生理活动和人类疾病特别是癌症中发挥重要作用[8-9]。根据文献报道,目前有发现 19 个关键 m^6A 甲基化相关基因(METTL3、METTL14、WTAP、RBM15、RBM15B、ZC3H13、YTHDC1、YTHDC2、YTHDF3、YTHDF1、YTHDF2、HNRNPC、IGF2BP1、IGF2BP2、IGF2BP3、RBMX、HNRNPA2B1、FTO 和 ALKBH5)[6]。然而,对于 m^6A 甲基化相关基因与 ccRCC 及患者预后之间的关系知之甚少。为了进一步研究 ccRCC 中 m^6A 的精确调控模式,本研究分析了 m^6A 甲基化相关基因在 ccRCC 中的表达、调控及与预后的关系,以期为了解 ccRCC 的发病机制、预防和治疗提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料来源　病例组织样本来源于 2022－2023 年在广元市中心医院确诊为 ccRCC 的 10 例患者。所有患者经影像学检查、血液检查和病理学检查明确诊断为 ccRCC。10 例入选患者中男 6 例,女 4 例,年龄(60.40±2.87)岁。本研究获得所有患者的知情同意,并经过广元市中心医院伦理委员会审查通过。

1.2　试剂　提取组织 RNA 采用 Trizol 试剂,蛋白定量采用 BCA Protein Assay 试剂盒,购自日本 Takara 公司。FastKing 一步法逆转录荧光定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。IGF2BP3 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。定量 PCR(qPCR)引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计并合成。

1.3　方法

1.3.1　生物信息学分析　对癌症基因组图谱(TCGA)数据库(portal. gdc. cancer. gov/)和基因型组织表达(GTEx)数据库(https://gtexportal. org/)中 532 例患者癌组织样本和 161 例患者癌旁组织样本信息进行联合分析,所有数据均为人源,基因表达采用 R 4.1.1 软件的 wilcox-tests 法分析。预后生存分析指标包括总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)、疾病特异性生存期(DSS),若相对危险度(HR)>1,说明该基因是高风险基因,该基因表达越高,预后越差;HR≤1,说明该基因是低风险基因,该基因表达越高,预后越好。

1.3.2　qPCR　采用 Trizol 试剂提取癌组织和癌旁组织总 RNA,采用试剂盒将 cDNA 进行逆转录,并对 mRNA 的表达进行定量检测。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达水平。引物设计合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。IGF2BP3 上游引物为 TATATCGGAAACCTCAGCGAGA,下游引物为 GGACCGAGTGCTCAACTTCT;内参 β-actin 上游引物为 CTCCATCCTGGCCTCGCTGT,下游引物为 GCTGTCACCTTCACCGTTCC。

1.3.3　免疫组织化学法　将临床样本包埋成石蜡块,切成 4 μm 石蜡切片。将切片与 IGF2BP3 抗体(按 1∶200 比例稀释),在 4 ℃下孵育 12 h,然后与二抗(按 1∶500 比例稀释)在 37 ℃孵育 0.5 h,然后用 3,3-二氨基联苯胺覆盖。在光学显微镜下(×400)观察。

1.3.4　细胞培养　人肾透明细胞癌细胞 RCC23 置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,培养基为含有 10% 胎牛血清的 DMEM,待细胞贴壁生长至培养瓶 90% 时进行消化、传代培养。

1.3.5　基因敲减　通过小干扰 RNA(siRNA)在 RCC23 细胞中对 IGF2BP3 进行敲减,siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成,siRNA 为 19 个核苷酸+dtdtdt3′悬垂结构。使用 ribo-FECTTM-CP 试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司)转染这些质粒。

1.3.6　CCK-8 检测细胞增殖能力　将 RCC23 细胞接种在 96 孔板,接种密度为 5×10^4 个/孔,每组设置 5 个复孔。分别在细胞培养的 0、24 h 时,向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续孵育 1 h。采用酶标仪测量 450 nm 波长处吸光度(A)值。细胞存活率=实验组 A 值/对照组 A 值×100%。

1.3.7　细胞迁移和侵袭　细胞迁移能力采用划痕试验,分为对照组和敲减组,细胞接种于 6 孔板,细胞汇度约 80%时用 10 μL 枪头制造划痕,磷酸盐缓冲液(PBS)洗去漂浮的细胞,24 h 后于显微镜下(×40)拍照。细胞侵袭能力采用 Transwell 试验,分为对照组和敲减组,取细胞悬液 100 μL 加入上室,下室中加入浓度为 10%的完全培养基,最后放入培养箱中培养 24 h,弃去原有培养基,每孔加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 20 min。弃去固定液,每孔加入 0.1%结晶紫溶液,染色 2 min 后洗涤晾干、封片,显微镜下(×200)拍照。

1.4　统计学处理　采用 SPSS27.0 和 R4.1.1 进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组数据比较采用 Wilcoxon 秩和检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　ccRCC 中 m^6A 甲基化相关基因的筛选　通过对 TCGA 和 GTEx 数据库中 532 例癌组织样本和 161 例癌旁组织样本的基因表达联合分析发现,16 个 m^6A 甲基化相关基因在癌组织中表达上调,分别是 METTL14、WTAP、RBM15、RBM15B、ZC3H13、YTHDC1、YTHDC2、YTHDF3、YTHDF2、YTH-

DF1、HNRNPC、IGF2BP1、IGF2BP3、RBMX、FTO 和 ALKBH5($P<0.05$)。3 个 m^6A 甲基化相关基因在癌组织中表达下调,分别是 METTL3、IGF2BP2 和 HNRNPA2B1($P<0.05$)。见图 1。

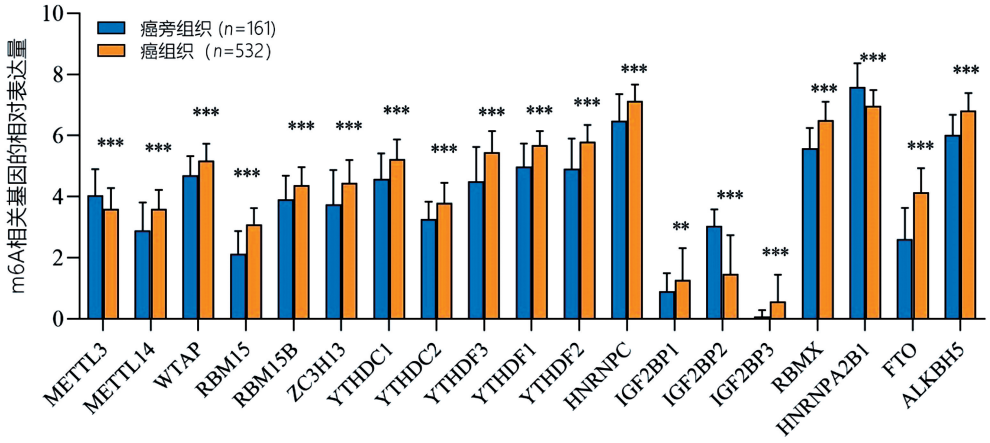
2.2　ccRCC 中 m^6A 甲基化相关基因与预后的关系　16 个高表达基因中,12 个基因表达与 OS、PFS、DSS 呈正相关($P<0.05$),1 个基因表达与 OS 呈负相关($P<0.05$),1 个基因表达与 OS、PFS、DSS 呈负相关($P<0.05$),2 个基因与 OS、PFS、DSS 均无相关性($P>0.05$)。3 个低表达基因中,1 个基因表达与 OS、PFS、DSS 呈正相关($P<0.05$),2 个基因表达与 OS、PFS、DSS 均无相关性($P>0.05$)。见表 1。19 个 m^6A 甲基化相关基因中,仅有 IGF2BP3 在 OS、PFS 和 DSS 中 *HR* 均>1($P<0.05$),IGF2BP3 为 ccRCC 中的关键 m^6A 甲基化基因。

2.3　临床样本中 IGF2BP3 的表达　通过对 10 例临床样本 qPCR 验证发现,IGF2BP3 在 ccRCC 癌组织中呈高表达。通过免疫组织化学法也发现 IGF2BP3 在 ccRCC 中呈高表达。见图 2。

2.4　敲减 IGF2BP3 后 RCC23 的细胞存活率　根据广州市锐博生物科技有限公司提供的 3 条 SiRNA 序列,序列 1 对 IGF2BP3 的敲减效果最佳。采用序列 1 将 IGF2BP3 敲减后发现,RCC23 细胞的存活率明显下降($P<0.05$)。见图 3。

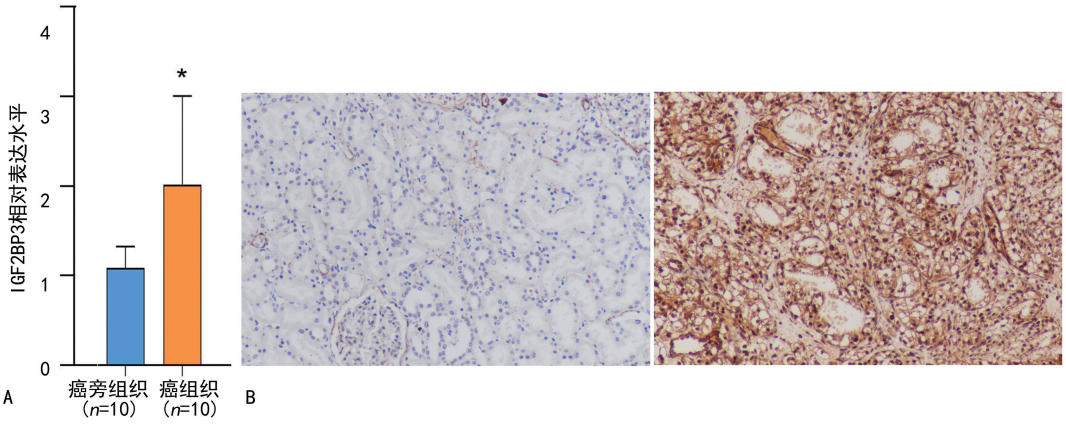
表 1　ccRCC 中 m^6A 甲基化相关基因与预后的关系

基因名称	OS		PFS		DSS	
	P	*HR*	*P*	*HR*	*P*	*HR*
METTL3	0.487	1.111	0.186	0.809	0.894	1.026
METTL14	<0.001	0.515	<0.001	0.388	<0.001	0.269
WTAP	0.259	0.842	0.264	0.836	0.242	0.797
RBM15	0.019	0.698	0.004	0.625	0.010	0.603
RBM15B	0.004	0.634	0.040	0.718	0.012	0.608
ZC3H13	<0.001	0.505	<0.001	0.514	<0.001	0.366
YTHDC1	0.001	0.583	<0.001	0.477	<0.001	0.387
YTHDC2	0.003	0.635	0.005	0.634	0.001	0.503
YTHDF3	<0.001	0.554	0.001	0.574	<0.001	0.474
YTHDF1	0.030	0.715	0.003	0.619	0.028	0.647
YTHDF2	0.028	0.714	0.008	0.651	0.011	0.604
HNRNPC	0.141	0.799	0.103	0.770	0.109	0.732
IGF2BP1	0.011	1.475	0.093	1.307	0.149	1.320
IGF2BP2	0.033	1.383	<0.001	1.810	<0.001	2.282
IGF2BP3	<0.001	2.061	<0.001	2.402	<0.001	3.003
RBMX	<0.001	0.550	<0.001	0.509	<0.001	0.407
HNRNPA2B1	0.968	1.006	0.312	0.851	0.866	1.033
FTO	<0.001	0.495	<0.001	0.557	<0.001	0.368
ALKBH5	0.004	0.643	0.023	0.694	0.001	0.525



注:$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

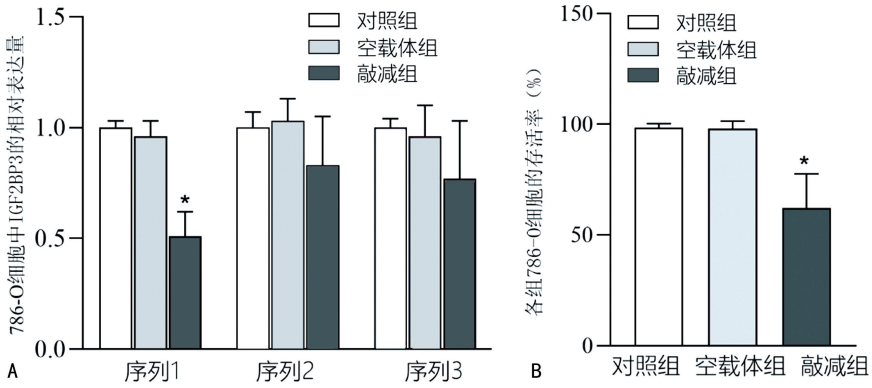
图 1　TCGA 数据库和 GTEx 数据库中 19 个 m^6A 甲基化相关基因的表达



注:A 为临床样本中 IGF2BP3 的表达,$^{*}P<0.05$;B 为临床样本中 IGF2BP3 的蛋白表达(×400)。

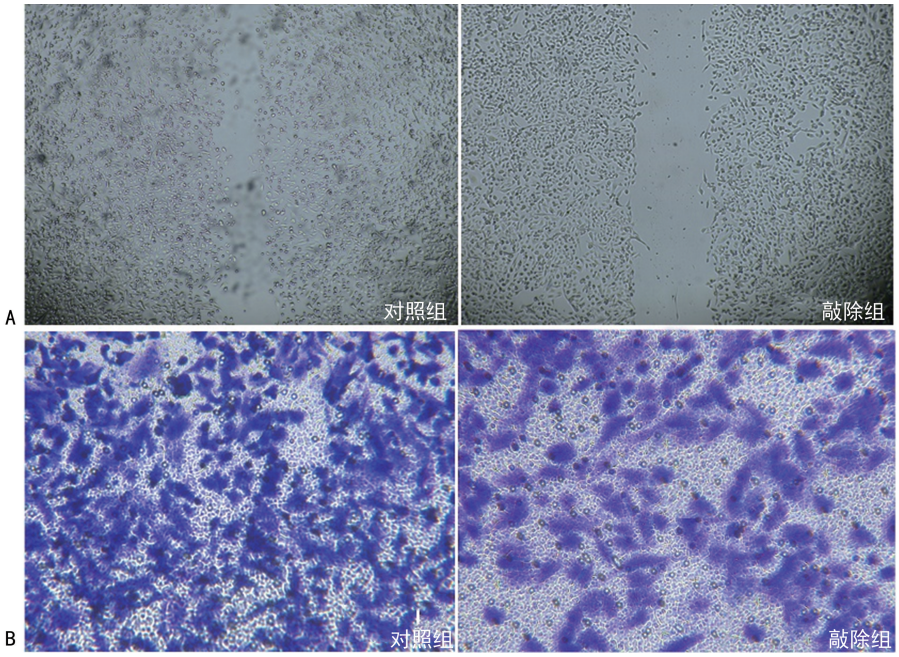
图 2　临床样本中 IGF2BP3 的表达

2.5　敲减 IGF2BP3 后 RCC23 细胞的迁移和侵袭能力　划痕试验和 Transwell 试验结果显示，敲减 IGF2BP3 后 RCC23 细胞的迁移和侵袭能力明显降低。见图 4。



注：A 为不同序列敲减后 RCC23 细胞中 IGF2BP3 的表达；B 为敲减 IGF2BP3 后 RCC23 细胞的存活率；* $P<0.05$。

图 3　敲减 IGF2BP3 及 RCC23 细胞存活率比较



注：A 为 RCC23 细胞中敲减 IGF2BP3 后的划痕试验（×40）；B 为 RCC23 细胞中敲减 IGF2BP3 后的 Transwell 试验（×200）。

图 4　敲减 IGF2BP3 后 RCC23 细胞的迁移和侵袭能力

3　讨　　论

癌症已成为全世界关注的基本公共卫生问题。为了寻找有用的癌症预后标志物，基于 TCGA 的生物信息学，笔者发现 13 个 m^6A 甲基化相关基因在 ccRCC 中表达上调，3 个 m^6A 甲基化相关基因表达下调。通过分析 m^6A 甲基化相关基因与预后的关系，笔者确定了与预后不良呈正相关、在肿瘤中高表达的关键 m^6A 甲基化相关基因 IGF2BP3。此外，笔者通过临床标本验证了 IGF2BP3 在 ccRCC 癌组织中呈高表达，进一步验证了生物信息学分析的结果。目前关于 IGF2BP3 与 ccRCC 关系的研究较少，本研究的结论提示 IGF2BP3 可能是 ccRCC 治疗的潜在靶点。

RNA 修饰是影响 RNA 稳定性和降解的转录后调控。目前已报道了 150 多种 RNA 修饰，广泛分布于各种类型的 RNA 中，如信使 RNA（mRNA）、转运 RNA（tRNA）、核糖体 RNA（rRNA）、小非编码 RNA（sncRNA）和长非编码 RNA（lncRNA）。然而，由于技术上的限制，大多数 RNA 修饰的生物学价值仍然没有被深入探索。m^6A 是指腺嘌呤第 6 个氮原子的甲基化修饰，占 RNA 修饰的 60%以上，影响几乎所有 RNA 代谢活动，如剪接、运输、翻译和降解[10]。转录本 m^6A 的修饰水平受甲基转移酶（“写入器”）、结合蛋白（“读取器”）和去甲基酶（“擦除器”）的动态调控。METTL3、METTL14、KIAA1429、RBM15、WTAP 和 ZC3H13 已被证明作为 m^6A 的“写入器”[11]。HNRNPC、HNRNPA2B1 和 YTH 结构域家族成员已被确定为 m^6A 的“读取器”，并调节 mRNA 代谢活动[12]。ALKBH5 和 FTO 是从靶 mRNA 中特异性去除 m^6A 的关键去甲基化酶，已被确定为 m^6A 的“擦除器”[13]。

m^6A 影响 mRNA 代谢的多个方面,并可调节基因翻译,m^6A 的失调被认为与包括癌症进展在内的各种生物过程有关。此外,这些基因并不单独发挥作用,而是可以相互作用。然而,m^6A 及其关键调节剂是否在抑制或促进癌症方面发挥特定作用至今尚无定论。因此,在基因水平上研究 m^6A 甲基化相关基因与 ccRCC 的关系具有重要意义。IGF2BP 家族成员包含 IGF2BP1、IGF2BP2 和 IGF2BP3[14]。IGF2BP 家族对于识别 m^6A 修饰并调节 mRNA 稳定和翻译尤为重要。有研究发现,IGF2BP1 和 IGF2BP2 可以促进癌细胞的增殖和转移[15-17]。IGF2BP3 是一种具有转录后活性的肿瘤蛋白,参与皮肤黑色素瘤[18]、结直肠癌[4]等中癌细胞的生长、转移、生存,化疗抵抗,肿瘤干细胞的自我更新和肿瘤发生,但其在 ccRCC 中的研究较少。本研究揭示了 IGF2BP3 在 ccRCC 癌细胞的迁移和侵袭中起关键作用,为研究 m^6A 甲基化相关基因调节抗肿瘤的潜在机制提供了新的视角,这可能有助于开发新的治疗策略,但也需要进一步的研究来阐明详细的潜在机制。

本研究有几个局限性。首先,样本量小,需要扩大患者的样本量以进行更广泛的研究;其次,应在多个水平上进行 m^6A 甲基化位点预测和功能验证,以确认 IGF2BP3 的表观遗传调控机制。这些都是未来研究应该解决的重要问题,另外 IGF2BP3 在 ccRCC 中的作用需要进一步阐明。

综上所述,本研究分析了 m^6A 甲基化相关基因在 ccRCC 中的表达及其与预后的关系。本研究筛选出了关键基因 IGF2BP3,其高表达与预后不良密切相关,且与癌细胞的迁移和侵袭密切相关。本研究可能有助于确定提高 ccRCC 治疗效果的新的靶标。

参考文献

[1] DELEUZE A,SAOUT J,DUGAY F,et al. Immunotherapy in renal cell carcinoma:the future is now[J]. Int J Mol Sci,2020,21(7):165-168.

[2] GRAY R E,HARRIS G T. Renal cell carcinoma:diagnosis and management[J]. Am Fam Physic,2019,99(3):179-184.

[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.

[4] LIU X,HE H,ZHANG F,et al. m^6A methylated EphA2 and VEGFA through IGF2BP2/3 regulation promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 signaling[J]. Cell Death Dis,2022,13(5):483.

[5] WOLF M M,KIMRYN R W,BECKERMANN K E. Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications[J]. Oncogene,2020,39(17):3413-3426.

[6] ZHU Z M,HUO F C,ZHANG J,et al. Crosstalk between m^6A modification and alternative splicing during cancer progression[J]. Clin Transl Med,2023,13(10):e1460.

[7] FANG Z,MEI W,QU C,et al. Role of m^6A writers,erasers and readers in cancer[J]. Exp Hematol Oncol,2022,11(1):45.

[8] SUN Y,JIN D,ZHANG Z,et al. N6-methyladenosine (m^6A) methylation in kidney diseases:Mechanisms and therapeutic potential[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech,2023,1866(4):194967.

[9] GAO R,YE M,LIU B,et al. m^6A modification:a double-edged sword in tumor development[J]. Front Oncol,2021,11:679367.

[10] ZHANG H,SHI X,HUANG T,et al. Dynamic landscape and evolution of m^6A methylation in human[J]. Nucleic Acids Res,2020,48(11):6251-6264.

[11] LI N,HUI H,BRAY B,et al. METTL3 regulates viral m^6A RNA modification and host cell innate immune responses during SARS-CoV-2 infection[J]. Cell Rep,2021,35(6):109091.

[12] QIAO Y,SUN Q,CHEN X,et al. Nuclear m^6A reader YTHDC1 promotes muscle stem cell activation/proliferation by regulating mRNA splicing and nuclear export[J]. Elife,2023,12:6112-6119.

[13] WANG T,KONG S,TAO M,et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in Cancer progression[J]. Mol Cancer,2020,19(1):88.

[14] KENDZIA S,FRANKE S,KROHLER T,et al. A combined computational and functional approach identifies IGF2BP2 as a driver of chemoresistance in a wide array of pre-clinical models of colorectal cancer[J]. Mol Cancer,2023,22(1):89.

[15] LI B,ZHU L,LU C,et al. circNDUFB2 inhibits non-small cell lung cancer progression via destabilizing IGF2BPs and activating anti-tumor immunity[J]. Nat Commun,2021,12(1):295.

[16] RAMESH-KUMAR D,GUIL S. The IGF2BP family of RNA binding proteins links epitranscriptomics to cancer[J]. Semin Cancer Biol,2022,86(Pt 3):18-31.

[17] ZHU T Y,HONG L L,LING Z Q. Oncofetal protein IGF2BPs in human cancer:functions,mechanisms and therapeutic potential[J]. Biomark Res,2023,11(1):62.

[18] HANNIFORD D,ULLOA-MORALES A,KARZ A,et al. Epigenetic silencing of CDR1as drives IGF2BP3-mediated melanoma invasion and metastasis[J]. Cancer Cell,2020,37(1):55-70.

(收稿日期:2024-06-02　修回日期:2024-08-12)