

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.010

· 临床研究 ·

## 基于TCGA数据库分析DTX2在肾透明细胞癌组织中表达的临床意义及其对肾癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响

秦翰成<sup>1</sup>, 刘婉璐<sup>1</sup>, 静雅杰<sup>2</sup>, 陈志鸿<sup>1,2</sup> (1. 右江民族医学院 基础医学院, 广西 百色 533000; 2. 宿州学院 生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000)

**[摘要]** **目的:** 基于TCGA数据库分析Deltex E3泛素连接酶2(DTX2)在肾透明细胞癌(ccRCC)组织中的表达水平及临床意义, 探讨DTX2对ccRCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 利用TIMER数据库分析DTX2在泛癌组织中的表达水平, 通过UALCAN数据库进一步验证ccRCC组织和癌旁组织中DTX2 mRNA和蛋白表达差异。使用UALCAN数据库中的TCGA-ccRCC队列数据集, 分析ccRCC中DTX2表达与患者临床病理特征的相关性。通过K-M plot数据库分析DTX2表达与ccRCC患者预后的相关性。利用DAVID数据库对DTX2相关基因进行GO和KEGG通路富集分析。通过qPCR法检测DTX2基因在人胚肾293(HEK293)细胞和ccRCC细胞A498、Caki-1中的表达水平。利用siRNA技术分别将DTX2 siRNA及其阴性对照质粒转入A498、Caki-1细胞, 采用CCK-8法、平板克隆实验、划痕实验及Transwell侵袭实验分别检测敲低DTX2对细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果:** TCGA数据库分析结果表明, 与癌旁组织相比, ccRCC组织中DTX2 mRNA和蛋白均呈高表达(均 $P<0.01$ )。DTX2表达水平与ccRCC患者的病理分期、临床分级、不同亚型和淋巴结转移相关联(均 $P<0.01$ ), DTX2高表达与患者的不良预后具有相关性(均 $P<0.01$ )。GO功能和KEGG通路富集分析结果显示, DTX2表达相关基因主要参与蛋白酶体介导的泛素依赖性蛋白质分解代谢等生物学过程, 并主要富集到了mTOR信号通路等与肿瘤的相关信号通路中(均 $P<0.05$ )。体外细胞实验结果表明, A498和Caki-1细胞中DTX2表达水平高于HEK293细胞; 敲低DTX2表达可显著降低A498和Caki-1细胞的增殖、迁移及侵袭能力(均 $P<0.01$ )。**结论:** DTX2在ccRCC组织和细胞中呈高表达, 其高表达患者的预后较差。敲低DTX2表达可抑制ccRCC细胞增殖、迁移和侵袭, DTX2有望成为ccRCC新的生物标志物和治疗靶点。

**[关键词]** Deltex E3泛素连接酶2; 肾透明细胞癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 临床意义

**[中图分类号]** R737.11; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)04-0383-09

## Clinical significance of DTX2 expression in clear cell renal cell carcinoma tissues and its effect on renal cancer cell proliferation, migration and invasion based on TCGA database

QIN Hancheng<sup>1</sup>, LIU Wanlu<sup>1</sup>, JING Yajie<sup>2</sup>, CHEN Zhihong<sup>1,2</sup> (1. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, Anhui, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the expression level and clinical significance of Deltex E3 ubiquitin ligase 2 (DTX2) in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) based on TCGA database, and explore the effect of DTX2 on the proliferation, migration and invasion of ccRCC cells. **Methods:** TIMER database was utilized to analyze the expression level of DTX2 in pan-cancer tissues, while UALCAN database was used for further verification of the differences in mRNA and protein expressions of DTX2 in ccRCC and adjacent tissues. TCGA-ccRCC cohort dataset in UALCAN database was employed to examine the correlation between DTX2 expression in ccRCC and clinicopathological features of patients. The correlation between DTX2 expression and the prognosis of ccRCC patients was analyzed using K-M plot database. Using DAVID database, gene ontology (GO) analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed to explore DTX2-related genes. The expression levels of DTX2 gene in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and ccRCC A498 and Caki-1 cells were detected by qPCR. SiRNA technology was employed to transfect DTX2 siRNA and its negative control plasmids into ccRCC A498 and Caki-1 cells. CCK-8 cell proliferation assay, plate clone

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82160502); 宿州学院博士科研启动基金(No. 2023BSK021)

**[作者简介]** 秦翰成(1994—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤发生分子机制方面的研究。E-mail: 157865879@qq.com

**[通信作者]** 陈志鸿, E-mail: 285824248@qq.com

formation assay, scratch wound assay, and Transwell migration assay were performed to detect respectively the effects of knockdown DTX2 on the proliferation, migration and invasion of ccRCC cells. **Results:** Analysis of TCGA database showed that, compared with adjacent tissues, both DTX2 mRNA and protein were highly expressed in ccRCC tissues (all  $P < 0.01$ ). The expression level of DTX2 was associated with the pathological stage, clinical grade, different subtype, and lymph node metastasis of ccRCC patients (all  $P < 0.01$ ). High DTX2 expression was correlated with poor prognosis in patients (all  $P < 0.01$ ). The results of GO function analysis and KEGG pathway enrichment analysis showed that genes related to DTX2 expression were mainly involved in biological processes such as proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process, and these genes were primarily enriched in tumor-related signaling pathways such as the mTOR signaling pathway (all  $P < 0.05$ ). The results of *in vitro* cell experiments showed that the expression levels of DTX2 in A498 and Caki-1 cells were higher than those in HEK293 cells; knockdown of DTX2 expression significantly lowered the proliferation, migration and invasion abilities of A498 and Caki-1 cells (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** High expression of DTX2 is observed in ccRCC tissues and cells, and its high expression is associated with poor prognosis in patients. Knockdown of DTX2 expression may inhibit the proliferation, migration and invasion of ccRCC cells. DTX2 is expected to become a new biomarker and therapeutic target for ccRCC.

**[Key words]** Deltex E3 ubiquitin ligase 2 (DTX2); clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); proliferation; migration; invasion; clinical significance

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(4): 383-391. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.010]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是常见的泌尿系统恶性肿瘤之一, 约占所有成人恶性肿瘤的3%。据统计, 2020年全球有超过43万例新诊断的RCC病例和约18万例与RCC相关的死亡病例<sup>[1]</sup>。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是RCC最常见的病理类型, 占RCC总数的70%~85%<sup>[2]</sup>。近年来, 原发性RCC的发病率逐年升高, 但其发病机制目前尚未完全明确, 针对RCC的早期诊断及靶向治疗手段依然缺乏。因此, 从分子水平阐明RCC的发生发展的机制, 研发新的生物标志物及治疗靶点对于RCC的防治具有十分重要的意义<sup>[3]</sup>。Deltex E3泛素连接酶2(Deltex E3 ubiquitin ligase 2, DTX2)属于泛素-蛋白酶体降解系统中关键酶之一, 通过参与靶蛋白翻译后的泛素化修饰, 在调控细胞的生物学功能方面发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。DTX2高表达于肿瘤细胞, 与肿瘤的发生发展密切相关。例如, DTX2可通过调控Notch2/Akt轴促进结直肠癌细胞迁移和侵袭<sup>[7]</sup>; 沉默DTX2基因表达后胶质瘤细胞的增殖和迁移能力显著下降, 且高表达DTX2与胶质瘤患者不良预后具有显著相关性<sup>[6]</sup>。但是, 目前关于DTX2在ccRCC细胞中的表达及其生物学功能尚不明确。因此, 本研究基于TCGA数据库分析DTX2在ccRCC组织中表达及其临床意义, 并通过体外细胞实验观察DTX2对ccRCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 为ccRCC的治疗和预后评估提供新的生物标志物和治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 ccRCC数据来源及分析

利用TIMER数据库(<http://timer.cistrome.org/>)分析DTX2在泛癌组织中的表达情况, 同时通过

UALCAN数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)进一步验证ccRCC组织及癌旁组织中DTX2的mRNA和蛋白表达差异。利用UALCAN数据库分析DTX2表达与ccRCC病理分期、临床分级、不同亚型和淋巴结转移等临床病理特征的相关性。利用K-M plot数据库(<http://kmplot.com/analysis>)分析DTX2与ccRCC患者预后的关系(数据来源包括GEO、EGA和TCGA), 并利用GEPIA数据库(数据来源包括TCGA和GTEx)进一步验证DTX2与ccRCC的生存预后关系。利用LinkedOmics数据库(<http://linkedomics.org/>)下载ccRCC中与DTX2共表达的相关基因( $P < 0.01$ ,  $R > 0.5$ )。利用DAVID数据库对DTX2正负相关的前1500个基因进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。以 $P < 0.05$ 为检验水准, 获得ccRCC中DTX2表达相关基因参与的分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)及KEGG通路信息, 并通过微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn>)平台对富集结果进行可视化, 结果以条形图展示。利用STRING数据库(<https://string-db.org/>)分析DTX2相关基因的蛋白互作信息, 将蛋白质互作(protein-protein Interaction, PPI)网络导入Cytoscape软件制作PPI网络图。利用TIMER和TISIDB数据库(<http://cis.hku.hk/TISIDB/>)分析ccRCC中DTX2的表达与免疫细胞浸润的相关性。

### 1.2 细胞及主要试剂

人ccRCC细胞Caki-1、A498细胞和人胚肾293(HEK293)细胞、MEM培养基均购自武汉普诺赛公司。胎牛血清(FBS)购自上海生工生物工程有限公司, 总RNA提取试剂盒购自北京简石生物技术有限公司, HighGene

plus 转染试剂购自 ABclonal 公司, 逆转录试剂盒、qPCR Mix 购自广州易锦生物, CCK-8 试剂购自 Biosharp 公司, Transwell 小室购自 JET 公司, DTX2 siRNA 干扰序列由苏州吉玛基因股份有限公司合成。si-DTX2#1 序列: 正义链为 5'-GCGAUGUGACUGACAGCAATT-3', 反义链为 5'-UUGCUGUCAGUCACAUCGCTT-3'; si-DTX2#2 序列: 正义链为 5'-GCAAUAAGGAUGGAAGUCUTT-3', 反义链: 5'-AGACUUGCAUCCUUAUUGCTT-3'; 阴性对照序列: 正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCA CGUTT-3', 反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGA ACTT-3'。

### 1.3 细胞培养、分组及转染

Caki-1、A498 细胞和 HEK293 细胞采用含 10% FBS 的 MEM 完全培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。分别取对数生长期的 Caki-1、A498 细胞, 接种于六孔板 (4×10<sup>5</sup> 个/孔) 中, 待细胞汇合度达 70% 时, 按 HighGene plus 转染试剂使用手册进行转染。分别将两种 ccRCC 细胞分为 si-DTX2#1、si-DTX2#2 和 si-NC 组, 分别转染 siRNA DTX2#1、DTX2#2 和阴性对照。

### 1.4 qPCR 法检测 ccRCC 细胞中 DTX2 mRNA 的表达水平

按照 RNA 快速提取试剂盒说明书提取 1 μg 总 RNA 用于反转录成 cDNA。按照 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行 qPCR。引物序列: DTX2 正向引物为 5'-GCGGGACCATC CTCATAGTT-3', 反向引物为 5'-GCGTTGTCTGGA AGGTAGCA-3'; GAPDH 正向引物为 5'-GACAAC TTTGGCATCGT-3', 反向引物为 5'-ATGCAGGGA TTGATGTTCTGG-3'。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s、63 °C 20 s、72 °C 20 s, 共 40 个循环。结果以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

### 1.5 CCK-8 法检测 ccRCC 细胞的增殖能力

取各组细胞, 用胰蛋白酶消化并充分重悬后进行细胞计数, 将密度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液接种于 96 孔板 (100 μL/孔) 中, 分别在培养 0、24、48 和 72 h 时加入 10 μL CCK-8 试剂, 在 37 °C 下避光反应 2 h, 使用多功能酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔细胞的光密度 (D) 值, 并绘制细胞增殖曲线。

### 1.6 平板克隆实验检测 ccRCC 细胞的克隆形成能力

将各组细胞用胰蛋白酶消化, 充分重悬后进行细胞计数, 将每组密度为 1×10<sup>3</sup> 个细胞铺板于 6 孔板中, 每隔 3 d 进行换液并观察细胞生长状态, 培育 2 周后至肉眼可见克隆时终止培养。弃去旧培养基后, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 在 0.5% 结晶紫染色 15 min 后晾干。白色背景下用相机进行拍照, 并用 Image J 软件计数克隆形成数。

### 1.7 划痕实验检测 ccRCC 细胞的迁移能力

将各组细胞接种到 6 孔板 (3×10<sup>5</sup> 个/孔) 中, 待细胞汇合度达 80%~90% 时, 用 200 μL 移液器吸头尖端垂直六孔板划痕, 用 PBS 清洗掉划下的细胞并用无血清培养基代替含有 10% FBS 的培养基, 分别在 0、12 和 24 h 对划痕宽度进行观察和拍照。

### 1.8 Transwell 侵袭实验检测 ccRCC 细胞的侵袭能力

取各组细胞, 将 200 μL 密度为 3×10<sup>4</sup> 个/mL 的细胞悬液接种在预铺基质胶的 Transwell 小室的上室中, 下室中加入 600 μL 含有 30% FBS 的培养基。37 °C 下培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛溶液固定侵入小室的细胞, 并用 0.5% 结晶紫溶液染色 20 min, 后在光学显微镜下计算侵袭细胞数并拍照。

### 1.9 统计学处理

qPCR 法、CCK-8 法、平板克隆、细胞划痕和 Transwell 侵袭实验均独立重复 3 次。应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析和绘图。两样本均数间比较使用 *t* 检验, 多样本均数间的比较使用方差分析。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DTX2 在 ccRCC 组织中呈高表达

利用 TIMER 数据库分析 DTX2 在泛癌组织中表达的结果 (图 1A) 显示, DTX2 在 ccRCC、膀胱尿路上皮癌 (bladder urothelial carcinoma, BLCA)、乳腺浸润癌 (breast invasive carcinoma, BRCA)、宫颈鳞癌及腺癌 (cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)、胆管癌 (cholangiocarcinoma, CHOL)、肝细胞肝癌 (liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD)、肺鳞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC)、结肠癌 (colon adenocarcinoma, COAD)、胃癌 (stomach adenocarcinoma, STAD) 等癌组织中呈高表达 (*P*<0.01 或 *P*<0.001)。进一步利用 UALCAN 数据库分析 ccRCC 及癌旁组织中 DTX2 mRNA 和蛋白表达的结果 (图 1B、C) 显示, ccRCC 组织中 DTX2 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于癌旁组织 (均 *P*<0.01)。

### 2.2 DTX2 表达与 ccRCC 患者临床病理特征的相关性

利用 UALCAN 数据库分析 DTX2 表达水平与 ccRCC 患者临床病理特征相关性的结果 (图 2) 显示, DTX2 表达水平与 ccRCC 患者的病理分期、临床分级、不同亚型及淋巴结转移相关联 (均 *P*<0.01)。随着 DTX2 表达水平的增加, ccRCC 患者的病理分期、临床分级逐渐增加; 相对于 ccA 型, ccB 型中 DTX2 表达水平更高, 且高表达 DTX2 的 ccRCC 患者更易发生

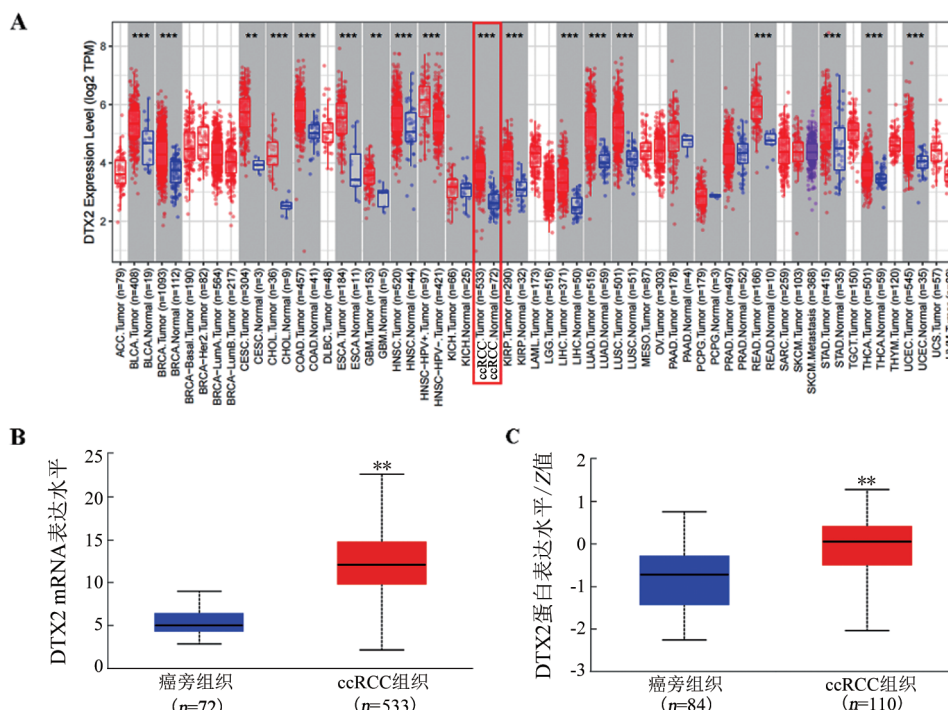


淋巴结转移。

### 2.3 DTX2 表达水平与 ccRCC 患者生存预后的关系

利用 K-M plot 和 GEPIA 数据库分析 DTX2 表达水平与 ccRCC 患者预后相关性的结果(图3)显示,

DTX2 表达水平与 ccRCC 患者的 OS 率具有显著相关性( $P<0.01$ ),DTX2 高表达患者 OS 率明显低于 DTX2 低表达患者。



A: 利用 TIMER 数据库分析 DTX2 在泛癌组织中的表达情况。ACC: 肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma), DLBC: 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma), ESCA: 食管癌(esophageal carcinoma), GBM: 多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme), HNSC: 头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma), KICH: 肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe), KIRP: 肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma), LAML: 急性髓性白血病(acute myeloid leukemia), LGG: 低级别胶质瘤(low grade glioma), MESO: 间皮瘤(mesothelioma), OV: 卵巢癌(ovarian carcinoma), PAAD: 胰腺导管癌(pancreatic ductal adenocarcinoma), PCPG: 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(pheochromocytoma and paraganglioma), PRAD: 前列腺腺癌(prostate adenocarcinoma), READ: 直肠癌腺癌(rectum adenocarcinoma), SARC: 肉瘤(sarcoma), SKCM: 皮肤黑色素瘤(skin cutaneous melanoma), TGCT: 睾丸生殖细胞肿瘤(testicular germ cell tumor), THCA: 甲状腺癌(thyroid carcinoma), THYM: 胸腺瘤(thymoma), UCEC: 子宫内膜癌(uterine corpus endometrial carcinoma), UCS: 子宫癌肉瘤(uterine carcinosarcoma), UVM: 葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma); B 和 C: 利用 UALCAN 数据库分析 ccRCC 及癌旁组织中 DTX2 mRNA(B) 和蛋白(C) 的表达水平。与癌旁组织比较, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图1 ccRCC 组织中 DTX2 mRNA 和蛋白的表达情况

### 2.4 DTX2 表达相关基因的 GO 和 KEGG 富集分析

利用 LinkedOmics 数据库下载 ccRCC 中 DTX2 表达相关基因( $P<0.01$ ,  $R>0.5$ ), 利用 DAVID 在线数据库对 DTX2 正负相关的前 1 500 个基因进行富集分析(图4A、B、C)。

GO 功能富集分析结果(图4D)显示, DTX2 表达相关基因显著富集到蛋白酶体介导的泛素依赖性蛋白质分解代谢、上皮细胞迁移的正调控及细胞增殖等生物学过程; 细胞组分富集分析结果显示, DTX2 相关基因主要位于核质、胞质溶胶及细胞质等; 分子功能富集分析结果显示, DTX2 表达相关基因与蛋白质结合、GTP 酶激活剂活性及 RNA 结合等显著相关

(均  $P<0.05$ )。

KEGG 分析结果(图4E)显示, DTX2 表达相关基因主要与 mTOR 信号通路、Toll 样受体信号通路及 NF- $\kappa$ B 信号通路等显著相关(均  $P<0.05$ )。

利用 STRING 数据库对 DTX2 表达相关基因进行 PPI 网络分析, 并使用 Cytoscape 软件中的插件 CytoHubb 进行核心基因筛选, 筛选到了泛素结合酶 E2I(UBE2I)、泛素结合酶 E2C(UBE2C)及 SPII 等多个蛋白(图4F)。

以上分析结果表明, ccRCC 中 DTX2 表达水平与 ccRCC 细胞增殖、迁移和侵袭等恶性生物特征具有相关性。



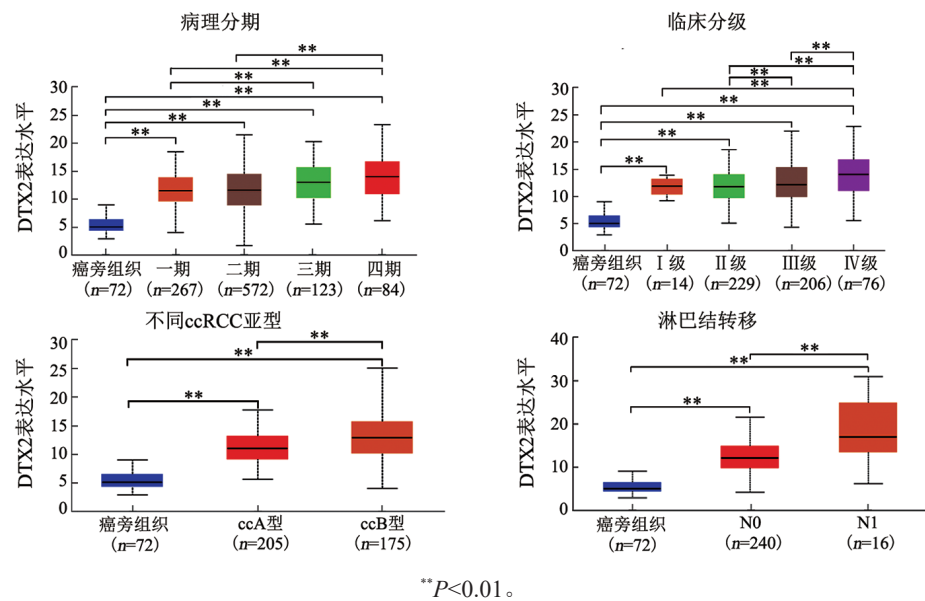


图2 DTX2表达与ccRCC患者临床病理特征的相关性

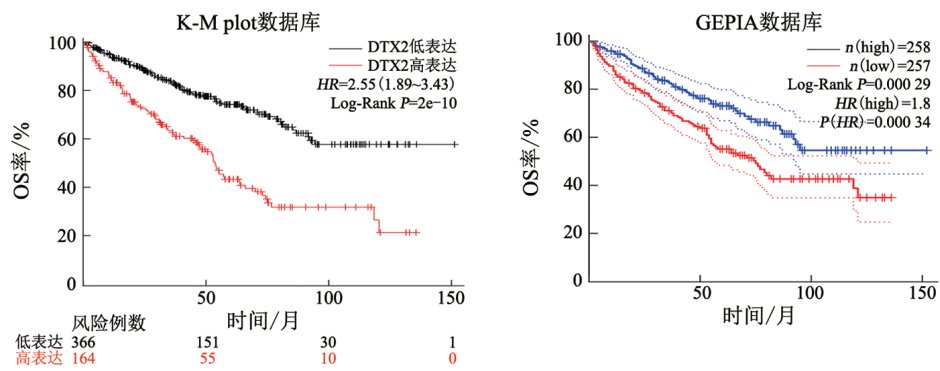
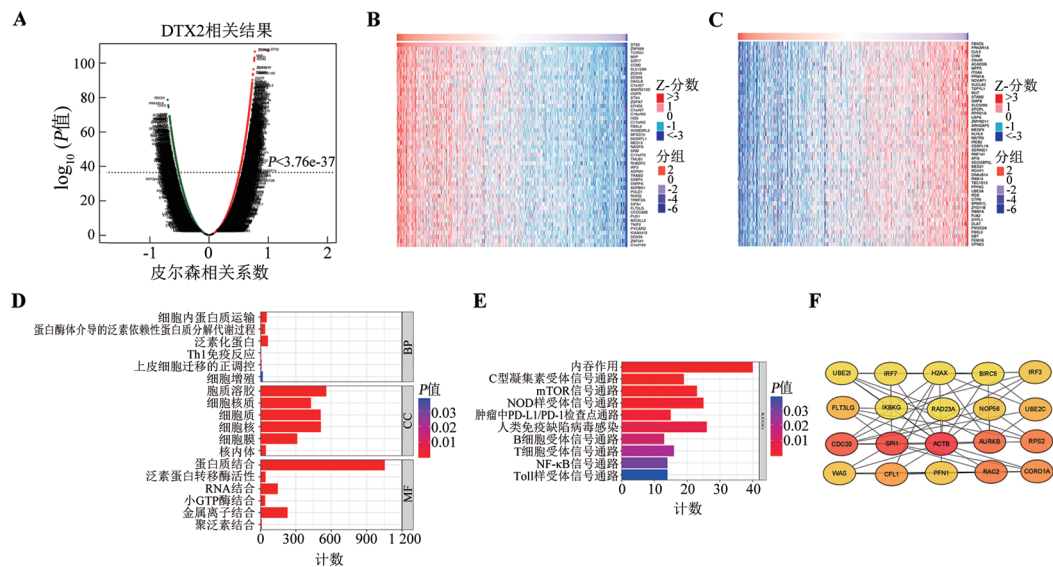


图3 DTX2表达水平与ccRCC患者生存预后的相关性



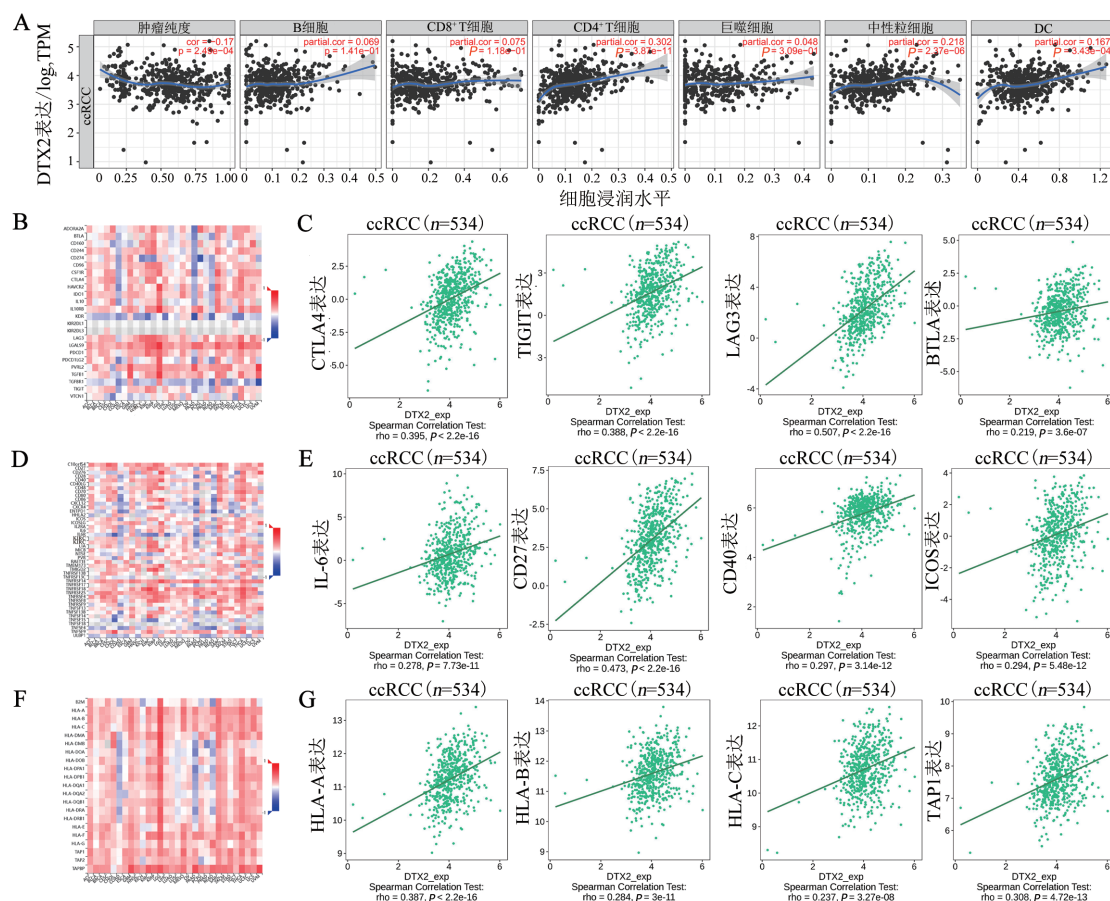
A: DTX2表达相关基因分布火山图,其中深红色为与DTX2正相关基因,深绿色为与DTX2负相关基因;B和C: DTX2相关性前50的基因热图,其中B为正相关基因,C为负相关基因;D: GO分析;E: KEGG通路富集分析;F: 利用Cytoscape软件筛选DTX2正相关排名前20的核心基因并制作PPI图。

图4 DTX2表达相关基因的GO和KEGG富集分析

## 2.5 DTX2表达与免疫细胞浸润的相关性

肿瘤的免疫反应是肿瘤发生、发展中的重要过程,脱离机体免疫的监控后肿瘤的恶性生物学行为将会进一步加快,从而促进肿瘤的增殖、侵袭和转移<sup>[8-9]</sup>。首先,通过TIMER数据库分析了ccRCC中DTX2的表达与不同免疫浸润细胞之间的相关性,结果表明,ccRCC中DTX2的表达与CD4<sup>+</sup> T细胞、中性

粒细胞存在着显著的相关性(均 $P < 0.001$ ,图5A)。进一步利用TISIDB数据库分析了ccRCC中DTX2的表达与免疫检查点、免疫相关标志物之间的相关性,结果表明,在ccRCC中DTX2与多种免疫抑制因子、免疫刺激因子及MHC因子呈显著正相关(均 $P < 0.001$ ,图5B~G)。



A: 利用TIMER数据库分析ccRCC中DTX2的表达与免疫浸润细胞之间的相关性; B~G: 利用TISIDB数据库分析ccRCC中DTX2表达与免疫检查点、免疫相关标志物之间的相关性,其中B、C为DTX2的表达与CTLA4、TIGIT、LAG3及BTLA等多种免疫抑制因子呈显著正相关,D、E为DTX2的表达与IL-6、CD26、CD40及ICOS等多种免疫刺激因子呈显著正相关,F、G为DTX2的表达与HLA-A、HLA-B、HLA-C及TAP1等多种MHC因子呈显著正相关。

图5 DTX2表达与免疫细胞浸润的相关性

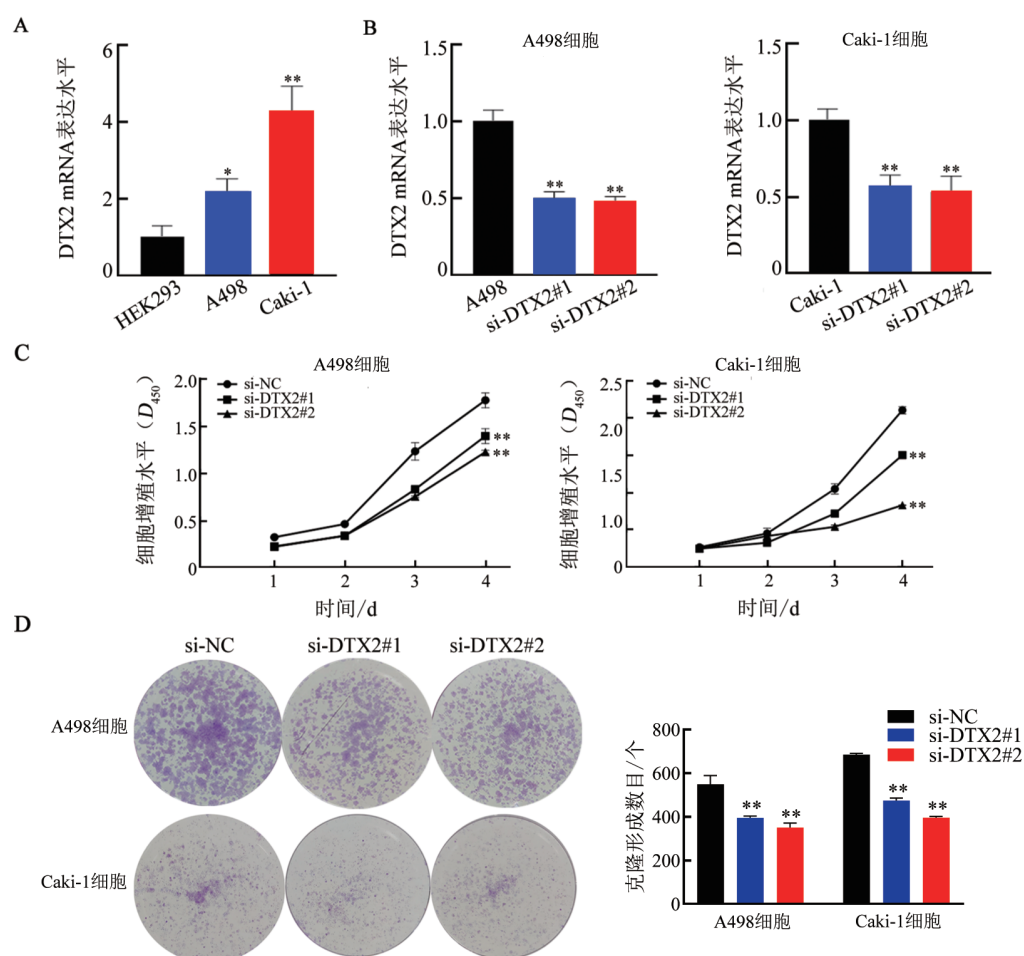
## 2.6 敲低DTX2可显著抑制ccRCC细胞增殖、迁移和侵袭能力

上述生信分析结果表明,DTX2在ccRCC组织中呈高表达。为了验证这一结果,利用qPCR法检测了DTX2在HEK293和A498、Caki-1细胞中的表达水平。结果(图6A)显示,DTX2在两种ccRCC细胞中的表达水平高于HEK293细胞( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

为确定下调DTX2对ccRCC细胞生物学特征的影响,分别在A498、Caki-1细胞中进行了DTX2敲低实验。结果显示,转染DTX2 siRNA后,ccRCC细胞中

DTX2 mRNA表达水平显著下降(均 $P < 0.01$ ,图6B),表明合成的DTX2 siRNA可以在ccRCC细胞中下调DTX2的表达。

为验证DTX2表达与ccRCC细胞生物学特征的关系,进一步利用CCK-8实验、平板克隆实验、细胞划痕及Transwell实验检测了敲低DTX2表达对A498、Caki-1细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果表明,敲低DTX2表达可显著抑制两种ccRCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力(均 $P < 0.01$ ,图6C、D,图7),这与前面的生信分析结果相一致。



A: qPCR法检测DTX2 mRNA在HEK293和ccRCC细胞中表达水平;B: qPCR法检测DTX2基因在A498、Caki-1细胞中的敲低效率;C: CCK-8法检测敲低DTX2对细胞增殖的影响;D: 平板克隆实验检测敲低DTX2对细胞克隆形成的影响。与si-NC组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图6 敲低DTX2对ccRCC细胞DTX2 mRNA表达水平和增殖能力的影响

### 3 讨论

近年来,随着分子生物学和生物信息学技术的快速发展,TCGA数据库被广泛用于肿瘤相关研究中。TCGA数据库是一个公共数据库,包含大量癌症患者的基因组学数据,并提供全面的癌症分子特征信息。通过对这些相关数据进行分析,可以揭示肿瘤发生和发展的分子机制,为肿瘤的诊断和治疗提供重要的依据<sup>[10-15]</sup>。

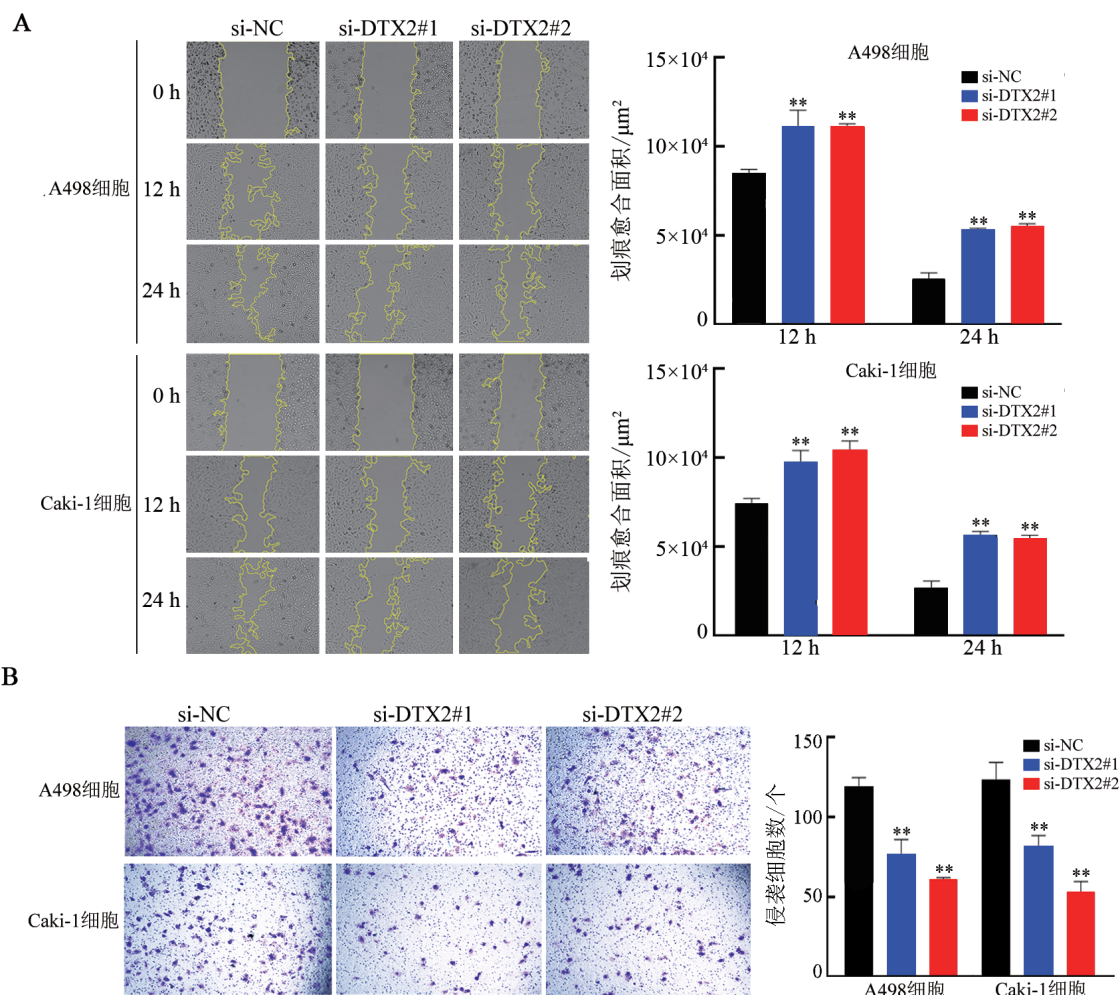
目前,关于DTX2在肿瘤中的作用及相关分子机制的研究鲜有报道。本研究利用TCGA在线数据库分析发现,ccRCC中DTX2的mRNA和蛋白表达水平均高于癌旁组织,且DTX2的表达水平与ccRCC患者的临床病理特征有关,包括病理分期、临床分级、不同亚型、淋巴结转移和患者预后,随着DTX2表达水平的增加,ccRCC的恶性程度增加。为进一步分析DTX2在ccRCC细胞中发挥作用的相关分子机制,本研究利用TCGA在线数据库下载ccRCC中DTX2表达相关基因,并进行GO富集分析和KEGG通路分

析。GO富集分析结果表明,DTX2表达相关基因在细胞膜、细胞核及细胞质均有分布。生物学过程主要与蛋白质泛素化途径降解、细胞增殖和细胞迁移等具有相关性,分子功能主要与蛋白质结合和RNA结合具有相关性。利用STRING数据库对DTX2表达相关基因进行PPI网络分析,并使用Cytoscape软件中的插件CytoHubb进行核心基因筛选,发现DTX2互作蛋白中排名前15位的基因中包含UBE2I和UBE2C。UBE2I和UBE2C这两个蛋白是泛素-蛋白酶体系统的重要组成部分,与细胞增殖和迁移等恶性生物学特征密切相关<sup>[16-18]</sup>。这些生信分析结果提示,作为一种E3泛素酶,ccRCC细胞中DTX2可能通过与UBE2I和UBE2C相互作用,经泛素-蛋白酶途径在翻译后水平调节与ccRCC细胞增殖和转移相关的靶基因表达进而发挥促癌基因的作用。这与已报道的DTX2通过泛素化过程参与其他肿瘤发生和发展过程相一致<sup>[19-21]</sup>。此外,也有研究<sup>[7,22]</sup>表明,DTX2是Notch结合蛋白,可通过调控Notch信号通路参与



结肠癌发生和发展。但本研究中KEGG信号通路富集分析结果显示,DTX2表达相关基因主要与mTOR、Toll样受体和NF- $\kappa$ B等信号通路具有相关性,而与

Notch信号通路无显著相关性,提示不同类型肿瘤中DTX2相关基因参与的信号路径可能不同。



A: 划痕实验检测敲低DTX2对A498、Caki-1细胞迁移能力的影响( $\times 40$ ); B: Transwell实验检测敲低DTX2对A498、Caki-1细胞侵袭能力的影响( $\times 100$ )。与si-NC组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

图7 敲低DTX2显著降低ccRCC细胞的迁移与侵袭能力

为了确定DTX2在ccRCC细胞中的生物学功能,本研究通过qPCR法、CCK-8细胞增殖实验、平板克隆实验、划痕实验和Transwell侵袭实验等对生信分析结果进行了初步验证。结果显示,ccRCC细胞中DTX2的表达水平明显高于正常肾HEK293细胞,利用siRNA下调DTX2表达后可以显著抑制ccRCC细胞的增殖、迁移和侵袭。这些实验结果与基于TCGA数据库的生信分析结果一致,即DTX2促进ccRCC细胞的增殖、侵袭和迁移,在ccRCC发生和发展中作为促癌基因而发挥作用,这与已报道的DTX2在其他类型肿瘤中的作用相一致<sup>[6-7, 23]</sup>。此外,生信分析结果表明,DTX2表达与ccRCC患者的预后具有相关性,而免疫细胞浸润与肿瘤患者预后密切相关,免疫细胞治疗可以通过修复患者机体免疫系统、激发免疫功

能成为肿瘤的一种新的治疗方法<sup>[24]</sup>。因此,本项研究利用TIMER和TISIDB数据库评估了ccRCC中DTX2的表达与不同免疫浸润细胞之间的相关性。结果显示,ccRCC中DTX2的表达与CD4<sup>+</sup>T细胞、中性粒细胞及多种常见的免疫调节因子之间具有显著相关性,提示DTX2可能通过免疫调节作用影响ccRCC患者的预后,但需要进一步的实验加以证实。

综上所述,本研究基于TCGA数据库探讨了DTX2在ccRCC细胞中的表达及其对ccRCC细胞恶性生物学行为的影响,并通过体外实验进行了验证。研究结果表明,DTX2在ccRCC发生、发展过程中扮演重要角色,主要作为促癌基因发挥作用。这一研究结果为进一步研究DTX2在ccRCC发生和发展中的作用机制提供了重要线索,也为开发新的治疗策略提供了理论基础。

然而,本研究仅仅是对DTX2的在ccRCC细胞中的生物学功能进行的初步研究,今后还需要更加深入的基础和临床研究来进一步探讨DTX2在ccRCC细胞中表达调控的分子机制、相关的信号通路及关键分子,为ccRCC的诊断和治疗提供新的思路。

## [参 考 文 献]

- [1] JONASCH E, WALKER C L, RATHMELL W K. Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality[J/OL]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4): 245-261[2023-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8172121/>. DOI: 10.1038/s41581-020-00359-2.
- [2] JIANG A M, BAO Y W, WANG A B, *et al.* Establishment of a prognostic prediction and drug selection model for patients with clear cell renal cell carcinoma by multiomics data analysis[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3617775[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35028006/>. DOI: 10.1155/2022/3617775.
- [3] LI Z Y, XIN S Y, YU S B, *et al.* Prognostic signatures and therapeutic value based on the Notch pathway in renal clear cell carcinoma[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1669664[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35096263/>. DOI: 10.1155/2022/1669664.
- [4] WANG L D, SUN X D, HE J N, *et al.* Functions and molecular mechanisms of deltex family ubiquitin E3 ligases in development and disease[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 706997[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34513839/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.706997.
- [5] YONEZAWA T, TAKAHASHI H, HAO Y Y, *et al.* The E3 ligase DTX2 inhibits RUNX1 function by binding its C terminus and prevents the growth of RUNX1-dependent leukemia cells[J]. *FEBS J*, 2023, 290(21): 5141-5157. DOI: 10.1111/febs.16914.
- [6] WU S Z, SHEN S H, LU F, *et al.* Bromodomain containing 4 transcriptionally activated Deltex E3 ubiquitin ligase 2 contributes to glioma progression and predicts an unfavorable prognosis[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(6): 313[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35434025/>. DOI: 10.21037/atm-22-555.
- [7] 马振南, 赵雪峰, 张晓微, 等. DTX2通过Notch2/Akt轴促进结直肠癌细胞的迁移和侵袭[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3): 340-348. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2023.03.02.
- [8] GUARDASCIONE M, TOFFOLI G. Immune checkpoint inhibitors as monotherapy or within a combinatorial strategy in advanced hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6302[2023-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7504231/>. DOI: 10.3390/ijms21176302.
- [9] HUO J Y, GUAN G, CAI J Z, *et al.* Integrated analysis of 1804 samples of six centers to construct and validate a robust immune-related prognostic signature associated with stromal cell abundance in tumor microenvironment for gastric cancer[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20(1): 4[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34983559/>. DOI: 10.1186/s12957-021-02485-y.
- [10] TOMCZAK K, CZERWIŃSKA P, WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. *Contemp Oncol*, 2015, 19(1A): A68-A77. DOI: 10.5114/wo.2014.47136.
- [11] VRIEND J, THANASUPAWAT T, SINHA N, *et al.* Ubiquitin proteasome gene signatures in ependymoma molecular subtypes[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12330[2023-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9604155/>. DOI: 10.3390/ijms232012330.
- [12] LEEMANS C R, SNIJDERS P J F, BRAKENHOFF R H. The molecular landscape of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(5): 269-282. DOI: 10.1038/nrc.2018.11.
- [13] LIU T, YANG K, CHEN J M, *et al.* Comprehensive pan-cancer analysis of KIF18A as a marker for prognosis and immunity[J/OL]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 326[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36830695/>. DOI: 10.3390/biom13020326.
- [14] ZHENG W Z, ZHANG S Q, GUO H, *et al.* Multi-omics analysis of tumor angiogenesis characteristics and potential epigenetic regulation mechanisms in renal clear cell carcinoma[J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 39[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33761933/>. DOI: 10.1186/s12964-021-00728-9.
- [15] PENG L, LI J S, WU J, *et al.* A pan-cancer analysis of SMARCA4 alterations in human cancers[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 762598[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34675941/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.762598.
- [16] MEREDITH L J, WANG C M, NASCIMENTO L, *et al.* The key regulator for language and speech development, FOXP2, is a novel substrate for SUMOylation[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(2): 426-438. DOI: 10.1002/jcb.25288.
- [17] JIN Z N, ZHAO X Y, CUI L, *et al.* UBE2C promotes the progression of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523(2): 389-397. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.12.064.
- [18] LIN C Y, YU C J, LIU C Y, *et al.* CDK4/6 inhibitors downregulate the ubiquitin-conjugating enzymes UBE2C/S/T involved in the ubiquitin-proteasome pathway in ER<sup>+</sup> breast cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(11): 2120-2135. DOI: 10.1007/s12094-022-02881-0.
- [19] MAKI K, SASAKI K, SUGITA F, *et al.* Acute myeloid leukemia with t(7; 21) (q11.2; q22) expresses a novel, reversed-sequence RUNX1-DTX2 chimera[J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(2): 268-273. DOI: 10.1007/s12185-012-1112-z.
- [20] AHMED S F, BUETOW L, GABRIELSEN M, *et al.* DELTEX2 C-terminal domain recognizes and recruits ADP-ribosylated proteins for ubiquitination[J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(34): eabc0629[2023-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7442474/>. DOI: 10.1126/sciadv.abc0629.
- [21] LUO D, MORREE A D, BOUTET S, *et al.* Deltex2 represses MyoD expression and inhibits myogenic differentiation by acting as a negative regulator of Jmjd1c[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(15): E3071-E3080[2023-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5393251/>. DOI: 10.1073/pnas.1613592114.
- [22] MATSUNO K, DIEDERICH R J, GO M J, *et al.* Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats[J]. *Development*, 1995, 121(8): 2633-2644. DOI: 10.1242/dev.121.8.2633.
- [23] ZHOU Z F, LI Y J, XU H M, *et al.* An inducible CRISPR/Cas9 screen identifies DTX2 as a transcriptional regulator of human telomerase[J/OL]. *iScience*, 2022, 25(2): 103813[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35198878/>. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103813.
- [24] 施明, 谢云波, 王福生, 等. 肿瘤免疫细胞治疗: 前景与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(1): 1-9. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2024.01.001.

[收稿日期] 2023-11-08

[修回日期] 2024-03-17

[本文编辑] 党瑞山