

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.10.015

论著·基础

FKBP11 下调对肾癌细胞增殖、迁移、侵袭及 TGF- β_1 /Smad3 通路的影响

张苗,何德娇,凌娜,李小丽,梁轶岚,张丽丽,胡威

基金项目:湖北省卫生健康委员会 2019—2020 年度指导性项目(WJ2019F159)

作者单位:430000 武汉大学人民医院肾内二科(张苗、何德娇、凌娜、李小丽、梁轶岚、胡威),老年病科(张丽丽)

通信作者:张丽丽, E-mail: humour214@163.com

【摘要】目的 探讨下调 FK506 结合蛋白 11 (FKBP11) 对肾细胞癌 (RCC) 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 同源物 3 (Smad3) 通路的作用。方法 2020 年 3 月—2021 年 3 月于武汉大学人民医院生物实验室进行实验。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和免疫印迹 (Western-blot) 法测定人正常肾小管上皮细胞系 (HK-2) 和 RCC 细胞系 (A498、ACHN、CaKi-1、786-O) 中 FKBP11 的 mRNA 和蛋白表达水平。将 786-O 细胞分为空白组 (不转染)、对照组 (转染阴性对照 siRNA)、si-FKBP11 组 (转染 si-FKBP11) 和 si-FKBP11 + LY364947 组 (转染 si-FKBP11 同时加入 TGF- β_1 /Smad3 通路抑制剂 LY364947), 采用 qRT-PCR 和 Western-blot 检测各组细胞中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平, CCK-8 法和集落形成实验检测细胞的增殖活力, Transwell 小室检测细胞的侵袭和迁移能力, Western-blot 检测各组细胞中增殖细胞核抗原 (PCNA)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、凋亡抑制蛋白 (Twist)、锌指转录因子 (Snail)、TGF- β_1 、Smad3 及磷酸化 Smad3 (p-Smad3) 蛋白表达水平。结果 与正常肾小管上皮细胞系 HK-2 比较, RCC 细胞系 A498、ACHN、CaKi-1、786-O 中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 且在 786-O 细胞中表达最高。与对照组比较, si-FKBP11 组细胞中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平、细胞增殖能力、细胞侵袭和迁移能力及 PCNA、Vimentin、Twist、Snail、TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白水平显著降低, E-cadherin 蛋白水平显著增高 ($P < 0.05$); 与 si-FKBP11 组比较, si-FKBP11 + LY364947 组细胞增殖能力、细胞侵袭和迁移能力以及 PCNA、Vimentin、Twist、Snail、TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白水平显著降低, E-cadherin 蛋白水平显著增高 ($P < 0.05$); 而空白组与对照组上述各项指标变化比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 FKBP11 下调可通过抑制 TGF- β_1 /Smad3 通路激活进而抑制 RCC 细胞增殖、侵袭和迁移。

【关键词】 肾细胞癌; FK506 结合蛋白 11; 转化生长因子- β_1 /Smad 同源物 3 通路; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞迁移

【中图分类号】 R737.11

【文献标识码】 A

Effects of down-regulation of FKBP11 on proliferation, migration, invasion and TGF- β_1 /Smad3 pathway of renal cancer cells

Zhang Miao*, He Dejiao, Ling Na, Li Xiaoli, Liang Yilan, Zhang Lili, Hu Wei. * Department of Nephrology II, People's Hospital of Wuhan University, Department of Geriatrics, Hubei Province, Wuhan 430000, China

Corresponding author: Zhang Lili, E-mail: humour214@163.com

Funding program: 2019-2020 Guidance Project of Hubei Provincial Health Commission (WJ2019F159)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of down-regulation of FK506-binding protein 11 (FKBP11) on the proliferation, migration and invasion of renal cancer (RCC) cells and its effect on the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smad homolog 3 (Smad3) pathway. **Methods** From March 2020 to March 2021, experiments were conducted in the Biological Laboratory of the People's Hospital of Wuhan University. The mRNA of FKBP11 in human normal renal tubular epithelial cell line (HK-2) and RCC cell line (A498, ACHN, CaKi-1, 786-O) was determined by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and western blotting (Western-blot) methods and protein expression levels. The 786-O cells were divided into blank group (not transfected), control group (transfected with negative control siRNA), si-FKBP11 group (transfected with si-FKBP11) and si-FKBP11 + LY364947 group (transfected with si-FKBP11 and added TGF- β_1 /Smad3 pathway inhibitor LY364947), the expression levels of FKBP11 mRNA and protein in cells of each group were detected by qRT PCR and Western blot, the proliferation activity of cells was detected by CCK-8 method and colony formation assay, the invasion and migration ability of cells were detected by Transwell chamber, and Western blot was detected proliferating cell nuclear antigen

(PCNA), E-cadherin (E-cadherin), vimentin (Vimentin), apoptosis inhibitory protein (Twist), zinc finger transcription factor (Snail), TGF- β_1 , Smad3 and phosphorylation in each group of cells Smad3 (p-Smad3) protein expression levels. **Results** Compared with the normal renal tubular epithelial cell line HK-2, the mRNA and protein expression levels of FKBP11 in RCC cell lines A498, ACHN, CaKi-1, and 786-O were significantly up-regulated ($P < 0.05$), and the expression was the highest in 786-O cells. Compared with the control group, the expression levels of FKBP11 mRNA and protein, the ability of cell proliferation, the ability of cell invasion and migration, and the protein levels of PCNA, Vimentin, Twist, Snail, TGF- β_1 and p Smad3 in the si-FKBP11 group were significantly decreased, and the protein level of E-cadherin was significantly decreased. Compared with the si-FKBP11 group, the si-FKBP11 + LY364947 group had significantly lower cell proliferation ability, cell invasion and migration ability, PCNA, Vimentin, Twist, Snail, TGF- β_1 and p-Smad3 protein levels, E-cadherin protein level was significantly increased ($P < 0.05$); however, there was no significant difference between the blank group and the control group in the changes of the above indicators ($P > 0.05$). **Conclusion** Downregulation of FKBP11 can inhibit RCC cell proliferation, invasion and migration by inhibiting the activation of TGF- β_1 /Smad3 pathway.

【Key words】 Renal cell carcinoma; FK506 binding protein 11; Transforming growth factor- β_1 /mothers against decapentaplegic homolog 3 pathway; Cell proliferation; Cell invasion; Cell migration

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 简称肾癌, 是常见的恶性肿瘤^[1]。RCC 对化疗和放疗的敏感性低, 仅有少数患者可通过免疫治疗获效^[2]。RCC 患者 5 年生存率相对较低, 尤其是 RCC 伴转移患者 5 年生存率不超过 10%^[3]。FK506 结合蛋白 (FK506-binding proteins, FKBP) 在多种肿瘤细胞的发生发展中具有重要作用, 参与调控癌细胞增殖、侵袭及迁移等^[4-6]。FK506 结合蛋白 11 (FK506-binding protein 11, FKBP11) 的基因表达水平与 RCC 患者的预后密切相关, 可作为潜在标志物评估 RCC 患者的预后^[7]。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)/Smad 同源物 3 (mothers against decapentaplegic homolog 3, Smad3) 信号通路参与调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等过程^[8-9]。本研究通过观察下调 FKBP11 对 RCC 细胞增殖、侵袭和迁移及 TGF- β_1 /Smad3 通路的影响, 探讨其在 RCC 中可能的作用机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 细胞: 人正常肾小管上皮细胞系 HK-2 和 RCC 细胞系 A498、ACHN、CaKi-1、786-O 均购自美国 ATCC 细胞库。(2) 试剂: DEME 培养基、胰蛋白酶及 CCK-8 试剂盒均购自美国 BPB 公司; Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Trizol 试剂、qRT-PCR 反应试剂盒、LY364947 (TGF- β_1 /Smad3 通路抑制剂)、ECL 发光试剂及结晶紫均购自美国 Sigma 公司; FKBP11 siRNA (si-FKBP11) 和其阴性对照 siRNA 购自广州 Ruibo 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 一抗兔抗人 FKBP11、增殖细胞核抗原 (PCNA)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、凋亡抑制蛋白 (Twist)、锌指转录因子 (Snail)、TGF- β_1 、 β -actin、Smad3 及磷酸化 Smad3 (p-Smad3) 均

购自英国 Abcam 公司; 所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。(3) 仪器、设备: MG80 型二氧化碳细胞培养箱购于上海冠森生物科技有限公司; Multiskan™ FC 型酶标仪、Applied Biosystems 型 qRT-PCR 仪、NERLTM 型流式细胞仪及 E-Gel Imager 型凝胶成像仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, TS100 型倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 实验方法 2020 年 3 月—2021 年 3 月于武汉大学人民医院生物实验室进行实验。

1.2.1 细胞培养: 人正常肾小管上皮细胞系 (HK-2) 和 RCC 细胞系 (A498、ACHN、CaKi-1、786-O) 培养于 DEME 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 在含 5% CO₂、饱和湿度的 37℃ 恒温细胞培养箱中培养。根据细胞生长状态, 细胞融合程度超过 80% 以上时, 更换培养基传代培养。用于检测 FKBP11 的 mRNA 和蛋白表达水平。

1.2.2 细胞分组与转染: 取对数期且生长状态良好的 786-O 细胞, 以 2×10^5 个/ml 的细胞密度接种于 6 孔细胞培养板中, 当细胞融合达到 80% 时, 将细胞分为 4 组, 正常培养细胞作为空白组, 其余 3 组按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书分别转染阴性对照 siRNA、si-FKBP11 及 si-FKBP11 + LY364947 $3 \mu\text{l}$ ^[9], 依次作为对照组、si-FKBP11 组和 si-FKBP11 + LY364947 组, 转染 24 h 后检测各组细胞中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 不同细胞系中 FKBP11 的 mRNA 表达水平检测: 收集 HK-2 和 RCC 细胞, 加入 Trizol 裂解液裂解细胞, 提取细胞的总 RNA, 将 RNA 反转录形成 cDNA, 通过荧光定量 PCR 测定 FKBP11 的 mRNA 表达水平。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应程序为: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。FKBP11 引物: 上游 5'-GGCGTAGGCGATTGGTTCCTA-3', 下游 5'-CCATTCCATTCAT-TTCTCTGGATCG-3'。GAPDH (内参) 引物: 上游 5'-CCCATGGCAAGTTCAAAGGCA-3', 下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTAGATT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算细胞中 FKBP11 的 mRNA 相对表达量。

1.3.2 免疫印记 (Western-blot) 检测细胞中蛋白表达水平: 蛋白裂解液从细胞中提取总蛋白。取蛋白样品使用 SDS-PAGE 胶电泳分离 100 min, 通过湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 随后添加 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h, 随后加入一抗: FKBP11、PCNA、E-cadherin、Vimentin、Twist、Snail、TGF- β_1 、Smad3、p-Smad3 和 β -actin 低温过夜孵育, 添加二抗孵育 2 h, 添加 ECL 化学发光混合液反应 5 min, 在凝胶成像仪中观察拍照。使用 Image J 软件分析条带灰度值。蛋白相对表达水平 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 蛋白的灰度值。

1.3.3 786-O 细胞增殖检测: CCK-8 法检测细胞增殖活力。取各组处于对数期生长的 786-O 细胞, 以细胞密度为 5×10^3 个/ml 接种到 96 孔细胞培养板中, 培养 24、48、72 h 时, 每孔依次添加 CCK-8 溶液 10 μ l, 再继续培养 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的光密度值 (IOD), 以光密度值来表示细胞的增殖活力。

集落形成实验检测各组细胞集落形成情况, 各组处理后的 786-O 细胞 1×10^3 个接种在 6 孔板中孵育 2 周。4% 多聚甲醛固定细胞后通过 1% 结晶紫染色, 通过显微镜拍照集落形成情况。对超过 50 个细胞的集落进行统计。

1.3.4 Transwell 小室实验检测各组 786-O 细胞的侵袭和迁移数目: 在 Transwell 小室中预涂 Matrigel 基质胶 50 μ l, 干燥备用。取各组处于对数期生长的 786-O 细胞, 添加无血清的培养基重悬调整细胞密度为 2.5×10^4 个/ml, 后吸取细胞悬浮液 200 μ l 接种 Transwell 小室上室中, 下室添加含 10% 胎牛血清的完全培养基, 培养 24 h 后, 取出小室, 使用 PBS 冲洗 2~3 次, 添加甲醇固定细胞, 后用棉签轻轻擦拭掉上室细胞, 将下室细胞用 1% 结晶紫染色 30 min, 在显微镜视野下观察, 分别选取左上、右上、中部、左下及右下 5 个视野, 计算穿膜细胞数目。迁移实验不需要添加基质胶, 其余操作方法同侵袭实验。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检

验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞系中 FKBP11 表达水平比较 与正常肾小管上皮细胞系 HK-2 比较, RCC 细胞系 A498、ACHN、CaKi-1、786-O 中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平显著上调 (P < 0.05), 见图 1、表 1。其中 FKBP11 在 786-O 细胞中表达最高, 故后续实验以 786-O 细胞为研究对象。

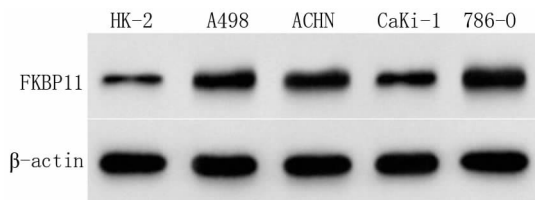


图 1 Western blot 检测 RCC 细胞与正常肾小管上皮细胞中 FKBP11 蛋白表达水平

Fig. 1 Western blot detection of FKBP11 protein expression in RCC cells and normal renal tubular epithelial cells

表 1 正常肾小管上皮细胞与 RCC 细胞中 FKBP11 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of FKBP11 expression levels in normal renal tubular epithelial cells and RCC cells

细胞系	n	FKBP11 mRNA	FKBP11 蛋白
HK-2	3	1.01 ± 0.04	0.23 ± 0.03
A498	3	1.52 ± 0.13 ^a	0.70 ± 0.06 ^a
ACHN	3	1.51 ± 0.11 ^a	0.66 ± 0.07 ^a
CaKi-1	3	1.46 ± 0.07 ^a	0.49 ± 0.05 ^{abc}
786-O	3	1.74 ± 0.16 ^a	0.87 ± 0.07 ^{abcd}
F 值		17.143	52.455
P 值		<0.001	<0.001

注: 与 HK-2 比较, ^aP < 0.05; 与 A498 比较, ^bP < 0.05; 与 ACHN 比较, ^cP < 0.05; 与 CaKi-1 比较, ^dP < 0.05

2.2 各组 786-O 细胞中 FKBP11 表达水平比较 与对照组比较, si-FKBP11 组 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平显著下调 (P < 0.05); 空白组与对照组, si-FKBP11 组与 si-FKBP11 + LY364947 组细胞中 FKBP11 的 mRNA 和蛋白表达水平比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 见图 2、表 2。

2.3 各组 786-O 细胞增殖活力比较 细胞培养 24 h 后, 各组 786-O 细胞的增殖活力比较差异无统计学意义 (P > 0.05); 培养 48、72 h 后, 与对照组比较, si-FKBP11 组 786-O 细胞增殖活力明显降低 (P < 0.05); 与 si-FKBP11 组比较, si-FKBP11 + LY364947 组 786-O 细胞增殖活力明显降低 (P < 0.05); 而空白组与对照组

786-O 细胞增殖活力比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外,集落形成实验证实,与对照组比较,si-FKBP11 组集落形成明显减少 ($P < 0.05$);与 si-FKBP11 组比较,si-FKBP11 + LY364947 组 786-O 细胞集落形成数量显著降低 ($P < 0.05$);而空白组与对照组 786-O 细胞集落形成数量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3、表 3。

表 2 各组 786-O 细胞中 FKBP11 mRNA 和蛋白表达水平比较

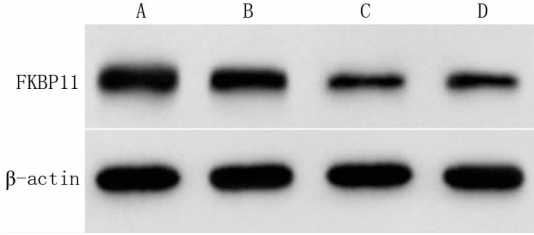
Tab.2 FKBP11 mRNA and protein expression in 786-O cells in each group

组别	n	FKBP11 mRNA	FKBP11 蛋白
空白组	3	1.02 ± 0.04	0.80 ± 0.07
对照组	3	0.99 ± 0.06	0.72 ± 0.06
si-FKBP11 组	3	0.42 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.04 ^a
si-FKBP11 + LY364947 组	3	0.45 ± 0.04	0.36 ± 0.03
F 值		140.129	55.230
P 值		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

数目显著减少 ($P < 0.05$);与 si-FKBP11 组比较,si-FKBP11 + LY364947 组 786-O 细胞中侵袭和迁移细胞数目显著减少 ($P < 0.05$);而空白组与对照组 786-O 细胞中侵袭和迁移细胞数目比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 4、表 4。

2.5 各组 786-O 细胞中 PCNA、E-cadherin、Vimentin、Twist 和 Snail 蛋白表达水平比较 与对照组比较,si-FKBP11 组 786-O 细胞中 PCNA、Vimentin、Twist 和 Snail 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$);与 si-FKBP11 组比较,si-FKBP11 + LY364947 组 786-O 细胞中 PCNA、Vimentin、Twist 和 Snail 蛋白水平显著降低 ($P <$



A. 空白组;B. 对照组;C. si-FKBP11 组;D. si-FKBP11 + LY364947 组

图 2 Western-blot 检测各组 786-O 细胞中 FKBP11 蛋白水平比较

Fig.2 Western blot detection of FKBP11 protein levels in 786-O cells in each group

2.4 各组 786-O 细胞侵袭和迁移能力比较 与对照组比较,si-FKBP11 组 786-O 细胞中侵袭和迁移细胞

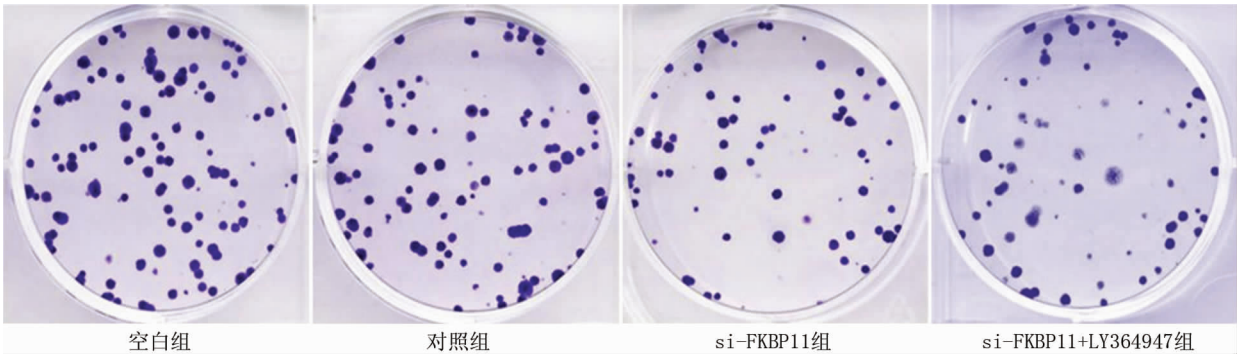


图 3 集落形成实验检测细胞增殖比较

Fig.3 Comparison of cell proliferation detected by colony formation assay

表 3 各组 786-O 细胞增殖情况比较 ($\bar{x} \pm s, IOD$)

Tab.3 The proliferation of 786-O cells in each group

组别	n	细胞增殖活力			集落形成数量 (个)
		24 h	48 h	72 h	
空白组	3	0.36 ± 0.08	0.74 ± 0.09	1.11 ± 0.13	96.23 ± 8.76
对照组	3	0.34 ± 0.06	0.75 ± 0.06	1.09 ± 0.11	87.32 ± 7.12
si-FKBP11 组	3	0.31 ± 0.07	0.49 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.09 ^a	49.35 ± 4.18 ^a
si-FKBP11 + LY364947 组	3	0.29 ± 0.05	0.38 ± 0.03 ^b	0.55 ± 0.07 ^b	37.22 ± 3.98 ^b
F 值		0.667	28.789	21.714	61.330
P 值		0.596	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 si-FKBP11 组比较,^b $P < 0.05$

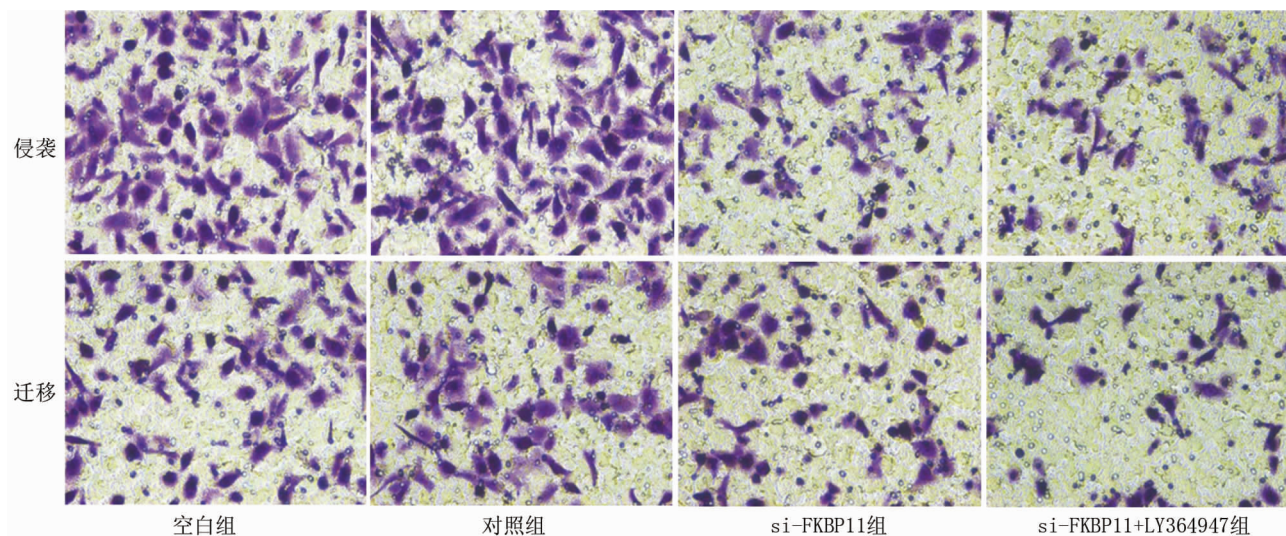


图 4 各组 786-O 细胞侵袭和迁移实验结果比较(×200)

Fig. 4 Comparison of 786-O cell invasion and migration test results in each group (×200)

表 4 各组 786-O 细胞侵袭和迁移细胞数目比较 ($\bar{x} \pm s$, 个)

Tab. 4 Comparison of the number of 786-O cells invading and migrating cells in each group

组别	n	侵袭细胞数目	迁移细胞数目
空白组	3	80.15 ± 10.12	66.15 ± 8.79
对照组	3	81.54 ± 9.56	67.35 ± 7.56
si-FKBP11 组	3	56.89 ± 5.42 ^a	42.16 ± 4.26 ^a
si-FKBP11 + LY364947 组	3	42.15 ± 3.45 ^b	29.45 ± 3.17 ^b
F 值		18.561	25.560
P 值		0.001	<0.001

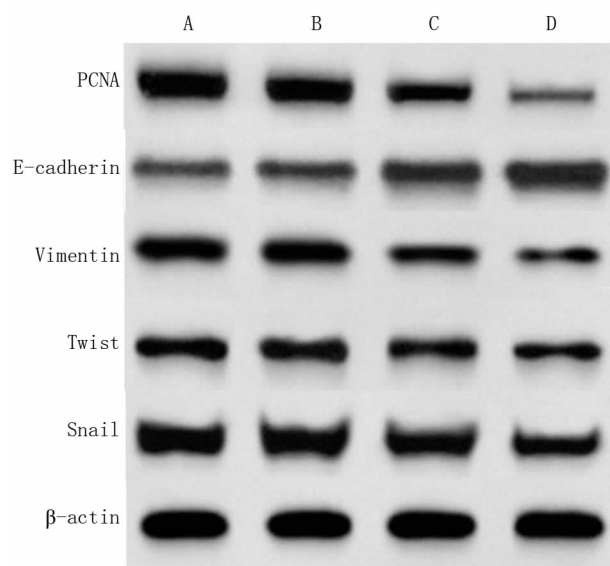
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 si-FKBP11 组比较,^b $P < 0.05$

0.05), E-cadherin 蛋白水平显著升高($P < 0.05$);而空白组与对照组 786-O 细胞中上述蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 5、表 5。

2.6 各组 786-O 细胞中 TGF- β_1 、Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达水平比较 各组 786-O 细胞中 Smad3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较, si-FKBP11 组 786-O 细胞中 TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与 si-FKBP11 组比较, si-FKBP11 + LY364947 组 786-O 细胞中 TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);而空白组与对照组 786-O 细胞中 TGF- β_1 和 p-Smad3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 6、表 6。

3 讨论

RCC 发病率占成人恶性肿瘤的 2% ~ 3%, 早期具有隐匿性, 约 30% 的患者初诊时就已经发生转移^[10-11]。传统的化学疗法和放射疗法对 RCC 治疗基



注:A. 空白组;B. 对照组;C. si-FKBP11 组;D. si-FKBP11 + LY364947 组

图 5 Western-blot 检测各组 786-O 细胞中 PCNA、E-cadherin、Vimentin、Twist 和 Snail 蛋白表达水平比较

Fig. 5 Western-blot detection of PCNA, E-cadherin, Vimentin, Twist and Snail protein expression levels in 786-O cells in each group

本无效^[2], 因此发现新的有效的诊断方法和治疗方案尤为重要。

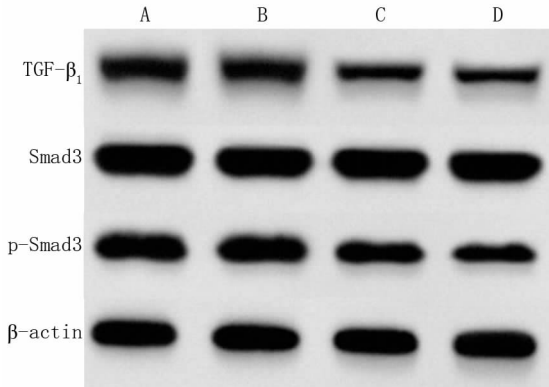
FKBPs 是一类包含肽基脯氨酸顺式/反式异构酶结构域的蛋白质家族, 可参与多种生物学功能, 如心脏调节功能、神经元的发育等, 且与多种疾病的发生发展密切相关^[7]。研究发现, FKBP11 可参与蛋白质的折叠和分泌^[12]。过表达的 FKBP11 是狼疮 B 细胞的

表 5 各组 786-O 细胞中 PCNA、E-cadherin、Vimentin、Twist 和 Snail 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of PCNA, E-cadherin, Vimentin, Twist and Snail protein levels in 786-O cells in each group

组别	n	PCNA	E-cadherin	Vimentin	Twist	Snail
空白组	3	1.05 ± 0.11	0.37 ± 0.03	0.77 ± 0.08	0.70 ± 0.06	1.18 ± 0.12
对照组	3	1.01 ± 0.10	0.40 ± 0.05	0.74 ± 0.06	0.68 ± 0.07	1.15 ± 0.11
si-FKBP11 组	3	0.45 ± 0.06 ^a	0.78 ± 0.08 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.81 ± 0.09 ^a
si-FKBP11 + LY364947 组	3	0.29 ± 0.03 ^b	0.99 ± 0.10 ^b	0.31 ± 0.02 ^b	0.43 ± 0.02 ^b	0.52 ± 0.06 ^b
F 值		67.549	55.051	49.533	19.733	30.628
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^aP < 0.05;与 si-FKBP11 组比较,^bP < 0.05



注: A. 空白组; B. 对照组; C. si-FKBP11 组; D. si-FKBP11 + LY364947 组

图 6 Western-blot 检测 786-O 细胞中 TGF-β₁ 和 Smad3、p-Smad3 蛋白表达水平比较

Fig. 6 The protein expression levels of TGF-β₁, Smad3 and p-Smad3 in 786-O cells detected by Western-blot

表 6 各组 786-O 细胞中 TGF-β₁ 和 Smad3、p-Smad3 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 TGF-β₁ and Smad3, p-Smad3 protein levels in 786-O cells of each group

组别	n	TGF-β ₁	Smad3	p-Smad3
空白组	3	0.86 ± 0.09	1.25 ± 0.13	0.97 ± 0.08
对照组	3	0.83 ± 0.10	1.24 ± 0.15	0.93 ± 0.09
si-FKBP11 组	3	0.44 ± 0.05 ^a	1.26 ± 0.11	0.58 ± 0.06 ^a
si-FKBP11 + LY364947 组	3	0.32 ± 0.03 ^b	1.21 ± 0.13	0.42 ± 0.03 ^b
F 值		41.651	0.082	45.495
P 值		<0.001	0.968	<0.001

注:与对照组比较,^aP < 0.05;与 si-FKBP11 组比较,^bP < 0.05

特征之一,可破坏 B 细胞的耐受性并导致浆细胞分化^[13]。另外,FKBP11 表达可随着肝癌细胞的发展而逐渐增高,可成为肝细胞癌早期诊断的标志物之一^[14]。此外,也有研究证明,FKBP11 在肾透明细胞癌(ccRCC)组织中高表达,且其表达可随着 ccRCC 病理分级的增高而升高,与 ccRCC 的发生发展密切相关^[7]。但关于 FKBP11 在 RCC 中的作用机制还未见

详细报道。本研究结果显示,FKBP11 在 RCC 细胞系中高表达,与以往研究相似^[7],且在 786-O 细胞中 FKBP11 表达最高。进一步分析显示,FKBP11 下调可抑制 786-O 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。同时结果表明,敲低 FKBP11 可降低 PCNA、Vimentin、Twist、Snail 蛋白水平,上调 E-cadherin 表达。已知 PCNA 主要在细胞核中表达,其蛋白水平可用来评估细胞的增殖状态^[15]。E-cadherin 水平降低及 Vimentin 水平升高是上皮-间质转化(EMT)发生的重要标志^[16]。以上结果说明,FKBP11 可通过调控细胞行为相关蛋白的表达进而参与 RCC 的发生发展过程,但 FKBP11 在 RCC 中的作用机制尚不清楚。

肿瘤的发生发展是一个极为复杂的过程,可由多种信号通路参与调控,其中 TGF-β₁/Smad3 信号通路为癌细胞发生发展的重要通路之一^[17]。有研究证明,TGF-β₁/Smad3 促进肾脏炎症反应和纤维化发展^[18]。此外有研究报道,雌激素受体 β(ERβ)可通过激活 TGF-β₁/Smad3/miRNAs 信号通路,进而影响 EMT 过程,促进 RCC 的侵袭和迁移作用,当此通路被抑制时,可逆转 ERβ 促进 RCC 发展过程,从而为有效抑制转移性 RCC 的新疗法提供基础^[19]。据报道, Twist 和 Snail 是 TGF-β₁/Smad3 通路上游转录因子,当其水平升高可促进通路激活^[20]。TGF-β₁ 和 p-Smad3 的蛋白水平则可反映 TGF-β₁/Smad3 通路状况,当二者水平增高时,表示此通路被激活,反之则为抑制^[21]。本研究结果显示,敲低 FKBP11 表达抑制 Twist、Snail、TGF-β₁ 和 p-Smad3 蛋白水平,表明敲低 FKBP11 表达可能抑制 TGF-β₁/Smad3 通路活化。进一步研究显示,TGF-β₁/Smad3 通路抑制剂部分逆转 FKBP11 下调对 RCC 细胞恶性行为及 TGF-β₁/Smad3 通路的影响。以上结果表明,下调 FKBP11 抑制 RCC 细胞恶性细胞行为,可能与抑制 TGF-β₁/Smad3 通路激活有关。

综上所述,下调 FKBP11 可抑制 RCC 细胞的增殖、侵袭和迁移,其机制可能与抑制 TGF-β₁/Smad3 通

路活化有关。然而本研究并未探究下调 FKBP11 影响 RCC 的发生发展过程是否还有其他通路的参与,还有待后续更深入的探究。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张苗、张丽丽:构思、设计研究方案;何德娇、凌娜、李小丽:进行实验操作;梁轶岚、胡威:撰写论文,分析或解释数据;张苗:论文终审

参考文献

- [1] Dizman N, Arslan ZE, Feng M, et al. Sequencing therapies for metastatic renal cell carcinoma [J]. *Urol Clin North Am*, 2020, 47 (3): 305-318. DOI:10.1016/j.ucl.2020.04.008.
- [2] Xu DD, Ding M, Tong P, et al. Synergistic effects of low-dose chemotherapy and T cells in renal cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44 (3): 897-908. DOI:10.3892/or.2020.7679.
- [3] Wolf MM, Kimryn Rathmell W, Beckermann KE. Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications [J]. *Oncogene*, 2020, 39 (17): 3413-3426. DOI:10.1038/s41388-020-1234-3.
- [4] Xia Z, Zhang G, Wang C, et al. The role of FKBP51 in the prognosis of ulcerative colitis-associated colorectal cancer [J]. *Adv Med Sci*, 2021, 66 (1): 89-97. DOI:10.1016/j.advms.2021.01.003.
- [5] Knüppel L, Heinzelmann K, Lindner M, et al. FK506-binding protein 10 (FKBP10) regulates lung fibroblast migration via collagen VI synthesis [J]. *Respir Res*, 2018, 19 (1): 67-75. DOI: 10.1186/s12931-018-0768-1.
- [6] Wang RG, Zhang D, Zhao CH, et al. FKBP10 functioned as a cancer-promoting factor mediates cell proliferation, invasion, and migration via regulating PI3K signaling pathway in stomach adenocarcinoma [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36 (5): 311-317. DOI: 10.1002/kjm2.12174.
- [7] Sun Z, Qin X, Fang J, et al. Multi-Omics analysis of the expression and prognosis for FKBP gene family in renal cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11 (25): 697534-697548. DOI:10.3389/fonc.2021.697534.
- [8] Yao X, Cui X, Wu X, et al. Tumor suppressive role of miR-1224-5p in keloid proliferation, apoptosis and invasion via the TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495 (1): 713-720. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.10.070.
- [9] Li Y, Wang P, Ye D, et al. IGHG1 induces EMT in gastric cancer cells by regulating TGF- β /SMAD3 signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2021, 12 (12): 3458-3467. DOI:10.7150/jca.56056.
- [10] Lai Y, Tang F, Huang Y, et al. The tumour microenvironment and metabolism in renal cell carcinoma targeted or immune therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236 (3): 1616-1627. DOI: 10.1002/jcp.29969.
- [11] Derosa L, Routy B, Fidelle M, et al. Gut bacteria composition drives primary resistance to cancer immunotherapy in renal cell carcinoma patients [J]. *Eur Urol*, 2020, 78 (2): 195-206. DOI:10.1016/j.eururo.2020.04.044.
- [12] Preisendörfer S, Ishikawa Y, Hennen E, et al. FK506-binding protein 11 is a novel plasma cell-specific antibody folding catalyst with increased expression in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Cells*, 2022, 11 (8): 1341. DOI:10.3390/cells11081341.
- [13] Ruer-Laventie J, Simoni L, Schickel JN, et al. Overexpression of Fkbp11, a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2015, 3 (3): 265-279. DOI:10.1002/iid3.65.
- [14] Wang W, Li Q, Huang G, et al. Tandem mass tag-based proteomic analysis of potential biomarkers for hepatocellular carcinoma differentiation [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14 (1): 1007-1020. DOI: 10.2147/OTT.S273823.
- [15] Cardano M, Tribioli C, Prosperi E. Targeting proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an effective strategy to inhibit tumor cell proliferation [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, 20 (4): 240-252. DOI: 10.2174/1568009620666200115162814.
- [16] Niknami Z, Muhammadnejad A, Ebrahimi A, et al. Significance of E-cadherin and Vimentin as epithelial-mesenchymal transition markers in colorectal carcinoma prognosis [J]. *EXCLI*, 2020, 19 (12): 917-926. DOI:10.17179/excli2020-1946.
- [17] Hu W, Zheng X, Liu J, et al. MicroRNA MiR-130a-3p promotes gastric cancer by targeting Glucosaminyl N-acetyl transferase 4 (GCNT4) to regulate the TGF- β_1 /SMAD3 pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 11634-11647. DOI:10.1080/21655979.
- [18] Tian F, Zhang ZY, Sun J, et al. Expression of miR-207 in renal tissue of renal fibrosis rats and its correlation analysis with protein expression of TGF- β_1 and Smad3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25 (2): 787-794. DOI:10.26355/eurrev_202101_24641.
- [19] Song W, He D, Chen Y, et al. Targeting newly identified ER β /TGF- β_1 /SMAD3 signals with the FDA-approved anti-estrogen Faslodex or an ER β selective antagonist in renal cell carcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12 (12): 2055-2071. DOI:10.1002/1878-0261.12377.
- [20] Wang B, Ge Z, Wu Y, et al. MFGE8 is down-regulated in cardiac fibrosis and attenuates endothelial-mesenchymal transition through Smad2/3-Snail signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (21): 12799-12812. DOI:10.1111/jcmm.15871.
- [21] Liu CM. Ampelopsin attenuates carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis and hepatic stellate cell activation associated with the SIRT1/TGF- β_1 /Smad3 and autophagy pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77 (1): 105984-105991. DOI:10.1016/j.intimp.2019.105984.

(收稿日期:2022-05-11)