

MIS18BP1 经 PI3K/AKT 通路调控肾癌细胞上皮-间充质转化、增殖和迁移

赵保凤^{1,2}, 谭雪莹², 梁雪雯^{2,3}, 潘玉垚^{2,3}, 原江水², 宋卫青²

¹青岛大学基础医学院病原生物学系, 山东 青岛 266071; ²青岛市市立医院检验科, 山东 青岛 266011; ³山东省第二医科大学医学检验学院, 山东 潍坊 261053

摘要:目的 探讨 MIS18BP1 通过 PI3K/AKT 信号通路调控肾癌细胞上皮-间充质转化(EMT)、增殖和迁移的作用及分子机制。方法 基于 TCGA 和 GEO 数据库分析 MIS18BP1 在肾透明细胞癌(KIRC)中的表达特征,并通过免疫组化验证在肾癌及癌旁组织中的表达差异,进一步探讨其诊断价值及与临床病理参数、免疫浸润的相关性($P<0.05$);采用加权基因共表达网络分析(WGCNA)筛选 MIS18BP1 相关基因模块并进行功能富集分析;通过慢病毒转染技术敲低肾癌细胞系 786-O 和 ACHN 中 MIS18BP1 的表达,采用 CCK-8、克隆形成、Transwell 与划痕愈合实验检测细胞增殖与迁移能力;Western blotting 检测 EMT 标志蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin)及 PI3K/AKT 通路关键蛋白(PI3K、p-AKT、AKT)的表达变化,进一步采用 740Y-P(PI3K 激活剂)处理进行回复实验。结果 MIS18BP1 在 KIRC 组织中高表达,与正常肾上皮细胞 HK-2 相比,MIS18BP1 在 786-O 和 ACHN 中均升高,其表达水平与肿瘤 TNM 分期、病理分级呈正相关,且对 KIRC 具有良好的诊断效能($AUC=0.693\sim0.885$);WGCNA 与富集分析显示 MIS18BP1 相关基因富集于 PI3K/AKT 信号通路;细胞实验证实,敲低 MIS18BP1 可抑制肾癌细胞的增殖、迁移与克隆形成能力($P<0.05$),同时下调 N-cadherin、Vimentin 表达,上调 E-cadherin 表达,并降低 PI3K 与 AKT 的磷酸化水平($P<0.05$)。740Y-P 处理可部分逆转敲低 MIS18BP1 所致的增殖和迁移抑制效应。结论 MIS18BP1 在肾癌中高表达且与不良临床特征相关,其可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进 EMT 进程,从而增强肾癌细胞的增殖与迁移能力。

关键词: MIS18BP1; 肾透明细胞癌; PI3K/AKT 信号通路; 上皮-间充质转化; 细胞增殖; 细胞迁移

MIS18BP1 regulates epithelial-mesenchymal transition, proliferation, and migration of renal cancer cells via the PI3K/AKT pathway

ZHAO Baofeng^{1,2}, TAN Xueying², LIANG Xuewen^{2,3}, PAN Yuyao^{2,3}, YUAN Jiangshui², SONG Weiqing²

¹Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China; ²Department of Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China; ³College of Medical Laboratory Science, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China

Abstract: Objective To explore the regulatory role of MIS18BP1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT), proliferation, and migration of renal cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** TCGA and GEO databases were used to analyze the expression patterns of MIS18BP1 in kidney renal clear cell carcinoma (KIRC), and its differential expression between tumor and adjacent tissues was validated by immunohistochemistry. The diagnostic value of MIS18BP1 and its correlation with clinicopathological parameters and immune infiltration were evaluated. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was performed to identify MIS18BP1-related gene modules for functional enrichment analysis. In renal cancer cell lines (786-O and ACHN), the effects of lentivirus-mediated MIS18BP1 knockdown on cell proliferation and migration were evaluated using CCK-8, colony formation, Transwell, and wound healing assays. Western blotting was performed to determine the expression levels of EMT-related proteins and PI3K/AKT pathway-related proteins, and rescue experiments were carried out using 740Y-P (a PI3K activator). **Results** MIS18BP1 was significantly overexpressed in KIRC tissues and in 786-O and ACHN cells compared with normal renal epithelial cells (HK-2). MIS18BP1 expression level was positively correlated with TNM stage and pathological grade, and showed good diagnostic performance for KIRC ($AUC=0.693\sim0.885$). WGCNA and enrichment analyses indicated that MIS18BP1-related genes were significantly enriched in the PI3K/AKT signaling pathway. In cultured renal cancer cells, MIS18BP1 knockdown significantly inhibited the proliferation, migration, and colony-forming ability of the cells, resulting also in decreased expression of N-cadherin and vimentin, increased expression of E-cadherin, and significantly lowered phosphorylation levels of PI3K and AKT. Treatment with 740Y-P partially reversed the inhibitory effects of MIS18BP1 knockdown on cell proliferation and migration. **Conclusion** MIS18BP1 is overexpressed in renal cancer and is associated with unfavorable clinical features. High expression of MIS18BP1 enhances proliferation and migration of renal cancer cells possibly by promoting EMT via activating the PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords: MIS18BP1; clear cell renal cell carcinoma; PI3K/AKT signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition; cell proliferation; cell migration

收稿日期:2026-01-20

基金项目:国家自然科学基金(31971191)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31971191).

作者简介:赵保凤,在读硕士研究生,E-mail:zbf12340316@163.com

通信作者:原江水,主任技师,硕士生导师,E-mail:yjs19790104@163.com

宋卫青,主任技师,硕士生导师,E-mail:songweiqing68@163.com

肾细胞癌(RCC)是成人中最常见的肾脏恶性肿瘤^[1]。根据世界卫生组织最新分类,其主要的病理亚型包括透明细胞癌、乳头状肾细胞癌及嫌色细胞癌等^[2]。其中,透明细胞癌占有病例的70%~80%,是肾癌最主要的形式^[3]。肾癌具有高度侵袭性,早期症状隐匿,确诊

时多已进展至中晚期,导致患者预后不良^[4]。局部进展性或转移性肾癌患者的5年生存率降低,整体5年生存率仅约为76%,晚期转移患者的5年生存率低于15%^[1]。

MIS18BP1作为MIS18复合体的关键支架蛋白,其功能主要通过和MIS18 α/β 亚基结合来实现^[5],精确调控CENP-A在着丝粒的特异性沉积^[5]。这一过程对于后续新着丝粒的组装和动粒的正确形成至关重要^[6],从而确保有丝分裂中纺锤体微管附着和姐妹染色单体准确分离,保障遗传信息的稳定传递^[7,8]。因此,MIS18BP1是维持基因组完整性和细胞周期正常进程的核心调控因子^[9]。

研究表明,MIS18BP1的功能失调通过不同分子机制促进多种癌症的进展。在宫颈癌中,KAT7介导的MIS18BP1乙酰化破坏着丝粒组装,诱发染色体不稳定^[10]。在结直肠癌中,核转位的ATG5通过干扰MIS18复合物功能导致DNA修复缺陷^[11]。在膀胱癌中,MIS18BP1通过抑制P53信号通路驱动肿瘤增殖并与不良预后相关^[12]。这些证据共同提示,MIS18BP1是连接基因组稳定性、关键抑癌通路与肿瘤发生发展的一个重要调控节点。

上皮-间充质转化(EMT)是上皮来源恶性肿瘤细胞获得迁移与侵袭能力的关键早期事件^[13]。在这一过程中,E-钙黏蛋白(E-cadherin)作为维持上皮表型的重要蛋白,其表达下降会削弱细胞间黏附,而上皮特性降低则伴随N-cadherin与波形蛋白(Vimentin)等间质标志物的表达上调,从而增强细胞的迁移和侵袭能力^[14]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路在肿瘤细胞增殖、分化及EMT调控中起到重要作用,可通过下调E-cadherin、上调N-cadherin与Vimentin等表达,促进细胞向间质表型转化,进而加速EMT进程^[15,16]。尽管MIS18BP1在多种癌症中的重要作用已得到证实,但目前关于其在肾细胞癌中的具体功能、分子机制及临床意义仍缺乏系统深入的研究,其在调控肾癌细胞恶性表型(如增殖、迁移等)及相关下游信号通路中的作用机制目前尚未见相关研究。

基于此,本研究首次探究MIS18BP1对人肾癌细胞增殖和迁移能力的影响,检测敲低MIS18BP1后EMT相关蛋白的表达变化,研究PI3K/AKT通路在此过程中的调控作用。通过探讨MIS18BP1在肾癌786-O和ACHN细胞增殖与迁移中的功能与机制,以期对肾癌的诊断治疗及预后提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

786-O细胞、ACHN细胞和HK2细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司);1640培养基、MEM培养基(凯基

生物科技有限公司);胎牛血清(Gibco);MIS18BP1敲低慢病毒颗粒及阴性对照慢病毒颗粒(1×10^8 TU/mL,上海吉凯基因科技有限公司);CCK-8(APEX-BIO);Transwell小室(康宁公司); β -actin抗体、GAPDH抗体(北京博奥森生物技术有限公司);MIS18BP1抗体(Thermo Fisher Scientific);Vimentin抗体、AKT抗体、p-AKT(S473)抗体、PI3K抗体(Cell Signaling Technology);N-cadherin抗体、E-cadherin抗体、抗兔免疫组化检测试剂盒、Tris-EDTA抗原修复液(50 $\times$)(武汉三鹰生物技术有限公司);山羊抗兔抗体(Abcam);青霉素-链霉素双抗混合液、通用型抗体稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);ECL发光试剂盒(Millipore);740 Y-P(MedChemExpress)。

1.2 方法

1.2.1 数据来源 通过TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)获取KIRC的mRNA表达数据并提取TPM格式的数据,共纳入613个样本,包括541个KIRC组织样本和72个正常肾组织样本。剔除临床病理参数不详或不完整的病例以及重复的资料病例。从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中选择3个微阵列数据集(GSE36895、GSE35757、GSE64272),纳入KIRC患者癌组织和正常组织mRNA表达谱数据,其中GSE36895包括29例KIRC组织样本和23例正常肾组织样本,GSE35757包括72例KIRC组织样本和72例正常肾组织样本,GSE64272包括26例KIRC组织样本和27例正常肾组织样本。

1.2.2 MIS18BP1在泛癌及其正常组织的表达 使用TIMER 3.0数据库(<https://compbio.cn/timer3/>)^[17]进行在线分析MIS18BP1在泛癌中的表达。在TCGA队列中对目标基因MIS18BP1肿瘤组织和正常组织中的表达水平进行比较。在同一患者个体内,比较肿瘤组织与自身癌旁组织之间的MIS18BP1表达差异。

1.2.3 免疫组化(IHC)染色检测MIS18BP1蛋白的表达 将10例肾透明细胞癌及配对的癌旁正常组织标本制作为4 μ m病理切片,用二甲苯脱蜡,然后依次在100%、95%、80%和60%乙醇中脱水,再用EDTA修复液对切片进行抗原热修复。采用内源性过氧化物酶灭活,将3% H_2O_2 覆盖整个组织上,10%山羊血清进行封闭。使用MIS18BP1抗体(1:200)孵育1 h,再与二抗(1:500)结合约20 min,DAB染色3 min,随后用苏木素复染2~3 min。最后,用PBS进行清洗,并用中性树脂进行封片。得分为正染色强度(0=负,1=弱,2=中等,3=强)乘以染色面积(0=负或1%~10%,1=10%~25%,2=25%~75%,3=75%~100%)。在高倍显微镜下观察并对2项指标分别评分,最后将两者评分相乘计算总分。

1.2.4 临床特征的相关性分析 MIS18BP1表达水平在

不同临床分组间的比较通过 Wilcoxon 秩和检验完成。采用 ggpubr 与 ggplot2 包绘制箱线图。

1.2.5 免疫细胞浸润分析 基于 CIBERSORT 算法分析了 MIS18BP1 的表达水平与 22 种免疫细胞浸润程度之间的相关性。分析结果以相关性棒棒图形式呈现。样本依据 MIS18BP1 表达中位数划分为高表达组与低表达组,并采用 ESTIMATE 算法计算并比较两组间各免疫细胞浸润比例的差异。

1.2.6 WGCNA 构建与模块识别 采用加权基因共表达网络分析(WGCNA)构建基因共表达网络,识别与 MIS18BP1 相关的关键模块。利用 goodSamplesGenes 函数剔除离群样本,剩余样本经 hclust 函数聚类后,采用 cutreeStatic 函数筛选分析样本集。运用 pickSoftThreshold 函数在 1~20 范围内选择软阈值,确保无标度拓扑模型拟合优度(signed R^2) ≥ 0.90 。基于基因间相关性构建邻接矩阵及拓扑重叠矩阵(TOM),通过层次聚类与动态树切割法将基因划分为各模块,以不同颜色标识。计算各模块特征基因(ME)与 MIS18BP1 的相关系数,筛选相关系数绝对值最大的模块作为核心模块。

1.2.7 构建蛋白/基因互作网络 基于 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并参考既往研究中筛选 Hubs 基因的常用方法^[18,19]。具体步骤如下:首先,将 WGCNA 分析所得核心模块的基因列表提交至 STRING 在线平台(<http://string-db.org>),设定互作置信度阈值为 0.4。将互作数据导入 Cytoscape3.10 软件,通过计算网络中各个节点的连接度值与介数中心性(BC),分别对节点连接度和 BC 进行排序,选取前 15 个关键基因并取交集,筛选核心基因。最后进行网络可视化及进行相关性分析。

1.2.8 GO 与 KEGG 富集分析 基于 clusterProfiler 包进行了系统的功能富集分析。采用 enrichGO 函数进行 GO 富集分析,涵盖生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组分(CC)3 个层面;采用 enrichKEGG 函数进行 KEGG 通路富集分析。以 Benjamini-Hochberg 方法进行多重检验校正,校正后 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果使用 enrichplot 包的 dotplot 函数进行可视化,并借助 ggplot2 包绘制气泡图。

1.2.9 细胞培养 786-O 细胞和 ACHN 在 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养,HK-2 在 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素的 MEM 培养基中培养,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.10 细胞转染 取生长状态良好的 786-O 和 ACHN 细胞,使用完全培养基制备单细胞悬液,取适量细胞悬液接种于 6 孔板中,过夜培养后细胞融合度达到 40%。将 786-O 和 ACHN 细胞分别进行分组:阴性对照组

(Vector)、MIS18BP1 敲低组(sh-MIS18BP1)。在 2 mL 感染体系内加入 10 μ L 慢病毒液,充分混匀,感染 18 h 后更换新鲜完全培养基。扩增感染后的 786-O 和 ACHN 细胞,利用最低有效浓度嘌呤霉素筛选出稳定转染细胞株后传代扩增用于后续实验,并用 Western blotting 实验进行敲低效果验证。

1.2.11 CCK-8 检测 将转染成功的 786-O 细胞和 ACHN 细胞铺入 96 孔板(786-O 细胞为 3000/100 μ L 培养基,ACHN 细胞为 10 000/100 μ L 培养基),在 0、24、48、72 h 时,加入 CCK-8(10 μ L/孔)并培养 1 h 后使用酶标仪检测 $A_{450\text{ nm}}$ 。

1.2.12 克隆形成实验 转染成功后将 500 个 786-O 细胞和 1000 个 ACHN 细胞分别接种于 6 孔板内,在 37 °C、5% CO₂ 的环境下进行培养。并于 14 d 后弃掉培养基,使用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,之后用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,然后使用结晶紫染色 30 min,拍照并统计克隆形成数量。

1.2.13 划痕愈合实验 将转染成功的 786-O 和 ACHN 细胞以过夜培养达 80%~90%密度接种于 6 孔板中。过夜培养后用无菌的 100 μ L 移液器尖端刮除伤口,并用 PBS 洗净悬浮细胞,再次加入无血清 1640 培养基 2 mL/孔进行培养。显微镜在 0 h 和 24 h 拍摄图像并计算细胞迁移率。

1.2.14 Transwell 实验 将转染成功的 786-O 和 ACHN 细胞用无血清 1640 培养基重悬,调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。Transwell 小室的下室内加入 600 μ L/孔含 30%胎牛血清的 1640 培养基,上室内加入 100 μ L。在 37 °C、5% CO₂ 的环境下培养 24 h 后,用 PBS 清洗腔室,并用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min 后用 PBS 清洗,再用结晶紫染色 30 min。擦除上室内侧面未成功穿过小室膜的细胞,显微镜下观察并计数上室外侧面迁移细胞数目。

1.2.15 Western blotting 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后,湿转至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶封闭 2 h。随后与以下一抗于 4 °C 孵育 16 h:抗 MIS18BP1 抗体(1:500)、抗 Vimentin 抗体(1:1000)、抗 N-cadherin 抗体(1:8000)、抗 E-cadherin 抗体(1:8000)、抗 AKT 抗体(1:1000)、抗 p-AKT 抗体(1:1000)、抗 PI3K 抗体(1:1000),以及内参抗 β -actin 抗体(1:1000)和抗 GAPDH 抗体(1:1000)。之后与相应二抗(山羊抗兔二抗,1:5000;山羊抗鼠二抗,1:5000)室温孵育 2 h。PBST 洗涤后,采用化学发光仪显影。

1.3 统计学分析

应用 R 语言和 GraphPad Prism 10.3.1 软件进行数据分析和绘图。两组比较采用 t 检验,多组间比较采用方差检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验均

独立重复3次。

2 结果

2.1 MIS18BP1在泛癌及KIRC中的表达特征

MIS18BP1在肾透明细胞癌(KIRC)等多种肿瘤中的表达均上调(图1A)。MIS18BP1在肾癌组织的非配对样本和配对样本表达均高于正常组织(图1B、C)。10例肾透明细胞癌患者组织标本进行免疫组化染色,结果为肾透明细胞癌组织MIS18BP1蛋白阳性率高于癌旁组织(图1D),且其表达水平与临床分期相关。细胞系检测结果表明,与正常肾上皮细胞HK-2相比,MIS18BP1在786-O和ACHN肾癌细胞系中的表达均升高(图1E)。

2.2 MIS18BP1对KIRC的诊断价值

MIS18BP1在TCGA数据集中诊断肾透明细胞癌的ROC曲线下面积(AUC)为0.693(图2A)。进一步利用GEO数据库中的3个独立数据集(GSE36895、GSE53757、GSE66272)进行分析,AUC值分别为0.816、0.879和0.885(图2B~D)。MIS18BP1在TCGA中的诊断灵敏度和特异度分别为60.07%和76.39%;在3个GEO数据集中,灵敏度范围为80.77%~89.66%,特异度范围为65.22%~92.59%,约登指数最高为0.7336(表1)。

2.3 MIS18BP1表达与KIRC临床病理特征及免疫浸润的关系

MIS18BP1的表达水平与肿瘤的T分期(图3A)、N分期(图3B)、M分期(图3C)以及病理分级(图3D)具有相关性($P<0.05$)。MIS18BP1表达与多种免疫细胞相关(图3E)。MIS18BP1在肿瘤浸润免疫细胞差异分析显示,MIS18BP1表达在初始B细胞、记忆B细胞、活化的记忆性CD4⁺T细胞之间的差异有统计学意义($P<0.05$,图3F)。

2.4 WGCNA识别MIS18BP1相关基因模块

GoodSamplesGenes质控分析确认所有样本均合格,所有样本均纳入后续聚类分析(图4A)。通过选择最优软阈值 $\beta=12$,构建了满足无标度分布的网络(图4B)。基于动态树剪切法合并相似模块,最终识别出11个基因模块(图4C)。模块-性状关联分析结果显示,棕色模块与MIS18BP1呈最强的正相关($r=0.66$, $P<0.001$),且该模块共包含618个基因(图4D)。该棕色模块内的基因被用于后续的PPI分析及GO/KEGG功能富集分析。

2.5 MIS18BP1相关基因的筛选及其功能通路富集分析

通过Cytoscape结合度中心性与介数中心性排名前15取交集,最终筛选出10个关键基因(图5A)。相关性分析表明,这些关键基因与MIS18BP1均显著相关(图5B)。进一步的GO和KEGG富集分析显示,GO富集生物学过程包括蛋白质定位调控、造血调控及细胞外

基质(ECM)组织与细胞-基质粘附等;KEGG通路主要富集于HIF-1信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药途径、PI3K/AKT信号通路等(图5C)。

2.6 敲低肾癌细胞中的MIS18BP1基因

Western blotting结果显示,Control组与Vector组间MIS18BP1蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);而在sh-MIS18BP1组中,MIS18BP1蛋白表达较Vector组降低($P<0.05$,图6)。

2.7 MIS18BP1影响肾癌细胞的增殖

敲低MIS18BP1后,786-O和ACHN肾癌细胞的增殖能力随时间呈下降趋势(图7A、B)。细胞的集落形成能力亦受到抑制(图7C、D)。Transwell实验显示,下调MIS18BP1表达24 h后,穿过小室的细胞数量较Vector组减少(图7E、F)。

2.8 MIS18BP1影响肾癌细胞的迁移

敲低MIS18BP1后,786-O和ACHN细胞在划痕后24 h的迁移率较Vector组降低(图8)。

2.9 敲低MIS18BP1基因抑制肾癌细胞EMT的发生

在sh-MIS18BP1组中,间充质标志物Vimentin与N-cadherin表达下调,上皮细胞标志物E-cadherin表达上调(图9)。

2.10 MIS18BP1对PI3K/AKT信号通路的影响

KEGG富集分析结果显示MIS18BP1相关基因富集于PI3K/AKT信号通路。Western blotting结果显示,在MIS18BP1表达下调后,AKT磷酸化水平与PI3K蛋白表达降低(图10)。

2.11 MIS18BP1下调表达抑制肾癌增殖和迁移的作用能被740Y-P部分逆转

在786-O和ACHN细胞中,CCK-8、Transwell及划痕愈合实验结果显示,敲低MIS18BP1可显著抑制细胞增殖和迁移;而加入740Y-P后,上述作用被部分逆转(图11)。

3 讨论

肾透明细胞癌是全球常见的恶性肿瘤,它的发病人数约占全部恶性肿瘤新发病例数的3%,每年约有40.3万的发病人数,死亡病例约7.4万例,其死亡率位于泌尿系统肿瘤的首位^[20,21]。肾癌的治疗主要根据疾病分期和类型采取不同的治疗策略^[22]。对于早期局限性病变,手术切除及局部射频消融治疗是主要干预方式;而对于晚期或转移性患者,则以全身治疗为主,包括放疗、化疗、免疫治疗及靶向治疗等方法^[23]。然而,临床实践中仍面临多重挑战:相当比例患者对一线免疫联合治疗存在原发性耐药或继发性耐药,且耐药后后续治疗选择有限^[24];此外,免疫及靶向治疗相关不良反应常导致治疗中断并严重影响患者生活质量^[25]。因此,深入探索肾癌

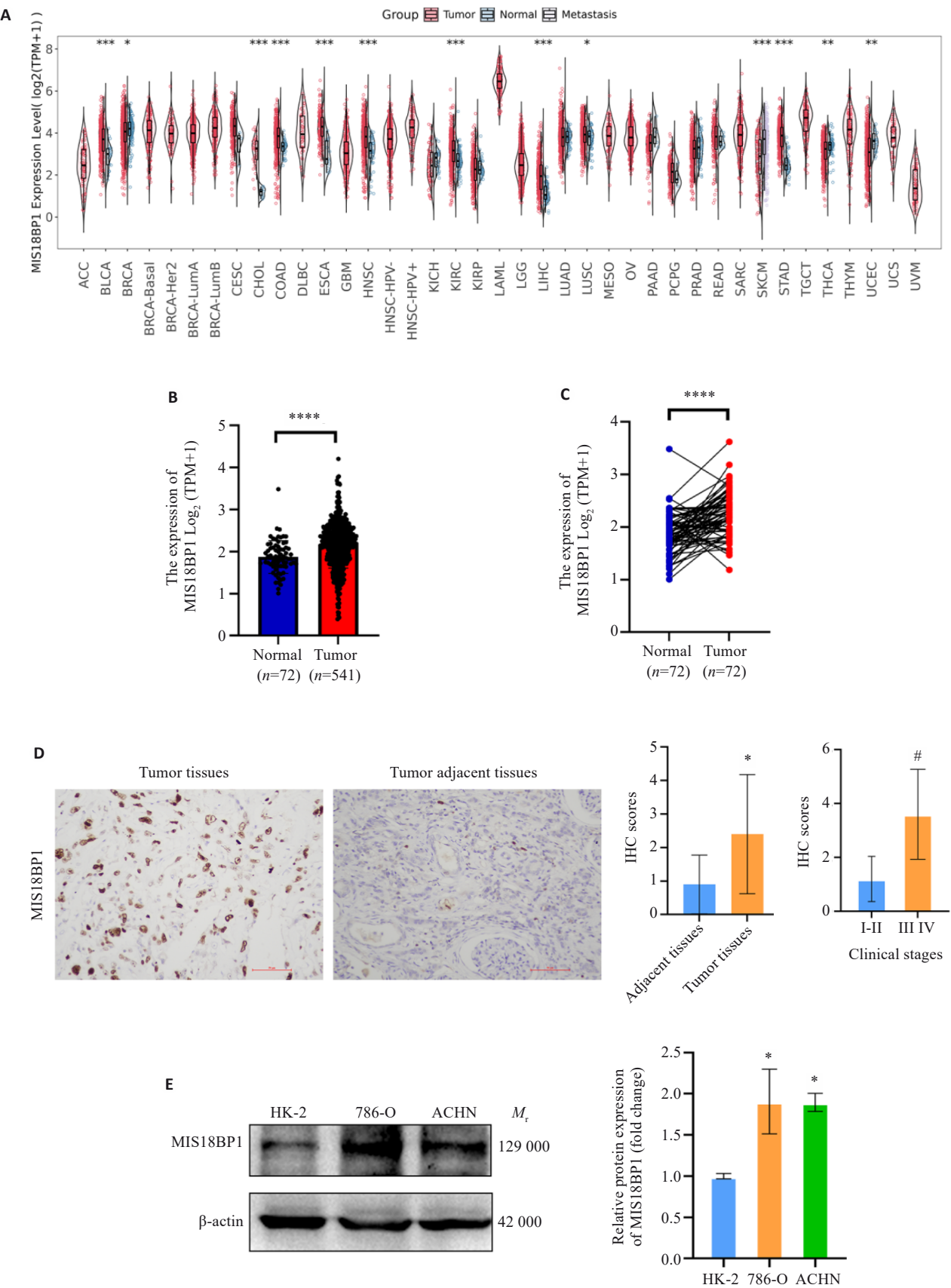


图1 MIS18BP1在泛癌及肾透明细胞癌中的表达特征

Fig.1 Expression patterns of MIS18BP1 in pan-cancer and renal clear cell carcinoma. **A:** Differential expression of MIS18BP1 in pan-cancer. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Normal. **B:** Differential expression of MIS18BP1 in KIRC. **** $P<0.0001$. **C:** Paired difference analysis. **** $P<0.0001$. **D:** Expression of MIS18BP1 protein in renal clear cell carcinoma tissue and adjacent non-cancerous tissue (Original magnification: $\times 200$). * $P<0.05$ vs adjacent tissues, # $P<0.05$ vs clinical stage I-II. **E:** Expression of MIS18BP1 protein in normal renal epithelial cells and renal cancer cell lines. * $P<0.05$ vs HK-2.

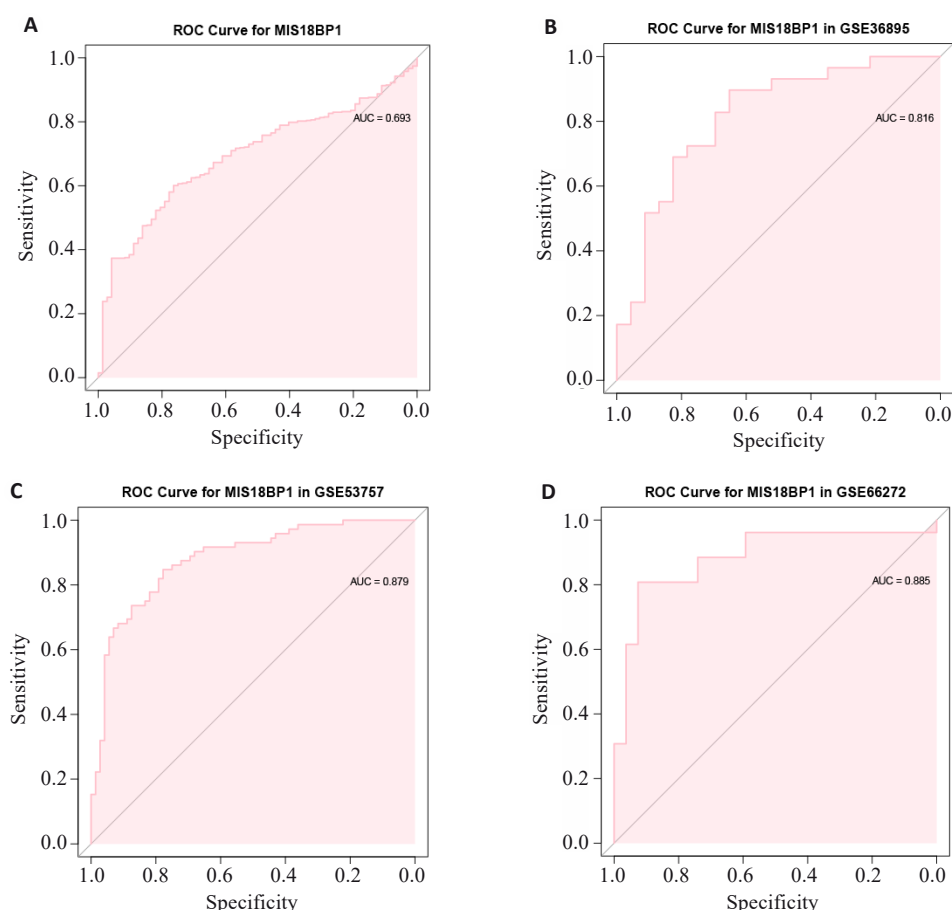


图2 MIS18BP1对KIRC的诊断价值

Fig.2 Diagnostic value of MIS18BP1 for KIRC. A: MIS18BP1 ROC curve for predicting overall survival in TCGA. B: ROC curve of MIS18BP1 for predicting overall survival in GSE36895. C: ROC curve of MIS18BP1 for predicting overall survival in GSE53757. D: ROC curve of MIS18BP1 for predicting overall survival in GSE66272.

表1 MIS18BP1在TCGA和GEO数据集中对KIRC的诊断效能
Tab.1 Diagnostic performance of MIS18BP1 for KIRC in TCGA and GEO datasets

Dataset	AUC	Best cutoff	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Youden index
TCGA	0.693	2.097	60.07	76.39	0.3646
GSE36895	0.816	5.017	89.66	65.22	0.5488
GSE53757	0.879	6.759	84.72	77.78	0.6250
GSE66272	0.885	0.0806	80.77	92.59	0.7336

的分子机制,寻找新的治疗靶点及预测性生物标志物,对实现个体化精准治疗、改善患者预后具有重要意义。

MIS18BP1是调控基因组稳定性的核心因子,通过介导着丝粒中CENP-A的沉积,确保染色体的准确分离,其功能异常与肿瘤的发生发展密切相关^[26-28]。MIS18BP1在宫颈癌、膀胱癌等多种实体瘤中已被证实通过破坏基因组稳态、抑制p53通路等方式发挥促癌作用。然而,在肾癌中的表达特征、临床意义及其具体作用机制尚缺乏系统研究。目前尚未见关于MIS18BP1在肾细胞癌中对细胞增殖、迁移及EMT过程影响的报

道。因此,探讨MIS18BP1在肾癌中的功能及其潜在机制,具有重要的理论价值和创新意义。

本研究首次证实MIS18BP1在KIRC肿瘤组织中呈现高表达,且在多个独立队列中展现出稳定的诊断能力。其高表达与肿瘤TNM分期、病理分级的显著正相关性进一步表明,MIS18BP1的表达水平可能随着肿瘤恶性程度的升高而增加,或直接参与了肿瘤的进展过程。值得注意的是,免疫浸润分析显示MIS18BP1高表达与B细胞及活化CD4⁺T细胞亚群的改变相关,这暗示MIS18BP1可能通过影响肿瘤免疫微环境间接促进肿瘤发展。

实验证实敲低MIS18BP1能显著抑制肾癌细胞的增殖、迁移能力。这可能与其在维持基因组稳定性中的功能相关^[25]。本研究首次在肾癌中揭示了MIS18BP1与EMT进程的关联。敲低MIS18BP1导致上皮标志物E-cadherin表达上调,间质标志物N-cadherin和Vimentin表达下调,表明MIS18BP1可能是KIRC中EMT的调控因子。EMT是肿瘤细胞获得迁移侵袭能力的关键步骤,其与肿瘤的转移和不良预后密切相关^[13]。

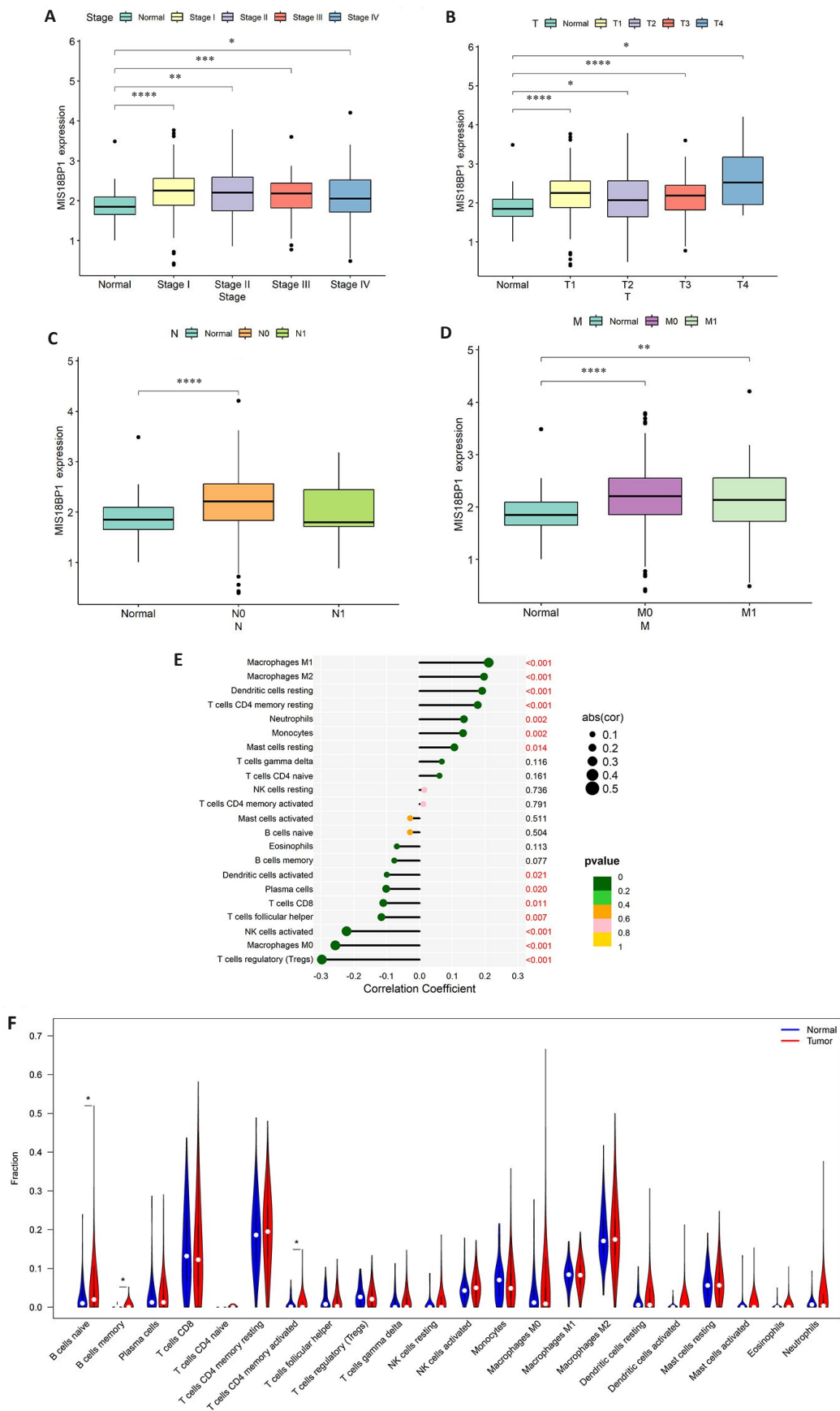


图3 MIS18BP1 表达与KIRC临床病理特征及免疫浸润的关系

Fig.3 Correlation of MIS18BP1 expression level with clinical pathological features and immune infiltration in KIRC. **A:** Relationship between MIS18BP1 expression and T stage. **B:** Relationship between MIS18BP1 expression and N stage. **C:** Relationship between MIS18BP1 expression and M stage. **D:** Relationship between MIS18BP1 expression and grade. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. **E:** Relationship between MIS18BP1 expression and immune cells. **F:** Differential expression of MIS18BP1 in immune cells. * $P<0.05$.

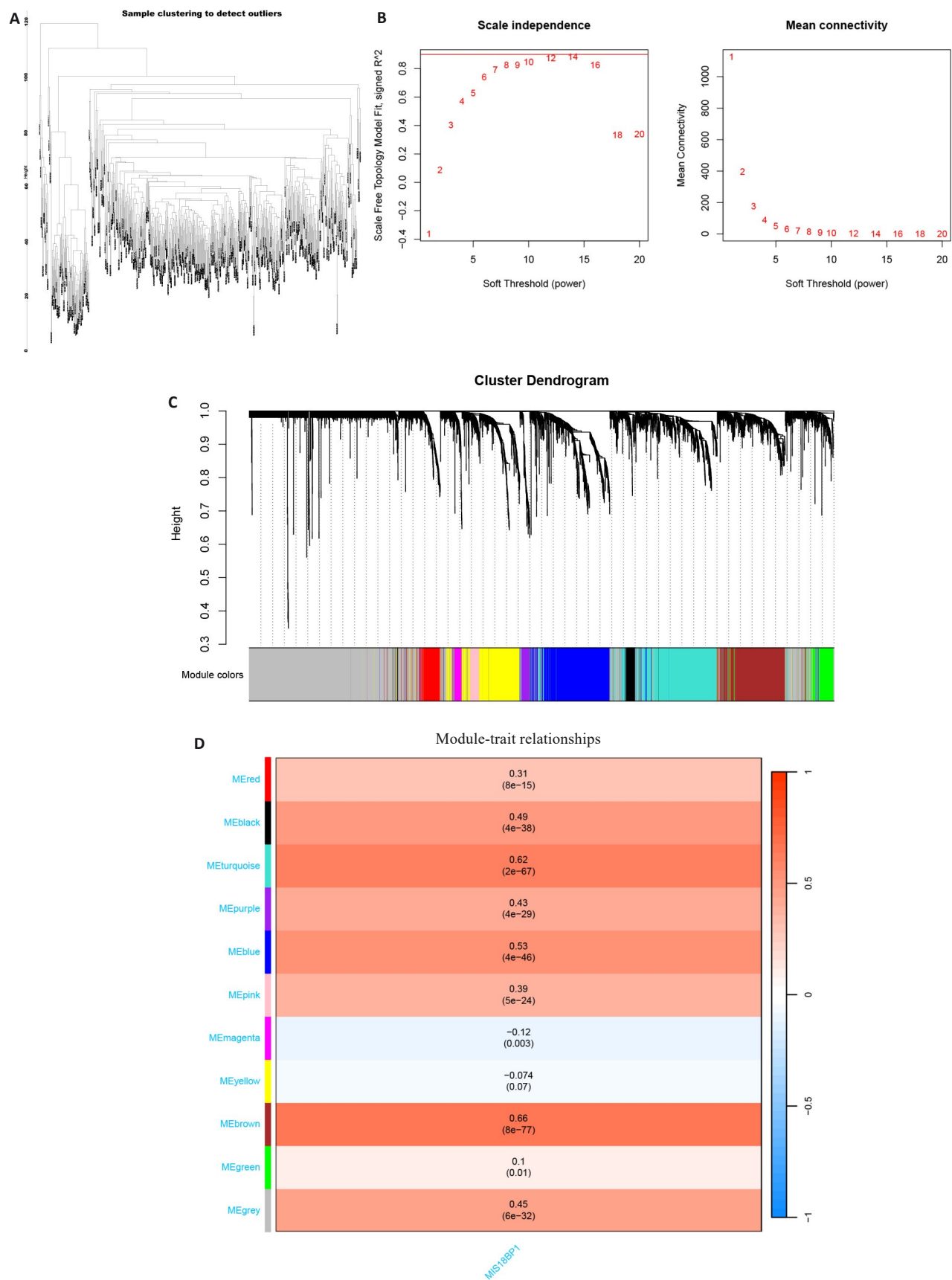


图4 WGCNA识别MIS18BP1相关基因模块

Fig. 4 Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) for identifying MIS18BP1-related gene modules. **A**: Sample clustering dendrogram. **B**: Determination of the optimal soft threshold (left: scale independence assessment; right: average connectivity analysis), with the red reference line indicating $R^2 = 0.9$. **C**: Gene clustering dendrogram (branches represent individual genes, and the colored blocks at the bottom indicate co-expression modules). **D**: Module-trait association heatmap (colored blocks represent co-expression modules, red and blue indicate positive and negative correlations with correlation coefficients and P -value annotations).

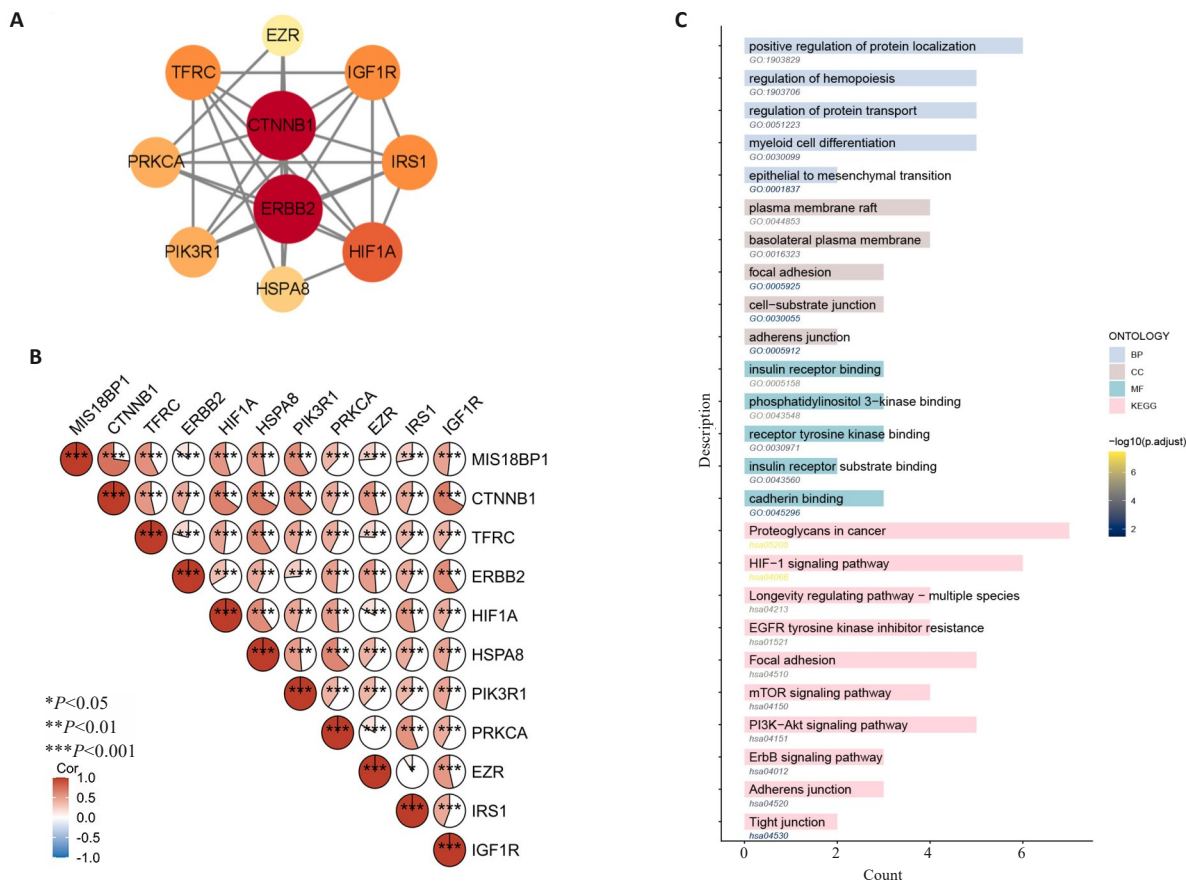


图5 MIS18BP1 相关基因的筛选及其功能通路富集分析
Fig.5 Screening of MIS18BP1-related genes and their GO/KEGG analysis. **A**: Screening key genes related to MIS18BP1 based on the PPI network. Node size is proportional to degree centrality, and node color intensity is proportional to betweenness centrality (dark red indicates high betweenness). **B**: Correlation analysis between key genes and MIS18BP1 expression. * $P<0.05$, *** $P<0.001$. **C**: GO and KEGG enrichment analysis of key genes.

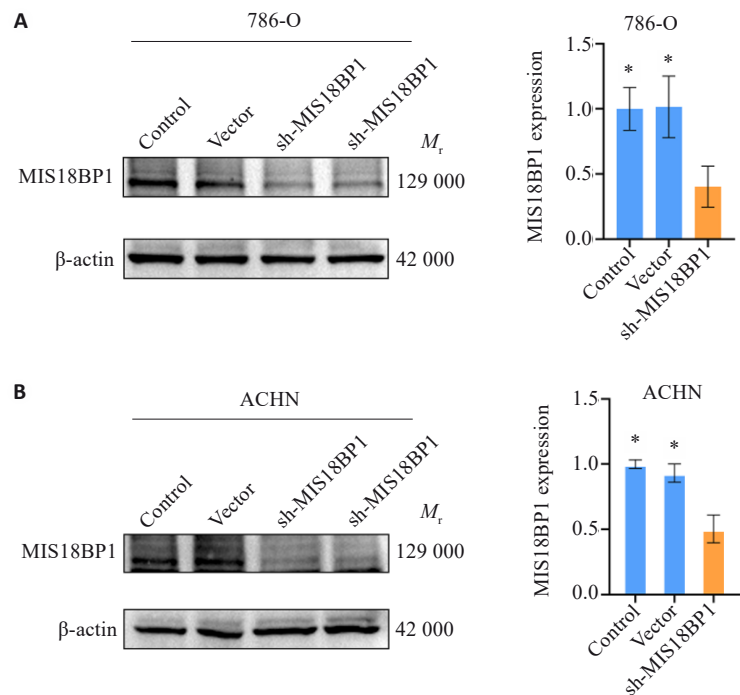


图6 敲低肾癌细胞中的 MIS18BP1
Fig.6 Knockdown of MIS18BP1 in renal cancer cells. **A**: Western blotting for detection of MIS18BP1 protein expression in 786-O cell line. **B**: Western blotting for detection of MIS18BP1 protein expression in ACHN cell line. * $P<0.05$ vs sh-MIS18BP1.

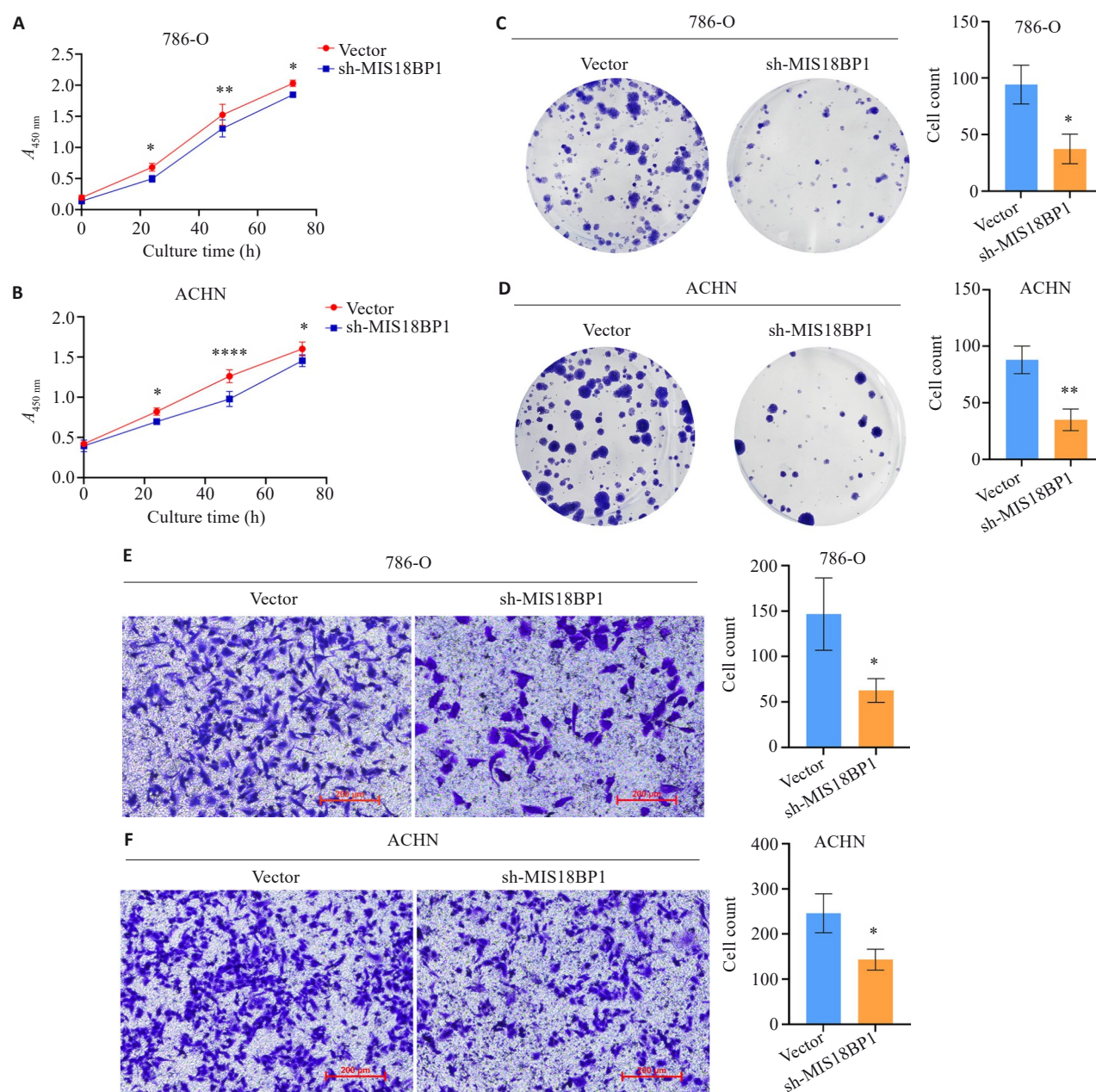


图7 敲低MIS18BP1蛋白抑制肾癌细胞的增殖能力

Fig.7 Knocking down MIS18BP1 inhibits proliferation of renal cancer cells. **A, C, E:** Knockdown of MIS18BP1 significantly inhibits proliferation of 786-O cells (Scale bar=200 μm). **B, D, F:** Knockdown of MIS18BP1 significantly inhibits proliferation of ACHN cells (Scale bar=200 μm). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ vs Vector.

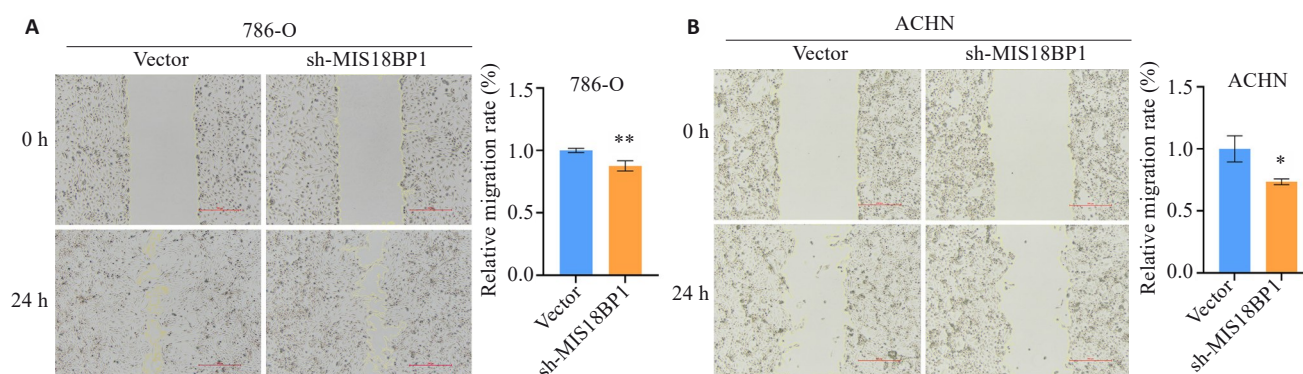


图8 敲低MIS18BP1蛋白抑制肾癌细胞的迁移能力

Fig.8 Knocking down MIS18BP1 inhibits migration ability of renal cancer cells. **A:** Knocking down MIS18BP1 in inhibits migration ability of 786-O cells (Scale bar=500 μm). **B:** Knocking down MIS18BP1 inhibits migration ability of ACHN cells (Scale bar=500 μm). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Vector.

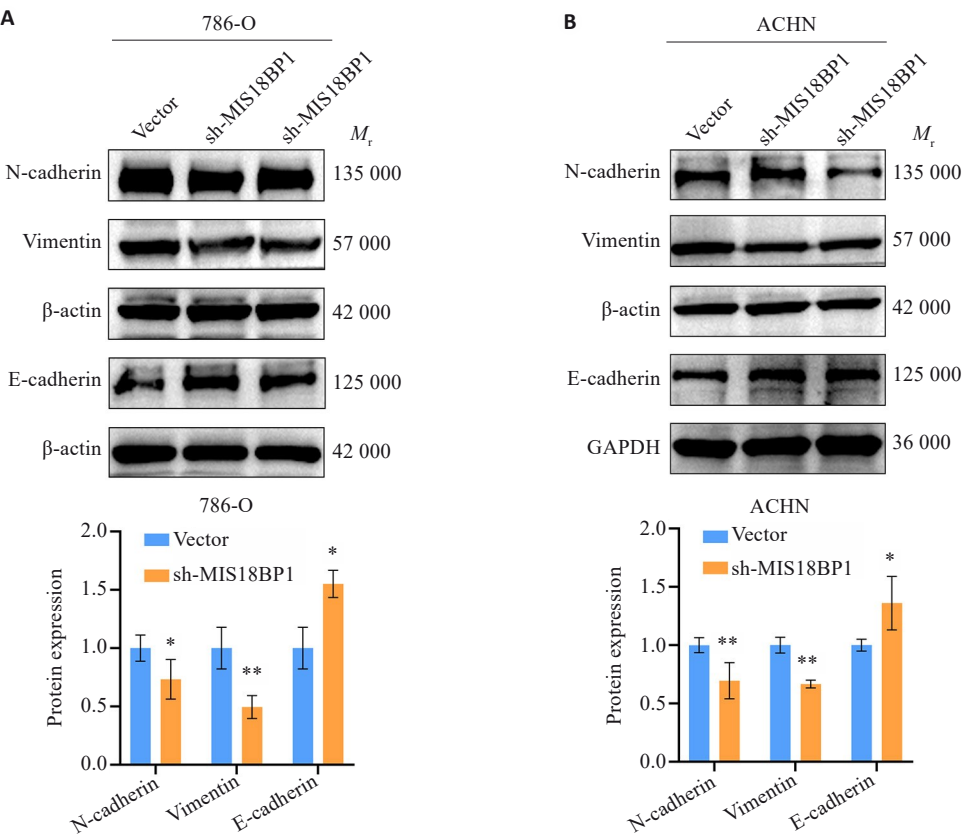


图9 MIS18BP1对肾癌细胞EMT相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of MIS18BP1 on expression of EMT-related proteins in renal cancer cells. **A:** MIS18BP1 regulates the expression of EMT-related proteins in 786-O cells. **B:** MIS18BP1 regulates the expression of EMT-related proteins in ACHN cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Vector.

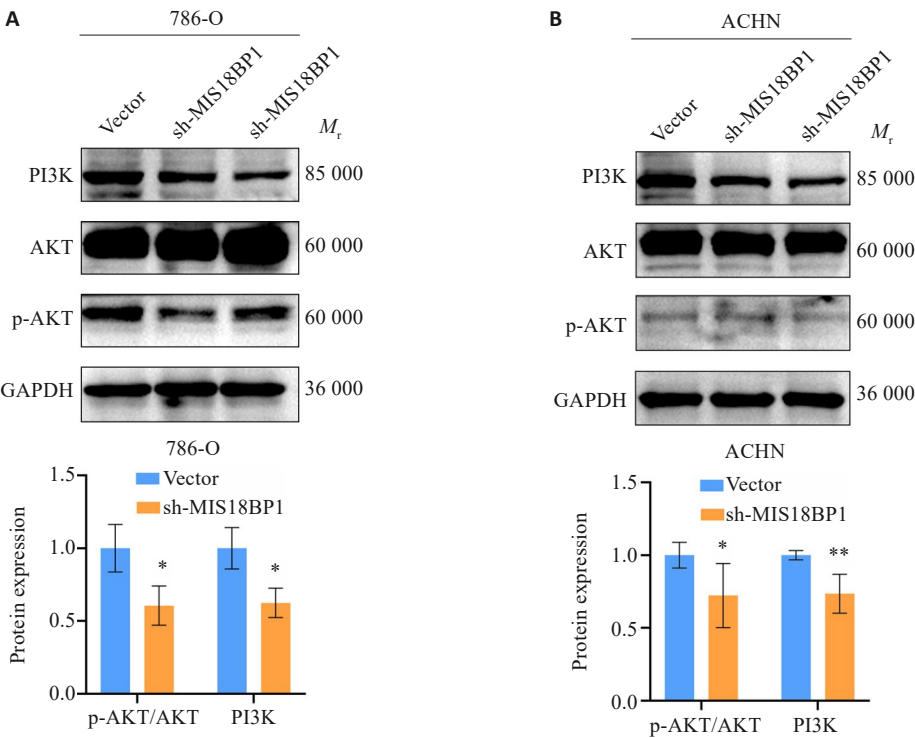


图10 MIS18BP1下调对PI3K/AKT信号通路的影响

Fig.10 Effect of MIS18BP1 knockdown on the PI3K/AKT signaling pathway. **A:** MIS18BP1 regulates the expression of key proteins in the PI3K/AKT signaling pathway in 786-O cells. **B:** MIS18BP1 regulates the expression of key proteins in the PI3K/AKT signaling pathway in ACHN cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Vector.

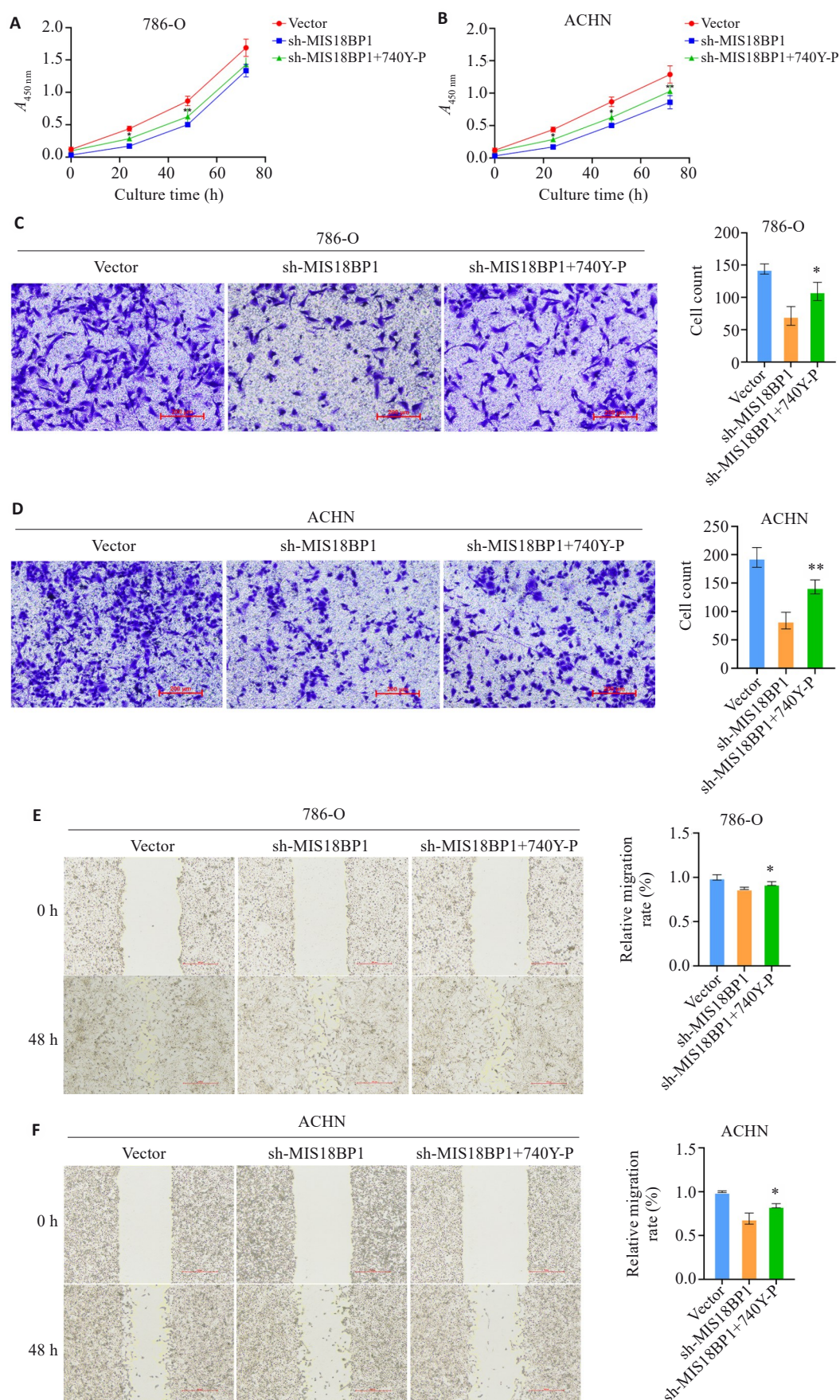


图 11 敲低MIS18BP1抑制786-O和ACHN细胞增殖及迁移,该作用可被740Y-P部分逆转

Fig. 11 Knockdown of MIS18BP1 inhibits proliferation and migration of 786-O and ACHN cells, which is partially reversed by 740Y-P. A, B: CCK-8 assay for assessing proliferation activity of 786-O (A) and ACHN (B) cells. C, D: Wound healing assay for assessing migration ability of 786-O (C) and ACHN (D) cells (Scale bar=200 μm). E, F: Transwell assay for detecting 786-O (E) and ACHN (F) cells passing through the membrane (Scale bar=500 μm). * P <0.05, ** P <0.01 vs sh-MIS18BP1 (C-F).

进一步探索将 MIS18BP1 与 PI3K/AKT 信号通路的关联,KEGG 富集分析提示 MIS18BP1 相关基因显著富集于 PI3K/AKT 通路,而 Western blotting 实验证实敲低 MIS18BP1 能有效抑制 AKT 的磷酸化水平与 PI3K 的表达。PI3K/AKT 通路是调控细胞生存、增殖和 EMT 的核心信号轴之一^[15]。本研究表明,MIS18BP1 可能是通过激活 PI3K/AKT 通路,进而下调 E-cadherin、上调间质蛋白表达,从而驱动 EMT 并增强肾癌细胞的增殖迁移能力。且该作用可被 PI3K 激活剂 740Y-P 部分逆转。这一发现丰富了 MIS18BP1 在肾细胞癌中对促癌机制的理解。

关于 MIS18BP1 调控 PI3K/AKT 信号通路的上游分子机制,目前尚不完全明确,但结合现有文献可提出以下可能性:首先,MIS18BP1 作为着丝粒组装的关键调控因子,其功能异常可导致染色体不稳定(CIN)^[10],而 CIN 已被证实可通过激活多种信号通路(包括 PI3K/AKT)促进肿瘤进展。其次,MIS18BP1 可能通过调控某些分泌性蛋白(如 EDIL3、TGFB1 等)的表达间接激活 PI3K/AKT 通路。

近年来多项研究证实,多种调控因子可通过激活 PI3K/AKT 通路促进肾癌进展:EDIL3 作为分泌性细胞外基质蛋白,可通过激活 PI3K/AKT 通路诱导 EMT 并促进透明细胞癌进展^[29]。COL1A1 通过调控 PI3K/Akt 通路驱动 KIRC 进展和 EMT^[30]。PLCB2 作为磷脂酶 C 家族成员,通过 PI3K/AKT 信号通路调控 RCC 的 EMT 过程^[31]。TGFB1 通过 PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α 通路促进 RCC 增殖和 EMT^[32]。这些研究提示,MIS18BP1 可能类似于上述分子,通过直接或间接机制激活 PI3K/AKT 通路影响肾癌细胞的增殖、迁移和 EMT。

关于 PI3K/AKT 通路调控 EMT 的分子机制,已有较为深入的认识。PI3K 作为该通路的核心枢纽,响应上游信号后激活 AKT,进而通过多种下游效应分子参与 EMT 进程的调控。第一,AKT 可通过抑制 GSK3 β 的激酶活性,减少 Snail 蛋白的磷酸化降解,增强其稳定性并促进其入核,进而抑制 E-cadherin 的转录^[33]。此外,AKT2 亚型能够与 Snail1 直接结合于 E-cadherin 基因启动子区,从而直接抑制其转录^[34]。第二,AKT 介导的 GSK3 β 失活可同时稳定 β -catenin,促进其核转位并激活下游转录,进一步推动 EMT 进程^[35]。第三,AKT 可通过 mTOR/S6K1 信号轴促进蛋白质合成,上调间质标志物 Vimentin、N-cadherin 及基质金属蛋白酶(MMPs)的表达^[36]。第四,AKT 可激活 NF- κ B 通路,进而诱导 EMT 相关转录因子 ZEB1、Twist 的表达^[37]。本研究观察到敲低 MIS18BP1 后 E-cadherin 表达上调、N-cadherin 与 Vimentin 表达下调,这一变化特征与 PI3K/AKT 通路调控 EMT 的经典模式相一致。

本研究也存在局限性:MIS18BP1 调控 PI3K/AKT 通路的具体分子机制尚不明确,其是否通过影响上游受体或与通路关键分子直接互动有待进一步验证;本研究结论主要基于细胞模型,需要在动物体内实验和更大规模的临床样本中加以证实。

综上所述,本研究系统阐明了 MIS18BP1 在 KIRC 中作为癌基因的功能,并初步揭示了其通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进 EMT 及肿瘤恶性表型的新机制。这些发现不仅为理解 KIRC 的发生发展提供了新的理论依据,也提示 MIS18BP1 可能成为 KIRC 诊断和靶向治疗的一个潜在新靶点。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] Moch H, Amin MB, Berney DM, et al. The 2022 World Health Organization classification of tumours of the urinary system and male genital organs: part A: renal, penile, and testicular tumours[J]. Eur Urol, 2022, 82(5): 458-68.
- [3] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17009.
- [4] Ljungberg B, Albiges L, Bedke J, et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2023 Update[J]. Eur Urol, 2023, 119-53.
- [5] Thamkachy R, Medina-Pritchard B, Park SH, et al. Structural basis for Mis18 complex assembly and its implications for centromere maintenance[J]. EMBO Rep, 2024, 25(8): 3348-72.
- [6] Fujita Y, Hayashi T, Kiyomitsu T, et al. Priming of centromere for CENP-a recruitment by human hMis18 α , hMis18 β , and M18BP1[J]. Dev Cell, 2007, 12(1): 17-30.
- [7] McKinley KL, Cheeseman IM. The molecular basis for centromere identity and function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(1): 16-29.
- [8] Kixmoeller K, Allu PK, Black BE. The centromere comes into focus: from CENP-a nucleosomes to kinetochore connections with the spindle[J]. Open Biol, 2020, 10(6): 200051.
- [9] Stellfox ME, Nardi IK, Knippler CM, et al. Differential binding partners of the Mis18 α / β YIPPEE domains regulate Mis18 complex recruitment to centromeres[J]. Cell Rep, 2016, 15(10): 2127-35.
- [10] Ohzeki JI, Shono N, Otake K, et al. KAT7/HBO1/MYST2 regulates CENP-a chromatin assembly by antagonizing Suv39h1-mediated centromere inactivation[J]. Dev Cell, 2016, 37(5): 413-27.
- [11] Sun SY, Hu XT, Yu XF, et al. Nuclear translocation of ATG5 induces DNA mismatch repair deficiency (MMR-D)/microsatellite instability (MSI) via interacting with Mis18 α in colorectal cancer[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(11): 2351-69.
- [12] Cao WJ, Tan XY, Li XZ, et al. MIS₁₈BP₁ promotes bladder cancer cell proliferation and growth via inactivating P53 signaling pathway[J]. Med Oncol, 2025, 42(5): 156.
- [13] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-96.

- [14] Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-90.
- [15] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a011189.
- [16] Larue L, Bellacosa A. Epithelial - mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7443-54.
- [17] Li TW, Fan JY, Wang BB, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-10.
- [18] Ahmed MM, Tazyeen S, Ali R, et al. Network centrality approaches used to uncover and classify most influential nodes with their related miRNAs in cardiovascular diseases[J]. *Gene Rep*, 2022, 27: 101555.
- [19] Muetze T, Goenawan IH, Wiencko HL, et al. Contextual Hub Analysis Tool (CHAT): a Cytoscape app for identifying contextually relevant hubs in biological networks[J]. *F1000Research*, 2016, 5: 1745.
- [20] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-63.
- [21] 张永贞, 杨国庆, 张思维, 等. 中国2009年肾及泌尿系统其他癌发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(5): 333-7.
- [22] Chen YW, Wang LK, Panian J, et al. Treatment landscape of renal cell carcinoma[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, 24(12): 1889-916.
- [23] Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(12): 1116-27.
- [24] Pal SK, Albiges L, Tomczak P, et al. Atezolizumab plus cabozantinib versus cabozantinib monotherapy for patients with renal cell carcinoma after progression with previous immune checkpoint inhibitor treatment (CONTACT-03): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2023, 402(10397): 185-95.
- [25] McKay RR, McGregor BA, Xie WL, et al. Optimized management of nivolumab and ipilimumab in advanced renal cell carcinoma: a response-based phase II study (OMNIVORE) [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(36): 4240-8.
- [26] Moree B, Meyer CB, Fuller CJ, et al. CENP-C recruits M18BP1 to centromeres to promote CENP-a chromatin assembly[J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(6): 855-71.
- [27] Stellfox ME, Bailey AO, Foltz DR. Putting CENP-a in its place[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(3): 387-406.
- [28] Musacchio A, Desai A. A molecular view of kinetochore assembly and function[J]. *Biology*, 2017, 6(1): 5.
- [29] Tao LS, Xie W, Du Y, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by EDIL3 induces EMT and promotes tumor progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Mol Genet Genom*, 2026, 301(1): 47.
- [30] Zhao HN, Wang EM. COL1A1 drives tumor progression in kidney renal clear cell carcinoma by regulating EMT through the PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 25(1): 314.
- [31] Wang SJ, Xie DQ, Yue HZ, et al. Phospholipase C beta 2 as a key regulator of tumor progression and epithelial-mesenchymal transition via PI3K/AKT signaling in renal cell carcinoma[J]. *Biomedicines*, 2025, 13(2): 304.
- [32] Zhan SZ, Bai XJ, Zhao YQ, et al. TGFBI promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma through PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 265.
- [33] Zhou BP, Deng J, Xia WY, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial - mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 931-40.
- [34] Villagrasa P, Díaz VM, Viñas-Castells R, et al. Akt2 interacts with Snail1 in the E-cadherin promoter[J]. *Oncogene*, 2012, 31(36): 4022-33.
- [35] Yan D, Avtanski D, Saxena NK, et al. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(11): 8598-612.
- [36] Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway[J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(3): 437-51.
- [37] Yin SS, Liu L, Brobbey C, et al. PRMT5-mediated arginine methylation activates AKT kinase to govern tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 3444.

(编辑:郎 朗)