基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003626

RGS17通过激活cAMP信号通路促进肾透明细胞癌进展

叶燕乐，黄　琦，周　金，蔡经爽，黄志扬
（泉州市第一医院泌尿外科，泉州　352000）

【摘　要】目的：探讨G蛋白信号蛋白家族的调节因子17（regulator of G protein signaling 17，RGS17）在肾透明细胞癌患者中的临床意义和功能机制。**方法：**获得癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库中肾透明细胞癌（kidney renal clear cell carcinoma，KIRC）的RNAseq数据和相应的临床信息。利用R软件研究RGS17在KIRC中的表达差异及其与临床特征的关系。使用免疫组化及PCR进行验证。采用Kaplan-Meier（K-M）分析、受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线、单因素COX分析、多因素COX分析来评估患者的生存和预后，并构建nomogram模型。使用STRING进行RGS17相关基因的PPI网络构建，并进行GO及KEGG富集分析。并采用RT-qPCR、Western blot、CCK-8、Transwell和划痕实验等方法检测RGS17对ACHN细胞增殖迁移及cAMP信号通路的影响。**结果：**RGS17在KIRC中高表达，且RGS17的高表达与更高的T分期、临床分期、肿瘤转移显著相关。K-M生存分析显示，RGS17上调与KIRC患者总生存期、无疾病进展生存期下降密切相关。ROC曲线表明RGS17能较好的区分正常和KIRC患者，并在预测KIRC患者的预后方面具有一定的准确性。RGS17是KIRC独立预后因素。使用RGS17表达、临床分期、病理分级构建nomogram预后模型能较好预测1、3、5年生存率。RGS17敲低显著抑制ACHN细胞的增殖、迁移和侵袭能力。另外，RGS17敲低能够抑制cAMP信号通路的激活。**结论：**RGS17在肾透明细胞癌中具有促癌基因的作用，其可能通过激活cAMP信号通路促进肾透明细胞癌的进展。

【关键词】肾透明细胞癌；G蛋白信号蛋白家族的调节因子17；细胞增殖；细胞迁移和侵袭；PKA/CREB信号通路
【中图分类号】R737.11　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-06-22

RGS17 promotes the progression of kidney renal clear cell carcinoma via activating the cAMP signaling pathway

Ye Yanle，Huang Qi，Zhou Jin，Cai Jingshuang，Huang Zhiyang
（*Department of Urology，Quanzhou First Hospital*）

【Abstract】*Objective*： To investigate the clinical significance and functional mechanism of regulator of G protein signaling 17 (RGS17) in patients with kidney renal clear cell carcinoma (KIRC). ***Methods*：** RNAseq data and related clinical information on KIRC were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The differential expression of RGS17 in KIRC and its relationship with clinical characteristics were studied using R software. and the results were validated using immunohistochemistry and polymerase chain reaction (PCR). Patient survival and outcome were analyzed by using the Kaplan-Meier (K-M) method, receiver operating characteristic (ROC) curve, and univariable and multivariable Cox analyses, and a nomogram model was constructed. We constructed the protein-protein interaction (PPI) network of RGS17-related genes using the STRING database, and performed Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses. The effects of RGS17 on the proliferation and migration of ACHN cells and the cAMP signaling pathway were determined by real-time quantitative PCR, Western blot, Cell Counting Kit-8, transwell assay, and wound healing assay. ***Results*：** RGS17 was highly expressed in KIRC, and its high expression was significantly associated with a higher T stage, a higher clinical stage, and tumor metastasis. The K-M survival analysis showed that RGS17 upregulation was closely related to decreased overall survival and progression-free survival in patients with KIRC. The ROC curve analysis indicated that RGS17 could well distinguish between normal people and

作者介绍：叶燕乐，Email：yanleye@163.com，研究方向：泌尿系肿瘤。
通信作者：黄志扬，Email：hzy8902@126.com。
基金项目：2021年医疗卫生领域指导性科技计划资助项目（编号：泉科〔2021〕150号）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20241114.1825.032（2024-11-18）

patients with KIRC, showing certain accuracy in predicting the outcome of patients with KIRC. RGS17 was identified as an independent prognostic factor for KIRC. The nomogram model constructed using RGS17 expression, clinical stage, and pathological grade could well predict the 1-, 3-, and 5-year survival rates. Knocking RGS17 down significantly suppressed the proliferation, migration, and invasion abilities of ACHN cells as well as the activation of the cAMP signaling pathway. ***Conclusion***: RGS17 acts as an oncogene in KIRC, which may promote the progression of KIRC by activating the cAMP signaling pathway.

【Key words】clear cell renal cell carcinoma; regulator of G protein signaling 17; cell proliferation; cell migration; invasion; PKA/CREB signaling pathway

肾癌是第三大泌尿系统恶性肿瘤，肾透明细胞癌（kidney renal clear cell carcinoma，KIRC）是最常见的亚型，占所有肾癌患者的70%[1]。肾癌早期症状不明显，且缺乏有效的筛查指标，当出现血尿、腰痛、腹部肿块（三联症）时已属晚期[2]。研究发现有远处转移的晚期KIRC的5年生存率低于10%[3]。因此，寻找早期诊断指标和新的治疗靶点具有重要的临床意义。

G蛋白信号蛋白家族的调节因子(regulators of G-protein signaling，RGS)可以加速G蛋白α亚基的GTP酶活性，提高GTP到GDP的转化率[4]。而GTP转化为GDP有利于肿瘤增殖、迁移、侵袭及血管生成[5]。根据RGS结构域和蛋白结构的同源性将其分为8个亚家族(RZ/A、R4/B、R7/C、R12/D、RA/E、RGEF/F、RGRK/G和RSNX/H)[6]。RGS17是最近发现的RZ/A亚家族成员，被报道与肺癌[7]、前列腺癌[8]、肝癌[9]等多种肿瘤发生发展相关[10]。James MA等[11]研究发现RGS17在人肺癌及前列腺癌中高表达，并通过cAMP/PKA/CREB促进肿瘤细胞增殖。Zhang W等[9]研究也证实miR-199通过靶向RGS17抑制肝细胞癌中的细胞增殖、迁移和侵袭。以上研究表明RGS17有成为肿瘤预后和治疗相关生物标志物的潜力，但RGS17在肾癌中的作用机制尚不十分明确。

本研究初步探讨了RGS17的表达与KIRC的临床病理特征和预后的关系。并进一步敲低RGS17，明确RGS17对肾癌细胞系ACHN细胞增殖迁移的影响。初步探究了RGS17对cAMP信号通路的调节作用，本研究发现，RGS17有潜力成为肾癌预后相关生物标志物。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

人肾细胞腺癌细胞ACHN细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司）；胎牛血清、DMEM完全培养基、胰酶细胞消化液（0.25%胰酶，含EDTA，不含酚红）、青霉素-链霉素溶液（100×）、CCK-8试剂（大连美仑生物技术有限公司）；GAPDH、RGS17、PKA、p-PKA、CREB、p-CREB蛋白、蛋白提取试剂盒（ImmunoWay公司）；蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液、快速封闭液、快速转膜液（苏州新赛美生物科技有限公司）；BCA蛋白定量试剂盒（江苏凯基生物有限公司）；SDS—PAGE蛋白上样缓冲液（5×）（中国碧云天公司）；FuturePAGETM蛋白预制胶（艾思易生物科技有限公司）；ECL发光液（Advansta公司）；细胞、组织RNA柱式提取试剂盒、HiScript® Ⅲ All-in-one RT SuperMix、Perfect for qPCRTaq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；通用型组织固定液（赛维尔生物科技有限公司）；凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司），荧光倒置显微镜（德国蔡司公司），T100 THERMAL CYCLER PCR仪（美国Bio-Rad公司）。

1.2 方法

1.2.1 不同临床分组样本RGS17表达量差异分析 使用Timer数据库进行泛癌表达分析。从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库中获得KIRC的RNAseq数据和相应的临床信息。利用R软件研究RGS17在KIRC中的表达差异及其与临床特征的关系，绘制箱线图，计算RGS17的差异表达。本研究所用数据均为标准化后TPM数据，其数据分布接近正态分布。

1.2.2 生存预后分析 采用Kaplan-Meier（K-M）生存分析，分析KIRC患者RGS17生存天数、无疾病生存时间与表达之间的关系。根据RGS17 mRNA表达水平中值分为低表达组和高表达组。Log-rank用于检验K-M生存分析、比较上述两组的生存差异，进行了诊断ROC、timeROC分析以比较

RGS17基因的诊断与预后预测准确性。采用单因素和多因素logistic回归分析确定KIRC的独立预后因素。

1.2.3 RGS17的相关基因分析及GO、KEGG分析 使用STRING网站评估蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）的生物学工具，获取50个RGS17相关基因，并构建PPI网络。并对相关基因集进行GO和KEGG富集分析。

1.2.4 免疫组化 石蜡切片烘箱60 ℃烤1 h后置于二甲苯Ⅰ 10 min、二甲苯Ⅱ 10 min、无水乙醇5 min、95%乙醇5 min、85%乙醇5 min、70%乙醇5 min、蒸馏水5 min脱蜡水化，自来水冲洗1 min。按照免疫组化试剂盒说明书进行免疫组化染色后，加入DAB显色液5~10 min复染，再进行分化反蓝透明处理再经苏木素返蓝液返蓝2~5 s，最后添加中性树胶进行封片。

1.2.5 细胞获得与培养 细胞完全培养基为：DMEM+10%胎牛血清+1%青/链霉素双抗，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。倒置显微镜观察细胞生长密度到70%~80%时，用0.25%胰酶消化传代进行后续实验。

1.2.6 RT-qPCR实验 使用Lipo8000™试剂转染shRNA NC（阴性对照）及shRNA RGS17质粒48 h后，使用试剂盒提取细胞RNA，并逆转录为cDNA，qPCR反应条件为：95 ℃预变性30 s，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，溶解曲线反应，循环数为40个。最后，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析计算RGS17的表达。所用引物如下，见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

引物名称	序列（5′-3′）
GAPDH（正向）	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH（反向）	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
RGS17（正向）	ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC
RGS17（反向）	TGTGTCCGAAGGACTAGGGA

1.2.7 Western blot实验 提取总蛋白，蛋白定量使用BCA法，加上样缓冲液后100 ℃变性5 min。电泳后恒流电转于PVDF膜上，封闭10 min，TBST浸洗3遍后一抗4 ℃过夜孵育。TBST再次浸洗3次，二抗孵育1 h，TBST浸洗3次后曝光。以GADPH为内参，计算相对蛋白表达量。

1.2.8 CCK-8实验 取对数生长细胞，以初始密度4×10^3/孔接种于96孔板上。细胞贴壁后，按照完全培养基：CCK-8=10∶1的比例配制CCK-8悬液；吸除细胞培养基后，PBS润洗；去掉PBS，每孔加入等量的CCK-8悬液，放回培养箱避光孵育2 h。收集不同时间段所测得的OD值作图。

1.2.9 平板克隆实验 取对数生长期的细胞，以初始密度500个细胞每孔接种于6孔板上，使细胞分散均匀。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时，培养终止。弃去培养液，用PBS润洗后，4%多聚甲醛进行细胞固定，结晶紫染色液进行染色，用流水洗去染色液并待其干燥。用显微镜计数大于10个细胞的克隆数。

1.2.10 划痕实验 培养皿中细胞满到90%时，用无菌移液管尖端垂直均匀划痕；用PBS轻轻润洗3次，更换无血清培养基，将细胞放回培养箱中；每隔6 h显微镜下查看细胞迁移情况，分别于0 h、12 h拍照记录，计算各组闭合率。

1.2.11 Transwell实验 按照细胞传代步骤消化离心，用无血清培养基重悬，细胞计数，使得每个上室中细胞浓度为1×10^4个/300 μL；下室为含胎牛血清20%的500 μL培养基；培养箱中培养48 h；取出小室，移液枪吸弃小室内残余溶液，固定使用4%多聚甲醛；取出小室，棉签拭去小室上层细胞，倒扣风干，结晶紫染色液避光染色30 min后将小室置于PBS中漂洗干净，显微镜下观察拍照、计数。

1.3 统计学方法

生信分析方法和R软件包均使用v4.3.2版R软件执行。其余数据应用SPSS 26.0软件（IBM Corp，Armonk，NY，USA）进行数据处理。服从正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析或成组t检验进行组间比较。检验标准α=0.05。

2 结 果

2.1 RGS17在KIRC及其他肿瘤中的表达水平

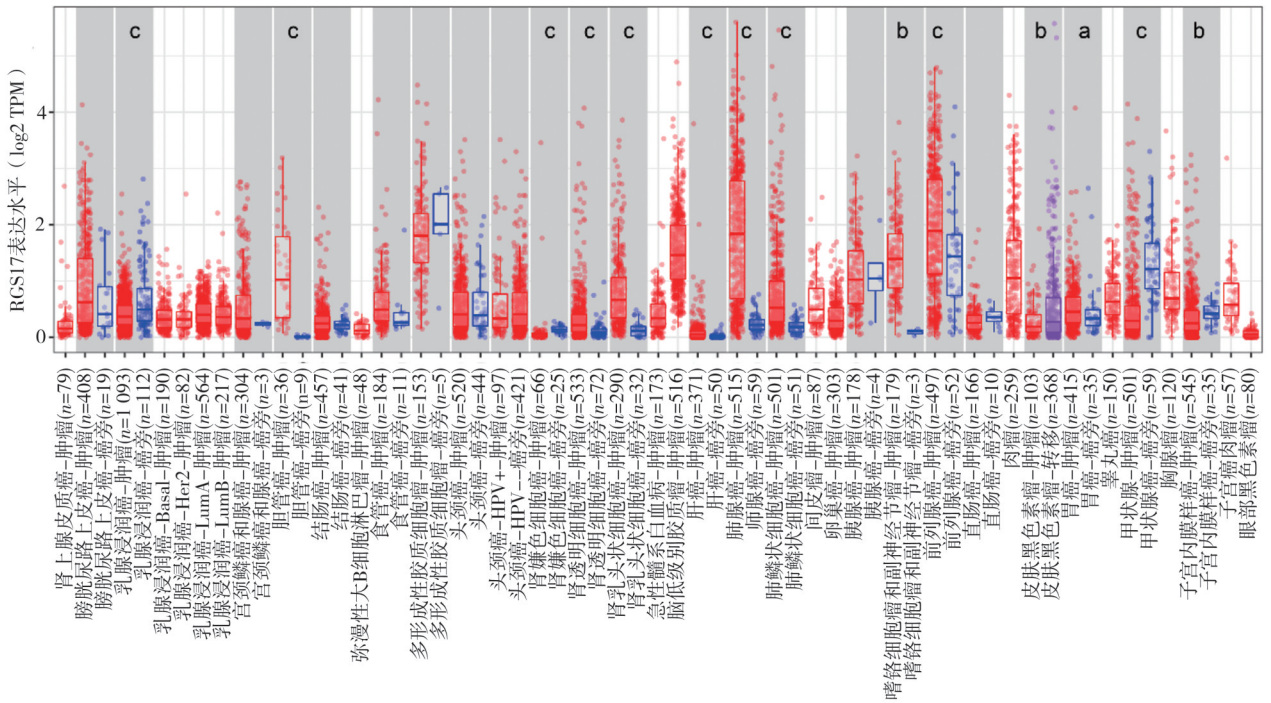
本课题组使用Timer数据库中获取33种肿瘤及癌旁样本RGS17的表达，发现在浸润性乳腺癌、胆管癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、胃癌中，RGS17较癌旁样本高表达，皮肤黑色素瘤转移瘤RGS17表达较皮肤黑色素瘤增高，但在肾显色细胞癌中，RGS17表达较癌旁样本下降（图1A）。由于Timer数据库时效性，本课题组从TCGA官方数据库中下载最新KIRC mRNA表达队列，其中有542个肿瘤样本及72个癌旁样本，对其RGS17表达进行差异分析，并对其中72组成对样本进行配对样本差异分析，使用箱线图进行展示。结果与之前一致，即RGS17在KIRC中表达较癌旁样本升高（均P<0.001，图1B、C）。

2.2 RGS17表达验证

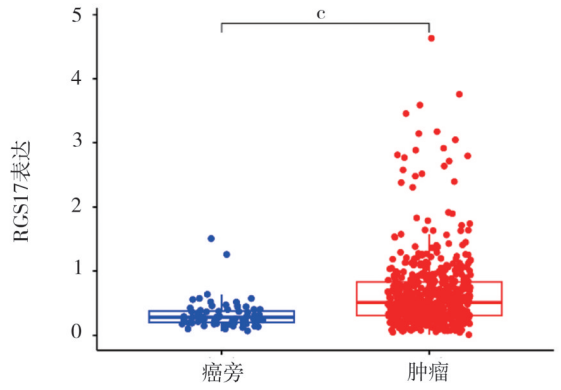
收集肾透明细胞癌及其配对癌旁组织进行mRNA及免疫组织化学染色，结果证实KIRC组织中RGS17的蛋白表达水平高于正常组织（图2A~C）。

2.3 RGS17与临床变量的相关性分析

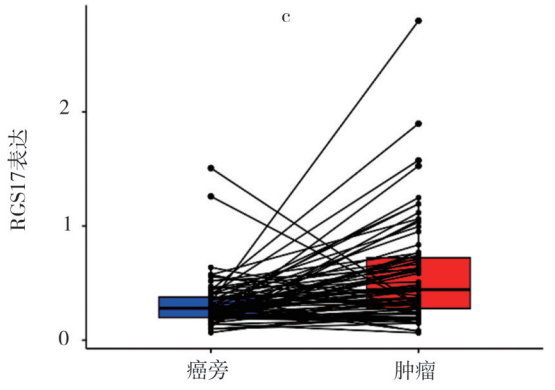
为了揭示RGS17与KIRC临床性状之间的相关性，本研究比较了不同年龄、性别、病理分级、临床分期、T分期、N分



A. TCGA数据库中33种肿瘤中RGS17 mRNA表达差异



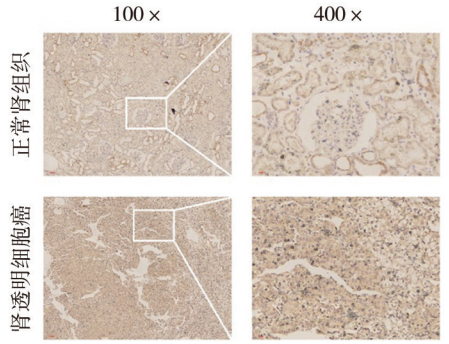
B. TCGA–KIRC队列中RGS17 mRNA表达差异



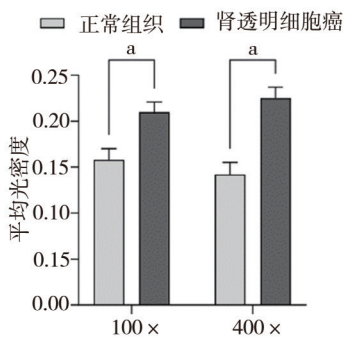
C. TCGA–KIRC队列中72组成对样本RGS17 mRNA配对表达差异

注：a，$P<0.05$；b，$P<0.01$；c，$P<0.001$

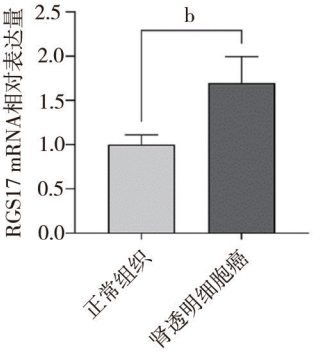
图1　RGS17在各种肿瘤中的表达差异



A. KIRC组织和配对癌旁组织中 RGS17 的免疫组化蛋白染色



B. KIRC组织和配对癌旁组织中RGS17 的免疫组化蛋白染色半定量分析



C. KIRC组织和配对癌旁组织中 RGS17的mRNA相对表达水平

注：a，$P<0.01$；b，$P<0.000\ 1$

图2　RGS17表达验证

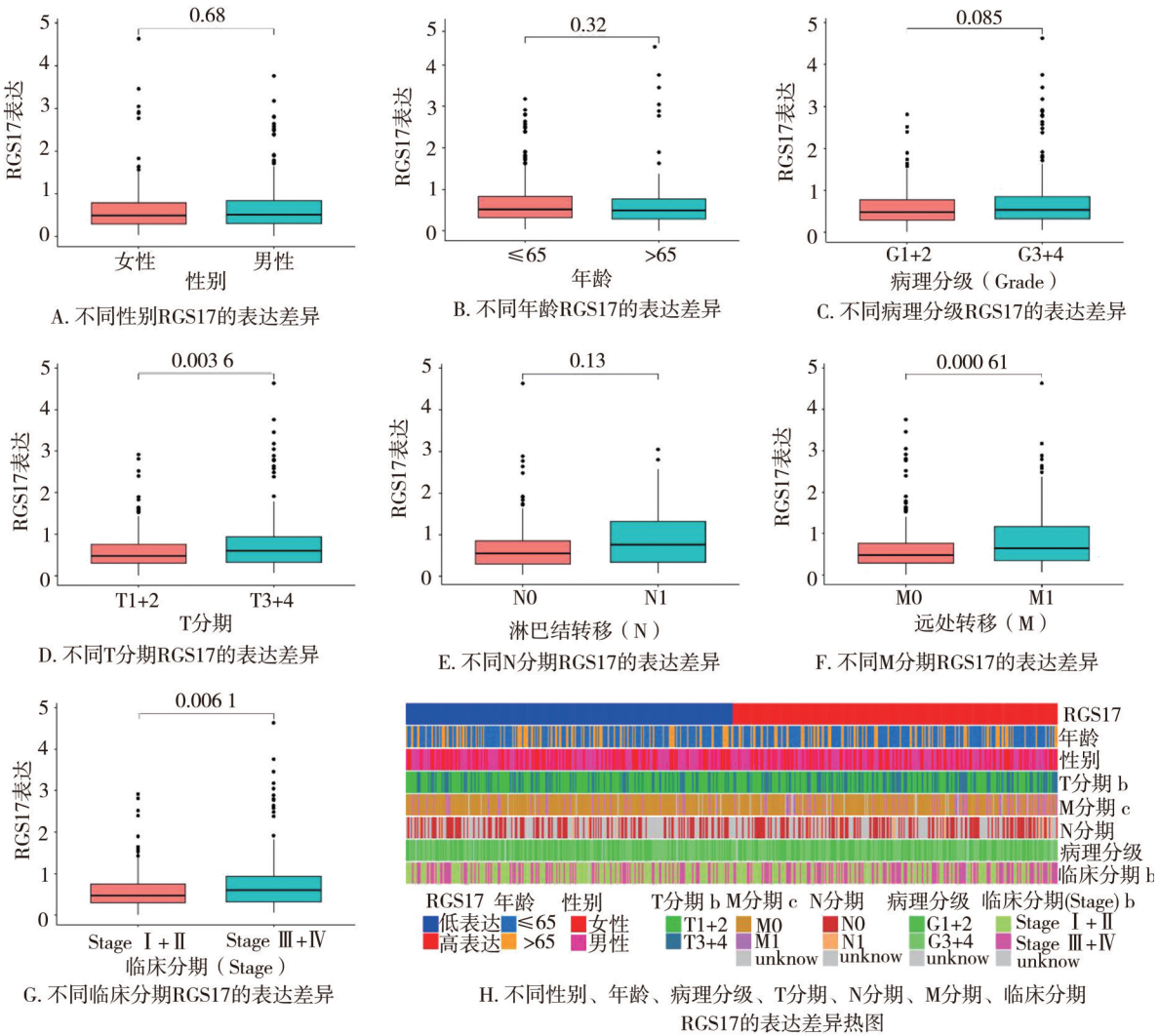
期、M 分期 RGS17 的表达差异，结果提示：不同年龄及性别之间也未见明显差异（图 3A、B）。发现 RGS17 上调与更高的 T 分期、临床分期及远处转移相关（均 P<0.01，图 3D、F、G）；而淋巴结转移、更高病理分期的患者 RGS17 表达升高不明显（P=0.13、0.085，图 3C、E）；此外，本课题组还创建了 1 个热图来比较展示高低表达组在年龄、性别、病理分级、临床分期、T 分期、N 分期、M 分期等临床数据方面的差异（图 3H）。

2.4 RGS17 与 KIRC 预后相关

K-M 生存分析结果表明，RGS17 高表达组的总生存时间（overall survival，OS）及无进展生存期（progression-free survival，PFS）较 RGS17 低表达组短（均 P<0.001，图 4A、B）。本研究进一步构建了受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线以明确 RGS17 对 KIRC 的诊断价值（图 4C），发现 RGS17 表达水平能较好区分肿瘤组织和正常组织，AUC 值为 0.746（95%CI=0.697~0.794），而时间依赖性的 ROC 曲线分析显示，基于 RGS17 表达水平预测 KIRC 患者 1、3、5 年生存率的 AUC 值均在 0.6 以上（图 4D）。除此之外，本课题组还进行单变量和多变量 Cox 回归分析，以探讨 RGS17 表达水平的预后价值。单变量 Cox 回归分析结果表明 RGS17、年龄、临床分期、病理分级与 OS 相关（均 P<0.001，图 4E）。多变量 Cox 独立预后分析结果表明，RGS17、年龄、临床分期、病理分级为 KIRC 的独立预后因素（均 P<0.05，图 4F）。

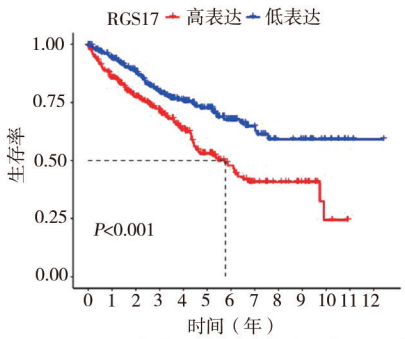
2.5 Nomogram 模型构建及校准曲线

根据单因素、多因素 Cox 独立预后分析结果，选取为独立预后因素且 HR 值较高的临床分期、病理分级及 RGS17 表达构建 Nomogram 模型，RGS17 高表达组得分约为 46 分（图 5A），校准曲线显示出观测值与预测值具有较好的一致性，提示 nomogram 模型在预测 KIRC 患者 1、3、5 年生存率方面具有较高的临床价值（图 5B）。

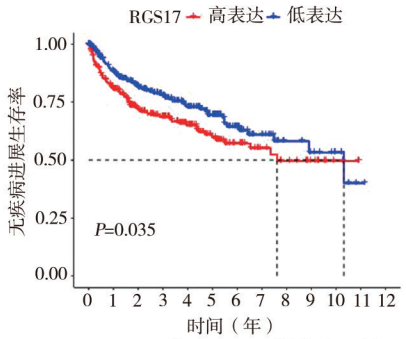


注：a，P<0.05；b，P<0.01；c，P<0.001；d，P<0.000 1

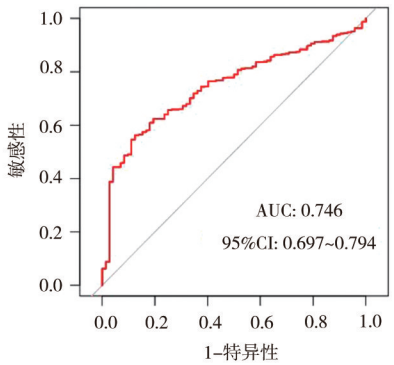
图 3 RGS17 与临床变量的相关性分析



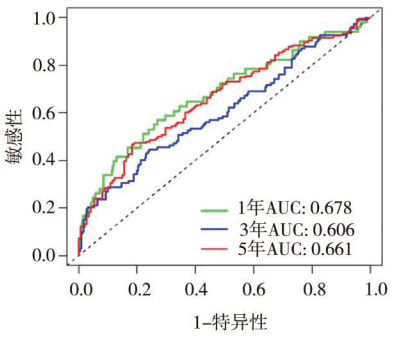
A. RGS17高表达组和低表达组的KIRC患者总生存期 K-M分析



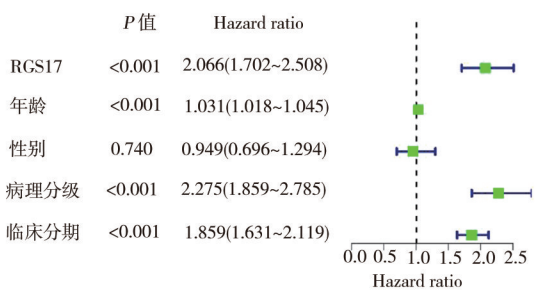
B. RGS17高表达组和低表达组的KIRC患者无疾病进展期 K-M分析



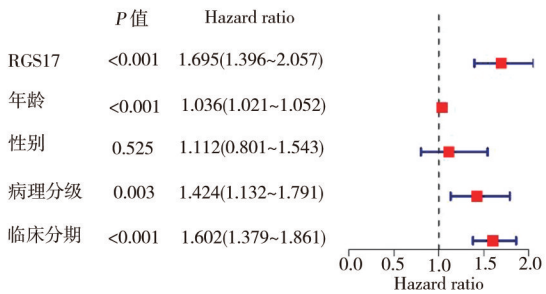
C. 根据RGS17表达水平区分KIRC组织与正常组织的诊断ROC曲线



D. 基于RGS17表达量预测KIRC患者的1、3、5年生存率的时间依赖生存ROC曲线



E. RGS17表达及临床性状单因素分析森林图



F. RGS17表达及临床性状多因素分析森林图

图4　RGS17与KIRC预后相关

2.6　RGS17相关基因的PPI网络和功能富集分析

使用STRING在线工具构建RGS17相关PPI网络，以预测RGS17生物学功能（图6A）。并对RGS17及其相关基因进行GO分析，发现这些基因主要富集在G蛋白偶联受体调节、GTP酶激活等相关通路（图6B）。此外，还对RGS17及其相关基因KEGG中代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞过程通路进行富集分析，发现RGS17相关基因在cAMP信号通路，cGMP-PKG信号通路、PI3K-Akt信号通路等信号通路上明显富集（图6C）。

2.7　RGS17敲低效率验证

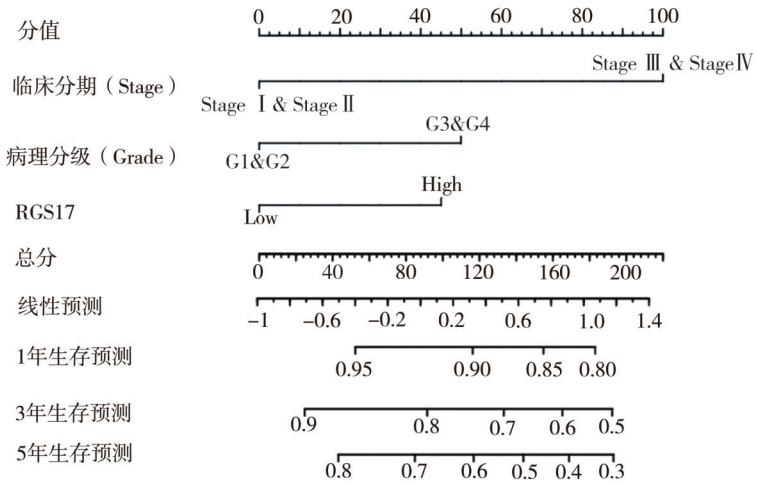
通过RT-qPCR和Western blot方法检测RGS17 mRNA和蛋白水平，结果显示：RGS17转染shRGS17质粒后，ACHN细胞中RGS17mRNA及蛋白表达明显下降（$P<0.001$，图7A~C）。

2.8　RGS17敲低对ACHN增殖的影响

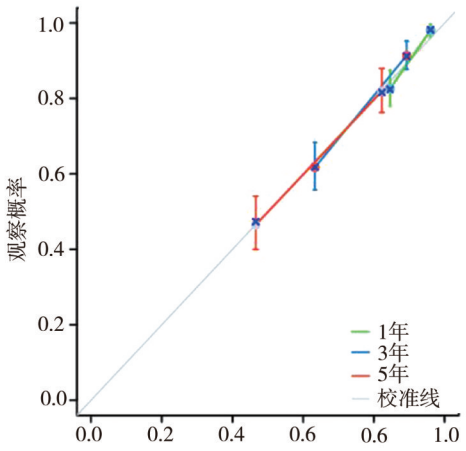
通过CCK-8及平板克隆实验检测shNC及shRGS17组ACHN细胞的增殖情况，结果证明：RGS17敲低抑制ACHN细胞增殖活性（$P<0.001$，图8A），转染RGS17细胞生长10 d后增殖克隆数为对照组的2.59倍（$P<0.001$，图8B）。

2.9　RGS17敲低对ACHN迁移和侵袭的影响

通过划痕实验及transwell实验检测shNC及shRGS17组ACHN细胞的迁移侵袭情况。结果提示，与对照组相比，shRGS17组12 h划痕愈合面积明显减少（$P<0.001$，图9A、B）。Transwell迁移及侵袭实验也发现了相同的结果，即抑制RGS17的表达将明显降低ACHN细胞的迁移和侵袭能力（$P<0.001$，图9C、D）。

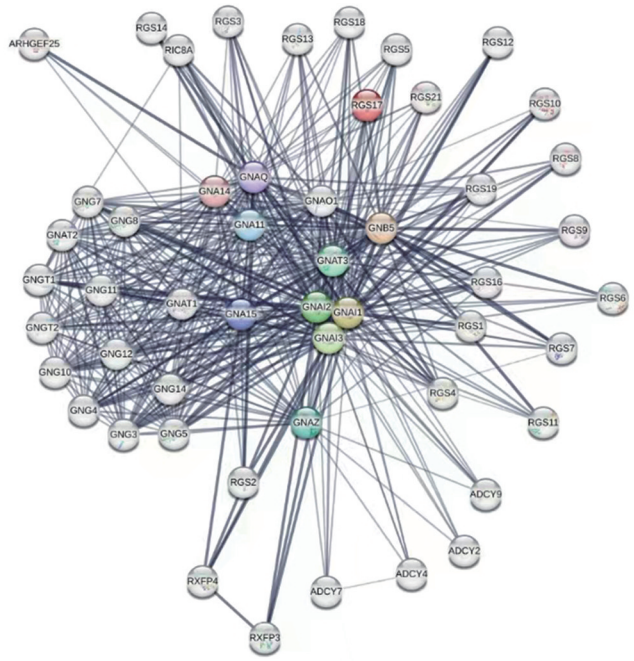


A. 使用临床性状（临床分期、病理分级）和RGS17表达水平构建预测KIRC患者1、3、5年生存率的nomogram模型

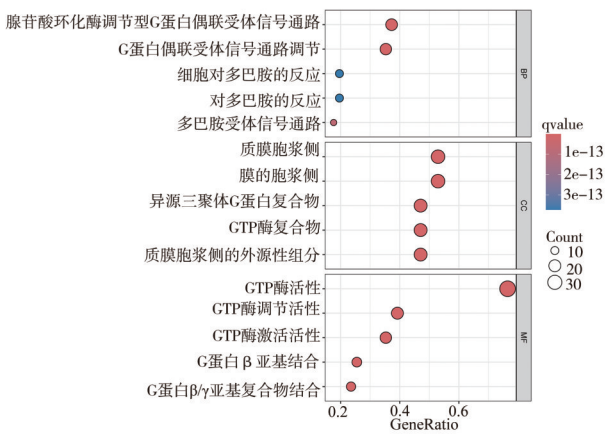


B. 评价nomogram模型预测能力的预后校准曲线图

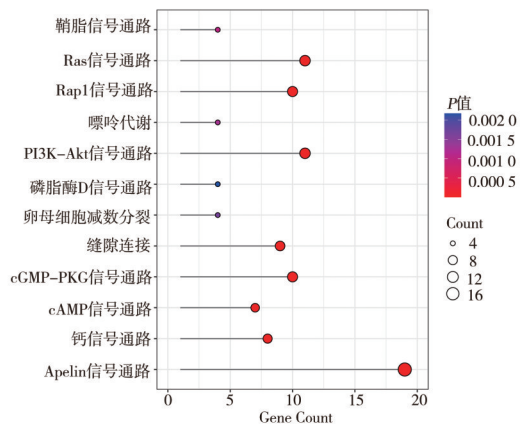
图5　Nomogram模型构建及校准曲线



A. RGS17相关基因的PPI网络

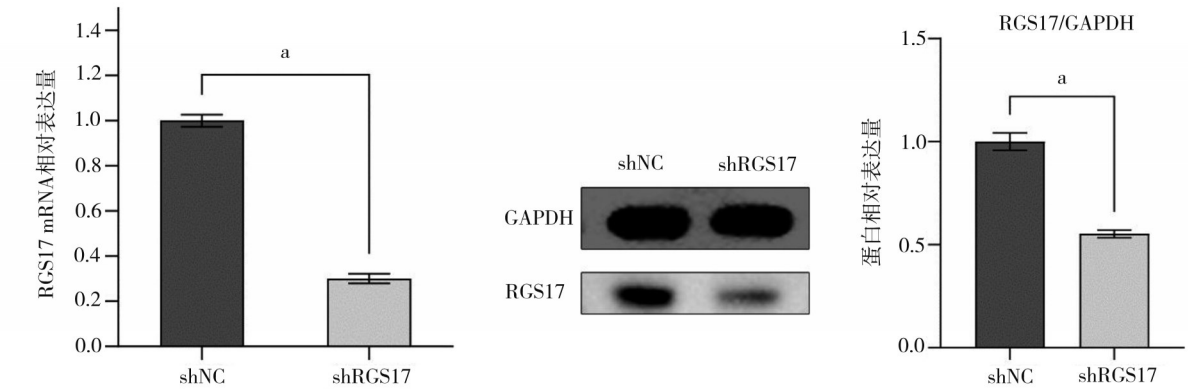


B. RGS17相关基因的GO分析



C. RGS17相关基因的KEGG分析

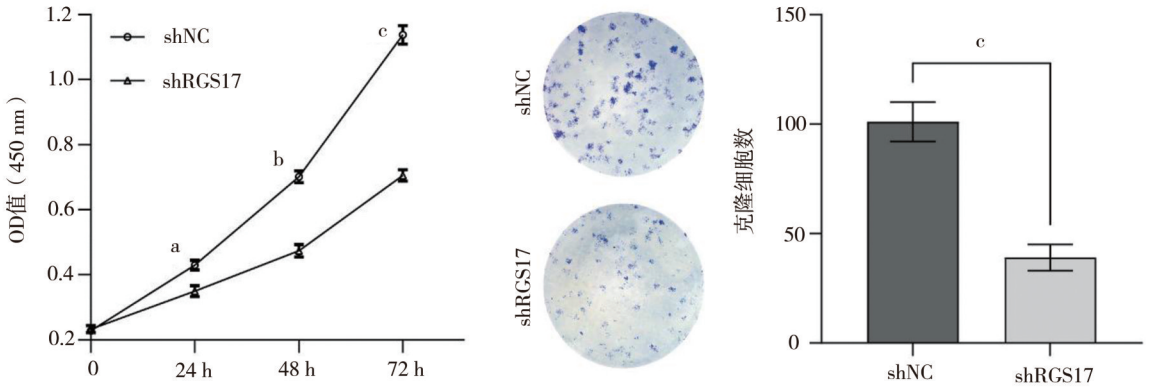
图6　RGS17相关基因的PPI网络和功能富集分析



A. 对照组（shNC）及敲低组（shRGS17）mRNA相对表达量比较　B. shNC组及shRGS17组蛋白相对表达量比较　C. shNC组及shRGS17组蛋白相对表达量比较

注：a，$P<0.000\ 1$

图7　RGS17敲低效率验证



A. shNC组及shRGS17组细胞增殖能力比较　B. shNC组及shRGS17组生长10 d后增殖克隆数比较

注：a，$P<0.01$；b，$P<0.001$；c，$P<0.000\ 1$

图8　RGS17敲低对ACHN增殖的影响

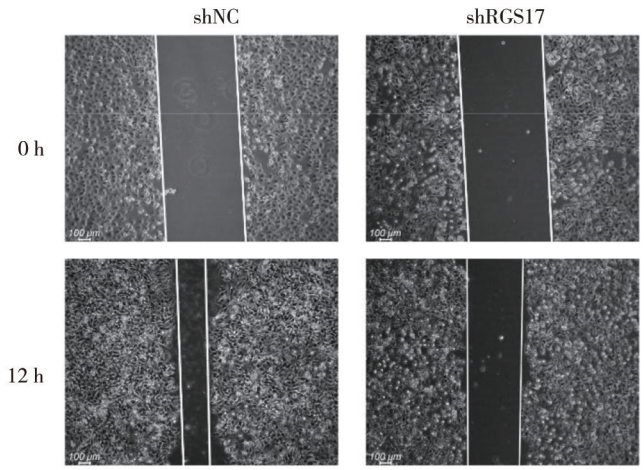
2.10　RGS17敲低对PKA/CREB通路的影响

通过Western blot实验检查PKA/CREB通路中PKA、CREB蛋白及其磷酸化表达的变化，结果提示，敲低RGS17后，PKA、CREB蛋白表达减少（$P<0.05$，图10A、B），其磷酸化水平也下降（$P<0.001$，图10A、C），提示RGS17下调会抑制PKA/CREB通路的激活。

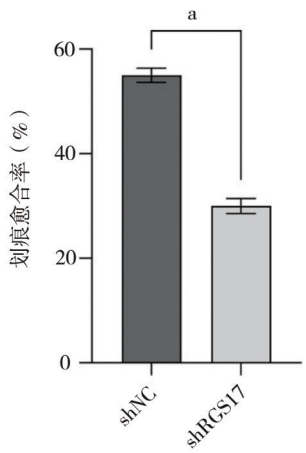
3　讨　论

在非小细胞肺癌[7]、前列腺癌[8]、卵巢癌[10]、乳腺癌[6]、肝癌[9]、结直肠癌[12]等多种类型的癌症中发现RGS17高表达，并在肿瘤生长和转移中发挥潜在作用。通过泛癌分析，本研究验证了相似结论，发现RGS17在浸润性乳腺癌、胆管癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、前列腺癌、胃癌、皮肤黑色素瘤转移瘤中高表达。

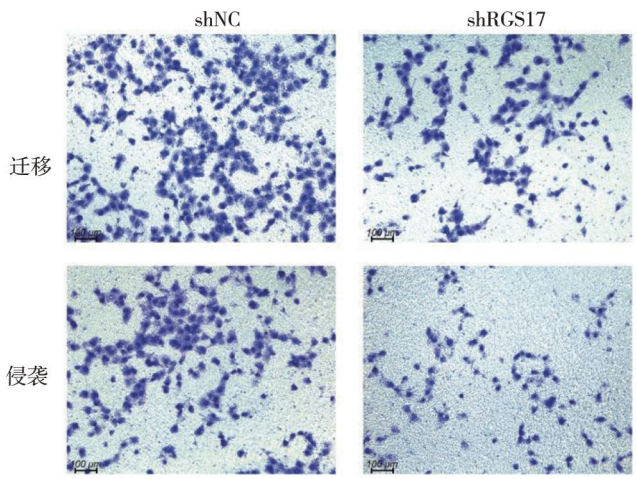
本研究从TCGA获取KIRC患者数据评估RGS17预后价值。本课题组发现KIRC样本RGS17表达较正常样本明显上调，免疫组化实验及PCR也得到相同结果。且RGS17表达升高与不良的临床病理特征如T分期、远处转移相关。但淋巴结转移、更高病理分期患者表达升高不明显。K-M曲线显示，RGS17表达水平较高的KIRC患者拥有较短的OS和PFS。ROC曲线结果提示RGS17能较好区分正常与KIRC患者，并能较好预测1、3、5年生存率，有作为KIRC诊断和预后标志物的潜能。肾癌男性发病率高于女性，且男性肾癌患者往往肿瘤体积更大，分期更高，预后更差[13]。研究发现年龄、性别、病理分级、TNM分期是肾癌患者独立预后因素[14-15]。



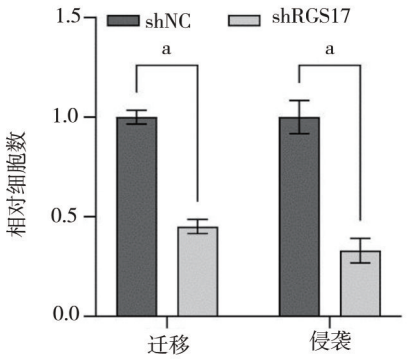
A. shNC组及shRGS17组0 h，12 h 细胞划痕愈合面积的对比



B. shNC组及shRGS17组0 h，12 h 细胞划痕愈合面积的对比



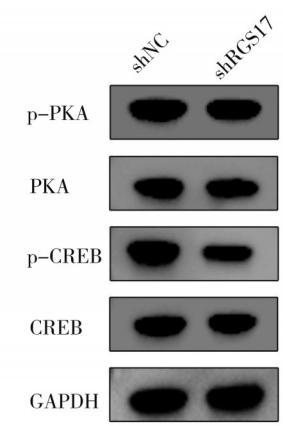
C. shNC组及shRGS17组 中板24 h后细胞向下迁移、侵袭对比



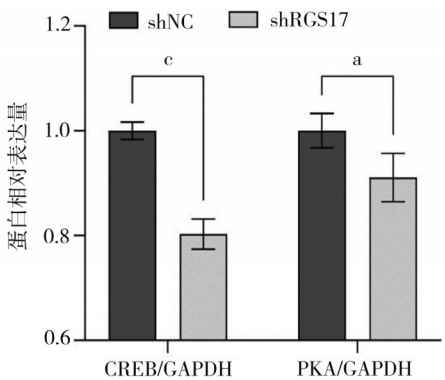
D. shNC组及shRGS17组 中板24 h后细胞向下迁移、侵袭对比

注：a，$P<0.000\ 1$

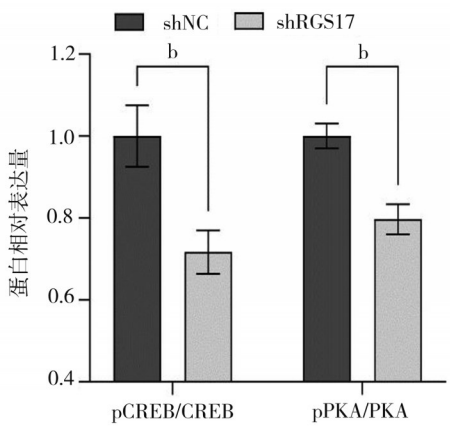
图9　RGS17 敲低对 ACHN 迁移和侵袭的影响



A. shNC组及shRGS17组PKA、CREB蛋白及其磷酸化表达对比



B. shNC组及shRGS17组PKA、CREB蛋白表达对比



C. shNC组及shRGS17组PKA、CREB蛋白磷酸化表达对比

注：a，$P<0.05$；b，$P<0.01$；c，$P<0.001$

图10　RGS17 敲低对 PKA/CREB 通路的影响

选取RGS17、年龄、性别、临床分期、病理分级进行单因素及多因素回归分析，结果发现年龄、临床分期、病理分级、RGS17是KIRC的独立预后因子。选取其中HR值较高的RGS17表达、临床分期、病理分级构建nomogram预后模型，校准曲线显示出观测值与预测值具有较好的一致性，提示该nomogram模型在预测KIRC患者1、3、5年生存率方面具有较高的临床价值。

为了进一步明确RGS17影响肾癌的机制，本研究在体外对RGS17进行敲减，发现RGS17的下调会抑制肾癌细胞ACHN的增殖、迁移和侵袭。这与远处转移的KIRC患者拥有高RGS17表达的结果一致。以上结果证明RGS17在KIRC发生发展过程中起促癌作用。

G蛋白耦联受体（G-Protein Coupled Receptors，GPCRs）参与大部分细胞生理功能的调节，目前市面上约34%的药物都直接或间接以G蛋白耦联受体作为靶点[16]。RGS蛋白可以作为GTP酶激活蛋白作用于G蛋白α亚基，加速与Gα亚基结合的GTP水解速度，使Gα亚基更快地恢复到非活性的GDP结合状态，负调控G蛋白偶联受体信号通路，参与细胞的生长、增殖、分化和迁移[17-18]。目前研究发现RGS17的功能主要集中在加速GTP的水解及诱导G蛋白的失活[19]。本课题组对RGS17进行PPI网络构建，并将其相关基因集进行GO富集分析，也发现生物过程 、细胞组分、分子功能中，RGS17相关基因集富集结果均包含GTP酶激活及G蛋白偶联受体调控相关通路。

细胞外信号与GPCRs结合后通过介导腺苷酸环化酶的活性，调控ATP向cAMP转化[20]。cAMP是首个发现的第二信使，在细胞信号传导中扮演着重要角色，主要通过PKA及其下游效应因子调节多种靶基因的转录，影响细胞生物学行为[21]。cAMP表达增高能促进PKA激活cAMP反应元件结合蛋白（cAMP-responsive element binding protein，CREB），使CREB靶基因（如血管内皮生长因子[22]或细胞周期蛋白D1[23]）过度转录，从而影响细胞增殖。研究发现RGS17蛋白表达水平的改变具有级联效应，RGS17过表达可通过降低Gαi/o/z活性，操控cAMP反应元件调控基因的转录[24]。在肺癌中，RGS17上调导致cAMP过度表达[11]，减少cAMP依赖的PKA抑制剂介导的生长停滞效应[11]。Tie P等[25]研究证实cAMP/PKA/CREB通路的激活促进肾癌细胞增殖和侵袭。Zhang B等[26]提出肾癌细胞株（ACHN、GRC-1和786-O）中Gα亚基的表达显著较正常肾上皮细胞HK-2明显增加，并依赖PKA相关通路发挥作用。而RGS17基因敲除会导致Gα亚单位信号的长时间抑制，抑制PKA/CREB通路的激活[24]。但RGS17在KIRC患者中对cAMP通路的影响及机制尚未探明。本研究在KIRC患者中对RGS17相关基因集中进行GO富集时发现腺苷酸环化酶调节型G蛋白偶联受体信号通路富集，KEGG富集分析时发现其在cAMP通路上显著富集。推测RGS17通过影响GPCRs，活化腺苷酸环化酶，介导cAMP经典通路激活进而参与肾癌进展。为此，本研究进一步进行体外实验，探索cAMP通路关键蛋白PKA、CREB表达变化，结果提示RGS17的敲低下调了PKA、CREB蛋白表达，并使得PKA磷酸化水平及CREB蛋白磷酸化水平降低下调，减弱了PKA及CREB的活性。因此，本课题组认为RGS17可能通过介导cAMP经典通路，参与肾癌发生发展过程。

综上所述，本研究通过生物信息学发现了RGS17在KIRC患者中高表达，与肿瘤转移、更高T分期等不良预后相关，且拥有较低的OS和PFS。RGS17是KIRC的独立预后因素。使用RGS17表达、临床分期、病理分级构建nomogram预后模型能较好预测1、3、5年生存率。RGS17的敲低可以抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这可能与其下调抑制cAMP通路的激活有关。本研究结果初步证明了RGS17在KIRC患者肿瘤生长、转移及预后中起关键作用，有望成为肾癌诊疗新分子靶点，为后续RGS17的深入研究提供了重要的生物信息学基础和相关理论依据。

参 考 文 献

[1] Gansler T，Fedewa S，Amin MB，et al. Trends in reporting histological subtyping of renal cell carcinoma：association with cancer center type [J]. Hum Pathol，2018，74：99-108.

[2] Lu T, Xu HR, Dong W, et al. Expression and prognosis analysis of PAQR5 in kidney cancer[J]. Front Oncol, 2022, 12: 955510.

[3] Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer[J]. Nat Rev Urol, 2010, 7(5): 245-257.

[4] Sethakorn N, Dulin NO. RGS expression in cancer: oncomining the cancer microarray data[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2013, 33(3): 166-171.

[5] Yamauchi Y, Miura Y, Kanaho Y. Machineries regulating the activity of the small GTPase Arf6 in cancer cells are potential targets for developing innovative anti-cancer drugs[J]. Adv Biol Regul, 2017, 63: 115-121.

[6] Li YH, Li LL, Lin JY, et al. Deregulation of RGS17 expression promotes breast cancer progression[J]. J Cancer, 2015, 6(8): 767-775.

[7] Wang SC, Zhang CC, Chen RL. Circ_0006220 promotes non-small cell lung cancer progression via sponging miR-203-3p and regulating RGS17 expression[J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271211062854.

[8] Ma JH, Wei HB, Li XL, et al. Hsa-miR-149-5p suppresses prostate carcinoma malignancy by suppressing RGS17[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 2773-2783.

[9] Zhang W, Qian S, Yang GW, et al. MicroRNA-199 suppresses cell proliferation, migration and invasion by downregulating RGS17 in hepatocellular carcinoma[J]. Gene, 2018, 659: 22-28.

[10] Hooks SB, Callihan P, Altman MK, et al. Regulators of G-Protein signaling RGS10 and RGS17 regulate chemoresistance in ovarian cancer cells[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 289.

[11] James MA, Lu Y, Liu Y, et al. RGS17, an overexpressed gene in human lung and prostate cancer, induces tumor cell proliferation through the cyclic AMP-PKA-CREB pathway[J]. Cancer Res, 2009, 69(5): 2108-2116.

[12] Li L, Luo HS. G-protein signaling protein-17 (RGS17) is upregulated and promotes tumor growth and migration in human colorectal carcinoma[J]. Oncol Res, 2018, 26(1): 27-35.

[13] Mancini M, Righetto M, Baggio G. Gender-related approach to kidney cancer management: moving forward[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3378.

[14] Schulz S, Woerl AC, Jungmann F, et al. Multimodal deep learning for prognosis prediction in renal cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11: 788740.

[15] Zheng BS, Wang SD, Zhang JY, et al. Incidence, prognostic factors, and survival of patients with renal cancer: a population-based study[J]. J Investig Surg, 2023, 36(1): 2197506.

[16] Hertz E, Saarinen M, Svenningsson P. GM1 is cytoprotective in GPR37-expressing cells and downregulates signaling[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12859.

[17] Yin ZY, Zhang XF, Wang JZ, et al. MoMip11, a MoRgs7-interacting protein, functions as a scaffolding protein to regulate cAMP signaling and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Environ Microbiol, 2018, 20(9): 3168-3185.

[18] Cabrera IE, Oza Y, Carrillo AJ, et al. Regulator of G protein signaling proteins control growth, development and cellulase production in *Neurospora crassa*[J]. J Fungi, 2022, 8(10): 1076.

[19] Zhang LS, Ma HG, Sun FH, et al. MiR-203 inhibits the malignant behavior of prostate cancer cells by targeting RGS17[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(13): 5667-5674.

[20] Shikata Y, Yoshimaru T, Komatsu M, et al. Protein kinase A inhibition facilitates the antitumor activity of xanthohumol, a valosin-containing protein inhibitor[J]. Cancer Sci, 2017, 108(4): 785-794.

[21] Zhang HY, Kong QB, Wang J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer[J]. Exp Hematol Oncol, 2020, 9(1): 32.

[22] Bitar MS, Al-Mulla F. Upregulation of CREM/ICER suppresses wound endothelial CRE-HIF-1α-VEGF-dependent signaling and impairs angiogenesis in type 2 diabetes[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(1): 65-80.

[23] Jones C, Bisserier M, Bueno-Beti C, et al. A novel secreted-cAMP pathway inhibits pulmonary hypertension via a feed-forward mechanism[J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(8): 1500-1513.

[24] Hayes MP, O'Brien JB, Crawford RA, et al. Fragment-based nuclear magnetic resonance screen against a regulator of G protein signaling identifies a binding "hot spot"[J]. Chembiochem, 2021, 22(9): 1609-1620.

[25] Tie P, Cheng J, Xue MX, et al. SLC18A3 promoted renal cancer development through acetylcholine/cAMP signaling[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(9): 4279-4289.

[26] Zhang B, Sun N, Mu X, et al. G protein alpha S subunit promotes cell proliferation of renal cell carcinoma with involvement of protein kinase A signaling[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(3): 237-242.

（责任编辑：周一青）