

LAPTM4B 通过 PI3K/AKT 信号通路促进肾细胞癌 恶性增殖的作用及机制研究

赵冠安, 李朋, 季清芬

丽水市人民医院 浙江丽水

【摘要】目的 研究 LAPTM4B 在肾细胞癌 (RCC) 中表达情况以及其激活 PI3K/AKT 信号传导机制促使肿瘤恶性增殖的作用机理。**方法** 收集自 2019 年 6 月至 2023 年 6 月份在我院接受根治性肾切除术的 RCC 患者的癌组织与癌旁正常组织样本各 64 份, 以免疫组化染色法、Western blot 及荧光定量 PCR 的方法检测 LAPTM4B 的表达量; 建立 LAPTM4B 持续性下调的 786-O 细胞株, 应用 CCK-8 法、克隆形成法以及流式细胞仪分析细胞增殖情况及其周期变化情况; 运用 Western blot 检测 PI3K/AKT 信号通路主要蛋白的磷酸化状态; 借助 PI3K 激活剂 740Y-P 进行救援实验以探索 LAPTM4B 影响肾细胞癌生长时是否经过 PI3K-AKT 途径。**结果** LAPTM4B 在肾癌组织中的表达量明显高于邻近正常肾组织 ($P < 0.001$)。而且较高的表达量也与肿瘤的临床分期、Fuhrman 分级以及淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$)。敲低 LAPTM4B 之后, 786-O 细胞的生长活力显著减弱, G1 相延迟增多, p-PI3K 以及 p-AKT 蛋白水平同时减少, 在加入 740Y-P 之后, 这种抑制作用得到了一定的缓解, 再次证明了 LAPTM4B 是通过活化 PI3K/AKT 信号网络来促进肾脏癌细胞的恶性增殖。**结论** LAPTM4B 在肾细胞癌高度过量表达, 通过活化 PI3K/AKT 信号通路使得癌细胞发生恶性增殖, 具有作为肾细胞癌治疗相关药物靶标的前景。

【关键词】 肾细胞癌; LAPTM4B; PI3K/AKT 信号通路; 恶性增殖

【基金项目】 丽水市科技计划项目, 项目编号: 2023SJZC102, 项目名称: LAPTM4B 通过 PI3K/AKT 信号通路促进肾细胞癌恶性增殖的作用及机制

【收稿日期】 2026 年 3 月 19 日

【出刊日期】 2026 年 4 月 28 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20260207

Study on the role and mechanism of LAPTM4B in promoting malignant proliferation of renal cell carcinoma via the PI3K/AKT signaling pathway

Guan'an Zhao, Peng Li, Qingfen Ji

Lishui People's Hospital, Lishui, Zhejiang

【Abstract】Objective To investigate the expression of LAPTM4B in renal cell carcinoma (RCC) and the mechanism by which it activates the PI3K/AKT signaling pathway to promote tumor malignancy and proliferation. **Methods** Sixty-four pairs of tumor tissue and adjacent normal tissue samples from RCC patients who underwent radical nephrectomy in our hospital from June 2019 to June 2023 were collected. The expression level of LAPTM4B was detected by immunohistochemical staining, Western blot, and fluorescence quantitative PCR. A 786-O cell line with continuous down-regulation of LAPTM4B was established. The cell proliferation and its cycle changes were analyzed by CCK-8 assay, colony formation assay, and flow cytometry. The phosphorylation status of the main proteins of the PI3K/AKT signaling pathway was detected by Western blot. Rescue experiments with the PI3K activator 740Y-P were conducted to explore whether LAPTM4B affects the growth of renal cell carcinoma through the PI3K-AKT pathway. **Results** The expression level of LAPTM4B in renal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent normal renal tissues ($P < 0.001$). Moreover, the higher expression level was also closely related to the clinical stage, Fuhrman grade, and lymph node metastasis of the tumor ($P < 0.05$). After knockdown of LAPTM4B, the growth vitality of 786-O cells was significantly weakened, the G1 phase was delayed, and the levels of p-PI3K and p-AKT proteins were simultaneously reduced. After adding 740Y-P, this inhibitory effect was alleviated, further confirming that LAPTM4B promotes the malignant

proliferation of renal cell carcinoma cells by activating the PI3K/AKT signaling network. **Conclusion** LAPTM4B is highly overexpressed in renal cell carcinoma, and its activation of the PI3K/AKT signaling pathway leads to malignant proliferation of cancer cells, presenting a prospect as a target drug for renal cell carcinoma treatment.

【Keywords】 Renal cell carcinoma; LAPTM4B; PI3K/AKT signaling pathway; Malignant proliferation

肾细胞癌 (Renal Cell Carcinoma, RCC) 位居泌尿系统常见的恶性肿瘤之二, 从世界肿瘤发病率来看, 肾细胞癌发病率在过去四十年来逐年增加, 每年新增病例数大约有 430,000 例左右, 病亡人数达到 180,000 左右, 而透明细胞型肾细胞癌占据所有亚型的 75% 成为首要致死因素, 因为肾细胞癌发病较晚, 很多患者在第一次就诊的时候就出现了局部或者远处转移, 手术以后的局部复发率以及远处转移也较高, 在治疗过程中出现的原发性、继发性的耐药一直困扰着临床。

1 资料与方法

1.1 临床资料

共选取 2019 年 6 月-2023 年 6 月在本院泌尿外科进行根治性肾切除术的肾细胞癌患者的癌组织以及匹配的癌旁正常肾组织各 64 份。入组条件为: 手术后的病理结果确诊是透明细胞肾细胞癌, 并且在术前无任何的抗癌治疗史、完整的随访记录等。排除条件为: 合并其他恶性肿瘤、病检材料不满足实验检测标准等等。其中男性患者有 43 例, 女性患者有 21 例, 年龄从 38 到 74 岁不等, 平均年龄 57 岁。所有受试者均已获得知情同意书, 本研究已获得我院伦理委员会批准 (伦理批准号: XXEC-2019-046)。

1.2 实验方法

免疫组化检查组织样本用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片至 4 μ m 厚度, 进行抗原修复, 血清封闭后孵育 LAPTM4B 一抗 (兔抗人, 1: 200 浓度), 孵育相应的二抗以及 DAB 显色, 两位病理医生分别对每张切片独立打分, 用着色程度乘以阳性细胞百分率的乘积计分法, 所得总分大于等于 4 分为高表达。

Western Blot 检测组织蛋白、细胞蛋白用 RIPA 裂解液裂解, 称重后进行 SDS-PAGE 电泳及转膜, 依次孵育 LAPTM4B、p-PI3K (p85, Tyr458)、PI3K、p-AKT (Ser473)、AKT、细胞周期蛋白 D₁ (Cyclin D₁)、p27 及 β -actin 抗体, 经 ECL 发光后进行拍照、测量灰度值。

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 用 TRIzol 法提取组织、细胞全 RNA, 经逆转录后用 SYBR Green 法进行扩增, 以 GAPDH 为参照基因, 相对量运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法得出。

细胞培养以及慢病毒感染人肾细胞癌细胞系 786-O 由中科院细胞库提供, 培养在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液内。使用慢病毒 shRNA (shLAPTM4B)、阴性对照 shNC 对 786-O 细胞进行稳定转染, 通过嘌呤霉素筛选得到稳定克隆, 敲低效果用 Western blot 和 RT-qPCR 检测。

CCK-8 增殖检测每个处理组细胞用 2×10^3 个/孔接种在 96 孔板上培养 1, 2, 3, 4, 5 d 分别加 CCK-8 反应液孵育 2 h 后在 450 nm 处测量吸光值, 绘制细胞生长曲线图。

克隆形成实验每一组细胞以 500 个/皿接种到 6cm 培养皿上, 继续培养 14 天用甲醇固定、结晶紫染色, 显微镜下拍照统计克隆数量。

流式细胞术细胞用 70% 乙醇固定过夜之后使用碘化丙啶 (PI) 单染来对细胞周期进行测定, 通过 FlowJo 软件统计细胞各个周期所占的比例。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 26.0 做数据处理, 计量指标用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较使用独立样本 t 检验, 多组间使用单因素方差分析, LAPTM4B 表达及与临床病理参数的关系使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAPTM4B 在肾细胞癌组织中表达情况及与临床病理指标的相关性研究

免疫组化结果显示, LAPTM4B 蛋白定位于癌细胞的胞质与细胞表面, 呈棕黄色颗粒样分布; 在 64 个配对样本中, 癌组织的高表达率是 73.4% (47/64), 癌旁的正常肾组织仅为 20.3% (13/64), 差异有极其显著性意义 ($P < 0.001$)。RT-qPCR 及 Western blot 结果与上述结论高度一致, 提示 LAPTM4B 在肾细胞癌组织中同时有转录、翻译的双重升高。

进一步的相关性分析结果显示, LAPTM4B 过量表达跟肿瘤 TNM 分期 (III~IV 期)、Fuhrman 核分级 (3~4 级)、淋巴结转移的发生有密切关系, 但与患者的性别、年龄无关, 说明 LAPTM4B 的激活程度同肾细胞癌病程严重程度有关 (表 1)。

2.2 敲低 LAPTM4B 抑制 786-O 细胞的恶性增殖

慢病毒转染之后通过 Western blotting 以及 RT-qPCR 检测结果可以看出 shLAPTM4B 组 LAPTM4B 蛋白水平比 shNC 组降低约 78%，降效效果明显可以用于下一步的功能实验研究中。

表 1 LAPTM4B 表达水平和肾细胞癌病人临床病理参数相关性分析 (n=64)

临床病理特征	例数 (n)	LAPTM4B 低表达 (n=17)	LAPTM4B 高表达 (n=47)	χ^2 值	P 值
性别				0.412	0.521
男	43	12	31		
女	21	5	16		
年龄 (岁)				0.318	0.573
<57	30	9	21		
≥57	34	8	26		
TNM 分期				6.847	0.009
I~II 期	38	14	24		
III~IV 期	26	3	23		
Fuhrman 分级				5.623	0.018
1~2 级	36	13	23		
3~4 级	28	4	24		
淋巴结转移				7.194	0.007
无	42	15	27		
有	22	2	20		
肿瘤直径 (cm)				4.891	0.027
<4	29	11	18		
≥4	35	6	29		

CCK-8 结果显示: 从第 3 天开始, shLAPTM4B 组细胞生长速率明显低于 shNC 组, 在第 5 天时两组光密度值差异显著增大 ($P < 0.001$) 显示出明显的时程效应抑制作用; 而克隆形成实验也发现 shLAPTM4B 组细胞克隆形成的数量减少了大约 62% ($P < 0.01$) 克隆大小也有明显的变化, 说明 LAPTM4B 对于 786-O 细胞长期内的增值能力有着非常重要的影响。

FCM 周期分析结果表明, 相对于 shNC 组而言 shLAPTM4B 组细胞 G_1 期的比率从 $(43.7 \pm 2.8)\%$ 上升到 $(61.2 \pm 3.4)\%$, S 的比率降低, 说明 LAPTM4B 的敲低造成细胞停滞在 G_1 期, 细胞周期被阻断。同时与之相对应的是 Western blot 实验的结果也证明了这一现象, shLAPTM4B 组细胞促生长因子 cyclinD₁ 的表现量有减少的趋势, 而周期负调控蛋白 p27 的表达量增加, 从分子水平证实细胞周期阻滞。

2.3 LAPTM4B 促进 PI3K/AKT 信号通路影响肿瘤细胞增殖

为了了解 LAPTM4B 介导肾细胞癌增殖的下游信

号途径, 我们测试了 PI3K/AKT 信号路径上重要的标记酶磷酸化程度。Western blot 实验表明, 在 shLAPTM4B 组细胞相比于 shNC 组细胞其 p-PI3K(p85, Tyr458)、p-AKT (Ser473) 蛋白磷酸化程度均有明显的降低, 而总的 PI3K 与总的 AKT 表达均无差异, 提示 LAPTM4B 是主要通过调控通路蛋白磷酸化水平发挥作用, 不影响总蛋白表达量。再对其通路下游 mTOR 磷酸化水平进行检测, 也显示 shLAPTM4B 组 p-mTOR 表达下降, 与上游相吻合, 说明 LAPTM4B 可以触发 PI3K/AKT/mTOR 信号级联的整体激活。

3 讨论

肾细胞癌是高分子异质性的泌尿系恶性肿瘤之一, 在其发生发展中存在诸多未知的内部分子调控因素, 本文以 LAPTM4B 作为溶酶体相关跨膜蛋白进行研究, 全面阐述了其在肾细胞癌组织中异常上调趋势以及通过 PI3K/AKT 信号途径来推进细胞分裂增殖的作用机理, 对相关疾病的研究有着很好的启示意义。

在表达特征方面, 该文通过分析 64 组配对样本得

出 LAPTM4B 在肿瘤组织中的过表达比例明显高于其周围正常组织, 在此基础上还发现 LAPTM4B 的过度表达与患者的肿瘤发展程度、病理分型以及淋巴结转移有着十分密切的相关性, 由此推测 LAPTM4B 的过度活化并不是发生于肾细胞癌的早期偶然现象, 而是一个伴随肿瘤恶变逐渐加强的一个动态的过程变化点。综合目前在乳腺癌, 肝癌等肿瘤中的报道可得, LAPTM4B 在绝大多数实体瘤都存在着普遍性的癌基因过表达的现象, 但各个肿瘤类型的 LAPTM4B 调控通路可能会有所不同, 在肾细胞癌中更应该去探究一下相关的调控机制。

在功能方面, 细胞实验结果明确显示了 LAPTM4B 是 786-O 细胞增殖所必须的, CCK-8 及克隆形成实验都表明下调 LAPTM4B 之后细胞增殖活力明显且稳定的下降, 而下降的效果随时间的变化而累加也更加证实了 LAPTM4B 对肾细胞癌细胞保持持久性的增殖潜能是有必不可少的贡献的。周期检测的数据为更明确的突破口提供了依据, G_1 期停滞的产生推测出 LAPTM4B 促进增殖的功能可能是通过调节 G_1/S 检查点实现的。Cyclin D1 是推动 G_1 期进入 S 期关键的周期蛋白, 在细胞内以 Cyclin D1-CDK4/6 复合物的形式激活磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白 (Rb) 从而使 E2F 转录因子得以释放, 进而控制 S 期基因的转录进程。实验中我们发现 shLAPTM4B 细胞 Cyclin D1 降低及 p27 升高与 G_1 期停滞的表型相符, 从分子水平上为周期调控机制的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李彦伟.FHIT、LAPTM4B 在 NACT 宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J].实用癌症杂志,2025,40(10):1583-1585+1590.
- [2] 沈玲玲,刘黎明,陈东.三阴性乳腺癌组织中 LAPTM4B 和 p27kip1 的表达对患者临床病理特征和预后的影响[J].中国医学工程,2025,33(07):37-42.
- [3] 廖飞飞.活血解毒方调控 LAPTM4B/mTORC1/TFEB 通路介导的自噬流减轻心肌缺血再灌注损伤的研究[D].北京中医药大学,2025.
- [4] 黄沈莉.LAPTM4B 单克隆抗体的制备及功能验证[D].武汉工程大学,2025.
- [5] 彭郭飞,江鹏,张丹平等.能谱 CT 与血清 LAPTM4B-35、KLF5 联合检测对早期原发性肝癌患者的诊断价值[J].影像科学与光化学,2024,42(06):610-616.
- [6] 张永艳,夏妍芬,林佳慧,等.miR-518b 靶向调控 LAPTM4B 在稽留流产发病中的作用[J].郑州大学学报(医学版),2024,59(04):496-501.
- [7] 沈磊.LAPTM4B-35 介导的铁死亡参与胰腺导管腺癌吉西他滨的耐药研究[D].安徽医科大学,2024.
- [8] 黄永秀.LAPTM4B 通过调节 RPS9/STAT3 轴促进 AML 进展[D].重庆大学,2023.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS