基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003897

TMEM9通过影响自噬促进前列腺癌增殖及侵袭

朱辉轩，苏 帅，张金栋，罗 雨，宋良东，刘恒川，王德林
（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨跨膜蛋白9（transmembrane protein 9，TMEM9）作为促癌基因在前列腺癌（prostate cancer，PCa）中的表达情况，并通过干预其表达探究对PCa细胞增殖、侵袭的影响，以及对Wnt/β-catenin信号通路及PCa细胞自噬的影响。**方法：**采用癌症基因组图谱泛癌分析TMEM9在不同肿瘤中表达水平，临床PCa和前列腺增生标本中分析TMEM9的蛋白和信使核糖核酸（messenger ribonucleic acid，mRNA）水平。实时荧光定量聚合酶链式反应和蛋白质免疫印记分析TMEM9在不同PCa细胞系中的表达水平。细胞计数实验分析细胞增殖，TUNEL染色分析凋亡，Transwell检测PCa的侵袭。裸鼠皮下成瘤分析肿瘤体内增殖情况。蛋白质免疫印记分析自噬相关通路蛋白的表达情况，透射电子显微镜和免疫荧光共定位检测自噬小体和溶酶体细胞共定位。**结果：**TMEM9在PCa中高表达。PCa组织中TMEM9的mRNA和蛋白水平的表达高于前列腺增生组织。TMEM9在PC3细胞（人PCa细胞）中表达量最高（t=17.150，P<0.01），敲低TMEM9的PC3细胞增殖（t=3.165，P<0.05）、侵袭（F=76.620，P<0.01）明显减弱，凋亡率明显增高（t=13.530，P<0.01）。敲低TMEM9后裸鼠皮下肿瘤的体积减小（F=1 699.000，P<0.01），质量减轻（t=9.057，P<0.01），肿瘤生长受抑制。TMEM9可调控Wnt/β-catenin信号通路并抑制AKT-mTOR信号通路来促进PCa自噬。**结论：**TMEM9抑制AKT-mTOR信号通路通过自噬促进PCa细胞的增殖和侵袭。

【关键词】跨膜蛋白9；前列腺癌；增殖；侵袭；自噬
【中图分类号】R737.25 **【文献标志码】**A

TMEM9 promotes the proliferation and invasion of prostate cancer by affecting autophagy

Zhu Huixuan，Su Shuai，Zhang Jindong，Luo Yu，Song Liangdong，Liu Hengchuan，Wang Delin
（*Department of Urology，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To explore the expression of transmembrane protein 9 (TMEM9) as an oncogene in prostate cancer (PCa), and to examine its effect on the proliferation and invasion of PCa cells as well as on the Wnt/β-catenin signaling pathway and autophagy of PCa cells by intervening with its expression. ***Methods*：**The Cancer Genome Atlas was used for pan-cancer analysis of TMEM9 expression levels in different tumors, and TMEM9 protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in clinical PCa and prostatic hyperplasia specimens were analyzed. Real-time quantitative polymerase chain reaction and western blotting were used to analyze TMEM9 expression levels in different PCa cell lines. Cell counting, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), and Transwell assay were used to analyze cell proliferation, apoptosis, and PCa cell invasion, respectively. Subcutaneous tumorigenesis in nude mice was used to analyze tumor proliferation *in vivo*. Western blotting was used to analyze the expression of autophagy-related pathway proteins, and transmission electron microscopy and immunofluorescence colocalization were used to determine the colocalization of autophagosomes and lysosomes. ***Results*：**TMEM9 was highly expressed in PCa. The mRNA and protein expression levels of TMEM9 were higher in PCa tissues than in prostatic hyperplasia tissues. The expression of TMEM9 was highest in PC3 cells (human PCa cells) (t=17.150, P<0.01). In TMEM9-knocked down PC3 cells, the proliferation (t=3.165, P<0.05) and invasion (F=76.620, P<0.01) significantly decreased, and apoptosis (t=13.530, P=0.010) significantly increased. After knockdown of TMEM9, the volume (F=1 699.000, P<0.01) and weight (t=9.057, P<0.01) of subcutaneous tumors in nude mice were reduced, and tumor growth was inhibited. TMEM9 regulated the Wnt/β-catenin signaling pathway and inhibited the AKT-mTOR signaling pathway to promote autophagy in PCa cells. ***Conclusion*：**TMEM9 inhibits the AKT-mTOR signaling pathway and promotes the proliferation and invasion of PCa cells through autophagy.

【Key words】transmembrane protein 9; prostate cancer; proliferation; invasion; autophagy

作者介绍：朱辉轩，Email：1269980993@qq.com，研究方向：泌尿系统肿瘤。
通信作者：王德林，Email：wandelin@hospital.cqmu. edu.cn。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250624.1433.006（2025-06-25）

前列腺癌（prostate cancer，PCa）是全球第五大肿瘤死亡原因[1]。2019年研究显示，全球PCa病例为1 410 450例，导致486 840例死亡，使PCa成为全世界中老年男性常见的恶性肿瘤之一[2]。2020年全球癌症统计数据显示，中国PCa的发病率和病死率分别占全球PCa的8.2%和13.6%[3-4]。目前对PCa发生发展过程的具体分子机制阐释尚不完全。因此，进一步探索新的基因功能对揭示PCa发生发展的分子机制、设计合理的治疗药物及判断预后有重要意义。

作为蛋白质中一种独特结构并且在酶活性、信号转导和细胞接触中起重要作用的跨膜蛋白（transmembrane protein，TMEM）因具有多种功能，使其成为理想的药物靶点[5]。TMEM9由6个外显子和5个内含子组成，其编码蛋白质由183个氨基酸组成并且定位于染色体1q41，其蛋白质N端包括3个潜在的N-糖基化位点构成的N端信号肽和胱氨酸域[6]。Kveine M等[7]研究表明TMEM9是一种在细胞内转运功能系统中广泛表达的跨膜蛋白。已有研究证实TMEM家族与结直肠癌[8]、乳腺癌[9]、胶质母细胞瘤[10]、卵巢癌[11]、头颈部鳞状细胞癌[12]、喉癌[13]、胰腺癌[14]、肝细胞癌[15]的发生发展密切相关。目前研究发现TMEM9与肝癌[5]、乳腺肿瘤[16]的发生发展相关，TMEM45B[17]和TMEM158[18]与PCa密切相关。在本研究中探讨了TMEM9基因在PCa细胞增殖和侵袭过程中所起的作用并研究其分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 筛选2016年1月至2021年12月就诊于重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，经病理科确诊为PCa或良性前列腺增生（benign prostatic hyperplasia，BPH）的患者。获取病理科用于病理诊断的剩余石蜡包埋组织并进行切片。纳入标准：①经病理诊断确诊为PCa或BPH的患者；②首次于本院确诊且术前未接受过任何形式治疗的患者；③患者临床资料完整。排除标准：①术前存在任何形式感染的患者；②患者并发其他肿瘤或免疫相关疾病；③患者术前曾接受内分泌治疗、化疗或者其他治疗；④神经内分泌肿瘤的患者。本研究经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准（批号：2022-K234），并取得患者的知情同意。

1.1.2 PCa细胞株 PCa细胞株22RV1、LNCaP、DU145和PC3，购自中国科学院细胞库（中国上海），以上所有细胞均储存于重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心，液氮低温冷冻保存<1年。未经处理细胞为对照组，敲低TMEM9细胞系为实验组（敲低TMEM9基因shTMEM9）。

1.1.3 试剂 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。二氨基联苯胺（diaminobezidin，DAB）试剂购自广州Biosharp生物技术有限公司。苏木素染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。培养基F12-K、DMEM、RPMI-1640、PBS缓冲液、胎牛血清均购自美国Gibco公司。Eastep®总RNA提取试剂盒购自美国Promega公司。PrimeScript™ RT试剂盒购自日本Takara公司，Chamq Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒购自南京诺唯赞生物科技技术股份有限公司。实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative reverse transcription PCR，RT-qPCR）中使用引物购自北京擎科生物有限公司。SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、预制胶和中性树脂胶购自上海碧云天生物技术有限公司。TMEM9兔一抗（ab2576846）购美国Thermo Fisher Scientific公司，对应的羊抗兔二抗（ab205718）购自美国Abcam公司。兔抗人mTOR、兔抗人P-mTOR购美国CST公司。兔抗人Beclin 1购美国Abcam公司。转染所用慢病毒[慢病毒为三保一，其干预片段的序列如下，TMEM9-RNAi（108581-1）：GCTCTTATCTTTGGTGGCTGT；TMEM9-RNAi（108582-1）：ACCACCATCAAGGTCATCATT；TMEM9-RNAi（108583-1）：GACAGTCTTCGATCGGCACAA]购自上海吉凯基因有限公司。Tunel试剂盒（G7130）购自美国promega公司。流氏细胞所用Annexin V Binding Buffer和RNasa A购自上海碧云天生物技术有限公司、Annexin V-FITC Reagent（MBS355858）购自美国MyBoisource公司、PIReagent（E-CK-A161）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.1.4 动物 本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准（动物伦理批号为2022-K234）。动物实验所用裸鼠为4~5周BALB/c雄性裸鼠，购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司，木屑垫料、饲料及饮水均无菌处理。在重庆医科大学动物实验中心IVC实验室进行饲养及实验，动物分为注射PC3细胞作为对照组（n=5），注射敲低TMEM9的PC3细胞为实验组（n=5），均饲养1周后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 TMEM9在泛癌中的表达分析 从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库下载TMEM9的表达谱数据，从中提取了TMEM9在人体34种实体肿瘤样本及对应的癌旁样本中的表达数据，并采用R语言（R 4.3.1）对TMEM9在各肿瘤样本和癌旁样本中的表达差异进行可视化分析。探究TMEM9在泛癌中的表达情况。

1.2.2 临床患者信息收集 收集2016年1月至2021年12月就诊于本院泌尿外科并且行PCa根治术，术后病理诊断为前列腺腺癌的52例PCa患者和30例BPH患者信息、新鲜标本和石蜡标本。所有结果由3名病理科医生鉴定组织标本的临床病理特征。

1.2.3 免疫组化 将脱蜡水化后石蜡切片浸没在预先煮沸的柠檬酸盐缓冲液中抗原修复。将切片滴加3%过氧化氢室温孵育10 min后加山羊血清封闭液，以1∶500的浓度滴加

一抗并覆盖住组织，然后切片放入湿盒内 4 ℃的冰箱过夜。第 2 天取出湿盒内切片，室温复温 30 min 后，磷酸缓冲盐溶液（phosphate-buffered solution，PBS）洗涤。然后滴加可以覆盖组织的链霉菌抗生物素-过氧化物酶二抗溶液，在室温环境下孵育 10 min。然后每张片子滴加约 100 μL 的 DAB 显色溶液，显微镜下观察后苏木素复染，蒸馏水洗涤 15 min 后按照乙醇梯度顺序，将切片依次浸没于乙醇溶液中，最后二甲苯溶液浸泡 30 min 后用中性树脂胶进行封片。封片待胶干后显微镜下拍照，然后采用 Image J（NIH，美国）检测各切片的平均光密度（integrated optical density，IOD）。

1.2.4 细胞培养 使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养 22RV1 细胞。使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养 DU145 细胞。使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养 LNcap 细胞。使用含有 10% 胎牛血清的 Ham's F-12k 完全培养基培养 PC3 细胞。培养环境均为 37 ℃，含 5%CO_2 的细胞培养孵箱。所有细胞均待生长至对数生长期再行后续实验。

1.2.5 总 RNA 提取及 RT-qPCR 使用 Eastep® 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。按照说明书，取 1 μg 总 RNA 使用 PrimeScript™ RT 试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 保存于-20 ℃。使用 Chamq Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 RT-qPCR。反应条件为：95 ℃ 3 min，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环，95 ℃ 5 s，65 ℃ 5 s，95 ℃ 15 s。以 GAPDH 作为内参进行对照。引物序列如下：TMEM9-forward，5'-AACTGCACAATGAGGAGGAGAAT-3'；TMEM9-reverse，5'-CAACCACACCAGCCCATCTAG-3'；GAPDH-forward，5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3'；GAPDH-reverse，5'-GTCATGAGTCCTTCCACGATACC-3'。每个样本做 4 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并分析实验结果。

1.2.6 Western blot 实验 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。5× 蛋白上样缓冲液与蛋白以 1∶4 比例混合后，100 ℃变性 10 min，-20 ℃保存。使用 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白上样和电泳（120 V 恒压电泳）。将电泳后的蛋白转移到 PVDF 膜上（冰盒内转膜，250 mA 恒流转膜）。使用 TBST 缓冲液与 5% 脱脂牛奶（Beyotime，上海）配制的混合液室温封闭抗体 2 h。一抗（1∶2 000）在 4 ℃下摇床孵育过夜。用山羊抗兔 IgG 二抗（1∶5 000）室温孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次（每次 5 min）后使用超敏 ECL 化学发光液（1∶1）对膜处理后进行图像采集。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）作为内参。

1.2.7 慢病毒敲低 PCa 细胞 TMEM9 在 6 孔板中的细胞密度达 50%~70% 时，加入慢病毒，将含有 PC3 细胞的 6 孔板分为 2 组（空载-TMEM9 组和 shTMEM9 敲低组），每组 3 个孔，各组每孔分别加入空载-TMEM9 7 μL、shTMEM9 3 μL（使 MOI 值约为 50），然后分别加入 93 μL 和 97 μL 混合培养基，最后每孔分别加入含有 40 μL HitransG P 的混合培养基 900 μL 补齐至 1 000 μL，继续置于培养箱中。24 h 后更换新的培养基；使用 WB 检测转染效果。

1.2.8 PCa 细胞 CCK-8 实验 取待测对数生长期的细胞，使用胰酶消化成细胞悬液并进行细胞计数。按照 2×10^3 个/孔的密度接种 96 孔板，每组细胞设置 5 个复孔。加入样本完成后放入 37 ℃、5%CO_2 浓度细胞孵箱中培养。吸取原有培养基，每孔以换液方式加入 CCK-8 试剂与培养基混合液 100 μL，37 ℃、5%CO_2 孵箱内孵育 2 h。应用酶标仪检测每孔 450 nm 吸光度（absorbance，A）值并记录，将接种 96 孔板后 24 h 为测定 0 h，同时检测空白孔（PBS+100 μL CCK8 试剂）A 值并记录。以后在同一个时间点检测 A 值，记为 24、48、72、96 h。

1.2.9 PCa 细胞 Transwell 实验 向 Transwell 上室加入 50 μL 稀释后的 Matrigel 基质胶并且 37 ℃细胞孵育箱孵育 1 h 进行激活。取已种板有 PCa 细胞的 6 孔板，用无血清 Ham's F12 k 培养基培养细胞 24 h，胰酶消化下细胞，接着无血清 Ham's F12k 培养基重悬细胞，调整并使细胞密度为 4×10^5 个/mL。取 200 μL 细胞悬液加入上室，下室内加入 600 μL 含 20%FBS 的完全培养基，然后将装有小室的 24 孔板放入 37 ℃、5%CO_2 的细胞孵育箱内孵育。孵育 24 h 后取出小室，用 PBS 液清洗 1 次，含有小室的 24 孔板每孔内加入 600 μL 甲醇固定 30 min。PBS 清洗后拍照。

1.2.10 PCa 细胞 Tunel 染色实验 取处于对数生长期的 shTMEM9-PCa 细胞和 NC-PCa 细胞，弃上清液，加入约 1 mL PBS，轻轻摇晃。洗掉残留培养基中血清。并用 PBS 重复洗涤 2 次。在 6 孔板样品上加入 100 mL TUNEL 检测液 37 ℃避光孵育 60 min。用 PBS 液洗涤 6 孔板内样品 3 次，每次 5 min。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下使用 450~500 nm 的激发波长范围和 515~565 nm 发射波长范围为观察。

1.2.11 BALB/c PC3 细胞裸鼠成瘤动物实验 选择 4~5 周龄 22~25 g 雄性 BALB/c 裸鼠右腿皮下进行接种，使用 75% 的乙醇棉球擦拭并消毒注射部位，然后在裸鼠右臀皮下接种 200 μL PCa 细胞；使用游标卡尺测量并记录 1 次裸鼠皮下肿瘤体积，5 周后使用断颈法处死小鼠，分离皮下肿瘤，进行称重、测量（$V=0.52\times L\times W^2$），L：即肿瘤块的最长直径；W：即与最长径垂直的 1 条最长横径；H：即肿瘤的高度计算。样本放置-80 ℃保存以便后续检测。

1.2.12 裸鼠肿瘤组织 Tunel 实验 将裸鼠肿瘤组织切片放置在实验台上，接着在每片载玻片上滴上 100 μL 的蛋白酶 K 液。室温孵育裸鼠肿瘤组织载玻片 10 min。将裸鼠肿瘤组织载玻片浸没入 PBS 液中，室温放置 5 min。将裸鼠肿瘤组织载玻片浸入甲醛溶液中，室温放置 5 min。再将裸鼠肿瘤组织载玻片浸没入 PBS 液中，室温放置 5 min。最后使用荧光显微镜观察裸鼠肿瘤组织载玻片记录并拍照。

1.2.13 透射电子显微镜观察细胞自噬小体 将待测细胞取出，吸去培养基，不进行漂洗，迅速加入电镜固定液。细胞刮匙刮取细胞到离心管中。1 000 r/min 离心机离心 3 min，弃固定液。加入新的电镜固定液固定 2 h，再转移至 4 ℃保存。送至重庆医科大学生命科学院电镜室制作切片，电镜下观察

并拍照。

1.2.14　激光共聚焦显微镜检测PCa细胞自噬小体和溶酶体细胞共定位　种植细胞至细胞爬片。细胞贴壁后继续培养24 h，取出细胞，吸取培养基，应用PBS摇床清洗3次，每次5 min。4%多聚甲醛进行细胞固定20 min，PBS摇床清洗3次，每次5 min，0.1% Triton-X-100溶液破膜，室温15 min。PBS摇床清洗3次，每次5 min。血清室温封闭1 h，进行一抗孵育。此步骤一抗为兔抗人LC3和鼠抗人LAMP1的混合抗体，根据抗体说明书要求配置相应抗体，并进行混合，两者体积比例为1∶1。一抗4 ℃孵育过夜，24孔板，每孔加入一抗约为100 μL。一抗回收，PBS清洗3次，每次5 min，孵二抗，室温避光孵育1 h，此步骤二抗为鼠抗和兔抗1∶1混合。避光下进行PBS清洗，5 min/次，共洗3次。DAPI染核室温避光孵育5 min。抗荧光淬灭剂封片，共聚焦显微镜观察并拍照，信号参数设置如下：DAPI 405 nm，LC 3 555 nm（标记红光），LAMP 1 647 nm（标记绿光）。

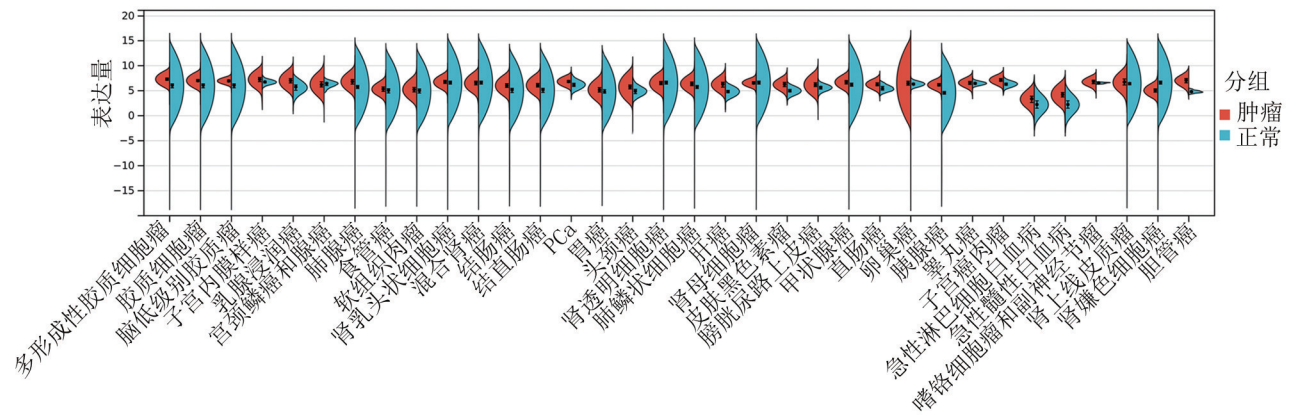
1.3　统计学方法

统计分析使用软件GraphPad Prism 9.0和SPSS 26.0。临床病理特征与TMEM9表达水平的相关性使用Spearman's相关性分析。计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2组间比较采用两独立样本t检验或配对t检验，多组间比较采用方差分析，检验水准α=0.05。

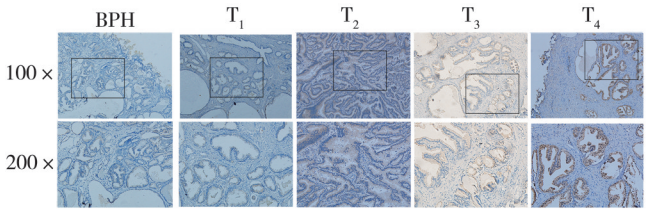
2　结　果

2.1　TMEM9在临床PCa患者标本中的表达

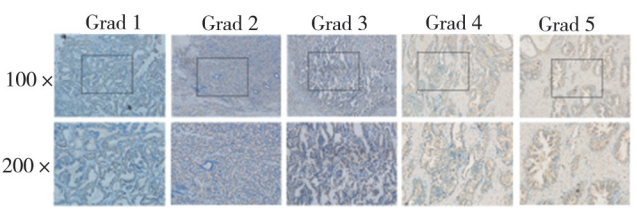
TMEM9在34种不同类型肿瘤中的表达水平显示TMEM9高表达于PCa，不同颜色表示TMEM9在不同组织中的表达量（图1A）。Spearman's相关性分析结果显示：TMEM9的表达水平与T分期呈正相关（图1B、表1，r_s=0.786，P<0.001），而且Gleason评分与TMEM9表达水平也呈现正相关（图1C、表1，r_s=0.691，P<0.001）。WB实验发现TMEM9表达在PCa为0.555±0.065，在BPH为0.135±0.045，差异有统计学意义（图1D，t=17.150，P<0.01）。RT-qPCR结果也显示TMEM9 mRNA在PCa中表达量为1.026±0.216，在BPH中表达量为0.279±0.104，差异有统计学意义（图1E，t=13.720，P<0.01）。



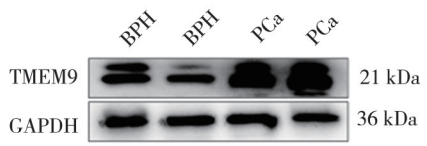
A. TMEM9在34种癌组织中的泛癌分析



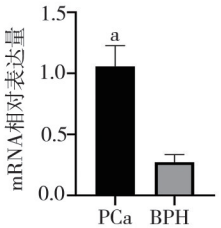
B. TMEM9表达水平与PCa样本T分期的关系



C. TMEM9表达水平与PCa样本Gleason评分的关系



D. WB检测TMEM9在PCa和BPH组织中的蛋白含量



注：n=6；a，与BPH比较，P<0.01

E. qRT-PCR检验TMEM9在PCa和BPH组织中mRNA的含量

图1　TMEM9在PCa及BPH组织中的表达水平

表1　PCa组织中TMEM9表达水平与临床病理指标的相关性（$\bar{x} \pm s$）

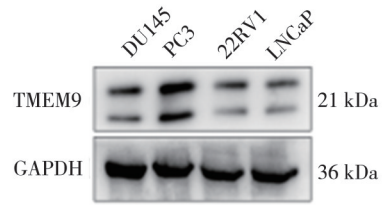
项目	病例数	TMEM9表达	r_s值	P值
T分期			0.786	<0.001
T_1	5	0.20 ± 0.02		
T_2	28	0.21 ± 0.06		
T_3	11	0.28 ± 0.06		
T_4	8	0.30 ± 0.05		
Gleason评分			0.691	<0.001
Grade 1：≤6	5	0.17 ± 0.02		
Grade 2：3+4=7	11	0.21 ± 0.02		
Grade 3：4+3=7	17	0.27 ± 0.04		
Grade 4：=8	9	0.28 ± 0.04		
Grade 5：≥9	10	0.30 ± 0.05		

2.2　TMEM9促进PCa细胞的增殖和侵袭

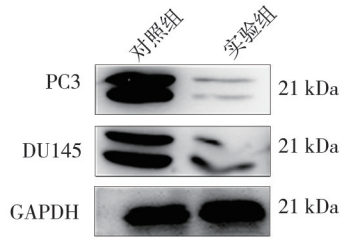
WB结果提示相较于22RV1和LNCaP，PC3的TMEM9蛋白表达量0.605 ± 0.107和DU145的TMEM9蛋白表达量0.306 ± 0.050更高，差异有统计学意义（图2A，F=62.670，P<0.01）。慢病毒转染敲低TMEM9通过WB检验TMEM9蛋白表达量在PC3中为0.200 ± 0.092、DU145为0.142 ± 0.026后（图2B，F=26.740，P<0.01），CCK8测量450 nm的A值发现实验组PC3（图2C，t=2.988，P<0.05）、DU145（图2C，t=3.165，P<0.05）在24、48、72、96 h的A值明显低于对照组。细胞Tunel实验测量光密度，发现实验组PC3为0.983 ± 0.171（对照组为0.573 ± 0.141）、DU145为1.064 ± 0.252（对照组为0.409 ± 0.145）较对照组差异有统计学意义（图2D，PC3：t=10.280，P<0.01；DU145：t=13.530，P<0.01）。接着Transwell实验测量转过基质胶的细胞数量，发现实验组的PC3为（190.500 ± 36.500）个[对照组为（376.000 ± 24.500）个]、DU145为（292.000 ± 13.000）个[对照组为（464.000 ± 46.000）]更少，差异有统计学意义（图2E，F=76.620，P<0.01）。

2.3　TMEM9对PCa的PC3细胞体内成瘤能力的影响

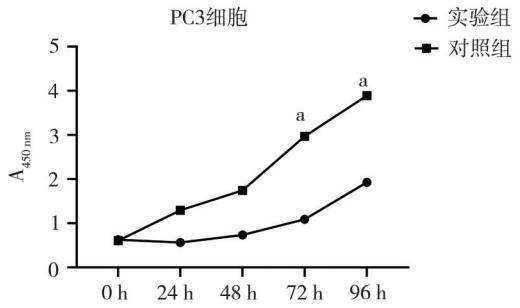
裸鼠成瘤中实验组肿瘤组织体积更小（图3A，F=1 699.000，P<0.01），同时实验组肿瘤重量（0.191±0.068）g较对照组重量（0.339 ± 0.051）g更轻，差异有统计学意义（图3B，t=9.057，P<0.01）。免疫组化测量平均光密度提示实验

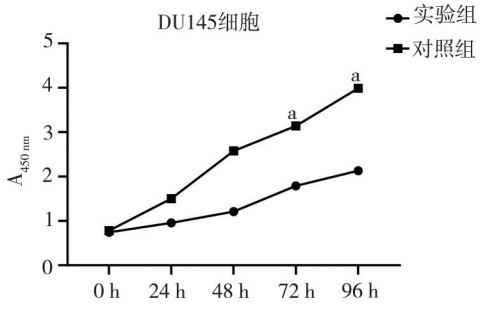


A. WB检测PC3、22RV1、DU145和LNCaP细胞中TMEM9表达量



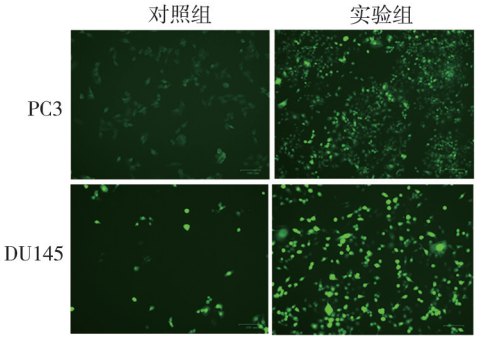
B. WB检测慢病毒敲低PCa细胞TMEM9效果



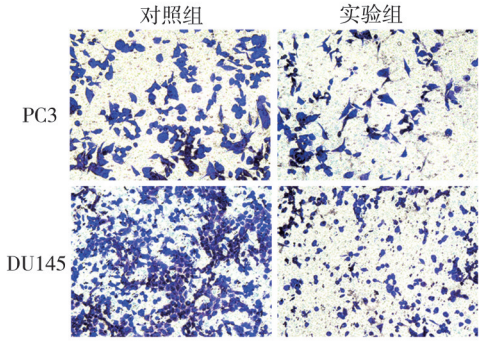


注：a，与实验组比较，P<0.05

C. 慢病毒敲低PCa细胞TMEM9后细胞CCK8



D. 慢病毒敲低PCa细胞TMEM9后Tunel实验（200×）



E. 慢病毒敲低PCa细胞TMEM9后细胞侵袭实验（200×）

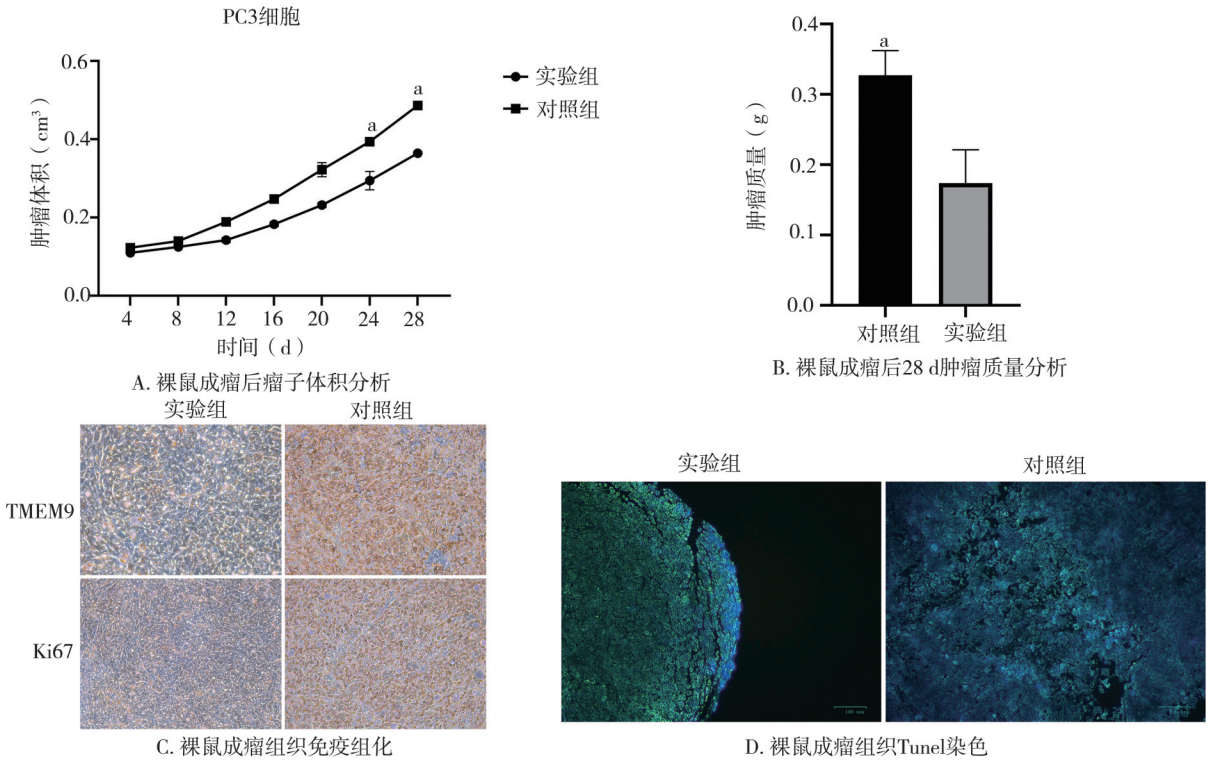
图2　TMEM9在PCa细胞中的表达水平以及促癌水平验证

组的TMEM9为0.102±0.029（对照组为0.201 ± 0.056）、Ki67为0.057 ± 0.032（对照组为0.166 ± 0.047）表达量更低，差异有统计学意义（图3C，TMEM9：t=5.274，P<0.01；Ki67：t=5.742，P<0.01）。Tunel染色测量合成点光密度，实验组0.955 ± 0.166较对照组0.567 ± 0.135更多，差异有统计学意义（图3D，t=10.350，P<0.01）。说明敲低TMEM9可抑制裸鼠皮下肿瘤的增殖能力。

2.4 TMEM9促进PCa增殖和侵袭的机制

WB实验发现实验组PC3细胞WNT4蛋白表达量为0.255 ± 0.120（对照组为2.715±0.155）、β-catenin为0.255 ± 0.120（对照组为0.389±0.068）更低，差异有统计学意义（图4A，F=63.350，P<0.01），同时WB实验还发现实验组PC3细胞p-AKT/AKT为0.935 ± 0.063（对照组为0.162 ± 0.051）、p-mTOR/mTOR为0.815 ± 0.060（对照组为0.125 ± 0.027）比值更高，差异有统计学意义（图4B，F=31.370，P<0.01），进一步检测自噬相关蛋白发现实验组PC3细胞中LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值为0.269 ± 0.064（对照组为1.555 ± 0.123）更高，而对照组中自噬相关蛋白ATG5的表达量为2.401 ± 0.289（实验组为1.251 ± 0.239）却更高，差异有统计学意义（图4C，F=206.900，P<0.01），说明TMEM9可以抑制AKT-mTOR信号通路相关蛋白的产生从而促进自噬。应用透射电镜检测细胞膜内黑色圆球自噬小体，发现实验组自噬小体数量（5.500 ± 1.500）个少于对照组（13.500 ± 2.500）个，差异有统计学意义（图4D，t=8.979，P<0.01），并且免疫荧光检测Merge黄色颗粒部分自噬溶酶体数量在实验组PC3细胞中为（24.000 ± 3.000）个少于对照组（44.500 ± 3.500）个，差异有统计学意义（图4E，t=18.180，P<0.01），表明TMEM9可以促进PCa细胞自噬。

通过WB实验也发现对照组WNT4表达量2.770 ± 0.140（实验组1.265 ± 0.145）、βcatenin表达量2.850 ± 0.270（实验组0.250 ± 0.075）更高（图5A，F=98.080，P<0.01），同时在PCa中WNT4表达量2.960 ± 0.210（BPH1.365 ± 0.085）、β-catenin表达量1.805 ± 0.185（BPH0.160 ± 0.050）也更高（图5B，F=700.500，P<0.01）。WB实验还发现实验组p-AKT/AKT为0.923 ± 0.087（对照组为0.123 ± 0.011）、p-mTOR/mTOR为1.146 ± 0.175（对照组为0.173 ± 0.039）比值更高（图5C，F=14.740，P<0.01），在PCa组织中p-AKT/AKT为0.106 ± 0.015（BPH为2.744 ± 0.232）、p-mTOR/mTOR为0.057 ± 0.023（BPH为3.359 ± 0.372）比值却更低（图5D，F=16.580，P<0.01），接着进一步检测自噬相关蛋白发现实验组中LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值为0.886 ± 0.010（对照组为1.051 ± 0.068）且ATG5的表达量为1.016 ± 0.117（对照组为2.052 ± 0.107）更低（图5E，F=217.300，P<0.01），而在PCa组织中LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值为1.001 ± 0.130（BPH为0.551 ± 0.162）且ATG5的表达量为3.060 ± 0.273（BPH为1.579 ± 0.336）却更高（图5F，F=491.800，P<0.01），进一步说明TMEM9促进PCa的发生发展与WNT4/β-catenin信号通路相关并且可通过抑制AKT-mTOR信号通路促进自噬来实现。



A. 裸鼠成瘤后瘤子体积分析

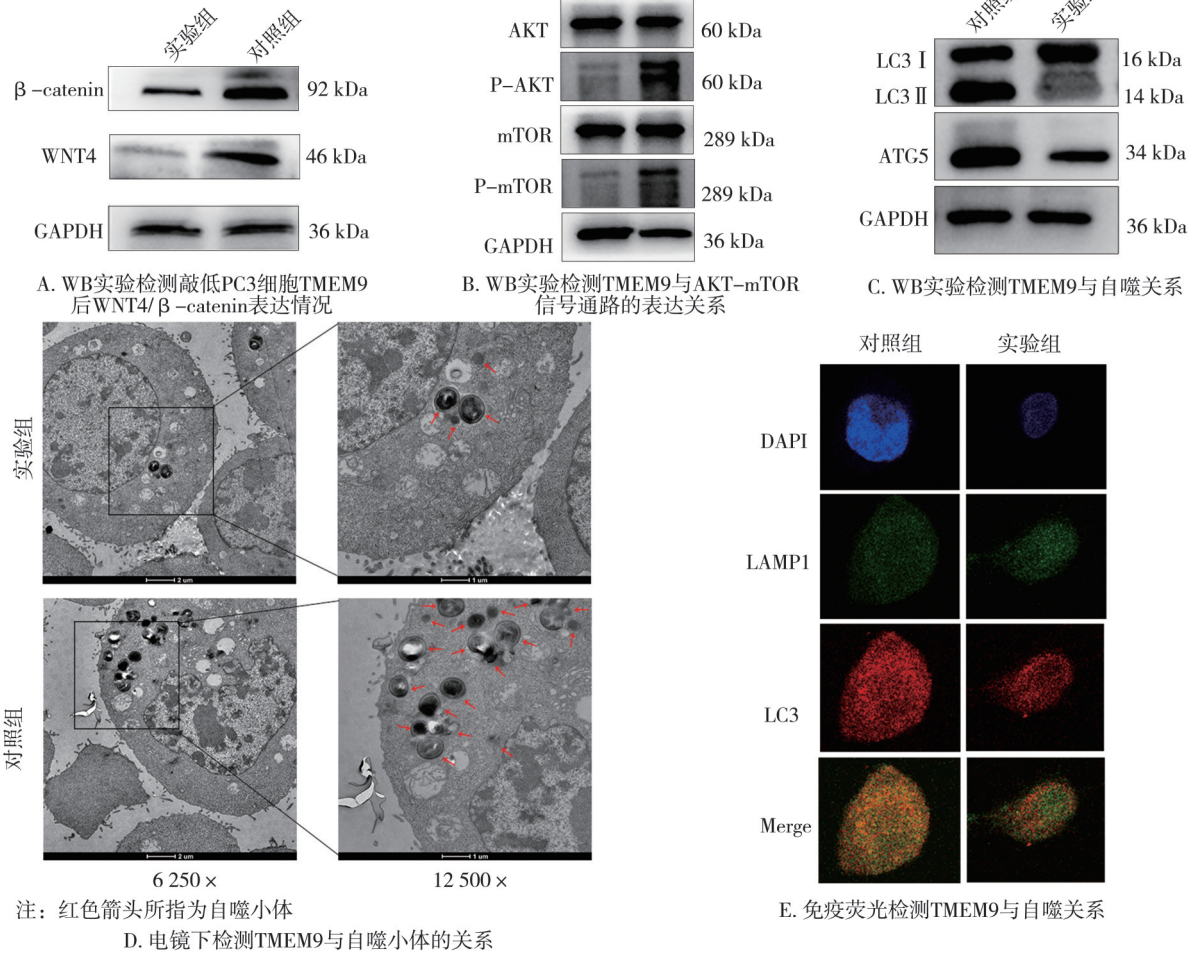
B. 裸鼠成瘤后28 d肿瘤质量分析

C. 裸鼠成瘤组织免疫组化

D. 裸鼠成瘤组织Tunel染色

注：n=12；a，与实验组比较，P<0.01

图3 TMEM9在裸鼠成瘤水平的验证



A. WB实验检测敲低PC3细胞TMEM9后WNT4/β-catenin表达情况

B. WB实验检测TMEM9与AKT-mTOR信号通路的表达关系

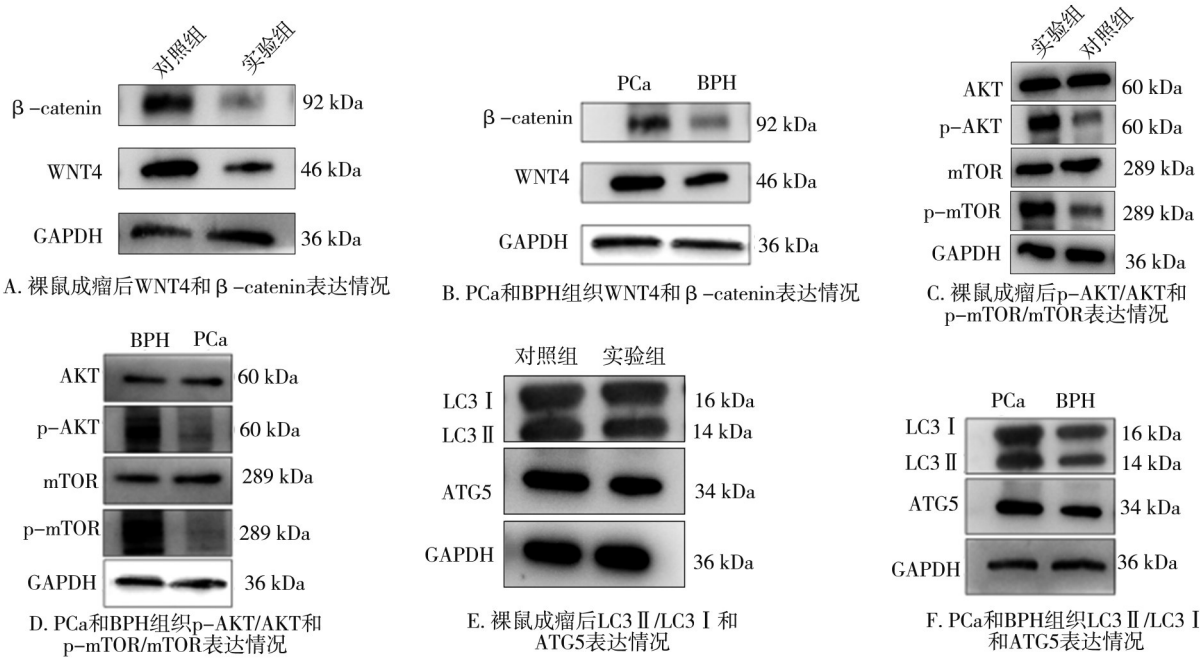
C. WB实验检测TMEM9与自噬关系

注：红色箭头所指为自噬小体

D. 电镜下检测TMEM9与自噬小体的关系

E. 免疫荧光检测TMEM9与自噬关系

图4　TMEM9促进PCa细胞发展的机制



A. 裸鼠成瘤后WNT4和β-catenin表达情况

B. PCa和BPH组织WNT4和β-catenin表达情况

C. 裸鼠成瘤后p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR表达情况

D. PCa和BPH组织p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR表达情况

E. 裸鼠成瘤后LC3Ⅱ/LC3Ⅰ和ATG5表达情况

F. PCa和BPH组织LC3Ⅱ/LC3Ⅰ和ATG5表达情况

图5　TMEM9促进PCa发展的机制

3 讨 论

在本研究中，通过泛癌分析、临床PCa组织的IHC、RT-qPCR、Western blot等实验发现在PCa组织中TMEM9高表达，而在BPH组织中TMEM9的表达明显降低，并通过CCK8、Transwell实验等分析其增殖、侵袭能力，发现TMEM9与PC3细胞的增殖、侵袭成正相关关系。并且敲低TMEM9后细胞凋亡率明显增高。TMEM9对PCa发生发展的促进作用同样在裸鼠体外成瘤模型中得到了验证。

Jung YS等[19]研究发现液泡-ATP酶激活Wnt/β-catenin信号通路促进肠道肿瘤发生与TMEM9相关，并提出在结直肠癌治疗上可以阻断TMEM9-v-ATPase作为可行的选择。有研究表明在PCa干细胞或祖细胞中，Wnt/β-catenin信号促进细胞自我更新或扩张[20]。并且WNT/β-Catenin信号通路与AKT/mTOR信号级联反应的激活有关，阻断AKT/mTOR通路导致WNT/β-Catenin信号通路异常激活[21]。通过WB实验本课题组也发现在PCa中TMEM9与WNT4/β-catenin信号通路相关。

AKT/mTOR信号通路已被证实是调节细胞自噬的主要通路，mTOR直接参与调节主要细胞自噬蛋白的活动，其上游调控因子只有PI3K/AKT轴，它能够整合来自细胞环境的信号通路，最终调节细胞自噬反应[22]。Baek S等[23]发现TMEM9可以和Beclin1之间相互作用使自噬抑制伴侣Bcl-2与Beclin1分离，从而激活LC3非依赖性和Rab9依赖性选择性自噬来调节替代自噬。Zhang S等[16]研究结果揭示了溶酶体TMEM9-v-ATPase-Ragulator-Rag轴对于mTOR信号完整性和乳腺癌细胞增殖至关重要，并且TMEM9可以作为生物标志物和分子靶点，可以克服mTORi抗性并为TMEM9相关乳腺癌提供可行的治疗策略。同时在胰腺癌[24]、头颈部鳞状细胞癌[25]、结肠癌[26]、膀胱癌[27]以及甲状腺未分化癌[28]中自噬的发生都与AKT-mTOR信号通路密切相关。

Liu Y等[29]研究表明成骨细胞分泌的外泌体miR-140-3p通过靶向ACER2激活AKT/mTOR通路抑制自噬，并在体外促进PCa细胞的进程。而且Kohvakka A等[30]研究也表明在PCa中长链非编码RNA对翻译的抑制作用是通过减少AKT的激活和抑制mTORC1通路来介导的，这都表明PCa的发生发展与AKT-mTOR信号通路的抑制密切相关。本课题组通过细胞电镜、免疫荧光及WB等实验也发现敲低TMEM9的PC3细胞中LC3I向LC3Ⅱ转换减少、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值降低、自噬相关蛋白ATG5的表达下调，均表明TMEM9可抑制AKT-mTOR信号通路并通过自噬促进PCa发生发展。

综上所述，TMEM9是PCa发生发展中的关键促癌基因，高表达于PCa组织，慢病毒敲低TMEM9后对PCa细胞的增殖、侵袭起到抑制作用，TMEM9促进PCa的发生发展与Wnt/β-catenin信号通路有关，TMEM9可以抑制AKT-mTOR信号通路使LC3I向LC3Ⅱ转换增多、自噬相关蛋白ATG5的表达上调促进PCa发生发展。但是在PCa中TMEM9与Wnt/β-catenin信号通路具体关系及TMEM9通过AKT-mTOR信号通路促进PCa发生发展的详细机制未深入探讨存在不足。

参 考 文 献

[1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2023, 73(1): 17-48.

[2] Huang Q, Zi H, Luo L, et al. Secular trends of morbidity and mortality of prostate, bladder, and kidney cancers in China, 1990 to 2019 and their predictions to 2030[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 1164.

[3] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J(Engl), 2021, 134(7): 783-791.

[4] Liu JZ, Dong L, Zhu YJ, et al. Prostate cancer treatment-China's perspective[J]. Cancer Lett, 2022, 550: 215927.

[5] Zhang Y, Ran Y, Xiong Y, et al. Effects of TMEM9 gene on cell progression in hepatocellular carcinoma by RNA interference[J]. Oncol Rep, 2016, 36(1): 299-305.

[6] Wei W, Jiang F, Liu XC, et al. TMEM9 mediates IL-6 and IL-1β secretion and is modulated by the Wnt pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 63: 253-260.

[7] Kveine M, Tenstad E, Døsen G, et al. Characterization of the novel human transmembrane protein 9 (TMEM9) that localizes to lysosomes and late endosomes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297(4): 912-917.

[8] Jung YS, Stratton SA, Lee SH, et al. TMEM9-v-ATPase activates Wnt/β-catenin signaling *via* APC lysosomal degradation for liver regen-

eration and tumorigenesis[J]. Hepatology, 2021, 73(2): 776-794.

[9] Zhang Z, Shang J, Dai Z, et al. Transmembrane protein 170B is a prognostic biomarker and associated with immune infiltrates in pancreatic adenocarcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 848391.

[10] Zhang L, Wu F, Zhao J. Transmembrane protein 45A regulates the proliferation, migration, and invasion of glioma cells through nuclear factor kappa-B[J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(9): 900-907.

[11] Zhang Z, Shang J, Dai Z, et al. Transmembrane protein 170B is a prognostic biomarker and associated with immune infiltrates in pancreatic adenocarcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 848391.

[12] Li J, Chen W, Luo L, et al. The microRNA miR-29c-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting TMEM98 in head and neck carcinoma[J]. Aging(Albany NY), 2020, 13(1): 769-781.

[13] Song F, Yang Y, Liu J. MicroRNA-548ac induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma cells by targeting transmembrane protein 158[J]. Oncol Lett, 2020, 20(4): 69.

[14] Fu Y, Yao N, Ding D, et al. TMEM158 promotes pancreatic cancer aggressiveness by activation of TGFβ1 and PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 2761-2775.

[15] Cai L, Du Y, Song K, et al. Transmembrane protein 88 suppresses hepatocellular carcinoma progression and serves as a novel prognostic factor[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1148498.

[16] Zhang S, Lee SH, Nie L, et al. Lysosomal TMEM9-LAMTOR4-controlled mTOR signaling integrity is required for mammary tumorigenesis[J]. Cancer Commun(Lond), 2023, 43(1): 159-163.

[17] Luo F, Yang K, Wang YZ, et al. TMEM45B is a novel predictive biomarker for prostate cancer progression and metastasis[J]. Neoplasma, 2018, 65(5): 815-821.

[18] Huang J, Liu W, Zhang D, et al. TMEM158 expression is negatively regulated by AR signaling and associated with favorite survival outcomes in prostate cancers[J]. Front Oncol, 2022, 12: 1023455.

[19] Jung YS, Jun S, Kim MJ, et al. TMEM9 promotes intestinal tumorigenesis through vacuolar-ATPase-activated Wnt/β-catenin signalling[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(12): 1421-1433.

[20] Murillo-Garzón V, Kypta R. WNT signalling in prostate cancer [J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(11): 683-696.

[21] Wang H, Liu Y, Wang D, et al. The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases[J]. Cells, 2019, 8(12): e1597.

[22] Daisy Precilla S, Biswas I, Kuduvalli SS, et al. Crosstalk between PI3K/AKT/mTOR and WNT/β-Catenin signaling in GBM-Could combination therapy checkmate the collusion? [J]. Cell Signal, 2022, 95: 110350.

[23] Baek S, Chang JW, Yoo SM, et al. TMEM9 activates Rab9-dependent alternative autophagy through interaction with Beclin1[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 322.

[24] Wang G, Dai S, Chen J, et al. USP19 potentiates autophagic cell death *via* inhibiting mTOR pathway through deubiquitinating NEK9 in pancreatic cancer[J]. Cell Death Differ, 2025, 32(4): 702-713.

[25] Fang S, Wang J, Liu T, et al. SAR1A induces cell growth and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell carcinoma: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Biomedicines, 2024, 12(11): 2477.

[26] Kim HB, Choi WY, Kim SH, et al. GNAO1 A novel tumor suppressor gene in colorectal cancer pathogenesis[J]. Anticancer Res, 2024, 44(12): 5425-5433.

[27] Li ZZ, Li JY, Cao QF, et al. Transcription factor TCF7L1 targeting HSPB6 is involved in EMT and PI3K/AKT/mTOR pathways in bladder cancer[J]. J Biol Chem, 2025, 301(1): 108024.

[28] Dai B, Xu L, Rong S, et al. YTHDF2 promotes anaplastic thyroid cancer progression by activating the DDIT4/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Biol Direct, 2024, 19(1): 122.

[29] Liu Y, Chen S, Guo K, et al. Osteoblast-derived exosomal miR-140-3p targets ACER2 and increases the progression of prostate cancer *via* the AKT/mTOR pathway-mediated inhibition of autophagy[J]. FASEB J, 2024, 38(23): e70206.

[30] Kohvakka A, Sattari M, Nättinen J, et al. Long noncoding RNA EPCART regulates translation through PI3K/AKT/mTOR pathway and PDCD4 in prostate cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2024, 31(10): 1536-1546.

（收稿：2024-12-31；修回：2025-03-25；录用：2025-05-13）

（责任编辑：曾　玲）

本文引用格式：

朱辉轩，苏　帅，张金栋，等. TMEM9通过影响自噬促进前列腺癌增殖及侵袭[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(9)：1281-1289.