DOI:10.16016/j.1000-5404.201902004

LAPTM4B 在胶质瘤组织中表达及对细胞增殖和侵袭力的影响

赵 岗[1],张哲莹[2],杜宝顺[1],王 阳[1],马 欢[1] 453000 河南 新乡,河南省新乡市中心医院神经外科[1];453000 河南 新乡,新乡医学院基础医学院病理教研室[2]

[摘要] **目的** 检测胶质瘤组织中溶酶体相关 4 次跨膜蛋白 B(lysosome-associated protein transmembrane-4 beta,LAPTM4B)蛋白表达,探讨其对细胞增殖和侵袭力的影响以及与患者预后的相关性。**方法** 选取 2011 年 6 月至 2015 年 6 月在新乡市中心医院行手术切除的胶质瘤患者 86 例,术后随访,随访截止时间 2018 年 6 月 30 日。选取同期正常脑组织 25 例,免疫组化(SP 法)检测胶质瘤和正常脑组织中 LAPTM4B 蛋白表达,生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-Rank 检验,影响患者预后的风险因素分析采用 Cox 比例风险模型分析,培养 U251 细胞并分为 siRNA-LAPTM4B 组、siRNA-NC 组和空白组,实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 LAPTM4B 表达,MTT 法和克隆形成实验检测细胞增殖能力,Transwell 法检测细胞迁移和侵袭力,Western blot 检测细胞中 LAPTM4B、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达。**结果** LAPTM4B 蛋白在胶质瘤组织中的阳性表达率为 77.91%,高于正常脑组织中的 28.00%($P<0.001$);LAPTM4B 蛋白阳性表达率在不同 WHO 分级差异有统计学意义($P<0.05$);Kaplan-Meier 生存分析结果显示,LAPTM4B 蛋白阳性表达组患者中位生存时间和累积生存率低于 LAPTM4B 蛋白阴性表达组($P=0.002$);Cox 比例风险模型分析结果显示,WHO 分级和 LAPTM4B 蛋白表达是影响胶质瘤患者预后的风险因素($P<0.05$);与 siRNA-NC 组和空白组比较,siRNA-LAPTM4B 组细胞中 LAPTM4B mRNA 和蛋白相对表达量降低($P<0.05$),24、48、72、96 h 时光密度值及细胞克隆数、迁移细胞数、侵袭细胞数、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达量均降低,而 E-cadherin 蛋白表达量升高($P<0.05$)。**结论** LAPTM4B 蛋白在胶质瘤组织中高表达,促进细胞增殖和侵袭,其机制可能与上皮-间质转化有关。LAPTM4B 蛋白表达高低与胶质瘤患者生存有关。

[关键词] 胶质母细胞瘤;LAPTM4B;增殖;迁移;侵袭
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R730.264 [文献标志码] A

Expression of LAPTM4B in glioma tissues and its effect on cell proliferation and invasion

ZHAO Gang[1], ZHANG Zheying[2], DU Baoshun[1], WANG Yang[1], MA Huan[1] [1]Department of Neurosurgery, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan Province, 453000; [2]Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, 453000, China

[**Abstract**] **Objective** To detect the protein expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in glioma tissues, and to determine its effect on cell proliferation and invasiveness and its correlation with prognosis. **Methods** A total of 86 glioma patients who underwent surgical resection in our hospital from June 2011 to June 2015 were recruited in this study, and they were followed up till June 30, 2018. In the same period, 25 cases of normal brain tissues were selected. Immunohistochemical assay (SP) was used to detect LAPTM4B protein expression in gliomas and normal brain tissues. Kaplan-Meier analysis and Log-Rank test were performed for survival analysis. Cox proportional

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(192102310362)
[通信作者] 张哲莹,E-mail:dbszzy@gmail.com
[网络首发] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.r.20190313.1718.011.html

hazards model analysis was carried out for risk factors affecting prognosis. U251 cells were cultured and divided into siRNA-LAPTM4B group, siRNA-NC group and blank group. The expression of LAPTM4B in the cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Cell proliferation was detected by MTT assay and colony formation assay. Cell migration and invasion was detected by Transwell assay. The protein levels of LAPTM4B, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blotting. **Results** The positive rate of LAPTM4B protein was 77.91% in glioma tissues, which was higher by 28.00% than that in the normal brain tissues ($P<0.001$). The positive expression rate of LAPTM4B protein had statistical difference with different WHO grades ($P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the median survival time and cumulative survival rate were significantly lower in the LAPTM4B-positive group than the negative group ($P=0.002$). Cox proportional hazard model analysis indicated that WHO classification and LAPTM4B protein expression were risk factors for prognosis of glioma patients ($P<0.05$). Compared with the siRNA-NC group and the blank group, the relative expression of LAPTM4B at mRNA and protein levels were decreased in the siRNA-LAPTM4B group ($P<0.05$), and the cell proliferation at 24, 48, 72 and 96 h, the numbers of cellular clone, migrated cells and invasive cells, and protein levels of N-cadherin and Vimentin were decreased, while the level of E-cadherin protein was increased in the siRNA-LAPTM4B group (all $P<0.05$). **Conclusion** LAPTM4B protein is highly expressed in glioma tissues, and promotes cell proliferation and invasion, which may be associated with epithelial-mesenchymal transition. Its expression level is correlated with prognosis of the patients.

[**Key words**] glioblastoma; LAPTM4B; proliferation; migration; invasion

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Research of Henan Province (192102310362). Corresponding author: ZHANG Zheying, E-mail: dbszzy@gmail.com

胶质瘤是颅内高发恶性肿瘤,侵袭力强、易复发、病死率高是其主要特点[1],尽管现有的手术及辅助放化疗手段不断进步,但患者总体预后依然较差[2]。研究表明,侵袭性生长是导致胶质瘤预后不佳的主要因素[3]。因此,深入探索与胶质瘤恶性生物学行为相关的靶标基因,对指导治疗及改善患者预后具有重要意义。

溶酶体相关 4 次跨膜蛋白 B(lysosome-associated protein transmembrane-4 beta, LAPTM4B)是新近发现的一种具有癌基因特性的基因,广泛存在于机体内,在调控细胞增殖、分化、迁移、侵袭及凋亡中发挥重要作用[4],在多种恶性肿瘤组织中呈高表达,参与了肿瘤发生、进展及转移浸润过程[5-7]。本研究检测胶质瘤组织中 LAPTM4B 蛋白表达,探讨其与临床指标及预后的关系,并观察其对胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡及侵袭力的影响,以期为胶质瘤机制研究提供基础资料。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2011 年 6 月至 2015 年 6 月在新乡市中心医院行手术切除的胶质瘤患者 86 例,术前未接受放化疗,术后病理学检查确诊。其中,男性 51 例,女性 35 例,年龄 20~69(47.25±10.64)岁,根据 WHO 分级标准[8]:Ⅰ级 10 例,Ⅱ级 26,Ⅲ级 22 例,Ⅳ级 28 例。同期,选取因脑外伤行颅内减压患者 25 例作为对照,男性 13 例,女性 12 例,年龄 20~65(46.85±11.21)岁,两组患者性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。术中留取胶质瘤组织和正常脑组织。所有患者术后进行随访,随访形式包括电话、门诊复查,随访截止时间 2018 年 6 月 30 日,以死亡作为终点事件,随访中,失访 5 例,随访率 94.19%。

1.2 主要试剂

免疫组化试剂盒及配套试剂购自北京中衫金桥生物,兔抗人 LAPTM4B 一抗购自 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗和 DMSO 购自 Sigma 公司,U251 细胞购自中科院上海生科院细胞资源中心,DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、链霉素和链霉素购自 Gibico 公司,Lipofectamine 2000 转染试剂和 TRIzol 总 RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司,LAPTM4B 干扰序列(siRNA-LAPTM4B)和阴性对照序列(siRNA-NC)由上海美轩生物科技有限公司构建,反转录和 PCR 试剂购自 Promega 公司,LAPTM4B 和 GAPDH 由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,MTT 购自上海炎熙生物科技公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,Matrigel 基质胶购自 BD 公司,兔抗人 E-cadherin、

N-cadherin 及 Vimentin 一抗购自 Proteintech 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 采用 S-P 法检测 LAPTM4B 的表达情况。采用半定量法判定结果[9]:①染色强度:按无染色、浅黄色、黄色、黄褐色分别赋予 0、1、2、3 分;②阳性细胞百分比:按<5%、5%~25%、25%~50%、50%~75%、>75%分别赋予 0、1、2、3、4 分。将①×②得分判定结果,0~3 分为阴性(-),≥4 分为阳性(+)。每个病理切片均由病理科 2 位具有副主任医师职称的医师盲法完成观察。

1.3.2 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中对 U251 细胞培养。胰酶消化,传导培养,待细胞融合度在 80%以上时,分组转染。①siRNA-LAPTM4B 组:按照小分子干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)技术操作步骤,利用 Lipofectamine 2000 转染试剂转染 LAPTM4B siRNA 序列:正义链:5′-GGAUCAGUAUAACUUUUCATT-3′,反义链:5′-UGAAAAGUUAUACUGAUCCGG-3′;②siRNA-NC 组:方法同 siRNA-LAPTM4B 组,转染阴性对照序列:正义链:5′-GAAUUAAUUAAAGAUGGCCCGUUGUACU-3′,反义链:5′-UCAUCGAAGUUAUAGGGAUACAUUACGUGAUC-3′;③空白组:不作任何处理。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 技术检测 用总 RNA 提取试剂提取细胞中总 RNA,使用紫外分光光度计检测纯度。按反转录试剂盒说明反转录为 cDNA,使用实时荧光定量 PCR 仪按 PCR 试剂盒说明对引物扩增。引物序列:上游:5′-TGTTACCAGCAATGACACTACG-3′,下游:5′-ATGTCTGCAAAGTCAAGCTG-3′;GAPDH:上游:5′-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3′,下游:5′-GACGGTGCCATGGAATTT-3′。反应条件:95 ℃ 3 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,75 ℃ 30 s,连续循环 38 次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞中 LAPTM4B mRNA 相对表达量。

1.3.4 MTT 细胞增殖实验 收集各组转染 24 h 细胞,消化,接种于 96 孔板,细胞数为 2×10^4/孔,继续在 37 ℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养。分别于 12、24、48、72、96 h 时,各孔中加入 MTT 液(5 mg/mL)50 μL,室温培养 5 h,弃去培养液,加入 DMSO,充分震荡使结晶物充分溶解,用酶标仪检测各孔在 490 nm 波长处光密度值[D(490)]。

1.3.5 肿瘤细胞克隆形成实验 各组细胞转染后培养 48 h,胰酶消化,1 000 r/min 离心 15 min,取沉淀,用完全培养液重悬,细胞数为 500/mL,取 1×10^3 个细胞均匀平铺于塑料培养皿中,在 37 ℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养,2 周后,用甲醇和冰醋酸混合液固定,结晶紫染色,倒置显微镜观察,以≥50 个细胞集落为 1 个克隆,计数克隆数。

1.3.6 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力 细胞迁移能力检测:各组细胞转染后培养 48 h,胰酶消化,离心,无血清培养液重悬,细胞数为 5×10^5/mL,取 200 μL 加入上室,下室加入含 20%血清培养液 600 μL,在 37 ℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养 24 h,甲醛固定,结晶紫染色,显微镜观察,计数穿膜细胞数。细胞侵袭力检测:将基质胶用预冷无血清培养液稀释后,加入 Transwell 小室上室,风干备用,其余步骤同细胞迁移能力检测。

1.3.7 蛋白质提取以及 Western blot 检测 使用总蛋白提取试剂盒提取各组细胞中总蛋白,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白,行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉封闭 60 min,TBST 冲洗 3 次,加入兔抗人 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 抗体一抗,4 ℃ 下过夜孵育,TBST 冲洗 3 次,加入二抗,室温孵育 120 min,TBST 冲洗 3 次,暗室下加入 ECL 液反应 10 min,拍照,使用 Image J 图像分析软件,以 β-actin 为参考分析各目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件分析,每项实验至少重复 3 次,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和 LSD-t 检验;计数资料采用率值表示,组间比较采用 χ^2 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-Rank 检验,影响患者预后的风险因素分析采用 Cox 比例风险模型分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

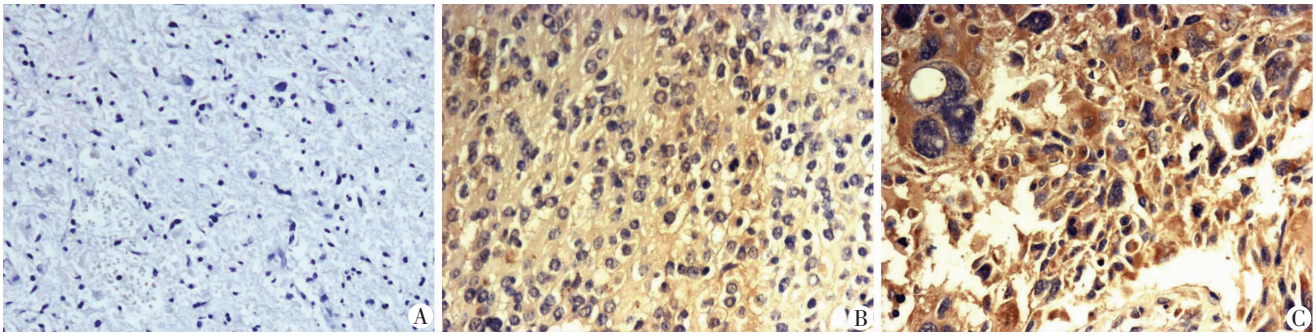
2 结果

2.1 胶质瘤组织中 LAPTM4B 蛋白表达

LAPTM4B 蛋白阳性表达主要定位于胶质瘤及正常脑组组的细胞质中。在胶质瘤组织中的阳性表达率为 77.91%(67/86),而正常脑组织中则为 28.00%(7/25),差异有统计学意义($\chi^2=21.710$,$P<0.001$,图 1)。

2.2 LAPTM4B 在胶质瘤组织中表达与临床病理特征的关系

不同性别、不同年龄、不同肿瘤位置、不同 KPS 评分的 LAPTM4B 蛋白阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$),不同 WHO 分级的 LAPTM4B 蛋白阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。



A:LAPTM4B 蛋白在正常脑组织阴性表达;B:LAPTM4B 蛋白在Ⅰ和Ⅱ级胶质瘤组织中弱表达;C:LAPTM4B 蛋白在Ⅲ和Ⅳ级胶质瘤组织中强表达

图 1　LAPTM4B 蛋白在胶质瘤和正常脑组织中表达　(S-P ×200)

表 1　LAPTM4B 在胶质瘤组织中表达与临床病理特征间关系[例(%)]

临床病理特征	例数	LAPTM4B 蛋白		χ^2 值	*P* 值
		+	−		
性别				0.150	0.698
男性	51	39(76.47)	12(23.53)		
女性	35	28(80.00)	7(20.00)		
年龄/岁					
≥48	54	43(79.63)	11(20.37)	0.250	0.617
<48	32	24(75.00)	8(25.00)		
肿瘤位置					
小脑幕上	68	52(76.47)	16(23.53)	0.389	0.533
小脑幕下	18	15(83.33)	3(16.67)		
肿瘤大小/cm					
≥3	56	45(80.36)	11(19.64)	0.560	0.454
<3	30	22(73.33)	8(26.67)		
WHO 分级					
Ⅰ~Ⅱ级	36	23(63.89)	13(36.11)	7.069	0.008
Ⅲ~Ⅳ级	50	44(88.00)	6(12.00)		
KPS 评分/分					
≥80	38	31(81.58)	7(18.42)	0.533	0.465
<80	48	36(75.00)	12(25.00)		

2.3　LAPTM4B 蛋白表达与胶质瘤患者预后的关系

81 例患者术后随访时间 1~54 个月,中位随访时间 13.2 个月。Kaplan-Meier 生存分析结果显示,LAPTM4B 蛋白阳性表达组患者中位生存时间 11 个月,累积生存率 3.1%,LAPTM4B 蛋白阴性表达组患者中位生存时间 19 个月,累积生存率 29.4%,Log-Rank 检验差异有统计学意义($\chi^2=9.309$,$P=0.002$,图 2)。

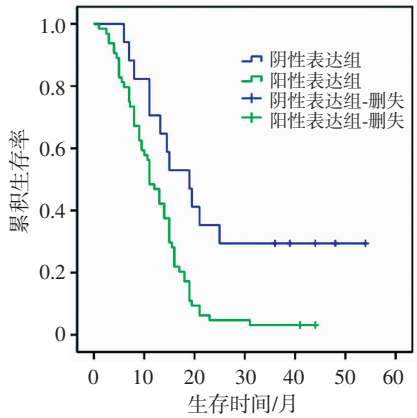


图 2　LAPTM4B 蛋白表达对胶质瘤患者预后的影响

2.4　Cox 比例风险模型分析影响胶质瘤患者预后的因素

Cox 比例风险模型分析结果显示,WHO 分级和 LAPTM4B 蛋白表达是影响胶质瘤患者预后的风险因素($HR=2.614$ 和 1.969,$P<0.05$),见表 2。

2.5　3 组细胞中 LAPTM4B 基因表达

LAPTM4B mRNA 在 siRNA-LAPTM4B 组、siRNA-NC 组和空白组细胞中相对表达量分别为(0.17±0.07)、(1.03±0.05)和(1.00±0.02),差异有统计学意义($F=568.784$,$P<0.001$),LAPTM4B mRNA 在 siRNA-NC 组和空白组细胞中相对表达量无差异($P=0.344$),LAPTM4B mRNA 在 siRNA-LAPTM4B 组细胞中相对表达量低于 siRNA-NC 组和空白组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.6　LAPTM4B 对胶质瘤细胞增殖活力的影响

MTT 实验结果显示,3 组细胞 12 h 时 D(490)值差异无统计学意义($P>0.05$),siRNA-LAPTM4B 组 24、48、72、96 h 时 D(490)值显著低于 siRNA-NC 组和空白组($P<0.01$,表 3)。

表 2 胶质瘤患者预后影响因素的 Cox 比例风险模型分析

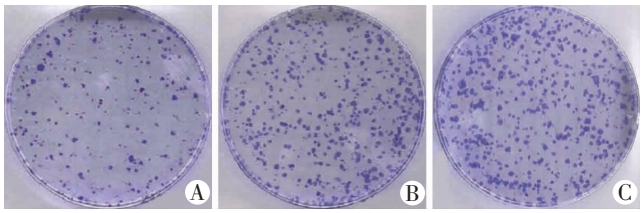
指标	*B*	*SE*	*Wald*	*P*	*HR*(95%*CI*)
性别	0.040	0.284	0.020	0.887	1.041(0.597~1.817)
年龄	0.105	0.270	0.152	0.697	1.111(0.654~1.886)
肿瘤位置	0.091	0.299	0.092	0.762	1.095(0.609~1.968)
肿瘤大小	0.184	0.277	0.442	0.506	1.202(0.699~2.069)
WHO 分级	0.961	0.268	12.853	0.000	2.614(1.546~4.421)
KPS 评分	0.089	0.244	0.134	0.715	1.093(0.678~1.762)
LAPTM4B 蛋白表达	0.677	0.336	4.069	0.044	1.969(1.019~3.802)

表 3 3 组细胞增殖活力比较[*D*(490)值,$n=3,\bar{x}\pm s$]

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
siRNA-LAPTM4B 组	0.12±0.02	0.20±0.03^{ab}	0.33±0.07^{ab}	0.52±0.06^{ab}	0.63±0.10^{ab}
siRNA-NC 组	0.10±0.04	0.38±0.07	0.54±0.06	0.64±0.08	0.74±0.06
空白组	0.13±0.04	0.40±0.05	0.50±0.02	0.66±0.03	0.80±0.04
F	0.922	24.567	26.954	9.968	9.270
P	0.419	<0.001	<0.001	0.002	0.002

a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与 siRNA-NC 组比较

克隆形成实验结果显示,siRNA-LAPTM4B 组、siRNA-NC 组和空白组细胞克隆数分别为(40.62±5.73)、(154.24±9.14)、(148.29±13.73)个,组间比较差异有统计学意义($F=241.440$,$P<0.001$),siRNA-NC 组和空白组细胞克隆数差异无统计学意义($P=0.322$),siRNA-LAPTM4B 组细胞克隆数显著低于 siRNA-NC 组和空白组($P<0.05$),见图 3。



A:siRNA-LAPTM4B 组;B:siRNA-NC 组;C:空白组

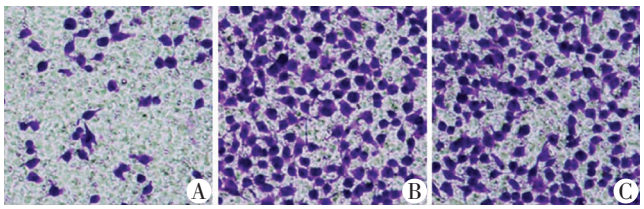
图 3 克隆形成实验检测 3 组细胞增殖能力 (结晶紫染色)

2.7 LAPTM4B 对胶质瘤细胞迁移和侵袭力的影响

Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力见图 4、5。迁移细胞数和侵袭细胞数在 siRNA-NC 组和空白组差异无统计学意义($P=0.229$ 和 0.405),siRNA-LAPTM4B 组迁移细胞数和侵袭细胞数显著低于 siRNA-NC 组和空白组($P<0.05$,表 4)。

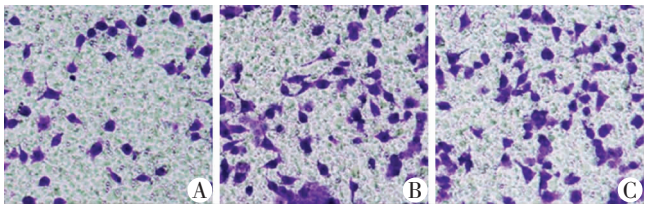
2.8 LAPTM4B 对胶质瘤细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响

siRNA-LAPTM4B 组细胞中 LAPTM4B、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达量低于 siRNA-NC 组和空白组,而 E-cadherin 蛋白表达量高于 siRNA-NC 组和空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5、图 6。



A:siRNA-LAPTM4B 组;B:siRNA-NC 组;C:空白组

图 4 Transwell 法检测细胞迁移能力 (结晶紫染色 ×200)



A:siRNA-LAPTM4B 组;B:siRNA-NC 组;C:空白组

图 5 Transwell 法检测细胞侵袭能力 (结晶紫染色×200)

表 4 3 组迁移细胞数和侵袭细胞数比较($n=3,\bar{x}\pm s$)

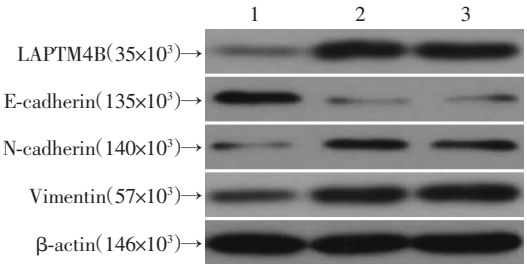
组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
siRNA-LAPTM4B 组	78.28±8.81^{ab}	69.50±7.39^{ab}
siRNA-NC 组	121.11±8.06	105.33±5.49
空白组	126.78±6.38	102.29±5.29
F 值	69.046	62.990
P 值	<0.001	<0.001

a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与 siRNA-NC 组比较

表 5 3 组细胞中 LAPTM4B、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	LAPTM4B 蛋白	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白	Vimentin 蛋白
siRNA-LAPTM4B 组	0.24±0.08[ab]	0.78±0.06[ab]	0.19±0.04[ab]	0.27±0.05[ab]
siRNA-NC 组	0.82±0.06	0.16±0.04	0.66±0.09	0.87±0.08
空白组	0.80±0.10	0.18±0.03	0.68±0.05	0.90±0.04
F	89.063	338.974	108.218	65.671
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与 siRNA-NC 组比较



1:siRNA-LAPTM4B 组;2:siRNA-NC 组;3:空白组

图 6 Western blot 检测各组 LAPTM4B、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达

3 讨论

胶质瘤占全部脑部肿瘤的 50%左右,且发病率呈不断升高趋势[10]。由于该肿瘤呈侵袭性生长可破坏血脑屏障而侵犯周围正常脑组织,具有较高的致死和致残性,即使采取手术切除辅以放化疗治疗,患者术后复发率依然较高,病死率居高不下[11]。基因靶向治疗是目前有望治愈肿瘤的有效手段,但关键在于寻找可靠的治疗靶点[12]。LAPTM4B 位于人染色体 8q22.1,由 7 个外显子及 6 个内显子组成,广泛表达于机体组织中,在调控细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等多项生物学性能中发挥重要作用[13]。研究报道,LAPTM4B 可发挥癌基因的特性而参与了多种恶性肿瘤发生及恶性化过程[14]。且与肿瘤多药耐药有关[15]。本研究结果显示,LAPTM4B 蛋白在胶质瘤组织中呈高表达,可能参与了胶质瘤发生过程;LAPTM4B 蛋白在 WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级患者组织中阳性表达率明显高于Ⅰ~Ⅱ级,说明 LAPTM4B 蛋白表达与胶质瘤恶性程度有关,LAPTM4B 可能参与了胶质瘤恶性进展。

研究报道,LAPTM4B 表达升高是乳腺癌患者不良预后的标志[16]。LAPTM4B 过表达时非小细胞肺癌复发和不良预后的生物标志物。本研究 Kaplan-Meier 生存分析结果显示,LAPTM4B 蛋白阳性表达组患者中位生存时间和累积生存率均低于 LAPTM4B 蛋白阴性表达组患者,说明 LAPTM4B 蛋白表达与胶质瘤患者生存时间及生存率有关,Cox 比例风险模型分析结果进一步显示,LAPTM4B 蛋白表达是影响胶质瘤患者预后的风险因素,提示 LAPTM4B 蛋白表达与胶质瘤患者预后密切相关。这与 DONG 等[17]研究结果一致,LAPTM4B 有望作为胶质瘤新的预后标志物。

本研究利用 siRNA 技术特异性下调 U251 细胞中 LAPTM4B 基因表达,结果显示,LAPTM4B mRNA 和蛋白在 siRNA-LAPTM4B 组细胞中相对表达量低于 siRNA-NC 组和空白组,siRNA-LAPTM4B 组细胞中 LAPTM4B 基因表达被抑制。本研究结果显示,siRNA-LAPTM4B 组培养 24、48、72、96 h 时 D(490)值及细胞克隆数低于 siRNA-NC 组和空白组,说明下调 LAPTM4B 基因表达可减少 U251 细胞增殖能力;siRNA-LAPTM4B 组侵袭细胞数低于 siRNA-NC 组和空白组,说明 LAPTM4B 与细胞侵袭有关,下调 LAPTM4B 基因表达可有效抑制 U251 细胞侵袭力。研究表明,上皮-间质转化可促进肿瘤细胞失去上皮细胞特性,可促进肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭而加速肿瘤恶性化进程[18]。本研究结果显示,siRNA-LAPTM4B 组细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达量低于 siRNA-NC 组和空白组,而 E-cadherin 蛋白表达量则升高,说明下调 LAPTM4B 基因表达可有效抑制细胞上皮-间质转化的发生,进一步提示 LAPTM4B 可能通过调控上皮-间质转化过程而参与了 U251 细胞恶性化过程。

综上所述,LAPTM4B 蛋白在胶质瘤组织中阳性表达率升高,且与恶性程度有关,是影响患者预后的风险因素,特异性下调 U251 细胞中 LAPTM4B 基因表达可显著减少细胞增殖,抑制细胞侵袭,其机制可能与抑制上皮-间质转化有关,有望为胶质瘤临床诊疗提供新的靶位。

参考文献:

[1] LAN F, QING Q, PAN Q, *et al*. Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma[J]. Cell Oncol (Dordr), 2018, 41(1):25-33. DOI: 10.1007/s13402-017-0355-3.

[2] LIPP E S, MCLENDON R E. Tissue is the issue: biomarkers of prognosis and classification in adult gliomas[J]. Semin Oncol Nurs, 2018, 34(5):430-442. DOI: 10.1016/j.soncn.2018.10.002.

[3] LV J, YANG H, WANG X, *et al*. Decreased BRMS1L expression is correlated with glioma grade and predicts poor survival in glioblastoma via an invasive phenotype[J]. Cancer Biomark, 2018, 22(2): 311-316. DOI: 10.3233/CBM-171019.

[4] MENG Y, WANG L, CHEN D, *et al*. LAPTM4B: an oncogene in various solid tumors and its functions[J]. Oncogene, 2016, 35(50):6359-6365. DOI: 10.1038/onc.2016.189.

[5] DING H, CHENG X, DING N, *et al*. Association between LAPTM4B gene polymorphism and susceptibility to and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncol Lett, 2018, 15(1):264-270. DOI: 10.3892/ol.2017.7318.

[6] 张静怡, 单丽珠, 张洁, 等. LAPTM4B-35 和 MMP-9 在胃癌中表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(24): 1226-1231. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2017.24.822.
ZHANG J Y, SHAN L Z, ZHANG J, *et al*. Expression and significance of LAPTM4B-35 and MMP-9 in patients with gastric cancer[J]. Chin J Clin Oncol, 2017, 44(24):1226-1231. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2017.24.822.

[7] MENG F, TAN S, LIU T, *et al*. Predictive significance of combined LAPTM4B and VEGF expression in patients with cervical cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 4849-4855. DOI: 10.1007/s13277-015-4319-9.

[8] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, *et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. Acta Neuropathol, 2007, 114(2):97-109. DOI:10.1007/s00401-007-0243-4.

[9] 李勐, 刘志慧, 马立新, 等. 趋化因子 CCLl 8 在胶质瘤中的表达及对其侵袭力影响的研究[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(6): 548-553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2016.06.002.
LI M, LIU Z H, MA L X, *et al*. CCL18 is highly expressed in glioma tissues and promotes activity of glioblastoma ceils[J]. Chin J Neuromed, 2018, 17(6):548-553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2016.06.002.

[10] YAMANAKA R, HAYANO A, KANAYAMA T. Radiation-induced gliomas: a comprehensive review and meta-analysis[J]. Neurosurg Rev, 2018, 41(3):719-731. DOI: 10.1007/s10143-016-0786-8.

[11] LU V M, JUE T R, MCDONALD K L, *et al*. The survival effect of repeat surgery at glioblastoma recurrence and its trend: A systematic review and meta-analysis[J]. World Neurosurg, 2018, 115(6):453-459.e3. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.04.016.

[12] 孙婷. 靶向肿瘤的溶瘤腺病毒制备策略的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(2):198-205. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.016.
SUN T. Research progress of preparation strategy of oncolytic adenovirus for targeted cancer[J]. Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2):198-205. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.016.

[13] HASHEMI M, BAHARI G, TABASI F, *et al*. LAPTM4B gene polymorphism augments the risk of cancer: Evidence from an updated meta-analysis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12):6396-6400. DOI: 10.1111/jcmm.13896.

[14] BLOM T, LI S, DICHLBERGER A, *et al*. LAPTM4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways[J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(10):799-806. DOI: 10.1038/nchembio.1889.

[15] LI S, WANG L, MENG Y, *et al*. Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(25):41282-41293. DOI: 10.18632/oncotarget.17176.

[16] KONG F, GAO F, CHEN J, *et al*. Overexpressed LAPTM4B-35 is a risk factor for cancer recurrence and poor prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56193-56199. DOI: 10.18632/oncotarget.10907.

[17] DONG X, TAMURA K, KOBAYASHI D, *et al*. LAPTM4B-35 is a novel prognostic factor for glioblastoma[J]. J Neurooncol, 2017, 132(2):295-303. DOI: 10.1007/s11060-017-2369-0.

[18] WANG Y, SONG W, KAN P, *et al*. Overexpression of Epsin 3 enhances migration and invasion of glioma cells by inducing epithelial mesenchymal transition[J]. Oncol Rep, 2018, 40(5):3049-3059. DOI:10.3892/or.2018.6691.

(**收稿**:2019-02-02;**修回**:2019-03-06)

(编辑 汪勤俭)