

LRFN4通过谷氨酰胺代谢途径影响胃癌细胞增殖

许尹梅, 付彦堪, 怀思远, 游路宽, 李建雄

解放军总医院第五医学中心放射治疗科, 北京 100071

摘要:背景 LRFN4是一种在癌症发生和发展中起关键作用的分子, 其在胃癌(gastric cancer, GC)中的作用以及与谷氨酰胺分解代谢的关系尚不清楚。目的 探讨LRFN4对胃癌的临床意义及预后预测价值, 并通过体外细胞学实验分析验证其对胃癌细胞谷氨酰胺代谢的影响。方法 用生物信息学方法, 借助TCGA、GEPIA和Kaplan-Meier Plotter等数据库以及R软件, 将数据分为LRFN4高表达组与LRFN4低表达组, 以分析LRFN4对胃癌患者临床预后等方面的影响。使用体外胃癌细胞系HGC-27, 构建差异表达LRFN4的胃癌细胞系, 随后通过采用高效液相色谱-质谱联用测定差异表达LRFN4细胞系的谷氨酰胺摄取情况, 用试剂盒检测谷氨酰胺酶活性以及ATP与乳酸谷氨酰胺代谢通路的关键产物以评估差异表达LRFN4的谷氨酰胺代谢, CCK-8法检测差异表达LRFN4细胞系的增殖情况, 流式细胞术检测差异表达LRFN4细胞系的凋亡, 以验证LRFN4对胃癌细胞的生物学功能。结果 差异分析显示, LRFN4在胃癌组织中表达上调($P<0.05$), 预后分析表明, 高表达组胃癌患者的总生存期和无病生存期均低于低表达组($P<0.05$), 提示LRFN4对胃癌患者的预后具有指导意义。LRFN4可能通过细胞周期等信号通路影响胃癌的发生发展。细胞实验证实LRFN4通过影响谷氨酰胺代谢促进细胞增殖($P<0.05$)、抑制细胞凋亡($P<0.05$)。结论 LRFN4可能通过影响谷氨酰胺代谢与胃癌患者的预后相关, 在胃癌细胞中发挥癌基因的作用, 促进肿瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡。

关键词: LRFN4; 胃癌; 预后; 谷氨酰胺代谢; 肿瘤代谢

中图分类号: R735.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)03-0247-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25010301

引用本文: 许尹梅, 付彦堪, 怀思远, 等. LRFN4通过谷氨酰胺代谢途径影响胃癌细胞增殖 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (3): 247-255.

LRFN4 regulates gastric cancer cell proliferation through glutamine metabolism

XU Yinmei, FU Yankan, HUAI Siyuan, YOU Lukuan, LI Jianxiong

Department of Radiation Oncology, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100071, China

Corresponding author: LI Jianxiong. Email: 301301ljx@sina.com

Abstract: Background LRFN4 is a pivotal molecule in the genesis and progression of cancer. Nevertheless, its function in gastric cancer (GC) and its correlation with glutamine catabolism remain elusive. **Objective** To explore the clinical significance and prognostic predictive value of LRFN4 in gastric cancer, and verify its impact on glutamine metabolism in gastric cancer cell lines through in-vitro cellular experiments. **Methods** Bioinformatics approaches were utilized to analyze the influence of LRFN4 on the clinical prognosis and other aspects of gastric cancer patients, by means of databases such as TCGA, GEPIA, and Kaplan-Meier Plotter, along with R language software. Gastric cancer cell lines were employed to detect glutamine metabolic activity via glutamine uptake and glutaminase activity assays, CCK - 8 assay for cell proliferation, and flow cytometry for cell apoptosis, aiming to verify the biological functions of LRFN4 on gastric cancer cells. **Results** Differential analysis revealed that LRFN4 expression was markedly upregulated in gastric cancer tissues ($P<0.05$). Prognostic analysis indicated that both the overall survival and disease-free survival of gastric cancer patients in the high-expression group were lower than those in the low-expression group ($P<0.05$), suggesting that LRFN4 held guiding significance for the prognosis of gastric cancer patients. LRFN4 might affect the occurrence and development of gastric cancer through signaling pathways like CELL CYCLE, promote cell proliferation ($P<0.05$), and inhibit cell apoptosis ($P<0.05$) by influencing glutamine metabolism. **Conclusion** LRFN4 may be associated with the prognosis of gastric cancer patients by modulating glutamine metabolism, functioning as an oncogenic driver in gastric cancer cells, promoting tumor cell proliferation, and inhibiting cell apoptosis.

Keywords: LRFN4; gastric cancer; prognosis; glutamine metabolism; cancer metabolism

Cited as: Xu YM, Fu YK, Huai SY, et al. LRFN4 regulates gastric cancer cell proliferation through glutamine metabolism [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(3): 247-255.

胃癌作为全球及我国高发的恶性肿瘤之一,

其病死率长期居高不下, 严重危及人类健康^[1-4]。

在肿瘤代谢研究进程中, 谷氨酰胺代谢备受瞩目^[5]。众多恶性肿瘤在代谢进程中对谷氨酰胺呈现出高摄取和高利用特性^[6]。谷氨酰胺酶

收稿日期: 2025-02-24

第一作者: 许尹梅, 硕士, 主治医师。Email: 2535189313@qq.com

通信作者: 李建雄, 博士, 主任医师。Email: 301301ljx@sina.com

(glutaminase, GLS)在胃癌组织与正常胃黏膜组织间表达差异有统计学意义,胃癌组织阳性表达率偏高,低分化胃癌组织尤为突出。体外实验也表明谷氨酰胺缺失严重阻碍胃癌细胞生长,凸显谷氨酰胺代谢在胃癌进程中的关键地位^[7-8]。LRFN4基因在肿瘤研究领域崭露头角,已有研究揭示其在部分肿瘤中表达失调,深度参与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移进程^[9-11]。在胃癌预后相关研究中,LRFN4表达水平与肿瘤恶性程度及患者预后密切相关^[12-13]。LRFN4有望成为评估胃癌预后的潜在生物标志物。谷氨酰胺代谢与癌症预后存在相关性。因此,LRFN4在胃癌的谷氨酰胺代谢调控中的潜在关联亟待深入探究,此研究结果对揭示胃癌发病机制有重要参考价值^[14-17]。

1 材料与方法

1.1 基于公共数据库的研究

1.1.1 数据获取 从癌症基因组图谱项目(The Cancer Genome Atlas, TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>)网站获得胃癌病患的基因表现信息及临床资料,包含了胃癌组织标本与对照样本^[18]。本研究共纳入444例(正常组织36例,胃癌组织408例)。数据筛选标准:样本须有完整的基因表达数据(经标准化高通量测序及严格质控预处理)和基本临床信息(含年龄、性别、肿瘤分期等关键信息且符合国际标准);排除不符合规定的样本。

1.1.2 差异分析 通过R语言的“limma”包对数据进行差异分析,以 $|\log_2$ 倍变化(\log_2 fold change, FC) ≥ 1 且错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 为标准,确定基因是否存在统计学差异。采用Wilcoxon方法比较LRFN4在胃癌组织样本及对照样本中的差异表达水平^[19-20]。采用“ggplot2”包将筛选出的差异基因绘制成火山图,采用Pheatmap(<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>)绘制热图。

1.1.3 LRFN4的表达水平与胃癌预后之间的生存分析 采用R软件的“Survival”“Survminer”包对收集的数据进行生存分析,研究LRFN4的表达水平与胃癌预后的关系。借助Kaplan-Meier Plotter数据库辅助分析^[21]。

1.1.4 LRFN4的表达与胃癌患者临床特征的Cox回归分析 分析胃癌患者的临床特征,采用Coxph函数进行单因素Cox回归分析,验证临床特征对于预后模型的独立性^[22]。研究变量包括性别、年龄、

临床分期、T分期、N分期、M分期以及LRFN4的表达,采用R软件中的Heatmap函数绘制临床因素热图。

1.1.5 LRFN4的表达与GSEA分析 根据胃癌患者LRFN4的表达量,将患者分为高表达组和低表达组,通过GSEA进一步分析两组之间的信号通路差异。将MsigDB数据库下载的版本7.0注释基因集作为亚型通路的注析基因集,进行亚型通路的差异表达分析,根据一致性得分对显著富集的基因集(调整 $P < 0.05$)进行排序^[23-25]。

1.1.6 LRFN4与谷氨酰胺代谢关键基因的相关性分析 采用Cor.test函数将LRFN4与谷氨酰胺代谢关键基因如GLS、GOT1、GOT2进行Pearson相关性分析,获得相关系数与 P 值,进一步绘制散点图可视化相关结果。

1.2 细胞生物学研究

1.2.1 人胃癌细胞培养 人胃癌细胞系HGC-27,购自普诺赛(武汉)公司。细胞在含有10%胎牛血清(SH30396.02, HyClone)和1%的青霉素链霉素混合液(SV30010, HyClone)的1640培养基(SH30027.01, HyClone)中培养,细胞培养在37°C, 5% CO₂的培养箱(Jiemei Electronics, CI-191C)中,每隔2 d更换培养基,直到细胞自然生长至指数期,可用于后续实验。

1.2.2 主要试剂和仪器 1640培养基(SH30027.01, HyClone);不含谷氨酰胺的DMEM(Thermo Fisher Science, A14431);L-[3,4-h(N)]-谷氨酰胺(1 mCi/mL, PerkinElmer Life Sciences);CCK-8(Scibiocold Matrigel Biocoat);细胞凋亡检测试剂盒(赛默飞);谷氨酸、ATP、乳酸检测试剂盒(碧云天);Anti-LRFN4抗体(ab106369, Abcam);β闪烁计数器(PerkinElmer Life Sciences);流式细胞仪(BD FACSCanto II);实时定量PCR仪(ABI PRISM 7300 RT-PCR平台);电泳仪(Bio-Rad PowerPac Basic);转膜仪(Bio-Rad Trans-Blot Turbo)。

1.2.3 LRFN4敲低及过表达HGC-27胃癌细胞模型构建 将处于对数生长期的HGC-27细胞接种到培养皿中,培养至细胞汇合度达到50%~70%。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=20的浓度添加敲降慢病毒,用于侵入并选择目标细胞。加入嘌呤霉素筛选稳转细胞,后续实验在HGC-27细胞中分4组,分别为对照组、转染对照组、转染组(shLRFN4)和谷氨酰胺剥夺对照组。慢病毒载体序

列 (shRNA1212: CCATAACCTTATTGACGCACT; shRNA2006: GCGAAGATGAGACCCTCATCT; shRNA2263: GCTGCCTTACTGGTCTTCACT) 由 Genomeditech 公司生成。

谷氨酰胺剥夺细胞模型的建立方法: 去除正常 DMEM, 用 PBS 清洗正常 HGC-27 细胞或转染细胞。加入不含谷氨酰胺的 DMEM (ThermoFisher Science, A14431)。在培养基中加入 10% 胎牛血清 (Gemini Bio Products), 在该培养基下培养细胞 24 h 并持续使用。

1.2.4 谷氨酰胺摄取实验检测谷氨酰胺含量 实验前, 用无谷氨酰胺的培养基孵育各组细胞 2 h, 使细胞内谷氨酰胺水平处于相对稳定且较低状态, 以减少内源性谷氨酰胺对实验结果的干扰。各组细胞用 5 μ L L-[3,4-h(N)]-谷氨酰胺 (1 mCi/mL, PerkinElmer Life Sciences) 在缺乏谷氨酰胺的培养基中 37 $^{\circ}$ C 下培养 10 min。孵育后, 用冷冻 PBS 洗涤 3 次, 用 200 μ L 的 0.2% SDS/0.2 mol/L NaOH 溶液裂解, 孵育 1 h, 随后用 20 μ L 的 1 mol/L HCl 中和, 用 β 闪烁计数器 (PerkinElmer Life Sciences) 进行分析。

1.2.5 谷氨酰胺酶活性测定 采用含标准谷氨酰胺浓度的培养基培育对照组、转染对照组、Sh-LRFN4 (转染组) 和谷氨酰胺剥夺培养基组的 HGC-27 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下生长至指数期。收集细胞, 用预冷的 PBS 清洗 2 次, 加入适当数量的细胞破碎试剂, 在冷冻状态下破碎细胞 30 min。裂解后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。细胞裂解液在 37 $^{\circ}$ C 下用 20 mmol/L 谷氨酰胺、50 mmol/L 三乙酸酯 (pH 8.5)、100 mmol/L 磷酸盐和 0.2 mmol/L 乙二醇四乙酸的混合液孵育 30 min, 加入 2 μ L 的 3 mol/L HCl 猝灭反应。随后, 将反应混合物与第二种测定混合物 (2.2 U 谷氨酸脱氢酶, 80 mmol/L Tris-HCl (pH 9.5), 200 mmol/L 胍, 0.25 mmol/L ADP 和 2 mmol/L NAD) 在 RT 下孵育 1 h。使用酶标仪在 340 nm 处测量吸光度。准备一系列已知浓度的谷氨酸标准溶液, 按照上述测定步骤进行处理, 制作标准曲线。通过线性回归分析拟合, 方程为 $y=ax+b$, 其中 y 为吸光度值, x 为谷氨酸浓度, a 为斜率, b 为截距。谷氨酰胺酶活性计算公式: 谷氨酰胺酶活性 [单位 μ mol/(min·mg 蛋白)] = $(n \times$ 反应体系稀释倍数) / [反应时间 (30 min, 换算为 0.5 h) \times 样本中蛋白含量 (mg)]。

1.2.6 谷氨酰胺生成/消耗、ATP、乳酸含量变化检

测 将对照组、转染对照组、Sh-LRFN4 (转染组) 和谷氨酰胺剥夺培养基组的 HGC-27 细胞培养 48 h 后, 小心转移细胞培养板中的上清液至无菌离心管中, 4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。按照各自试剂盒的使用说明书, 将细胞上清液按照制造商推荐的稀释比例进行稀释。使用 ATP 检测试剂盒, 在加入细胞上清后, 按照说明书进行孵育和读数。乳酸检测使用 WST-8 法, 按照说明书进行操作, 包括底物的添加和颜色变化的监测。谷氨酸检测通过竞争抑制反应进行, 按照说明书进行操作, 包括酶的添加和显色反应的监测。与对照组比较, 对谷氨酸生成、ATP 生成和乳酸生成的相对水平进行归一化处理。

1.2.7 CCK-8 检测细胞活力变化 将 HGC-27 细胞以 5×10^3 /孔的细胞密度分别接种到 96 孔板中, 分为对照组、转染对照组、Sh-LRFN4 (转染组) 和谷氨酰胺剥夺培养基组, 每组设 5 个复孔, 然后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 促使细胞贴壁。24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 充分混匀后继续在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h。孵育结束后, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的吸光度值 (OD 值)。同时设立不含细胞的空白对照孔, 以校准背景吸光度。

1.2.8 实时定量 RT-PCR (RT-qPCR) 检测 LRFN4 mRNA 表达量 从细胞中提取总 RNA, 使用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂。cDNA 由总 RNA、随机六聚体和上标逆转录酶 II (Promega) 制备。采用 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 及特定基因的引物 (正向引物: 5'-TGGCAGTACAGGATGAGGAG-3'; 反向引物: 5'-CCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3') 在 ABI PRISM 7300 RT-PCR 平台上执行实验, 结果以 GAPDH mRNA 为对照。分别设置空白组、转染对照组以及转染组 1、转染组 2、转染组 3 (三种转染序列 1、2、3, 选择效率最好的一组进行后续敲低实验组构建) 共 5 组样本进行转染效率验证。

1.2.9 Western blot 检测 LRFN4 蛋白表达量 完成空白组、转染对照组以及转染组 1、2、3 的蛋白提取后, 用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。根据蛋白质含量, 向总体蛋白质样本中加入相应体积的 SDS-PAGE 凝胶电泳上样缓冲液, 制备 SDS-PAGE 凝胶。将样品按计算所得体积上样至凝胶上样孔中 80 V 电压浓缩胶电泳 30 min, 随后调至 120 V 进

行分离胶电泳 90 min。以恒定压力 65 V 转膜 2 h。转膜完成后,对膜片进行切割和封口处理,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。将膜片置于稀释后的一抗(Anti-LRFN4 抗体, ab106369; 稀释比例为 1:1 000; Abcam)中,4°C 孵育过夜。次日,用 TBST 缓冲液清洗膜 3 次,每次 10 min,加入稀释后的二抗(稀释比例为 1:5 000),室温下浸泡 1 h。再次用 TBST 缓冲液清洗膜 3 次,每次 10 min,等待显影。

1.2.10 流式凋亡实验检测细胞凋亡情况 胰蛋白酶消化 HGC-27 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞, PBS 洗涤 2 次。将细胞重悬于 Binding Buffer,密度调为 1×10^6 /mL。100 μ L 细胞悬液中加 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI,避光孵育 15 min。15 min 后,加入 400 μ L Binding Buffer 稀释至 500 μ L,转移至流式检测管。设置 Annexin V-FITC 和 PI 检测通道,激发光波长 488 nm 和 535 nm,发射光波长 525 nm 和 617 nm,收集约 10 000 个细胞数据

1.2.11 统计学分析 采用 R 软件 4.1.2 进行数据分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验正态性后,正态分布数据用 One-way ANOVA 结合 Tukey HSD 法进行多组比较,非正态分布数据采用非参数检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法绘图,并用 Log-rank 检验标注 *P* 值。涉及时间变化的指标采用重复测量方差分析,评估时间与处理的交互作用。所有实验独立重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Student's *t* 检验用于两组间比较; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

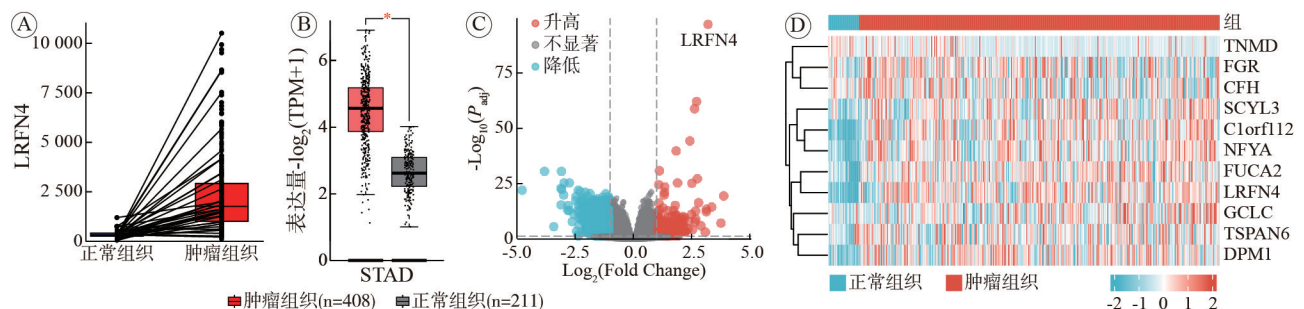
2.1 基于公共数据库的研究

2.1.1 LRFN4 mRNA 在胃癌组织中的表达高于正常组织 对 TCGA 数据库中的 444 例样本(正常组织 36 例,胃癌组织 408 例)进行分析,利用 R 软件

的“limma”包进行差异分析,以 $|\log_2$ 倍变化 (\log_2 fold change, FC) ≥ 1 , 错误发现率 (False Discovery Rate, FDR) < 0.05 为筛选标准,共筛选出 668 个差异基因,其中上调基因 274 个,下调基因 394 个。在上调基因中,亮氨酸丰富重复序列和纤连蛋白 III 型结构域蛋白 4 (Leucine-Rich Repeat and Fibronectin Type III Domain-Containing Protein 4, LRFN4) 基因表达变化明显(图 1A)。通过 R 软件进行差异性分析,结果显示 LRFN4 mRNA 表达水平在胃癌组织中高于正常胃黏膜组织,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。同时,利用 GEPIA 在线数据库分析验证,所得结论一致,进一步证实胃癌组织 LRFN4 mRNA 表达水平高于正常胃黏膜组织(图 1B)。利用“ggplot2”包绘制的火山图直观展示了差异基因的分布情况(图 1C),用“Pheatmap”绘制的热图表明不同 LRFN4 表达情况下,其他基因的表达差异(图 1D)。

2.1.2 LRFN4 表达水平低的患者,其总生存期和无进展生存期显著长于表达水平高的患者 根据 LRFN4 的表达水平将病患分为高表达组和低表达组。研究结果显示,高表达组(包括 325 例病患)的总生存期比低表达组(包括 550 例病患)短,这种差异有统计学意义 (*P* = 0.042)(图 2A)。这提示 LRFN4 表达水平可能作为预测胃癌患者预后风险的指标,高表达 LRFN4 的胃癌患者提示有较差的预后。

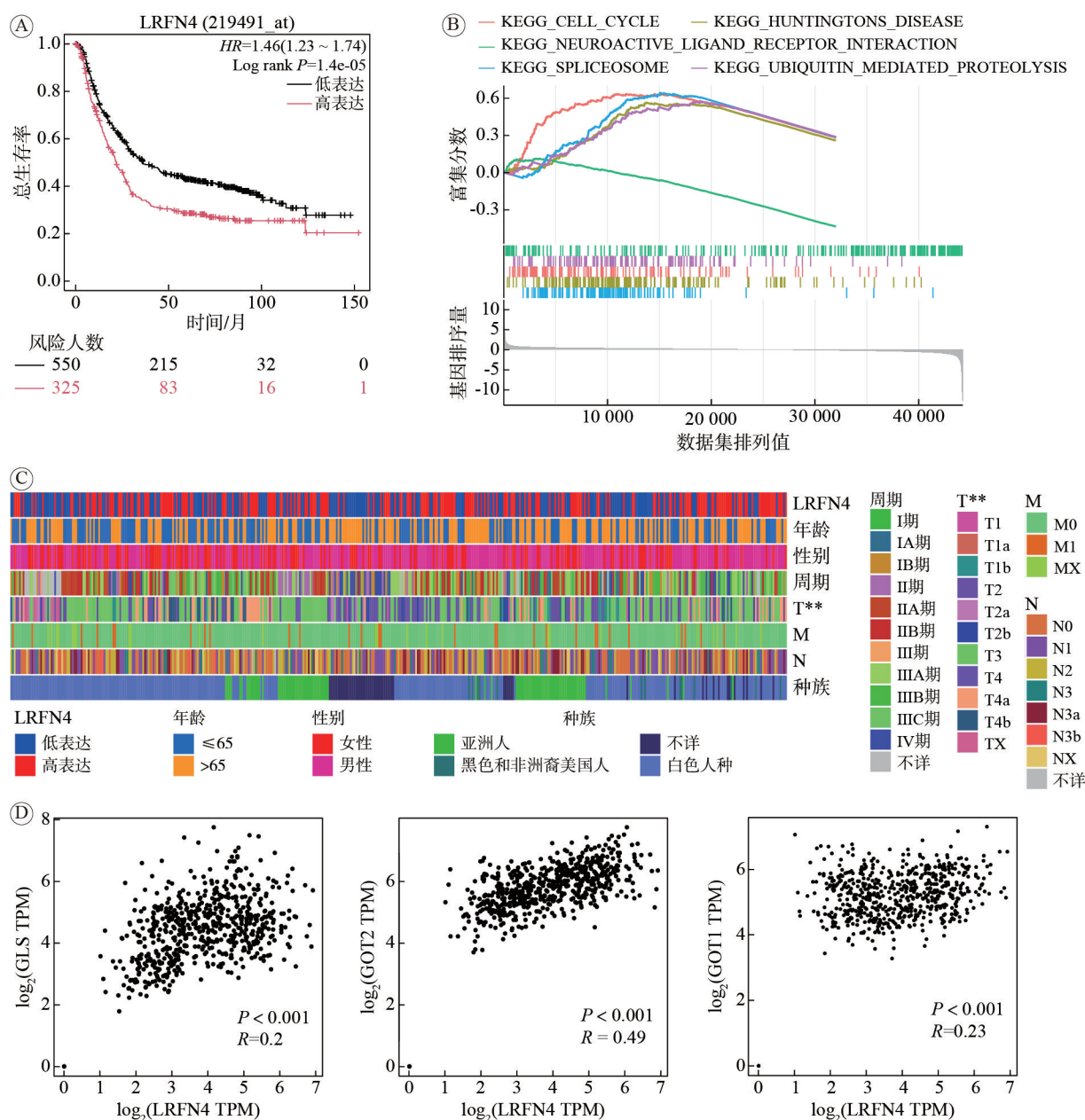
2.1.3 LRFN4 影响肿瘤进展的潜在分子机制 GSEA 结果可见 LRFN4 可以富集在 CELL CYCLE、HUNTINGTONS DISEASE、NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACTION、SPLICEOSOME、UBIQUITIN MEDIATED PROTEOLYSIS 等相关通路上。提示 LRFN4 在研究的样本中,细胞周期相关的生物学过程较为活跃,可能涉及细胞的增殖、分化或其他与细胞周



A: TCGA 数据库分析表达差异; B: GEPIA 数据库分析表达差异; C: 差异分析火山图; D: 差异分析热图。

图 1 LRFN4 表达在胃癌与正常组织中的差异及相关差异基因分析

Fig. 1 Differential expression of LRFN4 between gastric cancer and normal tissues and analysis of related differential genes



A: 生存分析; B: GSEA分析; C: 临床相关性热图; D: 相关性分析。

图2 LRFN4的临床价值与潜在功能

Fig. 2 Clinical value and potential functions of LRFN4

期调控紧密相关的事件(图2B)。

2.1.4 LRFN4表达与胃癌患者临床特征的关系

从临床相关性热图结果可知, LRFN4表达水平与T分期紧密相关。这表明LRFN4与肿瘤原发灶的局部浸润深度存在密切联系, 高表达的LRFN4可能促进肿瘤细胞突破基底膜, 向周围组织深度浸润, 加剧肿瘤局部进展, 增加对周边正常组织和器官的侵犯(图2C)。

2.1.5 LRFN4与谷氨酰胺代谢通路关键基因存在正相关关系 LRFN4可能通过增强与GLS、GOT1、GOT2的协同作用, 优化谷氨酰胺代谢通

量, 保障细胞内能量生成和物质合成途径的稳定运行, 进而增强肿瘤细胞的生存优势和侵袭能力。散点图直观展示了LRFN4与谷氨酰胺代谢关键基因之间的正相关关系(图2D)。

2.2 细胞生物学研究

2.2.1 构建敲低LRFN4胃癌细胞系 通过qPCR、Western blot方法检测转染敲降载体病毒的胃癌细胞LRFN4的表达效率, 以正常培养胃癌细胞及转染空载体病毒的胃癌细胞为对照, 选择转染效率最高的shRNA1212(转染组二)为转染组, qPCR结果显示, 转染组LRFN4 mRNA表达水平较对照组

降低($P<0.05$); Western blot 结果显示, 转染组 LRFN4 蛋白表达水平较对照组降低($P<0.05$), 这些结果表明, 已成功建立稳定敲降 LRFN4 的细胞系(图 3A, 图 3B)。

2.2.2 LRFN4 促进谷氨酰胺摄取 在 HGC-27 胃癌细胞中, 研究 LRFN4 对谷氨酰胺摄取的影响。结果显示, LRFN4 敲降能够降低谷氨酰胺摄取, 与谷氨酰胺剥夺组产生影响相似, 提示 LRFN4 可促进谷氨酰胺摄取, 增加谷氨酰胺代谢(图 3C)。

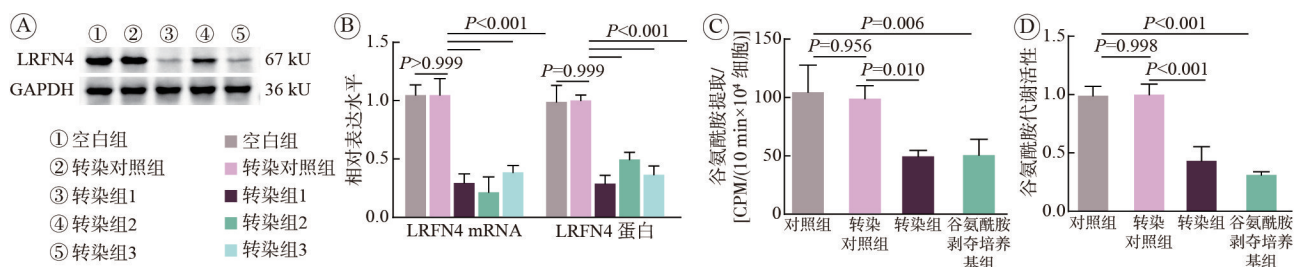
2.2.3 敲降 LRFN4 降低谷氨酰胺酶的活性 对不同组别中谷氨酰胺酶活性进行检测, 结果发现敲降 LRFN4 能够降低谷氨酰胺代谢通路中关键酶——谷氨酰胺酶的活性, 与谷氨酰胺剥夺组产生影响相似, 提示 LRFN4 在谷氨酰胺代谢中发挥关键作用。本次实验采用标准曲线拟合计算谷氨酰胺酶活性, R^2 为 0.985, 拟合效果良好(图 3D)。

2.2.4 LRFN4 促进胃癌细胞系中谷氨酰胺代谢相关产物的产生 分别对各组别的谷氨酰胺代谢相关产物进行检测。针对 ATP 含量的检测结果显示, (图 4)对照组和转染对照组的 ATP 相对生成量同样无统计学差异, 且维持在较高水平。而敲低 LRFN4 组和谷氨酰胺剥夺培养基组的 ATP 产生量下降($P<0.005$), 再次验证了敲低 LRFN4 对谷氨酰胺代谢的抑制作用, 影响了 ATP 的生成, 这可能与谷氨酰胺代谢过程中能量产生环节受阻有关。在乳酸表达量检测中, 对照组和转染对照组的乳酸相对生成量无差异, 且都保持在较高水平(图 4)。敲低 LRFN4 组的乳酸产生量相较于对照组和转染对照组低($P<0.005$)。谷氨酰胺剥夺培养基组的乳酸产生量下降($P<0.005$)。这充分说明, 敲低 LRFN4 能够抑制谷氨酰胺代谢相关的乳酸生成过程。结合谷氨酰胺剥夺同样会导致乳酸生成量降低, 进一步表明 LRFN4 在谷氨酰胺代谢与乳酸生成的关联中发挥着重要作用, 可能通过影响谷氨

酰胺代谢途径中的多个环节, 对乳酸的生成进行调控。在谷氨酸检测方面, 对照组与转染对照组的谷氨酸相对生成量并无统计学差异, 且均处于较高水平。与之形成鲜明对比的是, 敲低 LRFN4 组和谷氨酰胺剥夺培养基组的谷氨酸产生量降低(图 4)($P<0.01$)。这一结果清晰地表明, 敲低 LRFN4 会对谷氨酰胺代谢产生抑制作用, 进而影响谷氨酸的生成。

2.2.5 LRFN4 通过谷氨酰胺代谢途径抑制胃癌细胞的凋亡 利用流式细胞仪检测细胞凋亡。将处于对数生长期的 HGC-27 细胞分为对照组、转染对照组、敲低 LRFN4 组(转染组)和谷氨酰胺剥夺培养基组。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 通过流式细胞仪检测 LRFN4 对胃癌细胞凋亡的影响及其与谷氨酰胺代谢途径的相关性。实验结果显示, 对照组的凋亡率为 $5.23\% \pm 0.56\%$, 转染对照组的凋亡率为 $5.56\% \pm 0.62\%$, 两组间无统计学差异($P>0.05$); 敲低 LRFN4 组的凋亡率升高至 $25.34\% \pm 1.23\%$, 与对照组和转染对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.001$); 谷氨酰胺剥夺培养基组的凋亡率为 $24.87\% \pm 1.15\%$, 与敲低 LRFN4 组的凋亡率相近($P>0.05$), 上述结果提示 LRFN4 可能通过谷氨酰胺代谢途径抑制胃癌细胞的凋亡(图 5A~图 5E)。

2.2.6 LRFN4 通过谷氨酰胺代谢途径促进胃癌细胞的增殖能力 采用 CCK-8 实验检测 LRFN4 对胃癌细胞增殖的影响。将 HGC-27 细胞以 5×10^3 /孔的细胞密度分别接种 96 孔板中, 按对照组、转染对照组、敲低 LRFN4 组(转染组)和谷氨酰胺剥夺培养基组排列, 每组设 5 个复孔。培养一定时间后, 检测各组增殖能力。结果表明, 培养 24 h 后, 各组间无统计学差异($P>0.05$); 而 48 h、72 h 后, 敲低 LRFN4 组和谷氨酰胺培养基剥夺组增殖能力显著降低($P<0.001$)。由此推测 LRFN4 可促进胃癌细胞的增殖, 且这一过程可能通过谷氨酰胺相关代



A: qPCR 验证转染效率; B: Western blot 验证转染效率及统计图; C: 谷氨酰胺检测; D: 谷氨酰胺酶活性检测。

图 3 转染效率验证与代谢检测

Fig. 3 Verification of transfection efficiency and metabolic analysis

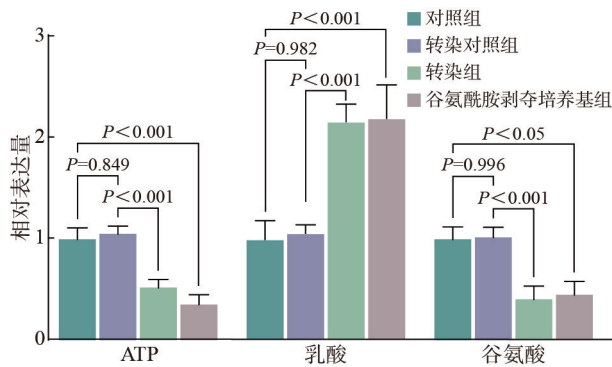


图4 谷氨酰胺代谢关键产物检测

Fig. 4 Detection of key products in glutamine metabolism

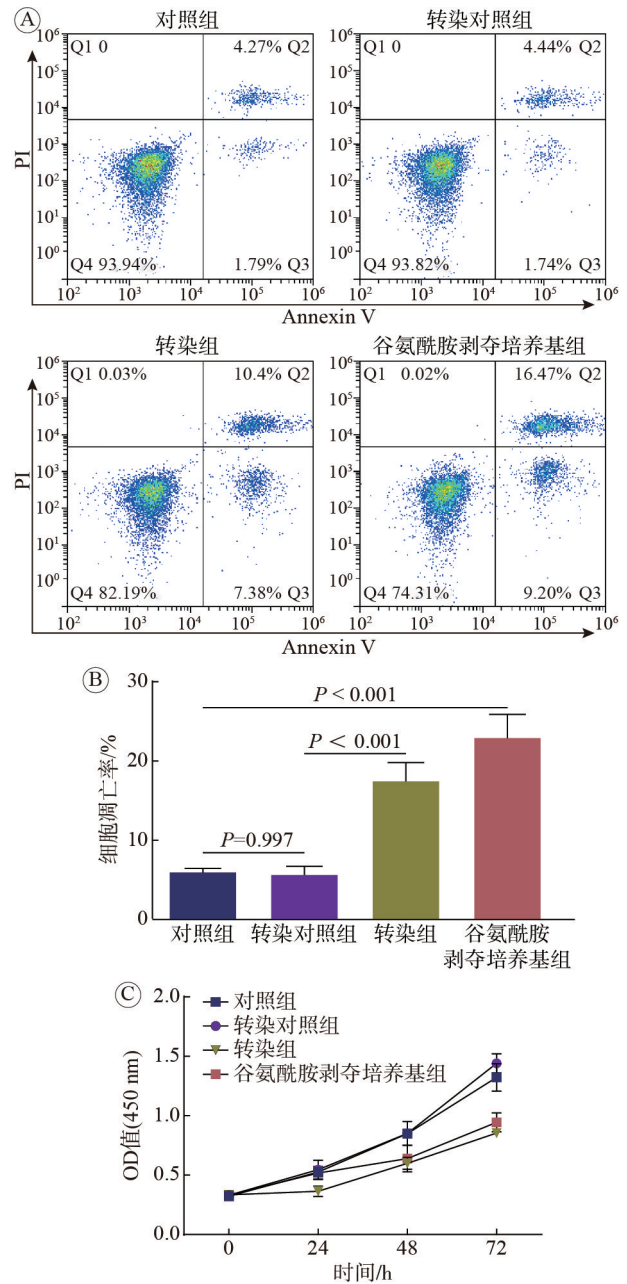
谢通路发挥作用(图5F)。

3 讨论

亮氨酸丰富重复序列和纤连蛋白III型结构域蛋白4所属的LRFN家族, 又称突触黏附样分子(synaptic adhesion-like molecules, SALM), 是一类在神经系统中发挥关键作用的蛋白质。该家族包含5个已知成员(LRFN1~LRFN5), 这些分子具有相似的结构域, 包括亮氨酸富集重复序列(leucine-rich repeat, LRR)、免疫球蛋白样结构域(immunoglobulin-like domain, Ig)和纤维连接蛋白III型结构域(fibronectin type III domain, Fn), 这些结构域同样存在于LRR-Ig-Fn超家族蛋白中^[26]。一项研究揭示了LRFN4在各种癌症及白血病细胞系内的存在, 并且其在结直肠癌组织的表达与其位置、侵入深度(T阶段)、区域淋巴结转移(N阶段)、TNM阶段以及CEA水平有明显关联。进一步的研究显示, LRFN4的高表达能有效提升患者存活概率并减少其死亡风险, 这暗示了LRFN4蛋白质在结直肠癌的发展过程中具有潜在的抗肿瘤效应^[27-28]。此外, 该研究还指出LRFN4对单核细胞/巨噬细胞从非炎区到炎区的迁移过程至关重要, 这也证实了LRFN4信号在单核细胞/巨噬细胞的迁移过程中起到核心作用^[29-30]。此外, 通过生信分析发现LRFN4与谷氨酰胺代谢的关系密切^[14,31]。

本研究综合公共数据库分析与细胞生物学实验, 深入探究了LRFN4在胃癌发生发展进程中的作用及其与谷氨酰胺代谢的紧密关联, 为胃癌的发病机制研究和临床诊疗提供了新的视角与潜在靶点。

在公共数据库的研究中我们发现, LRFN4的mRNA在胃癌组织中的表达显著, 并且高表达组的患者存活时间更短。通过ROC分析, 胃癌组织



A: 流式细胞术对照组凋亡检测; B: 转染对照组凋亡检测; C: 转染组凋亡检测; D: 谷氨酰胺剥夺组凋亡检测; E: 统计分析定量凋亡图; F: CCK-8统计分析定量增殖图。

图5 LRFN4促进胃癌细胞系增殖与抑制凋亡

Fig. 5 Promotion of proliferation and inhibition of apoptosis in gastric cancer cell lines by LRFN4

中LRFN4的AUC值为0.960, 表明其具备作为胃癌预后生物标志物的潜力。LRFN4表达与T分期呈正相关, 进一步揭示其在肿瘤进展各环节的深度参与。从分子机制层面, GSEA富集结果表明LRFN4涉及多个重要通路, 其中细胞周期通路的激活暗示其对胃癌细胞增殖的内在驱动作用。在肿瘤演进过程中, LRFN4的表达随分期上升而升高, 这可能是由于肿瘤细胞为满足持续增殖、

侵袭与转移需求, 激活相关信号通路促使 LRFN4 上调, 进而扰乱细胞周期调控, 加速肿瘤恶化。这与已有肿瘤代谢重编程及基因调控研究相契合, 凸显 LRFN4 在胃癌分子网络中的关键枢纽地位, 为后续进一步胃癌的谷氨酰胺代谢相关研究指明方向, 也为后续精准靶向治疗提供了明确的分子基础与干预方向。

在细胞生物学实验方面, 成功构建的 LRFN4 敲低胃癌细胞系为深入探究其功能奠定了坚实基础。敲低 LRFN4 后, 谷氨酰胺代谢关键产物谷氨酸、ATP 及乳酸生成减少, 有力证实了 LRFN4 对谷氨酰胺代谢的正向调控作用。从代谢流角度分析, LRFN4 可能通过影响谷氨酰胺转运蛋白活性或调控代谢酶基因表达, 增强细胞对谷氨酰胺的摄取与代谢效率, 为肿瘤细胞提供充足能量与生物合成前体, 维持其恶性表型。CCK-8 实验清晰表明, LRFN4 对胃癌细胞增殖具有一定促进作用, 且在 48 h 及 72 h 后效果尤为突出, 结合谷氨酰胺代谢抑制后增殖受阻现象, 充分说明谷氨酰胺代谢是 LRFN4 驱动胃癌细胞增殖的核心途径之一。在细胞凋亡调控方面, 敲低 LRFN4 引发胃癌细胞凋亡增加, 与谷氨酰胺剥夺组效果相近, 揭示 LRFN4 可能通过维持谷氨酰胺代谢稳态抑制细胞凋亡程序。其潜在机制可能涉及抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白表达平衡的调控, 在谷氨酰胺充足代谢条件下, LRFN4 促使抗凋亡信号增强, 确保肿瘤细胞存活优势; 而敲低 LRFN4 后, 此平衡被打破, 凋亡通路激活, 诱导细胞死亡。此外, LRFN4 对谷氨酰胺摄取及谷氨酰胺酶活性的促进作用, 进一步完善了其在谷氨酰胺代谢轴的关键调控角色, 从代谢酶活性与底物摄取层面为肿瘤细胞代谢重编程提供支持。与以往研究比较, 本研究首次系统地揭示了 LRFN4 在胃癌谷氨酰胺代谢中的关键作用, 为正确认识胃癌代谢重编程机制拓宽了新的视野。尤其值得强调的是, 本研究首次在胃癌研究中, 明确阐述了 LRFN4 通过谷氨酰胺代谢途径调控细胞增殖与凋亡的具体机制, 这一发现拓展了对胃癌代谢调控网络的理解, 为后续研究提供了全新的思路和方向。

尽管本研究取得了一定成果, 但仍存在局限性。在公共数据库研究中, 虽然样本量具有一定规模, 但受限于数据来源单一及临床信息的相对有限性, 可能存在潜在混杂因素影响结果的普适性。后续研究可整合多中心、多队列临床数据,

纳入更全面的患者临床特征与治疗信息, 深入剖析 LRFN4 与胃癌预后及治疗反应的关系。细胞实验方面, 仅采用了 HGC-27 一种胃癌细胞系, 不同胃癌细胞亚型在基因表达与代谢特性上存在异质性, 未来需拓展至更多细胞系及原代细胞培养模型, 验证 LRFN4 功能的一致性与特异性。同时, 本研究主要聚焦于 LRFN4 与谷氨酰胺代谢的直接关联, 肿瘤微环境中细胞间通讯、炎症因子及血管生成等因素与 LRFN4 的交互作用尚待深入挖掘。可借助共培养体系、动物模型及多组学联合分析技术, 全面解析 LRFN4 在胃癌复杂生态系统中的作用网络, 为开发基于 LRFN4 靶点的创新治疗策略提供更坚实的理论依据与实践指导, 有望推动胃癌精准医疗的发展进程, 改善患者预后与生存质量。此外, 本研究未进行 LRFN4 过表达后的分子生物学实验, 这可能导致对 LRFN4 在胃癌细胞中作用机制的理解不够全面。未来研究可开展 LRFN4 过表达实验, 进一步明确其在胃癌细胞中的功能及相关信号通路。

作者贡献 许尹梅: 论文撰写; 李建雄: 审阅和修订, 监督指导; 付彦堪、游路宽、怀思远: 审阅和修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: xuyinmei2535189313@163.com。

参考文献

- 1 Grantham T, Ramachandran R, Parvataneni S, et al. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and premalignant conditions [J]. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 2023, 13 (6): 100-106.
- 2 Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10251): 635-648.
- 3 杨斯茗, 许尹梅, 李建雄. AKR7A3 在胃癌中的表达、细胞生物学影响及临床意义研究 [J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45 (8): 868-877.
- 4 许鑫鑫, 鲁意迅, 李凯, 等. miR-143-3p 靶向 LASP1 抑制胃癌细胞侵袭和迁移的研究 [J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43 (8): 873-879.
- 5 De Martino M, Rathmell JC, Galluzzi L, et al. Author Correction: Cancer cell metabolism and antitumour immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2024, 24 (7): 537.
- 6 Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression [J]. *Science*, 2020, 368 (6487): eaaw5473.
- 7 李文生, 解燕川, 孙君军, 等. 胃癌及癌旁组织中谷氨酰胺合成酶的表达及其临床意义 (附 170 例分析) [J]. *福建医药杂志*, 2021, 43 (1): 75-77.
- 8 Fang L, Huang HX, Lv JL, et al. m5C-methylated lncRNA NR_033928 promotes gastric cancer proliferation by stabilizing GLS

- mRNA to promote glutamine metabolism reprogramming [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (8): 520.
- 9 Zheng F, Zhai XL, Wang WJ, et al. Expression and clinical significance of LRFN4 in colorectal cancer tissue [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2020, 100 (22): 1745-1749.
- 10 Han SL, Zhu W, Yang WL, et al. A prognostic signature constructed by CTHRC1 and LRFN4 in stomach adenocarcinoma [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 646818.
- 11 Hu G, Sun NJ, Jiang JS, et al. Establishment of a 5-gene risk model related to regulatory T cells for predicting gastric cancer prognosis [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 433.
- 12 金莉彬. 早期胃癌和癌前病变临床诊断方法比较及相关标志物的表达研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2018.
- 13 李引, 林青雨, 钱辰, 等. 富含亮氨酸重复序列/III型纤维连接蛋白4在胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *消化肿瘤杂志 (电子版)*, 2024, 16 (3): 327-333.
- 14 Li WD, Zhong QX, Deng NS, et al. Identification of a novel prognostic model for gastric cancer utilizing glutamine-related genes [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (19): e37985.
- 15 Liu Y, Chen XL, Chen X, et al. High SALM3 expression in tumor cells and fibroblasts is correlated with poor prognosis in gastric cancer patients [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/2019/8282414>.
- 16 Izzo LT, Affronti HC, Wellen KE. The bidirectional relationship between cancer epigenetics and metabolism [J]. *Annu Rev Cancer Biol*, 2021, 5 (1): 235-257.
- 17 Shang ZY, Ma ZY, Wu EQ, et al. Effect of metabolic reprogramming on the immune microenvironment in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116030.
- 18 Liao CQ, Wang X. TCGAplot: an R package for integrative pan-cancer analysis and visualization of TCGA multi-omics data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24 (1): 483.
- 19 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (7): e47.
- 20 Rutter L, Moran Lauter AN, Graham MA, et al. Visualization methods for differential expression analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2019, 20 (1): 458.
- 21 田捷, 陈吉涛, 邱美, 等. CENPW 基因在肾透明细胞癌中的表达特征及预后评估价值 [J]. *南昌大学学报 (医学版)*, 2022, 62 (6): 17-20.
- 22 Peng T, Sun F, Yang JC, et al. Novel lactylation-related signature to predict prognosis for pancreatic adenocarcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30 (19): 2575-2602.
- 23 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (43): 15545-15550.
- 24 Wang BW, van der Kloet F, Kes MBMJ, et al. Improving gene set enrichment analysis (GSEA) by using regulation directionality [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12 (3): e0345623.
- 25 Canzler S, Hackermüller J. multiGSEA: a GSEA-based pathway enrichment analysis for multi-omics data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21 (1): 561.
- 26 Karki S, Shkumatov AV, Bae S, et al. Structural basis of SALM3 dimerization and synaptic adhesion complex formation with PTP σ [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 11557.
- 27 陈林涛, 姚毅明, 周学伟, 等. 乙醛脱氢酶1B1、LRFN4在结肠癌组织中的表达与临床病理特征及预后的关系 [J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37 (5): 728-731.
- 28 周珩, 曹会鲲, 胡晓东, 等. 结肠癌组织LRFN4、HMGB2、MAGE-A9的表达及与临床病理特征和预后的关系分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21 (12): 2309-2313.
- 29 Konakahara S, Saitou M, Hori S, et al. A neuronal transmembrane protein LRFN4 induces monocyte/macrophage migration via actin cytoskeleton reorganization [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585 (14): 2377-2384.
- 30 Konakahara S, Suzuki Y, Kawakami T, et al. A neuronal transmembrane protein LRFN4 complexes with 14-3-3s and NCK1 to induce morphological change in monocytic cells via Rac1-mediated actin cytoskeleton reorganization [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586 (16): 2251-2259.
- 31 Xie Y, Li J, Tao Q, et al. Identification of glutamine metabolism-related gene signature to predict colorectal cancer prognosis [J]. *J Cancer*, 2024, 15 (10): 3199-3214.

(责任编辑: 孟晓彤)

(上接第246页)

- 32 Watson CK, Schloesser D, Fundel-Clemens K, et al. Antifibrotic drug nintedanib inhibits CSF1R to promote IL-4-associated tissue repair macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 68 (4): 366-380.
- 33 Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198 (3): 1006-1014.
- 34 Liu JH, Yong SS, Yin SS, et al. Tanshinol ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting M1 macrophage polarization through suppression of the Notch signaling pathway [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024, 397 (11): 8745-8758.
- 35 Zeng HR, Zhao B, Zhang D, et al. Viola yedoensis Makino formula alleviates DNCB-induced atopic dermatitis by activating JAK2/STAT3 signaling pathway and promoting M2 macrophages polarization [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154228.

(责任编辑: 孟晓彤)