

LRRC15通过激活PI3K/AKT与FAK信号通路促进肺鳞状细胞癌的增殖及转移

张煜婷¹ 胡清¹ 黄佳芙¹ 顾艺雯¹ 朱蕊² 刘盼² 苏丹² 应莉莎^{1,2*}

¹温州医科大学研究生培养基地(浙江省肿瘤医院), 杭州 310011;

²浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所, 杭州 310011)

摘要 LRRC15是富含亮氨酸重复序列蛋白家族成员之一。该研究旨在探讨LRRC15在肺鳞状细胞癌(LUSC)中的功能作用及其分子机制。综合利用cBioPortal、TIMER2.0、UALCAN、CPTAC等公共数据库,并结合本课题组42例临床样本的转录组测序数据,发现LRRC15在LUSC组织中呈现异常高表达,且其表达水平与肿瘤进展及患者不良预后显著相关。在功能实验中,实验室构建了LRRC15过表达的稳转细胞株,并通过CCK-8增殖实验、细胞划痕实验以及Transwell迁移实验证实,LRRC15过表达可显著促进LUSC细胞的增殖与迁移。进一步的生物信息学分析基于TCGA数据提示,LRRC15可能通过调控PI3K/AKT信号通路及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑来影响肿瘤细胞的恶性行为。Western blot实验验证发现,LRRC15过表达能够显著上调AKT和FAK的磷酸化水平。综上所述,LRRC15可能通过激活PI3K/AKT信号通路及促进ECM重塑双重机制,驱动LUSC细胞的增殖与迁移,其高表达可作为LUSC患者预后不良的潜在生物标志物,并为肺鳞癌的靶向治疗提供了新的研究方向。

关键词 LRRC15; 肺鳞癌; 细胞增殖; 迁移; 细胞外基质重塑; PI3K/AKT通路

LRRC15 Promotes Proliferation and Metastasis of Lung Squamous Cell Carcinoma by Activating the PI3K/AKT and FAK Signaling Pathways

ZHANG Yuting¹, HU Qing¹, HUANG Jiafu¹, GU Yiwen¹, ZHU Rui², LIU Pan², SU Dan², YING Lisha^{1,2*}

¹Postgraduate Training Base Alliance of Wenzhou Medical University (Zhejiang Cancer Hospital), Hangzhou 310011, China;

²Zhejiang Cancer Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310011, China)

Abstract LRRC15 is a member of the leucine-rich repeat protein family. This study aims to investigate the functional role of LRRC15 in LUSC (lung squamous cell carcinoma) and its underlying molecular mechanisms. By integrating public databases including cBioPortal, TIMER2.0, UALCAN, and CPTAC with transcriptome sequencing data from 42 clinical samples in laboratory, identified abnormally high LRRC15 expression in LUSC tissues. Its expression levels were significantly correlated with tumor progression and poor patient prognosis. In functional experiments, we established stably overexpressing LRRC15 cell lines. CCK-8 proliferation assays, cell scratch assays, and Transwell migration assays confirmed that LRRC15 overexpression significantly enhances the proliferation and

收稿日期: 2025-09-25 接受日期: 2025-12-25

浙江省自然科学基金联合基金资助项目(批准号: LKLZ25H200001)、浙江省医药卫生科技计划(批准号: 2023RC006)和浙江省自然科学基金(批准号: LQN25H160012)资助的课题

*通信作者。Tel: 0571-88122422, E-mail: yingls@zjcc.org.cn

Received: September 25, 2025 Accepted: December 25, 2025

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation Joint Fund (Grant No.LKLZ25H200001), the Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Program (Grant No.2023RC006), and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LQN25H160012)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88122422, E-mail: yingls@zjcc.org.cn

migration capabilities of LUSC cells. Further bioinformatics analysis based on TCGA data suggested that LRRC15 may influence tumor cell malignant behavior by regulating the PI3K/AKT signaling pathway and ECM (extracellular matrix) remodeling. Western blot experiments validated that LRRC15 overexpression significantly upregulates the phosphorylation levels of AKT and FAK. In summary, LRRC15 may drive LUSC cell proliferation and migration through dual mechanisms: activating the PI3K/AKT signaling pathway and promoting ECM remodeling. Its overexpression serves as a potential biomarker for poor prognosis in LUSC patients and provides new research directions for targeted therapy in lung squamous cell carcinoma.

Keywords LRRC15; lung squamous cell carcinoma; cell proliferation; migration; extracellular matrix remodeling; PI3K/AKT pathway

肺癌是全球癌症死亡的首要原因, 2022年全球新发病例约为250万例, 占全部癌症病例的12.4%, 其中中国患者超过三分之一^[1]。肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的主要亚型, 但在靶向治疗方面明显滞后于肺腺癌^[2]。尽管近年来免疫检查点抑制剂的应用改善了部分患者预后, 但LUSC每年造成的死亡人数超过40万, 这让该疾病的五年生存率并不乐观, 迫切需要探索新型治疗靶点^[3]。

富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)蛋白家族是跨膜信号转导的重要调控元件, 参与调节细胞黏附、迁移及与胞外基质(extracellular matrix, ECM)的相互作用等关键过程^[4]。该家族成员LRRC15(leucine rich repeat containing 15)在多种恶性肿瘤中呈现异常表达, 且被证实与肿瘤进展及转移密切相关。已有研究显示, 在前列腺癌、宫颈癌及软组织肉瘤中, LRRC15具有显著的促癌功能^[5-7]。在乳腺癌中, LRRC15在侵袭性和转移性病灶中表达显著上调, 并参与调控Wnt/ β -catenin信号通路, 促进肿瘤迁移与侵袭^[8-10]。在卵巢癌中, LRRC15可通过激活 β 1整合素/FAK通路驱动转移进程, 其靶向药物在临床前模型中也显示出抗转移效果^[11-12]。然而, LRRC15在LUSC中的表达特征、生物学功能及其所涉及的下游信号通路目前仍不清楚。

本研究旨在系统解析LRRC15在LUSC恶性进展中的作用和机制。我们通过生物信息学分析发现, LRRC15与ECM重塑相关基因(如COL1A1、THBS2等)显著相关, KEGG和GSEA富集分析提示, 其可能通过PI3K/AKT信号通路影响肿瘤细胞增殖, 并通过整合素/FAK通路调控细胞迁移。体外实验表明, LRRC15过表达可显著增强NCIH226细胞增殖和迁移能力, 并激活AKT和FAK信号。这些结果提示

LRRC15可能通过ECM重塑与PI3K/AKT通路的协同调控促进LUSC的恶性进展, 为开发LRRC15靶向治疗肺鳞癌提供了理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 正常支气管上皮细胞系HBE和人肺鳞癌细胞SK-MES-1、SW900、NCIH226、NCIH520、Calu-1均由浙江省肿瘤医院实验中心保存; 人HEK293T细胞主要用于慢病毒包装。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、MEM培养基及RPMI-1640培养基均购自美国ThermoFisher Scientific公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自苏州依科赛生物科技股份有限公司; Hieff TransTM脂质体核酸转染试剂购自羿圣生物科技(上海)股份有限公司; RNA Easy Fast动物组织/细胞总RNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; RT-qPCR相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Western blot及蛋白提取相关试剂购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 内参抗体 β -actin、Vinculin, 磷酸化抗体P-AKT(Ser473)、P-mTOR (Ser2448)、P-FAK(Tyr576/577)、P-FAK(Tyr397), 以及总蛋白抗体mTOR、LOXL2、MMP1均购自美国Cell Signaling Technology公司; LRRC15单克隆抗体购自英国Abcam公司; PI3K p110 α (PIK3CA)抗体购自美国ImmunoWay Biotechnology公司; FAK抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; Transwell培养小室购自美国Corning公司; CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒购自武汉贝赛特生物科技股份有限公司; LRRC15引物及过表达质粒均购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.1.3 研究对象 本研究收集了2008年4月至2015年3月期间在浙江省肿瘤医院收治的临床分期为I期

肺鳞状细胞癌的重度吸烟男性患者42例。所有患者的临床病理特征详见表1。其中,年龄>60岁者30例(71.4%),组织学分化程度以高/中分化为(28例,66.7%),T分期以T2a最多(23例,54.8%);按AJCC第8版分期系统,Ia期19例(45.2%),Ib期23例(54.8%),脉管侵犯与神经周围侵犯分别见于4例(9.5%)和11例(26.2%)。此外,该亚组所有患者均有吸烟史。本研究涉及的样本均来自浙江省肿瘤医院生物样本库,并取得浙江省肿瘤医院伦理委员会通过(批准号:IRB-2020-63)及患者的知情同意,允许将这些样本用于科学研究。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人HBE和HEK293T细胞,以及肺鳞癌细胞系SK-MES-1、SW900使用含10% FBS和1%青霉素-链霉素(双抗)的DMEM培养基培养;NCIH226、NCIH520使用含10% FBS和1%双抗的RPMI-1640培养基培养;Calu-1细胞使用含10%

FBS、1%双抗、1%非必需氨基酸(nonessential amino acid, NEAA)及1%丙酮酸钠的MEM培养基。所有细胞在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.2.2 LRRC15过表达质粒构建 通过PCR扩增获得人源LRRC15基因的完整编码序列(coding sequence, CDS)。以慢病毒载体pCDH-copGFP-T2A-Puro(System Biosciences, 美国)为骨架,在其多克隆位点区,利用Nhe I和BamH I(NEB, 美国)限制性内切酶进行双酶切,构建线性化载体。随后,采用T4 DNA连接酶(ThermoFisher Scientific, 美国)将LRRC15 CDS片段定向克隆至载体中,构建重组质粒pCDH-LRRC15-copGFP。重组质粒转化至DH5 α 感受态细胞中扩增,经质粒提取后,通过双酶切鉴定及全长DNA测序(北京擎科生物科技股份有限公司)验证插入序列的正确性及阅读框的准确性。空载体pCDH-copGFP作为阴性对照同步构建。

1.2.3 慢病毒包装 采用三质粒慢病毒包装系

表1 I期LUSC患者的临床病理特征

Table 1 Clinical and pathological characteristics of patients with stage I LUSC

临床病理特征 Clinical and pathological characteristics	例数, n(%) Number of cases, n (%)
Age (years)	
≤60	12 (28.6%)
>60	30 (71.4%)
Gender	
Male	42 (100%)
Histological differentiation	
Well/moderately differentiated	28 (66.7%)
Poorly differentiated	14 (33.3%)
Smoking history	
Smokers	42 (100%)
Lymphovascular invasion	
Yes	4 (9.5%)
No	38 (90.5%)
Perineural invasion	
Yes	11 (26.2%)
No	31 (73.8%)
T stage	
T1b	2 (4.8%)
T1c	17 (40.5%)
T2a	23 (54.8%)
AJCC stage	
Ia	19 (45.2%)
Ib	23 (54.8%)

采用美国癌症联合委员会AJCC Cancer Staging Manual(第8版)肺癌分期系统对肿瘤分期进行分类。

Tumor stages were classified according to the AJCC AJCC Cancer Staging Manual 8th edition lung cancer staging system.

统: 在HEK293T细胞中, 按比例混合psPAX2(4 μg)、pMD2.G(2 μg)及目的基因质粒(8 μg), 加入1.5 mL Opti-MEM; 另取1.5 mL Opti-MEM稀释42 μL 脂质体转染试剂(保持DNA质量与转染试剂体积比为1:3), 充分混匀后于室温静置5 min, 混合液室温静置20 min后加入无双抗7 mL培养液的HEK293T细胞中。转染6~8 h后更换为完全培养基。转染48 h后收集细胞上清液, 经超滤浓缩获得慢病毒液, 分装后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 稳定过表达细胞株筛选 将NCIH226细胞铺板至约50%汇合度, 加入病毒液100 μL 与聚凝胺(polybrene)(1:1 000)共混, 感染48 h后用适量puromycin筛选, 至亲本细胞完全死亡。存活细胞为稳定过表达株, 使用RT-qPCR和Western blot验证mRNA和蛋白水平的过表达效果。稳定株在培养中使用约半量筛选浓度的puromycin保持选择压力。

1.2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR) 使用HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix将提取的总RNA逆转录生成cDNA。随后以cDNA为模板, 利用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix在CFX96实时荧光定量PCR系统上进行扩增检测。引物序列如下。LRRC15引物F: 5'-TGC CCT AGC GAG TGT ACC T-3', R: 5'-GAT GTG CGT GTT GAG GAT CTG-3'; GAPDH引物F: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3', R: 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'。实验独立进行3次生物学重复, 且每个样本设置3个技术复孔。最后, 以GAPDH为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的mRNA相对表达水平。

1.2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot) 收集对照组及LRRC15过表达组细胞, 加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液, 于冰上裂解30 min, 其间每隔10 min进行10 s的轻微振荡以确保裂解充分。在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下, 以12 000 r/min离心20 min取上清液, 利用BCA法进行蛋白定量并统一各组浓度。按4:1 (V/V)的比例在蛋白样中加入5 \times 蛋白上样缓冲液, 于100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热10 min使蛋白变性。随后进行SDS-PAGE电泳(浓缩胶70 V恒压10 min, 分离胶90 V恒压至跑完)。先将PVDF膜浸入甲醇中活化, 随后在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下进行湿法转膜, 恒压90 V维持90 min。转膜结束后, 将膜置于5%脱脂奶粉或BSA封闭液中, 室温封闭1 h。加入按1:1 000稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日, 加入按1:5 000稀释的二抗, 室温

孵育2 h后, 用TBST洗膜3次。最后, 使用化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液进行显影曝光。利用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值作为蛋白质的相对表达量。

1.2.7 细胞增殖实验(CCK-8法) 将对照组及LRRC15过表达组细胞按每孔3 000个的密度接种于96孔板中, 每组设置6个技术复孔。接种6~8 h后加入CCK-8工作液(试剂与无血清培养液1:10, 100 μL /孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h, 分别于24、48、72、96 h测定波长在450 nm处的吸光度(D)值。实验独立重复3次。

1.2.8 Transwell迁移实验 实验采用Transwell小室(孔径8 μm)进行。首先, 在24孔板下室加入600 μL 含有20% FBS的RPMI-1640培养基作为趋化因子。将对照组及LRRC15过表达组细胞用无血清培养基重悬, 并按 3×10^4 /孔的密度接种于Transwell上室中。将培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中常规培养24 h。培养结束后, 取出小室, 弃去孔内液体, 用棉签轻轻擦拭除去上室底层未迁移的细胞。随后, 将小室浸入4%多聚甲醛中室温固定30 min, 洗涤后浸入0.1%结晶紫溶液中染色20 min。使用PBS缓冲液轻轻洗去多余染料并晾干。最后, 在倒置显微镜下随机选取3个视野进行拍照。利用ImageJ软件对各视野下的迁移细胞进行计数, 取平均值作为该组细胞的迁移数目。实验独立重复3次。

1.2.9 划痕实验 采用划痕小室, 将对照组及LRRC15过表达组细胞以每孔 4×10^4 个的密度接种于小室内。待细胞贴壁并融合至100%形成均匀单层后, 小心移除小室形成划痕。用PBS轻轻漂洗2~3次以除去悬浮细胞及碎片, 随后加入无血清培养基继续培养。分别于0 h和24 h在倒置显微镜下观察并拍照。使用ImageJ软件计算划痕愈合率。以上实验均独立重复3次。

1.2.10 病人组织RNA测序及数据分析 利用Kaiao K5500分光光度计进行RNA纯度检测。随后, 通过Bioanalyzer 2100系统配合RNA Nano 6000检测试剂盒完成RNA完整性评估与浓度测定。依据操作说明, 使用NEB Next Ultra RNA文库制备试剂盒构建mRNA文库。文库在Illumina NovaSeq 6000测序仪上进行双端测序, 获得150 bp读长。经去接头、过滤低质量及高N含量序列后, 得到高质量测序数据。使用HISAT2(v2.1.0)将测序读段

(reads)比对至人类基因组hg19, StringTie(v1.2.3)进行转录本组装, HTSeq(v0.6.0)统计基因计数, 并通过FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)计算基因表达水平。

1.2.11 统计分析 使用GraphPad Prism 9.0软件, *t*检验比较两组差异, $P < 0.05$ 为统计学显著。基于TCGA数据库中肺鳞状细胞癌(LUSC)和42例LUSC病人的RNA-seq数据, 系统开展了差异表达分析及功能富集研究。数据来源于肿瘤组织及配对癌旁正常组织, 采用标准流程进行表达量定量及标准化处理。差异表达基因筛选与富集分析: 使用DESeq2(version 1.38.3)识别肿瘤与正常组织间的差异表达基因, 筛选阈值为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$; 使用R语言程序包clusterProfiler(version 4.6.2)对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析; GO分析涵盖生物过程、分子功能与细胞组分三个本体, KEGG分析以 $\text{FDR} < 0.05$ 为显著性标准, 并选取富集最显著的15条通路进行可视化。基因集富集分析: 采用GSEA软件(version 4.3.2)在全基因组水平进行功能集富集分析; 基因集来源于MSigDB数据库的c2(已知通路)及c5(GO术语)子集; 以1 000次置换检验为基础, 显著阈值设为 $|\text{NES}| > 1$, 名义 $P < 0.05$ 且 $\text{FDR} < 0.25$ 。相关性分析: 为探究LRRC15与相关信号通路及细胞外基质基因的调控关系, 采用Spearman等级相关分析评估LRRC15表达水平与PI3K/AKT通路核心分子及ECM相关基因表达的相关性; 表达数据经 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 转换, 相关性强度以Spearman相关系数 ρ 表示, 并依据 $|\rho| \geq 0.3$ 、0.5、0.7分别界定为中度、高度及极强相关。统计显著性定义为双尾检验 $P < 0.05$, 结果以矩阵可视化图形形式呈现。

2 结果

2.1 LRRC15在肺鳞癌中的多组学表达特征及临床病理学关联

为探讨LRRC15在肺鳞癌中的表达特征及临床意义, 我们整合了多组学数据库和本课题组临床样本数据进行分析。cBioPortal数据库分析显示, 在TCGA(Pan-Cancer Atlas)队列的473例LUSC患者中, 28.73%的患者(136例)存在LRRC15基因扩增(am-

plification)突变(图1A)。TIMER2.0数据分析显示, LUSC肿瘤组织中LRRC15 mRNA水平显著高于癌旁组织, 同时LRRC15在膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BLCA)、乳腺浸润性癌(breast invasive carcinoma, BRCA)及头颈鳞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)等多种肿瘤中表达亦显著上调($P < 0.001$)(图1B)。TCGA转录组数据分析进一步证实, LRRC15在503例LUSC肿瘤组织中特异性高表达($P = 1.62 \times 10^{-12}$)(图1C~图1D)。CPTAC数据集显示, 在LUSC肿瘤组织($n = 110$)中LRRC15蛋白丰度较正常肺组织($n = 102$)显著升高($P = 4.09 \times 10^{-16}$)(图1E)。此外, 我们对42例临床LUSC患者的肿瘤及癌旁正常组织(tumor-adjacent lung tissues, TALs)进行RNA测序分析, 得出同样的结论即LRRC15在LUSC肿瘤组织中呈现高表达($P < 0.001$)(图1F)。后续我们进行了临床病理学关联的分析, 通过UALCAN对492例LUSC患者的临床数据进行分析, 发现I~III期患者LRRC15 mRNA水平均显著高于正常组织(Stage I $P = 2.22 \times 10^{-16}$; Stage II $P = 2.05 \times 10^{-12}$; Stage III $P = 8.01 \times 10^{-7}$), 且淋巴结转移(N1-2)患者的表达水平显著高于无转移者(N0)(N1 $P = 8.93 \times 10^{-13}$; N2 $P = 2.66 \times 10^{-2}$)(图1G和图1H)。IV期($n = 7$)及N3($n = 5$)患者中未呈现显著差异, 可能因样本量过少。这一结果提示, LRRC15表达水平与肿瘤进展及转移潜能呈正相关。Kaplan-Meier生存分析显示, 在527例LUSC患者的总生存期(overall survival, OS)数据中, 以cutoff=16为界将患者分为低表达组(Low)与高表达组(High), 两组的中位生存时间分别为63个月和49个月($\text{HR} = 1.29$, $P = 0.029$)(图1I)。在220例首发进展时间(first progression, FP)数据分析中, 根据cutoff=18进行分组, 低表达组的中位生存时间为16.33个月, 而高表达组仅为11.00个月($\text{HR} = 1.68$, $P = 0.026$)(图1J)。上述结果表明, LRRC15高表达与LUSC患者的预后不良显著相关, LRRC15可作为潜在的预后生物标志物。

2.2 LRRC15相关互作网络及功能富集分析

为探索LRRC15可能的分子作用网络及通路, 我们首先利用STRING数据库筛选互作评分 > 0.40 的潜在互作基因, 并结合GEPIA2数据库选取与LRRC15显著正相关的100个基因。通过韦恩图取交集, 得到7个核心基因: BGN、COL10A1、COL11A1、FAP、FNDC1、POSTN、THBS2(图2A), 功能注释

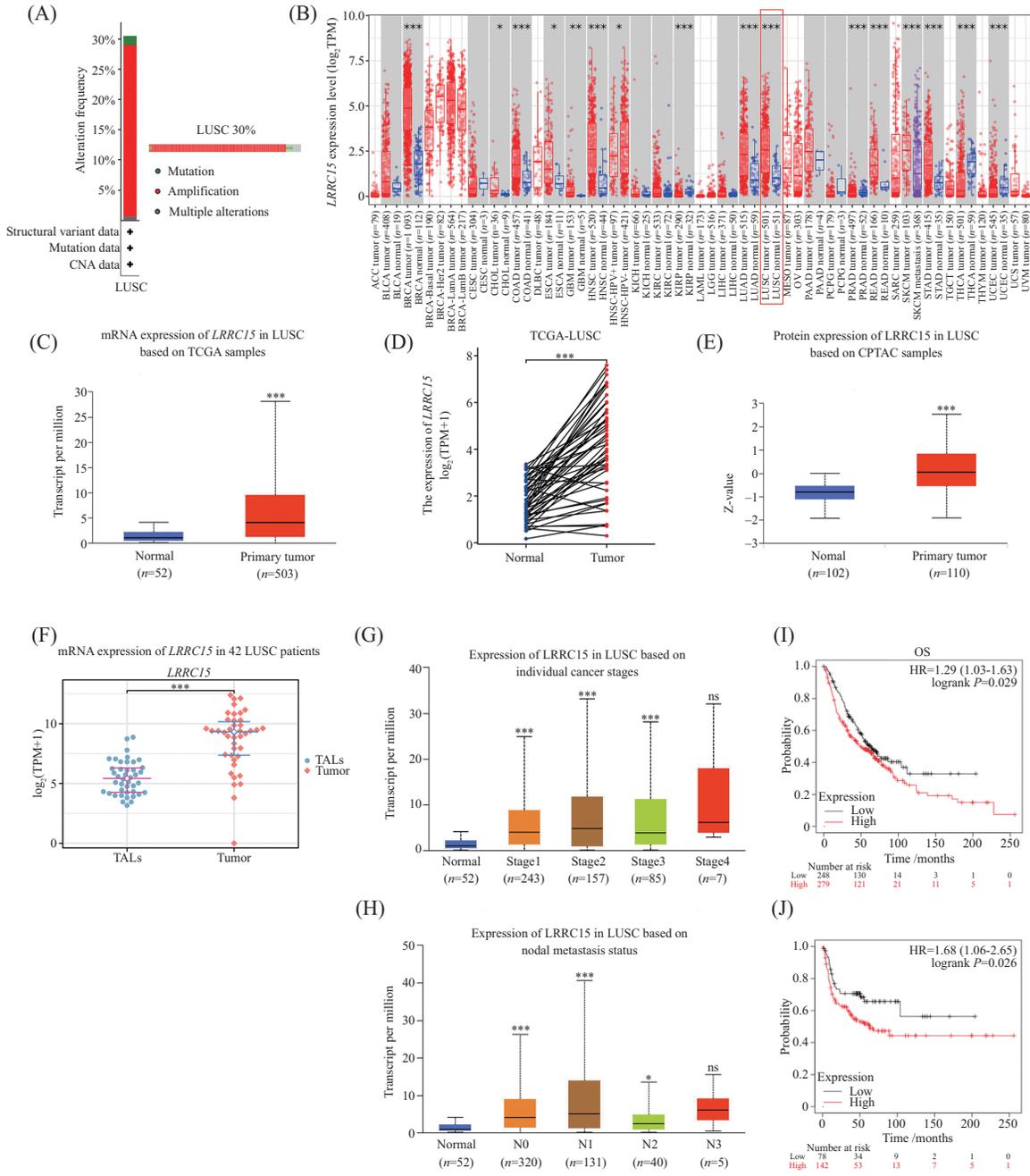
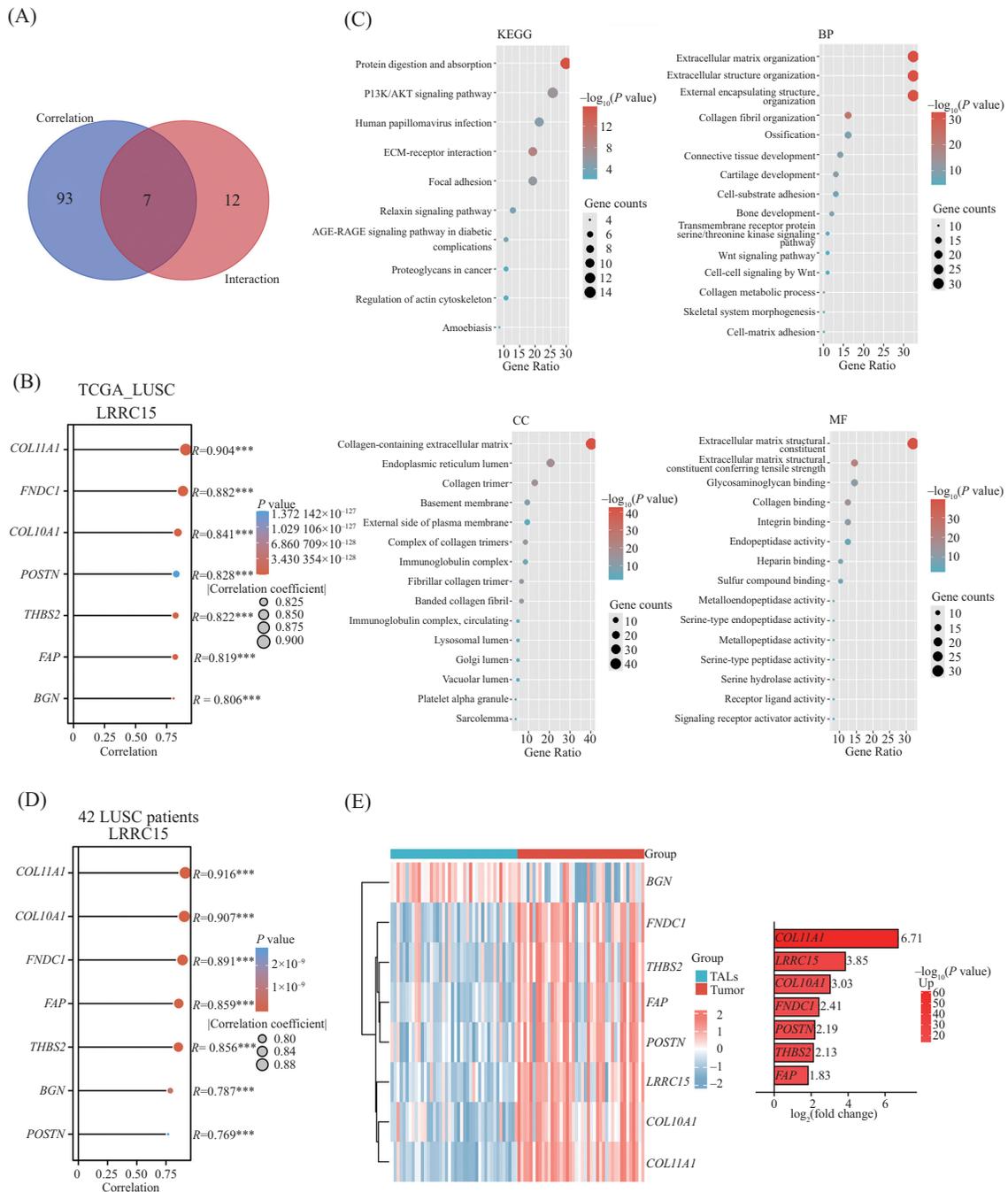


Figure 1 Multi-omics expression profile of LRRC15 in lung squamous cell carcinoma and its clinical-pathological correlations. **A:** cBioPortal analysis of LUSC (TCGA, Pan-Cancer Atlas) database mutations in the LRRC15 gene. **B:** TIMER2.0 analysis of LRRC15 differential expression between pan-cancer tumor tissue and adjacent normal tissue, with statistical significance calculated by Wilcoxon test, the red box highlights lung squamous cell carcinoma. **C, D:** TCGA (UALCAN) RNA-seq data show significantly higher LRRC15 expression in LUSC tumor tissue compared with adjacent non-cancerous tissue. **E:** CPTAC (UALCAN) data show high LRRC15 protein expression in LUSC tumor tissues. **F:** RNA-seq results from 42 clinical LUSC patients reveal higher LRRC15 expression in tumor tissues compared with TALs (tumor-adjacent lung tissues). **G, H:** UALCAN analysis of LRRC15 expression across tumor stages and lymph node metastasis status shows significantly higher levels than normal controls. **I, J:** Kaplan-Meier survival analysis (OS and FP) indicates shorter survival times in patients with high LRRC15 expression (HR>1, P<0.05), suggesting it is a poor prognostic factor. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with the normal group. ^{ns}P>0.05, no significant difference.

图1 LRRC15在肺鳞癌中的多组学表达特征及临床病理学关联

Fig.1 Multi-omics expression profile of LRRC15 in lung squamous cell carcinoma and its clinical-pathological correlations



A: 通过STRING数据库筛选LRRC15蛋白互作网络(PPI, 可信度>0.4), 结合GEPIA2数据库选取与LRRC15显著相关的100个基因, 韦恩图交集得到7个核心基因。B: 基于TCGA-LUSC数据库分析LRRC15与7个核心基因表达水平的相关性, Spearman相关性分析显示7个核心基因的表达水平均与LRRC15呈显著正相关, 其中*COL11A1*相关性最强。C: 将TCGA-LUSC RNA-seq数据按LRRC15中位表达分高低组, 筛选log₂(fold change) ≥ 1.5 差异基因, 进行KEGG通路及GO(CC、BP、MF)功能富集分析。D: 42例临床LUSC患者测序数据中, 7个核心基因与LRRC15的Spearman相关性分析结果均显著正相关, *COL11A1*相关性最显著。E: 42例临床样本的相对表达热图显示, 除*BGN*外, 其余基因在肿瘤组织中高表达, 且*COL11A1*表达量最高。***P<0.001, 与癌旁组织组比较。

A: by screening the LRRC15 protein-protein interaction network (PPI, confidence>0.4) via the STRING database and selecting 100 genes significantly associated with LRRC15 from the GEPIA2 database, the Venn diagram intersection yielded seven core genes. B: Spearman correlation analysis between the 7 core genes and LRRC15 using the TCGA-LUSC database revealed significant positive correlations for all genes, with *COL11A1* showing the strongest association. C: TCGA-LUSC RNA-seq data were stratified into high- and low-expression groups based on median LRRC15 expression. Genes with log₂(fold change) ≥ 1.5 were selected for KEGG pathway and GO (CC, BP, MF) functional enrichment analysis. D: Spearman correlation analysis of 42 clinical LUSC patient sequencing data showed significant positive correlations between LRRC15 and all 7 core genes, with *COL11A1* exhibiting the strongest correlation. E: relative expression heatmaps of 42 clinical samples indicate high expression of all genes except *BNG* in tumor tissues. ***P<0.001 compared with the TALs (tumor-adjacent lung tissues) group.

图2 LRRC15相关互作网络及功能富集分析

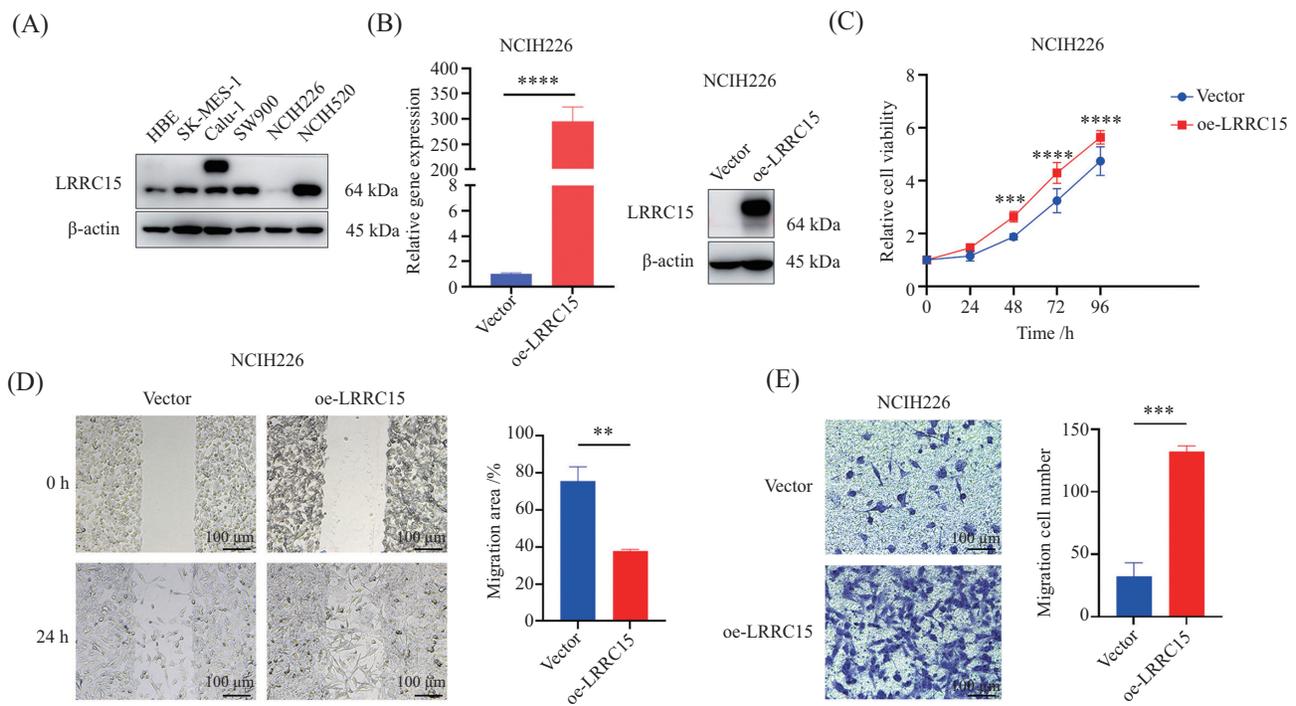
Fig.2 LRRC15-related interaction network and functional enrichment analysis

显示, 这些基因所编码的蛋白多与ECM的组成与重塑密切相关。基于TCGA-LUSC数据库($n=551$)进行Spearman相关性分析, 7个基因均与LRRC15呈显著正相关($P<0.001$), 其中COL11A1的相关性最显著($R=0.904$)(图2B)。我们进一步通过42例临床LUSC样本验证分析发现, LRRC15与7个ECM相关核心基因(*BGN*、*COL10A1*、*COL11A1*、*FAP*、*FND1*、*POSTN*、*THBS2*)均呈显著正相关($P<0.001$)(图2D)。进一步表达分析显示, 除*BNG*外, 其余基因在LUSC组织中均显著高表达(图2E), 提示LRRC15与ECM结构成分在肿瘤中协同上调。为进一步明确LRRC15调控的分子通路, 我们将样本按LRRC15表达中位数分为高/低表达组, 筛选出 $\log_2(\text{fold change}) \geq 1.5$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 的174个差异基因。KEGG富集分析显示, 这些差异基因主要集中于PI3K/AKT信号通路、ECM-受体相互作用及黏着斑通路。GO分析结果显

示: 细胞成分(cellular component, CC)主要富集于含胶原蛋白的细胞外基质; 生物学过程(biological process, BP)主要涉及细胞外基质组织、细胞外结构及外部封装结构组织; 分子功能(molecular function, MF)主要集中于细胞外基质结构成分(图2C)。

2.3 体外研究证实LRRC15促进肺鳞状细胞癌细胞的增殖与迁移

为探讨LRRC15在LUSC细胞中的生物学功能, 我们检测了人支气管上皮细胞HBE及5种LUSC细胞株(SK-MES-1、Calu-1、SW900、NCIH226、NCIH520)中LRRC15的蛋白表达水平, 结果显示NCIH226细胞中LRRC15表达量最低(图3A), 因此后续选择该细胞用于过表达株的构建。随后我们构建了pcDNA3.1-LRRC15的过表达载体并通过慢病毒包装系统转染NCIH226细胞, 并进行RT-qPCR和Western blot实验确认过表达株构建成功(图3B)。



A: LRRC15在5种LUSC细胞系(SK-MES-1、Calu-1、SW900、NCIH226、NCIH520)及人支气管上皮细胞HBE中的蛋白表达水平。B: NCIH226细胞转染空载体(Vector)或LRRC15过表达质粒(oe-LRRC15)后mRNA及蛋白水平验证。C: CCK-8增殖实验显示, 在48 h、72 h、96 h时LRRC15过表达组细胞增殖能力相比对照组显著增强。D、E: 划痕实验和Transwell迁移实验显示, LRRC15过表达显著增强LUSC细胞迁移能力, 右侧为3次实验结果的统计图。 $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, 与Vector组比较。

A: protein expression levels of LRRC15 in five LUSC cell lines (SK-MES-1, Calu-1, SW900, NCIH226, NCIH520) and human bronchial epithelial cells (HBE). B: validation of mRNA and protein levels in NCIH226 cells transfected with empty vector (Vector) or LRRC15 overexpression plasmid (oe-LRRC15). C: CCK-8 proliferation assay indicates significantly enhanced cell proliferation in the LRRC15 overexpression group compared with the control group at 48 h, 72 h, and 96 h. D,E: scratch assay and Transwell migration assay demonstrate that LRRC15 overexpression significantly enhances LUSC cell migration capacity. The right panel shows statistical analysis of three independent experiments. $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ compared with the Vector group.

图3 体外研究证实LRRC15促进肺鳞状细胞癌细胞的增殖与迁移

Figure 3 *In vitro* studies confirm that LRRC15 promotes proliferation and migration of lung squamous cell carcinoma cells

CCK-8增殖实验结果表明,与对照组相比,LRRC15过表达显著提升NCIH226细胞的增殖能力(图3C)。此外,划痕实验和Transwell迁移实验显示,过表达LRRC15显著增强LUSC细胞的迁移能力(图3D和图3E)。

2.4 LRRC15通过PI3K/AKT信号通路与ECM重塑协同调控LUSC恶性进展

KEGG富集分析提示,LRRC15可能通过PI3K/AKT信号通路参与调控肺鳞癌细胞的增殖过程。进一步通过GSEA分析发现,LRRC15相关差异表达基因在PI3K/AKT通路中呈现显著正富集($NES=2.277$,校正 P 值 <0.001 , $FDR<0.001$)(图4A)。基于TCGA-LUSC数据的Spearman相关性分析亦显示,LRRC15表达与PI3K/AKT/mTOR通路关键基因呈显著正相关($P<0.001$)(图4A)。为验证上述生物信息学预测,我们开展Western blot实验,结果显示在LRRC15过表达细胞中,PI3K催化亚基PIK3CA表达上调,AKT Ser473位点磷酸化水平显著升高,而总AKT蛋白表达未见明显变化(图4B)。以上结果表明,LRRC15可通过激活PI3K/AKT信号通路促进LUSC细胞增殖。

生物信息学分析同时提示,LRRC15可能参与细胞外基质重塑过程,进而促进肺鳞癌的恶性进展。GSEA通路富集分析表明,LRRC15相关基因在细胞外基质组织、胶原代谢、整合素-细胞表面相互作用、ECM-受体相互作用及黏着斑等多个ECM相关通路中均显著富集(图4C和表2)。值得注意的是,*COL11A1*和*ITGAI1*等关键基因在上述通路中富集信号最为显著,提示LRRC15可能通过调控*COL11A1*等ECM成分,影响整合素介导的细胞-基质信号转导,从而协同促进LUSC细胞的迁移与侵袭。此外,基于TCGA-LUSC数据的表达分析显示,多种基质重塑相关酶类(如MMPs、LOXL1/LOXL2)在肿瘤组织中表达显著上调($P<0.001$)(图4D),进一步支持LRRC15参与ECM重构的生物学假说。通过RT-qPCR实验验证,发现*MMP1*、*MMP17*、*LOXL1*及*LOXL2*的表达水平在LRRC15高表达细胞中均显著升高(图4E)。Western blot结果进一步显示,LRRC15过表达可上调P-FAK(Tyr576/577及Tyr397)的磷酸化水平,并伴随FAK底物表达水平增加,同时MMP1和LOXL2蛋白表达水平亦显著上升(图4F)。上述结果一致表明,LRRC15可通过调控ECM重塑过程,进而促进LUSC的恶性进展。

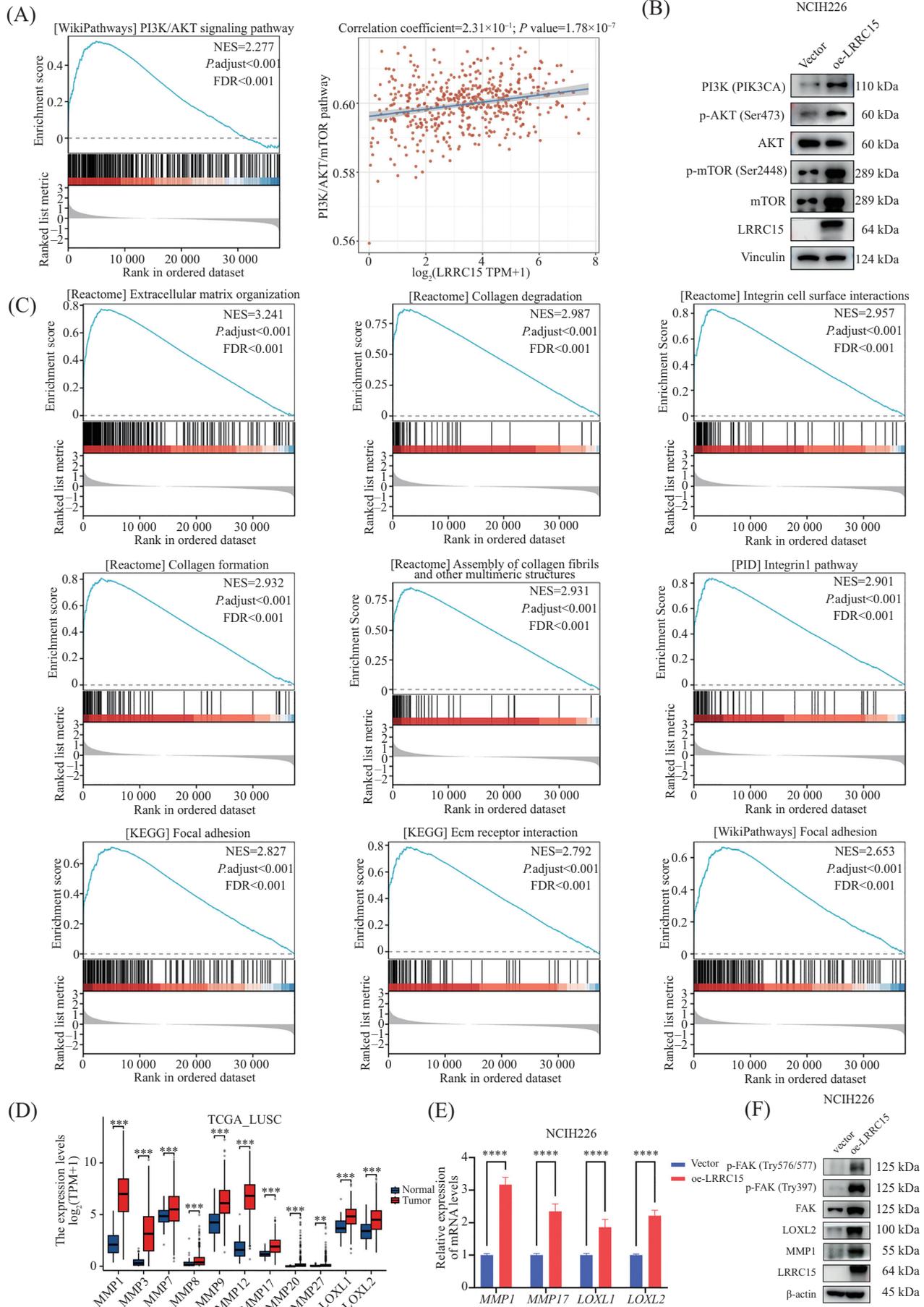
3 讨论

肺鳞癌占非小细胞肺癌的25%~30%,因其分子异质性强且缺乏有效治疗靶点,患者五年生存率低^[13]。其临床治疗面临三大挑战:一是靶向治疗适用人群有限,仅约5%的患者携带EGFR等可靶向驱动基因突变,且普遍存在获得性耐药问题^[14];二是免疫治疗响应率低,PD-1/PD-L1抑制剂单药有效率不足20%,肿瘤微环境中过度纤维化的细胞外基质可能通过物理屏障和免疫抑制降低疗效^[15-16];三是侵袭转移难以控制,超过50%的患者初诊时已发生淋巴或远处转移,传统化疗难以有效控制脑转移灶^[17]。因此,探索新的治疗靶点及其作用机制具有重要临床意义。

为系统探究LRRC15在LUSC中的表达特征、临床意义及潜在机制,本研究首先整合多组学生物信息学数据。通过cBioPortal数据库分析发现,LRRC15在约30%的LUSC病例中存在突变;TIMER2.0结果显示其在多种肿瘤中广泛高表达;UALCAN与CPTAC数据库分别从mRNA和蛋白水平证实LRRC15在LUSC组织中表达水平显著高于癌旁组织,且其高表达与肿瘤分期进展、淋巴结转移及患者不良预后相关(Kaplan-Meier生存分析)。以上分析初步确立了LRRC15作为LUSC潜在不良预后标志物的临床价值。

为深入解析LRRC15的功能调控网络,本研究进一步借助STRING与GEPIA2数据库进行蛋白互作及共表达分析,筛选获得与LRRC15显著相关的基因集合,经韦恩图交集得到7个核心互作基因(*BNG*、*COL10A1*、*COL11A1*、*FAP*、*FNDCC1*、*POSTN*、*THBS2*),并通过TIMER2.0数据库进行Spearman相关性验证。基于TCGA-LUSC和42例临床病人的RNA-seq数据的差异表达分析进一步显示,这些基因在肿瘤组织中显著上调。随后,通过KEGG与GO富集分析,发现LRRC15及其互作基因显著富集于PI3K/AKT信号通路及ECM重塑相关通路,提示LRRC15可能通过这两条关键途径调控肿瘤恶性表型。

在上述生信预测的基础上,本研究开展了系列体外实验验证。结果表明,LRRC15可通过激活PI3K/AKT信号通路促进LUSC细胞增殖,具体表现为PI3K催化亚基PIK3CA表达上调及AKT Ser473磷酸化水平升高。同时,LRRC15还可通过调控ECM重塑相关基因(如*COL11A1*、*ITGAI1*、*MMPs*、*LOXL1/2*等)增强细胞迁移能力,这一过程可能涉及



A: GSEA和TCGA数据库分析显示LRRC15在PI3K/AKT通路中显著正富集,并与相关基因呈正相关。B: Western blot验证结果显示,LRRC15过表达可上调PI3K催化亚基PIK3CA及AKT Ser473位点磷酸化水平,提示其通过激活PI3K/AKT信号通路促进细胞增殖。C: GSEA富集分析显示,与LRRC15表达呈正相关的差异基因显著富集于9条ECM及黏着斑相关通路,包括细胞外基质组织(NES=3.24)、胶原蛋白降解(NES=2.99)、整合素-细胞表面相互作用(NES=2.96)、胶原蛋白形成(NES=2.93)、胶原纤维及多聚体组装(NES=2.93)、整合素/FAK信号通路(NES=2.90)、KEGG黏着斑通路(NES=2.83)、ECM-受体相互作用(NES=2.79)及WikiPathways黏着斑通路(NES=2.65)。D: TCGA-LUSC数据库分析结果显示ECM重塑相关酶MMPs(MMP1、3、7、8、9、12、17、20、27)及LOXL1/LOXL2在肿瘤组织中高表达。E: RT-qPCR实验证实,在LRRC15高表达细胞中,*MMP1*、*MMP17*、*LOXL1*及*LOXL2*的mRNA表达水平均显著升高。F: Western blot实验结果显示,LRRC15过表达上调P-FAK(Tyr576/577与Tyr397)水平及FAK底物表达,并伴随MMP1与LOXL2蛋白表达水平升高。 $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$,与Vector组比较及与正常组比较。

A: GSEA and TCGA database analysis revealed significant positive enrichment of LRRC15 in the PI3K/AKT pathway, with positive correlation among related genes. B: Western blot validation demonstrated that LRRC15 overexpression upregulates the PI3K catalytic subunit PIK3CA and AKT Ser473 phosphorylation levels, suggesting it promotes cell proliferation by activating the PI3K/AKT signaling pathway. C: GSEA enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes positively correlated with LRRC15 were significantly positively enriched in nine ECM and focal adhesion-related pathways, including extracellular matrix organization (NES=3.24), collagen degradation (NES=2.99), integrin-cell surface interaction (NES=2.96), collagen formation (NES=2.93), collagen fiber and polymer assembly (NES=2.93), integrin/FAK signaling pathway (NES=2.90), KEGG focal adhesion pathway (NES=2.83), ECM-receptor interactions (NES=2.79), WP focal adhesion pathway (NES=2.65). D: results from the TCGA-LUSC database indicate that ECM remodeling-related enzymes MMPs (MMP1, 3, 7, 8, 9, 12, 17, 20, 27) and LOXL1/LOXL2 are highly expressed in tumor tissues. E: RT-qPCR experiments confirmed significantly elevated mRNA expression of *MMP1*, *MMP17*, *LOXL1*, and *LOXL2* in LRRC15-overexpressing cells. F: Western blot analysis revealed that LRRC15 overexpression upregulates P-FAK (Tyr576/577 and Tyr397) levels and FAK substrate expression, accompanied by increased MMP1 and LOXL2 protein expression. $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ compared with the Vector group or normal group.

图4 LRRC15通过PI3K/AKT信号通路与ECM重塑协同调控LUSC恶性进展

Fig.4 LRRC15 synergistically regulates LUSC malignant progression through the PI3K/AKT signaling pathway and ECM remodeling

表2 GSEA 富集分析结果详情

Table 2 Details of GSEA enrichment analysis results

序号 ID	基因集名称 Gene set name	基因集大小 SetSize	富集分数 Enrichment score	标准化富集分数 NES	校正后P值 P.adjust	核心富集基因 Core_enrichment
REACTOME_EXT RA-CELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	Extracellular matrix organization	299	0.771 413 3	3.240 636	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/ITGA11</i>
REACTOME_COLL AGEN_DEGRADATION	Collagen degradation	64	0.867 129 4	2.987 304	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/COL10A1</i>
REACTOME_INT EGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS	Integrin cell surface interactions	84	0.832 529 8	2.957 262	2.5×10^{-9}	<i>ITGA11/COL10A1</i>
REACTOME_COLL AGEN_FORMATION	Collagen formation	90	0.808 556 6	2.932 287	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/COL10A1</i>
REACTOME_ASS EMBLY_OF_COLLAGEN_FIBRILS AND_OTHER_MULTIMERIC STRUCTURES	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	61	0.862 123 4	2.930 767	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/COL10A1</i>
PID_INTEGRIN1_PATHWAY	Integrin1 pathway	66	0.838 348 9	2.901 201	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/ITGA11</i>
KEGG_FOCAL_ADHESION	Focal adhesion	199	0.709 671 6	2.826 767	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/ITGA11</i>
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	ECM receptor interaction	83	0.786 408 9	2.791 621	2.5×10^{-9}	<i>COL11A1/ITGA11</i>
WP_FOCAL_ADHESION (WikiPathways)	Focal adhesion (WikiPathways)	198	0.665 395 0	2.652 980	2.5×10^{-9}	<i>ITGA11/THBS2</i>

上表为图4C中GSEA富集分析结果的详细数值补充,展示了核心富集通路及其相关统计参数。

This table provides detailed numerical data for the GSEA enrichment analysis shown in fig.4C, including the top enriched pathways and their corresponding statistical parameters.

整合素/FAK信号通路的活化。其中, *COL1A1*作为LRRC15最显著相关的差异基因,在多种实体瘤中已被报道与肿瘤侵袭及不良预后相关^[18-19],提示其可能作为LRRC15下游关键效应分子介导ECM重构。已有研究指出,LRRC15可通过ITGB1/FAK/PI3K信号通路促进三阴性乳腺癌细胞的增殖与侵袭^[20],这进一步印证LRRC15在肿瘤进展中的促癌作用,并为其分子机制的解析提供了有力证据。

综上,本研究通过多层次生物信息学分析与实验验证相结合的策略,系统阐明了LRRC15在LUSC中的高表达特征、临床意义及其通过PI3K/AKT通路与ECM重塑双重机制促进肿瘤恶性进展的作用。这些发现不仅为LRRC15作为LUSC预后标志物和潜在治疗靶点提供了理论依据,也为后续开展靶向LRRC15及其相关信号网络的干预研究奠定了重要基础。

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-63.
- [2] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-54.
- [3] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [4] KOBE B, KAJAVA A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6): 725-32.
- [5] BEN-AMI E, PERRET R, HUANG Y, et al. LRRC15 targeting in soft-tissue sarcomas: biological and clinical implications [J]. *Cancers*, 2020, 12(3): 757.
- [6] BIERKENS M, KRIJGSMAN O, WILTING S M, et al. Focal aberrations indicate EYA2 and hsa-miR-375 as oncogene and tumor suppressor in cervical carcinogenesis [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(1): 56-68.
- [7] STANBROUGH M, BUBLEY G J, ROSS K, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2815-25.
- [8] SCHUETZ C S, BONIN M, CLARE S E, et al. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas *in situ* and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5278-86.
- [9] KLEIN A, OLENDROWITZ C, SCHMUTZLER R, et al. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes [J]. *Cancer Letters*, 2009, 276(2): 212-20.
- [10] YANG Y, WU H, FAN S, et al. Cancer-associated fibroblast-derived LRRC15 promotes the migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via Wnt/beta-catenin signalling pathway regulation [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1).
- [11] MARIANI A, WANG C, OBERG A L, et al. Genes associated with bowel metastases in ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 154(3): 495-504.
- [12] RAY U, JUNG D B, JIN L, et al. Targeting LRRC15 inhibits metastatic dissemination of ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(6): 1038-54.
- [13] NICHOLSON A G, TSAO M S, BEASLEY M B, et al. The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015 [J]. *J Thorac Oncol*, 2022, 17(3): 362-87.
- [14] DEARDEN S, STEVENS J, WU Y L, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9): 2371-6.
- [15] WANG Y, SAFI M, HIRSCH F R, et al. Immunotherapy for advanced-stage squamous cell lung cancer: the state of the art and outstanding questions [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2025, 22(3): 200-14.
- [16] OTANO I, UCERO A C, ZUGAZAGOITIA J, et al. At the crossroads of immunotherapy for oncogene-addicted subsets of NSCLC [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(3): 143-59.
- [17] JI H, HU C, YANG X, et al. Lymph node metastasis in cancer progression: molecular mechanisms, clinical significance and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 367.
- [18] VAZQUEZ-VILLA F, GARCIA-OCANA M, GALVAN J A, et al. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2213-22.
- [19] RAGLOW Z, THOMAS S M. Tumor matrix protein collagen XIalpha1 in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 357(2): 448-53.
- [20] WU X, LIU Y, HU Y, et al. Leucine rich repeat containing 15 promotes triple-negative breast cancer proliferation and invasion via the ITGB1/FAK/PI3K signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 14535.