·肿瘤专栏·

组织蛋白酶E对肺腺癌细胞增殖能力影响及作用机制的初步研究

雷 婧[1],刘益强[2],柳 阳[1],高静韬[1*]

(1.首都医科大学附属北京胸科医院临床试验机构管理办公室,北京市结核病胸部肿瘤研究所,临床试验机构管理办公室,北京 通州 101149;2.电子科技大学医学院肿瘤研究所,四川医学科学院肿瘤研究所,四川省人民医院肿瘤研究所,四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 分析组织蛋白酶E(cathepsin E,CTSE)在肺腺癌组织中的表达水平,探究CTSE对肺腺癌细胞增殖的调控作用及潜在分子机制,为肺腺癌病理评估及靶向干预提供实验依据。**方法** 选取肺腺癌患者临床样本,采用免疫组织化学法分析肺腺癌癌组织与癌旁组织CTSE表达差异及其影响因素;检测多种肺腺癌细胞系中CTSE表达水平。构建CTSE敲低与过表达细胞模型,通过细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8,CCK-8)实验和克隆形成实验评估其对肺腺癌细胞体外增殖能力的影响;构建裸鼠皮下移植瘤模型,验证CTSE对肺腺癌体内增殖能力的影响;结合流式细胞术分析细胞周期分布,采用免疫沉淀联合质谱分析探究CTSE影响肺腺癌细胞增殖的潜在分子机制。**结果** 肺腺癌组织中CTSE阳性面积高于癌旁组织,CTSE表达水平显著高于癌旁组织($P<0.05$)。CTSE高表达组肺腺癌病理分级2~3级比例高于CTSE低表达组。与对照组(HBE)比较,在PC9、A549、H1650、H1975细胞中CTSE信使RNA(message RNA,mRNA)和CTSE蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。CTSE敲低后,A549细胞和H1299细胞中单细胞克隆形成能力显著增强,倍增时间减少($P<0.05$)。CTSE过表达后,A549细胞和H1299细胞的CTSE mRNA和CTSE蛋白表达水平表达水平升高($P<0.05$)。CTSE过表达后,A549和H1299细胞的克隆形成能力显著降低,倍增时间增加($P<0.05$)。在裸鼠皮下注射CTSE敲低和对照组的A549细胞,构建了裸鼠皮下瘤移植模型,敲低CTSE后可显著加快肿瘤生长速度,并增加移植瘤重量($P<0.05$)。流式细胞术检测结果显示,A549敲低细胞系和H1299敲低细胞系中CTSE敲低后,细胞G1、S比例差异有统计学意义($P<0.05$)。A549过表达细胞系中,细胞G1延长,G2缩短,H1299过表达细胞系中G2缩短,差异有统计学意义($P<0.05$)。CTSE对增殖的调控不依赖细胞周期进程转换,可能通过溶酶体途径及雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)信号通路的其他功能实现。**结论** CTSE在肺腺癌组织中高表达且与病理密切相关,可作为肺腺癌病理分级评估的潜在生物学标识;CTSE通过溶酶体途径及mTOR通路负向调控肺腺癌细胞体内外增殖,有望为肺腺癌靶向治疗提供新靶点。

[关键词] 肺腺癌;组织蛋白酶E;细胞增殖 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.09.002

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-3205(2026)09-0999-13

A preliminary study on the effect and mechanism of cathepsin E on the proliferation ability of lung adenocarcinoma cells

LEI Jing[1], LIU Yi-qiang[2], LIU Yang[1], GAO Jing-tao[1*]

(1.*Office of Clinical Trial Management, Beijing Chest Hospital Affiliated to Capital Medical University/Office of Clinical Trial Management, Beijing Institute of Tuberculosis and Thoracic Oncology, Beijing* 101149, *China*; 2.*Cancer Research Institute, College of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China/Cancer Research Institute of Sichuan Medical Academy/Cancer Research Institute of Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu* 610072, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the expression level of cathepsin E (CTSE) in lung

[收稿日期]2026-04-21

[作者简介]雷婧(1999-),女,山西大同人,首都医科大学附属北京胸科医院医学硕士研究生,从事呼吸系统疾病诊治研究。

*通信作者。E-mail:jingtaogao88@126.com

adenocarcinoma（LUAD）tissues, and to investigate its regulatory role in proliferation and its potential molecular mechanism, so as to provide experimental evidence for the pathological assessment and targeted intervention in lung adenocarcinoma. **Methods** Clinical samples from LUAD patients were selected, and immunohistochemistry（IHC）was performed to evaluate the differential expression of CTSE between LUAD tissues and adjacent normal tissues, as well as the factors influencing CTSE expression. The expression levels of CTSE in various LUAD cell lines were evaluated. CTSE knockdown and overexpression cell lines were established to evaluate their effects on cell proliferation in vitro using cell counting kit-8（CCK-8）and colony formation assays. Subcutaneous xenograft tumor models were generated to verify the effect of CTSE on tumor proliferation in vivo. Flow cytometry was used to analyze cell cycle distribution and immunoprecipitation combined with mass spectrometry was employed to explore the potential molecular mechanisms underlying CTSE-mediated cell proliferation in LUAD. **Results** The CTSE-positive area was higher and the expression level of CTSE was significantly higher in LUAD tissue than in adjacent normal tissue（$P<0.05$）. The proportion of pathological grades 2—3 was higher in the CTSE-high expression group than in the CTSE-low expression group. Compared with normal human bronchial epithelial（HBE）control group, CTSE messenger RNA（mRNA）and protein expression levels were significantly increased in PC9, A549, H1650 and H1975 cells（$P<0.05$）. Following CTSE knockdown, the single-cell clone formation ability of A549 and H1299 cells was significantly enhanced, whereas the doubling time was reduced（$P<0.05$）. Conversely, after CTSE overexpression, the mRNA and protein expression levels of CTSE were significantly increased in both A549 cells and H1299 cells（$P<0.05$）. After CTSE overexpression, the colony formation ability of A549 and H1299 cells was significantly decreased, while the doubling time was increased（$P<0.05$）. Subcutaneous injection of CTSE-knockdown A549 cells and control A549 cells into nude mice was performed to establish a subcutaneous xenograft model; CTSE knockdown significantly accelerated tumor growth rate and increased xenograft weight（$P<0.05$）. Flow cytometry analysis demonstrated that after CTSE knockdown the proportions of cells in G1 and S phases were significantly altered in both A549 and H1299 knockdown cell lines（$P<0.05$）. In A549 cells overexpressing CTSE, the G1 phase was prolonged and the G2 phase was shortened, while in H1299 cells overexpressing CTSE, the G2 phase was also shortened, showing significant differences（$P<0.05$）. The regulation of cell proliferation by CTSE was independent of cell cycle progression transitions and might instead be mediated via lysosome pathway, mammalian target of rapamycin（mTOR）signaling pathway and other function pathway. **Conclusion** CTSE is highly expressed in LUAD tissues and is closely associated with pathology, serving as a potential biomarker for pathological grading assessment of LUAD. CTSE negatively regulates cell proliferation in vitro and in vivo via the lysosomal and mTOR signaling pathways, emerging as a promising novel target for targeted therapy in LUAD.

［**Key words**］ lung adenocarcinoma; cathepsin E; cell proliferation

肺癌是全球发病率与病死率最高的恶性肿瘤。肺腺癌（lung adenocarcinoma, LUAD）是肺癌最主要的病理亚型，其特征是异质性强、起病隐匿、进展快、预后差，因此给临床诊疗与预后改善带来巨大挑战[1-3]。细胞增殖是指细胞通过分裂产生新细胞的过程，细胞增殖与凋亡的平衡是维持细胞数量稳态的基础[4]。维持持续的增殖信号是肿瘤最基础的特征之一。肿瘤的增殖能力与肿瘤进展速度、病理分级及临床分期密切相关[5-8]，有研究[9]表明，细胞的克隆增殖能力是转移的驱动力。细胞周期是评估肿瘤细胞增殖能力的核心指标，受到促增殖信号通路持续激活、生长抑制信号逃逸、细胞周期调控紊乱及肿瘤微环境重塑等多个层面的调控[4]。在这些内外在因素的共同作用下，细胞周期呈现总时长改变、细胞周期转换异常、细胞周期检查点异常等多项特征[10]。其中，丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway, PI3K/Akt/mTOR）等经典促增殖信号轴的异常活化，通常可通过推动细胞周期转换、加速DNA合成与细胞分裂等促进肿瘤细胞异常增殖，细胞增殖的变化可以进一步影响细胞对化疗药物、靶向药物的反应性[11]。因此，筛选可精准反映LUAD增殖活性与病理分级的分子标志物，并探究其调控肿瘤增殖的机制，对优化LUAD危险分层、寻找新型治疗靶点具有重要临床意义。组织蛋白酶家族是一类广泛分布于细胞溶酶体和内体的蛋白酶，在调控增殖、诱导血管

生成、免疫逃逸等多个环节中发挥关键作用[12-14]。组织蛋白酶E（cathepsin E，CTSE）作为组织蛋白酶家族的重要成员，生理状态下参与抗原呈递、蛋白降解及免疫应答等过程，但近年研究[15-18]发现，CTSE在胰腺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中异常表达，可通过调控肿瘤细胞增殖、侵袭迁移及免疫抑制微环境形成参与肿瘤进展。然而，目前关于CTSE在LUAD中的表达特征、生物学功能及调控机制尚不清楚。基于此，本研究进一步聚焦于CTSE对LUAD增殖能力的影响，探讨CTSE对LUAD细胞体内外增殖能力的调控作用，并初步揭示其可能的分子机制，旨在为LUAD病理分级评估与靶向治疗提供实验依据。报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料　本研究所用组织芯片购自商业生物公司，所有组织标本均由供体签署知情同意书，标本采集及使用符合《赫尔辛基宣言》及相关医学伦理准则。本研究实验所用6周龄雄性BALB/cA-nu裸鼠购自北京华阜康生物科技有限公司，动物实验方案经北京胸科医院实验动物福利伦理委员会批准（批准文号：XK2023-166），所有动物饲养及操作均严格遵循国家《实验动物伦理审查指南》。

1.2　方法

1.2.1　免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）　采用上海芯超生物科技有限公司，阵列编号为HLugA180Su12的LUAD组织芯片。使用全自动智能染色机（中国深圳市达科为生物技术股份有限公司）进行脱蜡、抗原修复［中国北京兰杰柯科技有限公司TRIS-EDTA抗原修复液（50X）1∶50］、封闭（中国碧云天生物科技公司3%过氧化氢溶液）、CTSE一抗孵育（中国武汉爱博泰克生物科技有限公司货号A2678 1∶200）、二抗孵育（IHC EliVision™plus检测试剂盒）、3，3′-二氨基联苯胺（3，3′-diaminobenzidine，DAB）显色（北京中杉剑桥生物科技公司）、苏木素染核（中国碧云天生物科技公司）后无水乙醇脱水，通风橱晾干后封片。染色切片使用Aperio ScanScope XT（Leica Biosystems）以20倍分辨率扫描，采用Fuji软件进行图像分析。

1.2.2　细胞株与细胞培养　人支气管上皮细胞株HBE、人非小细胞肺癌细胞株H1299、人LUAD细胞株PC9、人LUAD细胞株A549、人LUAD细胞株H1650、人LUAD细胞株H1975、人胚肾细胞293T均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。细胞每2～3 d传代一次，实验所用细胞均位于第5～20代。细胞培养于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI 1640培养基及DMEM培养基（货号C22400500BT、C11995500BT，赛默飞世尔科技公司）中，置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。所有细胞株均经支原体聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）检测试剂盒（碧云天，#C0301S）检测，于2024年8月10日确认支原体阴性。

1.2.3　定量实时荧光聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qPCR）　收集适量新鲜细胞，使用RNA提取试剂盒FastPure® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2（中国南京诺唯赞生物科技公司，货号RC112）对RNA进行提取，对提取的RNA进行浓度测定和质检，然后使用Evo M-MLV反转录预混型试剂盒（中国湖南艾科瑞生物工程有限公司，货号AG11728）按照用量配置逆转录体系，将RNA与逆转录体系混合按照逆转录特定程序在PCR仪（美国Bio-Rad公司）上进行逆转录。取出逆转录后的互补脱氧核糖核酸，稀释后按照ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒（中国南京诺唯赞生物科技公司，货号Q311）给定的体系和时间程序进行qPCR。

1.2.4　免疫蛋白印迹（western blot，WB）　细胞于含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀（radio immunoprecipitation assay，RIPA）缓冲液中裂解并超声破碎。蛋白在95 ℃条件下变性10 min，经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，转印至聚偏氟乙烯膜上。将膜用5%脱脂牛奶室温封闭60 min，随后与一抗4 ℃孵育过夜：CTSE（中国武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号A2678，1∶1 000）、GAPDH（美国细胞信号转导技术有限公司，货号55174，1∶4 000）、DDDDK-Tag（Flag）（中国武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号AE092，1∶5 000）。含吐温20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水（tris-buffered saline with Tween 20，TBST）洗涤3次后，将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗（英国艾博抗有限公司，货号ab97051，1∶5 000），室温孵育1 h，TBST再次洗涤3次。使用增强化学发光底物液显影，并通过E-Gel成像系统采集条带图像。

1.2.5　稳定转染细胞株　用胰蛋白胨、酵母提取

物、氯化钠、琼脂粉（德国Biofrox公司，货号分别为2031GR500、2088GR500、1249GR500、8211GR500，质量分别为2 g、2 g、1 g、3 g）配置含氨苄青霉素溶液（中国北京兰杰柯科技有限公司，货号BL610A，1∶1 000）的Luria-Bertani（LB）固体培养基200 mL、含氨苄的LB液体培养基（比例同上，不加琼脂粉）、LB液体培养基（比例同含氨苄的LB液体培养基，不加氨苄霉素），并在添加氨苄前进行高温高压蒸汽灭菌。

将商品化的质粒慢病毒穿膜质粒［慢病毒包装质粒（psPAX2、pMD2.G，购自吉凯基因）、慢病毒短发夹RNA（short hairpin RNA，shRNA）表达质粒（GV112-Puromycin-shCTSE-1、GV112-Puromycin-shCTSE-2，购自吉凯基因）、慢病毒shRNA对照质粒（GV112-Puromycin-shControl，购自吉凯基因）、慢病毒过表达质粒（CV263-Puromycin-CTSE-OE、GV492-3Flag-gcGFP-Puromycin-CTSE-OE，购自吉凯基因）、慢病毒过表达对照质粒（CV263-Puromycin-VECTOR、GV492-3Flag-gcGFP-Puromycin-Vector，购自吉凯基因）和感受态大肠杆菌DH5α（购自擎科生物）置于冰上融化，向感受态大肠杆菌中加入1 μL质粒，轻轻混匀，冰上静置30 min，42 ℃热激1 min，转移至冰上2 min，加入无氨苄的LB培养基，37 ℃ 220 r/min摇床上培养1 h，在含氨苄的固体培养基分区划线，倒置培养过夜，挑取单克隆转移至5 mL含氨苄的LB液体培养基中培养至浑浊，转移至100 mL含氨苄的LB液体培养基培养过夜。离心后倒掉上清，使用天根无内毒素质粒小提中量试剂盒（货号DP118）对剩余菌体进行质粒提取，按照Lipofectamine™ 2000（购自赛默飞世尔科技公司）。按照试剂盒的要求使用293T和提取出的包装质粒和敲低、过表达质粒进行慢病毒包装。收集48 h后收集包装好的含有慢病毒的培养基液，以含有慢病毒的培养基与完全培养基1∶1的比例加入六孔板中，转染细胞。转染48 h后吸弃，加入合适浓度的嘌呤霉素进行筛选，筛选2周后进行qPCR和WB确认转染效果。

1.2.6　克隆形成实验　胰酶消化细胞，用细胞计数仪计数，接种于6孔板中使每孔的细胞数为500个，混匀静置于细胞培养箱中，每3 d对其进行换液，2周后去除培养基，使用配置好的结晶紫染液染色2 h，冲洗干净后拍照并使用Fuji设定程序进行自动计数，使用Graphpad Prism 10.2.3进行统计。

1.2.7　细胞计数试剂盒8（cell counting kit-8，CCK-8）实验　取生长状态良好的细胞，用胰酶消化后吸去上清，用1 mL完全培养基重悬细胞，进行细胞计数，稀释至500个/100 μL在96孔板中进行细胞铺板置于细胞培养箱（中国太仓艺斯高医疗器械科技公司）中培养。取出需要检测的细胞，吸去细胞培养基，每孔加100 μL CCK-8稀释液（中国南京诺唯赞生物科技公司，货号A311），继续于细胞培养箱中培养1 h，连续测量4～5 d。酶标仪（美国VERSA max公司）读取450 nm光吸收值，Graphpad Prism 10.2.3计算细胞生长曲线。

1.2.8　裸鼠皮下瘤成瘤实验　取生长状态良好的细胞，1×磷酸缓冲盐溶液（phosphate-buffered saline，PBS）润洗3次，用胰酶消化后吸去上清，用3 mL PBS重悬细胞，1 000 r/min离心3 min，再重复清洗一次。使用细胞计数仪进行计数。根据计数结果，稀释细胞至5×10^6个/100 μL，置于冰上备用。在注射前用移液枪再次混匀细胞，用1 mL胰岛素针吸取100 μL细胞待用。抓起小鼠，用酒精棉对待注射的部位进行消毒，进针至皮下，针头在皮下走行一段再缓慢注射，注射后可看见明显的鼓包，注射完毕后，缓慢退出针头，尽量避免漏液。使用游标卡尺对肿瘤进行测量，每2～3 d测量一次，分别测量肿瘤的长、宽，记录于实验记录本上，最后做成肿瘤生长曲线。

将小鼠使用脊髓脱位法处死，利用针头将其固定，用剪刀和镊子小心沿皮肤边缘分离皮下瘤，取出后立即放入有血清培养基中保存，准备带刻度线的打印纸，将皮下瘤擦干并按组别由大到小排列好，拍照记录，取一称量纸，将肿瘤依次放置于纸上称重，记录。

1.2.9　免疫沉淀　收集细胞，用免疫沉淀裂解缓冲液（赛默飞世尔科技公司，货号87788）在冰上裂解30 min。离心后取上清，取出部分溶液作为输入溶液，其余部分各自加入免疫沉淀裂解缓冲液清洗后的DYKDDDDK tag磁珠（中国杭州华安生物技术有限公司，货号016-101-003）带4 ℃旋转孵育过夜，使用磁力架去除上清，然后1X TBST旋转常温洗涤5次去除非特异性结合，弃去TBST，干冰条件下送样进行蛋白质谱分析。

1.2.10　蛋白质组分析　进行质量控制、去掉冗余信息和异质性。统一格式后，设定阈值为$P<0.05$、变化倍数为2倍及以上为筛选条件筛选过表达组和对照组中差异的基因。差异基因列表采用

京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）和反应组通路知识库（reactome pathway knowledgebase，Reactome）进行通路分析，使用条形图或气泡图进行结果可视化。

1.3　统计学方法　应用GraphPad Prism 10.2.3及IBM SPSS Statistics 26统计软件分析数据。首先进行正态分布和方差齐性检验，符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，比较采用独立样本t检验、t'检验、单因素方差分析和Dunnett's t检验、重复测量的方差分析。不符合正态分布的计量资料以M（QR）表示，比较采用秩和检验，计数资料以例数（%）表示，比较采用χ^2检验，等级资料比较采用秩和检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　CTSE在LUAD组织中高表达且与病理分级呈显著正相关　为探究CTSE在LUAD组织中的表达情况，对89例LUAD组织芯片进行IHC染色。结果显示，LUAD组织中CTSE阳性面积高于癌旁组织，CTSE表达水平显著高于癌旁组织，差异有统计学意义（$P<0.001$），见图1和表1。为进一步评估CTSE对LUAD患者预后的估计能力，根据CTSE阳性面积中位数（阳性面积为12.741%）将患者分为CTSE高表达组和CTSE低表达组，对其进行生存分析，结果显示，单独使用CTSE并未对LUAD患者产生良好的分层效应（Log-rank P=0.720），见图2。进一步分析显示，CTSE高表达组LUAD病理分级2～3级比例高于CTSE低表达组，差异有统计学意义（$P<0.05$），2组性别、年龄及临床分期、T分期、N分期和病灶位置、肿瘤类型组间差异无统计学意义（$P>0.05$），见表2。

表1　组织芯片LUAD组织和癌旁组织CTSE表达情况

Table 1　CTSE expression in LUAD tissues and adjacent normal tissues on tissue microarrays

（n=89）

组别	CTSE阳性面积（$\bar{x}\pm s$，%）	CTSE表达水平［M（QR）］
癌旁组织	8.423±2.469	0.336（0.018）
LUAD组织	12.895±6.722	0.350（0.035）
t/Z值	6.344	4.076
P值	<0.001	<0.001

2.2　CTSE在多种LUAD细胞系中多数呈高表达状态　qPCR结果显示，与对照组（HBE）比较，在PC9、A549、H1650、H1975细胞中CTSE信使RNA（message RNA，mRNA）表达水平显著升高，WB证实PC9、A549、H1650、H1975细胞中CTSE蛋白表达亦显著上调，差异有统计学意义（$P<0.05$）；在H1299细胞中CTSE mRNA表达水平及蛋白水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表3，图3。

表2　CTSE高表达组和CTSE低表达组临床资料比较

Table 2　Comparison of clinical characteristics between CTSE-high expression group and the CTSE-low expression group

（例数，%）

组别	例数	性别		年龄		分期			T分期			
		女性	男性	≤60岁	>60岁	Ⅰ期	Ⅱ期	Ⅲ期	1期	2期	3期	4期
CTSE高表达组	45	18(44.0)	27(60.0)	25(55.6)	20(45.5)	21(47.7)	13(28.9)	11(24.4)	26(57.8)	14(31.1)	3(6.7)	2(4.4)
CTSE低表达组	44	24(54.5)	20(45.5)	20(45.5)	24(54.5)	23(52.3)	12(27.3)	9(10.4)	25(56.8)	14(31.8)	4(9.1)	1(2.3)
χ^2/Z值		1.889		0.908		0.320			0.638			
P值		0.169		0.341		0.852			1.000			

组别	例数	N分期				病理分级	
		0期	1期	2期	3期	1级	2～3级
CTSE高表达组	45	27(60.0)	10(22.2)	7(15.6)	1(2.2)	0(0.0)	45(100.0)
CTSE低表达组	44	29(65.9)	8(18.2)	6(13.6)	1(2.3)	9(20.5)	35(79.5)
χ^2/Z值		0.653				8.113	
P值		0.930				0.004	

组别	例数	肿瘤左右定位		肿瘤上下定位				肿瘤类型	
		左	右	上叶	中叶	下叶	两叶	外周型	中央型
CTSE高表达组	45	14(31.1)	31(68.9)	19(42.2)	4(8.9)	20(44.5)	2(4.4)	38(84.4)	7(15.6)
CTSE低表达组	44	15(34.1)	29(65.9)	17(38.6)	9(20.5)	17(38.6)	1(2.3)	33(75.0)	11(25.0)
χ^2/Z值		0.090		2.628				1.230	
P值		0.764		0.518				0.267	

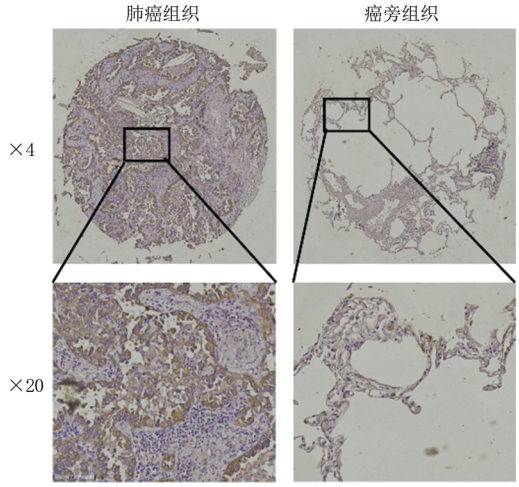


图1　CTSE在组织芯片的表达情况（免疫组织化学染色）

Figure 1　Expression of CTSE in the tissue microarray (Immunohistochemical staining)

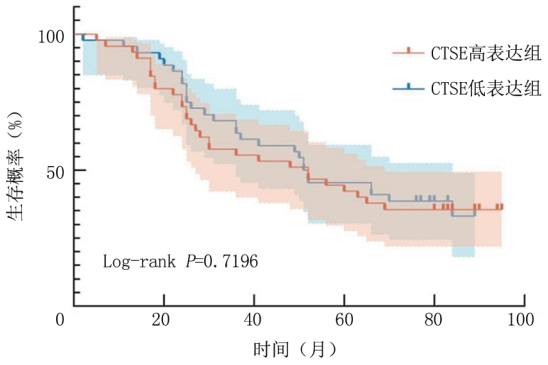


图2　CTSE不同表达水平患者的总体生存率生存曲线

Figure 2　Overall survival curves of patients stratified by CTSE expression levels

表3　CTSE在LUAD细胞系中的mRNA表达水平

Table 3　mRNA expression levels of CTSE in LUAD cell lines

（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	CTSE mRNA相对表达量
对照组（HBE）	4	1.007±0.136
H1299组	4	0.446±0.060
PC9组	3	2.287±0.368*
A549组	4	7.363±0.722*
H1650组	4	6.942±0.391*
H1975组	4	5.492±0.169*
*F*值		256.000
*P*值		＜0.001

*P值＜0.05与对照组比较（*Dunnett's t*检验）

2.3　CTSE负向调控LUAD细胞体外增殖能力

为验证CTSE对LUAD细胞增殖的调控作用，本研究选取CTSE表达水平具有代表性的A549细胞（高表达）与H1299细胞（低表达）细胞系，

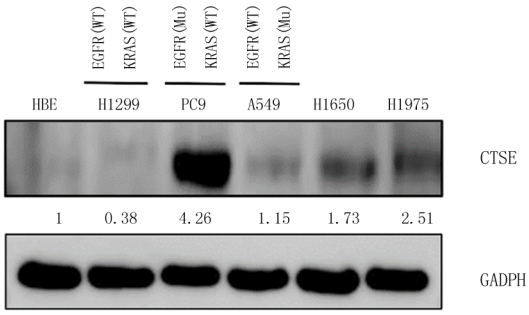


图3　CTSE在LUAD细胞系中的表达水平

Figure 3　Expression levels of CTSE in LUAD cell lines

构建CTSE敲低及过表达模型并开展功能实验。

2.3.1　CTSE敲低促进LUAD细胞的体外增殖

转染靶向CTSE shRNA的慢病毒用于敲低CTSE在细胞中的表达，qPCR检测结果显示，CTSE敲低后，A549细胞和H1299细胞中CTSE mRNA水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表4。WB结果显示，CTSE敲低后A549细胞和H1299细胞中CTSE的蛋白水平亦降低（图4）。

在A549细胞和H1299细胞中，与shControl对照相比，shCTSE-1组、shCTSE-2组后单细胞克隆形成能力显著增强，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图5、表5。CTSE敲低后H1299和A549细胞倍增时间减少，组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义（$P<0.05$），见表6和表7。

表4　CTSE在敲低细胞系中的mRNA表达水平

Table 4　mRNA expression levels of CTSE in knockdown cell lines

（$\bar{x}\pm s$）

组别	CTSE mRNA相对表达量	
	H1299细胞（n=3）	A549细胞（n=4）
shControl组	1.011±0.160	1.006±0.131
shCTSE-1组	0.073±0.005*	0.673±0.058*
shCTSE-2组	0.134±0.022*	0.485±0.067*
*F*值	95.370	33.570
*P*值	＜0.001	＜0.001

*P值＜0.05与shControl组比较（*Dunnett's t*检验）

2.3.2　CTSE过表达抑制LUAD细胞的体外增殖

将CTSE全长cDNA插入的慢病毒载体转染进A549细胞和H1299细胞，qPCR检测CTSE过表达后各细胞系的mRNA水平，结果显示，A549细胞和H1299细胞的CTSE mRNA表达水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表8。WB结果显示，过表达后A549和H1299中CTSE蛋白水平均升高（图6）。

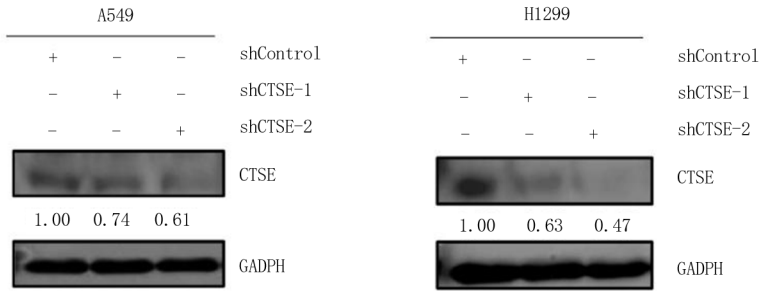


图4　CTSE敲低的LUAD细胞系WB验证

Figure 4　Western blot verification of CTSE knockdown in LUAD cell lines

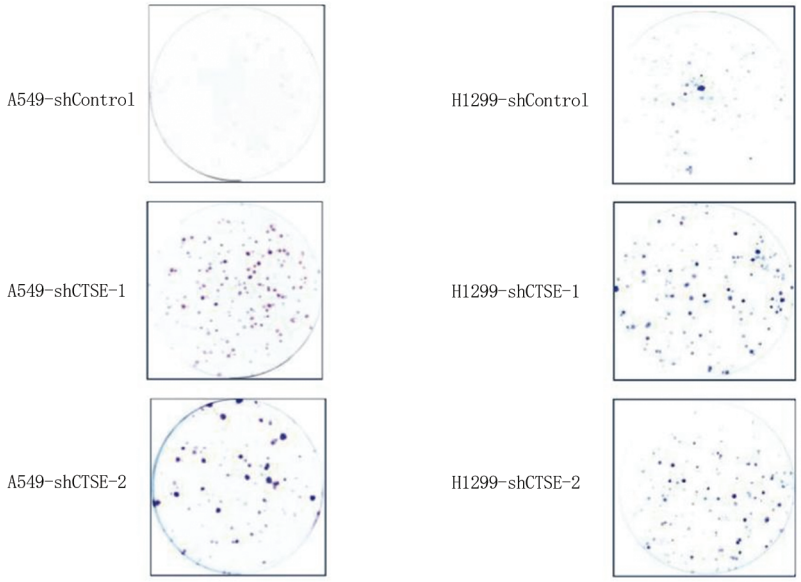


图5　CTSE敲低的LUAD细胞系增殖水平检测

Figure 5　Proliferation of LUAD cell lines with CTSE knockdown

表5　CTSE敲低细胞系中的克隆形成数量

Table 5　Number of colonies formed in CTSE-knockdown cell lines

（n=3，$\bar{x}\pm s$，个）

组别	克隆形成数量	
	H1299	A549
shControl组	62.000±8.888	1.667±0.577
shCTSE-1组	93.667±5.132*	99.000±8.185*
shCTSE-2组	95.667±14.189*	34.667±13.429*
F值	10.468	89.040
P值	0.011	<0.001

*P值<0.05与shControl组比较（*Dunnett's t*检验）

CTSE过表达后，A549和H1299细胞的克隆形成能力显著降低，差异有统计学意义（P<0.05）见图7、表9。CTSE过表达后，A549、H1299细胞倍增时间增加，组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义（P<0.05），见表10、表11。

2.4　CTSE负向调控LUAD细胞体内增殖能力　在裸鼠皮下注射CTSE敲低和对照组的A549细胞，构建了裸鼠皮下瘤移植模型，敲低CTSE后可显著加快肿瘤生长速度，并增加移植瘤重量，差异有统计学意义（P<0.05），见图8、表12、表13。

2.5　CTSE对细胞增殖调控的机制

2.5.1　调控细胞增殖不依赖细胞周期进程　流式细胞术检测结果显示，A549敲低细胞系和H1299敲低细胞系中CTSE敲低后，细胞G1、S比例差异有统计学意义（P<0.05），G2比较差异无统计学意义（P>0.05）。见表14。A549过表达细胞系中G1延长，G2缩短，H1299过表达细胞系中G2缩短，差异有统计学意义（P<0.05）。见表15。

2.5.2　CTSE可能通过溶酶体途径及mTOR信号通路调控增殖　利用带有Flag标签的CTSE过表达质粒包被的慢病毒转染A549细胞，构建带有Flag标记的CTSE过表达及对照组细胞系。对该过表达细胞及对照组细胞进行WB检测，结果显示，

表6　H1299 CTSE敲低细胞系的生长曲线

Table 6　Growth curves of the H1299 CTSE-knockdown cell line

（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	450 nm处吸光度				
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
shControl组	0.181±0.006	0.196±0.015	0.285±0.010	0.514±0.051	0.859±0.065
shCTSE-1组	0.175±0.003	0.197±0.003	0.305±0.013	0.709±0.083	1.114±0.075
shCTSE-2组	0.185±0.009	0.206±0.007	0.313±0.021	0.758±0.021	1.074±0.119
组间			F值=35.694	P值<0.001	
时点间			F值=814.037	P值<0.001	
组间·时点间			F值=10.489	P值<0.001	

表7　A549 CTSE敲低细胞系的生长曲线

Table 7　Growth curve of A549 CTSE-knockdown cell line

（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	450 nm处吸光度				
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
shControl组	0.190±0.001	0.214±0.009	0.256±0.022	0.657±0.079	0.755±0.090
shCTSE-1组	0.200±0.003	0.241±0.008	0.285±0.017	0.620±0.045	0.894±0.070
shCTSE-2组	0.191±0.003	0.234±0.003	0.332±0.044	0.777±0.085	1.054±0.168
组间			F值=19.199	P值<0.001	
时点间			F值=19.199	P值<0.001	
组间·时点间			F值=5.236	P值=0.006	

表8　过表达细胞系中的CTSE mRNA表达水平

Table 8　mRNA expression levels of CTSE in overexpression cell lines

（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	CTSE mRNA相对表达量	
	H1299	A549
Vector组	1.113±0.505	1.028±0.299
OE组	2 471.213±136.354	171.238±5.721
t'值	36.230	59.426
P值	<0.001	<0.001

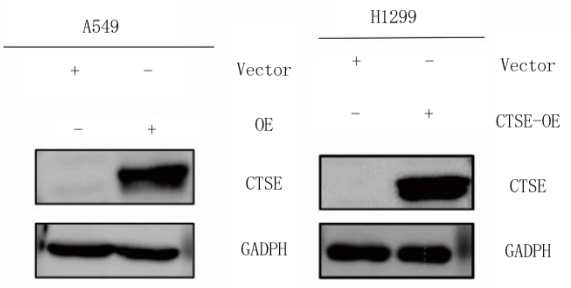


图6　CTSE过表达的LUAD细胞系WB验证

Figure 6　WB validation of CTSE overexpression in LUAD cell lines

转染过表达的慢病毒后A549细胞的Flag-CTSE蛋白水平明显增高（图9A）。为了进一步探究影响细胞周期的原因，对Flag-CTSE细胞进行免疫沉淀，结果表明，使用抗Flag磁珠可成功将带有Flag标签的CTSE蛋白成功拉下（图9B）。

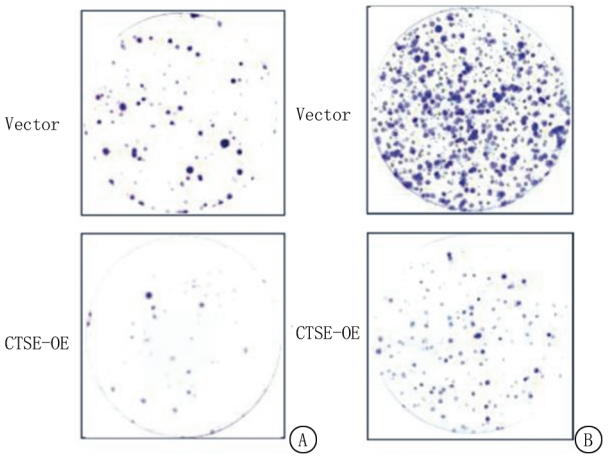


图7　CTSE过表达的LUAD细胞系增殖水平检测

A. A549细胞；B. H1299细胞

Figure 7　Proliferation analysis of LUAD cell lines with CTSE overexpression

表9　CTSE在过表达细胞系中的克隆形成数量

Table 9　Number of colonies formed in CTSE-overexpressing cell lines

（n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	克隆形成数量	
	H1299	A549
Vector组	222.667±17.616	53.667±18.556
OE组	125.333±29.161	20.000±7.000
t值	4.948	2.940
P值	0.008	0.042

表10　H1299 CTSE过表达细胞系的生长曲线

Table 10　Growth curves of the H1299 CTSE-overexpressing cell line

（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	450 nm处吸光度				
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
Vector组	0.213±0.010	0.365±0.014	1.234±0.193	1.912±0.149	2.395±0.122
OE组	0.189±0.006	0.201±0.006	0.378±0.028	0.717±0.049	1.457±0.096
组间			F值=356.193	P值<0.001	
时点间			F值=715.104	P值<0.001	
组间·时点间			F值=89.279	P值<0.001	

表11　A549 CTSE过表达细胞系的生长曲线

Table 11　Growth curves of the A549 CTSE-overexpressing cell line

（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	450 nm处吸光度				
	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
Vector组	0.202±0.011	0.311±0.017	0.472±0.028	0.907±0.053	2.159±0.264
OE组	0.204±0.006	0.281±0.014	0.388±0.019	0.847±0.101	1.634±0.237
组间			F值=18.719	P值=0.003	
时点间			F值=337.859	P值<0.001	
组间·时点间			F值=8.256	P值=0.014	

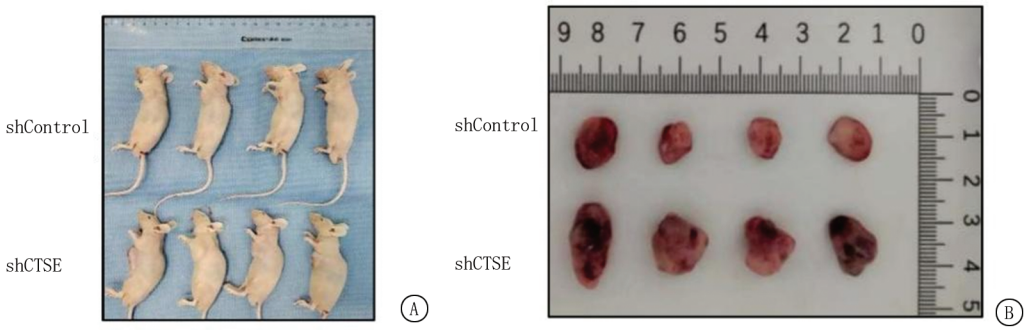


图8　CTSE敲低后裸鼠皮下瘤形成实验

A. 各组裸鼠皮下移植瘤大体形态观察；B. 25 d时裸鼠移植瘤体积

Figure 8　Xenograft tumor formation assay in nude mice following CTSE knockdown

表12　裸鼠移植瘤重量

Table 12　Weight of transplanted tumors in nude mice

（n=4，$\bar{x}\pm s$，g）

组别	皮下移植瘤重量
shControl组	0.318±0.049
shCTSE组	0.768±0.151
t值	5.656
P值	<0.001

对CTSE过表达及对照组细胞的免疫沉淀联合蛋白质谱分析显示，在CTSE过表达组PSMB9、FAH、RPE、BCS1L、SNX15、HEMK2、HSPBAP1、PARP8、BAG6、ODAD1、LAMTOR2、POLE4等蛋白水平升高（图10A）。通路富集结果显示，CTSE互作蛋白显著富集于溶酶体途径与mTOR信号通路上（图10B、图10C）。

3　讨　论

LUAD作为肺癌最主要的病理亚型，其恶性增殖是驱动疾病进展、影响患者预后的核心生物学特征，筛选可反映肿瘤恶性程度并调控增殖的关键分子，对优化临床病理评估、挖掘新型靶向治疗靶点具有重要意义。本研究探究了CTSE在LUAD中的表达特征、对细胞增殖的调控作用及潜在分子机制，为LUAD的基础研究与临床转化提供了新的实验依据。

多项研究[16, 18-20]证实，CTSE在胰腺癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌中的表达较正常组织升高，肿瘤细胞中的CTSE可以通过促进细胞的增殖、侵袭、迁移，参与恶性肿瘤发生发展[20-21]，

表13　裸鼠移植瘤生长曲线

Table 13　Growth curves of transplanted tumors in nude mice

（n=4，$\bar{x}\pm s$，mm^3）

组别	皮下瘤体积						
	5 d	10 d	13 d	16 d	19 d	22 d	25 d
shControl组	0.000±0.000	57.888±5.788	73.115±36.306	137.651±65.734	314.630±65.200	461.799±118.595	709.835±144.534
shCTSE组	0.000±0.000	88.233±22.696	129.722±29.042	196.958±41.080	447.104±159.807	786.363±145.755	1 115.550±254.344
组间				F值=10.683	P值=0.017		
时点间				F值=103.965	P值＜0.001		
组间·时点间				F值=5.706	P值=0.017		

表14　CTSE敲低细胞系细胞周期变化

Table 14　Cell cycle changes in CTSE-knockdown cell lines

（n=3，$\bar{x}\pm s$，%）

组别	A549			H1299		
	G1	S	G2	G1	S	G2
shControl组	50.633±0.907	36.567±1.914	10.273±2.149	36.633±0.379	43.067±3.980	17.467±3.828
shCTSE-1组	52.433±0.737*	37.867±1.242	6.897±0.412	35.600±0.529	40.900±0.872	20.000±1.400
shCTSE-2组	54.933±0.153*	31.367±3.355	12.667±3.758	42.733±0.929*	31.467±1.701*	23.067±1.021
F值	30.194	6.468	3.999	103.946	17.560	4.008
P值	＜0.001	0.032	0.079	＜0.001	0.003	0.078

*P值＜0.05与shControl组比较（Dunnett's t检验）

表15　CTSE过表达细胞系细胞周期变化

Table 15　Cell cycle changes in CTSE-overexpressing cell lines

（n=3，$\bar{x}\pm s$，%）

组别	A549			H1299		
	G1	S	G2	G1	S	G2
Vector组	52.133±1.563	37.567±1.616	7.783±0.627	33.700±1.044	39.800±0.794	24.267±0.702
OE组	54.833±0.513	36.300±0.361	5.730±0.303	34.600±5.950	38.933±4.552	21.900±1.253
t/t'值	2.843	1.325	5.108	0.258	0.325	2.854
P值	0.047	0.256	0.007	0.809	0.762	0.046

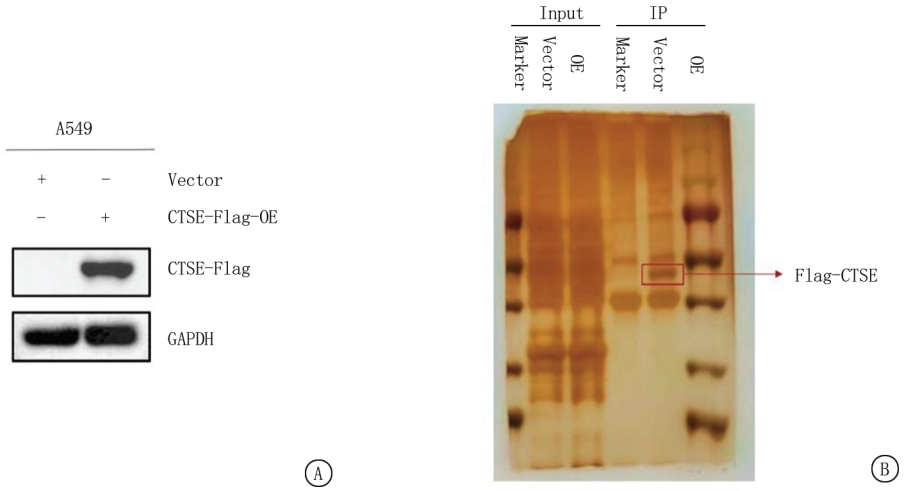


图9　带有Flag标签的CTSE过表达LUAD细胞系的构建和免疫沉淀

A. 带有Flag标签的A549 CTSE过表达细胞的构建；B. 以抗Flag磁珠进行转染Flag-CTSE及对照组细胞的免疫沉淀，沉淀产物经SDS-PAGE分离后银染，箭头示Flag-CTSE蛋白

Figure 9　Construction and co-immunoprecipitation of Flag-tagged CTSE-overexpressing LUAD cell lines

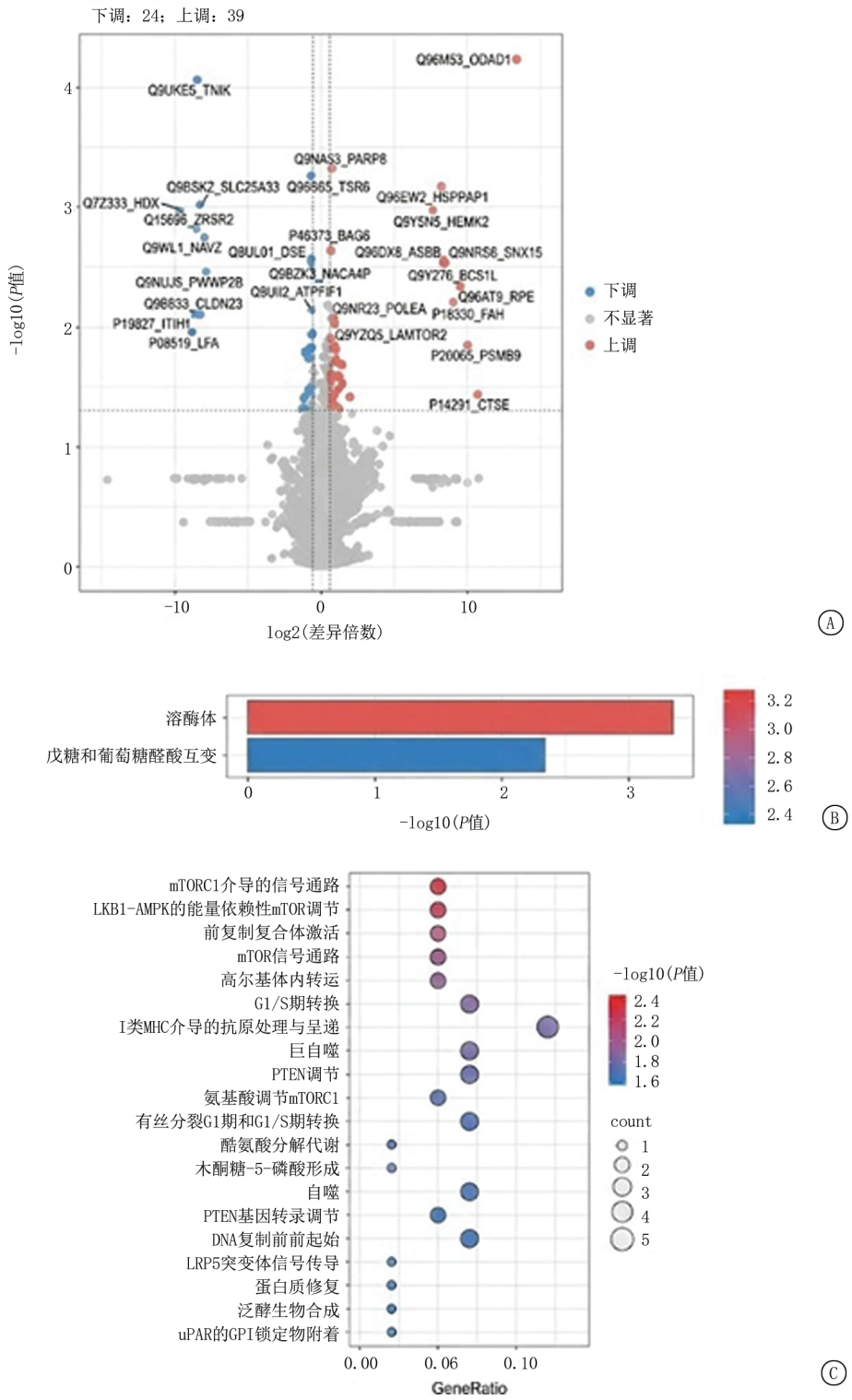


图10　CTSE过表达与对照组LUAD细胞系蛋白差异分析

A. CTSE过表达组与对照组免疫沉淀实验蛋白质质谱分析差异基因；B. CTSE组免疫沉淀上调基因的KEGG通路富集分析；C. CTSE组免疫沉淀上调基因的Reactome富集分析

Figure 10　Differential protein analysis between CTSE-overexpressing and control LUAD cell lines

然而CTSE在LUAD中的作用却鲜有报道。本研究首先通过组织芯片免疫组织化学检测发现，CTSE在LUAD组织中的表达水平显著高于癌旁组织，且与病理分级呈显著正相关，这与组织蛋白酶家族其他成员在其他肿瘤中的研究结果相似[22]，进一步表明组织蛋白酶家族在促进肿瘤发生发展中的普遍功能。但各成员的表达模式与功能可能存在一定特异性，各癌种的不同生长特点

与环境可能导致表观遗传水平调控差异，仍需进一步探究。

细胞系表达检测显示，CTSE在PC9、A549、H1650、H1975等多数LUAD细胞系中呈高表达状态，而在H1299细胞中表达无明显差异或呈低表达状态，这一现象反映了LUAD的分子异质性。LUAD不同细胞株的基因表达、生物学特性存在差异，这可能是导致CTSE表达水平不一致的主要原因。本研究选取A549与H1299细胞系开展体外功能验证，其中A549为LUAD研究中最常用、生物学特性稳定的经典细胞模型，结果具有较高的代表性与可重复性；H1299与A549同属表皮生长因子受体野生型细胞，可以排除表皮生长因子受体状态不同导致的增殖差异细胞且CTSE基础表达水平较低，可避免高表达背景对实验结果的干扰，适合开展双向功能验证。体外CCK-8及克隆形成实验结果一致证实，CTSE敲低可显著促进LUAD细胞增殖，过表达则显著抑制增殖，提示CTSE在LUAD细胞中发挥负向调控增殖的作用，且该功能具有在多细胞系内的普遍性，适合开展进一步的机制研究。

为进一步在体内水平验证CTSE的功能，本研究构建了裸鼠皮下移植瘤模型。CTSE敲低可显著加快裸鼠移植瘤生长速度、增加肿瘤体积与重量，与CTSE敲低的体外功能实验结果高度吻合，进一步证实了CTSE表达降低在体内外均发挥促进增殖的作用。但本研究仅采用A549细胞CTSE敲低模型，未开展CTSE过表达及H1299细胞体内实验验证，主要原因为A549细胞体内成瘤效率高、表型稳定，而H1299细胞成瘤能力较弱、成瘤周期长，不利于快速获得稳定的体内实验结果。

细胞周期是调控细胞增殖的经典途径，丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路、PI3K/Akt/mTOR等经典促增殖信号轴通常通过推动细胞周期转换、加速DNA合成与细胞分裂驱动肿瘤增殖[23-25]。为初步揭示CTSE调控LUAD细胞增殖的分子机制，本研究采用流式细胞术检测了CTSE过表达对细胞周期的影响，显示CTSE调控增殖不依赖细胞周期转换。进一步行免疫沉淀联合质谱分析结果显示，CTSE互作蛋白主要富集于溶酶体途径及mTOR信号通路，进一步佐证了CTSE可能通过非依赖细胞周期转换的方式调控增殖。

本研究仅在A549细胞中开展机制探索，未在H1299细胞中进行重复验证，主要原因为A549细胞CTSE呈高表达状态，更利于富集CTSE互作蛋白，提高质谱检测的效率与准确性，保证机制探索的可靠性；同时，A549细胞生物学特性稳定，是LUAD机制研究中最常用的经典模型，其通路分析结果更具代表性和可比性。

本研究也存在一定的局限性：其一，体内实验仅采用A549细胞CTSE敲低模型，未开展过表达及H1299细胞体内实验，后续可扩大细胞系范围、完善体内实验设计，进一步验证CTSE的体内功能；其二，机制研究仅初步通过质谱分析提示溶酶体途径及mTOR信号通路的参与，未开展通路的抑制剂验证、蛋白互作验证等，后续需深入探索CTSE与通路的具体作用关系，完善分子调控网络；其三，仅通过组织芯片分析了CTSE的表达与病理分级的相关性，未结合患者随访数据，后续可扩大临床样本量，探究CTSE表达与患者预后的关联，进一步明确其临床应用价值。

综上所述，本研究证实CTSE在LUAD组织中高表达且与病理分级密切相关，可作为LUAD病理分级评估的潜在生物学指标；CTSE通过溶酶体途径及mTOR信号通路负向调控LUAD细胞体内外增殖，且该调控作用不依赖细胞周期进程转换。本研究丰富了LUAD增殖调控的分子机制，也为LUAD的临床病理评估与新型靶向治疗提供了新的靶点与实验基础。

[参考文献]

[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): 229-263.

[2] Zimolzak AJ, Kapadia P, Upadhyay DK, et al. Frequent missed opportunities for earlier diagnosis of advanced-stage colorectal or lung cancer[J]. JAMA Intern Med, 2025, 185(9): 1102-1108.

[3] Zeng H, Ran X, An L, et al. Disparities in stage at diagnosis for five common cancers in China: A multicentre, hospital-based, observational study[J]. Lancet Public Health, 2021, 6(12): e877-e887.

[4] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[5] Hanahan D. Hallmarks of cancer-Then and now, and beyond[J]. Cell, 2026, 189(8): 2254-2277.

[6] Nukaga S, Shiraishi K, Hamabe K, et al. Mutation of CMTR2 in lung adenocarcinoma alters RNA alternative splicing and reveals therapeutic vulnerabilities[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 9754.

[7] Ren R, Fan T, Li Y, et al. PSAT1 knockdown mediated

VDAC1 oligomerization promotes ferroptosis and suppresses cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Biol Macromol,2025,330(Pt 4):148112.

[8] Wang K, Xiao Y, Ren J, et al. Ferroptosis and low-grade Glioma: The breakthrough potential of NUAK2[J]. Free Radic Biol Med,2025,234:203-219.

[9] Lucas O, Ward S, Zaidi R, et al. Characterizing the evolutionary dynamics of cancer proliferation in single-cell clones with SPRINTER[J]. Nat Genet, 2025, 57(1): 103-114.

[10] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm[J]. Nat Rev Cancer,2009,9(3):153-166.

[11] Charar C, Gruenbaum Y. Lamins and metabolism[J]. Clin Sci(Lond),2017,131(2):105-111.

[12] Wu C, Zhuo X, Yang J, et al. Discovery of bufalin as a molecular glue degrader of NCAPG to Inhibit the proliferation of hepatoma cells[J]. Drug Dev Res,2026,87(2):e70236.

[13] Alcaraz LB, Mallavialle A, David T, et al. A 9-kDa matricellular SPARC fragment released by cathepsin D exhibits pro-tumor activity in the triple-negative breast cancer microenvironment[J]. Theranostics, 2021, 11(13): 6173-6192.

[14] David T, Mallavialle A, Faget J, et al. Anti-cathepsin D immunotherapy triggers both innate and adaptive anti-tumour immunity in breast cancer[J]. Br J Pharmacol,2026,183(6): 1288-1309.

[15] Pontious C, Kaul S, Hong M, et al. Cathepsin E expression and activity: Role in the detection and treatment of pancreatic cancer[J]. Pancreatology,2019,19(7):951-956.

[16] Wan Y, Geng X, Liu Q, et al. CTSE inhibits anti-tumor T cell response by promoting des-γ-carboxy prothrombin releasing in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Dis,2025,16(1):434.

[17] Guo B, Zhou Z, Liao W, et al. Deciphering the role of cathepsins in digestive system cancers: A Mendelian randomization study[J]. Discov Oncol,2025,16(1):1782.

[18] Zhou S, Sun Y, Zha W, et al. Investigating the role of cathepsins in breast cancer progression: A Mendelian randomization study[J]. Front Oncol,2025,15:1408723.

[19] Fan G, Tao C, Li L, et al. The co-location of $MARCO^{+}$ tumor-associated macrophages and $CTSE^{+}$ tumor cells determined the poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Hepatology,2025,82(1):25-41.

[20] Zhang H, Feng J, Zhu M, et al. Cathepsin E drives colorectal cancer progression and immune evasion via ZNF326 ADP-ribosylation and TGF-β/SMAD activation[J]. J Transl Med, 2026,24(1):568.

[21] Chen H, Yang W, Li Y, et al. Leveraging a disulfidptosis-based signature to improve the survival and drug sensitivity of bladder cancer patients[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1198878.

[22] Konno-Shimizu M, Yamamichi N, Inada K, et al. Cathepsin E is a marker of gastric differentiation and signet-ring cell carcinoma of stomach: A novel suggestion on gastric tumorigenesis[J]. PLoS One,2013,8(2):e56766.

[23] Xing Y, Feng Z, Zhang Y, et al. EIF3B regulates the cell cycle of lung adenocarcinoma cells by activating the GTSE1 mediated ERK/MAPK pathway[J]. Respir Res, 2026, 27(1):133.

[24] Zhan J, Jücker M. The role of PI3K/AKT/mTOR signaling in tumor radioresistance and advances in inhibitor research[J]. Int J Mol Sci,2025,26(14):6853.

[25] Żołnowska B, Sławiński J, Chojnacki J, et al. Novel benzenesulfonamide-aroylhydrazone conjugates as carbonic anhydrase inhibitors that induce MAPK/ERK-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-associated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells[J]. Bioorg Med Chem,2024,114:117958.

（本文编辑：赵丽洁）