

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.005

KRT6A 调控胰腺导管腺癌细胞生物学行为的作用及作为诊断与预后判断靶标的研究

王浩泽, 杨轩, 陈昕苑, 顾炎(海军军医大学 基础医学院 免疫学教研室暨免疫与炎症全国重点实验室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**通过生物信息学分析以及细胞生物学实验研究角蛋白6A(KRT6A)对胰腺导管腺癌(PDAC)诊断、预后判断、免疫微环境以及PDAC细胞PANC1增殖、凋亡等生物学行为的影响。**方法:**通过GEPIA平台整合TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库与GTEx(Genotype-Tissue)数据库中的数据,分析KRT6A在PDAC组织中的表达情况,并通过CIBERSORT工具分析KRT6A表达与PDAC组织中免疫细胞浸润的关系,然后通过GSEA方法研究与KRT6A基因表达相关的肿瘤信号通路。选取长海医院病理科保存的60例PDAC组织与癌旁组织标本进行免疫组化分析,验证KRT6A在肿瘤组织中表达情况;通过干扰RNA敲减PANC1细胞中KRT6A的表达,采用CCK-8实验以及流式细胞术检测敲减KRT6A对细胞的增殖、凋亡的影响。**结果:**利用TCGA与GTEx数据库数据分析发现,KRT6A在人PDAC组织中呈高表达,且与患者较差的生存期存在关联($P=0.015$)。利用CIBERSORT软件以及GSEA分析发现,KRT6A高表达的PDAC组织中M2型巨噬细胞浸润性升高($P=0.034$),且与Wnt通路(NES:1.7359272, $P<0.05$)、磷酸戊糖途径(PPP)(NES:1.5613053, $P<0.05$)等信号通路上调有关联($P<0.05$ 或 $P<0.01$);免疫组化结果进一步验证了KRT6A在PDAC组织中呈高表达($P<0.001$)。增殖和凋亡实验发现,干扰KRT6A能够显著抑制PANC1细胞的增殖($P<0.05$)以及凋亡($P<0.001$)。**结论:**KRT6A在人PDAC组织中呈高表达,敲减其表达能够抑制PANC1细胞的增殖和凋亡,具有作为PDAC诊断与预后判断新靶标的潜力。

[关键词] 胰腺导管腺癌;KRT6A基因;PANC1细胞;增殖;凋亡;诊断;预后

[中图分类号] R735.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0462-07

The role of KRT6A in regulating the biological behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma PANC1 cells and its role as a target for diagnosis and prognosis

WANG Haoze, YANG Xuan, CHEN Xinyuan, GU Yan (National Key Laboratory of Immunity and Inflammation & Institute of Immunology, School of Basic Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study, through bioinformatics analysis and cellular biology experiments, the effects of keratin 6A (KRT6A) on the diagnosis, prognosis and immune microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and biological behaviors of PDAC PANC1 cells, such as proliferation and apoptosis. **Methods:** The GEPIA platform was used to integrate the data from the TCGA (The Cancer Genome Atlas) and the GTEx (Genotype-Tissue) to analyze the KRT6A expression in PDCA tissues. CIBERSORT software was then used to analyze the correlation between KRT6A expression and immune cell infiltration in PDCA tissues, and GSEA analysis was used to study the signaling pathway related to KRT6A gene expression. Immunohistochemical analysis was performed on cancer and adjacent tissue samples from 60 PDAC patients preserved in the Department of Pathology of Changhai Hospital to verify the expression of KRT6A in tumor tissues. The expression of KRT6A gene in PANC1 cells was inhibited by interfering with siRNA. The effects of KRT6A on the proliferation and apoptosis of PDAC cells were detected by CCK-8 assay and flow cytometry. **Results:** Data analysis of the TCGA and the GTEx found that KRT6A was highly expressed in human PDAC tissues and was significantly correlated with poor survival period of patients ($P=0.015$). CIBERSORT software and GSEA analysis showed that the infiltration of M2-type macrophages in PDCA tissues with high KRT6A expression was increased ($P=0.034$), and there was a significant correlation between high KRT6A expression and the up-regulation of Wnt pathway (NES: 1.7359272, $P<0.05$), pentose phosphate pathway (PPP) (NES: 1.5613053, $P<0.05$) and other signaling pathways ($P<0.05$ or $P<0.01$). Immunohistochemical results further verified the high

[基金项目] 上海市2021年度“科技创新行动计划”自然科学基金项目(No. 21ZR1477500)

[作者简介] 王浩泽(1998—),男,硕士生,主要从事肿瘤免疫及肿瘤微环境的基础研究。E-mail: wanghaoze20212021@163.com

[通信作者] 顾炎, E-mail: guyan@immunol.org

expression of KRT6A in PDCA tissues ($P<0.001$). Proliferation and apoptosis experiments showed that interfering with KRT6A gene could significantly inhibit the proliferation ($P<0.05$) and apoptosis ($P<0.001$) of PANC1 cells. **Conclusion:** KRT6A is highly expressed in human PDAC tissues, and knocking down its expression can inhibit the proliferation and apoptosis of PANC1 cells, and has the potential to be a new target for PDAC diagnosis and prognosis.

[Key words] pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC); keratin 6A (KRT6A); PANC1 cell; proliferation; apoptosis; diagnosis; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 462-468. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.005]

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是一种起源于胰腺导管上皮及腺泡细胞的消化系统恶性肿瘤,其恶性程度极高、起病隐匿,尽管外科手术和辅助治疗的手段不断进步,但PDAC患者的总生存率并没有显著提高,其发病率与病死率基本持平^[1-2]。在某些肿瘤组织中TGF- β 、Wnt/Notch以及hedgehog信号通路异常表达^[3-4],在某些肿瘤组织中有关细胞凋亡、DNA损伤修复等基因表达异常活化^[5]。而在PDAC中,许多信号通路蛋白异常表达具有明显的异质性,因此通过研究不同PDAC组织的基因表达谱可为未来肿瘤的个性化治疗提供参考。角蛋白6A(keratin 6A, KRT6A)是2型角蛋白的一种,其在甲床、口腔上皮和食管上皮细胞的形成中发挥重要作用。研究^[6]发现,在吸烟导致的非小细胞肺癌(NSCLC)患者中,KRT6A高表达与肿瘤患者的淋巴结转移以及预后较差存在密切关系。在机制研究^[7]中发现,KRT6A能够参与肿瘤干细胞的形成,调节肿瘤细胞干性、促进EMT进程,从而促进肿瘤的转移。在鼻咽癌中,通过基因沉默或者siRNA技术降低KRT6A基因表达进而抑制肿瘤细胞的增殖以及转移,这种方法也为鼻咽癌的治疗与诊断提供了创新性手段方法^[8]。在浆液性卵巢癌中,肿瘤细胞K6蛋白(其主要形式为KRT6A)表达升高与无进展存活期的缩短有关,也与疾病复发存在关联^[9]。尽管目前部分文献分析了KRT6A在PDAC中的表达,但KRT6A在PDAC发生发展中的相关机制尚未阐明。因此,研究KRT6A在PDAC中的表达差异以及探索相关机制,对发现新的PDAC生物标志物并且用于早期诊断与治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 KRT6A 基因表达差异性及生存期分析

通过 Gene Expression Profiling Interactive Analysis(GEPIA)平台,对TCGA数据库与GTEx数据库中的PDAC数据进行筛选整合。从中选取179例PDAC患者样本与171例健康成年人样本,分析KRT6A基因在PDAC组织与正常组织中表达的差异。选取89例高表达KRT6A基因与89例低表达

KRT6A基因的PDAC患者数据,分析KRT6A表达与患者生存期的关系,从而对患者预后做出评估。

1.1.2 KRT6A 基因表达差异性与肿瘤免疫浸润性间的关系分析

CIBERSORT免疫浸润分析法是一种基于基因表达的反卷积算法,用于评估一组基因相对于样本中其他基因的表达变化。因此,通过CIBERSORT软件分析KRT6A基因表达与肿瘤浸润的各种免疫细胞数量之间的关系。

1.1.3 KRT6A 基因的GSEA分析

GSEA分析是基因集富集分析的一种算法,用来评估一个先验定义的基因集合在一个表型排序的基因表中的分布趋势,从而判断其对表型的贡献程度^[10-11]。因此,在KRT6A高表达的PDAC患者中,通过GSEA分析,分析出与PDAC组织KRT6A高表达相关的信号通路的基因集合,从而确定相关的信号通路。

1.2 主要材料与试剂

1.2.1 实验样本

人PDAC病理组织芯片由上海芯超生物科技有限公司设计并制作,组织标本来自海军军医大学附属长海医院病理科,共120例,其中60例为PDAC组织标本,经病理诊断均为PDAC,另外60例为相应癌旁组织作为对照组织。人PDAC细胞PANC1购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.2.2 主要试剂与仪器

二甲苯溶液、酒精、盐酸溶液均购自国药集团化学试剂上海有限公司,柠檬酸钠抗原修复液、过氧化物酶封闭液、封闭用羊血清、即用型二抗(HRP标记的山羊抗小鼠/兔IgG聚合物)、DAB(二氨基联苯胺)显色试剂盒均购自中杉金桥生物公司,苏木精染液购自赛维尔生物公司,抗KRT6A单克隆抗体(种属:兔抗)购自Abcam公司,opti-MEM培养基、高糖型DMEM培养基购自Gibco公司,胰酶消化液购自博光生物公司,胎牛血清FBS购自德国Capricorn生物公司,细胞凋亡检测试剂盒购自Biolegend公司,CCK-8试剂盒购自MCE公司,Lipofectamine RNAiMAX转染试剂盒购自Thermo Fisher科技公司,总RNA快速抽提试剂盒购于上海飞捷生物技术有限公司,Premix型反转录试剂购自TaKaRa生物技

术公司, SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自艾科瑞生物公司, Leica HI1220 烤片机、Leica HI1210 摊片机均购自 Leica 公司, Applied Biosystems 实时荧光定量 PCR 仪器购自 Thermo Fisher 公司, 流式细胞仪购自 BD 医疗器械公司, 荧光酶标仪购自 PerkinElmer 公司。靶向 KRT6A 以及相应的阴性对照组的 siRNA 均由吉玛公司设计并合成。

1.3 免疫组化检测人 PDAC 组织芯片样本中 KRT6A 蛋白的表达

将人 PDAC 组织芯片经过烤片机 70 °C 烤片 3 h, 然后置于 45 °C 二甲苯溶液中脱蜡, 再依次置于 100%、95%、85%、70% 浓度梯度的酒精溶液中脱去二甲苯, 最后置于纯水中脱去酒精。再将组织芯片放置于柠檬酸钠溶液中高压蒸煮 160 s 左右, 室温静置冷却后将组织芯片放置于 PBS 中清洗, 再用阻水笔在组织周围画一个适当大小的圈, 向阻水圈中加入过氧化氢溶液, 室温下处理 30 min 后于 PBS 中清洗 3 次, 每次 3 min。擦干组织周围水分, 向阻水圈中加入封闭用羊血清, 室温下处理 1 h 进行封闭, 用抗体稀释液按照 1:200 比例配置好一抗溶液, 滴加至阻水圈中, 4 °C 处理过夜。第 2 天, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min。清洗之后, 直接在阻水圈中滴加即用型二抗, 于 37 °C 培养箱内下处理 40 min。PBS 清洗 3 次, 每次 3 min。清洗之后, 在阻水圈中加入 DAB 溶液显色, 然后放置于 PBS 中清洗, 终止显色。再放置于苏木素溶液中染色, 无水乙醇脱水, 最终滴加中性树脂进行封片, 光镜下观察 KRT6A 蛋白表达情况。

1.4 免疫组化结果评判标准

根据组织的染色强度以及染色的细胞数进行积分的半定量评定: (1) 染色强度为无阳性着色(阴性)为 0 分、浅棕色(弱阳性)为 1 分、棕黄色(阳性)为 2 分、深棕色(强阳性)为 3 分; (2) 根据阳性细胞的百分比分为四级, 染色的细胞数量占组织总细胞量 $\leq 25\%$ 为 1 分, $>25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。根据以上两项得分之乘积作为最终评定分数, 0 分为阴性(-) 1~4 分为一般阳性(+); 5~8 分为中度阳性(++) 9~12 分为强阳性(+++)。

1.5 向 PANC1 细胞转染 siRNA 以敲减 KRT6A 的表达

当用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养的 PANC1 细胞生长至 70%~80% 汇合时, 用胰酶消化并进行细胞铺板, 随机分为空白组、si-NC 组和 si-KRT6A 组。第 2 天, 将培养基换为温热的含 1% FBS 的 DMEM 培养基。按照 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂盒说明书, 将 siRNA 与转染试剂在 Opti-MEM 培养基中混匀, 加入至培养基中、混匀, 于 37 °C 细胞培养箱中静置 6 h, 将培养基换为温热的 10% FBS 的 DMEM 培

养。第 3 天, 提取细胞总 RNA, 反转录得到 cDNA, 进行 qPCR 实验检测 KRT6A 基因表达水平改变。KRT6A 的正向引物为 GTGAGGAGTGCA GGCTGAAT, 反向引物为 CATAGCCAC TGGAGACGGTG; GAPDH 的正向引物为 TGACCTCAACTACATGGTCTACA, 反向引物为 CTTCCCATTCTCGGCCTTG。反转录的反应时间以及温度为 37 °C 5 min, 85 °C 5 s, 4 °C 10 min。qPCR 条件为 95 °C 1 min; 95 °C 10 s; 56 °C 20 s; 72 °C 20 s, 循环 40 次; 95 °C 1 min; 65 °C, 1 min; 95 °C, 15 s; 40 °C, 2 min。反转录及 qPCR 实验具体步骤均按照实验试剂盒说明书进行操作。

1.6 CCK-8 法检测敲减 KRT6A 表达对 PANC1 细胞增殖的影响

在 96 孔板中按每孔 1×10^4 个/200 μ L 接种实验组以及对照组 PANC1 细胞, 在 24、48、72 h 时分别加入 10 μ L CCK-8 试剂, 放置于 37 °C 细胞培养箱中静置 2 h, 最后利用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的光密度 (D) 值, 统计数据并绘制细胞增殖曲线。

1.7 流式细胞术检测敲减 KRT6A 表达对 PANC1 细胞凋亡的影响

将加入 200 μ mol/L 吉西他滨处理的对照组以及实验组 PANC1 细胞放入培养箱中静置 24 h, 用胰酶消化得到细胞悬液, 500 \times g 离心 5 min, 弃掉上清液, 用 10 μ L 的 1 \times 结合缓冲液重悬细胞, 加入 0.5 mL Annexin V-FITC 后于室温下避光静置 15 min。上机前 2 min 加入 0.5 μ L PI-PE, 再加入 200 μ L 的 1 \times 结合缓冲液重悬, 转移至流式管中, 进行流式分析。

1.8 统计学处理

上述实验均经过 3 次或 3 次以上的独立重复实验。采用 GraphPad Prism 8.0.2 生物统计学软件进行数据的统计分析, 符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。当分析两组独立重复数据之间是否存在差异性时, 采用非配对 *t* 检验; 当存在单一自变量时分析 3 组或者 3 组以上独立重复数据之间是否存在差异性, 采用 one-way ANOVA 分析; 当存在两个自变量时分析 3 组或者 3 组以上独立重复数据之间是否存在差异性, 采用 two-way ANOVA 分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

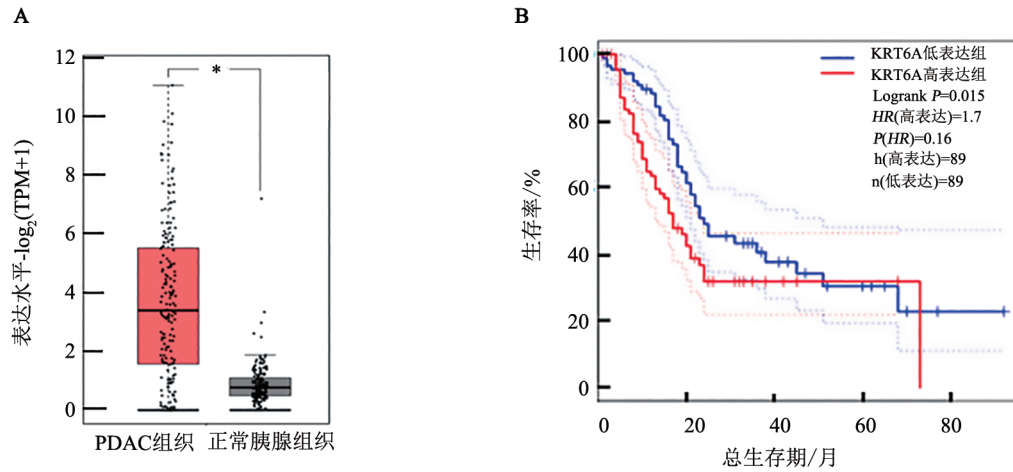
2 结果

2.1 高表达 KRT6A 的 PDAC 患者总生存期较短

通过 GEPIA 数据分析平台对 TCGA 数据库的肿瘤患者样本与 GTEx 数据库的正常健康人样本进行分析, 179 例 PDAC 患者标本与 171 健康人标本的转录组数据分析结果 (图 1A) 显示, KRT6A 基因在

PDAC 组织中表达显著升高 ($P < 0.05$)。通过对有生存数据的 89 例 KRT6A 高表达与 89 例 KRT6A 低表达的 PDAC 患者样本进行分析, 结果 (图 1B) 显示,

KRT6A mRNA 高表达的 PDAC 患者的总生存期显著缩短 ($P = 0.015$)。



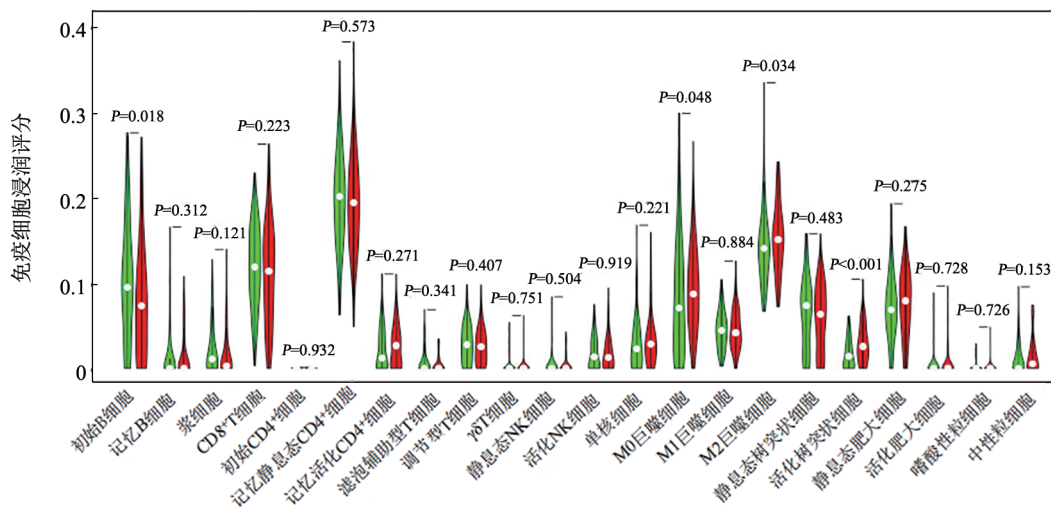
A: PDAC 组织 ($n = 179$) 和正常胰腺组织 ($n = 171$) 中 KRT6A 基因表达分析, 双侧 Student's t 检验, $*P < 0.05$;
B: Kaplan-Meier 检验分析 KRT6A 基因表达与 PDAC 患者的总生存期之间的关联。

图 1 KRT6A 基因在肿瘤及正常组织中的表达差异及与患者的预后分析

2.2 高表达 KRT6A 的 PDAC 组织中 M2 型巨噬细胞浸润程度升高

采用 CIBERSORT 软件对 KRT6A 不同表达水平的 PDAC 组织中的免疫细胞浸润进行评估, 对肿瘤组

织浸润的 22 种免疫细胞亚型进行分析发现, KRT6A 高表达的肿瘤组织中 M2 型巨噬细胞浸润程度显著升高 ($P = 0.034$, 图 2)。



绿色: KRT6A 低表达; 红色: KRT6A 高表达。

图 2 PDAC 组织中的 KRT6A 表达水平与组织浸润性免疫细胞亚型数量的关联

2.3 KRT6A 表达相关基因的 GSEA 富集分析

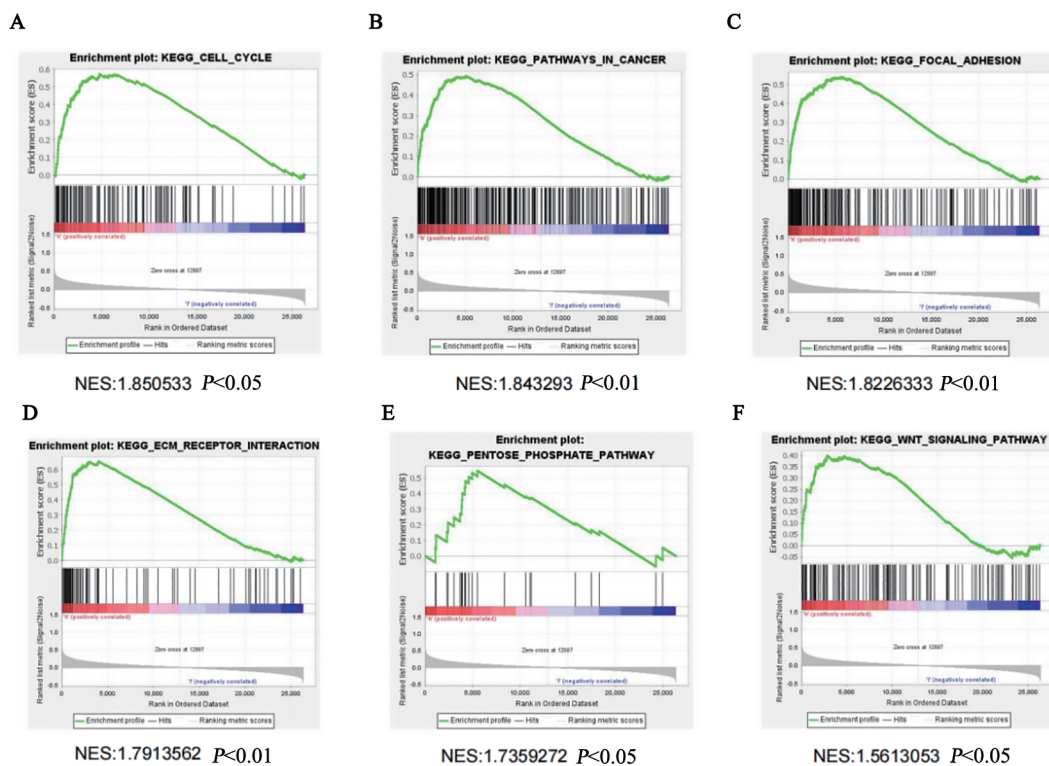
通过对 KRT6A 基因表达存在显著差异的两组肿瘤组织样本进行 GSEA 富集分析, 结果如图 3 所示, 细胞周期相关信号通路在 KRT6A 高表达的肿瘤组织中显著上调 (NES: 1.850533, $P < 0.05$) (图 3A), 说明 KRT6A 可能参与调控细胞周期和细胞增殖。此外,

细胞的胞外基质相互作用 (NES: 1.7913562, $P < 0.01$) (图 3D) 以及细胞黏连 (NES: 1.8226333, $P < 0.01$) (图 3C) 相关的信号通路在 KRT6A 高表达的肿瘤组织中显著上调, 说明 KRT6A 可能促进了肿瘤细胞的侵袭以及转移等^[12]。

从能量代谢角度分析发现, PDAC 组织中

KRT6A 表达增强与磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)代谢增强存在显著正相关关系(NES: 1.7359272, $P<0.05$) (图 3E), 这说明 KRT6A 表达增强, 提高 PPP 途径代谢效率, 可能为肿瘤细胞增殖提供更多的遗传物质以及 NADPH^[13]。进一步研究发

现, Wnt 信号通路在 KRT6A 高表达的 PDAC 组织中显著上调(NES: 1.5613053, $P<0.05$) (图 3F), 而 Wnt 通路异常激活在多种组织中具有促进肿瘤发生的效应, 并且能够调节肿瘤组织的干细胞特性, 抑制免疫细胞功能等^[14]。



KRT6A 表达相关信号通路基因的 GSEA 富集分析, 包括细胞周期(A)、癌症通路(B)、黏附(C)、ECM 受体相互作用(D)、磷酸戊糖通路(E)、Wnt 信号通路(F)。

图3 GSEA 富集分析 KRT6A 表达相关基因

2.4 人PDAC 组织中 KRT6A 呈高表达

免疫组化实验检测结果(图 4)显示, PDAC 组织的 KRT6A 蛋白表达水平显著高于癌旁组织 ($P<0.001$)。

2.5 敲减 KRT6A 对人 PDAC 肿瘤细胞的增殖以及凋亡的影响

为了进一步验证 KRT6A 对 PDAC 细胞的增殖凋亡等生物学行为的影响, 通过转染靶向 KRT6A 的 siRNA 敲减 PANC1 细胞中 KRT6A 基因的表达 ($P<0.001$; 图 5A)。CCK-8 法检测结果(图 5B)显示, 敲减 KRT6A 表达后, PANC1 细胞的增殖受到显著抑制 ($P<0.05$)。流式细胞术检测结果(图 5C~F)显示, 敲减 KRT6A 表达后, 吉西他滨诱导 PANC1 细胞的凋亡率明显升高 ($P<0.001$)。

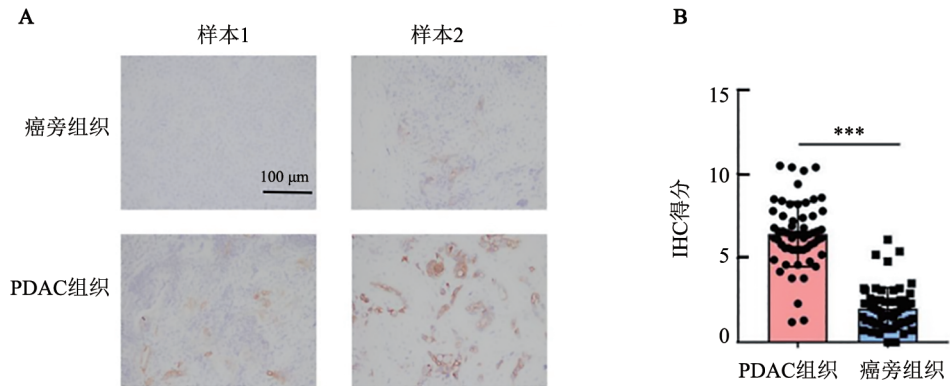
3 讨论

PDAC 患者预后差、病死率高。目前, 外科手术仍然是治疗的主要手段, 化疗药物仅能在一定程度

上缓解晚期患者的症状^[15-16]。因此 PDAC 治疗需要寻找新的分子生物学靶点。早期有研究通过对 24 例 PDAC 进行全外显子测序, 发现 PDAC 的基因组中存在 KRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4 等基因的突变峰, 进一步的大规模基因组测序发现与 DNA 损伤以及染色质重塑相关基因的表达发生改变^[17-18]。因此, 在 PDAC 的发生发展中, 抑癌基因、DNA 损伤修复相关基因异常表达以及染色质重塑等表观遗传分子改变可能扮演着重要的角色。而通过对人 PDAC 转录组学相关数据整合分析发现, 在具有侵袭以及转移表性的 PDAC 中, EMT、细胞周期蛋白以及 TGF- β 等信号通路相关蛋白明显上调, 这也揭示了 PDAC 肿瘤细胞发生侵袭转移时的重要蛋白分子的改变, 未来可能作为诊断以及靶向治疗 PDAC 的重要指标^[19]。而 PDAC 的相关基因以及信号通路蛋白分子改变又能影响整体的肿瘤微环境, 例如肿瘤组织中 Treg 细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)数量增多以及 CD8⁺T 细胞耗竭等, 最终造成肿瘤免疫抑制微环境形成^[20]。

尽管目前对 PDAC 相关分子改变以及肿瘤微环境改变有了一定认识,但是有效地用于临床诊断以及治

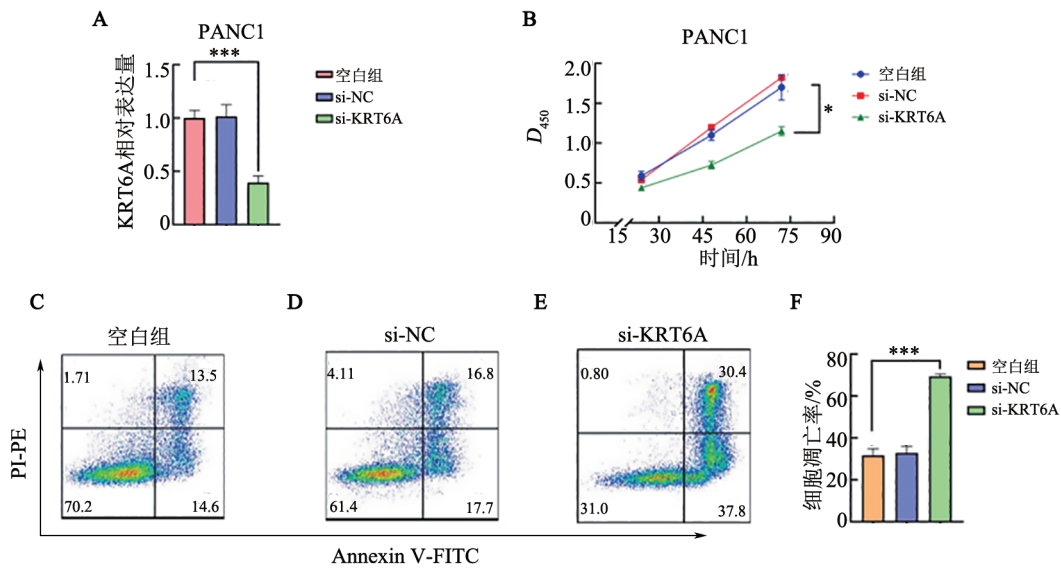
疗的靶标仍然了解较少,需要进一步深入研究与探索。



A: 免疫组化法检测 KRT6A 蛋白在 PDAC (n=60) 和癌旁组织 (n=60) 中的表达, 比例尺=100 μm。

B: KRT6A 表达的定量分析, 双侧 Student's t 检验。***P<0.001。

图4 KRT6A 蛋白在人 PDAC 组织与癌旁组织中的表达



A: 通过 qPCR 检测 siRNA 对 KRT6A 表达的影响; B: CCK-8 法检测敲减 KRT6A 表达对 PANC1 细胞增殖的影响;

C~F: 流式细胞术检测敲减 KRT6A 表达对 PANC1 的细胞凋亡的影响。*P<0.05、***P<0.001。

图5 KRT6A 对 PDAC 细胞 PANC1 的增殖及凋亡的影响

本研究通过生物信息学分析方法以及细胞生物学技术结合的方法,探索 KRT6A 基因在肿瘤发生发展中的表达以及效应。首先通过 GEPIA 平台整合 TCGA 数据库与 GTEx 数据库中的数据进行单因素相关性分析发现, PDAC 组织中 KRT6A 高表达且与患者生存期较短存在关联,而通过对人 PDAC 组织的免疫组化进一步验证了上述结论。其次,通过 CIBERSORT 软件对 KRT6A 基因高表达的 PDAC 组织的肿瘤免疫细胞浸润性进行评估,发现 M2 型巨噬细胞浸润程度升高。由于 KRT6A 在肿瘤组织以及正常组织中表达的差异性,因此 KRT6A 未来可能作为肿瘤临床诊断的重要靶标。

通过 GSEA 分析发现了与 KRT6A 高表达相关的上调的信号通路基因,如在 KRT6A 高表达的 PDAC 组织中,细胞的胞外基质相互作用以及细胞黏连相关的信号通路表达升高,说明 KRT6A 可能促进肿瘤细胞的侵袭以及转移^[12];再如 Wnt 信号通路在 KRT6A 高表达的肿瘤组织中表达上调,说明 KRT6A 也可能参与肿瘤组织的干细胞特性的调节以及免疫抑制微环境的形成^[14]。但是也存在一些通路活化的具体机制尚待研究解决。例如,在 GSEA 分析中发现, KRT6A 高表达的肿瘤组织样本半乳糖代谢高表达,而还有研究^[21]发现半乳糖在部分 AKT 突变型肿瘤组织中会抑制其增殖。这需要通过进一步深入研

究来探明其间的关联机制。本研究进一步通过细胞实验验证了敲减KRT6A能够抑制PANC1细胞增殖、促进细胞凋亡,推测KRT6A可能通过促进肿瘤细胞的恶性生物学行为参与肿瘤发生发展。

综上,本研究证实了PDAC患者肿瘤组织中KRT6A呈高表达且与患者生存期较短存在关联,在KRT6A高表达的肿瘤组织中细胞的胞外基质相互作用以及细胞黏连相关的信号通路、Wnt信号通路表达上调,而且敲减KRT6A能够抑制PANC1细胞增殖、促进细胞凋亡。上述发现提示KRT6A具有成为PDAC临床诊治标志物的潜力。

[参考文献]

- [1] GUPTA R, AMANAM I, CHUNG V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 116(1): 25-34. DOI: 10.1002/jso.24623.
- [2] KOLBEINSSON H M, CHANDANA S, WRIGHT G P, *et al*. Pancreatic cancer: a review of current treatment and novel therapies[J/OL]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1): 2129884[2024-02-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36191926/>. DOI: 10.1080/08941939.2022.2129884.
- [3] ZHOU B H, LIN W L, LONG Y L, *et al*. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 95[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8948217/>. DOI: 10.1038/s41392-022-00934-y.
- [4] ZHAO H D, WEI J, SUN J. Roles of TGF- β signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt B): 107101[2024-02-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099067/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107101.
- [5] ELTAWIL K M, RENFREW P D, MOLINARI M. Meta-analysis of phase III randomized trials of molecular targeted therapies for advanced pancreatic cancer[J/OL]. *HPB*, 2012, 14(4): 260-268[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371213/>. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00441.x.
- [6] ZHOU J Z, JIANG G Q, XU E W, *et al*. Identification of SRXN1 and KRT6A as key genes in smoking-related non-small-cell lung cancer through bioinformatics and functional analyses[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 810301[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8767109/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.810301.
- [7] YANG B, ZHANG W, ZHANG M M, *et al*. KRT6A promotes EMT and cancer stem cell transformation in lung adenocarcinoma[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820921248[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7225834/>. DOI: 10.1177/1533033820921248.
- [8] CHEN C J, SHAN H G. Keratin 6A gene silencing suppresses cell invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma *via* the β -catenin cascade[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3477-3484. DOI: 10.3892/mmr.2019.10055.
- [9] RICCIARDELLI C, LOKMAN N A, PYRAGIUS C E, *et al*. Keratin 5 overexpression is associated with serous ovarian cancer recurrence and chemotherapy resistance[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17819-17832[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5392289/>. DOI: 10.18632/oncotarget.14867.
- [10] SUBRAMANIAN A, KUEHN H, GOULD J, *et al*. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(23): 3251-3253. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm369.
- [11] TU Z B, XIONG J, XIAO R J, *et al*. Loss of miR-146b-5p promotes T cell acute lymphoblastic leukemia migration and invasion via the IL-17A pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5936-5948. DOI: 10.1002/jcb.27882.
- [12] JANISZEWSKA M, PRIMI M C, IZARD T. Cell adhesion in cancer: beyond the migration of single cells[J/OL]. *J Biol Chem*, 2020, 295(8): 2495-2505[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7039572/>. DOI: 10.1074/jbc.REV119.007759.
- [13] TESLAA T, RALSER M, FAN J, *et al*. The pentose phosphate pathway in health and disease[J]. *Nat Metab*, 2023, 5(8): 1275-1289. DOI: 10.1038/s42255-023-00863-2.
- [14] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, *et al*. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3 [2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8724284/>. DOI: 10.1038/s41392-021-00762-6.
- [15] BURRIS H A 3rd, MOORE M J, ANDERSEN J, *et al*. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(36): 5482-5492. DOI: 10.1200/JCO.22.02777.
- [16] STORNILOLO A M, ENAS N H, BROWN C A, *et al*. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma[J]. *Cancer*, 1999, 85(6): 1261-1268.
- [17] ICGC/TCGA PAN-CANCER ANALYSIS OF WHOLE GENOMES CONSORTIUM. Pan-cancer analysis of whole genomes[J/OL]. *Nature*, 2020, 578(7793): 82-93[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7025898/>. DOI: 10.1038/s41586-020-1969-6.
- [18] WOOD L D, CANTO M I, JAFFEE E M, *et al*. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(2): 386-402.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.
- [19] RAGHAVAN S, WINTER P S, NAVIA A W, *et al*. Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer[J/OL]. *Cell*, 2021, 184(25): 6119-6137.e26[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8822455/>. DOI: 10.1016/j.cell.2021.11.017.
- [20] HERTING C J, KARPOVSKY I, LESINSKI G B. The tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: current perspectives and future directions[J/OL]. *Cancer Metastasis Rev*, 2021, 40(3): 675-689[2024-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/4363743/>. DOI: 10.1007/s10555-021-09988-w.
- [21] ZHENG D Q, SUSSMAN J H, JEON M P, *et al*. AKT but not MYC promotes reactive oxygen species-mediated cell death in oxidative culture[J/OL]. *J Cell Sci*, 2020, 133(7): jcs239277[2024-02-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094265/>. DOI: 10.1242/jcs.239277.

[收稿日期] 2024-02-03

[修回日期] 2024-05-02

[本文编辑] 黄静怡