

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.004

· 基础研究 ·

## KCNN4在胰腺癌组织中的表达及其与预后的关系和对胰腺癌细胞增殖的影响

杨轩, 陈昕苑, 阮小玉, 吴清如, 顾炎(海军军医大学免疫学研究所暨免疫与炎症全国重点实验室, 上海200433)

**[摘要]** **目的:** 探究钾钙激活通道亚家族N成员4(KCNN4)在胰腺癌组织中的表达及其对胰腺癌进展的影响, 解析KCNN4在胰腺癌临床诊断及预后判断中的作用。**方法:** 利用GEPIA2数据分析平台, 结合TCGA和GTEx数据库的数据分析KCNN4在胰腺癌组织中的表达水平及其与患者预后的关系。收集24例海军军医大学长海医院手术切除的胰腺癌患者的癌及癌旁组织标本, 通过qPCR、WB法和免疫组化染色技术验证KCNN4在胰腺癌组织中的表达水平。利用shRNA敲低人胰腺癌细胞中BXPC3和PANC-1中KCNN4的表达, 通过CCK-8和克隆形成实验检测细胞增殖与生长情况。利用小鼠胰腺癌KPC细胞构建胰腺癌原位成瘤模型, 观察敲低KCNN4对胰腺原位成瘤的影响, 统计小鼠生存期(OS)。**结果:** 整合TCGA和GTEx数据库数据分析结果发现, KCNN4在胰腺癌组织中高表达( $P < 0.05$ ), 且与患者OS和DFS缩短相关(均 $P < 0.05$ )。胰腺癌组织中KCNN4 mRNA和蛋白表达量均显著高于癌旁组织(均 $P < 0.01$ )。KCNN4敲低后, 胰腺癌细胞生长速率显著减慢、克隆形成数量显著减少(均 $P < 0.01$ )。小鼠胰腺原位荷瘤实验结果表明, KCNN4敲低可抑制肿瘤细胞在胰腺原位的生长并延长小鼠OS。**结论:** KCNN4在胰腺癌组织中高表达, 其能促进胰腺癌细胞增殖和胰腺癌进展, 与患者预后密切相关, 有望作为胰腺癌临床诊断及预后评估的靶点。

**[关键词]** 胰腺癌; 钾钙激活通道亚家族N成员4; 增殖; 诊断; 预后

**[中图分类号]** R735.9; R730.2; 730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)04-0371-07

## Expression of KCNN4 in pancreatic cancer tissues, its correlation with prognosis, and impact on pancreatic cancer cell proliferation

YANG Xuan, CHEN Xinyuan, RUAN Xiaoyu, WU Qingru, GU Yan (National Key Laboratory of Immunology and Inflammation & Institute of Immunology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of potassium calcium-activated channel subfamily N member 4 (KCNN4) in pancreatic cancer tissues and its impact on tumor progression, and to explore its role in clinical diagnosis and prognosis evaluation of pancreatic cancer. **Methods:** Using the GEPIA2 data analysis platform, the expression of KCNN4 in pancreatic cancer tissues and its correlation with patient prognosis were analyzed by integrating data from the TCGA and GTEx databases. Cancerous and adjacent non-cancerous tissues from 24 patients with pancreatic cancer who underwent surgical resection at ChangHai Hospital of the Naval Medical University were collected. The expression of KCNN4 in pancreatic cancer tissues was validated using qPCR, Western blotting, and immunohistochemical staining. The expression of KCNN4 in human pancreatic cancer cell lines BXPC3 and PANC-1 was knocked down using shRNA. CCK-8 and colony formation assays were performed to detect tumor cell proliferation and growth. A murine KPC cell pancreatic cancer model was established to investigate the effects of KCNN4 knockdown on the growth of orthotopic pancreatic tumor and overall survival (OS) in mice. **Results:** Analysis of TCGA and GTEx data revealed that KCNN4 was highly expressed in pancreatic cancer tissues ( $P < 0.05$ ) and was associated with shortened OS and disease-free survival (DFS) in patients (both  $P < 0.05$ ). The expression levels of KCNN4 mRNA and protein were significantly elevated in pancreatic cancer tissues compared with those in adjacent non-cancerous tissues (all  $P < 0.01$ ). Knockdown of KCNN4 led to significantly reduced growth rates and fewer colony formations in pancreatic cancer cells (both  $P < 0.01$ ). The murine orthotopic pancreatic tumor experiment revealed that KCNN4 knockdown inhibited tumor progression and prolonged the OS of mice. **Conclusion:** KCNN4, highly expressed in pancreatic cancer tissues, promotes pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression, and its expression is closely associated with patient

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 32170918)

**[作者简介]** 杨轩(2000—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫及肿瘤微环境的基础研究

**[通信作者]** 顾炎(扫码获取作者联系方式)



prognosis, suggesting that KCNN4 may serve as a promising target for clinical diagnosis and prognosis evaluation of pancreatic cancer.

**[Key words]** pancreatic cancer, potassium calcium-activated channel subfamily N member 4 (KCNN4); proliferation; diagnosis; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(4): 371-377. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.004]

胰腺癌是一种极具侵袭性的恶性实体瘤,预后不良和高致死率是其主要临床特征<sup>[1-2]</sup>。由于胰腺癌起病隐匿,大部分患者初诊时已伴有全身性转移<sup>[3]</sup>。目前,手术切除仍是胰腺癌治疗首选方案,但仅约20%患者符合手术指征且术后复发率极高<sup>[4]</sup>。为提高术前及术后微转移灶的清除率,常辅以吉西他滨(gemcitabine)治疗,但癌细胞获得性耐药使其疗效降低<sup>[5]</sup>。因此,探寻胰腺癌早期诊断的生物标志物和特异性治疗靶点具有重要的临床意义。钾钙激活通道亚家族N成员4(potassium calcium-activated channel subfamily N member 4, KCNN4)编码Ca<sup>2+</sup>激活型K<sup>+</sup>通道蛋白KCa3.1<sup>[6]</sup>,在多种病理过程中发挥重要作用。在冷吡啉相关周期性综合征(cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS)中, Piezo 型机械敏感离子通道组分1(PIEZO1)诱导钙内流,上调 KCNN4 表达,促进钾离子外排,激活 NLRP3 炎性小体,加重 CAPS 患者自身炎症反应<sup>[7]</sup>。活化蛋白1可促进 KCNN4 转录,经由Ca<sup>2+</sup>信号传导激活mTORC1,抑制细胞自噬,使CD4<sup>+</sup> T细胞向Th1/Th17细胞分化,加重前列腺炎症<sup>[8]</sup>。此外, KCNN4 在多种肿瘤中高表达<sup>[9]</sup>。在肝细胞癌中, KCNN4 可激活 MAPK/ERK 信号通路,促进癌细胞侵袭和转移<sup>[10]</sup>;增强肿瘤细胞葡萄糖代谢,提高肝癌细胞干性<sup>[11]</sup>。在肾透明细胞癌中, KCNN4 表达上调,影响肿瘤微环境免疫浸润和免疫治疗因子效应,促进癌症进展<sup>[12]</sup>。但是目前关于 KCNN4 在胰腺癌中的报道较少,本文探究 KCNN4 对胰腺癌进展的影响,明确其在胰腺癌临床诊断及预后评估中的作用,以期找到胰腺癌早期诊断和治疗的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞、实验动物及主要试剂

本实验所用24例胰腺癌组织标本(包括胰腺癌组织及癌旁组织)来自海军军医大学第一附属医院(长海医院),于2024年5月至10月期间收集(伦理审批号:CHEC2024-109)。组织芯片由上海芯超生物公司制作完成。人胰腺癌细胞 BXPC3 和 PANC-1 购于葵赛生物有限公司,小鼠胰腺癌细胞 KPC 购于上海南模生物科技公司。C57BL/6J 野生型小鼠(合格证编号:20230009001272)购于上海必凯实验动物有限公司,饲养于 SPF 级动物房。实验过程中所有操作均符合国家相关动物实验伦理规定与要求。

细胞培养所用 DEME 培养基(11965092)、胎牛

血清(FBS)(A5670701)和胰蛋白酶-EDTA(15400054)均购于 Gibco 公司,柠檬酸盐缓冲溶液(G1219)、一抗稀释液(G2025)、苏木精染液(G1004)和结晶紫粉末(GC307002)均购于赛维尔生物有限公司,3%过氧化氢封闭液(ZLI-9311D)、封闭用羊血清(ZLI-9056)、DAB 显色试剂盒(ZLI-9018)和免疫组化笔(ZLI-9303)均购于中杉金桥有限公司,Opal Polymer HRP 即用型二抗溶液(ARH1001EA)购于 PerkinElmer 公司,TRIzol 试剂(15596018CN)购于 Invitrogen 公司,Evo M-MLV 反转录试剂预混液(AG11615)和 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (AG11719)购于艾科瑞生物公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(23225)购于 Thermo Fisher Scientific 公司,TBST 速溶颗粒(E-1004)、Tris-Glycine-SDS 速溶颗粒(E-1006)和 Tris-Glycine 速溶颗粒(E-1024)均购于北京思量长远生物科技公司,CCK-8 试剂盒(HY-K0301)购于 MCE 公司,Entranster™-R4000 试剂(4000-4)购于英格恩生物公司,抗β-actin 抗体(8457)、抗兔二抗(7074)均购于 Cell Signaling Technology 公司,抗 KCNN4 抗体(23271-1-AP)购于 Proteintech 公司。sh-NC 及 sh-KCNN4 均由吉玛基因构建,sh-KCNN4 干扰序列:5'-CCGGGCCTGGATGTTCTACAAACATCTCGAGATGTTTGTAGAACATCCAGGCTTTTTG-3'。慢病毒质粒 plent-ef1a-Fluc-CMV-GFP 由金唯智公司构建。

### 1.2 公共数据库分析 KCNN4 表达水平

在 Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2(GEPIA2)数据分析平台,利用TCGA和GTEx数据库,分析 KCNN4 在不同肿瘤类型癌组织和癌旁组织中的表达情况,采用 Boxplot 展示 KCNN4 在胰腺癌组织和癌旁组织中的表达。此外,在 GEPIA2 数据分析平台分析 KCNN4 高表达组与低表达组胰腺癌患者的总生存期(OS)和无病生存期(DFS)。

### 1.3 细胞培养、转染及分组

人胰腺癌细胞 BXPC3 和 PANC-1 均用含 10%FBS 的 DEME 培养基培养,小鼠胰腺癌细胞 KPC 用含 10%FBS 的 F12 培养基培养。将 BXPC3、PANC-1 和 KPC 细胞消化后稀释至适宜浓度进行铺板,以转染时细胞汇合度约 30% 为宜。待细胞贴壁后,使用 Entranster™-R4000 试剂按照实验说明进行质粒转染。实验分为 sh-NC 组和 sh-KCNN4 组。将野生型及 KCNN4 敲低的 KPC 细胞进行 plent-ef1a-Fluc-CMV-GFP 慢病毒质粒感染(MOI = 20),48 h 后

使用G418(1 μg/μL)进行药筛,药筛4 d后将感染成功的细胞扩增培养、冻存以进行后续实验。

#### 1.4 qPCR法检测胰腺癌组织中KCNN4 mRNA的表达水平

使用TRIzol试剂提取组织样本的总RNA,在NanoDrop仪器上测定RNA浓度。利用Evo M-MLV反转录试剂预混液配制反转录体系,将RNA反转录为cDNA。采用SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒II进行qPCR检测。qPCR引物均由生工生物工程有限公司合成。引物序列:KCNN4上游引物为5'-GCAGAGGAGTAAGAAGGTGGAA-3',下游引物为5'-TGGCAGGAAGTGGCATTG-3';β-actin上游引物为5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3';下游引物为5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。qPCR反应条件:预变性阶段95℃1 min;循环阶段95℃10 s、56℃20 s、72℃20 s,共40个循环;溶解曲线阶段95℃1 min,65℃1 min,95℃15 s。以β-actin作为内参对照,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析方法计算目的基因mRNA的相对表达量。

#### 1.5 WB法检测胰腺癌细胞中KCNN4蛋白的表达水平

在剪碎的组织样本中加入RIPA蛋白裂解液(含1%PMSF和1%Cocktail),研磨后进一步超声裂解蛋白,离心收集蛋白上清液。利用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,根据蛋白浓度测定结果,取30 μg蛋白加至聚丙烯酰胺凝胶上样孔中,进行电泳直至溴酚蓝指示剂到达凝胶底部时停止跑胶,用纯水清洗凝胶两次后通过湿转法转膜。转膜后,将硝酸纤维素膜置于慢速摇床上用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗用5%BSA溶液按1:500稀释抗KCNN4抗体后于4℃下处理过夜。次日,用5%BSA按1:2 000稀释抗兔二抗后室温反应1 h,利用超灵敏化学发光成像仪进行显色,用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

#### 1.6 免疫组化染色法检测人胰腺癌组织芯片中KCNN4蛋白的表达

将人胰腺癌组织芯片于烤片机70℃烤片2 h,将芯片依次经脱蜡、梯度乙醇下行水化后,将芯片放入柠檬酸盐缓冲溶液(pH 6.0)中,隔水加热以进行抗原修复。待柠檬酸盐缓冲溶液自然冷却至室温后,加入3%过氧化氢溶液室温下处理20 min以抑制内源性过氧化物酶活性,后采用山羊血清室温封闭1 h。封闭结束后,在KCNN4(1:125)一抗中4℃下过夜。次日,使用即用型羊抗兔二抗在室温下处理1 h后进行DAB染色和苏木精复染,无水乙醇脱水。待芯片自然风干后,常规封片,于光学显微镜下观察KCNN4蛋白表达情况。

采用积分制评分方法对染色结果进行半定量评估:

(1)染色强度:阴性(无阳性着色)计0分,弱阳性(浅棕色)计1分,阳性(棕黄色)计2分,强阳性(深棕色)计3分;(2)阳性细胞百分比评分:阳性细胞占比≤25%计1分,阳性细胞占比>25%~≤50%计2分,阳性细胞占比>50%~≤75%计3分,阳性细胞占比>75%计4分。最终评分为染色强度评分与阳性细胞百分比评分的乘积,评分结果分为以下等级:0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为中度阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。

#### 1.7 CCK-8实验检测干扰KCNN4表达后胰腺癌细胞的增殖能力

将胰腺癌BXP3和PANC-1细胞消化后按照 $1 \times 10^3$ 个/孔的密度铺板96孔板,置于37℃细胞培养箱培养。在检测时间点(细胞贴壁后0、24、48、72、96 h)从细胞培养箱中取出细胞,弃培养基,每孔加入100 μL完全培养基和10 μL CCK-8试剂,置于37℃细胞培养箱中培养2 h,在酶标仪波长450 nm处检测细胞的光密度(D)值。

#### 1.8 克隆形成实验检测干扰KCNN4表达后胰腺癌细胞的克隆形成能力

将胰腺癌BXP3和PANC-1细胞消化后,按照 $5 \times 10^2$ 个/孔的密度铺板6孔板中,于37℃细胞培养箱培养10~14 d,每间隔3 d更换一次培养基。待细胞克隆形成后,弃培养基,用 $1 \times$  PBS清洗2次。在0.5%结晶紫溶液中染色20 min后,用 $1 \times$  PBS洗至不再变色后置于室温晾干。使用Image J软件分析克隆形成数目。

#### 1.9 小鼠KPC细胞胰腺原位肿瘤模型的建立及观察

将汇合度至90%的sh-NC及sh-KCNN4组的KPC细胞消化后稀释至 $1 \times 10^7$ 个/mL,置于冰上备用。打开气麻机,调节气体流速至适宜后将小鼠放入气麻小室中。麻醉后,小鼠左侧卧位,常规消毒后,沿肋缘下处依次切开皮肤、肌肉及腹膜进入腹腔,找到胰,将100 μL细胞悬液(即 $1 \times 10^6$ 个细胞/只)缓慢单点注射至胰头处,可见胰头处出现透明鼓包。注射完成后,迅速滴注组织胶水于注射处,以防细胞液外渗。依次缝合腹壁,并编号小鼠。术后将小鼠置于加热垫(40℃)上直至苏醒,后饲养于SPF级动物室中。造模后全程记录小鼠生存情况,统计分析小鼠OS及中位生存期。另一批次sh-NC及sh-KCNN4 KPC胰腺原位荷瘤小鼠使用小动物活体成像仪器观察小鼠胰腺原位成瘤情况:小鼠胰腺原位荷瘤后第14 d(即sh-NC组荷瘤小鼠中位生存期),将小鼠左侧肋缘下进行剃毛处理,利用1 mL胰岛素注射器给小鼠腹腔注射100 μL荧光素(2 mg/mL),10 min后将小鼠放入气麻小室中麻醉。待小鼠麻醉后,将其放入活体成像仪器观察胰腺原位成瘤情况,记录并分析不同组小鼠胰腺部位的平均荧光强度。

### 1.10 统计学处理

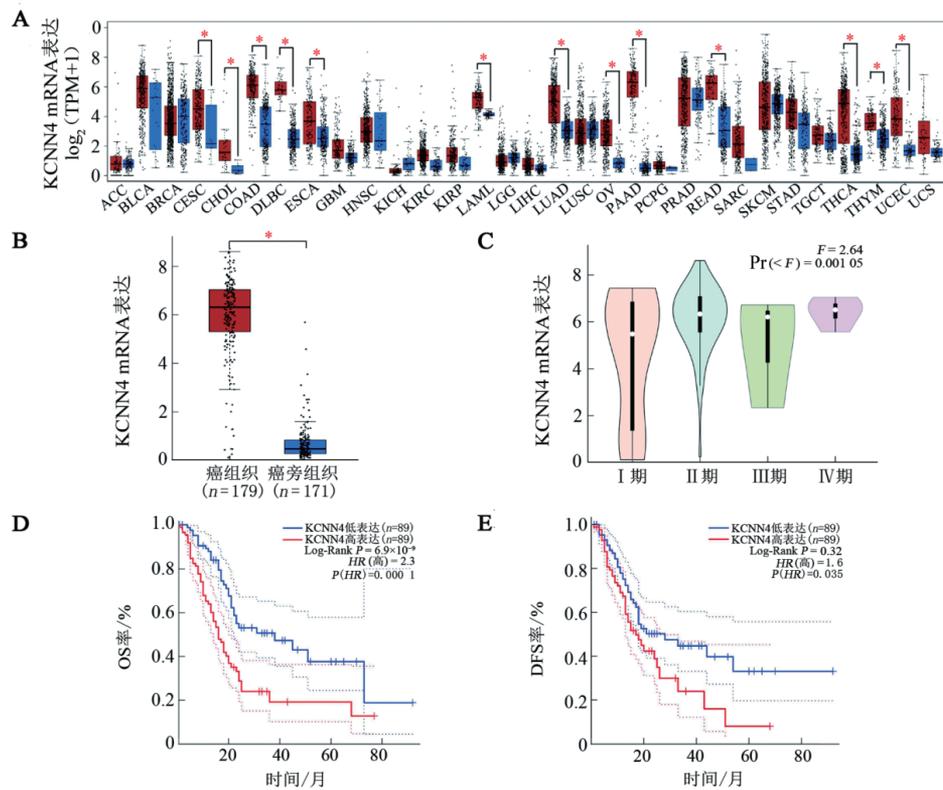
上述所有实验均独立重复3次。使用 GraphPad Prism8.0 软件处理实验数据, 两组间比较采用非配对 *t* 检验进行统计分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KCNN4 mRNA 在胰腺癌中高表达且与患者预后不良相关

经 GEPIA2 数据分析平台对 TCGA 和 GTEx 数据进行整合分析, 结果(图 1A)显示, 与癌旁组织相比,

13 种肿瘤组织中 KCNN4 mRNA 表达水平升高, 且 KCNN4 mRNA 在胰腺癌组织中表达较高。进一步分析发现, 与 171 例胰腺癌旁组织相比, 179 例胰腺癌组织中 KCNN4 mRNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ ), 且 KCNN4 的表达水平在胰腺癌不同临床分期中存在显著差异 ( $F = 5.64, Pr(> F) < 0.01$ ; 图 1B、C)。89 例胰腺癌患者的生存分析结果显示, 与 KCNN4 低表达组相比, KCNN4 高表达的胰腺癌患者 OS 和 DFS 均显著缩短(均  $P < 0.05$ , 图 1D、E), 说明 KCNN4 高表达的胰腺癌患者预后不良。



A: TCGA 和 GTEx 数据库中 KCNN4 mRNA 在泛癌组织及癌旁组织中的表达情况。ACC: 肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma), BLCA: 膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma), BRCA: 乳腺浸润癌(breast invasive carcinoma), CESC: 宫颈鳞癌和腺癌(cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma), CHOL: 胆管癌(cholangiocarcinoma), COAD: 结肠腺癌(colon adenocarcinoma), DLBC: 弥漫性大B细胞淋巴瘤(lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma), ESCA: 食管癌(esophageal carcinoma), GBM: 多形成性胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme), HNSC: 头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma), KICH: 肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe), KIRC: 肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma), KIRP: 肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma), LAML: 急性髓细胞样白血病(acute myeloid leukemia), LGG: 脑低级别胶质瘤(brain lower grade glioma), LIHC: 肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma), LUAD: 肺腺癌(lung adenocarcinoma), LUSC: 肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma), OV: 卵巢浆液性囊腺癌(ovarian serous cystadenocarcinoma), PAAD: 胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma), PCPG: 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(pheochromocytoma and paraganglioma), PRAD: 前列腺癌(prostate adenocarcinoma), READ: 直肠腺癌(rectum adenocarcinoma), SARC: 肉瘤(sarcoma), SKCM: 皮肤黑色素瘤(skin cutaneous melanoma), STAD: 胃腺癌(stomach adenocarcinoma), STES: 胃癌和食管癌(stomach and esophageal carcinoma), TGCT: 睾丸生殖细胞肿瘤(testicular germ cell tumor), THCA: 甲状腺癌(thyroid carcinoma), THYM: 胸腺癌(thymoma), UCEC: 子宫内膜癌(uterine corpus endometrial carcinoma), UCS: 子宫肉瘤(uterine carcinosarcoma); B: KCNN4 mRNA 在胰腺癌组织和癌旁组织中的表达水平分析, |Log<sub>2</sub>变化倍数|截断值: 1, *P*值截断值: 0.01; C: KCNN4 mRNA 在胰腺癌不同临床分期中的表达水平分析; D: KCNN4 高、低表达组胰腺癌患者的 OS 比较; E: 胰腺癌患者 KCNN4 表达水平与 DFS 的关系分析。\* $P < 0.05$ 。

图1 KCNN4 mRNA 在胰腺癌组织中高表达且与患者预后不良相关

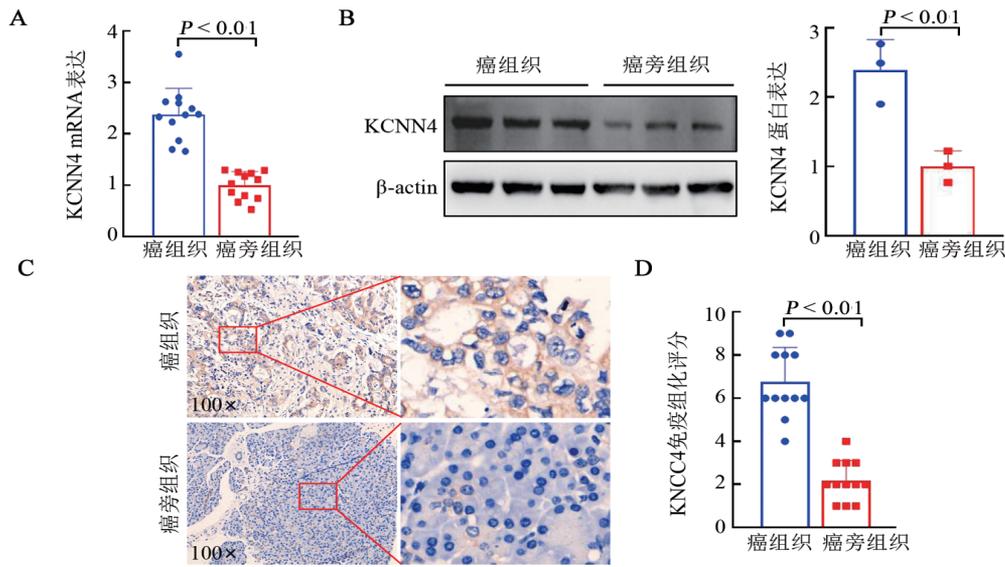
2.2 胰腺癌组织中 KCNN4 mRNA 和蛋白表达水平显著升高

qPCR 法检测结果(图 2A)显示,与癌旁组织相比,胰腺癌组织中 KCNN4 mRNA 表达水平显著上调( $P < 0.01$ )。WB 实验结果(图 2B)显示,胰腺癌组织中 KCNN4 蛋白表达量显著高于癌旁组织( $P < 0.01$ )。免疫组化评分结果(图 2C、D)显示,胰腺癌组织中 KCNN4 的蛋白表达平均得分显著高于癌旁组织(6.75 vs 2.17 分,  $P < 0.01$ )。以上实验结果表明, KCNN4 在胰腺癌组织中存在基因转录和蛋白翻

译层面的表达失调现象。

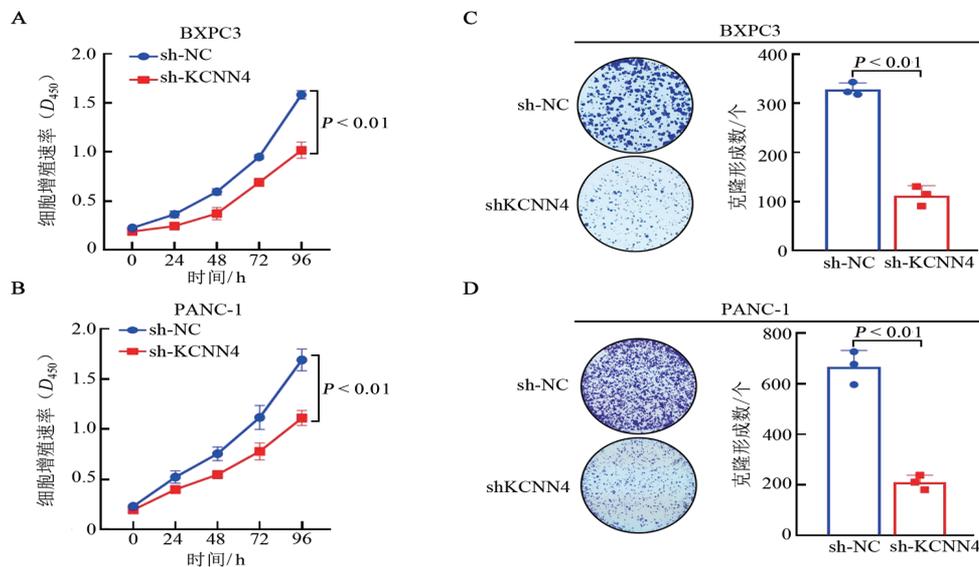
2.3 KCNN4 促进胰腺癌细胞增殖

CCK-8 实验检测结果(图 3A、B)显示,与 sh-NC 组相比,sh-KCNN4 组 BXPC3 和 PANC-1 细胞的增殖速率均显著减缓(均  $P < 0.01$ )。克隆形成实验检测结果(图 3C、D)显示,与 sh-NC 组相比,sh-KCNN4 组细胞的克隆形成数量均显著减少(均  $P < 0.01$ )。结果表明,敲低 KCNN4 可显著降低 BXPC3 和 PANC-1 细胞的增殖能力,说明 KCNN4 可促进胰腺癌细胞增殖。



A: qPCR 法检测 KCNN4 mRNA 的表达水平; B: WB 法检测 KCNN4 蛋白表达水平; C、D: 免疫组化检测 KCNN4 蛋白表达水平 (C: 右图为左图的局部放大) 及定量分析(D)。

图2 KCNN4在胰腺癌组织及癌旁组织中的表达水平比较



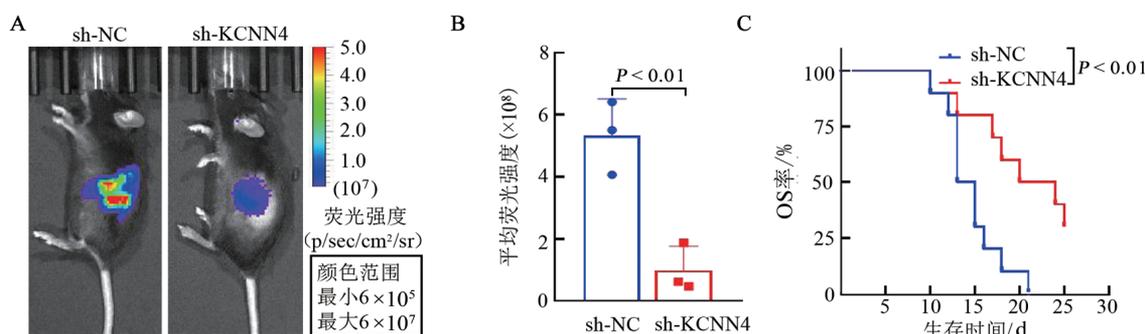
A、B: CCK-8 实验检测 BXPC3 细胞和 PANC-1 细胞的增殖速率; C、D: 克隆形成实验检测 BXPC3 细胞和 PANC-1 细胞的克隆形成能力。

图3 敲低 KCNN4 对胰腺癌 BXPC3 和 PANC-1 细胞增殖的影响

## 2.4 KCNN4促进小鼠胰腺癌进展

小动物活体荧光成像结果显示, KCNN4敲低后, 小鼠胰的平均荧光强度显著降低( $P < 0.01$ , 图4A、B)。此外, 小鼠胰腺原位荷瘤后OS统计分析显示,

KCNN4敲低后小鼠的OS显著延长( $P < 0.01$ , 图4D)。实验结果说明, KCNN4能促进小鼠的胰腺癌进展。



A: 小动物活体成像检测 KCNN4 敲低后小鼠胰腺原位成瘤情况; B: 小鼠胰平均荧光强度的定量分析; C: KCNN4 敲低后小鼠 OS 统计分析。

图4 KCNN4促进胰腺癌进展

## 3 讨论

关键基因突变或失调是驱动胰腺癌发生发展的重要因素<sup>[13]</sup>, 解析其调控肿瘤发生的机制, 找到可干预靶点, 利于通过个体化和精准化治疗提高患者的OS<sup>[14]</sup>。CA19-9是目前美国FDA批准的唯一用于胰腺癌诊断的生物标志物, 但其敏感性和特异性有限, 缺乏Lewis抗原的患者检测结果可能呈假阴性<sup>[15]</sup>。高达90%胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)患者均存在KRAS基因突变<sup>[16]</sup>, 常见突变为G12D(约36%)、G12V(35%)和G12R(约13%)<sup>[17]</sup>。高致癌性KRAS基因突变的累积及相关信号通路的异常诱导肿瘤细胞表型改变, 发生分化和转移, 致使临床预后不良<sup>[18]</sup>。但目前针对高频突变的KRAS G12D的单药治疗疗效不佳<sup>[17]</sup>。约5%~7%的胰腺癌患者携带BRCA基因突变, 该胰腺癌亚型患者对铂类化疗敏感, 联用PARP抑制剂例如奥拉帕利可实现合成致死效应, 成为胰腺癌首个获批的靶向治疗药物<sup>[19]</sup>。然而, 原发性/获得性耐药及适应证的局限性限制了其临床效益<sup>[20]</sup>。因而, 探寻特异性的肿瘤生物标志物有利于胰腺癌早期诊断、提高治疗疗效、改善胰腺癌患者预后。

KCNN是多种肿瘤的重要致癌基因, 其在胶质瘤中高表达, 与患者预后不良相关<sup>[21]</sup>。在甲状腺乳头状癌中KCNN4表达上调, 通过诱导上皮间质转化和抑制细胞凋亡以促进肿瘤进展<sup>[22]</sup>。基于此, 本研究分析了TCGA和GTEx数据库中KCNN4在31种癌组织及癌旁组织中的表达情况, 发现KCNN4在多种癌组织中表达显著上调, 且在胰腺癌组织中表达水平较高。而且, KCNN4

高表达组胰腺癌患者的OS显著缩短, 说明KCNN4是胰腺癌患者预后不良的关键因素。为深入探索KCNN4在胰腺癌中的表达及潜在诊断意义, 本研究收集了胰腺癌患者癌及癌旁组织标本, 通过qPCR、WB和免疫组化实验发现, 与癌旁组织相比, KCNN4在胰腺癌组织基因转录与蛋白翻译层面表达均显著上调, 证实KCNN4在胰腺癌组织中高表达且与患者预后不良相关。持续性增殖是恶性肿瘤的典型特征, 生长速率加快可增强肿瘤细胞恶性程度。本研究发现, 干扰KCNN4表达后, 胰腺癌细胞的增殖速率显著减缓、细胞克隆数减少, 说明KCNN4可促进胰腺癌细胞增殖。本研究进一步构建了胰腺原位肿瘤小鼠模型, 发现干扰KCNN4后, 小鼠胰腺原位肿瘤体积显著减小, 小鼠OS显著延长, 说明KCNN4促进胰腺癌进展, 与胰腺癌OS缩短相关。

综上所述, 本研究证实了KCNN4在胰腺癌组织中呈高表达, 与患者预后不良相关。干扰KCNN4表达后, 胰腺癌细胞的增殖速率减缓, 胰腺原位瘤体减小, 小鼠OS延长, 说明了KCNN4在胰腺癌治疗中的重要作用, 可作为胰腺癌诊断及治疗的潜在靶点。然而, KCNN4促进胰腺癌细胞增殖及胰腺癌进展的具体机制有待深入研究, KCNN4与胰腺癌关键驱动基因KRAS等是否存在交互作用网络。后续, 课题组计划通过转录组测序分析KCNN4促进胰腺癌细胞增殖的具体信号通路, 并结合免疫沉淀质谱分析KCNN4相互作用蛋白, 找到其效应靶点。此外, 肿瘤免疫治疗是抗肿瘤免疫治疗的新兴方法, 通过增加效应T细胞浸润或激活T细胞抗肿瘤反应提高胰腺癌临床治疗效应, 然而该方法受限于微环境中多种免疫抑制细胞及效应分子, 治疗效应不佳<sup>[23]</sup>。因而,

拟利用单细胞测序技术探究 KCNN4 敲低前后胰腺癌微环境中免疫细胞的变化, 并计划基于 KCNN4 离子通道结构域设计特异性抑制剂, 构建小鼠模型评估 KCNN4 抑制剂单药效应及其与其他免疫疗法联合应用效应。此外, 本研究中临床样本数较少, 有待扩大样本量, 分析不同临床分期、不同治疗应答效应患者 KCNN4 的表达差异, 探索 KCNN4 在胰腺癌进展及治疗中的效应, 后续可开展多中心队列研究, 分析 KCNN4 表达水平与胰腺癌治疗响应的相关性, 建立预后评估曲线。

### 【参考文献】

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2024, 74(1): 12-49. DOI: 10.3322/caac.21820.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2021, 71(1): 7-33. DOI:10.3322/caac.21654.
- [3] ZENG S Y, PÖTTLER M, LAN B, *et al.* Chemoresistance in pancreatic cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4504[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31514451/>. DOI: 10.3390/ijms20184504.
- [4] LIU T T, CHENG S H, XU Q, *et al.* Management of advanced pancreatic cancer through stromal depletion and immune modulation [J/OL]. *Medicina*, 2022, 58(9): 1298[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36143975/>. DOI:10.3390/medicina58091298.
- [5] BEUTEL A K, HALBROOK C J. Barriers and opportunities for gemcitabine in pancreatic cancer therapy[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 324(2): C540-C552. DOI:10.1152/ajpcell.00331.2022.
- [6] GRIMALDI A, D' ALESSANDRO G, GOLIA M T, *et al.* KCa3.1 inhibition switches the phenotype of glioma-infiltrating microglia/macrophages[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(4): e2174[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27054329/>. DOI: 10.1038/cddis.2016.73.
- [7] RAN L, YE T, ERBS E, *et al.* KCNN4 links PIEZO-dependent mechanotransduction to NLRP3 inflammasome activation[J/OL]. *Sci Immunol*, 2023, 8(90): eadf4699[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38134241/>. DOI:10.1126/sciimmunol.adf4699.
- [8] TENG J F, JIA Z M, GAO F, *et al.* AP-1 activates KCNN4-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling to induce the Th1/Th17 differentiation of CD4<sup>+</sup> cells in chronic non-bacterial prostatitis[J/OL]. *Cell Biol Toxicol*, 2024, 41(1): 18[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39729199/>. DOI: 10.1007/s10565-024-09967-1.
- [9] CHEN S H, SU X T, MO Z N. KCNN4 is a potential biomarker for predicting cancer prognosis and an essential molecule that remodels various components in the tumor microenvironment: a pan-cancer study [J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 812815[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35720112/>. DOI: 10.3389/fmolb.2022.812815.
- [10] LI Q T, FENG Y M, KE Z H, *et al.* KCNN4 promotes invasion and metastasis through the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Investig Med*, 2020, 68(1): 68-74. DOI:10.1136/jim-2019-001073.
- [11] FAN J, TIAN R F, YANG X M, *et al.* KCNN4 promotes the stemness potentials of liver cancer stem cells by enhancing glucose metabolism [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 6958[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35805963/>. DOI:10.3390/ijms23136958.
- [12] BU H T, SONG Q, ZHANG J X, *et al.* Development of a novel KCNN4-related CeRNA network and prognostic model for renal clear cell carcinoma[J/OL]. *Anal Cell Pathol*, 2023, 2023: 2533992 [2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39282155/>. DOI: 10.1155/2023/2533992.
- [13] QIAN Y Z, GONG Y T, FAN Z Y, *et al.* Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 130[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33008426/>. DOI:10.1186/s13045-020-00958-3.
- [14] GUGENHEIM J, CROVETTO A, PETRUCCIANI N. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer[J]. *Updates Surg*, 2022, 74(1): 35-42. DOI:10.1007/s13304-021-01186-1.
- [15] GUO M, ZHAO H. Growth differentiation factor-15 may be a novel biomarker in pancreatic cancer: a review[J/OL]. *Medicine*, 2024, 103(6): e36594[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38335385/>. DOI:10.1097/MD.00000000000036594.
- [16] PENG J Y, SUN B F, CHEN C Y, *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Res*, 2019, 29(9): 725-738. DOI:10.1038/s41422-019-0195-y.
- [17] QIAN Z R, RUBINSON D A, NOWAK J A, *et al.* Association of alterations in main driver genes with outcomes of patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(3): e173420[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29098284/>. DOI:10.1001/jamaoncol.2017.3420.
- [18] BÄRTHEL S, FALCOMATÀ C, RAD R, *et al.* Single-cell profiling to explore pancreatic cancer heterogeneity, plasticity and response to therapy[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(4): 454-467. DOI: 10.1038/s43018-023-00526-x.
- [19] BROZOS-VÁZQUEZ E, TOLEDANO-FONSECA M, COSTA-FRAGA N, *et al.* Pancreatic cancer biomarkers: a pathway to advance in personalized treatment selection[J/OL]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 125: 102719[2024-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38490088/>. DOI:10.1016/j.ctrv.2024.102719.
- [20] ALKASSIS S, YAZDANPANAH O, PHILIP P A. BRCA mutations in pancreatic cancer and progress in their targeting[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25(7): 547-557. DOI:10.1080/14728222.2021.1957462.
- [21] LEHRER S, RHEINSTEIN P H. Increased KCNN4 expression is correlated with poor survival in lower grade glioma[J]. *Cancer Diagn Progn*, 2023, 3(4): 428-432. DOI:10.21873/cdp.10235.
- [22] WEN J L, LIN B Y, LIN L Z, *et al.* KCNN4 is a diagnostic and prognostic biomarker that promotes papillary thyroid cancer progression[J]. *Aging*, 2020, 12(16): 16437-16456. DOI: 10.18632/aging.103710.
- [23] 查皓然, 朱波. 实体瘤免疫治疗现状与未来发展方向 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(11): 1061-1072. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.003.

[收稿日期] 2025-01-12

[修回日期] 2025-04-05

[本文编辑] 党瑞山