

# 钾电压门控通道亚家族 D 成员 1 对胰腺癌 放射抵抗的影响及其机制

陈俊霖<sup>1</sup>, 陈缘飞<sup>1</sup>, 廖翔<sup>2</sup>, 杭银辉<sup>1</sup>

(江苏大学附属医院 1. 影像科, 2. 检验科, 江苏 镇江 212001)

**[摘要]** **目的:** 探究钾离子通道蛋白钾电压门控通道亚家族 D 成员 1 (potassium voltage-gated channel subfamily D member 1, KCND1) 在胰腺癌放射抵抗中的作用及其潜在机制。**方法:** 体外培养人胰腺癌 PANC1 细胞系, 将其分为对照组 (不照射) 和 X 线照射组 (8 Gy), 照射 48 h, 采用转录组测序 (RNA-seq) 和实时荧光定量 PCR 检测细胞中钾离子通道相关 mRNA 表达水平; 采用免疫荧光检测 KCND1 蛋白表达水平。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 PANC1 细胞中 *KCND1*, 将细胞分为 sgControl、sgKCND1、sgControl+X 线照射 (8 Gy)、sgKCND1+X 线照射 (8 Gy) 组, 照射 48 h, 采用蛋白免疫印迹检测细胞内 caspase-3 和 Bax 蛋白表达; 采用流式细胞术检测细胞内凋亡和活性氧水平; 采用蛋白质免疫印迹和免疫荧光技术检测 E-钙黏蛋白和 N-钙黏蛋白表达水平; 采用划痕迁移实验检测细胞迁移能力。取 24 只 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠, 于右侧背部皮下接种小鼠胰腺癌 PANC02 细胞, 2 周后随机分为 4 组, 分别为对照组、X 线照射组 (5 Gy)、丙米嗪组 (20 mg/kg) 和 X 线照射 (5 Gy)+丙米嗪组 (20 mg/kg), 每组 6 只; 检测小鼠瘤体体积并比较; 采用蛋白免疫印迹检测小鼠皮下瘤组织中抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白以及 E-钙黏蛋白和 N-钙黏蛋白表达水平。**结果:** 与对照组相比, X 线照射组细胞钾离子通道 *KCNN4*、*KCND1*、*KCNA7*、*KCNA5*、*KCNMA1*、*KCNJ14* 等 mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 其中 *KCND1* mRNA 最显著。与 X 线照射组相比, sgKCND1+X 线照射组 caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 细胞凋亡比例明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), N-钙黏蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.01$ ), E-钙黏蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), 细胞划痕愈合率明显降低 ( $P<0.01$ )。与 X 线照射组相比, 丙米嗪+X 线照射组皮下瘤体积显著减小, 肿瘤重量明显减少 ( $P<0.05$ )。蛋白免疫印迹结果显示, 与 X 线照射组相比, X 线照射+丙米嗪组抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ ), 而促凋亡蛋白切割型 caspase-3 和 Bax 表达量则显著升高 ( $P<0.05$ ); 此外, E-钙黏蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.01$ ), N-钙黏蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ )。**结论:** 钾离子通道 KCND1 可能通过促进胰腺癌细胞上皮间充质转化和凋亡抵抗特性, 从而导致胰腺癌产生放射抵抗。

**[关键词]** 钾电压门控通道亚家族 D 成员 1; 胰腺癌; 放射; 钾离子; 肿瘤微环境

**[中图分类号]** R735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-7783(2026)04-0290-09

DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y250120

**[引用格式]** 陈俊霖, 陈缘飞, 廖翔, 等. 钾电压门控通道亚家族 D 成员 1 对胰腺癌放射抵抗的影响及其机制[J]. 江苏大学学报(医学版), 2026, 36(4): 290-298.

## The effect of potassium voltage-gated channel subfamily D member 1 on radioresistance in pancreatic cancer and its underlying mechanisms

CHEN Junlin<sup>1</sup>, CHEN Yuanfei<sup>1</sup>, LIAO Xiang<sup>2</sup>, HANG Yinhuai<sup>1</sup>

(1. Department of Radiology, 2. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of potassium voltage-gated channel subfamily D member 1 (KCND1) in pancreatic cancer radioresistance and its underlying mechanisms. **Methods:** Human pancreatic cancer cell line PANC1 was cultured *in vitro* and divided into control group (no irradiation) and X-ray irradiation group (8 Gy). After 48 hours of irradiation, mRNA expression levels of potassium channel-related genes were analyzed by RNA sequencing (RNA-seq) and real-time quantitative PCR;

**[基金项目]** 镇江市科技计划社会发展项目 (SH2024007)

**[作者简介]** 陈俊霖 (1998—), 男, 硕士研究生; 杭银辉 (通信作者), 住院医师, E-mail: hangyh@163.com

KCND1 protein expression was detected by immunofluorescence. CRISPR/Cas9 technology was used to knockout *KCND1* in PANC1 cells, which were then divided into four groups: sgControl, sgKCND1, sgControl + X-ray (8 Gy), and sgKCND1 + X-ray (8 Gy). After 48 hours of irradiation, caspase-3 and Bax protein expression were assessed by Western blotting; apoptosis and reactive oxygen species (ROS) levels were measured by flow cytometry; E-cadherin and N-cadherin expression levels were evaluated using Western blotting and immunofluorescence; and cell migration ability was determined by scratch wound healing assay. Twenty-four 6–8-week-old C57BL/6 mice were subcutaneously inoculated with PANC02 cells on the right back. Two weeks later, mice were randomly assigned to four groups: control group, X-ray irradiation (5 Gy) group, imipramine (20 mg/kg) group, and X-ray irradiation (5 Gy) + imipramine (20 mg/kg) group, with six mice per group. Tumor volume and weight were measured and compared. Expression levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins, as well as E-cadherin and N-cadherin, were analyzed in subcutaneous tumor tissues by Western blotting. **Results:** Compared with the control group, mRNA expression levels of potassium channels including *KCNN4*, *KCND1*, *KCNA7*, *KCNA5*, *KCNMA1*, and *KCNJ14* were significantly upregulated in the X-ray irradiation group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), among which *KCND1* showed the most prominent upregulation. Compared with the X-ray irradiation group, the sgKCND1 + X-ray group showed significantly higher expression of caspase-3 and Bax proteins ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), significantly reduced N-cadherin expression ( $P < 0.01$ ), markedly elevated E-cadherin expression ( $P < 0.05$ ), and a significantly lower scratch wound healing rate ( $P < 0.01$ ). Compared with the X-ray irradiation group, the X-ray + imipramine group exhibited significantly smaller tumor volumes and reduced tumor weights ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that, compared with the X-ray group, the X-ray + imipramine group had significantly lower expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 ( $P < 0.05$ ), while pro-apoptotic proteins cleaved caspase-3 and Bax were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ); additionally, E-cadherin expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ), while N-cadherin expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The potassium channel KCND1 may contribute to radioresistance in pancreatic cancer by promoting epithelial-mesenchymal transition and enhancing apoptosis resistance in pancreatic cancer cells.

[**Key words**] potassium voltage-gated channel subfamily D member 1; pancreatic cancer; radiotherapy; potassium ions; tumor microenvironment

胰腺癌作为消化系统预后最差的恶性肿瘤之一,其发病率在全球范围内呈逐年上升趋势。由于早期诊断困难、肿瘤进展迅速、高度转移以及对常规治疗普遍抵抗,胰腺癌患者5年生存率不足10%<sup>[1–3]</sup>。放疗作为胰腺癌的主要治疗手段之一,常用于新辅助治疗或姑息治疗;然而,绝大多数患者在放疗后仍会出现疾病进展,严重影响其预后和生活质量<sup>[4–5]</sup>。

钾离子通道是一类重要的跨膜蛋白,在正常细胞中呈组织特异性表达<sup>[6–7]</sup>。研究表明,钾离子通道在多种肿瘤中异常高表达,并在抑制细胞凋亡、促进增殖、侵袭和迁移等恶性生物学行为中发挥关键作用<sup>[8–12]</sup>。研究发现,胶质瘤细胞TRPC6通过上调K<sub>Ca</sub>1.1表达发挥抗凋亡效应<sup>[13]</sup>。此外,钾离子通道SK3和KCNK1可促进细胞增殖与转移<sup>[14–15]</sup>。目前,关于钾离子通

道在胰腺癌放疗抵抗中的具体作用和机制仍不清楚。

放疗通过诱导DNA损伤来杀伤肿瘤细胞,但肿瘤细胞可通过多种机制抵抗放疗,如上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、DNA损伤修复增强和肿瘤微环境重塑等<sup>[16–18]</sup>。值得注意的是,放疗诱导的细胞凋亡会增加肿瘤细胞微环境中的钾离子浓度,可能进一步影响放疗效果。因此,本研究拟探究放疗后胰腺癌细胞中钾离子通道的变化,并阐明钾离子通道在胰腺癌放疗抵抗中的作用及潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、动物、主要试剂与仪器

人胰腺癌PANC1细胞系、小鼠胰腺癌PANC02

细胞株、人胚肾 HEK293T 细胞购自江苏凯基生物技术股份有限公司。短串重复序列验证确认细胞系无误并储存于江苏大学基础医学研究所。24 只雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,购自江苏大学动物中心,饲养于 12 h/12 h 光暗循环和 40%~60%相对湿度环境,适应性喂养 3~4 d。本研究通过江苏大学动物保护和使用伦理委员会批准(UJS-IACUC-AP-2024073106)。

胎牛血清、DMEM 购自苏州依科赛生物公司;钾离子检测试剂盒(PBFI AM)、兔抗人/小鼠 caspase-3 单克隆抗体、兔抗人/小鼠钾电压门控通道亚家族 D 成员 1(potassium voltage-gated channel subfamily D member 1, KCND1)单克隆抗体、Bax 单克隆抗体、兔抗人/小鼠  $\beta$ -Tubulin 单克隆抗体均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;氯化钾、胰酶粉末、氯化钠、Tween-20 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;PBS、HBSS、DEP 无酶水、细胞冻存液、凋亡染色剂均购自美国 Thermo 公司;SYBR Green super mix、逆转录试剂盒购自南京诺维赞生物公司;RNA 提取试剂盒、牛血清蛋白购自上海碧云天生物公司。

分析电子秤(瑞士 Precisa 公司);SDS-PAGE 电泳仪、垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);超净细胞工作台(杭州佑宁仪器公司);恒温细胞培养箱(山东海尔集团公司);Varian IX 直线加速器(美国 Varian Medical Systems 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);光学显微镜(日本 Nikon 株式会社);研磨仪(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胰腺癌 PANC1 细胞和小鼠胰腺癌 PANC02 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中。

1.2.2 细胞 X 线照射 取处于对数生长期的人胰腺癌 PANC1 细胞,按每孔约 5×10<sup>5</sup>个细胞密度接种于 6 孔板;将细胞分为对照组(不照射)和 X 线照射组(接受 8 Gy 辐射),当细胞贴壁后移至医用直线加速器的照射区域,设定并施加精确的 8 Gy 辐射剂量,剂量率为 600 cGy/min,照射 80 s,确保照射野能均匀覆盖细胞;继续培养箱培养。采用直线加速器进行 X 线照射。

1.2.3 转录组测序(RNA-seq)实验检测钾离子通道表达量 取“1.2.2”分组照射细胞,48 h 后提取总 RNA。用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)按照说明书提取 RNA,测定浓度与纯度;根据实验设计,

用 poly(A) 富集方法获取 mRNA;将富集的 mRNA 逆转录为 cDNA,并通过末端修复、接头连接的步骤构建测序文库。PCR 扩增后,行文库质量检测;文库送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行测序;分析测序结果,分析钾离子通道 mRNA 表达量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测钾离子通道 mRNA 相对表达 取“1.2.2”分组照射细胞,用 Trizol 提取 mRNA 并逆转录合成 cDNA。反应体系 10  $\mu$ L: 4.1  $\mu$ L DEPC 水,5  $\mu$ L 2×SYBR Green Mix,0.5  $\mu$ L cDNA,0.2  $\mu$ L 上、下游引物。具体反应程序:95 ℃ 变性 10 s;56 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。计算公式(以 KCND1 为例): $\Delta Ct = Ct_{KCND1} - Ct_{\beta\text{-肌动蛋白}}$ , $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{KCND1} - \Delta Ct_{\beta\text{-肌动蛋白}}$ ,以  $\beta$ -肌动蛋白 mRNA 相对表达量为 1,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 KCND1 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列及长度

| 基因名称          | 序列(5'→3')                                              | 长度/<br>bp |
|---------------|--------------------------------------------------------|-----------|
| $\beta$ -肌动蛋白 | 正向:ACCATTGGCAATGAGCGGTTC<br>反向:ATCGGTTGGTGCCACTGAATGG  | 150       |
| KCND1         | 正向:CTGCTGCGTCTCTACCTGG<br>反向:AGGGTGCCTGTTTCATGTAAAG    | 147       |
| KCNA1         | 正向:CATCGTGGAACGCTGTGTAT<br>反向:AACCCTTACCAAGCGGATGAC    | 212       |
| KCNN1         | 正向:TCGGGGAAACCTCAAATGTG<br>反向:CCATGACGACGATGCCAAAC     | 99        |
| KCNJ14        | 正向:GGTCGCTTCGTCAAGAAAGAC<br>反向:CACGCATGTGGTGAACAGG     | 81        |
| KCNA7         | 正向:GCTTTTCGAGTTTCCCGAGAG<br>反向:GCAGAAGACGACGATGGAGA    | 72        |
| KCNN3         | 正向:GGCGGATAGCCATGACCTAC<br>反向:CGTGCCGTCCAGAAGAACTT     | 87        |
| KCNT2         | 正向:GGTACAGTTTTCGAGATTTGCT<br>反向:ACAGGCGTATCCTTAGACTTGA | 132       |
| KCNA5         | 正向:CGCGTCCACATCAACATCTC<br>反向:GGTAGAAGCGTATCTCGTCCG    | 230       |
| KCNS3         | 正向:CCCTGGACAAGACGAGGAAC<br>反向:GTCTGGTGTGAGGAAACCGC     | 76        |

1.2.5 免疫荧光检测 PANC1 细胞中 KCND1 蛋白表达 取“1.2.2”分组照射细胞,接种于 24 孔板内,弃培养基,PBS 洗 3 次;用 1 mL 4%多聚甲醛固定 20 min;PBS 洗 3 次;用 0.1% Triton X-100 室温破膜 20 min;5%牛血清白蛋白封闭 2 h;加入 KCND1 一抗 4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗 3 次,5 min/次;

加入对应的荧光二抗,室温避光孵育1 h;TBST洗3次,5 min/次;滴加带有DAPI的抗淬灭剂;显微镜下观察并拍摄。采用Image J处理图片,检测平均荧光强度,计算蛋白相对表达量。

**1.2.6 构建 *KCND1* 敲除质粒** 通过 Benchling 在线工具设计针对 *KCND1* 的特异性 sg 序列(5'→3'),分别为 sgKCND1-1: GAGTACGAGTCTGACCTGAC, sgKCND1-2: CTGACCGTACGTTAGCAGGA, 序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。采用核酸内切酶切除 V2 片段,42 ℃ 4 h;引物退火;取购买好的 F 与 R 片段各 2 μL,加入 cDNA 1 μL,PCRmix 12 μL,双蒸水补齐至 20 μL。95 ℃ 退火 1 min,95 ℃ 20 s 35 个循环;退火 20 s;72 ℃ 60 s;PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并在紫外成像系统下观察目的条带。将符合预期大小的目的条带切胶回收纯化后,采用 T4 DNA 连接酶与载体进行连接。用质粒提取盒提取质粒,并扩增,送公司检测序列。

**1.2.7 *KCND1* 敲除慢病毒包装** 取 HEK293T 细胞,按每孔约  $5 \times 10^5$  个细胞密度接种于 6 孔板,于 37 ℃ 细胞培养箱中孵育 12 h;取 100 μL 无血清培养基+5 μL PEI 溶液,为 PEI 管;取 100 μL 无血清培养基+0.25 μg pMD2. G 质粒+0.75 μg psPAX2 质粒+1 μg 目的质粒,为质粒管;分别振荡并瞬时离心,静置 5 min;混合两管,振荡并瞬时离心,静置 25 min;加至培养细胞中,孵育 48 h;取细胞培养液,即为病毒液;将其以  $8\,000 \times g$  离心 10 min,储存于 -80 ℃ 冰箱备用。

**1.2.8 PANC1 细胞质粒感染** 将人胰腺癌 PANC1 细胞接种至 6 孔板,每孔细胞量占孔一半左右;分别加 1.5 mL 完全培养基、2 μL 聚凝胺和 0.5 mL 病毒液,混匀,孵育 24 h;弃培养基,按照上述步骤,再重复感染细胞;第 4 天开始根据质粒所带抗性加入嘌呤霉素(1/10 000)进行筛选成功转染的细胞,根据细胞状态 1 ng/L 逐渐加大嘌呤霉素浓度筛选,直至裸细胞组细胞全部死亡,后续进行蛋白质免疫印迹检测敲除效率。

**1.2.9 蛋白免疫印迹实验验证 *KCND1* 敲除效率** 收集“1.2.7”及“1.2.8”处理后的细胞,采用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取总蛋白。取等量蛋白加入 5×蛋白上样缓冲液,于 100 ℃ 金属浴变性 10 min;行 SDS-PAGE,采用 10% 聚丙烯酰胺凝胶,160 V 电泳 1 h;将蛋白转移至硝酸纤维素膜,4 ℃ 转膜 2.5 h;采用 5% 脱脂奶粉室温封闭

30 min,加入相应一抗(兔抗人/小鼠,1:1 000 稀释),4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:10 000 稀释)室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,10 min/次;采用 ECL 化学发光试剂显色,采用凝胶成像系统采集图像,并利用 Image J 软件进行灰度值分析。

**1.2.10 细胞划痕迁移实验检测细胞迁移能力** 取“1.2.7”及“1.2.8”存活并经过蛋白免疫印迹实验验证后的 sgControl、sgKCND1 细胞,分为 X 线照射组、X 线照射+sgKCND1 组,按每孔约  $5 \times 10^5$  个细胞密度接种于 6 孔板,预热 PBS 清洗 2 次;用灭菌 200 μL 移液器枪头在每个孔中央划一道笔直痕迹,形成 0.5~1.0 mm 宽无细胞区域;PBS 清洗 2 次;更换为无血清培养基,立即于倒置显微镜下拍摄,计为划痕 0 h;24 h 后在相同位置再次拍照记录。用 Image J 图像分析测量不同时间点划痕宽度或面积,计算划痕闭合率,从而计算细胞迁移能力。

**1.2.11 流式细胞术检测细胞凋亡及活性氧水平** 将细胞接种至 6 孔板,按照实验目的进行处理,凋亡染色细胞分为 3 组:X 线照射组、X 线照射+sgKCND1-1 组、X 线照射+sgKCND1-2 组;活性氧染色细胞分为 6 组:sgControl 组、sgKCND1-1 组、sgKCND1-2 组、X 线照射组、X 线照射+sgKCND1-1 组、X 线照射+sgKCND1-2 组,按照“1.2.2”进行 X 线照射 48 h;收集细胞悬液,用含 5% 胎牛血清的 PBS 重悬, $800 \times g$  离心 5 min;凋亡染色时在每个 EP 管中加入 100 μL 上样缓冲液,再每孔加入 5 μL FITC 和 10 μL PI,避光孵育;活性氧染色时用 10 μL 活性氧染料染色约 5 min,按照细胞数量对每管再次稀释。通过 Flowjo 对流式细胞术结果进行处理,再通过计算得出细胞凋亡比例以及活性氧水平。

**1.2.12 异种移植皮下瘤模型构建及分组处理** 培养并重悬 PANC02 细胞,按照每只小鼠  $2 \times 10^5$  细胞数量,分别接种于 C57BL/6 小鼠右侧背部皮下。小鼠分组:对照组、丙米嗪组(20 mg/kg)、X 线照射组、X 线照射+丙米嗪(20 mg/kg)组,每组 6 只。当肿瘤体积达 50 mm<sup>3</sup> 时,给予 X 线照射 5 Gy/次,共 3 次,连续照射 3 d,并同时开始每两天给予小鼠注射药物治疗,连续 1 周。同时每两天检测 1 次小鼠肿瘤直径以及观察精神状态。于接种肿瘤 14 d,室温下麻醉小鼠,采用 8MV X 线照射,剂量率为 600 cGy/min,0 Gy 在相同条件下进行假照射。在 X 线照射 14 d 后将小鼠处死并提取皮下瘤组织,称

重,随后用于后续实验。

1.2.13 蛋白免疫印迹实验检测凋亡相关蛋白以及 EMT 相关蛋白表达 取“1.2.12”皮下瘤组织,用研磨仪研磨,并用 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,检测小鼠皮下瘤中 Bcl-2、cleaved caspase-3、Bax、N-钙黏蛋白、E-钙黏蛋白表达。此外,取“1.2.10”X 线照射组和 X 线照射+sgKCND1 组细胞,检测 N-钙黏蛋白、E-钙黏蛋白表达。另取“1.2.11”活性氧染色 6 组细胞,检测 Bax 蛋白表达。具体方法同“1.2.9”。

1.3 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据处理和统计分析,每组实验至少进行 3 次独立重复,计量数据用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用多因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射促进胰腺癌细胞钾离子通道相关 mRNA 表达

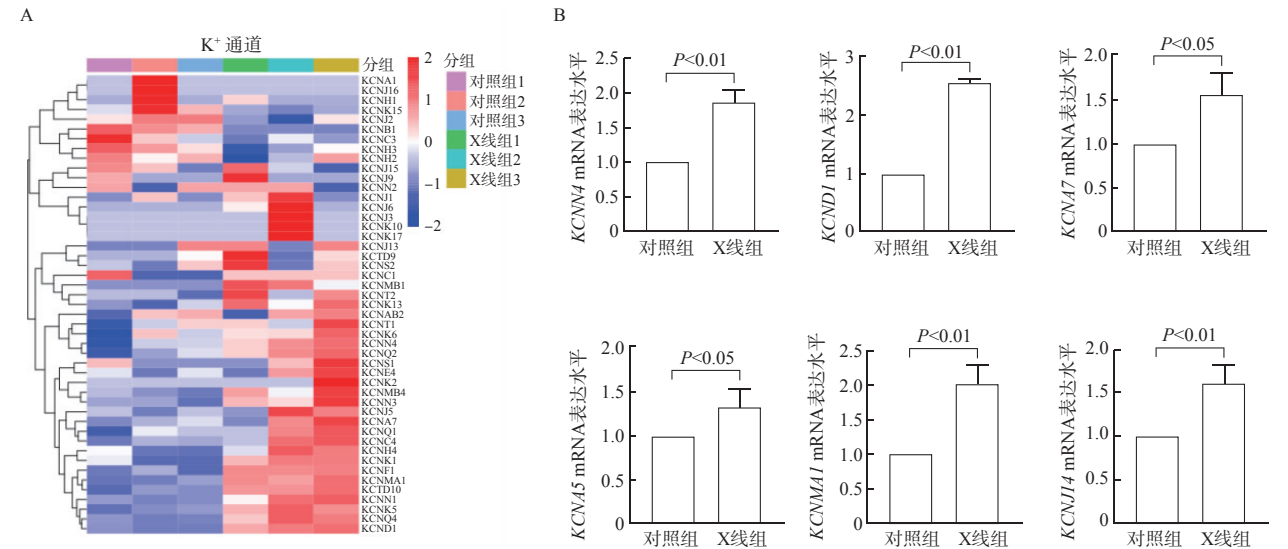
RNA-seq 结果显示(图 1A),经 8 Gy X 线照射处理 PANC1 细胞中钾离子通道 mRNA 水平较对照组有显著提升。qRT-PCR 检测结果显示(图 1B),与对照组相比,照射组钙激活钾离子通道亚家族 N 成员 4(potassium calcium-activated channel subfamily N member 4, *KCNN4*)、钾电压门控通道亚家族 D 成员 1(potassium voltage-gated channel subfamily D

member 1, *KCND1*)、钾电压门控通道亚家族 A 成员 7(potassium voltage-gated channel subfamily A member 7, *KCNA7*)、钾电压门控通道亚家族 A 成员 5(potassium voltage-gated channel subfamily A member 5, *KCNA5*)、钙激活钾离子通道亚家族 Mα 成员 1(potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1, *KCNMA1*)以及钾内向整流通道亚家族 J 成员 14(potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 14, *KCNJ14*) mRNA 相对表达水平显著升高(*P*<0.01 或 *P*<0.05),其中, *KCND1* mRNA 升高最显著,选择其进行后续实验。

2.2 敲除 KCND1 增敏放射诱导的胰腺癌细胞死亡

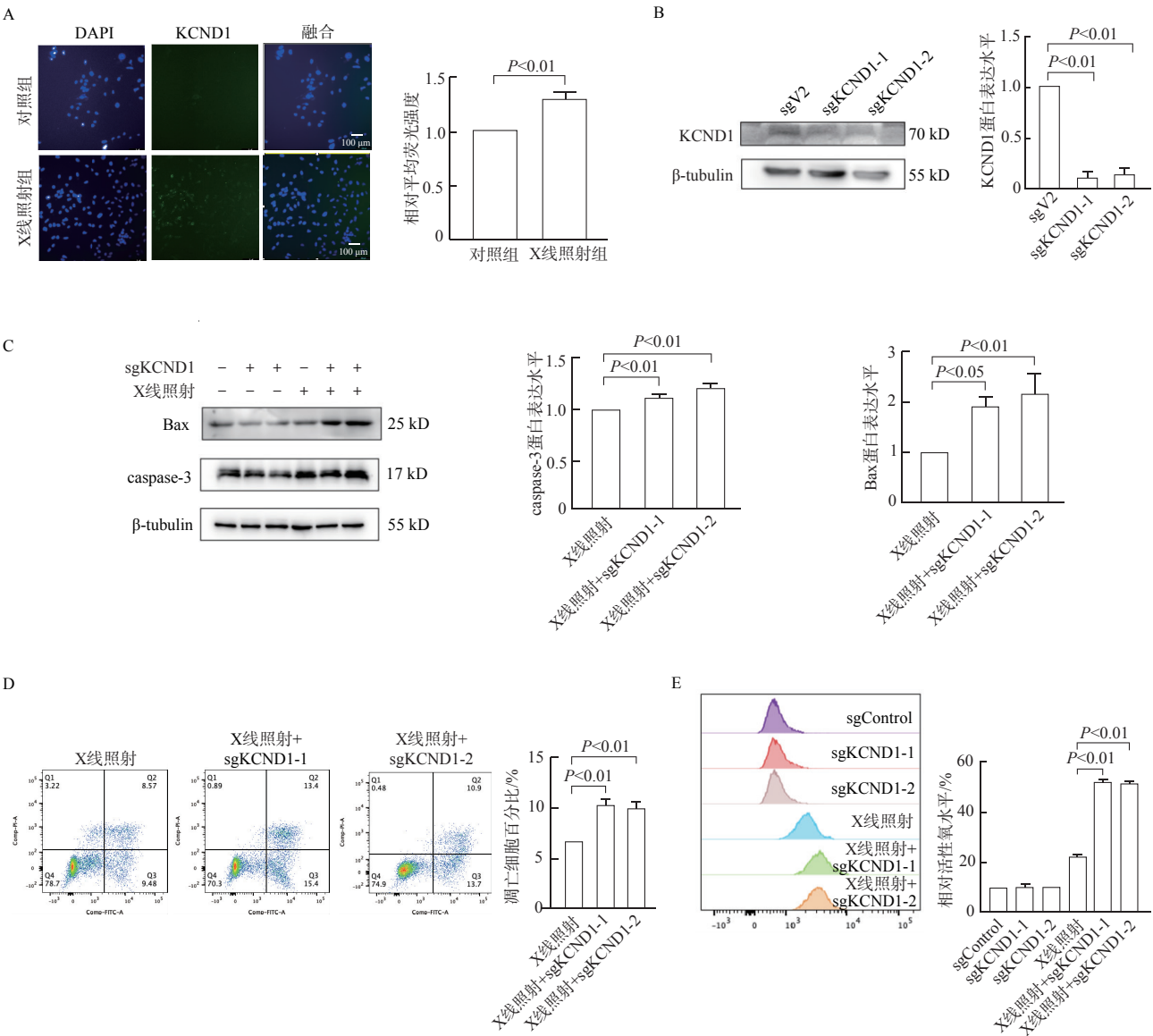
免疫荧光结果显示(图 2A),与对照组相比,X 线照射组 PANC-1 细胞系中 KCND1 蛋白荧光强度明显升高(*P*<0.01),提示其可能与胰腺癌放射抵抗相关。

蛋白免疫印迹结果显示(图 2B),与 sgV2 组相比,sgKCND1-1 组和 sgKCND1-2 组 KCND1 蛋白表达水平明显降低(*P*均<0.01);与 X 线照射组相比,X 线照射+sgKCND1-1 组和 X 线照射+sgKCND1-2 组凋亡相关蛋白 caspase-3 和 Bax 表达水平显著升高(*P*<0.01 或 *P*<0.05,图 2C)。流式细胞术检测结果显示(图 2D、2E),与 X 线照射组相比,X 线照射+sgKCND1-1 组和 X 线照射+sgKCND1-2 组细胞凋亡数量显著增加(*P*均<0.01),活性氧含量显著升高(*P*均<0.01)。由此表明, *KCND1* 敲除可通过抑制细胞凋亡,从而增强胰腺癌细胞对放射的敏感性。



A: X 线照射前后钾离子通道与钾离子转运蛋白 mRNA 表达热图;B: 两组钾离子通道 mRNA 相对表达水平比较

图 1 钾离子通道 mRNA 表达热图及 mRNA 相对表达水平比较



A:免疫荧光检测各组 KCND1 蛋白表达;B:蛋白免疫印迹验证敲除 KCND1 效率;C:蛋白免疫印迹检测凋亡相关蛋白表达;D:流式细胞术检测各组凋亡比例;E:流式细胞术验证敲除 KCND1 对 X 线照射后细胞活性氧水平的影响

图 2 各组 PANC1 细胞系中 KCND1 蛋白及凋亡细胞、活性氧水平比较

2.3 敲除 KCND1 抑制胰腺癌细胞 EMT 转化

蛋白免疫印迹结果显示(图 3A),与 X 线照射组相比, X 线照射 + sgKCND1-1 组和 X 线照射 + sgKCND1-2 组上皮标志物 E-钙黏蛋白表达显著增加( $P$  均 $<0.01$ ),而间质标志物 N-钙黏蛋白表达则显著降低( $P$  均 $<0.01$ );细胞免疫荧光结果显示(图 3B、3C),与 X 线照射组相比,X 线照射 + sgKCND1-1 组 E-钙黏蛋白相对荧光强度明显增强( $P<0.01$ ), N-钙黏蛋白相对荧光强度明显减弱( $P<0.01$ );划痕实验结果显示(图 3D),与 X 线照射组相比,X 线照射 + sgKCND1-1 组细胞划痕愈合率明显降低( $P<0.01$ ),表明胰腺癌细胞迁移能力明显减弱。由此提示,KCND1 可能通过促进胰腺癌细胞 EMT 进程,

从而增强其放射抵抗和侵袭能力。

2.4 丙米嗪增强胰腺癌放疗敏感性并减轻 EMT 进程

结果显示(图 4A~4C),与 X 线照射组相比,X 线照射 + 丙米嗪组皮下瘤体体积显著减小,肿瘤重量明显减轻( $P<0.05$ )。蛋白免疫印迹结果显示(图 4D、4E),与 X 线照射组相比,X 线照射 + 丙米嗪组抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低( $P<0.05$ ),而促凋亡蛋白切割型 caspase-3 和 Bax 表达量则显著升高( $P$  均 $<0.05$ );此外,E-钙黏蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),N-钙黏蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。由此表明,靶向钾离子通道可增强放疗效果,其机制可能与诱导肿瘤细胞凋亡和调控 EMT 蛋白表达相关。

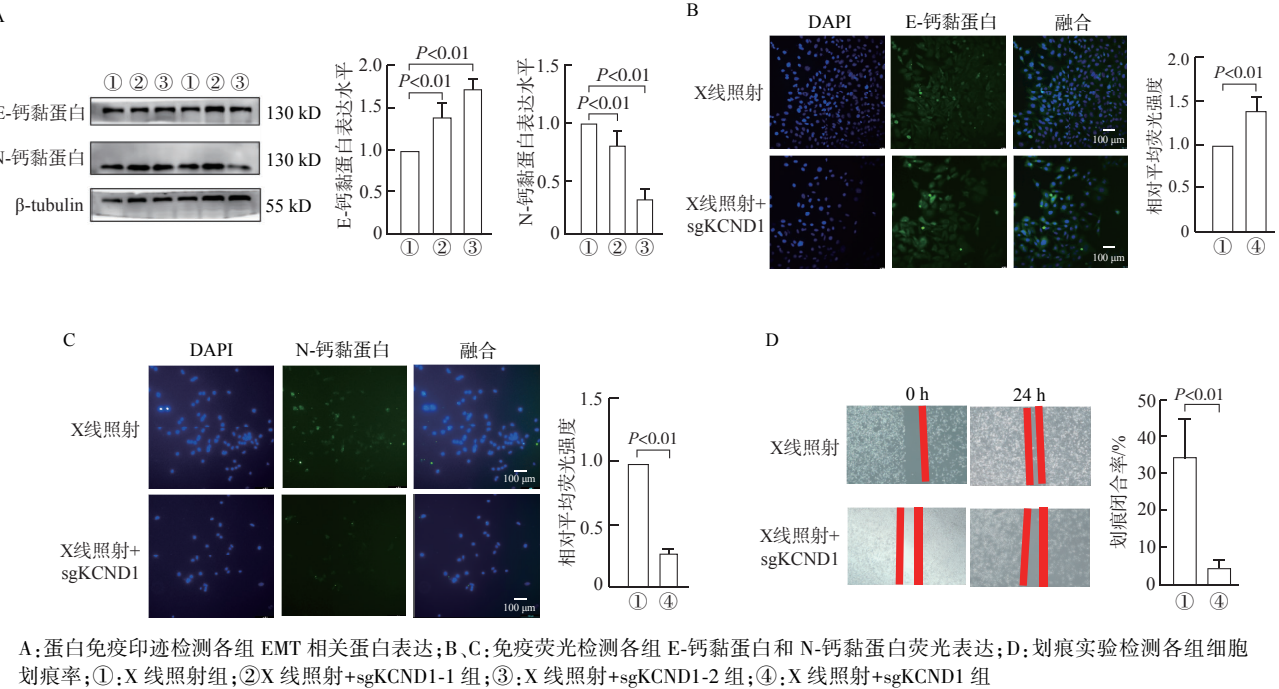


图 3 各组细胞中 EMT 相关蛋白表达及细胞划痕率比较

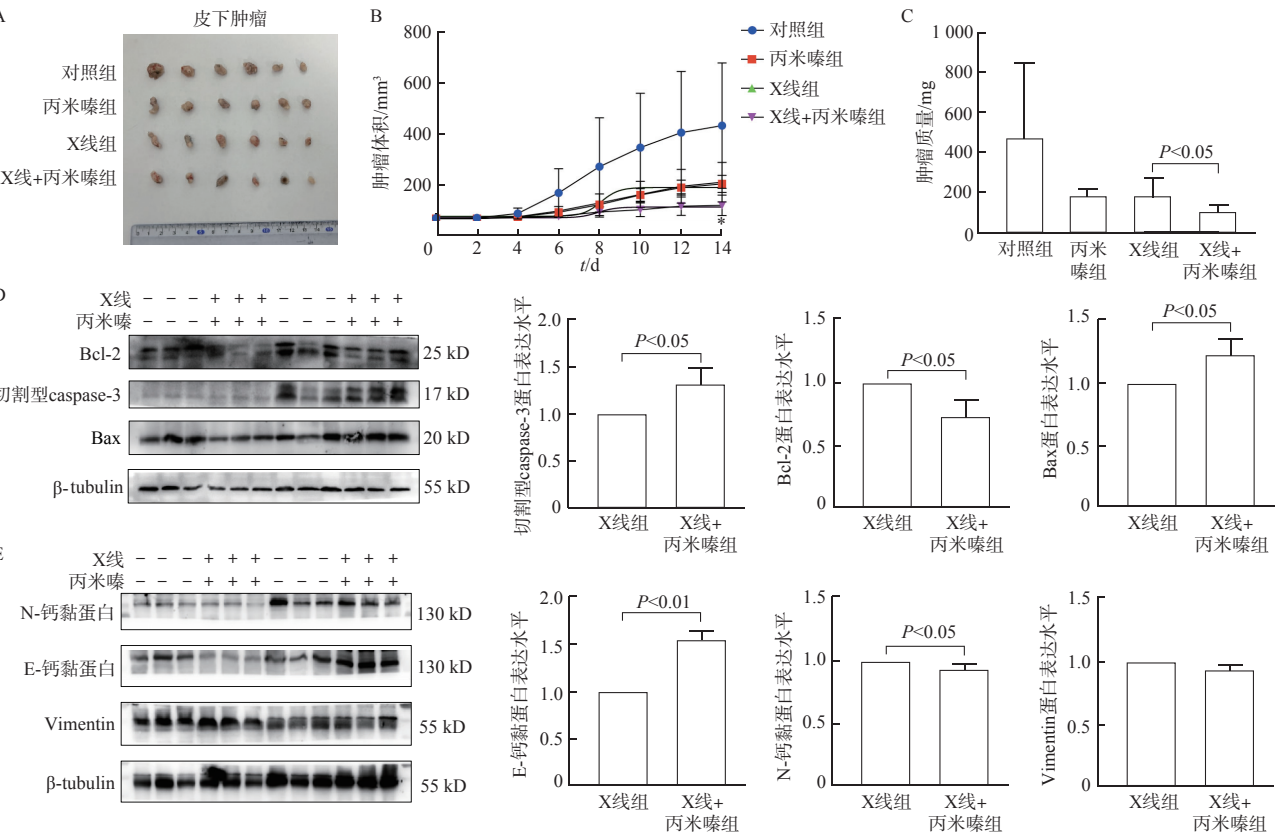


图 4 各组小鼠皮下瘤体积、重量及相关蛋白表达比较

**3 讨论**

本研究首先通过转录组测序筛选放疗相关差异基因,发现钾离子通道家族基因表达显著上调,其中 *KCND1* mRNA 表达变化最为明显。进一步研究表明,8 Gy X 线照射后 *KCND1* mRNA 及蛋白表达水平

均显著升高,提示 KCND1 可能参与胰腺癌细胞对放疗的抵抗过程。近年来,研究表明,钾离子通道不仅参与维持细胞膜电位稳态,还可调控肿瘤细胞增殖、侵袭<sup>[23]</sup>、迁移<sup>[24]</sup>及治疗耐受等多种生物学行为,因此其已成为肿瘤治疗的重要潜在靶点。本研究结果进一步提示,KCND1 可能是介导胰腺癌放射抵抗的重要钾离子通道之一。

电离辐射主要通过诱导 DNA 损伤和活性氧过量生成发挥细胞毒性作用,而过量活性氧可进一步激活线粒体凋亡通路,促进肿瘤细胞死亡<sup>[25]</sup>。本研究发现,KCND1 敲除联合照射后细胞内活性氧水平进一步升高,同时凋亡相关蛋白表达显著增加,表明 KCND1 缺失可增强放疗诱导的氧化应激和细胞凋亡,进而提高胰腺癌细胞的放射敏感性。由此提示,KCND1 可能通过抑制活性氧过度积累及放疗诱导的凋亡信号激活,促进胰腺癌细胞存活,从而参与放射抵抗的形成。

除放疗耐受外,肿瘤细胞侵袭转移能力也是影响患者预后的重要因素。EMT 是促进肿瘤细胞迁移、侵袭及治疗耐受的重要生物学过程。已有研究发现,皮层肌动蛋白结合蛋白(cortactin)和焦点黏附激酶(focal adhesion kinase,FAK)可与 Kv10.1 相互作用,通过调控黏附斑形成及重塑促进肿瘤细胞迁移和侵袭<sup>[25]</sup>。本研究发现,KCND1 敲除后 N-钙黏蛋白表达下调而 E-钙黏蛋白表达上调,提示 KCND1 可能通过促进 EMT 参与胰腺癌的恶性进展。结合体内实验结果,钾离子通道活性的抑制不仅增强胰腺癌对放疗的敏感性,同时抑制 EMT 相关表型及肿瘤侵袭转移能力,进一步表明钾离子通道在胰腺癌放射抵抗和恶性生物学行为中发挥重要作用。

综上所述,本研究结果表明,KCND1 可能通过调控细胞内活性氧水平、抑制放疗诱导的细胞凋亡以及促进 EMT 进程,共同增强胰腺癌细胞的放射抵抗表型。KCND1 有望成为提高胰腺癌放疗敏感性的潜在分子靶点,然而,其介导放射抵抗的下游信号通路及具体分子调控机制有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Li M, Tian P, Zhao Q, et al. Potassium channels: novel targets for tumor diagnosis and chemoresistance [J]. Front Oncol, 2023, 12: 1074469.
- [2] Dupuy M, Gueguinou M, Potier-Cartereau M, et al. SKC a- and Kv1-type potassium channels and cancer: promising therapeutic targets? [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 216: 115774.
- [3] Zúñiga L, Cayo A, González W, et al. Potassium channels as a target for cancer therapy: current perspectives[J]. Onco Targets Ther, 2022, 15: 783–797.
- [4] Munoz C, Saxena A, Pakladok T, et al. Stimulation of HERG channel activity by  $\beta$ -catenin [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43353.
- [5] Wu X, Zhong D, Lin B, et al. p38 MAPK regulates the expression of ether  $\alpha$ -go-go potassium channel in human osteosarcoma cells [J]. Radiol Oncol, 2013, 47(1): 42–49.
- [6] Haas B, Roth I, Sacker L, et al. Apoptotic and senolytic effects of hERG/Eag1 channel blockers in combination with temozolomide in human glioblastoma cells [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398(9): 12267–12278.
- [7] Yin H, Cheng H, Li P, et al. TRPC6 interacted with K<sub>Ca</sub>1.1 channels to regulate the proliferation and apoptosis of glioma cells [J]. Arch Biochem Biophys, 725: 109268.
- [8] Deshar G, Christensen NM, Novak I. Pantoprazole and riluzole target H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases and pH-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic cancer cells [J]. Int J Cancer, 2024, 155(9): 1641–1654.
- [9] Xia K, Zhu HC, Lai FY, et al. A novel prognostic and immune-related biomarker KCNC3 in colorectal cancer: a pan-cancer analysis [J]. Transl Cancer Res, 2025, 14(12): 8840–8858.
- [10] Nordstrom T, Andersson LC, Akerman KEO. Role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel HCN2 in embryonic neural stem cell proliferation and differentiation [J]. Neurochem Int, 2022, 159: 105387.
- [11] Ren Z, Xu Y, Wang X, et al. KCNQ10T1 affects cell proliferation, invasion, and migration through a miR-34a/Notch3 axis in breast cancer [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(19): 28480–28494.
- [12] Herrmann S, Ninkovic M, Kohl T, et al. Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel Kv10.1 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(53): 44151–44163.
- [13] Papin M, Fontaine D, Goupille C, et al. Endogenous ether lipids differentially promote tumor aggressiveness by regulating the SK3 channel [J]. J Lipid Res, 2024, 65(5): 100544.
- [14] Hou X, Ouyang J, Tang L, et al. KCNK1 promotes proliferation and metastasis of breast cancer cells by

activating lactate dehydrogenase A (LDHA) and up-regulating H3K18 lactylation [J]. PLoS Biol, 2024, 22(6): e3002666.

[15] Chun YS, Pawlik TM, Vauthey JN. 8th edition of the AJCC cancer staging manual: pancreas and hepatobiliary cancers[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(4): 845–847.

[16] Gong L, Zhang Y, Liu C, et al. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 1083–1102.

[17] Tang R, Yin J, Liu Y, et al. FLASH radiotherapy: a new milestone in the field of cancer radiotherapy [J]. Cancer Lett, 2024, 587: 216651.

[18] Agarwal JR, Griesinger F, Stühmer W, et al. The potassium channel Ether à go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 18.

[19] Monge-Cadet J, Moyal E, Supiot S, et al. DNA repair inhibitors and radiotherapy [J]. Cancer Radiother, 2022, 26(6/7): 947–954.

[20] Shi R, Liao C, Zhang Q. Hypoxia-driven effects in cancer: characterization, mechanisms, and therapeutic implications[J]. Cells, 2021, 10(3): 678.

[21] Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, et al. Cancer stem cells-origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1280.

[22] Lin Q, Gajan A, Nguyen I, et al. Synthesis and biological evaluation of novel triazine analogs as Rad6 inhibitors[J]. Pharm Res, 2025, 42(3): 511–527.

[23] Zhang M, Zhang X, Wang C, et al. Convertible ROS nanocatalyst/eliminator for enhancing tumor radio-immunotherapy and relieving radiation enteritis[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(33): e03602.

[24] Liu Q, Shi X, Tayier N, et al. Tumor irradiation induced immunogenic response: the impact of DNA damage induction and misrepair[J]. Radiat Oncol, 2025, 20(1): 133.

[25] Laîné M, Guénin S, Gutierrez L, et al. The Kv10.1 potassium channel, driver of hypoxia-induced EMT and breast cancer cell aggressiveness [J]. Cancer Cell Int, 2025, 25(1): 373.

[收稿日期] 2025–09–01 [编辑] 刘星星

(上接第 289 页)

[8] Shi X, Pang S, Zhou J, et al. Bladder-cancer-derived exosomal circRNA\_0013936 promotes suppressive immunity by up-regulating fatty acid transporter protein 2 and down-regulating receptor-interacting protein kinase 3 in PMN-MDSCs[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 52.

[9] 许永虎, 徐大志. 21 世纪以来胃癌治疗进展及未来展望[J]. 中国癌症杂志, 2024, 34(3): 239–249.

[10] 杨青茹, 王华, 周松峰, 等. 胃癌组织环状 RNA 表达谱分析[J]. 江苏大学学报(医学版), 2021, 31(3): 220–226.

[11] Sang H, Zhang W, Peng L, et al. Exosomal circRELL1 serves as a miR-637 sponge to modulate gastric cancer progression via regulating autophagy activation[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 56.

[12] Huang XJ, Wang Y, Wang HT, et al. Exosomal hsa\_circ\_000200 as a potential biomarker and metastasis enhancer of gastric cancer via miR-4659a/b-3p/HBEGF axis[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 151.

[13] Zhang C, Wei G, Zhu X, et al. Exosome-delivered circSTAU2 inhibits the progression of gastric cancer by targeting the miR-589/CAPZA1 axis [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 127–142.

[14] Chen Y, Liu H, Zou J, et al. Exosomal circ\_0091741 promotes gastric cancer cell autophagy and chemoresistance via the miR-330-3p/TRIM14/Dvl2/Wnt/ $\beta$ -catenin axis[J]. Hum Cell, 2023, 36(1): 258–275.

[15] Deng C, Huo M, Chu H, et al. Exosome circATP8A1 induces macrophage M2 polarization by regulating the miR-1-3p/STAT6 axis to promote gastric cancer progression[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 49.

[16] Wang Y, Zou R, Li D, et al. Exosomal circSTRBP from cancer cells facilitates gastric cancer progression via regulating miR-1294/miR-593-3p/E2F2 axis[J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(8): e18217.

[收稿日期] 2025–02–17 [编辑] 郭欣