

SK4在甲状腺乳头状癌中的表达及其功能机制研究

陈冠桦^{1,2} 李益波^{2,3} 伍慧慧^{2,3} 俞盛健^{1,2} 麻怀露^{2,3} 梁勇^{1,2*}

(¹温州医科大学第一临床学院, 温州 325000; ²台州学院医学院, 台州 318000; ³河北北方学院, 张家口 075000)

摘要 采用Real-time PCR、Western blot及免疫组化检测中电导钙激活钾离子通道蛋白(intermediate-conductance calcium-activated potassium channel protein, SK4/Kca3.1/KCNN4)在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)组织及细胞株中的表达情况, 同时, 对比研究SK4蛋白表达与PTC临床病理特征的关系。通过SK4特异性抑制剂(TRAM-34)下调SK4的表达后, 采用CCK-8、平板克隆实验及Transwell实验分别检测SK4对PTC细胞株CGTHW-3增殖、集落形成及迁移能力的影响并分析其可能的分子机制。Real-time PCR、Western blot结果显示, SK4在PTC组织中的mRNA及蛋白表达量均明显高于癌旁组织($P<0.01$)。免疫组化结果显示, SK4的阳性率明显高于正常甲状腺组织($P<0.01$), 而SK4蛋白表达阳性率与PTC患者性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移等临床病理特征之间并无显著统计学意义($P>0.05$)。TRAM-34可通过阻断SK4通道抑制CGTHW-3细胞的增殖、集落形成能力及迁移能力。以上结果提示, SK4通道在PTC组织及细胞中高表达, 参与调控PTC细胞的增殖及迁移过程, 可能与PTC发病的分子机制有关。SK4有可能成为PTC新的治疗靶点。

关键词 钾离子通道; 甲状腺乳头状癌; SK4; TRAM-34

Expression of SK4 in Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) and Its Roles in PTC Development

Chen Guanhua^{1,2}, Li Yibo^{2,3}, Wu Huihui^{2,3}, Yu Shengjian^{1,2}, Ma Huailu^{2,3}, Liang Yong^{1,2*}

(¹The First Clinical College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ²School of Medicine, Taizhou University, Taizhou 318000, China; ³Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract We detected the mRNA and protein levels of SK4 with Real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry in PTC tissues and cell line, and explore the relationship between SK4 and the clinicopathological characteristics of PTC. Simultaneously, after down-regulation of SK4 by its specific inhibitor (TRAM-34), we use CCK-8, plate cloning assay and Transwell assay to research the effects of SK4 on proliferation, colony formation and migration of PTC cell line CGTHW-3 respectively and the possible molecular mechanisms. The results showed that the mRNA and protein expression of SK4 in PTC tissues were significantly higher than that those in paracancerous tissue ($P<0.01$). The immunohistochemistry results indicated that the positive rate of SK4 was obviously higher than that of normal thyroid tissues ($P<0.01$). Nevertheless, there was no significant relationship between the positive rate of SK4 protein expression and clinicopathological features such as gender, age, tumor size, and lymph node metastasis in PTC patients ($P>0.05$). TRAM-34 can inhibit the proliferation, colony formation and migration of PTC cells by blocking SK4. The above results suggest that SK4 channels are

收稿日期: 2018-06-04

接受日期: 2018-09-25

浙江省自然科学基金(批准号: LY14H160036)和台州市科技计划项目(批准号: 1501KY31)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0576-88665191, E-mail: liangyu@aliyun.com

Received: June 4, 2018

Accepted: September 25, 2018

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY14H160036) and Taizhou Science and Technology Planning Project (Grant No. 1501KY31)

*Corresponding author. Tel: +86-576-88665191, E-mail: liangyu@aliyun.com

网络出版时间: 2018-10-26 11:16:27

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1116.022.html>

highly expressed in PTC tissues and cells and participate in regulating the proliferation and migration of PTC cells, which may be related to the molecular mechanism of PTC. SK4 may become a new therapeutic target for PTC.

Keywords potassium channel; papillary thyroid carcinoma; SK4; TRAM-34

甲状腺癌以其持续上升的发病率^[1], 越来越受到人们的重视。据赫捷院士团队统计, 2015年中国甲状腺新发病例达90 000例, 甲状腺癌患者死亡例数达6 800例^[2]。甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是甲状腺癌最为常见的类型, 占甲状腺癌总体发病率的80%~90%^[3]。PTC患者的总体生存率较高^[4], 但在部分PTC患者中, 肿瘤复发和与癌症相关的死亡率增加。因此, 进一步探索PTC发病机制, 寻找新的分子诊断标志物和治疗靶点, 对于甲状腺癌的早期诊断、治疗及预后判断有重要意义。

近年来研究显示, 离子通道的结构和功能异常与肿瘤的发生发展密切相关^[5]。钾离子通道是细胞膜上种类最多、分布最广的离子通道, 并与细胞膜电位形成、激素分泌、兴奋性、基因表达及细胞增殖和凋亡密切相关。中电导钙激活钾离子通道蛋白(intermediate-conductance calcium-activated potassium channel protein, SK4/Kca3.1/KCNN4)是钙激活钾离子通道家族中的一员, 目前已有实验证实其在肝癌、乳腺癌、胰腺癌和子宫内膜癌等组织中均呈高表达。同时, 在体外培养的多种肿瘤细胞中, siRNA途径下调SK4表达或药理学阻断SK4通道后, 发现肿瘤细胞增殖及分化能力明显受到抑制^[6-11]。但是, 目前SK4通道在PTC中的研究国内外尚未报道, 本实验通过检测SK4在甲状腺乳头状癌组织中的表达情况及其对细胞增殖、集落形成和迁移能力的影响, 进一步探讨其在甲状腺乳头状癌发生发展中的作用, 旨在为PTC的诊断、治疗有所帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床组织样本收集 新鲜组织样本取自台州市中心医院(台州学院附属医院)肿瘤外科。2017年2月~10月期间随机选择的甲状腺乳头状癌组织及对应癌旁组织各20例, 其中, 癌旁组织距肿瘤边缘2 cm以上。PTC患者中男性6例, 女性14例, 年龄25~68岁, 中位年龄46岁。另从台州市中心医院(台州学院附属医院)病理科获取2017年1月~10月临床资料完整的存档蜡块73例, 其中PTC蜡块52例, 正常甲状腺组

织蜡块21例。所有患者术前均未接受化疗、放疗以及其他抗肿瘤辅助性治疗。所有标本均经病理诊断证实。所有标本的收集均经患者签署知情同意后, 且标本使用获医院伦理委员会批准。

1.1.2 细胞培养 人甲状腺乳头状癌细胞株CGTHW-3及人正常甲状腺细胞株Nthy-ori3-1购买于ATCC。细胞分别培养于含10%新生牛血清的RPMI-1640和DMEM(H)培养基, 于37 °C、5.0% CO₂恒温培养箱中培养。

1.1.3 试剂及仪器 一步法超敏免疫组化检测试剂盒、DAB显色试剂盒、苏木素、山羊血清封闭工作液、中性树胶均购于北京中杉金桥生物科技有限公司。PrimeScript™ RT试剂盒及SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒均购于TaKaRa公司。PVDF膜购于Millipore公司。T-PER蛋白提取液及彩色蛋白Marker均购于ThermoFisher公司。SK4兔抗人多克隆抗体、GAPDH多克隆抗体购于Abcam公司。HRP标记的羊抗兔IgG抗体购于Bioword公司。WB成套器械购于北京六一仪器厂。凝胶成像仪购于Bio-Rad公司。Step One PCR仪器购于ABI公司。显微图像分析系统购于Leica公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Real-time PCR 参考产品说明书, 采用Trizol法抽取组织样本总RNA、TaKaRa PrimeScript™ RT试剂盒合成cDNA。根据TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒说明书配制20 μL反应体系。 β -actin作为内参照, 独立实验重复3次。PCR反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。反应结束后由StepOne Real-time PCR系统自动计算mRNA相对定量结果。所用引物由上海捷瑞生物工程有限公司根据设计合成, 引物序列见表1。

1.2.2 Western blot 各新鲜组织样本加入液氮充分碾磨(细胞收集: 胰酶消化后, 离心收集细胞, PBS洗涤1次)。在组织粉末或细胞沉淀中加入适量体积的T-PER溶液(含1% PMSF), 冰上放置30 min。4 °C 12 000 r/min离心5 min, 取上清液。BCA法检测蛋白浓度。加适量上样缓冲液, 98 °C变性10 min。12%分离胶, 5%浓缩胶电泳分离蛋白后, 湿转法转膜。

表1 引物序列
Table 1 Sequences for primers

基金名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物 Product
KCNN4	Forward: 5'-AGT AGC CTG GTT CCT CCT CGT-3'	142 bp
	Reverse: 5'-CCC TGG AGA AAC AGA TTG ACA-3'	
β -actin	Forward: 5'-CTA CCT CAT GAA GAT CCT CAC CGA-3'	84 bp
	Reverse: 5'-TTC TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT-3'	

封闭1.5 h, 加入兔抗人KCNN4多克隆抗体(1:500), 4 °C孵育过夜。回收一抗, TBST洗膜10 min/次, 共3次。二抗(1:10 000)孵育1.5 h, ECL显色, ImageQuant LAS 4000mini化学发光成像仪自动曝光, 结果用ImageJ软件进行分析。将曝光完毕的杂交膜放入一抗二抗去除液中, 水平摇床摇10 min。洗涤完毕后重新封闭杂交膜, 以上述同样方法检测内参蛋白GAPDH(1:1 000)的表达。

1.2.3 免疫组化 将已脱水脱钙包埋好的蜡块4 μ m厚度连续切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇去二甲苯, PBS洗涤。3% H₂O₂降低过氧化氢酶造成的非特异性背景染色, PBS洗涤, 枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)中煮沸法修复抗原。10%山羊血清封闭20 min后, 滴加兔抗人SK4抗体(1:1 000) 4 °C孵育过夜, 以PBS作阴性对照。37 °C复温40 min, PBS洗涤。滴加HRP标记的羊抗兔IgG抗体(即用型), 室温孵育30 min, PBS洗涤后DAB显色, 显微镜下判断染色情况, 蒸馏水冲洗10 min, 苏木素复染, 脱水封片后, 显微图像分析系统拍照。实验结果判断标准依据Carcangiu等^[12]的半定量评分方法。实验结果由两位病理医生双盲判定。

1.2.4 CCK-8检测细胞增殖能力 将指数期生长的CGTHW-3细胞以4 000/孔接种于96孔板中, 放入37 °C、5% CO₂培养箱中培养。同时设立空白对照组(含培养液, 不接种细胞, 不做给药处理)及阴性对照组(含培养液, 接种细胞, 不做给药处理)。待细胞贴壁后, 干预组给予TRAM-34, 浓度分别为5、10、20、30、40 μ mol/L。每组设立4~6个复孔。细胞培养箱中培养48 h后, 弃培养液, 加入100 μ L新鲜培养液, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 轻轻混匀后放入培养箱中孵育2 h。在酶联免疫检测仪上选择490 nm波长测定各孔的D值。

1.2.5 细胞平板克隆实验 收集处于生长期的CGTHW-3细胞接种于6孔板中, 每孔细胞数约400个。待细胞贴壁后, 对照组不作处理, 实验组加药处

理, 使其药物浓度为10 μ mol/L, 每组设3个复孔。定期换液给药, 3天/次。直至出现肉眼可见的克隆斑(50个细胞), 弃旧培养液, PBS洗涤后用10%甲醛固定, 再次洗涤后0.1%结晶紫染色25 min, PBS洗净拍照。计算每孔直径在1 mm以上的细胞集落数。

1.2.6 Tanswell细胞迁移实验 收集状态良好的CGRHW-3细胞, 以无血清RPMI1640培养液稀释并计数, 以 $8\times10^4\sim2\times10^5$ /孔接种于上室。于上室中加入预设浓度的TRAM-34, 至终体积为200 μ L。下室24孔板内加入500 μ L含10% FBS的RPMI1640完全培养液。注意排除小室与下方培养液之间的气泡。培养24 h后取出小室, 弃去小室培养液, PBS漂洗2次, 小室适当风干。固定染色后将小室倒置于显微镜下, 随机选取中间及周围上下左右5个视野观察拍照, 计数每个视野中细胞数目并进行统计。实验重复3次。

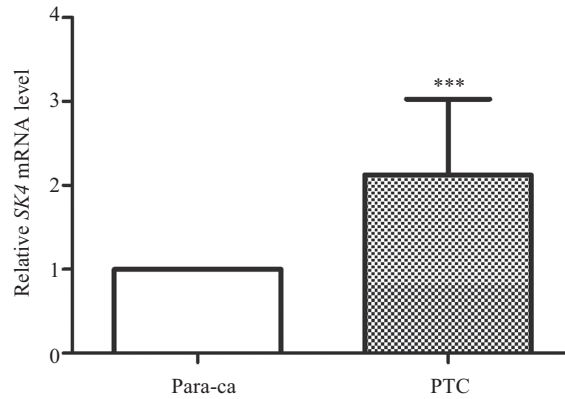
1.3 统计分析

应用SPSS 22.0和GarphPad Prism 7.0软件对数据进行分析。计量数据采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)表示, 两样本均数比较采用t检验, 多样本均数之间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。不同甲状腺组织免疫组化结果的两两比较及甲状腺乳头状癌组织中SK4蛋白表达与临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验或Fisher精确概率法。P<0.05差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Real-time PCR检测PTC组织中SK4 mRNA的表达情况

我们采用Real-time PCR技术检测20例临床切除的PTC组织及癌旁组织中SK4 mRNA的表达情况。结果显示, PTC组织的SK4 mRNA相对表达量明显高于癌旁组织, 约为后者的1.884倍, 差异具有统计学意义(P<0.01, 图1)。

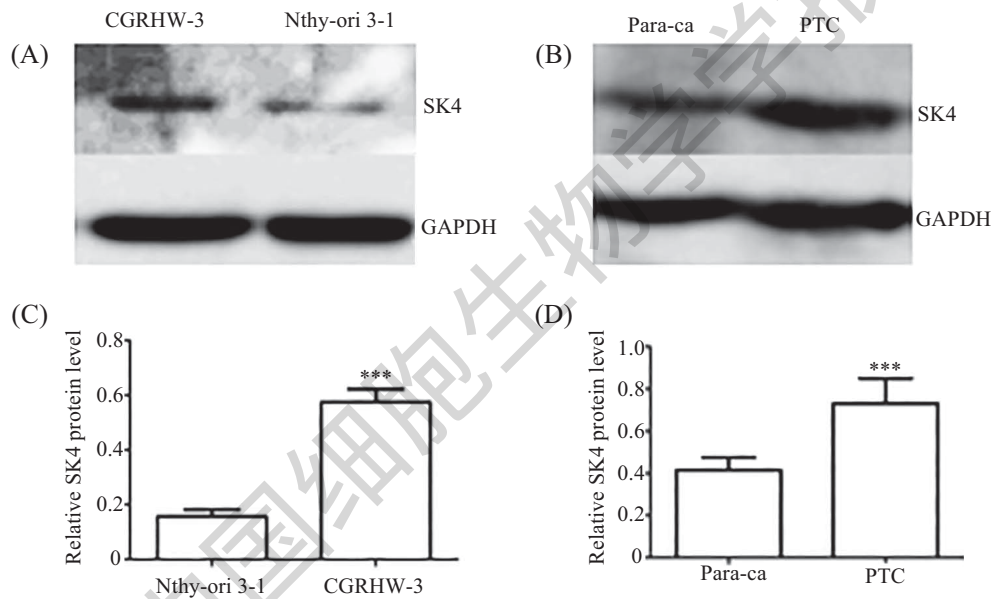


*** $P<0.001$, 与癌旁组织相比。

*** $P<0.001$ vs Para-ca group.

图1 SK4在两种不同甲状腺组织中的mRNA相对表达量($n=20$)

Fig.1 The relative mRNA levels of SK4 in different thyroid tissues ($n=20$)



*** $P<0.001$, 与癌旁组织相比。

*** $P<0.001$ vs para-ca group.

图2 PTC组织及细胞株中SK4的蛋白表达情况

Fig.2 The protein levels of SK4 in PTC tissues and cell lines detected by Western blot

2.2 免疫印迹法(Western blot)检测PTC组织及细胞株中SK4的表达情况

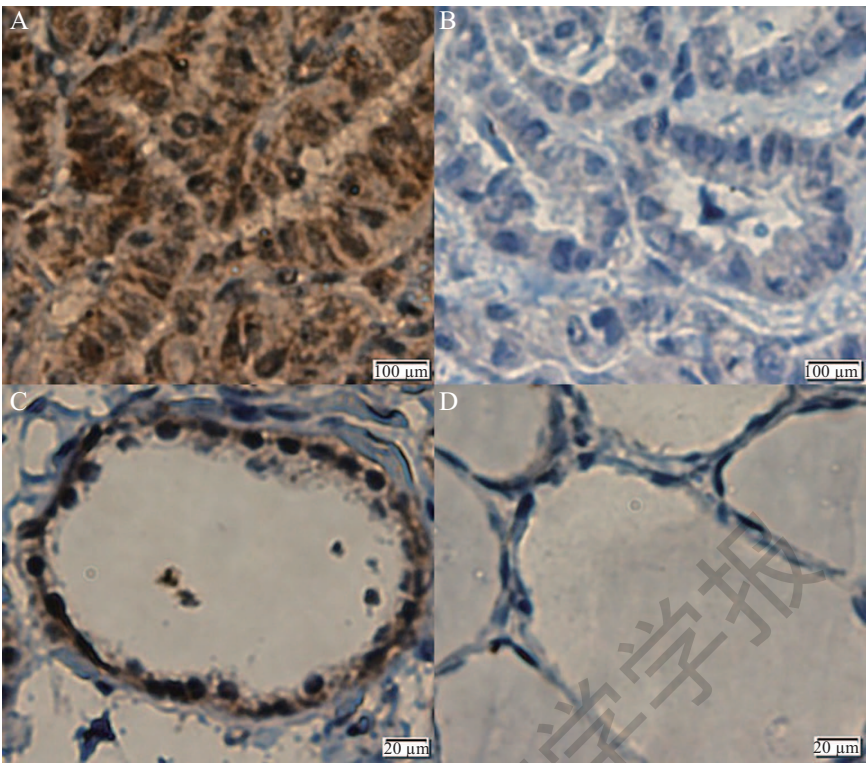
采用Western blot法检测PTC组织及细胞株中SK4的表达情况。结果显示, 癌组织及癌旁组织中SK4的蛋白相对表达量分别为: $0.732 0 \pm 0.118 5$ 、 $0.415 3 \pm 0.060 4$ 。PTC细胞株CGRHW-3及正常甲状腺细胞株Nthy-ori 3-1SK4中SK4的蛋白相对表达量分别为: $0.574 4 \pm 0.048 3$ 、 $0.156 2 \pm 0.025 4$ 。实验结果提示, SK4在PTC组织及细胞中呈高表达, 差异具有统计学意义($P<0.01$, 图2)。

2.3 免疫组化检测PTC组织及正常甲状腺组织中SK4的表达情况

免疫组化检测PTC和正常甲状腺组织的SK4蛋白表达情况及定位。结果显示, SK4在PTC组织的细胞质和细胞膜上均有表达(图3)。PTC组织中SK4阳性率为71.2%, 正常甲状腺组织中SK4阳性率为33.3%。经 χ^2 检验, 两者差异具有统计学意义($P<0.01$, 表2)。

2.4 SK4蛋白表达与PTC临床病理特征的关系

通过免疫组化结果分析SK4蛋白表达和PTC患者临床病理特征的关系。结果显示, SK4的表达与



A、B: 甲状腺乳头状癌组织; C、D: 正常甲状腺组织。
A,B: papillary thyroid carcinoma tissues; C,D: normal thyroid tissues.

图3 SK4在两种不同甲状腺组织中免疫组化结果

Fig.3 The protein levels of SK4 expression in normal and PTC tissues detected by immunohistochemistry assay

表2 免疫组化检测SK4在甲状腺乳头状癌和正常甲状腺组织中的表达情况

Table 2 The protein levels of SK4 expression in normal and PTC tissues detected by immunohistochemistry assay						
分组	例数	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2	P值
Groups	<i>n</i>	Positive	Negative	Positive rate (%)		<i>P</i> value
PTC	52	37	15	71.2	8.936	0.004
Normal	21	7	14	33.3		

患者的性别、年龄、肿瘤大小、有无淋巴结转移及肿瘤TNM分期均无明显相关($P>0.05$, 表3)。

2.5 CCK-8法检测TRAM-34对PTC细胞株CGRHW-3增殖能力的影响

添加不同浓度的TRIM-34溶液阻断SK4通道蛋白后, 检测其对PTC细胞株CGRHW-3增殖能力的影响。结果显示, 阴性对照组D值为0.43±0.05, 5、10、20、30、40 μmol/L实验组D值分别为0.40±0.02、0.36±0.02、0.32±0.01、0.28±0.01和0.22±0.01。统计分析结果显示, TRAM-34剂量依赖性地抑制CGRHW-3细胞增殖, 差异具有统计学意义($P<0.01$, 图4)。

2.6 平板克隆实验检测TRAM-34对PTC细胞株CGRHW-3集落形成能力的影响

与此同时, 我们采用平板克隆实验检测TRAM-

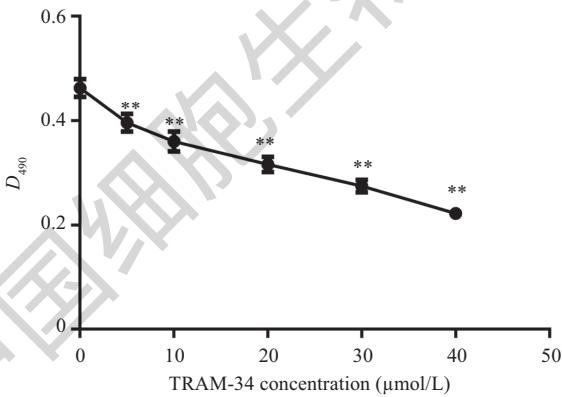
34对PTC细胞株CGRHW-3集落形成能力的影响, 阴性对照组的集落数为62.0±1.7, TRAM-34 10 μmol/L实验组的集落数为43.0±1.1。与CCK-8结果一致, 平板克隆实验中, SK4特异性抑制剂TRAM-34显著抑制CGRHW-3细胞克隆形成($P<0.01$, 图5)。

2.7 Transwell实验检测TRAM-34对PTC细胞株CGRHW-3迁移能力的影响

我们在细胞培养液中加入10 μmol/L的TRAM-34溶液, 观察阻断SK4通道后, 细胞迁移能力是否受影响。Transwell实验结果显示, 阴性对照组的小室中, 细胞穿膜数为每视野232±8, TRAM-34 10 μmol/L实验组小室细胞穿膜数为每视野98±6。与阴性对照组相比, 实验组CGRHW-3细胞迁移能力显著减弱, 差异具有统计学意义($P<0.01$, 图6)。

表3 PTC组织中SK4蛋白质阳性率与临床病理特征的关系

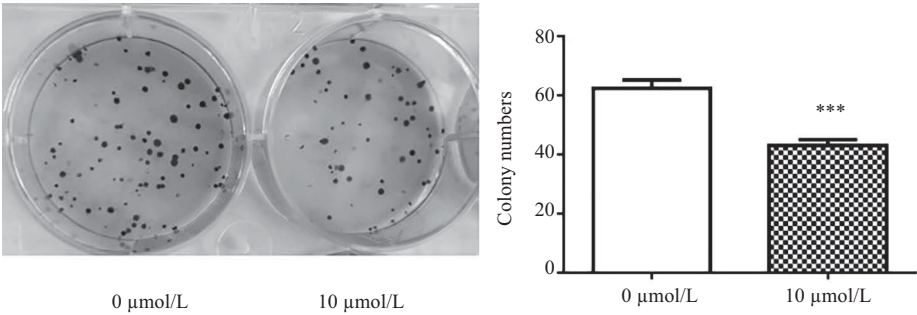
Table 3 Clinicopathologic variables and the expression status of SK4 in papillary thyroid carcinoma					
变量	例数	阳性	阴性	χ^2	P 值
Variables	n	Positive	Negative		P value
Sex					
Male	17	14	3	0.839	0.360
Female	35	23	12		
Age					
<45	21	15	7	1.641	0.200
≥45	31	25	5		
Tumor size					
≤2cm	44	36	9	1.773	0.183
>2cm	8	4	3		
Lymphatic metastasis					
No	26	17	5	0.105	0.746
Yes	29	22	8		
TNM stage					
I+II	40	29	11	0.144	0.704
III+IV	12	10	2		



***P*<0.01, 与0 μmol/L组比较。
***P*<0.01 vs 0 μmol/L group.

图4 TRAM-34对CGRHW-3细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of TRAM-34 on the proliferation of CGRHW-3 cells



****P*<0.001, 与阴性对照组(0 μmol/L)相比。
****P*<0.001 vs control (0 μmol/L) group.

图5 TRAM-34对CGRHW-3细胞集落形成能力的影响

Fig.5 Effect of TRAM-34 on the colony formation of CGRHW-3 cells

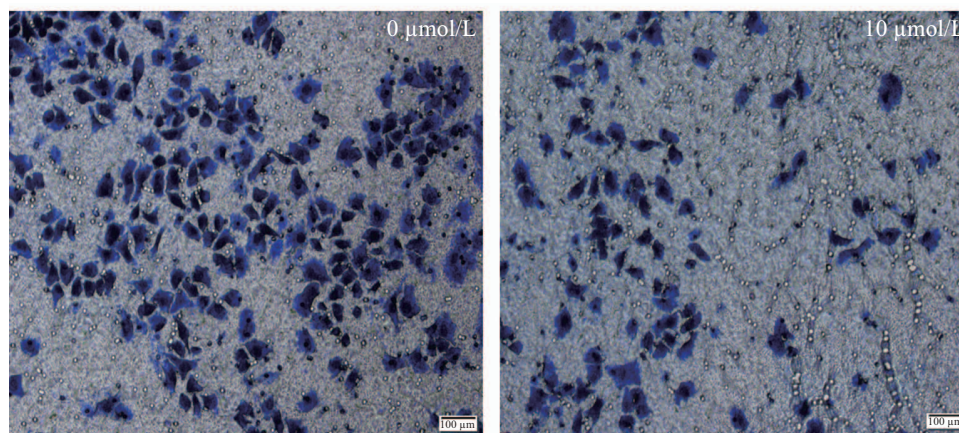


图6 TRAM-34对CGRHW-3细胞迁移能力的影响

Fig.6 TRAM-34 inhibits CGRHW-3 cells migration

3 讨论

中电导钙激活钾离子通道蛋白是由*KCNN4*基因编码的一类钙激活钾离子通道,在人体组织细胞中广泛分布。SK4通道的主要功能是在细胞活化和增殖过程中调节 Ca^{2+} 内流。SK4感受微量胞内钙离子变化,经过级联反应,间接性放大始动力,使大量钙离子内流,调节胞内由钙离子介导的多条信号通路,进而调控转录因子及相关基因的表达,从而对细胞的增殖、代谢、分化以及凋亡等生物学行为产生影响^[13]。通过诱导更负的膜电压, K^+ 通道的激活为 Ca^{2+} 流入肿瘤细胞提供了驱动力。此外,通过改变膜电位,调节钙离子的流入,钾离子通道对钙离子的电压依赖性活性和/或电导率产生了调控作用^[14-15]。而 Ca^{2+} 持续进入细胞,这对于T细胞、巨噬细胞和肥大细胞炎症趋化因子和细胞因子的产生至关重要^[16-17],也是许多细胞增殖的先决条件。

本课题组通过Real-time PCR、Western blot及免疫组化方法对比研究SK4在PTC组织及细胞中的转录及翻译情况。Real-time PCR结果显示,PTC组织中SK4转录水平高于癌旁组织,同时SK4蛋白质水平在PTC组织及细胞中均呈高表达,差异具有统计学意义。分析SK4蛋白表达与患者临床病理特征关系,结果显示,SK4阳性率与患者年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移及肿瘤TNM分期等临床特征之间无统计学意义,由此推断,SK4与PTC的各种生物学行为之间并无直接关系,或许是因为本实验病例数的限制,我们还难以得出明确的结论。与本研究报道一致的是,已有多个研究在肝癌、乳腺癌、胰腺癌和子宫内膜癌等组织中均检测出SK4转录及

翻译水平呈高表达,同时在体外培养的多种肿瘤细胞系中siRNA沉默或药理学阻断SK4表达后,发现肿瘤细胞增殖及分化能力明显受到抑制^[6-11]。

TRAM-34是中电导钙激活钾离子通道SK4的特异性抑制剂,是一种高度亲脂性、膜通透的三芳香基甲烷TRAM的类似物。本课题组使用TRAM-34阻断SK4通道后,检测SK4对CGRHW-3细胞增殖及迁移能力的影响。CCK-8实验结果显示,使用梯度浓度的TRAM-34干预CGRHW-3细胞48 h后,CGRHW-3细胞增殖能力出现浓度依赖性的下降,该结果提示,TRAM-34可通过抑制SK4的表达,抑制CGRHW-3细胞的增殖,且其效应具有浓度依赖性。与CCK-8结果一致,集落形成实验结果表明,TRAM-34下调SK4表达后,CGRHW-3细胞克隆形成数量明显减少。Transwell实验结果显示,阴性对照组的小室其穿膜细胞数明显多于实验组小室穿膜细胞数,间接表明SK4参与CGRHW-3细胞的迁移过程,且该过程可被TRAM-34所阻断。上述结果充分证明,SK4在PTC发生发展过程中可能扮演癌基因的角色,通过特异性抑制剂TRAM-34下调SK4的表达可以显著抑制肿瘤细胞的增殖及迁移能力,由此推测,SK4或许能成为PTC新的治疗靶点。

Steudel等^[13]通过构建携带MMTV-PyMT^{tg/tg}的SK4 WT和KO小鼠,发现与源自野生型小鼠的非恶性乳腺活检相比,MMTV-PyMT^{tg/tg}小鼠乳腺肿瘤组织SK4 mRNA含量显著升高,提示乳腺肿瘤的自发形成和进展可能需要SK4通道的功能性表达。其次,研究人员还发现,通过TRAM-34抑制SK4通道后,MMTV-PyMT^{tg/tg}小鼠原代乳腺肿瘤细胞G₁/S阻

滞,与WT细胞相比,SK4 KO细胞中Ki-67阳性细胞核数量、细胞周期相关标记物c-fos和c-jun均明显减少,进一步证实了SK4在控制细胞生长中的作用。同时,研究发现,在转移性乳腺癌细胞系MDA-MB-231中,用TRAM-34或siRNA抑制SK4通道抑制细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡^[18]。此外,在MDA-MB-231细胞中SK4的过度表达增加了原发性肿瘤生长和转移^[19]。Liu等^[20]研究发现,通过siRNA沉默及阻滞剂抑制SK4通道表达后,肝癌细胞生长及迁移明显受到抑制,且通过调节细胞内ROS的水平,促进p53蛋白的活化和肝癌细胞的凋亡。D'Alessandro等^[21]通过体内实验发现,与阴性对照组相比,实验组(TRAM-34处理后)小鼠肿瘤细胞的周围浸润和星形胶质细胞的增生显著减少。同时研究人员还发现,SK4通道同样存在于在小胶质细胞中,TRAM-34也会影响小胶质细胞的活性,并能降低小胶质细胞的吞噬能力和趋化活性,减少神经胶质瘤的侵袭^[22]。

关于SK4促进细胞增殖的机制,目前研究存在各种假说,有学者认为,SK4感受微量胞内钙离子变化,经过级联反应,间接性放大始动力,使大量钙离子内流,调节胞内由钙离子介导的多条信号通路,从而促进细胞增殖^[13]。也有学者认为,通过SK4通道的构象改变从而激活MAPK信号通路产生增殖效应^[23]。有文献报道,在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)调控细胞生长过程中,通过Ras/MEK/ERK上调SK4为其中的关键一步,说明SK4与Ras/MEK/ERK信号通路之间可能存在正向调节作用^[24]。生长因子与其受体结合,启动信号级联,其中活化蛋白-1和组蛋白乙酰化以及抑制因子1-沉默转录因子(repressor element 1-silencing transcription factor, REST)抑制的释放上调SK4通道。KCNN4基因的启动子含有REST结合位点,REST与启动子的结合抑制SK4转录。纤维化趋化因子碱性FGF通过MEK依赖性机制上调鼠肾成纤维细胞中的SK4表达,并且通过诱导G₀/G₁阻滞,SK4的选择性阻断有效抑制成纤维细胞增殖^[25]。

关于SK4促进细胞迁移的机制,有学者认为,是通过增加细胞内Ca²⁺、促进肌动蛋白聚合、募集MMP-2(matrix metalloproteinase-2),从而影响细胞的侵袭^[26]。如Yang等^[27]发现,TRAM-34可抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,

HUVEC)的增殖,且在细胞周期的G₁期阻滞HUVEC并下调这些细胞中的CDK4、波形蛋白和MMP-2。也有学者认为,SK4参与细胞形状和体积的变化、调整细胞向周围环境移动^[28]。SK4通道开放后,膜电位转向钾离子和氯离子的平衡电位之间,钾离子、氯离子同时外流,同时伴随水分子外流,细胞体积缩小。此过程使细胞膨胀部位形成伪足,也可促使后部分的细胞向前收缩,进而完成细胞的迁移过程^[28]。

综上所述,SK4通道作为一种多功能信号分子,可能通过复杂的信号通路正向调节细胞增殖与迁移过程。我们希望通过进一步研究,如构建CGRHW-3细胞的慢病毒载体转染并筛选稳转的CGRHW-3细胞,研究稳转的CGRHW-3细胞与阴性转染的CGRHW-3细胞在小鼠体内增殖能力、成瘤能力及迁移侵袭能力等方面的差异;利用SK4基因敲除小鼠开展有关SK4在PTC病理生理发展过程中扮演的作用的研究。通过对这些问题的研究,可更好地揭示及阐述SK4在PTC细胞增殖与迁移中的作用机制,并为PTC新的治疗策略提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. *Cancer* 2009; 115(16): 3801-7.
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 3 Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, *et al.* Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(1): 42-50.
- 4 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- 5 Pardo LA, Stuhmer W. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(1): 39-48.
- 6 Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, *et al.* Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 2009; 28(15): 1792-806.
- 7 Chou CC, Lunn CA, Murgolo NJ. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8(2): 179-87.
- 8 Jager H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro*. *Mol Pharmacol* 2004; 65(3): 630-8.
- 9 Roy JW, Cowley EA, Blay J, Linsdell P. The intermediate

- conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel inhibitor TRAM-34 stimulates proliferation of breast cancer cells via activation of oestrogen receptors. *Br J Pharmacol* 2010; 159(3): 650-8.
- 10 Wang ZH, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ, *et al.* Blockage of intermediate-conductance- Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene* 2007; 26(35): 5107-14.
- 11 Freise C, Ruehl M, Seehofer D, Hoyer J, Somasundaram R. The inhibitor of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels TRAM-34 blocks growth of hepatocellular carcinoma cells via downregulation of estrogen receptor alpha mRNA and nuclear factor-kappaB. *Invest New Drugs* 2013; 31(2): 452-7.
- 12 Carcangiu ML, Chambers JT, Voynick IM, Pirro M, Schwartz PE. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations. *Am J Clin Pathol* 1990; 94(3): 247-54.
- 13 Steudel FA, Mohr CJ, Stegen B, Nguyen HY, Barnert A, Steinle M, *et al.* SK4 channels modulate Ca^{2+} signalling and cell cycle progression in murine breast cancer. *Mol Oncol* 2017; 11(9): 1172-88.
- 14 Huber SM. Oncochannels. *Cell Calcium* 2013; 53(4): 241-55.
- 15 Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* 2014; 206(2): 151-62.
- 16 Gerlach AC, Gangopadhyay NN, Devor DC. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hK1. *J Biol Chem* 2000; 275(1): 585-98.
- 17 Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K^{+} channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* 2006; 61(10): 880-5.
- 18 Zhang P, Yang X, Yin Q, Yi J, Shen W, Zhao L, *et al.* Inhibition of SK4 potassium channels suppresses cell proliferation, migration and the epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* 2016; 11(4): e0154471.
- 19 Thurber AE, Nelson M, Frost CL, Levin M, Brackenbury WJ, Kaplan DL. IK channel activation increases tumor growth and induces differential behavioral responses in two breast epithelial cell lines. *Oncotarget* 2017; 8(26): 42382-97.
- 20 Liu Y, Zhao L, Ma W, Cao X, Chen H, Feng D, *et al.* The blockage of KCa3.1 channel inhibited proliferation, migration and promoted apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer* 2015; 6(7): 643-51.
- 21 D'Alessandro G, Catalano M, Sciacaluga M, Chece G, Cipriani R, Rosito M, *et al.* KCa3.1 channels are involved in the infiltrative behavior of glioblastoma *in vivo*. *Cell Death Dis* 2013; 4: e773.
- 22 Ferreira R, Lively S, Schlichter LC. IL-4 type 1 receptor signaling up-regulates KCNN4 expression, and increases the KCa3.1 current and its contribution to migration of alternative-activated microglia. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 183.
- 23 Millership JE, Devor DC, Hamilton KL, Balut CM, Bruce JI, Fearon IM. Calcium-activated K^{+} channels increase cell proliferation independent of K^{+} conductance. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300(4): C792-802.
- 24 Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, *et al.* Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 2000; 275(47): 37137-49.
- 25 Grgic I, Kiss E, Kaistha BP, Busch C, Kloss M, Sautter J, *et al.* Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of KCa3.1 potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(34): 14518-23.
- 26 Freise C, Querfeld U. Inhibition of vascular calcification by block of intermediate conductance calcium-activated potassium channels with TRAM-34. *Pharmacol Res* 2014; 85: 6-14.
- 27 Yang H, Li X, Ma J, Lv X, Zhao S, Lang W, *et al.* Blockade of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel inhibits the angiogenesis induced by epidermal growth factor in the treatment of corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2013; 110: 76-87.
- 28 Giannone G, Ronde P, Gaire M, Haiech J, Takeda K. Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 26364-71.