

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.002

· 基础研究 ·

CAPN4 调控肿瘤干细胞干性在肺腺癌顺铂耐药中的作用机制

张灵玉^{1,2}, 刘春江², 李秋妹¹, 叶韵斌^{1,2} (1. 福建医科大学肿瘤临床医学院 福建省肿瘤医院 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014; 2. 福州大学 化学学院, 福建 福州 350002)

[摘要] **目的:** 探讨钙蛋白酶小亚基 1 (CAPN4) 调控肺腺癌顺铂耐药性及肿瘤干细胞干性的作用机制, 为通过靶向干性逆转耐药提供实验依据。 **方法:** 收集 2023 年 1 月至 2024 年 1 月期间在福建省肿瘤医院手术切除的 10 例肺腺癌患者的组织标本, 通过免疫组织化学 (IHC) 法检测 5 例对顺铂耐药与 5 例敏感肺腺癌组织中 CAPN4 的表达差异, 并进行组织化学评分 (H 评分)。利用癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库和基因表达谱交互分析 (GEPIA) 平台进行肺癌 CAPN4 基因表达相关的生存分析。另收集 2 例对顺铂耐药、2 例敏感的肺腺癌组织标本, 建立肺腺癌类器官 (PDO) 模型, 采用 H-E、IHC 染色评估 PDO 与原发肿瘤形态学的一致性。采用慢病毒介导的 shRNA 技术敲减 CAPN4 基因表达, 运用 qPCR 和 WB 法检测 PDO 中干细胞标志物 ALDH1A1、CD133、Nanog 和 SOX9 的基因和蛋白表达水平。通过腺苷三磷酸 (ATP) 法检测 CAPN4 下调后肺腺癌 PDO 对顺铂的敏感性变化, 使用半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 活性检测法评估 CAPN4 下调的肺腺癌 PDO 经顺铂处理后的凋亡情况。 **结果:** IHC 检测结果表明, 耐药肺腺癌患者组织中 CAPN4 蛋白的表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。在 TCGA 数据库肺腺癌患者队列中, CAPN4 的高表达与肺腺癌患者的不良预后 (OS 缩短) 显著相关 ($HR = 1.4, P < 0.05$)。耐药患者来源的 PDO 中 CAPN4 蛋白表达、干细胞标志物的基因和蛋白表达水平均显著上调 (均 $P < 0.05$)。在顺铂敏感性测试中, 耐药患者来源 PDO 的 IC_{50} 值显著高于敏感患者来源的 PDO ($P < 0.05$)。敲低 CAPN4 后, 耐药患者来源的 PDO 的干细胞标志物表达显著降低, 顺铂敏感性增强 ($P < 0.05$)。 **结论:** 敲低 CAPN4 可降低肺腺癌 PDO 的干细胞标志物表达, 显著增强其对顺铂的敏感性, 为逆转肺腺癌顺铂耐药提供了潜在治疗靶点。

[关键词] 肺腺癌; 顺铂耐药; 肿瘤细胞干性; 钙蛋白酶小亚基 1

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 07-0681-08

Mechanism of CAPN4-mediated cancer stem cell stemness in cisplatin resistance in lung adenocarcinoma

ZHANG Lingyu^{1,2}, LIU Chunjiang², LI Qiumei¹, YE Yunbin^{1,2} (1. Fujian Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms by which calpain small subunit 1 (CAPN4) regulates cisplatin resistance and cancer stem cell (CSC) stemness in lung adenocarcinoma, and to provide experimental evidence for reversing drug resistance through targeting CSC stemness. **Methods:** Tissue samples were collected from 10 lung adenocarcinoma patients who underwent surgical resection at Fujian Cancer Hospital from January 2023 to January 2024. Immunohistochemistry (IHC) staining was used to detect the differential expression of CAPN4 in five cisplatin-resistant and five cisplatin-sensitive lung adenocarcinoma tissues, followed with a histological scoring (H-score). CAPN4 gene expression-related survival analysis in lung cancer patients was conducted using The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) platform. Additionally, tissue samples from two cisplatin-resistant and two cisplatin-sensitive lung adenocarcinoma cases were collected to establish lung adenocarcinoma organoid (PDO) models. H-E and IHC staining were used to assess the morphological consistency between PDOs and the primary tumors. CAPN4 gene expression was silenced using lentivirus-mediated shRNA transduction. The expression levels of stem cell markers ALDH1A1, CD133, Nanog, and SOX9 were detected at both the gene and protein levels using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting (WB), respectively. The sensitivity of CAPN4-knockdown PDOs to cisplatin was evaluated using the adenosine triphosphate (ATP) assay, and the apoptosis was assessed using the caspase-3 assay. **Results:** IHC results showed that CAPN4 protein expression was significantly upregulated in cisplatin-resistant lung adenocarcinoma tissues ($P < 0.05$). TCGA

[基金项目] 福建省自然科学基金 (No. 2022J05075); 福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目 (No. 2022GGA030); 福建创新联合基金项目 (No. 2021Y9198); 福建肿瘤医院高层次人才培养项目 (No. 2022YNG03)

[作者简介] 张灵玉 (1992—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤分子机制研究

[通信作者] 叶韵斌 (扫码获取作者联系方式)



cohort analysis revealed that high CAPN4 expression was significantly associated with poor prognosis (reduced OS) in lung adenocarcinoma patients ($HR = 1.4, P < 0.05$). PDOs derived from cisplatin-resistant patients exhibited significant upregulation in CAPN4 protein and stemness markers at both gene and protein levels (all $P < 0.05$). Cisplatin sensitivity assays demonstrated that PDOs derived from cisplatin-resistant patients had significantly higher IC_{50} values than those from cisplatin-sensitive patients ($P < 0.05$). After CAPN4 knockdown, the expression of stem cell makers in PDOs derived from cisplatin-resistant patients were significantly reduced, and their sensitivity to cisplatin was enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Knockdown of CAPN4 reduces stem cell marker expression and enhances cisplatin sensitivity in lung adenocarcinoma PDOs, providing a potential therapeutic target for reversing cisplatin resistance in lung cancer.

[Key words] lung adenocarcinoma; cisplatin resistance; tumor cell stemness; calpain small subunit 1 (CAPN4)

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(7): 681-688. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.002]

肺癌是全球范围内致死率极高的恶性肿瘤之一, 其治疗过程中常采用以顺铂为基础的化疗方案^[1]。然而, 顺铂耐药性的出现严重限制了化疗的效果, 导致治疗失败^[2]。近年来的研究^[3]发现, 肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)在肺癌顺铂耐药中扮演着关键角色。这些具有自我增殖、修复与分化潜能的“干性”细胞, 是肿瘤耐药与肿瘤复发转移的“罪魁祸首”^[4]。因此, 深入探索“干性”肿瘤细胞生物学机制, 寻找调控肿瘤“干性”的相关基因, 对逆转“干性”肿瘤细胞的耐药性具有重要意义。钙蛋白酶小亚基 1(calpain small subunit 1, CAPN4)与 CSC 的干性特征相关, 在多种肿瘤的发生和进展中扮演重要角色^[5], 并可能通过影响 Wnt/ β -catenin 信号通路等关键生物学过程, 参与调节 CSC 的干性^[6]。推测 CAPN4 可能通过影响 CSC 的干性特征, 进而影响肺癌细胞对顺铂的敏感性。患者来源类器官(patient-derived organoid, PDO)模型在研究干性机制方面具有独特优势, 能够高度模拟体内组织的细胞组成和功能, 同时保持原发肿瘤的异质性和关键特征^[7]。因此, 本研

究借助肺腺癌 PDO 模型探讨 CAPN4 在肺癌顺铂耐药中的作用及其对 CSC 干性特征的影响, 旨在为肺癌的临床治疗提供新的分子靶点和逆转耐药策略的实验依据。

1 材料与方法

1.1 基于数据库肺腺癌 CAPN4 基因表达与生存分析
利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库, 通过基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)平台对 CAPN4 基因进行生存分析。

1.2 组织标本与主要试剂

收集 2023 年 1 月至 2024 年 1 月期间福建省肿瘤医院胸外科手术切除的 10 例肺腺癌患者癌组织标本, 患者的人口统计学特征、临床特点及用于建立 PDO 的组织样本信息见表 1。本研究的实验方案已经福建省肿瘤医院伦理委员会的审查并获得批准(伦理审批号:K2023-118-01)。

表 1 10 例肺腺癌患者临床信息

| 患者编号 | PDO 编号 | 性别 | 年龄 | 肿瘤 | pT | pN | cM | 分期 |
|------|--------|----|----|-----|------|-----|-----|------|
| P1 | PDO#1 | 男 | 69 | 肺腺癌 | cT2a | N2 | M1a | IVA |
| P2 | PDO#2 | 男 | 52 | 肺腺癌 | cT1 | N0 | M1c | IVB |
| P3 | PDO#3 | 女 | 70 | 肺腺癌 | T2a | N3 | M1c | IVB |
| P4 | PDO#4 | 女 | 69 | 肺腺癌 | pT2a | N0 | M0 | IB |
| P5 | PDO#5 | 男 | 49 | 肺腺癌 | pT1b | N2a | M0 | IIIA |
| P6 | PDO#6 | 女 | 61 | 肺腺癌 | cT2b | N0 | M0 | IA2 |
| P7 | PDO#7 | 女 | 75 | 肺腺癌 | pT2a | N1 | M1 | IVA |
| P8 | PDO#8 | 女 | 81 | 肺腺癌 | pT2a | N0 | M0 | IB |
| P9 | PDO#9 | 女 | 61 | 肺腺癌 | pT1b | N0 | M1 | IV |
| P10 | PDO#10 | 男 | 73 | 肺腺癌 | pT1b | N0 | M0 | IB |

根据 RECIST 1.1 标准, 将 10 例接受顺铂方案化疗的肺腺癌患者分为两组。顺铂敏感组($n = 5$): 化疗后肿瘤体积缩小 $\geq 30\%$ 或肿瘤与周围血管关系改善, 无新发远处转移; 顺铂耐药组($n = 5$): 化疗后肿瘤体积

增加 $\geq 20\%$, 或出现大血管侵犯, 或新发远处转移。

组织消化液、肺腺癌 PDO 培养基、PDO 解离液均购自苏州 bioGenous 公司, 基质胶购自美国 Corning 公司, shCAPN4 及阴性对照慢病毒由上海吉玛生物

科技有限公司提供。TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司, SYBR Green PCR Master Mix 购自美国Life Technologies公司, PrimeScript RT Reagent Kit (#RR047A)购自 TaKaRa公司, CAPN4、ALDH1A1、CD133、SOX9和Nanog抗体购自武汉ABclonal公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊兔抗二抗购自美国CST公司, 4%的多聚甲醛购自美国Sigma-Aldrich公司, 半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)探针购自上海翌圣生物科技有限公司, CellTiter-Glo 3D细胞活性检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 肺腺癌PDO的构建

本研究基于4例临床肺腺癌组织标本(2例顺铂耐药: PDO#6、PDO#10; 2例顺铂敏感: PDO#1、PDO#5)构建PDO模型。获取肺腺癌组织标本后, 在洁净的生物安全柜内进行PDO培养的相关实验操作。首先, 将肿瘤组织转移至清洗液(含1%抗生素的PBS)中充分荡洗。随后, 使用眼科剪刀将组织细致剪切成0.5~1 mm³的小块, 使用特定的组织消化液在37 °C下处理30 min后, 通过100 μm孔径的细胞筛过滤, 以分离出单个癌细胞或细胞簇。接下来, 采用生长因子减少型的基质胶作为支架, 按照1 × 10⁶个/mL的细胞密度加入基质胶(> 70%)并在冰上混匀。然后, 将50 μL细胞-基质胶混合物添加到37 °C的24孔板的每个孔中, 并在37 °C下作用15 min, 以便基质胶固化。固化后, 沿孔壁缓慢加入500 μL肿瘤PDO完全培养基进行培养。传代时, 收集PDO混合物, 消化、清洗、离心后, 将细胞沉淀加入基质胶中混匀, 加入24孔培养板中传代培养。

1.4 慢病毒感染及分组

shRFP和shCAPN4慢病毒载体均含红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)基因。shRFP的序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTAA-3', shCAPN4的序列为5'-GACTCATGAACATTCTCAATAA-3'。取对数生长期的PDO, 用PDO解离液解离成单细胞, 接种于24孔板, 每孔4 × 10⁴个细胞。实验分为PDO-shRFP(sh-NC)、PDO-shCAPN4(sh-CAPN4)组。病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为50, 将病毒与细胞悬液在含有5% CO₂的37 °C培养箱中共同培养6 h后, 移至预冷PBS中, 4 °C、300 × g离心5 min。收集到的PDO进行种胶培养。7 d后, 使用1 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选, 持续7 d, 以获得稳定的聚集克隆。

1.5 H-E、免疫组织化学(IHC)法检测肺腺癌组织和PDO中CAPN4蛋白表达水平

肺腺癌组织和PDO在室温下用4%的多聚甲醛固定24 h后, 常规石蜡包埋。将石蜡样本切成5 μm厚的切片, 进行H-E染色和IHC分析。组织化学评分

(histochemistry score, H评分) = $\sum (p_i \times i) = (\text{弱强度阳性信号像素区域的比例} \times 1) + (\text{中等强度阳性信号像素区域的比例} \times 2) + (\text{强强度阳性信号像素区域的比例} \times 3)$ 。其中, p_i 代表阳性信号像素区域的比例与细胞数量之比; i 代表染色强度^[8]。

1.6 WB法检测PDO中CAPN4、ALDH1A1、CD133、SOX9和Nanog的蛋白表达水平

利用RIPA裂解液提取各组织细胞中的总蛋白, 通过BCA蛋白含量测定试剂盒测定蛋白浓度。进行10%SDS-PAGE分离蛋白质, 在200 mA恒定电流下转膜60 min, 用5%脱脂牛奶TBST缓冲液将PVDF膜在室温下封闭1 h, 加入CAPN4(1:1 000)、ALDH1A1(1:500)、CD133(1:1 000)、SOX9(1:1 000)和Nanog(1:1 000)一抗中4 °C下培养过夜。次日, 用TBST缓冲液洗膜3次, 加入HRP标记的山羊兔抗二抗(1:5 000), 室温下处理2 h, 洗膜后使用ECL化学发光法显影, 用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.7 腺苷三磷酸(ATP)法检测PDO活性

使用CellTiter-Glo 3D细胞活性检测试剂盒来确定PDO的活性。CellTiter-Glo试剂与PDO培养基以1:1的体积比混合, 振荡混匀5 min后, 室温下作用30 min, 应用GloMax®发光检测仪检测相对光单位(relative light unit, RLU)。发光信号的强度与ATP含量呈正比。基于检测结果, 进一步计算药物的半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.8 qPCR法检测PDO中CAPN4、ALDH1A1、CD133、SOX9和Nanog的mRNA表达水平

使用SYBR Green PCR Master Mix作为荧光定量PCR的反应体系, 以GAPDH为内参基因。利用TRIzol试剂从不同组的PDO中提取总RNA。采用PrimeScript RT Reagent Kit将提取的RNA逆转录成cDNA。将合成的cDNA进行PCR扩增。qPCR引物序列: CAPN4正向引物为5'-GGAGTCATCAGCGCCATCAGC-3', 反向引物为5'-CGGACCTCCTCACTCTCGTTGG-3'; ALDH1A1正向引物为5'-ACGCCAGACTTACCTGTCCTACTC-3', 反向引物为5'-TCTTGCCACTCACTGAATCATGCC-3'; CD133正向引物为5'-GTGGCGTGTGCGGCTATGAC-3', 反向引物为5'-CCAACCTCCAACCATGAGGAAGACG-3'; SOX9正向引物为5'-CACACGCTGACCACGCTGAG-3', 反向引物为5'-GCTGCTGCTGCTCGCTGTAG-3'; Nanog正向引物为5'-AGATGCCTCACACGGAGACTG-3', 反向引物为5'-GGGTTGTTTGCCTTTGGGACTG-3'; GAPDH正向引物为5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', 反向引物为5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'。PCR反应条件: 95 °C预变性10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C

20 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因mRNA的相对表达量。

1.9 Caspase-3检测PDO凋亡情况

在不同浓度的顺铂处理PDO后,加入携带绿色荧光标记的caspase-3探针(0.5 $\mu\text{mol/L}$),使用活细胞成像系统(TCS SP8,徕卡公司)对PDO凋亡细胞进行观察。荧光图像采用Image J软件进行定量分析,计算凋亡细胞比例。

1.10 统计学处理

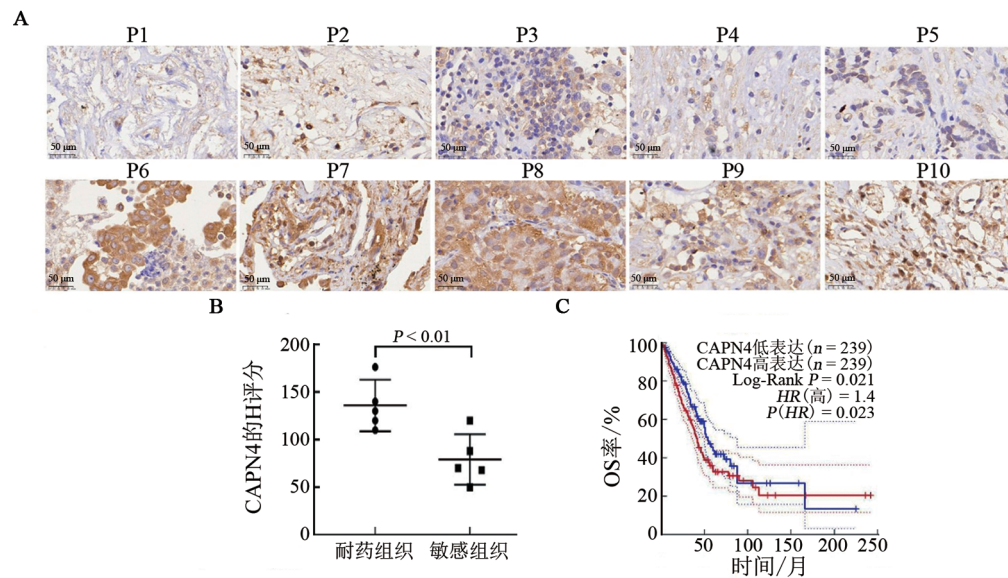
以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 9统计软件对实验数据进行分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用t检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。以

$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAPN4在顺铂耐药肺腺癌组织中呈高表达且与患者不良预后有关联

IHC检测肺腺癌组织中CAPN4蛋白的表达(图1A)。通过H评分(半定量评分法)分析顺铂耐药组织与敏感组织中CAPN4的表达差异,结果(图1B)显示,耐药组织中CAPN4蛋白的表达水平显著高于敏感组织($P < 0.01$)。进一步利用TCGA肺腺癌患者队列进行生存分析,发现CAPN4高表达患者总生存期(OS)均短于低表达组($HR = 1.4, P < 0.05$;图1C)。



A:IHC检测P1~P10肺腺癌患者组织中CAPN4蛋白的表达情况;B:H评分法对IHC染色结果进行定量分析;

C:CAPN4表达的TCGA肺癌队列的Kaplan-Meier生存分析。

图1 CAPN4在肺腺癌患者组织中的表达及其对患者预后的影响

2.2 肺腺癌PDO中CAPN4表达水平对干细胞标志物表达与顺铂敏感性的影响

由P1、P5、P6和P10肺腺癌患者手术样本构建的肺腺癌PDO呈致密球形。为验证其与原发肿瘤一致性,进行了H-E染色和肺癌特异性标志物TTF-1的IHC染色。结果(图2A)显示,肺腺癌PDO的形态学特征与原发肿瘤具有同质性。WB法检测结果(图2B)显示,PDO#1和PDO#5的CAPN4蛋白表达显著低于PDO#10和PDO#6(均 $P < 0.01$)。qPCR法检测结果(图2C)也表明,PDO#1和PDO#5中干细胞标志物ALDH1A1、CD133、SOX9和Nanog的mRNA表达水平显著低于PDO#10和PDO#6(均 $P < 0.05$)。这些结果通过WB法得到进一步的证实(图2D,均 $P < 0.01$)。ATP法进一步评估不同CAPN4表达水平的PDO对顺铂的敏感性。结果显示,PDO#1和PDO#5对顺铂

的敏感性显著高于PDO#10和PDO#6(图2E)。通过拟合曲线得出,PDO#1对顺铂的 IC_{50} 为(13.15 ± 0.18) $\mu\text{mol/L}$,PDO#5对顺铂的 IC_{50} 为(6.78 ± 0.55) $\mu\text{mol/L}$,而PDO#10的 IC_{50} 为(88.45 ± 0.13) $\mu\text{mol/L}$,PDO#6的 IC_{50} 为(57.33 ± 0.74) $\mu\text{mol/L}$ (图2F)。

2.3 下调CAPN4降低肺腺癌PDO干细胞标志物的表达

慢病毒转导技术成功将携带RFP和嘌呤霉素抗性标记的shCAPN4导入PDO。经嘌呤霉素筛选,构建了稳定敲低CAPN4的sh-NC组、sh-CAPN4组PDO(图3A)。

WB法检测结果(图3B)证实了PDO中CAPN4被敲低。敲低CAPN4后,PDO#10中干性相关蛋白ALDH1A1、CD133、SOX9和Nanog的表达水平均下调(图3B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。通过Image J软件分析明

场图像(图 3C),发现随着 CAPN4 下调,直径 $\geq 50 \mu\text{m}$ 的 PDO 数量显著减少(图 3D, $P < 0.01$)。此外,通过 ATP 法检测发现, CAPN4 下调后 PDO 的活性显著降

低(图 3E, $P < 0.05$),进一步证实了下调 CAPN4 降低了 PDO 的干性,从而影响了 PDO 的活性。

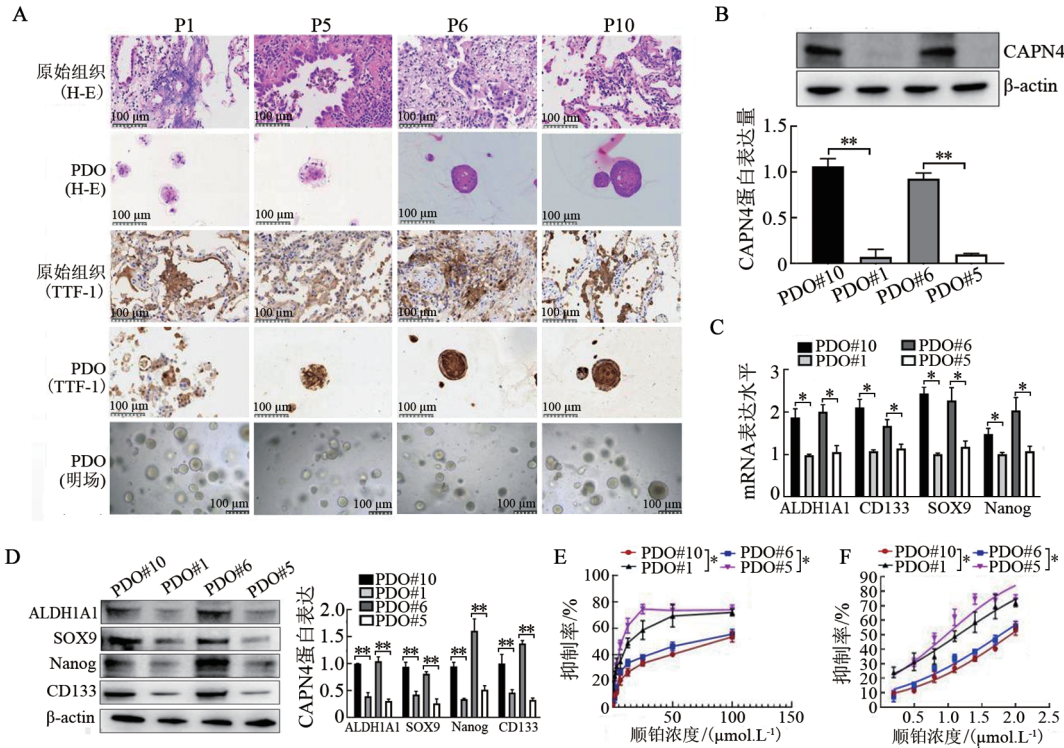


图 2 肺癌 PDO 中 CAPN4 表达水平的异质性及其对顺铂敏感性的影响

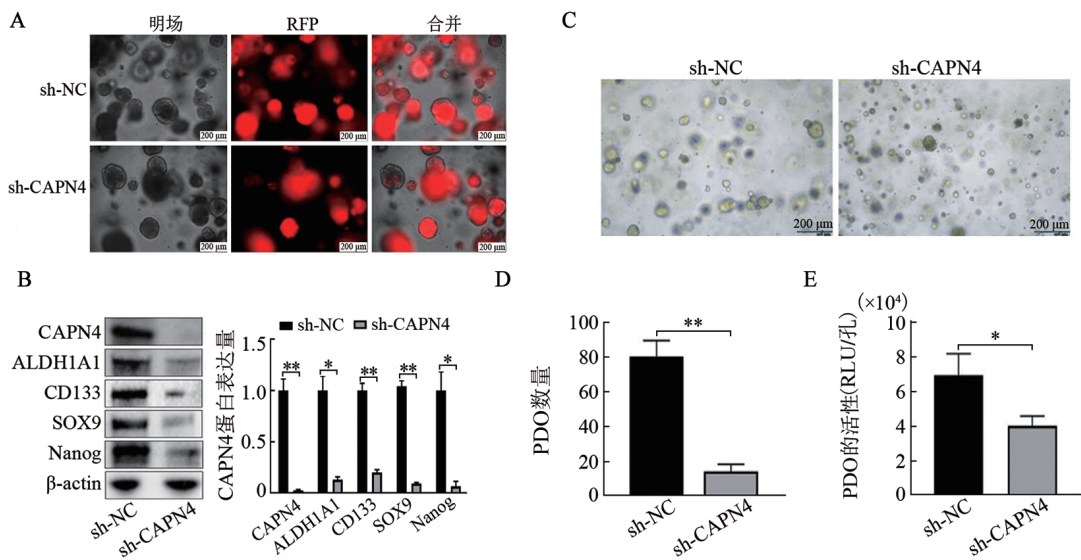
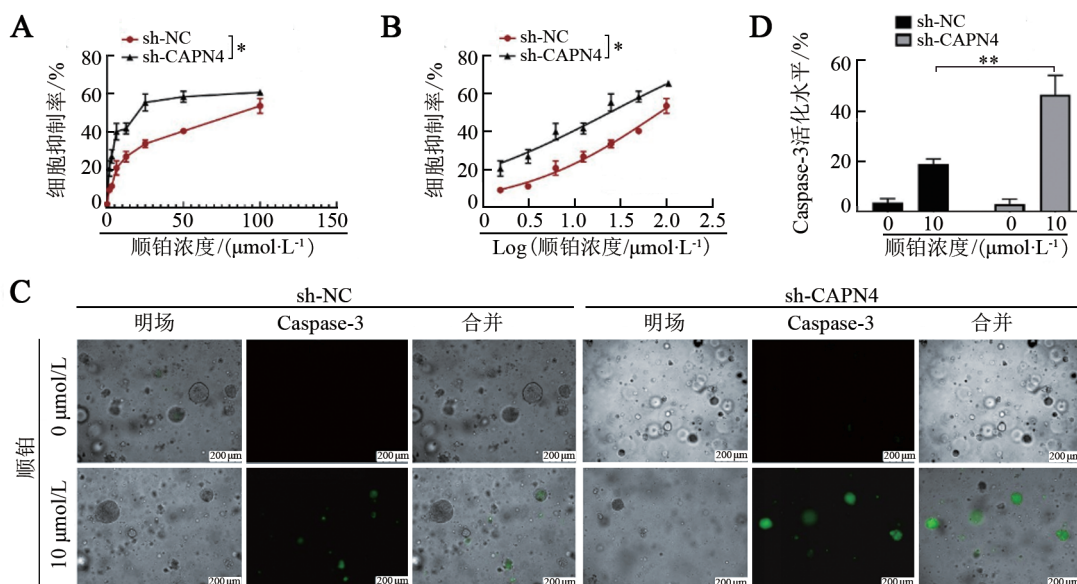


图 3 下调 CAPN4 降低 PDO(PDO#10)的干性

2.4 下调CAPN4增强肺腺癌PDO对顺铂的敏感性

ATP法检测结果显示,CAPN4下调显著增强了顺铂对肺腺癌PDO细胞的抑制(图4A, $P < 0.05$)。通过拟合曲线得出,PDO10#sh-NC组的 IC_{50} 值为 $(66.7 \pm 0.45) \mu\text{mol/L}$,而PDO10#sh-CAPN4组的 IC_{50}

值则显著降低至 $(18.9 \pm 1.05) \mu\text{mol/L}$ (图4B)。使用caspase-3细胞凋亡检测法进一步研究CAPN4对肺腺癌PDO化疗敏感性的影响,可以看到,CAPN4下调后,PDO大量崩解死亡(图4C),且顺铂作用后凋亡率显著增加(图4C、D, $P < 0.01$)。



A: ATP法检测CAPN4对顺铂的敏感性,利用细胞抑制率评估药物反应;B:PDO在sh-NC和sh-CAPN4条件下对顺铂的剂量反应拟合曲线比较;C:顺铂($10 \mu\text{mol/L}$)处理3 d后,对CAPN4下调前后的PDO中caspase-3(绿色)表达水平的变化;D:顺铂($10 \mu\text{mol/L}$)处理后,PDO中caspase-3活化水平的定量分析。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图4 下调CAPN4增强PDO(PDO#10)对顺铂的敏感性

3 讨论

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占所有肺癌病例的85%,其中大多数患者在初诊时已处于疾病晚期。目前,化疗在肺癌治疗中的地位仍然不可替代。顺铂是NSCLC化疗的核心药物,但耐药性的产生严重制约了治疗效果^[9]。化疗后的存活NSCLC细胞抗药性增加,是引起肺癌复发和耐药的基础。因此,提高肺癌细胞对化疗药物的敏感性是当前亟等解决的问题。现有研究已经揭示了多种导致癌症化疗抗性的机制,如药物外排、DNA损伤修复能力的增加以及凋亡途径的缺陷,但是这些发现未能显著改善化疗疗效^[10]。

CSC是肿瘤组织中一小部分具有高度多向分化、自我更新和无限增殖能力的细胞群,可启动肿瘤形成、肿瘤生长、上皮间质转化(EMT)过程、转移和复发,以及药物抗性^[11]。肺癌中,CSC可以通过表面标志物的表达来识别,如CD133、CD44、ALDH1A1和ABCG2,它们受Notch、Wnt和细胞周期信号通路的调控,这些通路对药物抗性的发生和维持也至关重要^[12-15]。先前的研究^[16-18]已经开发了针对CSC表面标志物和相关通路的抗CSC治疗,正在临床试验中

进行测试。因此,进一步理解CSC在顺铂耐药性中的作用对于开发新的治疗策略以治疗顺铂耐药的NSCLC至关重要。

PDO技术作为一种创新的三维体外干细胞培养技术,提供了一个独特、精准的平台。通过在培养皿中利用特定的微环境因子,PDO能够维持干细胞驱动的、近乎生理的自我更新组织的形成^[19]。该技术已被应用于包括肺癌在内的多种癌症组织,并且证实,癌症PDO能够反映其来源母体肿瘤的大部分遗传和组织学特征^[20-21]。PDO包含多种器官特异性细胞类型,源自干细胞和器官前体。因此,PDO作为一种特征明确的体外模型,能够紧密模拟体内微环境,又因为富含干细胞而成为研究CSC功能细节,包括药物抗性的理想模型^[22]。基于此,本研究利用PDO模型探讨了肺腺癌顺铂耐药性的机制。

钙蛋白酶家族的多个成员与肿瘤的发生发展密切相关。钙蛋白酶是一类依赖 Ca^{2+} 的半胱氨酸蛋白水解酶,在哺乳动物中包含14个大亚基、2个小亚基调节蛋白(CAPNS1/CAPN4和CAPNS2)以及1个内源性抑制蛋白——钙蛋白酶抑制蛋白。CAPN4作为钙蛋白酶的小分子亚基,分子量为28 000,对钙蛋白

酶形成二聚体至关重要^[22]。钙蛋白酶抑制蛋白作为钙蛋白酶的的特异性抑制剂,具有8个剪接变体^[12-13]。研究发现,在神经鞘瘤、脑膜瘤、结直肠癌和乳腺癌中钙蛋白酶表达增加^[23-24];在肾肿瘤中CAPN1 mRNA表达水平上调^[25];在子宫癌肉瘤中CAPN6表达增加^[26];在NSCLC中CAPN4表达上调^[27]。先前的研究^[5]已经表明,CAPN4通过激活特定的信号转导通路(如Wnt/ β -catenin/MMP9信号通路),促进胃癌的发展。CAPN4能够降低 β -catenin的泛素化,增强其在肺癌细胞中的稳定性,可能促进肿瘤的侵袭和耐药性。此外,CAPN4通过促进MMP2的表达,加速NSCLC的进展^[28]。CAPN4的沉默能够增强卵巢癌细胞的凋亡,表明CAPN4可能通过影响凋亡信号转导通路参与肿瘤耐药性的形成。本研究聚焦于CAPN4在肺癌干细胞干性中的调控作用。利用顺铂耐药和敏感的肺腺癌患者来源的组织,通过IHC分析表明,CAPN4在耐药患者癌组织中呈高表达,提示其在顺铂耐药中的潜在作用。通过耐药患者来源的PDO在体外验证了CAPN4影响肺腺癌对顺铂敏感性,并且CAPN4能够调控肺腺癌细胞的干性,从而介导肺腺癌顺铂耐药。

上述发现不仅揭示了CAPN4在肺腺癌耐药性中的重要作用,也为未来的治疗策略提供了新的靶点。然而,本研究仍存在以下局限性:(1)临床转化验证不足;目前结论主要基于体外和动物模型,需进一步开展CAPN4抑制剂或基因治疗的临床前研究,并探索其与现有化疗方案的协同效应;(2)微环境因素未充分考量:肿瘤微环境(如免疫细胞、成纤维细胞)对耐药性的影响未被纳入模型。未来需构建共培养体系或人源化小鼠模型以完善机制研究。

[参考文献]

- [1] YANG T, XIONG Y L, ZENG Y F, *et al.* Current status of immunotherapy for non-small cell lung cancer[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 989461[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36313314/>. DOI:10.3389/fphar.2022.989461.
- [2] 朱志明,王苏美,唐青,等. 基于EGFR/AKT和JAK2/STAT3通路研究 α -常春藤皂苷单独或与顺铂联用对非小细胞肺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024,31(4): 333-341. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X. 2024.04.003.
- [3] SUN X Y, LV X M, YAN Y Y, *et al.* Hypoxia-mediated cancer stem cell resistance and targeted therapy[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 1106230[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32791395/>. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110623.
- [4] ROBLES-OTEÍZA C, HASTINGS K, CHOI J, *et al.* Hypoxia is linked to acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer[J/OL]. *J Exp Med*, 2025, 222(1): e20231106[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39585348/>. DOI: 10.1084/jem.20231106.
- [5] LI Y H, ZHANG Z, ZHOU X L, *et al.* The oncoprotein HBXIP enhances migration of breast cancer cells through increasing filopodia formation involving MEKK2/ERK1/2/Capn4 signaling[J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2): 288-296. DOI:10.1016/j.canlet.2014.09.047.
- [6] ZHAO C W, YUAN G H, JIANG Y M, *et al.* Capn4 contributes to tumor invasion and metastasis in gastric cancer *via* activation of the Wnt/ β -catenin/MMP9 signalling pathways[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(2): 112220[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32777225/>. DOI:10.1016/j.yexcr.2020.112220.
- [7] XU H X, JIAO D C, LIU A G, *et al.* Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 58[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35551634/>. DOI:10.1186/s13045-022-01278-4.
- [8] KAWAHARA A, YAMAMOTO C, NAKASHIMA K, *et al.* Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3163-3170. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-3239.
- [9] WU C J, SPECTOR S A, THEODOROPOULOS G, *et al.* Dual inhibition of IDO1/TDO2 enhances anti-tumor immunity in platinum-resistant non-small cell lung cancer[J/OL]. *Cancer Metab*, 2023, 11(1): 7[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37226257/>. DOI:10.1186/s40170-023-00307-1.
- [10] ROTTENBERG S, DISLER C, PEREGO P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(1): 37-50. DOI:10.1038/s41568-020-00308-y.
- [11] SAW P E, LIU Q, WONG P P, *et al.* Cancer stem cell mimicry for immune evasion and therapeutic resistance[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(8): 1101-1112. DOI:10.1016/j.stem.2024.06.003.
- [12] HUANG Q, LIU L P, XIAO D K, *et al.* CD44⁺ lung cancer stem cell-derived pericyte-like cells cause brain metastases through GPR124-enhanced trans-endothelial migration[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(9): 1621-1636. DOI:10.1016/j.ccell.2023.07.012.
- [13] ALMARZA C, VILLALOBOS-NOVA K, TORO M A, *et al.* Cisplatin-resistance and aggressiveness are enhanced by a highly stable endothelin-converting enzyme-1c in lung cancer cells[J/OL]. *Biol Res*, 2024, 57(1): 74[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39443981/>. DOI:10.1186/s40659-024-00551-9.
- [14] NGUYEN A L, FACEY C O B, BOMAN B M. The significance of aldehyde dehydrogenase 1 in cancers[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 26(1): 251[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39796106/>. DOI:10.3390/ijms26010251.
- [15] ZHENG J Y, ZHU T, ZHUO W, *et al.* eIF3a sustains non-small cell lung cancer stem cell-like properties by promoting YY1-mediated transcriptional activation of β -catenin[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 213: 115616[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37211173/>. DOI:10.1016/j.bcp.2023.115616.
- [16] ROWBOTHAM S P, GORUGANTHU M U L, ARASADA R R, *et al.* Lung cancer stem cells and their clinical implications[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2022, 12(4): a041270[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34580078/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a041270.
- [17] SAYGIN C, MATEI D, MAJETI R, *et al.* Targeting cancer stemness in the clinic: from hype to hope[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 25-40. DOI:10.1016/j.stem.2018.11.017.

- [18] ZHANG Y M, WANG Z X, HU Q F, *et al.* 3D bioprinted GelMA-nanoclay hydrogels induce colorectal cancer stem cells through activating Wnt/ β -catenin signaling[J/OL]. *Small*, 2022, 18(18): e2200364[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35229478/>. DOI:10.1002/smll.202200364.
- [19] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262-265. DOI:10.1038/nature07935.
- [20] LANCASTER M A, KNOBLICH J A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies[J/OL]. *Science*, 2014, 345(6194): 1247125[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035496/>. DOI:10.1126/science.1247125.
- [21] LEE S Y, CHO H J, CHOI J, *et al.* Cancer organoid-based diagnosis reactivity prediction (CODRP) index-based anticancer drug sensitivity test in ALK-rearrangement positive non-small cell lung cancer (NSCLC)[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 309 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37993887/>. DOI: 10.1186/s13046-023-02899-4.
- [22] UKAI S, HONMA R, SAKAMOTO N, *et al.* Molecular biological analysis of 5-FU-resistant gastric cancer organoids; KHDRBS3 contributes to the attainment of features of cancer stem cell[J]. *Oncogene*, 2020, 39(50): 7265-7278. DOI: 10.1038/s41388-020-01492-9.
- [23] STORR S J, CARRAGHER N O, FRAME M C, *et al.* The calpain system and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 364-374. DOI: 10.1038/nrc3050.
- [24] ZHANG Y M, WEI S Y, CHEN Z J, *et al.* lncRNA FAISL inhibits calpain 2-mediated proteolysis of FAK to promote progression and metastasis of triple negative breast cancer[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(42): e2407493[2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39287113/>. DOI:10.1002/advs.202407493.
- [25] BRAUN C, ENGEL M, SEIFERT M, *et al.* Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type[J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(1): 6-9. DOI:10.1002/(sici)1097-0215(19990219)84:1<6::aid-ijc2>3.0.co;2-t.
- [26] LEE S J, CHOI Y L, LEE E J, *et al.* Increased expression of calpain 6 in uterine sarcomas and carcinosarcomas: an immunohistochemical analysis[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2007, 17(1): 248-253. DOI:10.1111/j.1525-1438.2006.00756.x.
- [27] DAI Z, ZHOU S L, ZHOU Z J, *et al.* Capn4 contributes to tumour growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activation of the FAK-Src signalling pathways[J]. *J Pathol*, 2014, 234(3): 316-328. DOI: 10.1002/path.4395.
- [28] GU J, XU F K, ZHAO G Y, *et al.* Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression *via* upregulation of matrix metalloproteinase 2 [J/OL]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 51[2025-01-13]. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-015-0500-7>. DOI:10.1007/s12032-015-0500-7.

[收稿日期] 2025-01-14

[修回日期] 2025-05-29

[本文编辑] 党瑞山