

PDZ结合激酶作为胰腺癌潜在预后标志物:从泛癌分析到胰腺癌验证

王锦帼¹, 马 扬², 李赵鑫³, 何丽妃³, 黄英泽⁴, 范晓明⁵

桂林医科大学¹公共卫生学院,²基础医学院,³广西肿瘤免疫与微环境调控重点实验室,广西 桂林 541004;³桂林医科大学附属医院放射肿瘤科,广西 桂林 541001;⁴桂林医科大学附属临床检验中心,广西 桂林 541001

摘要:目的 研究PDZ结合激酶(PBK)在胰腺癌(包含33种癌症类型)中的表达及其预后意义,并探索其作为治疗靶点的潜力。方法 采用TCGA、GEO和CPTAC数据库对33种肿瘤组织中PBK的表达进行分析,采用RT-PCR、Western blotting对胰腺癌临床标本及细胞中PBK的表达进行分析。通过生存分析、Cox回归分析、ROC曲线分析和临床相关性研究评估其对胰腺癌的诊断和预后价值。通过基因富集和免疫相关性分析来探讨PBK在肿瘤微环境中的潜在作用。通过对GDSC及CTRP的数据集的分析,研究PBK表达与药物敏感性的关系。通过慢病毒沉默方法建立沉默PBK的胰腺癌BXP3-3的稳定细胞系。采用CCK-8、细胞克隆、transwell实验检测沉默PBK后,对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。采用免疫共沉淀和Western blotting研究PBK与非SMC凝聚素II复合亚基G2(NCAPG2)的相互作用。结果 PBK在多种癌症组织及胰腺癌中过表达($P<0.05$),具有较高的诊断价值,PBK的高表达与不良预后相关($P<0.05$)。PBK的高表达还与免疫浸润和肿瘤微环境特征的改变有关。PBK高表达对MEK抑制剂(曲美替尼)及EGFR抑制剂(阿法替尼)的敏感性呈正相关,但对Bcl-2抑制剂(TW37)及氯硝柳胺的敏感性呈负相关($P<0.05$)。进一步敲低PBK抑制了NCAPG2的表达,且抑制了胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭($P<0.05$)。免疫共沉淀显示PBK能够与NCAPG2直接结合。结论 PBK是胰腺癌的关键调节因子,并与NCAPG2相互作用,促进胰腺癌的进展。它可能作为胰腺癌的潜在生物标志物和治疗靶点,同时为泛癌症研究提供新的见解。

关键词:PDZ结合激酶;泛癌分析;胰腺癌;免疫浸润;生物标志物;NCAPG2

PDZ-binding kinase as a prognostic biomarker for pancreatic cancer: a pan-cancer analysis and validation in pancreatic adenocarcinoma cells

WANG Jinguo¹, MA Yang², LI Zhaoxin³, HE Lifei³, HUANG Yingze⁴, FAN Xiaoming⁵

¹School of Public Health, ²School of Basic Medical Sciences, ³Guangxi Key Laboratory of Tumor Immunity and Microenvironment Regulation, Guilin Medical University, Guilin 541004, China; ³Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China; ⁴Affiliated Clinical Laboratory Center of Guilin Medical University, Guilin 541001, China

Abstract: Objective To investigate the prognostic significance of PDZ-binding kinase (PBK) in pan-cancer and its potential as a therapeutic target for pancreatic cancer. **Methods** PBK expression levels were investigated in 33 cancer types based on data from TCGA, GEO and CPTAC databases. RT-PCR and Western blotting were employed to examine PBK expression in clinical pancreatic cancer specimens and cell lines. The diagnostic and prognostic value of PBK in pancreatic cancer was evaluated using survival analysis, Cox regression analysis, ROC curve analysis, and clinical correlation studies. Gene enrichment and immune correlation analyses were conducted to explore the potential role of PBK in tumor microenvironment, and its correlation with drug sensitivity was investigated using GDSC and CTRP datasets. In pancreatic cancer BXP3-3 cells, the effects of lentivirus-mediated PBK knockdown on cell proliferation, migration, and invasion were examined using CCK-8, colony formation, and Transwell assays. The interaction between PBK and non-SMC condensin II complex subunit G2 (NCAPG2) was analyzed using co-immunoprecipitation and Western blotting. **Results** PBK was overexpressed in multiple cancer types, including pancreatic cancer. A high PBK expression was associated with a poor prognosis of the patients and correlated with immune infiltration and alterations in the tumor microenvironment. Elevated PBK expression was positively correlated with the sensitivity to MEK inhibitors (Trametinib) and EGFR inhibitors (Afatinib) but negatively with the sensitivity to Bcl-2 inhibitors (TW37) and niclosamide. In BXP3-3 cells, PBK knockdown significantly suppressed NCAPG2 expression and inhibited cell proliferation, migration, and invasion. Co-immunoprecipitation confirmed a direct binding between PBK and NCAPG2. **Conclusion** PBK is a key regulator of pancreatic cancer and interacts with NCAPG2 to promote tumor progression, suggesting its value as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer.

Keywords: PDZ-binding kinase; pan-cancer analysis; pancreatic cancer; immune invasion; biomarker; NCAPG2

PDZ结合激酶(PBK)又称TOPK,是一种丝氨酸/

苏氨酸蛋白激酶,其结构中存在PDZ结合结构域。该结构域使PBK能够与各种PDZ蛋白相互作用,在信号转导中起着至关重要的作用^[1]。PBK还具有ATP结合位点和激酶活性区,这对其参与细胞周期调节和信号通路至关重要^[2]。在有丝分裂期间,PBK活性明显上调,特别是在快速增殖的细胞中,如肿瘤细胞^[3]。在功能上,

收稿日期:2025-04-23

基金项目:广西自然科学基金(2023JJA141287)

作者简介:王锦帼,硕士,E-mail: wangjinguo401@alu.glmc.edu.cn

通信作者:范晓明,博士,讲师,硕士生导师,E-mail: fanxiaom1987@glmc.edu.cn;黄英泽,硕士,助理研究员,E-mail: youshxicun@glmc.edu.cn

PBK主要在细胞增殖、DNA损伤修复和细胞周期调节中发挥作用^[4]。在免疫细胞中,PBK也参与T细胞活化和炎症反应^[5]。虽然PBK在正常组织中的表达相对较低,但在增生性组织和肿瘤组织中的表达明显升高,提示其在肿瘤发生和癌症进展中的潜在作用^[6]。

近年来,PBK与各种癌症关系的研究取得了重大进展。PBK过表达在结直肠癌、肺癌、乳腺癌和膀胱癌中已被广泛报道,其与肿瘤侵袭性、转移及预后不良密切相关。尽管PBK在多种癌症中的作用被广泛研究,但对其在泛癌或胰腺癌中作用的研究仍然有限。胰腺癌是一种侵袭性高、预后极差的恶性肿瘤,其分子机制复杂^[7-9]。目前仅少数研究表明PBK可能与胰腺癌的细胞周期调节和肿瘤免疫微环境有关,但缺乏系统的分析和实验验证^[10]。探索PBK在胰腺癌中的表达模式及其潜在机制可以为胰腺癌的诊断和治疗策略提供新的见解。

本研究旨在通过生物信息学方法系统地研究PBK在多种癌症中的表达和功能,特别关注胰腺癌。利用来自癌症基因组图谱(TCGA)和基因表达图谱(GEO)的数据集,评估PBK表达水平与患者预后的相关性,并探讨其在肿瘤免疫微环境中的潜在作用。此外,生物信息学分析的结果将通过胰腺癌临床样本和细胞实验来验证,以确认PBK作为预后和免疫相关生物标志物的可行性,为阐明PBK在癌症中的作用机制及其潜在的临床应用提供理论和实验支持。

1 材料和方法

1.1 数据来源

在TCGA和GTEx数据库下载33种癌症及正常组织的基因表达谱和相应的临床数据(表1)。胰腺腺癌(PAAD)的数据包括178例癌症样本和4例正常对照样本。为进一步验证研究结果,GEO数据库提供了3个胰腺癌数据集:GSE15471,包括39例胰腺癌样本和39例匹配的正常对照;GSE16515,包括36例胰腺癌样本和16例正常对照,其中11例配对样本;GSE62165,包括118例胰腺癌样本和13例正常对照。PBK的蛋白表达数据来自临床蛋白质组学肿瘤分析协会(CPTAC)数据库,该数据库包括137例胰腺癌样本和74例正常对照。

1.2 差异基因表达分析

使用R及相关软件包对PBK在TCGA和GEO胰腺癌数据集中的差异表达进行分析。使用limma包对TCGA数据集中癌症和正常样本的差异表达进行数据归一化和统计检验。采用 t 检验评估差异的统计学意义。通过ComplexHeatmap包生成的热图显示PBK表达与临床特征(如肿瘤分期和大小)之间的关系。

采用pROC软件包进行ROC曲线分析。根据曲线

下面积(AUC)评估PBK的诊断准确性,AUC值范围为0.5~1.0,接近1.0表明诊断效果较好。

1.3 预后分析

采用生存包和survminer包构建Kaplan-Meier生存曲线评估PBK在胰腺癌中的预后意义。根据中位数作为截断值将PBK表达分为高、低两组,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用单因素和多因素Cox回归分析评估PBK作为预后因素的独立性。结果使用forestplot软件包生成的森林图、95%CI、 P 值和显示风险比(HR)进行可视化。

使用timeROC包生成1、3、5年生存率随时间变化的ROC曲线。使用rms包,根据Cox回归结果设计列线图以显示PBK和临床表现对预后的贡献;绘制校准曲线以验证其预测精度。

1.4 基因相关、基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析

使用cor函数计算TCGA胰腺癌数据集中PBK与其他基因之间的Pearson相关系数。鉴定出 $|r|>0.25$ 和 $P<0.05$ 的基因为共表达基因。在 $P<0.05$ 条件下,利用clusterProfiler软件包对共表达基因集进行GO和KEGG途径富集分析,使用ggplot2和enrichment包使结果可见。

1.5 免疫相关分析

评价PBK在肿瘤免疫微环境(TME)、微卫星不稳定性(MSI)、肿瘤突变负荷(TMB)和免疫浸润中的作用。TME分数通过ESTIMATE软件包计算。使用CIBERSORT软件包进行免疫浸润分析,以估计TCGA数据库中33种癌症类型中22种免疫细胞类型的比例。

1.6 药物敏感性分析

药物敏感性数据来源于癌症药物敏感性基因组学(GDSC)数据库,数据经以下预处理:剔除原始数据中缺失率 $>30\%$ 的化合物;对IC₅₀值进行log₂转换;采用sva包的ComBat算法校正实验批次效应;按化合物进行Z-score标准化;剔除标准化后绝对值 >3 的离群值进行质量控制。

1.7 样品采集和细胞来源

组织样本采集于桂林医科大学附属医院肝胆胰外科。经知情同意并经伦理委员会批准(伦理批号:GLMC20240354),共获得10例配对胰腺癌和邻近正常组织样本。细胞系包括1个正常胰腺上皮细胞系HPDE6-C7和4个胰腺癌细胞系PANC-1、AsPC-1、BxPC-3和SW1990(ATCC)。在37℃和5%CO₂的环境下,细胞在添加10%胎牛血清(Gibco)和1%青霉素-链霉素(Gibco)的高糖DMEM培养基(Gibco)中培养。每隔48h更换1次培养基,根据细胞融合程度按1:3的比例传代。

表1 来自TCGA、GEO和GTEx的样本

Tab.1 Data of the samples from TCGA, GEO and GTEx

Name	Detail	Tumor (TCGA)	Normal (source)
ACC	Adrenocortical carcinoma	77	77 (adrenal gland, GTEx)
BLCA	Bladder urothelial carcinoma	406	19 (TCGA)
BRCA	Breast invasive carcinoma	1085	99 (TCGA)
CESC	Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma	306	13 (cervix uteri, GTEx)
CHOL	Cholangio carcinoma	36	9 (TCGA)
COAD	Colon adenocarcinoma	448	41 (TCGA)
DLBC	Lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma	47	47 (whole blood, GTEx)
ESCA	Esophageal carcinoma	182	13 (TCGA)
GBM	Glioblastoma multiforme	167	163 (brain cortex, GTEx)
HNSC	Head and neck squamous cell carcinoma	519	44 (TCGA)
KICH	Kidney chromophobe	66	25 (TCGA)
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma	531	25 (TCGA)
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma	286	32 (TCGA)
LAML	Acute myeloid Leukemia	173	173 (whole blood, GTEx)
LGG	Brain lower grade glioma	524	255 (brain cortex, GTEx)
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma	369	50 (TCGA)
LUAD	Lung adenocarcinoma	513	59 (TCGA)
LUSC	Lung squamous cell carcinoma	486	50 (TCGA)
MESO	Mesothelioma	87	87 (heart atrial appendage, GTEx)
OV	Ovarian serous cystadenocarcinoma	426	180 (ovary, GTEx)
PAAD	Pancreatic adenocarcinoma	178	4 (TCGA)
PCPG	Pheochromocytoma and paraganglioma	183	182 (adrenal gland, GTEx)
PRAD	Prostate adenocarcinoma	499	52 (TCGA)
READ	Rectum adenocarcinoma	158	10 (TCGA)
SARC	Sarcoma	262	262 (adipose subcutaneous, GTEx)
SKCM	Skin cutaneous melanoma	461	461 (skin sun exposed lower, GTEx)
STAD	Stomach adenocarcinoma	408	36 (TCGA)
TGCT	Testicular germ cell tumors	139	137 (testis, GTEx)
THCA	Thyroid carcinoma	512	59 (TCGA)
THYM	Thymoma	118	118 (whole blood, GTEx)
UCEC	Uterine corpus endometrial carcinoma	544	35 (TCGA)
UCS	Uterine carcinosarcoma	57	57 (uterus, GTEx)
UVM	Uveal melanoma	80	79 (EyeGEx retina, GTEx)
GSE15471		39 (GEO)	39 (GEO)
GSE16515		36 (GEO)	16 (GEO)
GSE62165		118 (GEO)	13 (GEO)

1.8 shPBK的构建、转染及感染实验

shRNA序列的设计参考既往研究^[11,12]。将BXPC-3胰腺癌细胞系接种在6孔板中,当细胞融合度达到30%~50%时,采用添加了聚苯乙烯(Sigma)的病毒上清液感染细胞以提高感染效率。12~24 h后,加入新鲜培养基,再继续培养48 h。通过对嘌呤霉素的耐药性选择

稳定的细胞系来鉴定成功感染的细胞。采用Western blotting验证PBK的敲除效率,以确保在蛋白水平上有效沉默,为后续功能实验奠定基础。

1.9 Western blotting 和 RT-qPCR

总蛋白采用RIPA裂解缓冲液(Beyotime)和蛋白酶抑制剂PMSF(Beyotime)进行提取。蛋白浓度定量采

用BCA试剂盒(Beyotime)。利用SDS-PAGE分离蛋白质,然后将其转移到PVDF膜(Millipore)上。一抗(PBK、NCAPG2, 1:1000,兔抗,Abcam)和二抗(山羊抗兔, 1:5000, Proteintech)孵育。利用ECL检测试剂盒(Millipore)实现条带的可视化。

总RNA的提取采用TRIzol试剂(Invitrogen)。利

用HiScript II Q RT SuperMix (Vazyme)合成cDNA,利用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)进行实时PCR。引物由Sangon Biotech合成,引物序列(表2)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量,以GAPDH为内参。每组实验至少重复3次。

表2 实验所需引物序列

Tab.2 Primer sequences for RT-qPCR in this study

Gene name	Sequence	Tm	Amplicon length
PBK	F: TATGACTGCTCCTGCCTTCATAAC	60 °C	115
	R: CACAGCTTCTTTGGGTTTCCAT		
GAPDH	F: TCTCTGCTCCTCCCTGTTC	60 °C	125
	R: ACACCGACCTTACCATCT		

1.10 Transwell和细胞菌落测定

对于Transwell侵入试验,使用24孔跨井腔(Corning)和matrigel涂层膜(BD Biosciences)。细胞悬液加入无血清培养基至上腔,而下腔则加入含有化学引诱剂(FBS)的完整培养基。48 h后,在显微镜下染色计数。对于细胞集落实验,将细胞接种于6孔板中,约500个细胞/孔,培养1~2周形成集落。然后用4%多聚甲醛固定细胞,用结晶紫染色,并冲洗以去除多余的染料。最后,在显微镜下观察菌落。每组实验至少重复3次。

1.11 统计学分析

采用SPSS25.0和GraphPad Prism9.0进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位间距表示,组间比较采用Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用单因素方差分析。相关性分析采用Spearman秩相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBK在癌组织中高表达

通过对TCGA和GTEx数据集的综合分析发现:PBK在包括PAAD在内的几乎所有癌症类型中都显示出显著的高表达,但在某些癌症如TGCT和READ, PBK并未表现出明显的表达升高($P < 0.01$,图1A)。CPTAC蛋白质组学数据进一步验证显示:PBK蛋白在多种癌症类型中高表达,包括COAD、OV、LUAD、HNSC、GBM、KIRC和PAAD,而在BRCA中表达较低($P < 0.0001$,图1B)。ROC曲线分析显示,PBK在多种癌症中具有较高的诊断价值,尽管其在READ中的表现相对较低($P > 0.05$ 图1C)。

PAAD中,TCGA数据显示,胰腺癌中PBK的表达高于正常对照组($P < 0.0001$,图2A),CPTAC结果也支

持这一趋势($P < 0.001$,图2B)。GEO数据集进一步显示:在GSE16515(图2C)、GSE15471(图2D)和GSE62165(图2E)数据集中,PBK在胰腺癌组织中的表达高于正常组织($P < 0.0001$)。临床特征热图显示,PBK表达与导管型胰腺癌的高表达相关($P < 0.001$,图2F)。ROC曲线分析显示PBK表达能有效区分胰腺癌与正常组织(图2G)。

2.2 PBK在胰腺癌组织及细胞中高表达

胰腺癌临床样本结果显示:与正常对照相比,临床样本中PBK蛋白水平的表达均升高($P < 0.05$,图3A);和正常胰腺上皮细胞系HPDE6-C7相比,PANC-1、AsPC-1、BxPC-3和SW1990 4个胰腺癌细胞系中PBK的蛋白水平的表达均升高($P < 0.05$,图3B);RT-qPCR检测发现,临床标本中胰腺癌组织及胰腺癌细胞系和正常胰腺组织和细胞系相比,PBK mRNA的表达均增加($P < 0.05$,图3C、D)。

2.3 33种肿瘤中PBK表达与预后的关系

总生存期(OS)分析显示,在ACC、KICH、KIRC、KIRP、LGG、LIHC、LUAD、MESO、PAAD、PCPG、SARC和THYM患者中,PBK的高表达与较短的OS相关($P < 0.01$,图4A)。无病生存(DFS)分析显示,PBK高表达影响BRCA、KIRP、LIHC、LUAD、PAAD、PRAD、SARC和THCA患者的DFS($P < 0.05$,图4B)。疾病特异性生存(DSS)分析进一步显示,在ACC、COAD、KICH、KIRC、KIRP、LGG、LIHC、LUAD、MESO、PAAD、PCPG和SARC中,PBK的高表达与DSS相关($P < 0.05$,图4C)。无进展生存期(PFS)分析显示,在ACC、BRCA、KICH、KIRC、KIRP、LGG、LIHC、LUAD、MESO、PAAD、PCPG、PRAD、SARC、THCA和UVM患者中,PBK的高表达与PFS相关($P < 0.05$,图4D)。

Kaplan-Meier生存曲线显示:PAAD患者PBK高表达与OS、DFS、DSS、PFS呈负相关($P < 0.05$,图5)。

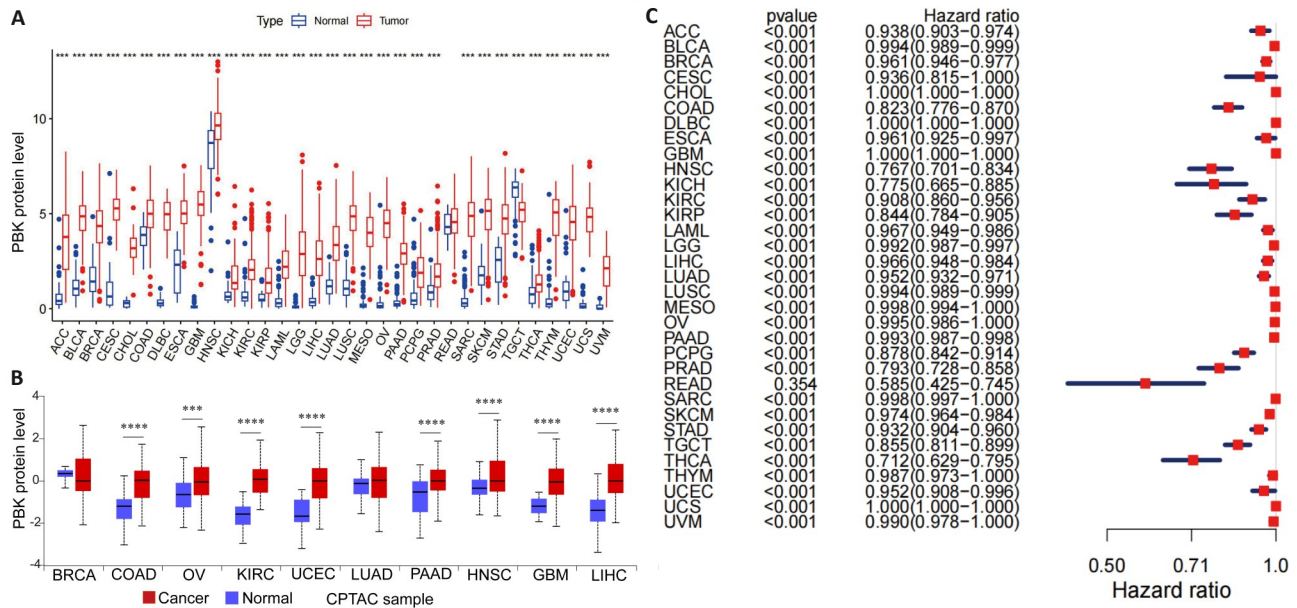


图1 PBK在33种癌症中的表达

Fig.1 PBK expression in 33 cancer types. A: Distribution of PBK mRNA expression in 33 cancer types and their normal controls based on TCGA data. B: Protein expression levels of PBK in different cancers based on data from the CPTAC database. C: ROC curve analysis of PBK in 33 cancer types, demonstrating its diagnostic ability to differentiate cancer from normal tissues. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

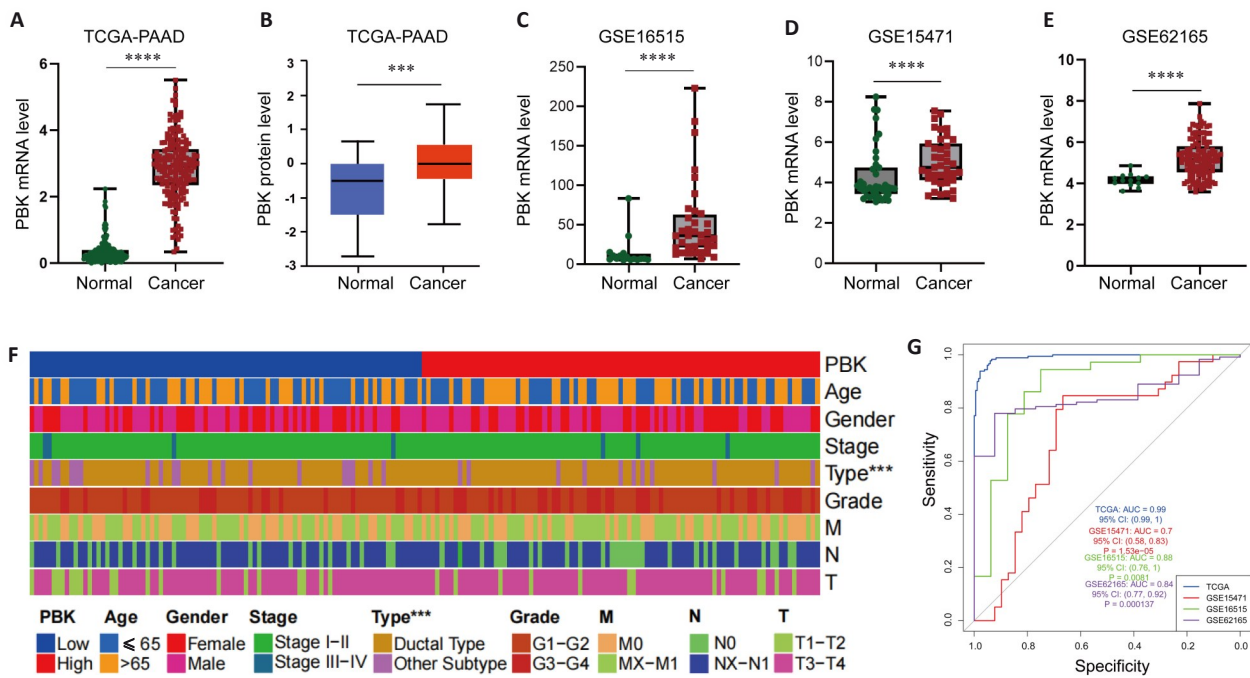


图2 PBK在胰腺癌中的表达

Fig.2 PBK expression in pancreatic cancer. A, B: TCGA and CPTAC data show significantly higher expression of PBK in pancreatic cancer tissues than in normal tissues. C-E: Differential expressions of PBK in pancreatic cancer and paired normal samples based on GSE16515, GSE15471 and GSE62165 datasets. F: Clinical feature heat map showing the association of PBK expression with pancreatic ductal adenocarcinoma and its correlation with tumor characteristics. G: ROC curves of the TCGA and GEO datasets further verify the reliability of PBK as a biomarker for diagnosis of pancreatic cancer. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

单因素和多因素 Cox 回归分析显示, PBK 不仅是胰腺癌的独立预后危险因素, 且肿瘤分级、患者年龄、肿瘤大小和淋巴结转移影响患者的生存 ($P < 0.01$, 图 6A、B)。PBK 和其他临床因素对患者的预后具有综合预测价值(图 6C)。校准曲线在预测 1、3、5 年生存方面

显示出较高的准确性(图 6D)。ROC 曲线分析进一步证实了 PBK 在 1、3、5 年预测中具有较高的 AUC 值(图 6E)。2.4 基因富集分析显示 PBK 参与细胞周期调控和免疫功能

通过 STRING 数据库进行的蛋白质-蛋白质相互作用

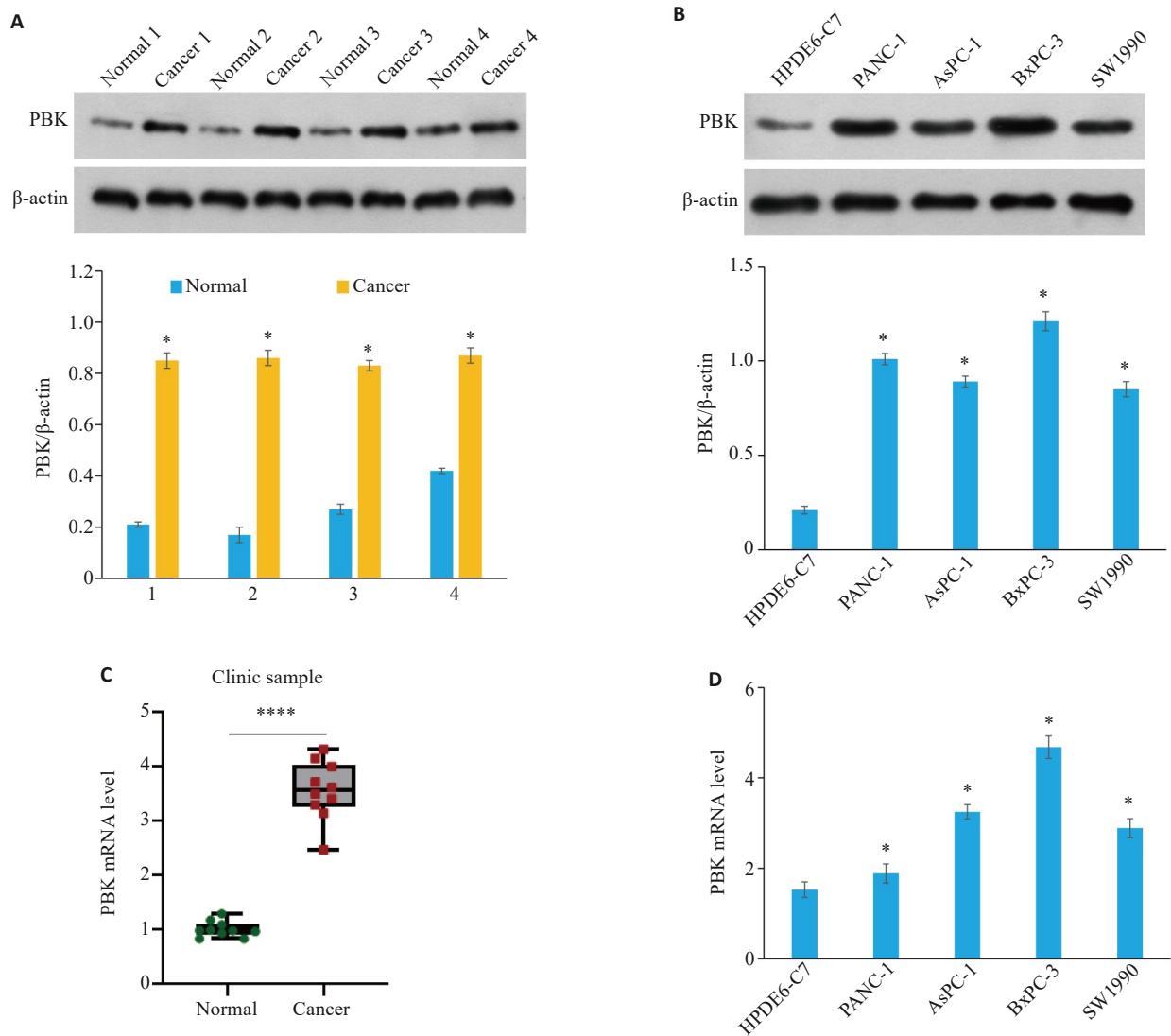


图3 PBK在胰腺癌临床样品和细胞系中高表达

Fig.3 PBK is highly expressed in clinical samples and cell lines of pancreatic cancer. **A:** PBK protein expression levels in 4 clinical pancreatic cancer samples and their paired normal tissues. $*P<0.05$ vs Normal. **B:** PBK protein expression levels in normal pancreatic cell line HPDE6-C7 and 4 pancreatic cancer cell lines (PANC-1, AsPC-1, BxPC-3, and SW1990). $*P<0.05$ vs HPDE6-C7. **C:** PBK mRNA expression levels in 4 clinical pancreatic cancer samples and their paired normal tissues. $****P<0.0001$. **D:** PBK mRNA expression levels in the normal pancreatic cell line HPDE6-C7 and 4 pancreatic cancer cell lines. $*P<0.05$ vs HPDE6-C7.

用网络分析得到与PBK相关的11个高度相关的基因,包括ATAD2、CCNB1、CDKN3、FEN1、HMGB2、KPNA2、NCAPG2、NUSAP1、PCNA、UBE2T和ZWINT(图7A),使用TCGA-PAAD、GSE15471、GSE16515和GSE62165的数据进行共表达分析,结果显示交叉分析鉴定出848个共享基因(图7B)。GO注释和KEGG途径富集分析结果表明,这些基因参与关键的生物学过程,如染色体稳定性、DNA修复和线粒体功能(图7C)。KEGG通路分析进一步揭示PBK可能通过关键通路参与肿瘤发生,包括细胞周期调节、DNA复制、错配修复和p53信号通路(图7D)。基因集富集分析(GSEA)表明,PBK可能在T细胞受体复合体中发挥重要作用(图7E)。

2.5 PBK表达与免疫的相关性分析

StromalScore结果表明,PBK表达在THCA中呈正相关,但在PAAD、SKCM、BLCA、COAD、OV、CESC和LIHC几种癌症中呈负相关(图8A)。ImmuneScore结果表明,PBK在THCA、THYM和KIRC中呈正相关,而在PAAD、BRCA、LUAD和KICH中呈负相关(图8B)。ESTIMATEScore也显示出一致的模式,PBK表达与THCA和KIRC呈正相关,而与PAAD、LUAD和ESCA呈负相关(图8C)。对于TMB,PBK表达与STAD、ACC、LUAD和PAAD呈正相关,但与THYM呈负相关(图8D)。对于MSI,PBK表达与STAD、UCEC和COAD呈正相关,而与TGCT呈负相关(图8E)。

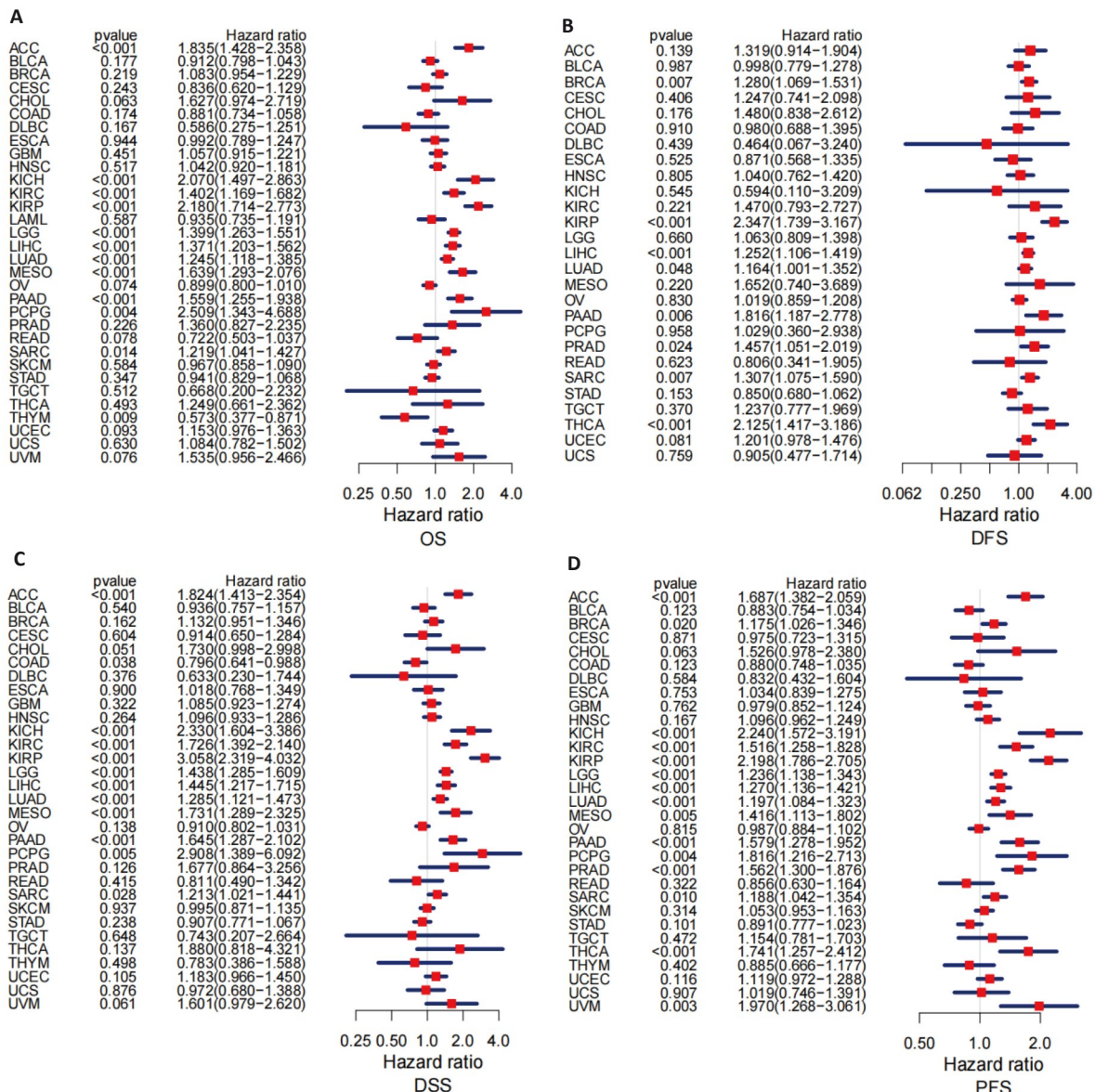


图4 PBK表达在33种癌症中的预后价值

Fig.4 Prognostic value of PBK expression across 33 cancer types. **A:** Forest plot analysis of overall survival (OS) showing the prognostic value of PBK across various cancers. **B:** Forest plot analysis of disease-free survival (DFS) highlighting the potential impact of PBK in pancreatic cancer. **C:** Analysis of disease-specific survival (DSS) showing the ability of PBK for predicting disease-specific mortality. **D:** Progression-free survival (PFS) analysis further supports the role of PBK as a prognostic indicator.

采用CIBERSORT算法评估PBK与22种免疫细胞类型的关系,结果表明:不同癌症的免疫细胞浸润模式存在差异(图9A)。即使在单一癌症类型中,例如PAAD, PBK与免疫细胞的相关性在不同的数据集(TCGA-PAAD、GSE15471、GSE16515和GSE62165)中也有所不同(图9B)。进一步分析显示PBK与24种免疫检查点分子之间存在显著关联,其模式因癌症而异(图9C)。此外, PBK与多个MHC分子呈正相关,而趋化因子及其受体则相反(图9D~F)。

2.6 PBK表达与药物敏感性的相关性

癌症治疗反应门户网站(CTRP)数据集的分析显示: PBK表达与药物敏感性相关, PBK表达升高与阿法替尼(EGFR抑制剂)的敏感性呈正相关;相反,

PBK过表达与氯硝柳胺的敏感性呈负相关(图10A)。GDSC数据集分析结果发现: PBK表达与药物反应之间存在明显关联,高PBK表达与曲美替尼(MEK抑制剂)的敏感性呈正相关,但对TW37(Bcl-2抑制剂)的敏感性呈负相关(图10B)。PBK与包括吉西他滨在内的常规化疗药物关系的评估结果表明, PBK表达升高的患者通常对吉西他滨和其他化疗药物的反应较差(图10C、D)。

2.7 shPBK通过NCAPG2抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

Western blotting结果显示, PBK敲低降低了潜在靶基因NCAPG2的表达(图11A)。免疫共沉淀实验揭示了PBK和NCAPG2之间的直接相互作用(图11B)。CCK-8实验表明,沉默PBK表达可降低胰腺癌细胞的增殖

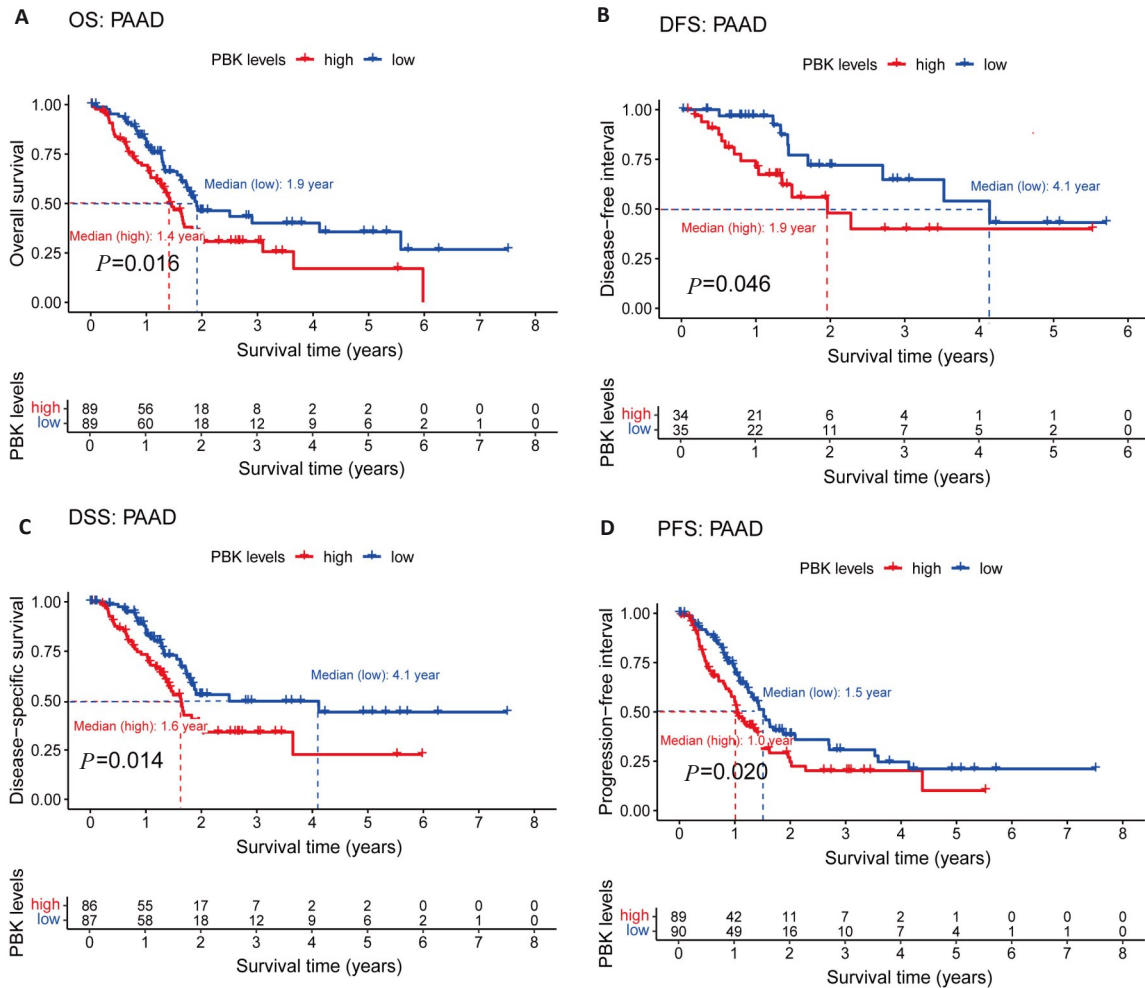


图5 PBK在胰腺癌中的表达与预后

Fig.5 PBK expression and its association with prognosis in pancreatic cancer. **A:** Kaplan-Meier survival curves show a significant association between high PBK expression and decreased OS. **B:** DFS survival curve validates the influence of PBK on disease-free survival. **C:** DSS survival curve highlights the relationship between high PBK expression and lower disease-specific survival. **D:** PFS survival curve reveals the connection between PBK expression and progression-free survival.

能力(图 11C)。Transwell实验结果表明,PBK敲低损害了胰腺癌细胞穿透细胞外基质的能力(图 11D);细胞克隆实验也证实,敲低PBK后细胞的克隆能力减弱($P<0.05$,图 11E)。

3 讨论

胰腺癌是一种高度恶性、预后差的消化系统肿瘤,其特点是早期诊断困难、治疗方案有限、患者预后差^[13,14]。流行病学数据显示,胰腺癌的5年生存率低于10%,是全球癌症相关死亡的主要原因之一^[15,16]。尽管近年来在手术、放疗和化疗方面取得了一些进展,但胰腺癌的侵袭性和耐药性意味着大多数患者被诊断为晚期,缺乏有效的治疗选择^[17]。此外,分子靶向治疗和免疫治疗的应用尚未显著提高胰腺癌患者的生存率^[18]。因此,更深入地探索胰腺癌发生和发展的分子机制,以及确定新的诊断和治疗靶点,仍然是一个主要的研究挑战。本研究重点探讨PBK在胰腺癌中的作用及机制,旨在揭示其关

键作用,为制定新的靶向治疗策略提供理论依据。

PBK是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,已被证明在多种癌症中过表达,并与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关^[19]。本研究显示,PBK在包括PAAD在内的几乎所有癌症类型中都高表达,说明PBK作为癌症相关标志物的潜在价值;进一步临床样本和胰腺癌细胞系中PBK mRNA和蛋白水平的表达均升高。这些发现证实了数据库的分析,并为PBK在胰腺癌中的高表达提供了强有力的实验证据。Kaplan-Meier生存分析和Cox回归模型进一步证实了PBK作为独立预后指标的价值。此外,PBK高表达与DFS和PFS呈负相关,这表明PBK高表达的患者预后较差,进一步强调了PBK在胰腺癌治疗中的潜在作用。PBK在1、3、5年预测中具有较高的AUC值,突出了其诊断胰腺癌预后的有效性和临床可行性。GO结果表明PBK及相关基因参与关键的生物学过程,如染色体稳定性、DNA修复和线粒体功能,KEGG通路分析揭示PBK可能通过调节细胞周期、

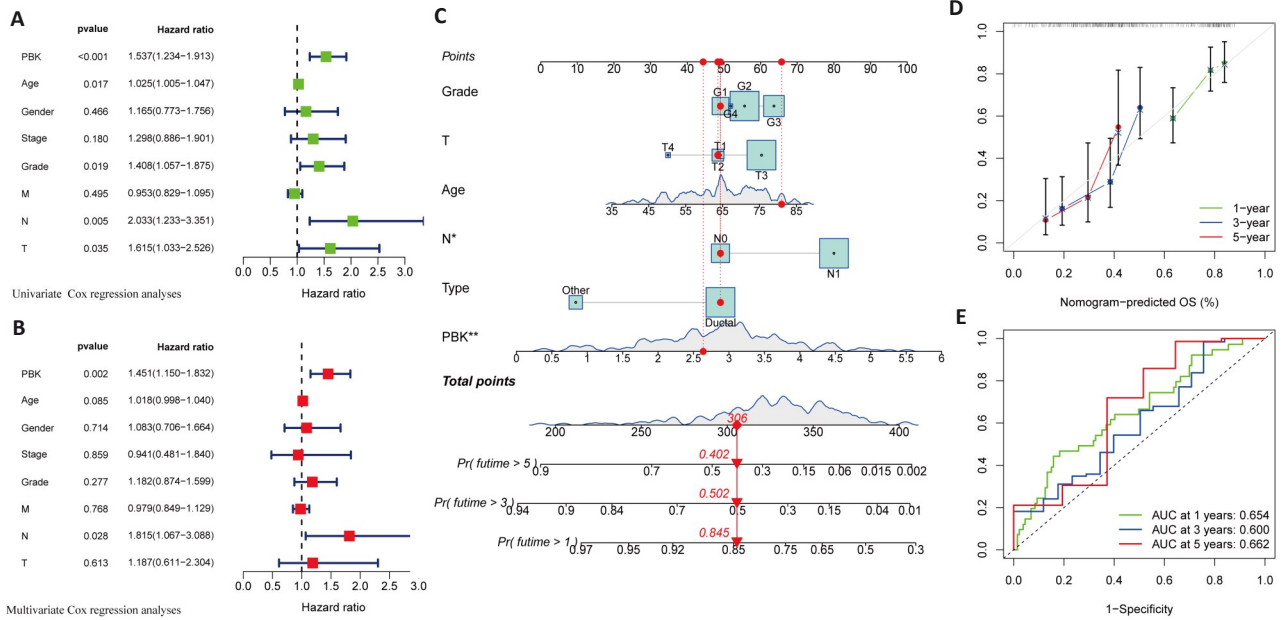


图6 胰腺癌中PBK高表达与预后的单因素及多因素分析

Fig. 6 Univariate and multivariate analysis of the association of high PBK expression with prognosis of pancreatic cancer. **A:** Univariate analysis reveals significant association of PBK with clinicopathological factors of pancreatic cancer. **B:** Multivariate analysis validates PBK as an independent prognostic factor after adjusting for other clinical variables. **C:** A nomogram model for predicting survival probabilities of pancreatic cancer patients based on PBK expression. **D:** Calibration plot confirms the prediction accuracy of the nomogram model. **E:** ROC curves for 1-, 3-, and 5-year survival showing the predictive performance of PBK. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

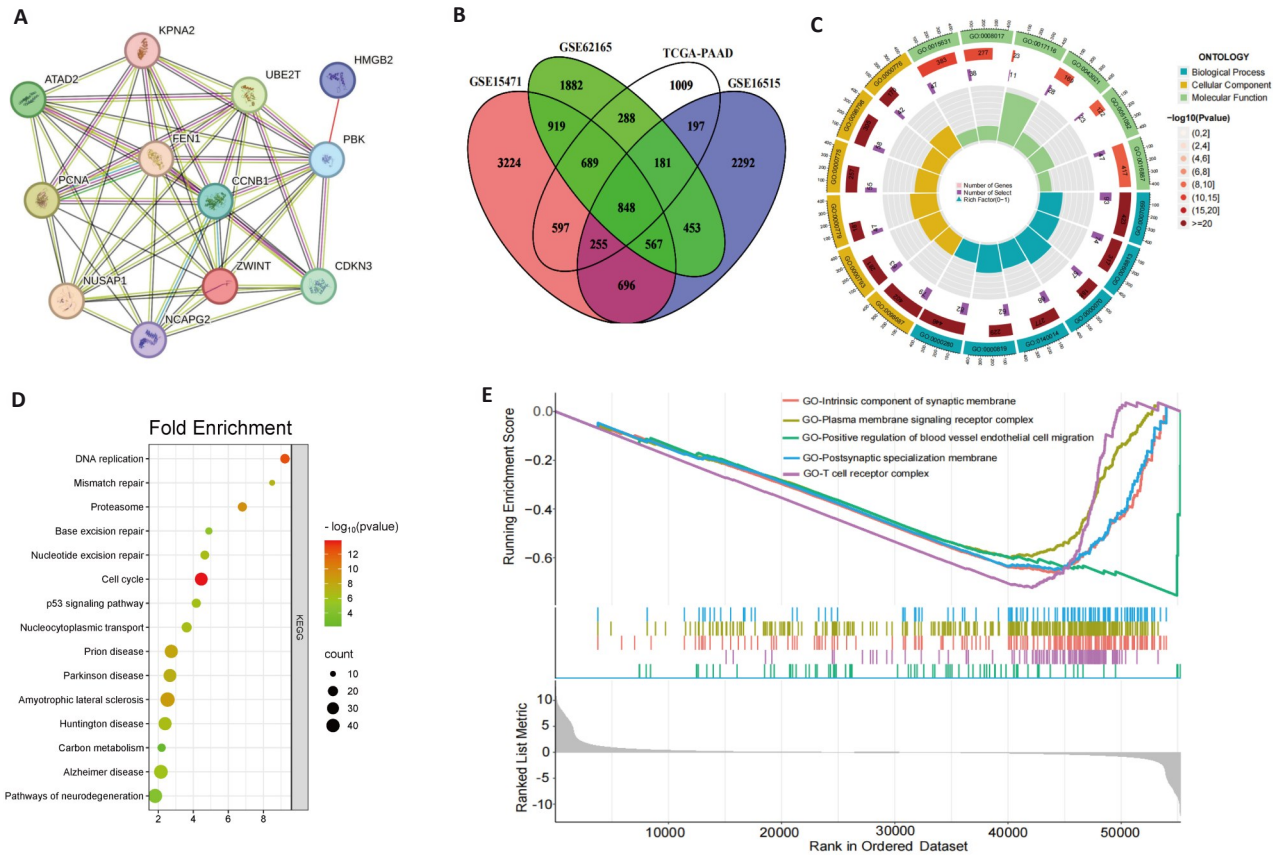


图7 基因相关及富集分析

Fig. 7 Gene correlation and enrichment analysis. **A:** Correlation analysis of PBK with 11 co-expressed genes across 33 cancer types. **B:** Intersection of PBK-related genes in pancreatic cancer, revealing key associated genes. **C:** GO analysis showing that PBK co-expressed genes are enriched in immune and cell cycle-related biological processes. **D:** KEGG pathway analysis shows that PBK is involved in cancer-related signaling pathways. **E:** GSEA analysis validates PBK-associated gene enrichment in immune regulation and tumor-related pathways.

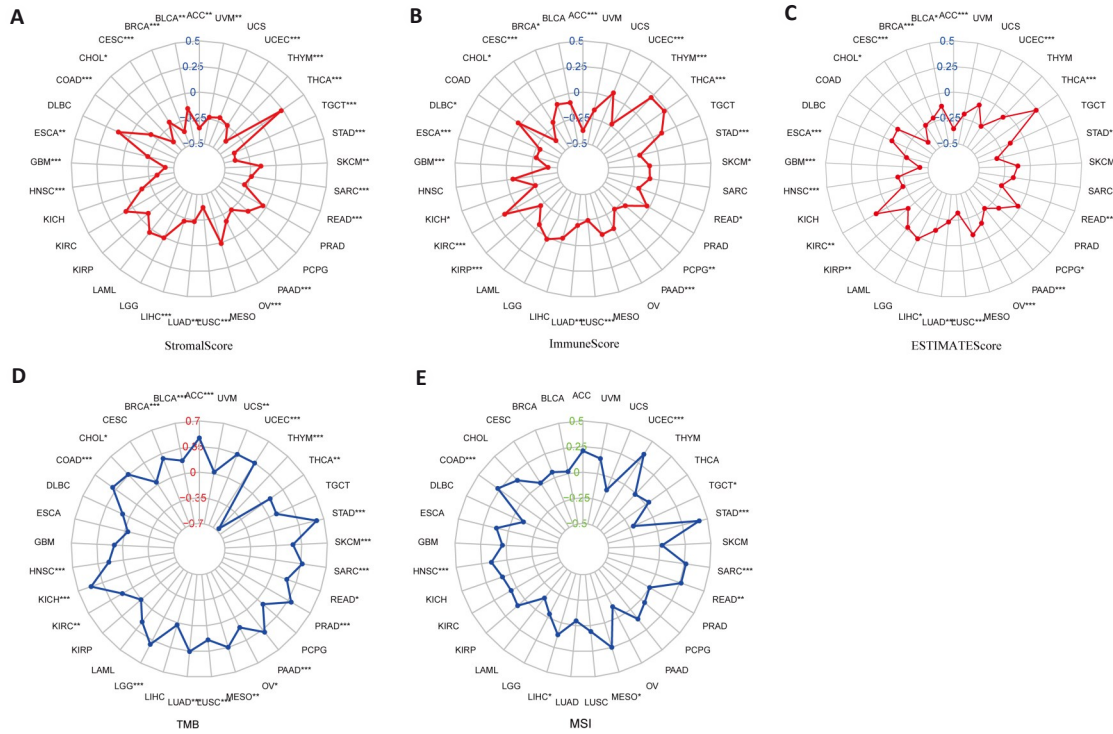


图8 PBK表达与肿瘤微环境分析

Fig.8 PBK expression and tumor microenvironment analysis. **A:** Stromal Score analysis shows a correlation between PBK expression and tumor stromal content. **B:** Immune Score analysis indicates that PBK expression is associated with tumor immune infiltration. **C:** ESTIMATE Score analysis validates the role of PBK in the tumor microenvironment. **D:** Correlation between PBK expression and tumor mutation burden (TMB). **E:** Correlation between PBK expression and microsatellite instability (MSI), suggesting its potential immune regulatory mechanisms. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

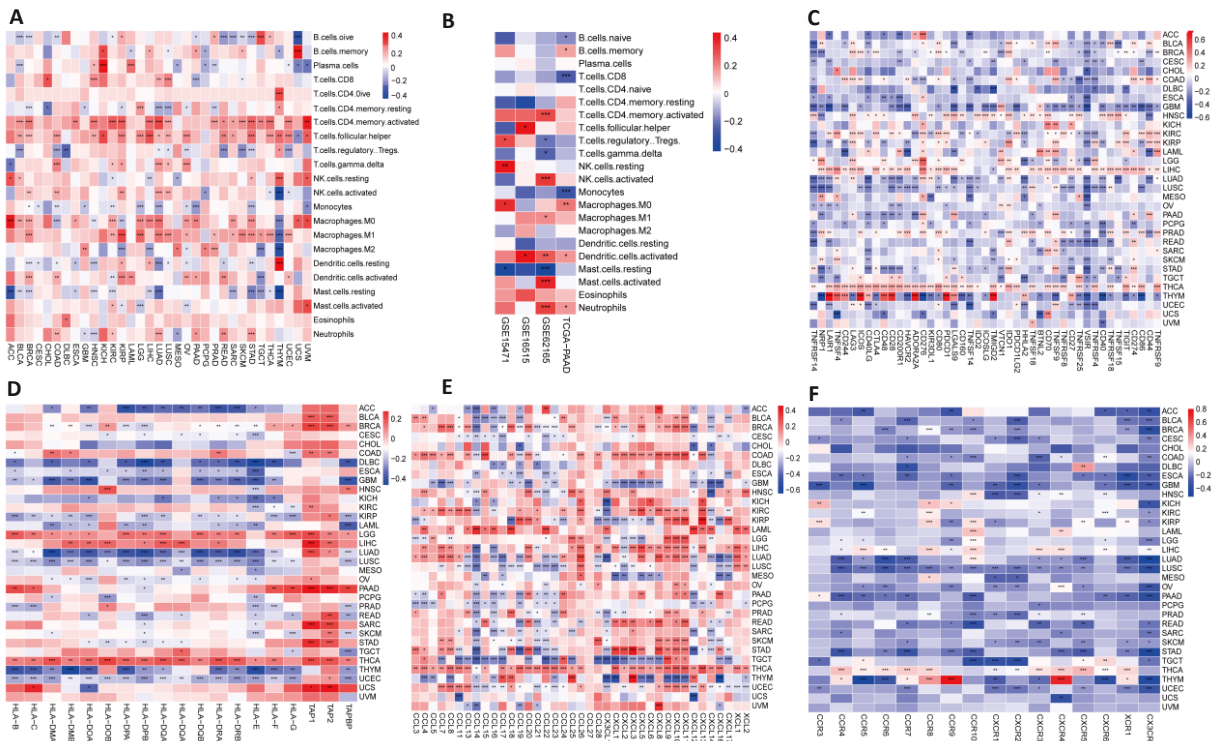


图9 PBK表达与免疫系统的关系

Fig.9 Relationship between PBK expression and immune system. **A:** Analysis of PBK expression and immune infiltration across 33 cancer types. **B:** Immune infiltration analysis of PBK in the pancreatic cancer immune microenvironment based on combined TCGA and GEO data. **C:** Correlation analysis of PBK expression with immune checkpoint molecules in 33 cancer types. **D-F:** Complex associations of PBK expression with MHC molecules (D), chemokines (E), and their receptors (F), suggesting its involvement in immune regulatory networks. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

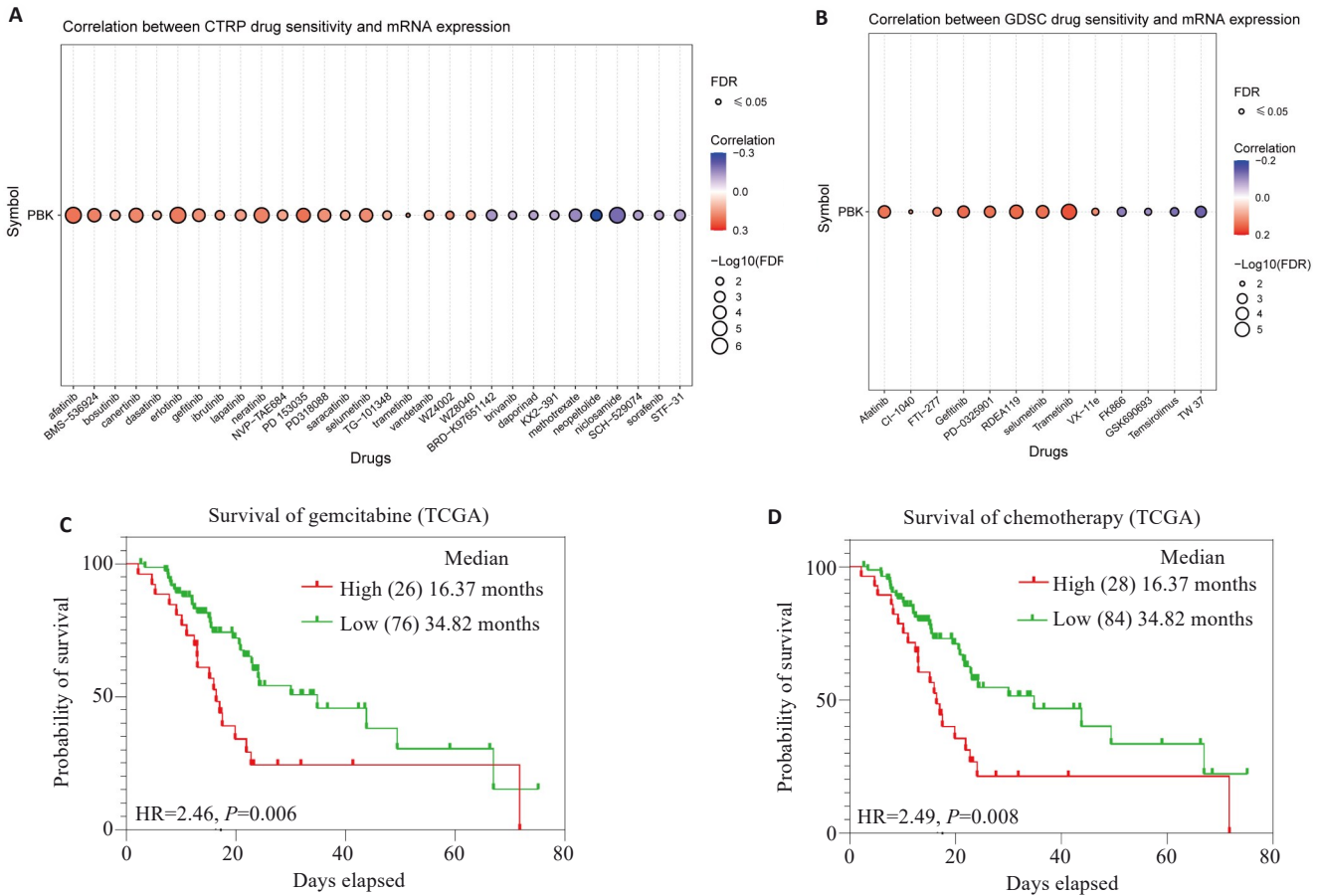


图 10 PBK 表达及药敏分析

Fig. 10 PBK expression and drug sensitivity analysis. **A**: Analysis from the CTRPC database shows that PBK mRNA expression affects drug sensitivity. **B**: Analysis from the GDSC database shows that PBK mRNA expression affects drug sensitivity. **C**: High PBK expression predicts poor response to gemcitabine treatment. **D**: High PBK expression is associated with chemotherapeutic drug resistance, indicating its potential as a drug target.

DNA 复制、错配修复和 p53 信号通路参与肿瘤发生。GSEA 表明, PBK 可能在 T 细胞受体复合体中发挥重要作用。

前期文献表明, PBK 作为一种新的生物标志物, 在与免疫浸润和甲基化相关的 HCC 中具有良好的诊断和预后价值^[20]。PBK 与乳腺癌中的免疫浸润有关, 提示乳腺癌免疫治疗研究的新途径^[21]。此外, PBK 抑制剂 HI-TOPK-032 通过上调记忆 T 细胞来增强肝细胞癌的 CART 细胞治疗^[22]; 另外, 前期生信分析发现: PBK 可能在大多数实体瘤中发挥致癌作用并促进免疫逃逸^[10]。为了进一步阐明 PBK 在泛癌免疫中的潜在作用, 本研究分析了 PBK 与 TME-StromalScore、ImmuneScore 和 EstimateScore 以及 TMB、MSI、免疫细胞和免疫相关分子的关系。结果表明, PBK 可能影响基因组的不稳定性和突变特征, 以及影响不同癌症类型对免疫治疗的敏感性。PBK 在免疫细胞调节中的作用可能受到肿瘤特异性或微环境因素的影响。对于 PBK 与免疫评分 (Stromal/ImmuneScore) 的相关性在不同癌种中方向不一致, 例如 PAAD 呈负相关而 THCA 呈正相关, 原因可

能是 PBK 在免疫细胞调节中的作用受到肿瘤特异性或微环境因素的影响。PAAD 的特征是肿瘤微环境中的深度免疫抑制, 可能会限制免疫疗法的效果^[23]。而在 THCA 中可能通过上调 DPP4 的表达, 促进 IL-13 的分泌和 CD8⁺ T 细胞的耗竭, 促进癌症的发生^[24]。进一步分析显示 PBK 与 24 种免疫检查点分子之间存在显著关联。此外, PBK 与多个 MHC 分子呈正相关, 而趋化因子及其受体则相反。这些发现表明, PBK 可能通过调节细胞因子网络和抗原递呈途径在肿瘤免疫中发挥广泛的调节作用。这些结果为探索 PBK 在免疫逃避和免疫治疗中的潜力提供了基础。

在耐药性方面, 课题组既往研究表明: PBK 通过降低 DNA 损伤反应增强结肠直肠癌细胞对放射治疗的敏感性^[25]。对胰腺癌的药物敏感性分析表明, PBK 高表达可能降低胰腺癌细胞对吉西他滨等化疗药物的敏感性, 可能影响治疗效果。因此, PBK 不仅可以作为重要的预后和诊断生物标志物, 还可以作为耐药的预测因子和潜在的治疗靶点。这一发现为胰腺癌精准治疗提供了新的途径。

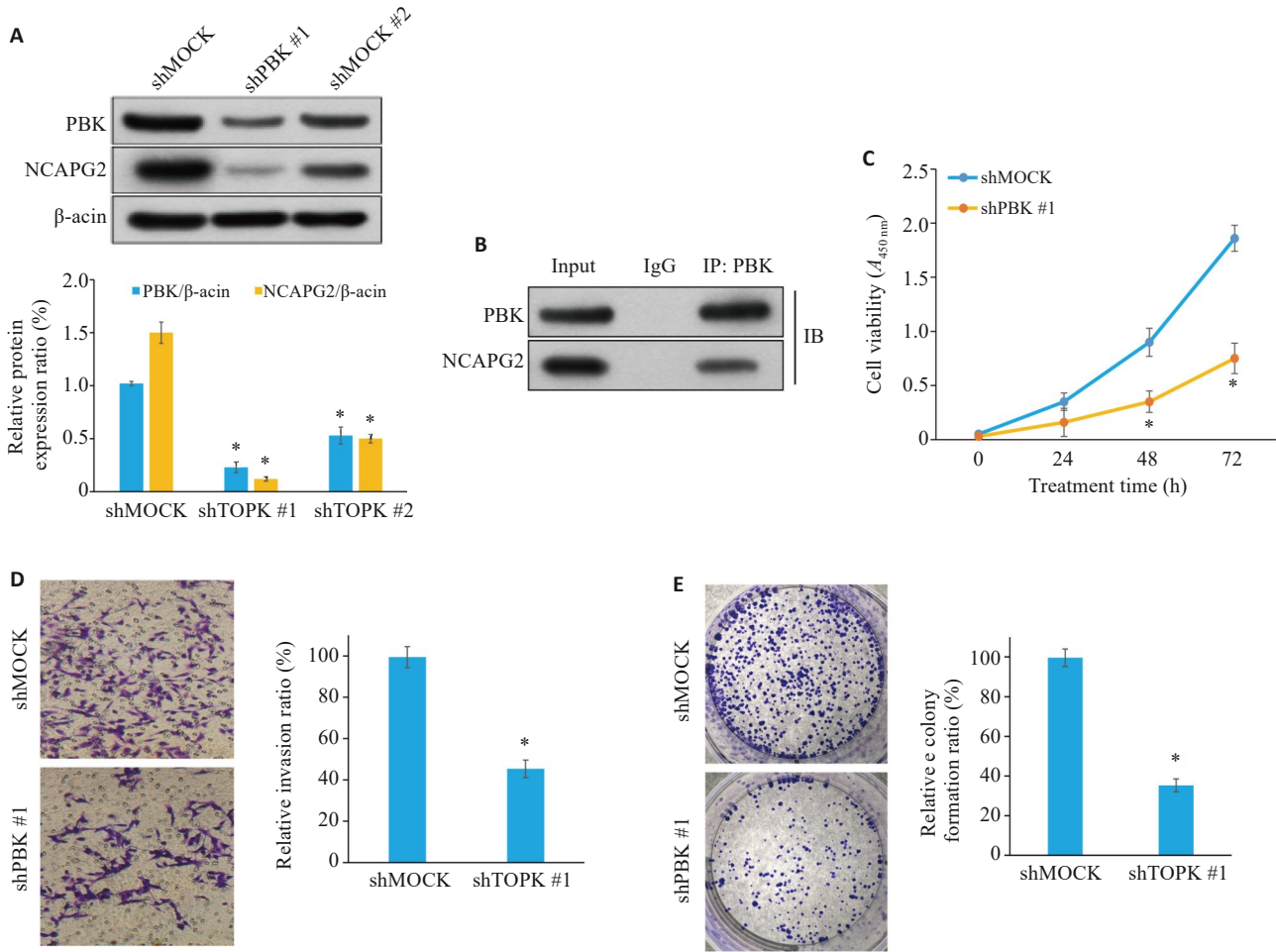


图 11 PBK 敲低抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

Fig. 11 PBK knockdown inhibits proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells. **A:** Western blotting showing efficient knockdown of PBK expression. **B:** Co-immunoprecipitation experiment shows that PBK directly interacts with NCAPG2, suggesting that the PBK-NCAPG2 axis plays a role in tumor progression. **C:** CCK-8 assay shows that PBK knockdown significantly inhibits cell proliferation. **D:** Transwell assay validating suppressed invasion ability of pancreatic cancer cells after PBK knockdown (Original magnification: $\times 200$). **E:** Effect of shPBK on clone formation ability of pancreatic cancer cells. * $P < 0.05$ vs shMock.

非SMC凝聚素II复合亚基G2(NCAPG2)是细胞分裂和染色体重组的关键调控因子^[26, 27]。已有研究表明,NCAPG2在多种癌症中过表达,促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭^[28-32]。本研究发现PBK可能通过直接调节NCAPG2的表达和活性来影响胰腺癌的进展。干扰PBK表达可降低NCAPG2水平,并抑制细胞增殖。免疫共沉淀实验进一步证实PBK直接与NCAPG2相互作用,提示PBK-NCAPG2轴可能通过调节染色体重组、DNA损伤修复和细胞周期控制等过程驱动肿瘤发展。这一机制为PBK作为胰腺癌治疗靶点提供了新的理论支持,并突出了PBK-NCAPG2轴作为靶向干预的潜在关键节点。

综上所述,PBK在调节胰腺癌进展中起着关键作用,不仅可以作为潜在的预后和诊断生物标志物,还可以作为免疫治疗和靶向治疗的新靶点。未来的研究应进一步验证PBK-NCAPG2轴在胰腺癌中的作用,并探

索靶向PBK或NCAPG2的分子抑制剂,以开发更有效的个性化治疗策略。通过深入研究PBK的功能和机制,可能会发现胰腺癌早期诊断和治疗的新解决方案,最终提高患者的生存率。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Mei QJ, Li KX, Tang TY, et al. miR-203-3p promotes senescence of mouse bone marrow mesenchymal stem cells *via* downregulation of Pbk[J]. *Aging Cell*, 2024, 23(11): e14293.
- [2] Han ZP, Li LZ, Huang YY, et al. PBK/TOPK: a therapeutic target worthy of attention[J]. *Cells*, 2021, 10(2): 371.
- [3] Lee DH, Jeong YJ, Won JY, et al. PBK/TOPK is a favorable prognostic biomarker correlated with antitumor immunity in colon cancers[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 299.
- [4] Herbert KJ, Ashton TM, Prevo R, et al. T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK): an emerging target for cancer-specific

- therapeutics[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1089.
- [5] Deng MQ, Yang RY, Sun Q, et al. Small-molecule inhibitor HI-TOPK-032 improves NK-92MI cell infiltration into ovarian tumours[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2024, 134(5): 629-42.
- [6] Huang H, Lee MH, Liu KD, et al. PBK/TOPK: an effective drug target with diverse therapeutic potential[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2232.
- [7] Niu NN, Shen XQ, Wang Z, et al. Tumor cell-intrinsic epigenetic dysregulation shapes cancer-associated fibroblasts heterogeneity to metabolically support pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(5): 869-84. e9.
- [8] Li PY, Zhang HY, Gao XY, et al. Difference in fecal and oral microbiota between pancreatic cancer and benign/low-grade malignant tumor patients[J]. *BMC Microbiol*, 2024, 24(1): 527.
- [9] De Santis MC, Bockorny B, Hirsch E, et al. Exploiting pancreatic cancer metabolism: challenges and opportunities[J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(6): 592-604.
- [10] Feng TT, Zhang Y, Ling SB, et al. PDZ binding kinase/T-LAK cell-derived protein kinase plays an oncogenic role and promotes immune escape in human tumors[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 8892479.
- [11] Fan XM, Tao JY, Cai Z, et al. Eupafolin suppresses esophagus cancer growth by targeting T-LAK cell-originated protein kinase[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1248.
- [12] Lu H, Huang YZ, Ni XF, et al. TOPK promotes the development of psoriasis and worenine alleviates psoriasiform dermatitis by inhibiting TOPK activity[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2024, 38(5): 851-63.
- [13] Brozos-Vázquez E, Toledano-Fonseca M, Costa-Fraga N, et al. Pancreatic cancer biomarkers: a pathway to advance in personalized treatment selection[J]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 125: 102719.
- [14] Praticò F, Garajová I. Focus on pancreatic cancer microenvironment[J]. *Curr Oncol*, 2024, 31(8): 4241-60.
- [15] McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, et al. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846-61.
- [16] Cai J, Chen HD, Lu M, et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 520: 1-11.
- [17] Nguyen N, Hoang TM, Huang T, et al. Macrophage-hitchhiked, effervescence-induced nanoemulsions for enhanced oral chemotherapy and immunotherapy: Impact on absorption route[J]. *Biomaterials*, 2025, 316: 123019.
- [18] Morrison AH, Byrne KT, Vonderheide RH. Immunotherapy and prevention of pancreatic cancer[J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(6): 418-28.
- [19] Feng TT, Jiang RB, Yin L, et al. PDZ-binding kinase aggravates pancreatic neuroendocrine neoplasm progression by activating the AKT/mTOR pathway[J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(5): 716-26.
- [20] Lv BB, Zhang FN, Zhang XY, et al. PBK as a novel biomarker performed excellent diagnostic and prognostic value in HCC associated with immune infiltration and methylation[J]. *J Mol Histol*, 2025, 56(2): 129.
- [21] Li BX, Yao TZ, Zhang M, et al. Correlation study of PBK/TOPK expression, prognosis, and immune infiltration in breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 15052.
- [22] Zhang QF, Zheng F, Chen YC, et al. The TOPK inhibitor HI-TOPK-032 enhances CAR T-cell therapy of hepatocellular carcinoma by upregulating memory T cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2024, 12(5): 631-43.
- [23] Song WH, Yu YB, Wang SQ, et al. Metabolic reprogramming shapes the immune microenvironment in pancreatic adenocarcinoma: prognostic implications and therapeutic targets[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1555287.
- [24] Jing R, Wu N, Zhang Q, et al. DPP4 promotes an immunoenhancing tumor microenvironment through exhausted CD8⁺ T cells with activating IL13-IL13RA2 axis in papillary thyroid cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 145: 113760.
- [25] Pang SG, Zhang X, Li ZX, et al. TOPK inhibition enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to radiotherapy by reducing the DNA damage response[J]. *Curr Med Sci*, 2024, 44(3): 545-53.
- [26] Wang Q, Li ZZ, Zhou SJ, et al. NCAPG2 could be an immunological and prognostic biomarker: From pan-cancer analysis to pancreatic cancer validation[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1097403.
- [27] Mi XH, Shan HF, Kang CB, et al. MYC and NCAPG2 as molecular targets of colorectal cancer and gastric cancer in nursing[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(18): e38029.
- [28] Zhang EC, Chen ZJ, Liu WM, et al. NCAPG2 promotes prostate cancer malignancy and stemness via STAT3/c-MYC signaling[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 12.
- [29] Feng Z, Zhang LF, Liu YX, et al. NCAPG2 contributes to the progression of malignant melanoma through regulating proliferation and metastasis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(6): 473-84.
- [30] Ren WJ, Yang S, Chen X, et al. NCAPG2 is a novel prognostic biomarker and promotes cancer stem cell maintenance in low-grade glioma[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 918606.
- [31] Jiang SY, Huang JJ, He H, et al. NCAPG2 maintains cancer stemness and promotes erlotinib resistance in lung adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(18): 4395.
- [32] Meng FZ, Zhang SG, Song RP, et al. NCAPG2 overexpression promotes hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis through activating the STAT3 and NF- κ B/miR-188-3p pathways[J]. *EBioMedicine*, 2019, 44: 237-49.

(编辑:郎 朗)