基于TCGA、CPTAC、GEO数据库生物信息学分析RCN2在胰腺导管腺癌肿瘤微环境中的作用及表达验证

陶善春[1]，崔 迪[2] [1.阜阳师范大学附属第二医院(阜阳市第五人民医院)输血科，安徽阜阳 236000；2.阜阳师范大学阜阳医学院，安徽阜阳 236037]

摘 要：目的 基于TCGA、CPTAC及GEO数据库的多组学数据信息，系统分析Reticulocalbin-2(RCN2)在胰腺导管腺癌(PDAC)中的表达特征、预后价值及其在肿瘤微环境中的潜在作用，并进行临床样本及体外实验验证。**方法** 整合TCGA、CPTAC及GEO数据库的转录组、蛋白组及临床数据，分析RCN2在PDAC中的表达差异及其与患者生存结局和治疗反应的关系。结合空间转录组及单细胞转录组数据，解析RCN2的空间分布及细胞类型特异性表达特征，并基于CellChat方法评估RCN2阳性成纤维细胞的细胞通讯特征。收集2020~2024年阜阳师范大学附属第二医院经病理确诊的8对PDAC组织及其对应癌旁正常组织，采用实时荧光定量PCR、Western blot及免疫组化检测RCN2的表达水平。此外，在PANC1细胞中采用siRNA敲低RCN2，检测其对细胞增殖、克隆及迁移能力的影响。**结果** RCN2在PDAC肿瘤组织中表达显著高于正常组织。高RCN2表达与总体生存期、疾病特异性生存期及无进展间期缩短显著相关，并与免疫治疗应答差异相关。空间转录组及单细胞分析显示，RCN2在肿瘤恶性区域显著富集，主要表达于肿瘤细胞及成纤维细胞。细胞通讯分析表明，RCN2阳性成纤维细胞与肿瘤细胞之间的通讯显著增强。临床样本验证结果显示，qRT-PCR、Western blot及免疫组化分析均证实RCN2在PDAC肿瘤组织中显著高于癌旁正常组织(t=2.951、2.992、2.656，均P<0.05)。功能实验结果表明，敲低RCN2可显著抑制PANC1细胞的增殖、克隆及迁移能力(Si1：t=6.325、4.982、6.415；Si2：t=4.411、6.208、6.394，均P<0.05)。**结论** RCN2在PDAC中显著高表达，与不良预后及治疗反应密切相关，可能通过调控肿瘤相关成纤维细胞介导的细胞通讯参与肿瘤微环境重塑。

关键词：胰腺导管腺癌；RCN2；肿瘤微环境；肿瘤相关成纤维细胞
中图分类号：R735.9；R730.4 **文献标志码：**A **文章编号：**1671-7414(2026)05-134-09
doi:10.3969/**j.issn.**1671-7414.2026.05.023

Bioinformatics Analysis of RCN2 in the Tumor Microenvironment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on TCGA, CPTAC, and GEO Databases with Expression Validation

TAO Shanchun[1], CUI Di[2] [1. *Department of Blood Transfusion, the Second Affiliated Hospital of Fuyang Normal University* (*Fuyang Fifth People's Hospital*), *Anhui Fuyang* 236000, *China*; 2. *Fuyang Medical School, Fuyang Normal University*, *Anhui Fuyang* 236037, *China*]

Abstract: Objective To systematically investigate the expression pattern, prognostic value, and potential role of Reticulocalbin-2 (RCN2) in the tumor microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) based on multi-omics data from TCGA, CPTAC, and GEO databases, and to validate the findings using clinical samples and in vitro experiments. **Methods** Transcriptomic, proteomic, and clinical data from TCGA, CPTAC, and GEO databases were integrated to analyze the differential expression of RCN2 in PDAC and its associations with survival outcomes and therapeutic response. Spatial transcriptomic and single-cell RNA sequencing datasets were used to characterize the spatial distribution and cell type-specific expression of RCN2. Cell-cell communication patterns of RCN2-positive fibroblasts were evaluated using CellChat analysis. Eight paired PDAC tumor tissues and adjacent normal tissues collected between 2020 and 2024 were analyzed by qRT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry to validate RCN2 expression. In addition, siRNA-mediated knockdown of RCN2 in PANC1 cells was performed to assess its effects on cell proliferation, colony formation, and migration. **Results** RCN2 expression was significantly higher in PDAC tissues than in normal tissues. Elevated RCN2 expression was significantly associated with shorter overall survival, disease-specific survival, and progression-free interval, and correlated with differences in immunotherapy response. Spatial and single-cell analyses showed that RCN2 was enriched in malignant regions and predominantly expressed in tumor cells and fibroblasts. Cell-cell communication analysis indicated significantly enhanced interactions between RCN2-positive fibroblasts

作者简介：陶善春(1979−)，男，学士，副主任技师、兼职教授，研究方向：临床输学技术、血型分子生物学，E-mail：13335581881@189.cn。
通讯作者：崔迪(1990−)，男，硕士，主管检验师、讲师，研究方向：肿瘤分子生物学，E-mail：202207005@fynu.edu.cn。

and tumor cells. Validation in clinical samples confirmed that RCN2 expression was significantly higher in PDAC tissues than in adjacent normal tissues as determined by qRT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry (t=2.951, 2.992, and 2.656, respectively; all P< 0.05). Functional assays demonstrated that RCN2 knockdown significantly inhibited proliferation, colony formation, and migration of PANC1 cells (Si1:t=6.325, 4.982, 6.415; Si2:t=4.411, 6.208, 6.394; all P < 0.05). **Conclusions** RCN2 is significantly upregulated in PDAC and is closely associated with poor prognosis and therapeutic response. It may participate in tumor microenvironment remodeling by regulating fibroblast-mediated intercellular communication. RCN2 may serve as a potential prognostic biomarker and therapeutic target for PDAC.

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma; Reciculocalbin 2; tumor microenvironment; cancer-associated fibroblasts

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是消化系统恶性程度最高的肿瘤之一，具有起病隐匿、侵袭性强、易转移及治疗耐受性高等特点，其5年生存率长期低于10%，严重影响患者的生存质量[1-2]。尽管近年来手术、化疗及免疫治疗等手段不断发展，但总体疗效改善有限[3]，提示仅从肿瘤细胞自身出发难以充分阐释PDAC的高度恶性生物学行为[4]。越来越多研究表明，PDAC的发生发展不仅依赖肿瘤细胞的遗传异常，还与高度复杂的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)密切相关[5]。显著的基质反应是PDAC最核心的组织学特征之一，其中肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)及其分泌的大量细胞外基质构成致密的肿瘤间质屏障[6]。CAFs不仅限制药物和免疫细胞渗透，还可通过分泌多种细胞因子和生长因子，与肿瘤细胞、免疫细胞形成复杂的相互作用网络，进而促进肿瘤进展及免疫逃逸[7-9]。因此，解析CAFs的分子特征及其在PDAC微环境中的功能，对深入阐明PDAC恶性进展机制具有重要意义。

Reticulocalbin 2(RCN2)是定位于内质网腔内的钙结合蛋白，属于CREC蛋白家族，参与钙稳态调控、蛋白折叠及内质网应激反应等生理过程[10]。近年来研究发现，RCN2在肝细胞癌、结直肠癌及食管鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤中异常高表达，且与肿瘤细胞增殖、侵袭转移、耐药性及不良预后密切相关[11-14]。然而，RCN2在PDAC中的表达特征、肿瘤微环境中的细胞来源及潜在功能尚缺乏系统研究，其是否参与CAFs介导的细胞通讯及免疫调控仍不明确。单细胞转录组和空间转录组技术为解析肿瘤组织中不同细胞类型的异质性及空间分布提供了新手段[15-16]。基于此，本研究整合TCGA、CPTAC及GEO等公共数据库信息，结合空间转录组、单细胞转录组、细胞通讯分析及临床样本的分子与组织学验证，系统探讨RCN2在PDAC中的表达特征、临床预后价值及肿瘤微环境调控作用，为PDAC的预后评估及靶向治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 *研究对象* 收集阜阳师范大学附属第二医院2020年~2024年8对经病理确诊的PDAC组织及其配对癌旁正常组织。所有样本手术切除后均分为2份：1份置于液氮中保存，用于RNA及蛋白提取；另1份经多聚甲醛固定，用于免疫组化检测。所有样本均经临床及病理确诊为PDAC，研究已获得患者知情同意，并经阜阳师范大学附属第二医院伦理委员会批准(批号20261002)。胰腺癌细胞系PANC1购自赛维尔公司，采用含10%(v/v)胎牛血清、100IU/ml青霉素及100 μg/ml链霉素的DMEM培养基，于37℃、5%(v/v)CO_2恒温孵箱中常规培养。

1.2 *仪器与试剂* PANC1细胞、PrimeScript™ RT试剂盒、SYBR Green qPCR试剂盒、凝胶成像系统(武汉赛维尔公司)，TRIzol RNA提取试剂(美国Invitrogen公司)，Lipo 8000转染试剂、BCA蛋白浓度检测试剂盒、RIPA蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、ECL化学发光检测试剂盒及DAB显色试剂盒(上海碧云天公司)，RCN2抗体、GAPDH抗体、α-SMA抗体及HRP标记二抗、FITC/Cy3标记荧光二抗(武汉三鹰公司)，PVDF膜及SDS-PAGE凝胶制备试剂(美国Millipore公司)；NanoDrop 2000超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)，实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)，荧光显微镜和普通光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 *方法*

1.3.1 公共数据库获取：从TCGA数据库及GTEx数据库获取PDAC转录组数据(RNA-seq)及对应临床信息，进行统一标准化处理；基因表达量以TPM(Transcripts Per Million)格式表示，并统一转换为$\log_2$(TPM+1)用于后续分析。利用CPTAC数据库中的PDAC蛋白组数据，评估RCN2在蛋白水平的表达差异；以GEO数据库中GSE62452数据集作为外部验证队列。PDAC空间转录组数据来源于GEO数据库(GSE203612，样本编号GSM6177618)，单细胞转录组数据来源于GEO数据库(GSE165399)。

1.3.2 空间转录组分析：采用R软件对空间转录组原始数据进行处理分析。首先进行质量控制，剔除检测基因数过低或线粒体基因比例过高的低质量spot；随后对表达矩阵进行归一化及log标准化转换，采

用Cottrazm包解析肿瘤组织中连接恶性区域与非恶性区域的边界区域，将切片中spot划分为恶性区域(malignant)、混合区域(mixed)及正常区域(normal)，比较不同空间区域中RCN2的平均表达水平。基于已知细胞标志基因进行细胞类型注释，主要包括肿瘤细胞、成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞及多种免疫细胞($CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、NK细胞、B细胞、浆细胞、树突状细胞)。

1.3.3 单细胞转录组解析：采用R软件对GSE165399单细胞转录组原始数据进行标准流程分析。先进行质量控制，过滤检测基因数过低或线粒体基因比例过高的低质量细胞；对筛选后的数据进行归一化、尺度化处理，通过主成分分析(PCA)降维，选取显著主成分用于UMAP降维可视化。基于已知细胞类型特异性标志基因对细胞簇进行注释，明确各细胞亚群的生物学属性。通过UMAP投影及分组比较，评估RCN2在不同细胞类型中的表达分布；采用非参数检验分析不同细胞类型中RCN2平均表达水平的差异。根据RCN2表达情况将细胞分为RCN2阳性与阴性细胞，比较不同细胞类型中两类细胞的比例分布。

1.3.4 细胞通讯分析：采用CellChat包对处理后的单细胞数据进行细胞通讯分析，通过解析细胞中已知配体-受体对的表达模式，预测不同细胞类型间的潜在通讯信号。利用ggplot2包对生成的细胞通讯网络进行可视化，以节点代表细胞类型，以边的粗细表示通讯信号强度。

1.3.5 生存分析：从TCGA数据库中提取经统一整理及质量控制的患者总体生存(overall survival，OS)、疾病特异性生存(disease-specific survival，DSS)及无进展间期(progression-free interval，PFI)等临床结局指标。依据TCGA-PDAC队列中RCN2的中位表达水平，将患者分为RCN2高表达组与低表达组；采用Kaplan-Meier法估计不同表达组患者的生存结局，通过Log-rank检验比较组间生存差异。构建单因素Cox比例风险回归模型，计算风险比(hazard ratio，HR)及其95%CI，评估RCN2表达水平与患者生存结局的相关性。

1.3.6 免疫治疗反应分析：基于TCGA-PDAC队列的转录组测序数据(RNA-seq，FPKM格式)及对应临床随访信息，采用计算预测方法评估肿瘤对免疫治疗的潜在反应。由于该队列缺乏接受免疫检查点抑制剂(ICI)治疗的真实临床响应数据，本研究通过计算肿瘤免疫功能障碍和排斥(Tumor Immune Dysfunction and Exclusion，TIDE)评分，预测肿瘤免疫逃逸状态及免疫治疗响应可能性[17]。根据实体瘤疗效评价标准，将患者分为完全缓解/反应(CR)、部分缓解/反应(PR)、疾病稳定(SD)及疾病进展(PD)四组，比较不同治疗反应组中RCN2的表达水平，评估其对治疗疗效的预测价值。

1.3.7 组织RNA提取和实时荧光定量PCR：组织样本经Trizol试剂匀浆处理后，通过氯仿分相、异丙醇沉淀和75%(v/v)乙醇洗涤提取总RNA，浓度通过NanoDrop光谱仪检测。提取的RNA进行逆转录合成cDNA，采用实时荧光定量PCR方法检测RCN2。qPCR反应体系为20μl，反应条件为95℃ 30s，95℃ 15s，60℃ 10s，72℃ 30s，循环40次。数据通过$\Delta\Delta Ct$法计算相对表达量，以内参基因GAPDH校正。RCN2引物为：5'-TGGACTCAGATGGCTTTCTCA-3' 和 5'-GACCTGAATCCTGGTTAGCTTTT-3'；GAPDH引物为：5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'和5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'(上海生工生物工程)。

1.3.8 Western blot实验：取液氮保存的肿瘤组织及配对癌旁组织，加入预冷RIPA裂解液并补加蛋白酶抑制剂，冰上充分匀浆裂解后，4℃、11 583r/min离心15min，取上清获得总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度，加入5×上样缓冲液后95℃变性5 min。样品经SDS-PAGE电泳分离后转膜至PVDF膜，以5g/dl脱脂奶粉室温封闭1h，加入一抗4℃孵育过夜；次日用TBST洗膜3次，加入HRP标记二抗室温孵1h，再次洗膜后采用ECL化学发光试剂显影，通过凝胶成像系统采集条带信号。采用ImageJ软件对条带灰度值进行定量分析，以RCN2/GAPDH灰度比值表示目标蛋白表达量，用于组间比较。

1.3.9 免疫组化染色：组织样本经多聚甲醛固定、石蜡包埋后，切成4μm厚切片；经二甲苯及梯度乙醇脱蜡、水化后，在柠檬酸钠缓冲液中进行抗原修复。采用3%(v/v)过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶活性，5g/dl BSA封闭以减少非特异性结合；切片4℃孵育特异性一抗过夜，次日孵育二抗及ABC复合物，DAB溶液显色，苏木精复染细胞核；切片经脱水、透明处理后封片，由两位高年资医师在显微镜下阅片评分。

1.3.10 组织免疫荧光染色：组织切片经柠檬酸钠缓冲液修复后，用3%(v/v)过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶活性，5g/dl BSA封闭以减少非特异性结合；切片4℃孵育一抗(抗RCN2抗体、抗α-SMA抗体)过夜，次日经PBS充分洗涤后，分别孵育荧光标记二抗(抗兔二抗标记FITC、抗鼠二抗标记Cy3)，DAPI复染细胞核。切片经抗荧光淬灭封片剂封片后，采用荧光显微镜观察成像；通过ImageJ软件定量分析荧光图像，计算α-SMA阳性细胞比例，比较RCN2高表达组与低表达组的差异。

1.3.11 细胞转染：将PANC1细胞接种于6孔板，待细胞融合度达60%~70%时，采用Lipo 8000转染试剂按说明书进行转染。将RCN2特异性siRNA(Si1、Si2)及阴性

对照siRNA(NC)分别与转染试剂混合后加入细胞，转染6h后更换为完全培养基继续培养；转染48h后收集细胞，用于后续qRT-PCR、Western blot及功能实验。

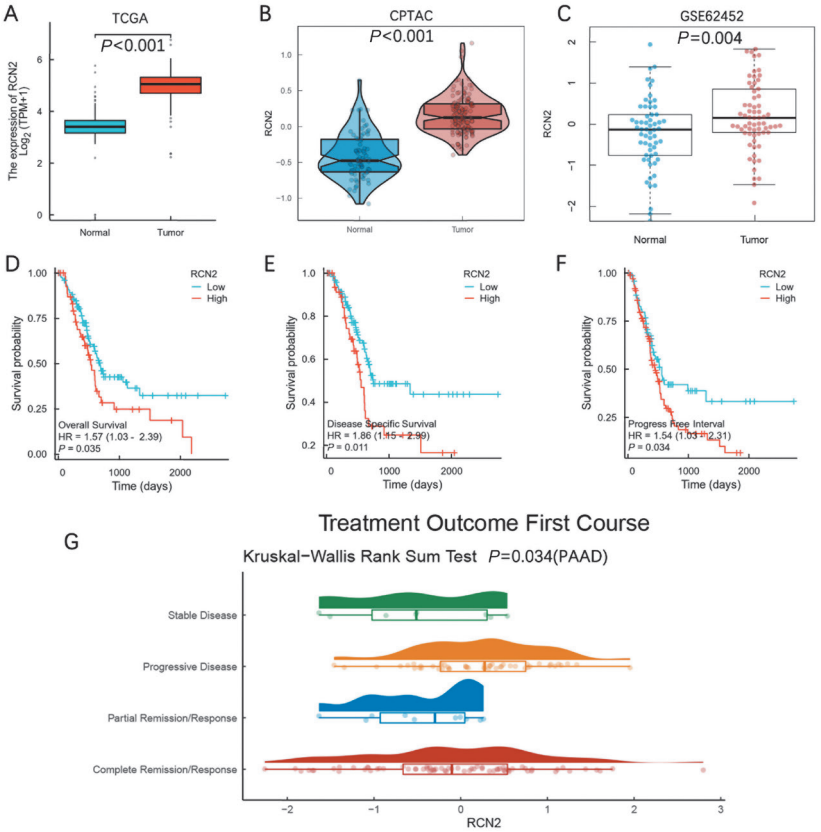
1.3.12　克隆形成实验：细胞转染24h后，将PANC1细胞以每孔约500个的密度接种于6孔板，常规培养10~14天，每2~3天更换一次培养基。克隆形成后，弃去培养基，4g/dl多聚甲醛固定15min，0.1g/dl结晶紫染色；清水洗涤后拍照记录，将直径≥50个细胞的克隆定义为有效克隆，进行计数分析。

1.3.13　细胞迁移实验：采用Transwell小室进行细胞迁移实验。细胞转染48h后，将PANC1细胞消化并重悬于无血清培养基中，取约2×10^4个细胞加入上室，下室加入含10%(v/v)胎牛血清的培养基作为趋化因子。培养24h后，棉签轻轻擦去上室未迁移细胞，迁移至下膜表面的细胞经4g/dl多聚甲醛固定并结晶紫染色。随机选取多个视野在显微镜下计数迁移细胞数量。

1.4　统计学分析　数据分析采用R软件(版本4.0)和GraphPad Prism(版本9.5)进行。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。PDAC肿瘤组织与配对癌旁正常组织中RCN2表达差异采用配对t检验进行分析；非配对样本两组之间使用Mann-Whitney U检验或独立样本t检验，两组以上使用Kruskal-Wallis检验或Wilcoxon秩和检验进行比较，P<0.05为差异具有统计学意义。

2.　结果

2.1　RCN2的表达特征及其与PDAC临床结局的相关性分析　TCGA-PDAC队列分析显示，PDAC肿瘤组织中RCN2的RNA表达水平显著高于正常胰腺组织(U=1 304，P<0.001)，见图1A；CPTAC-PDAC蛋白组数据证实，RCN2蛋白在肿瘤组织中表达显著升高(U=5 602，P<0.001)，见图1B；GEO数据库GSE62452数据集分析亦显示，RCN2在PDAC组织中显著高表达(U=3 320，P=0.004)，见图1C。以TCGA-PDAC队列中RCN2中位表达水平为界，将患者分为高表达组与低表达组，Kaplan-Meier生存分析显示，RCN2高表达患者的OS显著短于低表达患者(HR=1.57，95%CI: 1.03~2.39，P=0.035)，见图1D；此外，RCN2高表达还与较差的DSS(HR=1.86，95%CI: 1.15~2.99，P=0.011)，及PFI(HR=1.54，95%CI:1.03~2.31，P=0.034)显著相关，见图1E、图1F。基于PDAC免疫治疗队列的治疗反应分组分析显示，不同治疗反应组间RCN2表达水平存在显著差异，其中疾病进展(PD)患者RCN2表达水平较高，完全缓解/反应(CR)患者RCN2表达水平较低(H=8.7，P=0.034)，见图1G。

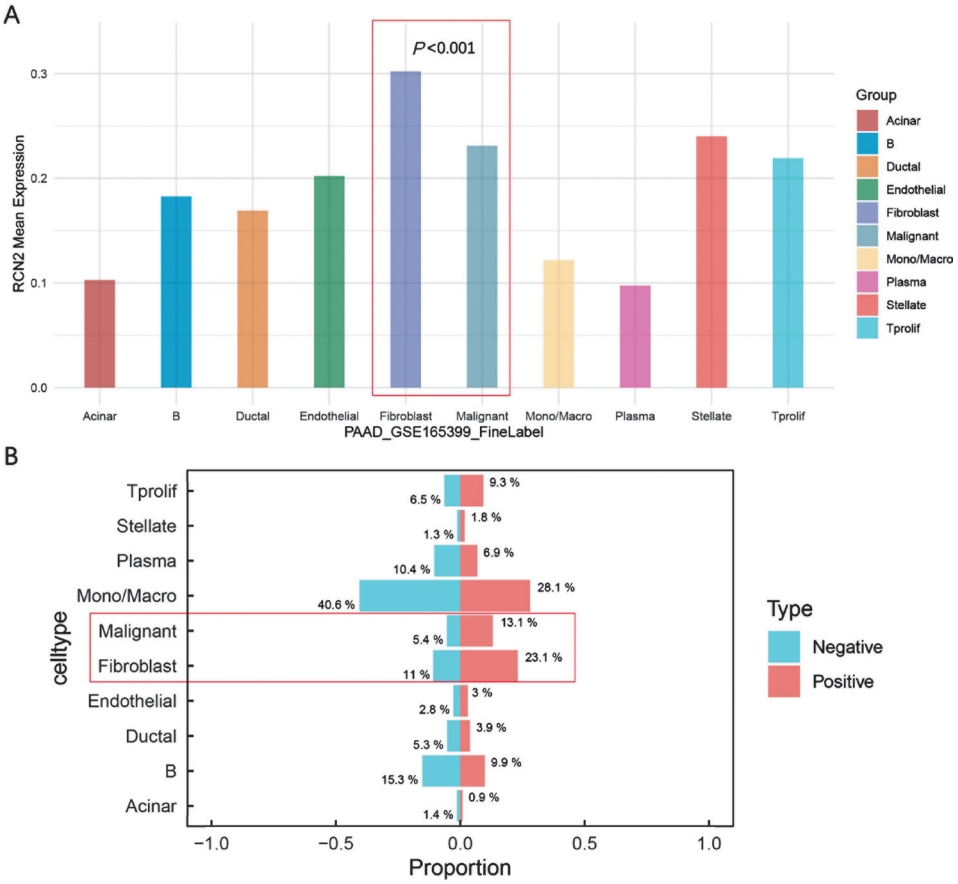


A：TCGA-PDAC队列中RCN2在PDAC肿瘤组织与正常组织中的表达差异；B：CPTAC蛋白组数据中RCN2在PDAC肿瘤组织与正常组织中的蛋白表达差异；C：GEO数据集GSE62452中RCN2在PDAC肿瘤组织与正常组织中的表达差异；D~F：Kaplan-Meier生存分析显示RCN2高表达患者的总体生存、疾病特异性生存及无进展间期显著低于低表达患者；G：基于PDAC免疫治疗队列不同首次治疗反应分组中RCN2表达水平的比较。

图1　RCN2在PDAC中的表达特征及其临床意义

2.2 RCN2在PDAC空间转录组中的区域特异性表达模式分析 基于PDAC空间转录组数据(GSE203612-GSM6177618)的分析显示，RCN2在肿瘤细胞和成纤维细胞富集区域呈明显高表达，在免疫细胞及上皮细胞区域表达相对较低；且RCN2在恶性区域的平均表达水平显著高于混合区域及正常区域(Z=4.964 1、7.823 9)；混合区域高于正常区域(Z=2.872 0)，差异均具有统计学意义(均P<0.01)，提示RCN2表达具有明显的空间区域特异性。

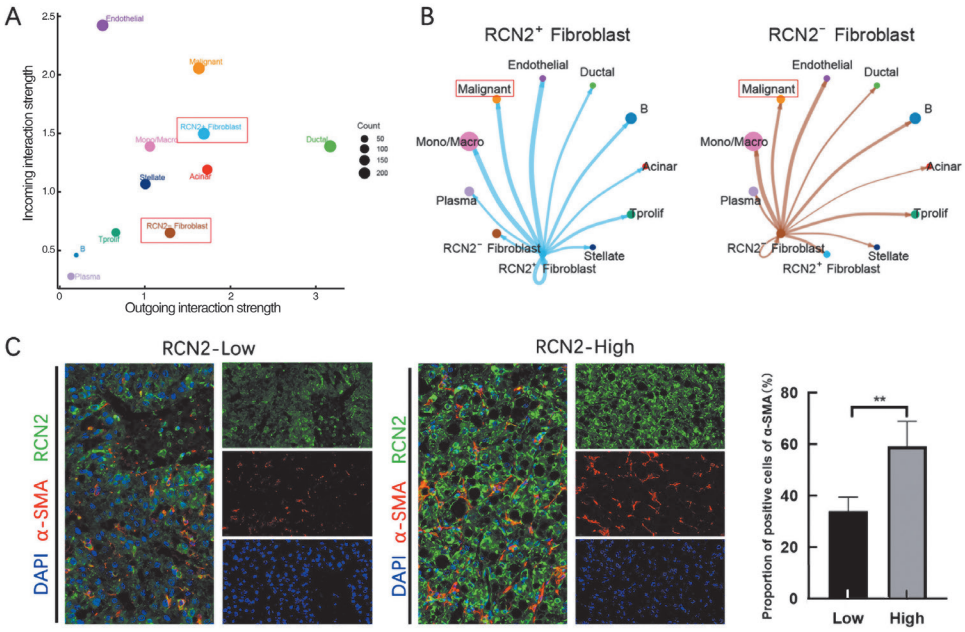
2.3 基于单细胞转录组的RCN2细胞类型特异性表达分析 对PDAC单细胞转录组数据集GSE165399进行系统分析，经质量控制、降维及细胞注释后，UMAP结果显示该数据集主要包含腺泡细胞(Acinar)、导管细胞(Ductal)、肿瘤细胞(Malignant)、成纤维细胞(Fibroblast)、内皮细胞(Endothelial)、单核/巨噬细胞(Mono/Macro)、浆细胞(Plasma)、B细胞、星状细胞(Stellate)及增殖型T细胞(Tprolif)等细胞亚群。定量分析显示，RCN2在成纤维细胞和肿瘤细胞中表达显著升高，明显高于其他细胞类型(H=32.3，P<0.001)，见图2A；进一步分析不同细胞类型中RCN2阳性与阴性细胞的比例发现，成纤维细胞和肿瘤细胞中RCN2阳性细胞比例显著高于其他细胞类型，而免疫细胞及正常上皮相关细胞中RCN2阳性细胞比例较低，见图2B。上述结果表明，RCN2主要来源于肿瘤细胞及成纤维细胞，提示其可能参与PDAC肿瘤细胞功能调控及肿瘤微环境重塑。



A：不同细胞类型中RCN2平均表达水平的比较，RCN2在成纤维细胞和肿瘤细胞中表达显著升高；B：不同细胞类型中RCN2阳性与阴性细胞比例的分布情况，成纤维细胞和肿瘤细胞中RCN2阳性细胞比例较高。

图 2 单细胞转录组解析 RCN2 在 PDAC 不同细胞类型中的表达特征

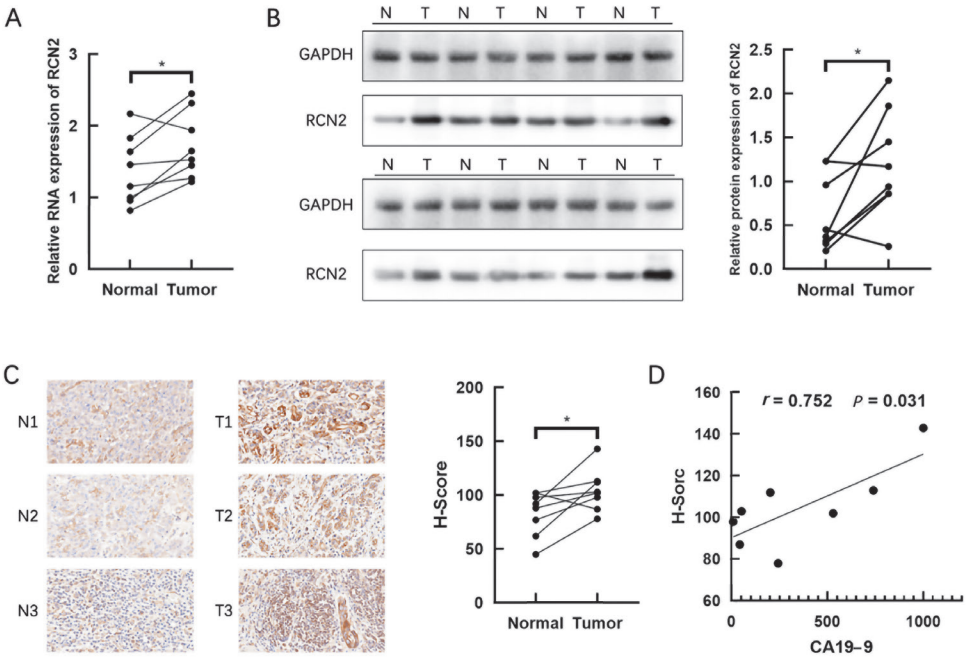
2.4 RCN2阳性成纤维细胞在PDAC中呈现增强的细胞通讯特征 根据RCN2表达水平，将GSE165399中的成纤维细胞分为RCN2阳性(RCN2$^+$ fibroblast)和RCN2阴性(RCN2$^-$ fibroblast)两类，比较其与其他细胞类型的通讯特征。细胞通讯强度分析显示，与RCN2$^-$ fibroblast相比，RCN2$^+$ fibroblast的外向(outgoing)和内向(incoming)通讯强度显著更高，参与的细胞通讯数量亦明显增加，见图3A；通讯网络可视化分析表明，RCN2$^+$ fibroblast与肿瘤细胞之间的通讯信号强度显著增强，见图3B；而RCN2$^-$ fibroblast与肿瘤细胞的通讯强度明显减弱。组织水平多重免疫荧光染色验证显示，RCN2高表达组中以α-SMA标记的成纤维细胞比例显著高于低表达组(t=−4.52，P<0.01)，见图3C，进一步证实RCN2高表达与成纤维细胞富集密切相关。



A：细胞通讯分析散点图，显示RCN2阳性成纤维细胞具有较高的通讯活性；B：RCN2阳性与阴性成纤维细胞的通讯网络比较，显示RCN2阳性成纤维细胞与肿瘤细胞之间的通讯增强；C：PDAC组织中RCN2低表达组与高表达组的多重免疫荧光染色及α-SMA阳性细胞比例定量分析。

图 3　RCN2 阳性成纤维细胞的细胞通讯特征及其与肿瘤基质的关系

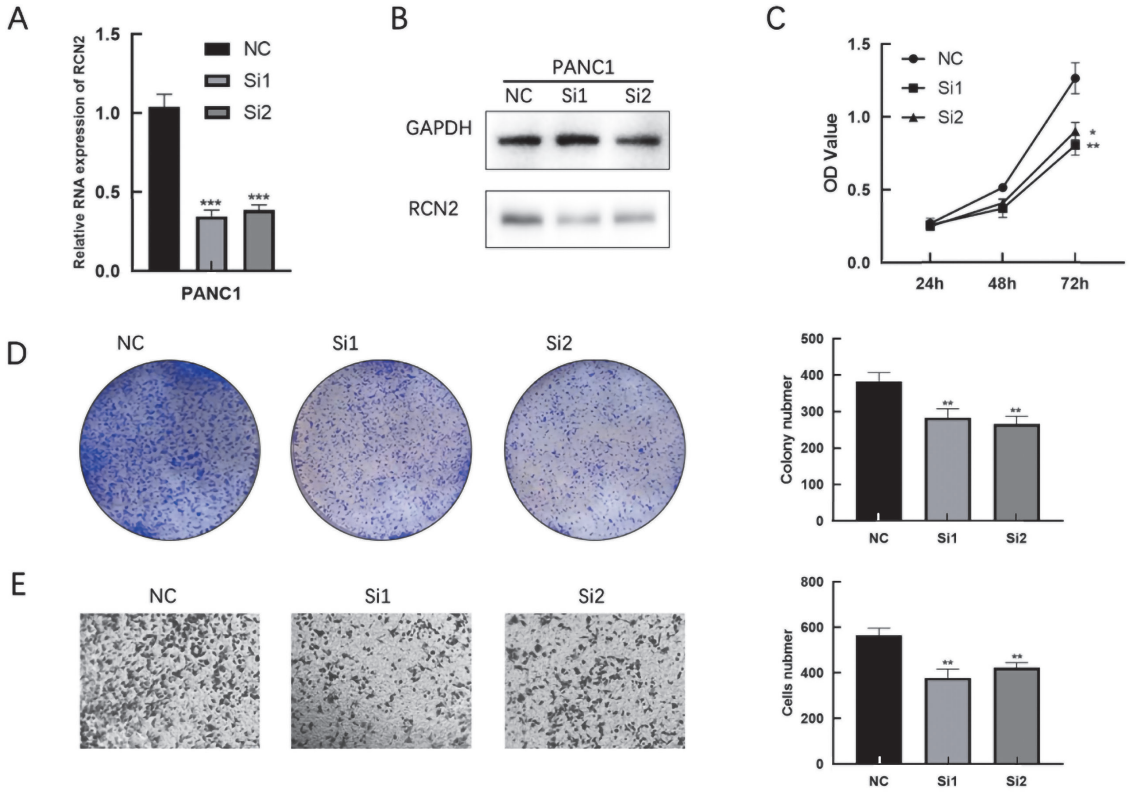
2.5　RCN2在PDAC组织中的表达验证　实时荧光定量PCR结果显示，PDAC肿瘤组织中RCN2的mRNA表达水平显著高于正常胰腺组织(t=2.951，P<0.05)，见图4A；Western blot结果进一步证实，肿瘤组织中RCN2蛋白表达显著高于配对正常组织(t=2.992，P<0.05)，见图4B。免疫组化染色显示，RCN2在PDAC肿瘤组织中呈强阳性染色，而在癌旁正常组织中染色较弱；H-score定量分析表明，PDAC组织中RCN2表达水平显著高于正常组织(t=2.656，P<0.05)，见图4C。相关性分析显示，RCN2的H-score与患者CA19-9水平呈正相关(r=0.752，P=0.031)，见图4D。上述结果从mRNA、蛋白及组织水平，一致验证了RCN2在PDAC中显著高表达的特征。



A：8对PDAC肿瘤组织及癌旁正常组织中RCN2的mRNA表达水平，采用实时荧光定量PCR检测；B：8对PDAC肿瘤组织及癌旁正常组织中RCN2的蛋白表达水平，采用Western blot检测并进行灰度值定量分析；C：8对PDAC肿瘤组织及癌旁正常组织中RCN2的免疫组化染色结果及H-score定量分析；D：CA19-9与免疫组化评分的相关性分析(*表示P<0.05)。

图 4　RCN2 在 PDAC 组织中的表达验证

2.6 RCN2敲低抑制PANC-1细胞的增殖、克隆及迁移能力 以PANC1细胞为模型，采用两条特异性siRNA(Si1、Si2)干扰RCN2表达，qRT-PCR结果显示，与阴性对照组(NC)相比，Si1和Si2均能显著降低PANC1细胞中RCN2的mRNA表达水平(t=11.81、10.36，均P<0.001)，见图5A；Western blot结果进一步证实，Si1和Si2组RCN2蛋白表达明显下调，见图5B，提示干扰效率良好。功能实验显示，与NC组相比，RCN2敲低后PANC-1细胞的增殖能力显著受抑(t=6.325、4.411)，见图5C；克隆形成数明显减少(t=4.982、6.208)，见图5D；迁移细胞数量显著减少(t=6.415、6.394)，见图5E。差异均具有统计学意义(均P<0.05)，表明RCN2可促进胰腺癌细胞的增殖、克隆形成及迁移。



A：实时荧光定量PCR检测RCN2在PANC-1细胞中敲低后的mRNA表达水平；B：Western blot检测RCN2蛋白表达水平，GAPDH作为内参。C：CCK-8实验检测RCN2敲低对PANC-1细胞增殖能力的影响；D：克隆形成实验及其定量分析，评估RCN2敲低对PANC-1细胞克隆形成能力的影响；E：Transwell迁移实验及其定量分析，评估RCN2敲低对PANC-1细胞迁移能力的影响，NC为阴性对照组，Si1和Si2为两条不同的RCN2特异性siRNA干扰组。(*表示P<0.05，**表示P<0.01，***表示P<0.001)

图5 RCN2敲低抑制PANC-1细胞的增殖、克隆形成及迁移能力

3 讨论

PDAC的高度侵袭性与治疗耐受已被公认为由肿瘤细胞内在致癌信号与复杂肿瘤微环境共同驱动，其中以成纤维细胞为核心的基质系统在肿瘤进展与免疫逃逸中发挥关键作用[18-19]。本研究发现，RCN2在多个独立PDAC队列中均稳定高表达，并与患者不良预后及治疗反应显著相关，提示RCN2并非肿瘤发生发展的伴随分子，而是参与调控PDAC恶性生物学行为的重要功能分子。

既往RCN2相关研究多聚焦于其在肿瘤细胞中的促癌功能，例如通过EGFR-ERK通路促进增殖、侵袭与耐药[20]，但此类研究多基于组织水平转录组或体外细胞模型，未能阐明RCN2在肿瘤组织中的真实细胞来源，也未揭示其与微环境细胞的内在联系。本研究借助空间转录组与单细胞转录组联合分析，在PDAC中系统揭示RCN2具有显著的区域特异性与细胞特异性表达特征：RCN2并非在组织中平均分布，而是主要富集于肿瘤恶性区域，并在细胞水平上高度限定于肿瘤细胞与成纤维细胞。这一分布模式与PDAC致密基质重塑的病理特征高度吻合，为RCN2参与肿瘤基质之间的相互作用提供了空间与细胞学依据。

RCN2是内质网腔钙结合蛋白，参与维持钙稳态、蛋白折叠与内质网应激反应。在DAC高代谢、高分泌、缺氧应激的微环境中，肿瘤细胞对线粒体-内质网介导的应激适应与稳态维持具有高度依赖性[21]。RCN2高表达可能通过增强内质网应激缓冲能力、维持蛋白合成与分泌功能，提升肿瘤细胞在恶劣微环境中的存活与适应能力，进而推动肿瘤进展。细胞通讯分析显示，RCN2阳性成纤维细胞具有更强的信

号收发能力，与肿瘤细胞之间的细胞互作更为活跃；组织学结果进一步证实，RCN2高表达的肿瘤组织中α-SMA 阳性成纤维细胞比例显著升高。现有研究表明，PDAC中成纤维细胞存在功能异质性，与肿瘤基质致密化、胶原沉积及免疫抑制密切相关[22-23]。有研究提示，MFAP5高表达的成纤维细胞可通过 MFAP5/RCN2/ERK/STAT1 轴调控透明质酸合成与趋化因子分泌，进而重塑基质与免疫微环境[24-25]。结合本研究结果提示，RCN2 可能标记一类功能高度活化、具备强基质重塑能力的成纤维细胞亚型，并通过强化肿瘤基质直接的通讯促进PDAC进展。

除在成纤维细胞中发挥作用外，RCN2在肿瘤细胞中的高表达同样具有重要功能意义。作为内质网钙结合蛋白，RCN2可广泛影响肿瘤细胞分泌谱、膜受体成熟与应激适应能力；同时，内质网应激与钙稳态失衡可直接调控肿瘤免疫原性与治疗响应[26-27]，这提示RCN2还可能通过改变肿瘤细胞内在的应激状态，间接调控基质重塑与免疫逃逸。本研究体外功能实验显示，干扰RCN2的表达可显著抑制胰腺癌细胞增殖、克隆与迁移能力，从细胞功能层面支持了RCN2的促癌作用。

在转化价值方面，RCN2在多队列中稳定高表达、与预后及治疗反应相关，并在临床样本中获得mRNA、蛋白及组织学水平的一致验证，具备成为PDAC预后标志物的潜力；同时，RCN2与成纤维细胞活化及细胞通讯增强密切相关，使其成为靶向肿瘤微环境的潜在干预靶点。但本研究存在以下不足：临床样本量较小；免疫治疗预测基于算法评分与外部队列，缺乏本队列ICI治疗真实疗效数据；未在免疫细胞层面开展机制干预，也缺少体内动物模型验证。未来可扩大前瞻性临床队列，结合免疫细胞模型，深入阐明 RCN2 在成纤维细胞活化、基质重塑及免疫调控中的因果机制，并进一步探索其在患者分层与联合治疗中的应用价值。

参考文献：

[1] SEUFFERLEIN T, ETTRICH T J. Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC)[J]. Transl Gastroenterol Hepatol, 2019, 4: 21.

[2] PAPADAKOS S P, DEDES N, GKOLEMI N, et al. The EPH/ephrin system in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): from pathogenesis to treatment[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 3015.

[3] 夏菊芳，刘洪．胰腺癌组织中KYNU mRNA的表达及其与免疫浸润和预后的相关性研究[J]．现代检验医学杂志，2024, 39(2):57-61.
XIA J F, LIU H. Expression of KYNU mRNA in pancreatic cancer tissue and its correlation with immune infiltration and prognosis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2024, 39(2): 57-61.

[4] PANCHAL K, SAHOO R K, GUPTA U, et al. Role of targeted immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: an overview[J]. International Immunopharmacology, 2021, 95: 107508.

[5] HO W J, JAFFEE E M, ZHENG L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2020, 17(9): 527-540.

[6] YAMASHITA K, KUMAMOTO Y. CAFs-associated genes (CAFGs) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and novel therapeutic strategy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(11): 6003.

[7] NIU N N, SHEN X Q, 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): 869-884, e9.

[8] MUCCIOLO G, ARAOS HENRÍQUEZ J, JIHAD M, et al. EGFR-activated myofibroblasts promote metastasis of pancreatic cancer[J]. Cancer Cell, 2024, 42(1): 101-118, e11.

[9] REBELO R, XAVIER C P R, GIOVANNETTI E, et al. Fibroblasts in pancreatic cancer: molecular and clinical perspectives[J]. Trends in Molecular Medicine, 2023, 29(6): 439-453.

[10] HONORÉ B. The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease[J]. BioEssays, 2009, 31(3): 262-277.

[11] WU M Y, HUANG X, LIN M, et al. RCN2 facilitates esophageal squamous cellular carcinoma metastasis and cisplatin resistance through UBR5-mediated PPP2CA ubiquitination and degradation[J]. Drug Resistance Updates, 2026, 85: 101339.

[12] YAO H, ZHANG S Y, XIE H J, et al. RCN2 promotes nasopharyngeal carcinoma progression by curbing calcium flow and mitochondrial apoptosis[J]. Cellular Oncology, 2023, 46(4): 1031-1048.

[13] MEI C J, JIANG X, GU Y, et al. YY1-mediated reticulocalbin-2 upregulation promotes the hepatocellular carcinoma progression via activating MYC signaling[J]. American Journal of Cancer Research, 2021, 11(5): 2238-2251.

[14] WANG G, WANG Q, FAN Y G, et al. Reticulocalbin 2 correlates with recurrence and prognosis in colorectal cancer[J]. American Journal of Cancer Research, 2017, 7(11): 2169-2179.

[15] LI K, HUANG J Z, TAN Y, et al. Single-cell and bulk transcriptome analysis reveals tumor cell heterogeneity and underlying molecular program in uveal melanoma[J]. Journal of Translational Medicine, 2024, 22(1): 1020.

[16] YU Y F, LI Y N, ZHOU L, et al. Hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma development by regulating histone lactylation: novel insights from single-cell RNA sequencing and spatial transcriptomics analyses[J]. Cancer Letters, 2024, 604: 217243.

[17] LIU J F, LICHTENBERG T, HOADLEY K A, et al. An

integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics[J]. Cell, 2018, 173(2): 400-416, e11.

[18] ELYADA E, BOLISETTY M, LAISE P, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts[J]. Cancer Discovery, 2019, 9(8): 1102-1123.

[19] GENG X L, CHEN H Z, ZHAO L, et al. Cancer-associated fibroblast (CAF) heterogeneity and targeting therapy of CAFs in pancreatic cancer[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 655152.

[20] DING D, HUANG H, JIANG W, et al. Reticulocalbin-2 enhances hepatocellular carcinoma proliferation via modulating the EGFR-ERK pathway[J]. Oncogene, 2017, 36(48): 6747-6748.

[21] 刘雪,卢静静,宋娟丽.STX4通过PI3K/AKT/mTOR信号通路参与调控卵巢癌细胞内质网-线粒体接触及促进迁移、侵袭的实验研究[J].现代检验医学杂志, 2025, 40(6): 18-21.
LIU X, LU J J, SONG J L. Experimental study on STX4 participates in regulating endoplasmic Reticulum-Mitochondria contact on promoting migration and invasion in ovarian cancer cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2025, 40(6): 18-21.

[22] PING Q R, YAN R P, CHENG X, et al. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions[J]. Cancer Gene Therapy, 2021, 28(9): 984-999.

[23] MURRAY E R, MENEZES S, HENRY J C, et al. Disruption of pancreatic stellate cell myofibroblast phenotype promotes pancreatic tumor invasion[J]. Cell Reports, 2022, 38(4): 110227.

[24] PENG Z W, REN Z H, TONG Z W, et al. Interactions between MFAP5^{+} fibroblasts and tumor-infiltrating myeloid cells shape the malignant microenvironment of colorectal cancer[J]. Journal of Translational Medicine, 2023, 21(1): 405.

[25] DUAN Y, ZHANG X Z, YING H G, et al. Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunochemotherapy via remodeling the matrix[J]. Oncogene, 2023, 42(25): 2061-2073.

[26] CHEN X, CUBILLOS-RUIZ J R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(2): 71-88.

[27] ISAAC S T, TAN T C, POLLY P. Endoplasmic reticulum stress, calcium dysregulation and altered protein translation: intersection of processes that contribute to cancer cachexia induced skeletal muscle wasting[J]. Current Drug Targets, 2016, 17(10): 1140-1146.

收稿日期：2026-01-27
修回日期：2026-03-02

(上接第133页)

Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(3): 317-327.

[12] XU X S, WANG A A, LUO Z Q, et al. M1-like tumor-associated macrophages promote colorectal cancer progression through feedback activation of the IL1β/NF-κB signaling activity[J]. International Immunopharmacology, 2026, 168: 115845.

[13] WANG H W, XIONG A W, CHEN A A, et al. CXCR1^{+} neutrophil infiltration orchestrates response to third-generation EGFR-TKI in EGFR mutant non-small-cell lung cancer[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 342.

[14] ZHU J, WEI Y J, DENG F N, et al. The role of FOXA1 in human normal development and its functions in sex hormone-related cancers[J]. Frontiers in Bioscience, 2024, 29(6): 225.

[15] QIAO Z X, LV Z P, SONG X Y, et al. SPDEF-mediated BIRC5 transcriptional activation enhances non-small cell lung cancer progression[J]. Mutat Res, 2026, 832: 111926.

[16] ZHU A Q, ZHOU C, DONG J, et al. FOXA1-NAT10 positive feedback pathway promotes non-small cell lung cancer cell progression[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2025, 39(11): e70597.

[17] NTZIFA A, MARRAS T, KALLERGI G, et al. Comprehensive liquid biopsy analysis for monitoring NSCLC patients under second-line osimertinib treatment[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1435537.

[18] 胡玉莲,齐健,王姝洁,等.基于H4C6甲基化水平和cfDNA浓度构建多癌种癌症风险预测模型[J].安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 597-603.
HU Y L, QI J, WANG S J, et al. A multi-cancer risk prediction model which constructed based on H4C6 methylation level and cfDNA concentration[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2023, 58(4): 597-603.

[19] QIAN T, ZHOU Z W, ZHANG Q X, et al. SEPT9, H4C6, and RASSF1A methylation in nasopharyngeal swabs: a reflection of potential minimally invasive biomarkers for early screening of nasopharyngeal cancer[J]. Medicine, 2023, 102(50): e36583.

[20] KE L, HUANG X, LIU W T, et al. A prediction model based on cfDNA concentration and cfDNA methylation biomarkers for lung cancer detection[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 30969.

[21] LI Y Q, WANG L C, WANGA W, et al. Acetylation modification of AIM2 by KAT2B suppresses the AKT/Wnt/β-catenin signaling pathway activation and inhibits breast cancer progression[J]. Epigenetics & Chromatin, 2025, 18(1): 27.

[22] HE Y J, ZHANG Y X, ZHANG J S, et al. Tanshinone IIA targets RNF123 to inhibit non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion via KAT2B-mediated H3K18ac modification[J]. Oncology Letters, 2025, 31(2): 69.

收稿日期：2025-12-22
修回日期：2026-01-19