

# TRPM4: 驱动三阴性乳腺癌恶性进展与介导钠超载死亡的“双刃剑”靶点

孔秋晨<sup>1</sup>, 伍勇<sup>2</sup>, 那振坤<sup>3</sup>, 杨琮<sup>1</sup>, 徐丽娇<sup>3\*</sup>

1. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广州 510000

2. 华南理工大学附属第二医院(广州市第一人民医院)肿瘤科, 广州 510000

3. 中国科学院杭州医学研究所, 杭州 310018

\* 联系人, E-mail: [lijiao03040904@163.com](mailto:lijiao03040904@163.com)

2025-10-01 收稿, 2025-12-31 修回, 2026-03-05 接受, 2026-03-06 网络版发表

浙江省自然科学基金(LZYQ25C050001)资助

**摘要** 乳腺癌在女性癌症中发病率和死亡率最高。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)约占所有乳腺癌病例的15%~20%, 因其高度异质性、高远处转移风险、极差的预后和有限的治疗选择等特征, 在乳腺癌治疗中仍然是一个主要挑战。瞬时受体电位阳离子通道M亚家族4成员(transient receptor potential cation channel subfamily M member 4, TRPM4), 是一种依赖钙的单价阳离子通道亚家族M成员, 对钠离子具有选择性的通透性。它不仅介导一种由钠离子内流导致细胞内钠超载的新型细胞死亡方式, 即钠超载细胞死亡(necrosis by sodium overload, NECSO), 亦被证明与多种癌症类型中的肿瘤迁移和侵袭有关, 提示其在癌症生物学中的潜在相关性。因此, 深入研究TRPM4在TNBC中的作用尤为必要。本研究利用生物信息学方法分析了TCGA(The Cancer Genome Atlas)和HPA(The Human Protein Atlas)数据库, 发现TRPM4在TNBC组织呈现中高表达, 且其表达水平升高与患者总体生存率降低显著相关。通过对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行基因本体(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析, 结果显示这些DEGs主要富集于多个肿瘤相关信号通路。为系统探究TRPM4的功能影响, 我们在TNBC细胞系中构建了TRPM4敲低模型, 并进行了一系列功能试验。结果表明, TRPM4敲低可显著抑制TNBC细胞的增殖、侵袭和迁移能力。此外, 在野生型TNBC细胞系中, 采用特异性TRPM4通道激动剂坏死素-1(necroside-1, NC1)处理可诱导NECSO, 而TRPM4敲低则使癌细胞对NECSO产生抵抗。综上所述, 本研究发现TRPM4的高表达与TNBC患者不良预后相关。值得注意的是, TRPM4在TNBC中表现出双重作用: 在特定条件下, 其敲低不仅增强癌细胞对NECSO的耐受性, 同时也能显著抑制其恶性表型。这一现象可以源于TRPM4在调节钠离子稳态和钙信号中的关键作用——TRPM4敲低可能干扰与致瘤相关的钠离子内流, 进而影响对细胞增殖、迁移和存活至关重要的下游钙依赖性过程。上述发现为将其作为TNBC潜在治疗靶点的后续开发提供了坚实的科学依据与新思路。

**关键词** TRPM4, 三阴性乳腺癌, 钠超载细胞死亡, 双重效应, 表型重塑

乳腺癌仍是全球范围内女性恶性肿瘤发病及癌症相关死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌(triple-negative

breast cancer, TNBC)约占所有乳腺癌的15%~20%, 其特征为高度异质性和高侵袭性, 导致患者中位生存期

**引用格式:** 孔秋晨, 伍勇, 那振坤, 等. TRPM4: 驱动三阴性乳腺癌恶性进展与介导钠超载死亡的“双刃剑”靶点. 科学通报, 2026, 71: 3253–3265

Kong Q, Wu Y, Na Z, et al. TRPM4: a “double-edged sword” target driving malignant progression of triple-negative breast cancer and mediating sodium overload-induced cell death (in Chinese). Chin Sci Bull, 2026, 71: 3253–3265, doi: [10.1360/CSB-2025-5614](https://doi.org/10.1360/CSB-2025-5614)

较短、预后不良、易产生耐药性、复发和转移频繁,与其他乳腺癌亚型相比死亡率显著升高<sup>[2]</sup>。目前,TNBC的临床治疗仍面临严峻挑战,亟需发掘可靠的生物标志物与新型治疗靶点。

瞬时受体电位阳离子通道M亚家族4成员(transient receptor potential cation channel subfamily M member 4, TRPM4)是一种钙激活的选择性钠离子通道<sup>[3]</sup>,其在肿瘤进展中的关键调控作用近年来逐渐被揭示。TRPM4在前列腺癌中已被广泛研究,其转录本和蛋白表达水平与恶性转化及高复发风险相关。TRPM4可受micro-RNA表达的调控,并作为上游基因激活 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,进而影响肿瘤生长与转移<sup>[4,5]</sup>。在宫颈癌HeLa细胞中,shRNA介导的TRPM4沉默可促进糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 $\beta$ )依赖性 $\beta$ -连环蛋白降解,抑制 $\beta$ -连环蛋白信号通路的转录,最终抑制肿瘤细胞增殖<sup>[6]</sup>。与此同时,在结直肠癌中,Chan Wan等人将TRPM4鉴定为一个受甲基化调控的新型抑癌基因,TRPM4可通过细胞内Ca<sup>2+</sup>信号激活钙蛋白酶介导的黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)切割底物,并经由磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase protein/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)信号级联通路抑制结直肠癌细胞的迁移与侵袭,这一发现明确了TRPM4作为结直肠癌诊断与治疗的重要生物标志物和靶点<sup>[7]</sup>。Ghosh等人<sup>[8]</sup>则证实TRPM4是抗癌治疗诱导坏死的关键执行蛋白,主要见于luminal型乳腺癌,该发现可能有助于开发新型诱导坏死的癌症疗法。上述研究共同确立了TRPM4在肿瘤治疗中的重要靶点地位,其调控的多样性值得深入探索。

值得注意的是,最新研究发现特异性药物Necro-cide-1(NC1)可持续性激活TRPM4,引起细胞外钠离子内流,导致细胞内发生不可逆的钠离子超载,从而引发一种新型细胞死亡方式,即钠超载性细胞坏死(necrosis by sodium overload, NECSO)<sup>[9]</sup>。该发现为理解钠依赖性细胞死亡及其在疾病中的作用提供了新视角。基于上述背景,本研究旨在系统评估TRPM4在TNBC中的功能:一方面探究TRPM4对TNBC细胞增殖、迁移与侵袭等恶性表型的调控作用;另一方面验证NECSO在TNBC中能否被诱导及其具体机制,以期为TNBC的治疗策略提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 公共数据库分析

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库获取TNBC组织及正常乳腺组织中TRPM4的mRNA表达数据。TCGA数据共包含226例样本,涵盖患者预后生存信息及差异基因表达分析。TRPM4免疫组化染色数据来自人类蛋白质图谱数据库(The Human Protein Atlas, HPA, <http://www.proteinatlas.org>)。利用Metabric数据库(<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress/studies/E-MTAB-193>)分析TRPM4表达水平对TNBC患者的预后价值。

### 1.2 功能富集分析

使用DESeq2包识别TRPM4高表达组与低表达组之间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。筛选阈值为 $|\text{Log}_2\text{FoldChange(FC)}| > 1$ 且校正后 $P < 0.05$ 。利用R包“ClusterProfiler”(版本3.14.3)进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析。基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)使用GSEA软件(v4.3.2)进行,基于我们的差异表达结果中信噪比排列的预排序基因列表。使用来自MSigDB Hallmark(H)和Canonical Pathways(C2:CP)集合的基因集进行测试。显著富集的基因集定义为满足以下阈值的集合: $|\text{标准化富集评分}(\text{normalized enrichment score, NES})| > 1.5$ ,  $P < 0.05$ ,以及假发现率(false discovery rate, FDR) $q < 0.25$ 。

### 1.3 细胞系与培养条件

MDA-MB-468细胞系培养于含4.5 g/L葡萄糖和L-谷氨酰胺的DMEM培养基(Thermo Fisher Scientific, 美国),BT549细胞培养于含4.5 g/L葡萄糖和L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基(Thermo Fisher Scientific)。两种培养基均添加10%胎牛血清(VISTECH, 中国)。所有细胞在37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养。两株细胞系均经支原体污染检测,并已经进行细胞身份认证。

### 1.4 siRNA转染

使用Lipofectamine 3000转染试剂(Thermo Fisher Scientific),按照说明书流程对MDA-MB-468和BT549细胞进行siRNA转染。转染8~16 h后更换为标准培养

基。培养48 h后收集转染细胞进行后续实验。TRPM4 siRNA(si TRPM4~1和si TRPM4~2)及阴性对照siRNA (Vector)购自吉玛基因(Genepharma, 中国), 靶序列为: 5'-GGCAACAGCGAUCUCUACUTT-3'; 5'-ACAUG-GAUAGUGUCAUUAATT-3'。

## 1.5 RNA提取与qRT-PCR

使用RNA-Quick Purification Kit(ES Science, 中国)提取MDA-MB-468和BT549细胞总RNA, 按Hifair® AdvanceFast 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Yeasen, 中国)说明书合成cDNA。采用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme, 中国)进行qRT-PCR扩增。引物由广州捷瑞生物设计并合成, TRPM4引物序列如下: 上游引物: 5'-GCACGACGTTTCATAGTTGACT-3', 下游引物: 5'-CTTCTCCGTGGTGTGTGCA-3'。

## 1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

使用免疫沉淀裂解液并加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂(NCM Biotech, 中国)提取细胞总蛋白。BCA蛋白检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific)测定蛋白浓度。取等量蛋白(20 µg)经10% SDS-PAGE凝胶(Vazyme)分离后转至PVDF膜(Millipore, 美国)。膜在室温下用5%脱脂牛奶封闭1 h, 4℃孵育一抗过夜。洗膜后室温孵育辣根过氧化物酶标记二抗1 h, 增强化学发光底物显影, 化学发光成像系统(TianYa Biotech, 中国)采集信号。所用抗体: 抗β-actin(Abcam, ab198991, 1:20000)、抗TRPM4(Proteintech, 21985-1-AP, 1:2000)。

## 1.7 细胞活力与死亡检测

采用Cell Counting Kit-8(GlpBio, 美国)检测细胞活力。简要步骤: 将MDA-MB-468和BT549细胞接种于96孔板, 培养24、48、72、96 h, 每孔加入10 µL CCK-8和100 µL完全培养基, 37℃孵育1 h后用酶标仪(Thermo Fisher Scientific)测定450 nm吸光度。实验重复三次, 结果以均值±标准差(X±SD)表示。

## 1.8 荧光强度检测

为检测细胞内钠离子浓度, 将细胞接种于96孔板培养, 药物处理适当时间后加入5 µmol/L CoroNa-AM染料(MKBio Incorporated, 中国), 37℃孵育30 min, 用Hank's平衡盐溶液洗涤两次。使用Varioskan LUX多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific)检测荧光强度, 并通

过GraphPad Prism(10.4.2版)进行数据分析。

## 1.9 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)实验

采用EdU细胞增殖检测试剂盒(Beyotime, 中国)评估细胞增殖。简要步骤: 将细胞以 $3 \times 10^4$ /孔密度接种于96孔板, 培养24 h后加入10 µmol/L EdU, 37℃孵育2 h, 固定后加入点击反应液避光反应30 min, DAPI(Beyotime, 中国)染核10 min, 荧光显微镜拍摄并使用ImageJ软件分析。

## 1.10 克隆形成实验

将细胞以500个/孔接种于6孔板, 在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养14 d, 每3 d换液一次。结束后用4%多聚甲醛固定30 min, 0.2%结晶紫染色15 min。

## 1.11 细胞划痕实验

将细胞以 $5 \times 10^5$ /孔接种于6孔板, 培养24 h至融合状态, 用无菌枪头划痕。划痕后分别在0、24 h随机选取5个相同的视野拍摄, 使用ImageJ计算原始划痕宽度, 迁移率计算公式为: (原始划痕面积-实际划痕面积)/原始划痕面积。

## 1.12 Transwell实验

采用8 µm孔径的24孔Transwell™小室(Corning Incorporated, 美国)进行迁移和侵袭实验。将重悬于无血清培养基的细胞( $5 \times 10^4$ /孔)接种于上室, 侵袭实验上室预铺基质胶(Corning Incorporated), 下室加入含20% FBS的培养基500 µL。培养24 h后多聚甲醛固定, 0.2%结晶紫染色, 显微镜计数并采用ImageJ分析。

## 1.13 流式细胞术

为检测细胞内钠离子浓度, 用不含EDTA的胰蛋白酶(Thermo Fisher Scientific)消化细胞, 制备单细胞悬液于Hank's平衡盐溶液(Solarbio, 中国)。加入5 µmol/L CoroNa-AM染料(MKBio Incorporated)37℃孵育30 min, 洗涤两次后使用CytoFlex S流式细胞仪(Beckman Coulter)检测, FITC通道(525/40 BP)检测钠信号, FlowJo软件分析。为评估25 nmol/L NC1(MedChemExpress, 美国)处理1 h后的钠离子浓度, 按前述方法细胞在处理消化检测。

### 1.14 活细胞成像

将细胞接种于共聚焦培养皿。为观察药物处理后不同组别细胞内钠流入动态,细胞经25 nmol/L NC1 (MedChemExpress)处理1 h后,加入5  $\mu$ mol/L CoroNa-AM染料(MKBio Incorporated)孵育30 min, Hank's平衡盐溶液(Solarbio)洗涤一次,并加入适量该溶液于成像过程中维持活细胞状态。

### 1.15 病毒感染

病毒感染以构建三阴性乳腺癌细胞*TRPM4*敲低模型。取对数生长期细胞,以适当密度接种于6孔板中,贴壁后进行病毒感染。病毒操作均于专用生物安全柜进行,按预实验感染复数值(multiplicity of infection, MOI)用完全培养基稀释病毒液,依说明书比例加入polybrene助转染剂混匀以提高感染效率。弃原培养基,PBS清洗后加入病毒工作液,孵育8~12 h。换完全培养基培养至72 h,按照适宜浓度向体系中加入嘌呤霉素筛选。验证感染效率后,部分细胞冻存储备用,部分预处理后送高通量测序。

### 1.16 统计学与可重复性

本研究采用GraphPad Prism进行双尾 $t$ 检验以及单因素ANOVA分析,数据均以均值 $\pm$ 标准差( $X\pm SD$ )表示。所有显微、生化及生物学实验均独立重复至少三次,结果一致。比较对照组与实验组均值的显著性差异, $P<0.05$ 视为具有统计学意义。本研究未通过统计学方法估算样本量,所有纳入数据均未进行排除。插图使用Adobe Illustrator制作。

## 2 结果

### 2.1 *TRPM4*在TNBC中表达上调并与不良预后相关

为探究*TRPM4*在TNBC中的临床相关性,我们基于TCGA数据库进行了生物信息学分析。结果显示,TNBC肿瘤组织中*TRPM4*的mRNA表达水平显著高于癌旁正常组织(图1(a))。生存分析进一步表明,*TRPM4*高表达组( $n=106$ )患者的总生存期显著短于低表达组( $n=120$ ),表明*TRPM4*高表达与TNBC患者不良预后相关(图1(b))。同时,我们还分析了非TNBC乳腺癌患者*TRPM4*表达水平及同一亚型中不同*TRPM4*表达水平下

乳腺癌患者生存期,在非三阴性乳腺癌患者中,*TRPM4*高表达患者呈现较长生存期,进一步明确*TRPM4*高表达及其与不良预后相关性具有TNBC特异性(图S1)。在蛋白层面,HPA数据库的免疫组化结果同样显示,TNBC组织中*TRPM4*蛋白的表达强度明显高于正常乳腺组织(图1(c)),进一步支持了转录组水平的发现。为系统探索*TRPM4*高表达所关联的生物学过程,我们对上述样本进行了DEGs分析(图1(d))。GO富集分析表明,DEGs显著富集于细胞外基质组成、细胞黏附(如黏着斑形成)以及细胞骨架调控(如肌动蛋白结合)等过程(图1(e, f))。KEGG通路分析显示,这些基因在多条与肿瘤进展相关的通路中显著富集,包括与侵袭、转移密切相关的信号通路(图1(g, h))。上述结果表明,*TRPM4*可能通过影响细胞黏附、运动及微环境重构等关键机制,参与TNBC的恶性进展。

### 2.2 *TRPM4*在TNBC细胞中的功能分析: 敲低*TRPM4*抑制细胞增殖

为明确*TRPM4*在TNBC中的生物学功能,首先在MDA-MB-468和BT549两种TNBC细胞系中确认了其在mRNA和蛋白水平均呈现高表达(图2(a, b))。随后,通过siRNA转染技术在这两种细胞系中敲低*TRPM4*,并通过qRT-PCR和Western blot验证了敲低效率(图2(c~f))。在功能层面,CCK-8实验表明*TRPM4*敲低可显著抑制两种细胞的增殖活性(图2(g, h)),EdU实验进一步显示:敲低*TRPM4*后,处于DNA合成期的细胞比例明显下降(图2(i~l)),提示其抑制细胞周期进程。此外,平板克隆形成实验也证实,*TRPM4*敲低显著削弱了细胞的长期增殖与集落形成能力(图2(m, n))。以上结果共同表明,*TRPM4*对维持TNBC细胞的增殖至关重要。

### 2.3 *TRPM4*在TNBC细胞中的功能分析: 敲低*TRPM4*抑制细胞迁移与侵袭

为进一步评估*TRPM4*对TNBC细胞迁移与侵袭能力的影响,我们分别进行了划痕愈合实验和Transwell实验。划痕实验结果显示,与对照组相比,敲低*TRPM4*可显著延缓MDA-MB-468和BT549细胞的划痕愈合速度(图3(a, c))。通过ImageJ软件对划痕愈合面积进行定量分析,进一步证实了*TRPM4*敲低对细胞迁移的抑制作用(图3(b, d))。为进一步考察细胞侵袭能力,我们在Transwell小室中铺置基质胶以模拟细胞外基质屏障。

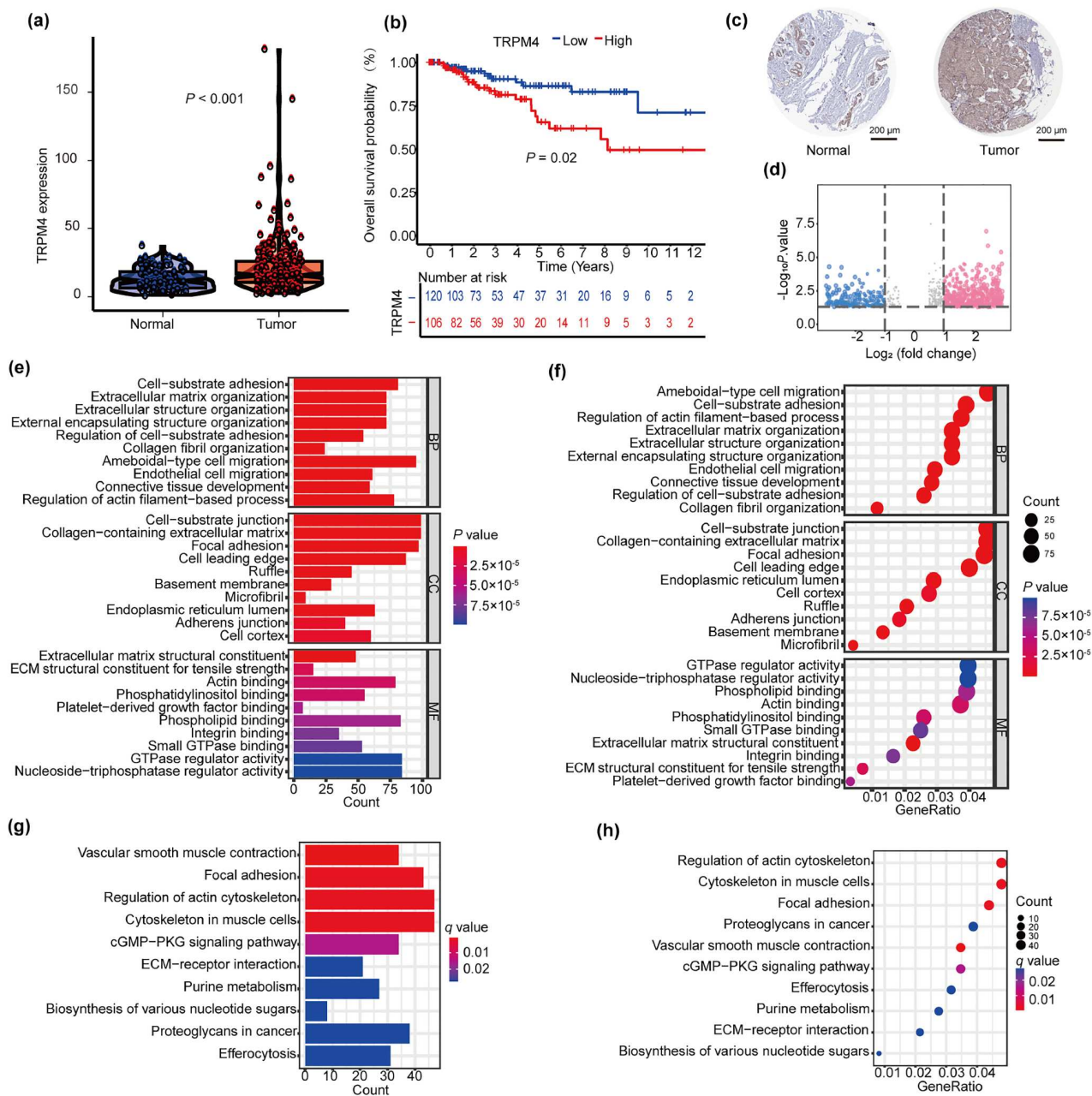


**图 1** (网络版彩色)TNBC中 $TRPM4$ 表达上调并与不良预后相关。(a) TCGA数据集中正常组织与TNBC组织中 $TRPM4$ 的表达水平。(b) Kaplan-Meier生存曲线显示, $TRPM4$ 高表达的TNBC患者总体生存率较低。(c) HPA数据库中正常乳腺组织与TNBC组织 $TRPM4$ 免疫组化染色的代表性图像。比例尺=200  $\mu$ m。(d) DEGs分析。(e, f) DEGs的GO富集分析及条形图与气泡图可视化结果。(g, h) DEGs的KEGG通路富集分析及条形图与气泡图可视化结果

**Figure 1** (Color online) *TRPM4* expression is upregulated in TNBC, associated with poor prognosis. (a) Expression of *TRPM4* in the normal tissues and TNBC tissues within the TCGA dataset. (b) Kaplan-Meier curves revealed that TNBC patients with high expression levels of *TRPM4* had a poor survival rate. (c) Representative images of immunohistochemical staining for *TRPM4* in normal breast and TNBC tissues derived from the HPA database. Scale bar= 200  $\mu$ m. (d) The analysis of DEGs. (e, f) GO enrichment analysis of DEGs and visualized bar charts and bubble charts. (g, h) KEGG pathway enrichment analysis of DEGs and visualized bar charts and bubble charts

结果显示, $TRPM4$ 敲低显著减少了穿越基质胶的细胞数量(图3(e)). 经ImageJ软件对迁移及侵袭细胞数进行

定量统计(图3(f-i)), 结果表明 $TRPM4$ 敲低能够有效抑制TNBC细胞的迁移与侵袭能力。

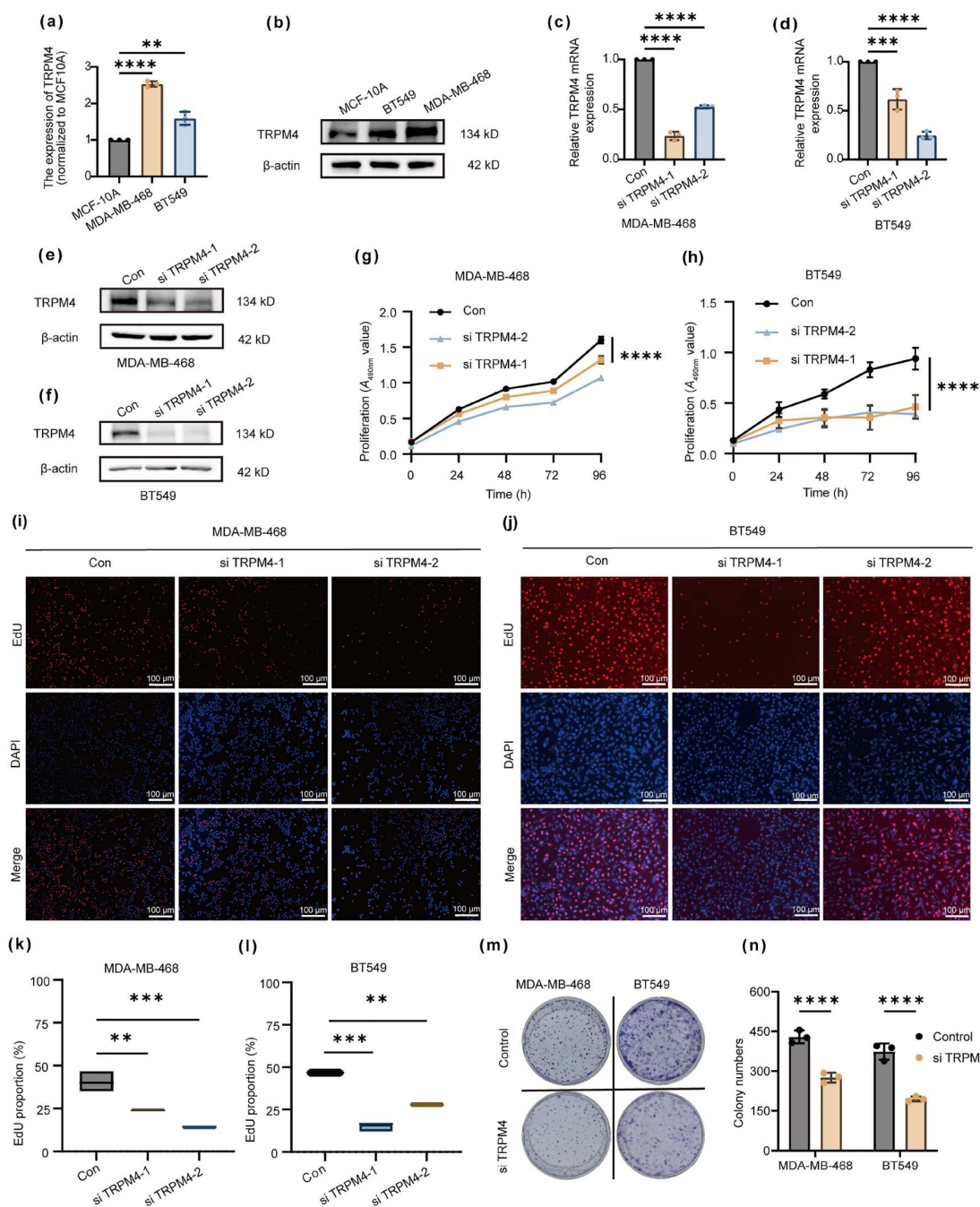


**图 2** (网络版彩色) *TRPM4* 在 TNBC 细胞中的功能分析: 敲低 *TRPM4* 抑制细胞增殖. (a, b) MDA-MB-468 和 BT549 细胞中 *TRPM4* 在转录水平及翻译水平的表达. (c, d) 通过 qRT-PCR 检测转染 si *TRPM4* 后 MDA-MB-468 和 BT549 细胞中 *TRPM4* 的敲降效率. (e, f) 通过 Western blot 检测转染 si *TRPM4* 后 MDA-MB-468 和 BT549 细胞中 *TRPM4* 的表达. (g, h) CCK-8 实验显示敲低 *TRPM4* 抑制 MDA-MB-468 和 BT549 细胞的增殖. (i, j) EdU 实验表明敲低 *TRPM4* 抑制 MDA-MB-468 和 BT549 细胞的增殖. 比例尺=100  $\mu$ m. (k, l) EdU 实验的定量分析. (m, n) 克隆形成实验显示敲低 *TRPM4* 抑制 MDA-MB-468 和 BT549 细胞的增殖, 以及实验结果的定量分析. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

**Figure 2** (Color online) Functional analysis of *TRPM4* in TNBC cells: *TRPM4*-knockdown inhibits proliferation. (a, b) Expression of *TRPM4* at the transcriptional and translational levels in MDA-MB-468 and BT549 cells. (c, d) *TRPM4* knockdown efficiency in MDA-MB-468 and BT549 cells transfected with si *TRPM4* was detected by qRT-PCR. (e, f) *TRPM4* expression in MDA-MB-468 and BT549 cells transfected with si *TRPM4* was detected by Western blot. (g, h) CCK-8 assay showed that knockdown of *TRPM4* inhibited the proliferation of MDA-MB-468 and BT549 cells. (i, j) EDU assay indicated that knockdown of *TRPM4* inhibited the proliferation of MDA-MB-468 and BT549 cells. Scale bar=100  $\mu$ m. (k, l) Quantitative analysis of the EDU assay. (m, n) Colony-formation assay indicated that knockdown of *TRPM4* inhibited the proliferation of MDA-MB-468 and BT549 cells, and quantitative analysis of the assay. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

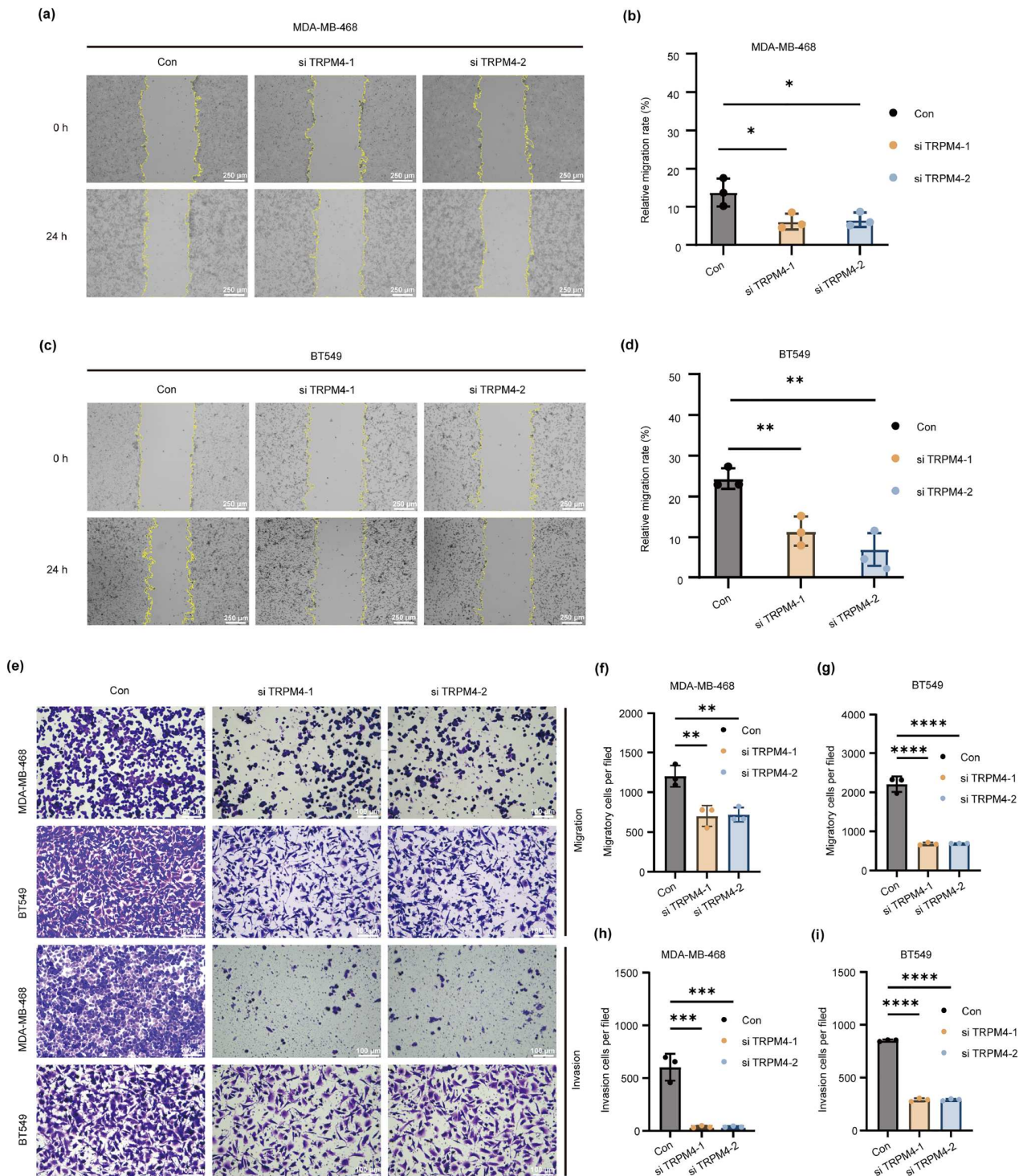


**图 3** (网络版彩色)*TRPM4*在TNBC细胞中的功能分析: 敲低*TRPM4*抑制细胞迁移与侵袭。(a, c)细胞划痕实验显示敲低*TRPM4*抑制MDA-MB-468和BT549细胞的迁移能力, 比例尺=250  $\mu$ m。(b, d) 细胞划痕实验的定量分析。(e) Transwell实验表明敲低*TRPM4*抑制MDA-MB-468和BT549细胞的迁移与侵袭能力, 比例尺=100  $\mu$ m。(f-i) Transwell实验的定量分析。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001

**Figure 3** (Color online) Functional analysis of *TRPM4* in TNBC cells: *TRPM4*-knockdown inhibits Migration and invasion. (a, c) Cell scratch assays indicated that knockdown of *TRPM4* inhibited the migration ability of MDA-MB-468 and BT549 cells. Scale bar= 250  $\mu$ m. (b, d) Quantitative analysis of Cell scratch assays. (e) Transwell assays indicated that knockdown of *TRPM4* inhibited the migration and invasion ability of MDA-MB-468 and BT549 cells. Scale bar= 100  $\mu$ m. (f-i) Quantitative analysis of Transwell assays. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001

## 2.4 NECSO在TNBC细胞中的验证

盐(氯化钠)作为维持机体稳态的必需营养素,其摄入失衡与多种疾病的发生发展密切相关.已有充分证据表明,高盐饮食所营造的高钠微环境参与心血管疾病<sup>[10]</sup>、肾脏疾病<sup>[11]</sup>、免疫系统疾病<sup>[12,13]</sup>、皮肤相关疾病<sup>[14]</sup>等病理过程.在肿瘤领域,尽管大量流行病学研究已明确高盐饮食是胃癌的危险因素<sup>[15-17]</sup>,且近年研究发现其可能通过调控髓系来源抑制性细胞分化进而抑制小鼠肿瘤生长并诱导癌细胞死亡<sup>[18]</sup>,但钠离子稳态失调是否直接参与调控肿瘤细胞命运,其具体机制尚不明确. TRPM4是一种选择性钠离子通道,已有研究报道其异常激活可导致钠离子大量内流,进而引发一种新型细胞死亡方式——NECSO<sup>[9]</sup>.基于此,我们提出科学问题:在TNBC细胞中,是否同样存在TRPM4介导的、由钠离子内流驱动的坏死通路?本研究通过特异性激活TRPM4通道,旨在精准地探究钠离子内流在TNBC细胞死亡中的直接作用.

为验证这一假设,我们在两种TNBC细胞系中应用TRPM4特异性激动剂NC1(25 nmol/L)进行干预.活细胞成像显示,在基础状态下,野生型与TRPM4敲低型细胞的胞内钠离子荧光强度无显著差异;而NC1处理后,野生型细胞中可见明显的钠离子内流及荧光信号增强,该效应在TRPM4敲低细胞中被显著抑制(图4(a)).对多视野下细胞平均荧光强度进行统计分析,进一步确认NC1引起的钠离子积累依赖于TRPM4表达(图4(b, c)).流式细胞术和酶标仪荧光检测的结果也一致表明,TRPM4敲低可有效阻断NC1诱导的细胞内钠离子浓度升高(图4(d~g)).为进一步明确钠内流对细胞存活的影响,我们通过CCK-8实验检测发现,在NC1作用下,TRPM4敲低细胞的存活率显著高于野生型细胞(图4(h, i)).这表明,由于TRPM4通道减少,钠离子内流受限,从而增强了细胞对NC1诱导死亡的抵抗能力.

综上所述,本研究并通过药理学手段证实:在三阴性乳腺癌细胞中,特异性激活TRPM4通道足以引发钠离子内流,并最终导致细胞坏死.实验结果明确支持了“TRPM4介导的NECSO”机制在TNBC细胞中的存在.该发现将“高盐”的宏观关联转化为对“钠离子通道功能”的微观机制探索,揭示了TRPM4的持续激活通过破坏钠离子稳态而发挥促癌细胞死亡作用,为理解离子通道在肿瘤生物学中的功能提供了新的视角.

## 2.5 TRPM4在TNBC发生发展中的机制探索

如前所述,本研究主要基于细胞系模型,对TRPM4介导的NECSO机制进行了验证,并系统探讨了TRPM4在TNBC恶性表型中的功能.为进一步探讨TRPM4在TNBC发生发展中的机制,我们通过慢病毒感染,利用TNBC细胞系构建了TRPM4敲低模型,并用高通量测序技术进行转录组测序.对TNBC细胞野生型和TRPM4敲低型进行差异表达基因分析(图5(a)).GO富集分析表明,野生型中钠离子转运显著上调(图5(b)),KEGG通路分析中TRPM4敲低型细胞中PI3K/Akt信号通路和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关通路下调(图5(c)),其通路在不同细胞功能(包括代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成)方面和调节细胞表型和行为方面发挥重要作用,这与我们上述研究成果不谋而合.此外,GSEA分析结果显示,在构建的TRPM4敲低模型中,敲低TRPM4会使肿瘤相关通路尤其是转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号通路下调并对Smad蛋白磷酸化产生影响(图5(d-f)).

## 3 讨论

本研究确立了TRPM4作为TNBC中兼具关键致癌驱动因子与情境依赖性细胞死亡介导者的双重角色.生物信息学分析表明,TRPM4在TNBC中高表达,且其表达水平与患者不良预后显著相关,提示其作为预后生物标志物的潜力.功能实验进一步揭示,TRPM4的作用高度依赖细胞所处的微环境状态:在生理条件下,TRPM4通过调控离子稳态维持肿瘤细胞的恶性表型,其敲低可显著抑制TNBC细胞的增殖、迁移与侵袭能力;而在药物(如NC1)诱导的应激状态下,TRPM4则介导大量钠离子内流,触发NECSO,此时敲低TRPM4反而增强细胞对该死亡形式的抵抗.这一“双刃剑”特性为靶向TRPM4的治疗策略提供了双向思路:既可开发抑制剂以遏制肿瘤进展,也可在特定情境下利用激动剂诱导其过度激活而清除癌细胞.此外,在探索TRPM4在TNBC发生发展中的作用机制时发现,TRPM4敲低模型中与肿瘤相关的PI3K/Akt通路及ECM相关通路均出现下调,同时TGF- $\beta$ 信号通路中Smad的磷酸化水平亦受到影响.

离子通道在癌症中的功能日益受到关注,它们通过调控膜电位、离子稳态及下游信号通路,在肿瘤发生发展中扮演复杂角色,且常表现出不同情境依赖

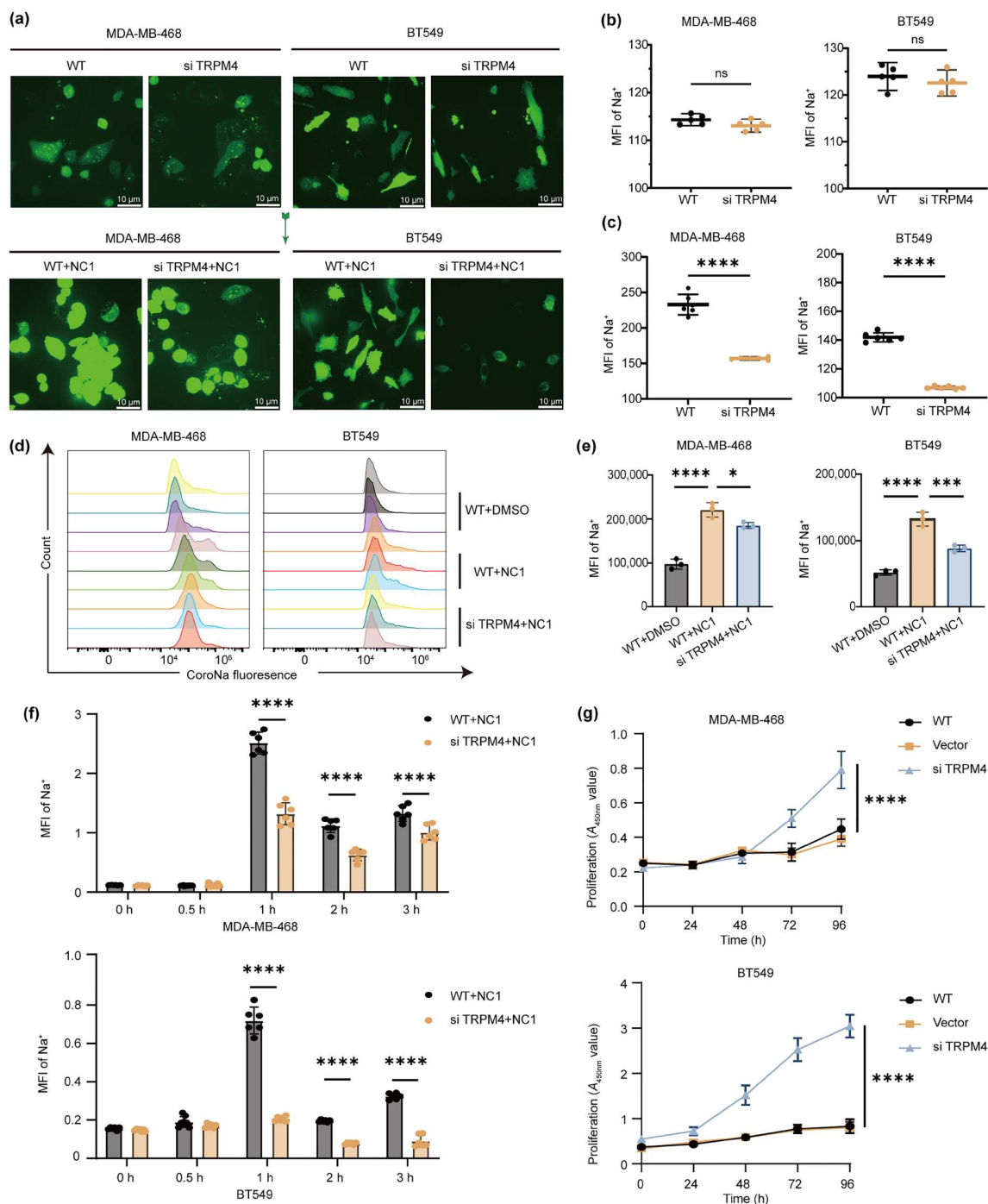


**图 4** (网络版彩色)NECSO在TNBC细胞中的验证。(a) 活细胞成像显示野生型与 $TRPM4$ 敲低细胞在NC1处理下胞内钠离子的基线水平及动态变化,比例尺=10  $\mu\text{m}$ 。(b, c) MDA-MB-468和BT549细胞平均荧光强度的定量分析。(d, e) 流式细胞术检测NC1处理后MDA-MB-468和BT549细胞内钠离子浓度的升高情况及定量分析。(f, g) 酶标仪荧光检测显示NC1处理后MDA-MB-468和BT549细胞内钠离子浓度升高。(h, i) CCK-8实验显示NC1作用下野生型与 $TRPM4$ 敲低组细胞的活力变化。\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns, 不显著

**Figure 4** (Color online) Validation of NECSO in TNBC cells. (a) Live-cell imaging showed the baseline level of sodium ions and the changes of intracellular sodium ions in the wild-type and the  $TRPM4$ -knockdown cells group with NC1 treatment. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (b, c) Quantitative analysis of average fluorescence intensity in MDA-MB-468 and BT549 cells. (d, e) Flow cytometry indicated the increased intracellular sodium ion concentration and the quantitative analysis of it in MDA-MB-468 and BT549 cells with the treatment of NC1. (f, g) Microplate reader fluorescence detection indicated the increased intracellular sodium ion concentration in MDA-MB-468 and BT549 cells. (h, i) CCK-8 assay showed the viability of wild-type cell group and  $TRPM4$ -knockdown group cells under the action of NC1. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns, not significant

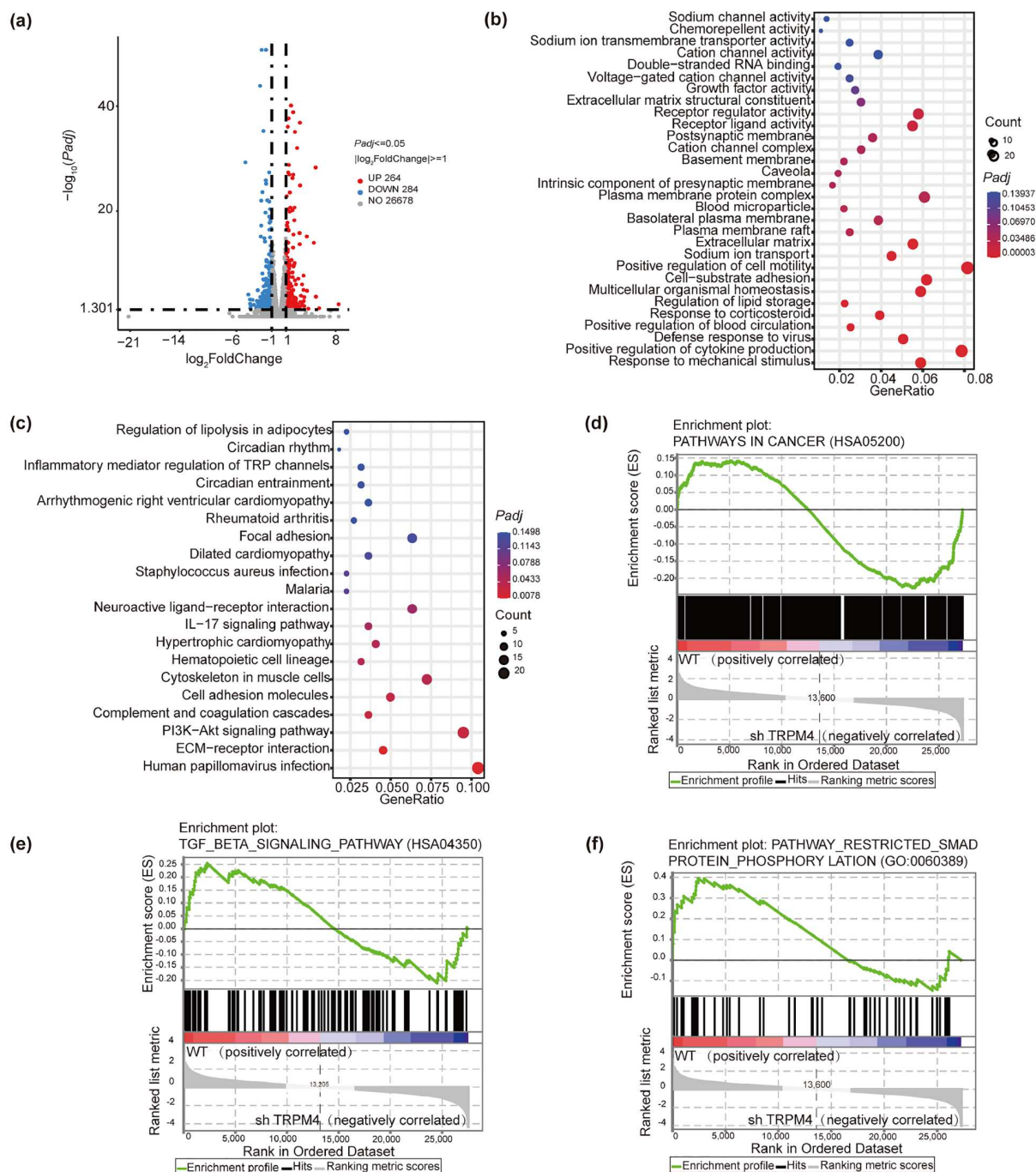


图 5 (网络版彩色)TRPM4在TNBC发生发展中的机制探索。(a) TNBC细胞*TRPM4*敲低模型DEGs分析。(b, c) DEGs的GO富集分析以及KEGG通路富集分析气泡图可视化结果。(d-f) GSEA可视化结果

**Figure 5** (Color online) Exploration of the simple mechanism of TRPM4 in the occurrence and development of TNBC. (a) DEGs analysis in the *TRPM4* knockdown model of TNBC cells. (b, c) GO enrichment analysis of DEGs and bubble plot visualization of KEGG pathway enrichment results. (d-f) Visualization results of GSEA

性<sup>[19~21]</sup>。这种复杂性体现在多个层面: 例如, 在肿瘤细胞中, 机械敏感性离子通道瞬时感受器电位香草酸受体4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)可

促进钙内流, 进而驱动细胞增殖、迁移和外渗; 然而, 在内皮细胞中, TRPV4的激活可通过调节血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor

2, VEGFR2)的磷酸化状态及亚细胞定位,促进血管正常化并抑制异常血管生成,从而可能抑制肿瘤进展<sup>[22,23]</sup>;此外,在胶质瘤模型中,TRPV4激活通过诱导线粒体功能障碍和致死性线粒体自噬,导致肿瘤细胞发生自噬性死亡<sup>[24]</sup>。这些机制差异为靶向治疗提供了理论基础:例如,TRPV4特异性激动剂GSK1016790A已被证明可选择性抑制乳腺癌生长<sup>[25]</sup>。类似地,PIEZO通道赋予胶质瘤细胞机械感知能力,通过整合素-黏着斑激酶信号通路促进组织硬化及肿瘤增殖,其过表达加剧胶质瘤进展<sup>[26]</sup>。此外,线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)的功能则更为复杂,其活性增强(如结直肠癌)或减弱(如黑色素瘤)在不同肿瘤类型中分别关联促癌或抑癌效应,表明其功能的精确平衡至关重要<sup>[27]</sup>。这些先例与本研究关于TRPM4的发现共同表明,离子通道是癌症治疗中一个机制丰富且前景广阔的重要方向。

值得注意的是,对于在TRPM4敲低模型中下调的PI3K/Akt通路以及TGF- $\beta$ 信号通路。TGF- $\beta$ 是一种多能细胞因子,有研究发现TGF- $\beta$ 可通过肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF-6)多泛化PI3K调控亚基p85 $\alpha$ ,并促进TGF- $\beta$  I型受体与p85 $\alpha$ 之间复合物的形成,从而激活了

PI3K和Akt,进而促进前列腺癌细胞迁移的分子机制<sup>[28]</sup>。此外,Smad是TGF- $\beta$ 相关信号传导活动中的关键下游介质,不仅调控TGF- $\beta$ 家族的细胞因子等直接靶基因的转录,同时Smad蛋白还与其他肿瘤相关信号通路进行广泛的交互作用<sup>[29]</sup>,对于细胞组织稳态具有重要影响。这提示TRPM4可能通过调控多条信号通路参与TNBC的发生发展。

尽管本研究为TRPM4在TNBC中的功能提供了扎实的实验证据,但仍存在一定局限性。目前对TRPM4介导的NECSO及其在恶性表型中作用的验证主要在细胞系模型中进行,未能完全模拟体内肿瘤微环境的复杂性。此外,TRPM4下游的具体信号传导机制仍有待深入阐明。未来的研究应致力于在更接近生理条件的模型(如患者来源异种移植模型)中验证TRPM4的功能,并深入探索其调控TNBC恶性行为的分子通路,进而评估靶向TRPM4(无论是作为单药还是与现有疗法联用)的治疗潜力。综上所述,本研究确立了TRPM4作为TNBC中一个关键的预后生物标志物和潜在治疗靶点,并揭示了其在肿瘤生物学中的双重功能。随着离子通道作为药物靶点的潜力日益凸显,针对TRPM4的进一步探索有望为开发TNBC的精准治疗策略提供重要理论基础和实验依据。

## 参考文献

- 1 Siegel R L, Kratzer T B, Giaquinto A N, et al. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75: 10–45
- 2 Wagle N S, Nogueira L, Devasia T P, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2025. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75: 308–340
- 3 Vennekens R, Nilius B. Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, 179: 269–285
- 4 Hong X, Yu J J. MicroRNA-150 suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis in prostate cancer through the TRPM4-mediated  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316: C463–C480
- 5 Sagredo A I, Sagredo E A, Pola V, et al. TRPM4 channel is involved in regulating epithelial to mesenchymal transition, migration, and invasion of prostate cancer cell lines. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 2037–2050
- 6 Armisén R, Marcelain K, Simon F, et al. TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the  $\beta$ -catenin signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 103–109
- 7 Wang C, Chen J, Kuang Y, et al. A novel methylated cation channel TRPM4 inhibited colorectal cancer metastasis through  $\text{Ca}^{2+}$ /Calpain-mediated proteolysis of FAK and suppression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Int J Biol Sci*, 2022, 18: 5575–5590
- 8 Ghosh S, Yang R, Duraki D, et al. Plasma membrane channel TRPM4 mediates immunogenic therapy-induced necrosis. *Cancer Res*, 2023, 83: 3115–3130
- 9 Fu W, Wang J, Li T, et al. Persistent activation of TRPM4 triggers necrotic cell death characterized by sodium overload. *Nat Chem Biol*, 2025, 21: 1238–1249
- 10 Mozaffarian D, Fahimi S, Singh G M, et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 2014, 371: 624–634
- 11 Mattson D L. Immune mechanisms of salt-sensitive hypertension and renal end-organ damage. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15: 290–300
- 12 Jiang X, Sundström B, Alfredsson L, et al. High sodium chloride consumption enhances the effects of smoking but does not interact with SGK1 polymorphisms in the development of ACPA-positive status in patients with RA. *Ann Rheumatic Dis*, 2016, 75: 943–946
- 13 Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 2013,

- 496: 518–522
- 14 Zhou G, Gan L, Zhao B, et al. Adding salt to foods and risk of psoriasis: a prospective cohort study. *J Autoimmunity*, 2024, 147: 103259
- 15 Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer. *Lancet*, 2020, 396: 635–648
- 16 Wu X, Chen L, Cheng J, et al. Effect of dietary salt intake on risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Nutrients*, 2022, 14: 4260
- 17 D'elia L, Rossi G, Ippolito R, et al. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Clin Nutr*, 2012, 31: 489–498
- 18 He W, Xu J, Mu R, et al. High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Nat Commun*, 2020, 11: 1732
- 19 Frede J, Fraser S P, Oskay-Özcelik G, et al. Ovarian cancer: ion channel and aquaporin expression as novel targets of clinical potential. *Eur J Cancer*, 2013, 49: 2331–2344
- 20 Levin M. Bioelectric signaling: reprogrammable circuits underlying embryogenesis, regeneration, and cancer. *Cell*, 2021, 184: 1971–1989
- 21 Gao Y, Liao P. TRPM4 channel and cancer. *Cancer Lett*, 2019, 454: 66–69
- 22 Kanugula A K, Adapala R K, Midha P, et al. Novel noncanonical regulation of soluble VEGF/VEGFR2 signaling by mechanosensitive ion channel TRPV4. *FASEB J*, 2019, 33: 195–203
- 23 Kanugula A K, Adapala R K, Jamaiyar A, et al. Endothelial TRPV4 channels prevent tumor growth and metastasis via modulation of tumor angiogenesis and vascular integrity. *Angiogenesis*, 2021, 24: 647–656
- 24 Huang T, Xu T, Wang Y, et al. Cannabidiol inhibits human glioma by induction of lethal mitophagy through activating TRPV4. *Autophagy*, 2021, 17: 3592–3606
- 25 Peters A A, Jamaludin S Y N, Yapa K T D S, et al. Oncosis and apoptosis induction by activation of an overexpressed ion channel in breast cancer cells. *Oncogene*, 2017, 36: 6490–6500
- 26 Chen X, Wanggou S, Bodalia A, et al. A feedforward mechanism mediated by mechanosensitive ion channel PIEZO1 and tissue mechanics promotes glioma aggression. *Neuron*, 2018, 100: 799–815.e7
- 27 Colussi D M, Stathopoulos P B. The mitochondrial calcium uniporter: balancing tumorigenic and anti-tumorigenic responses. *J Physiol*, 2024, 602: 3315–3339
- 28 Hamidi A, Song J, Thakur N, et al. TGF- $\beta$  promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 $\alpha$ . *Sci Signal*, 2017, 10: eaal4186
- 29 Luo K. Signaling cross talk between TGF- $\beta$ /Smad and other signaling pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9: a022137

## 补充材料

图S1 *TRPM4*在非TNBC不同乳腺癌亚型中的表达及其不同表达水平下患者生存分析

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “TRPM4: 驱动三阴性乳腺癌恶性进展与介导钠超载死亡的‘双刃剑’靶点”

# TRPM4: a “double-edged sword” target driving malignant progression of triple-negative breast cancer and mediating sodium overload-induced cell death

Qiuchen Kong<sup>1</sup>, Yong Wu<sup>2</sup>, Zhenkun Na<sup>3</sup>, Qiong Yang<sup>1</sup> & Lijiao Xu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China

<sup>2</sup> Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of South China University of Technology (Guangzhou First People's Hospital), Guangzhou 510000, China

<sup>3</sup> Hangzhou Institute of Medicine, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310018, China

\* Corresponding author, E-mail: [lijiao03040904@163.com](mailto:lijiao03040904@163.com)

Breast cancer currently represents a significant global health burden, exhibiting the highest incidence and mortality rates among malignancies in women. Within this landscape, triple-negative breast cancer (TNBC)—defined by the lack of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression—accounts for approximately 15%–20% of all cases. TNBC is clinically distinguished by its aggressive biological behavior, substantial heterogeneity, high propensity for visceral and brain metastasis, and an extremely poor prognosis. Due to the absence of specific therapeutic targets, patients have limited options beyond conventional chemotherapy, underscoring an urgent need to identify novel molecular drivers. Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4 (TRPM4) is a calcium-activated non-selective cation channel that is impermeable to calcium but critically regulates sodium ion influx. This channel modulates membrane potential and, consequently, the driving force for calcium entry, which is pivotal for cellular signaling. While TRPM4 has been implicated in tumor migration and invasion across various cancers, it also mediates a unique, necrotic-like cell death mechanism driven by intracellular sodium overload. Given these potential outcomes, a systematic investigation into the specific functional role of TRPM4 is warranted. In this study, we leveraged bioinformatics approaches to analyze the TCGA and HPA databases. Our analysis revealed that TRPM4 is significantly upregulated in TNBC tissues compared to normal tissues. Kaplan-Meier survival analysis further demonstrated that elevated *TRPM4* expression is positively correlated with reduced overall survival, establishing it as a potential prognostic biomarker. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses indicated that *TRPM4*-associated differentially expressed genes (DEGs) are primarily enriched in multiple oncogenic signaling pathways, suggesting that TRPM4 orchestrates a complex network favoring tumor progression. To elucidate the functional implications of these findings, we established *TRPM4* knockdown models in TNBC cell lines. *In vitro* functional assays demonstrated that *TRPM4* knockdown significantly inhibited cell proliferation, attenuated migration, and suppressed invasive capabilities. Mechanistically, this suppression is likely due to the disruption of sodium ion homeostasis, which impairs the downstream calcium-dependent signaling cascades essential for malignant phenotypes. However, a critical paradox emerged during pharmacological testing. We treated wild-type TNBC cells with NC1 (necrocid-1), a small-molecule compound specifically targeting the TRPM4 channel. Treatment-induced NECSO (necrosis by sodium overload) is a novel form of regulated necrosis. Strikingly, *TRPM4*-knockdown cells exhibited marked resistance to NC1-induced death. This finding highlights a “double-edged sword” effect: while high TRPM4 expression drives malignancy and metastasis (the oncogenic role), the functional presence of the channel is simultaneously a prerequisite for inducing sodium-overload-mediated cell death (the therapeutic vulnerability). In conclusion, our research identifies TRPM4 as a critical regulator in TNBC. We propose a model wherein *TRPM4* knockdown suppresses tumor aggressiveness by disrupting ion homeostasis, yet concurrently confers resistance to sodium-overload necrosis. These insights provide a comprehensive scientific foundation for precision medicine, suggesting that while TRPM4 is a valid therapeutic target, the strategy—whether to inhibit its function or exploit its presence to induce necrosis—must be carefully tailored.

**TRPM4, triple-negative breast cancer, necrosis by sodium overload, dual effect, phenotypic remodeling**

doi: [10.1360/CSB-2025-5614](https://doi.org/10.1360/CSB-2025-5614)