

# 高表达 LINC00626 通过 JAK1/STAT3/KHSRP 信号轴促进食管胃结合部腺癌转移的恶性进展

张 锋<sup>1</sup>, 范林林<sup>2</sup>, 康 霞<sup>2</sup>, 韦海涛<sup>1</sup>, 李 丽<sup>1,2</sup>

河南大学<sup>1</sup>淮河医院胸外科,<sup>2</sup>护理与健康学院, 河南 开封 475001

**摘要:**目的 探究 LINC00626 通过 JAK1/STAT3/KHSRP 信号轴调控食管胃结合部腺癌的恶性进展及分子机制。方法 收集并比较食管胃结合部腺癌组织和癌旁组织 LINC00626、KHSRP 的表达水平。qRT-PCR 法检测食管腺癌细胞系(OE-19、TE-7、BIC-1、FLO-1、SK-GT-4、BE-3)与正常食管上皮细胞系(Het-1A)中 LINC00626、KHSRP 的表达差异。利用慢病毒试剂,构建稳定敲降 LINC00626 的 OE-19、TE-7 细胞和稳定过表达 LINC00626 的 FLO-1、SK-GT-4。取对数生长期 OE-19 细胞分为 sh-NC 组(转染 LV3-NC 慢病毒)、sh-LINC00626 组(转染敲降 LINC00626 慢病毒),TE-7 细胞同上分组;取对数生长期 FLO-1 细胞分为 Vector 组(转染 LV6-NC 慢病毒)、LINC00626 组(转染过表达 LINC00626 慢病毒),SK-GT-4 细胞同上分组。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、Transwell 迁移/侵袭实验检测敲降和过表达 LINC00626 后对食管腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力。裸鼠皮下成瘤实验、肺转移实验检测敲降和过表达 LINC00626 在活体动物体内的作用。Western blot 实验检测敲降和过表达 LINC00626 后 KHSRP 和 JAK/STAT 通路蛋白的表达情况。**结果** LINC00626 和 KHSRP 在食管胃结合部腺癌组织和食管腺癌细胞中表达量显著升高( $P < 0.05$ )。敲降 LINC00626 后,体内和体外食管腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭水平显著下降( $P < 0.01$ ),过表达 LINC00626 后则效果反之( $P < 0.01$ )。在敲降 LINC00626 后, JAK/STAT 信号通路中 JAK1、STAT3 磷酸化水平明显降低( $P < 0.05$ ),过表达 LINC00626 后情况则反之( $P < 0.05$ )。**结论** LINC00626 通过 JAK1/STAT3/KHSRP 信号轴调控食管胃结合部腺癌转移的恶性进程。

**关键词:**食管胃结合部腺癌;LINC00626;JAK1/STAT3;KHSRP;转移

## High LINC00626 expression promotes esophagogastric junction adenocarcinoma metastasis: the mediating role of the JAK1/STAT3/KHSRP axis

ZHANG Feng<sup>1</sup>, FAN Linlin<sup>2</sup>, KANG Xia<sup>2</sup>, WEI Haitao<sup>1</sup>, LI Li<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery, Huaihe Hospital, <sup>2</sup>Institute of Nursing and Health, Henan University, Kaifeng 475001, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of JAK1/STAT3/KHSRP axis in mediating the regulatory effect of LINC00626 on progression of esophagogastric junction adenocarcinoma. **Methods** We collected surgical tumor and adjacent tissue specimens from 64 patients with esophagogastric junction adenocarcinoma and examined the expression levels of LINC00626 and KHSRP. qRT-PCR was used to detect the expressions of LINC00626 and KHSRP in 6 esophageal adenocarcinoma cell lines (OE-19, TE-7, Bic-1, Flo-1, SK-GT-4, and BE-3) and a normal esophageal epithelial cell line (HET-1A). OE-19 and TE-7 cell lines with stable LINC00626 knockdown and FLO-1 and SK-GT-4 cells stably overexpressing LINC00626 were constructed by lentiviral transfection, and the changes in proliferation, migration and invasion of the cells were evaluated using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and Transwell migration/invasion assay. The expressions of KHSRP and JAK/STAT pathway proteins in the transfected cells were detected with Western blotting. The effects of LINC00626 knockdown and overexpression on subcutaneous tumor formation and lung metastasis of OE-19 and FLO-1 cell xenografts were tested in nude mice. **Results** The expression levels of LINC00626 and KHSRP were significantly increased in esophagogastric junction adenocarcinoma tissues and in esophageal adenocarcinoma cells. LINC00626 knockdown obviously inhibited the proliferation, migration and invasion of esophageal adenocarcinoma cells *in vitro* and decreased their tumor formation and lung metastasis abilities in nude mice, while overexpression of LINC00626 produced the opposite effects. In esophageal adenocarcinoma cells, LINC00626 knockdown significantly decreased and LINC00626 overexpression strongly enhanced the phosphorylation of JAK1 and STAT3. **Conclusion** High LINC00626 expression promotes esophageal-gastric junction adenocarcinoma metastasis by activating the JAK1/STAT3/KHSRP signal axis.

**Keywords:** esophagogastric junction adenocarcinoma; LINC00626; JAK1/STAT3; KHSRP; metastasis

收稿日期:2023-10-28

基金项目:河南省科技厅指导项目(242102310184);河南省科技厅指导项目(242102310280);河南省科技厅指导项目(242102310100);河南省科技厅指导项目(242102310197);河南省教育厅资助项目(24A320002)

作者简介:张 锋,副主任医师,E-mail: 77371692@qq.com;范林林,在读硕士研究生,E-mail: 104754211911@henu.edu.cn。张 锋、范林林共同为第一作者

通信作者:韦海涛,主任医师,E-mail: taoge9885@163.com;李 丽,教授,E-mail: 10210051@vip.henu.edu.cn

食管胃结合部腺癌(EGJ)在全球癌症相关死亡原因中排名第4<sup>[1]</sup>,每年有超过150万患者<sup>[2]</sup>,由于早期症状不明显,EGJ患者在首次诊断时往往会出现局部侵袭和远处转移,导致EGJ患者的预后较差<sup>[3]</sup>,总体五年生存率约为10%~15%<sup>[4]</sup>。有关EGJ发病机制的临床研究尚未明确<sup>[5]</sup>。因此,深入研究EGJ发生与发展的分子机制,并寻找用于临床诊断和治疗EGJ的分子标志物<sup>[6]</sup>,对于改善临床诊断和治疗方法具有重要意义<sup>[7,8]</sup>。

长链非编码RNA(lncRNA)的失调在各种癌症中已经普遍存在,并被确认为人类癌症的重要调节因子<sup>[9]</sup>。越来越多的lncRNA被证实在EGJ细胞增殖、凋亡、细胞周期、迁移和侵袭中发挥着关键作用<sup>[4, 10]</sup>。因此,lncRNA不仅是一种潜在生物标志物,也是一种新的分子治疗靶点<sup>[11]</sup>。JAK/STAT信号通路是许多细胞因子进行细胞内外信息传导的主要通路,研究表明JAK/STAT3信号通路广泛参与细胞增殖、分化、凋亡和炎症等多种生理过程<sup>[12]</sup>,并与癌症的发病机制和进展密切相关<sup>[13]</sup>。KH型剪接调节蛋白(KHSRP)含有多个KH结构域,这些结构域通过与靶RNA分子结合,调节其在剪接过程中的选择性和效率。KHSRP与RNA结合后能够影响RNA的稳定性、核外转运以及翻译的调控。除了参与RNA的剪接和转运,KHSRP还对RNA的转录、剪接和翻译后修饰等起到调节作用<sup>[14]</sup>。

LINC00626在EGJ中的作用机制目前尚未见报道。鉴于lncRNA在EGJ中的潜在作用,我们旨在研究LINC00626在EGJ发生发展中的作用。已经有充分研究表明,非编码转录本通过以序列特异性模式与RNA结合蛋白(RBP)相互作用,在癌症中发挥着重要的调节作用<sup>[15]</sup>,KHSRP参与各种生物过程中的信号转导和转录激活因子(STAT)和NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[16]</sup>。因此,我们在前期质谱分析发现KHSRP基础上研究LINC00626在临床EGJ组织中的表达,并进一步分析其表达水平与JAK/STAT信号通路激活之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞实验

1.1.1 实验细胞、主要试剂及仪器 食管腺癌细胞系OE-19、TE-7、BIC-1、FLO-1、SK-GT-4、BE-3和DMEM培养基(武汉普诺赛公司)。正常食管上皮细胞Het-1A(宁波明舟生物公司)。TRIzol试剂、CCK-8试剂盒、10%聚偏二氟乙烯膜(Sigma Aldrich)。HiScript<sup>®</sup>II逆转录酶试剂盒、通用型高特异性染料法定量PCR检测试剂盒、RIPA缓冲液(北京索莱宝公司),BCA蛋白质定量试剂盒(南京诺唯赞公司),Transwell小室(Corning),慢病毒试剂(上海吉玛公司),流式细胞仪(Beckman),荧光显微镜(Olympus),Nano Drop 2000c分光光度计(赛默飞),酶标仪(北京普天新桥有限公司)。

1.1.2 细胞培养及转染 将细胞放置在5% CO<sub>2</sub>、37 °C的细胞培养箱中用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM培养基进行培养。后续细胞功能实验将选用表达相对较高的(OE-19、TE-7)和表达量相对较低的(FLO-1、SK-GT-4)细胞系进行。首先根据获取的LINC00626全长序列设计特异性敲降和过表达的RNA序列,并构建到稳定敲降载体和稳定过表

达载体上,其中FLO-1、SK-GT-4做过表达处理,OE-19、TE-7做敲降处理。准备4个6孔板,将FLO-1、SK-GT-4、OE-19、TE-7细胞分别接种到6孔板中,加入无双抗的完全培养基DMEM至2 mL,放入培养箱中进行培养,当细胞生长至70~80%以上的密度时开始转染,从-80 °C冰箱取出敲降LINC00626及敲降对照LV3-NC慢病毒和过表达LINC00626慢病毒以及过表达对照LV6-NC慢病毒放置冰上,待融化后使用移液器分别吸出20  $\mu$ L慢病毒和2  $\mu$ L polybrene液加入原先铺好的6孔板的孔中,轻轻混匀,放置细胞培养箱中进行培养。12 h后吸去含有病毒的培养基,换上新鲜培养基,37 °C继续培养。培养48 h后弃去细胞六孔板中带病毒液的培养基,按照4  $\mu$ L/mL加入嘌呤霉素,24 h加大至8  $\mu$ L/mL后根据细胞状态继续筛选,每2 d或者有大量漂浮细胞时换液。持续观察直至没有死亡细胞后得到稳定转染的敲降OE-19、阴性对照及敲降TE-7、阴性对照和过表达FLO-1、阴性对照及过表达SK-GT-4、阴性对照细胞株。OE-19细胞分为sh-NC组(转染LV3-NC慢病毒)sh-LINC00626组(转染敲降LINC0062慢病毒);TE-7细胞分为sh-NC组(转染LV3-NC慢病毒)sh-LINC00626组(转染敲降LINC0062慢病毒);FLO-1细胞分为Vector组(转染LV6-NC慢病毒)INC00626组(转染过表达LINC0062慢病毒);SK-GT-4细胞分为Vector组(转染LV6-NC慢病毒)INC00626组(转染过表达LINC0062慢病毒)。

1.1.3 qRT-PCR 使用TRIzol试剂提取组织、细胞中的总RNA,Nano Drop 2000c分光光度计测量RNA的浓度和纯度,然后进行反转录。使用qRT-PCR试剂盒检测LINC00626、KHSRP mRNA的表达量。引物由上海生物工程公司合成。GAPDH和U6作为对照,2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行分析(表1)。

1.1.4 CCK-8实验 将细胞以1 $\times$ 10<sup>4</sup>/孔接种到96孔板中,分别在细胞贴壁后、24、48、72和96 h时间点测试。每次测试前采用CCK-8试剂盒在每个孔中加入110  $\mu$ L培养基(100  $\mu$ L无血清培养基+10  $\mu$ L CCK-8溶液),孵育2 h后用酶标仪在450 nm处测量吸光度。

1.1.5 Transwell小室实验 采用Transwell小室(含/不含Matrigel胶)检测细胞侵袭、迁移能力。将200  $\mu$ L无血清培养基添加到上室,在下室中添加含有胎牛血清的培养基700  $\mu$ L。孵育24 h(迁移)/48 h(侵袭)后,去除留在膜上的细胞,并进行固定和染色。在倒置显微镜下以400倍率拍摄图像。对5个随机区域中的细胞进行计数,获得迁移或侵袭细胞平均数。

1.1.6 Western blotting实验 采用RIPA缓冲液提取细胞总蛋白。BCA蛋白质定量试剂盒进行定量。通过SDS凝胶电泳将蛋白质分离,之后转移到PVDF膜中,

表1 片段引物  
Tab.1 Fragment primers

lncRNA	Primer sequences (5'-3')
LINC00626-R	5'-CCAGACCTATCAGAATAAT-3'
LINC00626-F	5'-TGTTGAAAAGTCAGCCAT-3'
KHSRP mRNA-R	5'-AATGAGTACGGATCTCGGATTGG-3'
KHSRP mRNA-F	5'-CCGTCATCTTGCTTGAAGTGA-3'
GAPDH-R	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH-F	5'-GAAGATGGTATGGGATTTC-3'
U6-R	5'-CGCTTCGGCACATATACTA-3'
U6-F	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'

在5%脱脂牛奶中室温下封闭1 h,再与GAPDH抗体和一抗KHSRP 4 °C下孵育过夜,使用TBST洗涤3遍,与二抗一起室温下放置1.5 h。使用ECL试剂盒化学发光。

### 1.2 病例标本实验

收集2020年1月和2022年12月在河南大学淮河医院进行手术切除的EGJ患者64例。全部患者手术方式均由同一个手术团队进行,术中在标本离体20 min内迅速取材,无菌条件下留取新鲜EGJ组织及癌旁距肿瘤大于5 cm正常组织。所有参与者已签署知情同意书。本实验经河南大学淮河医院伦理委员会批准(批准编号:HUSOM2023-348)。

### 1.3 裸鼠实验

**1.3.1 皮下成瘤实验** 将32只从北京维通利华公司购买的4-6w雄性裸鼠随机分为4笼,每组8只,分别命名为sh-NC组、sh-LINC00626组、Vector组、LINC00626组。sh-NC组、sh-LINC00626组腹腔注射稳定转染的OE-19细胞,Vector组、LINC00626组腹腔注射稳定转染的FLO-1细胞,注射剂量均为 $5 \times 10^6$ 个细胞。每3 d测量1次肿瘤体积/体质量,体积公式为:体积( $\text{mm}^3$ )=长 $\times$ 宽 $\times$ 0.5。分别于第26天(敲降实验)和第21天(过表达实验)处死小鼠。

**1.3.2 尾静脉肺转移模型实验** 将40只从北京维通利华公司购买的4~6周龄雄性裸鼠,随机分为4笼,每组10只(饲养过程中,sh-NC组和sh-LINC00626组均有2只裸鼠死亡),分别命名为sh-NC组、sh-LINC00626组、Vector组、LINC00626组。sh-NC组、sh-LINC00626组尾静脉注射稳定转染的OE-19细胞,Vector组、LINC00626组尾静脉注射稳定转染的FLO-1细胞。注射浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,尾静脉接种0.1 mL/只。分别于第35天(敲降实验)和第28天(过表达实验)后,以颈椎脱臼法处死裸鼠,剖离并取出肺组织,肉眼和解剖显微镜下同时计数肺部转移病灶数。

### 1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用独立样本 $t$ 检验或单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较。计数资料以例(%)表示,采用卡方检验进行组间比较。采用ROC曲线预测LINC00626的诊断价值。双侧检验,检验校准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 LINC00626在食管胃结合部腺癌组织和细胞系中表达均显著上调**

qRT-PCR结果显示,EGJ组织中LINC00626表达水平高于癌旁组织(图1A, $P<0.001$ );食管腺癌细胞系中LINC00626表达水平高于食管正常上皮细胞(图1B, $P<0.05$ )。ROC显示,LINC00626在64例EGJ组织总样本中AUC=0.8035(图1C, $P<0.001$ );LINC00626在32例EGJ表达上调样本中AUC=0.8635(图1D, $P<0.001$ );32例表达上调EGJ患者不同分期的AUC=0.9228(图1E, $P<0.001$ );32例表达上调EGJ患者有无淋巴结转移的AUC=0.9458(图1F, $P<0.001$ )。

**2.2 LINC00626促进体外细胞增殖、迁移和侵袭**

qRT-PCR实验检测转染效率(图2, $P<0.001$ )。CCK-8实验结果显示,sh-LINC00626组细胞增殖能力明显低于sh-NC组,过表达则反之(图3, $P<0.001$ )。Transwell小室实验结果显示:sh-LINC00626组细胞侵袭、迁移能力明显低于sh-NC组,过表达则反之(图4, $P<0.01$ )。

**2.3 LINC00626促进裸鼠体内细胞生长和转移**

皮下成瘤实验中,sh-LINC00626组中肿瘤体积和质量明显低于sh-NC组,过表达组则反之(图5, $P<0.01$ )。尾静脉肺转移模型实验中,sh-LINC00626组中肺转移结节数量明显低于sh-NC组,过表达组则反之(图6, $P<0.01$ )。

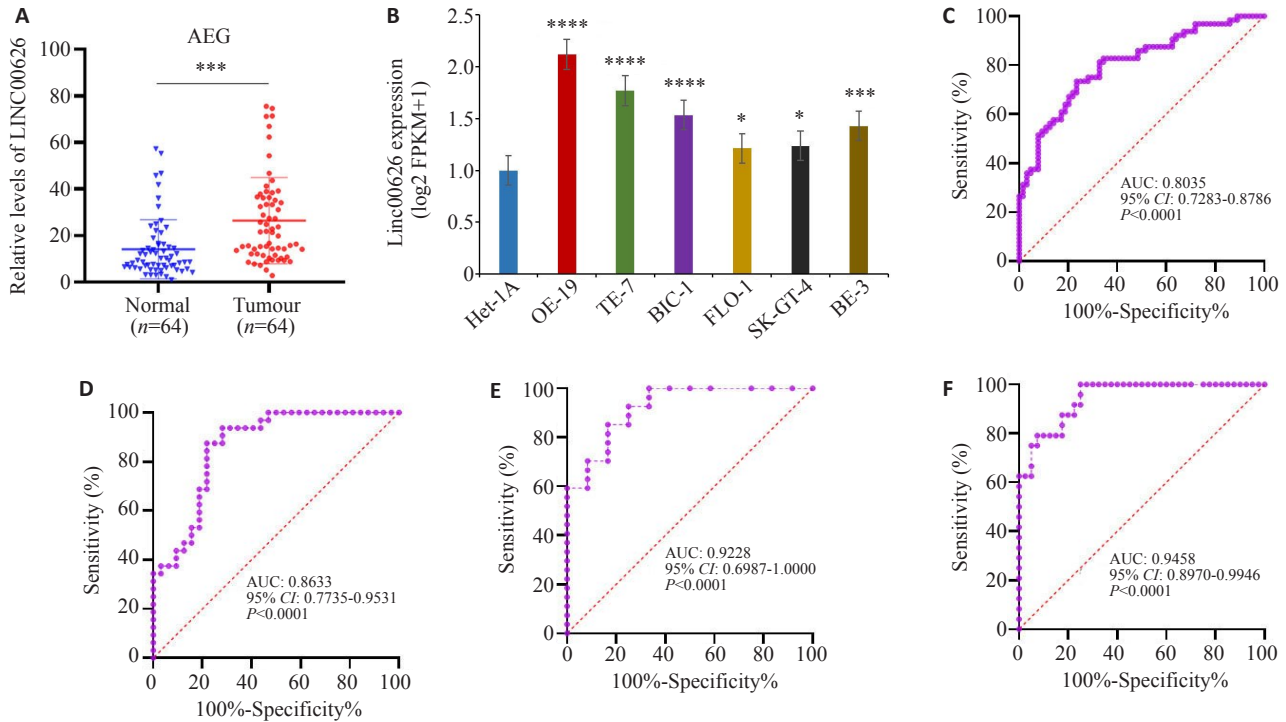


图1 LINC00626在EGJ中高表达

Fig.1 LINC00626 is upregulated in esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma. **A:** qRT-PCR for detecting LINC00626 expression of EGJ adenocarcinoma tissue. **B:** qRT-PCR for detecting LINC00626 expression in esophageal adenocarcinoma cell lines. **C:** ROC curve of LINC00626 expression in 64 EGJ tissue samples. **D:** ROC curve of LINC00626 expression in 32 EGJ tissues with upregulated LINC00626. **E:** ROC curves of LINC00626 expression in 32 cases with upregulated at different stages. **F:** ROC curves of LINC00626 expression in tissues with and without lymph node metastasis in 32 cases. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 vs Het-1A.

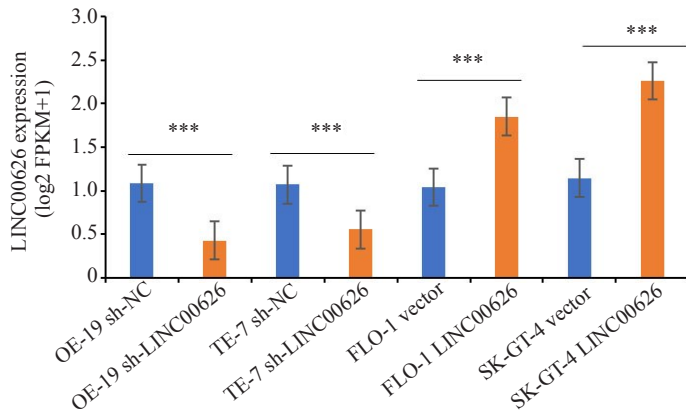


图2 RT-qPCR实验检测转染效率

Fig.2 RT-qPCR experiment to detect transfection efficiency (\*\*\*)P<0.001).

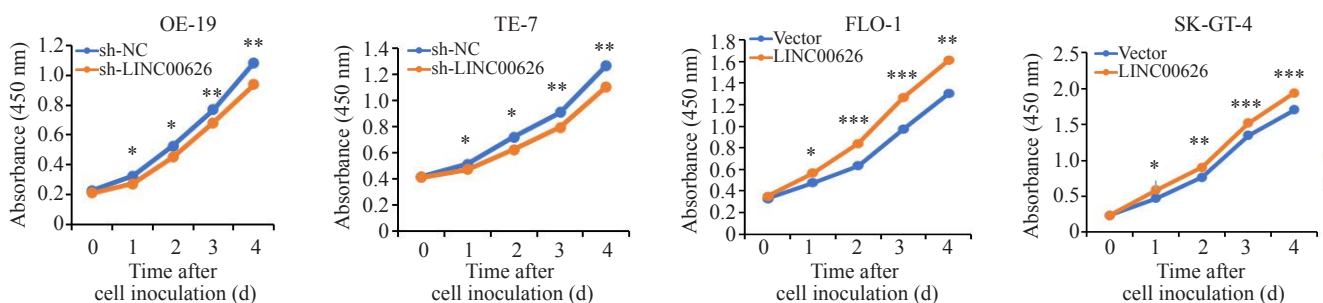


图3 CCK-8实验检测细胞增殖能力

Fig.3 CCK-8 assay for assessing cell proliferation ability (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

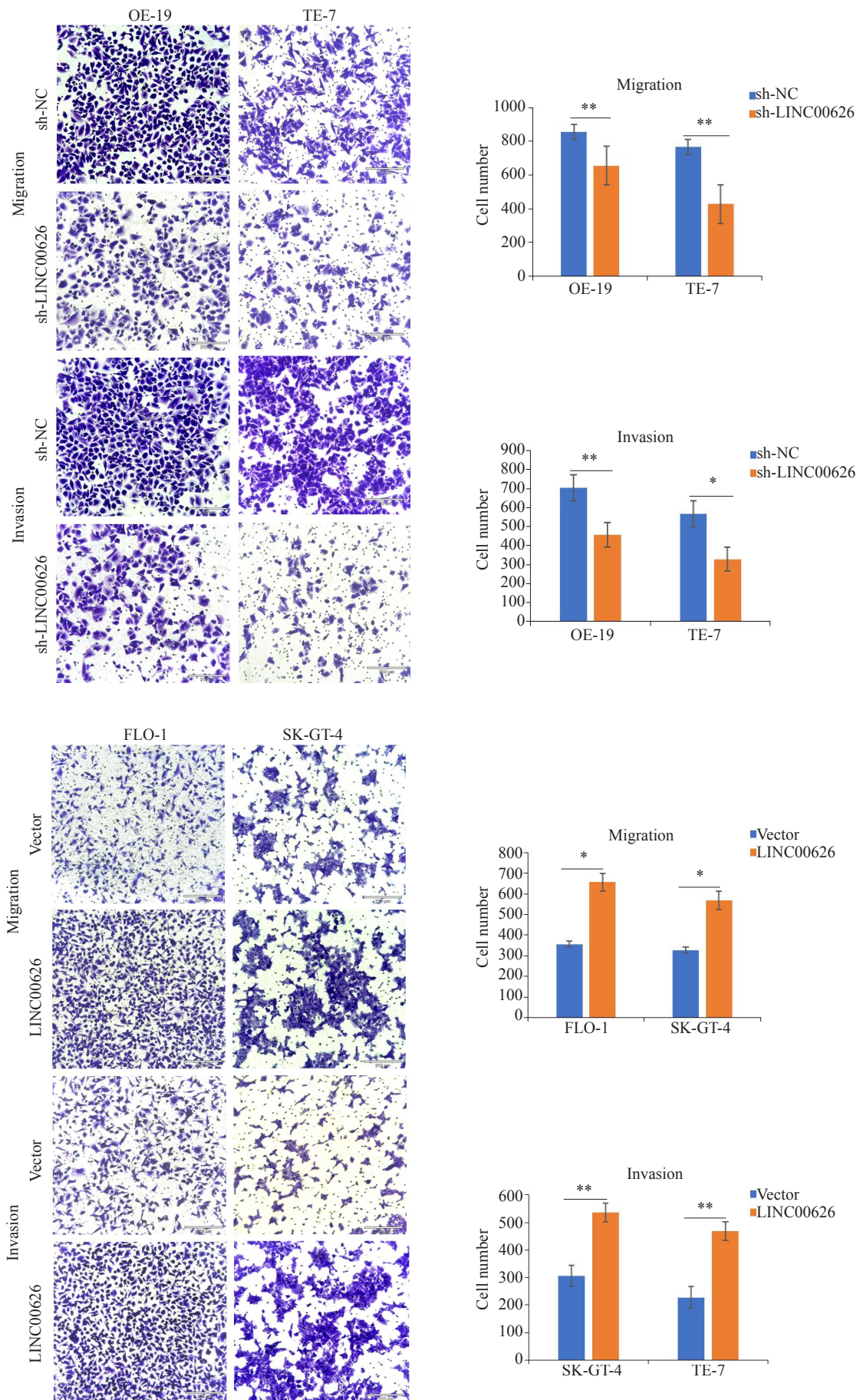


图4 Transwell小室实验检测细胞迁移和侵袭能力

Fig.4 Transwell chamber assay for detecting cell migration and invasion abilities (scale bar=210  $\mu$ m;

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).

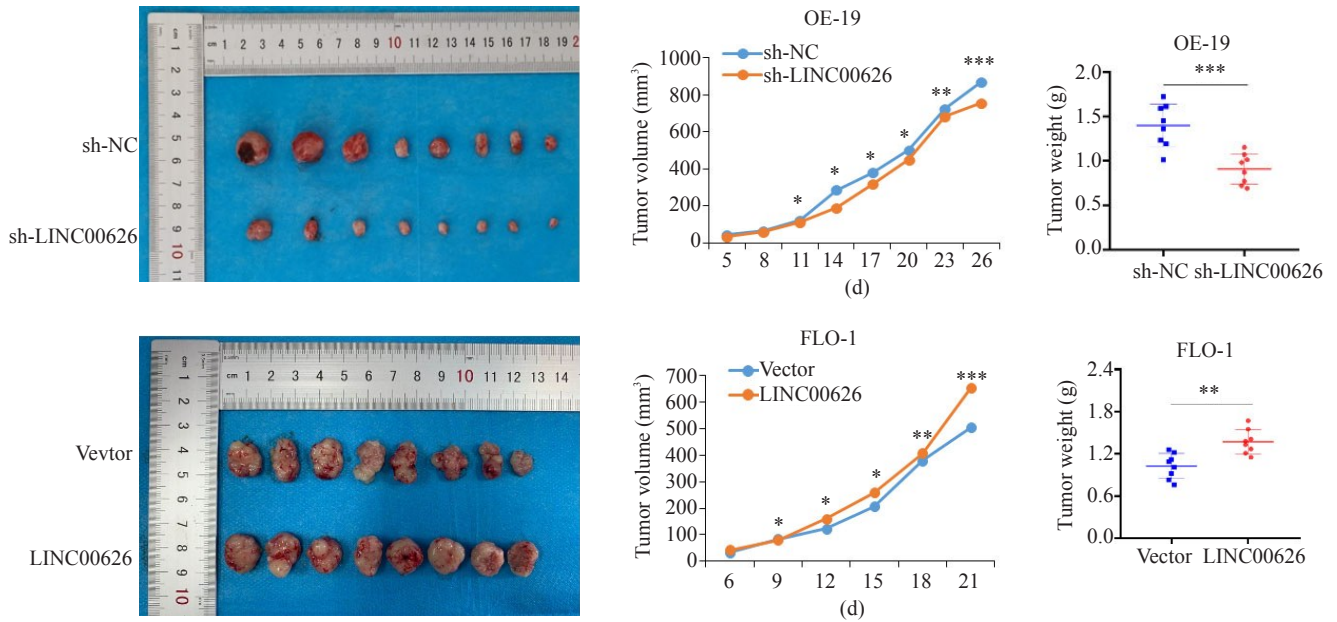


图5 皮下成瘤实验检测LINC00626对裸鼠体内细胞增殖能力的影响

Fig.5 Subcutaneous tumorigenesis experiment for assessing the effect of LINC00626 expression level on cell proliferation ability in nude mice (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

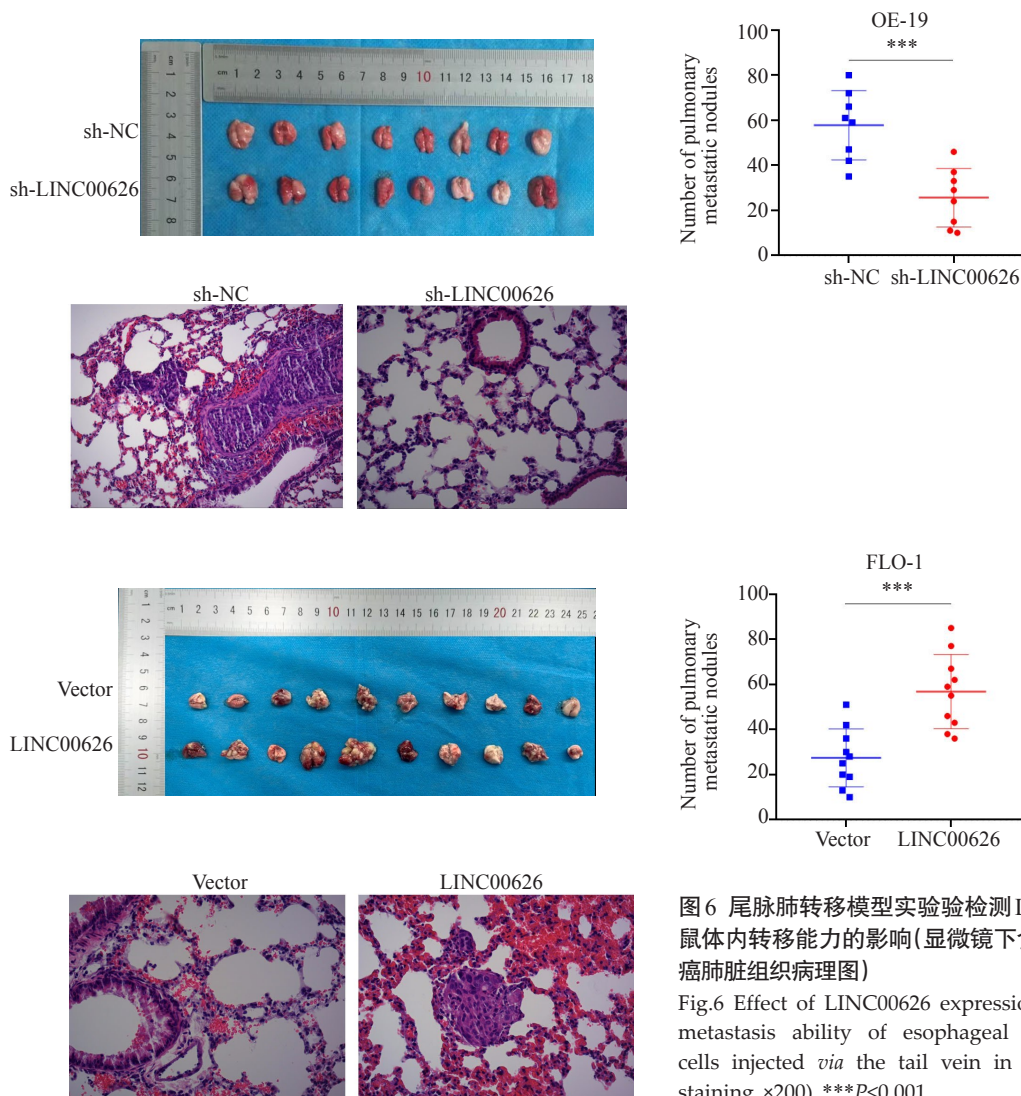


图6 尾脉肺转移模型实验检测LINC00626对裸鼠体内转移能力的影响(显微镜下食管胃结合部腺癌肺脏组织病理图)

Fig.6 Effect of LINC00626 expression level on lung metastasis ability of esophageal adenocarcinoma cells injected *via* the tail vein in nude mice (HE staining,  $\times 200$ ). \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.4 KHSRP在EGJ组织和细胞系中表达均显著上调

qRT-PCR结果显示,EGJ组织中KHSRP表达水平明显高于正常组织(图7A,  $P<0.001$ );食管腺癌细胞系

中KHSRP表达水平高于食管正常上皮细胞(图7B,  $P<0.05$ )。64例EGJ组织中LINC00626和KHSRP呈正相关(图7C,  $P<0.0001$ )。

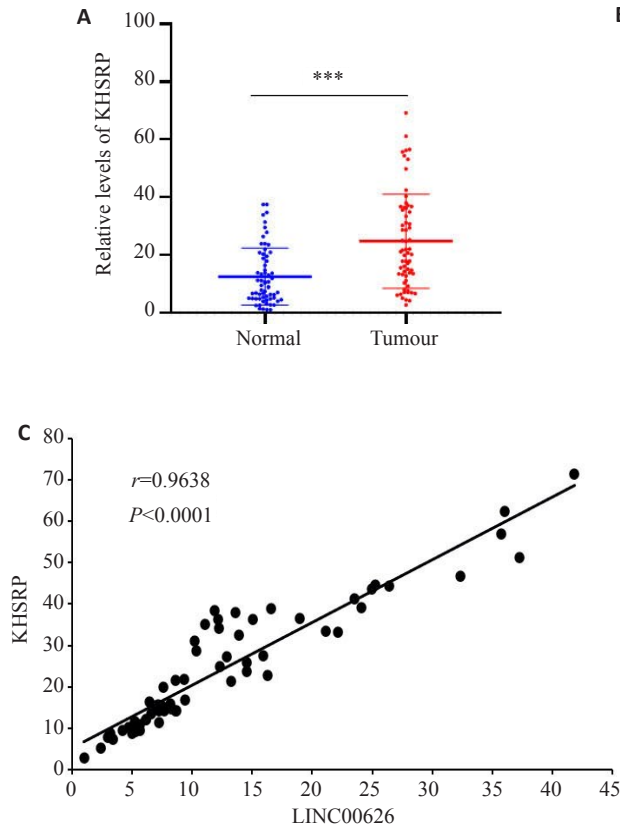


图7 KHSRP在EGJ中高表达

Fig.7 High expression of KHSRP in EGJ adenocarcinoma tissue and esophageal adenocarcinoma cell lines. A: qRT-PCR of KHSRP mRNA expression in EGJ adenocarcinoma. B: qRT-PCR for detecting KHSRP mRNA expression in esophageal adenocarcinoma cell lines. C: Pearson correlation analysis showing a positive correlation between LINC00626 and KHSRP.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.0001$  vs Het-1A.

## 2.5 KHSRP逆转LINC00626对细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响

qRT-PCR结果显示, KHSRP可以逆转敲降LINC00626对细胞的抑制作用(图8A,  $P<0.01$ )。CCK-8结果显示, KHSRP可以逆转sh-LINC00626对细胞增殖的抑制作用(图8B,  $P<0.001$ );Transwell小室实验结果显示, KHSRP可以逆转由sh-LINC00626对细胞迁移、侵袭的抑制作用(图8C,  $P<0.01$ )。

## 2.6 LINC00626在食管胃结合部腺癌中对JAK/STAT信号通路相关mRNA的调控作用

qRT-PCR实验结果显示,与sh-NC组相比,sh-LINC00626组中JAK1、p-JAK-1、STAT3 mRNA表达显著降低, JAK2、p-JAK2、STAT1、STAT2和STAT5 mRNA表达降低不明显(图9A,  $P<0.001$ )。与Vector组相比, LINC00626组JAK1、pJAK-1、STAT3 mRNA表达水平显著增高, JAK2、p-JAK2、STAT1、STAT2和STAT5 mRNA表达增高不明显(图9B,  $P<0.05$ )。

## 2.7 LINC00626对JAK/STAT信号通路相关蛋白的调控作用

Western blot实验结果显示,与sh-NC组相比,sh-LINC00626组中JAK1、p-JAK-1、STAT3蛋白表达显著降低, JAK2、p-JAK2、STAT1、STAT2和STAT5蛋白降低不明显(图10,  $P<0.05$ );与Vector组相比, LINC00626组JAK1、p-JAK1、STAT3表达水平显著升高, JAK2、p-JAK2、STAT1、STAT2和STAT5蛋白升高不明显(图11,  $P<0.05$ )。

## 3 讨论

lncRNA异常表达可以通过调节细胞增殖、迁移和侵袭来发挥肿瘤基因或抑制因子的作用<sup>[17]</sup>,目前,许多lncRNA已被证实可以充当竞争性内源性RNAs在EGJ的发生发展中发挥关键作用<sup>[18, 19]</sup>。本研究发现LINC00626在EGJ组织和细胞系中表达显著上调,且LINC00626可以促进EGJ细胞的增殖、迁移和侵袭。ROC曲线分析表明LINC00626的高表达与EGJ的晚期肿瘤分期和淋巴结转移显著有关。这说明LINC00626是EGJ的一个潜在治疗靶点,它作为一个促癌基因,可以调节体内EGJ转移的恶性进展,在EGJ患者中具有重

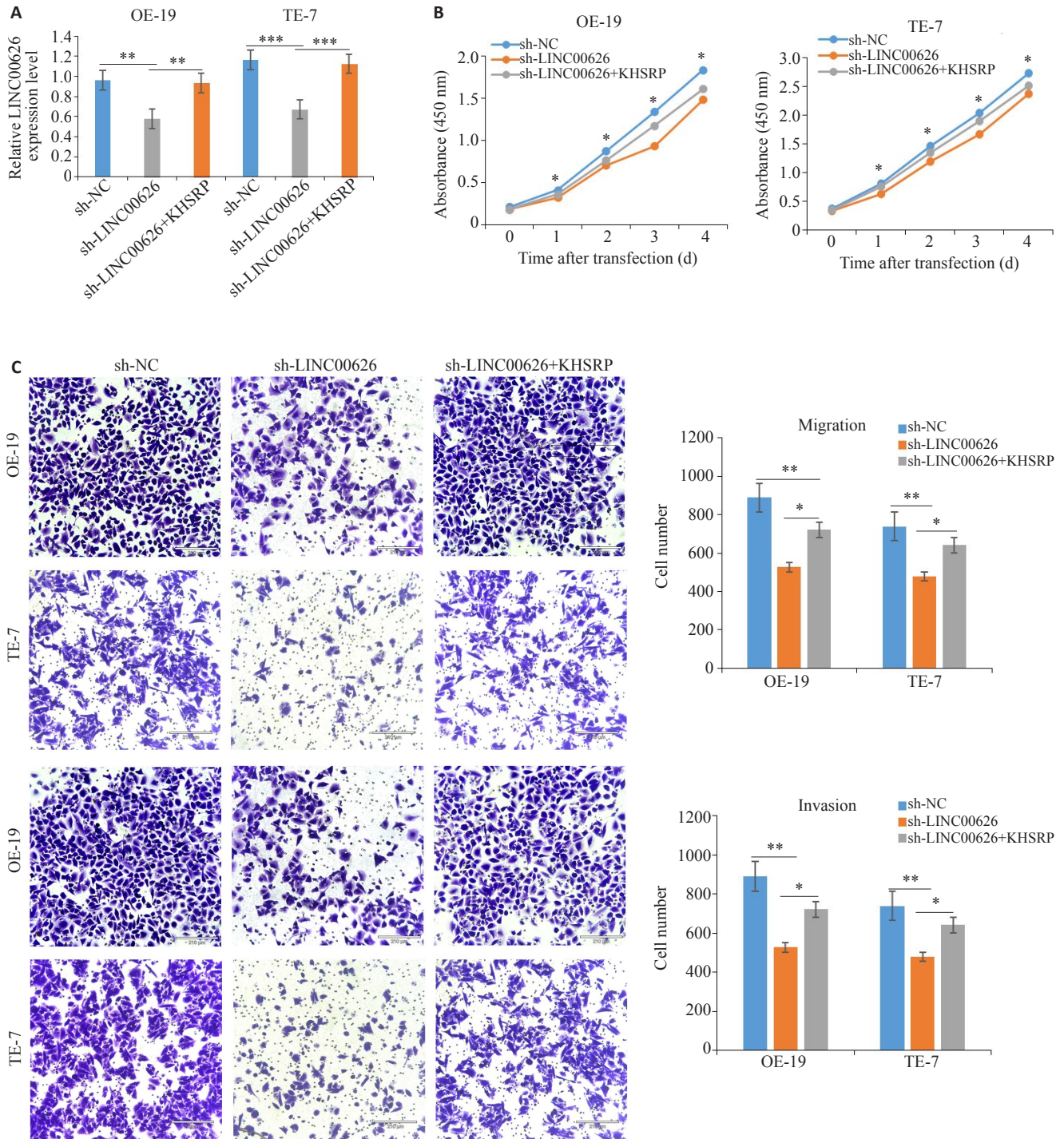


图8 KHSRP过表达可逆转sh-LINC00626对细胞增殖、迁移、侵袭能力的抑制作用

Fig.8 Overexpression of KHSRP reverses inhibitory effect of LINC00626 knockdown on proliferation, migration, and invasion abilities of esophageal adenocarcinoma cells. A: qRT-PCR for detecting transfection efficiency of KHSRP in sh-LINC00626 cells. B: CCK-8 experiment for assessing cell proliferation. C: Transwell chamber assay for assessing cell migration and invasion (scale bar=210 μm). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

要的诊断价值。

JAK/STAT信号通路在癌症的发生和发展过程中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。JAK(Janus激酶)是该通路中的酶类蛋白,可以磷酸化STAT(信号转导和转录激活子),使其进入细胞核并调节基因的转录,STAT1通常被描述为具有诱导细胞凋亡和细胞周期停滞能力的肿瘤抑制因子,

相比之下,STAT3是抑制细胞凋亡的关键介质,并促进对转移、侵袭、增殖和血管生成至关重要的基因的转录<sup>[21]</sup>。在癌症发生过程中,JAK/STAT信号通路可以被异常激活或抑制,导致细胞增殖、分化、凋亡和炎症等生理过程的紊乱<sup>[22]</sup>。例如,肿瘤微环境中的炎症因子可以激活JAK/STAT信号通路,促进癌细胞的增殖和侵袭能



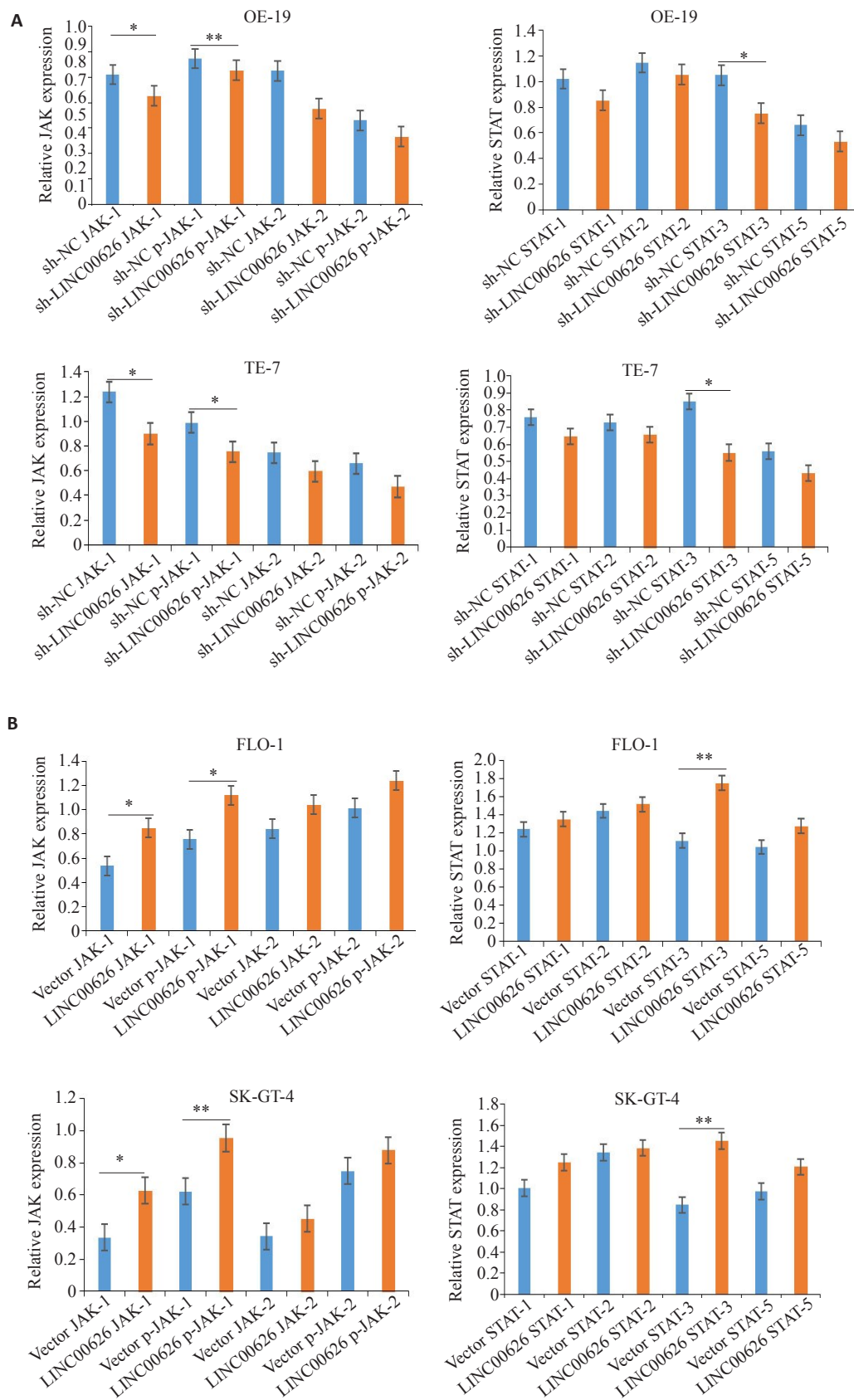


图9 qRT-PCR 检验 LINC00626 对 JAK/STAT 信号通路相关 mRNA 表达情况的影响

Fig.9 qRT-PCR for assessing the effect of LINC00626 on expressions of JAK/STAT signaling pathway. A: mRNA expression levels of JAK/STAT signaling pathway in cells with LINC00626 knockdown. B: mRNA expression levels of the JAK/STAT signaling pathway in cells overexpressing LINC00626. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

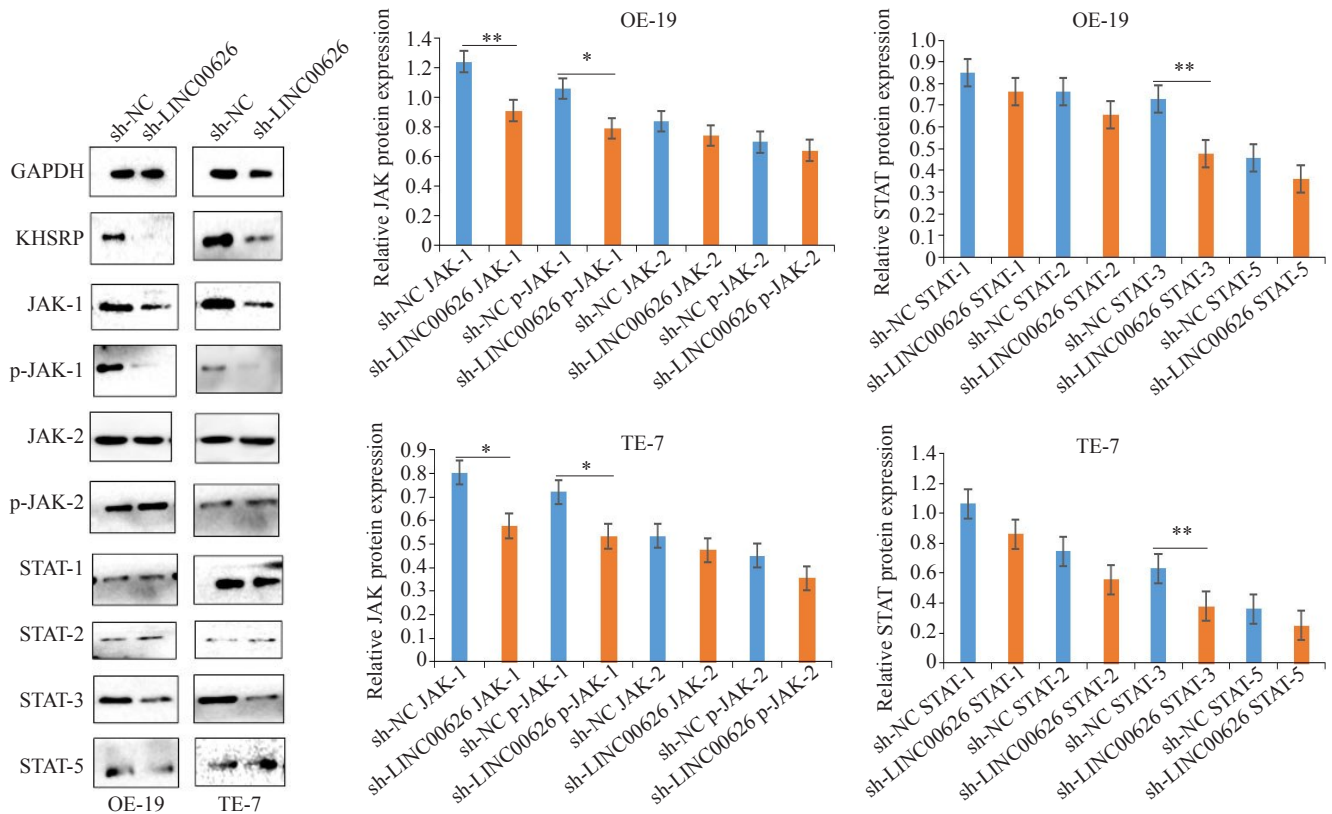


图10 Western blotting检测LINC00626对敲降组JAK/STAT通路相关蛋白表达情况的影响

Fig.10 Western blotting of JAK/STAT pathway-related proteins in esophageal adenocarcinoma cell lines with LINC00626 knockdown. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

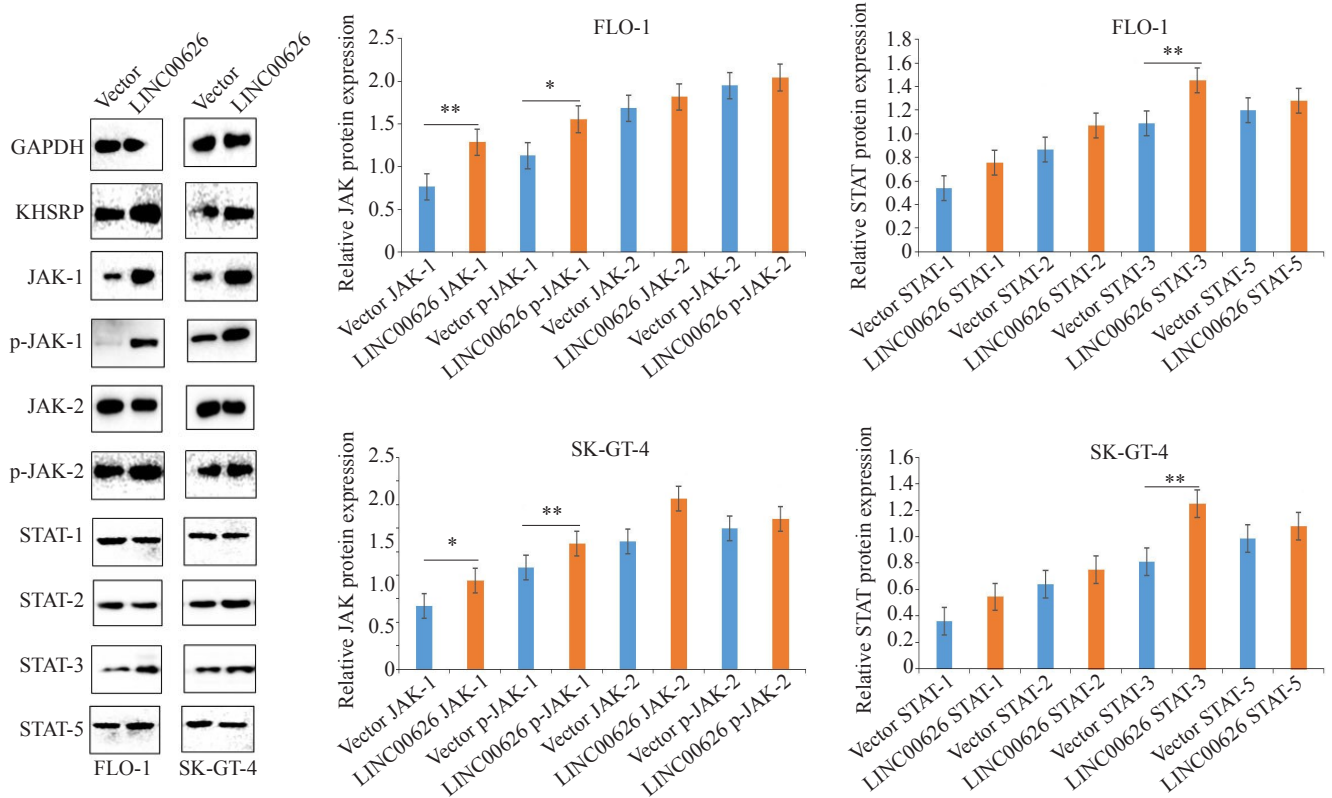


图11 Western blotting检测LINC00626对过表达组JAK/STAT通路相关蛋白表达情况的影响

Fig.11 Western blotting of JAK/STAT pathway-related proteins in esophageal adenocarcinoma cell lines with LINC00626 overexpression. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

力。此外,某些癌细胞可以通过突变激活 JAK 或 STAT 蛋白,导致细胞增殖和抗凋亡能力异常。Zhang 等发现 JAK/STAT 信号通路上调,STAT3 的抑制可减少乳腺癌中的干细胞群<sup>[23]</sup>。本研究应用 qRT-PCR 和 Western blot 实验确定 JAK/STAT 信号通路在 EGJ 中的表达变化。我们得出 LINC00626 和 KHSRP 参与 JAK/STAT 信号通路的表达,通过正向调控 JAK/STAT 信号通路中的 JAK1 和 STAT3 促进 EGJ 的恶性发生发展。

KHSRP 是 cGMP 信号通路的一种肌动蛋白结合蛋白,具有调节细胞黏附、变形、移动和增殖的功能<sup>[24]</sup>。文献表明,KHSRP 的异常表达在某些肿瘤疾病的发生中起到关键作用<sup>[25,26]</sup>,Chen 等<sup>[27]</sup>发现 KHSRP 在食管鳞状细胞癌(ESCC)中起致癌功能。Taniuchi 等发现在胰腺癌中,KHSRP 位于细胞核,敲低的 KHSRP 可以抑制胰腺癌细胞的侵袭和转移<sup>[28]</sup>。本研究通用 qRT-PCR 实验和 WB 实验证明 LINC00626 和 KHSRP 的 mRNA 和蛋白在 EGJ 中表达一致。细胞拯救实验表明,过表达 KHSRP 可消除敲降 LINC00626 对细胞增殖、迁移、侵袭能力的抑制作用。这证明了 LINC00626 与 KHSRP 之间存在相互作用关系,KHSRP 可能是 LINC00626 的一个下游靶蛋白,LINC00626 在 EGJ 中正向调控 KHSRP 的表达,从而促进 EGJ 的恶性进展过程。

综上所述,LINC00626 在 EGJ 中表达上调,并与 EGJ 患者转移的恶性进程密切相关。LINC00626 通过调节 JAK1/STAT3/KHSRP 轴抑制 EGJ 细胞增殖、侵袭和转移。本研究为 EGJ 的临床诊疗提供了一种新的分子标志物和潜在的治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 27-40.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] Li SL, Yuan L, Xu ZY, et al. Integrative proteomic characterization of adenocarcinoma of esophagogastric junction [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 778.
- [4] Hu X, Wu LX, Liu B, et al. Immune infiltration subtypes characterization and identification of prognosis-related lncRNAs in adenocarcinoma of the esophagogastric junction [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 651056.
- [5] Wang ZY, Xiao W, Jiang YZ, et al. HN1L promotes invasion and metastasis of the esophagogastric junction adenocarcinoma [J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(5): 650-8.
- [6] Guo W, Zhang CY, Wang X, et al. Resolving the difference between left-sided and right-sided colorectal cancer by single-cell sequencing [J]. *JCI Insight*, 2022, 7(1): e152616.
- [7] Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, et al. Esophageal and esophagogastric junction cancers, version 2.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(7): 855-83.
- [8] Liu Y, Yu MY, Cheng XC, et al. A novel LUAD prognosis prediction model based on immune checkpoint-related lncRNAs [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1016449.
- [9] Lou YQ, Shi Q, Zhang YW, et al. Multi-omics signatures identification for LUAD prognosis prediction model based on the integrative analysis of immune and hypoxia signals [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 840466.
- [10] Zhang H, Meng XL. Association of HOTAIR expression with PI3K/Akt pathway activation in adenocarcinoma of esophagogastric junction [J]. *Open Med*, 2016, 11(1): 36-40.
- [11] Xing C, Sun SG, Yue ZQ, et al. Role of lncRNA LUCAT1 in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111158.
- [12] Tang JH, Hao Thng DK, Lim JJ, et al. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepat Oncol*, 2020, 7(1): HEP18.
- [13] Liu CR, Feng HQ, Song LH, et al. Synergistic effects of thalidomide and cisplatin are mediated via the PI3K/AKT and JAK1/STAT3 signaling pathways in cervical cancer [J]. *Oncol Rep*, 2022, 48(4): 169.
- [14] Taniuchi K, Ogasawara M. KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(2): 131-47.
- [15] Mohamadkhani A. Long noncoding RNAs in interaction with RNA binding proteins in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepat Mon*, 2014, 14(5): e18794.
- [16] Shi SS, Zhao JY, Yang LL, et al. KHSRP participates in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(2): 454-65.
- [17] Wu SY, Huang XD, Tie XT, et al. Role and mechanism of action of circular RNA and laryngeal cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 223: 153460.
- [18] Zhang GH, Sun JP, Zhang XW. A novel Cuproptosis-related lncRNA signature to predict prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11325.
- [19] Song JH, Sun YY, Cao H, et al. A novel pyroptosis-related lncRNA signature for prognostic prediction in patients with lung adenocarcinoma [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5932-49.
- [20] He L, Tian L. Downregulation of miR-409-3p suppresses LPS-induced inflammation in human bronchial epithelial cells through SOCS3/JAK1/STAT3 signaling: the implication for bronchopneumonia [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3): 190.
- [21] Lamichhane S, Mo JS, Sharma G, et al. MicroRNA 452 regulates IL20RA-mediated JAK1/STAT3 pathway in inflammatory colitis and colorectal cancer [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(8): 903-14.
- [22] Jiang Y, Xu CH, Zhao Y, et al. LINC00926 is involved in hypoxia-induced vascular endothelial cell dysfunction via miR-3194-5p regulating JAK1/STAT3 signaling pathway [J]. *Eur J Histochem*, 2023, 67(1): 3526.
- [23] Zhang X, Hu B, Sun YF, et al. Arsenic trioxide induces differentiation of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma

- through inhibition of LIF/JAK1/STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways synergistically[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(2): e335.
- [24] Xu JY, Wang DS, Ma HL, et al. KHSRP combines transcriptional and posttranscriptional mechanisms to regulate monocytic differentiation [J]. *Blood Sci*, 2022, 4(3): 103-15.
- [25] Tong LH, Luo YS, Wei T, et al. KH-type splicing regulatory protein (KHSRP) contributes to tumorigenesis by promoting miR-26a maturation in small cell lung cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1/2): 61-74.
- [26] Yan MX, Sun L, Li J, et al. RNA-binding protein KHSRP promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 478.
- [27] Chen L, Zhao TJ. Identification of KHSRP-regulated RNAs in esophageal cancer by integrated bioinformatics analysis[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2021, 36(5): 412-24.
- [28] Taniuchi K, Ogasawara M. Correction: KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2023, 14: 104.

(编辑:吴锦雅)