

ELK3在胃癌中的表达特征和功能分析

周立强, 吴 忧, 辛 林

南昌大学第二附属医院胃肠外科, 江西 南昌 330006

摘要:目的 探讨ELK3在胃癌中的表达特征和潜在功能。方法 采用非配对 t 检验、 χ^2 检验分析E-MTAB-6693数据集ELK3在胃癌的表达特征;Kaplan-Meier生存分析、单因素和多因素Cox回归分析ELK3对预后的预测能力。Chip-Atlas、ChipBase、基因转录调控数据库、hTFtarget预测并构建ELK3转录调控网络。R软件“org.Hs.eg.db”包对靶基因进行功能富集分析。Cibersort工具分析胃癌组织中浸润性免疫细胞的比例,并计算Pearson系数分析ELK3与这些细胞的相关性。使用基因表达谱分析人类蛋白图谱公共数据库验证ELK3的表达。收集5组胃癌临床样本,利用rt-PCR验证ELK3的mRNA水平表达,利用Western blot验证ELK3在配对胃癌组织中蛋白水平表达差异。结果 在公共数据集和临床样本中ELK3在胃癌中高表达($P<0.05$);其表达随M分期、AJCC分期、神经侵袭的进展而升高($P<0.05$)。 χ^2 检验表明ELK3表达水平与N分期、AJCC分期、Lauren分型、分化程度、病理分型、微卫星状态相关($P<0.05$)。ELK3高表达患者的总体生存期和无痛生存期较低表达患者显著降低,是胃癌的独立预后因素($P<0.05$)。综合鉴定出176个潜在的ELK3转录调控靶基因,富集分析表明ELK3可能调控Rap1、AMPK、趋化因子、VEGF、TNF、肿瘤PD-L1/PD-1信号($P<0.05$)。ELK3表达与胃癌中调节T细胞、滤泡辅助性T细胞、CD8+T细胞数量呈负相关($P<0.05$)。结论 ELK3在胃癌中充当癌基因,可能促进胃癌细胞发生、发展和免疫逃避。

关键词:胃癌;ELK3;预后;转录调控;免疫逃避

Expression characteristics and functional analysis of ELK3 in gastric cancer

ZHOU Liqiang, WU You, XIN Lin

Department of Gastrointestinal Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To explore the expression characteristics of ELK3 and its role in the occurrence, progression and prognosis of gastric cancer. **Methods** We analyzed the expression characteristics of ELK3 in gastric cancer based on E-MTAB-6693 dataset and explored the prognostic value of ELK3 using Kaplan-Meier survival analysis and univariate and multivariate Cox regression analysis. Chip-Atlas, ChipBase, Genes Transcription Regulation Database, and hTFtarget were used for predicting the target genes of ELK3 and constructing the transcription regulation network. Functional enrichment analysis of the target genes was performed using R software. The proportions of infiltrating immune cells in gastric cancer were analyzed using Cibersort tool, and the Pearson coefficients between ELK3 and these cells were calculated. The expression profile of ELK3 was verified based on Gene Expression Profiling Interactive Analysis and Human Protein Atlas databases. We also collected 5 pairs of gastric cancer and adjacent tissue samples and detected the expression of ELK3 at both the mRNA and protein levels using RT-PCR and Western blotting. **Results** In public datasets and clinical samples, ELK3 was highly expressed in gastric cancer ($P<0.05$), and its expression increased with the progression of M stage, AJCC stage, and perineural invasion ($P<0.05$). ELK3 expression was correlated with N stage, AJCC stage, Lauren classification, differentiation, pathological classification, and microsatellite status of gastric cancer ($P<0.05$). A high expression of ELK3 was associated with significantly reduced overall survival and disease-free survival of the patients, and served as an independent prognostic factor of gastric cancer ($P<0.05$). Comprehensive analysis identified 176 potential target genes of ELK3, and enrichment analysis showed that ELK3 may regulate Rap1, AMPK, chemokines, VEGF, TNF, and tumor PD-L1/PD-1 signaling ($PP<0.05$). The expression of ELK3 was negatively correlated with regulatory T cells, follicular helper T cells, and CD8+T cells in gastric cancer ($P<0.05$). **Conclusion** ELK3 acts as an oncogene in gastric cancer, and its high expression may promote the occurrence, progression and immune escape of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; ELK3; prognosis; transcriptional regulation; immune escape

胃癌发病率在所有恶性肿瘤中排名第5,死亡率在癌症相关死亡中居第4位^[1]。中国是胃癌的高发地区,2020年中国胃癌新发病例和死亡病例分别占全球62.3%和51.4%^[1]。胃癌临床表现无显著特异性,与非恶

性消化道疾病表现类似,起病隐匿、进展迅速、早诊困难,确诊时多处于中晚期,使多数病例失去了最佳手术时机^[2]。目前国内外研究证实胃癌的病因包括幽门螺杆菌感染、不良饮食习惯、非甾体药物等,但胃癌发生发展的分子生物学机制尚未明确^[3]。若能在排除个体差异的基础上发掘重要的生物标志物,将有助于胃癌的早期诊断和治疗。

ELK3(又称Net、SAP-2或ERP)是ETS转录因子家族成员之一,定位于染色体12q23.1上。ELK3蛋白常与血清反应辅助蛋白1一起形成三元复合转录因子,

收稿日期:2021-03-22

基金项目:国家自然科学基金(81872480,81760549,81560492);江西省卫生健康委员会科技计划(2021110050)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81872480, 81760549, 81560492).

作者简介:周立强,在读博士研究生,E-mail: doczhoulq@163.com

通信作者:辛 林,教授,博士,博士生导师,E-mail: ndefy07020@ncu.edu.cn

其能结合富含嘌呤GGA核心序列的特定DNA序列,调节包括原癌基因在内的多种基因的表达^[4]。在基础条件下,ELK3是转录阻遏物,但却可被RAS/ERK信号和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径激活而转变为转录激活因子^[5,6]。ELK3被证实在乳腺癌、肝癌、肺癌等恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用,并被认为是有效的生物标志物^[7-11]。在胃癌中,目前尚无实验研究ELK3在肿瘤中发挥的作用。在本研究中,我们利用多种生物信息学的手段探索ELK3在胃癌中的表达特征及其影响胃癌进展的机制,这有助于ELK3后续研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 ELK3的表达特征

从 ArrayExpress 数据库 (www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) 下载 E-MTAB-6693 数据集,并收集与之相关的临床病理信息。首先利用非配对 *t* 检验分析 ELK3 在正常胃组织和胃癌组织临床病理特征间的表达差异。再利用受试者工作特征曲线(ROC)分析 ELK3 预测胃癌的敏感度,计算最大约登指数(Youden index),确定最佳临界点,据此将 ELK3 分为高、低表达组,用卡方检验分析 ELK3 的表达水平与临床病理特征之间的关系。

1.2 ELK3的预后能力

绘制 Kaplan-Meier 曲线分析 ELK3 高低表达组之间总体生存率和无病生存率之间的差异。通过计算 ROC 曲线下面积(AUC)分析 ELK3 预后的准确性。通过单因素和多因素 Cox 回归分析排除其他临床性状的条件,确定 ELK3 是否为胃癌的独立预后因素。

1.3 ELK3转录调控网络的构建

为分析 ELK3 的靶基因,我们利用 Chip-Atlas 数据库 (<http://chip-atlas.org/>)^[12]、ChipBase 数据库 (<http://rna.sysu.edu.cn/chipbase/index.php>)^[13]、基因转录调控数据库(GTRD, <http://gtrd.biouml.org/>)^[14] 在转录起始位点上下游 5000bp 内鉴别 ELK3 可能调控的基因。此外,在 hTFtarget 数据库 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/hTFtarget#!/>)^[15] 的 Epigenomic evidence、Chip-seq support 和 Motif support 条件下筛选 ELK3 的调控基因。利用 Draw Venn Diagram 工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 取 4 个数据库的交集获得 ELK3 转录调控靶基因,进一步利用 Cytoscape 3.8.1 绘制最终得到的转录调控网络。

1.4 基因本体论和京都基因与基因组百科全书富集分析 ELK3 影响胃癌机制

我们利用“org.Hs.eg.db”R包进行富集分析,将过滤条件设置为 $P < 0.05$ 和 $FDR < 0.05$,获得的条目使用“enrichplot”和“ggplot2”R包进行可视化。

1.5 ELK3和浸润性免疫细胞的关系

使用 ciphersort 工具计算免疫细胞的相对分数^[16],将数据上传到 ciphersort Web 网络工具,设置默认特征矩阵为 1000 个排列,以计算每个样品中 22 种浸润性免疫细胞(包括 B 细胞、T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞)的比例,并分析 ELK3 的表达与它们的关系, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.6 公共数据库验证 ELK3 的表达

通过基因表达谱分析(GEPIA)网络工具 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>),分析结合基因型组织表达数据库和癌症基因组图谱数据库中 ELK3 在胃癌和正常胃组织的表达差异。为验证 ELK3 蛋白的表达水平,我们通过人类蛋白图谱(HPA)数据库 (www.proteinatlas.org/),搜索 ELK3 在正常胃和胃癌组织的免疫组化数据,分析其差异。

1.7 荧光定量 RCR 检测胃癌中 ELK3 的 mRNA 表达

收集 5 组南昌大学第二附属医院胃肠外科手术标本,样本获取均取得患者知情同意并得到南昌大学第二附属医院伦理委员会批准。制备样品匀浆,使用 Trizol (Thermo Fisher)法提取总 RNA,获得的 RNA 使用逆转录试剂盒 RR047A (Takara)进行逆转录,以 ACTB 作为内参基因,使用 RR820 试剂盒 (Takara)在 7900-HT 系统 (Thermo Fisher)进行荧光定量 PCR,通过计算 ELK3 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值评估其 mRNA 表达,使用配对 *t* 检验分析胃癌及癌旁样本 ELK3 的表达差异。使用的引物均由上海生工公司合成,序列如下:ACTB 上游 5'-CACCATTGGC AATGAGCGGTTC-3',下游 5'-AGGTCTT TGCGGAT GTCCACGT-3'; ELK3 上游 5'-GAGAGTGCAATCAC GCTGTG-3',下游 5'-GTTCGAGGTCCAGCAGATCA A-3'。

1.8 蛋白印记法检测胃癌中 ELK3 的蛋白表达

将获得样本匀浆后,使用强效 RIPA 裂解液(北京索莱宝公司)提取总蛋白,BCA 试剂盒(上海碧云天公司)检测蛋白质浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后将蛋白转至 PVDF 膜(Millipore)上。使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液在室温下封闭 1 h。将内参和目的条带分离后,分别置于到 ELK3 (Santa Cruz) 和 GAPDH (Proteintech) 一抗中 4 °C 孵育过夜,吸净一抗并清洗后,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 二抗(北京康为世纪公司)稀释比例为 1:10 000,室温孵育 1 h,吸净二抗并清洗。用超敏 ECL 发光试剂盒(苏州宇恒公司)和化学发光成像系统(BioRad)进行曝光分析。

2 结果

2.1 ELK3 高表达与胃癌进展相关

E-MTAB-6693 数据集包括 46 例正常胃组织和 691

例胃癌组织数据。分析显示,ELK3在胃癌中表达显著高于正常胃组织($P<0.01$,图1A)。绘制ROC曲线并计算AUC值为0.6322,显示ELK3预测胃癌具有较良好的敏感性(图1B)。根据计算出最大约登指数(0.2328)所对应的ELK3表达水平(7.1670),将胃癌样本分为ELK3高表达组($n=470$)和低表达组($n=221$)。ELK3在不同临床病理特征胃癌组织中的表达分析显示,M1期ELK3表达高于M0期($P<0.05$,图1C),ELK3的表达随AJCCstage分期进展而升高($P<0.05$,图1D);在神经侵袭的样本中ELK3表达高于未侵袭样本($P<0.01$,图1E)。我们还分析了ELK3表达与不同临床病理特征的关系,结果显示,ELK3的表达水平与N分期、AJCC分期、Lauren分型、分化程度、病理分型、微卫星状态相关($P<0.05$,表1)。

2.2 ELK3高表达与胃癌患者不良预后相关

Kaplan-Meier曲线显示,ELK3高表达组患者的生存率较低表达组显著降低($P<0.01$,图2A),与3年、5年、7年总生存率对应的AUC为0.556、0.555、0.571(图2B)。通过单因素和多因素Cox回归分析,最终确定神经侵袭[HR=1.756,95% CI(1.057-2.915), $P=0.030$]、阳性淋巴结数目[HR=1.059,95% CI(1.023-1.097), $P=0.001$]、ELK3表达[HR=1.929,95% CI(1.039-3.580), $P=0.037$]为独立预测胃癌总体预后的因素(图2C,D)。

对于无病生存期,Kaplan-Meier曲线显示(图3A)ELK3高表达组患者的生存率较低表达组显著降低($P<0.05$)。ROC曲线显示,与3年、5年、7年总生存率对应的AUC为0.549、0.577、0.619(图3B)。通过单因素和多因素Cox回归分析,静脉侵袭[HR=1.830,95% CI(1.014-3.305), $P=0.045$]和ELK3表达[HR=2.555,95% CI(1.332-4.902), $P=0.037$]为独立预测无病生存期的因素(图3C、D)。

2.3 ELK3转录调控网络及其影响胃癌机制

Chip-Atlas数据库显示,ELK3潜在靶基因有3536个,ChipBase中得到11166个,GTRD中获得27740个,hTFtarget中有600个。通过绘制韦恩图提取4个数据库中共有基因(图4A),一共获得176个ELK3潜在的靶基因,并绘制了ELK3转录调控网络(图4B)。进一步利用GO和KEGG富集分析ELK3在胃癌中发挥的功能。我们将GO富集Top10进行了可视化(图5A),其中BP富集在RNA剪接、GTP酶活性调控等条目,CC富集在黏附连接、细胞间黏附等条目,MF集在GTP酶活化、GTP酶结合等条目。KEGG功能富集在胰岛素、雌激素、Ras相关蛋白1(Rap1)、AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)、松弛素、神经营养因子、趋化因子、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子(TNF)信号相关;值得

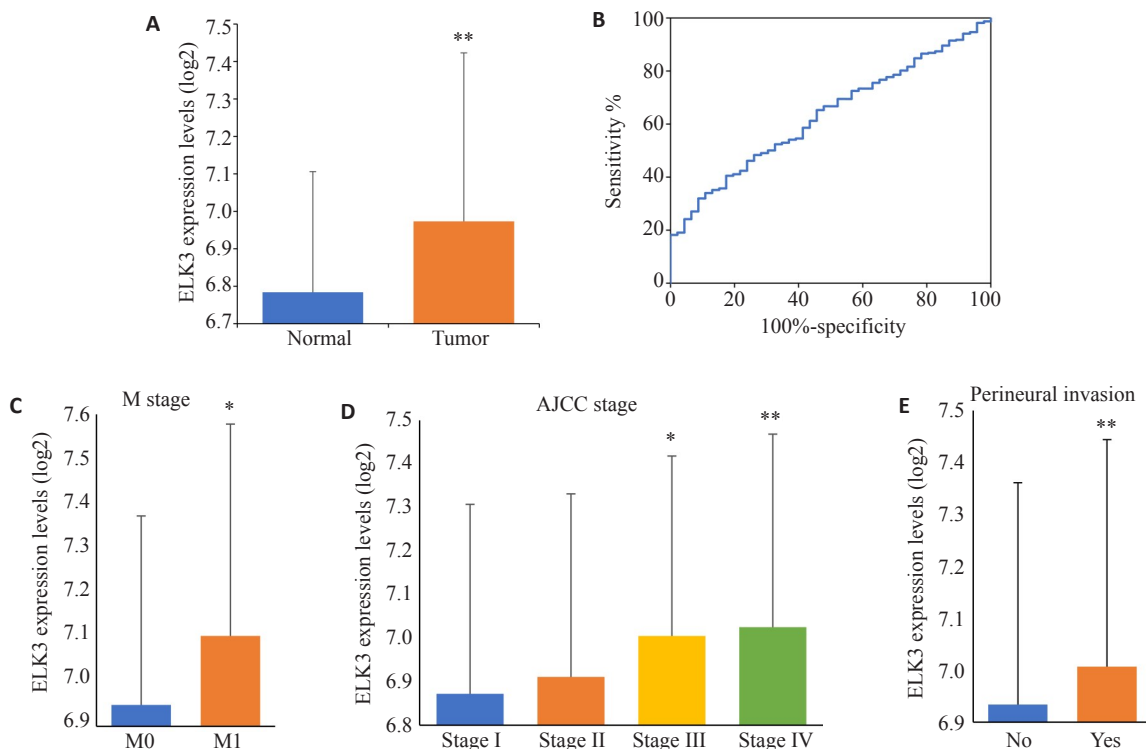


图1 ELK3在胃癌中的表达特征

Fig.1 Expression characteristics of ELK3 in gastric cancer. A: ELK3 expression in gastric cancer is higher than normal gastric tissue. B: ROC curve shows that ELK3 can predict the occurrence of gastric cancer. C: The expression of ELK3 in M1 stage was higher than that in M0 stage. Values are presented as Mean±SD (* $P<0.05$ vs M0). D: The expression of ELK3 increases with pathological stages. Values are presented as Mean±SD (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Stage I). E: Patients with Perineural invasion have higher expression of ELK3. Values are presented as Mean±SD (** $P<0.01$ vs No).

表1 胃癌中ELK3表达与各临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship between ELK3 expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer

Clinicopathological characteristics		Low expression (n)	High expression (n)	P
Gender	Male	294	139	0.9468
	Female	161	77	
Age (year)	≤60	141	74	0.3964
	>60	314	142	
T stage	T1	5	5	0.4538
	T2	166	85	
	T3	142	91	
	T4	13	10	
	N0	64	27	
N stage	N1	156	64	0.0014
	N2	91	48	
	N3	30	36	
M stage	M0	195	78	0.1915
	M1	16	11	
AJCC stage	Stage I	59	29	0.0010
	Stage II	115	41	
	Stage III	130	108	
	Stage IV	94	66	
Grade	G1	2	0	0.6503
	G2	9	4	
	G3	16	7	
Lauren classification	Diffuse	162	104	0.0037
	Mixed	255	92	
	Intestinal	37	15	
Differentiation	Poor	80	42	0.0297
	Moderate	38	43	
	Well	5	3	
Pathology classification	Adenocarcinoma	27	53	<0.0001
	Mucinous adenocarcinoma	2	6	
	Signet ring cell carcinoma	10	27	
Perineural invasion	Tubular adenocarcinoma	112	39	0.8736
	Not	112	47	
Venous invasion	Yes	57	31	0.3588
	Not	86	43	
Lymphovascular invasion	Yes	33	11	0.3029
	Not	52	21	
Margins	Yes	144	61	0.1632
	R0	44	22	
MLH1 status	R1	4	0	0.5147
	Negative	47	17	
TP53 status	Positive	162	72	0.7905
	Negative	85	22	
Microsatellite status	Positive	64	15	0.0134
	MSI	66	21	
Epstein-Barr virus Infection	MSS	9	10	0.1490
	Negative	184	73	
	Positive	10	8	

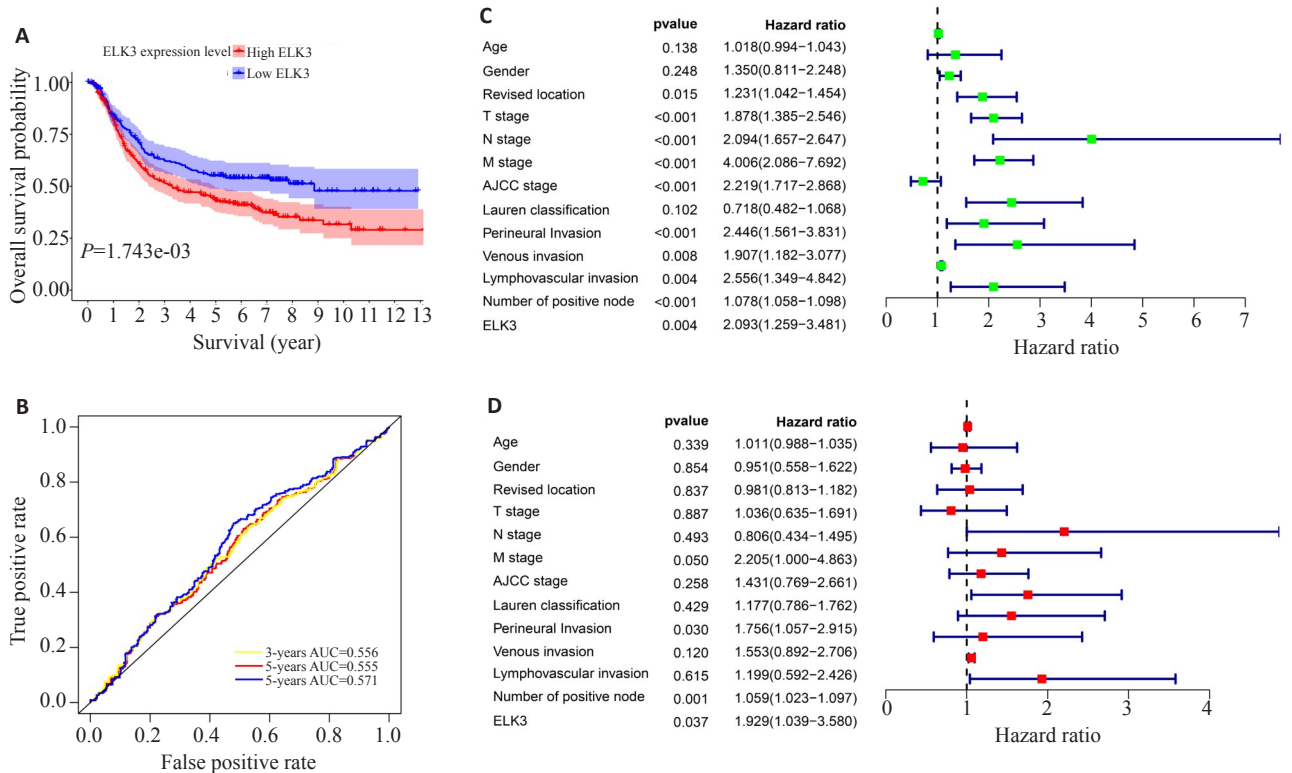


图2 ELK3预测总体预后且为独立预后因素

Fig.2 ELK3 predicts overall prognosis and is an independent prognostic factor of gastric cancer. **A:** Kaplan-Meier curve shows that a high expression of ELK3 is associated with a poor overall prognosis. **B:** ROC curve analysis of the ability of ELK3 to predict 3-, 5-, and 7-year survival. **C:** Univariate Cox regression analysis. **D:** Multivariate Cox regression analysis shows that ELK3 is an independent prognostic factor of gastric cancer.

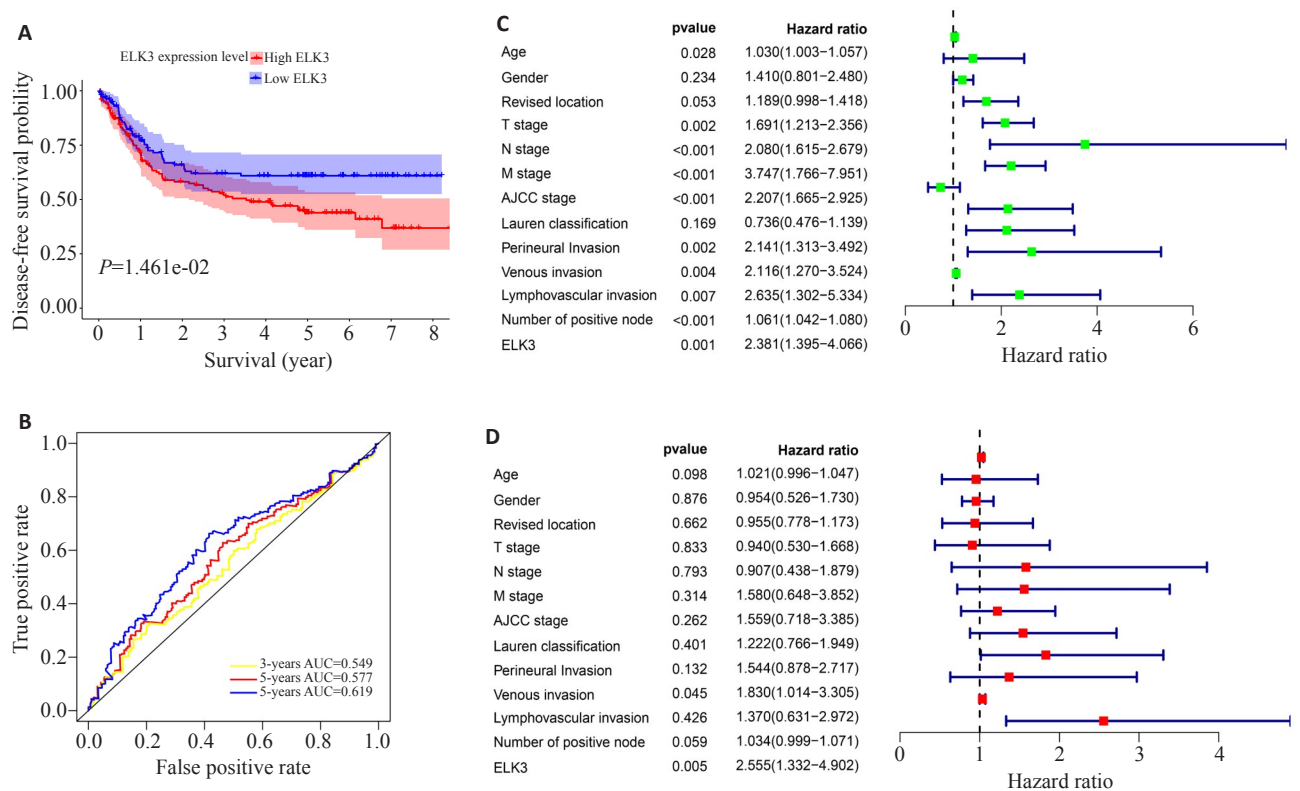


图3 ELK3预测无病生存期且为独立预后因素

Fig.3 ELK3 predicts disease-free survival and is an independent prognostic factor of gastric cancer. **A:** Kaplan-Meier curve shows that a high expression of ELK3 is associated with a poor disease-free survival. **B:** ROC curve analysis of the ability of ELK3 to predict 3-, 5-, and 7-year disease-free survival. **C:** Univariate Cox regression analysis. **D:** Multivariate Cox regression analysis shows that ELK3 is an independent prognostic factor of gastric cancer.

注意的是,ELK3靶基因还富集在多种病毒感染和肿瘤的细胞程序性死亡配体-1/程序性死亡受体1(PD-L1/PD-1)信号,显示ELK3可能参与肿瘤的免疫应答反应调控(图5B)。

2.4 ELK3与浸润性免疫细胞的关系

为了解ELK3在免疫应答反应中的可能作用,我们分析了691例胃癌样本中的浸润性免疫细胞分布,并分析ELK3表达和22种免疫细胞的关系。结果显示,ELK3表达与浆细胞($R=-0.260, P<0.001$)、静息NK细胞($R=-0.180,$

$P<0.001$)、调节性T细胞($R=-0.180, P<0.001$)、活化树突状细胞($R=-0.110, P<0.01$)、滤泡辅助性T细胞($R=-0.150, P<0.001$)和CD8+T细胞($R=-0.085, P<0.05$)的数量呈负相关,ELK3与M2型巨噬细胞($R=0.100, P<0.01$)、幼稚B细胞($R=0.130, P<0.001$)、M1型巨噬细胞($R=0.083, P<0.05$)、活化CD4+记忆T细胞($R=0.099, P<0.01$)、 $\gamma\delta$ T细胞($R=0.260, P<0.001$)及幼稚CD4+T细胞($R=0.085, P<0.05$)的数量呈正相关(图6)。

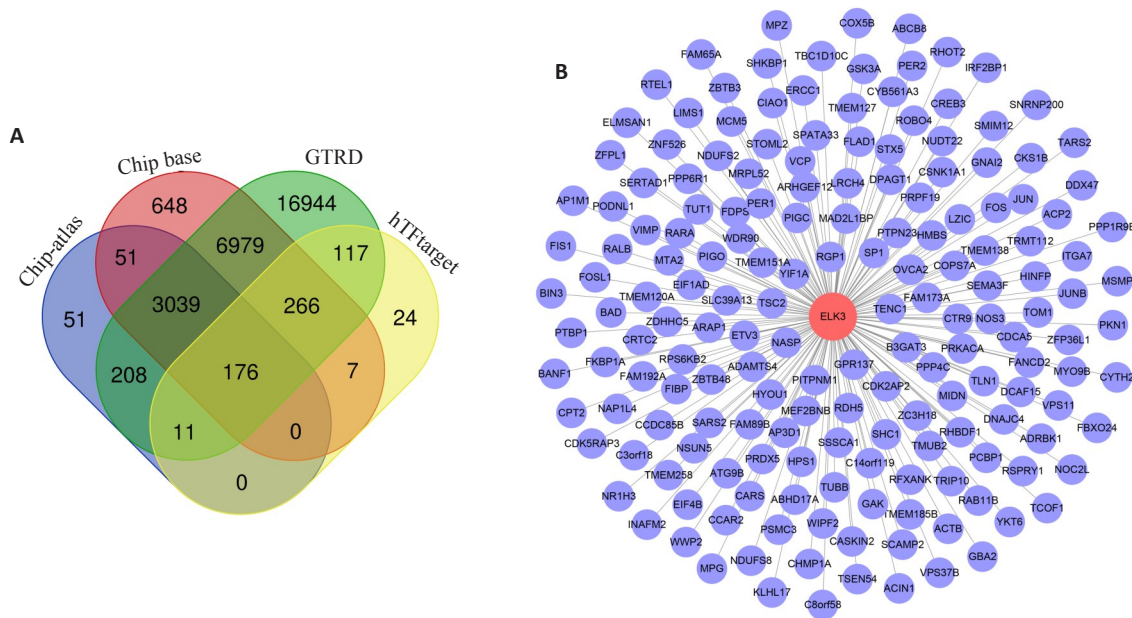


图4 ELK3转录调控网络的构建

Fig.4 Construction of ELK3 transcriptional regulation network. A: Venn diagram analysis showing 176 potential target genes of ELK3. B: ELK3 transcriptional regulation network.

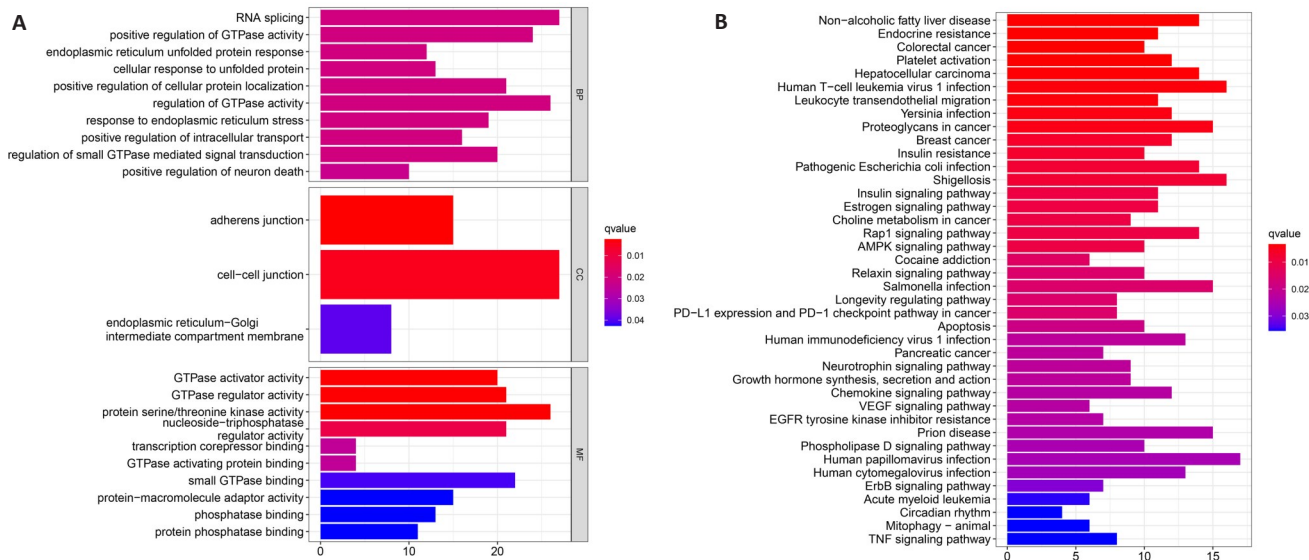


图5 ELK3靶基因功能富集分析

Fig.5 Function enrichment analysis of the target genes of ELK3. A: GO enrichment analysis. B: KEGG functional enrichment analysis.

2.5 ELK3的表达验证

在公共数据库中验证ELK3的表达,GEPIA表明,在211个正常胃组织中ELK3的mRNA表达水平显著低于408个胃癌组织(图7A);HPA数据库显示,正常胃组织免疫组化染色显示为未检测到,而胃癌组织种显示

低染色(图7B)。随机分析5个配对临床手术样本mRNA表达,结果表明,5对组织中ELK3在胃癌组织的表达均显著高于正常胃黏膜组织(图7C)。免疫蛋白质印记结果也显示,胃癌组织ELK3蛋白表达高于对于正常组织(图7D)

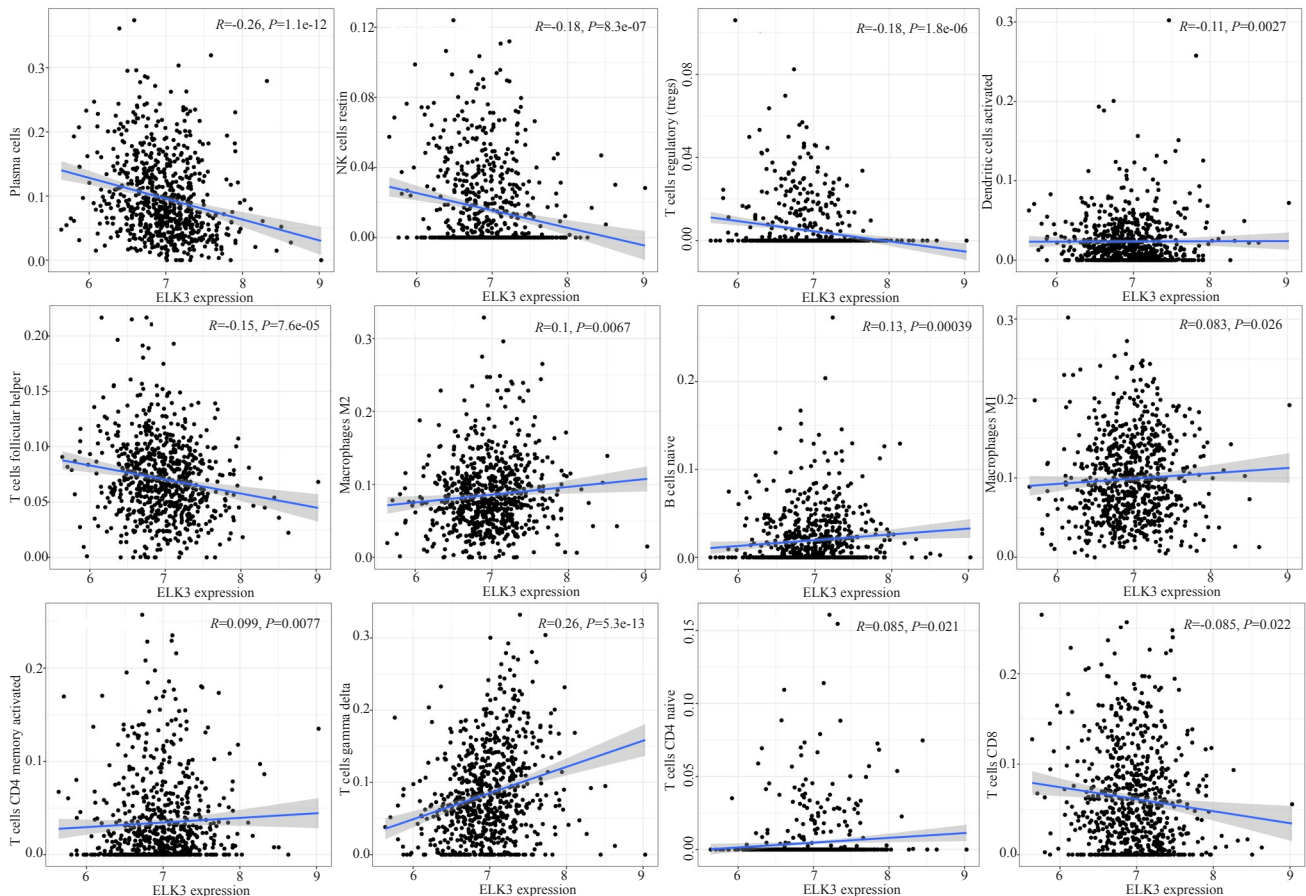


图6 ELK3与浸润性免疫细胞的相关性

Fig.6 Correlation between ELK3 and infiltrating immune cells in gastric cancer.

3 讨论

ELK3在一些实体肿瘤中过表达,并在肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移和耐药等生物过程中发挥重要作用^[8-10, 17, 18]。有报道显示ELK3在肿瘤中的低表达可抑制肿瘤细胞的进展^[19]。这提示,由于肿瘤的异质性和遗传多样性,ELK3在不同类型的肿瘤和微环境中的表达可能产生不同的功能。为分析ELK3在胃癌中扮演的角色,我们通过对公共数据集的分析和临床样本检测证实了ELK3在胃癌组织中上调。此外,ELK3随着胃癌进展表达升高,其表达水平与N分期、AJCC分期、Lauren分型、分化程度、病理分型等密切相关。我们还发现ELK3表达与不良总体预后高度相关。一些对其他实体肿瘤的相关研究也证实了我们的结论,研究显示,ELK3可以促进膀胱癌、黑色素瘤的进展^[20, 21]。此外,

ELK3还可以促进转化生长因子-β1(TGF-β1)诱导的肿瘤转移^[22];在三阴性乳腺癌中敲低ELK3,TGF-β信号转导活性下降,肿瘤转移能力和上皮间质转化表型减弱^[23]。ELK3与肿瘤化疗耐药存在密切联系,它可以通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号诱导自噬促进肿瘤化疗耐药^[18]。对结直肠癌的相关研究表明,ELK3表达的升高与肿瘤化疗耐药性密切相关,下调其表达可以提高化疗敏感性^[24]。根据以上结果我们可以认为,ELK3在胃癌中充当癌基因,是治疗胃癌良好的生物标志物。

为了解ELK3在肿瘤中发挥功能,我们基于多个数据库鉴定ELK3转录调控靶基因,构建ELK3的转录调控网络,并对靶基因进行GO和KEGG功能富集分析。GO主要富集在RNA剪接、GTP酶活性调控、GTP酶结

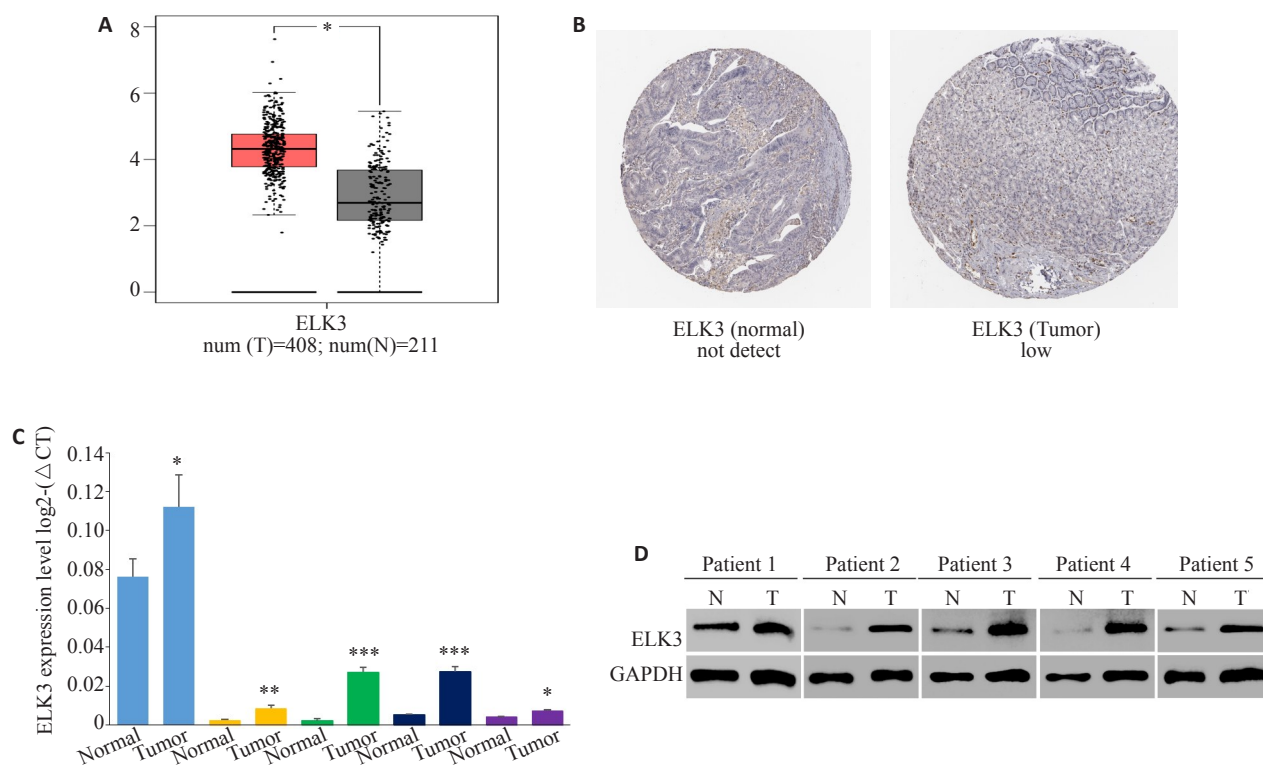


图7 公共数据库和临床样本中验证ELK3在胃癌中高表达

Fig.7 Verification of high ELK3 expression in gastric cancer based on public databases and clinical samples. A: Analysis of GEPIA showing that the RNA level of ELK3 in gastric cancer tissue is increased. B: Analysis of HPA database showing that the protein expression of ELK3 is up-regulated in gastric cancer. C: ELK3 mRNA expression is increased in clinical samples of gastric cancer detected using RT-PCR. D: Western blotting results showing increased ELK3 protein expression in gastric cancer. Values are presented as Mean±SD (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs normal).

合、细胞间黏附等相关。KEGG则富集在Rap1、AMPK、VEGF、TNF等信号相关通路。Rap1是小型GTPases的Ras家族的成员,在许多细胞类型中均受到多种细胞外刺激的激活。最近,大量证据表明,Rap1激活失调是导致恶性肿瘤发展的原因^[25]。AMPK是与能量代谢密切相关的一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白,在能量调节代谢作用方面起到关键性作用^[26]。近年来发现AMPK激活可以磷酸化一些关键的代谢酶或激活转录因子调节下游基因表达,干扰肿瘤的物质和能量代谢,间接影响肿瘤细胞的生物学行为^[27]。在肿瘤细胞中VEGF是一类重要的促进血管生成的生长因子,通常响应于通过低氧诱导因子-1α途径增加的肿瘤缺氧^[28]。VEGF可以影响肿瘤微环境中免疫细胞的功能,参与肿瘤免疫逃避^[29]。TNF是一种促炎性细胞因子,在哺乳动物免疫和细胞体内平衡中具有重要作用,作为一种内源性致热原,它能够引起细胞凋亡,诱导进一步的TNF表达,促进恶性细胞产生其他细胞因子、趋化因子和C-X-C趋化因子受体4。这些趋化因子可能作用于淋巴细胞,导致局部免疫抑制,增强原发肿瘤生长并促进转移扩散,调节白细胞浸润和血管生成的程度和表型^[30]。

我们还发现ELK3与肿瘤PD-1/PD-L1信号相关。PD-1是重要的免疫检查点,通过与其两个配体PD-L1和PD-L2的作用抑制T细胞的活化及细胞因子的产生,在维持机体的外周耐受上发挥至关重要的作用。肿瘤细胞及微环境通过上调PD-L1表达并与肿瘤特异的CD8+T细胞表面的PD-1结合,限制宿主的免疫反应^[31]。我们分析了胃癌中免疫细胞的比例,并发现ELK3的表达与调节T细胞、滤泡辅助性T细胞、CD8+T细胞的数量呈负相关,提示了ELK3可能参与免疫逃避。

本研究利用公共数据验证了ELK3在胃癌中高表达,并使用临床样本进一步验证ELK3高表达与肿瘤进展和不良预后密切相关。通过预测ELK3的靶基因并进行富集分析,结果表明它在肿瘤进展密切相关的机制中发挥作用。目前尚未有报道确定ELK3是否通过以上途径影响胃癌的进展,还需要更深入的研究。

参考文献:

[1] 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]. CAA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
 [2] 王胤奎,李子禹,陕飞,等.我国早期胃癌的诊治现状:来自中国胃肠

- 肿瘤外科联盟数据的启示[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(2): 168-74.
- [3] Kozak J, Forma A, Czezelewski M, et al. Inhibition or reversal of the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer: pharmacological approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 277.
- [4] Ahmad A, Zhang W, Wu M, et al. Tumor-suppressive miRNA-135a inhibits breast cancer cell proliferation by targeting ELK1 and ELK3 oncogenes[J]. *Genes Genomics*, 2018, 40(3): 243-51.
- [5] Giovane A, Pintzas A, Maira SM, et al. Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras[J]. *Genes Dev*, 1994, 8(13): 1502-13.
- [6] Ducret C, Maira SM, Lutz Y, et al. The ternary complex factor Net contains two distinct elements that mediate different responses to MAP kinase signalling cascades[J]. *Oncogene*, 2000, 19(44): 5063-72.
- [7] Oh N, Park JI, Park JH, et al. The role of ELK3 to regulate peritumoral lymphangiogenesis and VEGF-C production in triple negative breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(4): 896-902.
- [8] Lee JH, Hur W, Hong SW, et al. ELK3 promotes the migration and invasion of liver cancer stem cells by targeting HIF-1 α [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 813-22.
- [9] Sloan KA, Marquez HA, Li J, et al. Increased PEA3/E1AF and decreased Net/Elk-3, both ETS proteins, characterize human NSCLC progression and regulate caveolin-1 transcription in Calu-1 and NCI-H23 NSCLC cell lines[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(8): 1433-42.
- [10] Yoo SM, Lee CJ, An HJ, et al. RSK2-mediated ELK3 activation enhances cell transformation and breast cancer cell growth by regulation of c-fos promoter activity[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1994.
- [11] 李天柱, 王加茹, 张俊毅, 等. ELK-3蛋白在肝癌组织中的表达及其对肝癌HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2018, 44(4): 736-40, 892.
- [12] Oki S, Ohta T, Shioi G, et al. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data[J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(12): e46255.
- [13] Zhou KR, Liu S, Sun WJ, et al. ChIPBase v2.0: decoding transcriptional regulatory networks of non-coding RNAs and protein-coding genes from ChIP-seq data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(d1): D43-50.
- [14] Kolmykov S, Yevshin I, Kulyashov M, et al. GTRD: an integrated view of transcription regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(d1): D104-11.
- [15] Zhang Q, Liu W, Zhang HM, et al. hTFtarget: a comprehensive database for regulations of human transcription factors and their targets[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2020, 18(2): 120-8.
- [16] Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-7.
- [17] Kong SY, Kim KS, Kim J, et al. The ELK3-GATA3 axis orchestrates invasion and metastasis of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 65137-46.
- [18] Park JH, Kim KP, Ko JJ, et al. PI3K/Akt/mTOR activation by suppression of ELK3 mediates chemosensitivity of MDA-MB-231 cells to doxorubicin by inhibiting autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(2): 277-82.
- [19] Li BW, Wan XJ, Zhu Q, et al. Net expression inhibits the growth of pancreatic ductal adenocarcinoma cell PL45 *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57818.
- [20] Kim HK, Park JD, Choi SH, et al. Functional link between miR-200a and ELK3 regulates the metastatic nature of breast cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1225.
- [21] Meng L, Xing Z, Guo Z, et al. LINC01106 post-transcriptionally regulates ELK3 and HOXD8 to promote bladder cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1063.
- [22] Li TZ, Kim SM, Hur W, et al. Elk-3 contributes to the progression of liver fibrosis by regulating the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Gut Liver*, 2017, 11(1): 102-11.
- [23] Kim KS, Kim J, Oh N, et al. ELK3-GATA3 axis modulates MDA-MB-231 metastasis by regulating cell-cell adhesion-related genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 509-15.
- [24] Cho HJ, Oh N, Park JH, et al. ZEB1 collaborates with ELK3 to repress E-cadherin expression in triple-negative breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(11): 2257-66.
- [25] Hattori M, Minato N. Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy [J]. *J Biochem*, 2003, 134(4): 479-84.
- [26] Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(7): 527-51.
- [27] Kuhajda FP. AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited [J]. *Int J Obes*, 2008, 32(4): S36-41.
- [28] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1248-64.
- [29] Hansen W, Hutzler M, Abel S, et al. Neuropilin 1 deficiency on CD4+ Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(11): 2001-16.
- [30] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5): 361-71.
- [31] Ren D, Hua Y, Yu B, et al. Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 19.

(编辑:余诗诗)