



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.006

· 基础研究 ·

KHSRP 靶向调控 JAK1/STAT3 信号通路对食管胃结合部腺癌恶性生物学行为的影响

张海峰^a, 王梦瑶^{b△}, 王晓龙^a, 刘洋洋^b, 李丽^{a,b}, 韦海涛^a(河南大学 a. 淮河医院 胸外科; b. 护理与健康学院 慢病研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] 目的:探讨 KH型剪切调节蛋白(KHSRP)靶向调控JAK1/STAT3信号轴对食管胃结合部腺癌(AEG)细胞增殖、迁移和侵袭及移植瘤生长与肺转移的影响。方法:收集2017年1月至2018年12月间在淮河医院确诊的64例AEG组织和癌旁组织标本及临床资料,采用免疫组化法观察AEG组织和癌旁组织中KHSRP的表达水平。qPCR法检测AEG细胞OE-19、TE-7、BIC-1、FLO-1、SK-GT-4、BE-3与正常食管上皮细胞Het-1A中KHSRP的表达差异。通过慢病毒载体对KHSRP进行敲减和过表达处理,分别转染OE-19与TE-7细胞、FLO-1与SK-GT-4细胞,实验分为sh-NC组、sh-KHSRP组和Vector组、KHSRP过表达组(KHSRP组)。采用qPCR法检测敲减或过表达效率,CCK-8法、Transwell小室法分别检测敲减或过表达KHSRP对AEG细胞增殖、迁移和侵袭的影响。构建小鼠异种移植瘤和肺转移模型,观察KHSRP对移植瘤体内生长和转移的作用。WB法验证KHSRP靶向JAK/STAT信号通路。细胞拯救实验验证KHSRP是否通过调节JAK1/STAT3信号通路促进AEG细胞的恶性进程。结果:与癌旁组织相比,AEG组织中KHSRP表达水平显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。细胞功能实验分析显示,KHSRP过表达在体外均显著促进AEG细胞增殖、迁移和侵袭($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。动物实验结果显示,KHSRP在裸鼠体内具有促进AEG细胞移植瘤生长与肺转移的作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在敲减KHSRP后,JAK/STAT信号通路中JAK1、STAT3磷酸化水平均明显降低,过表达KHSRP后情况则均反之($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。细胞拯救实验显示,KHSRP可以逆转敲减JAK1/STAT3对细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:KHSRP通过激活JAK1/STAT3信号通路调控AEG细胞转移的恶性进程,KHSRP有望成为AEG临床治疗的潜在靶点。

[关键词] 食管胃结合部腺癌; KHSRP; JAK1/STAT3 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭; 小鼠模型

[中图分类号] R735.1;R730.51 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2025)01-0038-10

Effects of KHSRP targeting JAK1/STAT3 signaling pathway on the malignant biological behavior of the adenocarcinoma of esophagogastric junction

ZHANG Haifeng^a, WANG Mengyao^{b△}, WANG Xiaolong^a, LIU Yangyang^b, LI Li^{a,b}, WEI Haitao^a(a. Department of Thoracic Surgery, Huaihe Hospital; b. Chronic Disease Research Institute, Institute of Nursing and Health, Henan University, Kaifeng 475004, Henan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of KH-type splicing regulatory protein (KHSRP) targeting and regulating JAK1/STAT3 signaling axis on the proliferation, migration and invasion of the adenocarcinoma of esophagogastric junction (AEG) cells, as well as the growth of transplanted tumors and lung metastasis. Methods: A total of 64 pairs of AEG tissue and adjacent normal tissue samples, along with clinical data from patients diagnosed at Huaihe Hospital from January 2017 to December 2018 were collected. The expression level of KHSRP in AEG tissues and adjacent normal tissues was observed using immunohistochemical staining. The differential expression of KHSRP in AEG cells (OE-19, TE-7, BIC-1, FLO-1, SK-GT-4, BE-3) and normal esophageal epithelial cells (Het-1A) was detected by qPCR. Lentiviral vectors were used to knockdown and overexpress KHSRP in OE-19, TE-7, FLO-1, and SK-GT-4 cells. The experiment was divided into the following groups: sh-NC group, sh-KHSRP group, Vector group, and KHSRP overexpression group (KHSRP group). The knockdown or overexpression efficiency was detected by qPCR, and the effects of KHSRP knockdown or overexpression on AEG cell proliferation, migration and invasion were evaluated using CCK-8 and Transwell assays, respectively. A mouse xenograft and lung metastasis model was established to observe the effects of KHSRP on tumor growth and

[基金项目] 河南省教育厅资助项目(No. 24A320002, No. 25B320018, No. 25B320022);河南省科技厅指导项目(No. 232102310007, No. 242102310184, No. 242102310197)

[作者简介] 张海峰(1984—),男,硕士,主要从事胸外科肿瘤的研究,E-mail: 544122188@qq.com;王梦瑶(2001—),女,硕士生,主要从事肿瘤护理研究,E-mail: wmy18637876113@163.com。△为共同第一作者

[通信作者] 李丽,E-mail: 10210051@vip.henu.edu.cn;韦海涛,E-mail: taoge9885@163.com



metastasis *in vivo*. The targeted regulation of JAK/STAT signaling pathway by KHSRP was verified by Western blotting. A rescue experiment was conducted to verify whether KHSRP promoted malignant progression of AEG cells through the JAK1/STAT3 signaling pathway. **Results:** Compared with adjacent normal tissues, the expression level of KHSRP in AEG tissues was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Cell function experiments showed that KHSRP overexpression significantly promoted AEG cell proliferation, migration, and invasion *in vitro* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). *In vivo* animal experiments showed that KHSRP promoted AEG cell xenograft tumor growth and lung metastasis in nude mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After KHSRP knockdown, the phosphorylation levels of JAK1 and STAT3 in the JAK/STAT signaling pathway were significantly reduced, while overexpression of KHSRP led to the opposite results ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Rescue experiment showed that KHSRP could reverse the inhibition of cell proliferation, migration, and invasion caused by JAK1/STAT3 knockdown ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** KHSRP regulates the malignant progression of AEG cells by activating JAK1/STAT3 signaling axis. KHSRP may become a potential target for the clinical treatment of AEG.

[Key words] adenocarcinoma of esophagogastric junction (AEG); KH-type splicing regulatory protein (KHSRP); JAK1/STAT3 signaling pathway; proliferation; migration; invasion; mouse model

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(1): 38-47. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.01.006]

食管胃结合部腺癌(adenocarcinoma of esophagogastric junction, AEG)是一种原发于食管胃结合部上皮组织的恶性肿瘤,肿瘤中心位于食管胃结合部上下5 cm范围内^[1-2]。AEG在国内往往被称为贲门癌(位于食管与胃交界线下2 cm范围内的癌症),而食道下段腺癌发生于食管下端而不涉及食管胃结合部^[3]。研究^[4-6]发现,AEG在全球肿瘤相关死亡原因中居第四位,其发病率呈逐年增高的趋势。因此,深入研究AEG发生发展的分子机制具有重要意义^[7-8]。Janus 激酶/信号转导及转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路是一种细胞信号转导的范例,源于对细胞如何响应干扰素(interferon, IFN)的研究^[9]。JAK/STAT信号通路在多种生物学过程中发挥重要作用,包括造血、免疫和代谢、肿瘤的发生与发展等^[10-12]。KH型剪切调节蛋白(KH-type splicing regulatory protein, KHSRP)是一种多功能核酸结合蛋白,其表达水平及蛋白结构的改变与肿瘤的发生与发展密切相关^[13]。研究结果^[14]表明,KHSRP介导的NF-κB、PI3K/Akt或p38信号通路的激活与肿瘤发生与转移密切相关。然而,尚未见KHSRP-JAK/STAT信号通路与AEG发生与发展相关的研究报道。因此,本研究基于数据库检索和以往实验研究基础,将研究目标锁定在KHSRP和JAK/STAT信号通路,通过预实验初步验证KHSRP和JAK/STAT信号通路在AEG细胞中的表达水平,进一步探讨KHSRP对AEG细胞生物学行为的影响,以及KHSRP是否通过JAK/STAT信号通路调控AEG发生与发展,从而为AEG的精准诊治提供新的生物标志物和分子靶标。

1 材料和方法

1.1 组织标本、细胞、实验动物及主要试剂

收集2017年1月至2018年12月间在河南大学淮河医院确诊的64例AEG患者的癌和相应的癌旁组织标本及临床资料。病例纳入标准:(1)病理学检

查确诊为AEG患者;(2)肿瘤累及食管胃交界部。病例排除标准:(1)曾经接受手术、放疗、化疗或辅助治疗者;(2)存在基础疾病及其他恶性肿瘤病史者;(3)临床病理资料记录不全者。本研究已通过河南大学淮河医院伦理委员会批准(伦理审批号:HUSOM2023-348),所有患者均签署知情同意书。

4~6周龄、体质量16~22 g的SPF级BALB/c nude雄性小鼠购自北京维通利华公司[实验动物许可证号:SYXK(京)2022-0052],饲养于河南大学医学院[许可证号:SYXK(豫)2016-0006]。本实验通过动物福利伦理审查批准(伦理审批号:HUSOM2024-303),并遵循实验动物使用的3R原则进行人道化处理。

AEG细胞OE-19、TE-7、BIC-1、FLO-1、SK-GT-4和BE-3购自武汉普诺赛公司,正常食管上皮细胞Het-1A购自宁波明舟生物公司。TRIzol试剂、CCK-8试剂盒、10%聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国Sigma Aldrich公司,HiScript® 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缓冲液均购自北京索莱宝公司,BCA蛋白质定量试剂盒购自南京诺唯赞公司,Transwell小室购自美国Corning公司,慢病毒试剂购自上海吉玛公司。WB一抗、山羊抗兔二抗购自中国YEASEN公司。

1.2 细胞培养、转染及分组

所有细胞均在10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的培养基中,于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。根据KHSRP序列设计RNA,构建到载体上进行敲减或过表达处理(FLO-1、SK-GT-4细胞过表达,OE-19、TE-7细胞敲减)。将细胞接种到6孔板中培养,待细胞汇合度达到80%后进行转染,使用含有聚凝胺的慢病毒,并在转染36~72 h后更换培养基和筛选细胞。将OE-19、TE-7细胞分为sh-NC组(为无相关性的核苷酸序列插入慢病毒质粒)、sh-KHSRP组(感染敲减KHSRP慢病毒)、sh-JAK1/STAT3组、sh-JAK1/STAT3+KHSRP组;



FLO-1、SK-GT-4细胞分为Vector组(感染无相关性的核苷酸序列插入慢病毒质粒)、KHSRP组(感染过表达KHSRP慢病毒)。

1.3 免疫组化染色法检测AEG组织及癌旁组织中KHSRP蛋白的表达水平

将癌旁正常组织和AEG组织石蜡标本进行烤片、二甲苯脱蜡和梯度乙醇水化处理。接着,进行微波炉抗原修复,并用 $3\%H_2O_2$ 溶液处理以阻断内源性过氧化物酶。KHSRP抗体稀释后在 $4^{\circ}C$ 下反应过夜。次日,PBS清洗后加入二抗室温反应30 min,DAB显色,苏木素复染细胞核,氨水返蓝,最后封片。在光学显微镜下按(1)染色强度评分:无染色0分,浅棕色弱染色1分,棕色中度染色2分,深棕色强染色3分;(2)阳性细胞百分率评分:0%~ $\leq 25\%$ 1分, $>25\% \sim \leq 50\%$ 2分, $>50\% \sim \leq 75\%$ 3分, $>75\%$ 4分。两项评分相加:0~2分为低表达,3~7分为高表达。

1.4 qPCR法检测AEG组织和细胞中KHSRP、JAK1、STAT3 mRNA的表达

使用TRIzol试剂从各组AEG细胞和组织中提取总RNA,使用M-MLV RTase试剂将总RNA逆转录为cDNA。然后,按照qPCR试剂盒说明书对KHSRP mRNA的表达水平进行定量分析。引物序列:KHSRP上游引物为5'-AATGAGTACGGATCTCGGATTGG-3',下游引物为5'-CCGTCATCTTGC TTGAAGTGTA-3';JAK1上游引物为5'-ACGCTCTGGAAATCTGCTA-3',下游引物为5'-ATGATGGCTCGGAAGAAAGG-3';STAT3上游引物为5'-CTGGCCTTGTTGAAAT-3',下游引物为5'-AAGGCACCCACAGAAACAAC-3';GAPDH上游引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物为5'-GAAGATGGTATGGGATTTC-3';U6上游引物为5'-CGCTTCGGCACATATACTA-3',下游引物为5'-CGCTTCACGAATTGCGTGTCA-3'。PCR反应条件: $95^{\circ}C$ 1 min; $95^{\circ}C$ 15 s、 $60^{\circ}C$ 25 s,共40个循环。以GAPDH和U6作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因mRNA的相对表达水平。

1.5 CCK-8法检测敲减或过表达KHSRP对AEG细胞增殖的影响

将各组细胞接种在96孔板(1×10^4 个/孔)中,在含有10%FBS的培养基中培养。根据制造商的说明,分别在1、2、3、4 d时向各孔内加入10 μL CCK-8试剂,在 $37^{\circ}C$ 下反应2 h,上酶标仪检测450 nm波长处的光密度(D)值,绘制细胞增殖曲线。

1.6 Transwell小室法检测敲减或过表达KHSRP对AEG细胞迁移与侵袭的影响

利用8 μm 孔径腔室插入物的24孔板,使用

Transwell小室进行细胞侵袭和迁移能力的评估。

细胞迁移实验:将200 μL 密度为 $5\sim 8 \times 10^4$ 个/mL无血清培养基中的细胞接种到Transwell小室上室中,下室中加入800 μL 含有10%FBS的培养基。**细胞侵袭实验:**将200 μL 密度为 $5\sim 8 \times 10^5$ 个/mL无血清培养基中的细胞接种到预铺基质胶的Transwell小室上室中,下室中加入800 μL 含有10% FBS的培养基。在 $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$ 培养24~48 h后,洗去未穿膜细胞,用100%甲醇溶液固定穿膜细胞,在0.1%结晶紫染色液中染色30 min,光学显微镜下成像并计数穿膜细胞数。

1.7 WB法检测敲减或过表达KHSRP对AEG细胞KHSRP、JAK1/STAT3通路相关蛋白表达的影响

使用T-PER[®]蛋白提取试剂与磷酸酶抑制剂混合物和蛋白酶抑制剂混合物提取细胞和组织蛋白,BCA蛋白质检测试剂盒测定蛋白质浓度后,进行12%SDS-PAGE并将蛋白质条带转移到PVDF膜上,在5%脱脂牛奶溶液中封闭膜1 h后,加入稀释比例均为1:5 000的KHSRP、JAK1/STAT3、GAPDH一抗, $4^{\circ}C$ 下处理过夜。TBST清洗膜3次后,将膜加入羊抗兔二抗(稀释比例为1:5 000)中反应1.5 h。最后,应用ECL化学发光试剂盒显影,用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.8 AEG细胞裸鼠异种移植瘤模型的建立及观察

将密度 5×10^6 个的sh-KHSRP和sh-NC组OE-19细胞,以及过表达KHSRP和Vector组FLO-1细胞,分别接种到裸鼠的右背侧皮下组织中,每组8只。每3 d测量一次肿瘤的体积,肿瘤体积计算公式为“(长×宽²)/2”。3~4周后,断颈处死小鼠,分离移植瘤,称量质量并测量体积,将肿瘤拍照、记录后,将其固定于10%中性福尔马林溶液中,以备进一步研究。

1.9 AEG细胞裸鼠尾静脉肺转移模型的建立及观察

将密度为 1×10^6 个/mL的sh-KHSRP及sh-NC组OE-19细胞、KHSRP及Vector组FLO-1细胞分别注射到裸鼠(0.1 mL/只)的侧尾静脉中,每组10只,以制备AEG细胞肺转移模型。sh-NC组和sh-KHSRP组均有2只裸鼠死亡。7~10周后,断颈处死小鼠,分离小鼠肺组织并固定于10%中性福尔马林溶液中,经石蜡包埋、制片、H-E染色后,在光学显微镜下观察肺转移灶。

1.10 细胞拯救实验

在含有敲减JAK1/STAT3的OE-19、TE-7细胞加入过表达的KHSRP,通过qPCR法检测各组细胞中的KHSRP mRNA表达水平,CCK-8和Transwell小室实验观察过表达KHSRP能否逆转敲减JAK1/STAT3对AEG细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用,具体

实验方法同 1.4、1.5 和 1.6。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。利用 GraphPad Prism8.0 软件对实验数据进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间比较采用独立样本 *t* 检验或者单因素方差分析(ANOVA); 非正态分布的数据或者计数数据以例数(%)表示, 各组间比较采用卡方检验; 利用 Kaplan-Meier 分析进行生存分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

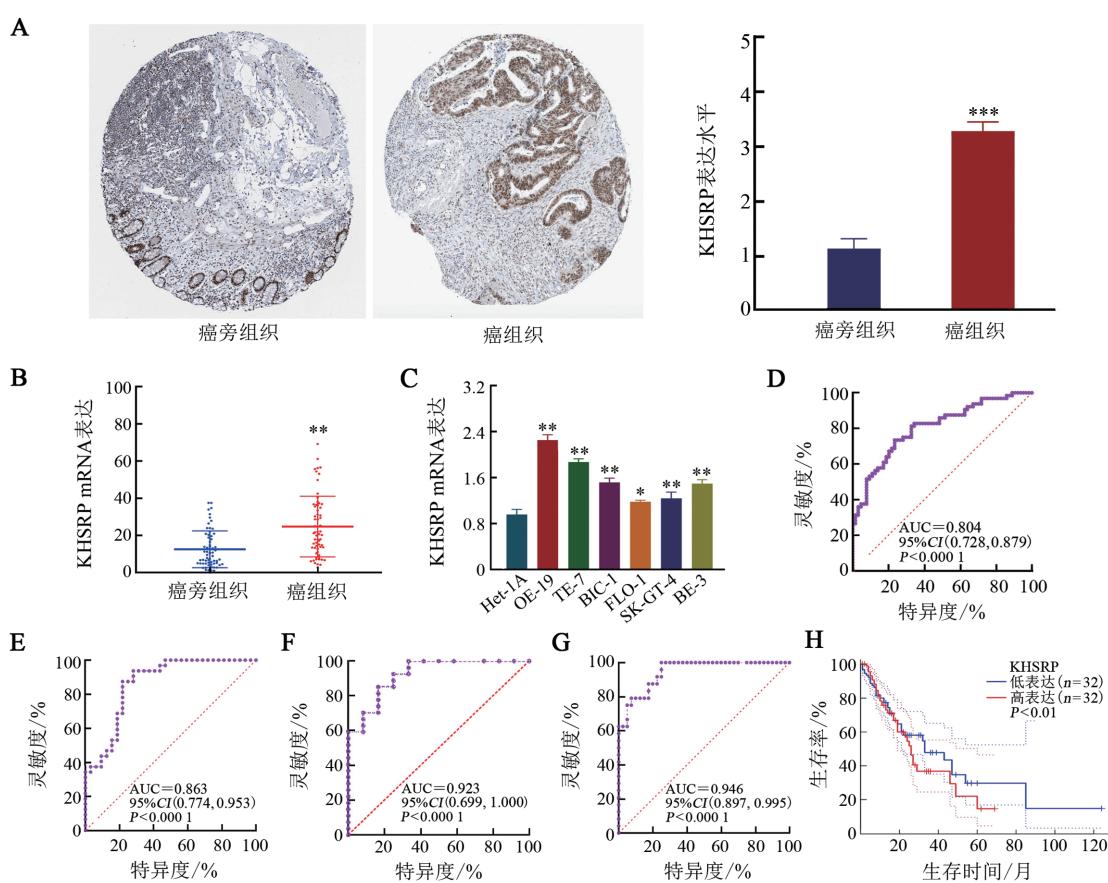
2 结 果

2.1 KHSRP 在 AEG 组织和细胞中呈高表达

免疫组化染色法检测结果(图 1A)显示, AEG 组织中 KHSRP 表达水平显著高于癌旁组织($P < 0.001$)。qPCR 法检测结果显示, 与癌旁组织相比, AEG 组织中 KHSRP mRNA 表达水平显著增加(图 1B, $P < 0.01$); 与 Het-1A 细胞相比, AEG 细胞中 KHSRP mRNA 表达水平平均显著升高(图 1C, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。OE-19 和 TE-7 细胞中内源性 KHSRP 表达水平较高, 而 FLO-1 和

SK-GT-4 细胞中内源性 KHSRP 表达较低, 表明 KHSRP 在高转移性 AEG 细胞中的表达水平远高于低转移性 AEG 细胞。因此, 后续实验选择 OE-19 和 TE-7 细胞进行 KHSRP 敲减实验, 选择 FLO-1 和 SK-GT-4 细胞进行 KHSRP 过表达实验。

收集的 64 例 AEG 患者的肿瘤分期和淋巴结转移资料, 与 AEG 中 KHSRP mRNA 的表达水平进行了受试者工作曲线分析, 结果显示, KHSRP 在 64 例 AEG 组织总样本中 $AUC = 0.804$ (图 1D, $P < 0.0001$); KHSRP 在 32 例 AEG 表达上调样本中 $AUC = 0.863$ (图 1E, $P < 0.0001$); 32 例表达上调 AEG 患者不同分期 ROC 曲线下面积 $AUC = 0.923$ (图 1F, $P < 0.0001$), 表达上调 AEG 患者有无淋巴结转移 ROC 曲线下面积 $AUC = 0.946$ (图 1G, $P < 0.0001$)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, KHSRP 高表达与 AEG 患者生存时间密切相关(图 1H, $P < 0.01$)。以上结果表明, KHSRP 在 AEG 组织中呈现高表达, 并且 KHSRP 表达上调与 AEG 患者转移的恶性进程密切相关。



A: 免疫组化染色法检测 AEG 组织中 KHSRP 表达水平($\times 40$); B、C: qPCR 法检测 KHSRP mRNA 在 AEG 组织(B)和细胞(C)中的表达; D~G: 受试者工作曲线特征分析 KHSRP 表达随 TNM 分期和有淋巴结转移逐渐升高; H: KHSRP 不同表达水平与总生存期的关系。与癌旁组织或 Het-1A 细胞相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

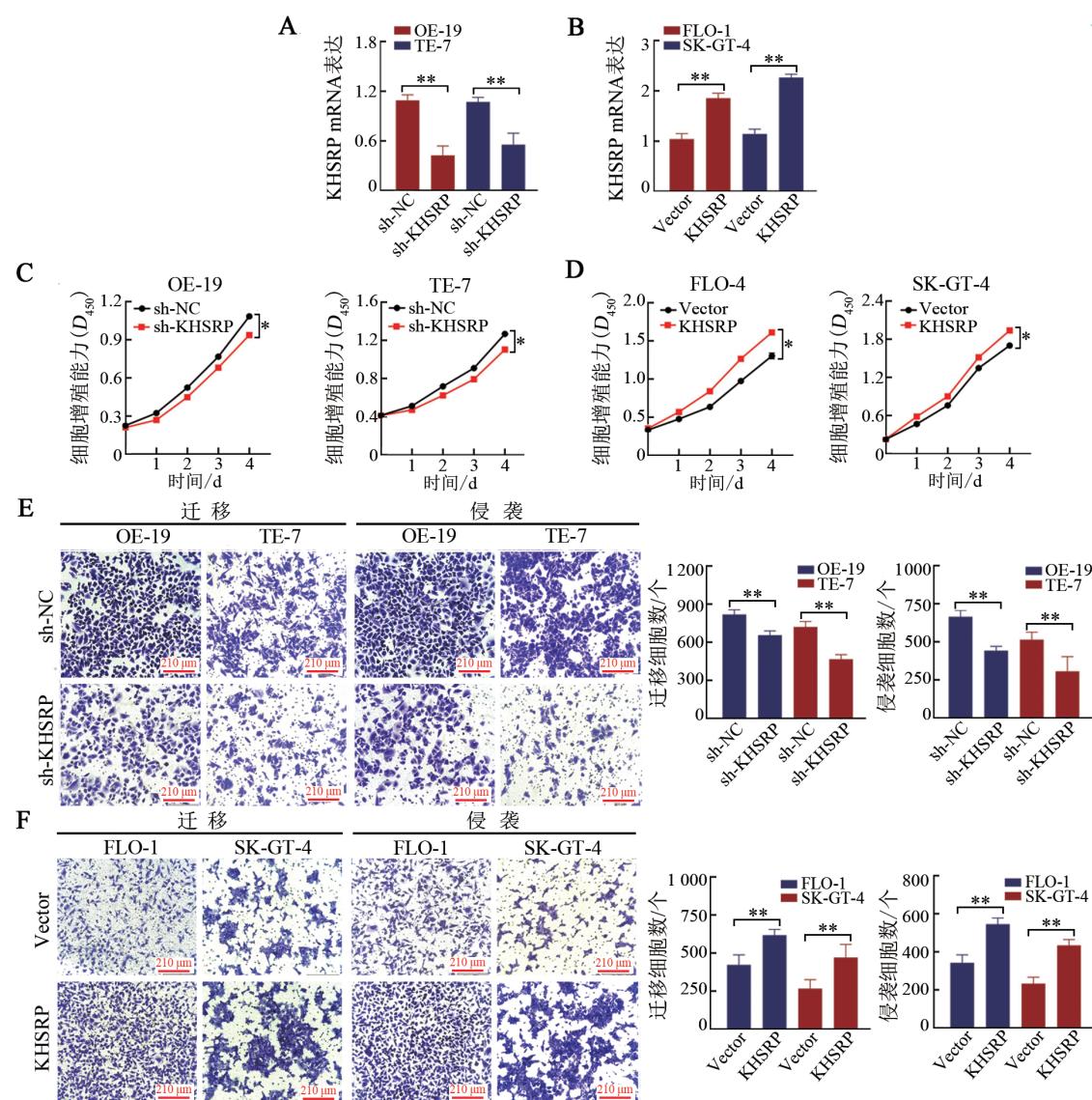
图 1 KHSRP 在 AEG 组织及细胞中的表达及其与患者临床特征和预后的关系

2.2 KHSRP 促进 AEG 细胞体外增殖、迁移和侵袭

qPCR 法检测结果显示, 敲减 KHSRP 的 OE-19 和 TE-7 细胞中 KHSRP mRNA 表达水平均显著降低(图 2A, 均 $P < 0.01$), 过表达 KHSRP 的 FLO-1 和 SK-GT-4 细胞中 KHSRP mRNA 表达水平均显著升高(图 2B, 均 $P < 0.01$)。结果表明, 成功构建了敲减或过表达 KHSRP 的细胞株, 可以进行后续功能实验。

CCK-8 检测结果显示, 敲减 KHSRP 显著降低 OE-19 和 TE-7 细胞的增殖能力(图 2C, 均 $P < 0.05$),

KHSRP 过表达则显著增强 FLO-1 和 SK-GT-4 细胞的增殖能力(图 2D, 均 $P < 0.05$)。Transwell 小室法检测结果显示, 敲减 KHSRP 显著降低 OE-19 和 TE-7 细胞的迁移和侵袭能力(图 2E, 均 $P < 0.01$), KHSRP 过表达显著增强 FLO-1 和 SK-GT-4 细胞的迁移和侵袭能力(图 2F, 均 $P < 0.01$)。结果表明, 敲减 KHSRP 显著抑制 AEG 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 而 KHSRP 过表达则显著增强 AEG 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。



A、B: qPCR 法检测敲减(A)或过表达(B)KHSRP 的转染效率;C、D: CCK-8 法检测敲减(C)或过表达(D)KHSRP 对细胞增殖的影响;E、F: Transwell 小室法检测细胞迁移(E)和侵袭(F)的影响(结晶紫染色, $\times 200$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 敲减或过表达 KHSRP 对 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

2.3 KHSRP 促进裸鼠 AEG 细胞移植瘤生长和转移

成功构建 AEG 细胞裸鼠异种移植模型。35 d 时观察结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-KHSRP 组小鼠移植瘤体积显著减小(图 3A, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 Vector

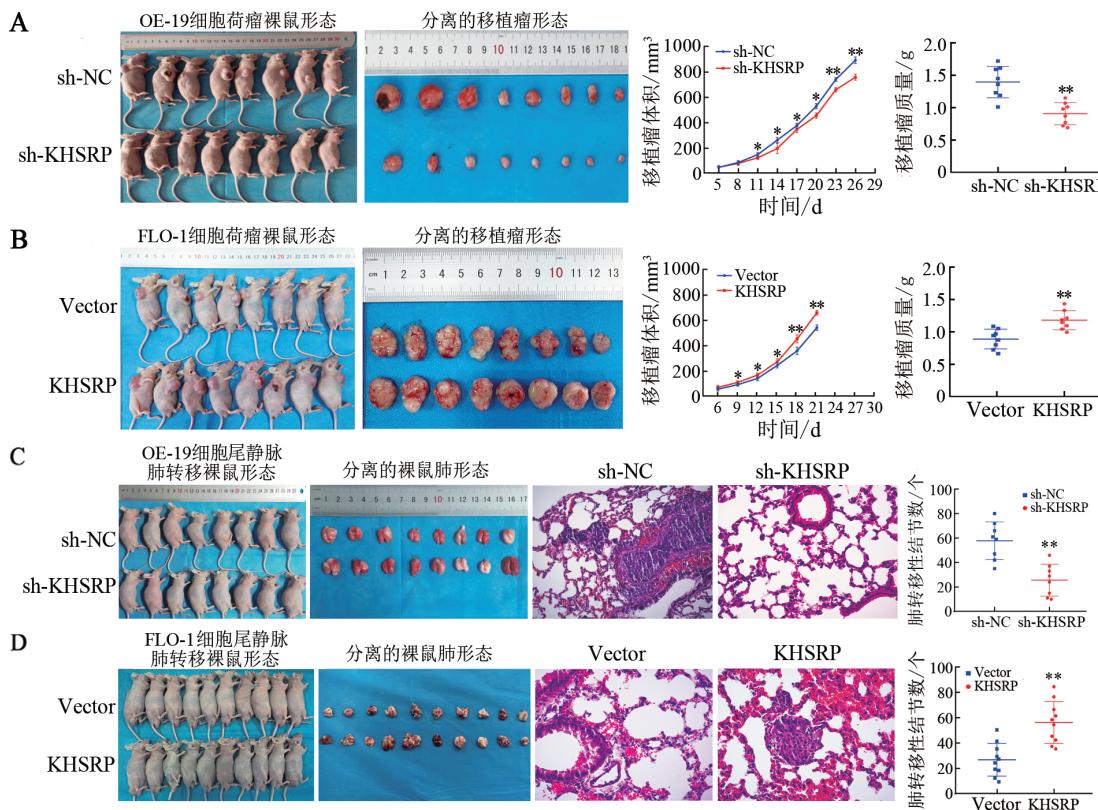
组相比, KHSRP 组小鼠移植瘤体积显著增大(图 3B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验结束后处死小鼠, 测量移植瘤质量发现, sh-KHSRP 组小鼠移植瘤质量显著小于 sh-NC 组(图 3A, $P < 0.01$); KHSRP 组小鼠移植质

量显著高于 Vector 组(图 3B, $P < 0.01$)。

成功构建 AEG 细胞裸鼠尾静脉肺转移模型。通过 H-E 染色确认小鼠肺表面转移性结节的数量, 结果发现, sh-KHSRP 组明显低于 sh-NC 组(图 3C,

$P < 0.01$), 过表达组则反之(图 3D, $P < 0.01$)。

上述实验结果表明, KHSRP 在裸鼠体内具有促进 AEG 细胞移植瘤生长与肺转移的作用。



A、B:荷瘤裸鼠实验检测敲减(A)或过表达(B)KHSRP对裸鼠AEG细胞移植瘤生长的影响;C、D:尾静脉肺转移实验检测敲减(C)或过表达(D)KHSRP对裸鼠肺转移的影响(显微镜下AEG肺组织病理图;H-E染色,×200)。

与 sh-NC 或 Vector 组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图3 敲减或过表达 KHSRP 对裸鼠体内 AEG 细胞生长和肺转移的影响

2.4 AEG 细胞中 KHSRP 对 JAK/STAT 信号通路转录水平的影响

qPCR 实验结果显示,与 sh-NC 组比较, sh-KHSRP 组 OE-19 和 TE-7 细胞中 JAK1、p-JAK-1 和 STAT3 mRNA 表达水平显著降低(图 4A, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余分子降低不明显;过表达组 FLO-1 和 SK-GT-4 细胞中 JAK1、p-JAK-1 和 STAT3 mRNA 表达水平则显著增高(图 4B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其余分子增高不明显。结果表明, KHSRP 可以激活 JAK1/STAT3 信号通路。

2.5 AEG 细胞中 KHSRP 靶向调控 JAK/STAT 信号通路

WB 实验分析比较了 KHSRP 敲减后的 AEG 细胞中与 JAK/STAT 信号通路相关的 8 个关键分子的相对表达水平,结果显示,有 3 个关键分子(JAK1、p-JAK-1、STAT3)的蛋白表达水平发生改变,其中敲减组的 JAK1、p-JAK-1、STAT3 蛋白表达显著降低(图

5A, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而过表达组的则显著升高(图 5B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明, KHSRP 对 JAK1/STAT3 信号通路存在正向调控作用。

2.6 KHSRP 调节 JAK1/STAT3 信号通路促进 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭

qPCR 法检测结果显示,与 sh-JAK1/STAT3 组相比, sh-JAK1/STAT3 + KHSRP 组细胞 KHSRP mRNA 表达水平平均显著增高(图 6A, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CCK-8 法检测结果显示,过表达 KHSRP 可以逆转敲减 JAK1/STAT3 对 AEG 细胞增殖能力的抑制作用(图 6B, 均 $P < 0.01$)。Transwell 小室法实验结果显示,在转染 KHSRP 前, sh-JAK1 组和 sh-STAT3 组细胞的迁移和侵袭能力较 sh-NC 组均明显减弱,但转染 KHSRP 后,两组细胞的迁移和侵袭能力均明显增强(图 6C, 均 $P < 0.01$)。结果表明, KHSRP 通过调节 JAK1/STAT3 信号通路促进 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭。

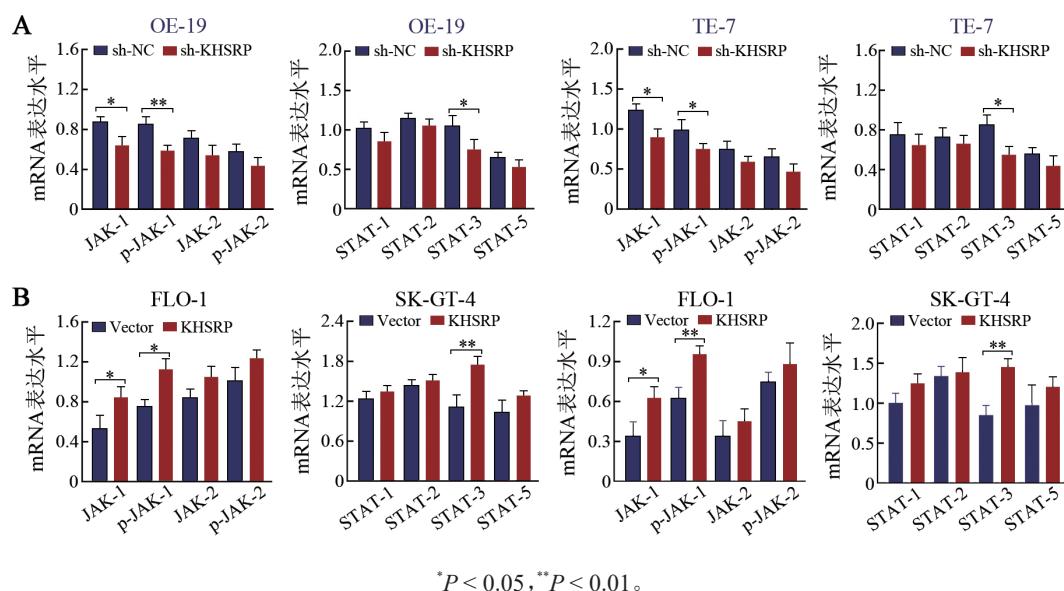


图4 qPCR法敲减(A)或过表达(B)KHSRP对JAK/STAT信号通路相关mRNA表达的影响

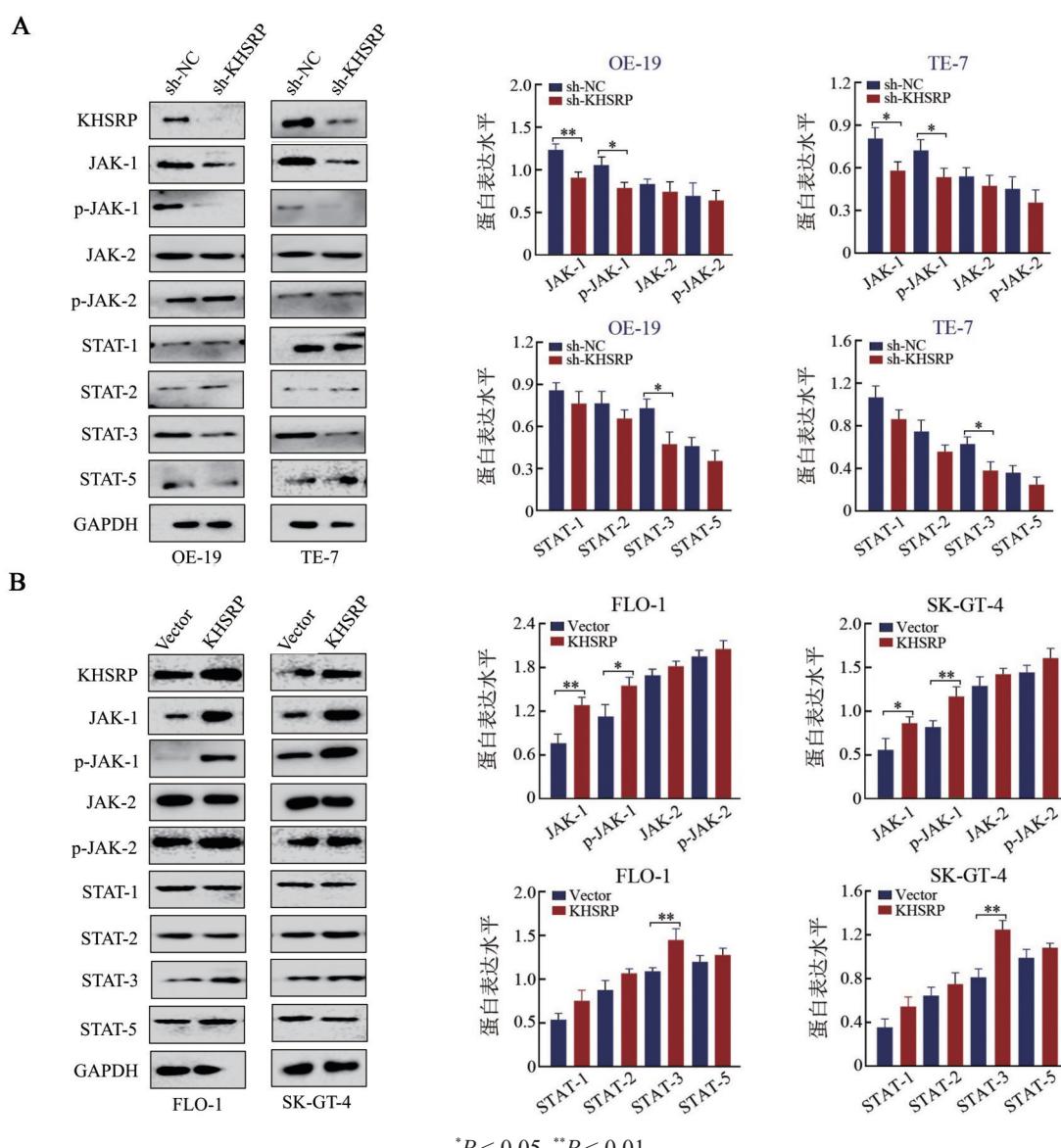
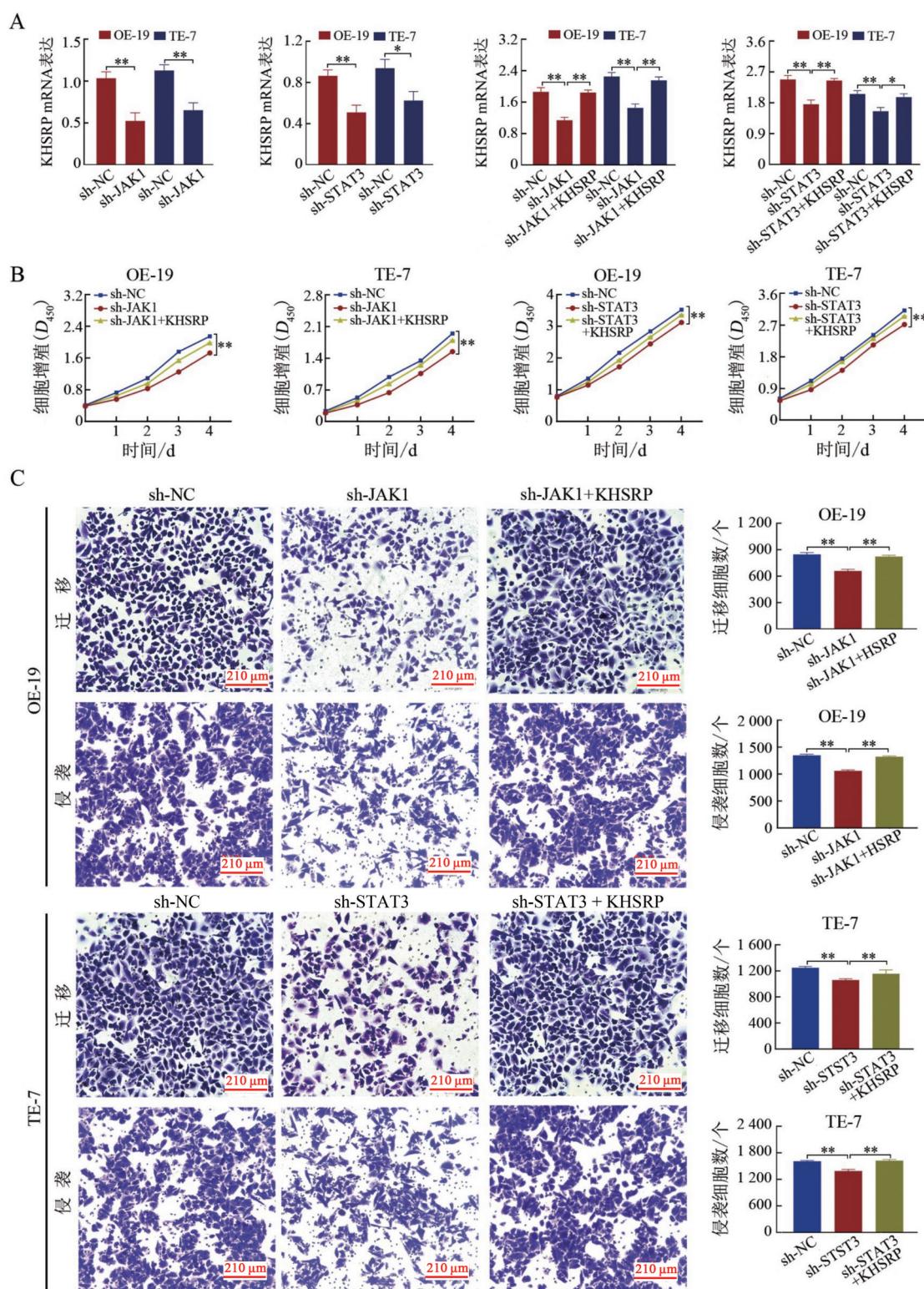


图5 敲减(A)或过表达(B)KHSRP对JAK/STAT通路相关蛋白表达的影响



A:qPCR 法检测转染效率;B:CCK-8 法检测 KHSRP 可以恢复 sh-JAK1 和 sh-STAT3 对细胞增殖能力的影响;C:Transwell 小室法检测 KHSRP 可以恢复 sh-JAK1 和 sh-STAT3 细胞迁移和侵袭能力的影响(结晶紫染色)。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图6 KHSRP 通过调控 JAK1/STAT3 信号通路促进 AEG 细胞的增殖、迁移和侵袭

3 讨 论

AEG 在肿瘤生物学行为和临床病理特征方面不同于胃癌和食管癌，并且缺少独立的 TNM 分期系统，从而影响对 AEG 的预防和治疗^[15]。目前，由于缺乏

靶向治疗的相关研究，多数 AEG 患者的预后较差且 5 年生存率低于 15%^[16]。因此，探明各种致癌基因在 AEG 细胞异常增殖中的作用，对于揭示 AEG 的发病机制和确定新的治疗靶点具有重要意义^[17]。到目前为止，已有多项研究^[18]聚焦于 KHSRP 在肿瘤的发生



和发展过程中所扮演的角色。研究^[19-20]发现, KHSRP 促进非小细胞肺癌的生长和转移。KHSRP 在胰腺癌细胞中主要分布于细胞核和细胞突起中, 通过小干扰 RNA 技术抑制 KHSRP, 可以显著减少这些细胞突起的形成, 从而抑制胰腺癌细胞的侵袭和转移^[13]。然而, 目前关于 KHSRP 如何驱动 AEG 细胞恶性进展的分子机制研究较少, 亟需深入挖掘 KHSRP 影响 AEG 功能的具体靶点及分子作用途径。

本研究通过体外和体内实验探讨 KHSRP 在调控 AEG 细胞侵袭和转移中的生物学功能。首先验证了在正常食管上皮细胞和 AEG 细胞中 KHSRP 的表达差异, 发现 KHSRP 在 AEG 细胞中表达上调, 并从组织水平上得到进一步验证; 受试者工作曲线和 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, KHSRP 表达水平的增加与晚期肿瘤分期、淋巴结远处转移和患者总生存期显著相关; 此外, 体外细胞功能实验发现, 敲减 KHSRP 可以抑制 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭, 过表达 KHSRP 则会促进 AEG 细胞增殖、迁移和侵袭。通过构建裸鼠异种移植瘤模型和肺转移模型发现, 裸鼠体内移植瘤的质量、体积、肺表面转移性结节的数量受体内 KHSRP 表达水平的影响, 过表达 KHSRP 会促进裸鼠移植瘤质量和体积增大、肺表面转移性结节的数量增多。

在肿瘤发生发展中, JAK2/STAT3 通路是发挥重要作用的细胞信号转导通路之一^[21-22]。JAK 是细胞因子和生长激素信号转导的介质。激活的 JAK 磷酸化信号转导和转录激活因子(STAT)蛋白, 转位到细胞核, 调节参与细胞增殖、分化和凋亡的基因转录^[23]。JAK/STAT 信号转导是肿瘤进展的基石, 既可以作为肿瘤生长与转移的肿瘤内在驱动因素, 也可以作为免疫监视的调节剂^[24]。例如, circNOL10 通过调节 miR-767-5p/SOCS2 轴使 JAK2/STAT5 信号失活抑制乳腺癌细胞的增殖^[25]。JAK/STAT 信号通路的上调和 STAT3 的抑制可减少乳腺癌中的干细胞群^[26]。基于数据库检索和以往研究基础, 将 KHSRP 的下游靶向通路锁定在 JAK/STAT 信号通路。本研究通过敲减 KHSRP, 发现 JAK1、p-JAK-1、STAT3 mRNA 及蛋白的表达水平明显下降, 过表达则反之, 说明 KHSRP 对 JAK1/STAT3 信号通路具有正向调控作用。为阐明 KHSRP 与 JAK1/STAT3 信号通路间的作用机制, 进行细胞拯救实验发现, 过表达 KHSRP 可以逆转敲减 JAK1/STAT3 对 AEG 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用。KHSRP 介导的肿瘤生长和转移至少部分归因于 JAK1/STAT3 信号通路的激活, 这对 AEG 的发生和转移至关重要。因此, JAK1/STAT3 信号通路可能是 KHSRP 在 AEG 中的致癌功能的原因。

综上所述, 本研究结果表明, KHSRP 可以通过 JAK1/STAT3 信号通路促进 AEG 细胞的增殖、侵袭和迁移, 未来 KHSRP 有可能成为 AEG 诊断与治疗潜在的生物标志物和新的治疗靶点。但是本研究还存在一定的局限性, 例如: 没有通过双荧光素酶报告基因实验检测 KHSRP 和 JAK1/STAT3 mRNA 之间的靶向关系; 在进行细胞拯救实验时未能做全套验证, 仅对下游 JAK1/STAT3 敲减后过表达 KHSRP 进行了验证, 而未对 KHSRP 敲减后过表达 JAK1/STAT3 进行验证。因此, 在未来的研究中应完善对 KHSRP 和 JAK1/STAT3 信号通路靶向关系进行进一步的验证, 使结果更具说服力。同时关注 KHSRP 是否与其他肿瘤细胞的恶性生物学行为有关, 深入挖掘 KHSRP 在不同类型肿瘤细胞中的作用机制, 为临床肿瘤的靶向治疗提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN J R, HUANG Q S, LI Y Q, et al. Comparative single-cell analysis reveals heterogeneous immune landscapes in adenocarcinoma of the esophagogastric junction and gastric adenocarcinoma[J/OL]. Cell Death Dis, 2024, 15(1): 15[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10770337/>. DOI: 10.1038/s41419-023-06388-6.
- [2] NAGTEGAAL I D, ODZE R D, KLIMSTRA D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system[J]. Histopathology, 2020, 76(2): 182-188. DOI: 10.1111/his.13975.
- [3] RICE T W, PATIL D T, BLACKSTONE E H. 8th edition AJCC/UICC staging of cancers of the esophagus and esophagogastric junction: application to clinical practice[J]. Ann Cardiothorac Surg, 2017, 6(2): 119-130. DOI: 10.21037/acs.2017.03.14.
- [4] JANJIGIAN Y Y, 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/OL]. Lancet, 2021, 398(10294): 27-40[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8436782/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
- [5] LIU K, YANG K, ZHANG W H, et al. Changes of esophagogastric junctional adenocarcinoma and gastroesophageal reflux disease among surgical patients during 1988-2012: a single-institution, high-volume experience in China[J/OL]. Ann Surg, 2016, 263(1): 88-95[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679348/>. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001148.
- [6] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [7] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, 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): 855-883. DOI: 10.6004/jnccn.2019.0033.



- [8] LIU Y, YU M Y, CHENG X C, et al. A novel LUAD prognosis prediction model based on immune checkpoint-related lncRNAs [J/OL]. *Front Genet*, 2022, 13: 1016449[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9533213/>. DOI: 10.3389/fgene.2022.1016449.
- [9] JOHNSON H M, NOON-SONG E, AHMED C M. Noncanonical IFN signaling, steroids, and STATs: a probable role of V-ATPase[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 4143604[2024-07-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31275057/>. DOI: 10.1155/2019/4143604.
- [10] HIN TANG J J, HAO THNG D K, LIM J J, et al. JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Hepat Oncol*, 2020, 7(1): HEP18 [2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7137178/>. DOI: 10.2217/hep-2020-0001.
- [11] LIU C R, FENG H Q, SONG L H, et al. Synergistic effects of thalidomide and cisplatin are mediated via the PI3K/AKT and JAK1/STAT3 signaling pathways in cervical cancer[J/OL]. *Oncol Rep*, 2022, 48(4): 169[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9478987/>. DOI: 10.3892/or.2022.8384.
- [12] SARAPULTSEV A, GUSEV E, KOMELKOVA M, et al. JAK-STAT signaling in inflammation and stress-related diseases: implications for therapeutic interventions[J/OL]. *Mol Biomed*, 2023, 4(1): 40[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10632324/>. DOI: 10.1186/s43556-023-00151-1.
- [13] TANIUCHI K, OGASAWARA M. KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2020, 11(2): 131-147[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6968780/>. DOI: 10.18632/oncotarget.27413.
- [14] SHI S S, ZHAO J Y, YANG L L, et al. KHSRP participates in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(2): 454-465. DOI: 10.1007/s12031-014-0367-7.
- [15] LI S L, YUAN L, XU Z Y, et al. Integrative proteomic characterization of adenocarcinoma of esophagogastric junction[J/OL]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 778[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9922290/>. DOI: 10.1038/s41467-023-36462-8.
- [16] HU X, WU L X, LIU B, et al. Immune infiltration subtypes characterization and identification of prognosis-related lncRNAs in adenocarcinoma of the esophagogastric junction[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 651056[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8195339/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.651056.
- [17] WANG Z Y, XIAO W, JIANG Y Z, et al. HN1L promotes invasion and metastasis of the esophagogastric junction adenocarcinoma[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(5): 650-658[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7919121/>. DOI: 10.1111/1759-7714.13842.
- [18] XU J Y, WANG D S, MA H L, et al. KHSRP combines transcriptional and posttranscriptional mechanisms to regulate monocytic differentiation[J]. *Blood Sci*, 2022, 4(3): 103-115. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000122.
- [19] YAN M X, SUN L, LI J, et al. RNA-binding protein KHSRP promotes tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 478[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6882349/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1479-2.
- [20] TONG L H, LUO Y S, 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. DOI: 10.1007/s11010-016-2806-y.
- [21] 马涛, 王红梅, 赵婷, 等. 阿曼托双黄酮通过JAK2-STAT3通路影响甲状腺癌SW579细胞的增殖和凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2023, 30(3): 211-216. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.004.
- [22] 朱志明, 王苏美, 唐青, 等. 基于EGFR/AKT和JAK2/STAT3通路研究α-常春藤皂苷单独或与顺铂联用对非小细胞肺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(4): 333-341. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.003.
- [23] LAMICHHANE S, MO J S, SHARMA G, et al. MicroRNA 452 regulates IL20RA-mediated JAK1/STAT3 pathway in inflammatory colitis and colorectal cancer[J/OL]. *Inflamm Res*, 2021, 70(8): 903-914 [2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/26323879/>. DOI: 10.1007/s00011-021-01486-7.
- [24] JIANG Y, XU C H, ZHAO Y, et al. LINC00926 is involved in hypoxia-induced vascular endothelial cell dysfunction via miR-3194-5p regulating JAK1/STAT3 signaling pathway[J/OL]. *Eur J Histochem*, 2023, 67(1): 3526[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10300425/>. DOI: 10.4081/ejh.2023.3526.
- [25] WANG F, WANG X C, LI J R, et al. Correction to: CircNOL10 suppresses breast cancer progression by sponging miR-767-5p to regulate SOCS₂/JAK/STAT signaling[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 31[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8074445/>. DOI: 10.1186/s12929-021-00723-9.
- [26] ZHANG X, HU B, SUN Y F, et al. Arsenic trioxide induces differentiation of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma through inhibition of LIF/JAK1/STAT3 and NF-κB signaling pathways synergistically[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(2): e335[2024-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7901720/>. DOI: 10.1002/ctm2.335.

[收稿日期] 2024-07-06

[修回日期] 2024-11-05

[本文编辑] 党瑞山