

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2026.02.0117

论著

# LINC01296 调控 STAT3 影响头颈部鳞状细胞癌顺铂敏感性的研究

刘小龙<sup>1</sup>, 王聿清<sup>1</sup>, 郑建伟<sup>1</sup>, 孙孟宇<sup>3</sup>, 周旋<sup>3</sup>, 任玉<sup>2</sup>, 梅玫<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070; 2. 天津医科大学基础医学院遗传学系, 天津 300070; 3. 天津医科大学肿瘤医院颌面耳鼻喉肿瘤科, 天津 300060)

**摘要** 目的: 探究 LINC01296 在头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)中表达与临床相关性及其对顺铂敏感性的影响。方法: 通过癌症基因组图谱(TCGA)数据库分析 LINC01296 在 HNSCC 中的表达及预后。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)与荧光原位杂交(FISH)检测 HNSCC 患者的肿瘤、癌旁组织中 LINC01296 表达差异, 并收集患者的临床病理资料。RT-qPCR 检测 HNSCC 各空白组细胞中 LINC01296 的表达水平。细胞增殖检测实验、平板克隆实验和流式细胞术检测 shNC 组和 shLINC01296 组的细胞增殖和凋亡。通过核糖核酸-蛋白质结合预测、核糖核酸沉降与核糖核酸免疫沉淀实验验证 LINC01296 与信号转导及转录激活因子 3(STAT3)的相互作用。RT-qPCR 和蛋白印迹法实验检测 shNC 和 shLINC01296 组细胞 STAT3 mRNA 和蛋白水平。实验设置敲低对照组(shNC)、敲低 LINC01296 组(shLINC01296)、过表达对照组(Vector)、过表达 STAT3 组(STAT3)、敲低 LINC01296 并过表达 STAT3 组(shLINC01296+STAT3)。分别通过蛋白印迹法、细胞增殖检测实验和平板克隆实验检测敲低 LINC01296 对 SCC15 细胞顺铂敏感性的影响。免疫组化(IHC)评估肿瘤组织中 p-STAT3<sup>Y705</sup> 与 LINC01296 的相关性。结果: TCGA 结果显示, LINC01296 在 HNSCC 肿瘤组织中高表达( $t=6.711, P<0.001$ ), 并与预后不良相关( $HR=1.42, 95\%CI: 1.09\sim 1.85, P=0.01$ )。RT-qPCR 结果显示 LINC01296 在患者肿瘤组织中高表达( $t=3.641, P<0.001$ )。FISH 染色显示, LINC01296 在患者肿瘤组织中显著高表达。临床特征显示 LINC01296 表达与 T 分期( $\chi^2=13.4634, P<0.001$ )和 AJCC 分期( $\chi^2=4.9583, P<0.05$ )呈正相关。在 SCC15 细胞中, LINC01296 的表达相对较高。与 shNC 组相比, 敲低 LINC01296 降低细胞增殖速率( $t=5.135, P<0.001$ )和克隆形成数量( $t=18.00, P<0.0001$ ), 同时促进细胞凋亡( $t=5.861, P<0.01$ )。LINC01296 与 STAT3 蛋白直接结合; 敲低 LINC01296 后, STAT3 mRNA 和蛋白水平无明显变化(均  $P>0.05$ ), STAT3<sup>Y705</sup> 的磷酸化水平降低, SCC15 细胞对顺铂的敏感性恢复。IHC 结果显示, p-STAT3<sup>Y705</sup> 与 LINC01296 的表达呈正相关( $r=0.61, P<0.001$ )。结论: LINC01296 在 HNSCC 中高表达并与预后不良相关, 通过调控 STAT3 磷酸化可降低 HNSCC 细胞对顺铂的敏感性。

**关键词** LINC01296; 头颈部鳞状细胞癌; 信号转导及转录激活因子 3; 顺铂

中图分类号 R739.91

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2026)02-0117-09

## LINC01296 modulates STAT3 to affect cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma

LIU Xiaolong<sup>1</sup>, WANG Yuqing<sup>1</sup>, ZHENG Jianwei<sup>1</sup>, SUN Mengyu<sup>3</sup>, ZHOU Xuan<sup>3</sup>, REN Yu<sup>2</sup>, MEI Mei<sup>1</sup>

(1. Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3. Department of Maxillofacial and Otorhinolaryngology Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical relevance of LINC01296 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its effect on cisplatin sensitivity. **Methods:** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database analysis evaluated LINC01296 expression and prognosis in HNSCC. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and fluorescence in situ hybridization (FISH) were used to quantify the differential expression of LINC01296 in tumor and adjacent non-tumor tissues from HNSCC patients, and clinicopathological data were compiled. The expression level of LINC01296 in control cells of HNSCC was detected by RT-qPCR. Cell proliferation assay, colony formation assay and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis in the shNC group and shLINC01296 group. The interaction between LINC01296 and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was predicted by RNA-protein interaction prediction using only sequence information (RPISeq) and verified through RNA pull-down and RNA immunoprecipitation (RIP) assays. RT-qPCR and Western blotting were used to quantify STAT3 mRNA and protein levels in the shNC group and LINC01296 knockdown group. Groups including shNC, shLINC01296, Vector, STAT3, and shLINC01296+STAT3 were established, and the effect of LINC01296 knockdown on cisplatin sensitivity in SCC15 cells was evaluated by Western blotting, cell proliferation assays, and colony-formation assays. Immunohistochemistry (IHC) was used to evaluate the correlation between p-STAT3<sup>Y705</sup> and LINC01296 in tumor tissues. **Results:** TCGA data showed that LINC01296 was

基金项目 国家自然科学基金面上项目(82272663)

作者简介 刘小龙(1997-),男,硕士在读,研究方向:细胞生物学;通信作者:梅玫, E-mail: meim@tmu.edu.cn。

highly expressed in HNSCC tumor tissues ( $t=6.711, P<0.001$ ) and associated with poor prognosis ( $HR=1.42, 95\% CI: 1.09-1.85, P=0.01$ ). RT-qPCR results demonstrated that LINC01296 was highly expressed in tumor tissues ( $t=3.641, P<0.001$ ). FISH staining demonstrated markedly higher LINC01296 expression in tumor tissues. Clinical characteristics analysis indicated that LINC01296 expression positively correlated with T stage ( $\chi^2=13.463 4, P<0.001$ ) and AJCC stage ( $\chi^2=4.958 3, P<0.05$ ). In SCC15 cells, LINC01296 expression was relatively high. Compared with the knockdown control group, knockdown of LINC01296 decreased the cell proliferation rate ( $t=5.135, P<0.001$ ) and colony formation number ( $t=18.00, P<0.000 1$ ), while promoting cell apoptosis ( $t=5.861, P<0.01$ ). Knockdown of LINC01296, which directly binds to STAT3, specifically reduced STAT3<sup>Y705</sup> phosphorylation without altering STAT3 mRNA or protein levels, and restored DDP sensitivity in SCC15 cells. IHC analysis revealed a statistically significant positive correlation between p-STAT3<sup>Y705</sup> and LINC01296 expression ( $r=0.61, P<0.001$ ). **Conclusion:** LINC01296 is highly expressed and associated with poor prognosis in HNSCC, which reduces cisplatin sensitivity in HNSCC cells by regulating STAT3 phosphorylation.

**Key words** LINC01296; head and neck squamous cell carcinoma; signal transducer and activator of transcription 3; cisplatin

头颈部癌症是全球第六大常见癌症,每年全球约有 89 万人确诊,45 万人因该病死亡,且其发病率仍在持续上升<sup>[1]</sup>。在中国,男性常见肿瘤中头颈部癌症发病率排名第 6 位,死亡率排名第 7 位。其中,鳞状细胞癌是最常见的病理类型,占有头颈部肿瘤的 90%。在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)的临床治疗中,根治性手术联合辅助化疗是目前最有效的治疗模式<sup>[2]</sup>。顺铂是 HNSCC 的标准化疗药物,但耐药性限制了其治疗效果。因此,针对顺铂治疗效果不佳的 HNSCC 患者,提高对顺铂的敏感性以解决化疗耐药的难题,具有十分重要的临床意义。

人类基因组中仅约 2%的核糖核酸(RNA)编码蛋白质,其余大部分为非编码 RNA,其中长链非编码 RNA(lncRNA)占非编码 RNA 的 68%以上。LncRNA 是由 RNA 聚合酶 II 转录生成的长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA,其功能紊乱已被证实对多种肿瘤的发生和发展产生深远影响<sup>[3]</sup>。LINC01296 是一种新发现的与肿瘤进展相关的 lncRNA,位于染色体 14q11.2<sup>[4]</sup>。研究表明,LINC01296 在神经母细胞瘤<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[7]</sup>中的表达上调,促进肿瘤进展。但其在 HNSCC 顺铂耐药中的作用尚不明确。

信号转导与转录激活因子 3(STAT3)参与细胞增殖、免疫逃逸和肿瘤转移,其在大多数肿瘤中被过度磷酸化,导致细胞核中磷酸化 STAT3 的持续产生<sup>[8]</sup>,进而影响肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭等进程。STAT3 持续激活不仅会维持肿瘤进展,还可限制标准化疗药物的疗效。阻断 STAT3 激活可使肿瘤对铂类和紫杉烷类药物重新敏感<sup>[9]</sup>。本文基于临床 HNSCC 患者样本、癌症基因组图谱(TCGA)数据库资料及相关细胞实验,分析 LINC01296 表达与 HNSCC 顺铂敏感性的相关性,为临床治疗提供新的见解与思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 临床组织样本及病例信息 收集天津医科大学肿瘤医院 2018 年 1 月至 2022 年 6 月间 54 例 HNSCC 患者肿瘤组织标本和 13 例癌旁组织标本。统计对应临床信息,包括患者性别、年龄、吸烟史、饮酒史、T 分期和 AJCC 分期等信息。本研究收集的临床组织样本及病理信息已获得患者及其家属的知情同意,并且已获得天津医科大学肿瘤医院伦理委员会审核批准(审批号:Ek2020212)。

1.1.2 HNSCC 细胞系 人下咽鳞癌 FaDu 和人舌鳞癌 SCC15、SCC25、Cal27 细胞株均购自美国模式培养物集存库(ATCC)。其中 FaDu、Cal27 用含 1% 青霉素-链霉素双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养,SCC15、SCC25 则培养于含同等补料的 DMEM/F12。细胞实验分组为:空白组(Cal27)、空白组(SCC25)、空白组(Fadu),此外 SCC15 细胞:空白组(SCC15)、敲低对照组(shNC)、敲低 LINC01296 组(shLINC01296)、过表达对照组(Vector)、过表达 STAT3 组(STAT3)、敲低 LINC01296 并过表达 STAT3 组(shLINC01296+STAT3)。

1.1.3 试剂及仪器 青霉素-链霉素双抗、TRIzol 试剂、嘌呤霉素购自北京索莱宝。空白对照载体(Vector)、STAT3 野生型(STAT3 WT)、shNC、shLINC01296 慢病毒质粒购自上海吉凯基因医学。反转录及 qPCR 试剂盒购自北京宝日医生物。GAPDH(60004-1-Ig)、Caspase-3(82202-1-RR)购自武汉三鹰;STAT3(ab119352)、p-STAT3<sup>Y705</sup>(ab76315)、p-STAT3<sup>S727</sup>(ab219593)抗体购自英国 Abcam Public Limited 公司。IgG(CST2729S)抗体购自美国 Cell Signaling Technology。RNA FISH 试剂盒购自上海吉玛基因。Magna RIP Kit 试剂盒购自德国 Merck。CCK-8 试剂购自安徽白鲨生物。DMEM/F12、DMEM 培养基、胎牛

血清均购自美国 Grand Island Biological 公司。Lipofectamine3000 转染试剂、BCA 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific。顺铂购自美国 Selleck Chemicals LLC。Odyssey 双色红外荧光成像系统购自美国 Li-cor, 流式细胞仪采购自美国 Becton Dickinson 公司, 实时荧光定量 PCR 系统购自上海罗氏制药, 显微镜购自日本奥林巴斯。

## 1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 癌症基因组图谱-头颈部鳞状细胞癌(TCGA-HNSC)项目 STAR 流程的RNAseq 数据来源于 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov>), 从中提取 TPM 格式的数据以及临床数据。通过 survival 包进行比例风险假设检验并进行拟合生存回

归,最终通过 survminer 包以及 ggplot2 包进行可视化。  
1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 TRIzol 法提取细胞或患者组织中的 RNA。应用反转录试剂盒合成 cDNA。依照设定逆转录程序,37℃反应 15 min;85℃反应 5 s,于 4℃反应即可获得 cDNA。根据试剂盒说明,使用 TB Green qPCR 试剂盒对 cDNA 进行 qPCR 检测。按照设定 PCR 循环进行实验。预变性 95℃ 30 s。然后进行 95℃ 10 s;60℃ 20 s;72℃ 15 s 为 1 个循环,共 40 个循环。分别评估了 FaDu、SCC15、SCC25、Cal27 细胞系及患者组织中 LINC01296 的表达水平,并评估了 SCC15 细胞中 STAT3 的表达水平。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。将 GAPDH 作为 LINC01296、STAT3 的内参。引物序列见表 1。

表 1 引物序列及产物大小

Tab.1 Primer sequences and length of products

| 基因名称      | 上游引物(5'→3')          | 下游引物(3'→5')          | 引物大小(bp) |
|-----------|----------------------|----------------------|----------|
| LINC01296 | TGGCTGGTGGAGGATGTCTT | CCTGGGCTCCCTCAAATCAG | 20       |
| STAT3     | GGACTTCCCGGACAGTGAG  | TCGCTTGTGTGCCAGAG    | 19       |
| GAPDH     | GCATTGCCCTCAACGACCAC | CCACCACCCTGTGCTGTAG  | 20       |

注:STAT3:信号转导与转录激活因子 3; GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.2.3 RNA FISH 和原位杂交 根据制造商的说明,使用 F40112 荧光原位杂交试剂盒进行 FISH 实验。石蜡包埋的 HNSCC 组织切片经脱蜡、水化处理。在蛋白酶 K 处理后,用 4%多聚甲醛固定。加入荧光标记 LINC01296 探针(AGCTGACACTGAATCTATGC-CT)并在 37℃避光孵育过夜。DAPI 染核 10 min,激光共聚焦成像。固定倍数下随机选取 5 个视野,使用 Image J 评估强弱。以阴性对照的平均强度+3×标准差为基线。低表达:≤基线×2 倍;高表达:>基线×2 倍。

1.2.4 细胞增殖实验 选取处于对数生长期的 SCC15 细胞,胰酶消化,计数后于 96 孔板接种  $2 \times 10^3$  个/孔细胞。在指定时间点(培养 48、96、144 h)加入 CCK-8 试剂(15  $\mu$ L/孔)后,培养 30 min 后测定 450 nm 吸光度。根据实验需要,将浓度倍比稀释后的顺铂加入 96 孔板中,培养 48 h,加入 CCK-8 试剂后再培养 30 min 后测定 450 nm 吸光度。通过 GraphPad Prism v11.0 分析 IC50 值。

1.2.5 平板克隆实验 选取处于对数生长期的 SCC15 细胞,胰酶消化,计数后于 6 孔板接种  $1 \times 10^3$  个/孔细胞,于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 环境培养。细胞贴壁后添加顺铂处理,克隆形成后 PBS 清洗,使用多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 5 min,晾干后拍照计数。

1.2.6 细胞凋亡检测实验 消化收集 SCC15 细胞,计数调整细胞数量为  $5 \times 10^6$  个,加入 5  $\mu$ L Annexin V 试剂,轻柔摇匀,立即添加 5  $\mu$ L 7-AAD 试剂,室温避

光静置 15 min,通过流式细胞仪评估细胞凋亡程度。

1.2.7 RNA-蛋白质相互作用预测 使用 RPISeq 数据库(<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/>)进行 RNA-蛋白质相互作用预测。RPISeq 预测基于在 RPI2241 和 RPI369 两个非冗余的 RNA 蛋白相互作用基准数据集上训练和测试的随机森林(RF)或支持向量机(SVM)算法。预测结果范围为 0 至 1,大于 0.5 的结果被视为阳性。

1.2.8 稳转细胞系的构建转染与筛选 选取处于对数生长期的 SCC15 细胞,胰酶消化,计数后于 6 孔板接种  $5 \times 10^4$  个细胞,待细胞贴壁密度为 30%~40%进行病毒感染。每组设置一个对照孔,其余孔分别转染包含 polybrene(终浓度为 8 g/mL)、Vector 或 STAT3-WT 病毒液(1 mL)和完全培养基(1 mL)的混合液。24 h 后更换为完全培养基继续培养,72 h 后使用嘌呤霉素筛选 7 d。

1.2.9 RNA pull-down 实验 将 LINC01296 或反义 LINC01296(antisense LINC01296)cDNA 克隆到 pBluescript II 载体中,antisense LINC01296 为阴性对照。使用裂解缓冲液提取 SCC15 细胞蛋白,分别加入预洗后的链霉亲和素磁珠及相应的 RNA 探针、反义 RNA 探针,室温混合旋转反应 1 h,形成 RNA-蛋白质复合物。洗涤 3 次添加上样缓冲液后,煮沸变性,Western blotting 实验鉴定蛋白。

1.2.10 RNA 免疫沉淀反应 根据制造商的说明,

使用 Magna RIP Kit 试剂盒与 STAT3 抗体或 IgG 进行核糖核酸免疫沉淀(RIP)实验,IgG 作为对照。收集  $1 \times 10^7$  个 SCC15 细胞,使用 Complete RIP Lysis Buffer 裂解取上清,分别加入对应预混后的抗体-磁珠,4℃孵育过夜,使用 TRIzol 提取共沉淀的 RNA,洗脱后用于进行 qPCR 实验。

**1.2.11 Western 印迹实验** 使用细胞裂解液提取蛋白,以 BCA 法测定浓度;添加对应体积的上样缓冲液并于 100℃变性。使用预制 10%的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,将蛋白条带转印至预活化的 PVDF 膜,5% BSA 或脱脂奶粉封闭 1 h。TBST 清洗后,按实验需求分别使用稀释的 STAT3(1:1 000)、STAT3<sup>Y705</sup>(1:1 000)、p-STAT3<sup>S727</sup>(1:1 000)、Caspase-3(1:5 000)、GAPDH(1:10 000)一抗,4℃孵育过夜,在室温使用 1:10 000 稀释的对应兔/鼠二抗孵育 1 h,化学发光显影。

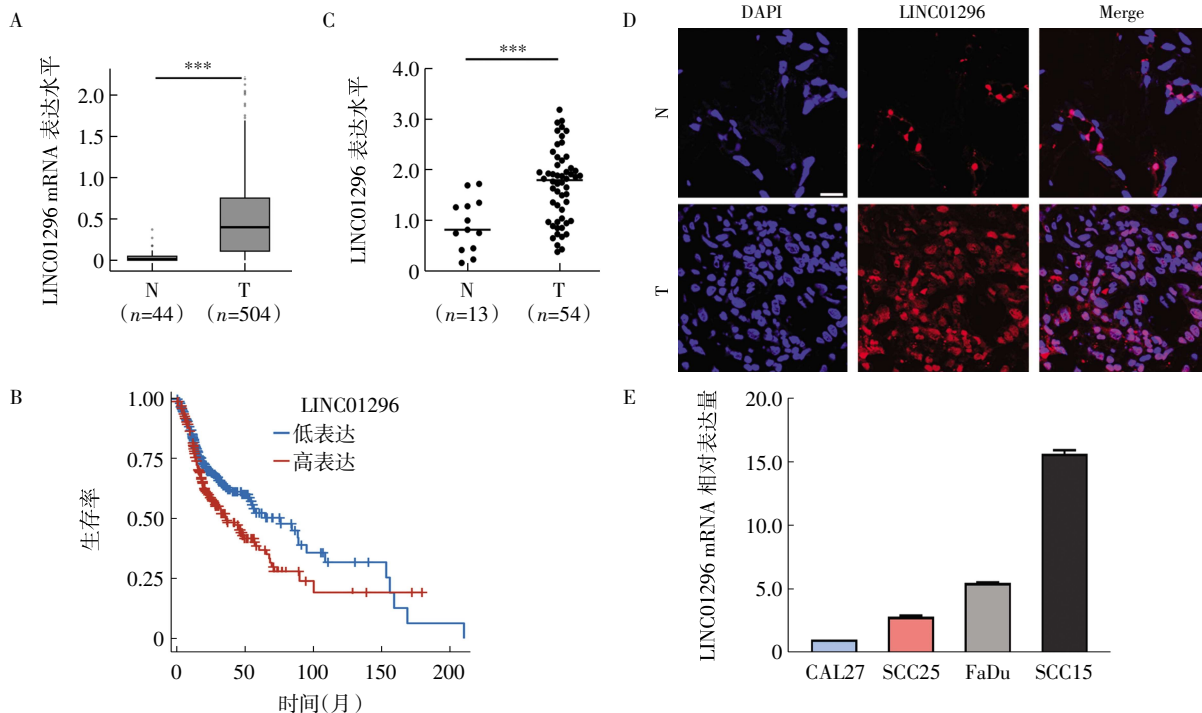
**1.2.12 免疫组织化学染色(IHC)** 70℃烘烤 HNSCC 患者组织石蜡切片 3 h,进行两次 25 min 的脱蜡处理,依次使用梯度浓度乙醇进行脱水。切片在 100℃高压条件下进行 4 min 抗原修复,内源性过氧化物酶阻断 30 min 后,3% BSA 封闭。加入 1:200 稀释的 p-STAT3<sup>Y705</sup> 抗体后,4℃孵育过夜。次日,添加 1:1 000 稀释的兔二抗,孵育 30 min,DAB 显色后,核复染。切片经逆浓度梯度乙醇脱水、脱蜡后,使用中

树胶封片。通过正置显微镜(OLYMPUS)及成像系统收集图像。IHC 评分:总分=染色强度×染色范围。总分>6 分为高表达,≤6 分为低表达。

**1.3 统计学处理** 数据采用 GraphPad Prism v11.0 进行统计学分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异比较采用 *t* 检验,Pearson 相关性分析用于评估变量之间的相关性。计数资料采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LINC01296 在 HNSCC 中高表达** 本研究通过 TCGA 数据库分析了 LINC01296 在头颈部肿瘤组织中的表达(图 1A),LINC01296 在 HNSCC 患者肿瘤组织中的表达高于正常组织( $t=6.711, P < 0.001$ )。生存分析显示,高表达 LINC01296 与 HNSCC 患者预后不良相关( $HR=1.42, 95\% CI: 1.09 \sim 1.85, P=0.01$ ),见图 1B。本研究收集了 54 例 HNSCC 肿瘤患者组织标本和 13 例癌旁组织标本,RT-qPCR 实验显示,与正常组织样本相比,HNSCC 肿瘤组织中 LINC01296 的表达水平明显升高( $t=3.641, P < 0.001$ ,图 1C)。同时,对 HNSCC 患者切片组织的 FISH 染色显示,在患者肿瘤组织中,LINC01296 显著高表达,见图 1D。通过 RT-qPCR 检测各 HNSCC 空白组细胞系中 LINC01296 的表达水平,选择 LINC01296 mRNA 表达水平最高的 SCC15 进行后续实验,见图 1E。



注:HNSCC:头颈部鳞状细胞癌;A:TCGA 数据库分析LINC01296 在 HNSCC 患者肿瘤和癌旁组织中的表达;B:TCGA 数据库分析 HNSCC 患者 LINC01296 高、低表达组的总生存期差异;C:RT-qPCR 验证 LINC01296 基因在 HNSCC 患者肿瘤和癌旁组织中的表达;D:FISH验证 LINC01296 在 HNSCC 患者肿瘤和癌旁组织中的表达和定位,比例尺:20  $\mu\text{m}$ ;E:RT-qPCR 验证 LINC01296 基因在不同 HNSCC 细胞系中的表达水平;\*\*\* $P < 0.001$

图 1 LINC01296 在 HNSCC 组织及细胞系中的表达

Fig.1 The expression of LINC01296 in HNSCC tissue and cell line

根据原位杂交染色结果,将 LINC01296 分为高表达组与低表达组,对临床特征进行分析。结果显示,LINC01296 表达与 T 分期 ( $\chi^2=13.463\ 4, P<0.001$ )、AJCC 分期( $\chi^2=4.958\ 3, P<0.05$ )呈正相关,而与患者性别、年龄、吸烟史、饮酒史等因素无显著相关性(均  $P>0.05$ ,表 2)。

**2.2 敲低 LINC01296 抑制 SCC15 细胞的增殖** RT-qPCR 实验证实对 LINC01296 的敲低效率约为 90%,见图 2A。CCK-8 实验显示,与敲低对照组相比,LINC01296 敲低组细胞增殖速率显著降低( $t=5.135, P<0.001$ ,图 2B)。克隆形成实验中,与敲低对照组相比,LINC01296 敲低组 SCC15 细胞数量显著下降( $t=18.00, P<0.000\ 1$ ,图 2C)。此外,流式细胞术检测显示,敲低 LINC01296 后,SCC15 细胞的总体凋亡率显著增加( $t=5.861, P<0.01$ ,图 2D)。

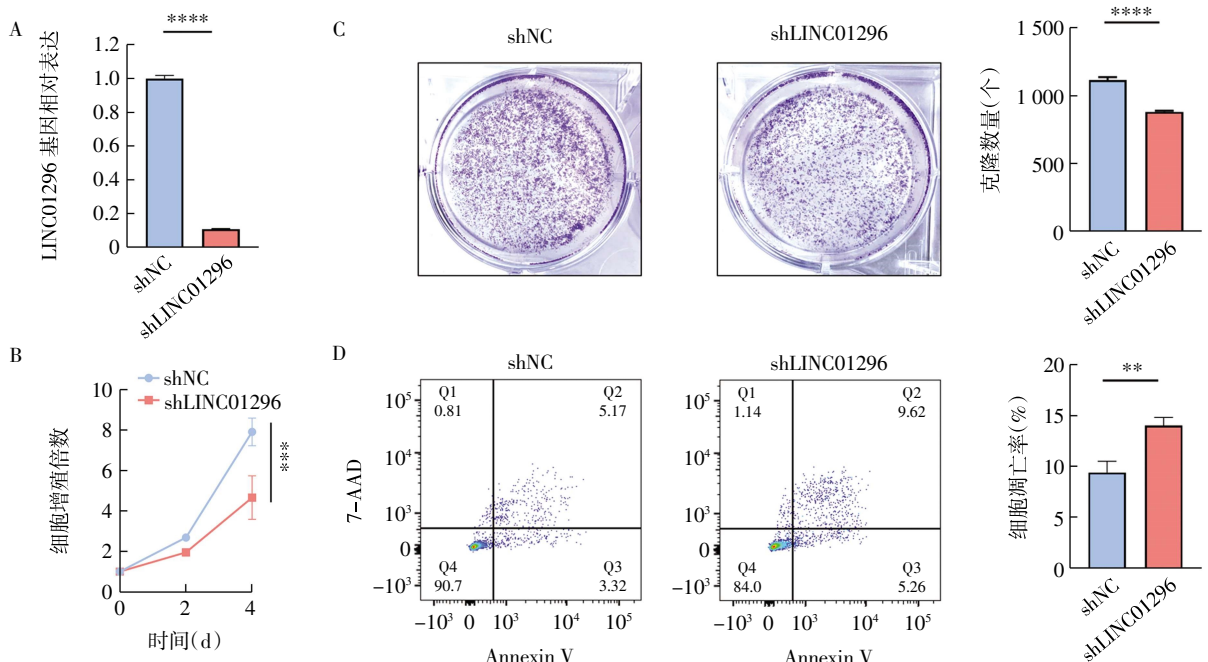
**2.3 敲低 LINC01296 下调 p-STAT3 的表达** RPISeq 预测 LINC01296 与 STAT3 的相互作用,得分为 0.8 (RF)和 0.96 (SVM),表明 LINC01296 与 STAT3 可能存在相互作用。Western 印迹实验检测 LINC01296 所下拉的蛋白复合物,发现 STAT3 与 LINC01296 结合,见图 3A。RIP 实验进一步验证了 STAT3 与 LINC01296 之间的相互作用,见图 3B( $t=6.072, P<0.01$ )。RT-qPCR 检测 SCC15 细胞中 STAT3 mRNA 表达水平,结果显示与对照组相比,敲低 LINC01296 对 STAT3 mRNA 表达水平无明显影响( $P>0.05$ ),见

表 2 LINC01296 表达与 HNSCC 患者临床病理特征的相关性分析[n( % )]

**Tab.2 The correlation analysis between LINC01296 expression and clinicopathological features of patients with HNSCC [n( % )]**

| 临床特征    | 例数        | LINC01296 |           | $\chi^2$ | P       |
|---------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
|         |           | 高表达       | 低表达       |          |         |
| 性别      |           |           |           | 0.037 9  | 0.845 7 |
| 男       | 36(66.67) | 15(27.78) | 21(38.89) |          |         |
| 女       | 18(33.33) | 8(14.81)  | 10(18.52) |          |         |
| 年龄      |           |           |           | 0.075 7  | 0.783 2 |
| >60 岁   | 27(50.00) | 11(20.37) | 16(29.63) |          |         |
| ≤60 岁   | 27(50.00) | 12(22.22) | 15(27.78) |          |         |
| 吸烟      |           |           |           | 0.012 9  | 0.909 7 |
| 是       | 31(57.41) | 13(24.07) | 18(33.33) |          |         |
| 否       | 23(42.59) | 10(18.52) | 13(24.07) |          |         |
| 饮酒      |           |           |           | 0.015 1  | 0.902 0 |
| 是       | 24(44.44) | 10(18.52) | 14(25.93) |          |         |
| 否       | 30(55.56) | 13(24.07) | 17(31.48) |          |         |
| 肿瘤分化    |           |           |           | 1.086 7  | 0.297 2 |
| 低级别     | 37(68.52) | 14(25.93) | 23(42.59) |          |         |
| 中/高级别   | 17(31.48) | 9(16.67)  | 8(14.81)  |          |         |
| 淋巴结转移   |           |           |           | 2.866 7  | 0.090 4 |
| 有       | 28(51.85) | 15(27.78) | 13(24.07) |          |         |
| 无       | 26(48.15) | 8(14.81)  | 18(33.33) |          |         |
| T 分期    |           |           |           | 13.463 4 | 0.000 2 |
| T3~T4   | 29(53.70) | 19(35.19) | 10(18.52) |          |         |
| T1~T2   | 25(46.30) | 4(7.41)   | 21(38.89) |          |         |
| N 分期    |           |           |           | 0.260 1  | 0.610 1 |
| N2~N3   | 26(48.15) | 12(22.22) | 14(25.93) |          |         |
| N0~N1   | 28(51.85) | 11(20.37) | 17(31.48) |          |         |
| AJCC 分期 |           |           |           | 4.958 3  | 0.026 0 |
| Ⅲ~Ⅳ     | 33(61.11) | 18(33.33) | 15(27.78) |          |         |
| Ⅰ~Ⅱ     | 21(38.89) | 5(9.26)   | 16(29.63) |          |         |

注: HNSCC: 头颈部鳞状细胞癌



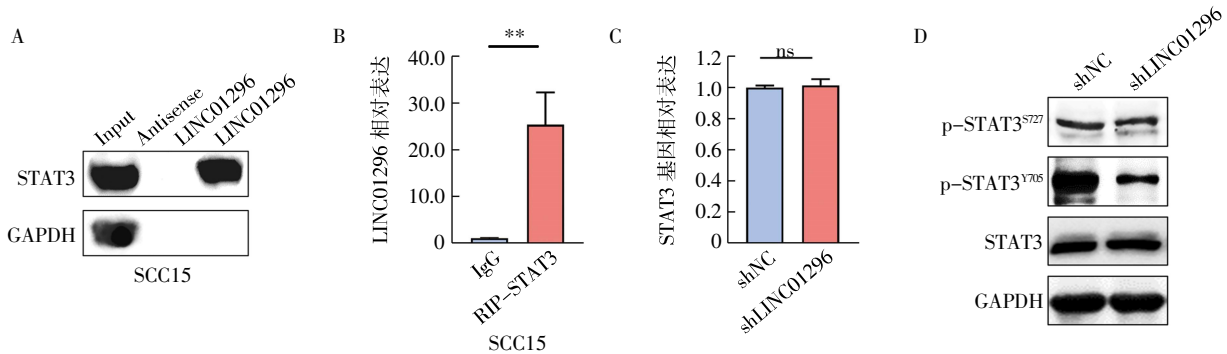
注: HNSCC: 头颈部鳞状细胞癌; A: RT-qPCR 验证 LINC01296 敲低效率; B: CCK-8 探究 LINC01296 对 SCC15 细胞增殖的影响; C: 克隆形成实验探究 LINC01296 对 SCC15 细胞增殖的影响; D: 流式细胞术探究 LINC01296 对 SCC15 细胞凋亡的影响; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.000\ 1$ ; shNC: 敲低对照组; shLINC01296: 敲低 LINC01296 组

图 2 敲低 LINC01296 对 HNSCC 细胞增殖能力、凋亡的影响

Fig.2 The effect of LINC01296 knockdown on the proliferation ability and apoptosis of HNSCC cell

图 3C。Western blotting 结果显示,与敲低对照组相比,敲低 LINC01296 对 STAT3 和 STAT3<sup>S727</sup> 表达无

明显影响(均  $P>0.05$ ),但能显著降低 STAT3<sup>Y705</sup> 的表达,见图 3D。



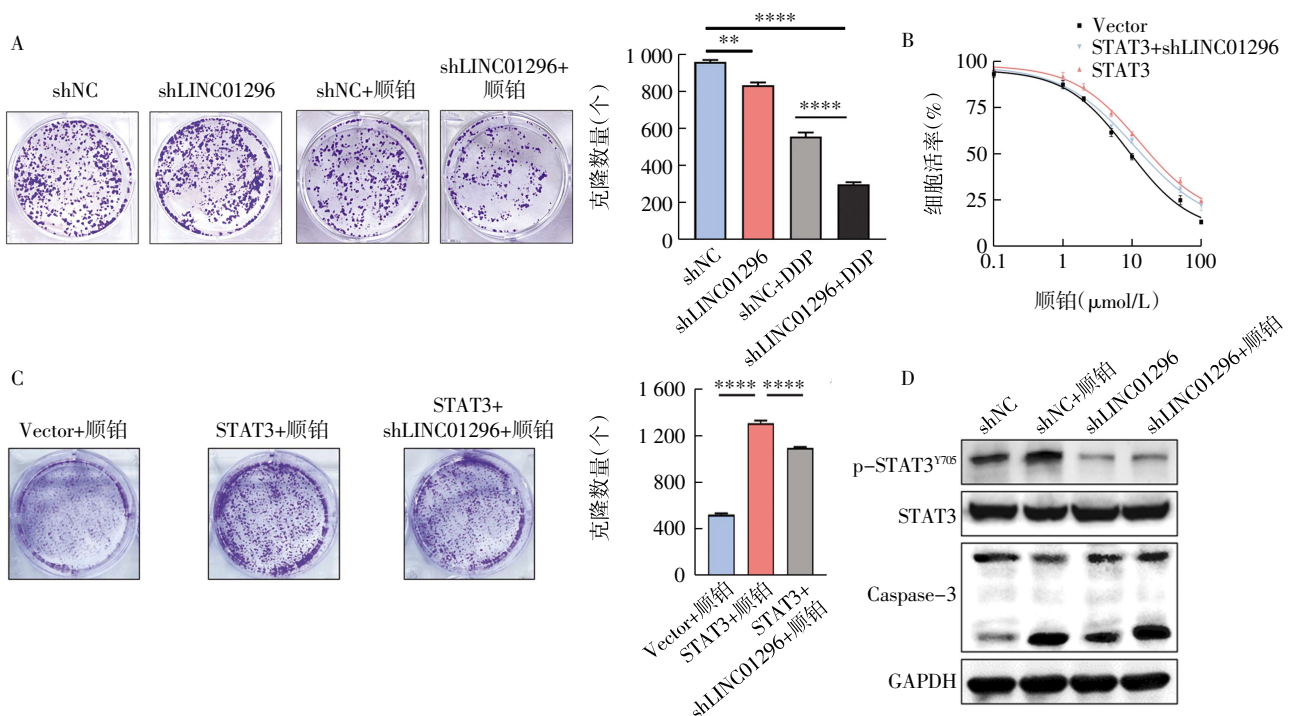
注:shNC:敲低对照组;shLINC01296:敲低 LINC01296 组;STAT3:信号转导与转录激活因子 3;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;A:Western 印迹检测 LINC01296 下拉蛋白复合物中 STAT3 的表达;B:RIP 验证 LINC01296 与 STAT3 的相互作用;C:RT-qPCR 探究敲低 LINC01296 后 STAT3 mRNA 表达;D:Western 印迹检测敲低 LINC01296 后 STAT3 蛋白表达;ns:非显著性结果;\*\* $P<0.01$

图 3 敲低 LINC01296 对 p-STAT3 表达的影响

Fig.3 The effect of LINC01296 knockdown on p-STAT3 expression

2.4 LINC01296 通过调节 p-STAT3 的表达影响 HNSCC 细胞对顺铂的敏感性 分别使用和不使用顺铂处理 shNC 组、shLINC01296 组 SCC15 细胞,进行细胞克隆形成实验,见图 4A。结果显示,与敲低对照组相比,敲低 LINC01296 后细胞数量降低( $t=7.379, P<0.01$ );在加入顺铂后,敲低 LINC01296 使细胞对 DDP 的敏感性增强,抑制细胞增殖( $t=17.67, P<0.0001$ )。使用顺铂处理 Vector 组,STAT3 组以及 STAT3+shLINC01296 组 SCC15 细胞,进行 CCK-8 和

平板克隆实验,见图 4B、4C。结果显示,与 Vector 组( $IC_{50}^{顺铂}:8.809 \mu\text{mol/L}$ )相比,STAT3 组细胞( $IC_{50}^{顺铂}:12.85 \mu\text{mol/L}$ )对顺铂的敏感性降低,顺铂抑制细胞增殖的能力下降( $t=53.49, P<0.0001$ )。在 STAT3 过表达的基础上敲低 LINC01296 组的细胞( $IC_{50}^{DDP}:10.97 \mu\text{mol/L}$ )对顺铂的敏感性恢复,顺铂抑制细胞增殖的能力增强( $t=15.61, P<0.0001$ )。免疫印迹检测发现,与 shNC 组相比,敲低 LINC01296 后促进凋亡指标 Caspase-3 的激活,见图 4D。



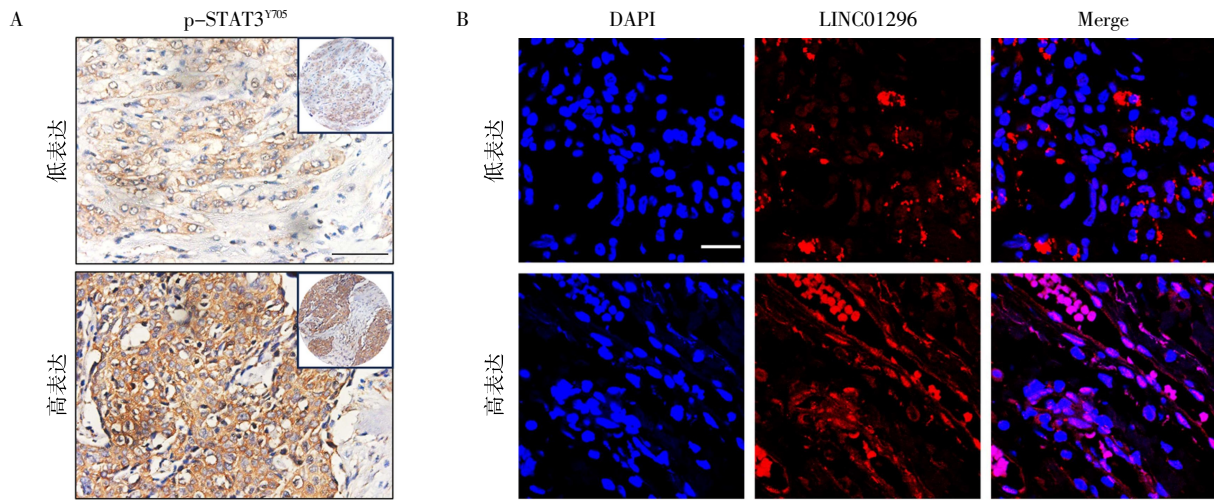
注:shNC:敲低对照组;shLINC01296:敲低 LINC01296 组;HNSCC:头颈部鳞状细胞癌;STAT3:信号转导与转录激活因子 3;Caspase-3:半胱天冬酶-3;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;A:克隆形成实验探究顺铂处理后 SCC15 细胞增殖能力;B:CCK-8 实验检测顺铂处理后 SCC15 的细胞活力;C:克隆形成实验探究顺铂处理后 SCC15 细胞增殖能力;D:Western 印迹检测顺铂处理后凋亡蛋白表达;\*\* $P<0.01$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$

图 4 LINC01296 对 HNSCC 细胞顺铂敏感性的影响

Fig.4 The effect of LINC01296 on cisplatin sensitivity in HNSCC cells

2.5 p-STAT3<sup>Y705</sup> 与 LINC01296 的表达呈正相关  
对 54 例患者肿瘤组织切片进行免疫组织化学染色, 并进行评分和相关性分析。结果显示 p-STAT3<sup>Y705</sup> 和

LINC01296 表达具有相关性( $r=0.61, P<0.001$ ), 见图 5A、5B、表 3。



注: HNSCC: 头颈部鳞状细胞癌; A: HNSCC 肿瘤组织中 p-STAT3<sup>Y705</sup> 的表达, 比例尺: 20 μm; B: HNSCC 肿瘤组织中 LINC01296 的表达, 比例尺: 20 μm

图 5 p-STAT3<sup>Y705</sup> 和 LINC01296 之间的相关性(SP×200)

Fig.5 The correlation between p-STAT3<sup>Y705</sup> and LINC01296 (SP×200)

表 3 LINC01296 和 p-STAT3<sup>Y705</sup> 表达的相关性 [n( % )]

Tab.3 The correlation between LINC01296 and p-STAT3<sup>Y705</sup> expression [n( % )]

| 项目                      |     | LINC01296 |           | $\chi^2$ | P       |
|-------------------------|-----|-----------|-----------|----------|---------|
|                         |     | 高表达       | 低表达       |          |         |
| p-STAT3 <sup>Y705</sup> | 高表达 | 17(31.48) | 7(12.96)  | 14.090 7 | 0.000 2 |
|                         | 低表达 | 6(11.11)  | 24(44.44) |          |         |

注: STAT3: 信号转导与转录激活因子 3

### 3 讨论

HNSCC 是一种高转移、易复发的恶性实体肿瘤。由于早期诊断难, 大约 60% 的患者确诊时已有广泛的局部浸润或淋巴结转移, 并且局部复发和远处转移风险更高, 总体预后差。顺铂是 HNSCC 治疗中应用最广泛的化疗药物之一。然而, 顺铂疗效受内在或获得性耐药限制, 耐药性已成为化疗失败的主要原因, 直接导致患者预后不良<sup>[10]</sup>。尽管顺铂耐药已涉及 DNA 修复增强、细胞解毒能力提升及非编码 RNA 调控等关键环节, 但其详细机制仍有待完全阐明。因此, 深入了解 HNSCC 耐药机制, 增强 HNSCC 患者顺铂敏感性对于提高 HNSCC 的治疗效果具有重要意义。

LncRNA 曾被认为无生物学功能, 但近年来的研究逐渐揭示了其在细胞调控过程中的重要作用。LncRNA 调控肿瘤增殖、凋亡、侵袭转移, 并在肿瘤细胞耐药性形成中扮演着重要角色。例如有研究指出 LINC00115 在乳腺癌中促进了耐药性乳腺癌干细胞的自我更新、迁移和侵袭能力, 从而增强了乳腺癌

的耐药性和转移能力<sup>[11]</sup>。目前发现数百种 lncRNA 与肿瘤的发生和发展相关, 并且与正常组织相比, 超过 2 500 种 lncRNA 在肿瘤组织中表达异常。

本课题组的前期工作对临床收集的 5 例配对 HNSCC 肿瘤组织和癌旁组织进行 lncRNA-seq, 发现 42 个 lncRNA 在肿瘤组织中高表达, 通过与两个公共数据集的 lncRNA-seq (GSE117007 与 GSE84805) 进行差异分析, 最终确定 LINC01296 为 HNSCC 肿瘤组织中高表达的 lncRNA。本研究通过分析 TCGA 数据库和 HNSCC 患者标本的 FISH 结果后发现, LINC01296 在 HNSCC 肿瘤组织中的表达显著高于正常组织, 表明 LINC01296 可能为 HNSCC 中致癌的 lncRNA。在对患者的临床特征进行分析后发现, 肿瘤组织的 LINC01296 表达水平与 T 分期、AJCC 分期呈正相关, 因此 LINC01296 的高表达可能促进了 HNSCC 的进展。

LINC01296 是一种新近被发现的 lncRNA, 被认为在多种肿瘤中发挥致癌作用。本研究采用 shRNA 转染了 LINC01296 相对表达水平最高的 SCC15 细

胞。CCK-8 检测和细胞平板克隆形成实验获得的结果进一步表明,抑制 LINC01296 的表达可以显著降低 HNSCC 细胞的集落形成能力与增殖能力。流式细胞术分析结果显示,降低 LINC01296 的表达可增强 HNSCC 细胞凋亡。上述研究结果共同表明,LINC01296 可作为肿瘤治疗的新靶点。

为了进一步探讨 LINC01296 促进 HNSCC 细胞增殖的内在机制,本研究通过 RPISeq 数据库进行 RNA-蛋白质相互作用预测,发现 LINC01296 可能与 STAT3 发生相互作用,并通过 RNA 结合蛋白富集和免疫沉淀实验进行了验证。进一步研究发现,LINC01296 影响 STAT3 的磷酸化,敲低 LINC01296 降低了 STAT3<sup>Y705</sup> 磷酸化。Tyr705 的磷酸化促进 STAT3 二聚体的形成,使其进入细胞核,在转录水平调节肿瘤相关基因的表达<sup>[12]</sup>。持续过度磷酸化的 STAT3 通过上调 Bcl-2 家族抗凋亡基因、细胞周期蛋白 D1 及磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/丝裂原活化蛋白激酶通路活性,抑制细胞死亡并驱动肿瘤细胞无限增殖<sup>[13-14]</sup>。因此,LINC01296 所调控的 STAT3 磷酸化可能是介导 HNSCC 细胞增殖的内在机制之一。

细胞增殖与肿瘤治疗密切相关,铂类耐药是 HNSCC 患者治疗过程中不能得到缓解甚至死亡的重要原因之一。本研究发现,敲低 LINC01296 可抑制肿瘤细胞增殖并促进细胞凋亡,恢复 HNSCC 细胞对顺铂的敏感性。铂类药物通过形成的“铂-DNA 加合物”造成 DNA 双链断裂,阻断 DNA 的复制与转录,最终引发细胞凋亡。在肿瘤细胞中,活化的 STAT3 进入细胞核后,可激活核苷酸切除修复通路相关基因及 DNA 损伤识别修复因子的转录,清除铂-DNA 加合物,从而削弱顺铂的疗效<sup>[15]</sup>。其次,顺铂在线粒体中可诱导活性氧生成,导致线粒体膜通透性增加,释放促凋亡分子以激活凋亡过程<sup>[16]</sup>。研究表明,磷酸化 STAT3 能直接结合髓系细胞白血病-1 (MCL-1)并促进其表达,通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/MCL-1 通路阻断顺铂诱导的线粒体凋亡<sup>[17]</sup>。此外,顺铂耐药性还与药物胞内浓度不足密切相关,这主要是由于药物摄入减少和外排增加所致<sup>[18]</sup>。MDR1 是 ABC 转运蛋白家族的关键成员,通过其 ATP 依赖性的“外排泵”活性,将胞内药物泵出,降低胞内药物浓度。研究表明,活化的 STAT3 可在多种癌症中直接上调 MDR1 的转录<sup>[19-21]</sup>。MDR1 表达增加会促进顺铂外排,降低其胞内药物浓度,进而削弱药物毒性,最终导致耐药。综上所述,LINC01296 可能通过调控 STAT3 介导的 DNA 损伤修复能力增强、抗凋亡基因的表达上升或细胞内顺铂外排增

加,共同导致 HNSCC 对顺铂的敏感性降低。

在疾病中起关键作用的 lncRNA,凭借其高度的组织特异性和精准的调控能力,已成为蕴含巨大潜力的治疗靶点,相关药物研发优势显著。首先,lncRNA 位于诸多“不可成药”致癌蛋白(如转录因子)的上游,通过靶向 lncRNA 可间接调控这些难以作用的蛋白网络,为干预关键致癌通路开辟了新途径<sup>[22]</sup>。其次,lncRNA 无需翻译、周转快速且表达水平较低,靶向药物能以更低剂量实现更快速的治疗效果<sup>[23]</sup>。此外,lncRNA 在介导肿瘤治疗耐药中发挥关键作用。例如已上市的 NanoCurcumin 被认为可下调 lncRNA MALAT1,其与他莫昔芬联用,可有效恢复肿瘤细胞的药物敏感性<sup>[24]</sup>。目前在肿瘤治疗领域,针对 lncRNA 的药物研发已取得实质性进展。未来针对 LINC01296 设计的靶向药物有望为 HNSCC 治疗提供新选择,尤其在克服顺铂耐药性方面极具潜在价值。

综上所述,本研究探讨了 LINC01296 在 HNSCC 进展过程中的作用,发现 LINC01296 通过调控 HNSCC 中 STAT3 磷酸化而降低顺铂敏感性,为临床 HNSCC 患者的靶向治疗提供了新思路,而 LINC01296 调控 STAT3 磷酸化的具体分子机制仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] JOHNSON D E, BURTNESS B, LEEMANS C R, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92.
- [2] CRAMER J D, BURTNESS B, LE Q T, et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(11): 669-683.
- [3] COAN M, HAEFLIGER S, OUNZAIN S, et al. Targeting and engineering long non-coding RNAs for cancer therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(8): 578-595.
- [4] LUO L, YANG F, FU X, et al. The emerging role of long non-coding RNA 01296 in human malignancies[J]. *Curr Mol Med*, 2025, 25(8): 1010-1024.
- [5] XIAO H, LI Y, ZHANG Y, et al. Long noncoding RNA LINC01296 regulates the cell proliferation, migration and invasion in neuroblastoma[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(4): 1247-1258.
- [6] XU H, MAO H L, ZHAO X R, et al. Mir-29c-3p, a target miRNA of LINC01296, accelerates tumor malignancy: therapeutic potential of a LINC01296/mir-29c-3p axis in ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 31.
- [7] LI Y, ZHANG H, GUO J, et al. Downregulation of LINC01296 suppresses non-small-cell lung cancer via targeting mir-143-3p/ATG2B[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(12): 1681-1690.
- [8] WANG W, LOPEZ MCDONALD M C, KIM C, et al. The complementary roles of STAT3 and STAT1 in cancer biology: insights into

- tumor pathogenesis and therapeutic strategies[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1265818.
- [9] ZHANG T, XIAO H C. Unveiling the role of JAK2/STAT3 signaling in chemoresistance of gynecological cancers: from mechanisms to the therapeutic implications[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2025, 211: 104712.
- [10] GARCIA-MAYEA Y, MIR C, MASSON F, et al. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 166-180.
- [11] LUO F, ZHANG M, SUN B, et al. Linc00115 promotes chemoresistant breast cancer stem-like cell stemness and metastasis through SETDB1/PLK3/HIF1 $\alpha$  signaling[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 60.
- [12] SHI D, TAO J, MAN S, et al. Structure, function, signaling pathways and clinical therapeutics: the translational potential of STAT3 as a target for cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(6): 189207.
- [13] SHEN Y, CAI H, MA S, et al. Telocinobufagin has antitumor effects in non-small-cell lung cancer by inhibiting STAT3 signaling [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(4): 765-775.
- [14] MAHARJAN S, LEE M G, KIM S Y, et al. Morin sensitizes MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to doxorubicin cytotoxicity by suppressing FOXM1 and attenuating EGFR/STAT3 signaling pathways[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(5):672.
- [15] LI T, ZHU K, TONG H, et al. Cancer-associated fibroblast derived CXCL14 drives cisplatin chemoresistance by enhancing nucleotide excision repair in bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2025, 44(1): 265.
- [16] LUGONES Y, LOREN P, SALAZAR L A. Cisplatin resistance: genetic and epigenetic factors involved [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10):1365.
- [17] WANG L, XU L, HAN S, et al. Anlotinib inhibits cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cells by inhibiting MCL-1 expression via MET/STAT3/Akt pathway[J]. *Can Respir J*, 2024, 2024: 2632014.
- [18] SUN C Y, NIE J, HUANG J P, et al. Targeting STAT3 inhibition to reverse cisplatin resistance[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109135.
- [19] FANG Z, CHEN W, YUAN Z, et al. LncRNA -MALAT1 contributes to the cisplatin-resistance of lung cancer by upregulating MRP1 and MDR1 via STAT3 activation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 536-542.
- [20] JI L, LIU X, ZHANG S, et al. The novel triazolonephthalimide derivative LSS-11 synergizes the anti-proliferative effect of paclitaxel via STAT3-dependent MDR1 and MRP1 downregulation in chemoresistant lung cancer cells[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1822.
- [21] YUAN C H, HORNG C T, LEE C F, et al. Epigallocatechin gallate sensitizes cisplatin-resistant oral cancer cell apoptosis and autophagy through stimulating AKT/STAT3 pathway and suppressing multidrug resistance 1 signaling[J]. *Environ Toxicol*, 2016, 32(3): 845-855.
- [22] YAO Z T, YANG Y M, SUN M M, et al. New insights into the interplay between long non-coding RNAs and RNA-binding proteins in cancer[J]. *Cancer Commun(Lond)*, 2022, 42(2): 117-140.
- [23] STATELLO L, GUO C J, CHEN L L, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 22(2):96-118.
- [24] NASIRI KENARI F, SABERIAN M, ABIKENARI M, et al. Restoring tamoxifen sensitivity in breast cancer: the role of lncRNA MALAT1 and NanoCurcumin as modulators of drug resistance[J]. *Biomed Res Int*, 2025 sep 2:2025; DOI:10.1155/bmri/5824748.

(2025-08-31 收稿)

新理念 新定位 新内涵 新医科