DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.015

LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7信号通路在二氢杨梅素抑制食管鳞状细胞癌增殖和转移中的作用研究

郑璇[1],黄兰香[2],崔逸爽[1],吴亚男[1],洪紫谦[1],张梦诗[1],孙国贵[2]
(1.华北理工大学公共卫生学院,河北 唐山 063200;2.华北理工大学附属医院,河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨二氢杨梅素(dihydromyricetin,DMY)对食管鳞癌(Esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)增殖和转移的影响及是否由LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7轴介导。方法 采用梯度浓度(0、25、50、100 μmol/L)的DMY处理ESCC细胞,以探究DMY对ESCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响。利用生物信息学手段预测了ESCC中LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7轴之间是否存在相互作用。实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)实验检测细胞中LncRNA CASC9、miR-195-5p和E2F7的表达,RT-qPCR、蛋白免疫印迹(Western blot)和双荧光素酶报告基因实验进一步验证其调控关系。通过细胞计数试剂盒-8(Cell counting kit-8,CCK-8)、集落形成、划痕以及Transwell侵袭实验分别检测细胞活性、增殖、迁移以及侵袭能力。应用Western blot实验检测上皮间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition,EMT)标志物如E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达。结果 DMY可以显著抑制ESCC细胞增殖、迁移和侵袭。生物信息学分析及细胞水平验证发现LncRNA CASC9在ESCC中高表达,DMY处理后可通过下调ESCC细胞中LncRNA CASC9的表达水平,从而抑制ESCC细胞增殖、迁移和侵袭。此外,miR-195-5p在ESCC中表达下调,而E2F7表达上调。RT-qPCR、Western blot和双荧光素酶报告基因实验进一步证实LncRNA CASC9通过吸附miR-195-5p进而调控E2F7的表达。敲低E2F7可以逆转敲低miR-195-5p对ESCC细胞增殖、转移以及EMT进程的促进作用,而过表达E2F7可逆转过表达miR-195-5p产生的抑制作用。结论 DMY可通过LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7轴抑制ESCC的增殖和转移。

关键词:二氢杨梅素;LncRNA CASC9;miR-195-5p;E2F7;食管鳞癌;转移
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)08-0065-12

Research on Role of LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7 Signaling Pathway in Dihydromyricetin Inhibiting Proliferation And metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ZHENG Xuan[1],HUANG Lanxiang[2],CUI Yishuang[1],WU Yanan[1],HONG Ziqian[1],ZHANG Mengshi[1],SUN Guogui[2]
(1.School of Public Health,North China University of Science and Technology,Tangshan 063200,Hebei,China;
2.North China University of Science and Technology Affiliated Hospital,Tangshan 063000,Hebei,China)

Abstract:*Objective* To investigate the effect of dihydromyricetin(DMY) on proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) and whether it is mediated by the LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7 axis. *Methods* Gradient concentrations(0,25,50,100 μmol/L) of DMY were used to treat ESCC cells in order to investigate the effects of DMY on ESCC cells proliferation,migration and invasion. The possible interaction between the LncRNA CASC9/miR-195-5p/E2F7 axis in ESCC was predicted using bioinformatics. Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) assay was used to detect the expressions of LncRNA CASC9,miR-195-5p and E2F7 in cells,and the regulation relationship was confirmed using RT-qPCR,Western blot and double luciferase reporter gene assays. In order to test the cell viability,proliferation,migration and invasion ability,cell counting kit-8(CCK-8),colony formation,wound healing and Transwell invasion assays were used respectively. Western blot assay was used to test the expressions of epithelial mesenchymal transition(EMT) markers E-cadherin,N-Cadherin and Vimentin. *Results* The proliferation,migration and invasion abilities of ESCC cells were significantly inhibited by DMY. LncRNA CASC9 was hyperexpressed in ESCC by bioinformatics analysis and cell level verification. The proliferation,mi-

基金项目:国家自然科学基金项目(82172658)
作者简介:郑璇(1992-),女,河北唐山人,主管检验技师,博士,研究方向:胸部肿瘤非编码RNA的功能机制及小分子药物筛选。
通讯作者:孙国贵(1980-),男,河北唐山人,主任医师,研究方向:胸部肿瘤非编码RNA的功能机制及小分子药物筛选。E-mail:guogui_sun2021@sina.com。

gration and invasion abilities of ESCC cells were inhibited by DMY treatment leaded to by down – regulating the expression level of LncRNA CASC9 in ESCC cells. Furthermore, the miR – 195 – 5p expression was down – regulated in ESCC while E2F7 expression was up – regulated. RT – qPCR, Western blot and double luciferase reporter gene assays all confirmed that LncRNA CASC9 regulated E2F7 expression by adsorbing miR – 195 – 5p. E2F7 knocking down – reversed the promotion of miR – 195 – 5p knocking down on the proliferation, metastasis and EMT process of ESCC, whereas E2F7 overexpression reversed the inhibition of miR – 195 – 5p overexpression. *Conclusion* DMY inhibits ESCC proliferation and metastasis via the LncRNA CASC9/miR – 195 – 5p/E2F7 axis.

Keywords: dihydromyricetin; LncRNA CASC9; miR – 195 – 5p; E2F7; esophageal squamous cell carcinoma; metastasis

食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是目前食管癌的主要组织学类型,占所有病例的 90%[1],其特点是高侵袭性、复发性和转移性[2]。尽管包括放化疗和手术在内的诊疗技术取得了进步,但大多数患者诊断时已为晚期,并且由于复发和转移,ESCC 患者的预后仍然不理想[3-4],5 年总生存率仅为 10% ~30%[5]。因此,探索 ESCC 发生转移的潜在机制,对发掘 ESCC 早期诊断和治疗的新型生物标志物和治疗靶点具有重要意义。

近年来,天然产物已成为抗肿瘤药物研发的热点[6]。二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY)是葡萄属植物藤茶的提取物,是藤茶中的主要活性成分黄酮类化合物,具有清除自由基、抗氧化、抗血栓、抗肿瘤、消炎等多种奇特功效[7-8]。一项研究报道,DMY 通过抑制 AKT/stat3 信号通路的激活和 HMGB1 的表达来抑制胃癌细胞的增殖和迁移[9]。然而,DMY 在 ESCC 转移中的作用以及潜在机制尚未得到充分地阐明。因此,DMY 在 ESCC 转移中的作用值得进一步研究。长链非编码 RNA(Long non – coding RNAs, LncRNAs)已被证实与许多肿瘤的发展有关[10]。例如,LncRNA CASC9 在 ESCC[11]、胃癌[12]和口腔鳞状细胞癌[13]中高表达,促进肿瘤增殖、迁移和侵袭的作用。然而,LncRNA CASC9 在 ESCC 增殖和转移中潜在作用机制尚不明。许多 LncRNAs 含有 miRNA 反应元件和结合位点,通过充当“miRNA 海绵”来调节基因表达从而影响癌症的生长和进展[14]。我们通过 starbase 数据库预测发现,LncRNA CASC9 和 miR – 195 – 5p 存在结合位点,且 E2F7 可能是 miR – 195 – 5p 的靶基因。因此,本文旨在探讨 DMY 在 ESCC 细胞生物学行为中的作用以及 DMY 通过 LncRNA CASC9/miR – 195 – 5p/E2F7 轴在 ESCC 细胞转移中的功能。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人 ESCC 细胞系(KYSE – 150、KYSE – 30 以及 ECA109)以及人正常食管上皮细胞(HEEC)购自北京北纳创联生物技术研究院;RPMI – 1640 培养基、F – 12 培养基、DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)、细胞冻存液和细胞计数试剂盒 – 8(Cell counting kit – 8, CCK – 8)购自北京中生奥邦生物科技有限公司;opti – MEM 培养基、胎牛血清(Fetal calf serum, FBS)和 Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司;DMY 购自上海陶术生物科技有限公司;Lipofectamine 2000 和 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;普通实时荧光定量聚合酶链反应(Real – time quantitative polymerase chain reaction, RT – qPCR)试剂盒购自日本 Takara 公司;miRNA 专用 RT – qPCR 试剂盒购自北京金百特生物技术有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、10% SDS – PAGE 凝胶制备试剂盒、聚偏二氟乙烯膜、ECL 化学发光检测试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;一抗兔抗人 E – 钙黏蛋白(E – cadherin)、N – 钙黏蛋白(N – Cadherin)、波形蛋白(Vimentin)以及甘油醛 – 3 – 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、二抗山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Proteintech 公司;小干扰 RNA(si – CASC9、si – E2F7)及其阴性对照(si – NC)、miR – 195 – 5p 抑制剂(inhibitor – miR – 195 – 5p)及其阴性对照(inhibitor – NC)、miR – 195 – 5p 模拟物(mimics – miR – 195 – 5p)及其阴性对照(mimics – NC)由广州锐博生物科技有限公司设计并合成;过表达质粒(pcDNA3.1 – CASC9 和 pcDNA3.1 – E2F7)及其阴性对照(pcDNA3.1)、野生型和突变型 LncRNA CASC9(CASC9 – WT/MUT)及野生型和突变型 E2F7(E2F7 – WT/MUT)双荧光素酶报告基因质粒、LncRNA CASC9、E2F7、GAPDH、miR – 195 – 5p 和 U6 引物由北京西贝宏程生物科技有限公司设计并合成。

1.2 生信分析 使用 starbase 数据库预测与 LncRNA CASC9 具有相互作用的 miRNA,选取在 ESCC 中低表达的 miRNA,随后计算 miRNA 与 LncRNA CASC9 表达的相关性。进一步利用 starbase、miRabel、miRDB 和 targetScan 数据库预测 miRNA 的下游调控 mRNA,取交集选取目的 mRNA,并通过 starbase 数据库计算 miRNA 与 mRNA 表达的相关性。此外,从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库获得 ESCC 患者癌和癌旁的 RNA – seq 数据和 miRNA 数据(level3),通过 R 语言 v4.0.3 软件计算 LncRNA CASC9、miRNA 以及 mRNA 在 ESCC 癌和癌旁中的表达量并通过 ggplot2 包进行可视化。

1.3 细胞培养 KYSE – 150 和 KYSE – 30 细胞培养于含 45% RPMI – 1640 + 45% F – 12 + 10% FBS 的完全培养基;ECA109 细胞培养于含 90% RPMI – 1640 + 10% FBS 的完全培养基;HEEC 细胞培养于含 90% DMEM + 10% FBS 的完全培养基,培养条件为 37 ℃、5% CO_2。待细胞生长密度达 90% 以上时,进行后续实验研究。

1.4 细胞转染 将对数生长期细胞按 3×10^5 个/孔接种到 6 孔板,待细胞生长汇合度达 70% ~90% 时,按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书要求将 si – NC、si – CASC9、si – E2F7、pcDNA3.1、pcDNA3.1 – CASC9、pcDNA3.1 – E2F7、mimics – NC、mimics – miR – 195 – 5p、inhibitor – NC 以及 inhibitor – miR – 195 – 5p 单独或联合转染至细胞。

1.5 总 RNA 提取和定量实时荧光定量聚合酶链反应(Real – time quantitative polymerase chain reaction, RT – qPCR) 使用

TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，接下来，超微量分光光度计（Molecular Devices，SpectraMaxQuickDrop）测定 RNA 的浓度。将获得的 RNA 按照 Takara 公司或金百特公司逆转录试剂盒说明书操作获得互补 DNA（complementary DNA，cDNA）模板。随后，使用各自对应的 qPCR 试剂盒制备反应系统，于荧光定量 PCR 仪（Thermo Fisher Scientific，QuantStudio3）上进行反应。实验条件如下：检测 LncRNA CASC9 和 E2F7 以 GAPDH 作为内参，反应程序：95 ℃ 30 s、95 ℃ 5 s、60 ℃ 34 s、40 个循环；检测miR－195－5p 以 U6 作为内参，反应程序：94 ℃ 3 min、94 ℃ 10 s、60 ℃ 34 s、40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达水平。引物序列如表 1。

表 1 引物序列表

引物	序列（5’→3’）
LncRNA CASC9	正义链：CTTTTCTGGAACATAGCCTGTGA
	反义链：ATAGTGCCAATGACTCTCCAGC
E2F7	正义链：AGCATCCAACGCACACATCG
	反义链：CGTGACTGGTTCCTTTCTCTTCT
GAPDH	正义链：ACCCACTCCTCCACCTTTGA
	反义链：CCACCCTGTTGCTGTAGCCA
miR－195－5p	正义链：CGCAGCACAGAAATATTGGC
	反义链：CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC
U6	正义链：CTCGCTTCGGCAGCACA
	反义链：AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.6 蛋白免疫印迹（Western blot）实验 应用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白质，BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度，10% SDS－PAGE 凝胶电泳分离蛋白。随后，将其转移至聚偏二氟乙烯膜上，于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温下封闭 1 h。接下来，将膜置于稀释的一抗溶液 E－cadherin（1∶5000）、N－Cadherin（1∶2000）、Vimentin（1∶2000）、GAPDH（1∶5000）中，4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。将膜在与一抗种属对应的二抗（1∶5000）室温下孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。使用 ECL 底物试剂盒以及凝胶成像系统（Azure biosystems，c300）检测蛋白表达。

1.7 CCK－8 实验 将细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱静置 16 h，使细胞完全恢复形态，用梯度浓度（0、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L）DMY 处理细胞 24 h；用 DMY 联合转染剂或者单独转染剂处理细胞 24 h，按 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，置于培养箱中继续培养细胞 24、48、72 和 96 h。随后在相应孔中加入 CCK－8 溶液（10 μL/100 μL 培养基），37 ℃孵育 2 h，随后应用酶标仪（Thermo Fisher Scientific，Multiskan FC）在 450 nm 波长处测定吸光度值。

1.8 集落形成实验 将处理后细胞按 2×10^3 个/孔接种于 6 孔板中，7～10 d 后终止培养，用甲醇固定 15 min，1% 结晶紫溶液染色 15 min，对染色的细胞集落进行拍照和计数。

1.9 划痕实验 将处理后细胞按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 48 h。用 200 μL 枪头在孔内均匀划出一道直线，PBS 冲洗，加入无血清培养基后拍照。然后，将细胞继续培养，24 h 后用显微镜捕捉划痕区域的图像。划痕面积用 image J 软件（version 1.46）测量，并计算迁移率，迁移率 =（0 h 划痕面积－24 h 划痕面积）/0 h 划痕面积×100%。

1.10 Transwell 侵袭实验 将 matrigel 胶在 4 ℃下融化，随后取 50 μL 的 matrigel 胶混合液（matrigel∶opti－MEM 培养基 = 1∶8）滴入 transwell 上室，在 37 ℃培养箱中孵育 2 h。收集处理后细胞，用 opti－MEM 培养基重悬制备单细胞悬液，按 1×10^5 个/室接种于 transwell 上室，transwell 下室加入 600 μL 含 20% FBS 的完全培养基。培养 24 h 后，将小室底部在甲醇溶液中固定 15 min，1% 结晶紫溶液染色 15 min，自来水冲洗，棉签去除上层细胞。随后风干小室滤膜，用手术刀片剔下整张滤膜，底面朝上平铺于载玻片上，加盖盖玻片，中性树胶封片，选取有代表性的区域进行拍摄并计数。

1.11 双荧光素酶报告基因实验 利用 Lipofectamine2000 将 mimics－NC 或 mimics－miR－195－5p 和 LncRNA CASC9－WT/MUT 或 E2F7－WT/MUT 双荧光素酶报告基因质粒共转染 ESCC 细胞。转染 48 h 后，按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行处理，使用发光光度计（Promega，GloMax® 20/20）检测荧光素酶活性并计算其比值。

1.12 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行实验数据分析，Graphpad Prism 7.0 软件进行图像绘制，计量资料表示为平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）。如 LncRNA CASC9 在 ESCC 患者肿瘤组织及邻近癌旁组织比较等计量资料，使用独立样本 t 检验进行两组间比较，如梯度浓度 DMY 对 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响，使用单因素方差分析进行比较，组间两两比较采用 LSD－t 检验，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMY 抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭 为了探究 DMY 在 ESCC 细胞生物学中的抗肿瘤活性，使用梯度浓度 DMY（0、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L）处理 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞 24 h 并通过 CCK－8 实验检测细胞活性。结果显示，与对照组相比，DMY 以剂量依赖性方式抑制细胞活性，且高浓度 DMY（25、50、100 μmol/L）具有显著抑制效果（插页Ⅻ图 1A）。DMY 对 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的 IC50 值分别为 99.38 μmol/L 和 91.72 μmol/L。集落形成、划痕以及 Transwell 侵袭实验结果表明，DMY 显著抑制 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，且抑制效果呈剂量依赖性（插页Ⅻ图 1B－图 1D）。

2.2 DMY 可以下调 LncRNA CASC9 的表达，抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭 生物信息学分析发现 LncRNA CASC9 在 ESCC 患者肿瘤组织的表达显著高于邻近癌旁组织（插页Ⅻ图 2A）。RT－qPCR 实验检测正常食管上皮细胞 HEEC 和 ESCC 细胞系 KYSE－150、KYSE－30 和 ECA109 中 LncRNA CASC9 的表达水平，进一步证实 LncRNA CASC9 在 ESCC 中显著上调（插页Ⅻ图 2B）。DMY（50 μmol/L）处理导致 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞中 LncRNA CASC9 的表达水平显著低于未处理组（插页Ⅻ图 2C）。接下来，探究 DMY 联合 LncRNA CASC9 对 ESCC 细胞活性和增殖能力的影响。由于先前研究显示 KYSE－150 细胞中 LncRNA CASC9 表达水平相对较高，而 KYSE－30 细胞相对较低，故后续实验对 KYSE－150 细胞进行敲低处理，KYSE－30 细胞进行过表达处理，RT－qPCR 实验验证敲低或过表达效果（插页Ⅻ图 2D）。CCK－8 和集落形成实

验结果表明敲低 LncRNA CASC9 显著抑制 KYSE－150 细胞活性和增殖能力，而 DMY 处理后增强了该抑制作用。相反，过表达 LncRNA CASC9 则显著促进 KYSE－30 细胞活性和增殖能力，而 DMY 处理后减弱了该促进作用（插页Ⅻ图 2E－图 2F）。

此外，应用划痕和 Transwell 侵袭实验进一步评估了 DMY 联合 LncRNA CASC9 对 ESCC 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果显示，敲低 LncRNA CASC9 显著抑制 KYSE－150 细胞的迁移和侵袭能力，而添加 DMY 处理后增强这种抑制作用。相反地，过表达 LncRNA CASC9 显著促进 KYSE－30 细胞的迁移和侵袭能力，而添加 DMY 处理后减弱这种促进作用（插页ⅩⅤ图 3A－图 3B）。最后，Western blot 实验检测上皮间充质转化（Epithelial－mesenchymal transition，EMT）相关蛋白（E－cadherin、N－Cadherin、Vimentin）的表达，分析 DMY 联合 LncRNA CASC9 对细胞 EMT 的影响。结果显示，敲低 LncRNA CASC9 显著促进 KYSE－150 细胞中 E－cadherin 的表达，抑制 N－cadherin 和 Vimentin 的表达，而添加 DMY 进一步增强该效应。相反，过表达 LncRNA CASC9 则显著抑制 KYSE－30 细胞中 E－cadherin 的表达，促进 N－Cadherin 和 Vimentin 的表达，而添加 DMY 后部分逆转该效应（插页ⅩⅤ图 3C）。

2.3 LncRNA CASC9 靶向 miR－195－5p 调节 E2F7 的表达 为了探究 LncRNA CASC9 的下游调控机制，通过 starbase 数据库预测 LncRNA CASC9 靶向的 miRNA，发现 LncRNA CASC9 与 miR－195－5p 存在结合位点，进一步预测显示 LncRNA CASC9 与 miR－195－5p 的表达水平显著负相关（插页ⅩⅥ图 4A）。生物信息学分析和 RT－qPCR 实验验证分别显示 miR－195－5p 在 ESCC 组织和细胞中的表达水平显著下调（插页ⅩⅥ图 4B－图 4C）。接下来，将含有 LncRNA CASC9－WT 或 LncRNA CASC9－MUT 的双荧光素酶报告基因质粒与 mimics－NC 或 mimics－miR－195－5p 共转染到 ESCC 细胞，并进行荧光素酶基因报告测定。结果显示，过表达 miR－195－5p 会降低野生型 LncRNA CASC9 3’－UTR 荧光素酶活性（插页ⅩⅥ图 4D－图 4F）。此外，RT－qPCR 结果显示敲低 LncRNA CASC9 可以显著提高 miR－195－5p 的表达，过表达 LncRNA CASC9 则显著降低 miR－195－5p 的表达（插页ⅩⅥ图 4G）。

接着，使用 starbase、miRabel、miRDB 和 targetScan 数据库发现 miR－195－5p 与 E2F7 存在互补结合位点，表明 E2F7 为 miR－195－5p 的潜在靶点（插页ⅩⅦ图 5A）。应用 starbase 数据库进行相关性分析显示 miR－195－5p 与 E2F7 的表达水平显著负相关（插页ⅩⅦ图 5B）。生物信息学分析和 RT－qPCR 实验验证分别显示 E2F7 在 ESCC 组织和细胞中的表达水平显著上调（插页ⅩⅦ图 5C－图 5D）。为了进一步验证 miR－195－5p 与 E2F7 的结合关系，利用双荧光素酶实验验证两者的靶向结合关系，实验结果显示 E2F7 是 miR－195－5p 的直接靶标（插页ⅩⅦ图 5E－图 5F）。最后，分别用 si－CASC9 和 in－miR－195－5p 单独或共转染 KYSE－150 细胞，用 pcDNA3.1－CASC9 和 mimics－miR－195－5p 单独或共转染 KYSE－30 细胞，随后 RT－qPCR 和 Western blot 实验检测 E2F7 的表达水平。与 si－NC＋in－NC 组相比，转染 si－CASC9＋in－NC 后 E2F7 的表达水平显著降低，而共转染 si－CASC9＋in－miR－195－5p 后 E2F7 的表达恢复到 si－NC＋in－NC 组水平（插页ⅩⅦ图 5G－图 5H）；与 pcDNA3.1＋mimics－NC 组相比，转染 pcDNA3.1－CASC9＋mimics－NC 后 E2F7 的表达水平显著升高，而共转染 pcDNA3.1－CASC9＋mimics－miR－195－5p 后 E2F7 的表达恢复到 pcDNA3.1＋mimics－NC 组水平（插页ⅩⅦ图 5I－图 5J）。上述结果表明，LncRNA CASC9 可以通过吸附 miR－195－5p 调控 E2F7 的表达。

2.4 miR－195－5p 靶向 E2F7 抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭 为了证实 miR－195－5p 可能通过直接调节 E2F7 来影响 ESCC 细胞的恶性表型，分别用 in－miR－195－5p 和 si－E2F7 单独或共转染 KYSE－150 细胞，用 mimics－miR－195－5p 和 pcDNA3.1－E2F7 单独或共转染 KYSE－30 细胞，RT－qPCR 和 Western blot 实验验证 E2F7 的敲降或过表达效果（插页ⅩⅧ图 6A－图 6B）。随后，通过 CCK－8、集落形成、划痕以及 Transwell 侵袭实验评估不同处理方式对 ESCC 细胞恶性表型的影响。结果显示，敲降 miR－195－5p 明显促进了 KYSE－150 细胞活性以及细胞的增殖、迁移和侵袭能力，进一步敲降 E2F7 可以逆转敲降 miR－195－5p 产生的促进作用；过表达 miR－195－5p 明显抑制了 KYSE－30 细胞活性以及细胞的增殖、迁移和侵袭能力，进一步过表达 E2F7 可以逆转过表达 miR－195－5p 产生的抑制作用（插页ⅩⅧ图 6C－图 6F）。此外，通过 Western bolt 实验评估不同处理方式对 ESCC 细胞 EMT 进程的影响。结果显示，敲降 miR－195－5p 显著抑制 KYSE－150 细胞中 E－cadherin 的表达，促进 N－cadherin 和 Vimentin 的表达，敲降 E2F7 后可逆转该效应；过表达 miR－195－5p 则显著促进 KYSE－30 细胞中 E－cadherin 的表达，抑制 N－cadherin 和 Vimentin 的表达，过表达 E2F7 后可逆转该效应（插页ⅩⅧ图 6G）。总之，miR－195－5p 靶向 E2F7 抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭。

3 讨论

藤茶最早在《茶经》中被提及，之后人们在长期茶饮总结出其在抵抗疾病方面的潜力及药用价值，遂应用于医学治疗。中草药专著《中华本草》等都有对藤茶的相关记载。现代药理研究进一步揭示了藤茶中的关键成分二氢杨梅素（Dihydromyricetin，DMY 或 DHM，也称为蛇葡萄素 Ampelopsin，AMP）是其主要活性化合物，具有抗肿瘤、抗氧化和抗炎等多种药理作用。藤茶扮演着重要的药效角色，并成为当前研究的焦点。ESCC 是一类预后差、恶性程度高、治愈率极低的肿瘤，尽管手术、放疗和化疗取得了较大的进展，但大多数转移性患者的治疗选择仍然有限[15]。因此，寻找创新有效的候选药物及治疗靶点对改善目前的 ESCC 疗效至关重要。由于中药被认为含有具有潜在抗癌特性的化合物，从中草药中分离出的活性成分已逐渐被开发为新型治疗剂[16]。本研究证实 DMY 可以通过 LncRNA CASC9/miR－195－5p/E2F7 轴抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭，这一结果为 DMY 在 ESCC 中发挥抗肿瘤作用提供了新的证据。

我国传统中医药资源丰富，种类众多，已累积了大量在肿瘤治疗方面的实践经验。研究和开发中药中的活性成分，特别是那些具有低毒性和高效性的成分，展示了在肿瘤辅助治疗领域的巨大潜力[17－21]。自然来源的草药化合物被视为抑制癌症增长和转移的有效选择；大部分从植物中提取的化合物在癌细

胞中表现出显著的细胞毒性，成为未来药物开发的重要候选。DMY 这种自然的黄酮类化合物主要从藤茶、枳椇子等植物的嫩茎叶中提取，含量可达 38.5%[22]。目前的研究已经证明 DMY 具有多种生物活性，包括抗氧化、抗癌、解酒和保护肝脏等，它通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和自噬、逆转药物耐药性以及减少癌细胞转移等机制发挥抗肿瘤作用[23]。DMY 黄酮类化合物在抑制肿瘤进展中起到抗转移作用。比如在宫颈癌中，DMY 通过 ERK1/2/β－catenin 途径降低 S100A4 的表达，从而抑制肿瘤细胞迁移和侵袭[24]；在胆管癌中，DMY 通过下调 miR－21 的表达来抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡[25]。本研究的结果表明 DMY 可以降低 ESCC 细胞中 LncRNA CASC9 的表达水平。LncRNA CASC9 是多种癌症的致癌基因。在膀胱癌中，LncRNA CASC9 海绵 miR－758－3p 通过上调 TGF－β2 促进膀胱癌增殖和 EMT[26]。此外，STAT3 激活的 LncRNA CASC9 通过增强 H3K27ac 激活的 SOX4 促进乳腺癌侵袭和淋巴管的形成[27]。我们发现 DMY 通过抑制 ESCC 细胞中 LncRNA CASC9 的表达，从而抑制细胞增殖、迁移和侵袭。过表达 LncRNA CASC9 可以促进 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭，而添加 DMY 可以部分逆转这种细胞表型。结合以上研究结果，我们推测 DMY 可通过多靶点多机制抑制多种肿瘤的增殖和转移。

LncRNAs 影响下游基因表达的方式很多，最重要也是最常见的一种方式是作为 miRNA 的 ceRNA，进一步调控 miRNA 下游 mRNA 的表达，这种调控方式也被简单地总结为 lncRNA－miRNA－mRNA 调控网络。如 LncRNA LINC00680 通过海绵吸附 miR－423－5p 来促进 PAK6 的表达，进而促进 ESCC 的增殖、迁移和侵袭[28]。LncRNA LOC146880 通过 miR－328－5p/FSCN1/MAPK 轴促进 ESCC 的增殖、侵袭、迁移和 EMT[29]。本研究利用生信数据库预测 LncRNA CASC9 的下游靶 miRNA 以及对应的靶基因 mRNA，结果发现了 LncRNA CASC9/miR－195－5p/E2F7 调控轴，随后通过细胞功能实验以及双荧光素酶报告基因实验证实 LncRNA CASC9 可以作为 miR－195－5p 的分子海绵，进而促进 E2F7 的表达。以上研究结果提示，ESCC 中存在复杂的 lncRNAs－miRNAs 网络调控细胞增殖和转移。

miR－195－5p 已被证实在多种肿瘤（包括 ESCC、结直肠癌、三阴性乳腺癌）中发挥抑癌基因作用[30－32]。如 miR－195－5p 靶向 YAP1 抑制宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT[33]；miR－195－5p 通过 FOXK1 抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[34]。此外，FANG K 等[35]发现 miR－195－5p 是 LncRNA FGD5－AS1 的下游靶点，LncRNA FGD5－AS1 通过调节 miR－195－5p/NUAK2 轴促进乳腺癌的恶性进展。本研究中，我们的结果表明 miR－195－5p 在 ESCC 组织和细胞中表达下调，过表达 miR－195－5p 可以抑制 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程。这与 MENG X F 等[36]报道的相一致。此外我们还发现 miR－195－5p 可以靶向抑制 E2F7 的表达。据报道，E2F7 与大量癌症恶性增殖和转移密切相关[37－38]。如 microRNA－30a－5p 通过靶向 E2F7 抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移和转移[39]；LINC00174 通过 miR－3127－5p/E2F7 轴促进结直肠癌细胞的增殖、迁移和 EMT 进程[40]。本研究的结果表明，敲低 E2F7 可以逆转敲低 miR－195－5p 对食管鳞癌细胞增殖、转移以及 EMT 进程的促进作用，而过表达 E2F7 可逆转过表达 miR－195－5p 产生的抑制作用。总之，miR－195－5p 在大多数肿瘤中起着抑癌作用，而 E2F7 是典型的促癌因子。以上结果说明 miR－195－5p 可通过多个靶基因在多种肿瘤中发挥抑癌作用，miR－195－5p/E2F7 是 ESCC 治疗的潜在靶点。

综上，本研究证实 DMY 对 ESCC 细胞的增殖和转移具有明显抑制作用，表明 DMY 是治疗 ESCC 的潜在候选药物。我们还检测到 DMY 显著抑制 LncRNA CASC9 的表达，DMY 通过下调 LncRNA CASC9 的表达，抑制 ESCC 细胞的增殖和转移。机制上，我们还证实 LncRNA CASC9/miR－195－5p/E2F7 在 ESCC 转移中的促癌作用。总之，在未来的研究中，我们将进行更多 DMY 在癌症治疗领域的应用和机制的探索，进一步深入分析 DMY 及其衍生物在癌症治疗中的作用机制，肿瘤微环境中的影响，以及与宿主因素的相互作用。充分利用藤茶这种具有药食同源特性的植物资源，开发基于 DMY 预防和治疗恶性肿瘤的创新药物，为中医药在全球医疗领域的应用和推广提供更多的科学依据，也有助于推动传统中药在现代医学中的创新和国际化。

参考文献

[1] REICHENBACH Z W, MURRAY M G, SAXENA R, et al. Clinical and translational advances in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Adv Cancer Res, 2019, 144: 95－135.

[2] ZHENG Y X, LUO M, LÜ M H, et al. *Let－7c－5p* inhibits cell proliferation and migration and promotes apoptosis *via* the CTHRC1/AKT/ERK pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 11193－11209.

[3] ROGERS J E, SEWASTJANOW－SILVA M, WATERS R E, et al. Esophageal cancer: emerging therapeutics[J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(2): 107－117.

[4] SHANG Q X, YANG Y S, YUAN Y, et al. Clinical and prognostic effects of adjuvant therapy on less advanced esophageal squamous cell carcinoma patients[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(3): 681－699.

[5] MORGAN E, SOERJOMATARAM I, RUMGAY H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020[J]. Gastroenterology, 2022, 163(3): 649－658.

[6] NAEEM A, HU P Y, YANG M, et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives[J]. Molecules, 2022, 27(23): 8367.

[7] WU J J, XIAO Z W, LI H F, et al. Present status, challenges, and prospects of dihydromyricetin in the battle against cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(14): 3487.

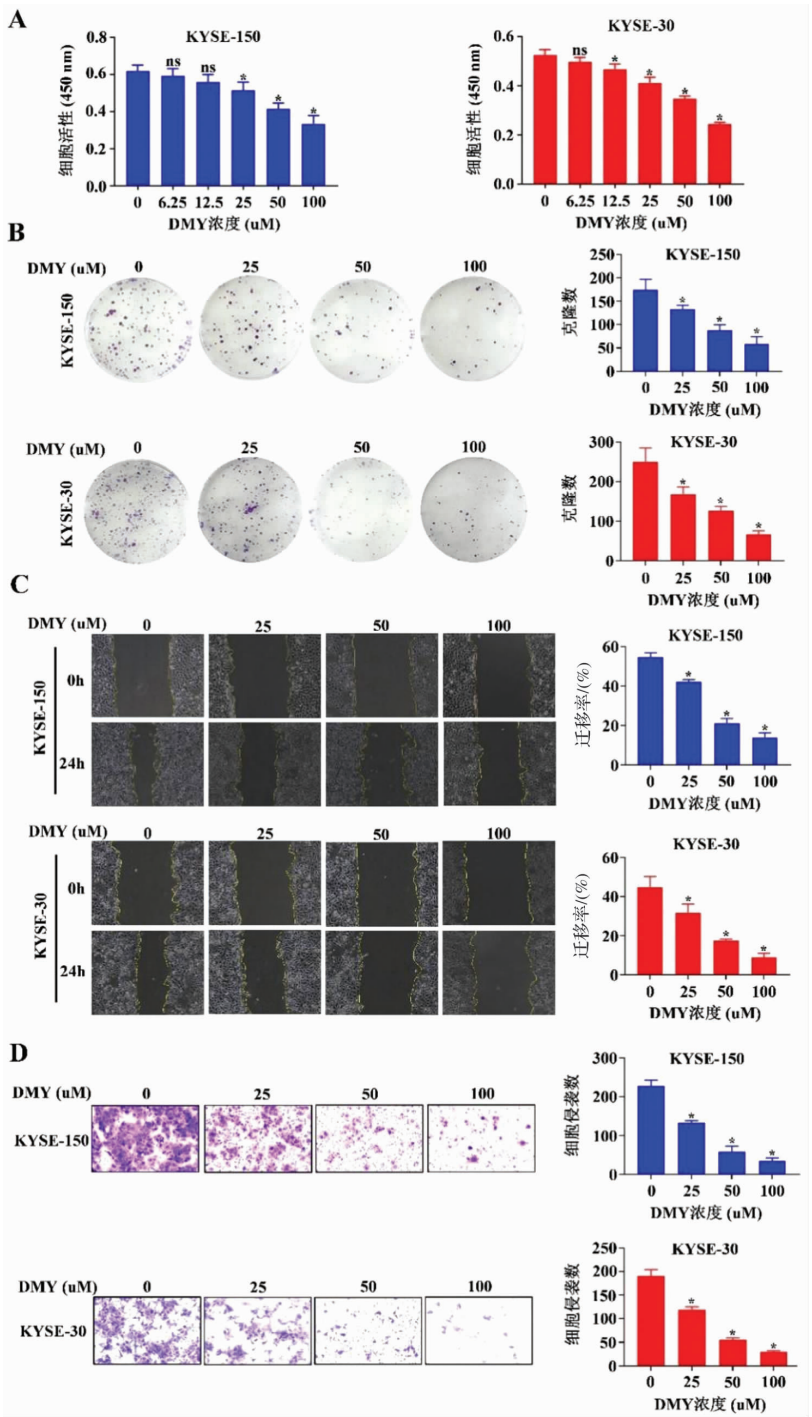
[8] YE L, YIN G D, JIANG M H, et al. Dihydromyricetin exhibits antitumor activity in nasopharyngeal cancer cell through antagonizing Wnt/β－catenin signaling[J]. Integr Cancer Ther, 2021, 20: 1534735421991217.

[9] WANG S N, GE F, CAI T Y, et al. Dihydromyricetin inhibits proliferation and migration of gastric cancer cells through regulating Akt/STAT3 signaling pathways and HMGB1 expression[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2021, 41(1): 87－92.

[10] SANCHEZ CALLE A, KAWAMURA Y, YAMAMOTO Y, et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(7): 2093-2100.
[11] LIANG Y, CHEN X D, WU Y Y, et al. LncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through upregulating LAMC2 expression by interacting with the CREB-binding protein [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(11): 1980-1995.
[12] LI C S, ZHANG J Y, ZHOU Y Y, et al. Long non-coding RNA CASC9 promotes the progression and development of gastric cancer *via* regulating miR-370/EGFR axis[J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(4): 509-516.
[13] NING B S, GUO S Y, MEI Y E. Long non-coding RNA CASC9 promotes tumor progression in oral squamous cell carcinoma by regulating microRNA-545-3p/laminin subunit gamma 2[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 7907-7919.
[14] ENTEZARI M, TAHERIAZAM A, OROUEI S, et al. LncRNA-miRNA axis in tumor progression and therapy response: an emphasis on molecular interactions and therapeutic interventions[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113609.
[15] WANG H, TANG H, FANG Y, et al. Morbidity and mortality of patients who underwent minimally invasive esophagectomy after neoadjuvant chemoradiotherapy vs neoadjuvant chemotherapy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma: a randomized clinical trial[J]. JAMA Surg, 2021, 156(5): 444-451.
[16] PENG F, XIE X F, PENG C. Chinese herbal medicine-based cancer therapy: novel anticancer agents targeting microRNAs to regulate tumor growth and metastasis[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(8): 1711-1735.
[17] 张桐, 丁桂清, 乔曦, 等. 藤茶及其活性成分二氢杨梅素的药理作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(7): 107-113.
[18] 姚元勇, 张萌, 陈仕学. 二氢杨梅素抑制黄嘌呤氧化酶生物活性综合评价与作用机制研究[J]. 中成药, 2024, 46(1): 319-323.
[19] 王凤杰. 基于 MAPK 通路调控 GRASP65 探讨二氢杨梅素抗卵巢癌的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
[20] 潘真真, 吴春梅, 林亚, 等. 二氢杨梅素纳米粒的制备及其体外抗肿瘤研究[J]. 中南药学, 2023, 21(3): 589-593.
[21] 张雅琪,黄高扬,思秀慧,等. 藤茶中二氢杨梅素抗炎抗氧化药理作用的研究进展[C]//第 4 届西南高校民族医药论坛论文集,2018:514-518.
[22] 雷华平, 冯纪南, 任名新, 等. 不同季节的显齿蛇葡萄中二氢杨梅素和总黄酮的含量测定[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(1): 37-39.
[23] LU C J, HE Y F, YUAN W Z, et al. Dihydromyricetin-mediated inhibition of the Notch1 pathway induces apoptosis in QGY7701 and HepG2 hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(34): 6242-6251.
[24] HSIN M C, HSIAO Y H, CHEN P N, et al. Dihydromyricetin inhibited migration and invasion by reducing S100A4 expression through ERK1/2/β-catenin pathway in human cervical cancer cell lines[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15106.
[25] CHEN L, YANG Z S, ZHOU Y Z, et al. Dihydromyricetin inhibits cell proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis *via* regulating miR-21 in Human Cholangiocarcinoma Cells[J]. J Cancer, 2020, 11(19): 5689-5699.
[26] ZHANG Z, CHEN F F, ZHAN H R, et al. lncRNA CASC9 sponges miR-758-3p to promote proliferation and EMT in bladder cancer by upregulating TGF-β2[J]. Oncol Rep, 2021, 45(1): 265-277.
[27] FAN S J, CUI Y, LI Y H, et al. LncRNA CASC9 activated by STAT3 promotes the invasion of breast cancer and the formation of lymphatic vessels by enhancing H3K27ac-activated SOX4[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(9): 848-857.
[28] XUE S T, ZHENG B, CAO S Q, et al. Long non-coding RNA LINC00680 functions as a *CeRNA* to promote esophageal squamous cell carcinoma progression through the miR-423-5p/PAK6 axis [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 69.
[29] TANG J W, XU H L, LIU Q, et al. LncRNA LOC146880 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression *via* miR-328-5p/FSCN1/MAPK axis[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(10): 14198-14218.
[30] LI F, NIU R, GAO S L, et al. Pro-angiogenesis role of LINC00662 from esophageal squamous cell carcinoma cells-derived extracellular vehicles[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 772514.
[31] FOROUZAN JAHROMI Z, JAVERI A, FAKHR TAHA M. Tumor suppressive effects of the pleiotropically acting miR-195 in colorectal cancer cells[J]. EXCLI J, 2019, 18: 243-252.
[32] WANG H L, FANG Q, YOU S, et al. miRNA-195-5p/PSAT1 feedback loop in human triple-negative breast cancer cells[J]. Genes Genomics, 2023, 45(1): 39-47.
[33] LIU X M, ZHOU Y, NING Y, et al. miR-195-5p inhibits malignant progression of cervical cancer by targeting YAP1[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 931-944.
[34] LONG Z Q, WANG Y D. miR-195-5p suppresses lung cancer cell proliferation, migration, and invasion *via* FOXK1[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820922587.
[35] FANG K, XU Z J, JIANG S X, et al. lncRNA FGD5-AS1 promotes breast cancer progression by regulating the hsa-miR-195-5p/NUAK2 axis[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(6): 460.
[36] MENG X F, LIU A D, LI S L. SNHG1 promotes proliferation, invasion and EMT of prostate cancer cells through miR-195-5p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(19): 9880-9888.
[37] LIU Y, TANG H, ZHANG Y L, et al. Circular RNA hsa_circ_0000519 contributes to angiogenesis and tumor progression in hepatocellular carcinoma through the miR-1296/E2F7 axis[J]. Hum Cell, 2023, 36(2): 738-751.
[38] XU C, QI X X. miR-10b inhibits migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma *via* regulating E2F7[J]. J Clin Lab Anal, 2020, 34(10): e23442.
[39] YE Y Y, MEI J W, XIANG S S, et al. microRNA-30a-5p inhibits gallbladder cancer cell proliferation, migration and metastasis by targeting E2F7[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 410.
[40] MA Y H, LI Y Z, TANG Y Y, et al. LINC00174 facilitates proliferation and migration of colorectal cancer cells *via* miR-3127-5p/E2F7 axis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2021, 31(8): 1098-1108.

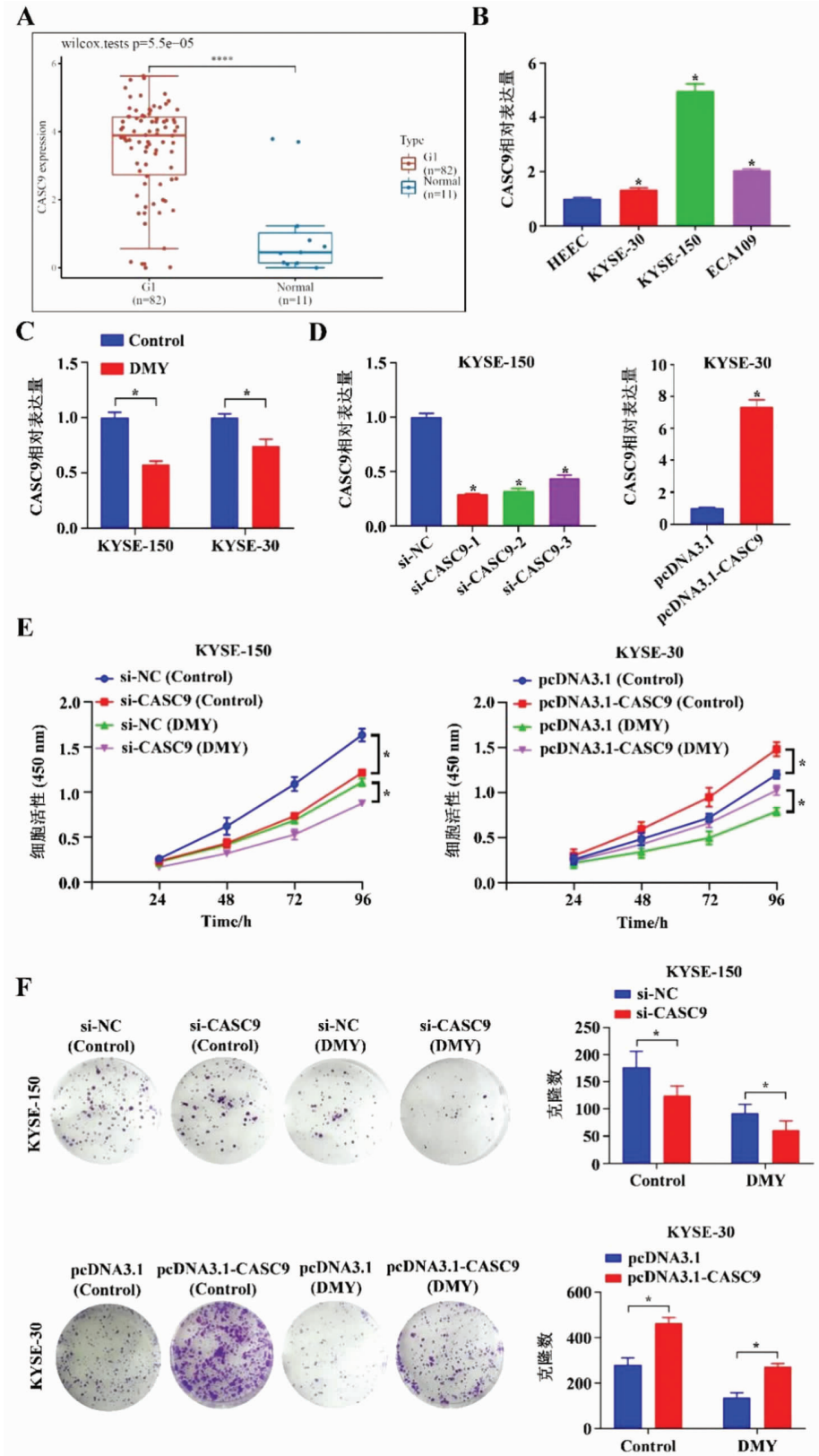
LncRNA CASC9/miR－195－5p/E2F7 信号通路在二氢杨梅素抑制食管鳞状细胞癌增殖和转移中的作用研究

（正文见 65－70 页）



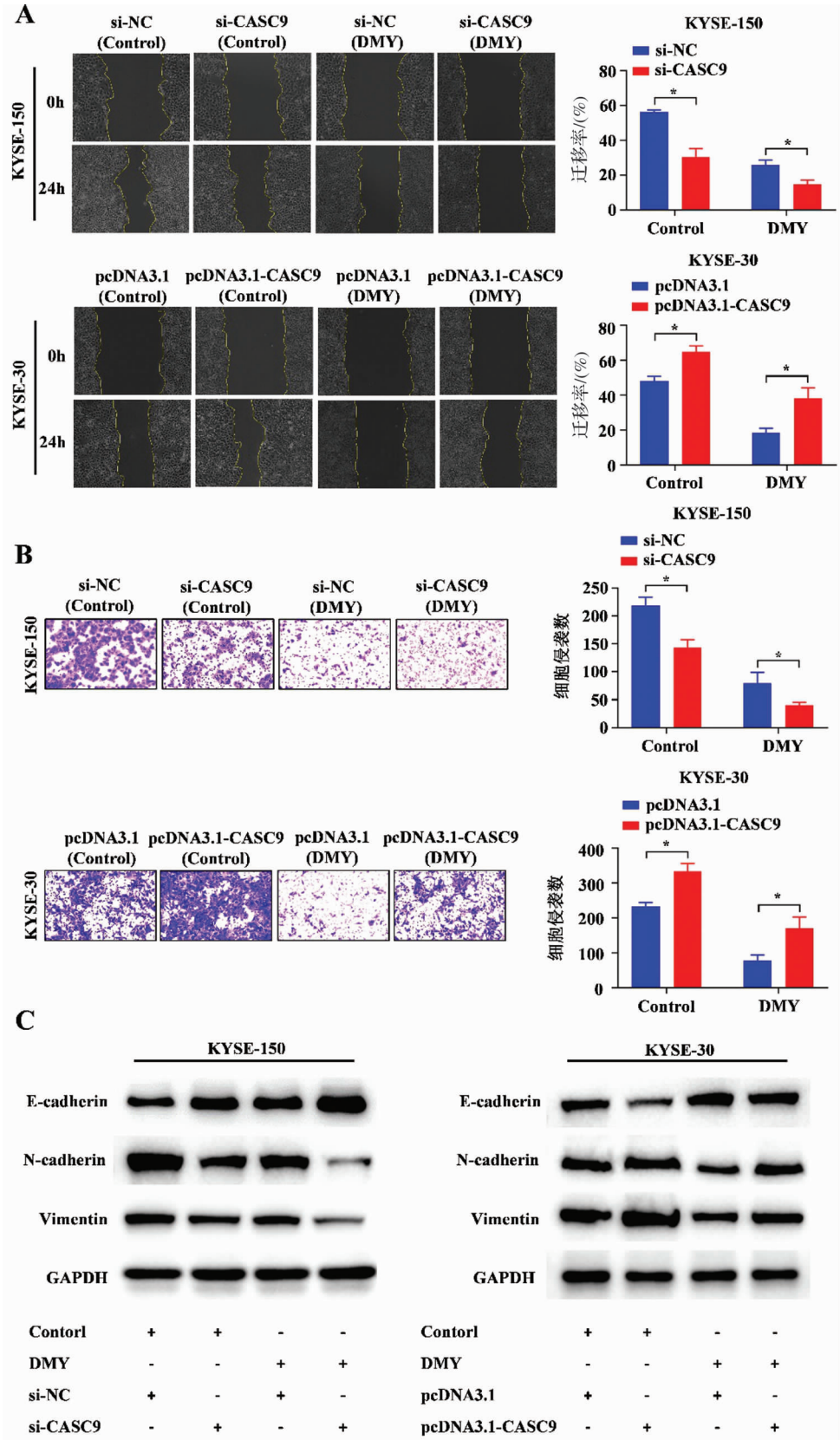
注：A：CCK－8 实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的细胞活性；B：集落形成实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的增殖能力（结晶紫染色）；C：划痕实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的迁移能力（×40）；D：Transwell 侵袭实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的侵袭能力（结晶紫染色，×200）；＊与 0 μmol/L 比较，$P<0.05$，ns 与 0 μmol/L 比较，$P>0.05$。

图 1　DMY 抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭



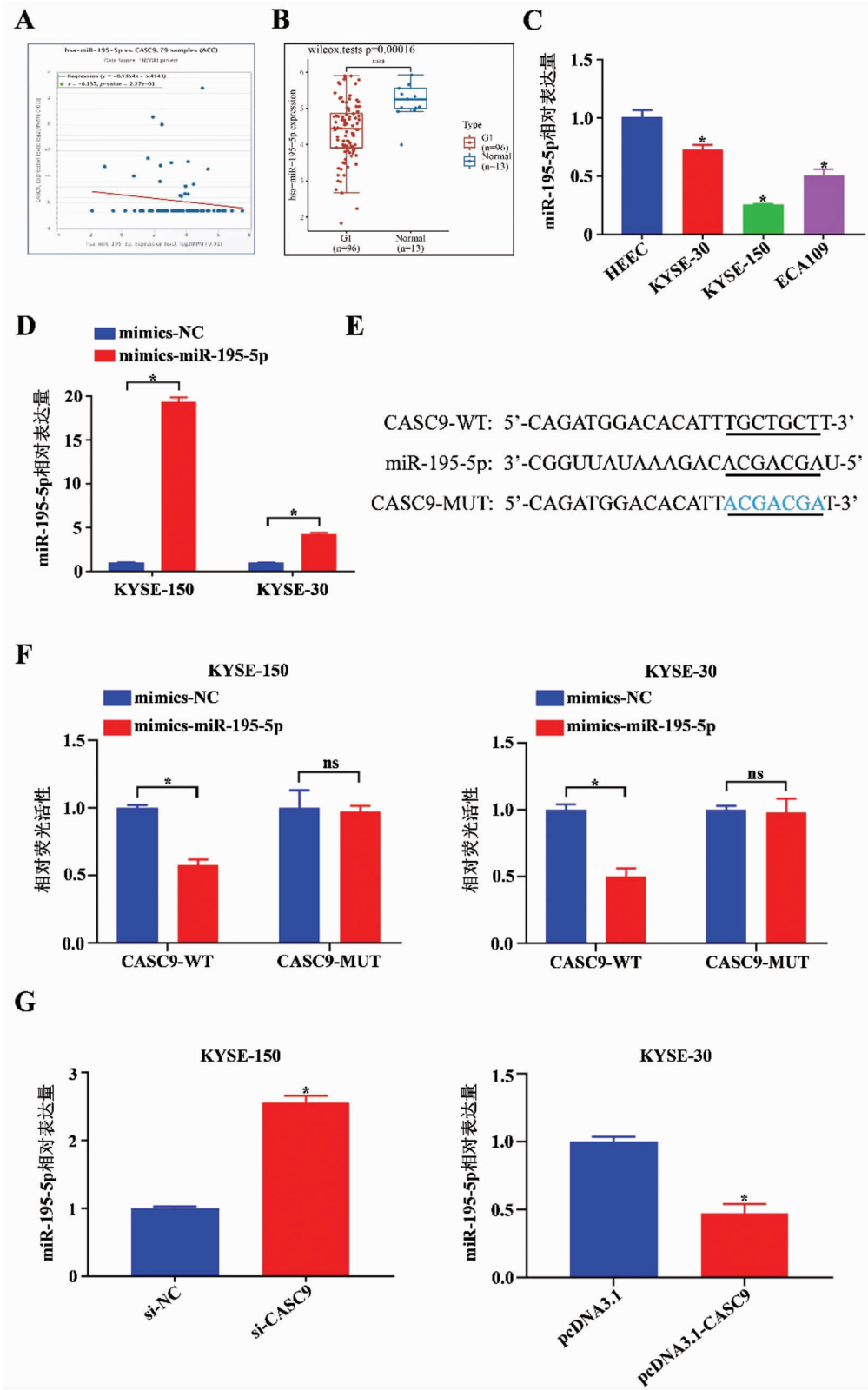
注：A：生物信息学分析 LncRNA CASC9 的表达；B－C：RT－qPCR 实验检测细胞中 LncRNA CASC9 的表达；D：RT－qPCR 实验验证 LncRNA CASC9 的敲低和过表达效果；E：CCK－8 实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞活性；F：集落形成实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的增殖能力（结晶紫染色）；$*P<0.05$。

图 2 DMY 下调 LncRNA CASC9 的表达，抑制 ESCC 细胞增殖



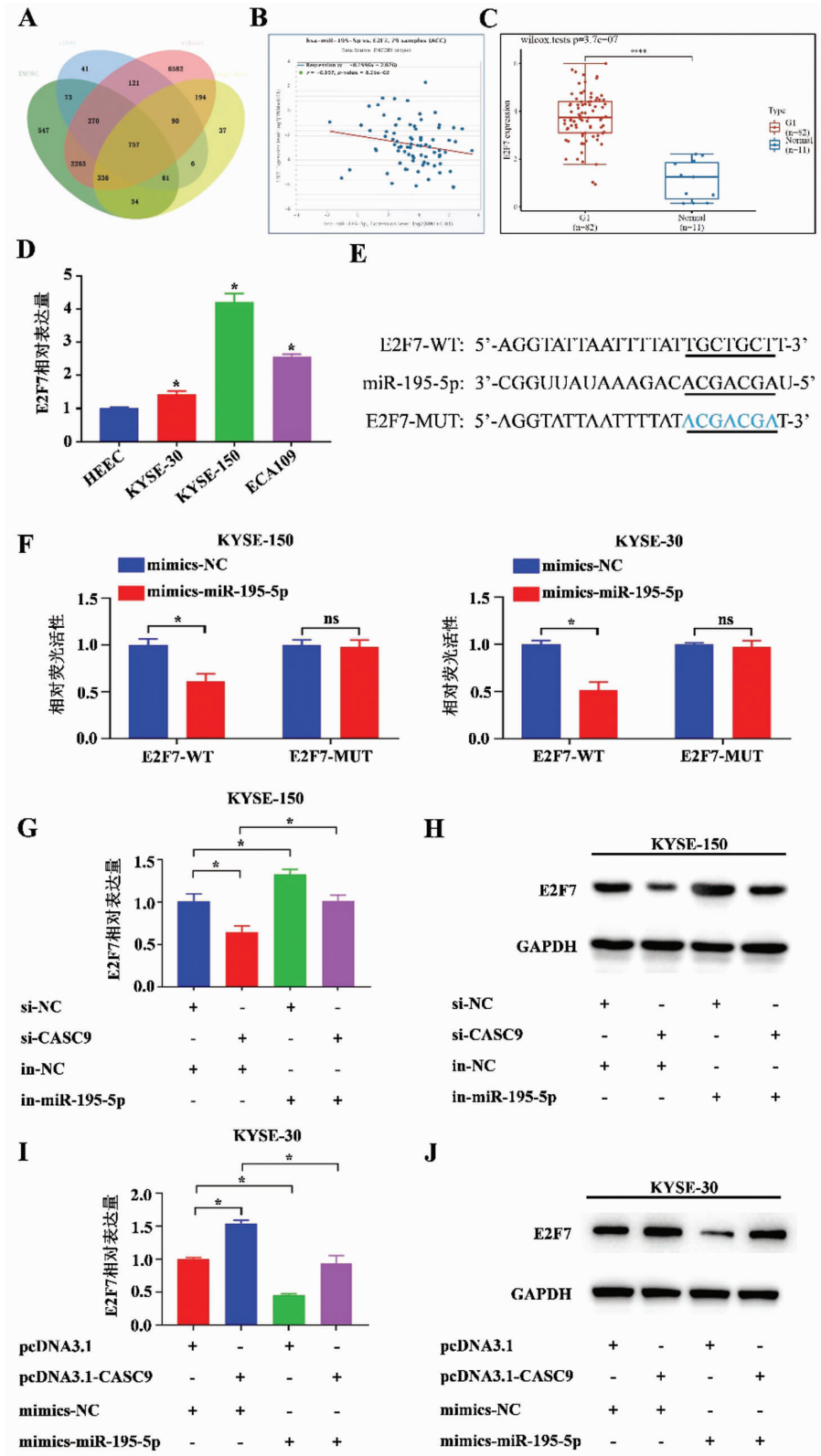
注：A：划痕实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的迁移能力；B：Transwell 侵袭实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的侵袭能力（结晶紫染色，×200）；C：Western blot 实验检测 KYSE－150 和KYSE－30 细胞中 E－cadherin、N－cadherin、Vimentin 蛋白表达水平；$*P<0.05$。

图 3 DMY 通过下调 LncRNA CASC9 的表达，进而抑制 ESCC 细胞迁移和侵袭



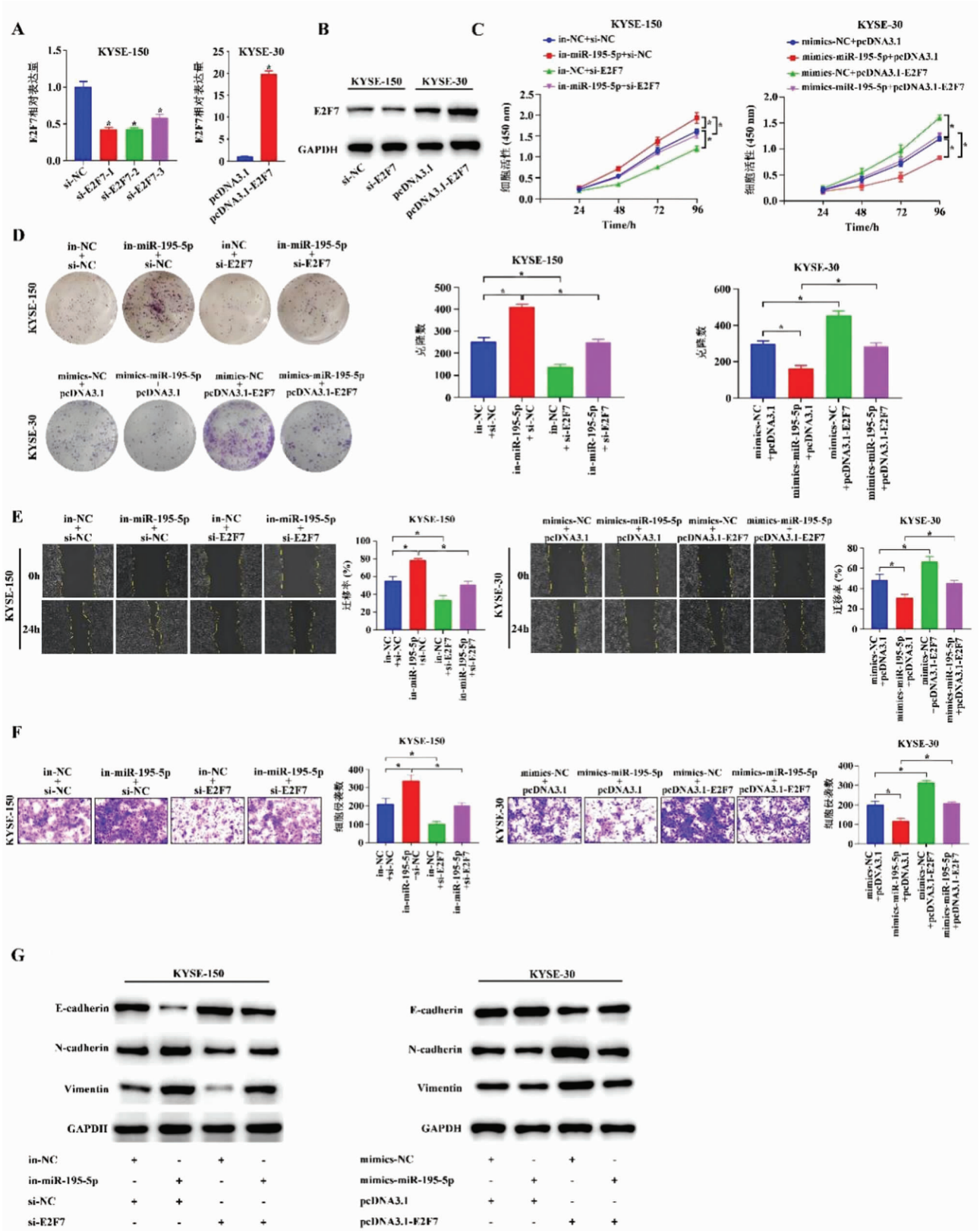
注：A：LncRNA CASC9 和 miR－195－5p 的 person 相关性分析；B：生物信息学分析 miR－195－5p 在 ESCC 组织中的表达；C：RT－qPCR 实验检测细胞中 miR－195－5p 的表达；D：RT－qPCR 实验验证 miR－195－5p 的过表达效果；E：LncRNA CASC9 与 miR－195－5p 的核苷酸结合序列点位；F：双荧光素酶报告基因实验验证 LncRNA CASC9 和 miR－195－5p 的结合关系；G：RT－qPCR 实验检测不同处理组 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞中 miR－195－5p 的表达；$*P<0.05$，ns $P>0.05$。

图 4　LncRNA CASC9 靶向调控 miR－195－5p 的表达



注：A：数据库预测 miR－195－5p 调控下游靶基因 venn 图；B：miR－195－5p 和 E2F7 的 person 相关性分析；C：生物信息学分析 E2F7 在 ESCC 组织中的表达；D：RT－qPCR 实验检测细胞中 E2F7 的表达；E：miR－195－5p 与 E2F7 的核苷酸结合序列点位；F：双荧光素酶报告基因实验验证 miR－195－5p 和 E2F7 的结合关系；G－J：RT－qPCR 和 Western blot 实验检测不同处理组 KYSE－150 细胞中 E2F7 mRNA（G）和蛋白（H）的表达水平以及 KYSE－30 细胞中 E2F7 mRNA（I）和蛋白（J）的表达水平；$*P<0.05$，ns $P>0.05$。

图 5　miR－195－5p 靶向调控 E2F7 的表达



注：A－B：RT－qPCR 和 Western blot 实验检测不同处理组 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞中 E2F7 mRNA（A）和蛋白（B）的表达；C：CCK－8 实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的细胞活性；D：集落形成实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的增殖能力（结晶紫染色）；E：划痕实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的迁移能力；F：Transwell 侵袭实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞的侵袭能力（结晶紫染色，×200）；G：Western blot 实验检测 KYSE－150 和 KYSE－30 细胞中 E－cadherin、N－cadherin、Vimentin 蛋白表达水平；$*P<0.05$。

图 6　miR－195－5p 靶向 E2F7 抑制 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭