

本文引用: 张文娟, 靳晓彩, 刘海涛, 李常娟, 赵学荣, 马立东, 乔冠恩. 基于 miR-96/RECK 信号通路探讨南蛇藤总萜对食管鳞癌细胞增殖、侵袭的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 1021-1029.

基于 miR-96/RECK 信号通路探讨南蛇藤总萜对食管鳞癌细胞增殖、侵袭的作用机制

张文娟¹, 靳晓彩¹, 刘海涛¹, 李常娟^{1*}, 赵学荣², 马立东¹, 乔冠恩¹

1. 邯郸市第一医院消化内科, 河北 邯郸 056000; 2. 承德医学院免疫教研室, 河北 承德 067000

[摘要] **目的** 探讨南蛇藤总萜(TTC)对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞增殖和侵袭的影响,并研究其是否通过调控 miR-96/回复引导半胱氨酸丰富蛋白含 Kazal 基元基因(RECK)通路实现。**方法** 选取人 ESCC 细胞系 KYSE410 为研究对象。将 KYSE410 细胞分为 8 组,每组设置 3 个复孔:Ctrl 组(无药物处理)、L-TTC 组(40 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理 24 h)、M-TTC 组(80 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理 24 h)、H-TTC 组(160 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理 24 h)、miR-96 NC 组(转染阴性对照)、miR-96 NC+TTC 组(转染阴性对照,并用 160 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理 24 h)、miR-96 mimic 组(转染 miR-96 mimic)和 miR-96 mimic+TTC 组(转染 miR-96 mimic,并用 160 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理 24 h)。MTT 检测 TTC 对 ESCC 细胞活力的影响。平板克隆实验、细胞划痕以及 Transwell 实验检测 KYSE410 细胞增殖、迁移和侵袭能力。RT-qPCR 检测 miR-96 表达水平。Western blot 检测具有 Kazal 基序的逆转诱导 RECK、基质金属蛋白酶(MMP)-9 和 MMP-2 蛋白表达水平。**结果** KYSE410 细胞经 20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTC 处理后,可显著抑制其细胞活力,并呈剂量依赖性($P < 0.05$)。与 Ctrl 组相比,L-TTC 组、M-TTC 组和 H-TTC 组的细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率及 miR-96 mRNA、MMP-9、MMP-2 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),RECK 蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$),呈剂量依赖性。与 miR-96 NC 组相比,miR-96 NC+TTC 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、细胞迁移率和穿膜细胞数及 MMP-9、MMP-2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),RECK 蛋白表达水平增加($P < 0.05$)。与 miR-96 NC 组相比,miR-96 mimic 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率及 MMP-9、MMP-2 蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$),RECK 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与 miR-96 mimic 组相比,miR-96 mimic+TTC 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率及 MMP-9、MMP-2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),RECK 蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$)。**结论** TTC 通过调控 miR-96/RECK 信号通路,有效下调 MMP-9 和 MMP-2 的表达,进而抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

[关键词] 食管鳞癌;南蛇藤总萜;miR-96;回复引导半胱氨酸丰富蛋白含 Kazal 基元基因;增殖;侵袭;基质金属蛋白酶

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.005

Mechanism of action of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells based on the miR-96/RECK pathway

ZHANG Wenjuan¹, JIN Xiaocai¹, LIU Haitao¹, LI Changjuan^{1*}, ZHAO Xuerong²,

MA Lidong¹, QIAO Guan'en¹

1. Department of Gastroenterology, The First Hospital of Handan, Handan, Hebei 056000, China;

2. Department of Immunology, Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China

[收稿日期]2025-03-03

[基金项目]河北省医学科学研究课题计划资助项目(20220500)。

[通信作者]* 李常娟,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:15803105963@163.com。

[Abstract] Objective To investigate the effects of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* (TTC) on the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, and to study whether it is achieved by regulating the miR-96 / RECK pathway. **Methods** Human ESCC cell line KYSE410 was selected as the research object. KYSE410 cells were divided into 8 groups, each with 3 replicates: Ctrl group (no drug treatment), L-TTC group (40 $\mu\text{g/mL}$ TTC treatment for 24 h), M-TTC group (80 $\mu\text{g/mL}$ TTC treatment for 24 h), H-TTC group (160 $\mu\text{g/mL}$ TTC treatment for 24 h), miR-96 NC group (transfected with negative control), miR-96 NC+TTC group (transfected with negative control and treated with 160 $\mu\text{g/mL}$ TTC for 24 h), miR-96 mimic group (transfected with miR-96 mimic), and miR-96 mimic+TTC group (transfected with miR-96 mimic and treated with 160 $\mu\text{g/mL}$ TTC for 24 h). MTT assay was used to detect the effect of TTC on the viability of ESCC cells. Plate cloning assay, cell scratch assay, and Transwell assay were used to detect the proliferation, migration, and invasion abilities of KYSE410 cells. RT-qPCR was used to detect the expression level of miR-96. Western blot was used to check the protein expression levels of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). **Results** After KYSE410 cells were treated with 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$ TTC, the cell viability was significantly inhibited in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the Ctrl group, the number of cell clones, transmembrane cells, cell migration rate, the expression levels of miR-96 mRNA, MMP-9 and MMP-2 proteins in the L-TTC group, M-TTC group, and H-TTC group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression level of RECK protein was significantly increased ($P < 0.05$), showing a dose-dependent effect. Compared with miR-96 NC group, miR-96 mRNA expression level, cell clone number, cell migration rate, and transmembrane cell number, MMP-9 and MMP-2 protein expression levels in miR-96 NC+TTC group were significantly decreased ($P < 0.05$), and RECK protein expression level was increased ($P < 0.05$). Compared with the miR-96 NC group, the expression level of miR-96 mRNA, the number of cell clones, the number of transmembrane cells, and cell migration rate, the expression levels of MMP-9 and MMP-2 protein in the miR-96 mimic group were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of RECK protein was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with miR-96 mimic group, miR-96 mRNA expression level, cell clone number, transmembrane cell number, and cell migration rate, MMP-9 and MMP-2 protein expression levels in miR-96 mimic+TTC group were significantly decreased ($P < 0.05$), and RECK protein expression level was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** TTC effectively down-regulates the expression of MMP-9 and MMP-2 by regulating the miR-96/RECK signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells.

[Keywords] esophageal squamous cell carcinoma; total terpenoids from *Celastrus orbiculatus*; miR-96; recovery guide cysteine-rich protein containing Kazal motif gene; proliferation; invasion; matrix metalloproteinase

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤,位居全球肿瘤相关死亡第 6 位,其特点为早期难以诊断且易转移^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌的主要组织学亚型,约占中国新诊断病例的 90%^[2]。由于 ESCC 的隐匿性特点,患者通常于晚期确诊,导致治疗效果不理想,预后较差,5 年生存率仅为 20%^[3]。目前,临床上尚无批准的化学预防 ESCC 药物,其治疗仍是一个重大挑战^[4]。因此,迫切需要有效的抗癌药物。南蛇藤为卫矛科植物,其茎藤具有苦涩辛辣、性温稍热的特性,在中医药学中常用于祛风除湿、疏通经络、缓解疼痛及促进血液循环和解毒^[5]。相关研究证实,南蛇藤的提取物——南蛇藤总萜(the total terpenoids of *Celastrus orbiculatus* Thunb., TTC)是一种很有潜力的抗

肿瘤候选药物,对多种恶性肿瘤,包括 ESCC,具有显著抗癌效果^[6]。miRNA 属于一类高度保守的小型非编码 RNA 分子群体,通过诱导 mRNA 降解或经由与非翻译区的部分序列配对来精细调控基因的表达水平。miR-96 是 miRNA 家族重要成员之一,在 ESCC 中显著高表达,并促进其恶性进展^[7]。具有 Kazal 基序的逆转诱导富含半胱氨酸蛋白(reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs, RECK)是一种负调控基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的新型肿瘤抑制基因。近期研究显示,RECK 能抑制癌细胞系的侵袭、转移及肿瘤血管生成,其低表达与 ESCC 的淋巴结转移有关^[8]。此外,RECK 还受到 miR-96 的靶向抑制,进而促进食管癌的肿瘤侵袭^[9]。然而,关于 TTC 对 ESCC 的

有效性,目前研究尚不充分。因此,本研究旨在探讨 TTC 通过调控 miR-96/RECK 通路对 ESCC 细胞生物学特性的影响,并初步分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

人食管鳞系 KYSE410 细胞(货号:BFN6021517)和正常食管上皮细胞 HEEC(货号:BFN60806561)购自上海细胞库。南蛇藤购于广州至信中药饮片公司;DMEM 培养基(货号:11965118)、胎牛血清(货号:A5256701)购自美国 Gibco Invitrogen 公司;MTT 试剂(货号:CT01-5)和双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:LUC1-1KT)购自美国 Sigma 公司;miR-96 mimic 及其阴性对照(无货号)购自武汉金开瑞生物工程有限公司;野生型 RECK^{UTR}(RECK-WT)序列 5'-CUGCUACUUAUAUAAUUGCCAAA-3' 和突变型 RECK^{UTR}(RECK-MUT)序列 5'-CUGCUGCUCACAUAUACUCUUC-3' 报告载体由山东 Vigenebio 公司构建;基质金属蛋白酶 9(MMP-9)抗体(货号:ab76003)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)抗体(货号:ab181286)、具有 Kazal 基序的逆转诱导富含半胱氨酸蛋白(RECK)抗体(货号:ab88249)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号:ab179467)购自美国 Abcam 公司;反转录试剂盒和 SYBR Green qPCR Mix 试剂(货号:FP201)购自北京天根科技有限公司。多功能酶标仪(型号:SpectraMax Mini)购自上海美谷分子仪器(上海)有限公司;流式细胞仪(型号:FACSAriaTM Fusion)购自美国 BD 公司;荧光定量 PCR 仪(型号:QuantStudio)购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 TTC 的制备

参考既往研究^[10],制备 TTC:南蛇藤经过粉碎处理并干燥,随后使用 95%乙醇进行 3 次加热回流提取,过滤,得到醇提液,减压浓缩得到醇浸膏;将醇浸膏加水混悬,采用乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,减压浓缩,得到乙酸乙酯浸膏,该浸膏的主要活性成分为 TTC,包括二萜和三萜类。

1.3 细胞培养

ESCC 细胞系 KYSE410 均在含有 10%胎牛血清及 1%青霉素/链霉素双抗的 DMEM 完全培养基中培养,在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行孵育。

1.4 细胞分组及处理

在培养好的 KYSE410 细胞中,加入 0、20、40、80、160 μ g/mL 的 TTC 培养 24 h 和 48 h,MTT 检测细

胞活力,筛选 TTC 的最佳干预浓度。将 KYSE410 细胞分为 8 组:Ctrl 组(无药物处理)、L-TTC 组(40 μ g/mL 的 TTC 处理 24 h)、M-TTC 组(80 μ g/mL 的 TTC 处理 24 h)、H-TTC 组(160 μ g/mL 的 TTC 处理 24 h)、miR-96 NC 组(转染阴性对照)、miR-96 NC+TTC 组(转染阴性对照,并用 160 μ g/mL 的 TTC 处理 24 h)、miR-96 mimic 组(转染 miR-96 mimic)和 miR-96 mimic+TTC 组(转染 miR-96 mimic,并用 160 μ g/mL 的 TTC 处理 24 h)。按照分组,分别转染相应的 miR-96 mimic 及其阴性对照,并用药物进行处理,每组设置 3 个复孔。

1.5 MTT 检测细胞活力

经过胰蛋白酶的消化步骤后,将 KYSE410 和 HEEC 细胞以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种至 96 孔培养板,待细胞贴壁时分别加入浓度为 0、20、40、80、160 μ g/mL 的 TTC 溶液分别干预 24 h 和 48 h。处理结束后,向各孔中加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,并在室温条件下继续培养 4 h。随后移除培养液,并向每孔内加入 150 μ L 的 DMSO。经过 10 min 的轻微振荡,确保结晶物充分溶解。最后,在 490 nm 波长下,使用分光光度计测定各孔的 OD 值。

1.6 平板克隆实验

从 KYSE410 细胞悬液中吸取 100 μ L(细胞密度为 1×10^3 个/mL)接种于 6 孔培养板中,随后将细胞置于含有不同浓度 TTC(0、40、80、160 μ g/mL)的 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清及 1%青霉素/链霉素双抗)中,在 37 °C 恒温且含有 5% CO₂ 的细胞培养箱内连续培养 2~3 周。培养结束后,使用 PBS 清洗细胞,4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min,再次用 PBS 清洗,并使用 0.1%结晶紫溶液染色 10 min,统计各孔中的细胞克隆数量。

1.7 Transwell 实验

在 Transwell 侵袭实验中,首先将 Transwell 小室置于冰上进行预处理,随后将 KYSE410 细胞以 1×10^5 个/mL 细胞的密度接种至上室,上室预先加入了含有不同浓度 TTC(0、40、80、160 μ g/mL)的无血清 DMEM 培养基进行孵育。同时,在下室中加入含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养基作为化学趋化因子,以诱导细胞迁移。经过 48 h 的培养周期后,使用 4%多聚甲醛对细胞进行固定处理,并采用 0.1%结晶紫溶液染色 15 min。利用光学显微镜(放大倍

数 $\times 10$)观察并拍摄细胞的侵袭情况,对侵袭细胞的数量进行计数与分析。

1.8 细胞划痕实验

KYSE410 细胞被接种至 6 孔培养板中,待其生长至约 80%的融合状态。利用枪头在培养板底部垂直划线,并借助 PBS 冲洗步骤以去除游离的细胞。在 0 h 时间点,记录划痕区域的面积并拍摄照片以供后续比对。向各孔中分别添加了含有不同浓度 TTC (0、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的新鲜培养基,并将细胞继续培养 24 h。利用 ImageJ 图像分析软件,对各时间点的划痕面积进行量化分析,并据此数据计算出细胞的迁移速率。

1.9 qRT-PCR

从各组细胞中提取总 RNA,操作遵循 TRIZOL 试剂盒提供的指南。随后,利用反转录过程合成 cDNA。接下来,准备 qRT-PCR 反应体系,其中包含 2 μL cDNA、2 μL 正向引物、2 μL 反向引物、7.2 μL ddH₂O 以及 10 μL SYBR Green Master Mix。使用 β -actin 作为内参基因,通过 qRT-PCR 反应检测目标基因。最终,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法计算得出 miR-96 mRNA 的相对表达水平。引物序列详见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列表

Table 1 qRT-PCR primer sequence table

组别	序列 5'→3'	引物长度/bp
miR-96	正向: CGAACTTTGGCACTAGGCACATT	95
	反向: TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT	
β -actin	正向: CAGAAGGAGATTACTGCT	128
	反向: TACTCTGCTGTGATCCAC	

1.10 双荧光素酶实验

利用 Lipofectamine™ 3000 试剂盒,用 miR-96 mimic 或 NC mimic 和 RECK-WT 和 RECK-MUT 共转染 KYSE410 细胞。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测量荧光素酶活性。

1.11 Western blot

收集 KYSE410 细胞后,用 RIPA 裂解液提取蛋白,经 SDS-PAGE 分离后,通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶封闭 2 h,随后与一抗 (RECK、MMP-9、MMP-2, 1:1 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加二抗室温孵育 2 h,ECL 显色并拍照记录,以 β -actin 为内参,用 Quantity One 4.6.6 软件分析条带相对表达量。

1.12 统计学分析

数据统计分析采用 SPSS 21.0 软件进行处理。计量资料符合正态分布以“ $\bar{x}\pm s$ ”的形式表示。对于两组间的差异比较,采用独立样本 t 检验;对于多组间的差异分析,选用单因素方差分析 (ANOVA),进一步利用 SNK- q 进行组间两两比较。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TTC 对 KYSE410 细胞活力的影响

KYSE410 细胞经 20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TTC 处理后,可显著抑制其细胞活力,并呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。详见表 2。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TTC 虽能抑制细胞活力 ($P<0.05$),但抑制效果相对较弱,因此选择 40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TTC 作为后续实验浓度。

2.2 各组 KYSE410 细胞增殖、迁移和侵袭的情况

与 Ctrl 组相比,L-TTC 组、L-TTC 组和 H-TTC 组的细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率均显著降低 ($P<0.05$)。详见图 1。

2.3 各组 KYSE410 细胞 miR-96/RECK 信号通路和 MMPs 蛋白表达的情况

与 NC mimic 组相比,miR-96 mimic 组的 RECK-WT 荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$),RECK-WUT 荧光素酶活性无显著变化 ($P>0.05$)。与 Ctrl 组相比,L-TTC 组、L-TTC 组和 H-TTC 组的 miR-96 mRNA 及 MMP-9 和 MMP-2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$),RECK 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$),并呈剂量依赖性。详见图 2。

表 2 南蛇藤总萜对 KYSE410 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* on the viability of KYSE410 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	80 $\mu\text{g}/\text{mL}$	160 $\mu\text{g}/\text{mL}$	F 值	P 值
24 h	100.00 \pm 0.46	89.59 \pm 3.06*	75.58 \pm 6.85*#	63.01 \pm 3.36*# Δ	49.16 \pm 5.23*# Δ \blacktriangle	64.980	<0.001
48 h	100.00 \pm 0.51	80.64 \pm 4.11*	68.87 \pm 4.67*#	53.09 \pm 4.93*# Δ	31.28 \pm 4.09*# Δ \blacktriangle	128.808	<0.001
t 值	0.000	1.721	3.025	2.880	4.648		
P 值	1.000	0.160	0.039	0.045	0.010		

注:与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比,* $P<0.05$;与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比,# $P<0.05$;与 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, Δ $P<0.05$;与 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, \blacktriangle $P<0.05$ 。

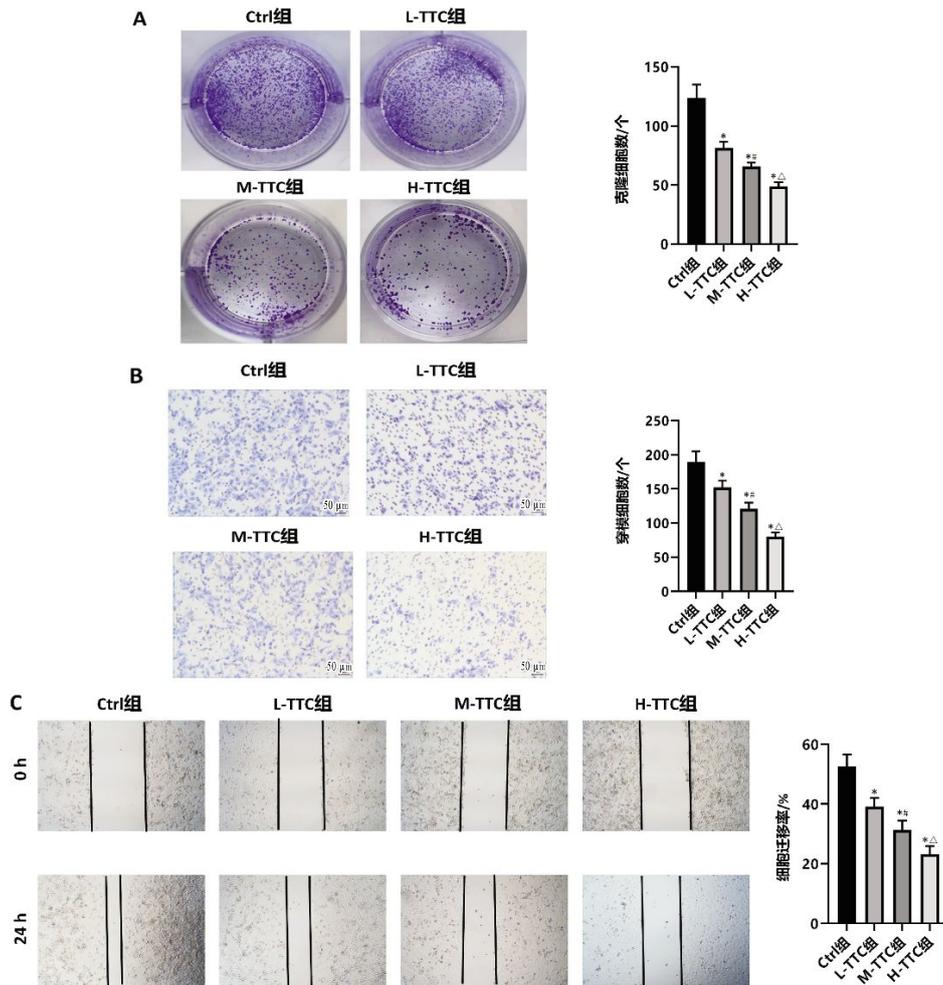


图 1 TTC 对 KYSE410 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.1 Effects of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* on proliferation, migration and invasion of KYSE410 cells
注:A.平板克隆实验;B.Transwell 实验(标尺:50 μm);C.细胞划痕实验。与 Ctrl 组相比,* $P<0.05$;与 L-TTC 组相比,# $P<0.05$;与 M-TTC 组相比,△ $P<0.05$ 。

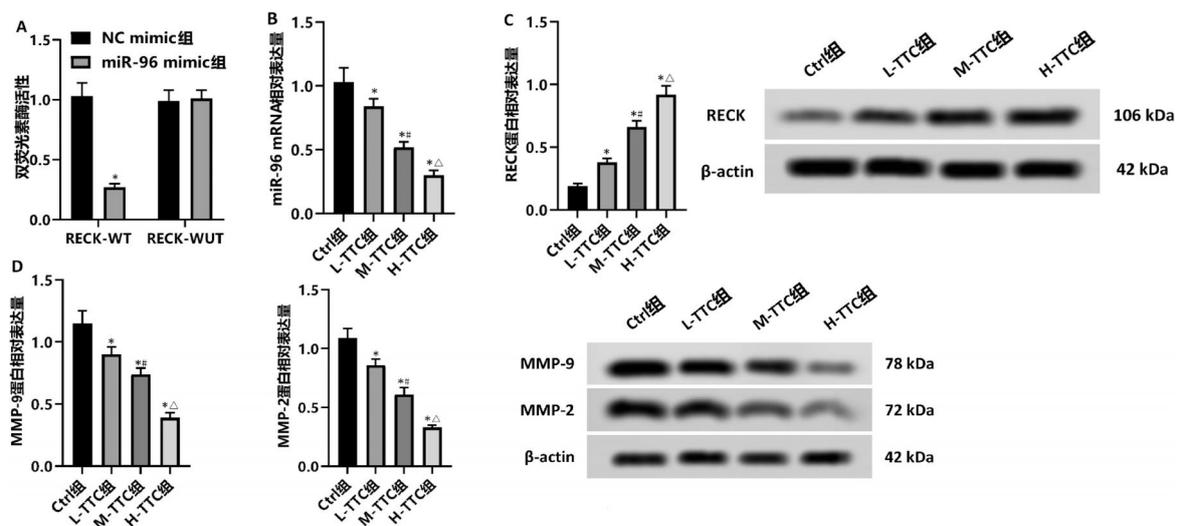


图 2 TTC 对 KYSE410 细胞 miR-96/RECK 信号通路和 MMPs 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* on miR-96/RECK signaling pathway and MMPs protein expression in KYSE410 cells

注:A.双荧光素酶实验;B.miR-96mRNA 相对表达量;C.RECK 蛋白相对表达量;D.MMPs 蛋白相对表达量。与 miR-96 mimic 组相比,* $P<0.05$;与 Ctrl 组相比,# $P<0.05$;与 L-TTC 组相比,# $P<0.05$;与 M-TTC 组相比,△ $P<0.05$ 。

2.4 各组 miR-96 过表达 KYSE410 细胞增殖、迁移和侵袭的情况

与 miR-96 NC 组相比,miR-96 NC+TTC 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率显著降低($P<0.05$),RECK 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。与 miR-96 NC 组相比,miR-96 mimic 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率显著增加($P<0.05$),RECK

蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与 miR-96 NC+TTC 组相比,miR-96 mimic+TTC 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率显著增加($P<0.05$),RECK 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与 miR-96 mimic 组相比,miR-96 mimic+TTC 组的 miR-96 mRNA 表达水平、细胞克隆数、穿膜细胞数和细胞迁移率显著降低($P<0.05$),RECK 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。详见图 3。

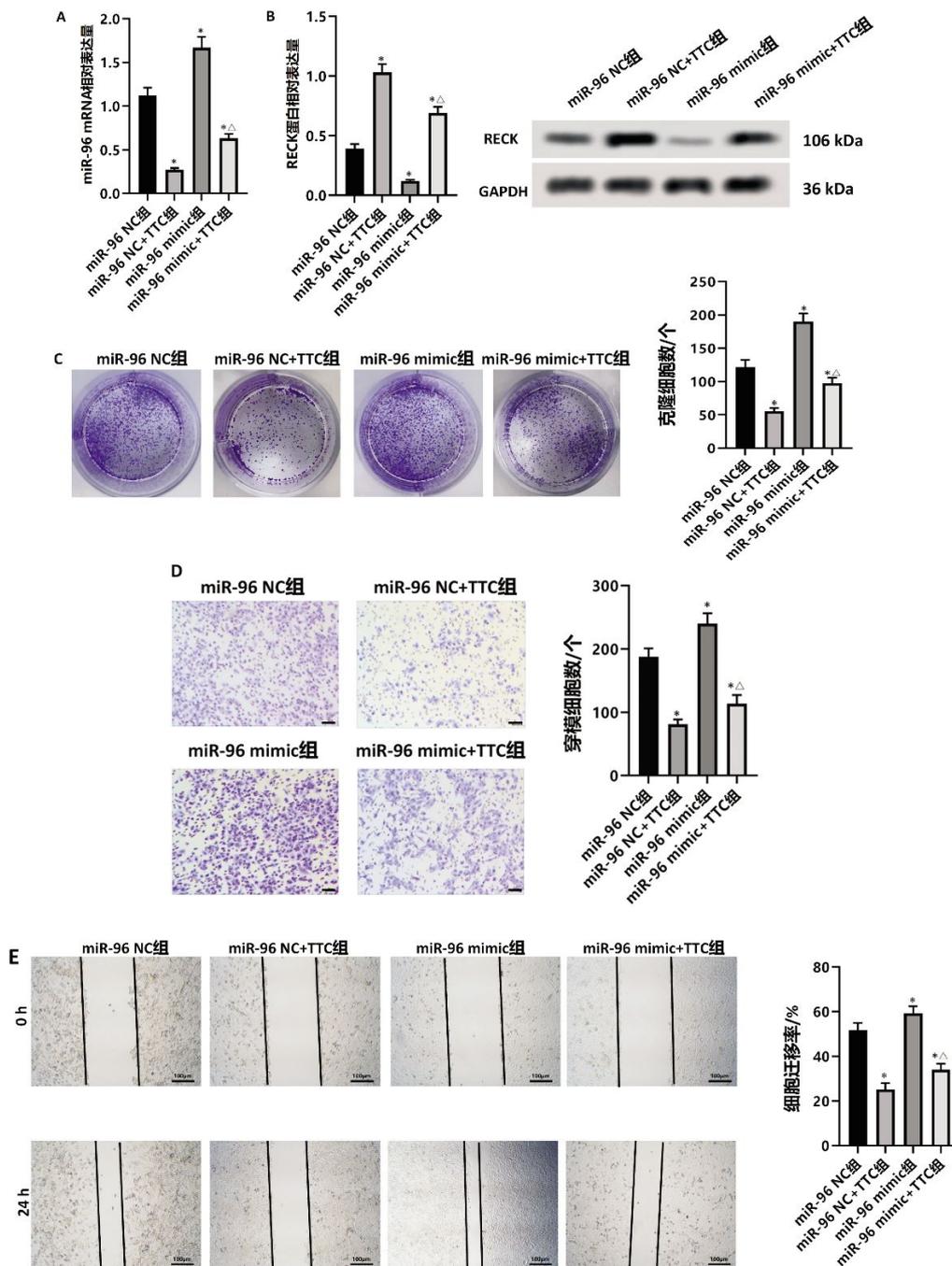


图 3 TTC 对 miR-96 过表达 KYSE410 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.3 Effects of total terpenoids from *Celastrus orbiculatus* on proliferation, migration and invasion of KYSE410 cells
注:A.miR-96 mRNA 相对表达量;B.RECK 蛋白相对表达量;C.平板克隆实验;D.Transwell 实验(标尺:50 μm);E.细胞划痕实验。与 miR-96 NC 组相比,* $P<0.05$;与 miR-96 NC+TTC 组相比,# $P<0.05$;与 miR-96 mimic 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

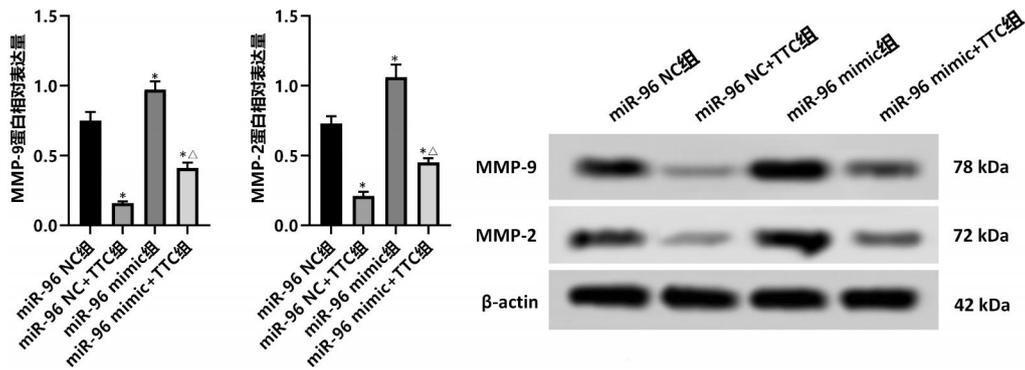


图4 TTC对miR-96过表达KYSE410细胞MMPs蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of total triterpenoids from *Celastrus orbiculatus* on the expression of MMPs protein in miR-96 overexpressed KYSE410 cells

注:与miR-96 NC组相比,* $P<0.05$;与miR-96 NC+TTC组相比,* $P<0.05$;与miR-96 mimic组相比,[△] $P<0.05$ 。

2.5 各组 miR-96 过表达 KYSE410 细胞MMPs 蛋白表达的情况

与miR-96 NC组相比,miR-96 NC+TTC组的MMP-9和MMP-2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与miR-96 NC组相比,miR-96 mimic组的MMP-9和MMP-2蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。与miR-96 NC+TTC组相比,miR-96 mimic+TTC组的MMP-9和MMP-2蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。与miR-96 mimic组相比,miR-96 mimic+TTC组的MMP-9和MMP-2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。详见图4。

3 讨论

目前,食管癌的主要治疗手段包括手术切除、化疗、放疗和分子靶向治疗^[11]。化疗主要包括顺铂、氟尿嘧啶和紫杉醇,在ESCC的治疗中发挥着重要作用,尤其针对于无法手术的晚期患者^[12]。然而,这些药物存在非选择性毒性、毒副作用显著及患者依从性差等问题^[13]。随着免疫疗法的发展,曲妥珠单抗、拉穆单抗、派姆单抗虽已获批用于治疗食管癌,但常与化疗联用才能达到理想疗效,且成本高昂,适用患者有限^[14]。因此,探索一种新的ESCC化学预防药物势在必行。中药作为一种很有前景的抗肿瘤疗法,可以通过促进癌细胞凋亡、抑制癌细胞转移等方式发挥抗肿瘤作用。研究表明,中药对ESCC有良好的治疗作用^[15-16]。而南蛇藤作为传统中草药,具有消肿止痛、祛风活血及解毒等多重功效,应用广泛。其乙酸乙酯提取物TTC是抗癌作用的主要物质基础,已在

胃癌、胶质母细胞瘤及肺癌等多种肿瘤细胞增殖、侵袭与迁移抑制方面展现显著效果^[17-18]。在ESCC的治疗,研究发现,南蛇藤的提取物能够联合miR-302通过PI3K/Akt信号通路调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移^[6]。另一项研究也表明,TTC通过下调环氧化酶-2(COX-2)相关通路,诱导人食管癌细胞Eca-109凋亡,抑制其侵袭转移^[10]。本研究进一步发现,TTC在抑制ESCC细胞生长中起关键作用,能抑制锚定非依赖性生长。细胞运动是肿瘤细胞转移的必要条件。癌细胞首先要有移动的能力才能转移,这意味着癌细胞的移动是癌细胞攻击周围组织的先决条件。通过划痕愈合实验、Transwell实验等功能实验发现,TTC对ESCC细胞的迁移和侵袭表现出高度的抑制活性。进一步证实,TTC具有良好的抗肿瘤活性,能够显著抑制ESCC细胞的恶性行为。

miRNAs被广泛报道参与肿瘤的发病机制,涵盖增殖、转移和凋亡等过程。在ESCC中,多种miRNA已被确认为肿瘤促进因子,例如miR-503^[19]、miR-301a-3p^[20]和miR-623^[21]。作为miR-183家族的一员,miR-96已被证明可通过抑制基因表达调节多种恶性肿瘤的转移和增殖^[22]。研究表明,miR-96可通过竞争内源性RNA网络影响EGFR信号通路,诱导非小细胞肺癌细胞转移^[23];也能够靶向调控叉头盒转录因子O1(FOXO1),抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移及侵袭,并促其凋亡^[24]。RECK作为一种肿瘤相关基因,在调节癌细胞增殖和迁移中起重要作用。先前研究证实,RECK在正常组织中广泛表达,但在ESCC组织中显著降低,且该基因的启动子高甲基

化与 ESCC 的低表达和低生存率相关^[25]。RECK 表达的恢复可减少癌细胞侵袭^[26]。据报道,miR-96 能通过靶向 RECK 的 3'UTR,抑制 RECK 的表达,从而促进食管癌、非小细胞肺癌等癌细胞的侵袭和转移^[9,27]。本研究结果显示,TTC 能显著降低 ESCC 细胞中 miR-96 的表达量,并上调 ESCC 细胞的 RECK 的表达水平。提示 TTC 可能通过调控 miR-96/RECK 信号通路,抑制 ESCC 细胞的增殖和侵袭。MMPs 是细胞外基质降解的重要因子,一直被认为是肿瘤转移的重要因素。其中,MMP-9 和 MMP-2 作为 MMPs 家族的核心成员,能够通过降解基底膜和细胞外基质,从而推动恶性肿瘤细胞向其他器官或组织的侵袭和转移^[28]。先前研究表明,南蛇藤提取物能下调结肠癌细胞中 MMP-9 和 MMP-2 的表达水平,进而影响其恶性生物学行为^[29]。本研究同样发现,TTC 能显著抑制 ESCC 细胞中 MMP-9 和 MMP-2 的蛋白表达。据报道,肿瘤细胞中 RECK 表达水平的恢复主要通过降低 MMPs(尤其是 MMP-2 和 MMP-9)的表达抑制迁移和侵袭活性^[30]。基于上述研究,推测 TTC 或可通过调控 miR-96/RECK 信号通路,降低 MMPs 的表达,从而抑制 ESCC 细胞的转移能力。为深入验证这一机制,本研究在 ESCC 细胞中转染了 miR-96 模拟物(miR-96 mimic)及其阴性对照。实验结果显示,TTC 能够显著逆转 miR-96 mimic 对 ESCC 细胞增殖、迁移及侵袭的促进作用,并减少 MMP-9 和 MMP-2 的表达。这一发现进一步证实了本研究的假设,即 TTC 通过抑制 miR-26/RECK 通路,进而抑制 MMPs 的表达,从而发挥对 ESCC 细胞增殖和侵袭的抑制作用。

综上所述,TTC 通过调控 miR-96/RECK 信号通路,有效下调了 MMP-9 和 MMP-2 的表达,进而抑制了 ESCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。本研究为开发新型抗 ESCC 药物提供了新思路。然而,TTC 是否通过调节其他 miRNA 或信号通路发挥抗 ESCC 作用,仍有待进一步探究。

参考文献

[1] THRIFT A P. Global burden and epidemiology of Barrett oesophagus and oesophageal cancer[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(6): 432-443.

[2] YAO L H, WU P, YAO F Y, et al. ZCCHC4 regulates esophageal cancer progression and cisplatin resistance through ROS/c-myc axis[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 5149.

[3] MA R J, MA C, HU K, et al. Molecular mechanism, regulation, and therapeutic targeting of the STAT3 signaling pathway in esophageal cancer (Review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2022, 61(3): 105.

[4] CAO Y Y, YU J, LIU T T, et al. Plumbagin inhibits the proliferation and survival of esophageal cancer cells by blocking STAT3-PLK1-AKT signaling [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 17.

[5] 毛佛有. 南蛇藤的价值及应用[J]. *林业科技情报*, 2022, 54(4): 114-117.

[6] 于耀洋, 赵佳, 李向楠. 南蛇藤提取物联合 miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的研究[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2371-2376.

[7] 金凤, 刘延庆, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物对人食管鳞癌 TE-8 细胞凋亡的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3474-3477.

[8] LIN J, LIU Z W, LIAO S S, et al. Elevation of long non-coding RNA GAS5 and knockdown of microRNA-21 up-regulate RECK expression to enhance esophageal squamous cell carcinoma cell radio-sensitivity after radiotherapy [J]. *Genomics*, 2020, 112(3): 2173-2185.

[9] XIA H F, CHEN S M, CHEN K, et al. miR-96 promotes proliferation and chemo-or radioresistance by down-regulating RECK in esophageal cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2014, 68(8): 951-958.

[10] 杨庆伟, 梁海鹏, 陈小鹏, 等. 南蛇藤总萜对人食道癌 Eca-109 细胞增殖和侵袭转移的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2020, 43(1): 27-29.

[11] YANG H O, LI X W, YANG W H. Advances in targeted therapy and immunotherapy for esophageal cancer[J]. *Chinese Medical Journal*, 2023, 136(16): 1910-1922.

[12] IKEDA G, YAMAMOTO S, KATO K. The safety of current treatment options for advanced esophageal cancer after first-line chemotherapy[J]. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2022, 21(1): 55-65.

[13] CHEN J H, GUO Q F, LIU Q G, et al. Chaetoglobosin E inhibits tumor growth and promotes the anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs in esophageal squamous cell carcinoma by targeting PLK1[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(22): 1236.

[14] LU Y, XU M L, GUAN L L, et al. PD-1 inhibitor plus chemotherapy versus chemotherapy as first-line treatment for advanced esophageal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2022, 45(5): 243-253.

- [15] 王敏丹, 刘莉, 崔夏莲, 等. 冬凌草甲素对食管鳞状细胞癌细胞内谷胱甘肽代谢网络影响的研究[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(7): 77-82, 94.
- [16] 李冰, 郭占领, 周平, 等. 葛根素通过调控 PI3K/AKT 信号通路影响食管鳞状细胞癌体内外生长和转移[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 109-114.
- [17] FENG X Y, YIN Z X, OU S Y, et al. The anti-tumor effects of *Celastrus orbiculatus* Thunb. and its monomer composition: A review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 310: 116363.
- [18] JANG H J, KIM K H, PARK E J, et al. Anti-inflammatory activity of diterpenoids from *Celastrus orbiculatus* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Journal of Immunology Research*, 2020, 2020: 7207354.
- [19] 巩彤阳, 陈洪岩, 刘芝华. miR503 宿主基因通过调控 hsa-miR-503 信号通路促进食管鳞癌细胞增殖侵袭和迁移[J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44(11): 1160-1167.
- [20] 寿雨薇. 食管鳞癌源性外泌体中 miR-301a-3p 通过诱导巨噬细胞向 M2 型极化促进血管生成的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.
- [21] 费松, 吴伟东, 李丹, 等. miR-623 靶向 MMP1 调控食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(14): 2511-2517.
- [22] WAN L, CHENG Z X, SUN Q C, et al. LncRNA HOXC-AS3 increases non-small cell lung cancer cell migration and invasion by sponging premature miR-96[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2022, 16(5): 587-593.
- [23] DING H, CHU M Q, YUE J J, et al. miR-96 induced non-small-cell lung cancer progression through competing endogenous RNA network and affecting EGFR signaling pathway[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2019, 22(8): 908-914.
- [24] 李峰, 刘卓, 仇红平. miR-96 在子宫内膜癌中表达的变化及其对癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(3): 275-282.
- [25] ZHU J, LING Y, XU Y, et al. Promoter hypermethylation of the RECK gene is associated with its low expression and poor survival of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(3): 1911-1918.
- [26] MASUDA T, FUKUDA A, YAMAKAWA G, et al. Pancreatic RECK inactivation promotes cancer formation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2023, 133(18): e161847.
- [27] GUO H Z, LI Q P, LI W H, et al. miR-96 downregulates RECK to promote growth and motility of non-small cell lung cancer cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014, 390(1/2): 155-160.
- [28] CHEN L, BI S N, WEI Q R, et al. Ivermectin suppresses tumour growth and metastasis through degradation of PAK1 in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(9): 5387-5401.
- [29] 王威, 邓瑞, 周培华. 南蛇藤提取物通过调控微小 RNA-378 对结肠癌细胞生物学行为的影响[J]. 河北中医, 2024, 46(12): 2017-2023.
- [30] TENG M Y, HU C Y, YANG B M, et al. Salvianolic acid B targets mortalin and inhibits the migration and invasion of hepatocellular carcinoma via the RECK/STAT3 pathway[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1): 654.

(本文编辑 苏维)