

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.006

· 基础研究 ·

miR-7-5p 调控 FOXM1 对食管鳞状细胞癌 KYSE-150 细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响

程璐¹, 陆小群¹, 孙艳¹, 梅舟¹, 王佳露¹, 孙杰² (1. 苏州大学附属常州老年病医院暨常州市第七人民医院 检验科, 江苏 常州 213000; 2. 苏州大学附属常州老年病医院暨常州市第七人民医院 急诊科, 江苏 常州 213000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-7-5p 调控叉头框转录因子 M1 (FOXM1) 对食管鳞状细胞癌 (ESCC) KYSE-150 细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响。**方法:** 通过双萤光素酶报告基因实验验证 miR-7-5p 与 FOXM1 的靶向结合位点。收集 2022 年 1 月至 2024 年 10 月期间苏州大学附属常州老年病医院收治的 56 例 ESCC 患者的癌组织和癌旁组织标本, 以及患者的基本临床资料。采用 qRT-PCR 法检测 ESCC 组织中 miR-7-5p 和 FOXM1 的表达水平, 分析其表达与临床病理特征的关系。常规培养的 KYSE-150 细胞为 Ctrl 组, 用 Lipofectamine 3000 转染试剂将质粒转染 KYSE-150 细胞, 分为 Mimic NC 组、miR-7-5p mimic 组、miR-7-5p mimic + OE-NC 组和 miR-7-5p mimic + OE-FOXM1 组。EdU 染色和 CCK-8 实验检测 KYSE-150 细胞增殖能力, 流式细胞术检测 KYSE-150 细胞的凋亡和 CD8⁺ T 细胞凋亡情况, WB 法检测 KYSE-150 细胞中 PD-L1、FOXM1、BAX 和 PCNA 蛋白的表达。构建 KYSE-150 细胞裸鼠移植瘤模型, 观察 miR-7-5p 过表达对移植瘤生长和组织中 Ki-67、FOXM1 表达的影响。**结果:** miR-7-5p 可以靶向负调控 FOXM1 ($P < 0.05$)。ESCC 组织中 miR-7-5p 呈低表达, FOXM1 呈高表达 (均 $P < 0.05$), 其表达分别与 TNM 分期、分化程度显著相关联 (均 $P < 0.05$)。miR-7-5p 过表达组 EdU 阳性细胞率、细胞增殖能力、CD8⁺ T 细胞凋亡率, 以及 PD-L1、PCNA、FOXM1 mRNA 和蛋白均显著降低 (均 $P < 0.05$), 细胞凋亡率、miR-7-5p、BAX 水平均显著升高 (均 $P < 0.05$); 同时过表达 FOXM1 则可逆转上述作用 (均 $P < 0.05$)。miR-7-5p 过表达可降低小鼠移植瘤质量和体积, 以及移植瘤组织中 Ki-67、FOXM1 蛋白的表达 (均 $P < 0.05$)。**结论:** miR-7-5p 过表达能够显著抑制 KYSE-150 细胞增殖和免疫逃逸并促进细胞凋亡, 其机制可能是通过靶向负调控 FOXM1 基因实现的。

[关键词] miR-7-5p; 叉头框转录因子 M1; 食管鳞状细胞癌; KYSE-150 细胞; 增殖; 凋亡; 免疫逃逸

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 10-1044-09

Effects of miR-7-5p on the proliferation, apoptosis, and immune escape of esophageal squamous cell carcinoma KYSE-150 cells by regulating FOXM1

CHENG Lu¹, LU Xiaoqun¹, SUN Yan¹, MEI Zhou¹, WANG Jialu¹, SUN Jie² (1. Department of Clinical Laboratory, Changzhou Geriatric Hospital & the Seventh People's Hospital of Changzhou Affiliated to Soochow University, Changzhou 213000, Jiangsu, China; 2. Department of Emergency, Changzhou Geriatric Hospital & the Seventh People's Hospital of Changzhou Affiliated to Soochow University, Changzhou 213000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-7-5p on the proliferation, apoptosis, and immune escape of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) KYSE-150 cells by regulating forkhead box M1 (FOXM1). **Methods:** The targeted binding sites of miR-7-5p and FOXM1 were verified by the dual-luciferase reporter gene assay. The cancer tissues and adjacent paracancerous tissues as well as the basic clinical data of 56 ESCC patients hospitalized at Changzhou Geriatric Disease Hospital affiliated to Soochow University between January 2022 and October 2024 were collected. qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-7-5p and FOXM1 in ESCC tissues, and analyze the relationship between their expressions and clinicopathological characteristics. Normal cultured KYSE-150 cells were selected as the Control group. Plasmids were transfected into KYSE-150 cells using Lipofectamine 3000 transfection reagent, and the cells were assigned into the Mimic-NC group, the miR-7-5p mimic group, the miR-7-5p mimic + OE-NC group, and the miR-7-5p mimic + OE-FOXM1 group. EdU staining and CCK-8 assay were used to detect the proliferation ability of KYSE-150 cells. Flow cytometry was performed to detect the apoptosis of KYSE-150 cells and CD8⁺ T cells. Western blot assay was performed to detect the expression levels of PD-L1, FOXM1, BAX, and PCNA proteins in KYSE-150 cells. A nude mouse transplanted

[基金项目] 江苏省科学技术厅项目 (No. 202203250)

[作者简介] 程璐 (1988—), 女, 硕士生, 主管技师, 主要从事免疫学研究

[通信作者] 陆小群 (扫码获取作者通信方式)



tumor model of KYSE-150 cells was established to observe the effects of miR-7-5p overexpression on the growth of the transplanted tumors and the expressions of Ki-67 and FOXM1 in the tissues. **Results:** miR-7-5p could target and negatively regulate FOXM1 ($P < 0.05$). miR-7-5p expression was low and FOXM1 expression was high in ESCC tissues (both $P < 0.05$). The expressions of miR-7-5p and FOXM1 were significantly correlated with TNM stage and differentiation degree, respectively (all $P < 0.05$). The rates of EdU-positive cells, cell proliferation ability, CD8⁺ T cell apoptosis rate, as well as PD-L1, PCNA, and FOXM1 mRNA and protein in the miR-7-5p overexpression group were significantly reduced (all $P < 0.05$), while the apoptosis rate, miR-7-5p, and BAX increased significantly (all $P < 0.05$). Meanwhile, overexpression of FOXM1 could reverse the above effects (all $P < 0.05$). Overexpression of miR-7-5p decreased the mass and volume of transplanted tumors, and the expressions of Ki-67 and FOXM1 proteins in transplanted tumor tissues (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Overexpression of miR-7-5p can significantly inhibit the proliferation and immune escape of KYSE-150 cells and promote cell apoptosis, which may be achieved by targeted negative regulation of FOXM1.

[Key words] miR-7-5p; forkhead box M1 (FOXM1); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); KYSE-150 cell; proliferation; apoptosis; immune escape

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(10):1044-1052. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.006]

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是一种极具侵袭性的食管恶性肿瘤,是全球第八大常见癌症,亦是重大健康负担。ESCC的发病显示出显著的地理差异,尤其在东亚、中亚和非洲部分地区的发病率特别高^[1]。ESCC的发生是一个多步骤过程,涉及食管上皮的进行性遗传和分子改变,长期接触致癌物,如吸烟和过度饮酒,会引发细胞损伤,导致细胞不受控制的增殖和恶性转化^[2]。尽管早期诊断和多学科癌症治疗水平有了很大的提高,但ESCC患者的长期预后仍不令人满意。近几十年来,随着肿瘤免疫学的深入研究,免疫治疗逐渐受到人们的关注,其通过激活抗肿瘤免疫,重新启动并维持癌症-免疫周期,最终促使肿瘤细胞死亡^[3]。免疫检查点抑制剂作为免疫治疗的代表,已成功用于ESCC的临床治疗。然而,由于原发性或获得性耐药,仅少数ESCC患者对免疫治疗有反应。肿瘤细胞可通过抑制免疫细胞和限制抗原识别等方式逃避免疫系统的攻击,即免疫逃逸^[4]。因此,深入研究ESCC细胞恶性生物学行为和免疫逃逸的相关机制,寻找新的有效治疗靶点,是提高ESCC患者生存率的重要手段。外泌体内的生物分子(如蛋白质和非编码RNA)可在细胞间转移,促进细胞间的通讯,参与肿瘤发生发展及其耐药性形成。微小RNA(miRNA)属于非编码RNA,是外泌体中含量最丰富的关键信号分子,可以介导ESCC细胞的恶性生物学行为和免疫逃逸^[5]。有研究^[6]通过微阵列数据集成分析,鉴定了与ESCC相关差异表达基因和miRNA,结果发现miR-7-5p在ESCC中存在差异表达,且与患者预后密切相关。叉头框转录因子M1(forkhead box M1, FOXM1),在ESCC及多种实体瘤中呈高表达,激活FOXM1导致多种癌症表型,包括但不限于调节细胞增殖、DNA损伤修复、细胞侵袭、血管生成和化疗耐药^[7]。肺癌组织和细胞中FOXM1表达上调,

miR-7-5p表达下调,miR-7-5p靶向负调控FOXM1,上调miR-7-5p抑制FOXM1可以抑制肺癌细胞的恶性生物学行为^[8]。本研究发现miR-7-5p与FOXM1存在结合位点,据此推测miR-7-5p可能靶向FOXM1调控ESCC的进展。本研究探讨miR-7-5p调控FOXM1对ESCC细胞生物学的影响,为ESCC的分子靶向治疗提供潜在的新靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞、动物及主要试剂

收集2022年1月至2024年10月期间在苏州大学附属常州老年病医院围手术期采集的56例ESCC患者的癌组织和邻近癌旁组织标本,以及患者的基本临床资料。这些患者在手术前均未接受化疗或放疗。组织病理学诊断由经验丰富的病理学家证实。样品在液氮中快速冷冻,在-80℃超低温冰箱中保存。本研究已获得本院医学伦理委员会批准(伦理审评号:202112102),标本采集前均告知患者并由患者或其家属签署书面知情同意书。

人ESCC细胞KYSE-150(货号:SHC1180)购自南京赛泓瑞公司。CD8⁺T细胞(货号:PRI-H-00121)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

雄性、4-6周龄BALB/c裸鼠[实验动物合格证号:SCXK(苏)2025-0006]购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,饲养在温度(22±2)℃、湿度(50±10)%、12 h/12 h明暗交替循环条件下。研究方案经过本院动物伦理委员会审核通过(伦理审批号:动20220402)。

miR-7-5p模拟物(mimic)(货号:HY-R02406)购自美国MedChemExpress LLC公司,双萤光素酶报告基因检测试剂盒(货号:KGAF040)购自江苏凯基公司,cDNA合成试剂盒(货号:BN12028)购自北京百瑞极公司,SYBR Green Master Mix(货号:A25742)购自上海朗智生物科技有限公司,Lipofectamine 3000

转染试剂(货号:L3000015)购自上海觅拓公司, EdU-488、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(货号:BES-20231CR、BES-20212CR)购自上海博尔森公司, Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号:kl-v-fitc)购自上海柯雷公司, 兔源 GAPDH(货号:ab181602)、兔源 PD-L1(货号:ab213524)、兔源 PCNA(货号:ab280088)、兔源 FOXM1(货号:ab234077)、兔源 BAX(货号:ab182734)和兔源 Ki-67(货号:ab16667)一抗和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(货号:ab205718)均购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养及分组转染

选取正常培养的 KYSE-150 细胞作为对照(Ctrl)组。KYSE-150 细胞在 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,直至对数生长期。使用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 miR-7-5p mimic 及其阴性对照(Mimic NC)、FOXM1 过表达质粒(OE-FOXM1)及其阴性对照(OE-NC)分别转染至 KYSE-150 细胞中,从而构建以下实验组:miR-7-5p mimic 组、Mimic NC 组、miR-7-5p mimic + OE-NC 组和 miR-7-5p mimic + OE-FOXM1 组。

1.3 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-7-5p 与 FOXM1 的靶向结合位点

使用 Starbase 网站预测 miR-7-5p 与其 FOXM1 的靶向结合位点。将含有 miR-7-5p 与 FOXM1 的 3'-UTR 结合序列的野生型(WT)和突变型(MUT)FOXM1 片段克隆到 pmirGLO 双荧光素酶 miRNA 靶表达载体中,分别命名为 FOXM1-WT、FOXM1-MUT。采用 Lipofectamine 3000 将 FOXM1-WT、FOXM1-MUT 与 Mimic NC、miR-7-5p mimic 分别转染至 KYSE-150 细胞,48 h 后检测细胞中的荧光素酶活性。

1.4 qRT-PCR 法检测 ESCC 组织中 miR-7-5p 和 FOXM1 mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂从 ESCC 组织中提取总 RNA。取 2 µg RNA 与 3 U/µg RNase R 进行反应。随后,使用特定的 cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。采用 qRT-PCR 检测试剂盒进行定量分析。反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 15 s,60 °C 1 min,共进行 40 个循环。实验中,GAPDH 用作 FOXM1 的内源性对照,U6 用作 miR-7-5p 的内源性对照。最终,通过 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列:miR-7-5p 上游引物为 5'-TGCGCTCAGCAAACA TTTATTG-3',下游引物为 5'-CCAGTGCAGGGT CCGAGGTATT-3';U6 上游引物为 5'-AGCGGGAAA TCGTGCCTGACA-3',下游引物为 5'-GTGGACTFG GGAGAGGACTGG-3';FOXM1 上游引物为 5'-ACG

TCCCCAAGCCAGGCTC3-3',下游引物为 5'-CTA CTGTAGCTCAGGAATAA-3';GAPDH 上游引物为 5'-CAAGCTCATTTCCTGGTATGAC-3',下游引物为 5'-CAGTGAGGGTC TCTCTCTTCCT-3'。

1.5 EdU 染色和 CCK-8 实验检测 KYSE-150 细胞的增殖能力

EdU 染色:将转染后的 KYSE-150 细胞接种于 24 孔板中,培养过夜。随后,向培养基中加入 EdU 试剂,在 37 °C 下反应 2 h 后。用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,用 0.5% Triton-X-100 透化细胞膜 20 min。用含 Hoechst 33342 染色液对细胞核进行染色后,使用荧光显微镜捕获并记录图像,以评估细胞增殖情况。

CCK-8 实验:将各组 KYSE-150 细胞以每孔 5 × 10³ 个细胞的密度接种于 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,培养 24 h 后,加入 10 µL CCK-8 试剂,在 37 °C 下反应 2 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的光密度(D)值。

1.6 流式细胞术检测 KYSE-150 细胞的凋亡水平

将各组 KYSE-150 细胞以每孔 1 × 10⁶ 个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 100 µL 结合缓冲液轻柔重悬细胞后,加入 5 µL Annexin V-FITC 和 5 µL PI 染色液,避光条件下静置 15 min。最后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 流式细胞术检测 CD8⁺ T 细胞凋亡率

KYSE-150 细胞(微孔室上室)与 CD8⁺ T 细胞(下室)以 10:1 的 E/T 比例共培养,参照细胞凋亡检测方法用流式细胞仪检测 CD8⁺ T 细胞凋亡率。

1.8 WB 法检测 KYSE-150 细胞中 PD-L1、PCNA、FOXM1 和 BAX 蛋白的表达

采用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解 KYSE-150 细胞并提取总蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度后,取 30 µg 蛋白质经 10%~15% SDS-PAGE 分离,并转移至 PVDF 膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液在室温下反应 1 h 后,将膜与 PD-L1(稀释比例 1:1 000)、PCNA(稀释比例 1:1 000)、FOXM1(稀释比例 1:100)、BAX(稀释比例 1:1 000)和 GAPDH(稀释比例 1:10 000)抗体中 4 °C 下处理过夜。次日,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(稀释比例 1:2 000)室温下处理 2 h,采用增强型 ECL 试剂显色,用 ImageJ 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 KYSE-150 细胞移植瘤模型的构建及观察

将 BALB/c 裸鼠分为 Mimic NC 组和 miR-7-5p mimic 组,每组各 6 只。分别在裸鼠右侧背部肩胛骨下方的皮下注射转染 Mimic NC、miR-7-5p mimic 的 KYSE-150 细胞(1 × 10⁷ 个/200 µL)。饲养 24 d 后处

死小鼠,分离移植瘤,用电子天平称质量,使用游标卡尺测量体积,收集移植瘤组织标本进行免疫组化检测。

1.10 免疫组化法检测裸鼠移植瘤组织中 Ki-67 和 FOXM1 蛋白的表达

裸鼠移植瘤组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、制片,在60℃下加热2h,脱蜡、水合、清洗、抗原回收,用荧光猝灭剂保护5min,水洗10min,用BSA阻断30min,并在稀释比均为1:200的FOXm1和Ki-67抗体中4℃下处理过夜。次日,切片与山羊抗兔二抗(稀释比1:2000)在37℃下处理50min,与DAB作用10min,在光学显微镜下观察并拍照,按照公式“阳性细胞率=(阳性细胞数/总细胞数)×100%”计算阳性细胞率。

1.11 统计学处理

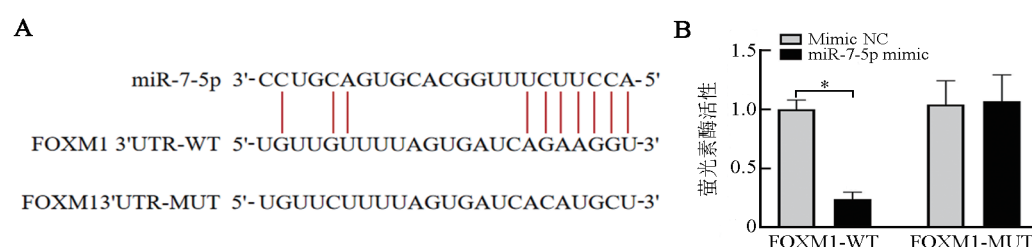
以上主要实验均独立重复6次。采用SPSS 25.0

软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-7-5p能够直接靶向结合FOXm1

通过Starbase网站预测发现,miR-7-5p在FOXm1的3'-UTR存在潜在的结合位点(图1A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图1B)显示,在转染FOXm1-WT的KYSE-150细胞中,miR-7-5p mimic组的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),而在转染FOXm1-WUT的细胞中,荧光素酶活性则未见显著变化($P > 0.05$)。结果表明,miR-7-5p能够直接靶向FOXm1的3'-UTR并抑制其表达。



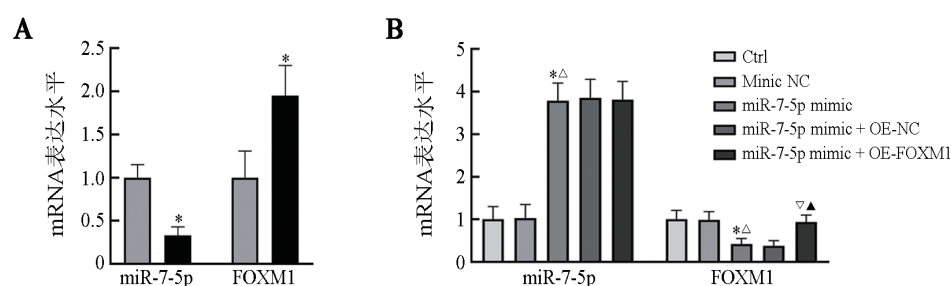
A:miR-7-5p与FOXm1的靶向结合位点;B:双荧光素酶活性比较。* $P < 0.05$ 。

图1 双荧光素酶报告基因实验验证miR-7-5p与FOXm1的靶向结合关系

2.2 ESCC组织中miR-7-5p呈低表达、FOXm1呈高表达

qRT-PCR法检测结果(图2A)显示,与癌旁组织

相比,ESCC组织中miR-7-5p表达水平显著降低($P < 0.05$),而FOXm1 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$)。



A:miR-7-5p、FOXm1在ESCC组织及癌旁组织中的表达比较;B:miR-7-5p、FOXm1在各组KYSE-150细胞中的表达比较。与癌旁组织或Ctrl组比较,* $P < 0.05$;与Mimic NC组比较,Δ $P < 0.05$;与miR-7-5p mimic组比较,▽ $P < 0.05$;与miR-7-5p mimic + OE-NC组比较,▲ $P < 0.05$ 。

图2 qRT-PCR法检测ESCC组织和KYSE-150细胞中miR-7-5p、FOXm1 mRNA的表达

2.3 ESCC组织中miR-7-5p、FOXm1表达与患者TNM分期和分化程度显著关联

分析结果(表1)显示,ESCC组织中miR-7-5p、

FOXm1表达分别与患者TNM分期、分化程度显著相关(均 $P < 0.001$),而与患者年龄、性别和肿瘤位置无关联(均 $P > 0.05$)。

表1 miR-7-5p、FOXM1 mRNA在ESCC组织中的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	miR-7-5p	<i>t</i>	<i>P</i>	FOXM1	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄/岁						1.249	0.217
< 60	25	0.36 ± 0.12	1.071	0.289	1.89 ± 0.34		
≥ 60	31	0.33 ± 0.09			2.00 ± 0.37		
性别						0.877	0.384
男	38	0.31 ± 0.10	1.901	0.063	1.92 ± 0.35		
女	18	0.37 ± 0.12			2.01 ± 0.37		
肿瘤位置						1.630	0.109
食管上段	26	0.32 ± 0.11	0.522	0.604	2.03 ± 0.38		
食管下段	30	0.34 ± 0.11			1.88 ± 0.32		
TNM分期						4.039	0.000
I + II	23	0.42 ± 0.13	5.514	0.000	1.74 ± 0.29		
III + IV	33	0.27 ± 0.08			2.10 ± 0.34		
分化程度						2.322	0.024
高	21	0.39 ± 0.12	3.628	0.001	1.82 ± 0.30		
低 + 中	35	0.29 ± 0.09			2.02 ± 0.32		

2.4 成功构建 miR-7-5p 与 FOXM1 过表达的 KYSE-150 细胞

qRT-PCR法检测结果(图2B)显示,与Ctrl组、Mimic NC组相比,miR-7-5p mimic组KYSE-150细胞中miR-7-5p显著升高,FOXM1表达显著降低(均 $P < 0.05$);与miR-7-5p mimic组、miR-7-5p mimic + OE-NC组相比,miR-7-5p mimic + OE-FOXM1组FOXM1表达显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p能够负调控FOXM1的表达,而过表达FOXM1可逆转miR-7-5p对其的抑制作用。

2.5 miR-7-5p 过表达显著降低KYSE-150细胞的增殖能力

EdU染色、CCK-8实验检测结果(图3)显示,与Ctrl组、Mimic NC组相比,miR-7-5p mimic组EdU阳性细胞率、细胞增殖能力均显著降低(均 $P < 0.05$);与miR-7-5p mimic组、miR-7-5p mimic + OE-NC组相比,miR-7-5p mimic + OE-FOXM1组EdU阳性细胞率、细胞增殖能力均显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p过表达降低KYSE-150细胞的增殖能力,而同时过表达FOXM1则可逆转miR-7-5p对细胞增殖抑制作用。

2.6 miR-7-5p 过表达促进KYSE-150细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图4A、C)显示,与Ctrl组、Mimic NC组相比,miR-7-5p mimic组KYSE-150细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.05$);与miR-7-5p mimic组、miR-7-5p mimic + OE-NC组相比,miR-7-5p mimic + OE-FOXM1组KYSE-150细胞凋亡率显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p过表达促进KYSE-150细胞凋亡,而同时过表达FOXM1则可逆转miR-7-5p对细胞凋亡的促进作用。

2.7 miR-7-5p 过表达对KYSE-150细胞免疫逃逸的影响

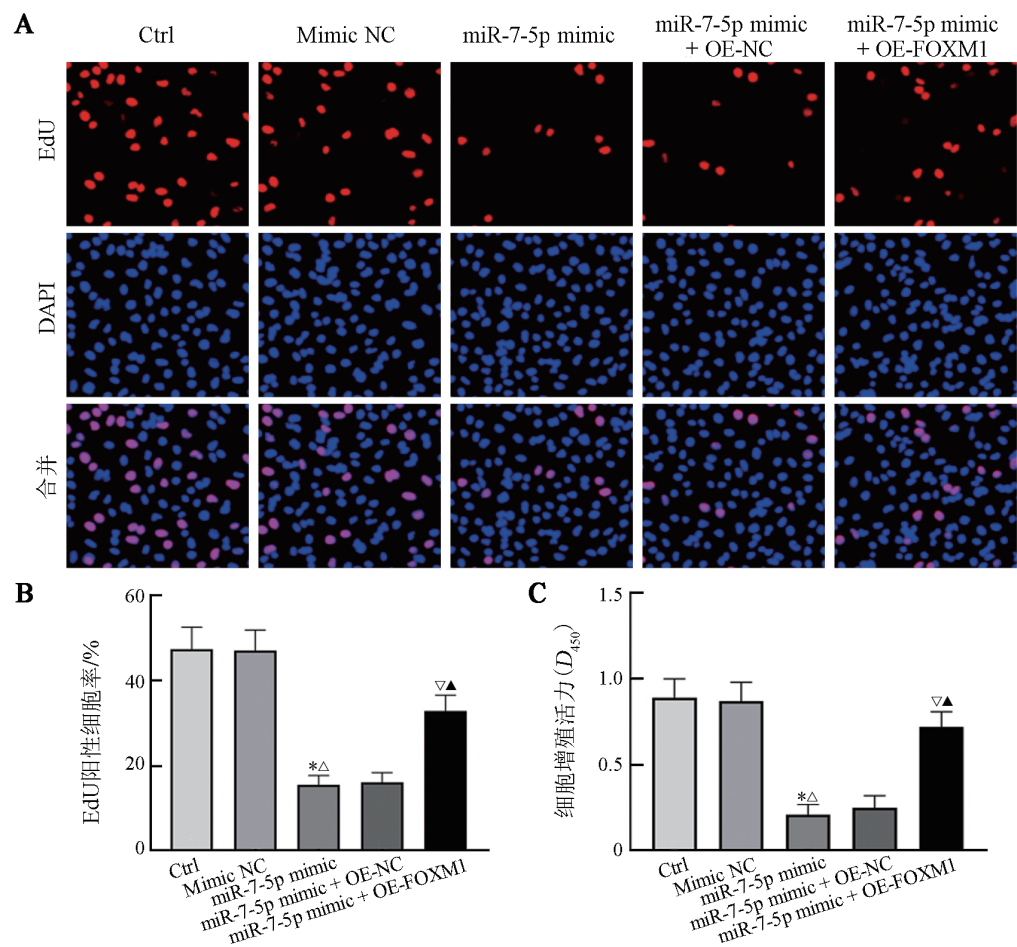
流式细胞术检测结果(图4B、D)显示,与Ctrl组、Mimic NC组相比,miR-7-5p mimic组CD8⁺T细胞凋亡率显著降低(均 $P < 0.05$);与miR-7-5p mimic组、miR-7-5p mimic + OE-NC组相比,miR-7-5p mimic + OE-FOXM1组CD8⁺T细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p过表达降低CD8⁺T细胞凋亡率,而同时过表达FOXM1则可逆转miR-7-5p对CD8⁺T细胞凋亡的抑制作用。

2.8 miR-7-5p 过表达对KYSE-150细胞中PD-L1、FOXM1、BAX和PCNA蛋白表达的影响

WB法检测结果(图5)显示,与Ctrl组、Mimic NC组相比,miR-7-5p mimic组PD-L1、FOXM1、PCNA蛋白表达显著降低,BAX表达显著升高(均 $P < 0.05$);与miR-7-5p mimic组、miR-7-5p mimic + OE-NC组相比,miR-7-5p mimic + OE-FOXM1组PD-L1、FOXM1、PCNA蛋白表达显著升高,BAX蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p能够通过靶向FOXM1来抑制PD-L1、FOXM1和PCNA蛋白的表达并促进BAX蛋白的表达。

2.9 miR-7-5p 过表达对裸鼠移植瘤生长的影响

成功构建KYSE-150细胞移植瘤模型(图6A)。miR-7-5p mimic组裸鼠移植瘤质量和体积均显著低于Mimic NC组(均 $P < 0.05$,图6B、C)。免疫组化染色结果(图6D)显示,miR-7-5p mimic组移植瘤组织中Ki-67、FOXM1蛋白的表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,miR-7-5p在体内能够显著抑制裸鼠移植瘤的生长,其机制可能与降低Ki-67和FOXM1蛋白的表达有关。



A:EdU 染色法检测 KYSE-150 细胞的增殖能力($\times 400$);B:各组 EdU 阳性细胞率比较;C:CCK-8 实验检测 KYSE-150 细胞的增殖能力。与 Ctrl 组比较, * $P < 0.05$;与 Mimic NC 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组比较, $\nabla P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组或 miR-7-5p mimic + OE-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图3 miR-7-5p 过表达对 KYSE-150 细胞增殖的影响

3 讨论

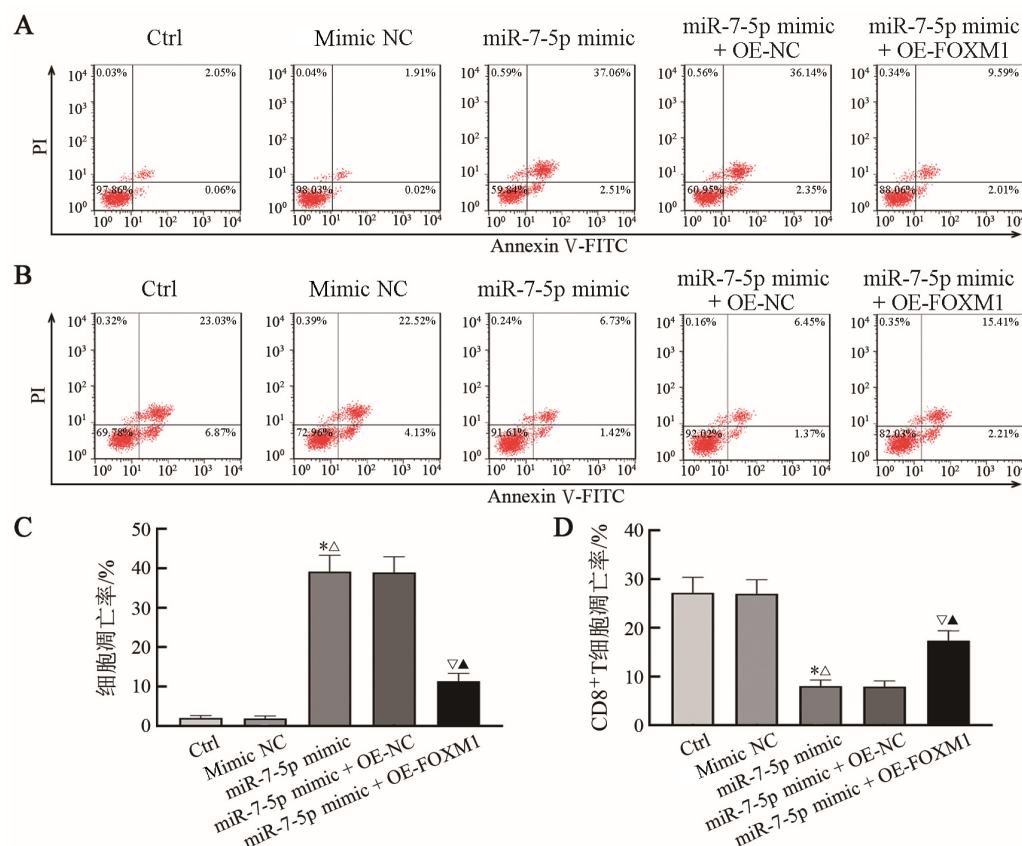
食管癌的发病率和病死率均较高,在中国,ESCC是食管癌中最常见的组织学类型,占有食管癌的95%以上^[9]。由于ESCC患者的早期症状不明显、恶性程度高、预后不良和手术复杂,给治疗带来了重大挑战。ESCC患者5年生存率仍低于20%^[10]。ESCC中的免疫逃逸也涉及免疫检查点途径的利用,ESCC细胞可以上调PD-L1的表达,使其与T细胞上相应的受体结合,导致T细胞衰竭和功能障碍,ESCC细胞还可以重编程其代谢以逃避免疫识别并抵抗免疫介导的细胞毒性,从而使抗肿瘤免疫反应丧失功能^[11]。此外,由于肿瘤的异质性和复杂性,ESCC细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的潜在机制仍不清楚。因此,阐明肿瘤发生与进展的分子机制对于有效控制和管理肿瘤发展至关重要。

miRNA通过调控关键mRNA的翻译调节细胞内过程,参与ESCC增殖、凋亡和转移^[12]。LIANG等^[13]

发现,miR-7-5p在乳腺癌细胞中低表达,miR-7-5p靶向受体酪氨酸激酶基因mRNA,使其表达降低,进而导致下游因子c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)磷酸化水平降低,从而抑制上皮间质转化过程,抑制乳腺癌的迁移和侵袭。WANG等^[14]发现,马鞭草糖苷可以促进miR-7-5p在胶质母细胞瘤细胞中的表达,通过外泌体将miR-7-5p转移到受体细胞中,下调表皮生长因子受体表达,使PI3K/Akt信号通路失活,在体外抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成,在体内降低肿瘤形成和转移。LIU等^[15]发现,非小细胞肺癌患者中miR-7-5p低表达,低水平的miR-7-5p是非小细胞肺癌预后不良的独立危险生物标志物,内源性miR-7-5p或外泌体携带的miR-7-5p联合依维莫司均可通过靶向MNK/eIF4E轴和mTOR增强抗肿瘤效果。SHI等^[16]发现,miR-7-5p在食管癌组织中低表达,且与患者的生存率呈负相关,miR-7-5p直接靶向KLF4,抑制MAPK信号通路,从而抑制食管癌细胞增殖和侵袭。彭慧等^[17]发现,

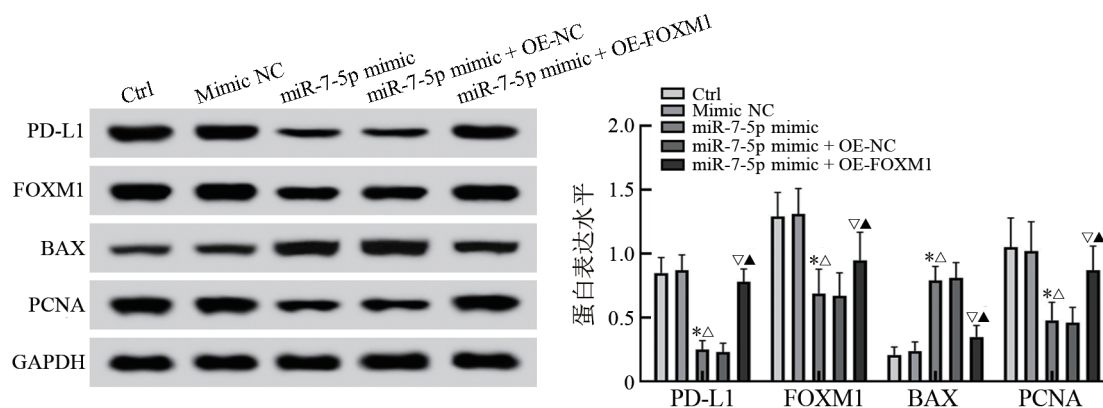
miR-7-5p 通过靶向负调控 KLF4 及其下游 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制食管癌细胞增殖和迁移。本研究发现,miR-7-5p 在 ESCC 组织中呈低表达,与 TNM 分期、分化程度有关联;miR-7-5p 过表达在体外可以抑制 ESCC 细胞增殖和 CD8⁺ T 细胞凋亡,并促

进 ESCC 细胞凋亡,在裸鼠体内可以抑制 ESCC 细胞移植瘤的生长。结果提示,miR-7-5p 可能通过抑制 KYSE-150 细胞的增殖和免疫逃逸并促进凋亡,抑制移植瘤的生长。



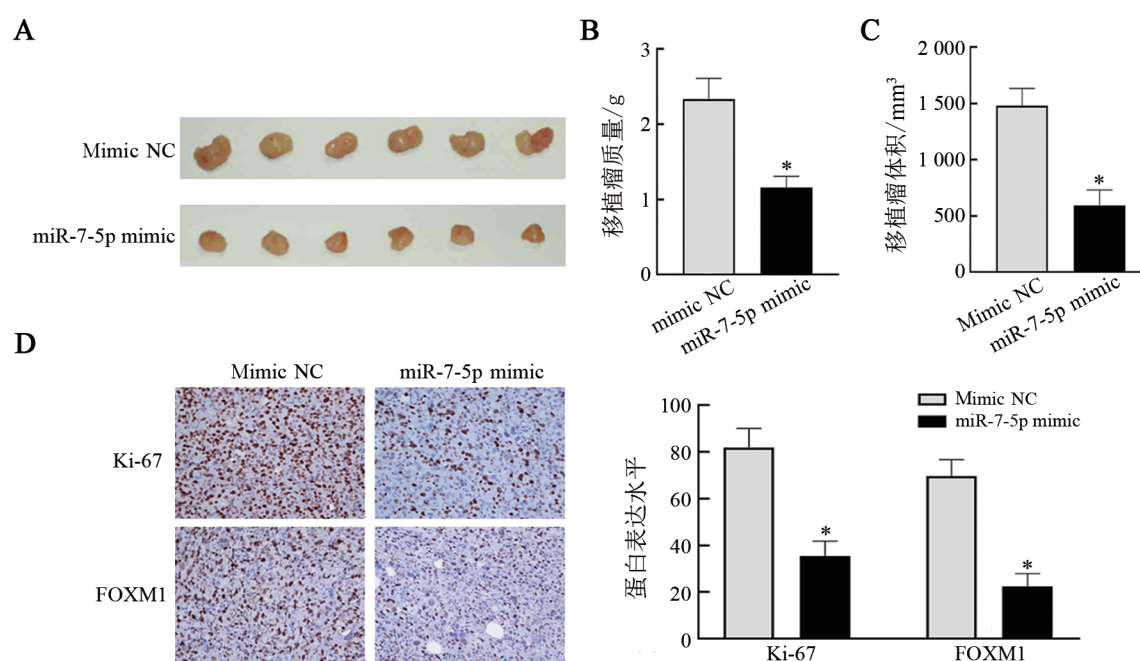
A、C:流式细胞术检测 KYSE-150 细胞的凋亡水平;B、D:流式细胞术检测与 KYSE-150 细胞共培养 CD8⁺ T 细胞的凋亡水平。与 Ctrl 组比较,* $P < 0.05$;与 Mimic NC 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组比较, $\nabla P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组或 miR-7-5p mimic + OE-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 miR-7-5p 过表达对 KYSE-150 细胞及 CD8⁺ T 细胞凋亡的影响



与 Ctrl 组比较,* $P < 0.05$;与 Mimic NC 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组比较, $\nabla P < 0.05$;与 miR-7-5p mimic 组或 miR-7-5p mimic + OE-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 5 WB 法检测 miR-7-5p 过表达对 KYSE-150 细胞中 PD-L1、FOXM1、BAX 和 PCNA 蛋白的表达



A: 剥离的移植瘤标本; B: 移植瘤的质量分析图; C: 移植瘤的体积分析图; D: 免疫组化检测移植瘤组织中 Ki-67、FOXM1 蛋白表达 ($\times 200$)。与 Mimic NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图6 裸鼠移植瘤生长和 Ki-67、FOXM1 蛋白表达比较

FOXM1 是调控动物发育、细胞分化与增殖的核心因子,其异常高表达已在多种肿瘤中被广泛检出,其可通过促进细胞的恶性生物学行为,加速肿瘤进展^[18]。CHEN 等^[19]发现,母体胚胎亮氨酸拉链激酶(maternal embryonic leucine zipper kinase, MELK)通过激活 FOXM1 信号转导促进 ESCC 的发生和转移。ZHU 等^[20]发现,肿瘤外泌体 miR-620 通过靶向 FOXM1/HER2 途径,抑制 ESCC 的有氧糖酵解并促进转移。SU 等^[21]发现, lncRNA GACAT3 通过充当 miR-149 的竞争性内源性 RNA 上调 ESCC 中 FOXM1 的表达,促进 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进 ESCC 小鼠移植瘤的生长。QIN 等^[22]发现, ESCC 组织中 FOXM1 蛋白表达上调,辐照后表达降低; FOXM1 敲低在体外导致辐照后 ESCC 细胞克隆形成显著减少和凋亡增加,诱导 ESCC 细胞在放射敏感的 G2/M 期积累,并阻碍 DNA 损伤修复,在异种移植小鼠模型中,放疗和敲低 FOXM1 联合可发挥协同抗肿瘤作用, FOXM1 是一个有望增强 ESCC 放射敏感性的靶点。本研究发现, FOXM1 在 ESCC 组织中呈高表达,与 TNM 分期、分化程度显著相关联; miR-7-5p 可以靶向负调控 FOXM1, FOXM1 过表达可以逆转 miR-7-5p 过表达的作用,提示 miR-7-5p 可能靶向 FOXM1 抑制 ESCC 细胞的增殖和免疫逃逸,促进凋亡,可作为 ESCC 的潜在治疗靶点。

综上所述,本研究发现 miR-7-5p 过表达能够显著抑制 ESCC 细胞的增殖和免疫逃逸,并促进细胞凋

亡。其潜在机制可能是通过靶向负调控 FOXM1 基因的表达实现的。然而,本研究仅局限于细胞实验水平,且由于临床样本数量有限,尚未深入分析 miR-7-5p 和 FOXM1 表达水平与患者预后的相关性。因此,研究结果仍需在更多的临床样本中进一步验证。未来,将扩大样本量,深入探究 miR-7-5p 和 FOXM1 在 ESCC 中的作用机制及其与临床预后的相关性,为 ESCC 的诊治提供新的靶点与策略。

[参考文献]

- [1] RAHMATI M, MOGHTEADARI H, MOHAMMADI S, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor dynamics in esophageal squamous cell carcinoma: from immune modulation to therapeutic opportunities [J/OL]. *World J Exp Med*, 2024, 14(3): 96269[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39312702/>. DOI: 10.5493/wjem. v14. i3.96269.
- [2] TARAZI M, CHIDAMBARAM S, MARKAR S R. Risk factors of esophageal squamous cell carcinoma beyond alcohol and smoking [J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(5): 1009[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33671026/>. DOI: 10.3390/cancers13051009.
- [3] NIE Y L, YAO G Y, XU X Y, *et al.* Single-cell mapping of N⁶-methyladenosine in esophageal squamous cell carcinoma and exploration of the risk model for immune infiltration[J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1155009[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37025404/>. DOI: 10.3389/fendo. 2023.1155009.
- [4] LI R Y, HUANG B, TIAN H, *et al.* Immune evasion in esophageal squamous cell cancer: from the perspective of tumor microenvironment [J/OL]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1096717[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37025404/>.

- ncbi.nlm.nih.gov/36698392/. DOI: 10.3389/fonc.2022.1096717.
- [5] PENG S, ZHANG S Y, FAN X C, *et al.* Integrative analysis of negatively regulated miRNA-mRNA axes for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2023, 37(3): 191-203. DOI: 10.3233/CBM-220309.
- [6] ZHANG L M, CHEN J H, CHENG T L, *et al.* Identification of differentially expressed genes and miRNAs associated with esophageal squamous cell carcinoma by integrated analysis of microarray data[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1980921[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32714975/>. DOI: 10.1155/2020/1980921.
- [7] CHEN X F, CHEN J B, YU X B, *et al.* FOXM1 promotes malignant proliferation of esophageal squamous cell carcinoma through transcriptional activating CDC6[J/OL]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(7): 671-682. DOI: 10.1089/dna.2022.0169.
- [8] GAO J, DING C Z, ZHOU J H, *et al.* Propofol suppresses lung cancer tumorigenesis by modulating the circ-ERBB2/miR-7-5p/FOXM1 axis[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(6): 824-834. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33506582/>. DOI: 10.1111/1759-7714.13856.
- [9] 楚月明, 朱茂菲, 蒋杭遇, 等. 川楝素经 AKT/mTOR 通路下调 HIF1A 表达抑制食管鳞状细胞癌 KYSE150 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2025, 32(7): 723-730. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.007.
- [10] ZHOU X F, YAN Z Y, HOU J H, *et al.* The Hippo-YAP signaling pathway drives CD24-mediated immune evasion in esophageal squamous cell carcinoma *via* macrophage phagocytosis[J]. *Oncogene*, 2024, 43(7): 495-510. DOI: 10.1038/s41388-023-02923-z.
- [11] [11] SU X Y, DING X, DING C X, *et al.* The role of JMJD2A in immune evasion and malignant behavior of esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 137: 112401[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38878485/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112401.
- [12] WEI Q Y, JIN F, WANG Z Y, *et al.* microRNAs: a novel signature in the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(11): 1497-1523. DOI: 10.3748/wjg.v30.i11.1497.
- [13] LIANG Z Y, LIU L, GAO R X, *et al.* Downregulation of exosomal miR-7-5p promotes breast cancer migration and invasion by targeting RYK and participating in the atypical WNT signalling pathway[J/OL]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 88[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36210461/>. DOI: 10.1186/s11658-022-00393-x.
- [14] WANG H, FENG J G, AO F, *et al.* Tumor-derived exosomal microRNA-7-5p enhanced by verbascoside inhibits biological behaviors of glioblastoma *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 20: 569-582. DOI: 10.1016/j.omto.2020.12.006.
- [15] LIU S L, WANG W Y, NING Y, *et al.* Exosome-mediated miR-7-5p delivery enhances the anticancer effect of Everolimus *via* blocking MNK/eIF4E axis in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 129[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35136028/>. DOI: 10.1038/s41419-022-04565-7.
- [16] SHI W D, SONG J X, GAO Z Y, *et al.* Downregulation of miR-7-5p inhibits the tumorigenesis of esophagus cancer *via* targeting KLF4[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 9443-9453. DOI: 10.2147/OTT.S251508.
- [17] 彭慧, 陈丹, 李东林, 等. miR-7-5p 靶向 KLF4 基因调控食管癌细胞的增殖和迁移能力[J]. *肿瘤*, 2021, 41(4): 238-247. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2021.11.325.
- [18] KIMURA H, SADA R, TAKADA N, *et al.* The Dickkopf1 and FOXM1 positive feedback loop promotes tumor growth in pancreatic and esophageal cancers[J]. *Oncogene*, 2021, 40(26): 4486-4502. DOI: 10.1038/s41388-021-01860-z.
- [19] CHEN L, WEI Q R, BI S N, *et al.* Maternal embryonic leucine zipper kinase promotes tumor growth and metastasis *via* stimulating FOXM1 signaling in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 10[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047721/>. DOI: 10.3389/fonc.2020.00010.
- [20] ZHU Y B, LI F, WAN Y L, *et al.* Cancer-secreted exosomal miR-620 inhibits ESCC aerobic glycolysis *via* FOXM1/HER2 pathway and promotes metastasis[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 756109[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35651785/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.756109.
- [21] SU M, TANG J M, ZHANG B H, *et al.* lncRNA GACAT3 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through regulation of miR-149/FOXM1[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 478[2025-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34496842/>. DOI: 10.1186/s12935-021-02192-4.
- [22] QIN Q, CHEN H, XU H Z, *et al.* FoxM1 knockdown enhanced radiosensitivity of esophageal cancer by inducing apoptosis[J]. *J Cancer*, 2023, 14(3): 454-463. DOI: 10.7150/jca.76671.

[收稿日期] 2025-02-08

[修回日期] 2025-08-31

[本文编辑] 党瑞山