

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.02.0126

论著

# 阿帕替尼调控 miR-129-5p/*PBX3* 轴抑制食管癌细胞恶性生物学行为的研究

贺海发<sup>1a</sup>, 万里新<sup>1b</sup>, 李凯<sup>2</sup>, 李寅<sup>3</sup>, 王媛<sup>1c</sup>, 杜云辉<sup>1b</sup>

(1.南阳市中心医院 a 病理科, b 肿瘤内科, c 消化道肿瘤内科, 南阳 473000; 2.南阳理工学院张仲景国医国药学院, 南阳 473004; 3.南阳医学高等专科学校病理学教研室, 南阳 473004)

**摘要** 目的:探讨阿帕替尼(Apatinib)通过微小RNA(miR)-129-5p调控前B细胞白血病同源盒基因3(*PBX3*)对食管癌细胞恶性生物学行为的影响。方法:CCK-8法和划痕实验检测不同浓度Apatinib处理后KYSE450食管癌细胞的增殖、迁移能力;将KYSE450细胞分为KYSE450组、Apatinib-H组、Apatinib-H+miR-129-5p mimic组、Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-*PBX3*组,qRT-PCR及免疫荧光检测miR-129-5p、*PBX3*表达水平,EdU、Transwell和TUNEL法检测细胞增殖、侵袭和凋亡情况,免疫印迹法检测Janus激酶2(JAK2)/信号转导及转录激活因子3(STAT3)信号通路相关蛋白水平。将293T人胚肾细胞分为293T+mimic NC组、293T+miR-129-5p mimic组,双荧光素酶报告基因实验验证miR-129-5p/*PBX3*的靶向关系。结果:20、40、60 μmol/L的Apatinib均能抑制KYSE450细胞的增殖( $t=4.416, 11.331, 13.121$ , 均 $P<0.01$ )、迁移( $t=2.277, 4.286, 6.722$ , 均 $P<0.05$ );miR-129-5p与*PBX3*存在靶向关系;与KYSE450组相比,Apatinib-H组miR-129-5p mRNA水平升高( $t=6.327, P<0.01$ ),*PBX3* mRNA及蛋白水平降低( $t=6.098, 10.403$ , 均 $P<0.05$ );与Apatinib-H组相比,加入miR-129-5p模拟物可使KYSE450细胞的增殖率、侵袭个数及JAK2/STAT3通路关键蛋白水平降低,凋亡率升高( $t=3.112, 2.428, 4.726, 3.619, 4.258$ , 均 $P<0.05$ ),过表达*PBX3*可逆转上述变化( $t=3.698, 3.199, 4.082, 3.563, 5.840$ , 均 $P<0.01$ )。结论:阿帕替尼可能通过上调miR-129-5p而靶向下调*PBX3*,抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为。

**关键词** 食管癌;阿帕替尼;前B细胞白血病同源盒基因3;Janus激酶2;信号转导及转录激活因子3

中图分类号 R735.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)02-0126-08

## Apatinib inhibits malignant biological behavior of esophageal cancer cells by modulation of miR-129-5p/*PBX3* axis

HE Haifa<sup>1a</sup>, WAN Lixin<sup>1b</sup>, LI Kai<sup>2</sup>, LI Yin<sup>3</sup>, WANG Yuan<sup>1c</sup>, DU Yunhui<sup>1b</sup>

(1. a Department of Pathology, b Department of Oncology, c Department of Gastrointestinal Oncology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China; 2. Zhang Zhongjing Institute of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China; 3. Department of Pathology, Nanyang Medical College, Nanyang 473004, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Apatinib on the malignant biological behavior of esophageal carcinoma cells by regulating the pre-B-cell leukemia homeobox gene 3 (*PBX3*) through microRNA (miR) -129-5p. **Methods:** The CCK-8 assay and scratch assay were used to detect the proliferation and migration ability of KYSE450 esophageal cancer cells after treatment with different concentrations of Apatinib; KYSE450 cells were divided into the KYSE450 group, the Apatinib-H group, the Apatinib-H+miR-129-5p mimic group, the Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-*PBX3* group. The expression levels of miR-129-5p and *PBX3* were detected by qRT-PCR and immunofluorescence. EdU, Transwell and TUNEL methods were used to detect cell proliferation, invasion and apoptosis, and the levels of proteins associated with the Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway were detected by Western blotting. The 293T cells were divided into 293T+mimic NC group and 293T+miR-129-5p mimic group, and Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the miR-129-5p/*PBX3* targeting relationship. **Results:** 20, 40, and 60 μmol/L of Apatinib inhibited the proliferation ( $t=4.416, 11.331, 13.121$ , all  $P<0.01$ ) and migration ( $t=2.277, 4.286, 6.722$ , all  $P<0.05$ ) of the KYSE450 cells; there was a targeting relationship between miR-129-5p and *PBX3*. Compared with the KYSE450 group, miR-129-5p mRNA levels were increased ( $t=6.327, P<0.01$ ), *PBX3* mRNA and protein levels were decreased ( $t=6.098, 10.403$ , both  $P<0.05$ ) in the Apatinib-H group. Compared with Apatinib-H group, the addition of miR-129-5p mimics reduced the proliferation rate, the number of invasion and the level of key proteins of JAK2/STAT3 pathway, and increased the apoptosis rate of KYSE450 cells ( $t=3.112, 2.428, 4.726, 3.619, 4.258$ , all  $P<0.05$ ), and overexpression of *PBX3* reversed the above changes ( $t=3.698, 3.199, 4.082, 3.563, 5.840$ , all  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Apatinib may target down-regulate *PBX3* by up-regulating miR-129-5p, and inhibit the malignant biological

基金项目 河南省科技厅项目(242102310537)

作者简介 贺海发(1983-),男,主治医师,硕士,研究方向:消化道肿瘤的相关研究;通信作者:万里新,E-mail:nanyang1967@163.com。

behavior of tumor cells.

**Key words** esophagus cancer; apatinib; pre-B-cell leukemia homeobox gene 3; Janus kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3

食管癌是多发于食管下段和胃交接部的消化道常见恶性肿瘤之一,患者早期缺少特异性症状,确诊时已为局部晚期或存在远处转移,5年生存率不足15%<sup>[1]</sup>。近年来肿瘤靶向驱动基因为食管癌的治疗策略引入新方向,其中阿帕替尼(Apatinib)作为一种多靶点的酪氨酸激酶抑制剂,可通过抑制血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)的表达,降低肿瘤血管密度,已应用于多种肿瘤如结直肠癌、胃癌等的治疗,但在食管癌中的具体机制尚未完全明确<sup>[2]</sup>。研究表明,食管鳞状细胞癌中微小RNA(microRNA, miR)-129-5p呈低表达,上调其表达可抑制肿瘤细胞的增殖及侵袭<sup>[3]</sup>。TargetsCan 预测显示 miR-129-5p 与前 B 细胞白血病同源盒基因 3(pre-B-cell leukemia homeobox gene 3, PBX3)存在互补的核苷酸位点。PBX3 高表达可诱导上皮间质转化,促进食管癌的转移和侵袭<sup>[4]</sup>。因此,本研究主要探讨阿帕替尼是否通过调节 miR-129-5p/PBX3 的表达来影响食管癌的发生及发展,为其精准治疗提供可行性方案。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** 40只4~6周龄SPF级BALB/c雌性裸鼠(体重16~20g,恒温22~24℃,湿度45%~65%,饮食自由),购自河南省实验动物中心,生产许可证号:SCXK(豫)2022-0001,使用许可证号:SYXK(豫)2020-0008。本研究经南阳市中心医院动物伦理委员会批准(0320241011)。人食管癌细胞KYSE450、人正常食管上皮细胞HEEC及人胚肾293T细胞株均购自上海盈湾生物科技有限公司。甲磺酸阿帕替尼(Apatinib,规格:0.25g,批号:230214KK,国药准字:H20140103)购自江苏恒瑞医药股份有限公司。CCK-8试剂盒、EdU细胞增殖检测试剂盒、TUNEL凋亡检测试剂盒、脂质体转染试剂、Trizol试剂、逆转录试剂、SYBR Green 聚合酶链式反应试剂盒及BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:C0037、C0085S、C1091、C0526、R0016、D7168S、D7260、P0009)均购自上海碧云天生物技术有限公司;miR-129-5p模拟物(miR-129-5p mimics)及其阴性对照(miR NC)、过表达PBX3质粒(oe-PBX3)及野生型/突变型PBX3(WT/MUT-PBX3)荧光素酶报告基因载体均购自上海生工生物工程公司、兔抗Janus激酶2(JAK2)抗体、磷酸化Janus激酶2(p-JAK2)抗

体、信号转导及转录激活因子3(STAT3)抗体、磷酸化信号转导及转录激活因子3(p-STAT3)抗体、PBX3抗体和GAPDH抗体(货号:44-406G、44-426G、PA5-84386、12-9033-42、PA5-102989、39-8600)均购自美国赛默飞世尔科技公司。酶标仪(美国ThermoFisher公司,型号:Multiskan FC),荧光显微镜(德国徕卡公司,型号:Leica DM2500),实时定量聚合酶链式反应仪(美国Applied Biosystems公司,型号:ABI7500)。

## 1.2 方法

**1.2.1 裸鼠移植瘤实验** 取对数期细胞,消化、重悬后制成细胞悬液,将KYSE450单细胞悬液( $4 \times 10^6$ 个/mL)推注于裸鼠背部右侧臀部皮下,每日观察裸鼠饮食及肿瘤生长情况,当出现约5mm皮下硬质结节时表明移植瘤模型构建成功。将40只移植瘤裸鼠分为空白组和8.3、12.4、16.6 mg/kg Apatinib组,每组10只,均于移植瘤模型构建成功后进行药物处理。其中,8.3、12.4、16.6 mg/kg Apatinib组分别按照体重换算裸鼠用药剂量,给予每天8.3、12.4、16.6 mg/kg Apatinib灌胃处理,连续4周,空白组于同时间灌胃等量0.9%生理盐水。所有裸鼠均喂养至第28天时,给予安乐死,并进行解剖、拍照和称重。

**1.2.2 细胞培养、分组与转染** KYSE450、HEEC和293T细胞放置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中,用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基进行培养,当细胞铺满80%培养瓶时进行细胞传代。依次分为:Control组(HEEC正常培养,不做处理);KYSE450组(食管癌细胞KYSE450不做任何处理);Apatinib-L、M、H组(分别给予20、40、60 μmol/L Apatinib处理食管癌细胞KYSE450);mimic NC组(KYSE450细胞转染mimic NC);miR-129-5p mimic组(KYSE450细胞转染miR-129-5p mimic);Apatinib-H+miR-129-5p mimic组(采用60 μmol/L Apatinib处理转染miR-129-5p mimic的食管癌细胞KYSE450);Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-PBX3组:采用60 μmol/L Apatinib处理miR-129-5p mimic和oe-PBX3共转染的食管癌细胞KYSE450);293T+mimic NC组(50 nmol/L的mimic NC处理293T细胞);293T+miR-129-5p mimic组(50 nmol/L的miR-129-5p mimic处理293T细胞)。各组细胞培养24h后收集起来进行

后续实验。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力** 将 KYSE450 细胞接种在 96 孔板中( $1 \times 10^4$ 孔),用 0、20、40、60  $\mu\text{mol/L}$  Apatinib 处理,其中 0 为空白对照组(KYSE450 组),其余浓度为实验组,分别在 24、48 和 72 h 后,每孔均加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂继续培养 2 h,检测各孔细胞在 450 nm 的光密度值,分析细胞增殖能力。

**1.2.4 划痕实验检测细胞迁移能力** 各组细胞接种至 6 孔板中,用 10  $\mu\text{L}$  枪头做划痕实验,后用 PBS 洗去脱落细胞,分别于划痕后的 0、48 h 拍照观察划痕宽度,计算各组细胞的迁移率。

**1.2.5 qRT-PCR 法测定 miR-129-5p、PBX3 mRNA 表达水平** 用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,使用逆转录试剂进行逆转录,使用 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 和荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应,反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,40 个循环扩增反应(94 $^{\circ}\text{C}$  5 s,60 $^{\circ}\text{C}$  20 s)。引物序列如下:miR-129-5p:(上游)5'-CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC-3',(下游)5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3';U6:(上游)5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT-3',(下游)5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAA-3';PBX3:(上游)5'-TACAGAAGGCCAGGAAGTG-3',(下游)5'-AAAGCTGTAGATGGTGGGCT-3';GAPDH:(上游)5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3',(下游)5'-GGATGCAGGGATGATGTTT-3'。以 U6 和 GAPDH 为参照,根据  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  进行相对定量分析。

**1.2.6 免疫荧光法测定 PBX3 蛋白表达水平** 各组细胞用多聚甲醛固定 2 h,弃甲醛,经破膜、染色阻断后,加入 PBX3 一抗(1:200)过夜孵育,避光加入荧光标记的二抗(1:1000)孵育,滴加 DAPI 染液孵育 15 min 后洗涤,滴加抗荧光淬灭剂后封片观察。

**1.2.7 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-129-5p、PBX3 靶向关系** TargetScan 数据库发现 miR-129-5p 与 PBX3 之间存在靶向调控的可能性。构建 PBX3-WT、PBX-MUT 重组质粒,使用双荧光素酶载体对推定的结合位点 WT 及其 MUT 序列进行亚克隆,将 PBX3-MUT、PBX3-WT 载体分别与 miR-129-5p mimic、mimic NC 共转染到 293T 细胞中,48 h 后 PBS 洗涤细胞,使用双荧光素酶报告基因检测系统测定荧光素酶活性。

**1.2.8 EdU 法测定细胞增殖率** 收集各组干预后的细胞,参照 EdU 试剂盒进行操作,检测细胞的增殖率,荧光显微镜拍照,并用 Image J 软件处理图片。

**1.2.9 Transwell 法检测细胞侵袭能力** 各组细胞

接种到含 Transwell 膜的上室中,下室加入含 10% 胎牛血清的培养基,28 h 后,将侵入下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 10 min,再用 0.5% 结晶紫染色 15 min,PBS 冲去多余染料,在显微镜下计数。

**1.2.10 TUNEL 法测定细胞凋亡** 各组细胞接种至 6 孔板中,每孔内加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞,加入 0.1% Triton X-100 溶液透化细胞膜,按照 TUNEL 试剂盒进行避光孵育,孵育结束后染色封片,在荧光显微镜下拍照并记录凋亡率。

**1.2.11 Western 印迹测定 JAK2/STAT3 通路关键蛋白表达水平** 收集各组干预后的细胞,使用裂解液裂解并提取总蛋白,通过 BCA 蛋白法测定其浓度,上样、电泳、转膜和封闭后,将 PVDF 膜先与一抗(1:2000)孵育 24 h 后洗涤,接着与二抗(1:10000)孵育 1 h,通过化学发光成像系统检测特异性条带,分析蛋白的表达情况。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 26.0 软件进行分析。符合正态分布的数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,根据数据类型,采用单因素方差分析或  $t$  检验比较不同组数据, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

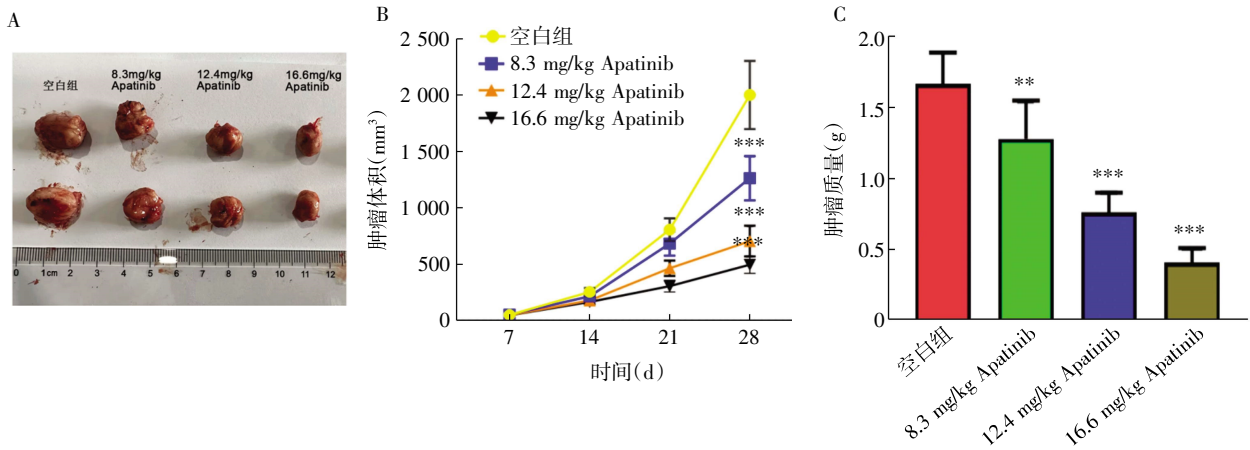
## 2 结果

**2.1 不同浓度阿帕替尼对皮下移植瘤的影响** 皮下移植瘤实验结果显示,第 28 天,与空白组相比,8.3、12.4 和 16.6 mg/kg Apatinib 组肿瘤体积( $t=6.465, 12.340, 15.254$ , 均  $P < 0.001$ )、质量( $t=3.541, 11.035, 16.489$ , 均  $P < 0.01$ )均明显降低;随着时间增加(第 7、14、21、28 天),空白组、8.3、12.4 和 16.6 mg/kg Apatinib 组的肿瘤体积均显著升高( $F=297.7, 230.7, 142.6, 165.4$ , 均  $P < 0.001$ ),见图 1。

**2.2 不同浓度阿帕替尼对 KYSE450 细胞增殖、迁移的影响** CCK8 和细胞划痕结果显示,处理 48 h 后,与 KYSE450 组相比,Apatinib-L、M、H 组的细胞增殖率( $t=4.416, P < 0.01; t=11.331, P < 0.001; t=13.121, P < 0.001$ )、迁移率( $t=2.277, P < 0.05; t=4.286, P < 0.01; t=6.722, P < 0.001$ )均降低,并呈现剂量效应。后续细胞实验均采用 Apatinib-H 组进行(图 2A~C)。

**2.3 食管癌 KYSE450 细胞中 miR-129-5p 低表达、PBX3 高表达** qRT-PCR 结果显示,与 Control 组相比,KYSE450 组 miR-129-5p mRNA 表达水平明显降低( $t=8.184, P < 0.001$ ),PBX3 mRNA 表达水平明显升高( $t=5.888, P < 0.001$ ),见图 3。

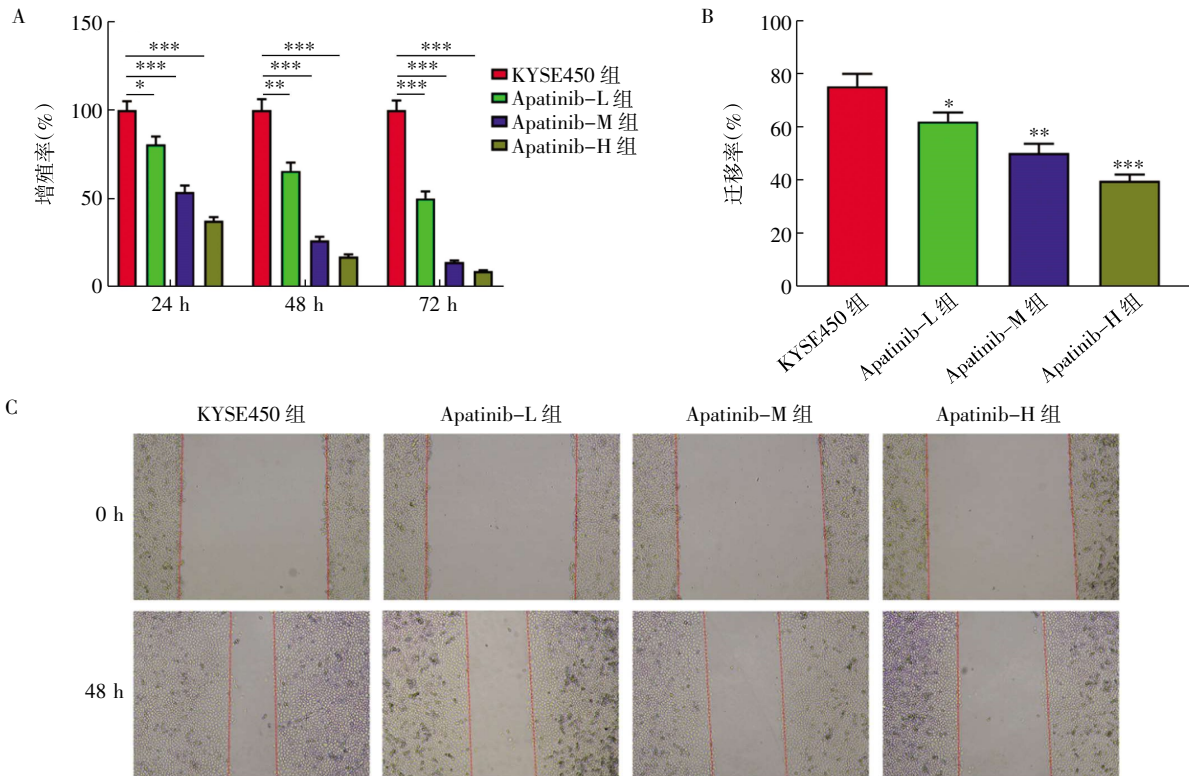
**2.4 miR-129-5p 负调控 PBX3 表达** 经 Targetscan (<https://www.targetscan.org/>)数据库查找显示,miR-129-5p 与 PBX3 二者间存在结合位点(图 4A);双



注: A: 实体瘤示意图; B: 实体瘤生长体积统计; C: 实体瘤质量统计; 与空白组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 1 阿帕替尼对食管癌皮下移植瘤生长影响

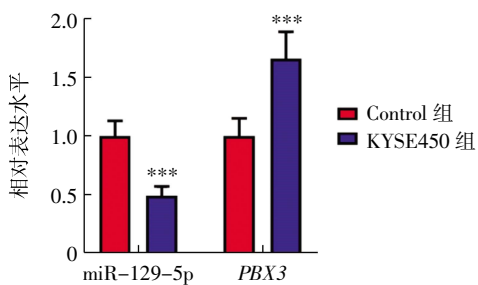
Fig.1 Effect of Apatinib on the growth of subcutaneous transplanted tumor of esophageal carcinoma



注: A: 各组细胞增殖能力比较; B-C: 各组细胞迁移能力比较; 与 KYSE450 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 2 阿帕替尼对 KYSE450 细胞增殖、迁移能力影响

Fig.2 Effects of Apatinib on the proliferation and migration of KYSE450 cells

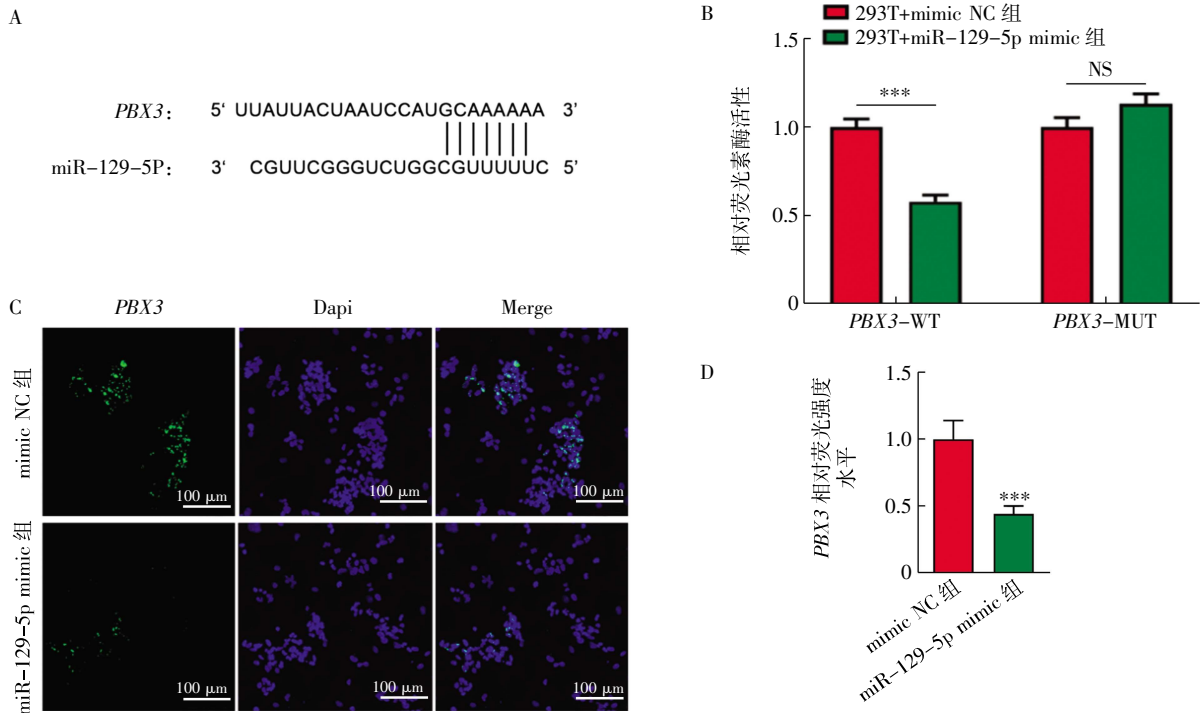


注: 与 Control 组相比, \*\*\* $P < 0.001$

图 3 KYSE450 细胞中 miR-129-5p、PBX3 表达水平

Fig.3 Expression levels of miR-129-5p and PBX3 in KYSE450 cells

荧光素酶报告基因法实验结果显示, 与 293T+mimic NC 组相比, 293T+miR-129-5p mimic 组转染 PBX3-WT 的 293T 细胞荧光素酶活性明显降低( $t=7.239$ ,  $P < 0.05$ ), 且 miR-129-5p mRNA 表达水平升高( $t=9.829$ ,  $P < 0.001$ ), 但转染 PBX3-MUT 质粒的 293T 细胞的荧光素酶活性无显著变化( $P > 0.05$ , 图 4B)。qRT-PCR 和免疫荧光结果显示, 与 mimic NC 组相比, miR-129-5p mimic 组的 PBX3 mRNA 和蛋白的相对表达水平均降低( $t=8.830, 9.006$ , 均  $P < 0.001$ ), 见图 4C~D。



注:A:miR-129-5p 与 *PBX3* 间结合位点预测;B:双荧光素酶验证 miR-129-5p 与 *PBX3* 相互作用;C:免疫荧光检测 *PBX3* 蛋白表达水平, Scale bar=100  $\mu\text{m}$ ,放大倍数 100 $\times$ ;D:*PBX3* 荧光水平量化结果,与 mimic NC 组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;*PBX3*:前 B 细胞白血病同源盒基因 3

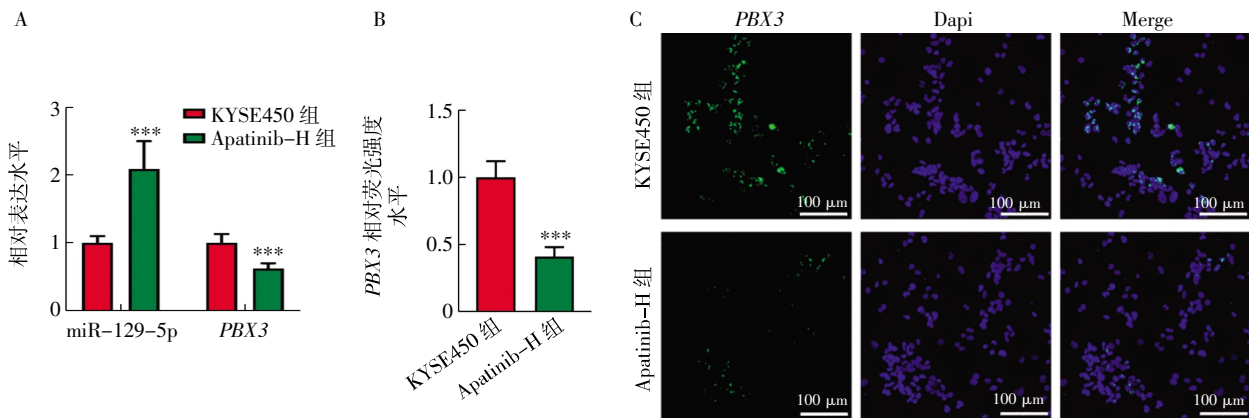
图 4 miR-129-5p 靶基因预测及其调控关系验证

Fig.4 Prediction of miR-129-5p target gene and verification of its regulatory relationship

2.5 阿帕替尼影响 miR-129-5p/*PBX3* 表达水平 qRT-PCR 和免疫荧光结果显示,与 KYSE450 组相比, Apatinib-H 组 miR-197-3p 表达水平明显升高( $t=6.327, P<0.001$ ),而 *PBX3* mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $t=6.098, 10.403$ ,均  $P<0.001$ ),见图 5A~C。

2.6 阿帕替尼通过 miR-129-5p 调控 *PBX3* 对 KYSE450 细胞增殖、侵袭及凋亡的影响 EdU、Transwell 和 TUNEL 结果显示,与 KYSE450 组相比, Apatinib-H 组中细胞增殖率、侵袭个数均显著

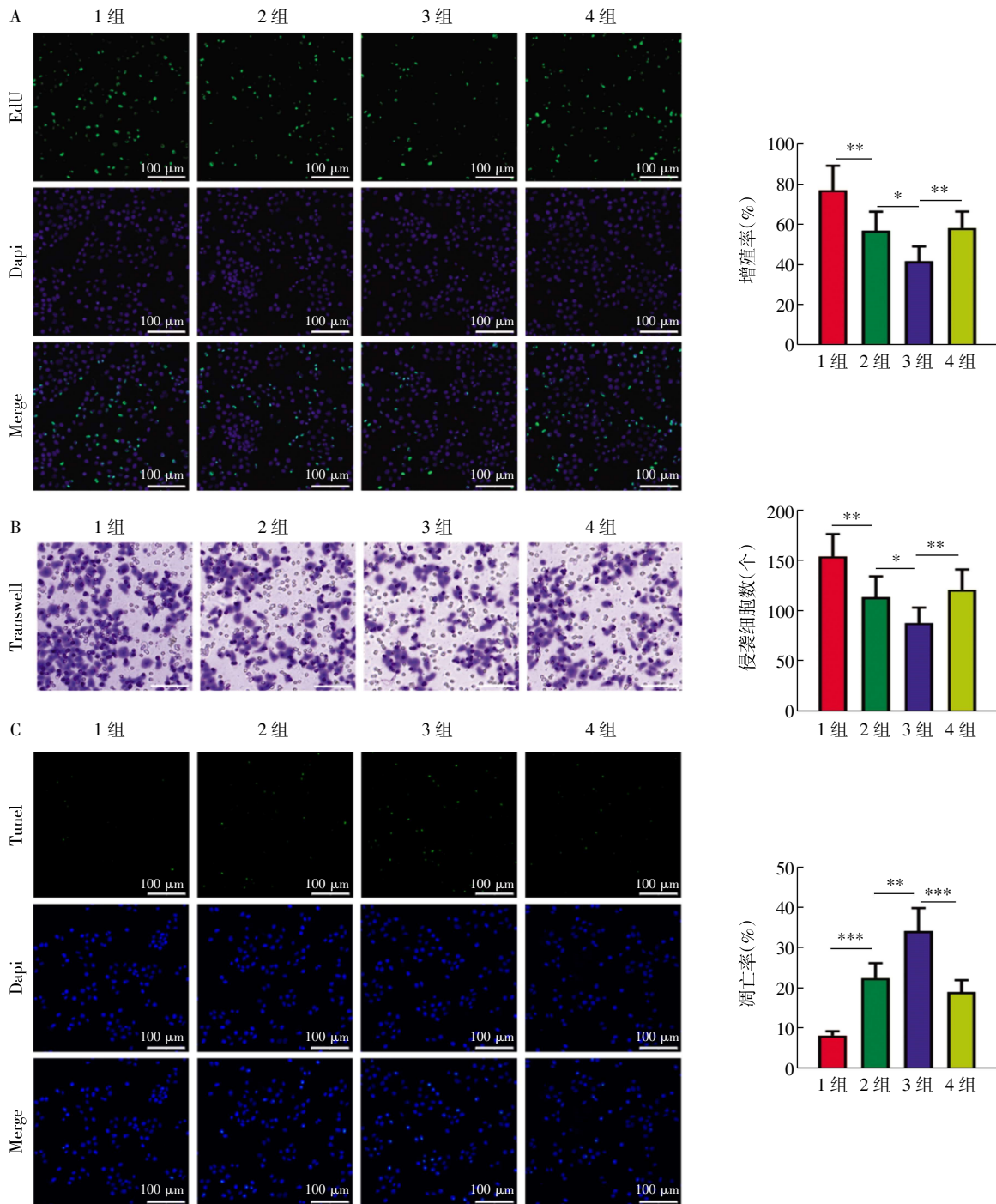
降低( $t=3.216, 3.285$ ,均  $P<0.01$ ),凋亡率显著升高( $t=9.091, P<0.001$ );与 Apatinib-H 组相比, Apatinib-H+miR-129-5p mimic 组细胞增殖率、侵袭个数均再次下降( $t=3.112, 2.428$ ,均  $P<0.05$ ),凋亡率再次升高( $t=4.258, P<0.01$ );与 Apatinib-H+miR-129-5p mimic 组相比, Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-*PBX3* 组中细胞增殖率、侵袭个数均明显升高( $t=3.698, 3.199$ ,均  $P<0.01$ ),凋亡率明显降低( $t=5.840, P<0.001$ ),见图 6A~C。



注:A:各组细胞中 miR-129-5p、*PBX3* 表达水平;B:*PBX3* 相对荧光强度量化结果,与 KYSE450 组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;C:*PBX3* 免疫荧光结果, Scale bar=100  $\mu\text{m}$ ,放大倍数 100 $\times$ ;*PBX3*:前 B 细胞白血病同源盒基因 3

图 5 阿帕替尼对 miR-129-5p、*PBX3* 水平的影响

Fig.5 Effects of Apatinib on levels of miR-129-5p and *PBX3*



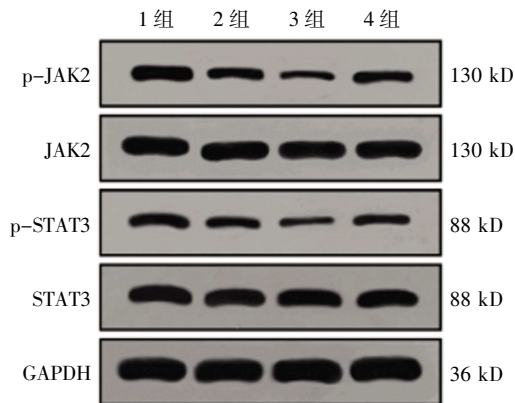
注: A: EdU 实验检测各组细胞增殖率; B: Transwell 实验检测各组细胞侵袭个数; C: TUNEL 实验检测各组细胞凋亡率; Scale bar=100 μm, 放大倍数 100×; 1 组: KYSE450 组; 2 组: Apatinib-H 组; 3 组: Apatinib-H+miR-129-5p mimic 组; 4 组: Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-PBX3 组; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 6 各组细胞增殖、侵袭、凋亡水平比较

Fig.6 Comparison of cell proliferation, invasion and apoptosis in each group

2.7 阿帕替尼通过 miR-129-5p 调控 PBX3 介导 JAK2/STAT3 信号通路 Western 印迹结果显示, 与 KYSE450 组相比, Apatinib-H 组 p-JAK2/JAK2 ( $t=4.625, P<0.001$ ) 和 p-STAT3/STAT3 ( $t=3.649, P<0.01$ ) 水平均明显降低; 与 Apatinib-H 组相比, Apatinib-H+miR-129-5p mimic 组 p-JAK2/JAK2 ( $t=4.082, P<0.01$ ) 和 p-STAT3/STAT3 ( $t=3.563, P<0.01$ ) 水平明显升高 (图 7、表 1)。

( $t=4.726, P<0.001$ ) 和 p-STAT3/STAT3 ( $t=3.619, P<0.01$ ) 水平均显著降低; 与 Apatinib-H+miR-129-5p mimic 组相比, Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-PBX3 组 p-JAK2/JAK2 ( $t=4.082, P<0.01$ ) 和 p-STAT3/STAT3 ( $t=3.563, P<0.01$ ) 水平明显升高 (图 7、表 1)。



注:1组:KYSE450组;2组:Apatinib-H组;3组:Apatinib-H+miR-129-5p mimic组;4组:Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-PBX3组;STAT:信号转导及转录激活蛋白;JAK:Janus 激酶

图7 各组 JAK2/STAT3 信号通路蛋白水平比较

Fig.7 Comparison of JAK2/STAT3 signaling pathway protein levels in each group

表1 各组中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 的比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Tab.1 Comparison of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 in each group( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
KYSE450组	1.00±0.18	1.00±0.20
Apatinib-H组	0.62±0.09 <sup>***</sup>	0.66±0.11 <sup>**</sup>
Apatinib-H+miR-129-5p mimic组	0.40±0.07 <sup>###</sup>	0.45±0.09 <sup>##</sup>
Apatinib-H+miR-129-5p mimic+oe-PBX3组	0.59±0.09 <sup>ΔΔ</sup>	0.68±0.13 <sup>ΔΔ</sup>
<i>F</i>	28.33	16.03
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 KYSE450 组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ;与 Apatinib-H 组相比, ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ ;与 Apatinib-H 组+miR-129-5p mimic 相比, Δ $P<0.01$ ;STAT:信号转导及转录激活蛋白;JAK:Janus 激酶

### 3 讨论

目前认为食管癌的发病与表观遗传改变、信号通路异常、细胞周期失调及促进血管生成等有关,涉及正常食管上皮细胞向癌前病变及最终形成浸润性肿瘤的转化,综合治疗药物如靶向治疗、免疫检查点抑制剂治疗等能提高局部晚期食管癌患者疗效,改善其生存质量<sup>[5-6]</sup>。既往研究发现,阿帕替尼的抑癌机制与其抑制 VEGFR 的激活及其通路的信号转导,阻断肿瘤血管生成,降低肿瘤细胞的增殖、生存和迁移能力有关<sup>[7]</sup>。本研究显示,阿帕替尼可抑制肿瘤生长,并促进食管癌肿瘤细胞凋亡,提示其是具有血管内皮生长因子作用的药物,除与抗肿瘤新生血管机制密切相关外,还存在其他尚未明确的抗肿瘤机制。miRNA 通过降解或抑制靶 mRNA 的

翻译,调节多种最终与致癌有关的细胞过程,从而调节食管癌细胞的侵袭性<sup>[8]</sup>。Yu 等<sup>[9]</sup>研究报道,上调 miR-129-5p 表达可增加胃癌细胞对阿帕替尼的敏感性。推测阿帕替尼可能通过靶向 miRNAs 发挥抗肿瘤活性。研究表明,miR-129-5p 通过抑制 COL1A1 表达而抑制胃癌细胞侵袭和增殖<sup>[10]</sup>。PBX3 表达与喉鳞状细胞癌、胃癌等多种恶性肿瘤的浸润深度和淋巴转移关系密切<sup>[11]</sup>。本研究证实,PBX3 是 miR-129-5p 的靶基因,且阿帕替尼处理后的 KYSE450 细胞中 miR-129-5p 表达量升高、PBX3 表达量降低,猜测阿帕替尼可能通过上调 miR-129-5p 而靶向下调 PBX3 的表达,从而对食管癌细胞发挥抑制作用。

为验证这一猜想,本研究在阿帕替尼干预 KYSE-450 细胞的基础上,同时采用 miR-129-5p 模拟物和过表达 PBX3 质粒处理进行增殖、侵袭能力的比较,发现前者可抑制癌细胞恶性行为,后者则起相反作用,证实了阿帕替尼能通过调控 miR-129-5p/PBX3 轴来抑制癌细胞的增殖、迁移。JAK2/STAT3 通路对免疫应答、细胞增殖和分化等多种生理功能至关重要,其失调可促进肿瘤的进展<sup>[12-13]</sup>。当 VEGFR2 被激活后发生磷酸化反应,促进下游转录因子 STAT3 磷酸化,进而调控多个基因转录,抑制促凋亡基因 caspase-1 表达,最终促进肿瘤进展<sup>[14]</sup>。杨晓丹和刘永叶<sup>[15]</sup>报道,上调细胞通路蛋白 p-JAK2、p-STAT3 的表达,可维持食管鳞癌细胞活力,增强细胞运动性,进而影响食管癌的恶性转化和预后。本研究中 JAK2/STAT3 通路相关蛋白表达与其趋势相符,表明阿帕替尼可能通过靶向 miR-129-5p/PBX3 轴抑制 JAK2/STAT3 通路活化,进而促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述,阿帕替尼可能通过提高 miR-129-5p 表达而降低 PBX3 的表达,抑制食管癌细胞增殖、侵袭,促进细胞凋亡,从而在食管癌中发挥抗肿瘤活性。但阿帕替尼是否可通过调控其他 miRNA/mRNA 而发挥作用尚需进一步研究,此外,本研究仅采用一种食管癌细胞株进行功能验证,后续将在其他食管癌细胞株中验证相关功能和机制。

#### 参考文献:

- [1] 宋颂,雷林,刘涵,等. 中国人群食管癌疾病负担:多数据源证据汇总及分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(15): 887-896.
- [2] 季从飞,苏小琴,倪婷婷,等. 免疫检查点抑制剂联合抗血管生成二线治疗晚期食管癌患者疗效及肿瘤标志物表达、预后生存期的影响[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(22): 4375-4379.
- [3] WANG H, LI H, YU Y, et al. Long non-coding RNA XIST promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma through

- sponging miR-129-5p and upregulating CCND1 expression[J]. Cell Cycle, 2021, 20(1):39-53.
- [4] 林小龙, 温东辉, 张梅燕, 等. PBX3 高表达促进食管鳞状细胞癌的侵袭和迁移(英文)[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(6):699-707.
- [5] 周敏, 张艳霞, 郭楠, 等. 甲磺酸阿帕替尼对裸鼠食管癌的抗肿瘤作用及机制研究[J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(12):1670-1674.
- [6] XIE C, ZHOU X, LIANG C, et al. Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1):266.
- [7] 孔泽. 阿帕替尼对食管鳞癌 ECA-109 细胞及其干性细胞辐射敏感性的影响及机制探讨[D]. 南京医科大学, 2018.
- [8] 刘海忠, 韩玉花, 任灵, 等. miR-129-5p 靶向 KLK7 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和侵袭的影响及分子机制[J]. 解剖科学进展, 2024, 30(2):186-189.
- [9] YU J, ZHANG X, MA Y, et al. MiR-129-5p Restrains apatinib resistance in human gastric cancer cells *via* downregulating HOXC10[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(1):95-105.
- [10] 杨万霞, 潘云燕, 管沛文, 等. miR-129-5p 调控的 COL1A1 作为胃癌潜在治疗靶点的生物信息学分析[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(5):540-546.
- [11] 杨珍珍, 董瑞, 王文超, 等. circRNA ID 在喉鳞状细胞癌中表达及对 miR-543/PBX3 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(13):3292-3298.
- [12] WANG M, SUN X, XIN H, et al. SPP1 promotes radiation resistance through JAK2/STAT3 pathway in esophageal carcinoma[J]. Cancer Med, 2022, 11(23):4526-4543.
- [13] 杨丽娜, 侯亚琼. 光甘草定调节 JAK2/STAT3 信号通路对食管癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的影响[J]. 药物评价研究, 2024, 47(9):2049-2057.
- [14] 封悦. 甲磺酸阿帕替尼调控 JAK2/STAT3 信号通路对食管癌细胞生物学功能的影响及其机制研究[D]. 南京医科大学, 2018.
- [15] 杨晓丹, 刘永叶. SPOCK2 对食管癌 EC109 细胞生物学行为的影响及机制研究[J]. 解剖科学进展, 2023, 29(6):651-654.

(2024-10-13 收稿)

(上接第 104 页)

- teoclastic activities[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(6):504-513.
- [22] BAROI S, CZERNIK P J, CHOUGULE A, et al. PPAR $\gamma$  in osteocytes controls sclerostin expression, bone mass, marrow adiposity and mediates TZD-induced bone loss[J]. Bone, 2021, 147(6):115913.
- [23] SUSVA M, MISSBACH M, GREEN J. Src inhibitors: drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both?[J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(12):489-495.
- [24] MIYAZAKI T, SANJAY A, NEFF L, et al. Src kinase activity is essential for osteoclast function[J]. J Biol Chem, 2004, 279(17):17660-17666.
- [25] WANG Y, YANG C, XIE W L, et al. Puerarin concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) and interleukin-6 production in human osteoblastic MG-63 cells[J]. Phytomedicine, 2014, 21(8-9):1032-1036.
- [26] MAJIDINIA M, SADEGHPOUR A, YOUSEFI B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4):2937-2948.
- [27] LIU X, BRUXVOORT K J, ZYLSTRA C R, et al. Lifelong accumulation of bone in mice lacking pten in osteoblasts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(7):2259-2264.
- [28] CHAI S, YANG Y, WEI L, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by ovx through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-Akt signaling[J]. Phytomedicine, 2024, 128(7):155516.
- [29] LIU G, XIE Y, SU J, et al. The role of EGFR signaling in age-related osteoporosis in mouse cortical bone[J]. FASEB J, 2019, 33(10):11137-11147.

(2024-10-13 收稿)