阿法替尼抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭研究

张瑞桐[1]，李 震[2*]
（1. 河南省南阳市中心医院药剂科，河南南阳 473005；2. 河南省南阳市中心医院静配中心，河南南阳 473005）

摘要：目的 探讨阿法替尼在胰腺癌（pancreatic carcinoma，PC）中的抗肿瘤作用和潜在机制。**方法** 分别用 0.5、1.0、2.0 及 4.0 μmol/L 阿法替尼干预 PC 细胞 Capan-1 细胞 24 h，并将正常培养细胞作为对照组，另取 Capan-1 细胞分别转染母系表达基因（maternally expressed gene，MEG）3 过表达质粒（pcDNA-MEG3）和空载质粒（pcDNA）48 h 后，记为 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组，Capan-1 细胞转染 MEG3 小干扰 RNA（si-MEG3）后用含 4.0 μmol/L 阿法替尼干预 24 h 记为 4.0 μmol/L 阿法替尼＋ si-MEG3 组和 4.0 μmol/L 阿法替尼＋ si- 空白对照（negative control，NC）组。采用流式细胞术检测细胞周期分布情况；Transwell 实验检测细胞迁移侵袭情况；定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）检测细胞 MEG3 表达的情况；采用免疫印记法检测细胞周期蛋白 D1（Cyclin D1）、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）2 和 MMP9 蛋白表达。**结果** 与对照组比较，各剂量阿法替尼组 Capan-1 细胞 Cyclin D1 蛋白表达、S 期细胞比例减少，Capan-1 细胞迁移和侵袭数量、MMP2 和 MMP9 蛋白表达降低，G0/G1 期细胞比例增多，Capan-1 细胞 MEG3 表达水平升高，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。与人胰腺导管上皮细胞比较，Capan-1 细胞中 MEG3 表达水平降低（$P < 0.05$）。与 pcDNA 组比较，pcDNA-MEG3 组 Capan-1 细胞 MEG3 表达、G0/G1 期细胞比例升高，S 期细胞比例、细胞迁移和侵袭数量及 Cyclin D1、MMP2、MMP9 蛋白表达降低，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。与 4.0 μmol/L 阿法替尼＋ si-NC 组比较，4.0 μmol/L 阿法替尼＋ si-MEG3 组 Capan-1 细胞 MEG3 表达、G0/G1 期细胞比例显著降低，S 期细胞比例、细胞迁移和侵袭数量及 Cyclin D1、MMP2、MMP9 蛋白表达显著升高，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 阿法替尼通过上调 MEG3 表达可抑制 PC 细胞 Capan-1 增殖、迁移和侵袭。

关键词： 阿法替尼；胰腺癌；迁移；侵袭；长链非编码 RNA 母系表达基因 3；细胞周期
中图分类号： R735.9 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188（2023）03-0220-09
DOI：10.13683/j.wph.2023.03.005

Study on the inhibitory effects of afatinib on proliferation, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells

ZHANG Ruitong[1], LI Zhen[2*]
（*1. Department of Pharmacy, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473005, Henan Province, China;*
2. Static Distribution Center, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473005, Henan Province, China）

Abstract: ***Objective*** To investigate the anticancer effects and potential mechanism of afatinib in pancreatic carcinoma（PC）. ***Methods*** Capan-1 cells were treated with 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 μmol/L afatinib for 24 h, and normal cultured cells were set as control group. Capan-1 cells were transfected with maternally expressed gene（MEG）3 overexpressed plasmid（pcDNA-MEG3） and empty loaded plasmid（pcDNA） for 48 h, respectively, which were set as pcDNA-MEG3 group and pcDNA group. Capan-1 cells transfected with MEG3 small interfering RNA（si-MEG3） were treated with 4.0 μmol/L afatinib for 24 h as 4.0 μmol/L afatinib＋si-MEG3 group and 4.0 μmol/L afatinib＋negative control（NC） group. Flow cytometry was used to detect cell cycle distribution. Transwell assay was used to detect cell migration and

收稿日期：2022-05-25；**修回日期：**2022-07-19
作者简介：张瑞桐，主管药师，研究方向：肿瘤药物临床试验研究。
通信作者：李震，主任药师，研究方向：创新药临床研究。
基金项目：南阳市科技攻关项目（192102310326）

invasion. Quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction（qRT-PCR） was used to measure the expression of MEG3. The expressions of Cyclin D1, matrix metalloproteinase（MMP）2 and MMP9 were determined by western blotting. ***Results*** Compared with the control group, Cyclin D1 protein expression, S phase cell proportion, migration and invasion number of Capan-1 cells, MMP2 and MMP9 protein expression decreased, G0/G1 phase cell proportion increased, MEG3 expression level of Capan-1 cells increased in afatinib group. The differences were statistically significant（$P<0.05$）. Compared with human pancreatic ductal epithelial cells, MEG3 expression level in Capan-1 cells was decreased（$P<0.05$）. Compared with the pcDNA group, MEG3 expression and the proportion of G0/G1 phase cells in Capan-1 cells in pcDNA-MEG3 group were increased, while the proportion of S phase cells, the number of cell migration and invasion, and the expression of Cyclin D1, MMP2 and MMP9 protein were decreased, with statistical significance（$P<0.05$）. Compared with 4.0 μmol/L Afatinib＋si-NC group, MEG3 expression and G0/G1 phase of Capan-1 cells in 4.0 μmol/L afatinib＋si-MEG3 group were significantly decreased. The proportion of cells in S phase, the number of cell migration and invasion, and the protein expressions of Cyclin D1, MMP2 and MMP9 were significantly increased, with statistical significance（$P<0.05$）. ***Conclusion*** Afatinib can inhibit Capan-1 proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells by up-regulating MEG3 expression.

Key words: afatinib; pancreatic cancer; migration; invasion; long non-coding RNA maternally expressed gene 3; cell cycle

阿法替尼是一种口服靶向药物，对人表皮生长因子受体（human epidermal growth factor receptor，HER）2 和表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）酪氨酸激酶具有强效、不可逆的双重抑制作用。尽管临床和临床前研究表明阿法替尼对非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）、头颈部鳞癌和乳腺癌具有抗肿瘤活性和临床疗效[1—2]，但其与胰腺癌（pancreatic carcinoma，PC）的相关研究较少。长链非编码 RNA（long non-coding RNA，lncRNA）是在转录、转录后和表观遗传水平调控各种细胞过程的功能性非编码 RNA，其与表达改变肿瘤进展相关[3]。据报道，lncRNA 母系表达基因（maternally expressed gene，MEG）3 在血管瘤和甲状腺癌等恶性肿瘤中表达下调，上调其表达可抑制肿瘤细胞恶性生物学行为，在肿瘤进展中起抑制恶性肿瘤功能[4—5]。PC 中 MEG3 低表达与肿瘤大小、转移和血管侵犯呈负相关，并预示 PC 患者预后较差，过表达 MEG3 可抑制 PC 细胞迁移、侵袭和上皮间充质转化，增强其对吉西他滨的敏感性[6—7]。本研究探讨阿法替尼对 PC 细胞周期分布、迁移和侵袭的影响，并以 MEG3 为切入点探讨其潜在抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺导管上皮细胞 hTERT-HPNE、PC 细胞 Capan-1（20180203、20180105）均购自美国 ATCC；阿法替尼（纯度：≥ 98%，20180201，30 mg）购自大连美仑生物公司；Lipofectamine™ 3000（20180106、20171223）购自美国 Invitrogen 公司；MEG3 过表达质粒（pcDNA-MEG3、20180502）、空载质粒（pcDNA、20180506）、MEG3 小干扰 RNA（si-MEG3、20180511）均购自上海吉玛制药公司；Transwell 小室（20171116）购自美国康宁公司；山羊抗兔免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G（ab205718）、细胞周期蛋白 D1（Cyclin D1）兔多克隆抗体（ab226823）、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）2 兔单克隆抗体（ab92536）、MMP9 兔单克隆抗体（ab137867）、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）兔多克隆抗体（ab9485）均购自美国 Abcam 公司；PrimeScript 逆转录试剂盒（20180302）、SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（20180315）均购自大连 Takara 生物公司；基因引物购自上海生工生物工程股份有限公司；StepOnePlus

定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）仪购自美国 ABI；FACS Calibur 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特；ECLIPSE Ts2R 光学显微镜购自日本尼康公司。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养和传代

Capan-1 细胞接种在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中，置于含 5% 二氧化碳、37 ℃恒温培养箱中培养。当细胞生长融合度为 80% 时进行 1 ∶ 3 比例传代，每周换液 2 次。

1.2.2 细胞转染及分组

正常培养的 Capan-1 细胞记为对照组；其余分别用 0.5、1.0、2.0 及 4.0 μmol/L 阿法替尼[8]的培养液孵育 Capan-1 细胞 24 h，依次记为 0.5、1.0、2.0 以及 4.0 μmol/L 阿法替尼组。由于 4.0 μmol/L 阿法替尼干预细胞作用效果最好且存活细胞数量足够进行后续实验，因此选用 4.0 μmol/L 阿法替尼进行后续转染实验。

将第 3 代对数期 Capan-1 细胞以 2×10^5 个 / 孔的密度接种 6 孔板，当细胞 50% 汇合时，使用 Lipofectamine™ 3000 试剂将 pcDNA-MEG3、pcDNA 分别转染 48 h 后，记为 pcDNA-MEG3 组、pcDNA 组；Capan-1 细胞转染寡核苷酸（si-MEG3）和其阴性对照物［si- 空白对照（negative control，NC）］，用含 4.0 μmol/L 阿法替尼的培养液孵育转染 si-MEG3 和转染 si-NC 的 Capan-1 细胞 24 h，记为 4.0 μmol/L 阿法替尼 + si-MEG3 组和 4.0 μmol/L 阿法替尼 + si-NC 组。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期分布情况

磷酸盐缓冲液洗涤每组细胞 2 次，加入 500 μl 70% 乙醇，4 ℃固定细胞 2 h，再向细胞中加入 100 μl 核糖核酸酶，37 ℃孵育 30 min。然后，加入 400 μl 碘化丙啶，4 ℃避光孵育 30 min 后收集细胞，使用流式细胞仪进行检测，CELL Quest 3.0 软件分析 G0/G1 期、S 期及 G2/M 期细胞比例。每组设置 3 个平行，实验独立重复 3 次。

1.2.4 细胞迁移和侵袭检测

将“**1.2.2**”中所有分组细胞重悬浮于 RPMI-1640 培养基中，取 200 μl 细胞悬液（含 3×10^4 个细胞）加入至预先包被基质胶的 Transwell 上腔。在下腔中加入 500 μl 含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。孵育 24 h 后，用无菌棉签小心擦去基质胶，0.4% 多聚甲醛固定 Transwell 膜下表面附着细胞，0.1% 结晶紫染色 15 min。以光学显微镜下随机选择 5 个视野的细胞数均值表示细胞侵袭数。迁移实验过程与此类似，不同的是采用未包被基质胶的 Transwell 小室。每组设置 3 个平行，实验独立重复 3 次。

1.2.5 免疫印迹检测 Cyclin D1、MMP2 和 MMP9 蛋白

采用 RIPA 缓冲液裂解细胞，收集含有蛋白质的上清液。蛋白定量后，将适量的 5 倍上样缓冲液与 4 倍体积的蛋白样品混合在 100 ℃下变性 10 min。取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分离蛋白，随后将蛋白转移至 PVDF 膜上。25 ℃下 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h，随后在 4 ℃下加入 Cyclin D1（1 ∶ 1 500 稀释）、MMP2（1 ∶ 1 500 稀释）和 MMP9（1 ∶ 1 000 稀释）一抗溶液孵育过夜。25 ℃下加入山羊抗兔 IgG 二抗（1 ∶ 2 500）孵育 PVDF 膜 1 h。利用 ECL 发光试剂盒检测蛋白条带。以 GAPDH 作为内参，Image J 软件分析目的蛋白相对灰度值。每组设置 3 个平行，实验独立重复 3 次。

1.2.6 qRT-PCR 检测细胞 MEG3 表达

采用 TRIzol 试剂提取 hTERT-HPNE 细胞以及各组细胞的总 RNA，按照 PrimeScript 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒说明书进行反转录和 qRT-PCR 来检测 MEG3 表达。GAPDH 作为内参，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 MEG3 相对表达量。MEG3 引物序列：上游为 5′-CCTGCTGCCATCTACACCTC-3′，下游为 5′-CCTCTTCATCCTTTGCC ATCCTGG-3′；GAPDH 引物序列：上游为 5′-GACCTGACCTGCCGTCTA-3′，下游为 5′-AGGAGTGGGTGT CGCTGT-3′。每组设置 3 个平行，实验独立重复 3 次。

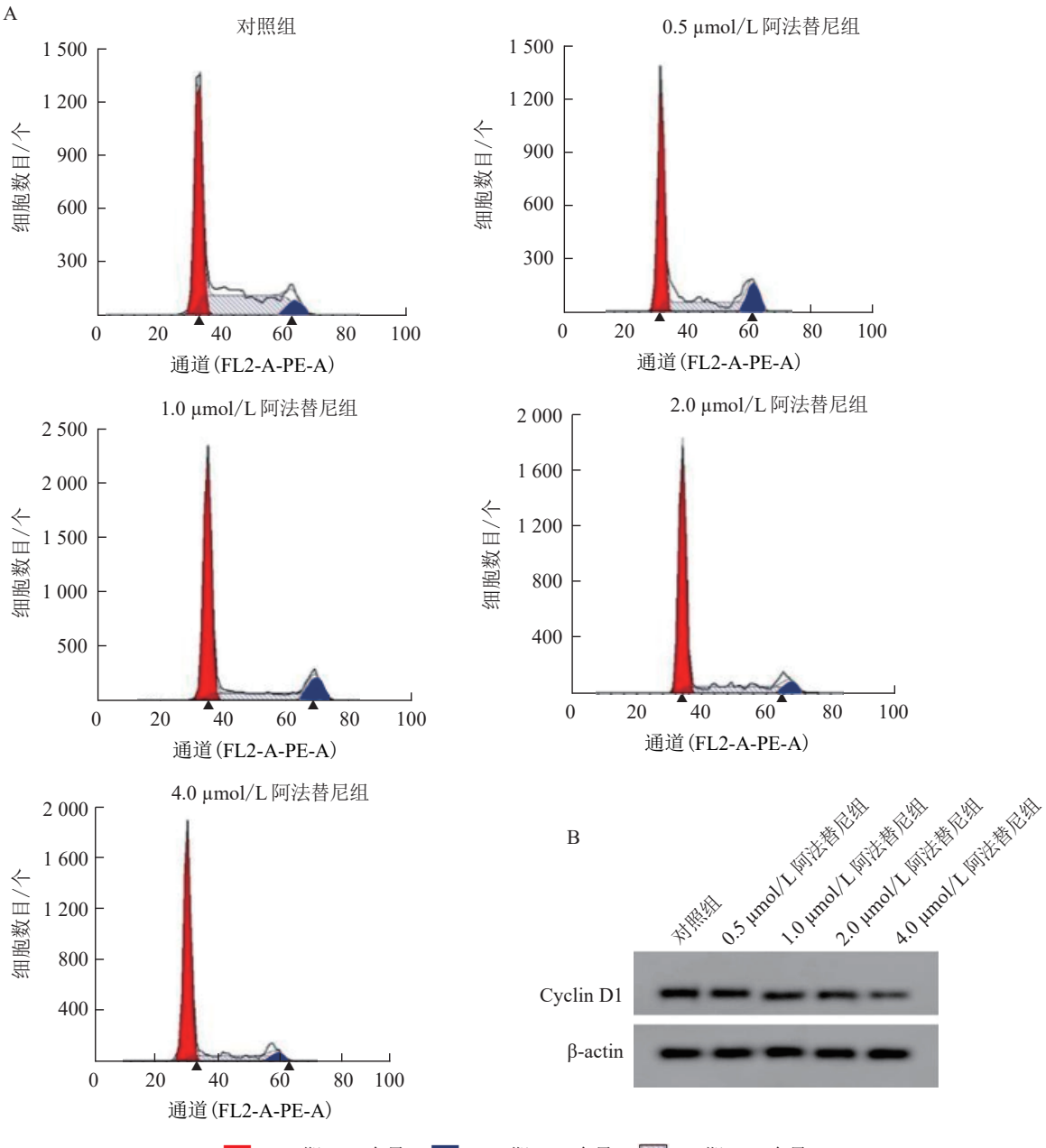
1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 进行统计描述。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和 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿法替尼对 Capan-1 细胞周期分部的影响

与对照组比较，各剂量阿法替尼组 Capan-1 细胞 Cyclin D1 蛋白表达、S 期细胞比例显著减少，G0/G1 期细胞比例显著增多（P 均<0.05），见图 1、表 1。



A：流式细胞仪检测细胞周期；B：免疫印迹蛋白检测 Cyclin D1 蛋白表达水平。

A: cell cycle was measured by flow cytometry; B: the expression level of Cyclin D1 protein was detected by western blotting.

图 1 阿法替尼对 Capan-1 细胞周期分布的影响

Figure 1 Effects of afatinib on Capan-1 cell cycle distribution

2.2 阿法替尼对 Capan-1 细胞迁移和侵袭的影响

与对照组组比较，各剂量阿法替尼组 Capan-1 细胞迁移和侵袭数量、MMP2 和 MMP9 蛋白表达均显著降低（$P < 0.05$），见图 2、表 2。

2.3 阿法替尼对 MEG3 表达的影响

与人胰腺导管上皮细胞 hTERT-HPNE 比较，Capan-1 细胞中 MEG3 表达水平显著降低（$P < 0.05$）。与对照组比较，各剂量阿法替尼组 Capan-1 细胞 MEG3 表达水平显著升高（$P < 0.05$）。见图 3。

2.4 过表达 MEG3 对 Capan-1 细胞周期分布、迁移和侵袭的影响

与 pcDNA 组比较，pcDNA-MEG3 组 Capan-1 细胞 MEG3 表达、G0/G1 期细胞比例显著升高（$P <$

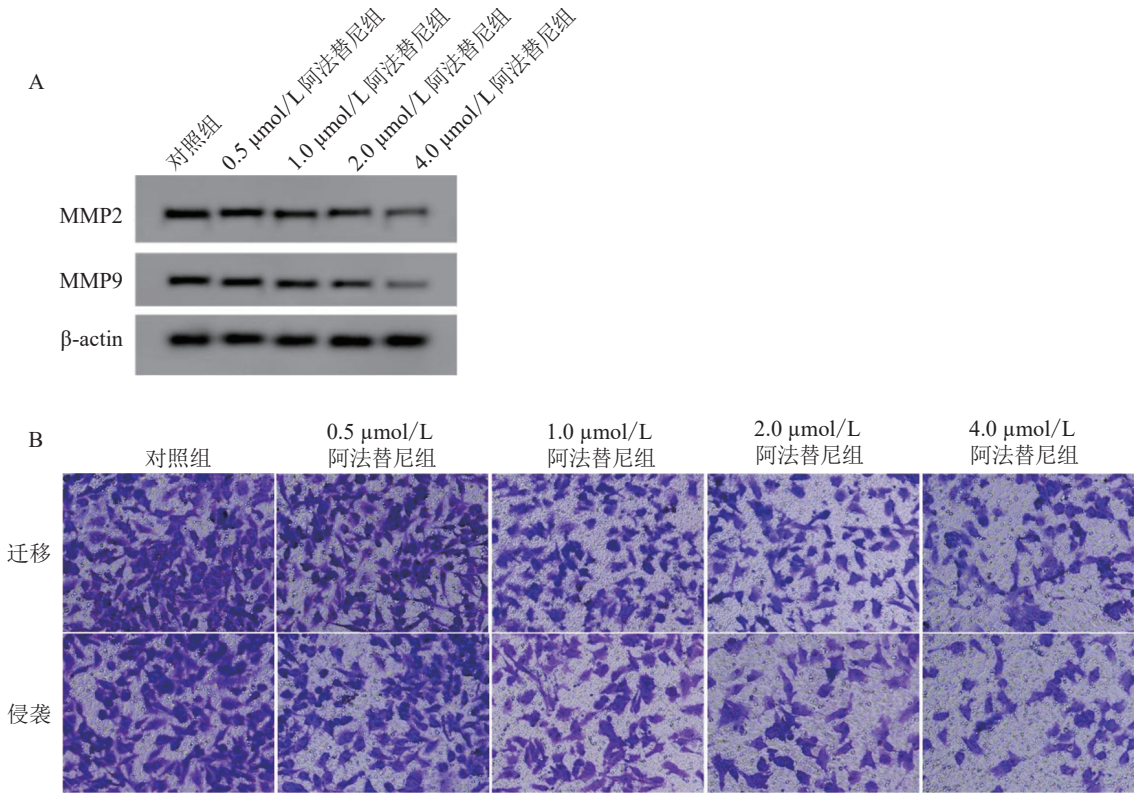
表 1 阿法替尼对 Capan-1 细胞周期分布的影响

Table 1 Effects of afatinib on Capan-1 cell cycle distribution

组别	Cyclin D1	G0/G1期/%	S期/%	G2/M期/%
对照组	0.89±0.07	51.12±3.15	37.62±1.17	11.26±0.76
0.5 μmol/L 阿法替尼组	0.72±0.06*	58.73±4.36*	29.26±1.35*	12.01±1.04
1.0 μmol/L 阿法替尼组	0.58±0.04*	66.81±4.28*	21.68±1.57*	11.51±0.88
2.0 μmol/L 阿法替尼组	0.44±0.03*	70.36±5.31*	17.67±1.14*	11.97±0.91
4.0 μmol/L 阿法替尼组	0.37±0.02*	77.11±6.07*	11.93±0.76*	10.96±0.64
*F*值	58.355	13.708	200.918	0.839
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	0.531

注：与对照组比较，*P＜0.05。

Note: *vs* control group, *P＜0.05.



A：免疫印迹检测 MMP2、MMP9 蛋白的表达；B：Transwell 检测 Capan-1 细胞迁移和侵袭。

A: the expressions of MMP2 and MMP9 proteins were detected by western blotting;

B: Capan-1 cell migration and invasion were detected by Transwell.

图 2 阿法替尼对 Capan-1 细胞迁移和侵袭的影响

Figure 2 Effects of afatinib on migration and invasion of Capan-1 cell

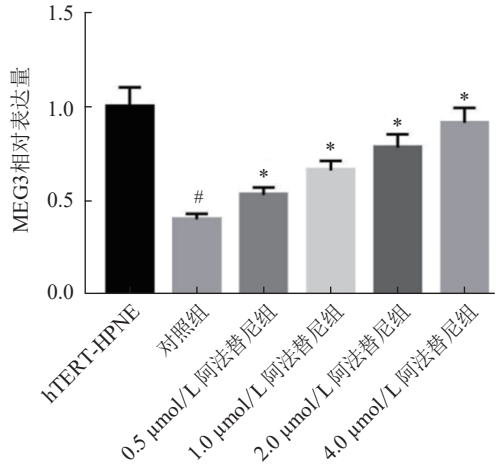
表 2 阿法替尼对 Capan-1 细胞迁移和侵袭的影响

Table 2 Effects of afatinib on migration and invasion of Capan-1 cell

组别	MMP2	MMP9	细胞迁移数量/个	细胞侵袭数量/个
对照组	0.81±0.06	0.76±0.06	234±12.51	187±11.52
0.5 μmol/L 阿法替尼组	0.70±0.06*	0.65±0.05*	208±13.24*	154±9.36*
1.0 μmol/L 阿法替尼组	0.57±0.05*	0.51±0.04*	161±11.51*	105±7.02*
2.0 μmol/L 阿法替尼组	0.47±0.04*	0.43±0.03*	118±8.34*	81±5.13*
4.0 μmol/L 阿法替尼组	0.40±0.03*	0.35±0.02*	91±6.15*	70±4.37*
*F*值	34.242	45.667	93.657	117.723
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组比较，*P＜0.05。

Note: *vs* control group, *P＜0.05.



注：与 hTERT-HPNE 比较，$^{\#}P$ ＜ 0.05；与对照组比较，*P ＜ 0.05。

Note: *vs* hTERT-HPNE, $^{\#}P$ ＜ 0.05; *vs* control group, *P ＜ 0.05.

图 3 阿法替尼对 MEG3 表达的影响

Figure 3 Effects of afatinib on the expression of MEG3

0.05)，S 期细胞比例、细胞迁移和侵袭数量以及 Cyclin D1、MMP2 以及 MMP9 蛋白表达显著降低（P ＜ 0.05），见图 4、表 3。

2.5 MEG3 低表达对 Capan-1 细胞周期分布、迁移、侵袭的影响

与 4.0 μmol/L 阿法替尼＋ si-NC 组比较，4.0 μmol/L 阿法替尼 ＋ si-MEG3 组 Capan-1 细胞 MEG3 表达、G0/G1 期细胞比例显著降低（P ＜ 0.05），S 期细胞比例、细胞迁移和侵袭数量以及 Cyclin D1、MMP2、MMP9 蛋白表达显著升高（P ＜ 0.05），见图 5、表 4。

3 讨论

研究证实，阿法替尼在多种人类癌症中具有治疗潜力。王胜奇等[8]证实，阿法替尼通过抑制 EGFR 通路激活，下调 EGFR 下游的磷脂酰肌醇 -3- 羟激酶 / 蛋白激酶 B 通路，进而对卵巢癌细胞具有增殖抑制作用。Tang 等[9]指出阿法替尼可抑制膀胱癌细胞株的增殖和侵袭，并促进其凋亡，其机制可能与抑制丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶信号通路有关。赵颖等[10]报道阿法替尼通过

表 3 过表达 MEG3 对 Capan-1 细胞周期分布、迁移和侵袭的影响

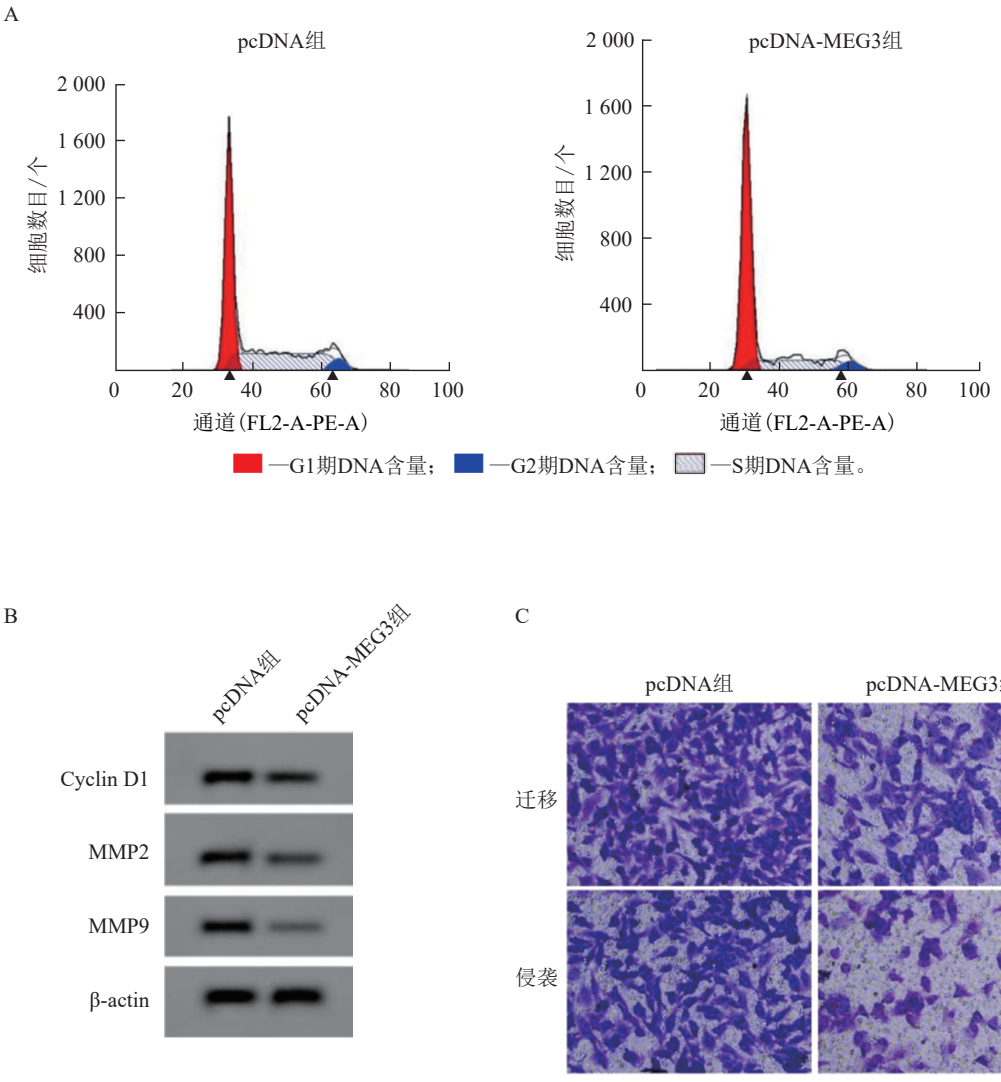
Table 3 Effects of overexpression of MEG3 on cell cycle distribution, migration, and invasion of Capan-1 cells

项目	pcDNA组	pcDNA-MEG3组	*t*值	*P*值
MEG3	1.00±0.10	2.14±0.15	10.953	＜0.001
Cyclin D1	0.87±0.08	0.43±0.03	8.92	0.001
MMP2	0.79±0.07	0.37±0.03	9.552	0.001
MMP9	0.73±0.06	0.31±0.03	10.844	＜0.001
G0/G1期/%	51.36±2.37	71.06±5.14	6.028	0.004
S期/%	37.19±2.04	16.98±1.24	14.663	＜0.001
G2/M期/%	11.45±0.81	11.96±0.91	0.725	0.509
迁移数量/个	237±15.17	109±8.10	12.892	＜0.001
侵袭数量/个	182±10.53	87±6.17	13.482	＜0.001

表 4 MEG3 低表达对 Capan-1 细胞周期分布、迁移、侵袭的影响

Table 4 Effects of low expression of MEG3 on cell cycle distribution, migration, and invasion of Capan-1 cells

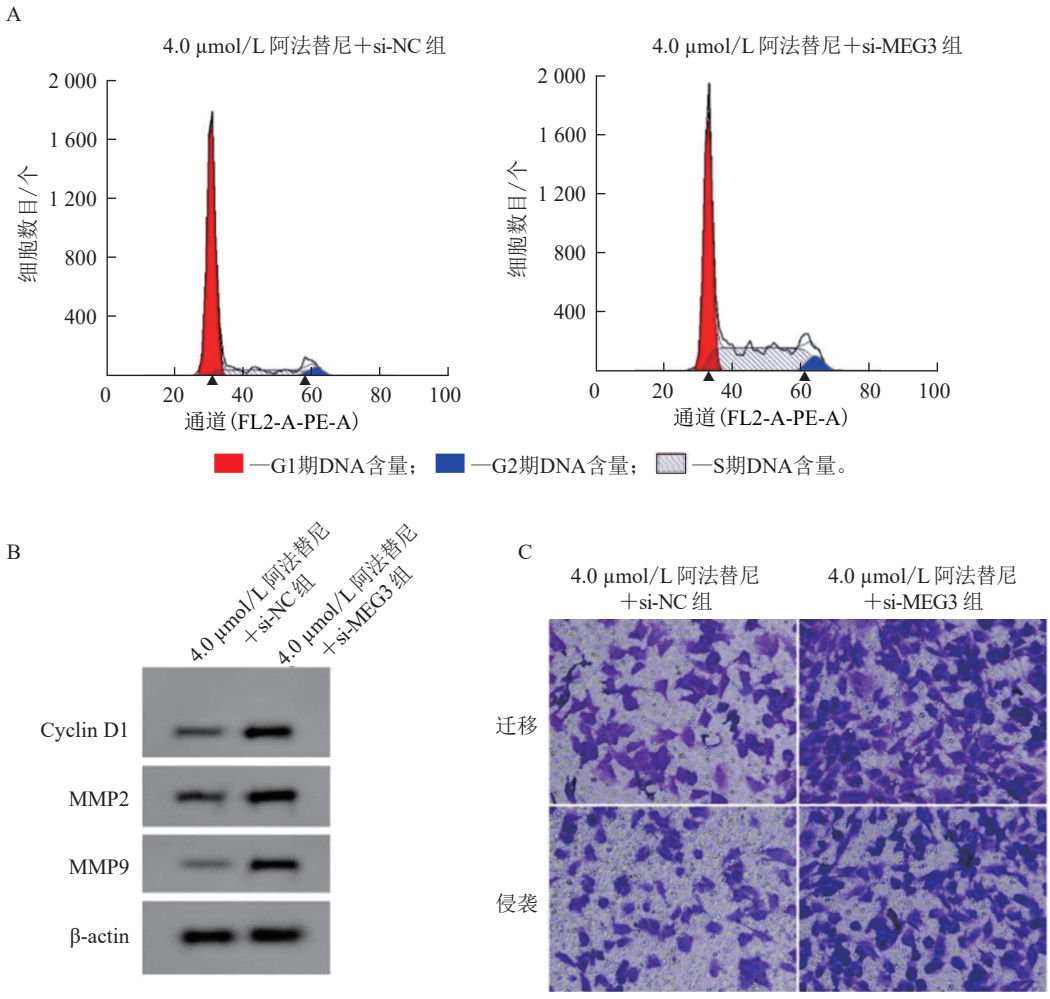
组别	4.0 μmol/L阿法替尼＋si-NC组	4.0 μmol/L阿法替尼＋si-MEG3组	*t*值	*P*值
MEG3	1.00±0.10	0.42±0.04	9.327	0.001
Cyclin D1	0.36±0.02	0.88±0.07	12.372	＜0.001
MMP2	0.42±0.04	0.81±0.07	8.379	0.001
MMP9	0.34±0.02	0.78±0.03	21.137	＜0.001
G0/G1期/%	77.02±5.43	49.16±3.21	7.65	0.002
S期/%	11.64±0.91	38.98±2.24	19.586	＜0.001
G2/M期/%	11.34±8.16	11.86±8.73	0.075	0.944
迁移数量/个	94±7.03	219±17.14	11.687	＜0.001
侵袭数量/个	75±5.41	181±10.39	15.673	＜0.001



A：流式细胞仪检测细胞周期；B：免疫印迹检测 CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白的表达；C：Transwell 检测 Capan-1 细胞迁移和侵袭。
A: cell cycle was measured by flow cytometry; B: the expressions of Cyclin D1, MMP2 and MMP9 proteins were detected by western blotting; C: Capan-1 cell migration and invasion were detected by Transwell.

图 4　过表达 MEG3 对 Capan-1 细胞周期分布、Cyclin D1、MMP2、MMP9 蛋白的表达以及迁移侵袭的影响
Figure 4　Effects of overexpression of MEG3 on cell cycle distribution, cyclin D1, MMP2, MMP9 protein expression, migration and invasion of Capan-1 cells

诱导 G0/G1 周期阻滞显著抑制乳腺癌细胞增殖。本研究结果表明，阿法替尼明显增加 G0/G1 期细胞比例，降低 S 期细胞比例，降低 Capan-1 细胞迁移和侵袭能力，且表现出明显的量效关系，表明阿法替尼对 Capan-1 细胞增殖、迁移和侵袭具有抑制作用。Cyclin D1 是调节细胞周期活动的重要蛋白，可与细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase-9，CDK）4、CDK6 形成 Cyclin D1/CDKs 复合物，促进视网膜母细胞瘤基因产物磷酸化，诱导细胞周期从 G1 向 S 期转换，在细胞增殖和肿瘤发生中发挥促进作用[11]。MMP 是锌依赖性内肽酶，可降解细胞外基质成分，其中 MMP2 和 MMP9 被认为在促进癌细胞侵袭转移中发挥重要作用[12]。研究报道，阿法替尼通过下调 MMP2 和 MMP9 表达抑制肺腺癌细胞迁移和侵袭[13]。本研究中阿法替尼以剂量依赖方式降低 Cyclin D1、MMP2 和 MMP9 表达水平，这与阿法



A：流式细胞仪检测细胞周期；B：免疫印迹检测 CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白的表达；C：Transwell 检测 Capan-1 细胞迁移和侵袭。
A: cell cycle was measured by flow cytometry; B: the expressions of Cyclin D1, MMP2 and MMP9 proteins were detected by western blotting; C: Capan-1 cell migration and invasion were detected by Transwell.

图 5　MEG3 低表达对 Capan-1 细胞周期、Cyclin D1、MMP2、MMP9 蛋白的表达以及迁移侵袭的影响
Figure 5　Effects of low expression of MEG3 on the cell cycle, cyclin D1, MMP2, MMP9 protein expression, migration and invasion of Capan-1 cells

替尼对 Capan-1 细胞的增殖、迁移和侵袭抑制作用一致。

MEG3 位于人染色体 14q32.3，目前已在胃癌、NSCLC 等多种癌症中被证实可抑制恶性肿瘤 [14—15]。研究显示，血清 MEG3 低表达结直肠癌患者肿瘤体积较大、临床分期较晚以及总生存率较差 [16]。在喉癌组织中 MEG3 表达下调，过表达 MEG3 在体内外均可抑制喉癌细胞增殖，诱导细胞凋亡 [17]。胶质瘤中 MEG3 通过靶向 miR-6088 可阻断胶质瘤细胞上皮间质转化进程，抑制细胞迁移和侵袭 [18]。本研究中，Capan-1 细胞中 MEG3 水平较人胰腺导管上皮细胞 hTERT-HPNE 显著下调，这与前人结论一致 [7]。据报道，非诺贝特通过上调 MEG3 诱导 p53 激活进而抑制 PC 细胞增殖 [19]。本研究结果显示，阿法替尼处理后以 Capan-1 细胞中 MEG3 水平显著上调，过表达 MEG3 明显下调 Cyclin D1、MMP2 和 MMP9 蛋白表达，诱导 G0/G1 期阻滞，抑制细胞迁移和侵袭，与阿法替尼对 Capan-1 细胞的抗肿瘤效果类似，

提示 MEG3 可能介导阿法替尼的抗肿瘤作用。干扰 MEG3 表达明显逆转阿法替尼对 Capan-1 细胞周期分布、迁移和侵袭的影响，这进一步证实上调 MEG3 是阿法替尼对 PC Capan-1 细胞发挥增殖、迁移和侵袭抑制作用的重要机制。

4 结论

综上所述，阿法替尼可通过上调 MEG3 表达来抑制 PC 细胞增殖、迁移和侵袭，在 PC 中具有抗肿瘤作用，在 PC 治疗中具有潜在应用前景。

参考文献：

[1] Specenier P, Vermorken J. Afatinib in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(9): 1295-1301.

[2] Harbeck N, Solca F, Gauler TC. Preclinical and clinical development of afatinib: a focus on breast cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Future Oncol, 2014, 10(1): 21-40.

[3] 封雪, 赵滨滨, 王咏强. 布比卡因调控LncRNA LBX2-AS1对宫颈癌细胞SiHa增殖及凋亡的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(10): 1829-1832.

[4] Dai Y, Wan Y, Qiu M, *et al*. lncRNA MEG3 suppresses the tumorigenesis of hemangioma by sponging miR-494 and regulating PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2872-2886.

[5] Wang C, Yan G, Zhang Y, *et al*. Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1[J]. Neoplasma, 2015, 62(4): 541-549.

[6] Gu L, Zhang J, Shi M, *et al*. lncRNA MEG3 had anti-cancer effects to suppress pancreatic cancer activity[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1269-1276.

[7] Ma L, Wang F, Du C, *et al*. Long non-coding RNA MEG3 functions as a tumour suppressor and has prognostic predictive value in human pancreatic cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1132-1140.

[8] 王胜奇, 宋志华, 梁倩莹, 等. 阿法替尼对人卵巢癌细胞的增殖抑制作用及其机制研究[J]. 今日药学, 2016, 26(9): 630-632.

[9] Tang Y, Zhang X, Qi F, *et al*. Afatinib inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of the T24 bladder cancer cell line[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(5): 1851-1856.

[10] 赵颖, 迟江瑞, 赵洪猛, 等. 阿法替尼对人乳腺癌细胞增殖与凋亡的影响及机制研究[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(15): 739-743.

[11] Ding J, Xu K, Sun S, *et al*. SOCS1 blocks G1-S transition in hepatocellular carcinoma by reducing the stability of the CyclinD1/CDK4 complex in the nucleus[J]. Aging(Albany NY), 2020, 12(4): 3962-3975.

[12] Zong L, Li J, Chen X, *et al*. Lipoxin A4 attenuates cell invasion by inhibiting ROS/ERK/MMP pathway in pancreatic cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 6815727.

[13] 袁茵, 宫颢, 李永文, 等. 阿帕替尼对肺癌细胞侵袭迁移的影响及其作用机制[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(5): 264-270.

[14] Wei GH, Wang X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(17): 3850-3856.

[15] Yang Z, Wang Z, Duan Y. lncRNA MEG3 inhibits non-small cell lung cancer via interaction with DKC1 protein[J]. Oncol Lett, 2020, 20(3): 2183-2190.

[16] Wang W, Xie Y, Chen F, *et al*. LncRNA MEG3 acts a biomarker and regulates cell functions by targeting ADAR1 in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(29): 3972-3984.

[17] Zhang X, Wu N, Wang J, *et al*. lncRNA MEG3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in laryngeal cancer via miR-23a/APAF-1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(10): 6708-6719.

[18] Gong X, Huang MY. Tumor-Suppressive function of lncRNA-MEG3 in glioma cells by regulating miR-6088/SMARCB1 axis[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4309161.

[19] Hu D, Su C, Jiang M, *et al*. Fenofibrate inhibited pancreatic cancer cells proliferation via activation of p53 mediated by upregulation of lncRNA MEG3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(2): 290-295.

（编辑：沈佳婕）