

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.010

· 基础研究 ·

## 高强度聚焦超声波通过调控 miR-1297/PTEN 分子轴抑制胰腺癌细胞的增殖与迁移

陈坚<sup>a</sup>, 裴峰<sup>b</sup>, 徐周敏<sup>c</sup> (中国人民武装警察部队上海市总队医院 a. 肿瘤科; b. 特检科; c. 消化科, 上海 201103)

**[摘要]** **目的:** 探讨高强度聚焦超声波 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 通过 miR-1297/PTEN 分子轴抑制胰腺癌细胞增殖和迁移的作用机制。 **方法:** HIFU 作用于体外培养的胰腺癌 PANC-1 细胞 1、2 和 3 s, 采用 CCK-8 法、Transwell 小室法和 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术分别检测 HIFU 对 PANC-1 细胞增殖、迁移和凋亡的影响; 用 qPCR 和 Western blotting 法分别检测 HIFU 对 PANC-1 细胞 miR-1297 和 PTEN 表达的影响, 用双荧光素酶报告基因验证 miR-1297 与 PTEN 的靶向关系。通过转染 miR-1297 inhibitor 和 PTEN-siRNA, 采用 Western blotting 法检测 HIFU 对 Akt 磷酸化的影响。 **结果:** 随着 HIFU 作用时间的延长, 对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和迁移能力的抑制作用不断增强, 并促进细胞凋亡 (均  $P < 0.01$ ), 抑制 PANC-1 细胞中 miR-1297 的表达和促进 PTEN 的表达 (均  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 同时, miR-1297 靶向作用 PTEN 并下调其表达水平。HIFU 显著抑制 Akt 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 **结论:** HIFU 通过下调 miR-1297 抑制 PTEN 的表达并阻断 Akt 信号通路, 进而抑制胰腺癌发生发展的进程。

**[关键词]** 胰腺癌; 高强度聚焦超声波; miR-1297; PTEN/Akt 信号通路; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R730.5; R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)10-1034-08

## High intensity focused ultrasound inhibits the proliferation and migration of pancreatic cancer cells via regulating miR-1297/PTEN axis

CHEN Jian<sup>a</sup>, PEI Feng<sup>b</sup>, XU Zhoumin<sup>c</sup> (a. Department of Oncology; b. Special Clinic; c. Digestive Department, Shanghai Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Shanghai 201103, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the role and molecular mechanism of high intensity focused ultrasound (HIFU) inhibits pancreatic cancer cell proliferation and invasion via regulating miR-1297/PTEN axis. **Methods:** With treating the cells with HIFU for 1 to 3 seconds, the effect of HIFU on cell proliferation, invasion and apoptosis of PANC-1 cells *in vitro* was examined by CCK-8, Transwell and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry, respectively. The effect of HIFU on expression of miR-1297 and PTEN were measured by qPCR and Western blotting. Moreover, the relationship between miR-1297 and PTEN was examined by dual luciferase report assay. Western blotting was used to detect the effect of HIFU on the expression of Akt, p-Akt (308) and p-Akt (473) after transfected with miR-1297 inhibitor and PTEN-siRNA. **Results:** HIFU treatment significantly inhibited the cell proliferation, invasion and promoted apoptosis of PANC-1 cells (all  $P < 0.01$ ), which was associated with inhibition of miR-1297 expression and activation of PTEN expression in pancreatic cancer cells (all  $P < 0.01$ ). Moreover, miR-1297 directly binds to the 3' UTR of PTEN mRNA to suppress its expression in PANC-1 cells. Further, HIFU exposure could significantly inhibit the expression of the phosphorylation of Akt ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** HIFU inhibits PTEN and blocks Akt signaling by down-regulating miR-1297, thereby suppresses the occurrence and progress of pancreatic cancer.

**[Key words]** pancreatic cancer; high intensity focused ultrasound; miR-1297; PTEN/Akt signaling pathway; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(10): 1034-1041. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.010]

胰腺癌是一种恶性程度极高、诊治困难、预后最差的消化道恶性肿瘤之一, 每年全世界病死人数超过 20 万<sup>[1]</sup>。近年来新型的高强度聚焦超声波 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 对胰腺癌<sup>[2]</sup>、前列腺癌<sup>[3]</sup>、鳞状细胞癌<sup>[4]</sup>和胃癌<sup>[5]</sup>等多种肿瘤具有显著疗效。微小 RNA (miRNA) 的异常表达与神经、心血管以及肿瘤的发生发展密切相关<sup>[6]</sup>。大量研究<sup>[7-8]</sup>证实,

胰腺癌中 miRNA 异常表达, 并且通过调控靶向蛋白抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及促进凋亡。miR-1297

**[作者简介]** 陈坚 (1970-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事中晚期恶性肿瘤综合治疗的研究, E-mail: keke3489@126.com

**[通信作者]** 裴峰 (PEI Feng, corresponding author), 学士, 主任医师, 主要从事肿瘤超声诊断和介入治疗, E-mail: peifeng1968@sina.com

通过靶向下调 PTEN 的表达进而促进非小细胞肺癌的发生发展<sup>[9]</sup>; miR-1297 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/Akt 通路促进乳腺癌细胞增殖和侵袭<sup>[10]</sup>; miR-1297 靶向 PTEN 在喉鳞状细胞癌<sup>[11]</sup>和睾丸生殖细胞肿瘤<sup>[12]</sup>等肿瘤的发生发展中具有重要作用。目前尚未见 miR-1297 通过靶向 PTEN 影响胰腺癌发生发展的相关分子机制的研究报道。本课题通过 HIFU 体外作用于胰腺癌 PANC-1 细胞株,观察其对癌细胞增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为的影响,旨在探讨 HIFU 通过调控 miR-1297/PTEN 分子轴抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、主要试剂与仪器

人胰腺癌细胞株 PANC-1 购自中科院上海细胞研究所。miR-1297 和 PTEN 的 siRNAs 和 mimics 购自上海吉玛公司,DMEM 和胎牛血清(FBS)购自美国 Biological Industries 公司,青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,CCK-8 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,全蛋白提取试剂盒、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司,SYBR Green Mix 购自 Applied Biosystems 公司,免疫印迹一抗(antibody-PTEN、antibody-Akt、antibody-p-Akt (Thr308)、antibody-p-Akt (Ser473)和二抗(羊抗兔 IgG(H+L))均购于购自美国 CST 公司,Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司。酶标仪、荧光定量 PCR 仪及电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,高强度聚焦超声诊断仪购自重庆海扶医疗科技股份有限公司。

### 1.2 细胞培养

人胰腺癌细胞株 PANC-1 采用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液在 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,并每 2 d 更换一次新鲜培养液。细胞汇合度达 70%~80% 时,收集细胞用于后续实验。

### 1.3 用 HIFU 处理胰腺癌 PANC-1 细胞

将培养至对数生长期的胰腺癌 PANC-1 细胞 1 000×g 离心 3 min,采用 DMEM 重悬细胞后于 1.5 ml 离心管(细胞 2×10<sup>6</sup> 个/管)中,然后将离心管浸没于超声池中。实验分为超声组与对照组,超声组细胞采用超声强度为 142.7 W/cm<sup>2</sup> 的 HIFU 分别对 PANC-1

细胞处理 1、2 和 3 s;对照组不做任何处理。

### 1.4 细胞转染

采用无血清细胞培养基 DMEM 培养液稀释质粒 DNA,轻轻混匀,标记为 A 液;将无血清的 DMEM 培养基用 Lipofectamine™ 2000 稀释,混匀后于 24 °C 条件下放置 5 min,标记为 B 液。将 A 液与 B 液混合,并置于 24 °C 条件下孵育 30 min。然后,将 DNA-Lipofectamine™ 2000 复合物于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养。次日,采用新鲜的含有血清的 DMEM 培养液培养上述获得的复合物,并于光学显微镜下观察其转染率。继续培养 3 d 后,将复合物培养原液于 53 000×g 离心 10 min,收集离心上清液。最后,将 DMEM 于无菌条件下将病毒颗粒悬浮起来,备用。

### 1.5 CCK-8 法检测 PANC-1 细胞的增殖能力

将对数生长期的胰腺癌 PANC-1 细胞接种于 96 孔板(细胞密度为 1×10<sup>4</sup> 个/孔),每孔含培养基 100 μl,并设置 6 个平行孔。于待检测前 1 h,向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1~4 h 后,用酶标仪测定波长在 450 nm 处的光密度(D)值。实验重复 3 次。

### 1.6 Transwell 小室法检测 PANC-1 细胞的迁移能力

将 Transwell 小室放入 24 孔板内,接种转染 siRNA 24 h 或经 HIFU 处理后的 PANC-1 细胞悬液 100 μl(密度为 2×10<sup>5</sup> 个/ml),培养 12 h 后,棉签擦去微孔膜上室的细胞,PBS 小心冲洗小室上下面 2 遍,4% 的多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 30 min,1% 结晶紫染色 10 min,PBS 冲洗小室,干燥后置于倒置显微镜(×100)下观察穿膜细胞数。实验重复 3 次。

### 1.7 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 PANC-1 细胞的凋亡率

选取经 HIFU 处理后的对数生长期 PANC-1 细胞,PBS 清洗 2 次。加入 500 μl 预冷的 1×结合缓冲液、5 μl Annexin V-FITC 和 2.5 μl PI 并混匀,室温下避光静置 10 min 后,于流式细胞仪上检测细胞的凋亡率。散点图的第四象限(Q4)代表健康的成活细胞(FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>),第三象限(Q3)代表早期凋亡细胞(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>),第二象限(Q2)代表坏死细胞和晚期凋亡细胞(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)。凋亡率的计算公式如下:凋亡率(%)=早期凋亡率(Q3)+晚期凋亡率(Q2)。实验重复 3 次。

### 1.8 双荧光素酶报告基因验证 miR-1297 与 PTEN 的靶向关系

将 PANC-1 细胞转染并表达 miR-1297 前体,按试剂盒说明书小心操作。并于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后,收集培养获得的细胞。然后,用双荧光素酶报告基因检测试剂盒对上述收集的细胞进行检测。设置 3 个重复样本。

1.9 Western blotting 检测 PANC-1 细胞相关蛋白表达

提取 PANC-1 细胞的蛋白, 依据 BCA 试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。每组取 30 μg 进行 SDS-PAGE 后转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 的牛血清蛋白封闭 1 h, 加入各稀释比例 1:1 000 的一抗 antibody-PTEN、antibody-Akt、antibody-p-Akt(Thr308) 和 antibody-p-Akt(Ser473), 4 °C 下过夜培养。后用洗膜缓冲液(TBST)冲洗蛋白 3 次, 每次 5 min, 随后加入稀释比例 1:500 的二抗[羊抗兔 IgG(H+L)], 温室下培养 1 h。再洗膜 3 次后, 加入化学发光试剂显影蛋白。以 β-actin 作为内参, 利用 Bio-Rad Gel DoleZ 成像系统采集图像、Image J 软件分析靶带的灰度水平。

1.10 qPCR 法检测 PANC-1 细胞 miR-1297 的表达

用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 取 2 μg 逆转录为 cDNA。取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 反应, 以 U6 为内参基因。引物序列: U6 F 为 5'-GATTCTCCCTCATCGCTTACAG-3', R 为 5'-CTGCTTCATGATCGTTGTTGCTTG-3'; PTEN F 为 5'-GGACGAACTGGTGTAATGAAT-3', R 为 5'-TCTACTGTTGTGAAGTACAGG-3'; miR-1297 F 为 5'-ACACTCCAGCTGGGTTCAAGTAATTCAGG-3', R 为 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTC-3'; β-actin F 为 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', R 为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。按试剂盒说明建立终体

积为 20 μl 的 PCR 反应体系、2 μl 逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、各 0.5 μl 上下游引物(10 μmol/L)。PCR 热循环参数为: 95 °C 5 min, 然后 3 步反应: 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 进行 45 个循环。检测结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行计算。实验重复 3 次。

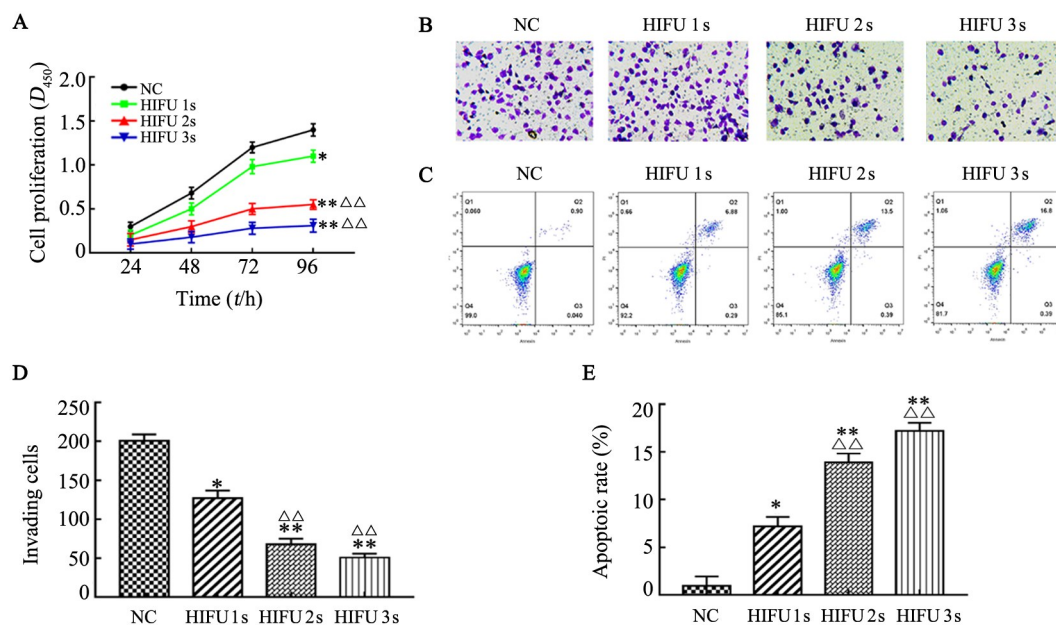
1.11 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 用 GraphPad Prism 7 软件绘制实验数据相关图片。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIFU 显著抑制 PANC-1 细胞增殖和迁移并促进其凋亡

CCK-8 法检测结果(图 1A)显示, 相比于对照组, HIFU 不同处理时间均显著抑制 PANC-1 细胞的增殖能力(*P*<0.05 或 *P*<0.01), 随着 HIFU 作用时间的延长抑制效果越显著, 且差异具有统计学意义(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。Transwell 小室法检测结果(图 1B、D)证实, HIFU 不同处理时间均显著抑制 PANC-1 细胞的迁移能力(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果(图 1C、E)发现, HIFU 显著上调 PANC-1 细胞凋亡水平(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。



\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs NC group; Δ*P*<0.05, ΔΔ*P*<0.01 vs HIFU 1 s group

A: The proliferation of PANC-1 cells was inhibited by CCK-8 assay; B, D: The migration ability of PANC-1 cells was inhibited by Transwell assay (×100); C, E: The percentage of apoptosis cells was promoted by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

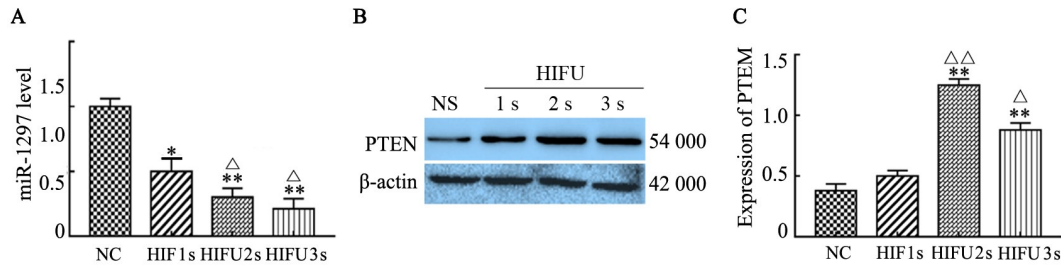
图 1 HIFU 对胰腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig. 1 Effect of HIFU on cell proliferation, invasion and apoptosis

## 2.2 HIFU 显著抑制 PANC-1 细胞中 miR-1297 的表达并促进 PTEN 的表达

qPCR 检测结果(图 2A)显示,HIFU 对 PANC-1 细胞分别处理 1、2 和 3 s 后,miR-1297 的表达水平显著低于对照组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。从 Western blotting

检测结果(图 2B、C)发现,HIFU 能显著促进 PANC-1 细胞 PTEN 蛋白的表达水平( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果表明,HIFU 可显著抑制胰腺癌 PANC-1 细胞 miR-1297 的表达水平,而促进 PTEN 的表达。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Control group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs Treatment 1 s of HIFU

A: The expression of miR-1297 was measured by qPCR;

B, C: The expression of PTEN protein was measured by Western blotting

图 2 HIFU 对胰腺癌细胞中 miR-1297 和 PTEN 表达水平的影响

Fig.2 Effect of HIFU on the expression of miR-1297 and PTEN in PANC-1 cells

## 2.3 PTEN 是 miR-1297 的靶基因

通过借助生物信息学数据库 TargetScan 对 miR-1297 的靶基因进行了预测,发现 PTEN 是 miR-1297 的候选靶基因。随后采用荧光素酶报告基因验证实验发现,在 PANC-1 细胞中 miR-1297 可以结合 PTEN 的 3' UTR(图 3A),并且 miR-1297 可以负调控 PTEN 的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ,图 3B)。同时,采用 qPCR 和 Western blotting 分别检测了 miR-1297 过表达后对 PTEN miRNA 和蛋白表达的影响,结果(图 3C、D)显示,miR-1297 过表达后可显著抑制 PTEN 在 PANC-1 细胞中的表达水平( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。由此可知,PTEN 是 miR-1297 的靶基因,并且 miR-1297 可负调控 PTEN 的表达。

## 2.4 HIFU 通过 miR-1297/PTEN/Akt 通路对 PANC-1 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Western blotting 检测结果(图 4A)显示,沉默 miR-1297 可显著促进 PANC-1 细胞 PTEN 的表达,而同时沉默 miR-1297 和 PTEN 可显著下调 miR-1297 inhibitor 对 PTEN 的促进作用( $P<0.05$ )。

CCK-8 法和 Transwell 小室法检测结果(图 4B 和 5A)共同证实,转染 miR-1297 inhibitor 后再经 HIFU 处理后,PANC-1 细胞的增殖和迁移能力显著低于对照组( $P<0.05$ );同时沉默 PTEN 和 miR-1297 的表达后再经 HIFU 处理后,可以显著恢复 miR-1297 inhibitor 对 PANC-1 细胞增殖和迁移能力的抑制作用( $P<0.05$ )。

流式细胞术检测结果(图 5B)进一步证实,转染 miR-144-3p inhibitor 可显著促进细胞凋亡( $P<0.01$ ),而同时转染 si-PTEN 和 miR-1297 inhibitor 可以显著

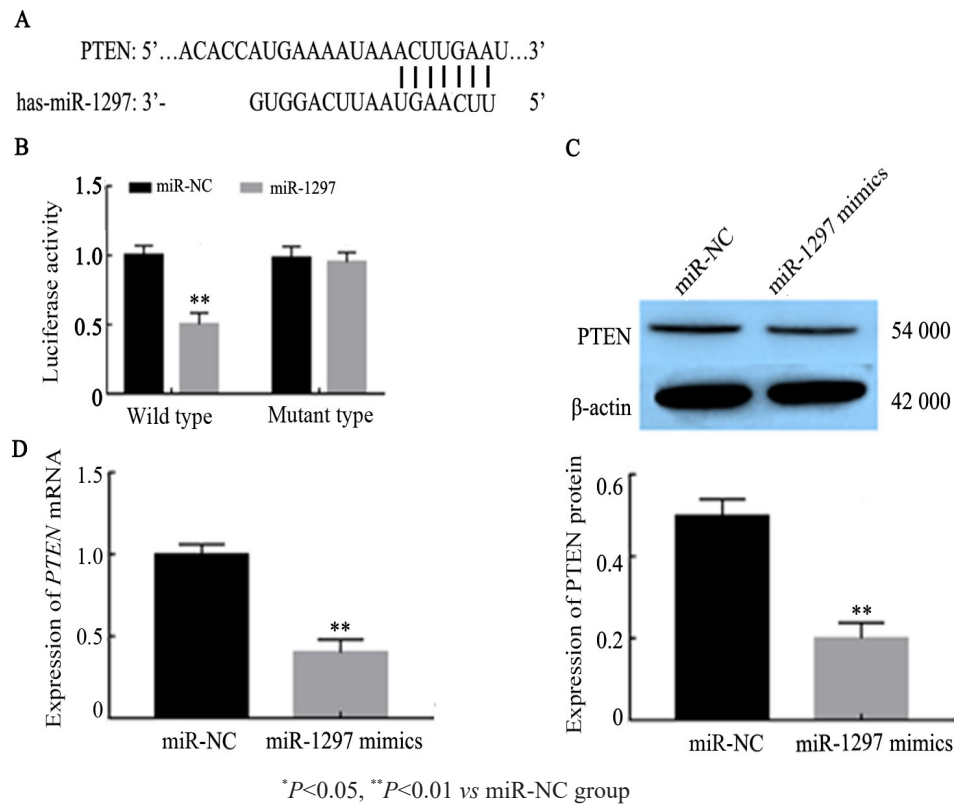
下调 miR-144-3p inhibitor 对 PANC-1 细胞凋亡的促进作用( $P<0.01$ )。

Western blotting 检测结果(图 5C)显示,不同 HIFU 作用时间分别抑制了 p-Akt(308)和 p-Akt(473)的表达水平,而 Akt 蛋白的表达没有变化( $P<0.05$ )。由此可知,HIFU 通过下调 PANC-1 细胞 miR-1297 对 PTEN 的抑制作用,并阻断 Akt 信号通路进而抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡。

## 3 讨论

胰腺癌是恶性程度极高的消化道肿瘤,号称“癌中之王”,患者 5 年生存率不足 5%。由于肥胖、高脂饮食、糖尿病、吸烟、酒精依赖及慢性胰腺炎等原因,胰腺癌的发病率呈逐年上升趋势。目前,胰腺癌的治疗原则是以外科手术治疗为主,结合放化疗等综合治疗,但是因胰腺癌的早期诊断困难、手术切除率低。同时,胰腺癌容易发生早期转移、对传统放化疗不敏感,造成其高病死率。因此,深入研究胰腺癌的早期转移机制,探索新的治疗方法显得极其重要。

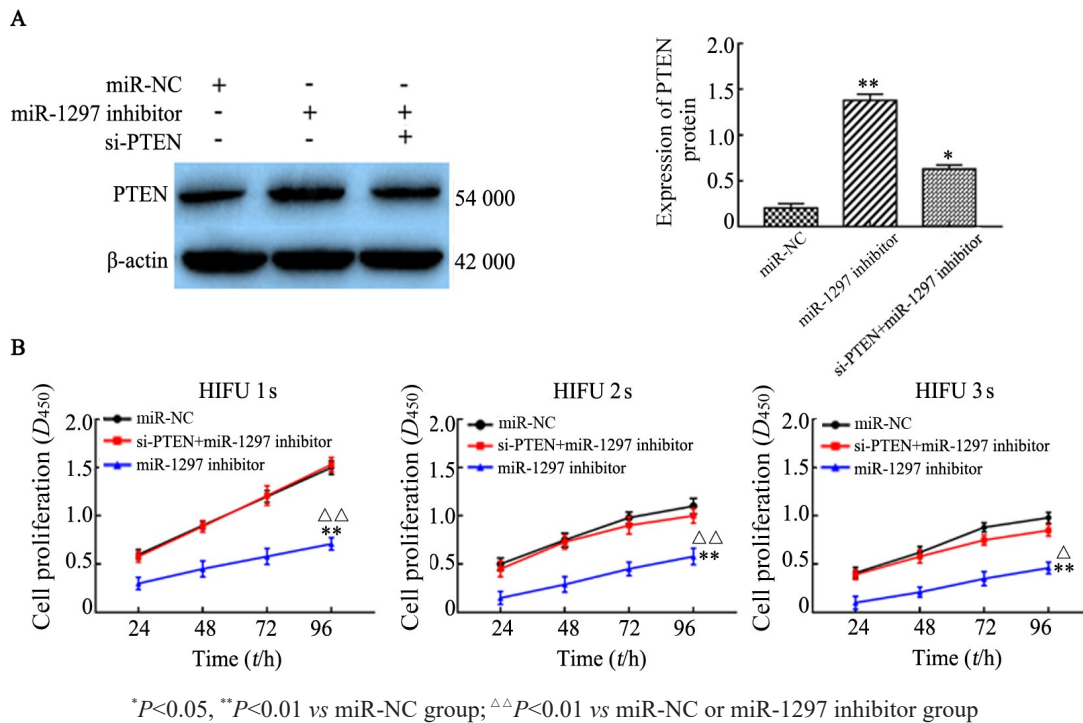
近年的临床研究发现,HIFU 是一种新型的治疗肿瘤的“手术刀”,对包括胰腺癌在内的多种肿瘤治疗具有显著疗效。GHAI 等<sup>[13]</sup>报道,经 HIFU 治疗 6 个月后前列腺癌患者肿瘤体积缩小 5%~15%;PEEK 等<sup>[14]</sup>研究表明,HIFU 可以作为临床上治疗良、恶性乳腺癌的有效手段。本研究发现,HIFU 能够显著抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和迁移能力以及促进细胞凋亡。此外,研究<sup>[15]</sup>发现,经 HIFU 治疗后有多种肿瘤相关生物标志物(如 mRNA 和蛋白)的差异表达。这



A: The bioinformatics analysis result showed that miR-1297 had a binding site with *PTEN*; B: The luciferase activity in *PTEN*-wt transfected with miR-1297 was lower than that in miR-NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C: The expression of *PTEN* protein was measured Western blotting; D: The expression of *PTEN* mRNA was measured by qPCR

图3 *PTEN* 是 miR-1297 靶基因

Fig.3 *PTEN* is the target gene of miR-1297

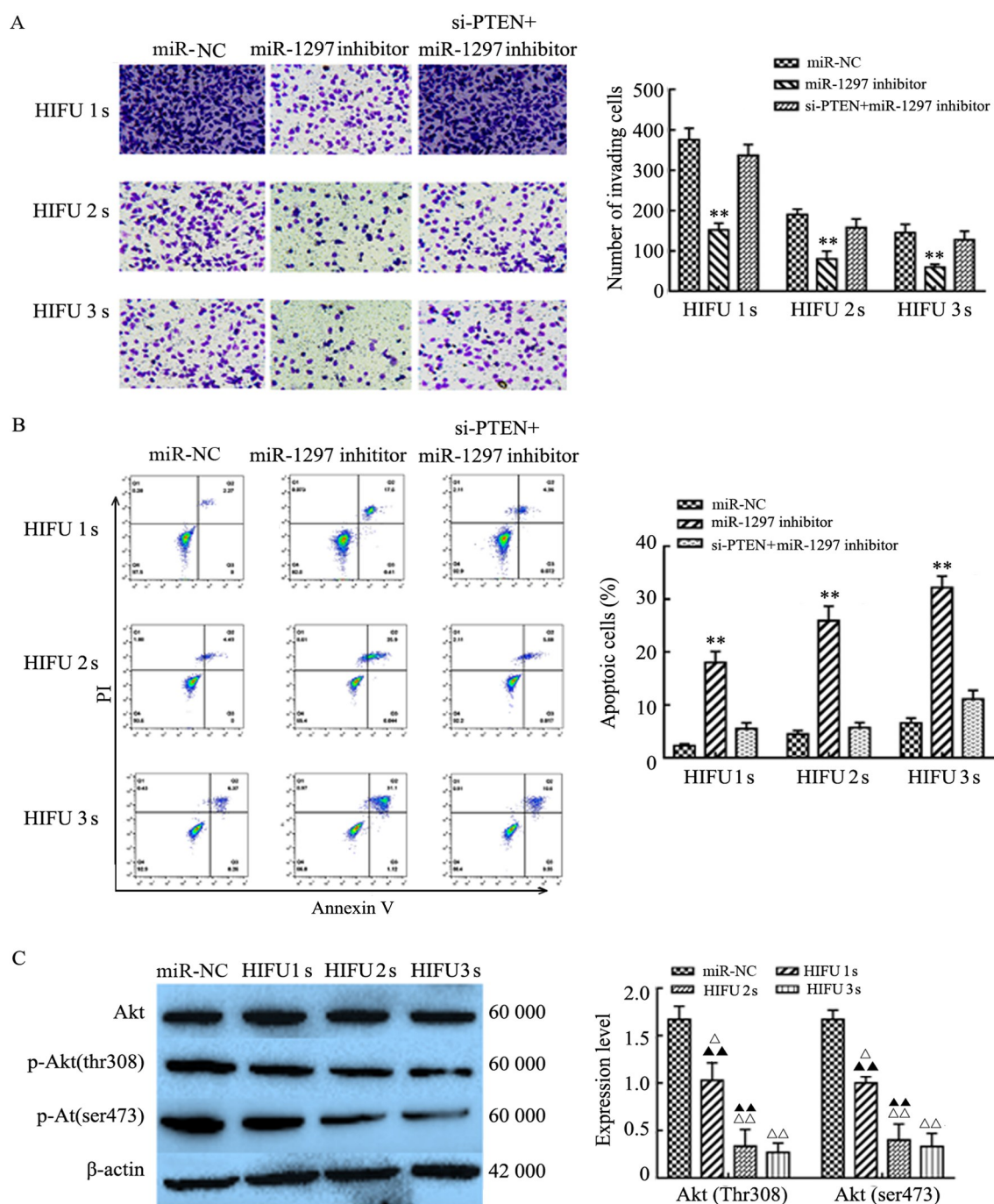


A: The expression of *PTEN* protein was detected by Western blotting;

B: Cell proliferation ability was inhibited in si-miR-1297 by CCK-8 assay

图4 HIFU 通过 miR-1297/*PTEN* 分子轴对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的影响

Fig. 4 HIFU affected cell proliferation via regulating miR-1297/*PTEN* axis



\*\* $P < 0.05$  vs miR-NC or siPTEN+miR1297 inhibitor group;

$\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs miR-NC group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs HIFU 3 s group

A: The migration ability of PANC-1 was inhibited in si-miR-1297 by Transwell assay ( $\times 100$ ); B: The percentage of apoptosis cells was promoted in si-miR-1297 by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry; C: The expression of Akt, p-Akt (Thr308) and p-Akt (Ser473) was detected by Western blotting

图5 HIFU通过 miR-1297/PTEN 分子轴对胰腺癌 PANC-1 细胞侵袭和凋亡的影响

Fig. 5 HIFU affected cell invasion and promoted apoptosis via regulating miR-1297/PTEN axis

预示, HIFU 可能通过调控 mRNA 或蛋白进而抑制肿瘤的发生发展。本研究结果发现, HIFU 处理胰腺癌 PANC-1 细胞后可以显著上调抑癌基因 *PTEN* 和抑制 miR-1297 的表达水平。miRNAs 是一类内源性非编

码单链 RNA 分子, 大约由 19~23 个核苷酸组成。人体中约有 30% 的蛋白编码基因受 miRNAs 的调控, 近年来成为生命科学领域的研究热点。研究<sup>[16]</sup>表明, miR-221 通过靶向下调 SOCS3 抑制胰腺癌细胞的增

殖能力。LI等<sup>[17]</sup>研究证实,miR-449a作为抑癌基因通过靶向下调ATDC抑制胰腺癌发生发展进程。此外,还有miR-455-3p<sup>[18]</sup>、miR-23b-3p<sup>[19]</sup>和miR-374-5p<sup>[20]</sup>等miRNA对胰腺癌具有调控作用。近期研究<sup>[21]</sup>表明,miR-1297通过靶向下调MTDH抑制胰腺癌细胞增殖和迁移。同时,PTEN基因是参与人类肿瘤相关性较高的一种抑癌基因。普遍认为PTEN的杂合性丢失、突变、启动子甲基化以及miRNA调控是PTEN参与胰腺癌的原因<sup>[22]</sup>。为此,本研究探究了miR-1297/PTEN分子轴参与HIFU介导胰腺癌细胞生物学行为的作用机制,结果显示沉默miR-1297可以通过靶向上调PTEN抑制胰腺癌细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡,该结果与miR-1297/PTEN分子轴介导非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>、乳腺癌<sup>[10]</sup>和子宫颈癌<sup>[23]</sup>进程的作用机制一致。

此外,PTEN能负调控Akt,降低Akt磷酸化水平,而激活Akt通路能促进胰腺癌细胞增殖和迁移<sup>[24-25]</sup>。笔者推测,起作用机制可能是PTEN具有磷酸酶活性,使第二信使PIP3在肌糖环3位置脱去磷酸磷脂酰肌醇,从而生成PIP2,降低Akt的磷酸化水平。Akt可是糖原合酶激酶3 $\beta$ 磷酸化失活,从而提高糖原合酶激酶3 $\beta$ 抑制转录因子Slug的活性,进一步抑制细胞迁移和侵袭。此外,对于这部分机制,将是本课题组后续研究的重点。

综上所述,本研究揭示了HIFU可以显著抑制胰腺癌PANC-1细胞增殖、迁移能力并促进其凋亡。此外,HIFU通过下调PANC-1细胞miR-1297对抑癌基因PTEN的抑制作用并阻断Akt信号通路,进而抑制胰腺癌PANC-1细胞增殖、迁移和促进细胞凋亡。本研究将为寻找合适的胰腺癌治疗方式以及预测疾病进展、转移及预后提供了理论基础,为HIFU在分子水平探讨肿瘤发生发展的机制提供了良好的启示,同时为胰腺癌的治疗提供更多的实验依据。

## 【参 考 文 献】

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015,65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.
- [2] MARINOVA M, HUXOLD H C, HENSELER J, et al. Clinical effectiveness and potential survival benefit of US-guided high-intensity focused ultrasound therapy in patients with advanced-stage pancreatic cancer[J/OL]. Ultraschall Med, 2018,2018: Epub ahead of print [2018-05-20]. <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/a-0591-3386>. DOI: 10.1055/a-0591-3386.
- [3] APFELBECK M, CLEVERT D A, RICKE J, et al. Contrast enhanced ultrasound (CEUS) with MRI image fusion for monitoring focal therapy of prostate cancer with high intensity focused ultrasound (HIFU)I[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2018, 69(1/2): 93-100. <https://content.iospress.com/articles/clinical-hemorheology-and-microcirculation/ch189123>. DOI: 10.3233/CH-189123.
- [4] HUNDT W, YUH E L, STEINBACH S, et al. Effect of continuous high intensity focused ultrasound in a squamous cell carcinoma tumor model compared to muscle tissue evaluated by MRI, histology, and gene expression[J]. Technol Cancer Res Treat, 2009, 8(2): 85-98. DOI: 10.1177/153303460900800201.
- [5] ZHANG M, LIU L, WANG J, et al. Effects of high-intensity focused ultrasound for treatment of abdominal lymph node metastasis from gastric cancer[J]. J Ultrasound Med, 2015, 34(3): 435-340. DOI: 10.7863/ultra.34.3.435.
- [6] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355. DOI: 10.1038/nature02871.
- [7] GIBORI H, ELIYAHU S, KRIVITSKY A, et al. Amphiphilic nano-carrier-induced modulation of PLK1 and miR-34a leads to improved therapeutic response in pancreatic cancer[J/OL]. Nat Commun, 2018, 9(1): 16[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5750234/>. DOI: 10.1038/s41467-017-02283-9.
- [8] AZMI A S, LI Y, MUQBIL I, et al. Exportin 1 (XPO1) inhibition leads to restoration of tumor suppressor miR-145 and consequent suppression of pancreatic cancer cell proliferation and migration[J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(47): 82144-82155[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669877/>. DOI: 10.18632/oncotarget.19285.
- [9] BU W, LUO T. miR-1297 promotes cell proliferation of non-small cell lung cancer cells: involving in PTEN/Akt/Skp2 signaling pathway[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(11): 976-982. DOI: 10.1089/dna.2017.3886.
- [10] LIU C, LIU Z, LI X, et al. MicroRNA-1297 contributes to tumor growth of human breast cancer by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling[J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2435-2443. DOI: 10.3892/or.2017.5884.
- [11] LI X, WANG H L, PENG X, et al. miR-1297 mediates PTEN expression and contributes to cell progression in LSCC[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427(2): 254-260. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.025.
- [12] YANG N Q, LUO X J, ZHANG J, et al. Crosstalk between Meg3 and miR-1297 regulates growth of testicular germ cell tumor through PTEN/PI3K/AKT pathway[J/OL]. Am J Transl Res, 2016,8(2): 1091-1099[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846952/>.
- [13] GHAI S, PERLIS N, LINDNER U, et al. Magnetic resonance guided focused high frequency ultrasound ablation for focal therapy in prostate cancer-phase 1 trial[J/OL]. Eur Radiol, 2018,2018: Epub ahead of print[2018-05-20]. <http://link.springer.com/journal/330>. DOI: 10.1007/s00330-018-5409-z.
- [14] PEEK M C L, WU F. High-intensity focused ultrasound in the treatment of breast tumours[J/OL]. Ecancermedalscience, 2018, 12: 794[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5804717/>. DOI: 10.3332/ecancer.2018.794.
- [15] D'SOUZA A L, CHEVILLET J R, GHANOUNI, et al. Tumor characterization by ultrasound-release of multiple protein and microRNA biomarkers, preclinical and clinical evidence[J/OL]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194268[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5856340/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0194268.
- [16] XIE J, WEN J T, XUE X J, et al. MiR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells via down regulation of SOCS3[J]. Eur Rev

- Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7): 1914-1921. DOI: 10.26355/eur-rev\_201804\_14714.
- [17] LI F, LIANG J, BAI L. MicroRNA-449a functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by the epigenetic regulation of ATDC expression[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 782-789[2018-05-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332218312836>. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.101.
- [18] ZHAN T, HUANG X, TIAN X, et al. Downregulation of microRNA-455-3p links to proliferation and drug resistance of pancreatic cancer cells via targeting TAZ[J/OL]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 10: 215-226[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862130/>. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.12.002.
- [19] HE R Q, WU P R, XIANG X L, et al. Downregulated miR-23b-3p expression acts as a predictor of hepatocellular carcinoma progression: a study based on public data and RT-qPCR verification[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2813-2831. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3513.
- [20] SUN D, WANG X, SUI G, et al. Downregulation of miR-374b-5p promotes chemotherapeutic resistance in pancreatic cancer by up-regulating multiple anti-apoptotic proteins[J/OL]. Int J Oncol, 2018, 52(5): 1491-1503[2018-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5873836/>. DOI:10.3892/ijo.2018.4315.
- [21] CHEN Z, MA Y, PAN Y, et al. MiR-1297 suppresses pancreatic cancer cell proliferation and metastasis by targeting MTDH[J/OL]. Mol Cell Probes, 2018, 40: 19-26[2018-05-31]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890-8508\(18\)30026-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890-8508(18)30026-4). DOI: 10.1016/j.mcp.2018.06.003.
- [22] SOUBANI O, ALI A S, LOGNA F, et al. Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(8): 1563-1571. DOI: 10.1093/carcin/bgs189.
- [23] CHEN Z, ZHANG M, QIAO Y, et al. MicroRNA-1297 contributes to the progression of human cervical carcinoma through PTEN[J/OL]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 19: 1-7[2018-05-31]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21691401.2018.1479711?journalCode=ianb20>. DOI:10.1080/21691401.2018.1479711.
- [24] MENG Q, SHI S, LIANG C, et al. Abrogation of glutathione peroxidase-1 drives EMT and chemoresistance in pancreatic cancer by activating ROS-mediated Akt/GSK3beta/Snail signaling[J/OL]. Oncogene, 2018, 2018: Epub ahead of print[2018-05-31]. <https://www.nature.com/articles/s41388-018-0392-z>. DOI: 10.1038/s41388-018-0392-z.
- [25] WANG S, LEI Y, CAI Z, et al. Girdin regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells via the PI3K/Akt signalling pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 40(2): 599-608. DOI: 10.3892/or.2018.6469.

[收稿日期] 2018-05-21

[修回日期] 2018-08-10

[本文编辑] 党瑞山