

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.007

· 基础研究 ·

miR-429通过下调 *PTEN* 并激活 PI3K/AKT 信号通路促进胰腺癌 PANC-1 细胞对卡培他滨耐药

何平, 王平, 熊隆信(南昌市第一医院 普外一科, 江西 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探讨 miR-429 靶向 *PTEN* 并通过 PI3K/AKT 信号通路调控胰腺癌 PANC-1 细胞对卡培他滨的耐药性及其作用机制。**方法:**建立胰腺癌卡培他滨耐药细胞株 PANC-1/CAP 后,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 实验检测 miR-429 和 *PTEN* 在胰腺癌细胞中的表达情况,平板克隆形成实验、CCK-8 法和 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测敲降 miR-429 对胰腺癌卡培他滨耐药细胞株 PANC-1/CAP 细胞增殖、凋亡和卡培他滨耐药性的影响,双荧光素酶报告基因验证 miR-429 与 *PTEN* 的靶向关系,Western blotting 实验进一步检测 miR-429 对 *PTEN*-PI3K/AKT 信号通路的调控作用。**结果:**miR-429 在胰腺癌 PANC-1 细胞和 PANC-1/CAP 细胞中的表达水平高于人胰腺导管上皮细胞(HPDE6-C7) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),敲降 miR-429 可显著抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖活力、促进细胞凋亡及下调细胞卡培他滨耐药性,且双荧光素酶报告基因证实 miR-429 靶向作用 *PTEN* 并下调其表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);敲降 miR-429 可通过靶向上调 *PTEN* 并阻断 PI3K/AKT 信号通路进而显著抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖活力,从而下调 PANC-1/CAP 细胞对卡培他滨的耐药性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**miR-429/*PTEN*-PI3K、AKT 信号通路与胰腺癌卡培他滨耐药性存在调控关系,且敲降 miR-429 可逆转 PANC-1/CAP 对卡培他滨的耐药性。

[关键词] 胰腺癌; PANC-1 细胞; 卡培他滨; miR-429; PI3K/AKT 信号通路

[中图分类号] R735.9; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1251-08

miR-429 promotes capecitabine-resistance in pancreatic cancer PANC-1 cells by down-regulating *PTEN* and activating PI3K/AKT signaling pathway

HE Ping, WANG Ping, XIONG Longxin (First Department of General Surgery, the First Hospital of Nanchang City, Nanchang 330006, Jiangxi, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of miR-429 targeting *PTEN* to affect capecitabine-resistance in pancreatic cancer PANC-1 cells through the PI3K/AKT signaling pathway. **Methods:** Capecitabine-resistant pancreatic cancer cell line PANC-1/CAP was constructed, and the expression of miR-429 and *PTEN* were detected by quantitative Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. The effect of miR-429 knock-down on cell proliferation viability, apoptosis and capecitabine-resistance was measured by colony formation assay, CCK-8 assay and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry assay, respectively. Subsequently, dual luciferase reporter assay verified that *PTEN* was a target gene of miR-429. Furthermore, the effect of miR-429 on *PTEN*-PI3K/AKT signaling pathway was measured by Western blotting. **Results:** miR-429 was found to be up-regulated in PANC-1 cells and PANC-1/CAP cells compared with the non-malignant pancreatic ductal cell line (HPDE6-C7) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, silencing of miR-429 significantly decreased cell proliferation viability, capecitabine-resistance and enhanced apoptosis of PANC-1/CAP cells; additionally, dual luciferase reporter assay confirmed that *PTEN* was a target of miR-429 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Suppression of miR-429 up-regulated *PTEN* and blocked the PI3K/AKT signaling pathway to decrease cell proliferation viability and further reduce the capecitabine-resistance of PANC-1/CAP cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-429/*PTEN*-PI3K/AKT signaling pathway plays a certain role in regulating the capecitabine-resistance of pancreatic cancer, and inhibition of miR-429 expression may reverse the resistance of PANC-1/CAP to capecitabine.

[Key words] pancreatic cancer; PANC-1 cell; capecitabine; miR-429; PI3K/AKT signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1251-1258. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.007]

[作者简介] 何平(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的基础和临床研究,E-mail:375022711@qq.com

[通信作者] 熊隆信(XIONG Longxin, corresponding author),硕士,副主任医师,主要从事胃肠肿瘤的基础和临床研究,E-mail:jgshp2008@163.com

胰腺癌是一种发生在消化道、恶性程度高以及5年预后性极差的恶性肿瘤之一。胰腺癌发病率和患病率逐年上升,好发于40岁以上的男性人群,严重的影响人们的生命健康^[1-2]。目前,临床上主要采用化疗来延长胰腺癌患者的生存期,但胰腺癌细胞对化疗药物容易产生继发性耐药性导致化疗后胰腺癌病灶残留,使得预期无法达到,甚至治疗失败^[3-4]。近年来,microRNA(miRNA)作为mRNA翻译的调控者,与多种肿瘤的发生发展密切相关。有研究^[5-7]显示,miR-429参与肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡过程,但是其调控胰腺癌细胞化疗药物耐药性的作用机制尚无相关报道。为此,本研究通过检测miR-429和PTEN在胰腺癌细胞系中的表达情况,并深入探讨miR-429通过调控PTEN介导胰腺癌细胞耐药性的分子机制,为改善胰腺癌临床治疗耐药以及患者预后提供更多的实验依据。

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、BXPC-3和ASPC-1)和人胰腺导管上皮细胞(HPDE6-C7)均购自中科院上海细胞研究所。miR-429和PTEN的siRNAs购自上海吉玛公司,DMEM、胎牛血清均购自美国Biological Industries公司,青霉素、链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,Annexin V-FITC双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司,高纯度总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,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,免疫印迹一抗和二抗均购于购自美国CST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,超速冷冻离心机、电泳槽均购自北京六一生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人胰腺癌细胞株(PANC-1、BXPC-3和ASPC-1)和人胰腺导管上皮细胞(HPDE6-C7)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℃、5%CO₂培养箱中常规培养。

1.3 胰腺癌卡培他滨耐药细胞株的建立

取对数生长期PANC-1细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,采用卡培他滨开始作用浓度为1 μg/ml,连续刺激48 h,弃去培养上清液;加入不含卡培他滨的新鲜的DMEM培养液继续培养,待细胞恢复正常生长后(3~6 d),消化传代,再用含终质量浓度为1.0 μg/ml的卡培他滨培养液连续作用细胞48 h。如此反复换液、传代,逐步提高卡培他滨的作用浓度,最终历

时6个月建立了可以在含有60 μg/ml的卡培他滨培养液中稳定传代的耐药细胞株PANC-1/CAP细胞。

1.4 细胞转染

选取对数生长期PANC-1/CAP细胞,采用胰酶消化后,再利用DMEM培养基调整密度为 1×10^5 个/ml。然后,将细胞接种到6孔板,每孔添加2 ml细胞悬液,并于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h,随后进行miR-429 inhibitor和PTEN siRNA转染,其转染方法参考Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书,转染48 h后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成

细胞放疗后,将6孔板置于细胞培养箱中,继续培养2周。当出现肉眼可见的细胞克隆时,终止培养,弃去培养液,PBS小心浸洗3次,干燥后,加4%多聚甲醛固定30 min,再用PBS清洗3次,加入1%结晶紫染色10 min。用PBS缓慢洗去染色液,空气干燥后用肉眼直接计算克隆数(≥ 50 个细胞的为1个克隆)。平板克隆形成率(%)=形成克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.6 CCK-8法检测PANC-1/CAP细胞的增殖

将处于对数生长期的PANC-1/CAP细胞接种于96孔板,每孔含细胞 1×10^4 个,每孔含培养基100 μl。于待检测前1 h,向每孔加入10 μl CCK-8溶液(不要在孔中生成气泡)。将培养板在培养箱内孵育1~4 h。用酶标仪测定波长在450 nm处的光密度(D)值。实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测PANC-1/CAP细胞的凋亡

选取转染组和未转染组PANC-1/CAP细胞并培养至对数生长期,PBS清洗2次,均匀地混合细胞与500 μl预冷的 $1 \times$ 结合缓冲液、5 μl Annexin-V-FITC,室温避光孵育15 min,然后在上机前5 min再加入2.5 μl PI染色,流式细胞仪检测PANC-1/CAP细胞的凋亡情况。凋亡率(%)=早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。实验重复3次。

1.8 qRT-PCR检测胰腺癌细胞中miR-429和PTEN mRNA的表达水平

采用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qRT-PCR反应,以U6为内参基因。引物序列见表1。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、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μl。PCR反应条件:第1步,95℃、5 min;第2步,95℃、10 s,60℃、20 s,72℃、20 s,进行40个循环;第3步,78℃、20 s(收集荧光强度)。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。实验重复3次。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab. 1 Sequence of qRT-PCR primers

Gene	Primer sequence
<i>U6</i>	F: 5'-GATTCTCCCTCATCGCTTACAG-3' R: 5'-CTGCTTCATGATCGTTGTTGCTTG-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' R: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
<i>PTEN</i>	F: 5'-CTGCAGAAAGACTTGAAGGCG-3' R: 5'-CACCAGTTCGTCCCTTCCA-3'
miR-429	F: 5'-GGAAGATGAGGAGGTCGCTG-3' R: 5'-GACTTGACTGGAAGGGTGGG-3'

1.9 Western blotting 检测 miR-429 和 PTEN 蛋白的表达水平

提取蛋白后,依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后,加热至 95 °C,维持 10 min。每孔样品的载药量是 30 μg,添加 10% 的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳的电压控制在 80~120 V,湿式转运和转膜的压力控制在 100 mV,持续 45~70 min。在聚偏二氟乙烯转膜后,蛋白密封于 5% 的牛血清蛋白中维持 1 h,再向其中加入一抗,4 °C 下过夜培养。洗膜缓冲液冲洗蛋白 3 次,每次 5 min,随后加入二抗,温室中培养 1 h。再洗膜 3 次后,加入化学发光试剂显影蛋白。GAPDH 用作内参, Bio-rad Gel DoleZ 成像器用来成像蛋白,采用 Image J 软件分析靶带的灰度水平。

1.10 双荧光素酶报告基因验证 miR-429 与 PTEN 的靶向关系

首先将 miR-429 的候选靶基因 *PETN* 3' UTR 靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体 pcDNA-EGFP-pre-miR-429 与其靶基因 *PTEN* 验证载体 pmirGLO-miR-429-PTEN 3' UTR 共转染到 293T 细胞,并设置空质粒载体与 miR-429 表达载体共转染对照。具体方法为:在 24 孔板中,每孔细胞转染 pmir-GLO-miRNA - 基因 3' UTR 200 ng、pcDNA - EGFP-pre-miRNA 600 ng 及阴性对照 30 ng。50 μl Opti-MEM I 培养基稀释 2 μl Lipofectamine™ 2000 试剂后室温孵育 5 min;混合需转染的 DNA 和稀释的 Lipofectamine™ 2000,室温孵育 20 min 后直接将复合物加到含 0.4 ml Opti-MEM I 培养基的细胞中,轻轻摇动培养板混匀;在 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 8 h 后换 0.5 ml 含 10% 胎牛血清,不含抗生素的正常 DMEM 培养基,在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h,收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书要求操作,采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。

1.11 Western blotting 检测 miR-429 对 PTEN-PI3K/AKT 信号通路的调控作用

提取蛋白后,以 SDS-PAGE 分离蛋白,转膜。蛋白密封于 5% 的牛血清蛋白中维持 1 h,再加入一抗(抗 AKT 抗体和 p-AKT 抗体),4 °C 下过夜。洗膜 3 次,每次 5 min,随后加入二抗,温室中 1 h。洗膜 3 次后,加入发光试剂显影蛋白。GAPDH 用作内参,采用 Image J 软件分析靶带的灰度水平。

1.12 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件, GraphPad Prism 7 对实验数据进行相关图片的绘制。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间的均数比较采用单因素方差分析,组内的两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

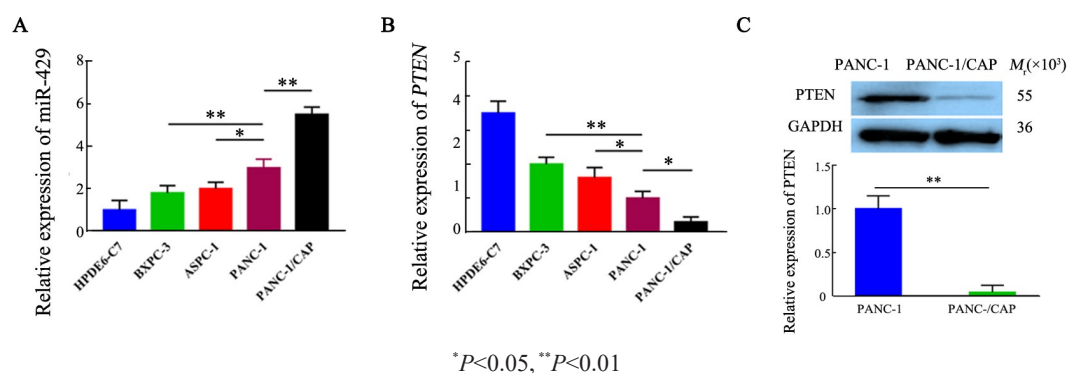
2.1 miR-429 和 PTEN 在胰腺癌细胞和卡培他滨耐药细胞中的表达水平

qRT-PCR 和 Western blotting 检测 miR-429 和 *PTEN* 在胰腺癌细胞系中的表达水平。qRT-PCR 检测结果(图 1A)显示,miR-429 在胰腺癌细胞 PANC-1 中的表达水平明显高于胰腺癌细胞系(BXPC-3 和 ASPC-1)和人正常胰腺导管上皮细胞(HPDE6-C7) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且卡培他滨耐药 PANC-1/CAP 细胞中 miR-429 表达水平明显高于 PANC-1 细胞 ($P < 0.01$)。此外,qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果均证实,*PTEN* 在胰腺癌 PANC-1 和 PANC-1/CAP 细胞中的表达水平明显低于 BXPC-3、ASPC-1 和 HPDE6-C7 细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1B),且在卡培他滨耐药细胞 PANC-1/CAP 中的表达水平低于 PANC-1 细胞 ($P < 0.05$,图 1C)。由此可知,miR-429 和 *PTEN* 的异常表达可能与胰腺癌细胞卡培他滨耐药性有关,并选择 PANC-1/CAP 细胞进行后续研究。

2.2 敲降 miR-429 可上调 PANC-1/CAP 细胞对卡培他滨药物敏感性并抑制细胞增殖活力

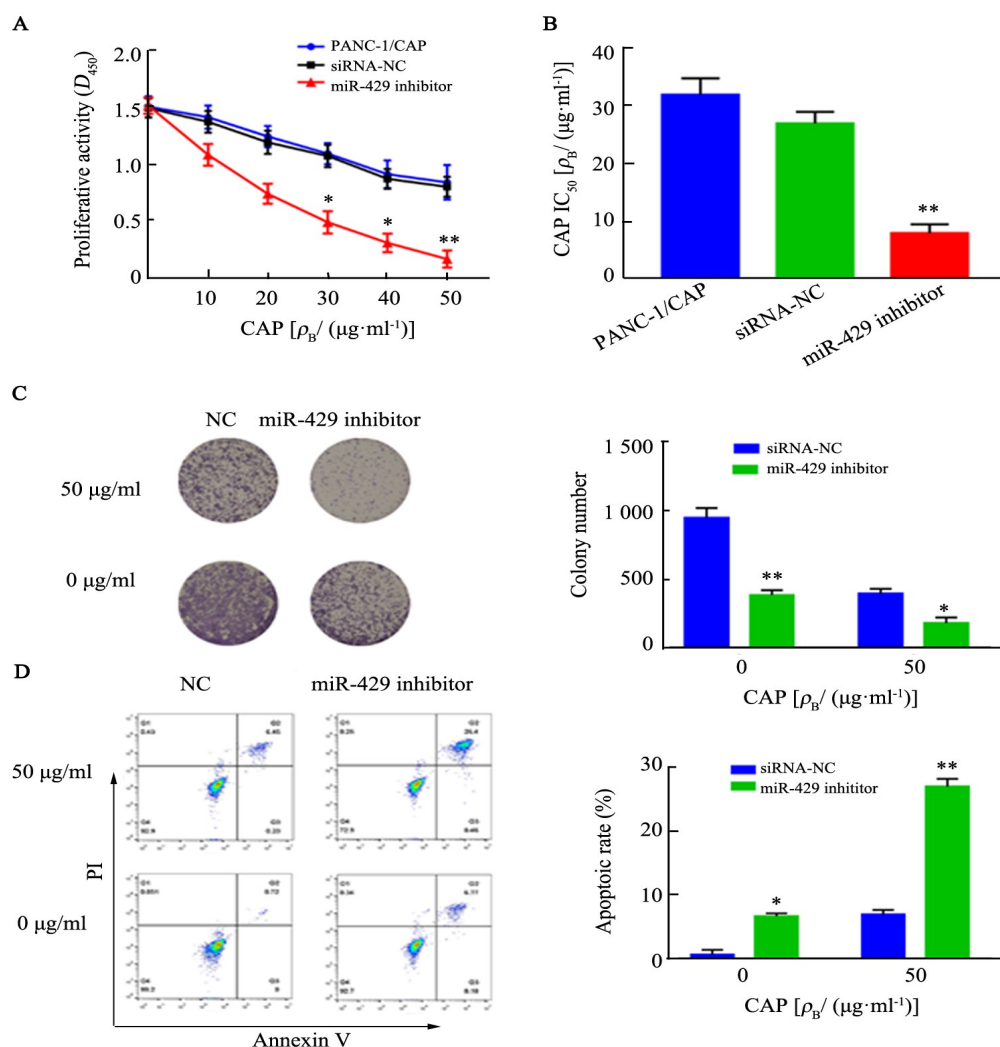
基于 miR-429 在胰腺癌卡培他滨耐药细胞株 PANC-1/CAP 中高表达,进一步探讨 miR-429 对 PANC-1/CAP 细胞卡培他滨耐药性及细胞生物学行为的影响。CCK-8 检测结果(图 2A、B)显示,在不同质量浓度(10、20、30、40、50 μg/ml)的卡培他滨作用下,敲降 miR-429 后可显著抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。平板克隆形成实验检测结果(图 2C)表明,敲降 miR-429 后可显著抑制 PANC-1/CAP 细胞在 50 μg/ml 卡培他滨药物作用下的克隆形成活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外,流式细胞术检测结果(图 2D)显示,敲降 miR-429 后可显著

促进 PANC-1/CAP 细胞凋亡 ($P < 0.01$)。由此可见, 敲降 miR-429 可显著抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖和对卡培他滨耐药性, 同时促进细胞凋亡。



A: Expression of miR-429 was detected by qRT-PCR; B: Expression of *PTEN* was detected by qRT-PCR; C: Expression of *PTEN* was measured by Western blotting.

图1 miR-429 和 *PTEN* mRNA 和蛋白在胰腺癌细胞系中的表达水平
Fig. 1 Expression levels of miR-429 and *PTEN* mRNA and protein in pancreatic cancer cell lines



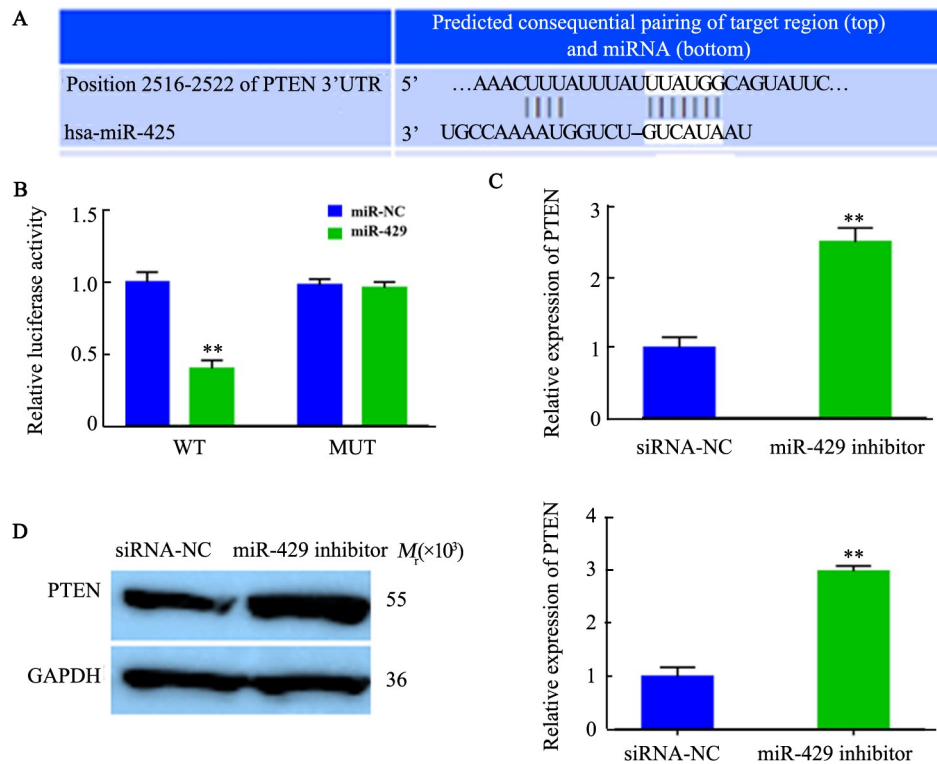
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs siRNA-NC or PANC-1/CAP group
A: Cell proliferation viability was measured by CCK-8 assay; B: The reported values were the IC_{50} of three independent experiments; C: Effects of down-regulating miR-429 on the clone formation of cells treated with or without CAP (50 $\mu\text{g/ml}$); D: PANC-1/CAP cells transfected with miR-429 inhibitor resulted in increased apoptosis rate compared with anti-miR-NC

图2 敲降 miR-429 可上调 PANC-1/CAP 细胞对卡培他滨敏感性和抑制细胞增殖活力
Fig.2 Down-regulation of miR-429 enhanced chemosensitivity and reduced proliferation of PANC-1/CAP cells

2.3 PTEN是miR-429的靶基因并接受其负调控

通过生物信息学数据库 TargetScan 对 miR-429 的靶基因进行了预测,发现 *PTEN* 是 miR-429 的候选靶基因,采用荧光素酶报告基因验证实验发现,miR-429 可以结合 *PTEN* 的 3' UTR(图 3A),并且 miR-429 可以负调控 *PTEN* 的表达($P<0.01$,图 3B)。同时,采

用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 miR-429 过表达后对 *PTEN* mRNA 和蛋白表达水平的影响,结果(图 3C、D)显示,miR-429 敲降后可显著促进 *PTEN* 在 PANC-1/CAP 细胞中的表达水平($P<0.01$)。由此可知,*PTEN* 是 miR-429 的靶基因,并且 miR-429 可负调控 *PTEN* 的表达。



** $P<0.01$ vs miR-NC or siRNA-NC group

A: The bioinformatics analysis showed that miR-429 had a binding site with *PTEN*; B: The luciferase activity in *PTEN*-WT cells transfected with miR-429 was lower than that in miR-NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C-D: The expression of *PTEN* mRNA and protein was measured by qRT-PCR and Western blotting.

图3 *PTEN*是miR-429靶向作用基因

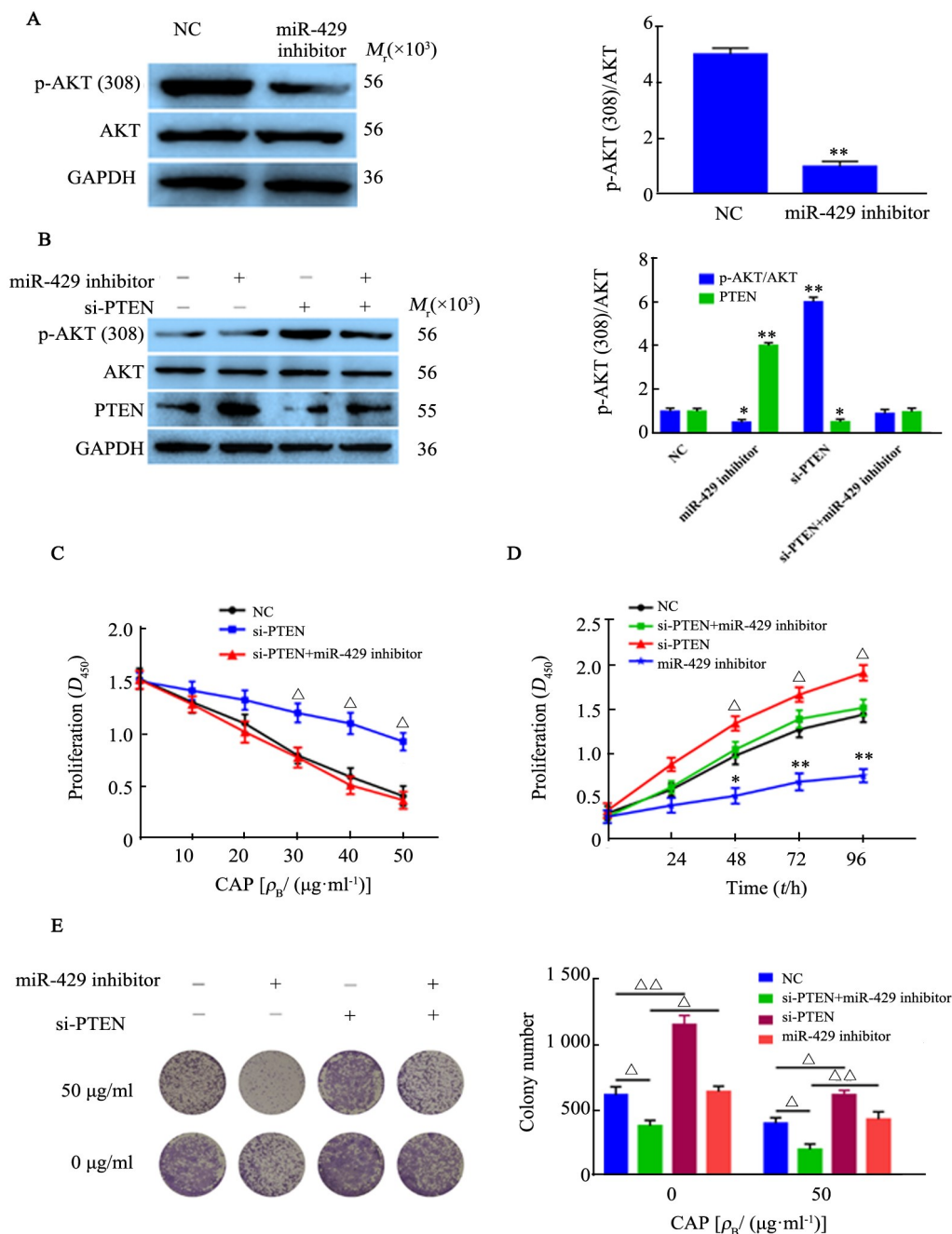
Fig. 3 *PTEN* was the target gene of miR-429

2.4 敲降miR-429通过PTEN-PI3K/AKT信号通路下调PANC-1/CAP对卡培他滨的耐药性及增殖活性

为了进一步明确 miR-429 通过靶向调控 *PTEN* 对胰腺癌 PANC-1/CAP 细胞卡培他滨耐药性的作用机制。采用 Western blotting 检测在 PANC-1/CAP 细胞中沉默 miR-429 的表达对 PI3K/AKT 信号通路的影响,结果(图 4A)显示,AKT(308)的磷酸化水平明显降低($P<0.01$)。同时敲降 miR-429 和 *PTEN* 后,Western blotting 检测结果(图 4B)显示,在 PANC-1/CAP 细胞中仅转染 si-PTEN 可显著上调 AKT(308)磷酸化水平及抑制 *PTEN* 的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而同时转染 miR-429 inhibitor 和 *PTEN* siRNA 后 AKT(308)的磷酸化水平和 *PTEN* 的表达与对照组无显著

差异($P>0.05$)。进一步采用 CCK-8 法和平板克隆形成实验检测在 0 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 的卡培他滨药物作用下 PANC-1/CAP 细胞增殖活力和细胞克隆形成能力。CCK-8 法检测结果(图 4C、D)显示,沉默 *PTEN* 的表达可显著促进 PANC-1/CAP 细胞对卡培他滨的耐药性和细胞克隆形成活力($P<0.05$);平板克隆形成实验结果(图 4E)显示,沉默 *PTEN* 的表达可显著促进细胞增殖活性($P<0.05$),敲降 miR-429 的表达可显著抑制细胞形成克隆数($P<0.05$),而同时沉默 miR-429 和 *PTEN* 的表达与对照组无显著差异($P>0.05$)。由此可知,沉默 miR-429 通过靶向上调 *PTEN* 并阻断 PI3K/AKT 信号通路进而抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖活力和细胞克隆形成数,从而下调胰腺癌细胞对卡培他

滨的耐药性。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs si-PTEN+miR-429 inhibitor or NC group

A: miR-429 inhibitor decreased the levels of p-AKT in PANC-1/CAP cells detected by Western blotting; B: Down-regulation of PTEN blocked the effects induced by miR-429 suppression in PANC-1/CAP cells by Western blotting; C-D: Cell viability was measured by CCK-8 assay; E: The clone formation of cells treated with or without capecitabine (50 $\mu\text{g/ml}$) was analyzed by clone formation assay

图4 miR-429通过PTEN-PI3K/AKT信号通路调控对PANC-1/CAP细胞的增殖及其对卡培他滨耐药性

Fig.4 miR-429 regulates PANC-1/CAP cell proliferation and CAP-resistance through PTEN-PI3K/AKT signaling pathway

3 讨论

胰腺癌是一种恶性程度很高,且诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤。目前,对于胰腺癌治疗主要以化疗为主,但容易产生耐药性,致使治疗失

败,导致患者生存期缩短。有研究^[8-9]报道,miRNA已被证实发生在肿瘤的发生发展进程和耐药中发挥了重要调控作用。本研究结果表明,miR-429在胰腺癌PANC-1和PANC-1/CAP细胞中高表达,同时其在PANC-1/CAP细胞中的表达水平显著高于PANC-1细

胞。然而,目前 miR-429 在胰腺癌卡培他滨耐药性中的作用机制尚不清楚。因此,进一步探讨 miR-429 调控胰腺癌卡培他滨化疗耐药性的下游靶基因,并研究其分子机制,进一步为胰腺癌临床治疗胰腺癌卡培他滨化疗耐药提供更多的实验依据。

本研究发现,敲降 miR-429 可显著抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖和促进细胞凋亡,进而上调 PANC-1/CAP 细胞对卡培他滨的敏感性。有研究^[10]认为, miR-429 通过调控下游靶基因抑制胰腺癌细胞增殖和侵袭能力,进而抑制胰腺癌发展进程。同时, LIN 等^[11]研究发现,过表达 miR-145 通过抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭和促进细胞凋亡,进而下调胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药性;敲降 miR-506 通过靶向上调 SPHK1 并阻断 AKT/NF- κ B 通路进而增强胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性^[12]。CHEN 等^[13]研究证实, miR-181c 通过激活 Hippo 通路促进胰腺癌细胞增殖和化疗药物的耐受性。miRNA 可通过调控下游靶蛋白及信号通路,进而调控胰腺癌细胞增殖和凋亡,从而介导胰腺癌细胞对化疗药物的耐受性,而 miR-429 被报道与胰腺癌细胞吉西他滨耐药性的调控有关^[14-16]。

PTEN 基因是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^[17]。本研究通过生物信息数据库预测发现, *PTEN* 是 miR-429 的下游靶基因,且双荧光素酶报告基因验证结果证实 miR-429 可以结合 *PTEN* 的 3' UTR, miR-429 可以负调控 *PTEN* 的表达。有文献报道^[18-19],敲降 miR-429 通过靶向上调 *PTEN* 抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和诱导凋亡,进而抑制恶性肿瘤的发展进程及转移。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^[20-21]。笔者推测,该机制可能是 *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 β 磷酸化失活,从而提高糖原合酶激酶 3 β 抑制转录因子 Slug 的活性,进一步抑制细胞迁移和侵袭,增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。本研究也证实,沉默 miR-429 可通过靶向上调 *PTEN* 并阻断 PI3K/AKT 信号通路,进而抑制 PANC-1/CAP 细胞增殖活力和细胞克隆形成数,从而增强胰腺癌细胞对卡培他滨的敏感性。

综上所述,本研究阐述了 miR-429 参与调控胰腺癌细胞对卡培他滨的耐药过程。同时,敲降 miR-429 可通过靶向 *PTEN* 并阻断 PI3K/AKT 通路抑制胰腺癌细胞增殖活力,进而促进卡培他滨对胰腺癌细胞的

杀伤作用,揭示了胰腺癌细胞卡培他滨耐药性的相关分子机制,也可能为胰腺癌化疗耐药性提供治疗靶点和分子标志物。

[参考文献]

- [1] SHU X, ZHENG W, YU D, et al. Prospective metabolomics study identifies potential novel blood metabolites associated with pancreatic cancer risk[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(9): 2161-2166. DOI: 10.1002/ijc.31574.
- [2] EFFENBERGER K E, SCHROEDER C, HANSEN A, et al. Improved risk stratification by circulating tumor cell counts in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(12): 2844-2850. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0120.
- [3] GELLER L T, BARZILY-ROKNI M, DANINO T, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine[J]. *Science*, 2017, 357(6356): 1156-1160. DOI:10.1126/science.aah5043.
- [4] FOX R G, LYTLE N K, JAQUISH D V, et al. Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 407-411. DOI:10.1038/nature17988.
- [5] WU C L, HO J Y, HUNG S H, et al. miR-429 expression in bladder cancer and its correlation with tumor behavior and clinical outcome [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(6): 335-340. DOI: 10.1016/j.kjms.2018.01.001.
- [6] CHEN L, XUE Y, ZHENG J, et al. MiR-429 regulated by endothelial monocyte activating polypeptide-II (EMAP-II) influences blood-tumor barrier permeability by inhibiting the expressions of ZO-1, occludin and claudin-5[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11(1): 35-41. DOI:10.3389/fnmol.2018.00035.
- [7] GUO C, ZHAO D, ZHANG Q, et al. miR-429 suppresses tumor migration and invasion by targeting CRKL in hepatocellular carcinoma via inhibiting Raf/MEK/ERK pathway and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2375-2380. DOI: 10.1038/s41598-018-20258-8.
- [8] ZHAO M, LUO R, LIU Y, et al. miR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-modulated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(111): 11309-11315. DOI:10.1038/ncomms11309.
- [9] NAPOLI M, VENKATANARAYAN A, RAULJI P, et al. Np63 / DGCR8-dependent micRNAs mediate therapeutic efficacy of HDAC inhibitors in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 874-888. DOI:10.1016/j.ccell.2016.04.016.
- [10] LIU D, SONG L, GUAN H, et al. miR-429 suppresses neurotrophin-3 to alleviate perineural invasion of pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. pii: S0006-291X(18)32080-1. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.147.
- [11] LIN Y, GE X, WEN Y, et al. MiRNA-145 increases therapeutic sensitivity to gemcitabine treatment of pancreatic adenocarcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 70857-70868. DOI:10.18632/oncotarget.12268.
- [12] LI J, WU H, LI W, et al. Downregulated miR-506 expression facilitates pancreatic cancer progression and chemoresistance via

- SPHK1/AKT/NF- κ B signaling[J]. *Oncogene*, 2016, 35(42): 5501-5514. DOI:10.1038/onc.2016.90.
- [13] CHEN M, WANG M, XU S, et al. Upregulation of miR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44466-44479. DOI:10.18632/oncotarget.6298.
- [14] YU G, JIA B, CHENG Y, et al. MicroRNA-429 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine through regulation of PDCD4[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 5048-5055.
- [15] 江森, 郑希, 何燕, 等. 乌苏酸联合吉西他滨对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(3): 252-257. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.007.
- [16] 张美静, 王斌, 湛先保. 胰腺癌免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(3): 288-292. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.013.
- [17] 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]. *Int J Oncol*, 2018, 52(5): 1491-1503. DOI:10.3892/ijo.2018.4315.
- [18] YONEYAMA K, ISHIBASHI O, KAWASE R, et al. miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(3): 1401-1410.
- [19] LANG Y, XU S, MA J, et al. MicroRNA-429 induces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer cells and targets multiple tumor suppressor genes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 154-159. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.084.
- [20] 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]. *Oncogene*, 2018, 37(44): 5843-5857. DOI: 10.1038/s41388-018-0392-z.
- [21] WANG S, LEI Y, CAI Z, et al. Girdin regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 599-608. DOI: 10.3892/or.2018.6469.

[收稿日期] 2018-07-14

[修回日期] 2018-11-02

[本文编辑] 王映红