

本文引用:黄亚兰,赖柏安,杨玲,等.微RNA-342-3p/末端尿苷酰转移酶1/凝血酶敏感素-2通路在胰腺导管腺癌中的作用及机制[J].新乡医学院学报,2022,39(12):1119-1126. DOI:10.7683/xxxyxb.2022.12.004.

### 【基础研究】

# 微 RNA-342-3p/末端尿苷酰转移酶 1/凝血酶敏感素-2 通路在胰腺导管腺癌中的作用及机制

黄亚兰, 赖柏安, 杨 玲, 张薇珊, 罗 婷  
(遂宁市中心医院病理科, 四川 遂宁 629000)

**摘要:** **目的** 探讨微 RNA(miR)-342-3p/末端尿苷酰转移酶 1(TUT1)/凝血酶敏感素-2(THBS2)通路在胰腺导管腺癌中的作用及 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 表达与患者临床病理学参数的关系。**方法** 选择 2008 年 5 月至 2021 年 3 月在遂宁市中心医院行根治性手术切除的胰腺导管腺癌标本( $n=80$ )和对应癌旁正常组织标本( $n=20$ )为研究对象。采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测胰腺导管腺癌组织和癌旁正常组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 的表达。将对数生长期人胰腺导管腺癌细胞株 PANC-1 细胞分为对照组(转染 miR-NC)、miR-342-3p 过表达组(转染 miR-342-3p mimic)、miR-342-3p 抑制剂组(转染 miR-342-3p inhibitor)、Vector 组(转染 pCS4-HA vectors)、TUT1 组(转染 pcDNA3-Flag-TUT1)、阴性对照组(转染 sh-NC 慢病毒载体)、TUT1 沉默组(转染 pGCSH-TUT1 载体)、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组(同时转染 miR-342-3p mimic 和 TUT1)、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组(同时转染 miR-342-3p mimic 和 THBS2)、TUT1 + THBS2 组(同时转染 pcDNA3-Flag-TUT1 和 THBS2)。采用细胞计数试剂盒-8 检测 10 组细胞的增殖能力,采用流式细胞术检测 10 组细胞的凋亡情况,采用双荧光素酶报告系统检测 miR-342-3p 与 TUT1 的靶向关系,采用 Western blot 法检测对照组、miR-342-3p 过表达组和 miR-342-3p 抑制剂组 PANC-1 细胞中 TUT1、THBS2 蛋白的表达。**结果** 胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 的相对表达量显著低于癌旁正常组织( $P<0.05$ )。不同年龄、不同肿瘤大小、淋巴结是否转移和不同肿瘤分期患者癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );高分化癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达显著高于中 + 低分化癌组织( $P<0.05$ )。培养 0 h 时,各组 PANC-1 细胞的增殖能力比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。培养 24、48、72 h 时,TUT1 组细胞的增殖能力均显著低于 Vector 组,细胞的凋亡率显著高于 Vector 组( $P<0.05$ )。培养 24、48、72 h 时,TUT1 沉默组细胞的增殖能力显著高于阴性对照组,细胞凋亡率显著低于阴性对照组( $P<0.05$ )。培养 24、48、72 h 时,miR-342-3p 抑制剂组的细胞增殖能力显著高于对照组( $P<0.05$ ),miR-342-3p 过表达组的细胞增殖能力显著低于对照组( $P<0.05$ )。培养 24 h 时,miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组与 miR-342-3p 过表达组的细胞增殖能力比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。培养 48、72 h 时,miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组的细胞增殖能力均显著低于 miR-342-3p 过表达组( $P<0.05$ )。miR-342-3p 抑制剂组细胞的凋亡率显著低于对照组( $P<0.05$ ),miR-342-3p 过表达组细胞的凋亡率显著高于对照组( $P<0.05$ )。miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组细胞的凋亡率显著高于 miR-342-3p 过表达组( $P<0.05$ )。miR-342-3p 过表达组细胞中野生型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性显著高于对照组( $P<0.05$ ),突变型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。miR-342-3p 过表达组细胞中 TUT1 和 THBS2 蛋白的相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ),miR-342-3p 抑制剂组细胞中 TUT1 和 THBS2 蛋白的相对表达量显著低于对照组( $P<0.05$ )。**结论** 激活 miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路可抑制 PANC-1 细胞增殖,促进其凋亡,进而抑制胰腺导管腺癌的发展,miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路有望成为诊治胰腺癌的潜在靶点。

**关键词:** 微 RNA-342-3p;末端尿苷酰转移酶 1;凝血酶敏感素-2;胰腺导管腺癌;临床病理

中图分类号: R735.9 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2022)12-1119-08

## Effect and mechanism of microRNA-342-3p/terminal uridylyl transferase 1/thrombospondin-2 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma

HUANG Yalan, LAI Bo'an, YANG Ling, ZHANG Weishan, LUO Ting

DOI:10.7683/xxxyxb.2022.12.004

收稿日期:2021-06-22

作者简介:黄亚兰(1989-),女,四川遂宁人,硕士,主治医师,研究方向:胰腺导管腺癌的病理学研究。

通信作者:罗 婷(1992-),女,四川遂宁人,硕士,住院医师,研究方向:糖尿病肾病;E-mail:32830402@qq.com

(Department of Pathology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of microRNA (miR)-342-3p/terminal uridylyl transferase 1 (TUT1)/thrombospondin-2 (THBS2) pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma and the relationship between miR-342-3p, TUT1, THBS2 mRNA expression and clinical pathological parameters of patients. **Methods** The specimens of pancreatic ductal adenocarcinoma ( $n = 80$ ) and the corresponding normal adjacent tissues ( $n = 20$ ) resected in Suining Central Hospital from May 2008 to March 2021 were selected as research objects. The expressions of miR-342-3p, TUT1, THBS2 mRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and normal adjacent tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method. Pancreatic ductal adenocarcinoma cell line PANC-1 cells at logarithmic growth stage were divided into control group (transfected with miR-NC), miR-342-3p overexpression group (transfected with miR-342-3p mimic), miR-342-3p inhibitor group (transfected with miR-342-3p inhibitor), Vector group (transfected with pCS4-HA vectors), TUT1 group (transfected with pcDNA3-Flag-TUT1), negative control group (transfected with sh-NC lentivirus vector), TUT1 silence group (transfected with pGCshL-TUT1 vector), miR-342-3p overexpression + TUT1 group (transfected with miR-342-3p mimic and TUT1 simultaneously), miR-342-3p overexpression + THBS2 group (transfected with miR-342-3p mimic and THBS2 simultaneously), TUT1 + THBS2 group (transfected with pcDNA3-Flag-TUT1 and THBS2 simultaneously). The proliferation ability of cells in the ten groups was detected by cell counting kit-8; the apoptosis of cells in the ten groups was detected by flow cytometry; the targeting relationship between miR-342-3p and TUT1 was verified and analyzed by luciferase reporting assay; the expressions of TUT1 and THBS2 protein in PANC-1 cells in the control group, miR-342-3p overexpression group and miR-342-3p inhibitor group were detected by Western blot. **Results** The relative expressions of miR-342-3p, TUT1, THBS2 mRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma were significantly lower than those in normal adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expressions of miR-342-3p and TUT1, THBS2 mRNA in cancer tissues of patients with different ages, tumor sizes, lymph node metastasis and tumor stages ( $P > 0.05$ ); the expressions of miR-342-3p and TUT1, THBS2 mRNA in high differentiation cancer tissues were significantly higher than those in medium and low differentiation cancer tissues ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the proliferation ability of PANC-1 cells in each group at 0 h of culture ( $P > 0.05$ ). At 24, 48, 72 h of culture, the proliferation ability of cells in the TUT1 group was significantly lower than that in the Vector group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of cells in the TUT1 group was significantly higher than that in Vector group ( $P < 0.05$ ). At 24, 48, 72 h of culture, the proliferation ability of cells in the TUT1 silencing group was significantly higher than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of cells in TUT1 silencing group was significantly lower than that in the negative control group ( $P < 0.05$ ). At 24, 48, 72 h of culture, the proliferation ability of cells in the miR-342-3p inhibitor group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ); the proliferation ability of cells in the miR-342-3p overexpression group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). At 24 h of culture, there was no significant difference in cell proliferation ability among the miR-342-3p overexpression + TUT1 group, miR-342-3p overexpression + THBS2 group and the miR-342-3p overexpression group ( $P > 0.05$ ). At 48, 72 h of culture, the proliferation ability of cells in the miR-342-3p overexpression + TUT1 group, miR-342-3p overexpression + THBS2 group, TUT1 + THBS2 group were significantly lower than that in the miR-342-3p overexpression group ( $P < 0.05$ ); the apoptosis rate of cells in the miR-342-3p inhibitor group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ); the apoptosis rate of cells in the miR-342-3p overexpression group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rates of cells in the miR-342-3p overexpression + TUT1 group, miR-342-3p overexpression + THBS2 group, TUT1 + THBS2 group were significantly higher than that in the miR-342-3p overexpression group ( $P < 0.05$ ). The luciferase activity of wild-type TUT1 reporter gene in the miR-342-3p overexpression group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), while the luciferase activity of mutant TUT1 reporter gene had no significant difference compared with that in the control group ( $P > 0.05$ ). The relative expressions of TUT1 and THBS2 protein in the miR-342-3p overexpression group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ); the relative expressions of TUT1 and THBS2 protein in the miR-342-3p inhibitor group were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Activation of miR-342-3p/TUT1/THBS2 pathway can inhibit the proliferation of PANC-1 cells, promote their apoptosis, and then inhibit the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. The miR-342-3p/TUT1/THBS2 pathway is expected to become a potential target for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

**Key words:** microRNA-342-3p; terminal uridylyl transferase 1; thrombospondin-2; pancreatic ductal adenocarcinoma; clinicopathology

胰腺导管腺癌是一种消化道肿瘤,恶性程度较高,诊断和治疗难度大<sup>[1]</sup>,患病早期可能出现慢性胃炎、复发性胰腺炎的症状。此外,由于胰腺癌压迫胆管,还可能导致黄疸症状的出现,同时也可能出现糖尿病、腹泻等良性疾病的症状<sup>[2]</sup>。胰腺导管腺癌是胰腺癌的主要类型,约占胰腺癌的 80% ~ 90%<sup>[3]</sup>。胰腺导管腺癌具有极高的侵袭性和转移能力,由于胰腺癌缺乏早期诊断标志物,确诊时多已发生局部浸润和远处转移,导致放射治疗和化学治疗效果不理想,治疗后患者的中位生存期小于 6 个月,即使接受胰腺癌手术的患者,5 a 生存率仍低于 20%<sup>[4]</sup>。因此,深入探讨胰腺导管腺癌的发病机制,为该病提供可行性诊断和治疗靶点是目前急需解决的问题。微 RNA (microRNA, miRNA) 具有发夹结构,能够降解信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 或抑制 mRNA 的翻译,进而调控靶基因的表达<sup>[5]</sup>。有研究发现,miR-342-3p 在鼻咽癌、肝细胞癌等多种肿瘤中呈低表达,具有促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞侵袭的生物学行为,可以作为预测肿瘤预后的独立因子<sup>[6]</sup>。末端尿苷酰转移酶 1 (terminal uridylyl transferase 1, TUT1) 可对特定的 miRNA 进行尿苷化,并间接控制其稳定性和 miRNA 的表达<sup>[7]</sup>。凝血酶敏感素-2 (thrombospondin-2, THBS2) 是血小板反应蛋白家族中的成员之一,具有多个结构域的钙离子相关性糖蛋白<sup>[8]</sup>。有研究发现,THBS2 具有调节组织创伤后重塑和抗血管生成的作用<sup>[9]</sup>,与肿瘤的关系密切。目前,尚未见关于 miR-342-3p 在胰腺导管腺癌组织中表达情况及调控 TUT1、THBS2 基因对胰腺导管腺癌细胞生物学行为的影响的相关报道。基于此,本研究探讨 miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路在胰腺导管腺癌中的作用及机制,以期胰腺癌的诊疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 组织来源 选择 2008 年 5 月至 2021 年 3 月在遂宁市中心医院行根治性手术切除的胰腺导管腺癌标本 (n = 80) 和对应癌旁正常组织标本 (n = 20) 为研究对象。病例纳入标准: (1) 经病理学检查确诊为胰腺导管腺癌患者; (2) 术前均未接受过放射治疗、化学治疗和靶向分子治疗; (3) 临床资料完整; (4) 原发胰腺导管腺癌; (5) 患者知情同意并签订知情同意书。排除标准: (1) 合并其他恶性肿瘤者; (2) 合并或并发影响本研究结果的疾病者。本研究通过医院医学伦理委员会审核批准。

1.2 细胞、试剂与仪器 人胰腺导管腺癌细胞株

PANC-1 购自中国科学院上海细胞库; 二辛可宁酸蛋白质定量试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司, 聚偏氟乙烯膜和达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳配胶试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司, TUT1 和 THBS2 一抗购自美国 Millipore 公司, miR-342-3p mimic 和 miR-342-3p inhibitor 由上海吉玛制药公司合成, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒和细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自美国 Promega 公司, Lipofectamine 3000、TRIzol 试剂购自北京鼎国生物技术有限公司, 慢病毒载体阴性对照 (shRNA negative control, sh-NC) 和 pGCshL-TUT1 载体由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 化学发光显影系统购自英国 Syngene 公司, 酶标仪购自美国 Biotech 公司, 常氧培养箱购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测胰腺导管腺癌组织和癌旁正常组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达 取胰腺导管腺癌组织和癌旁正常组织各 50 mg, 剪碎, 在液氮中研磨, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 应用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒反转录 RNA。miR-342-3p 上游引物序列为 5'-GCTACACATTA-CAGATACCT-3', 下游引物序列为 5'-GACACCACT-GCCATACCT-3'; TUT1 上游引物序列为 5'-TTCAT-TAATCTGGTCCATCT-3', 下游引物序列为 5'-GTA-ATCCTAGGTGATCTAT-3'; THBS2 上游引物序列为 5'-GTATCTCAGCGTACCGGCT-3', 下游引物序列为 5'-GCCTTAAGTGATGCCTAAGTCT-3'; 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, GAPDH 上游引物序列为 5'-GT-CAATCCAGGTATATACCT-3', 下游引物序列为 5'-GTTATCGTCTATATTACCAT-3'。qRT-PCR 反应体系: 2 × SYBR Green mixture 5 μL, PCR 正向引物和反向引物各 1 μL, cDNA 1 μL, 无 RNase 酶 2 μL; 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 相对表达量。

1.3.2 细胞培养 将人胰腺导管腺癌细胞株 PANC-1 接种于 DMEM 中, 置于 37 °C 含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。当细胞融合度达 80% 以上时, 弃培养液, 使用磷酸盐缓冲液 (phosphate

buffered saline, PBS) 冲洗 3 次, 胰蛋白酶消化细胞, 弃液, PBS 冲洗 2 次, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中继续培养。

**1.3.3 细胞转染和分组** 取对数生长期 PANC-1 细胞, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 24 h, 待细胞生长至融合度 80% ~ 90% 时进行转染, 取 6 孔板中的 PANC-1 细胞, 吸弃培养液, PBS 清洗, 加入使用 Lipofectamine 3000 转染试剂配置好的混合液。将细胞分为 10 组, 分别为对照组 (转染 miR-NC)、miR-342-3p 过表达组 (转染 miR-342-3p mimic)、miR-342-3p 抑制剂组 (转染 miR-342-3p inhibitor)、Vector 组 (转染 pCS4-HA vector)、TUT1 组 (转染 pcDNA3-Flag-TUT1)、阴性对照组 (转染 sh-NC 慢病毒载体)、TUT1 沉默组 (转染 pGCshL-TUT1 载体)、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组 (同时转染 miR-342-3p mimic 和 TUT1)、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组 (同时转染 miR-342-3p mimic 和 THBS2)、TUT1 + THBS2 组 (同时转染 pcDNA3-Flag-TUT1 和 THBS2), 按照说明书操作进行转染, 转染 48 h 后收集细胞。

**1.3.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖能力** 取对照组、miR-342-3p 过表达组、miR-342-3p 抑制剂组、Vector 组、TUT1 组、阴性对照组、TUT1 沉默组、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组对数生长期 PANC-1 细胞, 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 96 孔板, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 分别于 24、48、72 h 时取出培养板, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 4 h, 用酶标仪测各孔吸光度值, 吸光度值越大, 细胞增殖能力越强。实验重复 3 次, 取均值。

**1.3.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况** 取对照组、miR-342-3p 过表达组、miR-342-3p 抑制剂组、Vector 组、TUT1 组、阴性对照组、TUT1 沉默组、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组对数生长期 PANC-1 细胞, 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板, 用不含乙二胺四乙酸钠的胰蛋白酶消化并收集细胞, PBS 重悬细胞,  $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清、重新重悬细胞, 分别加入 5 μL 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 混匀, 避光孵育 20 min, 1 h 后使用流式细胞仪检测各组 PANC-1 细胞的凋亡情况。

**1.3.6 双荧光素酶报告系统检测 miR-342-3p 与 TUT1 的靶向关系** 通过 Targetscan 网站预测 miR-342-3p 与 TUT1 的 3' 非编码区 (3'-untranslated

region, 3'-UTR) 的结合点位, 采用聚合酶链式反应法从基因组扩增含有与 miR-342-3p 结合野生型或突变型的 TUT1 3'-UTR 序列, 克隆到 pGL-3 荧光素酶报告载体, 将载体和 TUT1、对照物转染到完全培养基培养 24 h 的 PANC-1 细胞中, 48 h 后, 采用双荧光素酶报告基因测试盒检测野生型和突变型 TUT1 相对荧光素酶活性。实验重复 3 次, 取均值。

**1.3.7 Western blot 法检测 PANC-1 细胞中 TUT1、THBS2 蛋白表达** 提取对照组、miR-342-3p 过表达组和 miR-342-3p 抑制剂组 PANC-1 细胞中的蛋白质,  $3\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 加入蛋白裂解液, 采用二喹啉甲酸法测蛋白浓度。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白, 转膜 1 h, 缓冲液冲洗。根据抗体说明书, 加入 TUT1 (1 : 1 000 稀释)、THBS2 (1 : 1 000 稀释) 一抗和 GAPDH 抗体 (1 : 1 000 稀释), 4 ℃ 过夜。室温下孵育二抗, 2 h 后回收二抗, 缓冲液冲洗, 电化学发光法显影, 拍照记录。以 GAPDH 为内参, 应用 Image J 软件进行目的蛋白定量分析, 目的蛋白相对表达量以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示。实验重复 3 次, 取均值。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 在胰腺导管腺癌组织和癌旁正常组织中的相对表达量** 比较胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 的相对表达量分别为  $1.03 \pm 0.02$ 、 $0.98 \pm 0.03$  和  $1.04 \pm 0.02$ , 癌旁正常组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 的相对表达量分别为  $1.67 \pm 0.39$ 、 $1.53 \pm 0.44$  和  $1.75 \pm 0.52$ ; 胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 的相对表达量显著低于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 表达与患者临床病理学参数的关系** 结果见表 1。不同年龄、肿瘤直径、淋巴结转移和肿瘤分期患者癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 高分化癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达显著高于中 + 低分化癌组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p、TUT1、THBS2 mRNA 表达与患者临床病理学参数的关系

Tab.1 Relationship between miR-342-3p, TUT1, THBS2 mRNA expression in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues and clinicopathological parameters of patients

参数	<i>n</i>	miR-342-3p	<i>t</i>	<i>P</i>	TUT1 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>	THBS2 mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄										
<65 岁	37	1.63 ±0.47	0.382	0.747	1.53 ±0.39	0.416	0.517	1.69 ±0.51	0.549	0.374
≥65 岁	43	1.64 ±0.48			1.58 ±0.41			1.73 ±0.54		
肿瘤直径										
<3 cm	36	1.65 ±0.46	0.713	0.412	1.54 ±0.42	0.294	0.674	1.71 ±0.53	0.418	0.598
≥3 cm	44	1.69 ±0.45			1.57 ±0.38			1.74 ±0.50		
肿瘤分化程度										
高分化	49	1.74 ±0.51	5.421	0.003	1.68 ±0.47	7.156	0.001	1.89 ±0.57	4.279	0.008
中+低分化	31	1.37 ±0.41			1.23 ±0.31			1.41 ±0.42		
淋巴结转移										
有	53	1.72 ±0.49	1.724	0.095	1.59 ±0.54	1.886	0.084	1.77 ±0.54	1.021	0.163
无	27	1.51 ±0.37			1.42 ±0.37			1.62 ±0.43		
肿瘤分期										
I + II	33	1.56 ±0.47	1.064	0.107	1.52 ±0.38	1.176	0.112	1.64 ±0.39	0.913	0.293
III + IV	47	1.73 ±0.49			1.61 ±0.43			1.79 ±0.57		

**2.3 各组 PANC-1 细胞的增殖能力和细胞凋亡率比较** 结果见表 2、表 3、表 4 和图 1。培养 0 h 时, 各组 PANC-1 细胞的增殖能力比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。培养 24、48、72 h 时,TUT1 组细胞的增殖能力均显著低于 Vecort 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。TUT1 组细胞的凋亡率显著高于 Vecort 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。培养 24、48、72 h 时,TUT1 沉默组细胞的增殖能力显著高于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。TUT1 沉默组的细胞凋亡率显著低于阴性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

培养 24、48、72 h 时,miR-342-3p 抑制剂组的细胞增殖能力显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );miR-342-3p 过表达组的细胞增殖能力显著低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 2 Vector 组与 TUT1 组 PANC-1 细胞增殖能力和细胞凋亡率比较

Tab.2 Comparison of the proliferation ability and apoptosis rate of PANC-1 cells between the Vector group and TUT1 group

组别	<i>n</i>	细胞增殖能力(吸光度值)				凋亡率/%
		0 h	24 h	48 h	72 h	
Vector 组	3	0.12 ±0.03	0.36 ±0.08	0.57 ±0.14	1.03 ±0.27	5.94 ±1.63
TUT1 组	3	0.11 ±0.05	0.22 ±0.06	0.36 ±0.09	0.58 ±0.16	32.84 ±5.89
<i>t</i>		0.216	3.419	4.546	7.184	16.735
<i>P</i>		0.694	0.027	0.015	0.001	0.001

表 3 阴性对照组与 TUT1 沉默组 PANC-1 细胞增殖能力和细胞凋亡率比较

Tab.3 Comparison of the proliferation ability and apoptosis rate of PANC-1 cells between the NC group and TUT1 group

组别	<i>n</i>	细胞增殖能力(吸光度值)				凋亡率/%
		0 h	24 h	48 h	72 h	
阴性对照组	3	0.11 ±0.03	0.28 ±0.06	0.37 ±0.09	0.74 ±0.21	7.05 ±1.87
TUT1 沉默组	3	0.13 ±0.04	0.42 ±0.11	0.73 ±0.18	1.39 ±0.38	2.29 ±0.96
<i>t</i>		0.198	3.127	4.918	8.364	9.156
<i>P</i>		0.745	0.032	0.011	0.001	0.001

表 4 对照组、miR-342-3p 抑制剂组、miR-342-3p 过表达组、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组和 TUT1 + THBS2 组细胞增殖能力和细胞凋亡率比较

Tab.4 Comparison of the proliferation ability and apoptosis rate among the control group, miR-342-3p inhibitor group, miR-342-3p overexpression group, miR-342-3p mimic + TUT1 group, miR-342-3p mimic + THBS2 group and TUT1 + THBS2 group

组别	n	细胞增殖能力(吸光度值)				凋亡率/%
		0 h	24 h	48 h	72 h	
对照组	3	0.11 ± 0.03	0.31 ± 0.09	0.75 ± 0.21	0.92 ± 0.27	6.01 ± 1.75
miR-342-3p 抑制剂组	3	0.14 ± 0.04	0.59 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.39 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.18 <sup>a</sup>
miR-342-3p 过表达组	3	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.32 <sup>a</sup>	27.84 ± 6.31 <sup>a</sup>
miR-342-3p 过表达 + TUT1 组	3	0.13 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.39 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.21 <sup>b</sup>	33.45 ± 7.19 <sup>b</sup>
miR-342-3p 过表达 + THBS2 组	3	0.14 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.45 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.19 <sup>b</sup>	34.72 ± 7.24 <sup>b</sup>
TUT1 + THBS2 组	3	0.13 ± 0.04	0.24 ± 0.08	0.46 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.21 <sup>b</sup>	29.87 ± 6.16 <sup>b</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 miR-342-3p 过表达组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

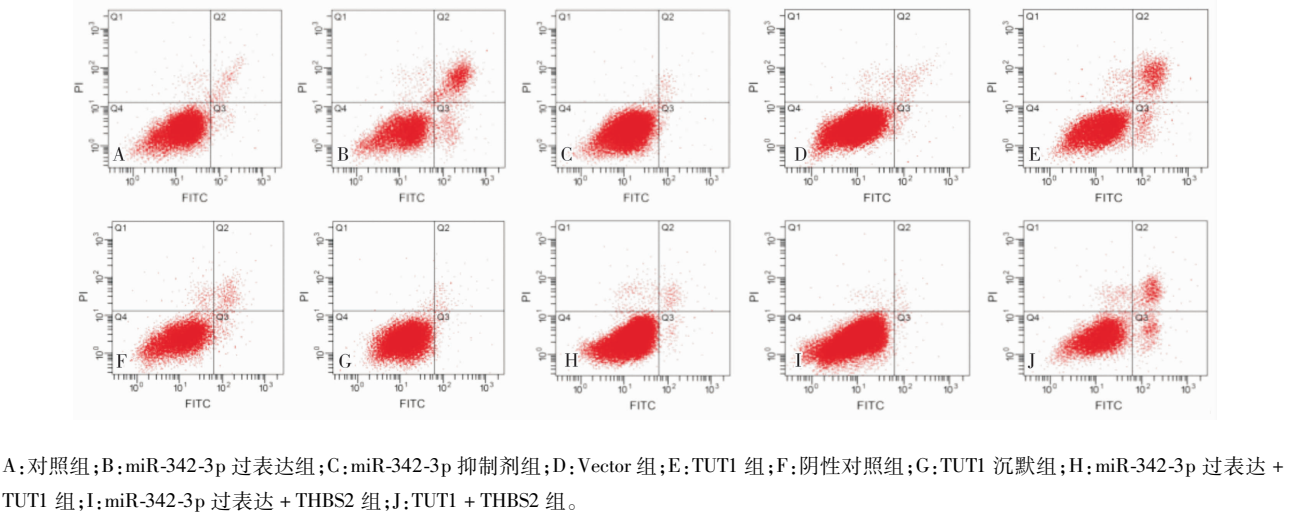


图 1 对照组、miR-342-3p 过表达组、miR-342-3p 抑制剂组、Vector 组、TUT1 组、阴性对照组、TUT1 沉默组、miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组细胞凋亡情况

Fig.1 Apoptosis of PANC-1 cells in control group, miR-342-3p overexpression group, miR-342-3p inhibitor group, Vector group, TUT1 group, negative control group, TUT1 silence group, miR-342-3p overexpression + TUT1 group, miR-342-3p overexpression + THBS2 group and TUT1 + THBS2 group

**2.4 miR-342-3p 与 TUT1 的靶向关系分析结果**

结果见图 2。荧光素酶报告结果显示,对照组和 miR-342-3p 过表达组细胞中野生型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性分别为 1.02 ± 0.19、1.74 ± 0.67,突变型 TUT1 的荧光素酶活性分别为 1.01 ± 0.23、1.03 ± 0.22。miR-342-3p 过表达组细胞中野生型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);突变型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。



图 2 miR-342-3p 与 TUT1 的靶向关系

Fig. 2 Targeting relationship between miR-342-3p and TUT1

**2.5 对照组、miR-342-3p 过表达组和 miR-342-3p 抑制剂组细胞中 TUT1、THBS2 蛋白相对表达量比较**

结果见图 3。对照组和 miR-342-3p 过表达组细胞中 TUT1 蛋白的相对表达量分别为 1.02 ± 0.07、1.63 ± 0.18,THBS2 蛋白的相对表达量分别为 0.97 ± 0.05、1.59 ± 0.14;对照组和 miR-342-3p 抑制剂组细胞中 TUT1 蛋白的相对表达量分别 1.01 ± 0.05、0.49 ± 0.03,THBS2 蛋白的相对表达量分别为 0.95 ± 0.07、0.34 ± 0.06。miR-342-3p 过表达组细胞中 TUT1 和 THBS2 蛋白的相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);miR-342-3p 抑制剂组细胞中 TUT1 和 THBS2 蛋白的相对表达量显著低于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

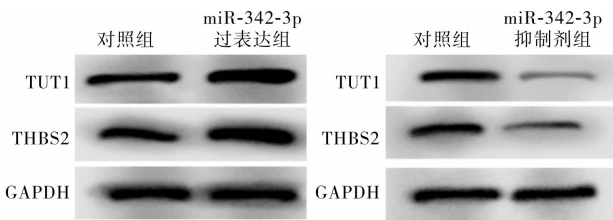


图 3 对照组、miR-342-3p 过表达组和 miR-342-3p 抑制剂组细胞中 TUT1、THBS2 蛋白表达 (Western blot)

Fig.3 Expression of TUT1 and THBS2 proteins of cells in the control group, miR-342-3p overexpression group and miR-342-3p inhibitor group (Western blot)

3 讨论

胰腺癌是一种致死率极高的消化系统常见的肿瘤。近年来,胰腺癌的发病率呈逐渐上升趋势,该病的发病比较隐匿,且在发病早期就可出现组织浸润和远处转移,而且恶性程度较高,放射治疗和化学治疗效果不理想。目前,最有效的办法是行根治性肿瘤切除手术。但近 80% 的患者确诊时已属于晚期或者已发生转移<sup>[10]</sup>。仅有 20% 的患者才有机会进行手术,10% 的患者才可行彻底的切除手术,而且常规手术治疗后,患者平均生存率最高为 20 个月,切除率较低,预后较差<sup>[11]</sup>。有研究报道,胰腺癌的 5 a 总生存率仅为 5%,是常见肿瘤中病死率较高的恶性肿瘤<sup>[12]</sup>。因此,迫切需要探索新的有效的治疗方法来改变胰腺癌的治疗现状。

miRNA 参与细胞增殖、凋亡等多种生理过程和生物学行为的调控<sup>[13]</sup>。miR-342-3p 由 14 号染色体编码,有研究表明,miR-342-3p 可通过靶向人宫颈癌中的 FOXM1 来抑制增殖、迁移和侵袭<sup>[14]</sup>。miR-342-3p 还可通过直接抑制 E2F1 的表达调控人肺癌 MYC 的转录活性<sup>[15]</sup>。还有研究表明,miR-342-3p 可通过靶向 AGR2 抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移<sup>[16]</sup>。关于 miR-342-3p 在肺癌、宫颈癌、甲状腺癌、乳腺癌中的作用的研究较多,但目前关于 miR-342-3p 在胰腺导管腺癌中的作用的报道较少。基于此,本研究探讨了 miR-342-3p 在胰腺导管腺癌中的作用,并通过观察 miR-342-3p 对 TUT、THBS2 的调控作用来验证 miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路在胰腺导管腺癌中的主要作用。

TUT1 是末端尿苷酰转移酶,可将尿苷磷酸化尾部与 U6-snRNA 的 30 区结合,诱导 LSM2-8 蛋白复合物的募集<sup>[17]</sup>。有研究表明,TUT1 可通过使特定 miRNA 的尿苷磷酸化,来间接控制 miRNA 的稳定性和整体 miRNA 的表达。在人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS 中,增强 TUT1 的表达可以抑制细胞

增殖<sup>[18]</sup>。THBS2 是一种钙结合糖蛋白,在创伤修复、肿瘤形成和胚胎发育中发挥着组织重建的作用<sup>[19]</sup>。有研究显示,THBS2 在宫颈癌中呈低表达<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 胰腺导管腺癌组织中的相对表达量显著低于癌旁正常组织。胰腺导管腺癌组织中 miR-342-3p 及 TUT1、THBS2 mRNA 的表达与患者的年龄、肿瘤大小、淋巴结是否转移及肿瘤分期无关;但与肿瘤的分化程度有关,其在高分化肿瘤组织中的相对表达量显著高于中+低分化组织。本研究结果提示,miR-342-3p、TUT1、THBS2 可能属于抑癌基因,其表达量增加能够阻止胰腺导管腺癌的发生和发展。

为了证实 miR-342-3p 在胰腺导管腺癌中的作用机制,本研究采用 CCK-8 和流式细胞术检测 PANC-1 细胞的增殖和凋亡情况,结果显示,过表达 miR-342-3p 可以抑制 PANC-1 细胞的增殖,促进其凋亡;抑制 miR-342-3p 的表达可以促进 PANC-1 细胞的增殖,降低其凋亡。本研究还发现,过表达 miR-342-3p 可显著上调野生型 TUT1 报告基因的荧光素酶活性;过表达 TUT1 后,PANC-1 细胞的增殖能力显著降低,凋亡率显著升高,沉默 TUT1 的表达后,PANC-1 细胞的增殖能力则显著升高,凋亡率显著降低;过表达 miR-342-3p 后,PANC-1 细胞中的 TUT1、THBS2 蛋白的表达显著增加,而抑制 miR-342-3p 表达后,TUT1、THBS2 蛋白的表达则显著降低。以上结果说明,miR-342-3p 与 TUT1、THBS2 存在正相关关系。为了进一步验证 miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路对 PANC-1 细胞增殖和凋亡的作用机制,本研究采用双转染实验来观察 miR-342-3p 对 TUT1 和 THBS2 的作用,结果显示,miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组的细胞增殖能力显著低于 miR-342-3p 过表达组。miR-342-3p 过表达 + TUT1 组、miR-342-3p 过表达组 + THBS2 组、TUT1 + THBS2 组的细胞的凋亡率显著高于 miR-342-3p 过表达组;这说明,miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路可以抑制 PANC-1 细胞的增殖,并促进其凋亡。

综上所述,过表达 miR-342-3p 可以抑制 PANC-1 细胞的增殖,促进其凋亡,进而抑制胰腺导管腺癌的发展,其机制可能与 miR-342-3p/TUT1/THBS2 通路有关。

参考文献:

[1] 朱婕,顾炎,刘艳芳,等. ECT2 基因在人胰腺导管腺癌中的表达及对胰腺癌细胞生物学特性的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗



杂志,2019,26(5):524-529.

ZHU J, GU Y, LIU Y F, *et al.* Expression of ECT2 gene in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its effect on biological characteristics of pancreatic cancer cells[J]. *Chin J Cancer Biother*, 2019, 26 (5): 524-529.

[2] 赵金钱, 陈炯, 方恒忠, 等. AQP8 在胰腺导管腺癌中的表达及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(2): 284-287.

ZHAO J Q, CHEN J, FANG H Z, *et al.* Expression of AQP8 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its clinical significance[J]. *J Anhui Med Univ*, 2018, 53(2): 284-287.

[3] 邢荣春. 胰腺导管腺癌肿瘤微环境的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(9): 1202-1206.

XING R C. Research progress in tumor microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2017, 26 (9): 1202-1206.

[4] 段睿男, 钟翔宇, 崔云甫. 胰腺导管腺癌的治疗进展[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(8): 1206-1212.

DUAN R N, ZHONG X Y, CUI Y F. Progress in the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *World Chin J Digest*, 2016, 24(8): 1206-1212.

[5] ROMERO-CORDOBA S L, SERGIO R C, VERONICA B P, *et al.* Loss of function of miR-342-3p results in MCT1 over-expression and contributes to oncogenic metabolic reprogramming in triple negative breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12252.

[6] 王非, 李巍, 冯帅, 等. miR-342-3p 对鼻咽癌细胞增殖、凋亡的影响及可能机制[J]. 解剖科学进展, 2019, 25(3): 260-264.

WANG F, LI W, FENG S, *et al.* Effect of mir-342-3p on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells and its possible mechanism[J]. *Prog Anat Sci*, 2019, 25(3): 260-264.

[7] KNOUF E C, WYMAN S K, TEWARI M. The human TUT1 nucleotidyl transferase as a global regulator of microRNA abundance[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69630.

[8] 王冰, 肖克源, 孟麟, 等. THBS2 特异性单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 25(5): 588-593.

WANG B, XIAO K Y, MENG L, *et al.* Preparation and identification of THBS2 specific monoclonal antibody [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 25 (5): 588-593.

[9] 赵志杰, 李永翔, 孙若川. THBS2 表达与胃癌血管生成以及预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10): 1343-1348.

ZHAO Z J, LI Y X, SUN R C. Relationship between THBS2 expression and angiogenesis and prognosis of gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(10): 1343-1348.

[10] SOHAL D, MANGU P B, KHORANA A A, *et al.* Metastatic pancreatic cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline[J]. *J Oncol Pract*, 2017, 34(23): 2784-2796.

[11] HEILER S, ZHE W, M ZÖLLER M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(26): 5971-6007.

[12] DU T, BILL K A, FORD J, *et al.* The diagnosis and staging of pancreatic cancer: a comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography with pancreas protocol [J]. *Am J Surg*, 2018, 215(3): 472-475.

[13] WANG S H, MA F, TANG Z H, *et al.* Long non-coding RNA H19 regulates FOXM1 expression by competitively binding endogenous miR-342-3p in gallbladder cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 160.

[14] LI X R, CHU H J, LV T, *et al.* miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer[J]. *FEBS Lett*, 2016, 588(17): 3298-3307.

[15] TAI M C, TAISUKE K, MASAHIRO N, *et al.* miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 11 (12): 1464-1473.

[16] XUE X, HU R. miR-342-3p suppresses cell proliferation and migration by targeting AGR2 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2018, 412(1): 170-178.

[17] KIM J, TSURUTA F, OKAJIMA T, *et al.* KLHL7 promotes TUT1 ubiquitination associated with nucleolar integrity: implications for retinitis pigmentosa [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(1): 220-226.

[18] ZHU D Q, LOU Y F, HE Z G, *et al.* Nucleotidyl transferase TUT1 inhibits lipogenesis in osteosarcoma cells through regulation of microRNA-24 and microRNA-29a [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(12): 11829-11835.

[19] 范冲冲, 叶圣昌, 陈贤真, 等. 血清 THBS2 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(7): 1061-1064.

FAN C C, YE S C, CHEN X Z, *et al.* Expression and clinical significance of serum THBS2 in non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Lab Diagn*, 2020, 24(7): 1061-1064.

[20] 吴湘光, 余艳红, 魏文斐, 等. THBS2 在宫颈癌中的表达及功能研究[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(12): 889-892.

WU X G, YU Y H, WEI W F, *et al.* Expression and function of THBS2 in cervical cancer [J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2017, 26(12): 889-892.

( 本文编辑: 孟 月 )