



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.230365
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.230365
China Journal of General Surgery, 2025, 34(3):495-505.

· 基础研究 ·

长链非编码 RNA NEAT1 调控 miR-124-3p/CTNNB1 轴 对胰腺癌细胞生物学功能的影响

陈巍, 韩峥, 黄莎莎, 蔡一珊, 郭芳, 田霞

(湖北省武汉市第三医院 消化内科, 湖北 武汉 430060)

摘要

背景与目的: 长链非编码 RNA (lncRNA) 核富集转录体 1 (NEAT1) 是一种致癌 lncRNA, 可通过竞争性内源性 RNA (ceRNA) 机制促进多种癌症进展。笔者前期通过 TargetScan 网站发现, NEAT1 与微小 RNA-124-3p (miR-124-3p), 以及 miR-124-3p 与钙黏蛋白相关蛋白 (CTNNB1) 之间存在结合位点。因此, 本研究探讨 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1 在胰腺癌中的表达, 以及它们之间相互作用对胰腺癌细胞功能的影响。

方法: 双荧光素酶报告基因试验验证 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1 的关系。检测胰腺癌组织及癌旁组织、胰腺癌 PANC-1 细胞及正常胰腺上皮 H6C7 细胞中 NEAT1 和 miR-124-3p 的表达水平, 以及 CTNNB1 蛋白的表达情况。将 NEAT1 siRNA 转染或与 miR-124-3p 抑制物同时转染 PANC-1 细胞, 评估转染后 PANC-1 细胞生物学功能、上皮-间充质转化相关蛋白表达以及在小鼠体内生长能力的变化。

结果: 双荧光素酶报告基因试验证实 NEAT1 与 miR-124-3p、miR-124-3p 与 CTNNB1 之间存在靶向关系。胰腺癌组织 (vs. 癌旁组织) 以及 PANC-1 细胞 (vs. H6C7 细胞) 中, NEAT1 与 CTNNB1 表达升高, miR-124-3p 表达降低 (均 $P < 0.05$)。转染 NEAT1 siRNA 后, PANC-1 细胞 NEAT1、CTNNB1 表达降低, miR-124-3p 表达增高, 而同时转染 miR-124-3p 抑制物后, PANC-1 细胞中 miR-124-3p 与 CTNNB1 上述表达变化被抑制 (均 $P < 0.05$)。转染 NEAT1 siRNA 后, PANC-1 细胞的增殖、迁移与侵袭能力明显减弱, 凋亡率明显升高, E-cadherin 蛋白表达上调, 而 N-cadherin、vimentin 蛋白表达下调, 在小鼠体内的生长能力明显降低 (均 $P < 0.05$); 同时转染 miR-124-3p 抑制物 PANC-1 细胞上述指标的变化明显减弱 (均 $P < 0.05$)。

结论: NEAT1 可能通过 ceRNA 机制与 miR-124-3p 竞争性结合, 削弱 miR-124-3p 对 CTNNB1 的抑制作用, 从而上调 CTNNB1 表达, 促进胰腺癌细胞的恶性生物学行为。

关键词

胰腺肿瘤; RNA, 长链非编码; 微 RNAs; 细胞增殖; 肿瘤浸润
中图分类号: R735.9

Long noncoding RNA NEAT1 regulates the miR-124-3p/CTNNB1 axis to affect the biological functions of pancreatic cancer cells

CHEN Wei, HAN Zheng, HUANG Shasha, CAI Yishan, GUO Fang, TIAN Xia

(Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China)

基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研基金资助项目 (WJ2023M129)。

收稿日期: 2023-08-14; **修订日期:** 2024-05-11。

作者简介: 陈巍, 湖北省武汉市第三医院副主任医师, 主要从事胆胰系统肿瘤机制方面的研究。

通信作者: 田霞, Email: hewy100@163.com

Abstract

Background and Aims: Long noncoding RNA (lncRNA) nuclear-enriched abundant transcript 1 (NEAT1) is an oncogenic lncRNA that promotes the progression of various cancers through the competing endogenous RNA (ceRNA) mechanism. Using the TargetScan database, we previously identified binding sites between NEAT1 and microRNA-124-3p (miR-124-3p), as well as between miR-124-3p and catenin beta-1 (CTNNB1). Therefore, this study was conducted to investigate the expression of NEAT1, miR-124-3p, and CTNNB1 in pancreatic cancer and their interactions affecting pancreatic cancer cell functions.

Methods: A dual-luciferase reporter assay was used to validate the relationships among NEAT1, miR-124-3p, and CTNNB1. The expression levels of NEAT1 and miR-124-3p, as well as CTNNB1 protein expression, were detected in pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues, as well as in pancreatic cancer PANC-1 cells and normal pancreatic epithelial H6C7 cells. PANC-1 cells were transfected with NEAT1 siRNA alone or co-transfected with a miR-124-3p inhibitor. After transfection, changes in PANC-1 cell biological functions, epithelial-mesenchymal transition related protein expression, and tumor growth ability in mice were assessed.

Results: The dual-luciferase reporter assay confirmed the targeting relationships between NEAT1 and miR-124-3p, as well as between miR-124-3p and CTNNB1. NEAT1 and CTNNB1 expression levels were significantly upregulated, while miR-124-3p expression was downregulated in pancreatic cancer tissues (vs. adjacent tissues) and in PANC-1 cells (vs. H6C7 cells) (all $P < 0.05$). NEAT1 siRNA transfection led to decreased NEAT1 and CTNNB1 expression and increased miR-124-3p expression in PANC-1 cells. However, co-transfection with a miR-124-3p inhibitor suppressed the expression changes in miR-124-3p and CTNNB1 (all $P < 0.05$). NEAT1 siRNA transfection significantly reduced PANC-1 cell proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis. Additionally, E-cadherin protein expression was upregulated, whereas N-cadherin and vimentin protein expression were downregulated. Tumor growth in mice was also significantly inhibited (all $P < 0.05$). These changes were attenuated upon co-transfection with the miR-124-3p inhibitor (all $P < 0.05$).

Conclusion: NEAT1 may act as a ceRNA by competitively binding to miR-124-3p, thereby attenuating miR-124-3p-mediated inhibition of CTNNB1. This leads to CTNNB1 upregulation, ultimately promoting the malignant biological behavior of pancreatic cancer cells.

Key words

Pancreatic Neoplasms; RNA, Long Noncoding; MicroRNAs; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.9

胰腺癌是世界上最致命的癌症之一，5年生存率不到10%^[1]。据报道^[2-3]，近年来中国胰腺癌发病率逐渐增加，且在未来20年将持续增高。众所周知，由于目前尚无针对胰腺癌的特异性筛查方法，且大多数处于胰腺癌早期的患者无症状^[4]，因此，患者直到疾病达到中期或晚期才被诊断出来。与其他类型的肿瘤相比，胰腺癌的治疗进展很少。尽管在过去的10年中，免疫疗法和靶向治疗在许多实体瘤中取得了成功，但这些药物并没有显示出对胰腺癌患者有显著的益处，化疗仍然是主要的治疗方案^[5]。胰腺癌的分子异质性可能需要基于

个体肿瘤特征的多种治疗方法^[6]。因此，了解胰腺癌所涉及的潜在分子机制对于制定更有效的治疗策略至关重要。已有大量研究^[7-8]发现长链非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 可以对胰腺癌的治疗起到积极效果。lncRNA核富集转录体1 (NEAT1) 作为一种致癌lncRNA，通过竞争性内源性RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 机制在结肠癌^[9]、黑色素瘤^[10]、乳腺癌^[11]中促进肿瘤形成、转移的作用。近期发现，胰腺癌组织中NEAT1上调表达，其高表达与TNM分期、远处转移和肿瘤大小有关，也预示着预后不良，NEAT1

可以促进胰腺癌生长和转移^[12]。笔者通过TargetScan网站(<https://starbase.sysu.edu.cn>)发现NEAT1与微小RNA-124-3p(miR-124-3p),以及miR-124-3p与钙黏蛋白相关蛋白(CTNNB1)自检存在结合位点。此外,研究证据显示,在食管鳞状细胞癌中,NEAT1可靶向下调miR-124-3p表达^[13];miR-124-3p上调可以抑制胰腺癌细胞的增殖^[14];CTNNB1上调促进胰腺癌生长并预测预后不良^[15]。因此,笔者推测NEAT1可能结合miR-124-3p调控靶基因CTNNB1的表达,从而影响肿瘤细胞的生物学行为。本研究探讨NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1在胰腺癌中的表达,以及它们之间相互作用对胰腺癌细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人胰腺癌细胞PANC-1购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人胰腺上皮细胞系HPDE6-C7(H6C7)购自上海传秋生物科技有限公司;NEAT1 siRNA(si-NEAT1)、阴性对照siRNA(si-NC)、miR-124-3p抑制物(miR-124-3p inhibitor)、抑制物阴性对照(inhibitor NC)、miR-124-3p模拟物(miR-124-3p mimic)、TRIzol试剂(货号:B511311-0100)均购自上海生工;CCK-8试剂盒(货号:CA1210),北京索莱宝科技有限公司;NEAT1野生型质粒(NEAT1-WT)、NEAT1突变型质粒(NEAT1-MUT)、CTNNB1野生型质粒(CTNNB1-WT)和突变型质粒(CTNNB1-MUT)由上海生工构建;上皮钙黏附素(E-cadherin,货号:ab231303)、神经型钙黏附蛋白(N-cadherin,货号:ab76011)、波形蛋白(vimentin,货号:ab20346)、CTNNB1抗体(货号:ab16051)购自Abcam;Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(货号:FY-PLS5835),上海富雨生物科技有限公司;增强化学发光系统试剂盒(货号:SQ101),上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.2 临床样本

收集2018—2022年在湖北省武汉市第三医院就诊患胰腺癌的15例患者的胰腺癌组织(胰腺癌组)及其邻近癌旁组织(正常组),本研究所有患者均签订知情同意书,且该实验获得武汉市第三医院伦理委员会的批准(批号:202301006)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组 将人胰腺癌细胞系PANC-1以及人胰腺上皮细胞系H6C7培养在DMEM培养基,培养基含有10%热灭活胎牛血清和1%青霉素/链霉素,培养环境为37℃,5%CO₂。将PANC-1细胞按照3×10⁵个/孔的密度接种在6孔培养板上,分别转染si-NC、si-NEAT1)、si-NEAT1+inhibitor NC、si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor,用转染试剂盒转染48 h。以不经任何处理的PANC-1细胞为空白对照。

1.3.2 双荧光素酶报告基因实验 通过TargetScan网站(<https://starbase.sysu.edu.cn>)发现NEAT1与miR-124-3p,miR-124-3p与CTNNB1存在结合位点。将覆盖野生型和突变型miR-124-3p结合位点的NEAT1或CTNNB1 3'非翻译区片段克隆到pmirGLO双荧光素酶载体中。然后将这些载体与指定的质粒共转染到PANC-1细胞中48 h,测定萤火虫和Renilla荧光素酶的活性。根据制造商的方案,使用微孔板读取器检测相应的吸光度。然后,将相对荧光素酶活性归一化为萤火虫荧光素酶内控。

1.3.3 qRT-PCR检测NEAT1、miR-124-3p表达 组织和细胞的总RNA提取使用TRIzol试剂。将提取的RNA逆转录为互补DNA,并按照试剂盒说明书进行PCR,首先将特异性PCR引物、Mix、ddH₂O配置成20 μL体系,随后,在实时PCR系统上进行qRT-PCR。PCR条件如下:95℃ 10 min,然后95℃ 5 s,60℃ 40 s,40个循环。使用GAPDH作为NEAT1的内源性对照,U6作为miR-124-3p的内源性对照,分析NEAT1和miR-124-3p表达。最后,采用2^{-ΔΔCt}法进行计算。用于qRT-PCR的引物序列见表1。

表1 用于qRT-PCR的引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	正向	反向
NEAT1	5'-GTT TGC CTG CCT TCT TGT G-3'	5'-TAC CCT CCC AGC GTT TAG C-3'
miR-124-3p	5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG GG CAT TCA-3'	5'-ACA CTC CAG CTG GGT AAG GCA CGC GGT GAA TGC C-3'
U6	5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'	5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'
GAPDH	5'-GGA GAG TGT TTC CTC GTC CC-3'	5'-TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTA G-3'

1.3.4 Western blot 测量 CTNNB1、N-cadherin、E-cadherin、vimentin 蛋白表达 首先，RIPA 裂解缓冲液用来提取 PANC-1 细胞、H6C7 细胞以及胰腺癌组织、癌旁组织的总蛋白。通过 BCA 试剂盒确定蛋白浓度后，在 10% SDS-PAGE 上电泳，然后转移到 PVDF 膜。接下来，在 5% 脱脂牛奶中阻断膜，然后用靶向 E-cadherin (1:2 000)、N-cadherin (1:1 000)、vimentin (1:2 000)、CTNNB1 (1:1 000)、GAPDH (1:1 000) 的一抗在 4 °C 孵育。次日，在室温下用二抗孵育 2 h。增强化学发光系统试剂盒用于检测信号，Image J 用于定量分析。

1.3.5 CCK-8 法分析 PANC-1 细胞增殖 收集各组 PANC-1 细胞，并将其接种于 96 孔板 (1 × 10⁴ 个/孔) 中，37 °C 和 5% CO₂ 培养 48 h。然后，添加 CCK-8 溶液，37 °C 孵育 2 h。测量 450 nm 处吸光度。

1.3.6 流式细胞术分析 PANC-1 细胞凋亡 将细胞浓度调节至 7 × 10⁴ 个/mL。然后用 500 μL 结合缓冲液重悬细胞，添加 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 在 4 °C 下避光 15 min。最后，使用流式细胞仪评估 PANC-1 细胞凋亡率。

1.3.7 Transwell 试验测定 PANC-1 细胞迁移和侵袭 将转染的 PANC-1 细胞悬浮在无 FBS 培养基中并接种到孔径为 8 μm 的 Transwell 腔室的上室。将含有 10% FBS (600 μL) 的 DMEM 培养基添加到下室中。培养 24 h 后，用棉签去除上室中未穿膜的细胞，同时将上室底面的细胞固定乙醇中，然后用 0.1% 结晶紫染色 30 min。最后，在光学显微镜下计数。Transwell 腔室的上室预涂 Matrigel 基质胶，按照上述方法操作，以测量细胞侵袭。

1.3.8 异种移植肿瘤模型 从湖北贝恩特生物科技有限公司[许可证号: SCXK (鄂) 2021-0027]购买 6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠。将上述分组的细胞以 1 × 10⁵ 个/mL 分别注射到 BALB/c 裸鼠的右侧腋窝皮下，在注射后第 35 天处死所有裸鼠，取出裸鼠肿瘤并称重。根据公式 (体积 = 肿瘤长度 × 肿瘤宽度²/2)

计算肿瘤体积。本研究试验已获得武汉市第三医院动物伦理委员会的批准 (批号: 202201009)。

1.4 统计学处理

所有数据均在 SPSS 25.0 软件处理，经正态分布、方差齐性检验后的数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。t 检验用于比较 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1 在胰腺癌组织、癌旁组织及 PANC-1 细胞、H6C7 细胞中的表达差异，多组间比较用单因素方差分析和 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌细胞中 miR-124-3p、NEAT1、CTNNB1 的关系

双荧光素酶报告基因实验结果显示，miR-124-3p mimic 降低了 WT-NEAT1 和 WT-CTNNB1 组的荧光素酶活性 (均 P < 0.05)，而 MUT-NEAT1 和 MUT-CTNNB1 的荧光素酶活性几乎不变 (均 P > 0.05) (图 1)。

2.2 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1 在胰腺癌组织及细胞中的表达

与癌旁正常组织比较，胰腺癌组织中 NEAT1、CTNNB1 表达水平增高，miR-124-3p 表达降低 (均 P < 0.05)；与 H6C7 细胞比较，PANC-1 细胞中 NEAT1、CTNNB1 表达水平升高，miR-124-3p 表达降低 (均 P < 0.05) (图 2-3)。

2.3 转染后各组细胞 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1 表达的变化

与空白对照组、si-NC 组比较，si-NEAT1 组 NEAT1、CTNNB1 水平降低，miR-124-3p 表达增高 (均 P < 0.05)；与 si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor NC 组比较，si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组 CTNNB1 水平升高，miR-124-3p 表达下降 (均 P < 0.05) (图 4)。

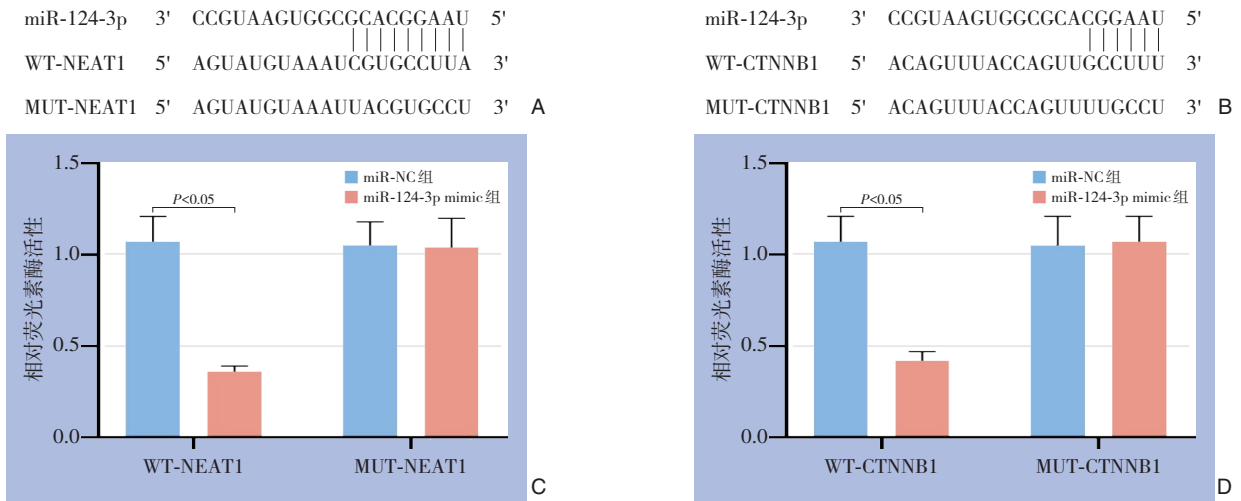


图1 双荧光素酶报告基因实验验证miR-124-3p、NEAT1、CTNNB1的关系 A: miR-124-3p在NEAT1上的野生型和突变结合位点; B: miR-124-3p在CTNNB1 3'UTR上的野生型和突变结合位点; C: 转染miR-124-3p mimic的WT-MUT与MUT-NEAT1 PANC-1细胞荧光素酶活性比较; D: 转染miR-124-3p mimic的WT-CTNNB1和MUT-CTNNB1 PANC-1细胞荧光素酶活性比较

Figure 1 Dual-luciferase reporter assay validating the relationships among miR-124-3p, NEAT1, and CTNNB1 A: Wild-type and mutant binding sites of miR-124-3p on NEAT1; B: Wild-type and mutant binding sites of miR-124-3p on the 3'UTR of CTNNB1; C: Comparison of luciferase activity in PANC-1 cells with WT-NEAT1 and MUT-NEAT1 after transfection with miR-124-3p mimic for; D: Comparison of luciferase activity in PANC-1 cells with WT-CTNNB1 and MUT-CTNNB1 after transfection with miR-124-3p mimic

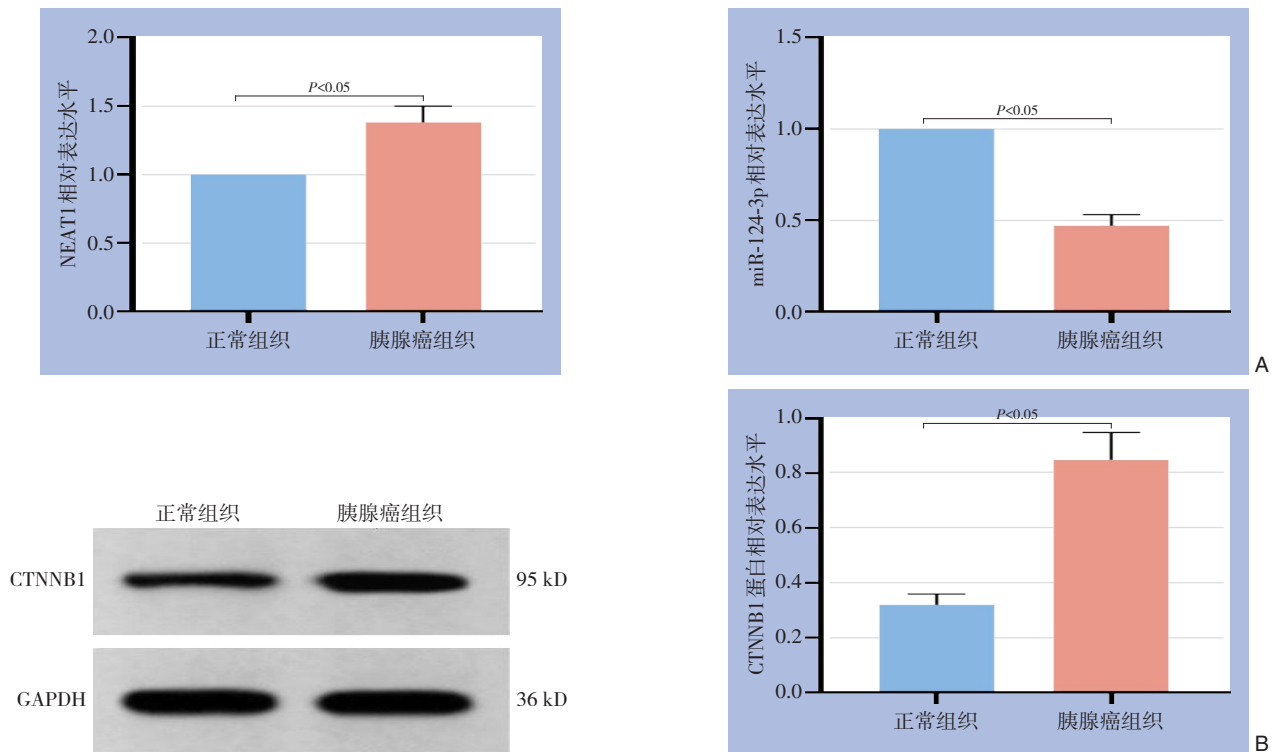


图2 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1在组织中的表达 A: qRT-PCR检测NEAT1、miR-124-3p在组织中的表达; B: Western blot检测CTNNB1蛋白在组织中的表达

Figure 2 Expression of NEAT1, miR-124-3p, and CTNNB1 in tissues A: qRT-PCR analysis of NEAT1 and miR-124-3p expression in tissues; B: Western blot analysis of CTNNB1 protein expression in tissues

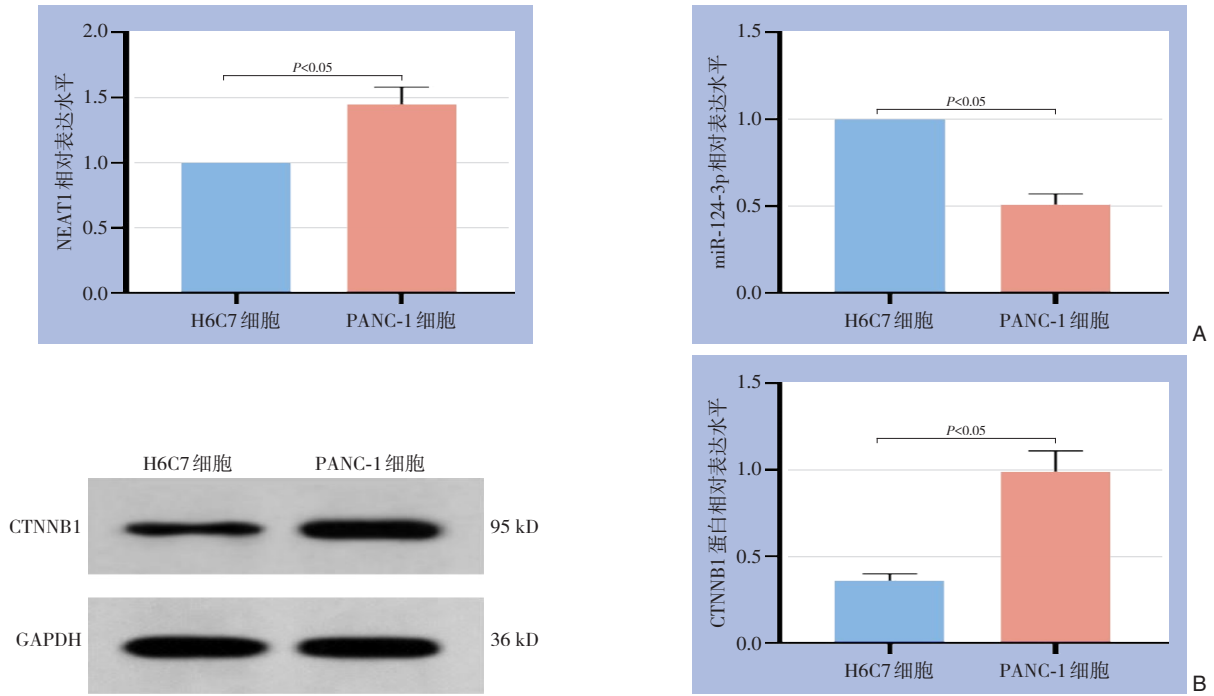


图3 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1在细胞中的表达 A: qRT-PCR检测NEAT1、miR-124-3p在细胞中的表达; B: Western blot检测CTNNB1蛋白在细胞中的表达

Figure 3 Expression of NEAT1, miR-124-3p, and CTNNB1 in cells A: qRT-PCR analysis of NEAT1 and miR-124-3p expression in cells; B: Western blot analysis of CTNNB1 protein expression in cells

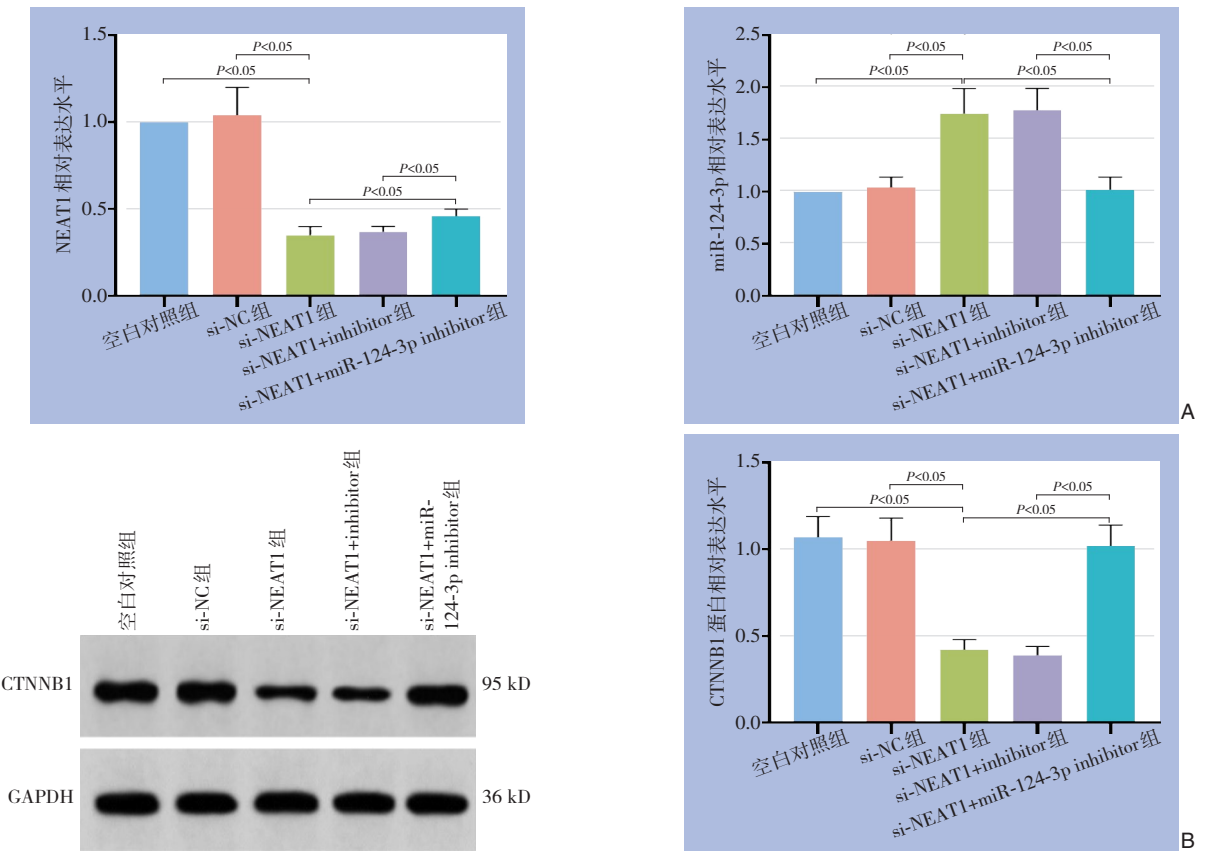


图4 NEAT1、miR-124-3p、CTNNB1蛋白在各组PANC-1细胞中的表达 A: qRT-PCR检测NEAT1、miR-124-3p的表达; B: Western blot检测CTNNB1蛋白的表达

Figure 4 Expression of NEAT1, miR-124-3p, and CTNNB1 protein in different groups of PANC-1 cells A: qRT-PCR analysis of NEAT1 and miR-124-3p expression; B: Western blot analysis of CTNNB1 protein expression

2.4 转染后各组 PANC-1 细胞增殖能力的变化

与空白对照组、si-NC 组比较, si-NEAT1 组 OD₄₅₀ 值降低 (均 $P<0.05$); 与 si-NEAT1 组、si-

NEAT1+inhibitor NC 组比较, si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组 OD₄₅₀ 值增高 (均 $P<0.05$) (表 2)。

表2 各组 PANC-1 细胞 OD₄₅₀ 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of OD₄₅₀ values among different groups of PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$)

分组	OD ₄₅₀ 值
空白对照组	0.97±0.11
si-NC 组	0.95±0.10
si-NEAT1 组	0.30±0.04 ^{1),2)}
si-NEAT1+inhibitor NC 组	0.32±0.03
si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组	0.85±0.09 ^{3),4)}

注: 1)与空白对照组比较, $P<0.05$; 2)与 si-NC 组比较, $P<0.05$; 3)与 si-NEAT1 组比较, $P<0.05$; 4)与 si-NEAT1+inhibitor NC 组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. blank control group; 2) $P<0.05$ vs. si-NC group; 3) $P<0.05$ vs. si-NEAT1 group; 4) $P<0.05$ vs. si-NEAT1+inhibitor NC group

2.5 转染后各组 PANC-1 细胞凋亡率的变化

与空白对照组、si-NC 组比较, si-NEAT1 组凋亡率升高 (均 $P<0.05$); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1+

inhibitor NC 组比较, si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组凋亡率降低 (均 $P<0.05$) (图 5) (表 3)。

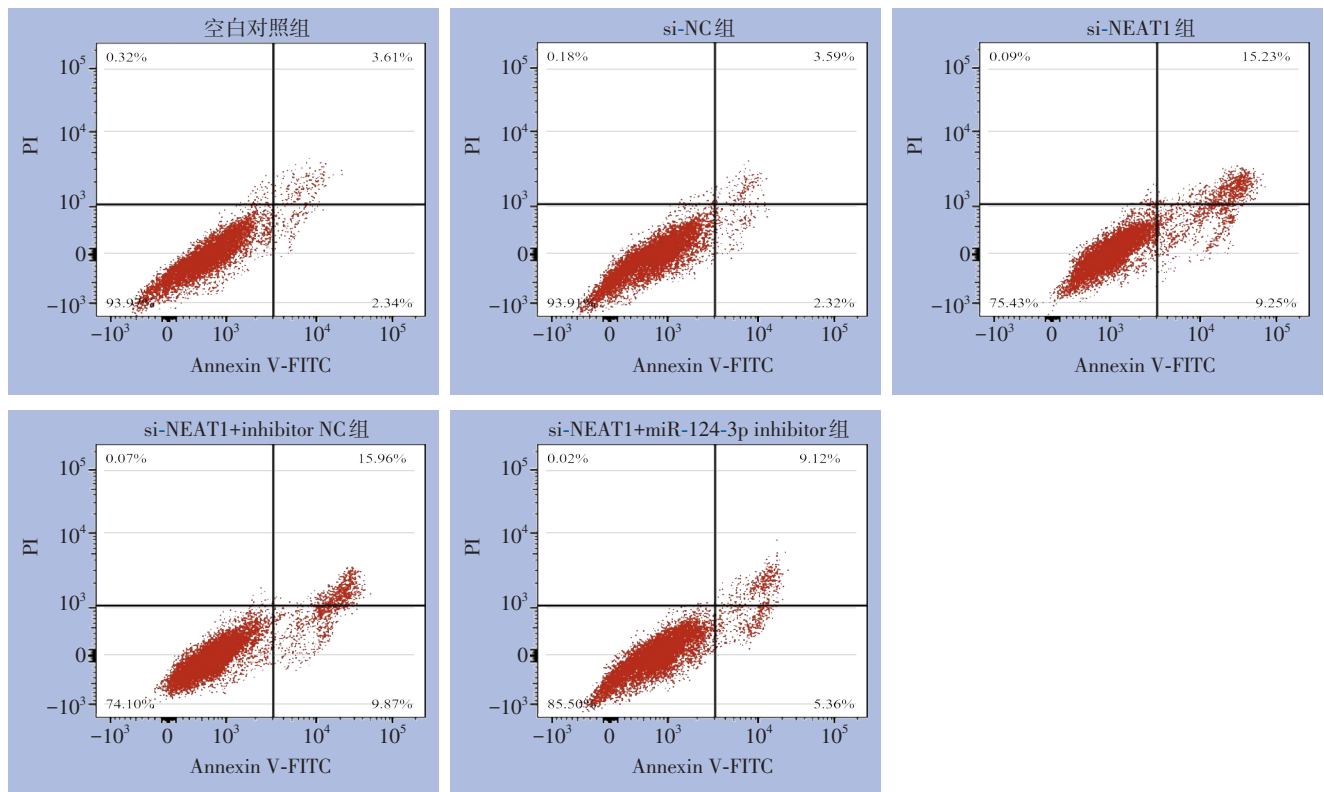


图5 流式细胞术检测 PANC-1 细胞凋亡

Figure 5 Apoptosis of PANC-1 cells detected by flow cytometry

2.6 转染后各组 PANC-1 细胞侵袭、迁移能力的变化

与空白对照组、si-NC 组比较, si-NEAT1 组迁移、侵袭细胞数量降低 (均 $P<0.05$); 与 si-NEAT1 组、

si-NEAT1+inhibitor NC 组比较, si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组迁移、侵袭细胞数量增高 (均 $P<0.05$) (图 6)。

表 3 各组 PANC-1 细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of apoptosis rates among different groups of PANC-1 cells (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	凋亡率
空白对照组	5.95±0.58
si-NC 组	5.91±0.63
si-NEAT1 组	24.48±2.94 ^{1),2)}
si-NEAT1+inhibitor NC 组	25.83±3.21
si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组	14.48±1.55 ^{3),4)}

注: 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 si-NC 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 si-NEAT1 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 si-NEAT1+inhibitor NC 组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group; 3) $P < 0.05$ vs. si-NEAT1 group; 4) $P < 0.05$ vs. si-NEAT1+inhibitor NC group

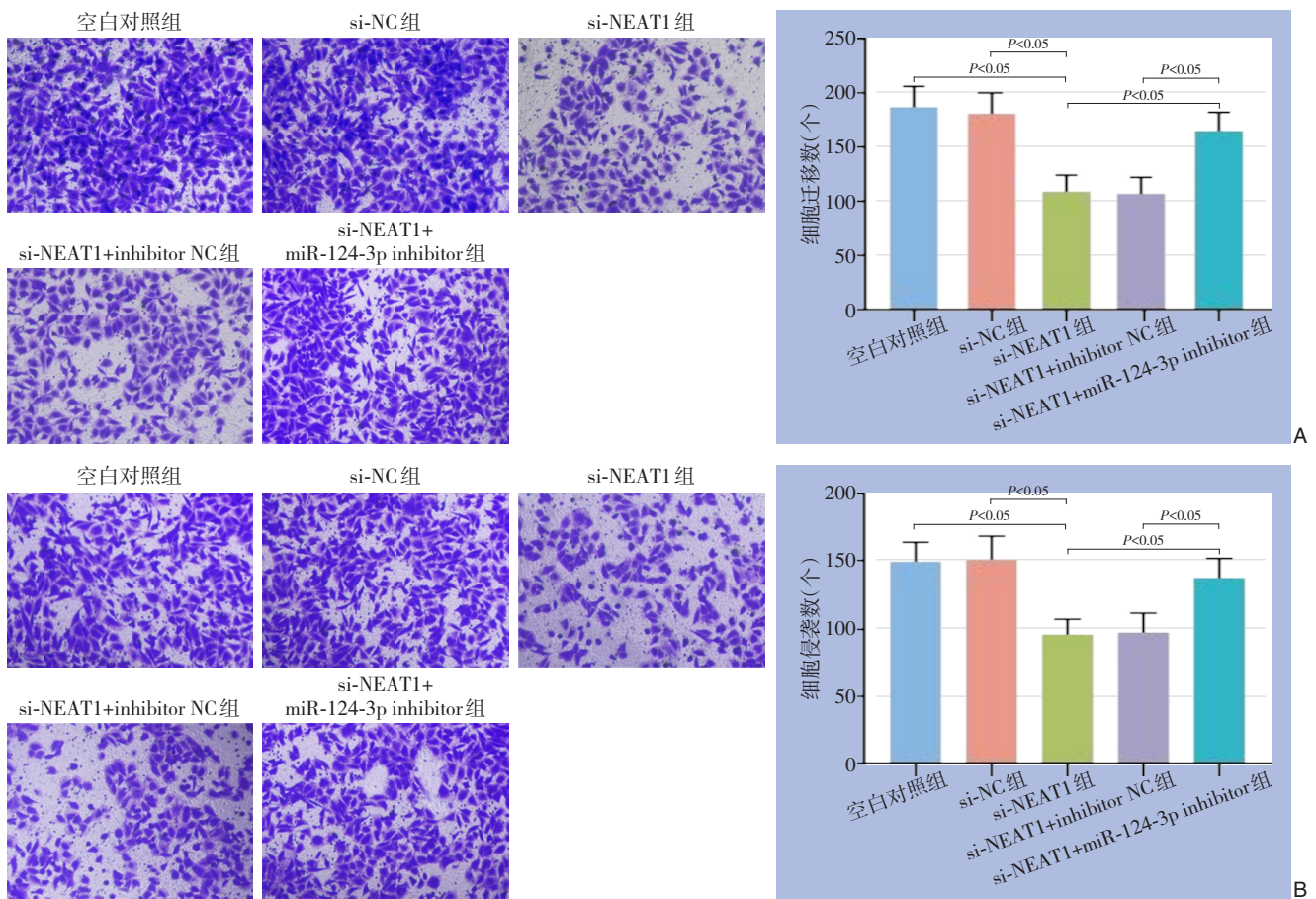


图 6 Transwell 实验 ($\times 200$)
Figure 6 Transwell assay ($\times 200$)

A: 细胞迁移检查; B: 细胞侵袭检测
A: Cell migration assay; B: Cell invasion assay

2.7 转染后各组 PANC-1 细胞上皮-间充质转化 (EMT) 相关蛋白表达的变化

与空白对照组、si-NC 组比较, si-NEAT1 组细胞 E-cadherin 蛋白表达增高, N-cadherin、vimentin 蛋白表达降低 (均 $P < 0.05$); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor NC 组比较, si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组细胞 E-cadherin 蛋白表达下降, N-cadherin、

vimentin 蛋白表达增高 (均 $P < 0.05$) (图 7)。

2.8 转染后各组 PANC-1 细胞在小鼠体内生长情况

si-NEAT1 组肿瘤体积、肿瘤质量明显小于空白对照组、si-NC 组比较 (均 $P < 0.05$); si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor 组肿瘤体积、肿瘤质量明显大于 si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor NC 组 (均 $P < 0.05$) (图 8) (表 4)。

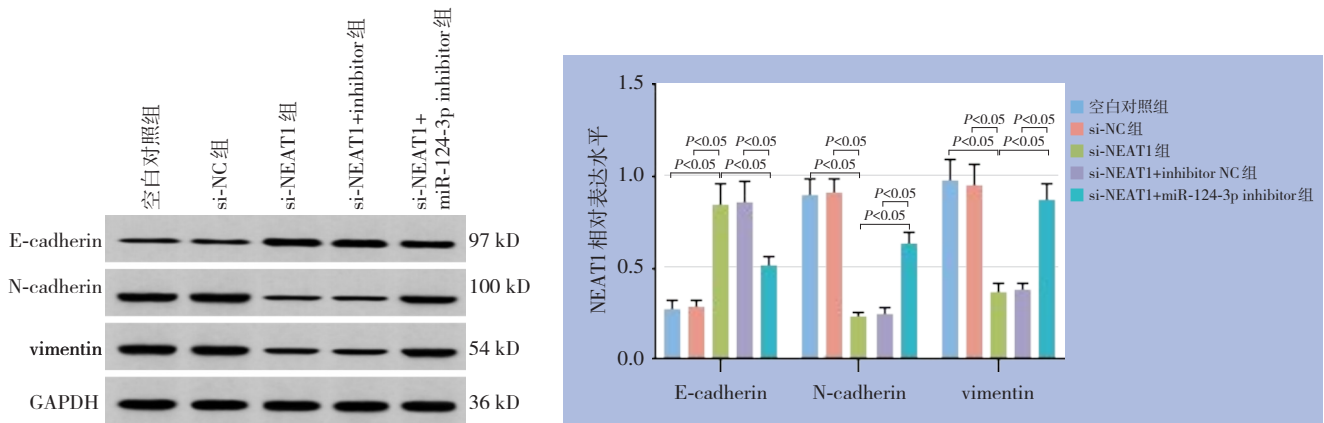


图7 Western blot测定E-cadherin、vimentin、N-cadherin蛋白表达

Figure 7 Western blot analysis for protein expressions of E-cadherin, Vimentin and N-cadherin

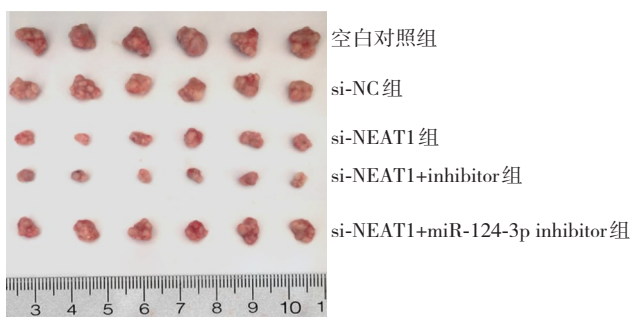


图8 各组裸鼠肿瘤代表图

Figure 8 Tumor representation of nude mice in each group

表4 各组肿瘤体积和肿瘤质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of tumor volume and tumor weight among different groups ($\bar{x} \pm s$)

分组	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤质量(g)
空白对照组	428.57±46.67	0.66±0.09
si-NC组	422.36±45.57	0.64±0.08
si-NEAT1组	134.93±15.57 ^{1),2)}	0.26±0.01 ^{1),2)}
si-NEAT1+inhibitor NC组	129.73±15.37	0.24±0.03
si-NEAT1+miR-124-3p inhibitor组	331.57±35.73 ^{3),4)}	0.57±0.04 ^{3),4)}

注: 1)与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2)与si-NC组比较, $P < 0.05$; 3)与si-NEAT1组比较, $P < 0.05$; 4)与si-NEAT1+inhibitor NC组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-NC group; 3) $P < 0.05$ vs. si-NEAT1 group; 4) $P < 0.05$ vs. si-NEAT1+inhibitor NC group

3 讨论

胰腺癌是最普遍的恶性肿瘤之一, 是全球主要的公共卫生问题^[16], 其5年生存率约为8%, 主要原因是诊断较晚且缺乏有效治疗^[17]。因此, 迫切需要更好地了解胰腺癌进展中涉及的分子机制,

确定治疗胰腺癌的新靶点和开发新的治疗策略。

研究^[18-20]表明, lncRNA生物标志物和lncRNA靶向治疗越来越受到人们的关注, 大量研究证实lncRNA在包括胰腺癌在内的各种人类恶性肿瘤中发挥着重要作用。据报道^[21], NEAT1是消化系统肿瘤中的不良预后因素。已有研究^[22]发现, NEAT1可能抑制胰腺癌的发生和发展。NEAT1在体外可能促进胰腺癌细胞增殖、迁移和吉西他滨耐药性, 并增强体内致瘤性^[23]。在本研究中, 在胰腺癌组织以及PANC-1细胞中, NEAT1、CTNNB1高表达, miR-124-3p低表达, 故本研究通过转染si-NEAT1来沉默NEAT1进而探讨NEAT1在胰腺癌细胞中的作用。结果显示, 沉默NEAT1使PANC-1细胞OD₄₅₀值、裸鼠肿瘤体积、肿瘤质量下降, 凋亡率升高, 表明沉默NEAT1可能在体外抑制胰腺癌细胞的恶性生物学行为, 在体内抑制移植瘤的生长。EMT过程涉及胚胎发育过程中的形态发生, 并且还促进肿瘤发生中的恶性进展^[24]。在EMT过程中, 上皮细胞通过下调E-cadherin失去其上皮特征, 通过上调N-cadherin和vimentin获得间质表型^[25]。PANC-1细胞在EMT过程后获得迁移和侵入周围基质的能力, 随后通过血液和淋巴管途径进一步扩散, 进而发展为晚期胰腺癌^[26]。因此, 抑制胰腺癌细胞EMT过程的发生可以抑制胰腺癌进展。本实验结果显示, 沉默NEAT1降低了PANC-1细胞的迁移、侵袭数量, 下调了N-cadherin、vimentin蛋白表达, 上调了E-cadherin蛋白表达, 表明沉默NEAT1可抑制PANC-1细胞获得间质表型, 抑制PANC-1细胞发生迁移和侵袭, 进而抑制胰腺癌的进展。据报道^[27-28], EMT由相关转录因子(Snail、Zeb、Slug、

Twist) 介导, 转录因子的激活可促进 EMT 激活。本研究推测 NEAT1 可能通过调节 Snail 等转录因子的水平促进 EMT 进程, 进而促进胰腺癌细胞的迁移和侵袭。但这需要在未来的实验研究中证实。

生物信息学预测结果显示, miR-124-3p 是 NEAT1 的可能靶基因。以上研究已经证实 NEAT1 在胰腺癌的作用, Guo 等^[29]发现, 沉默 miR-124-3p 促进乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和化学耐药性。Idichi 等^[30]研究显示, miR-124-3p 在胰腺导管腺癌中表达下调。与上述研究一致, 本实验结果显示, miR-124-3p 在胰腺癌组织和 PANC-1 细胞中低表达, 抑制 miR-124-3p 减轻了 NEAT1 沉默对 PANC-1 细胞迁移、侵袭、增殖的抑制作用。提示 NEAT1 可能通过 miR-124-3p 影响 PANC-1 细胞进展。接着, 本研究探索了 miR-124-3p 的靶 mRNA, 发现在 PANC-1 细胞中 miR-124-3p 直接靶向 CTNNB1。据报道, 胰腺癌中 CTNNB1 上调表达, 抑制其表达可阻碍胰腺癌细胞的转移、增殖能力, 并抑制胰腺癌细胞干性^[31]。本实验结果显示, PANC-1 细胞中 CTNNB1 高表达, 与上述研究一致, 说明 CTNNB1 在胰腺癌进展中起促进作用。在 PANC-1 细胞中沉默 NEAT1 后, CTNNB1 蛋白表达下降; 提高 miR-124-3p 表达后, CTNNB1 蛋白表达增高, 提示沉默 NEAT1 对 PANC-1 细胞迁移、侵袭、EMT 和增殖的抑制作用及对凋亡的促进作用可能是通过提高 miR-124-3p 表达、降低 CTNNB1 表达来实现的。

综上所述, NEAT1 可能通过 ceRNA 机制与 miR-124-3p 竞争性结合, 削弱 miR-124-3p 对 CTNNB1 的抑制作用, 从而上调 CTNNB1 表达, 促进胰腺癌细胞的恶性生物学行为。但本研究尚有不足之处, 首先是仅使用一种胰腺癌细胞系进行功能验证实验; 其次是未进行 miR-124-3p 调控 CTNNB1 表达的回复实验; 最后是只关注了裸鼠移植瘤的生长, 未在体内进行机制研究。以上不足也将是后续研究的重点。

作者贡献声明: 陈巍、黄莎莎负责实验实施与数据收集, 田霞负责实验设计与指导, 郭芳、韩峥、蔡一珊负责数据分析和论文写作、修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21654.
- [2] 朱鑫哲, 李浩, 徐华祥, 等. 2021年胰腺癌研究及诊疗新进展[J]. *中国癌症杂志*, 2022, 32(1): 1-12. doi: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.01.001.
- [3] Zhu XZ, Li H, Xu HX, et al. Advances in basic research, clinical diagnosis and treatment of pancreatic cancer in 2021[J]. *China Oncology*, 2022, 32(1): 1-12. doi: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.01.001.
- [4] 陈宏森, 杨之雨, 蒋栋铭, 等. 2006—2020年中国20岁及以上人群胰腺癌死亡分析及趋势预测[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2023, 30(12):699-707. doi:10.16073/j.cnki.cjcp.2023.12.01.
- [5] Chen HS, Yang ZY, Jiang DM, et al. Mortality analysis and trends of people aged 20 and above with pancreatic cancer in China between 2006 and 2020[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2023, 30(12): 699-707. doi: 10.16073/j.cnki.cjcp.2023.12.01.
- [6] Singhi AD, Wood LD. Early detection of pancreatic cancer using DNA-based molecular approaches[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(7):457-468. doi:10.1038/s41575-021-00470-0.
- [7] Kolbeinson HM, Chandana S, Wright GP, et al. Pancreatic cancer: a review of current treatment and novel therapies[J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1):2129884. doi:10.1080/08941939.2022.2129884.
- [8] Di Federico A, Tateo V, Parisi C, et al. Hacking pancreatic cancer: present and future of personalized medicine[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(7):677. doi:10.3390/ph14070677.
- [9] Zhang H, Zhu C, He Z, et al. lncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 179. doi: 10.1186/s13046-020-01687-8.
- [10] Luo Y, Wang Q, Teng L, et al. lncRNA DANCR promotes proliferation and metastasis in pancreatic cancer by regulating miRNA-33b[J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(1):18-27. doi:10.1002/2211-5463.12732.
- [11] Gao ZZ, Shi Y, Wang JW, et al. Long non-coding RNA NEAT1 absorbs let-7 g-5p to induce epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells through upregulating BACH1[J]. *Dig Liver Dis*, 2021:S1590-S8658(21)00216-4. doi:10.1016/j.dld.2021.04.031.
- [12] Chen Y, Chang Y, Zhou JP, et al. Inhibiting lncRNA NEAT1 facilitates the sensitization of melanoma cells to cisplatin through modulating the miR-519c-3p-McCP2 axis[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 243:154364. doi:10.1016/j.prp.2023.154364.
- [13] Wei XY, Tao S, Mao HL, et al. Exosomal lncRNA NEAT1 induces paclitaxel resistance in breast cancer cells and promotes cell migration by targeting miR-133b[J]. *Gene*, 2023, 860:147230. doi: 10.1016/j.gene.2023.147230.

- [12] Feng Y, Gao L, Cui G, et al. lncRNA NEAT1 facilitates pancreatic cancer growth and metastasis through stabilizing ELF3 mRNA[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(1):237-248.
- [13] 李险波, 张志强, 韩小勇, 等. lncRNA NEAT1通过调控miR-124-3p对食管鳞状细胞癌细胞迁移、侵袭的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(22): 2722-2727. doi: 10.3969/j. issn. 1673-4130.2022.22.007.
- Li XB, Zhang ZQ, Han XY, et al. Effects of lncRNA NEAT1 on the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by regulating miR-124-3p[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2022, 43(22): 2722-2727. doi: 10.3969/j. issn.1673-4130.2022.22.007.
- [14] Hung YH, Hsu SH, Hou YC, et al. Semaphorin 6C suppresses proliferation of pancreatic cancer cells via inhibition of the AKT/GSK3 β -catenin/cyclin D1 pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2608. doi:10.3390/ijms23052608.
- [15] Song C, Chen T, He L, et al. PRMT1 promotes pancreatic cancer growth and predicts poor prognosis[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(1):51-62. doi:10.1007/s13402-019-00435-1.
- [16] Cai J, Chen HD, Lu M, et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: trends, risk factors, screening, and prognosis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 520:1-11. doi:10.1016/j.canlet.2021.06.027.
- [17] Jiang Z, Zhang W, Zhang Z, et al. Intratumoral microbiota: a new force in diagnosing and treating pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2023, 554:216031. doi:10.1016/j.canlet.2022.216031.
- [18] Mas AM, Huarte M. Long noncoding RNA signatures as cancer biomarkers[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(16):3059-3062. doi:10.1200/JCO.23.00381.
- [19] Pierce JB, Zhou H, Simion V, et al. Long noncoding RNAs as therapeutic targets[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1363:161-175. doi: 10.1007/978-3-030-92034-0_9.
- [20] Wang H, Ding Y, He Y, et al. lncRNA UCA1 promotes pancreatic cancer cell migration by regulating mitochondrial dynamics via the MAPK pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 748:109783. doi: 10.1016/j.abb.2023.109783.
- [21] 乐奇, 吕坤, 朱俊亚, 等. lncRNA NEAT1与消化系统恶性肿瘤预后及临床病理特征关系的Meta分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(9): 1210-1219. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2022.09.010.
- Le Q, Lu K, Zhu JY, et al. Meta-analysis of the association of lncRNA NEAT1 with prognosis and clinicopathologic features of digestive system malignant tumors[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(9): 1210-1219. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2022.09.010.
- [22] Wei F, Yan Z, Zhang X, et al. lncRNA-NEAT1 inhibits the occurrence and development of pancreatic cancer through spongy miR-146b-5p/traff6[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2023. doi: 10.1080/02648725.2023.2192059. [Online ahead of print]
- [23] Wu R, Su Z, Zhao L, et al. Extracellular vesicle-loaded oncogenic lncRNA NEAT1 from adipose-derived mesenchymal stem cells confers gemcitabine resistance in pancreatic cancer via miR-491-5p/snai1/SOCS3 axis[J]. *Stem Cells Int*, 2023, 2023: 6510571. doi: 10.1155/2023/6510571.
- [24] Sato M, Matsumoto M, Saiki Y, et al. BACH1 promotes pancreatic cancer metastasis by repressing epithelial genes and enhancing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(6): 1279-1292. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-4099.
- [25] Ling Z, Cheng B, Tao X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: challenges and opportunities[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(7):1548-1561. doi:10.1002/ijc.33352.
- [26] Liu M, Zhang Y, Yang J, et al. Zinc-dependent regulation of ZEB1 and YAP1 coactivation promotes epithelial-mesenchymal transition plasticity and metastasis in pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5):1771-1783. doi:10.1053/j.gastro.2020.12.077.
- [27] Zhang T, Yang J, Sun Y, et al. Interleukin-6 and hypoxia synergistically promote EMT-mediated invasion in epithelial ovarian cancer via the IL-6/STAT3/HIF-1 α feedback loop[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2023, 2023: 8334881. doi: 10.1155/2023/8334881.
- [28] Li Z, Wu Y, Zhang C, et al. lncRNA SNHG5 suppresses cell migration and invasion of human lung adenocarcinoma via regulation of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Oncol*, 2023, 2023:3335959. doi:10.1155/2023/3335959.
- [29] Guo Q, Wang H, Duan J, et al. An alternatively spliced p62 isoform confers resistance to chemotherapy in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(21):4001-4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-0909.
- [30] Idichi T, Seki N, Kurahara H, et al. Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(48): 28849-28865. doi: 10.18632/oncotarget.25599.
- [31] Yao X, Mao Y, Wu D, et al. Exosomal circ_0030167 derived from BM-MSCs inhibits the invasion, migration, proliferation and stemness of pancreatic cancer cells by sponging miR-338-5p and targeting the Wif1/Wnt8 β -catenin axis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 512: 38-50. doi:10.1016/j.canlet.2021.04.030.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:陈巍,韩峥,黄莎莎,等.长链非编码RNA NEAT1调控miR-124-3p/CTNNB1轴对胰腺癌细胞生物学功能的影响[J].中国普通外科杂志,2025,34(3):495-505. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.230365

Cite this article as: Chen W, Han Z, Huang SS, et al. Long noncoding RNA NEAT1 regulates the miR-124-3p/CTNNB1 axis to affect the biological functions of pancreatic cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2025, 34(3):495-505. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.230365