

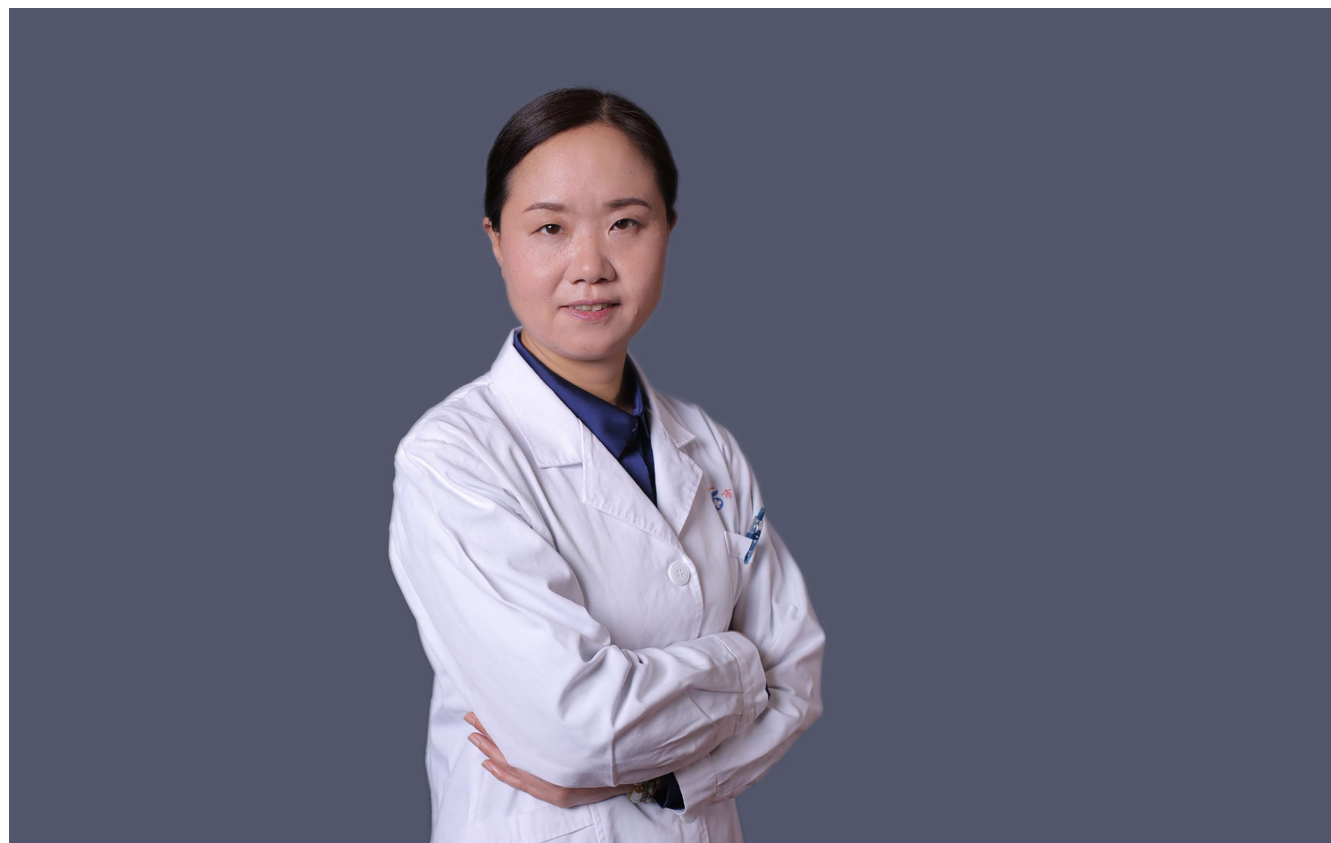
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2018 年 11 月 8 日 第 26 卷 第 31 期 (Volume 26 Number 31)



31 / 2018

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被美国国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.



述评

- 1789 驱动蛋白家族在消化道肿瘤中的研究进展

董晓骅, 杨晓军

基础研究

- 1795 miR-708-5p靶向GAGE12I抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭

李晶晶, 强锋, 邓中民

- 1805 非酒精性脂肪性肝病合并2型糖尿病大鼠模型的建立

柯淑红, 郑承红, 彭聪, 周扬, 马威

临床研究

- 1812 慢性萎缩性胃炎发生胃癌的危险因素: 一项长期随访研究

张华颖, 黄鑫宇, 薛会光, 杨爱华, 孙学国, 刘希双

- 1818 *SERPINE1*基因在胃癌中的表达及临床意义

沈苗, 钟兴伟

- 1825 西藏各地市健康人群*H. pylori*菌感染状况分析

陈荣, 刘超, 李晓萍, 宦徽, 胡仁伟, 吴浩, 邓凯

文献综述

- 1832 幽门螺杆菌感染引起的免疫应答与免疫逃逸机制研究进展

张鑫, 刘纯杰

临床实践

- 1843 血清同型半胱氨酸水平、幽门螺杆菌感染在重症阻塞性睡眠呼吸暂停综合征中的作用

赵云青

消 息

- 1804 《世界华人消化杂志》正文要求
1817 《世界华人消化杂志》修回稿须知
1824 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
1831 《世界华人消化杂志》栏目设置
1848 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

封面故事

陈凤媛, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 200240, 上海市闵行区鹤庆路801号, 复旦大学附属上海市第五人民医院消化内科. 擅长肠道炎症性疾病诊治、消化内镜技术、循证医学在消化病诊断与治疗中的应用. 上海市闵行区领军人才. 上海市医学会消化系专科分会第九届委员会青年委员, 中华医学会内科学分会临床循证医学组委员, 中华医学会消化病学分会临床流行病学协作组委员, 上海市浦东新区科学技术专家库评审专家. 曾在美国Georgia State University和Emory University做访问学者. 《世界华人消化杂志》编委. 主持和参与课题14项, 在国内外期刊发表论文30余篇.

本期责任人

编务 李香; 送审编辑 崔丽君; 组版编辑 张砚梁; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 崔丽君; 形式规范审核编辑部主任 马亚娟; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2018-11-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

[http://www.wjgnet.com/1009-3079/
editorialboard.htm](http://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm)

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjgd@wjgnet.com<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路
62号, 远洋国际中心D座903室
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被美国国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

定价

每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2018 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 26 Number 31 Nov 8, 2018

EDITORIAL

1789 Role of kinesin superfamily in gastrointestinal cancer

Dong XH, Yang XJ

BASIC RESEARCH

1795 *MiR-708-5p* inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting *GAGE12I*

Li JJ, Qiang F, Deng ZM

1805 Establishment of a rat model of non-alcoholic fatty liver disease combined with type 2 diabetes

Ke SH, Zheng CH, Peng C, Zhou Y, Ma W

CLINICAL RESEARCH

1812 Risk factors for development of gastric cancer in chronic atrophic gastritis: A long-term follow-up study

Zhang HY, Huang XY, Xue HG, Yang AH, Sun XG, Liu XS

1818 Clinical significance of expression of *SERPINE1* gene in gastric cancer

Shen M, Zhong XW

1825 Prevalence of *H. pylori* infection in healthy population in Tibet

Chen M, Liu C, Li XP, Huan H, Hu RW, Wu H, Deng K

REVIEW

1832 Immune response and immune escape mechanism in *Helicobacter pylori* infection

Zhang X, Liu CJ

CLINICAL PRACTICE

1843 Significance of serum homocysteine levels and *Helicobacter pylori* infection in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome

Zhao YQ

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 26 Number 31 Nov 8, 2018

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Feng-Yuan Chen, Chief Physician, Department of gastroenterology, Shanghai Fifth People's Hospital Fudan University, 801 Heqing Road, Minhang District, Shanghai 200240, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, and Superstar Journals Database.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Li-Jun Cui* Electronic Editor: *Yan-Liang Zhang* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Li-Jun Cui* Proof Editor: *Ya-Juan Ma* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date November 8, 2018

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <http://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

World Chinese Journal of Digestology

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2018 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <http://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

miR-708-5p靶向GAGE12I抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭

李晶晶, 强 锋, 邓中民

李晶晶, 强锋, 邓中民, 湖州市第一人民医院消化内科 浙江省湖州市 313000

李晶晶, 主治医师, 研究方向为消化道肿瘤.

作者贡献分布: 本文由李晶晶与强锋共同设计; 数据分析由邓中民与李晶晶共同完成; 写作由李晶晶、邓中民及强锋协作完成.

通讯作者: 强锋, 副主任医师, 313000, 浙江省湖州市吴兴区广场后路158号, 湖州市第一人民医院消化内科. 20886959@qq.com
电话: 05722039427

收稿日期: 2018-09-07

修回日期: 2018-10-10

接受日期: 2018-10-19

在线出版日期: 2018-11-08

MiR-708-5p inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting GAGE12I

Jing-Jing Li, Feng Qiang, Zhong-Min Deng

Jing-Jing Li, Feng Qiang, Zhong-Min Deng, Department of Gastroenterology, Huzhou First People's Hospital, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Feng Qiang, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Huzhou First People's Hospital, 158 Gonghou Road, Wuxing District, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China. 20886959@qq.com

Received: 2018-09-07

Revised: 2018-10-10

Accepted: 2018-10-19

Published online: 2018-11-08

Abstract

AIM

To explore the effect of *miR-708-5p* on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer (GC) cells and

the possible mechanism involved.

METHODS

qRT-PCR was used to detect the expression of *miR-708-5p* in GC cell lines AGS and BGC-823. MTT, colony formation and Transwell chamber assays were performed to detect the effect of overexpression of *miR-708-5p* and silencing of *GAGE12I* on the proliferation, migration and invasion of AGS and BGC-823 cells. The double luciferase reporter gene experiment was performed to confirm the relationship between *miR-708-5p* and *GAGE12I*. Western blot analysis was used to detect the effect of *miR-708-5p* on the expression of *GAGE12I*. Target response assay was used to confirm the effect of *GAGE12I* on the inhibition of proliferation, migration and invasion of AGS and BGC-823 cells by *miR-708-5p*.

RESULTS

MiR-708-5p was downregulated in GC tissues and GC cell lines AGS and BGC-823. Upregulation of *miR-708-5p* and silencing of *GAGE12I* inhibited the proliferation, migration and invasion of AGS cells. *GAGE12I* was a target gene of *miR-708-5p*, and *miR-708-5p* negatively regulated *GAGE12I* expression. Overexpression of *GAGE12I* partly reversed the inhibitory effect of *miR-708-5p* on proliferation, migration and invasion of AGS and BGC-823 cells.

CONCLUSION

MiR-708-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of GC cells by targeting *GAGE12I*.

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *miR-708-5p*; *GAGE12I*; Gastric cancer; Proliferation

Li JJ, Qiang F, Deng ZM. MiR-708-5p inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting GAGE12I. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2018; 26(31): 1795-1804 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v26/i31/1795.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v26.i31.1795>

摘要

目的

探讨miR-708-5p靶向GAGE12I对胃癌(gastric cancer, GC)细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

方法

qRT-PCR检测miR-708-5p在GC组织和GC细胞AGS和BGC-823中的表达; MTT法、克隆形成实验和Transwell小室法检测miR-708-5p和GAGE12I对GC细胞AGS和BGC-823增殖、迁移和侵袭的影响; 双荧光素酶报告基因实验验证miR-708-5p与GAGE12I之间的靶向关系; Western blot检测miR-708-5p对GAGE12I表达的影响; 靶标回复实验验证GAGE12I对miR-708-5p抑制GC细胞AGS和BGC-823增殖、迁移和侵袭作用的影响。

结果

miR-708-5p在GC组织和GC细胞AGS和BGC-823中低表达; 上调miR-708-5p和沉默GAGE12I抑制GC细胞AGS增殖、迁移和侵袭; GAGE12I是miR-708-5p的靶基因, 且miR-708-5p负性调节GAGE12I表达, 过表达GAGE12I可部分逆转miR-708-5p对GC细胞AGS和BGC-823增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

结论

miR-708-5p可靶向GAGE12I抑制GC细胞增殖、迁移和侵袭。

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: miR-708-5p; GAGE12I; 胃癌; 增殖

核心提要: miR-708-5p可靶向GAGE12I抑制胃癌(gastric cancer, GC)细胞增殖、迁移和侵袭, GAGE12I是miR-708-5p的靶基因且miR-708-5p负性调节GAGE12I表达, 过表达GAGE12I可部分逆转miR-708-5p对GC细胞AGS和BGC-823增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

李晶晶, 强锋, 邓中民. miR-708-5p靶向GAGE12I抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭. *世界华人消化杂志* 2018; 26(31): 1795-1804 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v26/i31/1795.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v26.i31.1795>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是一种发病率和致死率极高的

恶性肿瘤^[1,2], 研究GC发生发展的分子机制具有重要意义. miRNA, 可通过调控其靶基因, 在GC细胞发生发展中发挥作用^[3]. 研究发现, GAGE12I在GC组织中表达上调^[4]. 本研究, 发现miR-708-5p可靶向GAGE12I影响GC细胞增殖、迁移侵袭, 为明确GC发生发展机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人GC细胞AGS和BGC-823及人正常胃黏膜细胞GES-1购自美国ScienCell研究实验室; F12K培养基、RPMI-1640培养基、DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素(双抗)、胰蛋白酶购于哈灵生物; miR-708-5p mimic(miR-708-5p)和miR-NC, miR-708-5p inhibitor(anti-miR-708-5p)和negative control inhibitor(anti-miR-NC)、pcDNA3.0vector和pcDNA GAGE12I购于广州瑞博生物科技有限公司, GAGE12I基因特异性慢病毒包装载体shGAGE12I及对照载体购于上海吉玛生物公司; 细胞裂解和蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光检测试剂和抗小鼠IgG-HRP辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG购于碧云天生物科技公司; miRNeasy EFPE试剂盒购于BioTeke公司、Trizol试剂为广州豪凯生物公司产品; 反转录试剂盒和实时定量提取试剂盒购于TAKARA公司; 细胞培养板和羊Transwell小室分别购于Nest公司和Corning公司; Matrigel胶为BD公司产品; Lipofectamine 2000转染试剂为赛默飞公司产品. GAPDH一抗、GAGE12I抗体为Epitomics公司产品; CCK8试剂为上海晶抗生物公司产品; 双荧光素酶报告基因质粒为吉满生物科技公司合成构建; 所有的引物合成为金唯智公司合成。

采用2017/2018年浙江省湖州市第一人民医院经病理专家证实为GC的石蜡包埋标本30例. 所有患者术前均未接受过放化疗. 收集患者肿瘤组织前获得患者知情并签署知情同意书. 本研究经浙江省湖州市第一人民医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人GC细胞AGS和BGC-823分别培养于含有10%胎牛血清的F12K培养基和RPMI-1640培养基中; 人正常胃黏膜细胞GES-1培养于10%胎牛血清的DMEM培养基中, 培养基中双抗浓度为1%, 培养于95% CO₂ 37 °C温箱中。

1.2.2 qRT-PCR检测miR-708-5p和GAGE12I表达: 按照实验要求, 取对数生长的细胞, 利用miRNeasy EFPE试剂盒和Trizol法提取GC组织或细胞miRNA和总RNA, 并参照对应的反转录试剂盒及引物进行操作将RNA反转成cDNA, 进行实时荧光定量PCR检测, 以U6和GAPDH作为内参, 各基因引物如下: U6

引物: U6-F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', U6-R: 5'-AACGCTTCACGA-ATTTGCGT-3', GAPDH引物: GAPDH-F: 5'-CCACTCCT CCACCTTTGAC-3', GDF11-R: 5'-CCCAGTTAGGGGTTTC-AGTC GGT-3', miR-708-5p引物: miR-708-5p-F: 5'-GGCGC GCAAGCAGCTTACAATC-3', miR-708-5p-R: 5'-CTGCA GGGTCCCAGGTAT-3'. 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因的相对表达水平。

1.2.3 细胞转染: 将对数生长期的AGS和BGC-823细胞进行转染实验, 按照实验目的将AGS细胞按如下转染分组分为8组, miR-NC组(转染miR-NC组)、miR-708-5p组(转染miR-708-5p mimic组)、anti-miR-708-5p组(转染miR-708-5p inhibitor组)、anti-miR-NC组(转染inhibitor-NC组)、shGAGE12I组(转染慢病毒质粒shGAGE12I组)、Scrambled组(对照质粒组)、vector+miR-708-5p组(共转染pcDNA和miR-708-5p mimic)和GAGE12I+miR-708-5p组(共转染pcDNAGAGE12I和miR-708-5p mimic), 按照lipo2000转染试剂说明书进行转染, 根据实验目的进行MTT和克隆形成实验检测、Transwell小室法检测、qRT-PCR检测和Western blot检测。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖: 取上述转染24 h后的细胞, 将其制备呈 1×10^4 个/mL的单细胞悬液后, 每孔100 μ L接种至96孔板中, 每组设置6个复孔, 观察细胞1-3 d细胞增殖特征。将96孔板置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内继续培养, 待细胞贴壁24 h、后加入CCK-8试剂, 2 h后用酶标仪检测450 nm波长检测吸光度值, 之后48 h、72 h按照同样操作进行检测。

1.2.5 克隆形成实验: 取转染后的AGS和BGC-823细胞, 胰蛋白酶消化处理, 用含有10%胎牛血清的完全培养基终止消化制备细胞悬液, 以适当的细胞密度接种于含有10 mL 37 $^{\circ}$ C预温好的培养皿中, 轻轻转动, 使细胞分布均匀, 置于上述培养环境下继续培养10-14 d, 每隔3 d更换一次新鲜培养液, 直至生成肉眼可见的细胞克隆为止; 弃去培养基, PBS清洗3次, 2 mL甲醇室温固定10 min, 弃去甲醇, 等量吉姆萨染色液染色30 min, 计算克隆形成数。

1.2.6 Transwell小室法检测细胞迁移侵袭: 迁移实验: 取上述转染后48 h后细胞, 将细胞制备成密度为 1×10^5 个/mL的悬液, 将200 μ L细胞悬液接种至Transwell小室上室中, 下室中加入600 μ L含有15%血清的DMEM培养液, 37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内培养48 h, 每组设置3个复孔, 弃去培养液, PBS洗涤, 4%的多聚甲醛固定细胞, PBS洗涤去除固定液, 结晶紫染色后PBS洗涤, 使用棉签擦去膜上层细胞, 显微镜下观察, 随机选取5个视野进行细胞技术并做相应分析。侵袭实验: 在小室底部用Matrigel胶

处理, 其它步骤同迁移实验。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验验证miR-708-5p与GAGE12I之间的靶向关系: 通过Targetscan在线分析网站预测到miR-708-5p与GAGE12I的3'UTR存在结合位点, 构建野生型GAGE12I的3'UTR的全长质粒, 分别与miR-NC、miR-708-5p mimic、negative control inhibitor、miR-708-5p inhibitor进行共转染, 按照双荧光素酶报告基因试剂盒操作步骤进行检测。

1.2.8 Western blot检测GAGE12I表达: 收集细胞, 用RIPA蛋白裂解液提取蛋白, BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C变性10 min, 采用SDS-PAGE电泳进行蛋白, 湿转法转膜, 5%脱脂奶粉4 $^{\circ}$ C封闭过夜, GAGE12I和GAPDH的一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 37 $^{\circ}$ C相应羊抗鼠二抗孵育1 h, 使用ECL发光液进行显影、曝光。

统计学处理 实验结果用mean \pm SD表示, 应用SPSS 19.0软件对实验中所获得原始数据进行统计学分析, 使用统计软件GraphPad Prism 6.0进行分析。两组之间的均数比较采用配对t检验; 均数之间两两比较采用LSD-t检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-708-5p在GC组织和细胞中低表达 qRT-PCR检测miR-708-5p在人GC组织及其癌旁组织, 人GC细胞AGS和BGC-823及人正常胃黏膜细胞GES-1中的表达, 结果显示, 与癌旁组织和人正常胃黏膜细胞GES-1相比, miR-708-5pGC组织和GC细胞AGS和BGC-823中低表达, 差异显著($P < 0.05$), 见图1。

2.2 上调miR-708-5p抑制GC细胞增殖 将miR-708-5p mimics转染至AGS和BGC-823细胞, qRT-PCR结果发现, 与miR-NC组相比, miR-708-5p在AGS细胞中表达上调($P < 0.05$)(图2A和B); CCK检测结果显示, miR-708-5p能够显著抑制细胞的生长活力($P < 0.05$)(图2C和D); 克隆形成实验结果显示, miR-708-5p可显著减少AGS和BGC-823细胞的克隆形成数。

2.3 上调miR-708-5p抑制GC细胞迁移和侵袭 将miR-708-5p mimics转染至AGS和BGC-823细胞, Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力。结果显示, 与miR-NC组相比, 转染了miR-708-5p mimic的AGS和BGC-823细胞的迁移和侵袭能力显著降低。见图3。

2.4 GAGE12I是miR-708-5p的靶基因 通过Targetscan在线预测分析网站预测miR-708-5p与GAGE12I的3'UTR存在结合位点(图4A), 双荧光素酶报告基因实验验证二者之间的靶向关系, 结果显示: 与miR-NC组相比, miR-708-5p mimic可显著抑制野生型MRTFA-WT的荧光素酶活性显著($P < 0.05$), 与anti-miR-NC组相比, miR-20a-

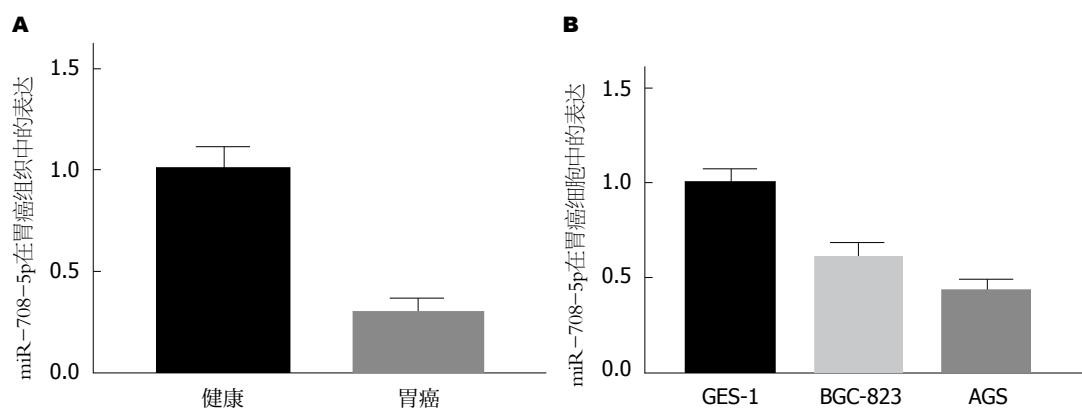
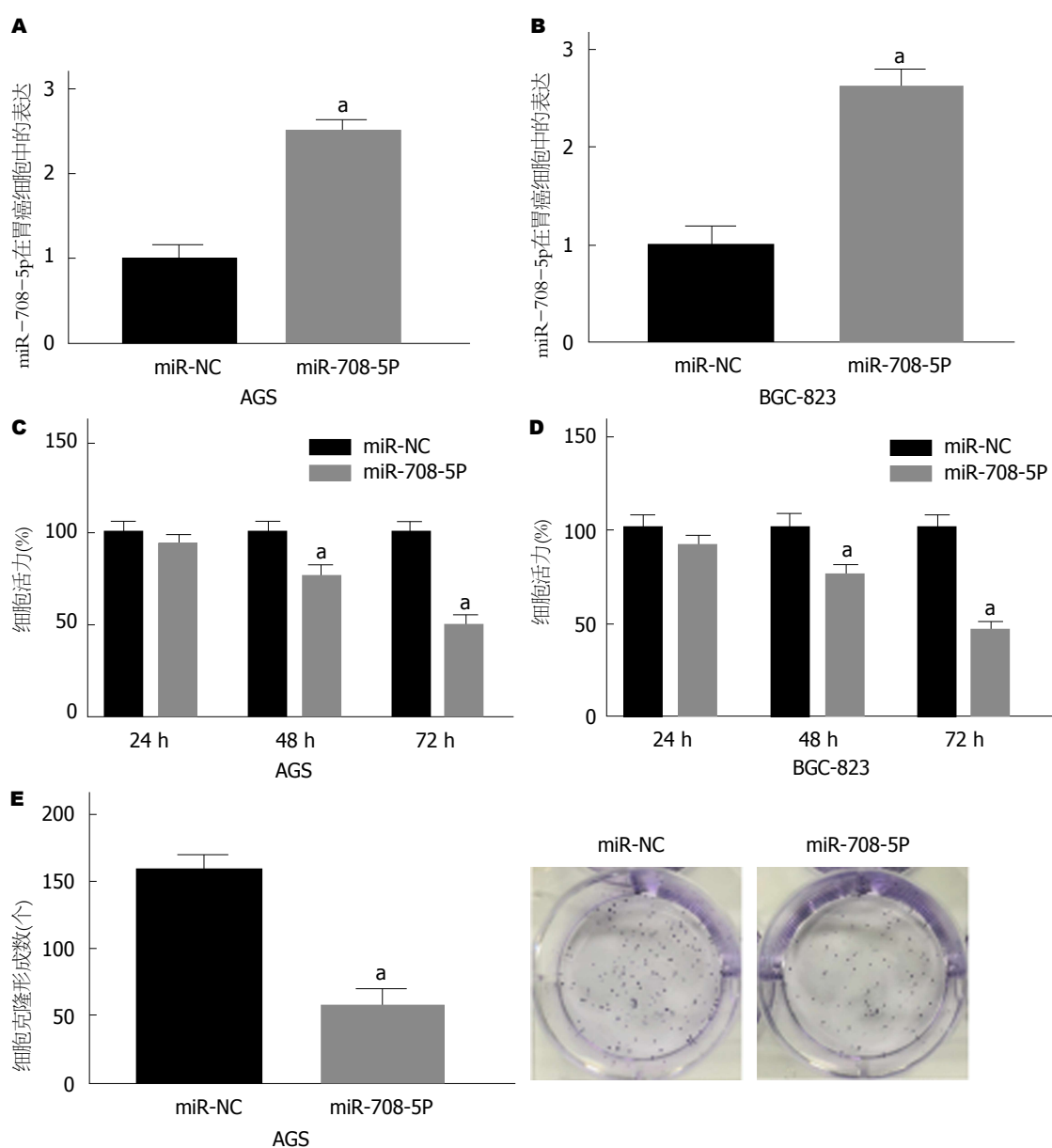


图1 miR-708-5p在胃癌组织和细胞中的表达。A: miR-708-5p在胃癌组织中的表达, 与对照组相比, $P < 0.05$; B: miR-708-5p在胃癌细胞中的表达, 与癌旁组织、GES-1细胞相比, $P < 0.05$ 。



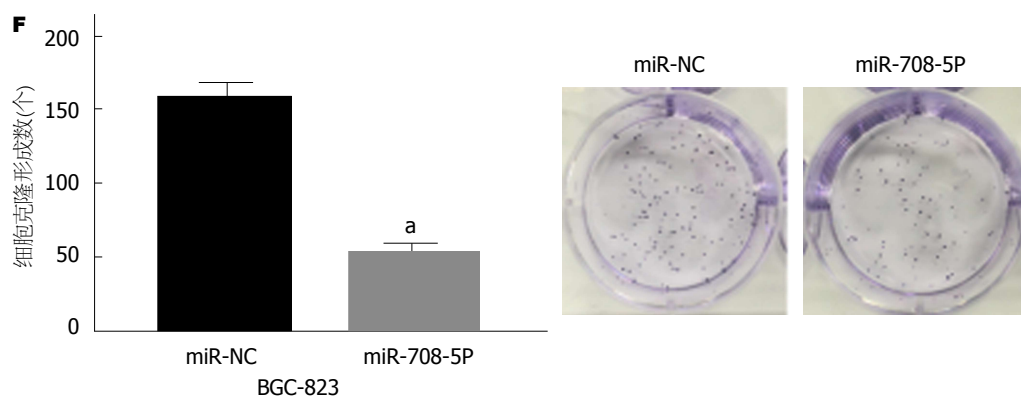


图 2 上调miR-708-5p对胃癌细胞AGS和BGC-823增殖的影响. A和B: qRT-PCR检测miR-708-5p在AGS, BGC-823细胞中的表达; C和D: CCK法检测不同时间点下的细胞活力; E和F: 克隆形成实验. ^a $P<0.05$, 与miR-NC组相比.

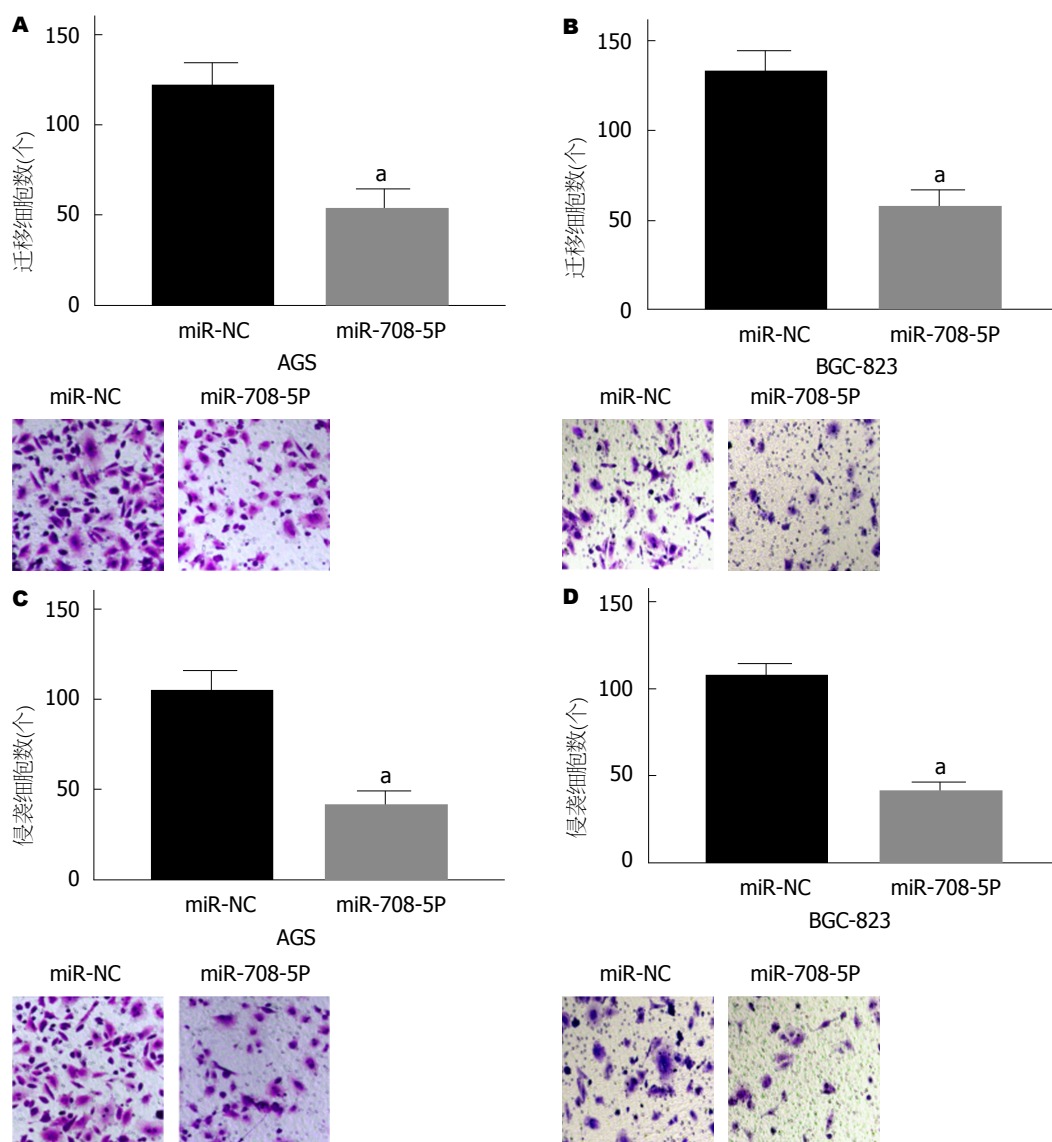


图 3 上调miR-708-5p对胃癌细胞AGS和BGC-823迁移侵袭的影响. A和B: Transwell法检测上调miR-708-5p对AGS, BGC-823细胞迁移的影响; C和D: Transwell法检测上调miR-708-5p对AGS, BGC-823细胞侵袭的影响. ^a $P<0.05$, 与miR-NC组相比.

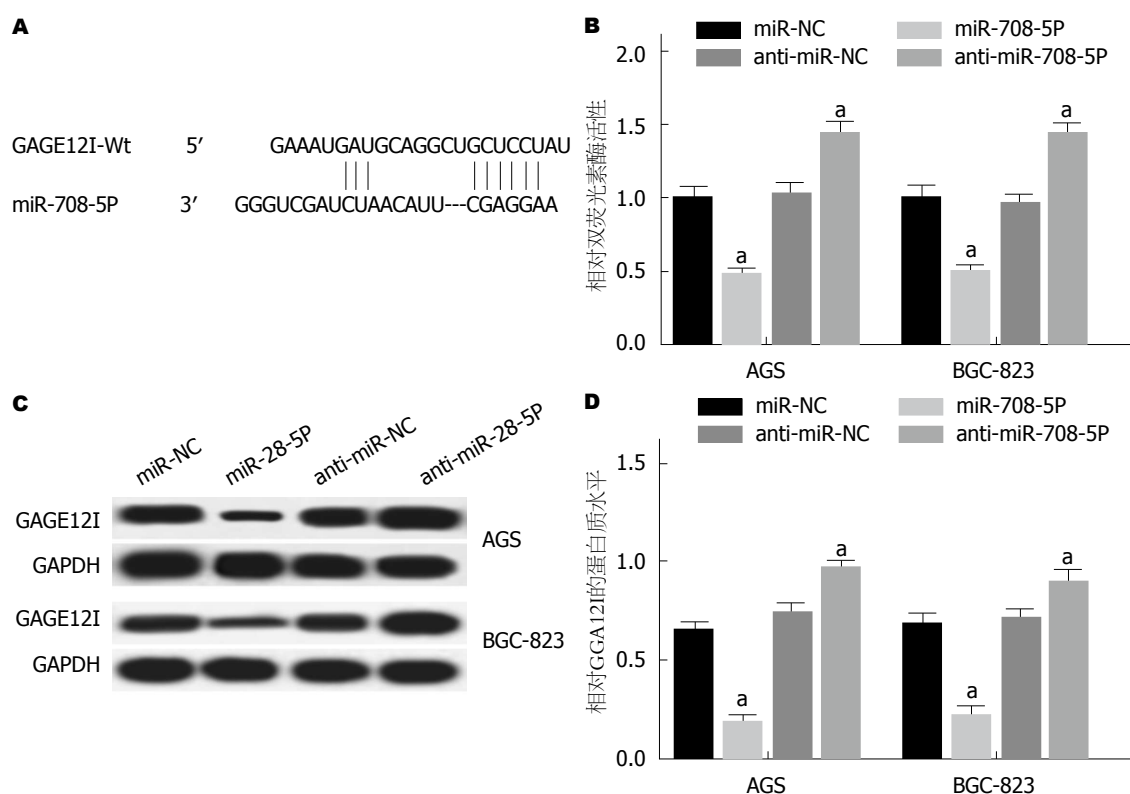


图4 GAGE12I与miR-708-5p之间的靶向关系。A: miR-708-5p与GAGE12I的3'UTR结合位点; B: 双荧光素酶报告基因验证GAGE12I与miR-708-5p之间的靶向作用关系。* $P<0.05$, 与miR-NC组相比; C和D: Western blot检测miR-708-5p对GAGE12I表达的影响。* $P<0.05$, 与anti-miR-NC组相比。

5p inhibitor可显著增强野生型MRTFA-WT的荧光素酶活性($P<0.05$)(图4B); Western blot检测miR-708-5p对GAGE12I表达的影响, 检测结果显示, 与miR-NC组相比, GAGE12I在miR-708-5p组细胞中表达显著下降($P<0.05$), 与anti-miR-NC组相比, GAGE12I在miR-708-5p组细胞中表达显著升高, $P<0.05$)(图4C和D)。

2.5 沉默GAGE12I抑制GC细胞的增殖、迁移和侵袭 将shGAGE12I转染至AGS和BGC-823细胞中, 与Scrambled组相比, shGAGE12I组细胞中GAGE12I mRNA和蛋白水平显著下调($P<0.05$)(图5A、B和C); CCK法和克隆形成实验结果显示, 与Scrambled组相比, 在转染后48 h, shGAGE12I组细胞的增殖能力降低, 克隆形成数降低($P<0.05$)(图5D和E), 迁移和侵袭能力显著降低($P<0.05$)(图5F和G)。

2.6 GAGE12I逆转miR-708-5对GC细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用 将miR-708-5p mimic和pcDNA GAGE12I共转染至AGS和BGC-823细胞。Western blot检测结果发现, 与pcDNAVector+miR-708-5p mimic转染组相比, miR-708-5p mimic和pcDNA GAGE12I共转染组细胞中GAGE12I表达显著上调($P<0.05$)(图6A和B); CCK和克隆形成实验结果显示, 与pcDNAVector+miR-708-5p mimic转染组相比, miR-708-5p mimic和pcDNA

GAGE12I共转染组细胞生长活力升高, 细胞克隆形成数增加($P<0.05$)(图6C和D); Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力, 结果显示, 与pcDNAVector+miR-708-5p mimic转染组相比, miR-708-5p mimic和pcDNA GAGE12I共转染组细胞的迁移和侵袭能力显著增加($P<0.05$)(图6E和F)。

3 讨论

近些年来, 不断有研究表明miRNA与GC的发生发展密切相关^[5], 如miR-1294在GC中表达下调, 可作为GC预后不良的分子标记^[6], miRNA与其靶基因的相互作用可参与调控GC细胞的增殖、迁移侵袭和凋亡等生物学过程^[7-12]。如有研究发现miR520d-3p通过EphA2抑制GC细胞增殖, 迁移和侵袭^[10], miR-6852可通过BOXJ1抑制细胞增殖和侵袭^[11], miR-543可通过SPOP促进细胞迁移和侵袭^[12]。miR-708-5p是近些年新发现的miRNA, 有研究表明miR-708-5p在多种癌症中差异表达^[13], 在肺癌、人胶质瘤和乳癌中作为促肿瘤生长和疾病进展的癌基因^[14-16], 但是关于miR-708-5p在GC细胞中的表达水平、生物学作用和机制尚不明确。GAGE是新近发现的与肿瘤密切相关的基因家族, 因其表达的特异性和引发免疫系统应答的特性而被认为是人体肿瘤免疫治疗的潜在

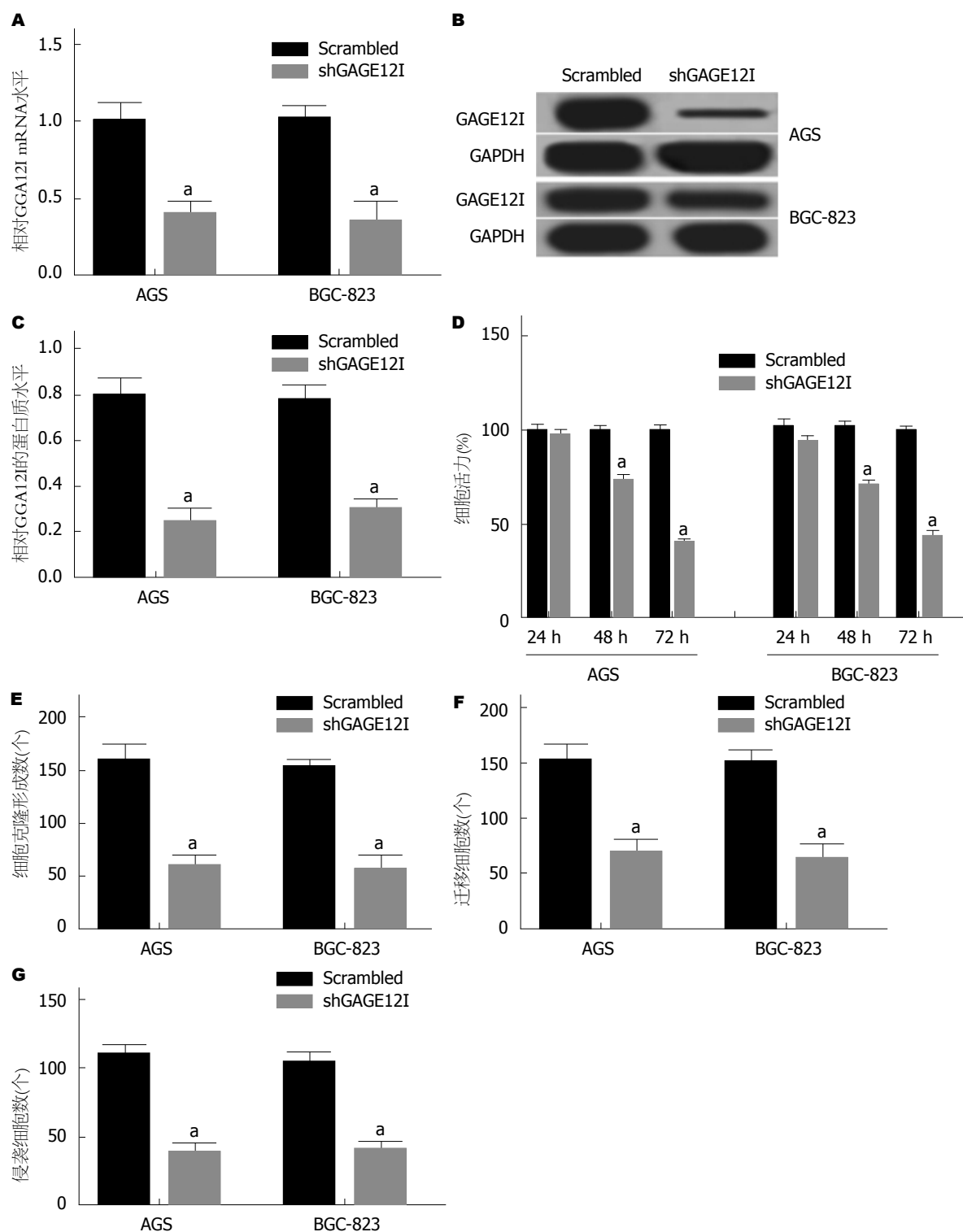


图 5 沉默GAGE12I对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。A-C: qRT-PCR和Western blot检测AGS和BGC-823细胞的转染效果; D: CCK法检测AGS和BGC-823细胞增殖能力; E: AGS, BGC-823细胞克隆形成实验; F和G: Transwell法检测AGS和BGC-823细胞迁移侵袭能力。* $P < 0.05$, 与Scrambled组相比。

靶点^[17,18], 但关于GAGE的肿瘤生物学功能研究十分少。GAGE12I是GAGE基因家族中新近发现的一个具有促癌作用的基因, 有研究表明GAGE12I在非转移性和转移性GC组织中表达上调^[4,19], 但关于GAGE12I在GC细胞的增殖、迁移侵袭过程中的作用仍报道较少。

本研究进一步揭示miR-708-5p参与调控GC增殖、迁移侵袭的分子机制, 为GC的靶向治疗提供实验数据, 为GC的治疗和预后提供科学依据。

本研究通过qRT-PCR、CCK法和迁移侵袭等实验验证了miR-708-5pGC细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制

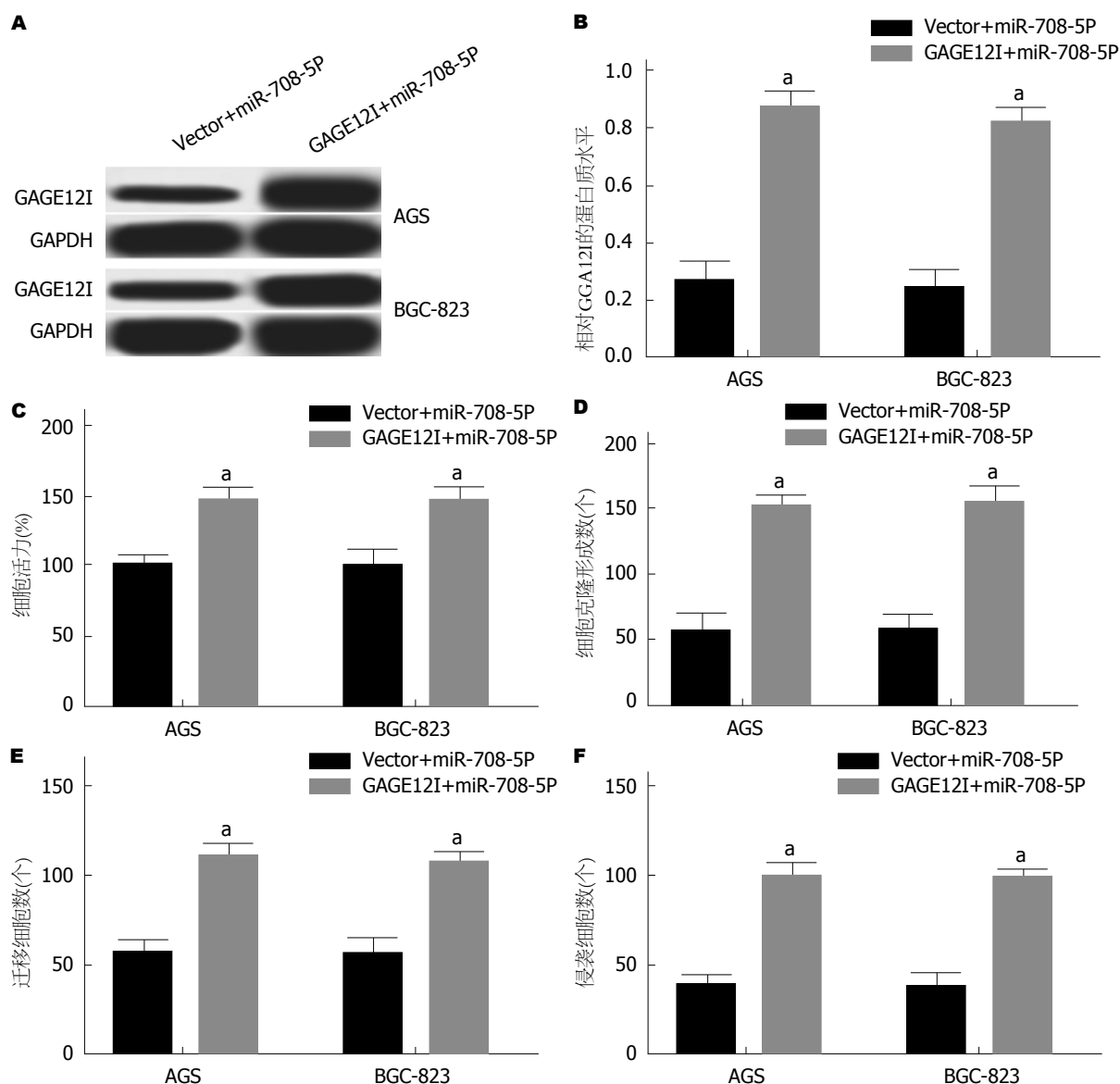


图 6 过表达GAGE12I逆转了miR-708-5p对胃癌细胞增殖迁移侵袭的影响. A和B: Western blot检测GAGE12I在AGS和BGC-823细胞中的表达; C: CCK法检测AGS和BGC-823细胞增殖能力; D: AGS, BGC-823细胞克隆形成实验; E和F: Transwell法检测AGS和BGC-823细胞迁移侵袭能力. 与Vector+miR-708-5p转染组相比, ^a $P < 0.05$.

效应. 同时发现miR-708-5p可通过GAGE12I参与调控GC细胞的增殖、迁移和侵袭过程, 进一步揭示了miR-708-5p参与调控GC发生发展的分子机制.

首先, 我们收集临床上30例GC组织及其癌旁组织, qRT-PCR分析miR-708-5p在GC组织中的表达情况, 结果显示miR-708-5p在GC组织中低表达, 后续研究中继续检测GC细胞中miR-708-5p的表达, 发现miR-708-5p在GC细胞AGS和BGC-823中表达同样显著下调, 提示我们miR-708-5p可能在GC的发生发展中发挥重要作用. 为了进一步揭示miR-708-5p对GC细胞的影响, 通过CCK法、克隆形成实验和Transwell小室法检测miR-708-5p对GC细胞增殖、迁移和侵袭的影响. 将miR-708-5p mimic转染至AGS和BGC-823细胞, 上调miR-708-5p

表达, CCK法检测细胞增殖情况, 结果显示, 在48 h后miR-708-5p组细胞增殖活力降低; 克隆形成实验结果显示, miR-708-5p组细胞形成数显著降低; Transwell小室法检测迁移侵袭能力, 结果显示, miR-708-5p组细胞的迁移侵袭能力显著降低, 上述结果表明, miR-708-5p在GC发生发展中发挥抑癌作用. 本研究通过生物信息学在线分析软件预测到miR-708-5p与GAGE12I可能存在结合位点, 后续实验中双荧光素酶报告基因实验证实二者之间的靶向关系, Western blot检测结果显示, 在AGS细胞中, miR-708-5p mimic转染组细胞GAGE12I表达下降, 而miR-708-5p inhibitor转染组细胞中GAGE12I表达上调, 上述结果表明miR-708-5p可靶向并负性调节GAGE12I表达. CCK法、克隆形成实验和Transwell

法检测沉默GAGE12I对AGS细胞增殖和迁移侵袭的影响, shGAGE12I转染组细胞的增殖、迁移和侵袭显著降低, 与上调miR-708-5p对GC细胞的影响一致. 为了进一步验证miR-708-5p是否可通过GAGE12I参与GC细胞增殖、迁移和侵袭的调控, 我们将miR-708-5p mimic和pcDNA GAGE12I共转染至AGS和BGC-823细胞; CCK法、克隆形成实验和Transwell法结果证实将pcDNA GAGE12I转染至GC细胞AGS和BGC-823, 可显著逆转miR-708-5p mimic转染组细胞增殖, 迁移和侵袭的抑制作用. 上述结果表明miR-708-5p可靶向GAGE12I抑制GC细胞AGS和BGC-823的增殖, 迁移和侵袭.

本研究发现miR-708-5p在GC组织和GC细胞AGS和BGC-823中miR-708-5p表达下调, 且上调miR-708-5p和沉默GAGE12I可抑制GC细胞AGS和BGC-823的增殖, 迁移和侵袭. miR-708-5p可靶向调控GAGE12I表达, 进而参与GC细胞增殖、迁移侵袭, 为GC的发生发展机制和靶向治疗提供依据.

总之, 本研究首次发现miR-708-5p在GC组织和细胞中低表达, 并首次在GC细胞中验证miR-708-5p与GAGE12I之间的靶向关系, 以此为基础进一步阐明了miR-708-5p靶向调控GAGE12I对GC细胞增殖、迁移侵袭的影响机制, 为miRNA参与调控GC细胞生物学功能的分子机制提供了新的实验依据.

本研究只探讨了miR-708-5p在GC细胞增殖, 迁移和侵袭的影响, 其对GC细胞凋亡及其它细胞生物学过程仍有待后续进一步研究.

文章亮点

实验背景

近些年来, 不断有研究表明miRNA与胃癌(gastric cancer, GC)的发生发展密切相关, 如miR-1294在GC中表达下调, 可作为GC预后不良的分子标记, miRNA与其靶基因的相互作用可参与调控GC细胞的增殖、迁移侵袭和凋亡等生物学过程.

实验动机

为GC的发生发展机制和靶向治疗提供依据, 为miRNA参与调控GC细胞生物学功能的分子机制提供了新的实验依据.

实验目标

miR-708-5p可靶向调控GAGE12I表达, 进而参与GC细胞增殖、迁移侵袭, 为GC的发生发展机制和靶向治疗提供依据.

实验方法

qRT-PCR检测miR-708-5p和GAGE12I表达, CCK-8法检测细胞增殖, Transwell小室法检测细胞迁移侵袭, Western blot 检测GAGE12I表达.

实验结果

miR-708-5p在GC组织和GC细胞AGS和BGC-823中miR-708-5p表达下调, 且上调miR-708-5p和沉默GAGE12I可抑制GC细胞AGS和BGC-823的增殖, 迁移和侵袭. miR-708-5p可靶向调控GAGE12I表达, 进而参与GC细胞增殖、迁移侵袭.

实验结论

miR-708-5p可靶向调控GAGE12I表达, 进而参与GC细胞增殖、迁移侵袭.

展望前景

miR-708-5p可靶向调控GAGE12I表达, 进而参与GC细胞增殖、迁移侵袭, 为GC的发生发展机制和靶向治疗提供依据, 为miRNA参与调控GC细胞生物学功能的分子机制提供了新的实验依据, 其对GC细胞凋亡及其它细胞生物学过程仍有待后续进一步研究.

4 参考文献

- 吕伟, 陈凛. 胃癌分子靶向治疗的现状与进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2672-2678 [DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2007.25.003]
- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 700-713 [PMID: 24618998 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1057]
- Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 10432-10439 [PMID: 25132759 DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10432]
- Lee EK, Song KA, Chae JH, Kim KM, Kim SH, Kang MS. GAGE12 mediates human gastric carcinoma growth and metastasis. *Int J Cancer* 2015; 136: 2284-2292 [PMID: 25346337 DOI: 10.1002/ijc.29286]
- 杜亚琼, 姜波健, 俞继卫. miRNA在胃癌发生发展中的作用. 中国普外基础与临床杂志 2016; 23: 499-502 [DOI: 10.7507/1007-9424.20160132]
- Shi YX, Ye BL, Hu BR, Ruan XJ. Expression of miR-1294 is downregulated and predicts a poor prognosis in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22: 5525-5530 [PMID: 30229824 DOI: 10.26355/eurrev_201809_15813]
- 蒯君, 秦咏梅, 郭晓鹤. miRNA-24通过靶向CARMA3基因调控胃癌AGS细胞的增殖和凋亡. 中国肿瘤生物治疗杂志 2017; 24: 1093-1100 [DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.10.009]
- 王栓虎, 骆杰, 刘牧林. MiRNA-509-5p靶向MDM2抑制胃癌细胞的侵袭和迁移. 中国组织化学与细胞化学杂志 2016; 25: 1-7 [DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.01.001]
- Han C, Zhou Y, An Q, Li F, Li D, Zhang X, Yu Z, Zheng L,

- Duan Z, Kan Q. MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour Biol* 2015; 36: 6715-6723 [PMID: 25874496 DOI: 10.1007/s13277-015-3358-6]
- 10 Li R, Yuan W, Mei W, Yang K, Chen Z. MicroRNA 520d-3p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by downregulating EphA2 expression. *Mol Cell Biochem* 2014; 396: 295-305 [PMID: 25063221 DOI: 10.1007/s11010-014-2164-6]
- 11 Yu H, Zhang J, Wen Q, Dai Y, Zhang W, Li F, Li J. MicroRNA-6852 suppresses cell proliferation and invasion via targeting forkhead box J1 in gastric cancer. *Exp Ther Med* 2018; 16: 3249-3255 [PMID: 30214548 DOI: 10.3892/etm.2018.6569]
- 12 Xu J, Wang F, Wang X, He Z, Zhu X. miRNA-543 promotes cell migration and invasion by targeting SPOP in gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 5075-5082 [PMID: 30174445 DOI: 10.2147/OTT.S161316]
- 13 Monteleone NJ, Lutz CS. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 71292-71316 [PMID: 29050362 DOI: 10.18632/oncotarget.19772]
- 14 Wu X, Liu T, Fang O, Dong W, Zhang F, Leach L, Hu X, Luo Z. MicroRNA-708-5p acts as a therapeutic agent against metastatic lung cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 2417-2432 [PMID: 26678031 DOI: 10.18632/oncotarget.6594]
- 15 Guo P, Lan J, Ge J, Nie Q, Mao Q, Qiu Y. miR-708 acts as a tumor suppressor in human glioblastoma cells. *Oncol Rep* 2013; 30: 870-876 [PMID: 23754151 DOI: 10.3892/or.2013.2526.]
- 16 Ma L, Ma S, Zhao G, Yang L, Zhang P, Yi Q, Cheng S. miR-708/LSD1 axis regulates the proliferation and invasion of breast cancer cells. *Cancer Med* 2016; 5: 684-692 [PMID: 26833707 DOI: 10.1002/cam4.623]
- 17 诸奇赞, 刘洋, 朱乃硕. GAGE基因家族的分子进化特征的研究. *遗传* 2007; 29: 559-564 [DOI: 10.1360/yc-007-0559]
- 18 赵飞兰, 蓝玲, 罗国容. 肝癌细胞株中肿瘤特异性抗原GAGE基因mRNA的表达. *华夏医学* 2006; 19: 392-393
- 19 Gjerstorff MF, Besir H, Larsen MR, Ditzel HJ. Expression, purification and characterization of the cancer-germline antigen GAGE12I: a candidate for cancer immunotherapy. *Protein Expr Purif* 2010; 73: 217-222 [PMID: 20546897 DOI: 10.1016/j.pep.2010.05.010]

编辑: 崔丽君 电编: 张砚梁



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2018 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

