

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

2019 年 7 月 28 日      第 27 卷      第 14 期      (Volume 27 Number 14)



## 14/2019

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《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)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录。



### 述评

- 851 肠道血流的CT和MRI评估

任小军

### 基础研究

- 857 下调MiR-221对胃癌顺铂耐药细胞增殖及顺铂敏感性的影响及其相关机制

徐丽娜, 金莉娜

- 864 miR-567靶向TRPM8调控结直肠癌细胞增殖凋亡的分子机制

杨庆华, 陈栋

### 临床研究

- 872 CBX2蛋白在胃癌中的表达水平及临床意义

何怡岚, 张波

- 878 剪切波超声弹性成像测定脂肪肝患者颈动脉斑块硬度及其与血脂水平相关性

欧阳骏, 张心荣, 王小伟

- 883 抗*H. pylori*治疗对胆石症患者胆汁*H. pylori* DNA、PLA<sub>2</sub>活性及免疫功能的影响

朱蔓然, 宁雪莲, 姚卫民, 郭勇杭, 何丽娟, 卢如相

- 889 体部立体定向放射治疗结肠癌伴肺转移的临床特点Meta分析

刘海源, 雷鑫明

### 文献综述

- 898 泄泻肝气乘脾证的研究进展

刘娅薇, 惠华英, 谭周进

- 903 胆囊癌的分子基因学研究进展

杨敏丽, 戴树龙

- 907 肠道产丁酸菌防治炎症性肠病的机制研究进展

陈映宇, 毛联智, 刘华缓, 孙素霞

## 消 息

- 856 《世界华人消化杂志》栏目设置  
877 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费  
897 《世界华人消化杂志》外文字符标准  
902 《世界华人消化杂志》修回稿须知

## 封面故事

孔德润, 男, 教授, 博导. 安徽医科大学第一附属医院消化内科主任医师, 病区主任, 中华医学会介入与微创学组委员、中国医促会门静脉高压学组委员、徽省食管与胃静脉曲张学组副组长、安徽省医师协会消化病分会委员、安徽省学术与技术带头人、安徽省卫健委青年领军人才. 主要研究肝硬化食管胃静脉曲张出血内镜诊治技术、消化道早癌的内镜下诊治技术、TIPS治疗肝硬化门脉高压静脉曲张出血和顽固性腹水. 主持国家自然科学基金等科研课题10余项, 以第一作者或通讯作者在*Endoscopy*, *PLOS one*, *World J Gastroenterol*等发表论文100余篇.

## 本期责任人

编务 李香; 送审编辑 崔丽君; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇; 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

(半月刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2019-07-28

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:

<https://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](mailto: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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<https://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)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》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136.00元 全年24期3264.00元

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

## Contents

Volume 27 Number 14 Jul 28, 2019

### EDITORIAL

- 851 CT and MRI assessment of intestinal blood flow

*Ren XJ*

### BASIC RESEARCH

- 857 Effect of down-regulation of miR-221 on cell proliferation and cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant gastric cancer cells and underlying mechanism

*Xu LN, Jin LN*

- 864 MiR-567 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting TRPM8

*Yang QH, Chen D*

### CLINICAL RESEARCH

- 872 Clinical significance of expression of CBX2 in gastric cancer

*He YL, Zhang B*

- 878 Assessment of carotid plaque hardness in patients with fatty liver by shear wave elastography: Correlation with blood lipid levels

*Ouyang J, Zhang XR, Wang XW*

- 883 Effect of anti-*Helicobacter pylori* therapy on bile *H. pylori* DNA and PLA<sub>2</sub> activity and immune function in patients with cholelithiasis

*Zhu MR, Ning XL, Yao WM, Guo YH, He LJ, Lu RX*

- 889 A meta-analysis of stereotactic radiotherapy for pulmonary oligometastases from colorectal cancer

*Liu HY, Lei XM*

### REVIEW

- 898 Progress in research of syndrome of diarrhea with Ganqi Chengpi

*Liu YW, Hui HY, Tan ZJ*

- 903 Advances in research of molecular genetics of gallbladder cancer

*Yang ML, Dai SL*

- 907 Mechanism of gut butyric acid producing bacteria for prevention and treatment of inflammatory bowel disease

*Chen YY, Mao LZ, Liu HH, Sun SX*

## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 27 Number 14 Jul 28, 2019

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Kong de-run, male, professor, Ph.D, Chief Physician, Ward director. Department of Gastroenterology, The first Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Jixi Road 218, Hefei 230022, Anhui Province, China

### Indexed/Abstracted by

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

### RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Li-Jun Cui* Electronic Editor: *Ji-Hong Liu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* 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** July 28, 2019

#### 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 <https://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](mailto:wjcd@wjgnet.com)

<https://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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<https://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 136 Yuan for each issue  
RMB 3264 Yuan for one year

#### COPYRIGHT

© 2019 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 <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

# 下调MiR-221对胃癌顺铂耐药细胞增殖及顺铂敏感性的影响及其相关机制

徐丽娜, 金莉娜

徐丽娜, 金莉娜, 台州恩泽医疗中心(集团)台州医院药剂科 浙江省台州市 317000

徐丽娜, 主管药师, 主要从事临床药理学和基础药理方面的研究。

**作者贡献分布:** 此课题由徐丽娜与金莉娜设计; 研究过程由上述两人共同完成; 实验的具体操作由徐丽娜完成; 数据分析由金莉娜完成; 本论文写作由徐丽娜与金莉娜两人共同完成。

**通讯作者:** 徐丽娜, 主管药师, 317000, 浙江省台州市临海回浦路92号, 台州恩泽医疗中心(集团)台州医院药剂科. xulina362@163.com  
电话: 0576-85131150

收稿日期: 2019-04-16

修回日期: 2019-06-11

接受日期: 2019-07-15

在线出版日期: 2019-07-28

## Effect of down-regulation of miR-221 on cell proliferation and cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant gastric cancer cells and underlying mechanism

Li-Na Xu, Li-Na Jin

Li-Na Xu, Li-Na Jin, Department of Pharmacy, Taizhou Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), Taizhou 317000, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Li-Na Xu, Pharmacist-in-Charge, Department of Pharmacy, Taizhou Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), 92 Linhai Huipu Road, Luqiao District, Taizhou 317000, Zhejiang Province, China. xulina362@163.com

Received: 2019-04-16

Revised: 2019-06-11

Accepted: 2019-07-15

Published online: 2019-07-28

## Abstract BACKGROUND

Patients with advanced gastric cancer (GC) usually undergo chemotherapy as the primary treatment. However, the effectiveness of chemotherapy is often limited by the development of drug resistance in GC cells. This study aimed to investigate the expression pattern, biological role, and potential mechanism of microRNA-221 (miR-221) in cisplatin (DDP)-resistant GC cells, in order to provide a reference for clinical treatment of this malignancy.

## AIM

To investigate the effect of down-regulation of miR-221 on cell proliferation and DDP sensitivity in DDP-resistant GC cells and to explore the underlying mechanism.

## METHODS

AGS and MGC-803 cells were screened for DDP-resistant cells (AGS/DDP and MGC-803/DDP). The expression levels of miR-221 in GC tissues, matched tumor adjacent tissues, DDP-sensitive tissues, DDP-resistant tissues, GC cells, and DDP-resistant GC cells were detected by RT-PCR. After AGS/DDP and MGC-803/DDP cells were transfected with LV-miR-221-shRNA, cell proliferation and DDP sensitivity in those cells were measured by MTT assay, cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining, and the mRNA and protein expression of CCND1 was detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. The potential target genes of miR-221 were predicted by bioinformatics analysis.

## RESULTS

The expression of miR-221 was up-regulated in GC tissues and gastric cells, especially in DDP-resistant tissues and DDP-resistant GC cells. Down-regulation of miR-221 inhibited the proliferation of AGS/DDP and MGC-803/DDP cells, but increased their apoptosis and chemosensitivity to DDP. CCND1 was found to be a

direct target gene of miR-221. Transfection with LV-miR-221-shRNA inhibited the mRNA and protein expression of CCND1.

## CONCLUSION

Down-regulation of miR-221 can inhibit cell proliferation and promote chemosensitivity to DDP in DDP-resistant GC cells, which may be achieved by inhibiting the expression of its target gene CCND1.

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer; Proliferation; Cisplatin; Chemosensitivity

Xu LN, Jin LN. Effect of down-regulation of miR-221 on cell proliferation and cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant gastric cancer cells and underlying mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2019; 27(14): 857-863  
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i14/857.htm>  
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i14.857>

## 摘要 背景

晚期胃癌(gastric cancer, GC)患者通常接受化疗作为主要治疗方法。然而,化疗的有效性受到GC细胞耐药性的限制。本研究旨在探讨microRNA-221(miR-221)在顺铂(cisplatin, DDP)耐药GC细胞中的生物学作用和潜在机制,以期为临床治疗提供参考。

## 目的

研究下调MiR-221对GC DDP耐药细胞增殖及DDP敏感性的影响及相关机制。

## 方法

采用AGS和MGC-803细胞构建出DDP耐药AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞。RT-qPCR检测GC及癌旁组织、DDP化疗敏感组织、DDP化疗耐药组织、GC细胞和GC DDP耐药细胞的miR-221表达水平;用LV-miR-221-shRNA慢病毒转染AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞后,MTT检测细胞增殖以及对DDP的化学敏感性;Annexin V-FITC/PI染色检测细胞凋亡;进行生物信息学分析以寻找miR-221的潜在靶基因,应用RT-qPCR和Western blotting检测细胞中CCND1的mRNA和蛋白表达。

## 结果

在GC组织和GC细胞中miR-221明显上调,且DDP耐药组织和DDP耐药细胞中miR-221表达更高。下调miR-221抑制了AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞增殖,促进了细胞凋亡和细胞对DDP的化学敏感性;CCND1是miR-221的直接靶基因,转染LV-miR-221-shRNA抑制CCND1 mRNA和蛋白表达水平。

## 结论

下调miR-221可以抑制GC DDP耐药细胞增殖,促进其对DDP的化学敏感性,这一作用可能通过抑制靶基因CCND1表达来实现的。

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 胃癌; 增殖; 顺铂; 化疗敏感性

**核心提要:** microRNA-221(miR-221)在胃癌(gastric cancer, GC)耐药组织和GC顺铂(cisplatin, DDP)耐药细胞中显著高表达。下调miR-221表达抑制GC耐药细胞增殖并促进其对DDP的化学敏感性。本研究发现, CCND1为GC中miR-221的直接靶基因,下调miR-221通过抑制CCND1发挥逆转GC DDP耐药的作用,为抗GC DDP化疗耐药的研究提供了参考。

徐丽娜, 金莉娜. 下调MiR-221对胃癌顺铂耐药细胞增殖及顺铂敏感性的影响及其相关机制. *世界华人消化杂志* 2019; 27(14): 857-863  
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i14/857.htm>  
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i14.857>

## 0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是世界上发病率第四高、死亡率第三高的常见癌症,每年导致大量人死亡(占总数的9.5%)<sup>[1]</sup>。由于缺乏有效的早期诊断技术,大多数GC患者被诊断出已是晚期<sup>[2]</sup>。化疗是晚期GC最常见的主要治疗方法。然而,成功化疗的主要障碍是多药耐药(multi-drug resistance, MDR),这是由于接触单一化疗药物后对多种化疗药物的耐药性的发展<sup>[3]</sup>。越来越多的证据表明,细胞介导的MDR引起许多变化,包括药物摄取和代谢、DNA合成和修复、细胞存活和凋亡,以及其他细胞功能<sup>[4,5]</sup>。尽管目前学者对MDR发展的机制进行了广泛的研究,但仍需要形成克服MDR的有效策略。

关于microRNA(miRNA)的研究有助于提高我们对化疗耐药性的理解。miRNA是一大类短的非编码单链RNA分子,可以发挥重要的调节作用。异常的miRNA表达已在包括GC在内的几乎所有类型的人类恶性肿瘤中广泛报道<sup>[6-8]</sup>。因此,靶向miRNA可能是治疗GC化学耐药性的新治疗策略。在本研究中,我们研究了microRNA-221(miR-221)在顺铂(cisplatin, DDP)耐药性中的作用,以期对GC细胞化疗敏感性提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 GC及癌旁组织收集: 收集台州医院2016/2018年经胃镜活检的20对GC及癌旁组织, 20例化疗敏感组织与

20例化疗耐药组织. 患者本人签署知情同意书, 且本研究通过台州恩泽医疗中心(集团)台州医院伦理委员会同意. 其中获取GC及癌旁组织的患者, 均首次发现, 未进行过抗癌等治疗; 获取的化疗敏感组织与化疗耐药组织患者, 均为患者进行DDP治疗方案的患者, 其中组织经病理科检验为化疗敏感组织与化疗耐药组织.

1.1.2 细胞培养和耐药株的筛选: (1)细胞获得与培养: GC细胞系, 包括AGS和MGC-803, 获自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所(上海, 中国). 人胃上皮细胞系GES-1购自美国ATCC. 所有这些细胞系均在补充有10%胎牛血清(FBS), 100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM培养基中生长(Gibco, 美国). 所有细胞系在含有5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中于37 °C培养. (2)筛选DDP耐药株: 采用反复刺激并逐渐增加DDP(Sigma, 美国)浓度刺激细胞的方法, 细胞贴壁后长至80%, DDP浓度为0.1 μg/mL DDP刺激48 h, 将细胞传代, 待细胞贴壁长至80%, 再用0.2 μg/mL DDP刺激48 h, 依次类推至DDP浓度达到1 μg/mL环境中稳定生长. 收集细胞用于后续实验.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 上海吉玛公司设计合成的miR-221的shRNA序列(miR-221-shRNA: 5'-GGCATGAACCTGGC ATACAAT-3')和乱码的对照序列(NC-shRNA: 5'-TTCTC CGAACGTGTCACGT-3'), 并克隆至慢病毒载体上. 然后将事先筛选的AGS/DDP和MGC-803/DDP耐药株培养传代生长至约50%-60%融合后, 分别转染30 MOI的LV-miR-221-shRNA或LV-NC-shRNA, 并继续培养细胞48 h.

1.2.2 RT-qPCR实验: 根据制造商的说明, 使用TRIzol<sup>®</sup> Plus RNA纯化试剂盒(Invitrogen, 美国)从组织样本或细胞中分离总RNA. 为了检测miR-221表达, 使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, 美国)进行逆转录以合成互补DNA(cDNA). 为了分析miR-221和CCND1 mRNA表达, 分别使用PrimeScript RT试剂盒(Takara Bio, 日本)和SYBR Premix Ex Taq TM试剂盒(Takara Bio, 日本)进行RT-qPCR. U6和GAPDH分别用作miR-221和CCND1 mRNA的内源对照. 数据通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算.

1.2.3 MTT法测定细胞增殖: 收集转染的细胞, 并以每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞的密度接种到96孔板中. 细胞培养24、48或72 h后, 根据制造商的说明书进行MTT测定, 将20 μL MTT溶液(5 mg/mL, Sigma, 美国)加入每个样品孔中, 温育4 h后, 将培养基替换为150 μL的DMSO并涡旋10 min. 然后, 使用自动多孔分光光度计(Bio-Rad Laboratories, 美国)在490 nm的波长下检测吸光度. 每个实验一式三孔进行, 并重复三次.

1.2.4 MTT法测定体外化学敏感性: 收集转染的细胞,

将细胞以每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞的密度接种到96孔板中. 细胞贴壁后, 用0、20、40、60和80 μmol/L的DDP(Sigma, 美国)处理细胞. 在DDP施用48 h后, 使用MTT法测定进行体外化学敏感性, 并绘制剂量-反应曲线. 每个实验一式三孔进行, 并重复三次.

1.2.5 流式细胞术分析: 流式细胞术分析用于评估细胞凋亡. 将细胞以每孔 $8 \times 10^5$ 个细胞的密度接种在6孔板中. 转染48 h后, 用浓度为60 μmol/L的DDP处理细胞. 在37 °C, 含5%CO<sub>2</sub>中培养48 h后, 胰蛋白酶消化收集细胞并用PBS洗涤. 根据制造商的说明书, 用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen, 美国)测定细胞凋亡. 然后, 将细胞重悬于300 μL的结合缓冲液中, 然后在室温下在黑暗中用5 μL Annexin V和5 μL PI染色15 min. 使用流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国)定量检测细胞凋亡. 每个测试进行重复三次.

1.2.6 双荧光素酶报告分析: 将含有miR-221的预测结合序列的野生型(WT) CCND1 3'-UTR和缺少miR-221结合序列的突变型(MUT)CCND1 3'-UTR的载体质粒使用Lipofectamine<sup>™</sup>2000辅助转染至细胞, 然后分别转染LV-miR-221-shRNA或LV-NC-shRNA. 在转染48 h后, 使用双荧光素酶报告分析系统(Promega Corporation, 美国)检测荧光素酶活性. Renilla荧光素酶活性用作内部参考.

1.2.7 Western Blotting分析: 使用裂解缓冲液(碧云天生物公司, 江苏)从细胞中提取总蛋白. 使用蛋白质测定试剂盒(碧云天生物公司, 江苏)检测总蛋白质的浓度后, 通过10%SDS-PAGE分离相同量的蛋白质, 并转移到PVDF膜(Millipore, 美国)上. 用含有吐温20的Tris缓冲液(TBST)中的5% 脱脂乳封闭1 h后, 将膜在4 °C下与抗CCND1的一抗(1:1000稀释; Santa Cruz, 美国)和β-actin(1:5000稀释; 碧云天生物公司, 江苏)孵育过夜. 用TBST洗涤三次后, 将膜与山羊抗小鼠辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5000稀释; 碧云天生物公司, 江苏)在室温下孵育2 h. 使用ECL化学发光法(Pierce Biotechnology, 美国)使蛋白质条带可视化. QuantityOne<sup>®</sup> 4.62软件(Bio-Rad, 美国)用于分析谱带强度.

**统计学处理** 计量资料的数值采用mean±SD的形式表示, 采用SPSS 20.0进行统计分析. 两组比较采用两独立样本t检验; 多组组间比较采用单因素方差分析后LSD检验; 当P<0.05时认为差异具有统计学意义.

## 2 结果

2.1 GC组织和细胞中miR-221表达 与癌旁组织相比, miR-221在GC组织中高表达(图1A, P<0.01). 与DDPGC化疗敏感组织相比, miR-221在DDPGC化疗耐药组织高表达(图1B, P<0.01). 与GES-1细胞相比, GC细胞(AGS

和MGC-803)中miR-221高表达, 而耐药株(AGS/DDP和MGC-803/DDP)中miR-221表达更高(图1C和D)。

**2.2 miR-221下调抑制GC耐药细胞增殖** 采用LV-miR-221-shRNA或LV-NC-shRNA慢病毒转染AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞, 使用RT-qPCR评估转染效率。结果显示, 与LV-NC-shRNA转染组相比, LV-miR-221-shRNA转染的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞中miR-221的表达显著下调( $P<0.01$ )(图2A和2B)。随后, 采用MTT检测转染24、48、72 h后细胞增殖的情况。如图2C和2D所示, 与LV-NC-shRNA转染组相比, miR-221下调在转染24、48、72 h后均显著降低了AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞的增殖( $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

**2.3 miR-221的下调增加GCDDP耐药细胞对DDP的敏感性** 转染LV-miR-221-shRNA后, 采用MTT检测GCDDP耐药细胞对DDP的化学敏感性的变化。结果显示, 转染LV-miR-221-shRNA的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞对DDP表现出增加敏感性( $P<0.01$ )(图3A和B)。为探索下调miR-221对GC细胞化疗敏感性影响的机制, 本研究进行了流式细胞术检测DDP诱导的GCDDP耐药细胞凋亡的情况。如图3C和3D所示, miR-221的下调增加了DDP诱导的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞凋亡( $P<0.01$ )。

**2.4 CCND1是GC细胞中miR-221的直接靶基因** 采用生物信息学分析以寻找miR-221的潜在靶标并探索可能导致miR-221在GC细胞中起作用的机制。结果发现CCND1(图4A)可能是miR-221的潜在靶标。为进一步确认, 应用RT-qPCR和Western印迹分析检测转染miR-221模拟物或miR-NC的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞中CCND1的mRNA和蛋白表达。结果显示, 转染LV-miR-221-shRNA降低了AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞中CCND1的mRNA水平( $P<0.01$ ) (图4B)和蛋白水平( $P<0.01$ )(图4C)。

### 3 讨论

大量研究表明, miRNA参与多种类型人类癌症对化疗的敏感性或耐药性<sup>[9,10]</sup>。因此, 全面了解化疗耐药相关miRNA在GC中的表达模式和生物学作用可能有助于开发新的治疗策略以提高GC的疗效。

在分子生物学中, miR-221是一种致癌microRNA<sup>[11]</sup>。它可以通过靶向CD117, 促进细胞迁移和增殖<sup>[12]</sup>。在肝癌中, miR-221诱导肿瘤血管生成<sup>[13]</sup>。然而, miR-221在GC中的表达模式、生物学功能和生物学机制仍不清楚。在这项研究中, 我们证实miR-221表达在GC组织和GC细胞中显著上调, 尤其是耐药组织和DDP耐药GC细胞。进一步研究发现, 下调miR-221能抑制AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞的增殖并增加它们对DDP的化学

敏感性。而miRNA通过以碱基配对方式与其靶基因的3'-非翻译区(3'-UTR)直接相互作用参与基因调控, 从而导致mRNA的重新调节或抑制翻译<sup>[14]</sup>。因此, 我们通过生物信息学对miR-221靶基因进行了预测, 发现CCND1为GC细胞中miR-221的直接靶标。位于染色体11q13的CCND1是在甲状腺癌<sup>[15]</sup>、乳腺癌<sup>[16]</sup>和肺癌<sup>[17]</sup>等多种肿瘤细胞中过表达的癌基因。在GC中, CCND1表达并与GC分化强弱相关<sup>[18]</sup>。且以往的研究表明CCND1在多种肿瘤中发挥抑癌及增加化疗敏感性的作用<sup>[19,20]</sup>。本研究发现下调miR-221靶向抑制CCND1表达在GC细胞生长和化学抗性中发挥肿瘤抑制作用, 这意味着miR-221可能被作为一种治疗靶点进行研究, 以快速阻断这种恶性肿瘤患者的肿瘤生长和化疗耐药。

总之, miR-221在GC DDP耐药组织和GC DDP耐药细胞中显著高表达。下调miR-221表达抑制GC耐药细胞增殖并促进其对DDP的化学敏感性。并且本研究发现, CCND1为GC中miR-221的直接靶基因, 下调miR-221可能通过抑制CCND1发挥逆转GC DDP耐药的作用。本研究为抗GC DDP化疗耐药的研究提供了参考。

### 文章亮点

#### 实验背景

胃癌(gastric cancer, GC)是常见的消化系统恶性肿瘤。化疗作为主要治疗方法, 但其有效性往往受到GC细胞耐药性发展的限制。

#### 实验动机

本研究旨在探讨microRNA-221(miR-221)在GC中的表达模式, 生物学作用和潜在机制, 以期为临床治疗提供参考。

#### 实验目标

研究的目的是探索下调MiR-221对GC顺铂(cisplatin, DDP)耐药细胞增殖及DDP敏感性的影响, 并探索其中的相关机制。

#### 实验方法

采用AGS和MGC-803细胞构建出DDP耐药AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞。使用RT-qPCR、慢病毒转染、MTT、Annexin V-FITC/PI染色等方法, 检测了GC及癌旁组织、化疗敏感组织、化疗耐药组织、GC细胞和GC DDP耐药细胞的miR-221表达水平; 检测细胞增殖以及对DDP的化学敏感性; 检测细胞凋亡并生物信息学分析以寻找miR-221的潜在靶基因。

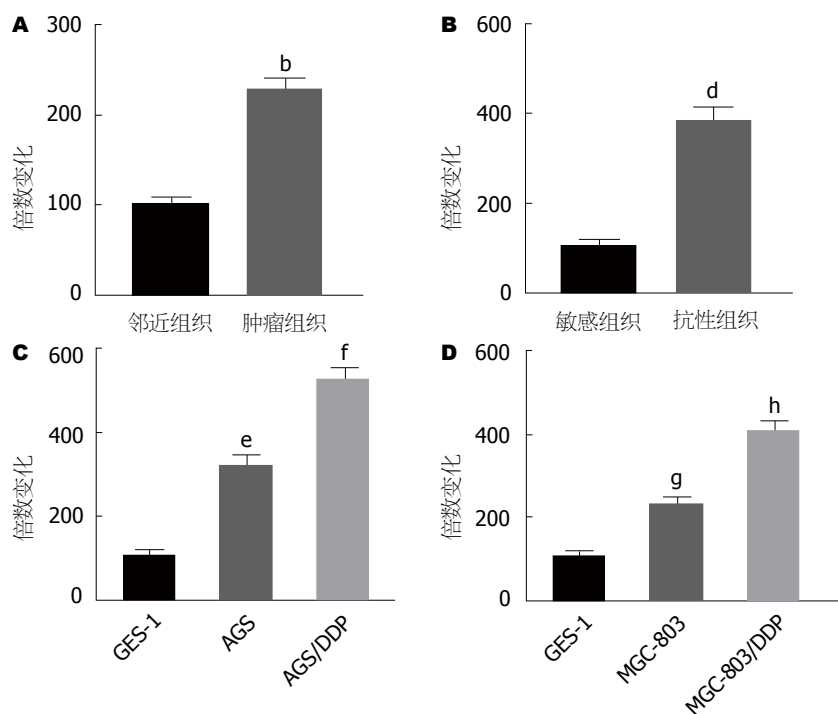


图 1 RT-qPCR检测胃癌组织和细胞系中miR-221表达. A: 胃癌组织和匹配的癌旁组织中miR-221表达.  $n = 20$ ,  $^bP < 0.01$ , 与正常组织比较; B: 敏感组织和耐药组织中miR-221表达.  $n = 20$ ,  $^dP < 0.01$ , 与敏感组织组比较; C: 胃癌AGS细胞系及其AGS/DDP耐药细胞中miR-221表达.  $n = 3$ ,  $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ , 与GES-1细胞比较; D: 胃癌MGC-803细胞系及其耐药MGC-803/DDP细胞中miR-221表达.  $n = 3$ ,  $^gP < 0.05$ ,  $^hP < 0.01$ , 与GES-1细胞比较.

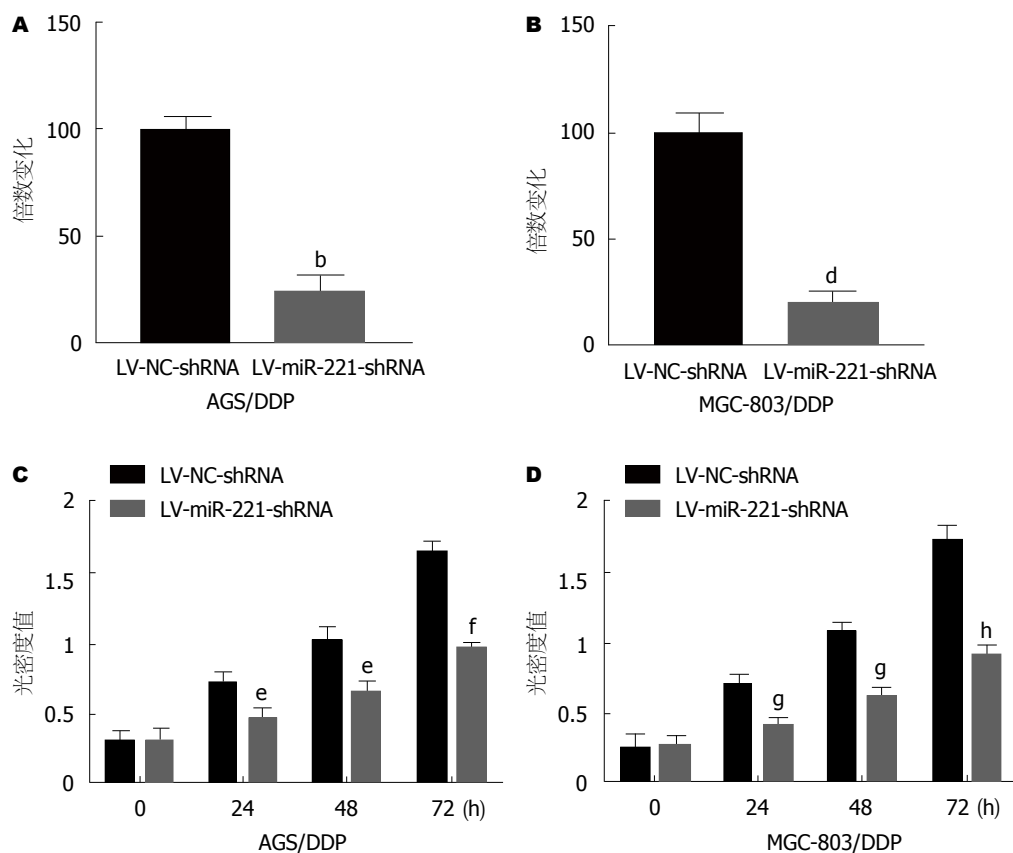


图 2 miR-221的下调抑制胃癌DDP耐药细胞的增殖. A: RT-qPCR评估在AGS/DDP细胞中LV-miR-221-shRNA转染效率.  $n = 3$ ,  $^bP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; B: RT-qPCR评估在MGC-803/DDP细胞中LV-miR-221-shRNA转染效率.  $n = 3$ ,  $^dP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; C: LV-miR-221-shRNA转染后, MTT检测AGS/DDP细胞增殖.  $n = 3$ ,  $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; D: LV-miR-221-shRNA转染后, MTT检测MGC-803/DDP细胞增殖.  $n = 3$ ,  $^gP < 0.05$ ,  $^hP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较.

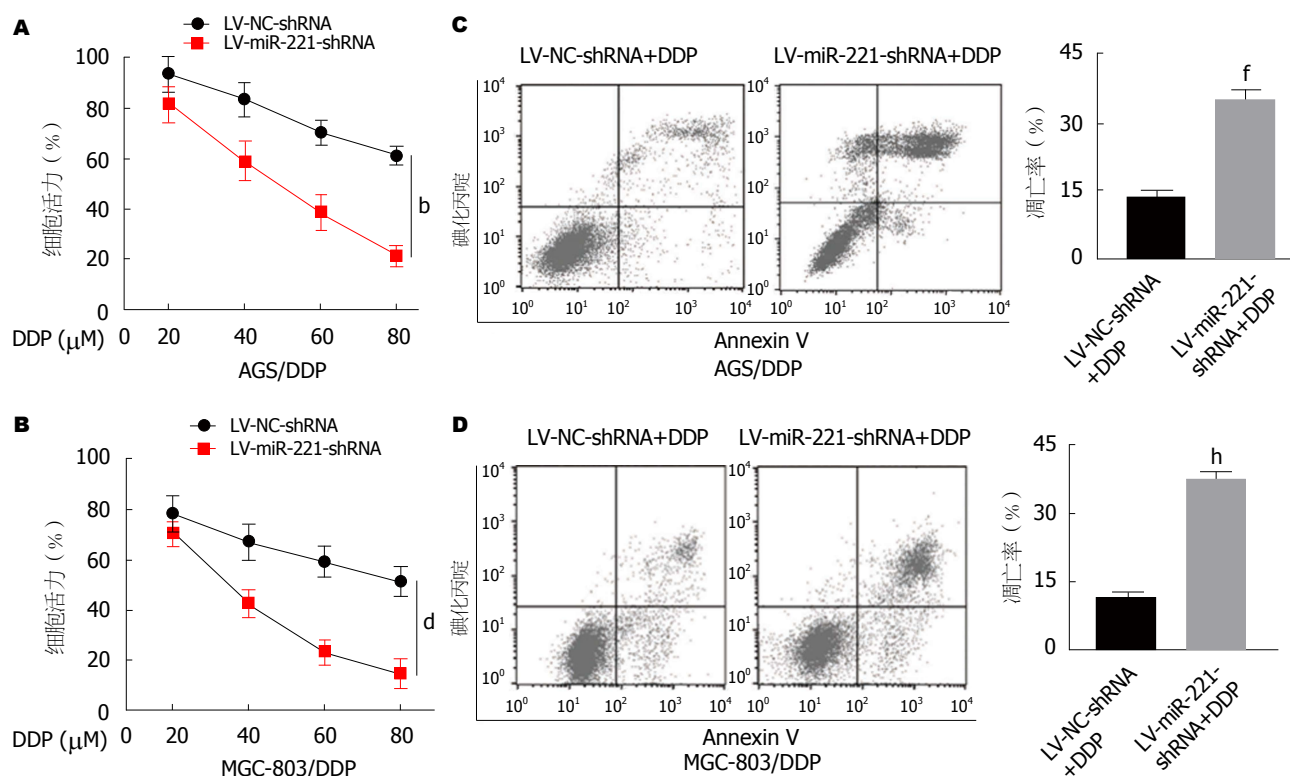


图 3 miR-221的下调增强胃癌DDP耐药细胞对DDP的化学敏感性. A: 下调miR-221表达增加AGS/DDP细胞对DDP的化学敏感性.  $n = 3$ ,  $^bP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; B: 下调miR-221表达增加MGC-803/DDP细胞对DDP的化学敏感性.  $n = 3$ ,  $^dP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; C: 下调miR-221表达促进DDP诱导AGS/DDP细胞凋亡.  $n = 3$ ,  $^fP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA+DDP组比较; D: 下调miR-221表达促进DDP诱导MGC-803/DDP细胞凋亡.  $n = 3$ ,  $^hP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA+DDP组比较.

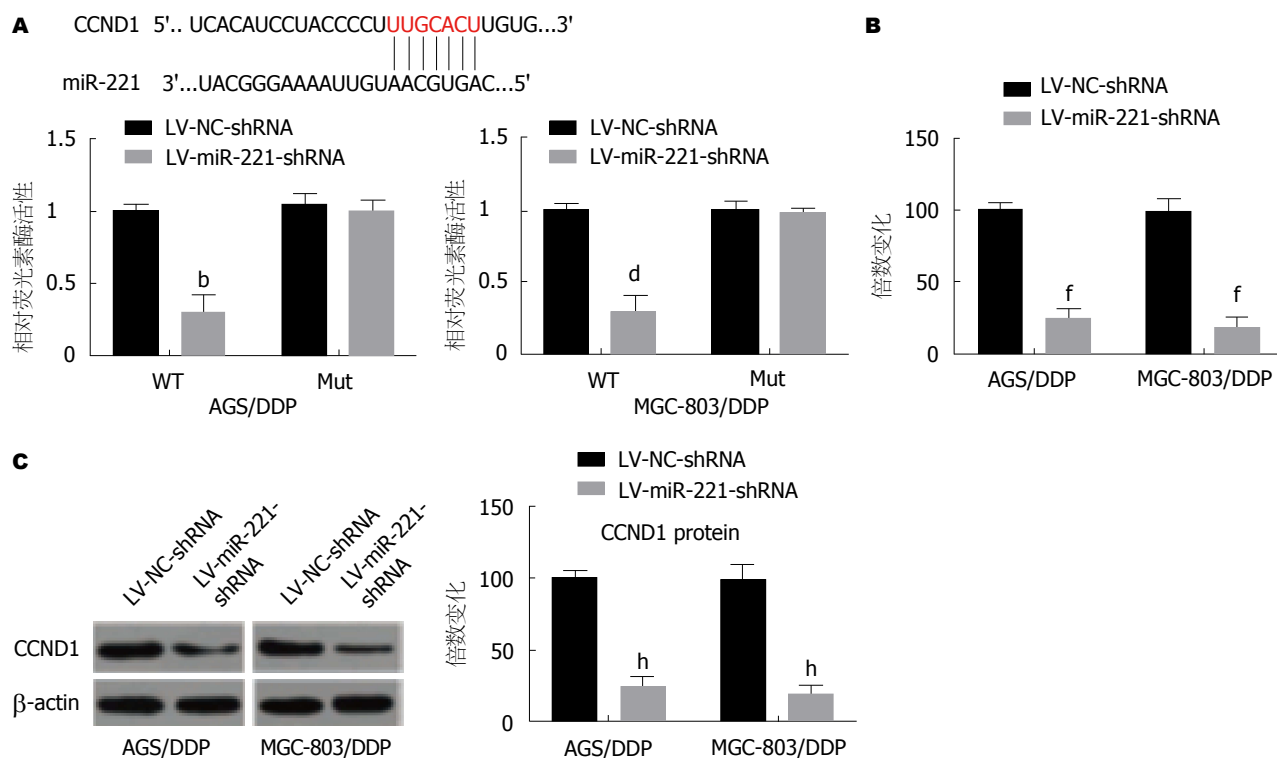


图 4 miR-221直接靶向胃癌细胞的CCND1. A: CCND1的3'非翻译区(3'-UTR)中的野生型(WT)和突变(MUT)miR-221结合序列.  $n = 3$ ,  $^bP < 0.01$ ,  $^dP < 0.01$ , 与 WT+LV-NC-shRNA组比较; B: 采用RT-PCR法检测LV-miR-221-shRNA 或LV-NC-shRNA转染的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞中CCND1的mRNA水平.  $n = 3$ ,  $^fP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较; C: Western印迹检测LV-miR-221-shRNA 或LV-NC-shRNA转染的AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞中CCND1的蛋白质水平.  $n = 3$ ,  $^hP < 0.01$ , 与LV-NC-shRNA组比较.

## 实验结果

GC组织和GC细胞中miR-221明显上调, 且耐药组织和DDP耐药细胞中miR-221表达更高. 下调miR-221抑制了AGS/DDP和MGC-803/DDP细胞增殖, 促进了细胞凋亡和细胞对DDP的化学敏感性; 我们报道了CCND1是miR-221的直接靶基因.

## 实验结论

下调miR-221可以抑制GC DDP耐药细胞增殖, 促进其对DDP的化学敏感性, 这一作用可能通过抑制靶基因CCND1表达来实现的.

## 展望前景

该研究提供了对作为GC细胞化学抗性基础的分子机制的重要见解. 这项研究的结果可能有助于开发一种新的GC治疗策略. 但是作为未来的临床治疗GC推广, 仍然需要深入的研究.

## 4 参考文献

- 1 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; 144: 1941-1953 [PMID: 30350310 DOI: 10.1002/ijc.31937]
- 2 An Y, Zhang Z, Shang Y, Jiang X, Dong J, Yu P, Nie Y, Zhao Q. miR-23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1766 [PMID: 25996293 DOI: 10.1038/cddis.2015.123]
- 3 Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 219-234 [PMID: 16518375 DOI: 10.1038/nrd1984]
- 4 Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 9-23 [PMID: 17084534 DOI: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006]
- 5 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-164 [PMID: 11832206 DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00625-6]
- 6 Tao Y, Yang S, Wu Y, Fang X, Wang Y, Song Y, Han T. MicroRNA-216a inhibits the metastasis of gastric cancer cells by targeting JAK2/STAT3-mediated EMT process. *Oncotarget* 2017; 8: 88870-88881 [PMID: 29179483 DOI: 10.18632/oncotarget.21488]
- 7 Yoshino H, Yonezawa T, Yonemori M, Miyamoto K, Sakaguchi T, Sugita S, Osako Y, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Downregulation of microRNA-127a induces cell apoptosis through regulation of BMP1B in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2018; 39: 173-181 [PMID: 29192325 DOI: 10.3892/or.2017.6098]
- 8 Yang X, Yang L, Ma Y, Zhao X, Wang H. MicroRNA-205 Mediates Proteinase-Activated Receptor 2 (PAR<sub>2</sub>)-Promoted Cancer Cell Migration. *Cancer Invest* 2017; 35: 601-609 [PMID: 28990808 DOI: 10.1080/07357907.2017.1378671]
- 9 Wang P, Li Z, Liu H, Zhou D, Fu A, Zhang E. MicroRNA-126 increases chemosensitivity in drug-resistant gastric cancer cells by targeting EZH2. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 479: 91-96 [PMID: 27622325 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.040]
- 10 Xu W, Jiang H, Zhang F, Gao J, Hou J. MicroRNA-330 inhibited cell proliferation and enhanced chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer by directly targeting thymidylate synthase. *Oncol Lett* 2017; 13: 3387-3394 [PMID: 28521444 DOI: 10.3892/ol.2017.5895]
- 11 Cha YJ, Lee JH, Han HH, Kim BG, Kang S, Choi YD, Cho NH. MicroRNA alteration and putative target genes in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: STAT3 and ZEB1 are upregulated during prostate carcinogenesis. *Prostate* 2016; 76: 937-947 [PMID: 27017949 DOI: 10.1002/pros.23183]
- 12 Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 581-588 [PMID: 18550634 DOI: 10.1093/cvr/cvn156]
- 13 Santhekadur PK, Das SK, Gredler R, Chen D, Srivastava J, Robertson C, Baldwin AS Jr, Fisher PB, Sarkar D. Multifunction protein staphylococcal nuclease domain containing 1 (SND1) promotes tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma through novel pathway that involves nuclear factor κB and miR-221. *J Biol Chem* 2012; 287: 13952-13958 [PMID: 22396537 DOI: 10.1074/jbc.M111.321646]
- 14 Cortés-Sempere M, Ibáñez de Cáceres I. microRNAs as novel epigenetic biomarkers for human cancer. *Clin Transl Oncol* 2011; 13: 357-362 [PMID: 21680295 DOI: 10.1007/s12094-011-0668-z]
- 15 Brzezińska E, Cyniak-Magierska A, Sporny S, Pastuszek-Lewandoska D, Lewiński A. Assessment of cyclin D1 gene expression as a prognostic factor in benign and malignant thyroid lesions. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; 28: 341-350 [PMID: 17693985]
- 16 Li X, Huo X, Li W, Yang Q, Wang Y, Kang X. Genetic association between cyclin D1 polymorphism and breast cancer susceptibility. *Tumour Biol* 2014; 35: 11959-11965 [PMID: 25399071 DOI: 10.1007/s13277-014-2489-5]
- 17 Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T, Thatcher N. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 294-300 [PMID: 8562333 DOI: 10.1038/bjc.1996.52]
- 18 Shan YS, Hsu HP, Lai MD, Hung YH, Wang CY, Yen MC, Chen YL. Cyclin D1 overexpression correlates with poor tumor differentiation and prognosis in gastric cancer. *Oncol Lett* 2017; 14: 4517-4526 [PMID: 28943959 DOI: 10.3892/ol.2017.6736]
- 19 Yuan C, Zhu X, Han Y, Song C, Liu C, Lu S, Zhang M, Yu F, Peng Z, Zhou C. Elevated HOXA1 expression correlates with accelerated tumor cell proliferation and poor prognosis in gastric cancer partly via cyclin D1. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35: 15 [PMID: 26791264 DOI: 10.1186/s13046-016-0294-2]
- 20 Wang L, Zhang Y, Zhao L, Liu S, Yu S, Ma Y, Sun G. MicroRNA-193b inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via targeting cyclin D1. *Acta Histochem* 2016; 118: 323-330 [PMID: 27071318 DOI: 10.1016/j.acthis.2016.02.001]

编辑: 崔丽君 电编: 刘继红





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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

