

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

2020 年 1 月 28 日 第 28 卷 第 2 期 (Volume 28 Number 2)



2 / 2020

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

- 43 合并肥胖的胃食管反流病外科策略选择
朱乾坤, 任海洋, 李小东, 翟博

基础研究

- 50 *ARHI*基因对胃癌细胞株MKN28增殖、侵袭、凋亡的影响及其机制研究
张晓威

临床研究

- 58 缩短术前禁食饮时间对老年胃肠道肿瘤患者临床效果的影响
孙学华, 张月华, 张永涛

文献综述

- 65 胃食管反流病与幽门螺杆菌感染相关机制研究进展
徐思佳, 王淑娴, 王孝通, 蔡凌宇, 孔桂美

研究快报

- 70 老年功能性消化不良患者共情满足与共情能力、心理弹性及社会支持相关性分析
王勇
- 76 同质医疗理念创新型护理实践对腹腔镜胆囊切除患者围术期应激反应的影响
陈贵兴, 楼彦君

消 息

- 49 《世界华人消化杂志》外文字符标准
64 《世界华人消化杂志》参考文献要求
75 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

封面故事

郝丽萍, 教授, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系, 德国洪堡大学博士后. 从事营养与食品卫生学、临床营养学等学科教学, 研究方向营养、代谢与慢性病. 主持国家自然科学基金1项和面上项目3项, 国家科技基础性工作专项分课题负责人1项, 国家重点研发子任务负责人1项, 参加“十一五”科技支撑和863项目各1项. 副主编教材3部, 参编教材和专著10余部. 以第一和通讯作者发表论文三十余篇(SCI 16篇). 副主编教材3部, 参编教材和专著10余部.

本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 王禹乔; 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 吴云晓健; 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 2020-01-28

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

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

Telephone: +1-925-3991568

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

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: 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

《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

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 28 Number 2 Jan 28, 2020

EDITORIAL

- 43 Surgical strategy for gastro-esophageal reflux disease in patients with obesity
Zhu QK, Ren HY, Li XD, Zhai B

BASIC RESEARCH

- 50 *ARHI* overexpression inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of gastric carcinoma MKN28 cells
Zhang XW

CLINICAL RESEARCH

- 58 Effect of shortening preoperative time of fasting and forbidding water on clinical outcome of elderly patients with gastrointestinal cancer
Sun XH, Sun YH, Zhang YT

REVIEW

- 65 Relationship between gastroesophageal reflux disease and *Helicobacter pylori* infection
Xu SJ, Wang SX, Wang XT, Cai LY, Kong GM

RAPID COMMUNICATION

- 70 Correlation analysis of empathy satisfaction and empathy, mental resilience, and social support in elderly patients with functional dyspepsia
Wang Y
- 76 Effect of innovative nursing practice on stress response of patients undergoing laparoscopic cholecystectomy
Chen GX, Lou YJ

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 28 Number 2 Jan 28, 2020

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Hao Li-Ping, Professor, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430070, Hubei 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: *Dong-Mei Wang* Review Editor: *Yu-Qiao Wang* Electronic Editor: *Ji-Hong Liu*
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Proof Editor: *Yun-Xiaojian Wu* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date January 28, 2020

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

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: 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

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2020 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.

ARHI基因对胃癌细胞株MKN28增殖、侵袭、凋亡的影响及其机制研究

张晓威

张晓威, 锦州医科大学附属第一医院 辽宁省锦州市 121000

张晓威, 住院医师, 研究方向为胃肠道肿瘤的防治及其发病机制的研究.

基金项目: 辽宁省教育厅2019年科学研究经费项目, No. 32027.

作者贡献分布: 此课题由张晓威设计; 研究过程由张晓威操作完成; 数据分析由张晓威完成; 本论文写作由张晓威完成.

通讯作者: 张晓威, 住院医师, 121000, 辽宁省锦州市古塔区人民街五段2号, 锦州医科大学附属第一医院, 锦州医科大学附属第一医院. 798328818@qq.com

收稿日期: 2019-12-11

修回日期: 2019-12-20

接受日期: 2020-01-07

在线出版日期: 2020-01-28

ARHI overexpression inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of gastric carcinoma MKN28 cells

Xiao-Wei Zhang

Xiao-Wei Zhang, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Supported by: 2019 Scientific Research Funding Project of Liaoning Provincial Department of Education, No. 32027.

Corresponding author: Xiao-Wei Zhang, Resident, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, No. 2, Section 5, Renmin Street, Guta District, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. 798328818@qq.com

Received: 2019-12-11

Revised: 2019-12-20

Accepted: 2020-01-07

Published online: 2020-01-28

Abstract

BACKGROUND

ARHI has been proved to be associated with tumorigenesis and progression. However, it is not clear whether ARHI gene overexpression can inhibit the proliferation of gastric cancer (GC). In this study, we investigated the effect of ARHI gene overexpression on cell proliferation, invasion, and apoptosis in GC cell line MKN28.

AIM

To investigate the effect of ARHI overexpression on the proliferation, invasion, and apoptosis of gastric carcinoma MKN28 cells and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS

The pcDNA 3.1-ARHI plasmid was constructed and used to transfect MKN28 cells. Meanwhile, a blank control group and a negative control mock group were set. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell scratch wound assay was used to detect the ability of cell migration. Transwell method was used to detect cell invasion ability. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used for detection of related protein expression.

RESULTS

Compared with blank control MKN28 cells ($1.257\% \pm 0.006\%$), the proliferation rates at 48 h after transfection in the mock group was comparable ($1.257\% \pm 0.006\%$ vs $1.163\% \pm 0.003\%$, $P > 0.05$), while that of the ARHI overexpression group was significantly decreased ($1.257\% \pm 0.006\%$ vs $0.826\% \pm 0.005\%$, $P < 0.05$); the migration ability in the mock group was not significantly changed ($19.918\% \pm 0.233\%$ vs $18.295\% \pm 0.534\%$, $P > 0.05$), while

that of the *ARHI* overexpression group was significantly decreased ($19.918\% \pm 0.233\%$ vs $4.299\% \pm 1.572\%$, $P < 0.05$); the invasion ability in the mock group was not significantly changed (234 ± 3.61 vs 235 ± 4.51 , $P > 0.05$), while that of the *ARHI* overexpression group was significantly decreased (234 ± 3.61 vs 93.3 ± 2.08 , $P < 0.05$); the total apoptosis rate in the mock group was not significantly changed ($3.513\% \pm 0.015\%$ vs $3.597\% \pm 0.25\%$, $P > 0.05$), while that of the *ARHI* overexpression group was significantly increased ($3.513\% \pm 0.015\%$ vs $14.133\% \pm 0.032\%$, $P < 0.05$). Western blot results showed that, compared with blank control MKN28 cells, the relative expression of *ARHI* protein (1.037 ± 0.003), vascular endothelial growth factor (VEGF) (1.026 ± 0.008), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) (1.014 ± 0.010), protein kinase B (AKT) (1.001 ± 0.005), and p-AKT protein (0.977 ± 0.003) was not significantly changed ($P > 0.05$), while the expression of *ARHI* protein (2.088 ± 0.007) was significantly up-regulated ($P < 0.05$), that of VEGF protein (0.456 ± 0.004), Bcl-2 protein (0.468 ± 0.005), and p-AKT protein (0.502 ± 0.001) was significantly down-regulated ($P < 0.05$), and that of AKT protein was not significantly changed ($P > 0.05$).

CONCLUSION

Excessive expression of *ARHI* gene can inhibit the proliferation of MKN28 cells and promote their apoptosis, which may be related to the reduction of VEGF and p-AKT protein expression.

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *ARHI* gene; Gastric carcinoma; Proliferation; Apoptosis

Zhang XW. *ARHI* overexpression inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of gastric carcinoma MKN28 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(2): 50-57
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i2/50.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i2.50>

摘要 背景

*ARHI*已经被证实表达缺失与肿瘤的发生与进展相关。但是,目前尚不清楚*ARHI*基因对胃癌(gastric cancer, GC)是否具有增殖抑制作用,此次实验以GC细胞株MKN28为例,构建高表达pcDNA3.1-*ARHI*质粒,通过细胞转染技术转染MKN28细胞株,进一步研究*ARHI*基因对GC细胞增殖、侵袭及凋亡的影响。

目的

以GC细胞MKN28为例,研究*ARHI*基因对GC细胞增殖、侵袭及凋亡的影响,并探讨其机制。

方法

构建pcDNA3.1-*ARHI*质粒,通过细胞转染技术转染MKN28细胞株,取处于对数期的空白对照组、阴性对照Mock组及*ARHI*高表达克隆株clone4细胞进行实验,以MTT比色法检测细胞增殖;细胞划痕检测细胞迁移能力;Transwell法检测细胞侵袭能力;流式细胞术检测细胞凋亡率;Western blot检测相关蛋白表达。

结果

与正常MKN28细胞48 h增殖率 $1.257\% \pm 0.006\%$ 相比,Mock组与*ARHI*高表达克隆株48h细胞增殖率分别为 $1.163\% \pm 0.003\%$ ($P > 0.05$), $0.826\% \pm 0.005\%$ ($P < 0.05$);与正常MKN28细胞48 h迁移率($19.918\% \pm 0.233\%$)相比,Mock组与*ARHI*高表达克隆株48 h细胞迁移率分别为 $18.295\% \pm 0.534\%$ ($P > 0.05$), $4.299\% \pm 1.572\%$ ($P < 0.05$);与正常MKN28细胞48 h侵袭率(234 ± 3.61)相比,Mock组与*ARHI*高表达克隆株48 h细胞侵袭率分别为 235 ± 4.51 ($P > 0.05$), 93.3 ± 2.08 ($P < 0.05$);与正常MKN28细胞48 h总凋亡率($3.513\% \pm 0.015\%$)相比,Mock组与*ARHI*高表达克隆株48 h细胞总凋亡率分别为 $3.597\% \pm 0.25\%$ ($P > 0.05$), $14.133\% \pm 0.032\%$ ($P < 0.05$);Western blot检测各组细胞内蛋白结果显示:与MKN28细胞相比,Mock组中*ARHI*蛋白为 1.037 ± 0.003 ($P > 0.05$),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白为 1.026 ± 0.008 ($P > 0.05$), B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白为 1.014 ± 0.010 ($P > 0.05$),蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)蛋白为 1.001 ± 0.005 ($P > 0.05$),磷酸化AKT(p-AKT)蛋白为 0.977 ± 0.003 ($P > 0.05$);高表达克隆株clone4中*ARHI*蛋白为 2.088 ± 0.007 ($P < 0.05$), VEGF蛋白为 0.456 ± 0.004 ($P < 0.05$), Bcl-2蛋白为 0.468 ± 0.005 ($P < 0.05$), AKT蛋白为 0.969 ± 0.005 ($P > 0.05$), p-AKT蛋白为 0.502 ± 0.001 ($P < 0.05$)。

结论

*ARHI*基因过表达可抑制GC细胞MKN28的增殖,促进细胞凋亡,这可能与*ARHI*基因高表达后导致磷脂酰肌醇3-激酶/AKT通路中的VEGF、p-AKT蛋白表达降低有关。

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: *ARHI*基因; 胃癌; 增殖; 凋亡

核心提要: 本实验创新性的构建pcDNA3.1-*ARHI*质粒,通过细胞转染技术转染MKN28细胞株,研究结果提示:*ARHI*基因过表达可抑制胃癌细胞MKN28的增殖,促进细胞凋亡,这可能与*ARHI*基因高表达后导致磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B通路中的血管内皮生长因子、磷酸化蛋白激酶B蛋白表达降低有关。这将为临床治疗提供新的基因靶点。

张晓威. *ARHI*基因对胃癌细胞株MKN28增殖、侵袭、凋亡的影响及其机制研究. 世界华人消化杂志 2020; 28(2): 50-57

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i2/50.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i2.50>

0 引言

根据最新2018年全球癌症统计报告, 胃癌(gastric cancer, GC)的死亡率在中国位居第二, 仅次于肺癌, 达39万, 占比13.6%^[1]. 较大多数GC患者确诊时已是晚期, 5年生存率不足30%^[2,3]. 目前研究已证实, 肿瘤的发生发展与表观遗传学总基因的甲基化修饰密切相关^[4-6]. *ARHI*为Ras超家族中的一员, 现已经被证实可以抑制多种肿瘤生长, 其表达缺失与肿瘤的发生与进展密切相关^[7-9]. 但是, 针对*ARHI*基因对GC是否具有增殖抑制作用, 尚无报道, 此次实验以GC细胞株MKN28为例, 研究*ARHI*基因对GC细胞增殖、侵袭及凋亡的影响, 并探讨其机制, 为临床研究提供基础.

1 材料和方法

1.1 材料 MKN28细胞由锦州医科大学附属第一医院脑与脊髓实验室馈赠, RPMI-1640培养基、胎牛血清、二甲亚砜、结晶紫、及碘化丙啶购买于美国Sigma公司, 检测细胞凋亡所用试剂盒购买于南京凯基生物科技有限公司. *ARHI*、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)、磷酸化AKT(p-AKT)、 β -actin抗体、兔II抗、鼠II抗购买于Santa Cruz公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MKN28细胞在含10%浓度胎牛血清的RPMI 1640培养基内, 5% CO₂、37 °C温度的孵箱内培养, 每36-60 h传代. 取处于对数生长期的MKN28细胞进行相关实验.

1.2.2 质粒转染: 以pcDNA3.1为载体, 由上海舜百生物科技有限公司构建pcDNA3.1-*ARHI*质粒并检测; 稳定转染法转染细胞, 步骤如下: 取处于对数生长期的MKN28细胞, 以 3×10^5 个/mL浓度接种至6 cm培养皿内, 5% CO₂、37 °C的孵箱内培养24 h后, 更换新培养基, 将配置好的转染体系(9 μ L转染试剂+200 μ L培养基+2.4 μ g质粒)加入6 cm培养皿内, 混匀后于5% CO₂、37 °C的孵箱内培养12 h后更换培养基, 24 h后加入G418(终浓度为500 μ g/mL), 每日观察细胞增殖情况, 每2-3 d更换培养基, 同时加入G418(终浓度为500 μ g/mL), 直至细胞为单个群落, 挑取单克隆细胞株至24孔板内孵育. 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)与Western blot实验挑取稳定高表达克隆株, 实

验重复3次. 空载体Mock组做阴性对照组.

1.2.3 RT-PCR检测各克隆细胞株*ARHI*基因mRNA表达水平: 收集处于对数生长的各组细胞, 加入Trizol液(每 1×10^7 个细胞加入1 mL), 取样器反复吹打至混匀; 每1 mL Trizol加入0.2 mL氯仿后震荡15 s后室温放置5 min. 12000 g(4 °C)下离心5 min, 取上层水相至新EP管内; 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20 °C放置30 min; 2000 r/min 4 °C离心10 min, 弃去上清, 加入预冷的75%乙醇(DEPC水配制); 7500 r/min 4 °C离心5 min, 弃去上清, 室温内放置晾干后加入DEPC水20 μ L; 检测mRNA浓度, 以最低浓度样品为标准, 配制各实验组上机样品并进行检测, 实验重复3次.

1.2.4 Western Blot检测蛋白表达: 收集对数期的MKN28细胞及各实验组细胞, 加入适量蛋白裂解缓冲液, 震荡, 于冰上裂解10 min, 然后13000 g 4 °C温度离心10 min. 取上清, 弃去沉淀. 以标准BCA试剂确定蛋白浓度定量. 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同大小蛋白分离, 然后转印蛋白至PVDF膜, 通过浓度为5%的脱脂牛奶封闭膜内非特异性抗体. 通过加入相应一抗后与PVDF膜上的目的蛋白相反应, 4 °C环境孵育12 h. 洗涤PVDF膜后与相应二抗在室温环境下孵育1 h, 洗涤PVDF膜3次. 在PVDF膜上滴加化学发光试剂, 后通过X射线片曝光、显像, 记录. 内参对照选 β -actin, 观察*ARHI*、VEGF、Bcl-2、AKT、p-AKT、 β -actin蛋白的表达情况. 实验重复3次.

1.2.5 MTT比色法检测细胞增殖: 取生长处于对数期的MKN28细胞及各实验组细胞株接种于96孔板, 每空接种细胞约 8×10^3 个, 每组设5个重复孔, 5% CO₂、37 °C温度的孵育箱内培养24 h、48 h及72 h后, 在96孔板内每孔加入20 μ L MTT, 继续孵育4 h, 弃去上清, 每孔加入150 μ L二甲亚砜, 震荡混匀, 通过酶标仪测定96孔板中每孔在490 nm波长处的吸光度值, 取平均值, 绘制生长曲线, 计算各组细胞增殖率. 实验重复3次.

1.2.6 细胞划痕实验检测各组细胞株迁移能力: 将MKN28细胞、Mock组及clone4细胞株接种于6孔板 5×10^5 个/孔, 培养至单层铺满, PBS液冲洗1次, 10 μ L枪头尖端分别在6孔板细胞上垂直划痕, 后用PBS液再清洗2次, 加入含1%胎牛血清的1640培养基中, 余为对照组, 均设2个复孔. 分别于0 h、48 h倒置相差显微镜($\times 400$)下观测划痕细胞迁徙状况并照相, 测定划痕间距, 计算迁移率并进行统计学分析. 实验重复3次.

1.2.7 Transwell实验检测各组细胞株侵袭能力: 分别将处于对数生长期的MKN28细胞、Mock组及clone4细胞株, 制成细胞密度为 1×10^5 个/mL的细胞悬液, 取200 μ L滴入Transwell上小室6孔板, 下室加500 μ L含10%FBS的

1640培养基,均设2个复孔.于7℃培育48 h后,棉签去掉小室内表面残存细胞,4%多聚甲醛固定后通过0.1%结晶紫染色,PBS液清洗,生物显微镜进行拍照并计数.实验重复3次.

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡:培养MKN28细胞、Mock组及clone4细胞株至对数生长期,更换培养基为无胎牛血清的RPMI 1640培养24 h后,5% CO₂、37℃温度的孵箱内培养48 h后,收集不同处理组细胞,4℃PBS洗涤3次,调整每组样品中细胞浓度约为 $1.5 \times 10^6/L$,分别按Annexin V FITC及PI试剂盒操作步骤及周期试剂盒操作步骤进行实验,检测各组细胞凋亡率,其中Annexin V FITC+/PI-的细胞百分率即为早期凋亡细胞率,Annexin V FITC+/PI+的细胞百分率即晚期细胞凋亡率,二者之和为总凋亡率.实验重复3次.

统计学处理 以SPSS 20.0进行统计学分析,通过 t 检验分析比较数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RT-PCR检测MKN28细胞株及各克隆细胞株中*ARHI*基因mRNA表达水平 与MKN28细胞株相比,Mock组*ARHI*基因mRNA表达量 1.003 ± 0.073 ($P > 0.05$); clone1细胞株*ARHI*基因mRNA表达量 0.899 ± 0.056 ($P > 0.05$); clone2细胞株*ARHI*基因mRNA表达量 1.995 ± 0.0127 ($P < 0.05$); clone4细胞株*ARHI*基因mRNA表达量 4.383 ± 0.329 ($P < 0.05$) (图1、表1).

2.2 Western Blot实验检测MKN28细胞株及各克隆细胞株中ARHI蛋白表达水平 与MKN28细胞株相比,Mock组ARHI蛋白表达量 0.252 ± 0.007 ($P > 0.05$); clone1细胞株ARHI蛋白表达量 0.254 ± 0.004 ($P > 0.05$); clone2细胞株ARHI蛋白表达量 0.524 ± 0.001 ($P < 0.05$); clone4细胞株ARHI蛋白表达量 0.997 ± 0.012 ($P < 0.05$) (图2、表2). 结合RT-PCR结果,clone4细胞株内*ARHI*基因转录mRNA水平及ARHI蛋白水平均较高,故选取clone4高表达株作实验组.

2.3 MTT实验检测MKN28细胞株、MOCK组及Clone4细胞株增殖水平 与MKN28细胞株相比,Mock组细胞增殖能力无统计学差异 ($P > 0.05$); clone4细胞株48 h增殖能力为 0.826 ± 0.005 ($P < 0.05$), 72 h增殖能力为 1.589 ± 0.006 ($P < 0.05$) (图3、表3).

2.4 细胞划痕实验检测MKN28细胞株、MOCK组及Clone4细胞株迁移水平 与MKN28细胞株迁移率($19.92\% \pm 0.23\%$)相比,Mock组细胞迁移率($18.30\% \pm 0.53\%$)无统计学差异 ($P > 0.05$); clone4细胞株48 h迁移率为 $4.30\% \pm 1.57\%$ ($P < 0.05$) (图4、表4).

2.5 Transwell实验检测MKN28细胞株、Mock组及

Clone4细胞株侵袭水平 与MKN28细胞株48 h侵袭(234 ± 3.61)相比,Mock组细胞侵袭能力(235 ± 4.51),无统计学差异 ($P > 0.05$); clone4细胞株侵袭能力为 93.3 ± 2.08 ($P < 0.05$) (图5、表5).

2.6 流式细胞术检测MKN28细胞株、Mock组及Clone4细胞株凋亡水平 流式细胞术检测各组细胞48 h总凋亡率显示,与MKN28细胞株总凋亡率($3.51\% \pm 0.02\%$)相比,Mock组细胞总凋亡率为($3.60\% \pm 0.03\%$),无统计学差异 ($P > 0.05$); clone4细胞株总凋亡率为 $14.13\% \pm 0.03\%$ ($P < 0.05$) (图6、表6).

2.7 Western blot检测MKN28细胞株、Mock组及Clone4细胞株内各蛋白表达水平 Western blot检测各组细胞蛋白表达显示,与MKN28细胞株相比,Mock组细胞内各蛋白表达无统计学差异 ($P > 0.05$); clone4细胞株内ARHI、VEGF、Bcl-2、p-AKT蛋白表达具有统计学差异 ($P < 0.05$), AKT蛋白表达无统计学差异 ($P > 0.05$) (图7、表7).

3 讨论

众所周知,肿瘤的发生发展与癌基因的激活和抑癌基因的失活密切相关^[10-12]. *ARHI*基因,作为Ras家族中的一员,长度大约为8 kb,包含2个外显子及1个内含子.相关研究证实:其编码蛋白已经证实人在人乳腺、卵巢内表达,结肠癌、胰腺癌、宫颈癌、肝细胞癌、卵巢癌及喉鳞癌内ARHI蛋白表达降低^[13-16].

本实验以GC细胞株MKN28为例,稳定转染pcDNA3.1-ARHI质粒,通过RT-PCR及Western blot筛选高表达细胞克隆株作为实验组,空载体MOCK组做阴性对照组,结果提示*ARHI*过表达后可抑制GC细胞株MKN28增殖,降低其侵袭和迁移能力,并促进其凋亡,这与多数研究相一致,为此,我们进一步检测了相关蛋白,进一步明确相关机制.大量研究显示Ras基因相关的信号通路,目前公认的主要有两个,一个是Ras-Raf-MAPKK-MAPK通路,另外一个则是磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT通路.针对PI3K/AKT通路,PI3Ks蛋白家族参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节,活化的p-AKT可下调上皮型钙黏蛋白及β-连环蛋白和上调间充质细胞中的波形蛋白表达,促进细胞上皮间充质转化,进而降低了细胞黏附力,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[18],这与本实验结果相一致,ARHI高表达克隆株细胞迁移能力降低,侵袭能力降低,差异具有统计学意义,提示ARHI高表达可抑制肿瘤细胞迁移及侵袭能力.活化的AKT通过磷酸化多种酶、激酶和转录因子等,在调节细胞凋亡

表 1 RT-PCR检测MKN28细胞株及各克隆细胞株内*ARHI*基因mRNA表达量

	MKN28	Mock	clone1	clone2	clone4
mRNA- <i>ARHI</i>	1.000 ± 0.059	1.003 ± 0.073	0.899 ± 0.056	1.995 ± 0.0127 ^a	4.383 ± 0.329 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

表 2 MKN28细胞株及各克隆细胞株内*ARHI*蛋白表达灰度值测量

	MKN28	Mock	clone1	clone2	clone4
<i>ARHI</i> 灰度值测量(相对于β-actin)	0.245 ± 0.005	0.252 ± 0.007	0.254 ± 0.004	0.524 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.012 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

表 3 MTT检测MKN28、Mock组及clone4细胞株增殖率

	MKN28	Mock	clone4
48 h增殖率(b100%)	1.257 ± 0.006	1.163 ± 0.003	0.826 ± 0.005 ^a
72 h增殖率(b100%)	2.451 ± 0.004	2.301 ± 0.007	1.589 ± 0.006 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

表 4 细胞划痕检测MKN28、Mock组及clone4细胞株迁移率

	MKN28	Mock	clone4
48 h迁移率(%)	19.918 ± 0.233	18.295 ± 0.534	4.299 ± 1.572 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

表 5 细胞Transwell实验检测MKN28、Mock组及clone4细胞株侵袭率

	MKN28	Mock	clone4
48 h侵袭率(个)	234 ± 3.61	235 ± 4.51	93.3 ± 2.08 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

表 6 MKN28、Mock组及clone4细胞株总凋亡率统计

	MKN28	Mock	Clone4
细胞总凋亡率(%)	3.513 ± 0.015	3.597 ± 0.025	14.133 ± 0.032 ^a

与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

中起着至关重要的作用. 研究证实: PI3K/AKT通路在被激活后, 会导致细胞周期蛋白D1的降解减少, 推动细胞

周期进行, 促进肿瘤细胞增殖. 陆英等^[19]报道显示*ARHI*基因表达增高可以抑制细胞周期内G2期向M期进展,

表 7 MKN28、Mock组及clone4细胞株内蛋白表达灰度值测量

	MKN28	Mock	Clone4
ARHI	1.000 ± 0.004	1.037 ± 0.003	2.088 ± 0.007 ^a
VEGF	1.000 ± 0.005	1.026 ± 0.008	0.456 ± 0.004 ^a
Bcl-2	1.000 ± 0.006	1.014 ± 0.010	0.468 ± 0.005 ^a
AKT	1.000 ± 0.000	1.001 ± 0.005	0.969 ± 0.005
p-AKT	1.000 ± 0.003	0.977 ± 0.003	0.502 ± 0.001 ^a

相对于正常MKN28细胞, ^a*P*<0.05. VEGF: 血管内皮生长因子; Bcl-2: B淋巴细胞瘤-2; AKT: 蛋白激酶B; p-AKT: 磷酸化蛋白激酶B.

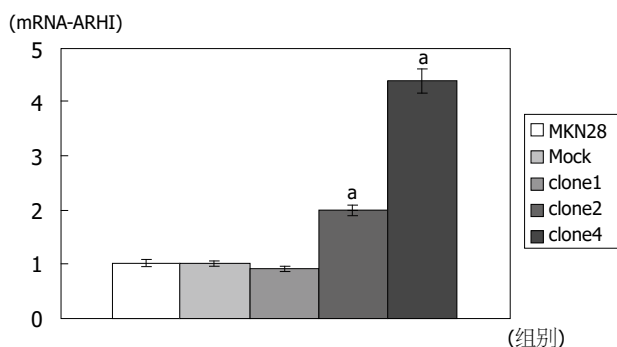


图 1 RT-PCR检测MKN28细胞株及各克隆细胞株内*ARHI*基因mRNA表达量. 与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

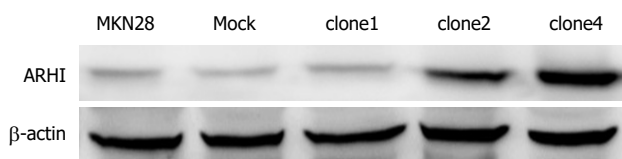


图 2 MKN28细胞株及各克隆细胞株内ARHI蛋白表达灰度图.

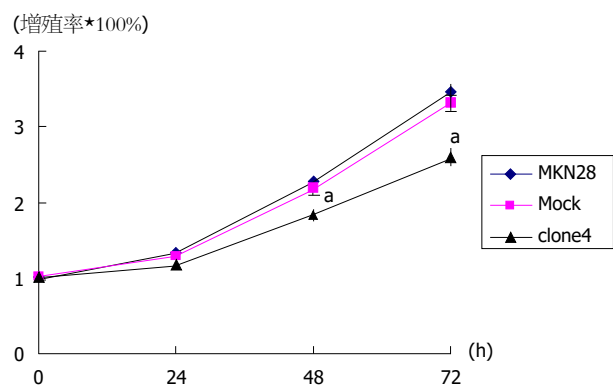


图 3 MTT检测MKN28、Mock组及clone4细胞株增殖能力. 与正常MKN28细胞相比, ^a*P*<0.05.

进而抑制细胞分裂; 此外, Li^[20]报道称*ARHI*基因过表达可导致乳腺癌细胞周期内G1期向S期进展抑制细胞分裂, 这可能与细胞类型不同有关.

Bcl-2基因是公认的癌基因, 可通过阻止细胞色素c从线粒体释放至细胞质, 从而抑制肿瘤细胞凋亡, 促进

增殖. AKT作为Bcl-2的上游蛋白, 当AKT磷酸化水平降低后, 引起Bcl-2蛋白表达降低, 进而导致细胞增殖能力降低, 凋亡率增加, 这与本实验凋亡结果相一致, 提示ARHI蛋白可以通过调节PI3K/AKT通路进而调节细胞凋亡.

总之, 本实验结果表明*ARHI*基因过表达可抑制GC细胞MKN28的增殖, 促进细胞凋亡, 这可能与*ARHI*高表达后导致PI3K/AKT通路中的VEGF、p-AKT蛋白表达降低有关, 这也可能为GC的治疗提供新的基因靶点.

文章亮点

实验背景

胃癌(gastric cancer, GC)作为消化道最常见的肿瘤之一, 在诊断时往往伴有腹腔内广泛转移, 因此进一步明确GC侵袭转移的机制至关重要, *ARHI*基因已经被证实对多种肿瘤细胞具有抑制作用. 进一步明确*ARHI*基因高表达对GC细胞的影响, 可为GC的诊断提供新思路.

实验动机

本研究拟明确: *ARHI*基因是否抑制GC细胞株增殖能力、迁移能力、侵袭能力; 是否可促进GC细胞株凋亡. 实验结果将为GC患者的治疗提供新的基因靶点.

实验目标

本研究结果显示*ARHI*基因可以抑制GC细胞株增殖能力、迁移能力、侵袭能力; 并促进GC细胞株MKN28的凋亡, 进一步明确了*ARHI*基因的功能, 为动物实验、临床实验提供了基础.

实验方法

实验首选通过构建pcDNA3.1-ARHI质粒, 后转染至MKN28细胞内, 为进一步明确转然后单克隆细胞内*ARHI*基因及蛋白表达情况, 后进行了RT-PCR及Western blot实验; 筛选出高表达克隆株clone4后, 通过MTT实验检测细胞增殖能力; 细胞划痕实验检验细胞迁移能力;

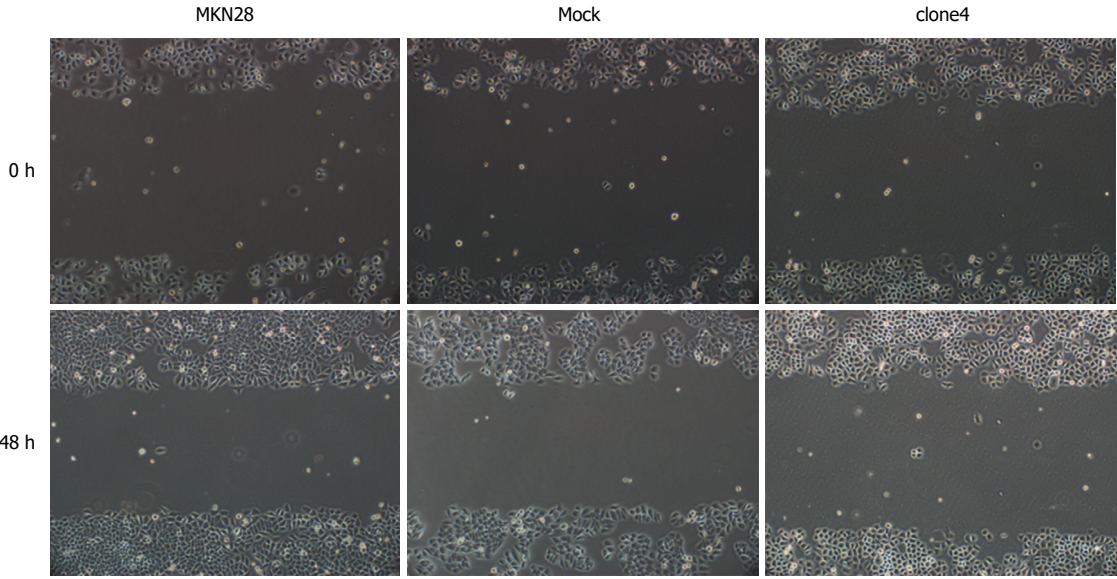


图 4 细胞划痕检测MKN28、Mock组及clone4细胞株迁移能力. 比例尺: 1:100 μm.

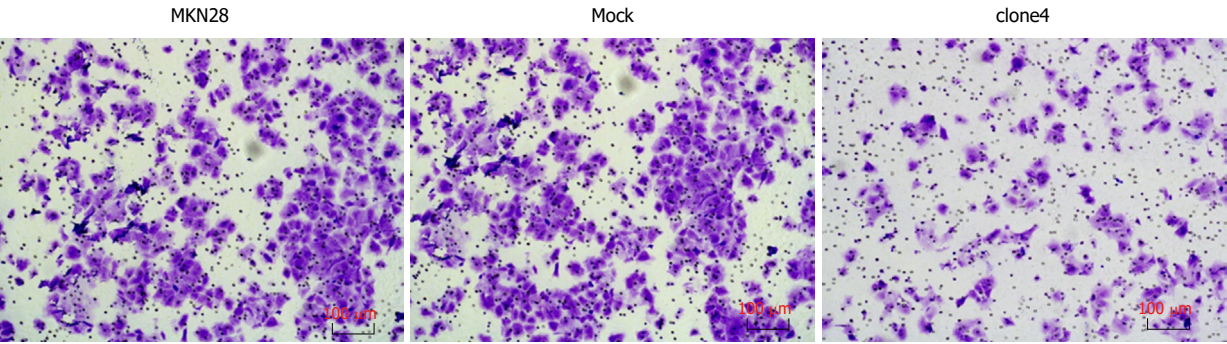


图 5 Transwell实验检测MKN28、Mock组及clone4细胞株侵袭能力.

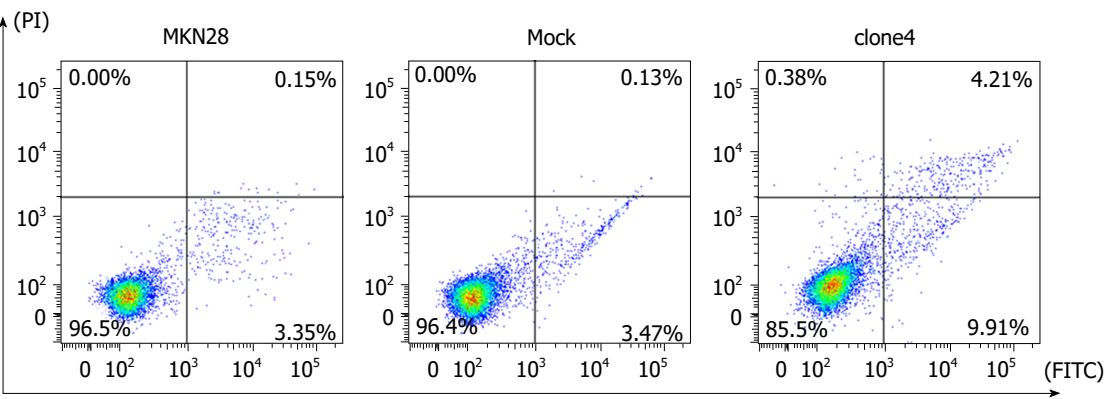


图 6 流式细胞术检测MKN28、Mock组及clone4细胞株凋亡率.

流式细胞术检测细胞凋亡能力; Western blot实验检测细胞内蛋白表达情况.

实验结果

本项实验达到预期实验结果, *ARHI*基因可以抑制GC细胞株增殖能力、迁移能力、侵袭能力; 并促进GC细胞

株MKN28的凋亡. 为接下来动物实验及临床实验提供基础及指导.

实验结论

*ARHI*基因过表达可抑制GC细胞MKN28的增殖, 促进细胞凋亡, 这可能与*ARHI*基因高表达后导致PI3K/AKT通

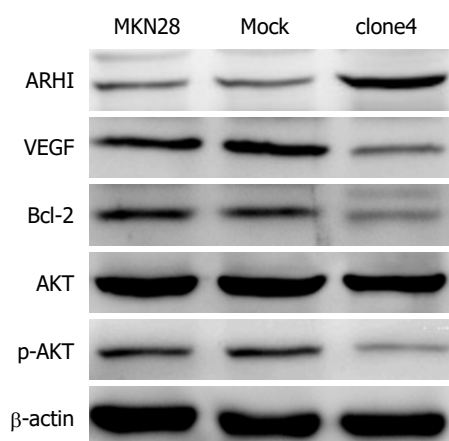


图 7 Western blot检测MKN28、Mock组及clone4细胞株内蛋白表达。

路中的VEGF、p-AKT蛋白表达降低有关。通过此次实验，有望将*ARHI*基因作为新的基因靶点，为GC患者的治疗提供新方案，同时有望成为GC是否发生转移的监测指标。

展望前景

实验未来研究的方向，主要是：(1)构建动物模型，进行组织学水平实验；(2)收集临床标本，通过免疫组化、组织芯片等技术进一步提高说服力。

4 参考文献

- 王宁, 刘硕, 杨雷, 张希, 袁延楠, 李慧超, 李加孚. 2018全球癌症统计报告解读. 肿瘤综合治疗电子杂志 2019; 5: 87-97
- Limprukkasem T, Chotivitayatarakorn P, Vilaichone RK. Mo1307 Clinical Predictors and Survival Rates of Diffuse and Intestinal Type of Gastric Cancer Patients: A 5-Year Longitudinal Study. *Gastrointest Endosc* 2019; 89 [DOI: 10.1016/j.gie.2019.03.786]
- Li ZY, Zhang QW, Teng LM, Zhang CH, Huang Y. Comparable rates of lymph node metastasis and survival between diffuse type and intestinal type early gastric cancer patients: a large population-based study. *Gastrointest Endosc* 2019; 90: 84-95.e10 [PMID: 30885598 DOI: 10.1016/j.gie.2019.03.002]
- Bouras E, Karakioulaki M, Bougioukas KI, Aivaliotis M, Tzimogiorgis G, Chourdakis M. Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review. *Gene* 2019; 710: 333-340 [PMID: 31202904 DOI: 10.1016/j.gene.2019.06.023]
- 雷天翔, 刘合利. DNA甲基化与胃癌发生发展的关系研究进展. 中国普通外科杂志 2018; 27: 1334-1340 [DOI: 10.7659/

- j.issn.1005-6947.2018.10.017]
- Ishihara H, Yamashita S, Fujii S, Tanabe K, Mukai H, Ushijima T. DNA methylation marker to estimate the breast cancer cell fraction in DNA samples. *Med Oncol* 2018; 35: 147 [PMID: 30218172 DOI: 10.1007/s12032-018-1207-3]
- 路新卿, 杨红, 李景南, 胡益群, 钱家鸣. *ARHI*基因抑制胰腺癌细胞增殖的作用机制研究. 中国全科医学 2015; 18: 4455-4458 [DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2015.36.011]
- Xiang S, Dauchy RT, Hoffman AE, Pointer D, Frasch T, Blask DE, Hill SM. Epigenetic inhibition of the tumor suppressor *ARHI* by light at night-induced circadian melatonin disruption mediates *STAT3*-driven paclitaxel resistance in breast cancer. *J Pineal Res* 2019; 67: e12586 [PMID: 31077613 DOI: 10.1111/jpi.12586]
- 张海燕, 李铁军, 陈亮, 姜伟. 抑癌基因*ARHI*在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义. 中国医学装备 2017; 14: 120-123 [DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2017.04.032]
- 米志宽, 赵菊梅. 抑癌基因甲基化与胃癌关系研究进展. 陕西医学杂志 2019; 48: 679-681
- 陈琴, 黄守国. 原癌基因与抑癌基因对子宫颈癌发生发展的影响. 海南医学 2018; 29: 2026-2028 [DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2018.14.030]
- Hayama T, Hashiguchi Y, Okamoto K, Okada Y, Ono K, Shimada R, Ozawa T, Toyoda T, Tsuchiya T, Iinuma H, Nozawa K, Matsuda K. G12V and G12C mutations in the gene *KRAS* are associated with a poorer prognosis in primary colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2019; 34: 1491-1496 [PMID: 31309326 DOI: 10.1007/s00384-019-03344-9]
- 魏薇, 王巍. 抑癌基因*ARHI*与全身各系统肿瘤相关性及其机制的研究进展. 现代肿瘤医学 2016; 24: 2308-2311 [DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2016.14.041]
- 杨红, 胡珊珊, 阮戈冲, 杨晓鸥, 钱家鸣. *ARHI*基因与*HuR*蛋白在胰腺癌PANC-1细胞中的表达. 协和医学杂志 2017; 8: 39-42 [DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2017.01.009]
- Ye K, Wang S, Wang J, Han H, Ma B, Yang Y. Zebularine enhances apoptosis of human osteosarcoma cells by suppressing methylation of *ARHI*. *Cancer Sci* 2016; 107: 1851-1857 [PMID: 27685841 DOI: 10.1111/cas.13088]
- 陈欣, 姜政. 过表达海兔属*Ras*同源物(*ARHI*)增加人SW480结肠癌细胞凋亡. 细胞与分子免疫学杂志 2016; 32: 1503-1506 [DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.007951]
- 刘鑫, 赵任. *K-ras*、*PIK3CA*基因突变与结直肠癌患者临床特征的关系及相关性分析. 癌症进展 2019; 17: 1579-1582
- Bisogno LS, Friedersdorf MB, Keene JD. Ras Post-transcriptionally Enhances a Pre-malignantly Primed EMT to Promote Invasion. *iScience* 2018; 4: 97-108 [PMID: 30240757 DOI: 10.1016/j.isci.2018.05.011]
- 陆英, 刘相富, 刘玲玲, 李芳, 覃雪玲, 林东军. *ARHI*基因抑制U937白血病细胞株生长并诱导其G₂/M期阻滞及凋亡. 中国病理生理杂志 2015; 31: 1950-1955 [DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.11.005]
- Li Y, Shi L, Han C, Wang Y, Yang J, Cao C, Jiao S. Effects of *ARHI* on cell cycle progression and apoptosis levels of breast cancer cells. *Tumour Biol* 2012; 33: 1403-1410 [PMID: 22528939 DOI: 10.1007/s13277-012-0388-1]

编辑: 王禹乔 电编: 刘继红





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton,
CA 94566, USA
Telephone: +1-925-3991568
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

