

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 3 月 28 日 第 28 卷 第 6 期 (Volume 28 Number 6)



6 / 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.

二零二零年三月二十八日

第二十八卷

第六期



述评

- 203 终末期肝病合并真菌感染诊治的热点与难点
刘晨瑞, 李亚萍, 冯丹丹, 党双锁

基础研究

- 210 下调长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1表达对胃癌HGC-27细胞生长和顺铂敏感性的影响
王亮, 张龙, 石伟
- 217 FTY720通过miR-494/MST1抑制结肠癌细胞并增加吉西他滨敏感性的分子机制
薛珊, 邢颖, 宋华伟

临床研究

- 226 内镜下乳头球囊扩张术治疗胆总管结石的安全性和远期疗效
叶艳清, 廖跃光, 曾斌, 谢云
- 231 自闭式插管造瘘在低位直肠癌保肛手术的临床应用研究
付旭堂, 邵华, 陈芑芑

临床实践

- 236 超声造影判定术前直肠癌T分期的临床应用价值
刘志红, 欧阳骏, 张荣

消 息

- 209 《世界华人消化杂志》参考文献要求
225 《世界华人消化杂志》栏目设置
235 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事
240 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

封面故事

郭卉, 主任医师, 现任天津中医药大学第一附属医院肝胆科主任, 天津中医药大学硕士研究生导师. 主要从事脂肪性肝病及代谢综合征、病毒性肝炎、肝癌及重症肝病的临床诊疗. 为天津市卫健委中医肝病重点专科学术带头人, 担任中华中医药学会肝病专业委员会常委, 天津中西医结合肝病专业委员会副主任委员等职, 《世界华人消化杂志》编委. 承担及参与国家重大传染病专项课题2项、天津市局级课题2项, 获得科研成果2项, 发表学术论文30余篇.

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 2020-03-28

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

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

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wcjd@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: +86-10-85381892

《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 6 March 28, 2020

EDITORIAL

- 203 Hot topics and difficult problems in diagnosis and treatment of end-stage liver disease with fungal infection
Liu CR, Li YP, Feng DD, Dang SS

BASIC RESEARCH

- 210 Effect of knockdown of long-chain noncoding RNA KCNQ1 overlapping transcript 1 on growth and cisplatin sensitivity of HGC-27 cells
Wang L, Zhang L, Shi W
- 217 FTY720 inhibits colon cancer cell survival and increases their sensitivity to gemcitabine through the miR-494/MST1 pathway
Xue S, Xing Y, Song HW

CLINICAL RESEARCH

- 226 Safety and long-term outcomes of endoscopic papillary balloon dilation for removal of common bile duct stones
Ye YQ, Liao YG, Zeng B, Xie Y
- 231 Clinical application of self-closing ileostomy in anus-preserving surgery for low rectal cancer
Fu XT, Shao H, Chen PP

CLINICAL PRACTICE

- 236 Clinical value of contrast-enhanced ultrasonography in assessment of T stage of rectal cancer before operation
Liu ZH, Ou-Yang J, Zhang R

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 28 Number 6 March 28, 2020

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Guo Hui, Chief Physician, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, No. 88, Changling Road, Xiqing District, Tianjin 300380, 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-Xiaojuan Wu*

Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date March 28, 2020

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

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.

下调长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1表达对胃癌 HGC-27细胞生长和顺铂敏感性的影响

王亮, 张龙, 石伟

王亮, 天津市第五中心医院药剂科 天津市 300450

张龙, 石伟, 河北医科大学药理组 河北省石家庄市 050017

王亮, 主管药师, 研究方向为临床药物研究.

作者贡献分布: 此课题由王亮、张龙及石伟设计; 研究过程由王亮、张龙及石伟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张龙与石伟提供; 数据分析由张龙与石伟完成; 本论文写作由王亮完成.

通讯作者: 王亮, 主管药师, 300450, 天津市滨海新区塘沽浙江路41号, 天津市第五中心医院药剂科. odxf48@163.com

收稿日期: 2020-01-07

修回日期: 2020-03-11

接受日期: 2020-03-15

在线出版日期: 2020-03-28

Effect of knockdown of long-chain noncoding RNA KCNQ1 overlapping transcript 1 on growth and cisplatin sensitivity of HGC-27 cells

Liang Wang, Long Zhang, Wei Shi

Liang Wang, Department of Pharmacy, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China

Long Zhang, Wei Shi, Pharmacology Group, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Corresponding author: Liang Wang, Pharmacist-in-Charge, Department of Pharmacy, Tianjin Fifth Central Hospital, No. 41, Zhejiang Road, Tanggu, Binhai New Area, Tianjin 300450, China. odxf48@163.com

Received: 2020-01-07

Revised: 2020-03-11

Accepted: 2020-03-15

Published online: 2020-03-28

Abstract

BACKGROUND

Gastric cancer (GC) had become one of the malignant tumors that threaten the safety of human life. At present, the molecular mechanism of the occurrence and development of GC has not been fully elucidated. The regulatory role of long-chain noncoding RNAs in these processes has not yet been elucidated.

AIM

To investigate the effect of KCNQ1 overlapping transcript 1 (KCNQ1OT1) on the proliferation, invasion, migration, and cisplatin sensitivity of HGC-27 cells.

METHODS

HGC-27 cells transfected with KCNQ1OT1-siRNA were used as a KCNQ1OT1-siRNA group, HGC-27 cells transfected with negative control siRNA were used as an NC-siRNA group, and normally cultured cells were used as a control group. After treatment of cells in the KCNQ1OT1-siRNA group and NC-siRNA group with cisplatin, cell viability was measured by Cell Counting Kit-8 assay, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. Real-time quantitative polymerase chain reaction, Transwell assay, flow cytometry, and Western blot were used to detect KCNQ1OT1 expression level, cell proliferation, invasion, and migration, cycle distribution, and the expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, P-glycoprotein (P-gp), and multidrug resistance associated protein 1 (MRP1), respectively.

RESULTS

Compared with the control group, there was no significant change in the indexes in the NC-siRNA group

($P > 0.05$). Compared with the control group or NC-siRNA group, the expression level of KCNQ1OT1, the percentages of cells in S phase and G2/M phase, the ability of cell proliferation, invasion, and migration, and the expression levels of N-cadherin and Vimentin in cells of the KCNQ1OT1-siRNA group were significantly reduced, while the percentage of cells in G0/G1 phase was significantly reduced ($P > 0.05$). Compared with the NC-siRNA group, the protein levels of P-gp and MRP1 in the KCNQ1OT1-siRNA group were significantly reduced ($P < 0.05$), and the IC50 was significantly reduced ($P < 0.05$).

CONCLUSION

KCNQ1OT1 knockdown can inhibit the proliferation, invasion, and migration of HGC-27 cells and enhance their sensitivity to cisplatin.

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

Key Words: Gastric cancer; Long-chain noncoding RNA; KCNQ1 overlapping transcript 1; Cell proliferation; Cisplatin; Apoptosis

Wang L, Zhang L, Shi W. Effect of knockdown of long-chain noncoding RNA KCNQ1 overlapping transcript 1 on growth and cisplatin sensitivity of HGC-27 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(6): 210-216

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i6/210.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i6.210>

摘要

背景

胃癌(gastric cancer, GC)已成为威胁人类生命安全的恶性肿瘤之一, 目前GC发生及发展的分子机制尚未完全阐明, 长链非编码RNA(long-chain noncoding RNA, lncRNA)在肿瘤中异常表达并可能参与肿瘤发生及发展过程, 但仍有部分lncRNA在GC发生及转移过程中的调控作用尚未阐明。

目的

探讨lncRNA KCNQ1重叠转录物1(KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1, KCNQ1OT1)对HGC-27细胞增殖、侵袭、迁移和顺铂敏感性的影响。

方法

将转染KCNQ1OT1-siRNA的HGC-27细胞作为KCNQ1OT1-siRNA组, 转染阴性对照的HGC-27细胞作为NC-siRNA组, 正常培养的细胞作为对照组。顺铂处理KCNQ1OT1-siRNA组、NC-siRNA组细胞后, 采用细胞计数试剂盒法检测细胞活力并计算细胞的半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC50)值。采用实时荧光定量聚合酶链

式反应、Transwell小室、流式细胞仪和免疫印迹法分别检测KCNQ1OT1表达水平、细胞增殖活力、侵袭与迁移、周期分布和细胞中上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药关联蛋白1(multidrug resistance associated protein 1, MRP1)表达情况。

结果

与对照组比较, NC-siRNA组中各指标差异无统计学意义($P > 0.05$); 与对照组或NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞中KCNQ1OT1表达水平、细胞在S期与G2/M期所占百分比和细胞增殖、侵袭、迁移能力以及细胞中N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平均明显降低, 而细胞在G0/G1期所占百分比和E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 与NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组P-gp蛋白水平显著降低($P < 0.05$), MRP1蛋白水平显著升高($P < 0.05$), IC50值明显降低($P < 0.05$)。

结论

下调KCNQ1OT1表达可抑制HGC-27细胞增殖、侵袭、迁移并增强细胞对顺铂的敏感性。

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

关键词: 胃癌; 长链非编码RNA; KCNQ1重叠转录物1; 细胞增殖; 顺铂; 细胞凋亡

核心提要: 本研究首次证实KCNQ1OT1在胃癌(gastric cancer, GC)细胞中呈高表达, 抑制KCNQ1OT1表达可抑制GC细胞增殖、迁移及侵袭, 还可增强顺铂敏感性。

王亮, 张龙, 石伟. 下调长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1表达对胃癌HGC-27细胞生长和顺铂敏感性的影响. *世界华人消化杂志* 2020; 28(6): 210-216

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i6/210.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i6.210>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是一种临床常见的消化系统肿瘤, 在全世界仍然是一个相当大的健康负担^[1]. 尽管, 我国GC的发病率已趋于平稳, 但总发病人数还在不断增加^[2]. 目前, 以铂类药物为基础的化疗仍是GC中晚期患者常用的治疗手段, 但化疗药物的长期或不规范使用会产生耐药抵抗, 导致治疗效果不太理想^[3]. 因此, 深入探讨GC发生发展的分子机制, 寻找有效提高肿瘤细胞对铂类化疗药物敏感性的方法具有重要意义. 越来越多

的研究^[4-6]显示, 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可通过调控基因表达在GC发生发展和耐药形成过程中发挥着重要作用. lncRNA KCNQ1重叠转录物1(KCNQ1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1)定位于人11p15.5染色体上, 是KCNQ1的反义链转录物, 据报道与结直肠癌和卵巢癌等肿瘤恶性进展和顺铂耐药密切相关^[7,8]. 有学者^[9,10]指出, 在GC组织和细胞中KCNQ1OT1表达上调, 且高表达KCNQ1OT1与患者淋巴结转移和不良预后有关, 但其在GC中的作用并不清楚. 本研究通过观察下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞增殖、侵袭、迁移和顺铂敏感性的影响, 旨在揭示KCNQ1OT1在GC发生发展中的作用, 以期对GC的治疗提供新线索.

1 材料和方法

1.1 材料 HGC-27细胞(美国ATCC), 细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(北京百奥生物), RPMI-1640培养基(美国HyClone), 胎牛血清(杭州四季青), 细胞周期检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒(江苏南京凯基), 顺铂(美国Sigma), 逆转录试剂盒、ECL发光液、BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE配胶试剂盒(上海碧云天), 上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体和山羊抗兔或鼠HRP标记的IgG二抗(美国Santa Cruz), Trizol试剂和Lipofectamine 2000(美国Invitrogen), 靶向KCNQ1OT1的小干扰RNA KCNQ1OT1-siRNA(UGAGCGUAGCAUCGAGAGCGUACGUCGAUCGAC)及其阴性对照NC-siRNA(上海吉玛), Matrigel和FACSCalibur流式细胞仪(美国BD), Varioskan LUX多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific), Transwell小室(美国Corning), BB15二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo), ProFlex™聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(美国ABI), ChemiDoc MP凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理: HGC-27细胞采用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在37℃、5%二氧化碳细胞培养箱中常规培养. 将对数生长期的HGC-27细胞以每孔 2×10^5 个接种至6孔细胞板上后, 常规培养约至70%融合度时, 参照Lipofectamine 2000说明书步骤进行瞬时转染. 将转染KCNQ1OT1-siRNA的细胞作为KCNQ1OT1-siRNA组, 转染NC-siRNA的细胞作为NC-siRNA组, 以正常培养的细胞作为对照组. 转染5 h后更换新鲜培养基, 继续培养48 h后收集对照组、NC-siRNA组和KCNQ1OT1-siRNA组细胞并采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)法检测各组细胞中

KCNQ1OT1的表达水平以评价转染效果. 另外, 将转染KCNQ1OT1-siRNA后给予顺铂处理48 h的细胞, 通过CCK-8法检测细胞活力, 并计算细胞的半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC50)值^[11].

1.2.2 qRT-PCR检测KCNQ1OT1表达: 采用Trizol法提取HGC-27细胞总RNA后, 参照逆转录试剂盒说明书步骤将RNA反转录合成cDNA. 以cDNA为模板, 在20 μL反应体系下根据设定的PCR反应条件(94℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 循环40次)上PCR仪进行扩增. 以GAPDH为管家基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算HGC-27细胞中KCNQ1OT1的表达水平. 其中, 由上海生工生物工程合成的PCR引物序列如下: KCNQ1OT1上游: 5'-CCTCCCTCACTGAGCTTTGG-3', 下游: 5'-GTGCGGACCCTATACGGAAG-3'; GAPDH上游: 5'-GCTGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3', 下游: 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'.

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖: 收集转染48 h后的NC-siRNA组、KCNQ1OT1-siRNA组和对照组HGC-27细胞, 按照每孔 10^5 个接种至96孔细胞板上, 其中每组设置3个复孔; 置于细胞培养箱中常规培养24 h、48 h、72 h和96 h后, 弃培养液, 每孔加入10 μL CCK-8试剂孵育2 h. 采用酶标仪检测HGC-27细胞在450 nm处的吸光度(optical density, OD)值, 实验重复3次.

1.2.4 Transwell小室实验检测细胞侵袭和迁移: (1)侵袭实验: 将50 μL Matrigel均匀地铺在(浓度为500 ng/μL)Transwell小室内面上, 置于细胞培养箱内孵育4 h使其凝固. 向24孔细胞板中每孔加入含血清培养基600 μL, 将Transwell小室放入24孔细胞板中, 并在小室上室中每孔加入200 μL细胞悬液(浓度为 10^5 个/mL); 放入培养箱内常规培养24 h后, 将小室取出. 以棉签小心拭去上室面残留的细胞后, 将小室放入4%多聚甲醛固定液中固定30 min; 再以0.1%结晶紫染色15 min后, 采用显微镜观察统计各组细胞的穿膜细胞数, 结果以随机选取的3个视野内细胞数的均值表示. 实验重复3次; (2)迁移实验: Transwell小室不需药使用Matrigel铺盖, 其余不同与侵袭实验相同.

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期: 收集转染48 h后的NC-siRNA组、KCNQ1OT1-siRNA组和对照组HGC-27细胞, 加入预冷的70%乙醇溶液在-20℃下孵育24 h. 弃上清后, 加入0.1 mL RNase(浓度5 μg/mL)和0.5 mL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)(浓度50 μg/mL)于37℃下避光反应30 min. 采用流式细胞仪检测各组细胞周期分布情况.

1.2.6 免疫印迹法检测细胞中E-cadherin、N-cadherin、

Vimentin、P-糖蛋白、多药耐药关联蛋白1蛋白表达: 将HGC-27细胞中加入细胞裂解液提取总蛋白后, 采用BCA法检测总蛋白的浓度与纯度. 将变性后的蛋白样品上样至SDS-PAGE凝胶中行电泳分离. 电泳结束后, 转PVDF膜. 以5%脱脂奶粉封膜2 h后, 加入E-cadherin(1:800)、N-cadherin(1:800)、Vimentin(1:1000)、P-gp(1:1000)、MRP1(1:1000)和GAPDH(1:1000)抗体于4℃下孵育24 h. 再以HRP标记的IgG二抗(1:5000)室温孵育2 h后, 加入ECL显影曝光. 以GAPDH为内参, 采用凝胶成像分析系统扫描分析HGC-27细胞中E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白的表达水平. 实验重复3次.

统计学处理 实验所得数据以mean±SD形式表示, 采用SPSS 22.0软件进行统计学分析, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较采用SNK-*q*, 两组间比较采用独立样本*t*检验. $P<0.05$ 代表差异有统计学意义.

2 结果

2.1 转染后HGC-27细胞中KCNQ1OT1表达 与对照组比较, NC-siRNA组细胞中KCNQ1OT1表达水平差异无统计学意义($P>0.05$); 与NC-siRNA组或对照组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞中KCNQ1OT1表达水平明显降低($P<0.05$)(图1).

2.2 下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞增殖的影响 与对照组比较, NC-siRNA组细胞在转染后继续培养不同时间后增殖活力差异无统计学意义($P>0.05$); 与对照组或NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞在转染后继续培养48 h、72 h和96 h后增殖活力明显降低($P<0.05$)(图2).

2.3 下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞周期的影响 与对照组比较, NC-siRNA组细胞在G0/G1期、S期和G2/M期所占百分比差异均无统计学意义($P>0.05$); 与对照组或NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞在G0/G1期所占百分比明显升高, 而在S期和G2/M期所占百分比明显降低($P<0.05$)(图3).

2.4 下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞侵袭和迁移的影响 与对照组比较, NC-siRNA组细胞侵袭数目和迁移数目差异均无统计学意义($P>0.05$); 与对照组或NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞侵袭数目和迁移数目均明显减少($P<0.05$)(图4).

2.5 下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞上皮间质转化的影响 与对照组比较, NC-siRNA组细胞中上皮标志物E-cadherin和间质标志物N-cadherin、Vimentin蛋白的表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$); 与对照组或NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组细胞

中E-cadherin蛋白表达水平明显升高, 而N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)(图5).

2.6 下调KCNQ1OT1表达对HGC-27细胞顺铂耐药性的影响 与NC-siRNA组比较, KCNQ1OT1-siRNA组P-gp蛋白水平显著降低($P<0.05$), MRP1蛋白水平显著升高($P<0.05$), IC50值明显降低($P<0.05$)(图6).

3 讨论

lncRNA是一类可在表观遗传水平、转录和转录后水平调控基因表达的长链非编码RNA, 不具备编码蛋白的功能, 在维持基因稳定性和促进DNA修复等过程中发挥着重要作用^[12]. 研究^[13-15]显示, 在GC组织或细胞中存在异常表达的lncRNA, 并且这些lncRNA可通过调控细胞增殖、侵袭和凋亡等生物学行为参与GC的发生发展和耐药形成.

KCNQ1OT1是lncRNA成员, 其在肿瘤发生发展中的作用逐渐引起关注. KCNQ1OT1在结肠癌组织中表达上调, 且其表达水平与患者总生存期和无复发生存率缩短有关, 被认为是结肠癌独立预后指标^[16]. 在膀胱癌中KCNQ1OT1发挥着原癌基因的作用, 敲低KCNQ1OT1表达可通过调控miR-145-5p/PCBP2轴抑制肿瘤细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡^[17]. 此外, KCNQ1OT1高表达还与肿瘤化疗耐药有关. 在抗奥沙利铂肝癌细胞KCNQ1OT1表达上调, 敲低KCNQ1OT1除了可通过调控miR-7-5p/ABCC1表达抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移外, 还可通过降低耐药基因MRP5、MDR1和LRP1表达降低肿瘤细胞对奥沙利铂的耐药抵抗^[18]; KCNQ1OT1可通过靶向调控miR-211-5p表达促进舌鳞状细胞癌细胞增殖并抑制顺铂诱导的细胞凋亡, 而敲低其表达可挽救肿瘤细胞的顺铂抵抗, 被认为是舌鳞状细胞癌治疗的新靶点^[19].

KCNQ1OT1在GC组织和细胞中呈现异常高表达, 且其表达水平的改变与患者不良预后密切相关, 但其在GC细胞生长和顺铂耐药抵抗中的作用并不清楚. GC的发生与发展是一个多因素、多阶段和多基因调控的复杂过程, 其中细胞周期失调导致的恶性增殖是GC发生发展的重要机制^[20]. 本研究下调KCNQ1OT1表达后发现, HGC-27细胞增殖能力明显减弱; 同时, HGC-27细胞在G0/G1期所占百分比明显升高, 在S期和G2/M期所占百分比明显减少. 结果表明, 下调KCNQ1OT1表达可通过诱导细胞周期阻滞于G0/G1期抑制GC细胞增殖. 此外, 侵袭转移是肿瘤发生发展的重要特征^[21], 而上皮间质转化是上皮来源肿瘤细胞获得侵袭能力的重要环节, 与GC细胞浸润和转移密切相关^[22-23]. 本研究发现, 下调KCNQ1OT1表达还可使HGC-27细胞中上皮标志

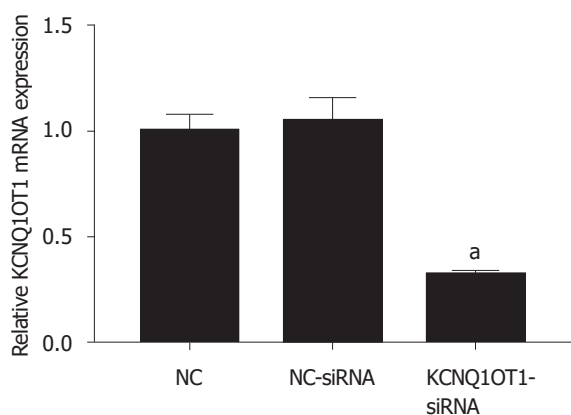


图 1 各组细胞中长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1表达水平的比较. 与对照组或NC-siRNA组比较, $^aP<0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1.

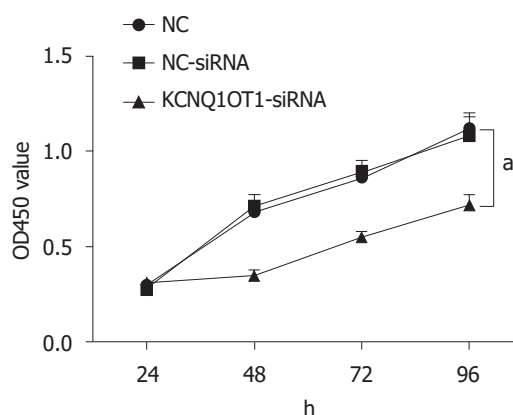


图 2 各组细胞增殖活力的比较. 与对照组或NC-siRNA组比较, $^aP<0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1; OD: 吸光度.

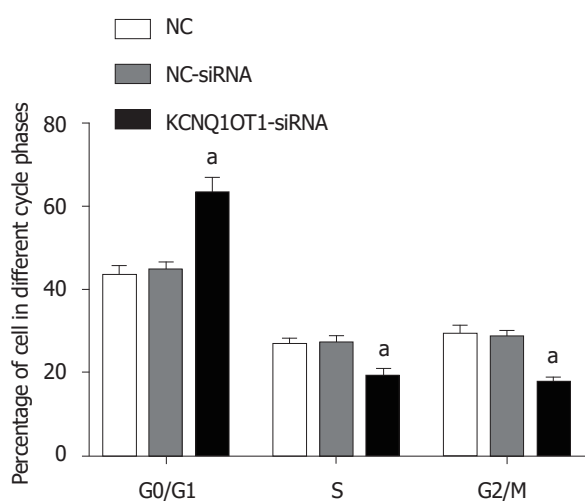


图 3 各组细胞周期分布比较. 与对照组或NC-siRNA组比较, $^aP<0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1.

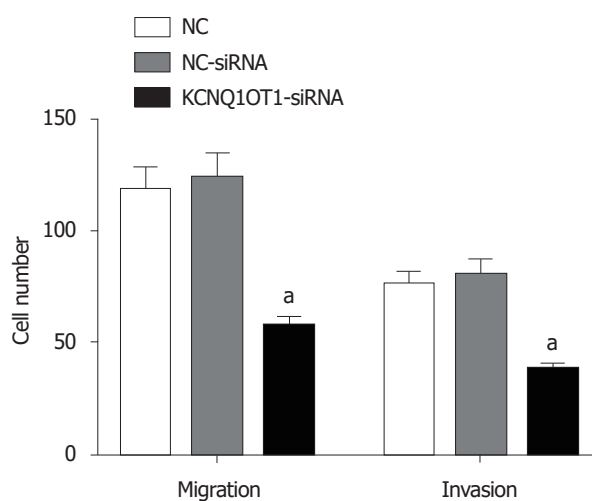


图 4 各组中侵袭数目和迁移数目的比较. 与对照组或NC-siRNA组比较, $^aP<0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1; Migration: 细胞迁移数量; Invasion: 细胞侵袭数量.

物E-cadherin蛋白表达升高, 而间质标志物N-cadherin和Vimentin蛋白表达降低, HGC-27细胞侵袭和迁移能力减弱. 结果表明, 下调KCNQ1OT1表达可通过抑制GC细胞上皮间质转化抑制癌细胞侵袭和迁移. 提示, KCNQ1OT1可通过调控细胞增殖、侵袭和迁移在GC发生发展过程中发挥着重要的促癌作用. 顺铂是GC化疗是常用药物之一, 但化疗过程中易产生耐药; 而靶向调控基因表达可增强顺铂对细胞的敏感性, 降低其耐药抵抗, 有望成为GC化疗的增敏剂^[24-25]. 本研究以靶向干扰KCNQ1OT1表达后发现, 顺铂IC₅₀值显著降低, P-gp蛋白水平降低, MRP1蛋白水平升高, 说明下调KCNQ1OT1表达可提高顺铂对GC细胞的敏感性. 提示, KCNQ1OT1在GC化疗耐药过程中发挥着重要作用, 而靶向干扰KCNQ1OT1表达可能是改善GC化疗耐药的重要策略.

综上所述, 下调KCNQ1OT1表达可抑制HGC-27细

胞增殖、侵袭、迁移并增强细胞对顺铂的敏感性. 本研究初步揭示了KCNQ1OT1在GC中的作用, 其具体的作用机制还需进一步深入探讨.

文章亮点

实验背景

胃癌(gastric cancer, GC)是临床常见的恶性肿瘤, 其发病率与死亡率逐年上升, 目前关于GC发生及转移的分子机制尚未阐明, 因而探寻转移相关基因对揭示GC发生及发展的分子机制具有重要意义.

实验动机

临床主要采用手术结合放化疗的方式进行治疗, 但患者极易产生耐药性, 因而探究GC细胞耐药性机制有助于提高治疗效果及改善患者预后.

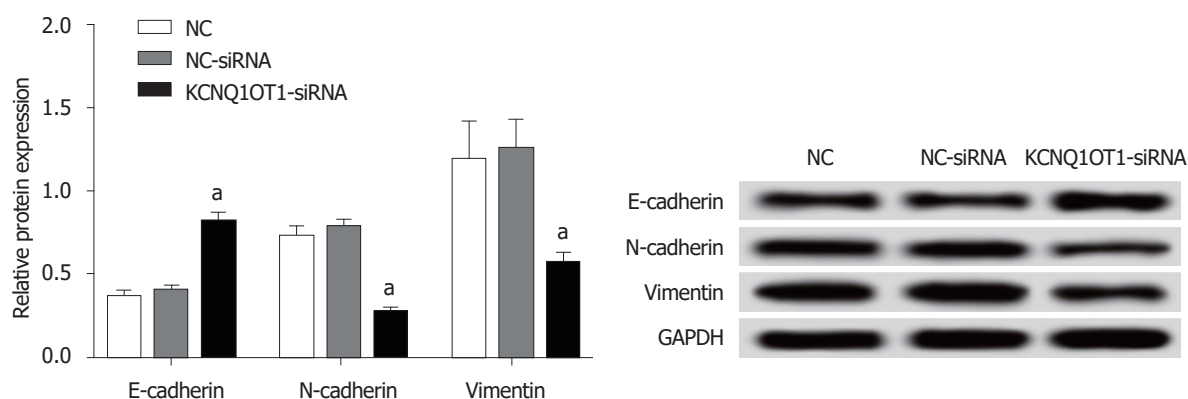


图 5 免疫印迹法检测上皮型钙黏蛋白、神经型钙黏蛋白和波形蛋白表达. 与对照组或NC-siRNA组比较, ^a $P < 0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1; E-cadherin: 上皮型钙黏蛋白; N-cadherin: 神经型钙黏蛋白; Vimentin: 波形蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

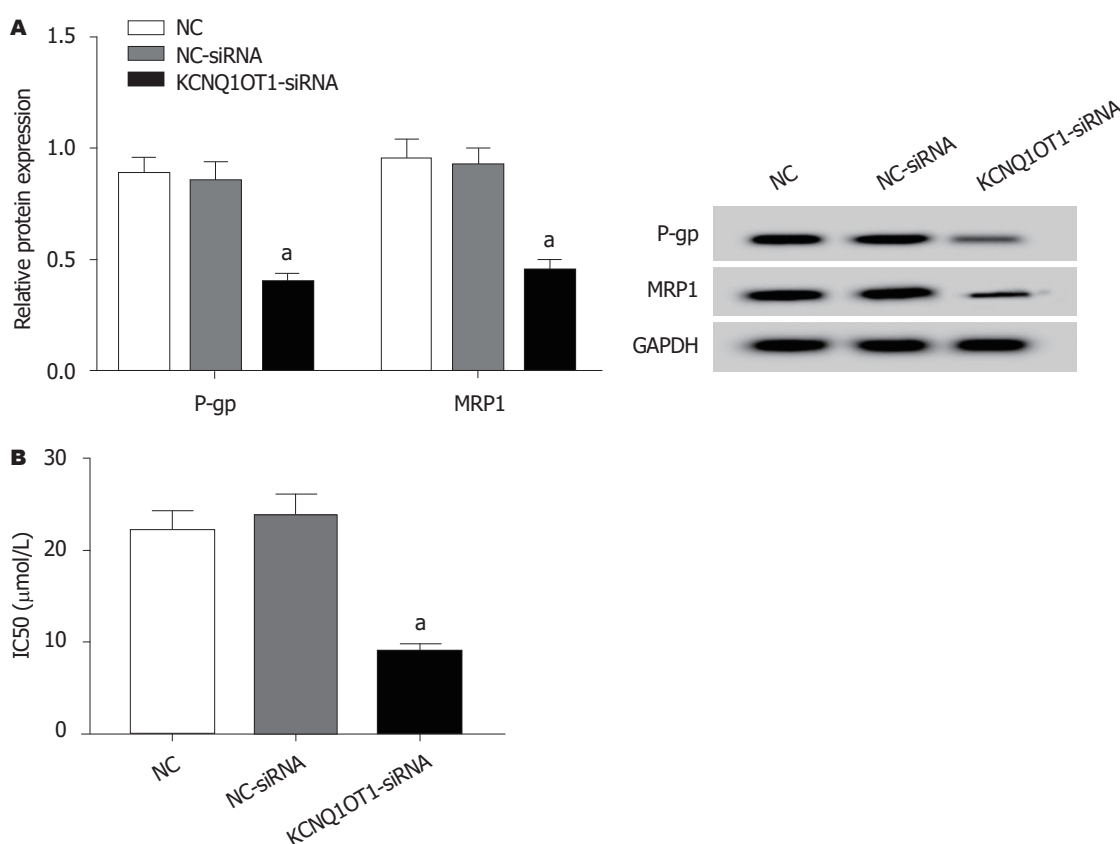


图 6 下调长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1表达对胃癌HGC-27细胞顺铂耐药性的影响. A: Western Blot检测P-糖蛋白、多药耐药关联蛋白1的表达; B: 各组细胞的半数抑制浓度比较. 与对照组比较, ^a $P < 0.05$. KCNQ1OT1: 长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1; P-gp: P-糖蛋白; MRP1: 多药耐药关联蛋白1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; IC50: 半数抑制浓度.

实验目标

探讨下调长链非编码RNA KCNQ1重叠转录物1(KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1, KCNQ1OT1)表达对GC细胞增殖、迁移及侵袭的影响及分子机制, 并探讨细胞对顺铂的敏感性.

实验方法

采用实时荧光定量聚合酶链式反应方法检测GC细胞

中KCNQ1OT1的表达, MTT检测细胞增殖, Transwell小室实验检测细胞迁移及侵袭, Western blot法检测细胞增殖、迁移及侵袭相关蛋白表达. 检测IC50值及耐药相关蛋白表达从而探究KCNQ1OT1对细胞耐药性的影响及其作用机制.

实验结果

KCNQ1OT1在GC细胞中呈高表达, 抑制KCNQ1OT1表

达可显著抑制细胞增殖、迁移及侵袭, 还可诱导细胞周期阻滞, 同时抑制KCNQ1OT1表达可增强细胞敏感性。

实验结论

抑制KCNQ1OT1表达可抑制GC细胞增殖、侵袭、迁移并增强细胞对顺铂的敏感性。

展望前景

KCNQ1OT1可能作为GC诊断及治疗的潜在靶点, 还可能为GC敏感性药物研发奠定理论基础。

4 参考文献

- Charalampakis N, Economopoulou P, Kotsantis I, Tolia M, Schizas D, Liakakos T, Elimova E, Ajani JA, Psyrri A. Medical management of gastric cancer: a 2017 update. *Cancer Med* 2018; 7: 123-133 [PMID: 29239137 DOI: 10.1002/cam4.1274]
- 杨之洵, 郑荣寿, 张思维, 曾红梅, 陈万青. 中国胃癌发病趋势及预测. *中国肿瘤* 2019; 28: 321-326 [DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.05.A001]
- 关露露, 赵青芳, 陈小兵. 胃癌多药耐药研究进展. *肿瘤研究与临床* 2017; 29: 422-425 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2017.06.018]
- Peng W, Wu J, Fan H, Lu J, Feng J. LncRNA EGOT Promotes Tumorigenesis Via Hedgehog Pathway in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res* 2019; 25: 883-887 [PMID: 29209988 DOI: 10.1007/s12253-017-0367-3]
- Wang CJ, Zhu CC, Xu J, Wang M, Zhao WY, Liu Q, Zhao G, Zhang ZZ. The lncRNA UCA1 promotes proliferation, migration, immune escape and inhibits apoptosis in gastric cancer by sponging anti-tumor miRNAs. *Mol Cancer* 2019; 18: 115 [PMID: 31272462 DOI: 10.1186/s12943-019-1032-0]
- Xu YD, Shang J, Li M, Zhang YY. LncRNA DANCR accelerates the development of multidrug resistance of gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 2794-2802 [PMID: 31002130 DOI: 10.26355/eurrev_201904_17554]
- Xian D, Zhao Y. LncRNA KCNQ1OT1 enhanced the methotrexate resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-760/PPP1R1B via the cAMP signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2019; 23: 3808-3823 [PMID: 30997746 DOI: 10.1111/jcmm.14071]
- 刘正泰, 肖方祥, 王俊杰, 杨超, 盖李乐, 屈家源, 袁成福. LncRNA KCNQ1OT1在卵巢癌组织中的表达及对卵巢癌细胞顺铂耐药的作用. *肿瘤* 2019; 39: 57-66
- Feng L, Li H, Li F, Bei S, Zhang X. LncRNA KCNQ1OT1 regulates microRNA-9-LMX1A expression and inhibits gastric cancer cell progression. *Aging (Albany NY)* 2020; 12: 707-717 [PMID: 31915311 DOI: 10.18632/aging.102651]
- Sun X, Xin Y, Wang M, Li S, Miao S, Xuan Y, Wang Y, Lu T, Liu J, Jiao W. Overexpression of long non-coding RNA KCNQ1OT1 is related to good prognosis via inhibiting cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 2018; 9: 523-531 [PMID: 29504267 DOI: 10.1111/1759-7714.12599]
- 程丽霞, 张本宏. 蛇床子素联合顺铂对人肺癌细胞的杀伤效应及机制. *检验医学* 2015; 30: 631-634 [DOI: 10.3969/

- j.issn.1673-8640.2015.06.021]
- 欧阳灿, 黄慧, 唐芳, 周征. 参与DNA损伤应答的长链非编码RNA. *生命科学研究* 2018; 22: 66-71 [DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2018.05.010]
- Chen M, Wu X, Ma W, Zhou Q, Wang X, Zhang R, Wang J, Yang X. Decreased expression of lncRNA VPS9D1-AS1 in gastric cancer and its clinical significance. *Cancer Biomark* 2017; 21: 23-28 [PMID: 29036784 DOI: 10.3233/CBM-170172]
- Zhang H, Lu W. LncRNA SNHG12 regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-320. *Mol Med Rep* 2018; 17: 2743-2749 [PMID: 29207106 DOI: 10.3892/mmr.2017.8143]
- Ding HX, Sun JF, Li RX, Wang GJ. Long non-coding RNA GACAT1 alleviates doxorubicin and vincristine resistance through a PTEN/AKT/mTOR/S6K1 regulatory pathway in gastric cancer. *RSC advances* 2019; 9: 8048-8055 [DOI: 10.1039/C8RA10030F]
- Zhang K, Yan J, Yi B, Rui Y, Hu H. High KCNQ1OT1 expression might independently predict shorter survival of colon adenocarcinoma. *Future Oncol* 2019; 15: 1085-1095 [PMID: 30932685 DOI: 10.2217/fon-2018-0499]
- Wang J, Zhang H, Situ J, Li M, Sun H. KCNQ1OT1 aggravates cell proliferation and migration in bladder cancer through modulating miR-145-5p/PCBP2 axis. *Cancer Cell Int* 2019; 19: 325 [PMID: 31827399 DOI: 10.1186/s12935-019-1039-z]
- Hu H, Yang L, Li L, Zeng C. Long non-coding RNA KCNQ1OT1 modulates oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma through miR-7-5p/ ABCC1 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503: 2400-2406 [PMID: 29966655 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.168]
- Zhang S, Ma H, Zhang D, Xie S, Wang W, Li Q, Lin Z, Wang Y. LncRNA KCNQ1OT1 regulates proliferation and cisplatin resistance in tongue cancer via miR-211-5p mediated Ezrin/Fak/Src signaling. *Cell Death Dis* 2018; 9: 742 [PMID: 29970910 DOI: 10.1038/s41419-018-0793-5]
- 尹华丽, 张杨, 甘润良. EB病毒驱动细胞周期及促进肿瘤发生的分子机制研究进展. *中华病理学杂志* 2017; 46: 659-661 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.09.018]
- 郑建洲, 何流漾, 夏蕾, 王勇, 杨明夏. 循环肿瘤细胞在肿瘤侵袭转移机制中的研究进展及应用前景. *国际遗传学杂志* 2017; 40: 384-388 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4386.2017.06.010]
- Kong F, Sun T, Kong X, Xie D, Li Z, Xie K. Krüppel-like Factor 4 Suppresses Serine/Threonine Kinase 33 Activation and Metastasis of Gastric Cancer through Reversing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 2440-2451 [PMID: 29367428 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3346]
- Zhou LH, Yang YC, Zhang RY, Wang P, Pang MH, Liang LQ. CircRNA_0023642 promotes migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22: 2297-2303 [PMID: 29762831 DOI: 10.26355/eurrev_201804_14818]
- Li M, Zhang YY, Shang J, Xu YD. LncRNA SNHG5 promotes cisplatin resistance in gastric cancer via inhibiting cell apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 4185-4191 [PMID: 31173289 DOI: 10.26355/eurrev_201905_17921]
- Peng Y, Wang L, Wu L, Zhang L, Nie G, Guo M. Methylation of SLFN11 promotes gastric cancer growth and increases gastric cancer cell resistance to cisplatin. *J Cancer* 2019; 10: 6124-6134 [PMID: 31762822 DOI: 10.7150/jca.32511]

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

