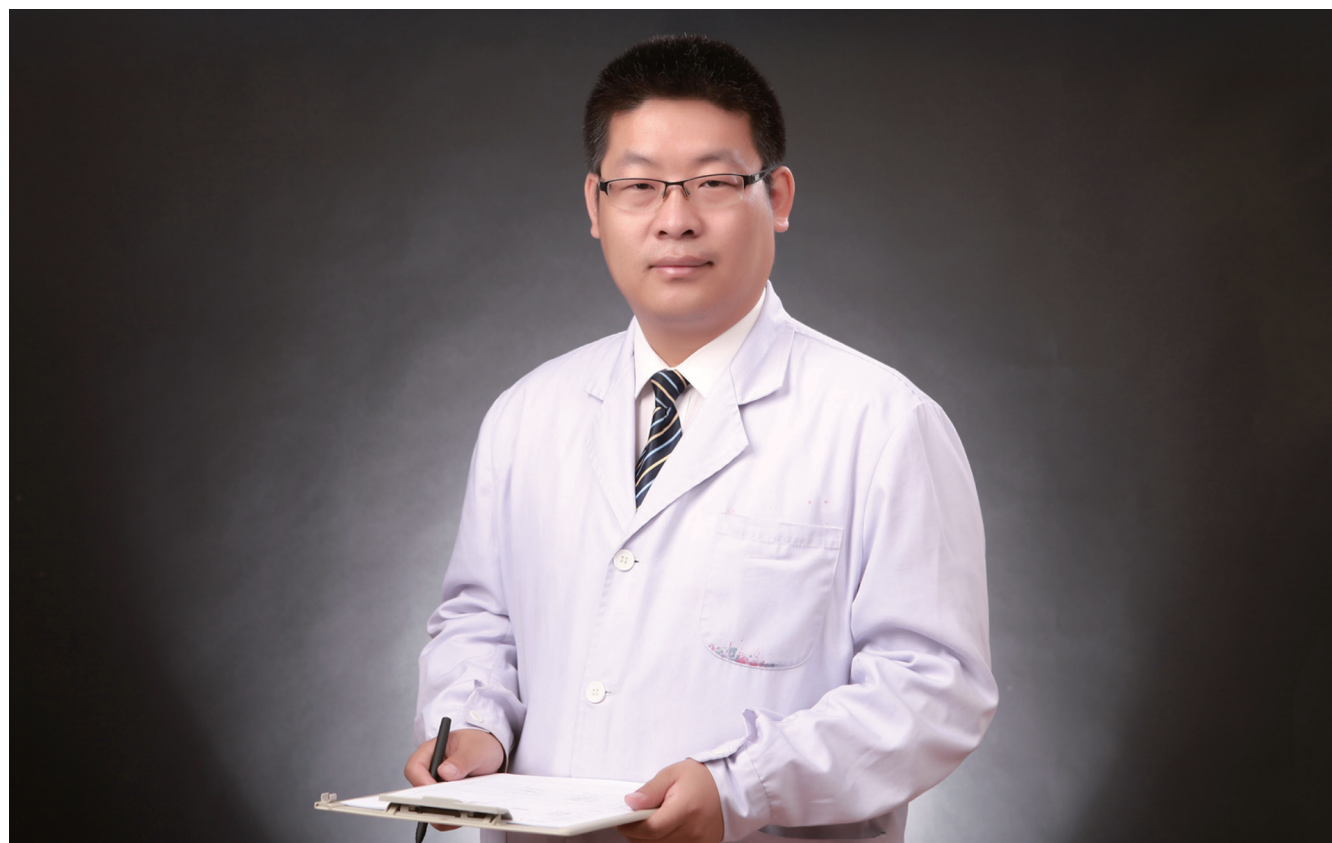


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2020 年 5 月 28 日 第 28 卷 第 10 期 (Volume 28 Number 10)



10 / 2020

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.



目次

2020年5月28日 第28卷 第10期 (总第654期)

述评

- 357 腹泻要方对肠道微生态影响的研究进展
袁榛, 舒兰, 彭昕欣, 谭周进

基础研究

- 362 miR-10b通过抑制KLF4表达诱导胃癌细胞对顺铂耐药
易弼顺, 马柏强, 李冰震, 田锋

文献综述

- 371 肝癌微波消融的研究进展
何泽华, 吴秋林, 叶行, 王开元, 黎乐群, 彭宁福

临床实践

- 378 肝细胞癌超声造影灌注参数与ANGPTL4表达水平相关性的初步研究
吴林德, 葛业红, 徐珊珊, 方苑仲

研究快报

- 384 老年慢性功能性便秘患者睡眠质量与睡眠信念及态度的相关性分析120例
盛雪芬

病例报告

- 389 新型冠状病毒肺炎合并肝硬化食管胃底静脉曲张破裂大出血1例的非内镜治疗体会
章诺贝, 陈新

消 息

- 370 《世界华人消化杂志》参考文献要求
377 《世界华人消化杂志》栏目设置
392 《世界华人消化杂志》修回稿须知

封面故事

崔清波, 主任医师, 医学博士, 博士后, 硕士研究生导师, 哈尔滨医科大学附属第二医院小儿外科支部书记兼副主任, 中华医学会小儿外科分会新生儿学组委员, 黑龙江省医师协会小儿外科分会副主任委员, 哈尔滨市医学会小儿外科分会副主任委员。基础研究: 一直围绕对抗组织纤维化进行。主持10余项科研课题(包括国家自然科学基金和中国博士后基金等), 发表第一作者论文20余篇。临床研究: 开展了小儿(新生儿)无痕手术治疗常见病及消化系统疾病, 获得黑龙江省医疗新技术奖7项, 黑龙江省卫健委科技成果一等奖, 获得中华医学会小儿外科年会优秀论文及手术奖4项, 获得专利1项。

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 2020-05-28

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 10 May 28, 2020

EDITORIAL

- 357 Influence of Tongxie formula on intestinal microorganisms
Yuan Z, Shu L, Peng XX, Tan ZJ

BASIC RESEARCH

- 362 MiR-10b induces cisplatin resistance in gastric cancer cells by inhibiting KLF4 expression
Yi BS, Ma BQ, Li BZ, Tian F

REVIEW

- 371 Microwave ablation of liver cancer: An updated review
He ZH, Wu QL, Ye H, Wang KY, Li LQ, Peng NF

CLINICAL PRACTICE

- 378 Correlation between perfusion parameters of contrast-enhanced ultrasound and ANGPTL4 expression in hepatocellular carcinoma
Wu LD, Hao YH, Xu SS, Fang YZ

RAPID COMMUNICATION

- 384 Correlation of sleep quality with sleep belief and attitude in 120 elderly patients with chronic functional constipation
Sheng XF

CASE REPORT

- 389 Non-endoscopic treatment of COVID-19 complicated with cirrhosis and esophageal gastric varices bleeding: A case report
Zhang NB, Chen X

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 28 Number 10 May 28, 2020

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Cui Qing-Bo, Chief Physician, Department of Pediatric Surgery, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, No 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang 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*

Production 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 May 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.

miR-10b通过抑制KLF4表达诱导胃癌细胞对顺铂耐药

易弼顺, 马柏强, 李冰震, 田 锋

易弼顺, 马柏强, 李冰震, 田锋, 丽水市人民医院创伤/急腹症、疝外科 浙江省丽水市 323000

易弼顺, 住院医师, 主要从事胃癌的诊断与治疗.

作者贡献分布: 此课题由易弼顺和马柏强设计; 研究过程由易弼顺与马柏强操作完成; 研究所用试剂及分析工具由易弼顺与李冰震提供; 数据分析由李冰震与田锋完成; 本论文写作由易弼顺完成.

通讯作者: 易弼顺, 住院医师, 323000, 浙江省丽水市莲都区大众街15号, 丽水市人民医院创伤/急腹症、疝外科. yibishun855@163.com

收稿日期: 2020-03-20

修回日期: 2020-04-22

接受日期: 2020-04-27

在线出版日期: 2020-05-28

MiR-10b induces cisplatin resistance in gastric cancer cells by inhibiting KLF4 expression

Bi-Shun Yi, Bai-Qiang Ma, Bing-Zhen Li, Feng Tian

Bi-Shun Yi, Bai-Qiang Ma, Bing-Zhen Li, Feng Tian, Department of Trauma, Acute Abdomen and Hernia Surgery, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Bi-Shun Yi, Resident Physician, Department of Trauma, Acute Abdomen and Hernia Surgery, The People's Hospital of Lishui, No. 15, Dazhong Street, Liandu District, Lishui 323000, Zhejiang Province, China. yibishun91@126.com

Received: 2020-03-20

Revised: 2020-04-22

Accepted: 2020-04-27

Published online: 2020-05-28

Abstract

BACKGROUND

Gastric cancer (GC) chemotherapy is prone to acquired chemotherapy resistance. MiR-10b has been found to be involved in regulating cisplatin (DDP) resistance of esophageal and nasopharyngeal carcinoma cells, but its

relationship with DDP chemotherapy sensitivity in GC is unclear.

AIM

To investigate whether miR-10b is related to DDP chemoresistance in GC cells and the underlying molecular mechanism.

METHODS

SGC-7901/DDP and MGC-803/DDP cell lines were established by repeated stimulation of SGC-7901 and MGC-803 cells with increasing concentrations of DDP. The expression levels of miR-10b and KLF4 in SGC-7901/DDP and MGC-803/DDP cells were detected. After SGC-7901 and MGC-803 cells were infected with a lentiviral vector overexpressing miR-10b, cell proliferation was detected by MTT assay, apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining, and KLF4 mRNA and protein expression was detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. In addition, these cells were further used to construct a xenograft tumor model, and after DDP chemotherapy, tumor morphology was observed macroscopically and tumor weight was measured. After co-transfection of SGC-7901 and MGC-803 cells with miR-10b and KLF4, the sensitivity of cells to DDP was detected by MTT assay.

RESULTS

Compared with SGC-7901 and MGC-803 cells, miR-10b expression levels in SGC-7901/DDP and MGC-803/DDP cells were significantly increased ($P < 0.01$), and KLF4 mRNA and protein levels were significantly decreased ($P < 0.01$). *In vitro* experiments showed that overexpression of miR-10b promoted DDP resistance in GC cells and inhibited KLF4 expression ($P < 0.01$). *In vivo*, after DDP treatment, tumor weight in the miR-10b group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Overexpression of KLF4 could partially reverse

DDP resistance of GC cells induced by overexpression of miR-10b.

CONCLUSION

MiR-10b promotes DDP resistance in GC cells by inhibiting the expression of KLF4, however, the DDP resistance induced by miR-10b overexpression can be reversed by up-regulation of KLF4.

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

Key Words: MiR-10b; KLF4; Cisplatin; Gastric cancer; Drug resistance; Apoptosis; Cell viability

Citation: Yi BS, Ma BQ, Li BZ, Tian F. MiR-10b induces cisplatin resistance in gastric cancer cells by inhibiting KLF4 expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(10): 362-370

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i10/362.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i10.362>

摘要

背景

胃癌(gastric cancer, GC)化疗容易产生获得性化疗耐药. miR-10b能参与调节食管癌和鼻咽癌细胞顺铂(cisplatin, DDP)耐药,而在GC中其与DDP化疗敏感性的关系并不清楚.

目的

探讨miR-10b是否参与GC细胞对DDP耐药,以及其中的分子机制.

方法

采用DDP反复刺激SGC-7901和MGC-803细胞并浓度递增法构建SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞.检测SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞中miR-10b和KLF4的表达.对SGC-7901和MGC-803细胞转染慢病毒携带的miR-10b过表达载体,MTT法检测miR-10b过表达对DDP敏感性的影响;Annexin V-FITC/PI染色法检测miR-10b过表达对DDP诱导的细胞凋亡的影响;RT-qPCR和Western blot检测miR-10b过表达对KLF4 mRNA和蛋白表达的影响.进一步构建异体移植瘤模型,并给予DDP化疗后,宏观观察瘤体形态并称重瘤体质量.对SGC-7901和MGC-803细胞共转染miR-10b和KLF4后,MTT法检测细胞对DDP敏感性变化.

结果

与SGC-7901和MGC-803细胞比较,SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞中miR-10b表达水平显著增加($P<0.01$),KLF4 mRNA和蛋白水平显著降低($P<0.01$).体外实验显示,过表达miR-10b促进GC细胞对DDP耐药,抑制KLF4表达($P<0.01$);在体实验显示,DDP治疗

后,miR-10b组瘤体质量显著高于NC组($P<0.01$).过表达KLF4能部分逆转过表达miR-10b诱导的GC细胞对DDP耐药.

结论

miR-10b通过抑制KLF4表达促进GC细胞DDP化疗耐药,而miR-10b高表达产生的DDP耐药性可以被上调KLF4解除.

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

关键词: miR-10b; KLF4; 顺铂; 胃癌; 耐药性; 细胞凋亡; 细胞活力

核心提要: miR-10b在胃癌(gastric cancer, GC)顺铂(cisplatin, DDP)耐药细胞中高表达.上调miR-10b能通过抑制KLF4表达来促进GC细胞对DDP耐药,而上调KLF4能部分逆转miR-10b过表达导致GC细胞DDP耐药.

文献来源: 易弼顺, 马柏强, 李冰震, 田锋. miR-10b通过抑制KLF4表达诱导胃癌细胞对顺铂耐药. *世界华人消化杂志* 2020; 28(10): 362-370

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i10/362.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i10.362>

0 引言

胃癌(gastric cancer, GC)是常见的消化系统肿瘤.早期GC症状与一些胃病(如:胃炎和胃溃疡等)类似,容易被忽视,多数患者确诊时已是中晚期GC^[1].对GC化疗主要是以铂类为主的联合化疗方案,但是药物化疗常出现耐药,导致治疗效果不佳^[2].

miRNAs可参与调控胚胎发育、肿瘤发生、转移、化疗耐药和代谢等众多生理和病理过程^[3-5].而,大多数miRNAs的生物学功能尚未完全阐明,且多数miRNAs在调节化疗耐药性中的作用以及其中涉及的分子机制未被报道.顺铂(cisplatin, DDP)是一种临床上常用的化疗药物,可对多种肿瘤(如:肺癌和食管癌等)发挥治疗效应^[6,7].尽管DDP通常在初始的治疗中表现出明显的疗效,但是由于耐药性的产生,则不可避免地导致后续化疗效果不理想.因此克服DDP的化疗抗性仍然是当前面临的重大挑战.已有研究^[8,9]报道,miR-10b能促进食管癌和鼻咽癌细胞DDP耐药.另外,多篇文献^[9-11]显示,miR-10b能通过下调Krueppel样因子4(Krueppel-like factor 4, KLF4)表达来促进多种肿瘤细胞上皮间质转化、迁移与侵袭.据报道^[12,13],miR-10b在GC组织中高表达,且其与肿瘤分期和预后不良呈正相关;而在GC中其与DDP化疗敏感性的关系并不清楚.因此本研究通过检测细胞活力、细胞凋亡以及细胞内分子水平的改变,推断

出GC可能的DDP耐药产生机制; 并试图探究miR-10b与KLF4的相互作用在GC细胞对DDP耐药性的影响, 为临床治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料 GC细胞SGC-7901和MGC-803(上海雅吉生物科技有限公司). DDP和MTT试剂盒(Sigma, 美国); 青霉素-链霉素混合溶液、RPMI-1640培养基(Thermo Fisher Scientific, 美国); ECL试剂(Millipore, 美国); BCA蛋白测定试剂盒和Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 中国)KLF4抗体和II抗(Abcam, 美国); MiRNeasy mini试剂盒、miScript II RT试剂盒和miScript SYBR Green PCR试剂盒(Qiagen, 德国). 酶标仪(Bio-Rad, 美国); 流式细胞仪(Bio-Rad, 美国); ABI StepOne TM实时PCR系统(Applied Biosystems, 美国).

1.2 方法

1.2.1 GC的DDP耐药细胞系构建: 以SGC-7901和MGC-803为亲本细胞, 诱导DDP耐药细胞. 首先用MTT法测定DDP对GC亲本细胞的半数抑制浓度为7.5 $\mu\text{mol/L}$ 和8.4 $\mu\text{mol/L}$. 首次加药浓度为2 $\mu\text{mol/L}$, 每48 h换液一次, 并反复加入同种浓度DDP, 待细胞在含DDP浓度的培养基中稳定生长时, 再按照2、3、5、8、12和16 $\mu\text{mol/L}$ DDP浓度递增方法, 直到细胞可在16 $\mu\text{mol/L}$ 的DDP浓度中稳定生长, 至此建立SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞. 在后续实验前, SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞在无DDP条件下培养2 wk.

1.2.2 细胞培养: SGC-7901、MGC-803、SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞培养于RPMI-1640培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO_2 的恒温箱中培养, 培养基中添加10% FBS及青霉素-链霉素混合溶液(含青霉素、链霉素各100 U/mL). 培养基每周更换2-3次, 用0.25%的胰蛋白酶消化传代, 传代比1:4.

1.2.3 慢病毒感染: miR-10b过表达的慢病毒载体(lentivirus-miR-10b, miR-10b)、阴性对照lentivirus-miR-NC(NC)、lentivirus-KLF4(KLF4)以及慢病毒空载体lentivirus-Vector(Vector)由广州锐博生物科技公司合成, 其中NC为乱码序列, 与人已知的miRNAs序列无同源性, 作为miR-10b的阴性对照; Vector作为KLF4的阴性对照.

分别将SGC-7901和MGC-803细胞以 2×10^4 细胞/孔接种在24孔板上, 然后10 MOI miR-10b或NC感染SGC-7901和MGC-803细胞48 h, 构建miR-10b组和NC组.

取miR-10b组或NC组的细胞, 再分别感染10 MOI Vector或KLF4 48 h, 构建NC+Vector组、miR-10b+Vector组和miR-10b+KLF4组.

1.2.4 MTT法检测细胞活力: 分别将SGC-7901、MGC-803、SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞和已经病毒感染的细胞以 1×10^4 个细胞/孔接种在96孔板上, 然后采用不同浓度(0、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$)DDP处理24 h. 吸除培养基后, 然后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下与100 μL 5 mg/mL MTT一起孵育3 h, 弃孔内上清液. 随后, 在室温下加入400 μL DMSO并摇动15 min. 通过酶标仪读取590 nm处各孔吸光度.

1.2.5 细胞凋亡分析: 分别取已感染的细胞, 以 2×10^4 个细胞/孔接种在24孔板上, 然后采用20 $\mu\text{mol/L}$ DDP处理24 h. 然后收集细胞, 按照Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤, 用碘化丙啶(propidium iodide, PI)和膜联蛋白V(annexin V)-FITC对细胞共染色. 通过流式细胞仪分选计数凋亡细胞.

1.2.6 RT-qPCR分析: 对于miR-10b分析采用使用MiRNeasy mini试剂盒按照说明书进行分析. 对于KLF4 mRNA检测, 采用TRIzol试剂盒提取总RNA, 测定RNA浓度后, 将(1 μg)的总RNA转化为cDNA. 将稀释的cDNA与含有通用引物和SYBR Green染料的miScript SYBR Green PCR Kit混合, 并加入含有冻干引物于PCR板的孔中.

miR-10b的正向引物为5'-ACATCATACCCTGTAGAACCGAA-3', 反向引物为5'-GATTGGATGTTCTCCACAGTCTC-3'; KLF4的正向引物为5'-CGAACCCACACAGGTGAGAA-3', 反向引物为5'-TACGGTAGTGCCTGGTCAGTTC-3'; U6的正向引物为5'-GCTTCGGCACATATACTAAAT-3', 反向引物为5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3'; GAPDH的正向引物为5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3', 反向引物为5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'. 用ABI StepOne TM实时PCR系统进行RT-qPCR检测, 并测定的Ct值, miR-10b以U6为内参, KLF4以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析基因的相对表达量.

1.2.7 蛋白质免疫印迹: 细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种在6孔培养皿中, 培养24 h后, 用1 mL PBS/孔洗涤细胞, 并通过胰蛋白酶消化收集细胞. 在冰上, 将细胞在RIPA裂解缓冲液中孵育30 min, 然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $1.2 \times 10^5 \text{ g}$ 离心30 min收集总蛋白. 使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度. 随后, 取50 μg 总蛋白使用8%-15%十二烷基SDS-PAGE凝胶电泳, 并转移到PVDF膜上. 将膜用含5%脱脂奶粉的TBST中封闭2 h, 并孵育I抗(KLF4抗体, 1:2000稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 洗涤膜3次, 并与II抗一起温育, 洗涤膜3次后用ECL试剂显影. 用凝胶成像设备对膜进行成像, 并用Image J软件进行半定量分析.

1.2.8 异种移植肿瘤模型: 6周龄SPF级雄性裸鼠(18-21 g)

购自温州医科大学实验动物中心[SCXK(浙)2015-0001], 饲养于温州医科大学实验动物中心SPF级动物房[SYXK(浙)2018-0017]。12只小鼠随机分成两组, 每组6只, 分别为阴性对照(NC)组和miR-10b过表达组。将NC组或miR-10b组的SGC-7901细胞(3×10^6 个细胞)重悬于100 μ L培养基中, 并以体积比1:1的比例与基质胶混合, 然后皮下注射到每只小鼠的右腹皮下。在第2周末, 观察小鼠成瘤情况, 其中miR-10b组有一只小鼠未成瘤, 剔除本研究。第3周起, 每日腹腔注射5 mg/kg(体重)DDP 1次, 持续4 wk。在第6周末, 用断颈法处死小鼠, 解剖并取出肿瘤测量称重。

统计学处理 数据表示为mean \pm SD。使用Graphpad Prism 7.0软件对数据进行分析。两组数据的比较行双尾 t 检验, 多组数据的两两比较行单因素方差分析后Bonferroni检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GC的DDP耐药细胞鉴定 MTT结果显示(图1), 不同浓度DDP处理后, 与SGC-7901或MGC-803细胞比较, SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞的细胞活力降低较慢($P < 0.01$)。以上结果表明构建的SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞株具有DDP耐药性。

2.2 GC的DDP耐药细胞中miR-10b表达增加 图2结果显示, 与SGC-7901或MGC-803细胞比较, SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞中miR-10b的表达显著增加($P < 0.01$)。提示, miR-10b可能是GC细胞产生耐药性的重要分子。

2.3 过表达miR-10b导致GC细胞对DDP耐药 对GC细胞进行慢病毒感染miR-10b或miR-NC, 结果如图3所示, 与NC组相比, miR-10b组的SGC-7901细胞(图3A)和MGC-803(图3B)中miR-10b表达显著增加($P < 0.01$)。结果表明, 过表达miR-10b的细胞构建成功。对已过表达miR-10b的GC细胞进行不同浓度的DDP处理, 再进行细胞活力检测, 结果发现, 与NC组比较, miR-10b组的SGC-7901细胞(图3C)和MGC-803(图3D)细胞活力显著增加($P < 0.01$)。随后, 本研究检测过表达miR-10b对20 μ mol/L DDP诱导的凋亡的影响, 结果发现, 与NC+20 μ mol/L DDP组比较, miR-10b+20 μ mol/L DDP组的SGC-7901细胞(图3E、F)和MGC-803(图3E、G)细胞凋亡比例显著降低($P < 0.01$)。

2.4 过表达miR-10b抑制体内DDP化疗效果 用NC组或miR-10b组的SGC-7901细胞构建异位GC移植瘤模型, 并使用DDP进行化疗。结果显示, 与NC+DDP组相比, miR-10b+DDP组SGC-7901细胞形成的肿瘤明显变大(图4A), 肿瘤质量显著增加(图4B)($P < 0.01$)。表明miR-10b高表达促进SGC-7901细胞产生DDP耐药性。

2.5 上调KLF4的表达可以抑制miR-10b介导的DDP耐药 首先分析KLF4在GC的DDP耐药细胞中表达, 结果(图5A-F)显示, 与SGC-7901或MGC-803细胞比较, SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞中KLF4的mRNA和蛋白表达均显著降低($P < 0.01$)。进一步对GC细胞过表达miR-10b, 检测KLF4的表达, 结果显示, 与NC组比较, 在miR-10b组的SGC-7901细胞中KLF4的mRNA(图5G)和蛋白(图5H、I)表达均显著降低($P < 0.01$); 在MGC-803细胞中也见类似的结果(图5J-L)。

构建miR-10b和KLF4共过表达的GC细胞, Western blot结果(图6A-D)显示, 与miR-10b+Vector组比较, miR-10b+KLF4组的SGC-7901和MGC-803细胞中KLF4蛋白表达均显著增加($P < 0.01$)。用不同浓度的DDP处理细胞, MTT结果显示, 与miR-10b+Vector组比较, miR-10b+KLF4组SGC-7901细胞(图6E)和MGC-803细胞的细胞活力显著增加($P < 0.05$)。提示, miR-10b可能通过抑制KLF4的表达导致GC细胞对DDP耐药。

3 讨论

GC常以铂类药物为基础的联合化疗方式进行化疗, 但化疗能产生耐药性^[2]。而探索GC化疗耐药产生的机制, 有助于提高今后对GC的化疗效果。

miRNA是一类内源性非编码的RNA小分子, 可通过碱基互补结合多个靶mRNA的3'UTR区调控靶基因mRNA表达, 从而在转录后调控生物学功能^[5]。miR-10b作为miRNA家族中的成员之一, 定位于2号染色体短臂3区1带1亚带的HOXD4与HOXD8基因之间^[14]。除了作用于翻译抑制外, 研究^[15]发现miR-10b结合含有末端寡嘧啶基序的一组转录物并诱导它们的翻译, 从而为miRNA家族添加新功能。miR-10b在乳腺癌中表达下调^[16], 其下调能促进乳腺癌进展; 而在GC^[12,13]、食管癌^[8]和黑色素瘤^[17]等恶性肿瘤中表达上调, 且其上调增强上述肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭^[9-11]。这体现了miR-10b在不同肿瘤中表达和功能的多样性。另外, miR-10b能促进食管癌和鼻咽癌细胞DDP耐药^[8,9], 而其在GC中与DDP化疗敏感性的关系并不清楚。本研究发现miR-10b过表达可致体外GC细胞DDP耐药性的产生, 且体内SGC-7901细胞移植瘤实验进一步确认了这一现象。KLF4在机体广泛表达, 主要表达于消化道、口腔、食管上皮、皮肤表皮、血管内皮和胸腺上皮细胞中^[18]。据报道^[19], 敲除KLF4可促进GC细胞增殖和转移, 而过表达KLF4则可抑制转移和浸润, 促进细胞凋亡。在线靶基因预测数据库显示miR-10b在KLF4的mRNA在295-301位点存在结合区域。且已有文献^[10,20]指出KLF4是miR-10b的靶基因之一。在多种肿瘤细胞中, 敲除KLF4能促进肿瘤细胞的

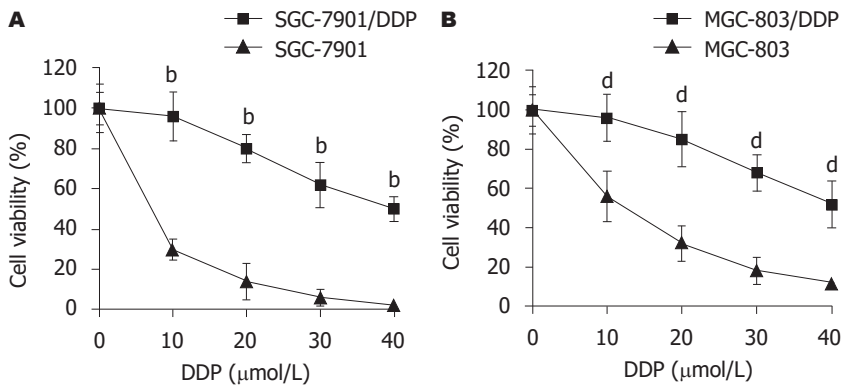


图1 SGC-7901/DDP和MGC-803/DDP细胞的顺铂耐药性鉴定. A、B: 分别用0、10、20、30和40 μmol/L DDP处理细胞24 h后, MTT法检测SGC-7901/DDP(A)和MGC-803/DDP(B)细胞的细胞活力. $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs SGC-7901细胞; $^dP < 0.01$ vs MGC-803细胞. DDP: 顺铂.

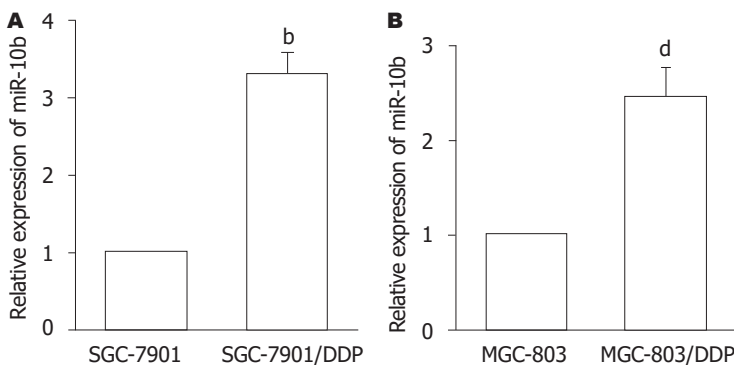


图2 miR-10b在胃癌顺铂耐药细胞中高表达. A、B: RT-qPCR检测SGC-7901/DDP(A)和MGC-803/DDP(B)细胞中miR-10b表达. $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs SGC-7901细胞; $^dP < 0.01$ vs MGC-803细胞. DDP: 顺铂.

多种化疗药物耐药, 而过表达KLF4能增强化疗药物敏感性^[21,22]. 本研究发现, DDP耐药的GC细胞(miR-10b过表达的GC细胞)中KLF4也处于低表达状态, 通过慢病毒过表达KLF4, 发现过表达KLF4能部分逆转miR-10b诱导的DDP耐药.

综上所述, 本研究表明上调miR-10b会使GC细胞对DDP产生耐药性, 并且这一作用可能是通过下调KLF4的表达实现的, 通过上调KLF4的表达能在一定程度上降低GC细胞对DDP的耐药性.

文章亮点

实验背景

胃癌(gastric cancer, GC)在化疗程序中会产生获得性化疗耐药, 最终导致化疗失败. 已有研究显示miRNAs可参与调节GC的化疗耐药, 而miRNAs数量众多, 多数miRNAs在调节GC化疗耐药中的作用尚未被鉴定.

实验动机

上调miR-10b能增加食管癌和鼻咽癌细胞对顺铂(cisplatin, DDP)的耐药性. miR-10b在GC中高表达. 而目

前尚无关于GC中miR-10b与DDP化疗敏感性的关系的报道.

实验目标

研究miR-10b与GC细胞DDP化疗敏感性的关系, 并探讨其中的机制.

实验方法

比较GC细胞与DDP耐药细胞中miR-10b的表达差异. 观察过表达miR-10b对体外和体内DDP化疗敏感性的影响. 分析过表达miR-10b对KLF4表达的影响, 并通过修复实验验证miR-10b、KLF4与DDP敏感性三者之间的内在联系.

实验结果

miR-10b在GC的DDP耐药细胞中高表达. 上调GC细胞中miR-10b表达能导致细胞对DDP敏感性降低, 并下调KLF4表达. 上调KLF4能废除过表达miR-10b对GC细胞DDP耐药的促进作用.

实验结论

上调miR-10b表达能通过负调控靶基因KLF4促进GC细

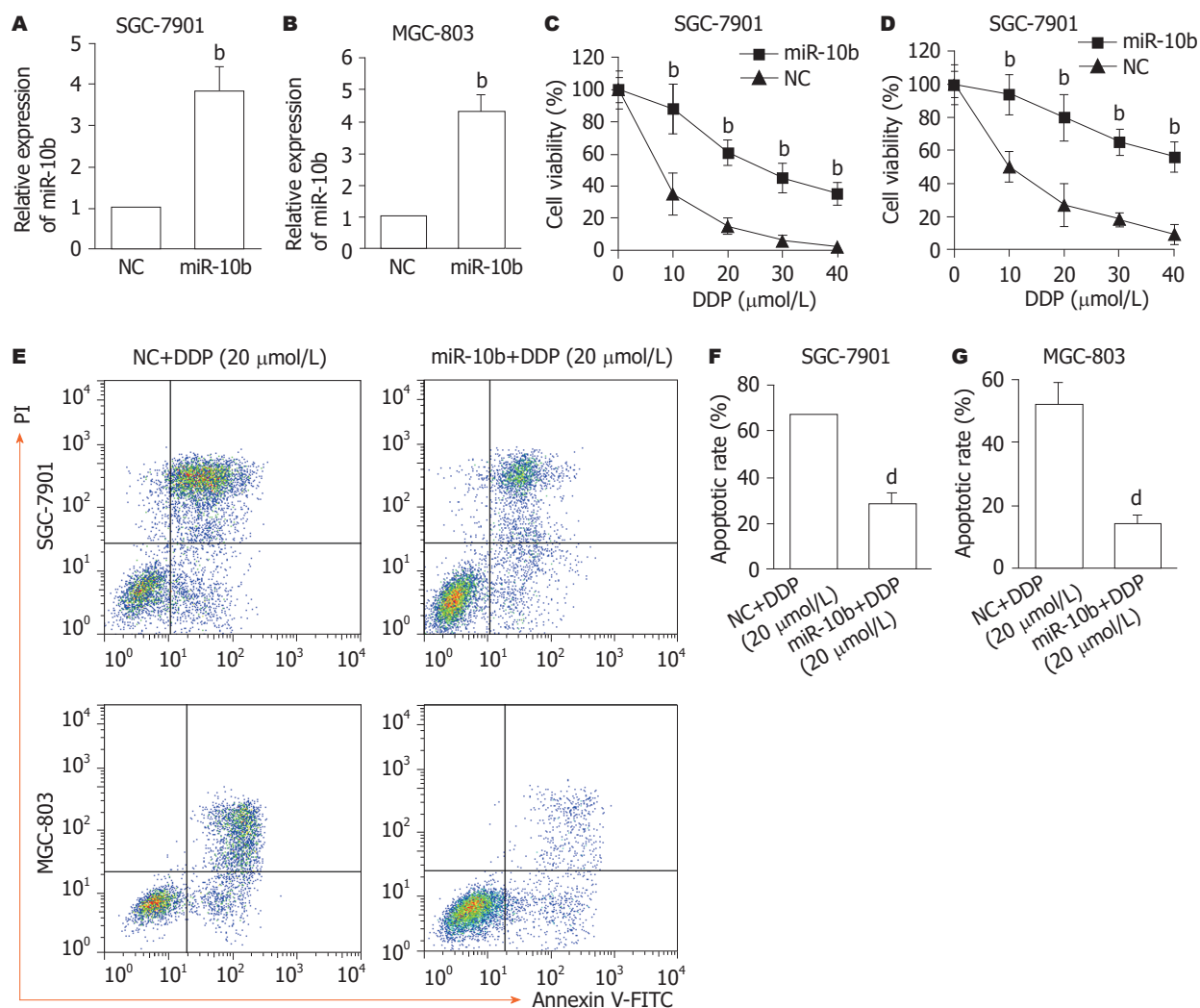


图 3 过表达miR-10b对顺铂诱导的胃癌细胞活力及凋亡的影响. A: SGC-7901细胞中miR-10b过表达效率鉴定, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC组; B: MGC-803细胞中miR-10b过表达效率鉴定, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC组; C: SGC-7901细胞转染miR-NC或miR-10b后, 接着再分别用0、10、20、30和40 $\mu\text{mol/L}$ DDP处理细胞24 h, MTT法检测细胞活力, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC组; D: MGC-803细胞转染miR-NC或miR-10b后, 接着再分别用0、10、20、30和40 $\mu\text{mol/L}$ DDP处理细胞24 h, MTT法检测细胞活力, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC组; E-G: SGC-7901和MGC-803细胞转染miR-NC或miR-10b后, 接着再用20 $\mu\text{mol/L}$ DDP处理细胞24 h, Annexin V-FITC/PI染色法检测细胞凋亡(E: 代表性流式细胞散点图; F: SGC-7901细胞凋亡统计结果, $n = 4$, $^dP < 0.01$ vs NC+DDP组; G: MGC-803细胞凋亡统计结果, $n = 4$, $^dP < 0.01$ vs NC+DDP组). DP: 顺铂; PI: 碘化丙锭; annexin V: 膜联蛋白V.

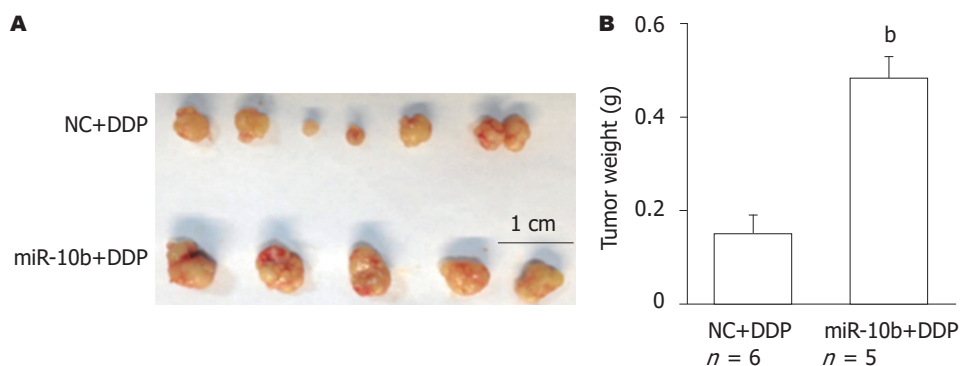


图 4 miR-10b过表达导致SGC-7901细胞移植瘤对顺铂产生耐药性. A: 瘤体的宏观图像; B: 瘤体重量的统计数据, $^bP < 0.01$ vs NC+DDP组. DDP: 顺铂.

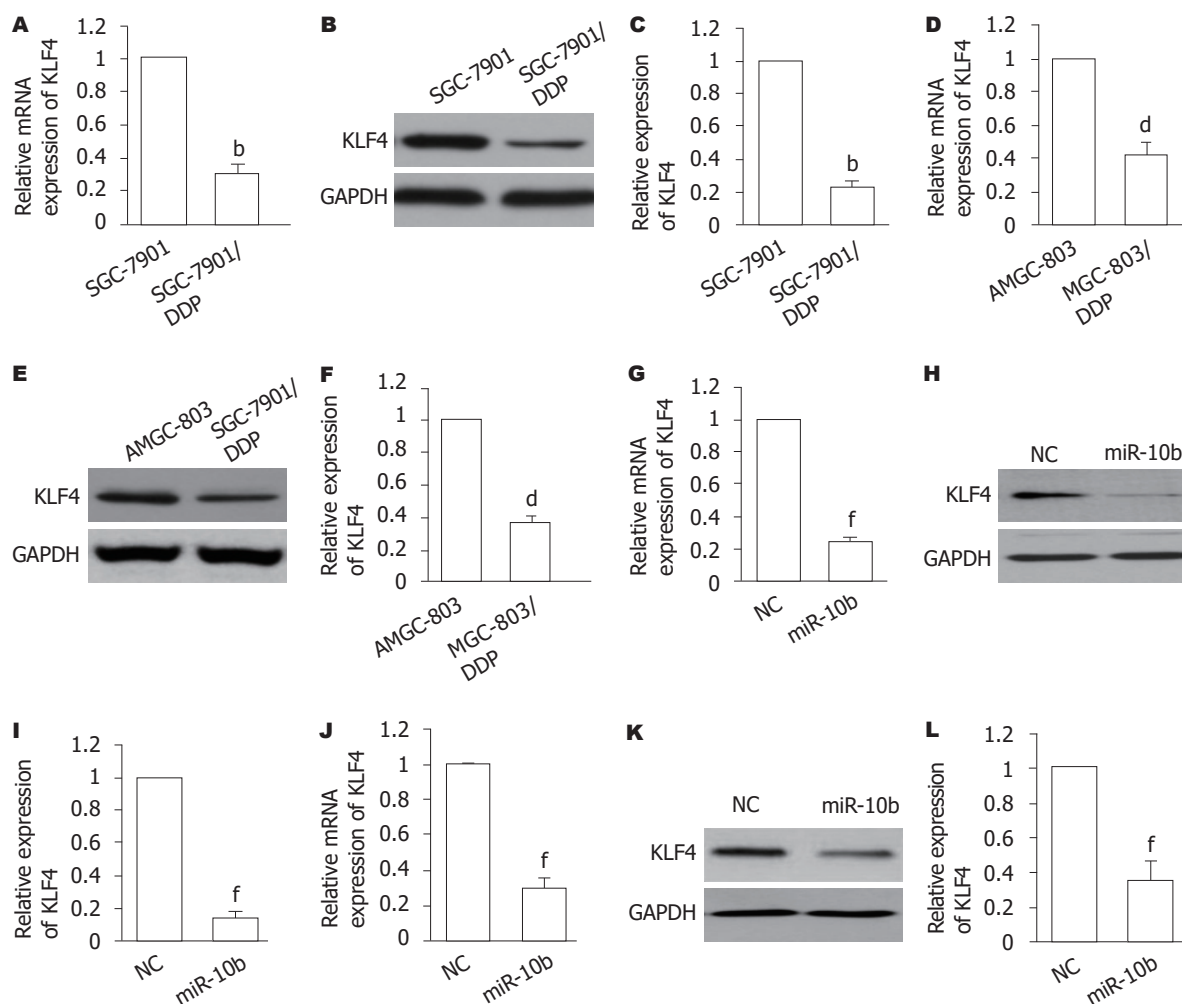
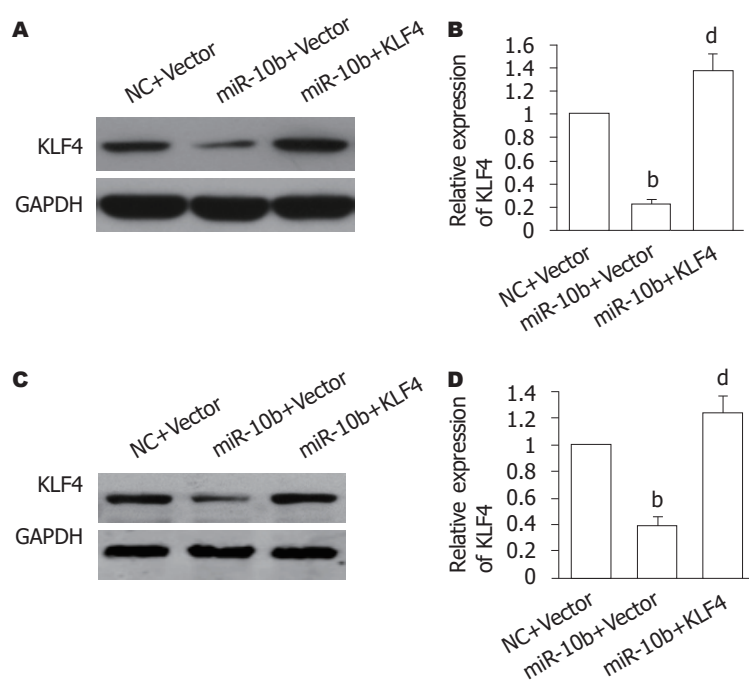


图 5 KLF4在胃癌顺铂耐药细胞中表达和miR-10b对KLF4表达的影响. A-C: SGC-7901和SGC-7901/DDP细胞中KLF4的mRNA (A)和蛋白(B和C)的表达水平, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs SGC-7901细胞; D-F: MGC-803和MGC-803/DDP细胞中KLF4的mRNA (D)和蛋白(E和F)的表达水平, $n = 4$, $^dP < 0.01$ vs MGC-803细胞; G-I: 过表达miR-10b后, SGC-7901细胞中KLF4的mRNA (G)和蛋白(H和I)的表达水平, $n = 4$, $^fP < 0.01$ vs NC组; J-L: 过表达miR-10b后, MGC-803细胞中KLF4的mRNA (J)和蛋白(K和L)的表达水平, $n = 4$, $^fP < 0.01$ vs NC组. DDP: 顺铂.



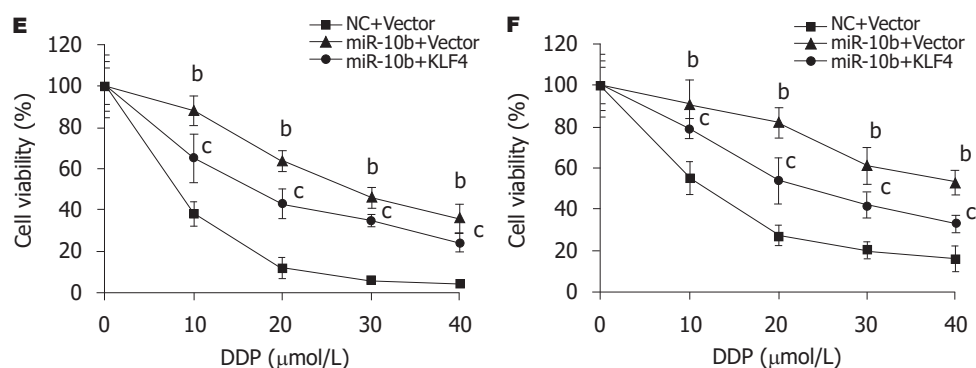


图 6 上调KLF4的表达可部分逆转miR-10b介导的顺铂耐药。A和B: 三组的SGC-7901细胞中KLF4的蛋白表达水平, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC+Vector组, $^dP < 0.01$ vs miR-10b+Vector组; C和D: 三组的MGC-803细胞中KLF4的蛋白表达水平, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC+Vector组, $^dP < 0.01$ vs miR-10b+Vector组; E: 三组的SGC-7901细胞的细胞活力, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC+Vector组; $^cP < 0.05$ vs miR-10b+Vector组; F: 三组的MGC-803细胞的细胞活力, $n = 4$, $^bP < 0.01$ vs NC+Vector组; $^cP < 0.05$ vs miR-10b+Vector组。DDP: 顺铂。

胞DDP化疗耐药。

展望前景

本研究探明了miR-10b促进GC的DDP耐药调控机制, 并为GC的DDP耐药的治疗提供了参考靶点。

4 参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7-30 [PMID: 29313949 DOI: 10.3322/caac.21442]
- Song Z, Wu Y, Yang J, Yang D, Fang X. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumour Biol* 2017; 39: 1010428317714626 [PMID: 28671042 DOI: 10.1177/1010428317714626]
- Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; 219: 346-361 [PMID: 27009502 DOI: 10.1111/apha.12681]
- Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 2015; 35: 3-11 [PMID: 25632930 DOI: 10.1055/s-0034-1397344]
- Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol* 2014; 51: 759-774 [PMID: 24045890 DOI: 10.1177/0300985813502820]
- Zhang L, Li W, Lyu X, Song Y, Mao Y, Wang S, Huang J. Adjuvant chemotherapy with paclitaxel and cisplatin in lymph node-positive thoracic esophageal squamous cell carcinoma. *Chin J Cancer Res* 2017; 29: 149-155 [PMID: 28536494 DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2017.02.08]
- Browning RJ, Reardon PJT, Parhizkar M, Pedley RB, Edirisinghe M, Knowles JC, Stride E. Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* 2017; 11: 8560-8578 [PMID: 28829568 DOI: 10.1021/acsnano.7b04092]
- Wu K, Hu Y, Yan K, Qi Y, Zhang C, Zhu D, Liu D, Zhao S. microRNA-10b confers cisplatin resistance by activating AKT/mTOR/P70S6K signaling via targeting PPAR γ in esophageal cancer. *J Cell Physiol* 2020; 235: 1247-1258 [PMID: 31267531 DOI: 10.1002/jcp.29040]
- Zhang P, Hong H, Sun X, Jiang H, Ma S, Zhao S, Zhang M, Wang Z, Jiang C, Liu H. MicroRNA-10b regulates epithelial-mesenchymal transition by modulating KLF4/Notch1/E-cadherin in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Cancer Res* 2016; 6: 141-156 [PMID: 27186392]
- Xiao H, Li H, Yu G, Xiao W, Hu J, Tang K, Zeng J, He W, Zeng G, Ye Z, Xu H. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer. *Oncol Rep* 2014; 31: 1832-1838 [PMID: 24573354 DOI: 10.3892/or.2014.3048]
- Liu Y, Li M, Zhang G, Pang Z. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Eur J Med Res* 2013; 18: 41 [PMID: 24216130 DOI: 10.1186/2047-783X-18-41]
- Obermannova R, Redova-Lojova M, Vychytilova-Faltejskova P, Grell P, Cho WC, Sachlova M, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O. Tumor Expression of miR-10b, miR-21, miR-143 and miR-145 Is Related to Clinicopathological Features of Gastric Cancer in a Central European Population. *Anticancer Res* 2018; 38: 3719-3724 [PMID: 29848733 DOI: 10.21873/anticancer.12651]
- Gao Y, Xu Z, Yuan F, Li M. Correlation of Expression Levels of Micro Ribonucleic Acid-10b (miR-10b) and Micro Ribonucleic Acid-181b (miR-181b) with Gastric Cancer and Its Diagnostic Significance. *Med Sci Monit* 2018; 24: 7988-7995 [PMID: 30403658 DOI: 10.12659/MSM.910809]
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677 [PMID: 17401365 DOI: 10.1038/ng2003]
- Lund AH. miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ* 2010; 17: 209-214 [PMID: 19461655 DOI: 10.1038/cdd.2009.58]
- Wang J, Yan Y, Zhang Z, Li Y. Role of miR-10b-5p in the prognosis of breast cancer. *PeerJ* 2019; 7: e7728 [PMID: 31579605 DOI: 10.7717/peerj.7728]
- Wang S, Wu Y, Xu Y, Tang X. miR-10b promoted melanoma progression through Wnt/ β -catenin pathway by repressing ITCH expression. *Gene* 2019; 710: 39-47 [PMID: 31129246 DOI: 10.1016/j.gene.2019.05.043]
- 易丽顺, 汤新逸, 王胜军. KLF4的生物学功能及其研究进展. *江苏大学学报(医学版)* 2014; 6: 545-548 [DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y140260]
- Zheng J, Liu Y, Qiao Y, Zhang L, Lu S. miR-103 Promotes Proliferation and Metastasis by Targeting KLF4 in Gastric Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18 [PMID: 28445396 DOI: 10.3390/ijms18050910]
- Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, Liu Z. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem* 2010; 285: 7986-7994 [PMID: 20075075 DOI: 10.1074/jbc.M109.062877]
- Yadav SS, Kumar M, Varshney A, Yadava PK. KLF4 sensitizes

the colon cancer cell HCT-15 to cisplatin by altering the expression of HMGB1 and hTERT. *Life Sci* 2019; 220: 169-176 [PMID: 30716337 DOI: 10.1016/j.lfs.2019.02.005]

22 Lund RJ, Huhtinen K, Salmi J, Rantala J, Nguyen EV, Moulder

R, Goodlett DR, Lahesmaa R, Carpén O. DNA methylation and Transcriptome Changes Associated with Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 1469 [PMID: 28473707 DOI: 10.1038/s41598-017-01624-4]

科学编辑: 王禹乔 制作编辑: 刘继红



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2020 Baishideng Publishing Group Inc.
All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,研究^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6,7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。



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

