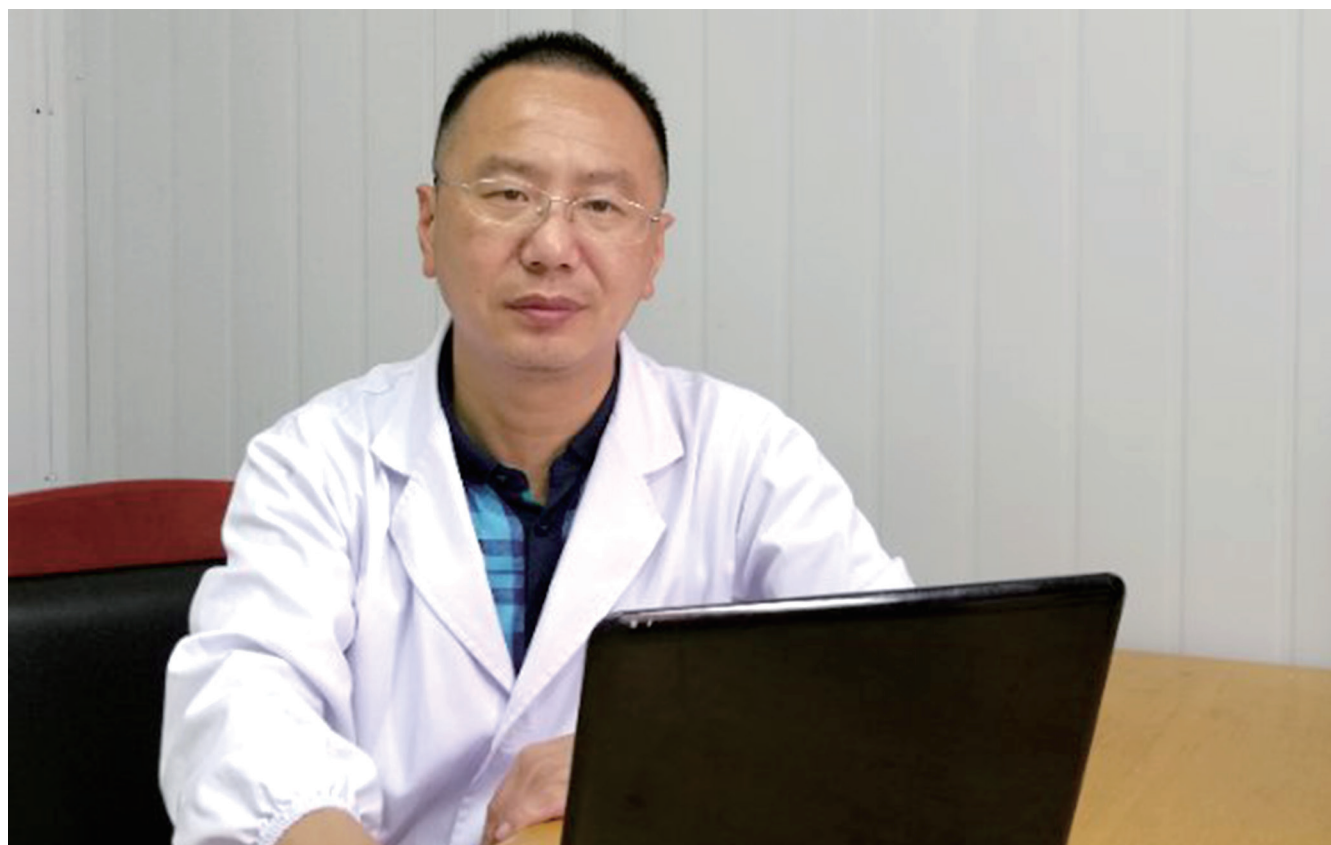


# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2020 年 9 月 8 日      第 28 卷      第 17 期      (Volume 28 Number 17)**



**17/2020**

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.



### 述评

- 819 氧化苦参碱在防治胰腺纤维化的研究前景及临床应用价值  
夏时海

### 基础研究

- 827 miR-145-3p在肝癌中的表达及其对肝癌细胞生长的调控作用  
叶小荣, 潘德标, 王理富

### 临床研究

- 834 益生菌在普通型新型冠状病毒肺炎合并腹泻患者中使用的重要性分析  
柯娥, 张海
- 839 改良型水辅助结肠镜下结直肠息肉黏膜切除术的临床应用研究  
施宏, 陈建华, 陈素玉, 黄贺, 陈敏敏, 黄剑云, 邵键伟

### 文献综述

- 847 高剂量三联疗法作为幽门螺杆菌感染根除方案的研究进展  
冯心怡, 张云, 邓彬
- 852 浅析半夏泻心汤古今应用  
沈沉
- 857 免疫检查点抑制剂耐药机制分析  
刘小军, 关泉林

### 临床实践

- 865 circ\_0001785与miR-330-5p在结直肠癌中的表达及其生物学意义  
赵卫华, 马睿, 温学红, 刘娜, 胡建功, 王新峰, 马亮

## 消 息

- 826 《肠道微生物与消化系统疾病》书讯
- 846 《世界华人消化杂志》栏目设置
- 856 《世界华人消化杂志》参考文献要求

## 封面故事

沈美龙, 医学博士, 主任医师, 泰州市中医院脾胃2科肝病科. 现为江苏省肝病免疫学委员, 泰州市肝病学会委员. 《世界华人消化病杂志》编委. 本人积极学习本专业前沿进展, 掌握肝病临床疑难杂症的治疗和处理, 在国内外期刊杂志上发表论文20余篇, 参与编辑书籍3本, 主持并完成省级以上课题2项. 研究方向是肝病基础与临床.

## 本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张晗; 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 李香; 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 2020-09-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

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

主编

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](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

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

## Contents

Volume 28 Number 17 September 8, 2020

## EDITORIAL

- 819 Prospect and clinical value of oxymatrine in prevention and treatment of pancreatic fibrosis

*Xia SH*

## BASIC RESEARCH

- 827 Expression of miR-145-3p in hepatocellular cancer and its regulatory effect on growth of hepatocellular cancer cells

*Ye XR, Pan DB, Wang LF*

## CLINICAL RESEARCH

- 834 Clinical effects of probiotics in ordinary-type COVID-19 patients with diarrhea

*Ke E, Zhang H*

- 839 Feasibility and safety of modified underwater endoscopic mucosal resection for colorectal polyps

*Shi H, Chen JH, Chen SY, Huang H, Chen MM, Huang JY, Shao JW*

## REVIEW

- 847 Progress in research of high-dose dual therapy as an eradication protocol for *Helicobacter pylori* infection

*Feng XY, Zhang Y, Deng B*

- 852 Applications of Banxiaxiexin decoction in ancient and modern times

*Shen C*

- 857 Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors

*Liu XJ, Guan QL*

## CLINICAL PRACTICE

- 865 Biological significance of expression of circ\_0001785 and miR-330-5p in colorectal cancer

*Zhao WH, Ma R, Wen XH, Liu N, Hu JG, Wang XF, Ma L*

## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 28 Number 17 September 8, 2020

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Mei-Long Shen, Medical Doctor, Chief Physician, Associate Professor, Department of Gastroenterology and Hepatology, Taizhou Traditional Chinese Medical Hospital, No. 6 Yimiao Road, Taizhou 225300, Jiangsu 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: *Han Zhang*

Production Editor: *Ji-Hong Liu*

English Language Editor: *Tian-Qi Wang*

Proof Editor: *Xiang Li*

Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** September 8, 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](mailto: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](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

#### 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-145-3p在肝癌中的表达及其对肝癌细胞生长的调控作用

叶小荣, 潘德标, 王理富

**叶小荣, 王理富**, 丽水市人民医院创伤急腹症、疝与腹壁外科 浙江省丽水市 323000

**潘德标**, 丽水市人民医院肝胆外科 浙江省丽水市 323000

叶小荣, 主治医师, 主要从事消化肿瘤方面的基础与临床研究.

**作者贡献分布:** 此课题由叶小荣与王理富设计; 研究过程由叶小荣与潘德标操作完成; 研究所用试剂由叶小荣提供; 数据分析由潘德标完成; 本文写作由叶小荣完成.

**通讯作者:** 叶小荣, 主治医师, 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、疝与腹壁外科. [yexiaorong9877@163.com](mailto:yexiaorong9877@163.com)

**收稿日期:** 2020-06-28

**修回日期:** 2020-08-04

**接受日期:** 2020-08-14

**在线出版日期:** 2020-09-08

## Expression of miR-145-3p in hepatocellular cancer and its regulatory effect on growth of hepatocellular cancer cells

Xiao-Rong Ye, De-Biao Pan, Li-Fu Wang

**Xiao-Rong Ye, Li-Fu Wang**, Department of Trauma, Acute Abdomen and Hernia Surgery, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, Zhejiang Province, China

**De-Biao Pan**, Department of hepatobiliary Surgery, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Xiao-Rong Ye, Attending Doctor, Department of Trauma, Acute Abdomen and Hernia Surgery, Lishui City People's Hospital, No. 15 Dazhong Street, Liandu District, Lishui 323000, Zhejiang Province, China. [yexiaorong9877@163.com](mailto:yexiaorong9877@163.com)

**Received:** 2020-06-28

**Revised:** 2020-08-04

**Accepted:** 2020-08-14

**Published online:** 2020-09-08

## Abstract

### BACKGROUND

miR-145-3p can play a tumor suppressive role in head and neck cancer, lung cancer, gastric cancer, and other tumors, while its expression and role in liver cancer are not clear.

### AIM

To investigate the expression of miR-145-3p in hepatocellular cancer and its regulatory role in the proliferation and apoptosis of hepatocellular cancer cells.

### METHODS

The expression levels of miR-145-3p in liver cancer tissues, paracancer tissues, liver cell lines (Hep3B, Huh-7, HepG2, and SMMC-7721), and the normal liver cell line L-02 were detected by RT-qPCR. After transfection of Hep3B cells with miR-145-3p mimic and miR-145-3p inhibitor, the cell viability, cell cycle, apoptosis, and the expression of mucin4 (MUC4) were detected by CCK-8 assay, flow cytometry, TUNEL assay, and Western blot, respectively. The target gene of miR-145-3p was identified by luciferase reporter assay. pcDNA-MUC4 was transfected into miR-145-3p mimic-transfected cells, and cell viability and apoptosis were detected by CCK-8 and TUNEL assays, respectively.

### RESULTS

miR-145-3p was lowly expressed in hepatocellular cancer tissues and cells. Overexpression of miR-145-3p inhibited cell proliferation and transition from G0/G1 phase to S phase, promoted apoptosis, and decreased MUC4 expression, while knockdown of miR-145-3p had the opposite effect. MUC4 was identified to be a target gene of miR-145-3p. Overexpression of MUC4 reversed the inhibitory effect of miR-145-3p mimic on cell survival.

## CONCLUSION

miR-145-3p is lowly expressed in hepatocellular cancer, and its expression is negatively correlated with T stage. Overexpression of miR-145-3p can inhibit the survival and growth of hepatocellular cancer cells, while knockdown of miR-145-3p can promote the survival and growth of hepatocellular cancer cells.

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

**Key Words:** miR-145-3p; Hepatocellular cancer; Mucin4; Proliferation; Apoptosis

**Citation:** Ye XR, Pan DB, Wang LF. Expression of miR-145-3p in hepatocellular cancer and its regulatory effect on growth of hepatocellular cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(17): 827-833  
**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i17/827.htm>  
**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i17.827>

## 摘要

### 背景

miR-145-3p在头颈癌、肺癌和胃癌等肿瘤可发挥抑癌的作用, 而其在肝癌中的表达和作用并不清楚。

### 目的

探讨miR-145-3p在肝癌中的表达及其对肝癌细胞的增殖与凋亡的调控作用。

### 方法

用RT-qPCR法检测肝癌组织、癌旁组织、肝细胞株(Hep3B、Huh-7、HepG2和SMC-7721)与正常肝细胞株L-02中miR-145-3p的表达水平; 将miR-145-3p mimic或miR-145-3p inhibitor转入Hep3B细胞, 用CCK-8法、流式细胞术、TUNEL法和Western blot法分别检测细胞活力、细胞周期、细胞凋亡和4型黏蛋白(mucin4, MUC4)表达。用荧光素酶报告基因实验鉴定miR-145-3p的靶基因。将pcDNA-MUC4转入已转染miR-145-3p mimic的细胞, 用CCK-8法和TUNEL法分别检测细胞活力与细胞凋亡。

### 结果

miR-145-3p在肝癌组织和细胞中呈低表达。过表达miR-145-3p能抑制细胞增殖和G0/G1期到S期转换, 促进凋亡和降低MUC4表达; 而敲减miR-145-3p则作用相反。MUC4是miR-145-3p的靶基因。过表达MUC4能逆转miR-145-3p mimic对细胞存活的抑制作用。

### 结论

miR-145-3p在肝癌低表达, 且其表达与T分期呈负相关。过表达miR-145-3p可抑制肝癌细胞存活与生长, 而敲减miR-145-3p能促进肝癌细胞存活与生长。

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

**关键词:** miR-145-3p; 肝癌; 4型黏蛋白; 增殖; 凋亡

**核心提要:** miR-145-3p在肝癌中低表达, 过表达miR-145-3p可通过靶向4型黏蛋白来抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡, 提示上调miR-145-3p表达可能是肝癌的潜在的治疗策略。

**文献来源:** 叶小荣, 潘德标, 王理富. miR-145-3p在肝癌中的表达及其对肝癌细胞生长的调控作用. *世界华人消化杂志* 2020; 28(17): 827-833

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i17/827.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i17.827>

## 0 引言

肝癌是全球第六大常见的恶性肿瘤, 且其死亡率在所有恶性肿瘤中排名前三<sup>[1]</sup>。据流行病学统计<sup>[2]</sup>, 肝癌患者主要分布在亚洲和非洲; 尤其是在我国, 由于丙型肝炎和乙型肝炎患者众多, 造成肝癌发病率一直居高不下。此外, 脂肪肝也具有进展为原发性肝癌的风险<sup>[3]</sup>。证据<sup>[4]</sup>表明, 肝癌的关键调控基因的改变与肝癌的发生、发展和预后相关。因此, 迫切需要对肝癌发生发展的关键基因进行研究。

微小RNA (microRNAs, miRNAs)是指一类大约22个核苷酸的內源性非编码小RNA, 它们可与靶基因以碱基互补配对模式一一结合, 并在转录后水平参与调节细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学功能<sup>[5]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明, 许多miRNAs在肿瘤的发生和进展中发挥着促癌或抑癌的作用。其中, miR-145-3p在头颈癌、肺癌和胃癌等肿瘤中表达下调, 且其可发挥抑癌的作用<sup>[6-8]</sup>。而miR-145-3p在肝癌中的表达和作用并不清楚, 因此, 本研究旨在调查miR-145-3p在肝癌进展中的作用, 以及其对肝癌细胞生长的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 一般材料: 胎牛血清和MEM培养基购于美国Gibco公司; miScript II RT试剂盒、miScript SYBR Green PCR试剂盒、miR-145-3p引物和U6引物均购于美国Qiagen公司; Trizol和Lipofectamine 2000试剂购自美国Invitrogen公司; miR-145-3p抑制剂(miR-145-3p inhibitor)、miR-145-3p模拟物(miR-145-3p mimic)、miR阴性对照(miR negative control, miR-NC)、pcDNA3.1-4型黏蛋白(mucin4, MUC4)和pcDNA3.1-空载体(pcDNA3.1-vector)购自广州锐博生物科技有限公司; CCK-8细胞增殖计数试剂盒、TUNEL荧光(绿色)检测试剂盒、双荧光素酶

报告基因检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; MUC4和GAPDH抗体以及二抗购自武汉菲恩生物科技有限公司。

1.1.2 组织样本收集: 本研究收集的临床样本来自于2017-09/2018-09间在我院行肿瘤切除术的25例肝癌患者(男女比例: 男20例、女5例; 年龄: 38-63岁, 平均年龄51.5岁±4.3岁; T分期: T1期5例、T2期7例、T3期8例、T4期5例; 病理分型: 肝细胞型22例、胆管细胞型2例、混合细胞型: 1例), 收集肝癌和癌旁组织样本。本实验获得了所有受试者的知情同意书以及医院伦理委员会的同意和批准。

1.1.3 细胞培养: 人肝癌细胞株Hep3B和人正常肝细胞株L-02购自于武汉普诺赛生命科技有限公司, 肝癌细胞株Huh7、SMMC-7721和HepG2为本实验室留存。所有细胞在含有10%胎牛血清的MEM培养基培养。

## 1.2 方法

1.2.1 瞬时转染: 按照说明书步骤, 使用Lipofectamine 2000转染试剂分别将miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC分别转入Hep3B细胞中, 转染剂量为20 nmol/L。转染48 h后, 通过RT-qPCR鉴定转染效率。

1.2.2 CCK-8分析: 取已转染miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC的Hep3B细胞, 种植于96孔板( $1 \times 10^4$ 个/孔), 分别培养1-4 d后, 按照CCK-8细胞增殖计数试剂盒说明书步骤, 用酶标仪检测490 nm波长处吸光度值, 并根据标准曲线计算细胞数。

1.2.3 细胞周期分析: 取已转染miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC的Hep3B细胞, 用70%乙醇溶液在4℃下固定过夜, 用PBS洗涤细胞2次后, 用RNase A (100 μg/mL)和PI (50 μg/mL)孵育细胞30 min。用FACS Canto流式细胞仪(BD Biosciences)测定DNA含量, 并通过FACS Diva Software(BD Biosciences)来评估细胞周期谱。

1.2.4 TUNEL分析: 取已转染miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC的Hep3B细胞, 继续培养48 h后, 按照TUNEL荧光检测试剂盒说明书步骤, 用携带荧光素的dUTP (绿色)和DAPI (蓝色)对其进行避光染色。通过荧光显微镜观察细胞凋亡情况。

1.2.5 Western blot分析: 取已转染miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC的Hep3B细胞, 继续培养48 h后, 用RIPA提取蛋白, 并通过常规Western blot法检测细胞MUC4蛋白的表达, 其中MUC4的稀释浓度为1:1000, 并以GAPDH为内参, 通过Image J软件量化MUC4的相对表达量。

1.2.6 RT-qPCR分析: 按照说明书步骤, 用Trizol试剂从组织或细胞系中提取的RNA, 并通过miScript II RT 试剂盒对提取的RNA逆转录为cDNA, 然后以cDNA为模

板混合miR-145-3p引物和U6引物, 使用miScript SYBR Green PCR试剂盒通过实时定量PCR仪进行RT-qPCR反应, 反应程序设置为95℃预变性5 min, 然后进行40个循环(95℃ 5 s, 60℃ 30 s)。引物序列: miR-145-3p (正向引物: 5'-GCGTCCAGTTTCCAGGA-3', 反向引物: 5'-TGGTGTCTGTGGAGTCG-3'); U6(正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', 反向引物: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTGTC-3'); MUC4 (正向引物: 5'-GCCCCAAGCTACAGTGTGACTCA-3, 反向引物: 5'-ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT-3'); GAPDH (正向引物: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3', 反向引物: 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3')。并以U6作为miR-145-3p的内参, 以GAPDH作为MUC4的内参, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因分析: 将含有miR-145-3p假定结合位点的MUC4野生型或突变型的3'非翻译区(UTR)克隆到psiCHECK-2载体上。将构建的质粒转入已转染miR-145-3p mimic、miR-145-3p inhibitor或miR-NC的Hep3B细胞中。48 h后, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书使用Dual-Luciferase Reporter系统评估细胞裂解物中的荧光素酶活性。

1.2.8 共转染分析: 取已转染miR-145-3p mimic的Hep3B细胞, 用Lipofectamine 2000转染试剂分别将20 nmol/L剂量的pcDNA-vector或pcDNA-MUC4分别转入细胞中。转染48 h后用Western blot鉴定转染效率。取共转成功的细胞, 继续培养48 h后, 用CCK-8法检测细胞活力, 用TUNEL染色法检测细胞凋亡。

**统计学处理** 实验数据采用mean±SD表示, 利用SPSS 17.0统计软件进行分析。两组数据比较采用t检验, 多组数据两两比较, 采用方差分析后Bonferroni检验。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 miR-145-3p在肝癌中低表达 图1A显示, 与癌旁组织比较, 肝癌组织中miR-145-3p表达水平明显降低( $P < 0.01$ ), 且随着T分期呈现递减现象。与正常肝细胞系L-02比较, 肝癌细胞系中miR-145-3p也呈低表达水平( $P < 0.01$ , 图1B)。这些结果表明miR-145-3p的表达水平与肝癌之间存在密切的关系。

2.2 过表达miR-145-3p抑制肝癌细胞增殖 图2A显示, 与miR-NC组比较, miR-145-3p inhibitor组中miR-145-3p表达水平明显降低( $P < 0.01$ ), miR-145-3p mimic组中miR-145-3p表达水平明显增加( $P < 0.01$ ), 说明成功构建了转染细胞。CCK-8细胞计数结果(图2B)显示, 与转染miR-NC的细胞比较, 敲减miR-145-3p的Hep3B细胞生长明

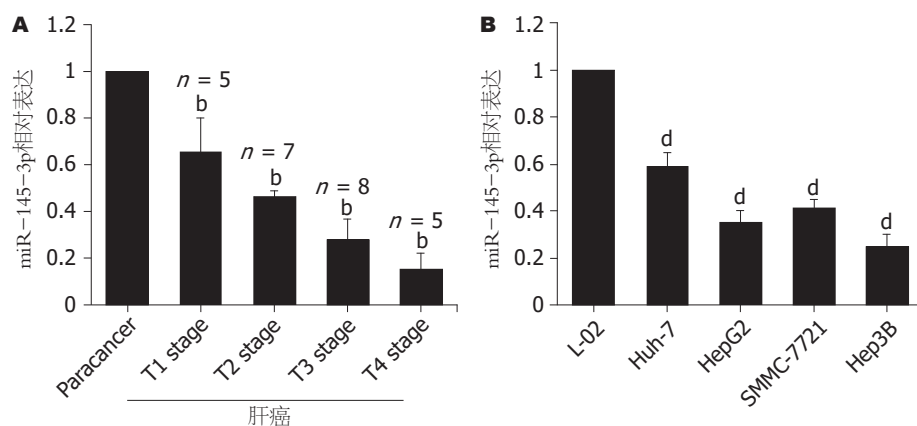


图1 miR-145-3p在肝癌组织和肝癌细胞中低表达. A: RT-qPCR检测不同T分期的肝癌组织与癌旁组织中miR-145-3p的表达水平, 与癌旁组织比较,  $^bP<0.01$ ;  $n=5-8$ ; B: RT-qPCR检测L-02细胞和不同的肝癌细胞中miR-145-3p的表达水平, 与L-02细胞比较,  $^dP<0.01$ ;  $n=3$ .

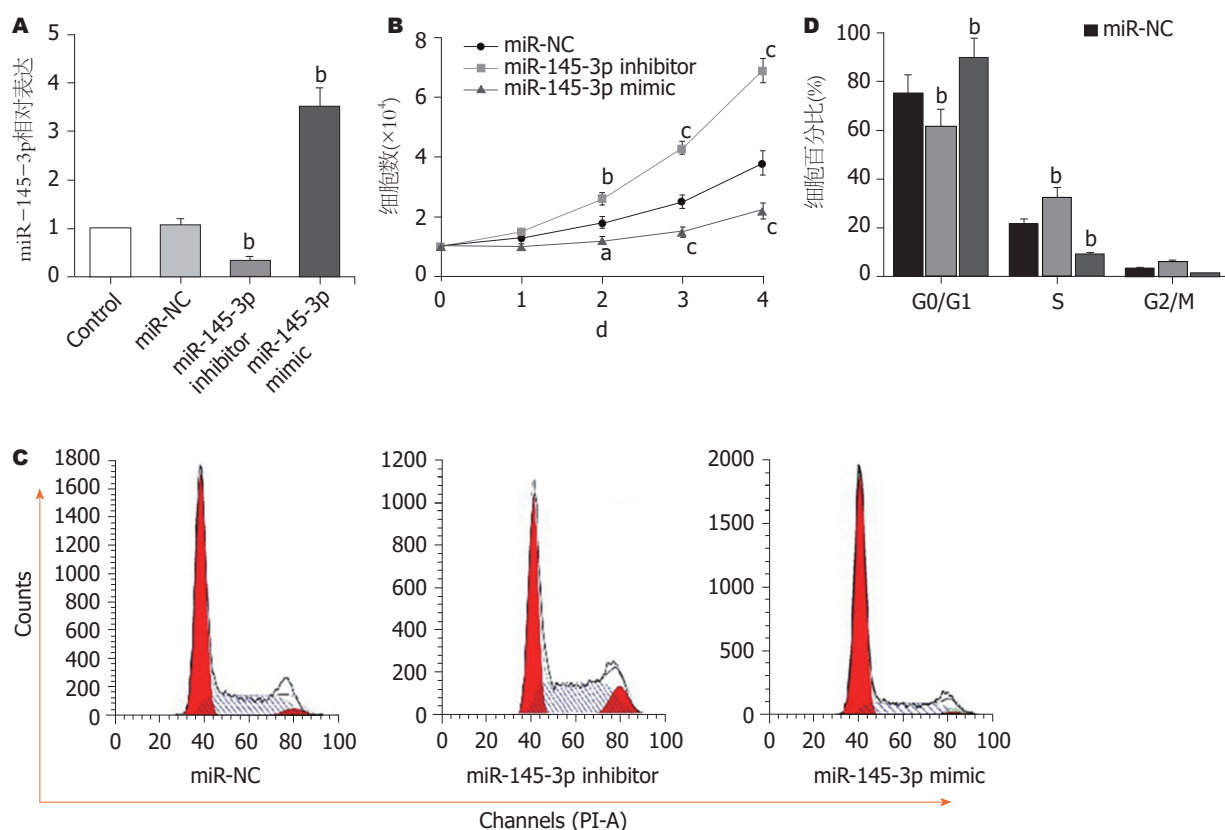


图2 过表达miR-145-3p抑制Hep3B细胞增殖. A: RT-qPCR鉴定miR-145-3p inhibitor/mimic转染效率; B: CCK-8法检测细胞生长; C和D: 流式细胞仪法检测细胞周期分布. 与miR-NC组比较,  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ,  $^cP<0.001$ ;  $n=3$ .

显加快( $P<0.01$ ), 过表达miR-145-3p的Hep3B细胞生长明显减缓( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 细胞周期检测(图2C和D)结果显示, 与转染miR-NC的细胞比较, 敲减miR-145-3p的Hep3B细胞中S期比例明显增多( $P<0.01$ )和G0/G1期比例明显减少( $P<0.01$ ), 过表达miR-145-3p的Hep3B细胞中S期比例明显减少( $P<0.01$ )和G0/G1期比例明显增多( $P<0.01$ ).

### 2.3 过表达miR-145-3p促进肝癌细胞的凋亡 TUNEL法

结果(图3)显示, 与转染miR-NC的细胞比较, 敲减miR-145-3p的Hep3B细胞中TUNEL阳性细胞比例明显减少( $P<0.01$ ), 过表达miR-145-3p的Hep3B细胞中TUNEL阳性细胞比例明显增多( $P<0.01$ ).

**2.4 MUC4是miR-145-3p的靶基因** MUC4是miR-145-3p的预测靶基因之一. Western blot结果(图4A和B)显示, 在肝癌组织(图4A)和肝癌细胞系(图4B)中MUC4表达明显增加( $P<0.01$ ). 进一步检测的结果(图4C和D)显示, 与转

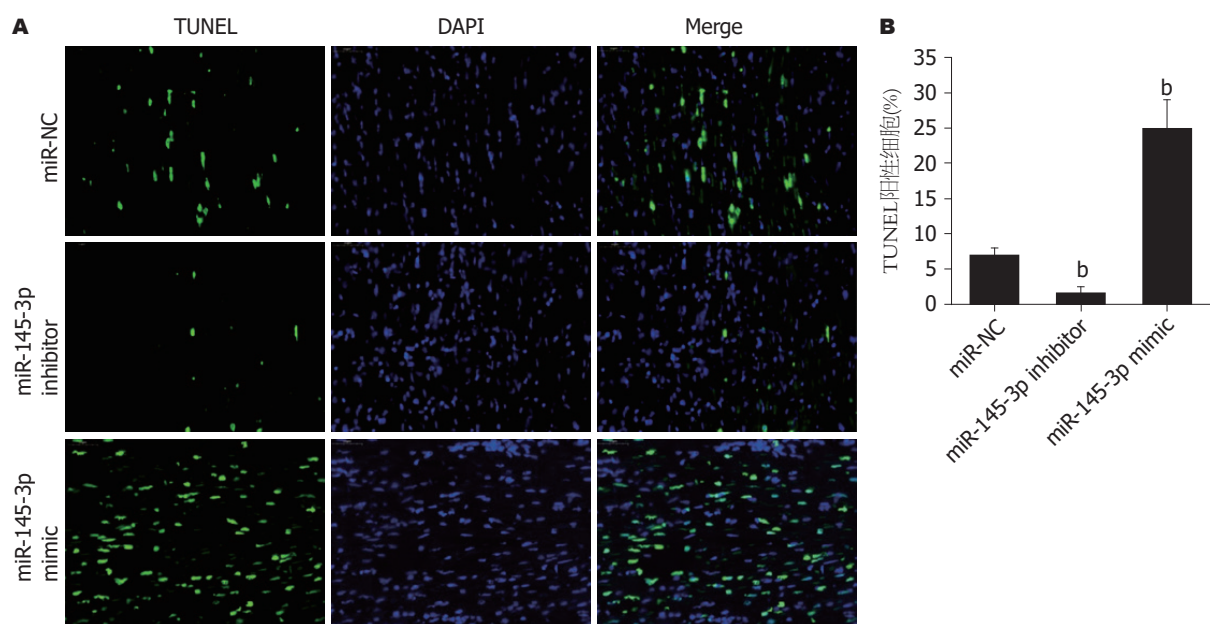


图3 过表达miR-145-3p抑制肝癌细胞凋亡. A: Hep3B细胞TUNEL染色代表图; B: TUNEL阳性细胞计数百分比的统计数据. 与miR-NC组比较,  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ .

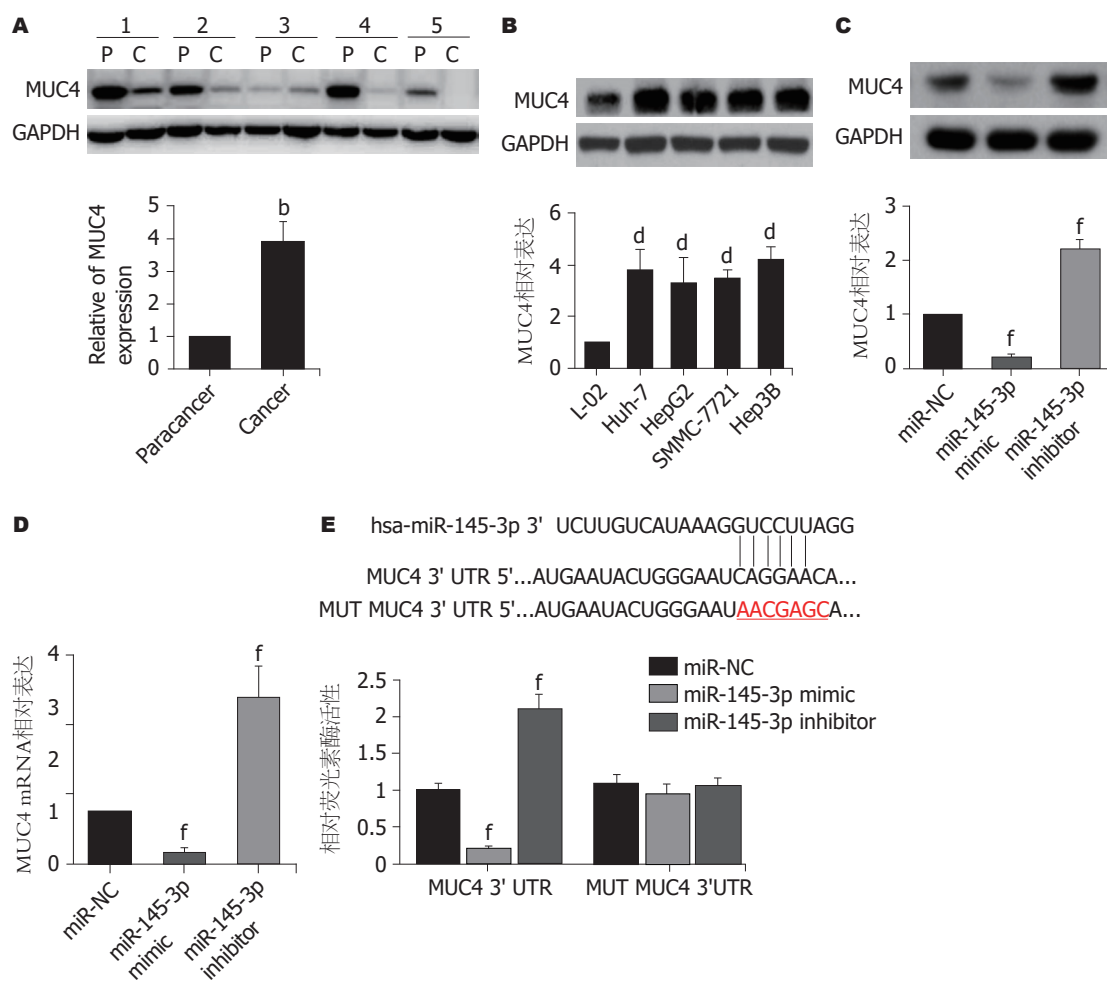


图4 miR-145-3p直接靶向4型黏蛋白. A: Western blot检测癌旁组织和肝癌组织中4型黏蛋白(mucin4, MUC4)的表达水平; P: 癌旁组织; C: 癌组织; 与癌旁组织组比较,  $P < 0.01$ ;  $n = 5$ ; B: Western blot检测L-02细胞和不同的肝癌细胞中MUC4的蛋白表达水平; 与L-02细胞比较,  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ ; C和D: 转染 miR-145-3p mimic和miR-145-3p inhibitor后, 分别用Western blot和RT-qPCR检测MUC4的蛋白(C)和mRNA(D)表达水平; E: 双荧光素酶报告基因分析荧光素酶活性. 与miR-NC组比较,  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ . MUC4: 4型黏蛋白.

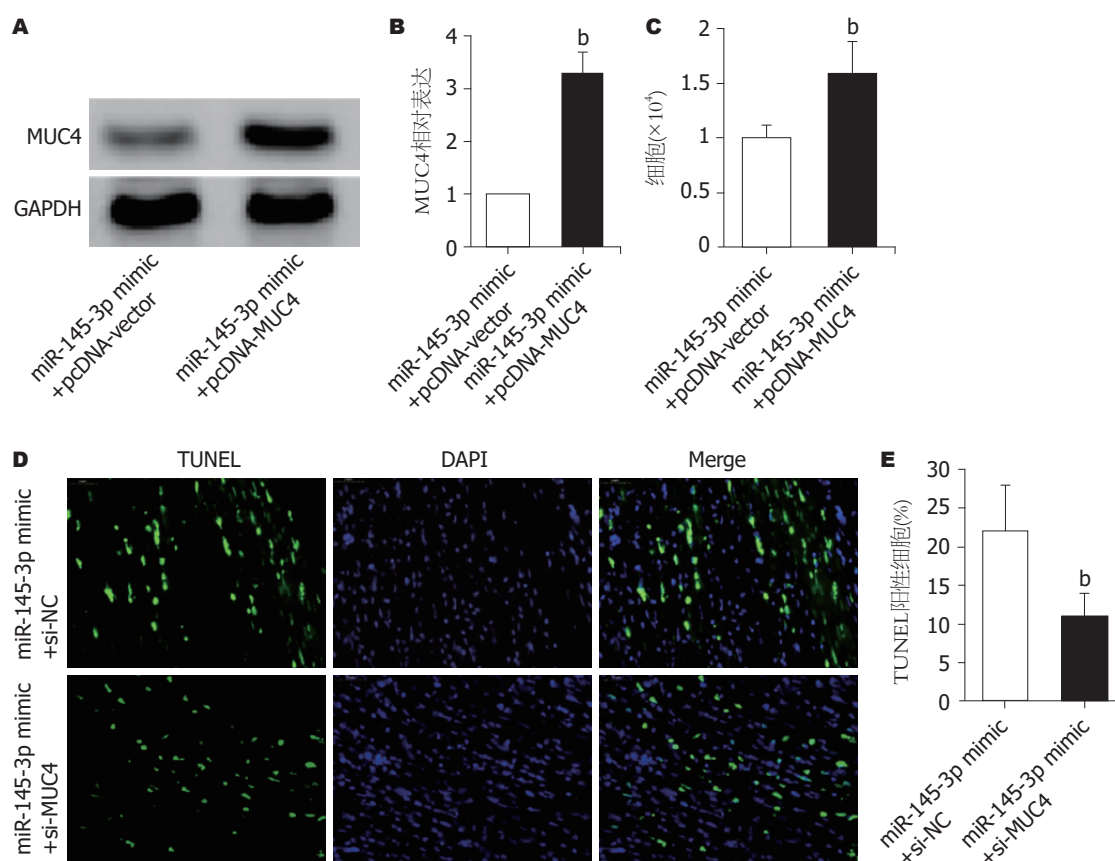


图 5 过表达4型黏蛋白逆转过表达miR-145-3p对细胞存活的抑制作用。A和B: Western blot检测4型黏蛋白的表达; C: CCK-8法检测细胞活力; D和E: 代表性TUNEL染色图和TUNEL阳性细胞计数百分比的统计数据。与miR-145-3p mimic+pcDNA-vector组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$ ;  $n=3$ 。

染miR-NC的细胞比较, 过表达miR-145-3p的Hep3B细胞中MUC4蛋白和mRNA表达显著下调( $P<0.01$ ), 敲减miR-145-3p的Hep3B细胞中MUC4蛋白和mRNA表达上调( $P<0.01$ )。双荧光素酶报告基因分析结果(图4E)显示, 在转染MUC4的野生型Hep3B细胞中, 与miR-NC组比较, miR-145-3p mimic组荧光素酶活性显著降低( $P<0.01$ ), 而miR-145-3p inhibitor组荧光素酶活性明显增加( $P<0.01$ )。

**2.5 过表达MUC4逆转过表达miR-145-3p对细胞存活的抑制作用** 图5A和B显示, miR-145-3p mimic+pcDNA-MUC4转染细胞构建成功。CCK-8细胞计数结果(图5C)显示, 与转染miR-145-3p mimic+pcDNA-vector的细胞比较, miR-145-3p mimic+pcDNA-MUC4的Hep3B细胞数明显增加( $P<0.01$ )。TUNEL染色结果(图5D和E)显示, 与转染miR-145-3p mimic+pcDNA-vector的细胞比较, miR-145-3p mimic+pcDNA-MUC4的Hep3B细胞的TUNEL阳性细胞数明显减少( $P<0.01$ )。以上结果表明: 过表达MUC4能逆转过表达miR-145-3p对细胞存活的抑制作用。

### 3 讨论

近年来, 肝癌的发病率呈高速增长趋势<sup>[1,2]</sup>, 而肝癌的治疗效果并不太理想。因此, 需要进一步研究肝癌治疗的

新策略, 而研究肝癌发生与进展机制可为肝癌的治疗策略提供参考依据。

miRNAs在包含肿瘤在内的众多疾病类型中发挥着重大作用。在肝癌中, 也已发现许多miRNAs参与调控肝癌发生与进展<sup>[9]</sup>, 但miRNAs成员众多, 依然有许多miRNAs未得到充分鉴定。miR-145-3p作为miRNAs成员之一, 已被证明其在头颈癌、肺癌和胃癌中发挥抑癌作用<sup>[6-8]</sup>。本研究结果也显示, miR-145-3p在肝癌组织和细胞中低表达, 且与T分期呈负相关关系, 提示, miR-145-3p可能参与肝癌的进展。为证明这一观点, 本研究进一步将miR-145-3p mimic或miR-145-3p inhibitor转入Hep3B细胞, 发现过表达miR-145-3p能抑制细胞增殖、周期转换和促进凋亡; 而敲减miR-145-3p呈相反作用, 这些结果说明了, miR-145-3p在肝癌中发挥抑癌作用。

miRNA通过与靶基因的3'UTR区以碱基互补配对方式结合, 来达到调节靶基因表达, 最终发挥后续生物学作用<sup>[5]</sup>。因此本研究通过靶基因预测软件targetScan 7.2筛选miR-145-3p潜在的靶基因, 结果发现miR-145-3p与MUC4的3'UTR (142-148位点)存在潜在的结合序列; 且本研究进一步通过点突变与荧光素酶法证明了MUC4是miR-145-3p的靶基因。已有研究表明, MUC4在

多种肿瘤细胞中高表达, 且其高表达能促进肿瘤细胞增殖与迁移<sup>[10,11]</sup>. 因此, 本研究进一步检测miR-145-3p对MUC4表达的影响, 结果显示miR-145-3p能负调控靶基因MUC4的表达. 另外, 本研究通过外源性引入MUC4过表达载体, 发现过表达MUC4可解除过表达miR-145-3p对细胞存活的抑制作用. 以上结果表明, miR-145-3p在肝癌中发挥抑癌作用可能与下调MUC4的表达相关.

#### 4 结论

综上, 本研究表明miR-145-3p在肝癌中表达降低, 且过表达miR-145-3p可通过靶向MUC4来抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡. 另外本研究还表明miR-145-3p可能是肝癌的潜在治疗靶点.

#### 文章亮点

#### 实验背景

miRNAs在肝癌的发生与进展中发挥着重要作用. 目前有许多参与肝癌发生与进展的miRNAs的功能并未得到鉴定. 因此, 继续筛选并鉴定参与肝癌发生与进展的miRNAs可能会为肝癌的诊断与治疗提供靶点.

#### 实验动机

miR-145-3p在头颈癌、肺癌和胃癌中发挥抑癌作用, 但在肝癌中的表达模式和作用并不清楚.

#### 实验目标

探讨miR-145-3p对肝癌细胞的增殖与凋亡的影响, 并分析其机制.

#### 实验方法

检测miR-145-3p在不同T分期的肝癌组织和不同的肝癌细胞中的表达情况; 进一步研究过表达或敲减miR-145-3p表达对肝癌细胞的增殖与凋亡的影响, 并分析其潜在的靶基因.

#### 实验结果

miR-145-3p在肝癌组织和肝癌细胞中低表达. 上调miR-145-3p能通过靶向4型黏蛋白来抑制肝癌细胞的增殖并促进凋亡.

#### 实验结论

上调miR-145-3p能抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡.

#### 展望前景

上调miR-145-3p可能是肝癌的潜在的治疗策略.

#### 5 参考文献

- Roskilly A, Rowe IA. Surveillance for hepatocellular cancer. *Clin Med (Lond)* 2018; 18: s66-s69 [PMID: 29700096 DOI: 10.7861/clinmedicine.18-2-s66]
- Sayiner M, Golabi P, Younossi ZM. Disease Burden of Hepatocellular Carcinoma: A Global Perspective. *Dig Dis Sci* 2019; 64: 910-917 [PMID: 30835028 DOI: 10.1007/s10620-019-05537-2]
- Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med* 2016; 67: 103-117 [PMID: 26473416 DOI: 10.1146/annurev-med-090514-013832]
- Rao CV, Asch AS, Yamada HY. Frequently mutated genes/pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer. *Carcinogenesis* 2017; 38: 2-11 [PMID: 27838634 DOI: 10.1093/carcin/bgw118]
- Li X, Yu X, He Y, Meng Y, Liang J, Huang L, Du H, Wang X, Liu W. Integrated Analysis of MicroRNA (miRNA) and mRNA Profiles Reveals Reduced Correlation between MicroRNA and Target Gene in Cancer. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 1972606 [PMID: 30627543 DOI: 10.1155/2018/1972606]
- Yamada Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Kikkawa N, Okato A, Idichi T, Arai T, Sugawara S, Katada K, Okamoto Y, Seki N. Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2018; 52: 166-178 [PMID: 29115582 DOI: 10.3892/ijo.2017.4190]
- Misono S, Seki N, Mizuno K, Yamada Y, Uchida A, Arai T, Kumamoto T, Sanada H, Suetsugu T, Inoue H. Dual strands of the miR-145 duplex (miR-145-5p and miR-145-3p) regulate oncogenes in lung adenocarcinoma pathogenesis. *J Hum Genet* 2018; 63: 1015-1028 [PMID: 30082847 DOI: 10.1038/s10038-018-0497-9]
- Zhang C, Zhang CD, Ma MH, Dai DQ. Three-microRNA signature identified by bioinformatics analysis predicts prognosis of gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 1206-1215 [PMID: 29568201 DOI: 10.3748/wjg.v24.i11.1206]
- Nagy Á, Lánckzy A, Menyhart O, Györfy B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci Rep* 2018; 8: 9227 [PMID: 29907753 DOI: 10.1038/s41598-018-27521-y]
- Senapati S, Gnanapragassam VS, Moniaux N, Momi N, Batra SK. Role of MUC4-NIDO domain in the MUC4-mediated metastasis of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2012; 31: 3346-3356 [PMID: 22105367 DOI: 10.1038/ncr.2011.505]
- Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 622-630 [PMID: 14744777 DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2636]

科学编辑: 张晗 制作编辑: 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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
**https://**[www.wjgnet.com](https://www.wjgnet.com)



ISSN 1009-3079

