

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 12 月 28 日 第 28 卷 第 24 期 (Volume 28 Number 24)



## 24/2020

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

- 1223 高甘油三酯血症性急性胰腺炎诊治进展  
孙昀

### 基础研究

- 1229 胃食管反流病患者CYP2C19基因启动子的遗传变异和功能分析  
王珏磊, 南寿山, 王柏清, 王超, 李朝霞, 窦广仙, 孙光斌
- 1235 下调CIC-3通过抑制细胞自噬增强结直肠癌细胞对奥沙利铂化疗敏感性  
段琮, 陈斌辉, 林义

### 临床研究

- 1243 消化道异物的内镜取出109例临床总结  
王寰, 林栋雷, 王晓枫, 屈亚威, 吴丽莎, 于鹏, 王伟岸
- 1249 新型抑酸剂沃诺拉赞与传统PPIs预防胃ESD术后迟发性出血和促进人造溃疡愈合比较的Meta分析: 2474例  
陈旋, 徐梦婷, 文剑波

### 文献综述

- 1261 幽门螺杆菌感染与胃肠道微生态的关系  
孙莹莹, 靖大道
- 1266 骶神经刺激的研究进展  
张树辉, 陈艳

### 临床实践

- 1272 预切开内镜下黏膜切除术在结直肠侧向发育型肿瘤治疗中的应用价值  
谈涛, 李蜀豫

## 消 息

- 1242 《世界华人消化杂志》栏目设置  
1265 《肠道微生物与消化系统疾病》书讯  
1271 《世界华人消化杂志》参考文献要求  
1278 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

## 封面故事

阳学风, 南华大学附属南华医院消化内科博士、主任医师、教授、博士研究生导师, 教育部学位与研究生教育评审专家, 衡阳市领军人才, 衡阳市肝病专业委员会主任委员, 《世界华人消化杂志》、《中南医学科学》编委, 《临床肝胆病杂志》审稿专家. 主持国家、省自然科学基金等课题10余项, 发表学术论文110余篇. 培养硕士、博士研究生90余名.

## 本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张晗; 组版编辑 张砚梁; 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 2020-12-28

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(Abtract 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 24 December 28, 2020

### EDITORIAL

- 1223 Progress in diagnosis and treatment of hypertriglyceridemic acute pancreatitis

*Sun Y*

### BASIC RESEARCH

- 1229 Functional genetic variations of *CYP2C19* promoter from patients with gastroesophageal reflux disease

*Wang JL, Nan SS, Wang BQ, Wang C, Li ZX, Dou GX, Sun GB*

- 1235 Down-regulation of CIC-3 enhances chemosensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by inhibiting autophagy

*Duan Q, Chen BH, Lin Y*

### CLINICAL RESEARCH

- 1243 Endoscopic management of foreign bodies in the gastrointestinal tract: A retrospective study of 109 cases

*Wang H, Lin DL, Wang XF, Qu YW, Wu LS, Yu P, Wang WA*

- 1249 Meta-analysis of vonoprazan and PPIs in preventing delayed bleeding and facilitating ulcer healing after gastric endoscopic submucosal dissection

*Chen X, Xu MT, Wen JB*

### REVIEW

- 1261 Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal microecology

*Sun YY, Jing DD*

- 1266 Progress in research of sacral nerve stimulation

*Zhang SH, Chen Y*

### CLINICAL PRACTICE

- 1272 Application value of pre-cutting endoscopic mucosal resection in treatment of colorectal laterally spreading tumors

*Tan T, Li SY*

## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 28 Number 24 December 28, 2020

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Xue-Feng Yang, PhD, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical College, University of South China, No.336 Dongfeng Road, Zhuhui District, Hengyang 421002, Hunan 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: *Yan-Liang Zhang* 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** December 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](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.



# 下调CIC-3通过抑制细胞自噬增强结直肠癌细胞对奥沙利铂化疗敏感性

段琼, 陈斌辉, 林义

段琼, 浙江中医药大学药学院 浙江省杭州市 310053

段琼, 陈斌辉, 台州恩泽医疗中心(集团)恩泽医院药剂科 浙江省台州市 317000

林义, 温岭市第一人民医院病理科 浙江省温岭市 317500

段琼, 主管药师, 主要从事肿瘤化疗方面的临床药学与基础药理研究。

**作者贡献分布:** 此课题由段琼设计; 临床样本收集由段琼与陈斌辉完成; 临床样本检测由林义完成; 细胞实验由段琼完成; 研究所用试剂由段琼提供; 数据分析由段琼与陈斌辉完成; 本论文写作由段琼完成。

**通讯作者:** 段琼, 主管药师, 317000, 浙江省台州市路桥区桐杨路东1号, 台州恩泽医疗中心(集团)恩泽医院药剂科. [duanqiongmed@163.com](mailto:duanqiongmed@163.com)

收稿日期: 2020-09-23

修回日期: 2020-11-09

接受日期: 2020-11-24

在线出版日期: 2020-12-28

## Down-regulation of CIC-3 enhances chemosensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by inhibiting autophagy

Qiong Duan, Bin-Hui Chen, Yi Lin

Qiong Duan, School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Qiong Duan, Bin-Hui Chen, Department of Pharmacy, Enze Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), Taizhou 317000, Zhejiang Province, China

Yi Lin, Department of Pathology, First People's Hospital of Wenling, Wenling 317500, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Qiong Duan, Responsible Pharmacist, Department of Pharmacy, Enze Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), No. 1 Tongyang Road East, Luqiao District, Taizhou 317000, Zhejiang Province, China. [duanqiongmed@163.com](mailto:duanqiongmed@163.com)

Received: 2020-09-23

Revised: 2020-11-09

Accepted: 2020-11-24

Published online: 2020-12-28

## Abstract

### BACKGROUND

Voltage-gated chloride channel 3 (CIC-3) can regulate the chemotherapy sensitivity of ovarian cancer, cervical cancer, and lung cancer, while its effect and mechanism in oxaliplatin therapy for colorectal cancer (CRC) are still unknown.

### AIM

To investigate the effect of CIC-3 on oxaliplatin sensitivity and the role of autophagy in CRC cells.

### METHODS

The expression of CIC-3 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3-II) in the tissues of chemotherapy resistant and sensitive CRC was detected by immunohistochemical staining. The expression levels of CIC-3 and LC3-II in HT-29 and HT-29/L-OHP cells were detected by Western blot. After transfection of HT-29 and HT-29/L-OHP cells with CIC-3 siRNA, the sensitivity of the cells to oxaliplatin was detected by CCK-8 assay, the autophagy was detected by Cyto-ID staining, and the expression levels of autophagy-related proteins Beclin1, LC3-I, LC3-II, and p62 were detected by Western blot. The HT-29 and HT-29/L-OHP cells transfected with CIC-3 siRNA were subsequently treated with the autophagy agonist rapamycin, and then the sensitivity of the cells to oxaliplatin and the expression levels of Beclin1, LC3-I, LC3-II, p62, and CIC-3 were detected by CCK-8 assay and Western blot, respectively.

## RESULTS

LC3-II and CIC-3 were highly expressed in tissues of chemo-resistant colorectal cancer and HT-29/L-OHP cells. After inhibition of CIC-3, the sensitivity of HT-29 cells and HT-29/L-OHP cells to oxaliplatin was both increased, and the autophagy level of the cells was decreased. Rapamycin reversed the sensitization of CIC-3 inhibition to oxaliplatin in colorectal cancer cells, but had no effect on the expression of CIC-3.

## CONCLUSION

Down-regulation of CIC-3 can enhance the sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin chemotherapy by inhibiting autophagy.

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

**Key Words:** CIC-3; Autophagy; Colorectal cancer; Oxaliplatin; Chemosensitivity

**Citation:** Duan Q, Chen BH, Lin Y. Down-regulation of CIC-3 enhances chemosensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by inhibiting autophagy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(24): 1235-1242

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i24/1235.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i24.1235>

## 摘要

### 背景

电压门控氯通道3(voltage-gated chloride channel 3, CIC-3)可参与调节卵巢癌、宫颈癌和肺癌的化疗敏感性的调节,而其在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的奥沙利铂化疗中的作用和机制尚不清楚。

### 目的

探究CRC细胞中CIC-3对奥沙利铂化疗敏感性的影响,以及细胞自噬在其中发挥的作用。

### 方法

用免疫组化染色观察CIC-3和微管相关蛋白1 II 轻链3(microtubule-associated protein 1 II light chain 3, LC3-II)在CRC耐药和敏感组织中的表达。用Western blot检测CIC-3和LC3-II在CRC HT-29细胞以及奥沙利铂耐药细胞(HT-29/L-OHP)中的表达。用CIC-3 siRNA分别转染HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞后, CCK-8法检测细胞对奥沙利铂的敏感性变化;用Cyto-ID染色观察自噬点形成;用Western blot检测自噬相关蛋白Beclin1、LC3-I、LC3-II和p62的表达。用自噬激动剂雷帕霉素处理已转染CIC-3 siRNA的HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞后,用CCK-8法和Western blot分别检测细胞对奥沙利铂的敏感性变化以及Beclin1、LC3-I、LC3-II、p62和CIC-3蛋白的表达。

## 结果

CRC耐药组织以及HT-29/L-OHP细胞中LC3 II 和CIC-3均呈现高表达。抑制CIC-3表达后, HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞对奥沙利铂的敏感性均增加,细胞的自噬水平降低。雷帕霉素能逆转抑制CIC-3对CRC细胞对奥沙利铂的增敏效应,但其对CIC-3的表达无影响。

## 结论

下调CIC-3可通过抑制细胞自噬来增强CRC细胞对奥沙利铂化疗的敏感性。

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

**关键词:** CIC-3; 细胞自噬; 结直肠癌; 奥沙利铂; 化疗敏感性

**核心提要:** 下调电压门控氯通道3可通过抑制细胞自噬来发挥增强结直肠癌细胞对奥沙利铂化疗的敏感性。

**文献来源:** 段琼, 陈斌辉, 林义. 下调CIC-3通过抑制细胞自噬增强结直肠癌细胞对奥沙利铂化疗敏感性. *世界华人消化杂志* 2020; 28(24): 1235-1242

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i24/1235.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i24.1235>

## 0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 尽管我国CRC发病率和死亡率低于发达国家水平<sup>[1]</sup>, 但随着经济的发展和人们饮食习惯的变更, 我国近几年CRC的发病率正以年均4%以上的速度增长<sup>[2]</sup>, 且北京、上海、广州等发达地区的CRC发病率已和发达国家持平<sup>[3]</sup>. 大部分CRC患者确诊时已是中晚期, 手术难以根除<sup>[4]</sup>. 目前临床上应用的FOLFOX方案是利用奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)与5-氟尿嘧啶及亚叶酸联合用药作为CRC的一线、二线治疗<sup>[5]</sup>, 但多数患者在治疗一段时间后产生获得性耐药. 且化疗不仅易出现耐药性, 还极易出现毒副作用, 导致临床上治疗效果不佳以及预后不良<sup>[6]</sup>. 因此如何逆转CRC细胞对奥沙利铂的耐药性, 提高CRC细胞对奥沙利铂的敏感性, 提高患者的生存率和减轻患者的毒副作用是目前研究的热点。

电压门控氯通道3(voltage-gated chloride channel 3, CIC-3)基因定位于4q33, 编码760个氨基酸组成的蛋白质, 广泛分布于心、脑、肝、肠、胰腺等组织. 依赖CIC-3的容积调节性氯电流参与调控细胞容积变化, 而细胞容积变化直接参与调控增殖、凋亡、细胞周期、细胞粘附、细胞动力学等多种生物学功能<sup>[7-9]</sup>. 实体肿瘤化疗时能使得实体肿瘤细胞内部微环境发生改变<sup>[10]</sup>.

在缺氧和缺营养的微环境高渗环境下, 细胞发生调节性容量增加(regulatory volume increase, RVI)<sup>[8]</sup>. 有文献<sup>[11]</sup>提出稳定过表达CIC-3的宫颈癌细胞对顺铂敏感性降低; CIC-3 siRNA转染后, 卵巢癌顺铂耐药细胞SKOV-3/DDP对顺铂敏感性增强<sup>[12]</sup>. 因此, 我们推测CIC-3表达可能与对肿瘤细胞化疗相关.

由以上研究背景可见, CIC-3均与肿瘤化疗药物敏感性相关, 但CIC-3在CRC癌奥沙利铂化疗中的研究却鲜有报道. 本研究试图探究下调CIC-3是否可以调节CRC细胞对奥沙利铂化疗的敏感性, 以及其中的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CRC组织耐药标本收集: 收集我院经FOLFOX方案化疗后再次复发的CRC患者再次行肿瘤切除手术的肿瘤组织和相应的癌旁组织(距离癌灶组织边缘2-3 cm)标本, 肿瘤组织和相应的癌旁组织经过病理科验证. 筛选出化疗耐药CRC组织( $n = 28$ 例)和化疗敏感CRC组织( $n = 10$ 例). 其中, 化疗耐药组织定义为经FOLFOX方案化疗后 $\leq 6$  mo出现复发的CRC患者的CRC组织, 化疗敏感组织定义为经FOLFOX方案化疗后 $> 6$  mo出现复发的CRC患者的CRC组织. 本次收集的化疗耐药CRC组织为FOLFOX方案化疗后 $4.12 \text{ mo} \pm 1.13 \text{ mo}$ 再次复发的CRC患者再次行肿瘤切除手术的结直肠组织, 化疗敏感CRC组织为FOLFOX方案化疗后 $22.35 \text{ mo} \pm 4.25 \text{ mo}$ 再次复发的CRC患者再次行肿瘤切除手术的结直肠组织. 所有标本及临床资料的收集均符合伦理规范, 同时征得患者或其家属同意并签署相关知情同意书.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及奥沙利铂耐药细胞模型构建:** HT-29细胞(ATCC, 美国)用含10%胎牛血清(Gibco, 美国)和100 U/mL青/链霉素双抗的DMEM培养基(Thermo Fisher Scientific, 美国)常规培养, 2 d换一次液, 每6 d按照1:3传代一次. 取对数期HT-29细胞, 将培养基换成含有 $2 \mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂(赛诺菲(杭州)制药有限公司)培养液, 培养48 h, 洗除药物, 换正常培养基, 每2 d换正常培养基一次, 持续6 d, 此为一个循环. 每个浓度反复刺激3个循环. 如此反复诱导、换液、传代, 并逐渐增加奥沙利铂浓度(每次增加 $1 \mu\text{mol/L}$ )间歇诱导培养, 最终获得能耐受 $20 \mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂的细胞, 并将其培养在含有 $10 \mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂培养液中, 直达细胞在 $10 \mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂培养液中稳定生长. 最终获得奥沙利铂耐药的HT-29/L-OHP细胞.

**1.2.2 转染:** 由Invitrogen公司(美国)按照

BLOCK-iT™ RNAi Designer设计合成人CIC-3 cDNA不同区域的RNAi(CIC-3 siRNA, 序列为: 5'-AUAUAGCUAACCUCUCAAACUA-3'), 以及无已知的基因编码的阴性对照siRNA(NC siRNA, 序列为: 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'). 按照说明书步骤, 用脂质体lipofect<sup>AMINE</sup>2000(Invitrogen, 美国)分别将CIC-3 siRNA和NC siRNA通过瞬时转染法染入HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞, 细胞继续在培养箱孵育48 h, 收集细胞用于后续研究.

**1.2.3 药物处理:** 用 $100 \text{ nmol/L}$ 雷帕霉素(自噬激动剂, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)处理已/未转染CIC-3 siRNA的HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞30 min, 再继续培养48 h后, 收集细胞用于后续研究.

**1.2.4 CCK-8实验:** 调整雷帕霉素已/未处理的已/未转染CIC-3 siRNA的HT-29细胞和HT-29/L-OHP密度为 $1 \times 10^4$ 个/孔, 接种于96孔板, 然后分别给予(0、4、8、16、32、64、 $100 \mu\text{mol/L}$ )奥沙利铂处理48 h, 待测孔加入 $100 \mu\text{L}$  CCK-8工作液(江苏凯基生物技术股份有限公司), 孵箱培养2 h. 用酶标仪在 $490 \text{ nm}$ 处测量吸光值计算细胞活力.

**1.2.5 Cyto-ID自噬率检测:** 将已转染CIC-3 siRNA或NC-siRNA的HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞调整密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于24孔板内, 细胞处理后用PBS清洗3次, 用4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS清洗3次, 加入Cyto-ID检测试剂(ENZO, 美国)孵育45 min, 激光共聚焦显微镜下观察, 统计单个细胞中Cyto-ID的阳性自噬点数, 每样本至少统计50个细胞.

**1.2.6 免疫组化:** 取癌旁组织、CRC化疗耐药组织和化疗敏感组织组织, 并用石蜡包埋. 切为 $6 \mu\text{m}$ 厚度的组织切片, 并经脱蜡至水、阻断内源性过氧化物酶和封闭后, 分别室温孵育抗CIC-3(1:150, Abcam, 美国)和抗微管相关蛋白1 II 轻链3(microtubule-associated protein 1 II light chain 3, LC3-II)(1:100, Abcam, 美国)2 h. PBS冲洗后, 室温孵育酶标抗兔二抗(1:100, 北京中山金桥生物技术有限公司)45 min. PBS冲洗后, 用DAB液显色, 苏木素复染后, 显微镜白光视野下观察并拍照, 用Image J软件统计阳性信号值.

**1.2.7 蛋白质免疫印迹:** 用RIPA细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)在冰上裂解细胞并提取蛋白. 蛋白用BCA蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行定量后, 调整蛋白上样量( $50 \mu\text{g}$ /样品), 进行SDS-PAGE凝胶电泳分离. 电泳结束, 将PVDF膜覆盖于分离胶上, 置于电转槽中用湿转法以 $200 \text{ mA}$ 恒流电转90 min. 用含5%脱脂奶粉的TBST将PVDF膜在室温中封闭1 h. 在室温下孵育针对CIC-3(1:1000,



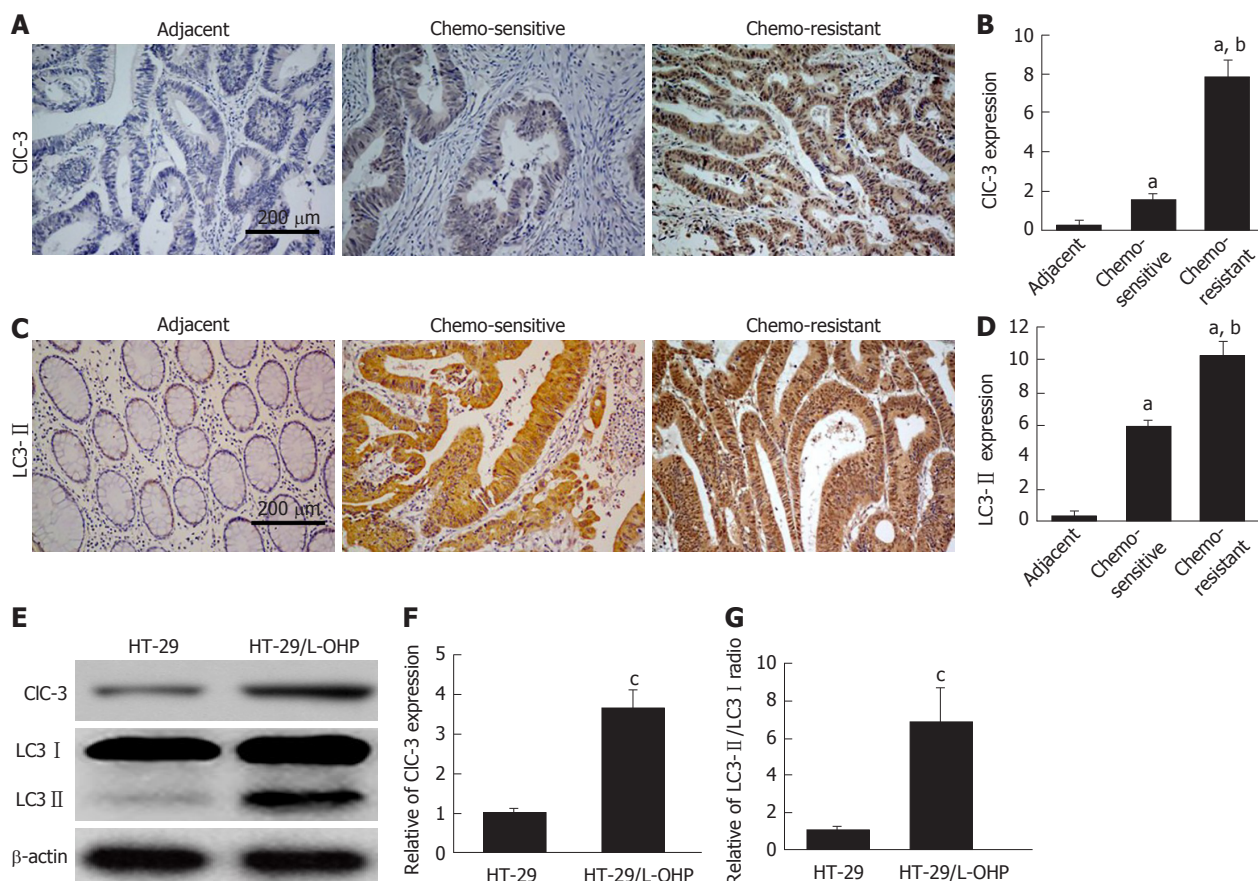


图1 CIC-3和LC3-II在结直肠癌化疗耐药组织和奥沙利铂耐药细胞HT-29/L-OHP中表达情况。A-D: 免疫组化检测癌旁组织( $n = 38$ )、结直肠癌(colorectal cancer, CRC)化疗耐药组织( $n = 28$ )和CRC化疗敏感组织( $n = 10$ )中CIC-3(A、B)和LC3-II(C、D)的表达; 与癌旁组织比较,  $^aP < 0.05$ ; 与化疗敏感组织比较,  $^bP < 0.05$ 。(E-G)Western blot检测HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中CIC-3表达(E、F)和LC3-II/LC3-I比率(E、G);  $n = 4$ , 与HT-29细胞比较,  $^cP < 0.05$ 。

Abcam, 美国)、Beclin1 (1:2000, Cell Signaling Technology, 美国)、LC3(1:1500, Cell Signaling Technology, 美国)和 $\beta$ -actin (1:5000, 武汉博士德生物工程有限公司)的一抗2 h。洗膜后, 孵育HRP标记的二抗(上海碧云天生物技术有限公司)1 h。洗膜后, 用避光ECL超敏发光液(上海碧云天生物技术有限公司)显影。使用Image J软件分析条带光密度值。

**统计学处理** 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用SPSS 21.0软件包对实验数据进行分析。两组数据比较采用 $t$ 检验; 多组间数据比较用方差分析, 再采用SNK检验法进行均数的两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CLC-3和LC3-II在CRC化疗耐药组织和奥沙利铂耐药细胞HT-29/L-OHP中高表达** 免疫组化染色结果显示, 与化疗敏感组织比较, 化疗耐药组织中CIC-3(图1A、B)和LC3-II(图1C、D)的表达均明显增加( $P < 0.05$ ), 说明CLC-3和LC3-II在CRC化疗耐药组织中呈现高水平。Western blot结果显示, 与HT-29细胞比较, 奥沙利铂

耐药细胞HT-29/L-OHP中CIC-3表达(图1E、F)和LC3-II/LC3-I比率(图1E、G)均明显增加( $P < 0.05$ )。以上结果提示, CIC-3表达和自噬可能与CRC奥沙利铂耐药相关。

**2.2 抑制CIC-3表达可以增强奥沙利铂敏感性** 用CIC-3 siRNA分别转染HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞, 与对照组比较, CIC-3 siRNA组的HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中CIC-3表达均明显降低(图2A、B;  $P < 0.05$ ), 说明构建的CIC-3 siRNA转染细胞成功。用CCK-8法检测不同处理后细胞活力的变化, 如图2C所示, 相比于HT-29细胞, 用CIC-3 siRNA处理的HT-29细胞的细胞活力明显下降, 表明细胞对于奥沙利铂化疗的敏感性增加; 同时, 在奥沙利铂耐药细胞HT-29/L-OHP中抑制CIC-3后, 细胞对奥沙利铂敏感性增强。总之, 不管是否发生奥沙利铂耐药, 抑制细胞中CIC-3表达均可以增强细胞对奥沙利铂的敏感性。

**2.3 抑制CIC-3表达能抑制自噬** Cyto-ID染色结果(图3A、B)显示, 在HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中转染CIC-3 siRNA, 转染CIC-3 siRNA后的两种细胞的细胞内Cyto-ID的阳性自噬点数均降低( $P < 0.05$ )。进一步通过

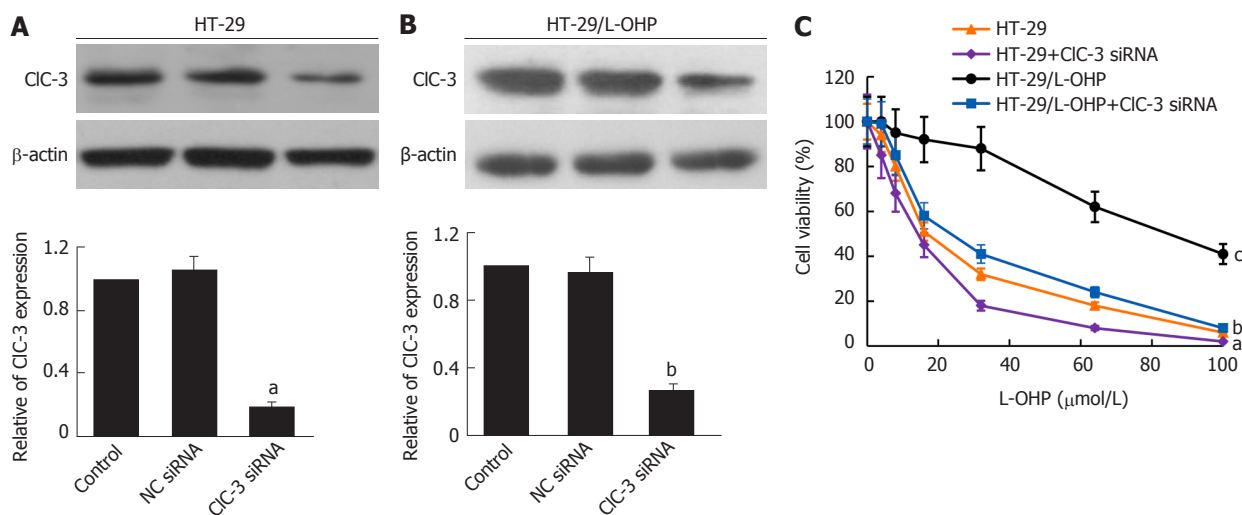


图 2 抑制CIC-3表达对结直肠癌细胞奥沙利铂化疗敏感性的影响. A, B: Western blot鉴定HT-29细胞(A)和HT-29/L-OHP细胞(B)的CIC-3 siRNA的转染效率; C: CCK-8法检测不同组细胞活力;  $n = 4$ ; 与HT-29细胞比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.05$ ; 与HT-29/L-OHP细胞比较,  $^c P < 0.05$ .

Western blot检测细胞内自噬关键蛋白的表达(图3C), 结果(图3C-F)显示, 不管是在HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中, 与转染NC siRNA比较, 转染CIC-3 siRNA后的两种细胞中LC3-II/LC3-I比率(图3D)和Beclin1表达(图3E)均明显降低( $P < 0.05$ ), 同时p62表达(图3F)明显增加( $P < 0.05$ ). 以上结果说明, 抑制CIC-3表达能降低CRC细胞的自噬水平.

**2.4 雷帕霉素能逆转CIC-3 siRNA对奥沙利铂的增敏效应** CCK-8结果(图4A)显示, 不管是在HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中, 与转染CIC-3 siRNA比较, 用自噬激动剂雷帕霉素处理均能降低细胞对奥沙利铂的敏感性( $P < 0.05$ ). Western blot结果(图4B-E)显示, 不管是在HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中, 与转染CIC-3 siRNA比较, 用雷帕霉素处理后的两种细胞中LC3-II/LC3-I比率(图4B、C)和Beclin1表达(图4B、D)均明显增加( $P < 0.05$ ), 同时p62表达(图4B、E)明显降低( $P < 0.05$ ); 以上结果说明, 促进自噬能逆转CIC-3 siRNA对CRC细胞的奥沙利铂的增敏效应. 另外, 结果(图4B、F)显示, 不管是在HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞中, 雷帕霉素对CIC-3表达无影响, 这提示CIC-3是细胞自噬的上游调节分子.

### 3 讨论

自噬是实体肿瘤细胞在缺氧和缺营养的癌灶中生存的重要方式, 而化疗药物往往能增强实体肿瘤细胞缺氧和缺营养的微环境<sup>[10]</sup>. 在自噬过程中, Beclin1上调能发挥启动自噬的作用; LC3-II则是自噬体形成的标记物; p62可同自噬过程中的降解底物一起被自噬体结合并降解. 且研究<sup>[13]</sup>已显示, 在实体肿瘤化疗耐药组织切片中发现, 其自噬关键标记物Beclin1和LC3-II的蛋白水平

升高. 因此, 自噬在实体肿瘤化疗敏感性中可能发挥着重要的作用. 另外, 缺氧和缺营养的微环境能促进细胞CIC-3表达<sup>[8]</sup>. 由此观之, 在肿瘤化疗中, CIC-3表达、自噬水平和化疗敏感性三者之间可能具有一定的内部联系. 因此, 本研究关注CIC-3和细胞自噬的作用, 以及它们在调控CRC化疗耐药细胞对奥沙利铂化疗的敏感性的作用.

CIC-3是电压门控性氯离子通道家族的成员, 有研究<sup>[14]</sup>发现抑制CIC-3的表达, 可抑制神经胶质瘤细胞U251的自噬, 促进U251细胞对顺铂化疗敏感性. 我们同样在CRC化疗耐药组织和奥沙利铂耐药的HT-29/L-OHP细胞株中发现CIC-3和LC3-II高表达, 由此推测CIC-3和LC3-II表达可能与CRC奥沙利铂化疗敏感性相关. 为证明CIC-3通过自噬参与结直肠的奥沙利铂化疗敏感性, 本研究采用CIC-3 siRNA转染HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞, 观察自噬水平及其奥沙利铂化疗敏感性变化, 结果显示, 不管是否发生奥沙利铂耐药, 抑制CIC-3表达均能使结直肠细胞对奥沙利铂增敏, 且其过程伴随自噬水平降低. 且Sun等<sup>[15]</sup>发现在化疗耐药CRC细胞中抑制细胞自噬, 奥沙利铂处理可以促使肿瘤细胞凋亡增加. 比较直接的证据是Selvakumaran等<sup>[16]</sup>在CRC细胞研究中发现, 给予自噬抑制剂氯喹预处理的CRC细胞或转染Beclin1 siRNA的CRC细胞对奥沙利铂的敏感性明显升高. 为证明下调CIC-3对CRC细胞的奥沙利铂的增敏效应是否通过抑制细胞自噬, 本研究进一步选用自噬激动剂雷帕霉素处理已转染CIC-3 siRNA的HT-29细胞和HT-29/L-OHP细胞, 发现增强自噬能逆转CIC-3 siRNA对奥沙利铂的增敏效应, 但其对CIC-3表达无影响, 这一结果, 更进一步证明了CIC-3是自噬的上游分

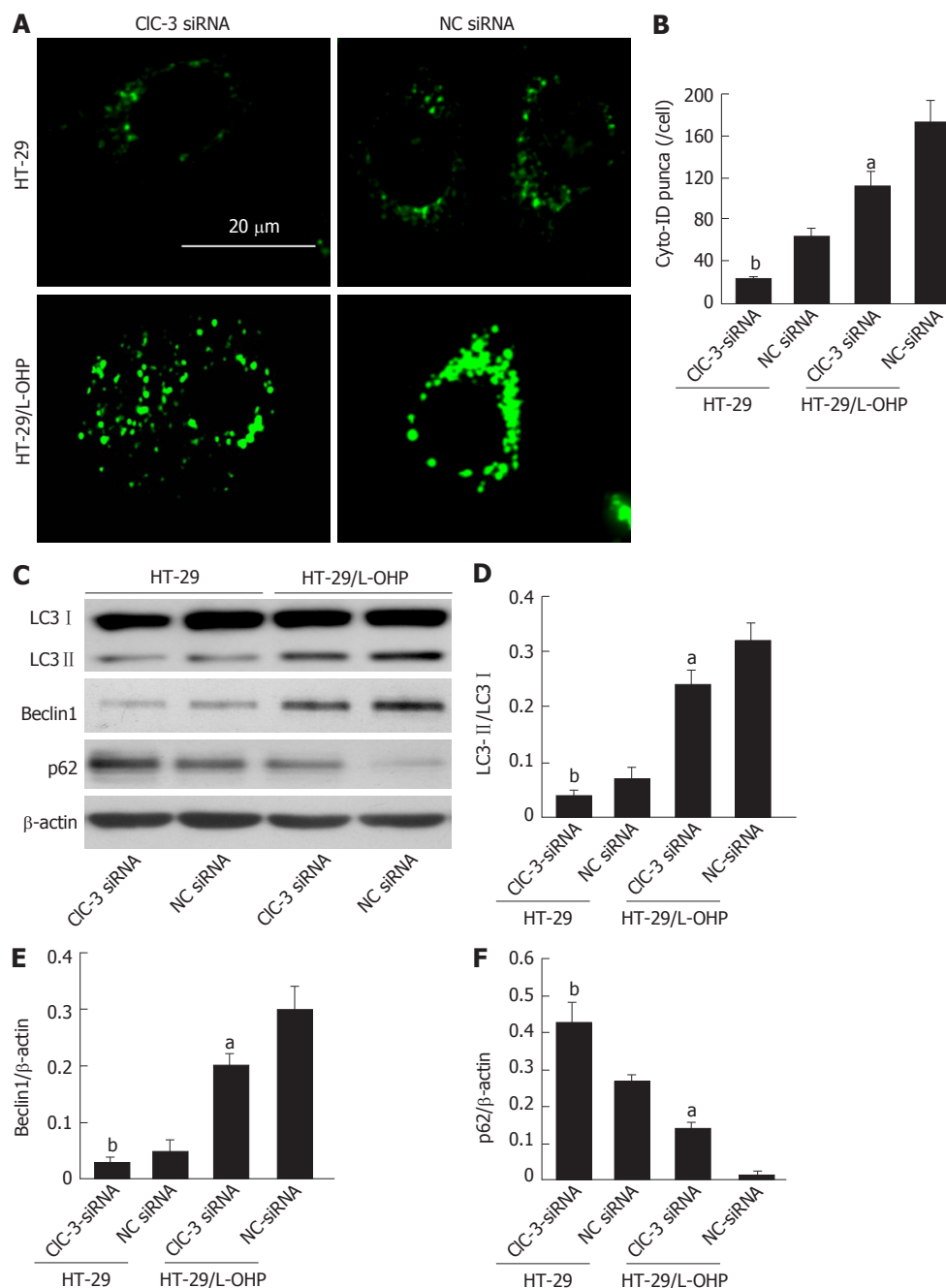


图 3 抑制CIC-3表达对结直肠癌细胞自噬的影响. A, B: Cyto-ID染色观察不同组中自噬点形成; C-F: Western blot检测不同组中LC3-II/LC3-I 比率(C、D)、Beclin1表达(C、E)和p62表达(C、F);  $n = 4$ ; 与HT-29+NC siRNA比较,  $^b P < 0.05$ ; 与HT-29/L-OHP+NC siRNA比较,  $^a P < 0.05$ .

子, 抑制CIC-3是通过降低CRC细胞自噬水平来达到对奥沙利铂的增敏.

#### 4 结论

总之, 我们的研究发现下调CIC-3通过抑制细胞自噬从而增强了CRC细胞对奥沙利铂化疗的敏感性. 我们的研究工作从组织学和细胞学两个方面探究CIC-3在CRC细胞奥沙利铂敏感性中的调控作用, 明确下调CIC-3在CRC化疗中的作用机制, 从一个新的角度为评估CIC-3参与CRC化疗作用提供了理论依据.

#### 文章亮点

##### 实验背景

化疗是肿瘤治疗的最主要的治疗策略之一. 而化疗敏感性制约着肿瘤的化疗效果. 因此, 研究增加化疗敏感性的策略对肿瘤的化疗具有重大的意义.

##### 实验动机

自噬是肿瘤细胞应对化疗的重要生存方式之一. 已有报道表明电压门控氯通道3(voltage-gated chloride channel 3,



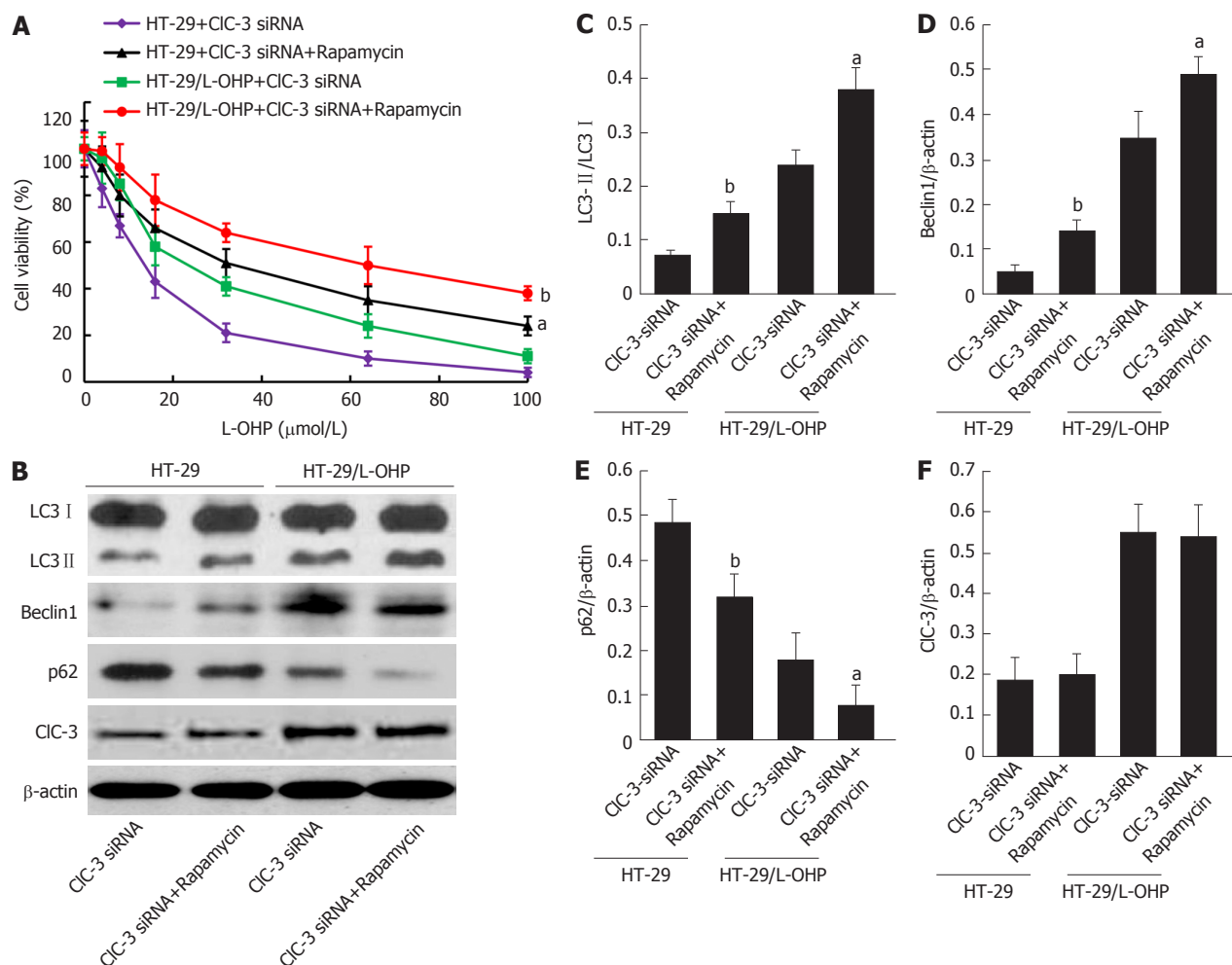


图 4 促进自噬逆转CIC-3 siRNA对奥沙利铂的增敏效应. A: CCK-8法检测不同组细胞活力; B-F: Western blot检测不同组中LC3-II/LC3-I比率(B、C)、Beclin1表达(B、D)、p62表达(B、E)和CIC-3表达(B、F);  $n = 3$ ; 与HT-29+CIC-3 siRNA比较,  $^bP < 0.05$ ; 与HT-29/L-OHP+CIC-3 siRNA比较,  $^aP < 0.05$ .

CIC-3)在化疗耐药组织高表达. 而在肿瘤化疗中, CIC-3表达、自噬和化疗药物敏感性三者之间的内部关系尚不完全清楚.

### 实验目标

研究结直肠癌(colorectal cancer, CRC)奥沙利铂化疗中, CIC-3表达、自噬和奥沙利铂敏感性三者之间的关系, 并分析内在的机制.

### 实验方法

分别检测FOLFOX方案化疗后的CRC化疗耐药组织和化疗敏感组织以及CRCHT-29细胞和奥沙利铂耐药细胞(HT-29/L-OHP)中CIC-3和微管相关蛋白1 II轻链3(microtubule-associated protein 1 II light chain 3, LC3-II)表达; 敲减HT-29和HT-29/L-OHP中CIC-3的表达后, 分别检测奥沙利铂敏感性和自噬水平的变化; 用雷帕霉素处理上述细胞, 再分别检测奥沙利铂敏感性、自噬水平

和CIC-3表达的变化.

### 实验结果

CRC耐药组织以及奥沙利铂耐药细胞中均存在高表达的LC3 II和CIC-3. 在HT-29和HT-29/L-OHP中, 下调CIC-3表达均对奥沙利铂增敏并降低自噬; 用雷帕霉素能部分消除敲减CIC-3对奥沙利铂的增敏效应.

### 实验结论

下调CIC-3通过抑制CRC细胞自噬水平来达到对奥沙利铂的增敏效应.

### 展望前景

在CRC化疗中, 下调CIC-3表达可能会让患者获益.

### 5 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7-30 [PMID: 29313949 DOI: 10.3322/



- caac.21442]
- 2 Zheng ZX, Zheng RS, Zhang SW, Chen WQ. Colorectal cancer incidence and mortality in China, 2010. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 8455-8460 [PMID: 25339046 DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.19.8455]
- 3 Fang JY, Dong HL, Sang XJ, Xie B, Wu KS, Du PL, Xu ZX, Jia XY, Lin K. Colorectal Cancer Mortality Characteristics and Predictions in China, 1991-2011. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 7991-7995 [PMID: 26625831 DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7991]
- 4 Coppède F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 943-956 [PMID: 24574767 DOI: 10.3748/wjg.v20.i4.943]
- 5 Guo Y, Xiong BH, Zhang T, Cheng Y, Ma L. XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Cancer Invest* 2016; 34: 94-104 [PMID: 26864862 DOI: 10.3109/07357907.2015.1104689]
- 6 Nagashima M, Ooshiro M, Moriyama A, Sugishita Y, Kadoya K, Sato A, Kitahara T, Takagi R, Urita T, Yoshida Y, Tanaka H, Oshiro T, Okazumi S, Katoh R. Efficacy and tolerability of controlled-release oxycodone for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the extension of FOLFOX therapy in advanced colorectal cancer patients. *Support Care Cancer* 2014; 22: 1579-1584 [PMID: 24452412 DOI: 10.1007/s00520-014-2132-4]
- 7 Zhou FM, Huang YY, Tian T, Li XY, Tang YB. Knockdown of Chloride Channel-3 Inhibits Breast Cancer Growth In Vitro and In Vivo. *J Breast Cancer* 2018; 21: 103-111 [PMID: 29963105 DOI: 10.4048/jbc.2018.21.2.103]
- 8 Ma MM, Lin CX, Liu CZ, Gao M, Sun L, Tang YB, Zhou JG, Wang GL, Guan YY. Threonine532 phosphorylation in CIC-3 channels is required for angiotensin II-induced Cl(-) current and migration in cultured vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 529-544 [PMID: 26562480 DOI: 10.1111/bph.13385]
- 9 Jentsch TJ, Pusch M. CLC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiol Rev* 2018; 98: 1493-1590 [PMID: 29845874 DOI: 10.1152/physrev.00047.2017]
- 10 Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* 2015; 368: 7-13 [PMID: 26276713 DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.039]
- 11 王施思, 杨清松, 施静雯, 林嘉麟, 徐彬. 稳定表达CIC-3对宫颈癌细胞顺铂敏感性的影响及其机制. *肿瘤* 2014; 34: 888-893 [DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2014.11.402]
- 12 于春艳, 刘希, 苏静, 钟加滕, 孙连坤, 刘玉和. 抑制CIC-3表达促进顺铂诱导人卵巢癌SKOV3/DDP细胞凋亡的作用机制. *中国妇幼保健* 2013; 28: 1004-1006 [DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2013.28.41]
- 13 Vasilevskaia IA, Selvakumaran M, Roberts D, O'Dwyer PJ. JNK1 Inhibition Attenuates Hypoxia-Induced Autophagy and Sensitizes to Chemotherapy. *Mol Cancer Res* 2016; 14: 753-763 [PMID: 27216154 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0035]
- 14 Su J, Xu Y, Zhou L, Yu HM, Kang JS, Liu N, Quan CS, Sun LK. Suppression of chloride channel 3 expression facilitates sensitivity of human glioma U251 cells to cisplatin through concomitant inhibition of Akt and autophagy. *Anat Rec (Hoboken)* 2013; 296: 595-603 [PMID: 23408563 DOI: 10.1002/ar.22665]
- 15 Sun C, Wang FJ, Zhang HG, Xu XZ, Jia RC, Yao L, Qiao PF. miR-34a mediates oxaliplatin resistance of colorectal cancer cells by inhibiting macroautophagy via transforming growth factor- $\beta$ /Smad4 pathway. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 1816-1827 [PMID: 28348487 DOI: 10.3748/wjg.v23.i10.1816]
- 16 Selvakumaran M, Amaravadi RK, Vasilevskaia IA, O'Dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2995-3007 [PMID: 23461901 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1542]

科学编辑: 张砚梁 制作编辑: 张砚梁



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》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 文献综述, 研究快报, 临床实践, 病例报告, 会议跟踪. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.



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

