

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

2021 年 4 月 8 日      第 29 卷      第 7 期      (Volume 29 Number 7)



## 7/2021

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议、开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录。



### 述评

- 325 基于肠道微生物对中医外感寒湿伤脾理论的初步探讨  
张晨阳, 谭周进

### 基础研究

- 332 敲除Linc00152对丝裂霉素耐药胃癌细胞NCI-N87/MMC的化疗耐药性影响及机制  
吴明东, 叶洁桐, 朱蓓蕾, 叶芳敏, 汪望月
- 340 敲减LncRNA TPT1-AS1抑制肝癌细胞侵袭及迁移  
刘清秀, 汪晓梅, 吕矫健, 卢毅, 赵园, 樊晓鹏

### 临床研究

- 347 IFOBT与肿瘤标志物、炎症指标联合检测对结直肠进展期腺瘤发生的预测价值  
王绪, 张竞宇, 郑忠青, 王涛, 朴美玉, 刘恒, 刘静, 刘文天
- 356 结直肠癌根治术后肠道菌群、miR-10a表达变化及微生态肠内营养干预作用  
金佳琪, 贾新能, 宣俊毅

### 文献综述

- 366 鼠李糖乳杆菌治疗肠易激综合征机制新进展  
苏帅, 张智芳, 王欣, 王玉明, 王邦茂

### 临床实践

- 372 创伤性颅脑外伤合并急性胃功能损伤患者血清中热休克蛋白70水平的变化及意义  
魏文桂, 张雪琴, 张艳景, 田野

### 病例报告

- 378 类鼻疽伯克霍尔德菌肝脾脓肿超声造影表现1例  
高玲, 时莹瑜, 卢强

## 消 息

- 355 《腹痛的诊断、鉴别诊断与治疗》书讯  
365 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标  
382 《世界华人消化杂志》正文要求

## 封面故事

杨晓军, 主任医师, 兰州大学副教授, 硕士研究生导师, 甘肃省人民医院普外二科主任, 美国宾夕法尼亚大学和中国兰州大学联合培养外科学博士, 甘肃省卫生健康行业骨干人才, 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目引进人才. 专业擅长肝胆胰疾病及消化道肿瘤微创治疗. 目前担任《中国微创外科杂志》、《腹腔镜外科杂志》、《世界华人消化杂志》、《中华肝脏外科杂志电子版》编委, 还担任中国抗癌协会青年理事、中国抗癌协会胆道肿瘤专业委员会、中国抗癌协会肿瘤精准治疗专业委员会等协会委员. 近五年在 *Cancer Research*、*Cancer Letter*、*PLoS One* 等国际著名刊物发表第一作者学术论文11篇.

## 本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张砚梁; 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 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 2021-04-08

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

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

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

© 2021 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

## Contents

Volume 29 Number 7 April 8, 2021

## EDITORIAL

- 325 Preliminary study on theory of spleen injury caused by exogenous cold and dampness based on intestinal microecology  
*Zhang CY, Tan ZJ*

## BASIC RESEARCH

- 332 Effect and mechanisms of LINC00152 knockdown on chemotherapy resistance in mitomycin-resistant gastric cancer NCI-N87/MMC cells  
*Wu MD, Ye JT, Zhu BL, Ye FM, Wang WY*
- 340 Knockdown of long non-coding RNA TPT1-AS1 inhibits invasion and migration of hepatocarcinoma cells  
*Liu QX, Wang XM, Lv JJ, Lu Y, Zhao Y, Fan XP*

## CLINICAL RESEARCH

- 347 Value of combined detection of IFOBT, tumor markers, and inflammatory markers in predicting occurrence of advanced colorectal adenoma  
*Wang X, Zhang JY, Zheng ZQ, Wang T, Piao MY, Liu H, Liu J, Liu WT*
- 356 Changes of intestinal flora and microRNA-10a expression after radical resection of colorectal cancer: Effect of microecological enteral nutrition intervention  
*Jin JQ, Jia XN, Xuan JY*

## REVIEW

- 366 Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* in treatment of irritable bowel syndrome  
*Su S, Zhang ZF, Wang X, Wang YM, Wang BM*

## CLINICAL PRACTICE

- 372 Significance of changes of serum heat shock protein 70 levels in patients with traumatic brain injury and acute gastrointestinal injury  
*Wei WG, Zhang XQ, Zhang YJ, Tian Y*

## CASE REPORT

- 378 Contrast-enhanced ultrasound findings in liver and spleen abscesses due to infection with *Burkholderis pseudomallei*: A case report  
*Gao L, Shi YY, Lu Q*



## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 29 Number 7 April 8, 2021

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Xiao-Jun Yang, Chief Surgeon, MD, PhD, Department of General Surgery, Gansu Provincial Hospital, No. 204 Dong-gang West Road, Chengguan District, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. yangxjmd@aliyun.com

### 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: *Yan-Liang Zhang*

Production Editor: *Yan-Liang Zhang*

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** April 8, 2021

#### 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

Jin-Lei Wang, Director

*World Chinese Journal of Digestology*

Baishideng Publishing Group Inc

7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

<https://www.wjgnet.com>

#### PUBLISHER

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>

#### 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

© 2021 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.

# 敲减LncRNA TPT1-AS1抑制肝癌细胞侵袭及迁移

刘清秀, 汪晓梅, 吕娇健, 卢毅, 赵园, 樊晓鹏

刘清秀, 汪晓梅, 吕娇健, 卢毅, 赵园, 丽水市人民医院肝病感染科 浙江省丽水市 323000

樊晓鹏, 丽水市人民医院肝胆胰外科 浙江省丽水市 323000

刘清秀, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病及感染性疾病的相关临床及科研工作。

**作者贡献分布:** 此课题由刘清秀与樊晓鹏设计; 研究过程由刘清秀、汪晓梅及吕娇健操作完成; 研究所用试剂由刘清秀提供; 数据分析由卢毅和赵园完成; 本论文写作由刘清秀完成。

**通讯作者:** 刘清秀, 硕士, 主治医师, 323000, 浙江省丽水市莲都区大众街15号丽水市人民医院肝病感染科, liuqingxiufg123@163.com

收稿日期: 2021-01-22

修回日期: 2021-02-24

接受日期: 2021-03-15

在线出版日期: 2021-04-08

## Knockdown of long non-coding RNA TPT1-AS1 inhibits invasion and migration of hepatocarcinoma cells

Qing-Xiu Liu, Xiao-Mei Wang, Jiao-Jian Lv, Yi Lu, Yuan Zhao, Xiao-Peng Fan

Qing-Xiu Liu, Xiao-Mei Wang, Jiao-Jian Lv, Yi Lu, Yuan Zhao, Department of Hepatology and Infection, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, Zhejiang Province, China

Xiao-Peng Fan, Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Qing-Xiu Liu, Master of Medicine, Attending Physician, Department of Hepatology and Infection, Lishui People's Hospital, No. 15 Dazhong Street, Liandu District, Lishui 323000, Zhejiang Province, China. liuqingxiufg123@163.com

Received: 2021-01-22

Revised: 2021-02-24

Accepted: 2021-03-15

Published online: 2021-04-08

## Abstract

### BACKGROUND

The long non-coding RNA (lncRNA) TPT1-AS1 has been proved to affect the migration and invasion of tumor cells by different means, but its specific role and related mechanisms in hepatic carcinoma still need further research.

### AIM

To investigate the expression of TPT1-AS1 in hepatocarcinoma tissues and cell lines and explore its biological role in the invasion and migration of hepatocarcinoma cells.

### METHODS

Real-time quantitative PCR was used to measure lncRNA TPT1-AS1 expression in hepatocarcinoma tissue and cell lines (Huh7, SMMC-7721, HCCLM3, and HepG2). After being transfected with small interfering RNA (siRNA-TPT1-AS1), the invasion and migration of HepG2 cells were detected by transwell assay and wound healing assay. Western blot was used to measure the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process and the activity of the PI3K/AKT pathway.

### RESULTS

TPT1-AS1 was up-regulated in hepatocarcinoma tissues and cell lines Huh7, SMMC-7721, HCCLM3, and HepG2. Transfection with siRNA-TPT1-AS1 noticeably restrained HepG2 cell invasion and migration, and suppressed the EMT process. Furthermore, TPT1-AS1 knockdown reduced MMP-9 expression and inhibited the activation of the PI3K/AKT pathway.

### CONCLUSION

TPT1-AS1 is up-regulated in hepatic carcinoma. Knockdown of TPT1-AS1 inhibits the invasion and migration of HepG2 cells *via* mechanisms that may

be associated with reducing the activity of PI3K/AKT pathway and the expression of its downstream gene MMP-9, and inhibiting the EMT process.

© The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** LncRNA TPT1-AS1; Hepatocarcinoma; Invasion; Migration; PI3K/AKT

**Citation:** Liu QX, Wang XM, Lv JJ, Lu Y, Zhao Y, Fan XP. Knockdown of long non-coding RNA TPT1-AS1 inhibits invasion and migration of hepatocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2021; 29(7): 340-346

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v29/i7/340.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v29.i7.340>

## 摘要

### 背景

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)肿瘤蛋白翻译调节因子1-反义RNA1(tumor protein translationally controlled regulator 1-antisense RNA 1, TPT1-AS1)TPT1-AS1可通过不同的作用方式影响肿瘤的侵袭转移, 但其在肝癌中的具体作用和相关作用机制还有待进一步的实验验证。

### 目的

探讨lncRNA TPT1-AS1在肝癌中的表达及其对肝癌细胞侵袭迁移能力的影响。

### 方法

实时荧光定量PCR检测肝癌组织及肝癌细胞系(Huh7、SMMC-7721、HCCLM3和HepG2)中lncRNA TPT1-AS1的表达。靶向TPT1-AS1的小分子干扰RNA(siRNA targeted for TPT1-AS1, si-TPT1-AS1)转染后, 经Transwell实验和划痕实验检测HepG2细胞侵袭及迁移能力的变化; Western blot评估上皮-间充质转分化进程(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及磷酸肌醇3激酶(phosphotylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)信号通路的活性。

### 结果

肝癌组织及肝癌细胞系(Huh7、SMMC-7721、HCCLM3和HepG2)中均可检测到lncRNA TPT1-AS1的高表达。转染siRNA-TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的侵袭及迁移, 同时抑制HepG2细胞的EMT进程。此外, 下调lncRNA TPT1-AS1可抑制MMP-9的表达及PI3K/AKT信号通路的活性。

### 结论

LncRNA TPT1-AS1在肝癌中高表达。敲减lncRNA TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的侵袭迁移, 其作用机制可能与下调PI3K/AKT信号通路的活性以及下

游基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的表达, 进而抑制细胞的EMT进程有关。

© The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**关键词:** lncRNA TPT1-AS1; 肝癌; 侵袭; 迁移; PI3K/AKT

**核心提要:** 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)肿瘤蛋白翻译调节因子1-反义RNA1(tumor protein translationally controlled regulator 1-antisense RNA 1, TPT1-AS1)在肝癌中表达上调。敲除TPT1-AS1抑制HepG2细胞的EMT进程、迁移和侵袭, 并减弱其PI3K/AKT信号活性。

**文献来源:** 刘清秀, 汪晓梅, 吕娇健, 卢毅, 赵园, 樊晓鹏. 敲减LncRNA TPT1-AS1抑制肝癌细胞侵袭及迁移. *世界华人消化杂志* 2021; 29(7): 340-346

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v29/i7/340.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v29.i7.340>

## 0 引言

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类RNA转录的产物, 其转录本长度大于200 nt, 但不具备编码蛋白质的功能。LncRNA可通过多种方式影响基因的表达, 从而参与调控细胞的转分化、代谢以及增殖凋亡等生物学行为; 此外lncRNA还可调控细胞内以及细胞间复杂的信号通路, 进而影响肿瘤的发生发展进程<sup>[1,2]</sup>。研究证实在包括胃癌、肝癌、肺癌以及乳腺癌等多类肿瘤中存在lncRNA的异常表达<sup>[3-6]</sup>。肝癌是发病率和死亡率均高的常见恶性肿瘤之一, 其早期的诊疗手段依旧十分有限, 而lncRNA作为近年来备受关注的“明星分子”, 有望为肝癌的诊疗以及靶点药物的设计提供新的思路和方法。目前已有多项研究证实lncRNA可通过抑癌或促癌作用参与调控肝癌的发生发展。如Wu等<sup>[7]</sup>的研究结果显示lncRNA MT1JP在肝癌组织中表达降低, 且可通过下调AKT抑制肝癌的进展。Lin等<sup>[8]</sup>的研究结果则显示lncRNA CRNDE可通过调控miR-33a-5p/CDK6轴在肝癌中发挥促癌作用。

肿瘤蛋白翻译调节因子1-反义RNA1(tumor protein translationally controlled regulator 1-antisense RNA 1, TPT1-AS1)位于13号染色体。既往研究发现<sup>[9-11]</sup>, TPT1-AS1在胃癌、卵巢癌以及结直肠癌等恶性肿瘤中异常高表达, 并可促进上述肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭; 但考虑到lncRNA作用的复杂性, lncRNA TPT1-AS1在肝癌中的具体作用和相关作用机制尚不清楚, 还需大量的实验验证。本研究首先通过实时荧光定量PCR检测肝癌中lncRNA TPT1-AS1的表达情况, 之后利用小分子干扰



RNA下调肝癌细胞中lncRNA TPT1-AS的表达, 初步分析其对肝癌细胞侵袭及迁移能力的影响, 并通过western blot等检测手段进一步探讨其可能的作用机制, 以期为肝癌的诊疗提供潜在的靶点和一定的实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝癌细胞系(Huh7、SMMC-7721、HCCLM3和HepG2)及人永生化肝细胞LO2均购自中科院上海细胞库; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、I 减血清培养基(I reduced serum medium modification of Eagle's minimal essential medium, Opti-MEM)培养基、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)培养基均购自美国Gibco公司; Trizol试剂、LipofectAMINE<sup>2000</sup>购自美国Invitrogen公司; 靶向TPT1-AS1的小分子干扰RNA (siRNA targeted for TPT1-AS1, si-TPT1-AS1) 及其阴性对照小分子干扰RNA (siRNA targeted for negative control sequence, si-NC)由广州锐博生物技术有限公司合成; PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix kit及SYBR-Green PCR Master Mix kit购自TaKaRa公司; 二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经-钙粘蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、和三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体均购自美国Abcam公司; 磷酸肌醇3激酶(phosphotylinositol 3 kinase, PI3K)、磷酸化PI3K(phospho-PI3K, p-PI3K)抗体购自上海泊湾生物科技有限公司; 蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)、磷酸化AKT(phospho-AKT, p-AKT)抗体购自美国Affinity Biosciences公司; 其余试剂均为国产市售分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 临床标本收集:** 收集2017-12/2019-12丽水市人民医院普外科肝胆病区行肝癌切除手术患者的癌组织及其配对的癌旁正常组织。所有纳入研究的12例病例均经我院病理科确证为肝细胞癌, 配对癌旁组织中无癌细胞, 距离癌组织边缘2.0 cm以上, 且所选病例术前并未接受过放化疗和介入等治疗。本研究所有的临床标本均经患者签署知情同意书并获得丽水市人民医院伦理委员会批准。标本离体后迅速取材并置于冻存管中放入液氮, 于-80℃超低温冰箱中保存备用。

**1.2.2 细胞培养、分组及转染:** 肝癌细胞系(Huh7、SMMC-7721、HCCLM3和HepG2)及人永生化肝细胞LO2均常规培养于含10% FBS的DMEM完全培养基中,

培养条件为37℃、含5%CO<sub>2</sub>的恒温细胞培养箱, 每2 d更换培养基一次, 每4-5 d细胞生长达80%左右时经0.25%的胰酶消化传代。

取对数生长期的HepG2细胞接种至6孔板中(接种密度为 $2 \times 10^5$ 个/mL), 并将细胞分为空白对照组(control, Ctrl)、阴性对照组(si-NC)和转染组(si-TPT1-AS1)。待细胞生长至约70%融合时进行转染。将si-TPT1-AS1/si-NC和LipofectAMINE<sup>2000</sup>分别加入到Opti-MEM培养基中混匀, 室温孵育5 min, 然后将已经添加si-TPT1-AS1/si-NC的培养基与已经添加LipofectAMINE<sup>2000</sup>分别轻柔混合, 室温继续孵育25 min。最后将混合物分别加至预设分组的各组细胞中, 置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>的恒温细胞培养箱中连续培养6 h, 更换为完全细胞培养基继续培养48 h。检测转染效率并进行后续实验分析。

**1.2.3 划痕实验:** 取对数生长期的HepG2细胞接种至6孔板中(预先用记号笔在培养板的背面画直线作为参考线), 接种密度为 $2 \times 10^5$ 个/mL。依据实验分组转染si-NC或si-TPT1-AS1后, 将细胞板重新置于细胞培养箱中继续培养至细胞生长达到约90%融合。用灭菌枪头依据参考线垂直在孔底划上划痕, PBS清洗后加入完全细胞培养基继续置于培养箱中培养。分别在0 h和48 h时用倒置相差显微镜随机选取6个视野观察并采集细胞图像, 检测划痕的修复情况并衡量细胞的迁移能力。

**1.2.4 Transwell实验:** 预先将人工基底膜(Matrigel)基质胶解冻并用无血清的DMEM培养基按1:8的比例稀释, 之后用Matrigel胶均匀包被transwell小室的微孔膜上, 37℃孵育2 h。用无血清培养基将各组细胞制成 $1 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬浮液, 然后每组细胞取100 μL细胞悬浮液分别接种至transwell小室的上室, 在下室中加入700 μL完全细胞培养基, 置于细胞培养箱中继续培养48 h。取出小室后用棉签轻柔擦除微孔膜上层的细胞, PBS清洗2次后加95%的乙醇固定微孔膜下层的细胞, 之后用体积分数为0.5%的结晶紫染液染色, PBS漂洗后, 于倒置显微镜下观察并计数穿膜细胞(每组取6个视野的均值)。

**1.2.5 实时荧光定量PCR:** 依据Trizol试剂盒说明书所提供的方法抽提组织或细胞总RNA, 经PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix kit催化合成cDNA后, 采用SYBR-Green PCR Master Mix Kit经ABI PRISM 7700系统检测lncRNA TPT1-AS1的表达。lncRNA TPT1-AS1的正向引物序列为5'-AGGAGGCTATCCTTGCCCATC-3', 反向引物序列为5'-AATTGGAGGCCAGTGCTCTGAA-3'; GAPDH作为内参, 正向引物序列为5'-GCGACACCCACTCTCCA CCTTT-3', 反向引物序列为5'-TGCTGTAGCCAAATTCG



TTGTCATA-3'. 反应参数设置: 95 °C 变性60 sec, 45个循环(94 °C 30 sec, 62 °C 45 sec). 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析LncRNA TPT1-AS1的相对表达量.

**1.2.6 Western blot:** 各组细胞经过相应的处理后, 加RIPA裂解液于冰上裂解30 min并用橡胶刮轻柔刮取细胞蛋白. 采用BCA蛋白定量试剂盒定量后调整每组上样蛋白总量至60  $\mu$ g, 加入蛋白上样缓冲液煮沸变性后行十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)凝胶电泳. 电泳结束后采用200 mA恒电流将蛋白转移至PVDF膜. 用质量分数为5%的脱脂牛奶室温封闭膜2 h. 依据各抗体说明书的要求加入一抗4 °C 孵育过夜, 洗膜缓冲液(tris-buffered saline with tween 20, TBST)震荡洗涤5 min $\times$ 3次; 加入对应的二抗室温孵育2 h, TBST震荡洗涤10 min $\times$ 3次, 将含蛋白的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜转移至暗室中利用电化学发光法显影, 定影并冲洗胶片. 所得结果采用Image J行灰度半定量分析.

**统计学处理** 实验数据均录入SPSS 19.0软件中行统计学分析. 计量资料以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 两组计量资料的统计学差异分析采用 $t$ 检验, 多组计量资料间的统计学比较采用方差分析,  $P<0.05$ 表示结果有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 Linc RNATPT1-AS1在肝癌中的表达** 实时荧光定量PCR检测结果显示(图1A和B), 在12例肝癌患者中, 相较于配对癌旁正常组织, 肝癌组织中lncRNA TPT1-AS1的表达显著升高( $P = 0.036$ )(图1A); 在6次独立细胞实验中, 相较于人永生化肝细胞LO2, 肝癌细胞系Huh7、SMC-7721、HCCLM3和HepG2中lncRNA TPT1-AS1的表达均出现不同程度的升高(图1B).

**2.2 转染siRNA-TPT1-AS1对肝癌细胞HepG2侵袭及迁移的影响** 转染效率检测如图2A所示, 在6次独立细胞实验中, 转染siRNA-TPT1-AS1之后HepG2细胞中lncRNA TPT1-AS1的表达降低至对照组的 $0.38\pm 0.05$ 倍, 可用于后续实验.

划痕实验的结果如图2B和D所示, 在6次独立细胞实验中, Ctrl、si-NC和siRNA-TPT1-AS1组的迁移距离( $\mu$ m)分别为:  $156.2\pm 9.31$ 、 $161.3\pm 10.03$ 和 $122.6\pm 6.47$ . 同样, Transwell实验的结果显示(图2C和E), siRNA-TPT1-AS1组HepG2细胞的侵袭率显著降低至 $(73.12\pm 5.99)\%$ ( $P<0.05$ ). 结果显示siRNA-TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的侵袭及迁移.

**2.3 转染siRNA-TPT1-AS1对HepG2细胞 EMT进程的影响** Western blot的检测结果显示如图3所示, 在6次独立细

胞实验中, 转染siRNA-TPT1-AS1之后, HepG2细胞中上皮细胞标记物E-cadherin的表达显著增加( $P<0.05$ ), 而间质细胞标记物N-cadherin和vimentin的表达明显减少( $P<0.05$ ). 结果显示siRNA-TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的EMT进程.

**2.4 转染siRNA-TPT1-AS1对PI3K/AKT信号通路活性的影响** 本实验检测了细胞中PI3K/AKT信号通路的活性, 结果显示(图4), 在6次独立细胞实验中, 相对于Ctrl组, 转染siRNA-TPT1-AS1后, MMP-9、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ). 说明在HepG2细胞中转染siRNA-TPT1-AS1可明显抑制PI3K/AKT信号通路的活性以及下游MMP-9的表达.

## 3 讨论

研究表明, lncRNA TPT1-AS1作为一个新的长链非编码RNA, 在不同的肿瘤中可通过不同的方式影响肿瘤的发生发展; 但其在肝癌中的作用尚不清楚. 本实验通过实时荧光定量PCR初步检测了肝癌中lncRNA TPT1-AS1的表达, 结果显示在肝癌组织及肝癌细胞中, lncRNA TPT1-AS1的表达均出现不同程度的升高. 这一结果提示, lncRNA TPT1-AS1可能在肝癌进展中发挥重要作用.

既往研究显示<sup>[9-11]</sup>lncRNA TPT1-AS1可影响胃癌、卵巢癌以及结直肠癌等恶性肿瘤的转移, 本实验通过下调lncRNA TPT1-AS1的表达, 系统的研究了其对肝癌细胞HepG2侵袭及迁移能力的影响, 并进一步探讨了其作用机制. 划痕实验和Transwell细胞侵袭实验的结果显示, 转染siRNA-TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的侵袭及迁移. 上皮-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤的侵袭迁移密切相关, 如lncRNA TUG1即是通过miR-137/AKT2轴影响肝癌细胞的EMT进程, 进而促进肝癌细胞的侵袭及迁移<sup>[12]</sup>. lncRNA HEIH则可通过miR-119a-3p影响肝癌细胞Huh7和Hep3B中vimentin、MMP-2以及MMP-3的表达, 进而调控细胞的增殖及迁移<sup>[13]</sup>. 我们的研究发现, 转染siRNA-TPT1-AS1之后, HepG2细胞中上皮细胞标志物(E-cadherin)表达升高而间质细胞标记物(N-cadherin, vimentin)的表达则明显下降, 提示下调lncRNA TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的EMT进程.

细胞中有多条信号通路可影响肿瘤细胞的EMT进程、迁移与侵袭, 其中PI3K/Akt信号通路是一条多功能的经典信号通路, PI3K激活后磷酸化并激活AKT, 将其定位在质膜中, 进而通过AKT将信号传递到下游不同的靶点, 影响肿瘤细胞的增殖凋亡、侵袭迁移以及分化等生理过程<sup>[14,15]</sup>. Liu等<sup>[16]</sup>的研究显示, 在结直肠癌中, PI3K/AKT信号通路被激活后可促进核转录因

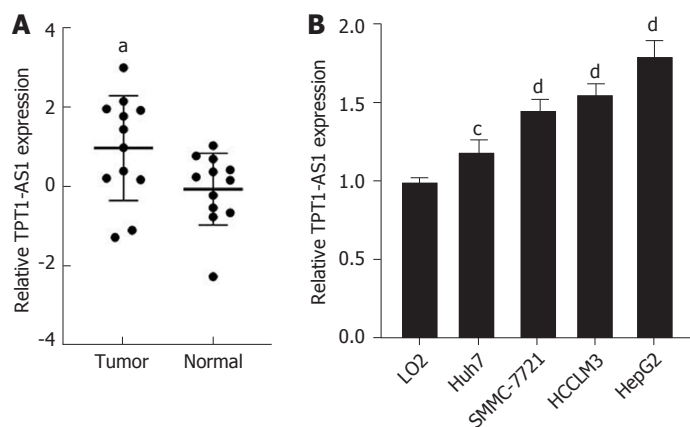


图 1 肝癌中lncRNA TPT1-AS1的表达情况. A: 肝癌组织和癌旁正常组织中lncRNA TPT1-AS1的表达水平, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 与癌旁正常组织比较; B: 人永生化的肝细胞LO2和肝癌细胞系中lncRNA TPT1-AS1的表达水平, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ 与LO2细胞比较.

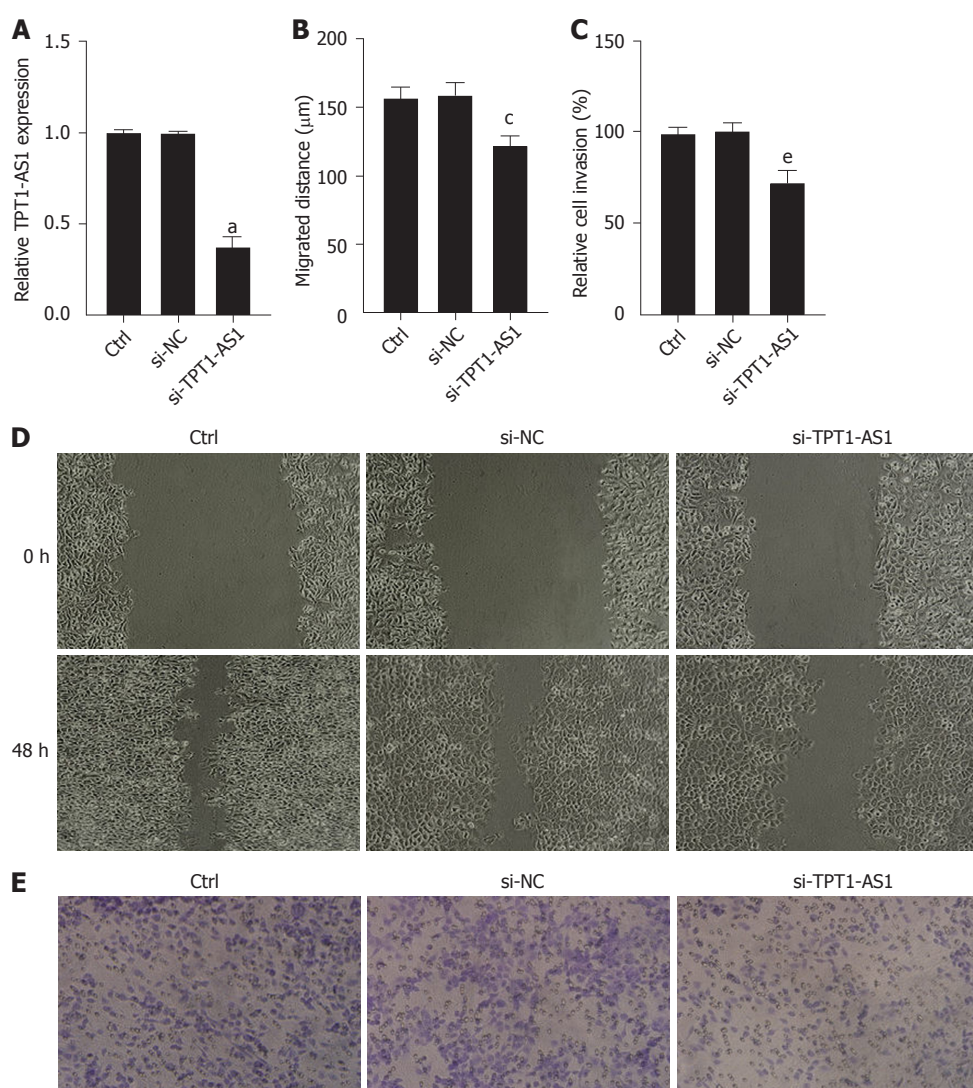


图 2 si-TPT1-AS1对HepG2细胞侵袭及迁移的影响. A: 转染效率检测, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 与对照组A比较; B和D: 划痕实验检测HepG2细胞的迁移(放大倍数100×), <sup>c</sup> $P < 0.05$ 与对照组B比较; C和E: transwell实验检测HepG2细胞的侵袭(放大倍数200×), <sup>e</sup> $P < 0.05$ 与对照组C比较.

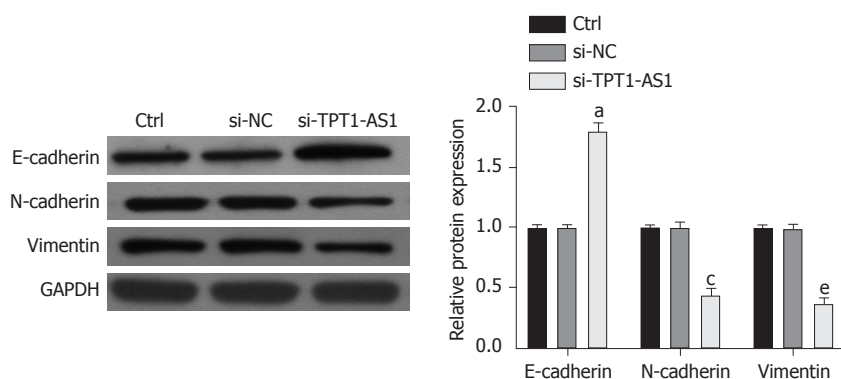


图 3 si-TPT1-AS1对HepG2细胞EMT进程的影响. <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>e</sup> $P<0.05$ 与对照组比较.

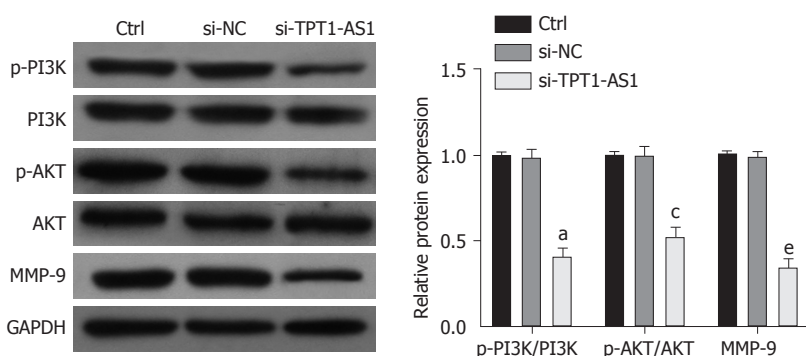


图 4 si-TPT1-AS1对HepG2细胞PI3K/AKT信号通路的影响. <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>e</sup> $P<0.05$ 与对照组比较.

子 $\kappa$ B(nuclear transcription factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)p65的活化及转位, 进而诱导EMT的发生. 在肝癌HepG2和HCCLM3细胞中, PI3K及AKT的磷酸化也是调控细胞EMT进程并影响细胞侵袭迁移的一个重要原因<sup>[17]</sup>. 故而本研究检测了LncRNA TPT1-AS1对PI3K/AKT信号通路的影响, 结果发现, 转染siRNA-TPT1-AS1后, p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达水平显著降低. Zhu等<sup>[18]</sup>研究表明PI3K/AKT的抑制剂LY294002可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞中MMP-2与MMP-9的表达. Li等<sup>[19]</sup>的研究也显示Bmi-1的过表达通过介导PTEN/PI3k/Akt和上调MMP-2和MMP-9的表达参与了肝细胞癌的转移和侵袭, 提示MMP-2与MMP-9可能受到PI3k/Akt信号通路调节. 本实验的检测结果也证实了在肝癌细胞HepG2中转染siRNA-TPT1-AS1可抑制MMP-9的表达. 以上结果提示下调LncRNA TPT1-AS1可能通过抑制HepG2细胞中PI3K/AKT信号通路的活性以及下游MMP-9的表达, 减少胞外基质的降解, 进而抑制细胞的EMT进程; 但是PI3K/AKT信号通路在其中的具体作用以及是否涉及其他信号通路和靶点还有待进一步深入的研究.

#### 4 结论

综上所述, LncRNA TPT1-AS1在肝癌组织及细胞中高表

达, 敲减LncRNA TPT1-AS1可抑制肝癌细胞HepG2的侵袭迁移, 其作用机制可能与抑制PI3K/AKT信号通路的活性以及下游MMP-9的表达, 进而影响细胞的EMT进程有关.

#### 文章亮点

##### 实验背景

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在肝癌中可发挥抑癌或促癌作用, 其有望成为肝癌诊疗的新靶点.

##### 实验动机

LncRNA TPT1-AS1在多种恶性肿瘤中异常高表达, 并可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭. 但, TPT1-AS1对肝癌细胞迁移和侵袭的影响尚不清楚.

##### 实验目标

研究TPT1-AS1对肝癌细胞迁移以及侵袭的影响, 以及潜在的机制.

##### 实验方法

用RT-qPCR检测肝癌组织与配对的癌旁组织样本、肝癌细胞系以及肝细胞LO2中LncRNA TPT1-AS1的表达.



以HepG2细胞为研究对象, 敲除TPT1-AS1后, 检测细胞迁移、侵袭、EMT进程以及PI3K/AKT信号活性。

## 实验结果

分别与癌旁组织或肝细胞LO2比较, lncRNA TPT1-AS1在肝癌组织样本和肝癌细胞系中表达增高。敲除TPT1-AS1后, HepG2细胞的迁移、侵袭、EMT进程以及PI3K/AKT信号活性均降低。

## 实验结论

敲除TPT1-AS1能抑制肝癌细胞的迁移、侵袭、EMT进程以及PI3K/AKT信号活性。

## 展望前景

靶向抑制TPT1-AS1可能是潜在的肝癌的治疗策略。

## 5 参考文献

- 1 Renganathan A, Felley-Bosco E. Long Noncoding RNAs in Cancer and Therapeutic Potential. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1008: 199-222 [PMID: 28815541 DOI: 10.1007/978-981-10-5203-3\_7]
- 2 Peng WX, Koirala P, Mo YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer. *Oncogene* 2017; 36: 5661-5667 [PMID: 28604750 DOI: 10.1038/onc.2017.184]
- 3 Lim LJ, Jin Y, Yang H, Chung AYP, Goh BKP, Chow PKH, Chan CY, Blanks WK, Cheow PC, Lee SY, Lim TKH, Chong SS, Ooi LLP, Lee CG. Network of clinically-relevant lncRNAs-mRNAs associated with prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Sci Rep* 2020; 10: 11124 [PMID: 32636408 DOI: 10.1038/s41598-020-67742-8]
- 4 Liu Y, Sharma S, Watabe K. Roles of lncRNA in breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 2015; 7: 94-108 [PMID: 25961689]
- 5 Chen R, Li WX, Sun Y, Duan Y, Li Q, Zhang AX, Hu JL, Wang YM, Gao YD. Comprehensive Analysis of lncRNA and mRNA Expression Profiles in Lung Cancer. *Clin Lab* 2017; 63: 313-320 [PMID: 28182363 DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160812]
- 6 Li Y, Ma D, Li T, Yin Y. Identification of functional long non-coding RNAs in gastric cancer by bioinformatics analysis. *Int J Exp Pathol* 2020; 101: 96-105 [PMID: 32608553 DOI: 10.1111/iep.12350]
- 7 Wu JH, Xu K, Liu JH, Du LL, Li XS, Su YM, Liu JC. LncRNA MT1JP inhibits the malignant progression of hepatocellular carcinoma through regulating AKT. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 6647-6656 [PMID: 32633354 DOI: 10.26355/eurev\_202006\_21651]
- 8 Lin C, Xiang Y, Sheng J, Liu S, Cui M, Zhang X. Long non-coding RNA CRNDE promotes malignant progression of hepatocellular carcinoma through the miR-33a-5p/CDK6 axis. *J Physiol Biochem* 2020; 76: 469-481 [PMID: 32621257 DOI: 10.1007/s13105-020-00754-0]

- 9 Tang J, Huang F, Wang H, Cheng F, Pi Y, Zhao J, Li Z. Knockdown of TPT1-AS1 inhibits cell proliferation, cell cycle G1/S transition, and epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Bosn J Basic Med Sci* 2021; 21: 39-46 [PMID: 32156253 DOI: 10.17305/bjbm.2020.4470]
- 10 Wu W, Gao H, Li X, Zhu Y, Peng S, Yu J, Zhan G, Wang J, Liu N, Guo X. LncRNA TPT1-AS1 promotes tumorigenesis and metastasis in epithelial ovarian cancer by inducing TPT1 expression. *Cancer Sci* 2019; 110: 1587-1598 [PMID: 30941821 DOI: 10.1111/cas.14009]
- 11 Zhang Y, Sun J, Qi Y, Wang Y, Ding Y, Wang K, Zhou Q, Wang J, Ma F, Zhang J, Guo B. Long non-coding RNA TPT1-AS1 promotes angiogenesis and metastasis of colorectal cancer through TPT1-AS1/NF90/VEGFA signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 2020; 12: 6191-6205 [PMID: 32248186 DOI: 10.18632/aging.103016]
- 12 Li W, Ge J, Xie J, Yang J, Chen J, He T. LncRNA TUG1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Migration and Invasion Via Targeting miR-137/AKT2 Axis. *Cancer Biother Radiopharm* 2020 [PMID: 32589479 DOI: 10.1089/cbr.2019.3297]
- 13 Wu MM, Shen WD, Zou CW, Chen HJ, Guo HM. LncRNA-HEIH suppresses hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis by up-regulating miR-199a-3p. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 6031-6038 [PMID: 32572917 DOI: 10.26355/eurev\_202006\_21497]
- 14 Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res* 2015; 5: 1602-1609 [PMID: 26175931]
- 15 Rahmani F, Ziaemehr A, Shahidsales S, Gharib M, Khazaei M, Ferns GA, Ryzhikov M, Avan A, Hassanian SM. Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Cell Physiol* 2020; 235: 4146-4152 [PMID: 31663122 DOI: 10.1002/jcp.29333]
- 16 Liu W, Wang S, Sun Q, Yang Z, Liu M, Tang H. DCLK1 promotes epithelial-mesenchymal transition via the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2018; 142: 2068-2079 [PMID: 29277893 DOI: 10.1002/ijc.31232]
- 17 Sun C, Zhang Z, He P, Zhou Y, Xie X. Involvement of PI3K/Akt pathway in the inhibition of hepatocarcinoma cell invasion and metastasis induced by SASH1 through downregulating Shh-Gli1 signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 89: 95-100 [PMID: 28600143 DOI: 10.1016/j.biocel.2017.06.006]
- 18 Zhu W, Wu X, Yang B, Yao X, Cui X, Xu P, Chen X. miR-188-5p regulates proliferation and invasion via PI3K/Akt/MMP-2/9 signaling in keloids. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2019; 51: 185-196 [PMID: 30668826 DOI: 10.1093/abbs/gmy165]
- 19 Li X, Yang Z, Song W, Zhou L, Li Q, Tao K, Zhou J, Wang X, Zheng Z, You N, Dou K, Li H. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol* 2013; 43: 793-802 [PMID: 23807724 DOI: 10.3892/ijo.2013.1992]

科学编辑: 张砚梁 制作编辑: 张砚梁







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

