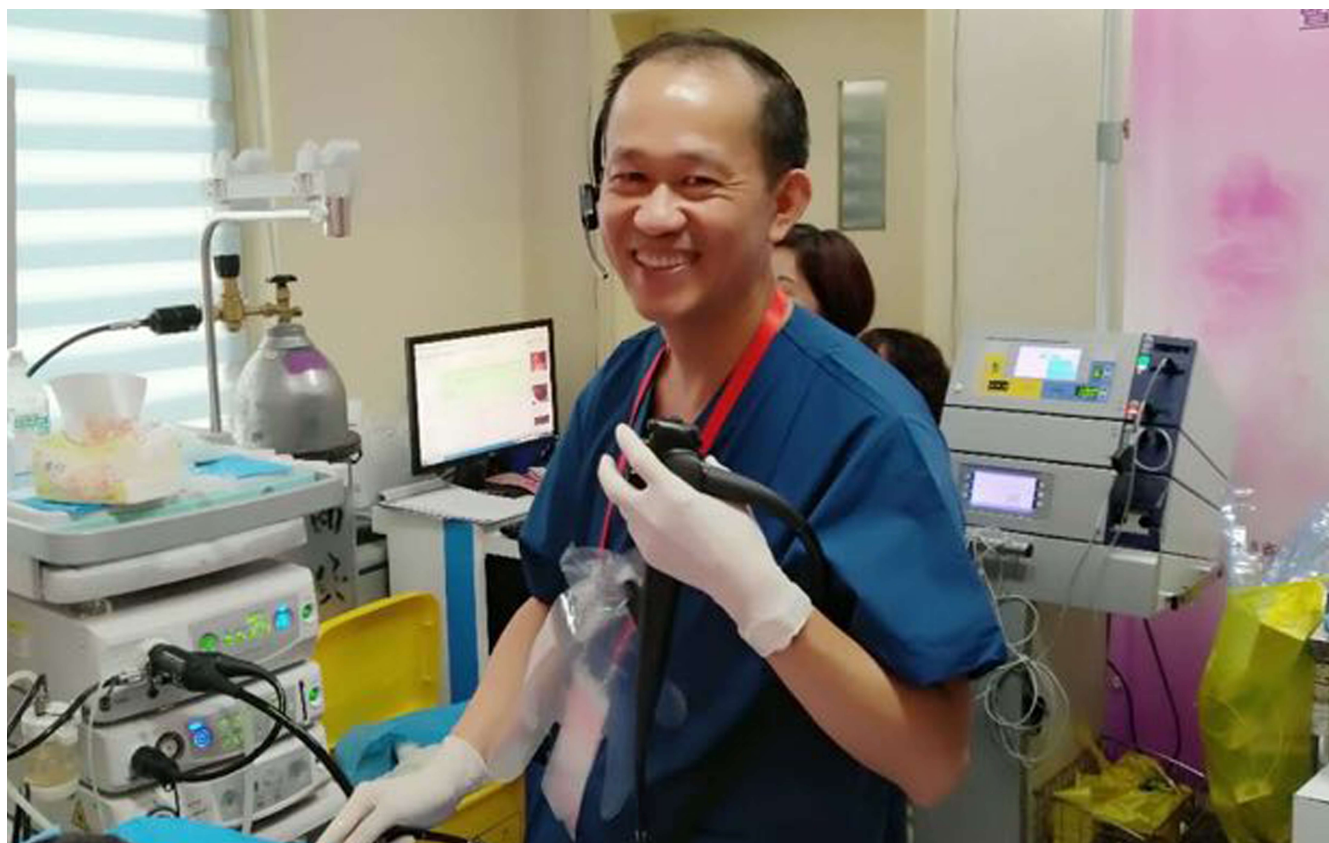


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2019 年 7 月 28 日 第 27 卷 第 14 期 (Volume 27 Number 14)



14/2019

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

- 851 肠道血流的CT和MRI评估

任小军

基础研究

- 857 下调MiR-221对胃癌顺铂耐药细胞增殖及顺铂敏感性的影响及其相关机制

徐丽娜, 金莉娜

- 864 miR-567靶向TRPM8调控结直肠癌细胞增殖凋亡的分子机制

杨庆华, 陈栋

临床研究

- 872 CBX2蛋白在胃癌中的表达水平及临床意义

何怡岚, 张波

- 878 剪切波超声弹性成像测定脂肪肝患者颈动脉斑块硬度及其与血脂水平相关性

欧阳骏, 张心荣, 王小伟

- 883 抗*H. pylori*治疗对胆石症患者胆汁*H. pylori* DNA、PLA₂活性及免疫功能的影响

朱蔓然, 宁雪莲, 姚卫民, 郭勇杭, 何丽娟, 卢如相

- 889 体部立体定向放射治疗结肠癌伴肺转移的临床特点Meta分析

刘海源, 雷鑫明

文献综述

- 898 泄泻肝气乘脾证的研究进展

刘娅薇, 惠华英, 谭周进

- 903 胆囊癌的分子基因学研究进展

杨敏丽, 戴树龙

- 907 肠道产丁酸菌防治炎症性肠病的机制研究进展

陈映宇, 毛联智, 刘华缓, 孙素霞

消 息

- 856 《世界华人消化杂志》栏目设置
877 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
897 《世界华人消化杂志》外文字符标准
902 《世界华人消化杂志》修回稿须知

封面故事

孔德润, 男, 教授, 博导. 安徽医科大学第一附属医院消化内科主任医师, 病区主任, 中华医学会介入与微创学组委员、中国医促会门静脉高压学组委员、安徽省食管与胃静脉曲张学组副组长、安徽省医师协会消化病分会委员、安徽省学术与技术带头人、安徽省卫健委青年领军人才. 主要研究肝硬化食管胃静脉曲张出血内镜诊治技术、消化道早癌的内镜下诊治技术、TIPS治疗肝硬化门脉高压静脉曲张出血和顽固性腹水. 主持国家自然科学基金等科研课题10余项, 以第一作者或通讯作者在*Endoscopy*, *PLOS one*, *World J Gastroenterol*等发表论文100余篇.

本期责任人

编务 李香; 送审编辑 崔丽君; 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 马亚娟; 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 2019-07-28

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

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

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

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

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

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjgd@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

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

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: 010-85381892

传真: 010-85381893

《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

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 27 Number 14 Jul 28, 2019

EDITORIAL

- 851 CT and MRI assessment of intestinal blood flow

Ren XJ

BASIC RESEARCH

- 857 Effect of down-regulation of miR-221 on cell proliferation and cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant gastric cancer cells and underlying mechanism

Xu LN, Jin LN

- 864 MiR-567 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting TRPM8

Yang QH, Chen D

CLINICAL RESEARCH

- 872 Clinical significance of expression of CBX2 in gastric cancer

He YL, Zhang B

- 878 Assessment of carotid plaque hardness in patients with fatty liver by shear wave elastography: Correlation with blood lipid levels

Ouyang J, Zhang XR, Wang XW

- 883 Effect of anti-*Helicobacter pylori* therapy on bile *H. pylori* DNA and PLA₂ activity and immune function in patients with cholelithiasis

Zhu MR, Ning XL, Yao WM, Guo YH, He LJ, Lu RX

- 889 A meta-analysis of stereotactic radiotherapy for pulmonary oligometastases from colorectal cancer

Liu HY, Lei XM

REVIEW

- 898 Progress in research of syndrome of diarrhea with Ganqi Chengpi

Liu YW, Hui HY, Tan ZJ

- 903 Advances in research of molecular genetics of gallbladder cancer

Yang ML, Dai SL

- 907 Mechanism of gut butyric acid producing bacteria for prevention and treatment of inflammatory bowel disease

Chen YY, Mao LZ, Liu HH, Sun SX

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 27 Number 14 Jul 28, 2019

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Kong de-run, male, professor, Ph.D, Chief Physician, Ward director. Department of Gastroenterology, The first Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Jixi Road 218, Hefei 230022, Anhui 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: *Xiang Li* Review Editor: *Li-Jun Cui* Electronic Editor: *Ji-Hong Liu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Proof Editor: *Ya-Juan Ma* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date July 28, 2019

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

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

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

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

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang 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

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

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

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2019 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-567靶向TRPM8调控结直肠癌细胞增殖凋亡的分子机制

杨庆华, 陈 栋

杨庆华, 义乌市中心医院肛肠科 浙江省义乌市 322000

陈栋, 浙江大学医学院附属第一医院肛肠外科 浙江省杭州市 310003

杨庆华, 主治医师, 研究方向为肛肠肿瘤的分子学机制.

作者贡献分布: 此课题由杨庆华与陈栋设计; 研究过程、数据分析及论文写作由杨庆华与陈栋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈栋提供.

通讯作者: 杨庆华, 主治医师, 322000, 浙江省义乌市江东街道699号, 义乌市中心医院肛肠科. eih93578995zhish@163.com
电话: 0579-85209668

收稿日期: 2019-04-03

修回日期: 2019-05-29

接受日期: 2019-07-15

在线出版日期: 2019-07-28

MiR-567 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting TRPM8

Qing-Hua Yang, Dong Chen

Qing-Hua Yang, Department of Anorectal Surgery, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China

Dong Chen, Department of Anorectal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Qing-Hua Yang, Chief Physician, Department of Anorectal Surgery, Yiwu Central Hospital, 699 Jiangdong Street, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China. eih93578995zhish@163.com

Received: 2019-04-03

Revised: 2019-05-29

Accepted: 2019-07-15

Published online: 2019-07-28

Abstract

BACKGROUND

The role of miRNAs in cancer is increasingly becoming a hot research topic. There have been relatively few studies on miR-567 in cancer, and its functional role in colorectal cancer (CRC) is still little understood.

AIM

To investigate the effect of miR-567 on proliferation and apoptosis of CRC cells and the underlying mechanism.

METHODS

qRT-PCR was used to detect the expression of miR-567 and transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) in the CRC cell lines SW480, SW1116, and HT29 as well as in the normal colorectal epithelial cell line NCM460. SW480 cells were transfected with miR-NC, miR-567 mimic, si-NC, si-TRPM8, miR-567 + pcDNA, or miR-567 + pcDNA-TRPM8 by using the liposome method. Cell proliferation was detected by MTT assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry; protein expression of TRPM8, CyclinD1, p21, p23, Bcl-2, Bax, and cleaved Capase-3 was detected by Western blot; and the fluorescence activity was detected by double luciferase reporter gene assay.

RESULTS

Compared with normal colonic epithelial cells (NCM460), the expression of miR-567 was significantly decreased in CRC cells, and the

expression of TRPM8 was significantly increased. Overexpression of miR-567 or inhibition of TRPM8 inhibited the proliferation and promoted apoptosis of SW480 cells. MiR-567 can inhibit the fluorescence activity of wild-type TRPM8 cells and negatively regulate the expression of TRPM8, while overexpression of TRPM8 reversed the proliferation inhibition and apoptosis-promoting effect of miR-567 overexpression in SW480 cells.

CONCLUSION

MiR-567 can inhibit the proliferation of CRC cells and promote their apoptosis via a mechanism possibly related to the targeting of TRPM8. This finding will provide a new direction for the prevention and treatment of CRC.

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: miR-567; TRPM8; Colorectal cancer; Proliferation; Apoptosis

Yang QH, Chen D. MiR-567 regulates proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting TRPM8. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2019; 27(14): 864-871
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i14/864.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i14.864>

摘要

背景

miRNA在癌症中的作用日益成为研究的热点, miR-567在癌症中的研究相对较少, 其在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的功能作用尚缺乏参考。

目的

研究miR-567对CRC细胞增殖、凋亡的影响及其机制。

方法

运用qRT-PCR法检测CRC细胞SW480、SW1116、HT29和正常结直黏膜上皮细胞NCM460中miR-567、瞬时受体电位8(transient receptor potential melastatin 8, TRPM8)的表达; 将miR-NC组(转染miR-NC)、miR-567组(转染miR-567 mimics)、si-NC组(转染si-NC)、si-TRPM8组(转染si-TRPM8)、miR-567+pcDNA组(共转染miR-567和pcDNA)、miR-567+pcDNA-TRPM8组(共转染miR-567和pcDNA-TRPM8), 用脂质体法转染至SW480细胞。MTT法检测细胞的增殖; 流式细胞术检测细胞的凋亡; Western blot检测细胞中TRPM8、CyclinD1、p21、p23、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3的蛋白表达; 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。

结果

与正常结直黏膜上皮细胞NCM460相比, CRC细胞中miR-567的表达明显降低, TRPM8的表达明显升高; 过表达miR-567或抑制TRPM8均可抑制SW480细胞的增殖, 促进其凋亡; miR-567可抑制野生型TRPM8细胞的荧光活性, 并负向调控TRPM8的表达; 过表达TRPM8逆转了过表达miR-567对SW480细胞的增殖抑制和凋亡促进作用。

结论

miR-567可抑制CRC细胞的增殖, 促进凋亡, 其机制与靶向TRPM8有关, 将可为CRC的预防和治疗提供新方向。

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: miR-567; TRPM8; 结直肠癌; 增殖; 凋亡

核心提要: miR-567在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中具有抑制癌细胞增殖, 促进癌细胞凋亡的功能, 瞬时受体电位8(transient receptor potential melastatin 8, TRPM8)的敲减具有抑制CRC细胞增殖, 促进凋亡的功能, 二者之间具有miR-567靶向抑制TRPM8表达的关系。

杨庆华, 陈栋. miR-567靶向TRPM8调控结直肠癌细胞增殖凋亡的分子机制. *世界华人消化杂志* 2019; 27(14): 864-871
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i14/864.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i14.864>

0 引言

miRNA为长度在18-25个核苷酸之间的短链非编码内源性保守的微小RNA分子, 其参与人类的多种疾病的发生发展, 尤其是肿瘤^[1]. 目前发现大量miRNA参与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的恶性化进程, 但miR-567在CRC中的功能国内外研究甚少. 瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)阳离子通道超家族在多种过程中起关键作用, 包括温度感知、疼痛转导、血管舒张、男性生育能力和肿瘤发生^[2]. TRP是七个离子通道超家族中的家族之一, TRPM家族包括八个结构和功能多样化的通道. 在TRPM亚科的所有成员中, TRPM8是最重要的成员^[3]. 许多文献已经证明, 瞬时受体电位8(transient receptor potential melastatin 8, TRPM8)由具有3312个核苷酸的开放阅读框的cDNA编码, 其编码1104个氨基酸的蛋白质, 分子量为128 kDa, 六通跨膜蛋白, 跨膜结构域S5和S6之间的长链段形成该四聚体蛋白的推定孔环^[4,5]. TRPM8在多种肿瘤中广泛异常表

达, 调控肿瘤的增殖、凋亡、迁移、侵袭和转移等生物学行为^[6]. 但其在CRC中的作用及调控机制尚未有人报道. 本研究拟以CRC细胞SW480为研究对象, 检测其中miR-567、TRPM8的表达, 观察过表达miR-567、抑制TRPM8对SW480细胞增殖、凋亡的影响, 揭示其机制与miR-567靶向调控TRPM8有关, 将为CRC的治疗研究提供新靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 CRC细胞SW480(编号: CVCL_0546)、SW1116(编号: CVCL_0544)、HT29(编号: CVCL_0320)和正常结直黏膜上皮细胞NCM460(编号: CVCL_0460)购自ATCC; DMEM培养基、胎牛血清、MTT、胰蛋白酶均购自美国Selleck公司; LipofectamineTM2000、BCA蛋白定量试剂盒、ECL发光液、RIPA蛋白裂解液、逆转录试剂盒购自大连Takara公司; 小鼠抗大鼠TRPM8、CyclinD1、p21、p23、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠二抗购自北京中山生物公司; PVDF膜购自德国罗氏公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司; Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝公司; 半干转膜仪购自美国BIO-RAD公司; ABI 7500型实时荧光定量PCR系统购自美国ABI公司; Genesys 10紫外分光光度计购自美国Thermo公司; 细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司; PCR 仪购自美国BIO-RAD公司. miR-NC、miR-567 mimics、si-NC、si-TRPM8序列的设计和合成均由上海吉玛生物公司完成

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将CRC细胞SW480、SW1116、HT29和正常结直黏膜上皮细胞NCM460用含10%胎牛血清的DMEM培养基, 置于37℃, 5%CO₂的恒温培养箱中常规培养, 待细胞生长至融合度75%左右, 用胰蛋白酶消化约1 min, 按照1:3的比例更换培养基, 每2 d传代一次.

1.2.2 细胞转染与分组: 将miR-NC、miR-567 mimics、si-NC、si-TRPM8、miR-NC+pcDNA、miR-567 mimics+pcDNA-TRPM8按照脂质体LipofectamineTM2000的说明书转染至SW480细胞, 分别标记为miR-NC组、miR-567组、si-NC组、si-TRPM8组、miR-NC+pcDNA组、miR-567+pcDNA-TRPM8组, 转染6 h后, 更换为新鲜培养基继续培养48 h, 用qRT-PCR法检测转染效率. 转染成功后, 用于后续试验.

1.2.3 qRT-PCR实验检测细胞中miR-567、TRPM8的表达: 取适量对数生长期1.2.2各组细胞, 遵照RNA抽提试剂盒说明书要求操作提取RNA, 进行定量, 然后按逆转录试剂盒按照说明书操作合成cDNA. 最后按qRT-PCR

试剂盒说明书操作进行miR-567、TRPM8的检测. 以U6、GAPDH为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-567、TRPM8的mRNA表达.

1.2.4 Western blot实验检测细胞中TRPM8、CyclinD1、p21、p23、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3的蛋白表达: 取适量对数生长期1.2.2各组细胞, RIPA裂解后用BCA进行定量, 变性离心后取上清进行蛋白上样. 按照Western blot实验常规操作流程进行电泳-转膜-封闭-I抗(TRPM8、CyclinD1、p21、p23、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3稀释倍数均为1:1000)孵育-II抗(TRPM8、CyclinD1、p21、p23、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3稀释倍数均为1:10000)孵育-显影曝光. Image J分析目的条带的灰度值, 以目的条带灰度值与GAPDH灰度值的比值表示目的蛋白的表达.

1.2.5 MTT法检测细胞增殖: 取适量细胞, 加入20 μ L 5 g/L的MTT溶液, 培养4 h, 然后弃去上清, 每孔加入150 μ L DMSO, 震荡, 使结晶溶解, 在490 nm波长下检测细胞吸光度(A). 每个样品做3个平行实验, 实验重复3次.

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡: 用500 μ L的Binding Buffer悬浮细胞, 分别加入5 μ L的Annexin V-FITC避光反应20 min后再加入5 μ L的PI避光反应20 min, 用300目铜筛过滤, 最后在1 h内上流式细胞仪结束检测. 细胞的凋亡率(%)早期凋亡率+晚期凋亡率. 每个样品做3个平行实验, 实验重复3次.

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞中miR-567与TRPM8的结合力: 化学合成的目的基因序列(TRPM8-WT)和突变序列(TRPM8-MUT)的两端加上Xho I 和Not I 酶切位点, 由吉玛公司合成, 再将其克隆到PUC-T载体. 然后用Xho I 和Not I 酶切目的片段2 h, 进行琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化酶切产物. psiCHECK-2载体也用同样的方法回收线性化的目的片段. 将连接目的序列与psiCHECK-2载体, 加入至冰浴的DH5 α 感受态细胞中, 42℃水浴热休克60 s, 快速将管转移至冰上, 静置3 min. 然后加入500 μ L LB液体培养基, 在37℃的摇床上200 r/min振荡培养1 h. 将菌液涂抹在含氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37℃培养过夜. 次日, 挑取单个菌落克隆, 再次进行电泳、测序鉴定, 保留所需克隆株, 并用含氨苄青霉素的LB液体培养基扩大培养, 提取质粒DNA. 取适量对数生长期的细胞, 遵照双荧光素酶报告基因检测试剂盒技术手册要求操作. psiCHECK2载体以萤火虫荧光素酶活性为内参, psiCHECK2-TRPM8-3' UTR WT和psiCHECK2-TRPM8-3' UTR MUT的表达为对照, 转染24 h后, 检测荧光强度. 海參荧光素酶的发光强度与萤火虫荧光素酶发光强度的比值即反应miR-567与TRPM8的结合力.

统计学处理 实验中所有数据均采用SPSS 21.0软件进行分析. 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 miR-567和TRPM8在CRC SW480、SW1116、HT29细胞和正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460中的表达 结果如图1所示, 与NCM460组相比, SW480、SW1116、HT29组细胞中miR-567表达显著降低, TRPM8的mRNA和蛋白表达均显著升高($P < 0.05$).

2.2 miR-567过表达对CRC SW480细胞增殖的影响 结果如图2所示, 与miR-NC组相比, miR-567组SW480细胞中miR-567表达显著升高, 细胞活性显著降低, 细胞中CyclinD1的蛋白表达量显著降低, p21、p23的蛋白表达量显著升高($P < 0.05$).

2.3 miR-567过表达对CRC SW480细胞凋亡的影响 结果如图3所示, 与miR-NC组相比, miR-567组SW480细胞的凋亡率显著升高, 细胞中Bcl-2的蛋白表达量显著降低, Bax、Cleaved-caspase-3的蛋白表达量显著升高($P < 0.05$).

2.4 抑制TRPM8表达对CRC SW480细胞增殖和凋亡的影响 结果如图4所示, 与si-NC组相比, si-TRPM8组SW480细胞中TRPM8蛋白表达量显著降低, 细胞活性显著降低, 细胞凋亡率显著升高, 细胞中CyclinD1、Bcl-2的蛋白表达量显著降低, p21、Bax的蛋白表达量显著升高($P < 0.05$).

2.5 miR-567靶向调控TRPM8的表达 运用miRcode数据库预测到 miR-567与TRPM8 3'UTR存在结合位点(图5A); 双荧光素酶活性检测结果显示, 与miR-NC组相比, miR-567组WT-TRPM8细胞中荧光活性显著降低, MUT-TRPM8细胞中荧光活性不受影响(图5B); 与miR-NC组相比, miR-567组细胞中TRPM8表达显著降低, 与anti-miR-NC组相比, anti-miR-567组细胞中TRPM8表达显著升高(图5C和D, $P < 0.05$).

2.6 TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对CRC SW480细胞增殖、凋亡的作用 结果如图6所示, 与miR-NC组相比, miR-567组SW480细胞中TRPM8的蛋白表达量显著降低, 细胞活性显著降低, 细胞凋亡率显著升高, 细胞中CyclinD1、Bcl-2的蛋白表达量显著降低, p21、Bax的蛋白表达量显著升高; 与miR-NC+pcDNA组相比, miR-567+pcDNA-TRPM8组SW480细胞中TRPM8的蛋白表达量显著升高, 细胞活性显著升高, 细胞凋亡率显著降低, 细胞中CyclinD1、Bcl-2的蛋白表达量显著升高, p21、Bax的蛋白表达量显著降低($P < 0.05$).

3 讨论

miRNA在肿瘤领域的研究已成为热点, 其通过抑制靶基因的转录或蛋白翻译, 参与肿瘤的发生发展调控^[7]. miR-567在癌症中的作用研究甚少, 目前仅在胰腺癌和乳腺癌中报道发挥抑制肿瘤进一步恶化的作用^[8]. 有研究报道, 在CRC的研究中采用回归模型来鉴定明显相关的miRNA, 其靶向通常涉及结肠直肠癌微卫星不稳定性及染色体不稳定性途径的候选基因发现, SMAD4与CRC组织中的miR-567呈正相关^[9], 而SMAD4在CRC中表达异常降低, 且与患者的预后差显著相关^[10], 因此推测miR-567在CRC中也呈低表达. El-Murr等^[11]在CRC的研究中发现, hsa-miR-567在80%的CRC中发生双等位基因突变, 提示miR-567在结直肠中具有潜在的调控功能. 本研究通过qRT-PCR法检测了CRC细胞SW480、SW1116、HT29和正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460中miR-567的表达发现, miR-567在CRC细胞中的表达均异常降低, 这与人体的研究和我们的推测均相一致, 正式报道, miR-567在CRC细胞中的异常表达; 进一步研究发现, 过表达miR-567可抑制CRC细胞增殖, 促进其增殖, 这揭示了miR-567对CRC细胞表型增殖、凋亡的抑制作用, 为体内研究miR-567对CRC生长的影响奠定基础. 深入研究, 通过生物信息学、双荧光素酶报告基因检测实验验证miR-567可靶向调控TRPM8, 为研究miR-567在CRC中的调控机制提供参考. 我们还推测miR-567的功能可能与SMAD4也存在一定的相关性.

TRPM8在脊椎动物和无脊椎动物中发挥多种功能, 其除了在冷感中众所周知的功能外, TRPM8还在各种生物系统中发挥作用, 包括体温调节, 癌症, 膀胱功能和哮喘^[2,12]. 最近的研究表明, TRPM8对于肿瘤的发生和发展是必需的, 并且TRPM8的异常表达在多种肿瘤中发现, 例如前列腺肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌和结肠直肠癌, 使其成为一种新颖的分子靶标可能有助于癌症的诊断和治疗^[13,14]. Borrelli等^[15]在CRC的研究中发现, 通过电穿孔进行TRPM8的小发夹RNA-载体沉默具有与大麻素相同的在体内外抑制CRC细胞和肿瘤的生长功能, 提示TRPM8抑制剂具有治疗CRC的潜力. 本研究通过qRT-PCR和Western blot检测了CRC细胞中TRPM8的表达发现, TRPM8在CRC细胞中表达异常升高, 这与TRPM8在其他癌症中的高表达的验证结果相呼应, 证实了TRPM8在CRC细胞中的异常高表达; 进一步研究发现, 抑制TRPM8具有与过表达miR-567同样的抑制CRC细胞增殖, 促进其凋亡的作用, 深入研究发现, 过表达TRPM8可逆转过表达miR-567对CRC的增殖抑制和凋亡促进作用, 这不仅验证了miR-567可靶向负调控

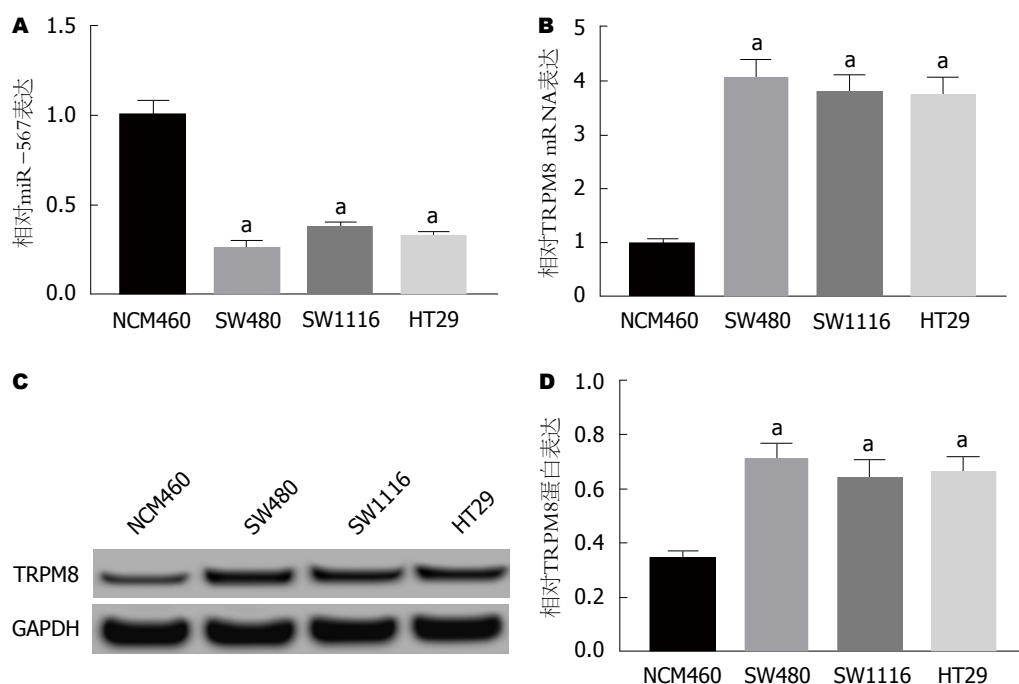


图 1 miR-567和TRPM8在结直肠癌细胞中的表达. A: miR-567在结直肠癌SW480、SW1116、HT29细胞和正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460中的表达; B: TRPM8 mRNA在结直肠癌SW480、SW1116、HT29细胞和正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460中的表达; C和D: TRPM8蛋白在结直肠癌SW480、SW1116、HT29细胞和正常结直肠黏膜上皮细胞NCM460中的表达. * $P < 0.05$, 与NCM460组相比.

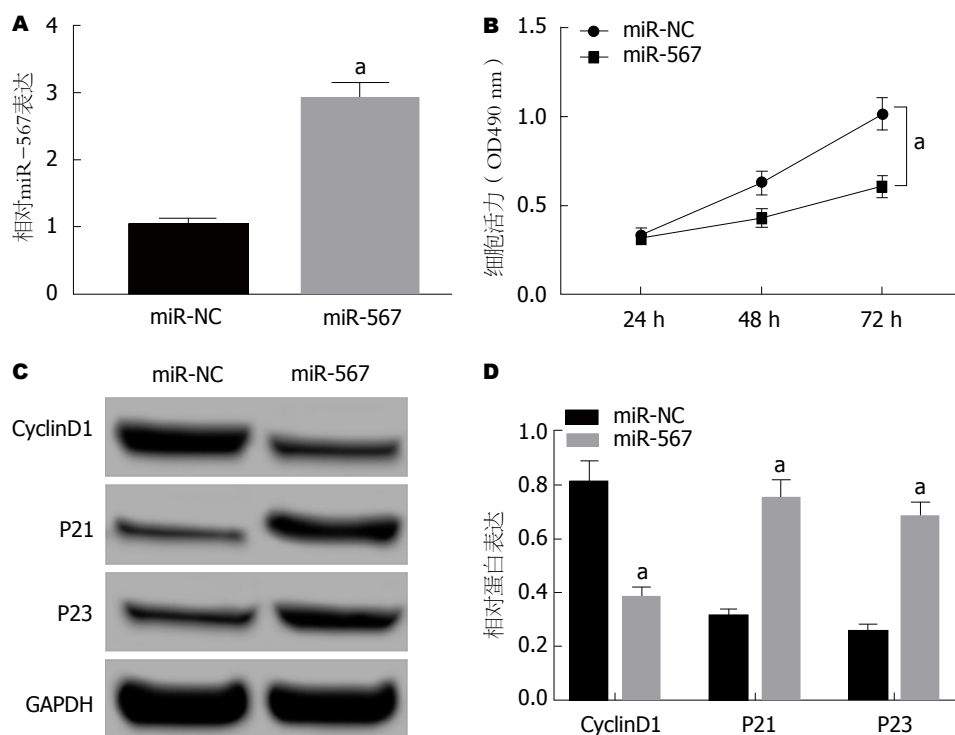


图 2 miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖的影响. A: miR-567相对表达量; B: miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖的影响; C和D: miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖相关蛋白表达的影响. * $P < 0.05$, 与miR-NC组相比.

TRPM8, 反过来, TRPM8也可以负向调控miR-567的表达和功能. 这为miR-567在CRC中的功能机制的探索提供实验依据.

总之, miR-567可抑制CRC细胞的增殖, 促进凋亡, 其机制与靶向负调控TRPM8相关, 为CRC的治疗提供新靶点.

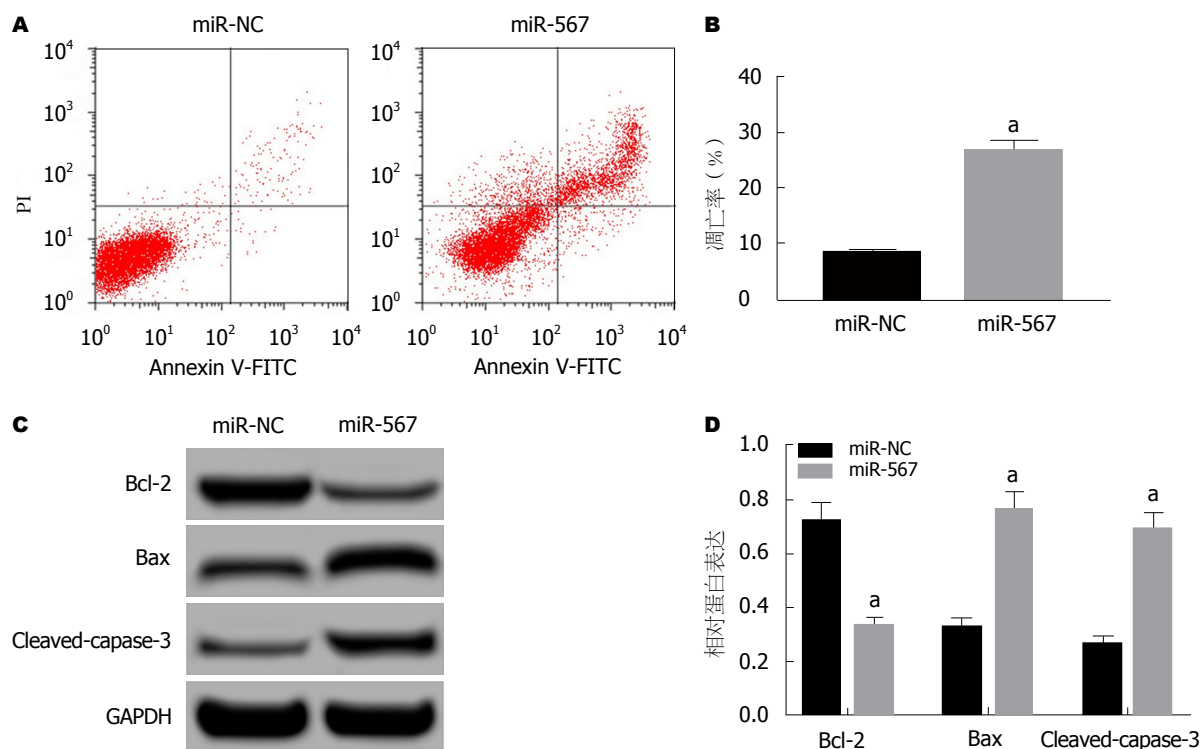


图 3 miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞凋亡的影响. A: 细胞凋亡流式图; B: miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞凋亡的影响; C和D: miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞凋亡相关蛋白表达的影响. * $P < 0.05$, 与miR-NC组相比.

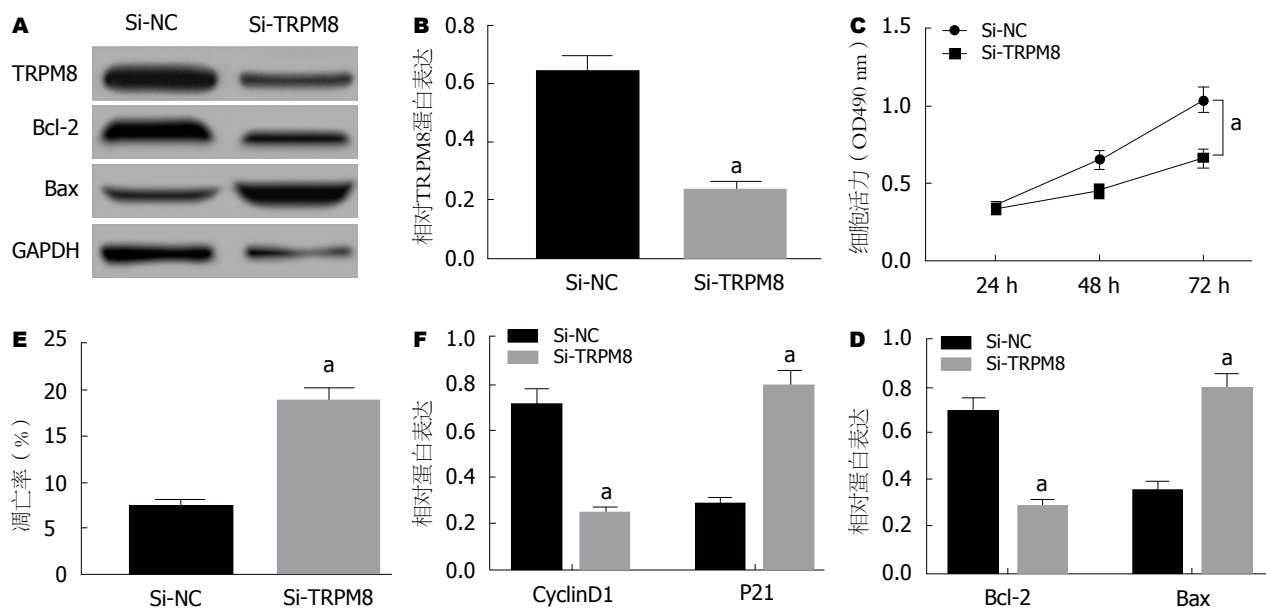


图 4 抑制TRPM8表达对结直肠癌SW480细胞增殖和凋亡的影响. A: 蛋白电泳图; B: TRPM8蛋白表达; C: 抑制TRPM8表达对结直肠癌SW480细胞增殖的影响; D: 抑制TRPM8表达对结直肠癌SW480细胞凋亡的影响; E: 抑制TRPM8表达对结直肠癌SW480细胞增殖相关蛋白表达的影响; F: 抑制TRPM8表达对结直肠癌SW480细胞凋亡相关蛋白表达的影响. * $P < 0.05$, 与si-NC组相比.

文章亮点

实验背景

近期miRNA通过靶向下游因子, 调节癌症细胞的细胞表型或肿瘤的恶化已成为研究的热点. 但miR-567对结

直肠癌(colorectal cancer, CRC)的作用机制国内外研究甚少.

实验动机

本研究旨在研究miR-567对CRC细胞增殖、凋亡的影

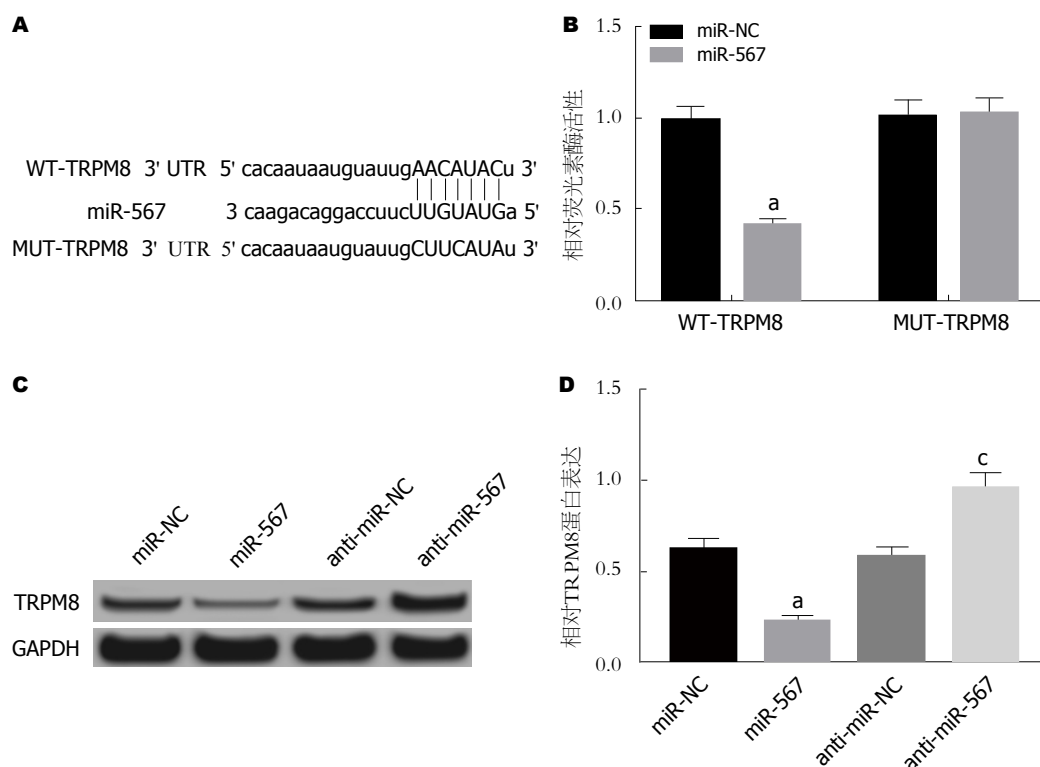


图 5 miR-567-3p靶向调控TRPM8的表达。A: TRPM8的3'UTR中含有与miR-567互补的核苷酸序列; B: 双荧光素酶报告实验; C和D: miR-567调控TRPM8蛋白的表达。* $P < 0.05$, 与miR-NC组相比, * $P < 0.05$, 与anti-miR-NC组相比。

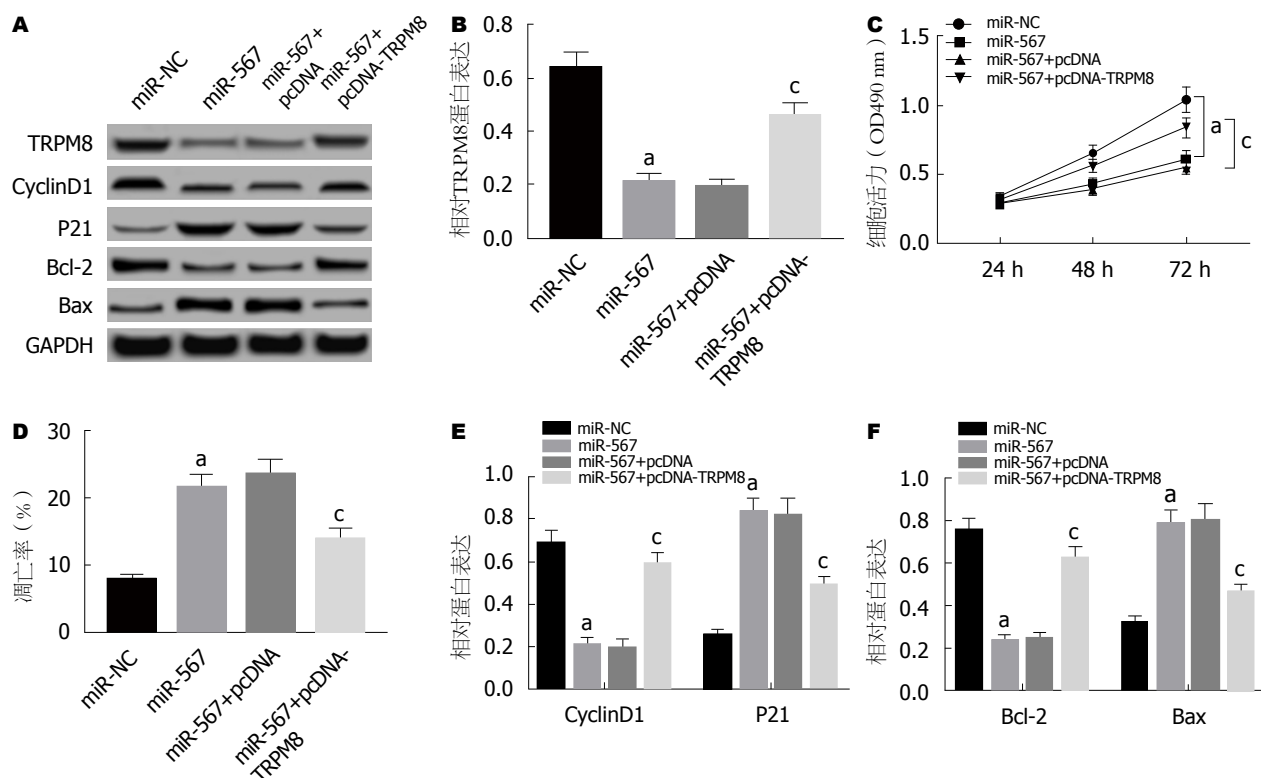


图 6 TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖、凋亡的作用。A: 蛋白电泳图; B: TRPM8蛋白表达; C: TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖的作用; D: TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞凋亡的作用; E: TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞增殖相关蛋白表达的作用; F: TRPM8过表达逆转了miR-567过表达对结直肠癌SW480细胞凋亡相关蛋白表达的作用。* $P < 0.05$, 与miR-NC组相比, * $P < 0.05$, 与miR-567+pcDNA组相比。

响, 并探讨其分子作用机制, 以期望为解决CRC靶向治疗的问题提供新线索.

实验目标

探讨miR-567抑制CRC细胞增殖, 促进凋亡的作用, 及其机制, 以期对CRC的治疗提供新方向.

实验方法

将CRC细胞SW480随机分成miR-NC组、miR-567组、si-NC组、si-瞬时受体电位8(transient receptor potential melastatin 8, TRPM8)组、miR-NC+pcDNA组、miR-567+pcDNA-TRPM8组, 用MTT法、流式细胞术分析miR-567对CRC细胞增殖、凋亡的影响, 双荧光素酶报告基因检测实验验证miR-567与TRPM8的靶向关系.

实验结果

本研究成功构建过表达miR-567和沉默TRPM8的CRC细胞发现, CRC细胞增殖能力减弱, 凋亡能力增强, 同时miR-567靶向调控TRPM8, 且回复TRPM8又能反向调控miR-567.

实验结论

miR-567可抑制CRC细胞的增殖, 促进凋亡, 其可能与靶向TRPM8有关, 提示miR-567可作为CRC细胞治疗的潜在靶点.

展望前景

本研究仅在体外研究miR-567对CRC细胞增殖、凋亡的调控, 后期还需增加miR-567在裸鼠体内对CRC肿瘤的生长对比实验, 以更清晰的展示miR-567对CRC细胞的治疗价值, 也为miR-567的靶向治疗提供更充分的理论依据.

4 参考文献

- 1 Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol* 2017; 1509: 1-10 [PMID: 27826912 DOI: 10.1007/978-1-4939-6524-3_1]
- 2 Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R.

- Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol Membr Biol* 2009; 26: 146-158 [PMID: 19115145 DOI: 10.1080/09687680802612721]
- 3 Valero ML, Mello de Queiroz F, Stühmer W, Viana F, Pardo LA. TRPM8 ion channels differentially modulate proliferation and cell cycle distribution of normal and cancer prostate cells. *PLoS One* 2012; 7: e51825 [PMID: 23251635 DOI: 10.1371/journal.pone.0051825]
- 4 DeFalco J, Duncton MA, Emerling D. TRPM8 biology and medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 2237-2252 [PMID: 21671871 DOI: 10.2174/156802611796904933]
- 5 Asuthkar S, Velpula KK, Elustondo PA, Demirkhanyan L, Zakharian E. TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6: 17221-17236 [PMID: 25980497 DOI: 10.18632/oncotarget.3948]
- 6 Fiorio Pla A, Gkika D. Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Front Physiol* 2013; 4: 311 [PMID: 24204345 DOI: 10.3389/fphys.2013.00311]
- 7 Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 98: 12-23 [PMID: 26481951 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.003]
- 8 张婷, 赵顺玉, 孔双喜. miR-567在胰腺癌细胞中的表达及其作用机制. *中国普通外科杂志* 2017; 26: 1141-1147
- 9 Wang F, Wong SC, Chan LW, Cho WC, Yip SP, Yung BY. Multiple regression analysis of mRNA-miRNA associations in colorectal cancer pathway. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 676724 [PMID: 24895601 DOI: 10.1155/2014/676724]
- 10 宋丹, 肖旷, 郑勇斌. Smad4在结直肠癌中的研究进展. *中国医药导报* 2017; 14: 28-31
- 11 El-Murr N, Abidi Z, Wanherdrick K, Svrcek M, Gaub MP, Fléjou JF, Hamelin R, Duval A, Lesuffleur T. MiRNA genes constitute new targets for microsatellite instability in colorectal cancer. *PLoS One* 2012; 7: e31862 [PMID: 22348132 DOI: 10.1371/journal.pone.0031862]
- 12 Andersson DA, Nash M, Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 2007; 27: 3347-3355 [PMID: 17376995 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4846-06.2007]
- 13 Liu Z, Wu H, Wei Z, Wang X, Shen P, Wang S, Wang A, Chen W, Lu Y. TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142: 1871-1881 [PMID: 26803314 DOI: 10.1007/s00432-015-2112-1]
- 14 黄维, 陈洁仪, 黄俊勇, 周成宇. TRPM8调控EMT促进人肾癌细胞A498迁移及侵袭的作用研究. *海南医学* 2015; 1: 18-21 [DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2015.01.0006]
- 15 Borrelli F, Pagano E, Romano B, Panzera S, Maiello F, Coppola D, De Petrocellis L, Buono L, Orlando P, Izzo AA. Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychotropic cannabinoid. *Carcinogenesis* 2014; 35: 2787-2797 [PMID: 25269802 DOI: 10.1093/carcin/bgu205]

编辑: 崔丽君 电编: 刘继红





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

