

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2019 年 5 月 8 日 第 27 卷 第 9 期 (Volume 27 Number 9)



**9/2019**

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

- 539 食滞胃肠证泄泻动物模型制备方法综述  
何云山, 惠华英, 周赛男, 谭周进

### 基础研究

- 544 miR-20b通过抑制JAK/STAT3信号通路逆转结肠癌细胞5-FU耐药性的研究  
余灵芝, 戴丹平, 项秀瑶

### 临床研究

- 551 腹腔镜辅助消化道重建对胃癌患者的应用及患者CyclinD1蛋白表达的影响  
张树朋, 徐杰, 潘建柱, 陈宗南, 邵建平, 珊巴嘎
- 557 聚桂醇联合组织胶治疗肝硬化胃静脉曲张的近远期疗效  
尹竞, 苟园园, 夏佳薇, 周智航, 何松
- 565 原发性肝细胞癌微血管密度与其超声造影血流灌注量参数的相关性  
潘建强, 盛陈卓娅, 张浩
- 570 13例Cronkhite-Canada综合征临床诊治分析  
王红霞, 闫斌, 周正华, 王静, 窦艳

### 文献综述

- 576 Peutz-Jeghers综合征发病机制及临床诊治研究进展  
李白容, 孙涛, 蒋宇亮, 宁守斌
- 583 食用油对身体健康的影响及与肠道菌群的关系  
刘娅薇, 惠华英, 谭周进
- 589 侵袭性伪足形成-基质硬度调控肿瘤侵袭转移的关键一环  
张希, 邢晓侠, 崔杰峰

### 临床实践

- 598 常规治疗联合康复新液与氟哌噻吨美利曲辛片治疗老年性反流性食管炎的临床研究  
廖卫民, 徐雷鸣

## 消 息

- 543 《世界华人消化杂志》参考文献要求  
550 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费  
556 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标  
564 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事  
604 《世界华人消化杂志》修回稿须知

## 封面故事

程斌, 德国波恩大学医学博士, 教授(三级)、主任医师, 博士生导师, 430040, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科副主任、消化内镜中心常务副主任。现任中国医师协会胰腺病专业委员会委员兼神经内分泌肿瘤专委会副主任委员; 中国医师协会消化病分会消化内镜专委会委员; 中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会委员; 中华消化病学会胰腺病学组委员; 中华医学会消化内镜学分会人工智能协作组委员; 湖北省消化病学会常委; 湖北省胰腺病学会常委; 武汉市消化病学会副主任委员。主持国家自然科学基金面上项目4项、国家教委科研基金1项、湖北省卫健委面上项目1项。在国内、外重要期刊上发表学术论文60余篇, 其中SCI文章30余篇。参编《消化超声内镜学》、《肝脏病学》、《肝胆外科学》、《胰腺病学》多部专著。

## 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 2019-05-08

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

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](mailto: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](mailto: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 9 May 8, 2019

## EDITORIAL

- 539 Preparation methods for animal models of diarrhea with gastrointestinal food stagnation syndrome: A review  
*He YS, Hui HY, Zhou SN, Tan ZJ*

## BASIC RESEARCH

- 544 MiR-20b reverses 5-FU resistance in colon cancer cells by inhibiting JAK/STAT3 signaling pathway  
*Yu LZ, Dai DP, Xiang XY*

## CLINICAL RESEARCH

- 551 Application of laparoscopic assisted digestive tract reconstruction in patients with gastric cancer: Impact on expression of Cyclin D1 protein  
*Zhang SP, Xu J, Pan JZ, Chen ZN, Shao JP, Shan BZ*
- 557 Short- and long-term efficacy of lauromacrogol combined with tissue adhesive in treatment of cirrhotic gastric varices  
*Yin J, Gou YY, Xia JW, Zhou ZH, He S*
- 565 Correlation between microvessel density and contrast-enhanced ultrasound perfusion parameters in hepatocellular carcinoma  
*Pan JQ, Sheng CZ, Zhang H*
- 570 Clinical diagnosis and treatment of 13 cases of Cronkhite-Canada syndrome  
*Wang HX, Yan B, Zhou ZH, Wang J, Dou Y*

## REVIEW

- 576 Pathogenesis, diagnosis, and treatment of Peutz-Jeghers syndrome  
*Li BR, Sun T, Jiang YL, Ning SB*
- 583 Effect of edible oil on health: Relationship with intestinal microflora  
*Liu YW, Hui HY, Tan ZJ*
- 589 Invadopodia formation: An important step in matrix stiffness-regulated tumor invasion and metastasis  
*Zhang X, Xing XX, Cui JF*

## CLINICAL PRACTICE

- 598 Conventional treatment combined with Rehabilitation New Fluid and flupentixol and melitracen tablets for treatment of reflux esophagitis in elderly patients  
*Liao WM, Xu LM*



## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 27 Number 9 May 8, 2019

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Bin Cheng, PhD, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology and Hepatology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei 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** May 8, 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](mailto: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](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

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-20b通过抑制JAK/STAT3信号通路逆转结肠癌细胞5-FU耐药性的研究

余灵芝, 戴丹平, 项秀瑶

余灵芝, 戴丹平, 项秀瑶, 台州恩泽医疗中心(集团)台州医院药剂科  
浙江省台州市 317000

余灵芝, 主管药师, 主要从事临床药理学和基础药理方面的研究.

**作者贡献分布:** 此课题由余灵芝设计; 研究过程由戴丹平与项秀瑶操作完成; 数据分析由余灵芝完成; 本论文写作由余灵芝、戴丹平及项秀瑶完成.

**通讯作者:** 余灵芝, 主管药师, 317000, 浙江省台州市临海回浦路92号, 台州恩泽医疗中心(集团)台州医院药剂科. yulingzhitty@163.com  
电话: 0576-85131150

收稿日期: 2018-12-27

修回日期: 2019-03-26

接受日期: 2019-04-16

在线出版日期: 2019-05-08

## MiR-20b reverses 5-FU resistance in colon cancer cells by inhibiting JAK/STAT3 signaling pathway

Ling-Zhi Yu, Dan-Ping Dai, Xiu-Yao Xiang

Ling-Zhi Yu, Dan-Ping Dai, Xiu-Yao Xiang, Department of Pharmacy, Taizhou Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), Taizhou 317000, Zhejiang Province, China

**Corresponding author:** Ling-Zhi Yu, Pharmacist-in-Charge, Department of Pharmacy, Taizhou Hospital, Taizhou Grace Medical Center (Group), 92 Linhai Huipu Road, Luqiao District, Taizhou 317000, Zhejiang Province, China. yulingzhitty@163.com

Received: 2018-12-27

Revised: 2019-03-26

Accepted: 2019-04-16

Published online: 2019-05-08

## Abstract

### BACKGROUND

Colon cancer is a common disease that seriously threatens human life and health. In recent years, the incidence

of colon cancer has been increasing significantly. Recurrence, metastasis, and chemotherapy resistance are the main obstacles to long-term survival of patients with colorectal cancer. More and more studies suggest that microRNAs are involved in the pathogenesis and drug resistance of colon cancer.

### AIM

To investigate the role of microRNA-20b in drug resistance of colon cancer cells and the underlying mechanism.

### METHODS

The resistance of common colon cancer cells (SW480) and drug-resistant cells (SW480/5-FU) to 5-fluorouracil (5-FU) was confirmed by MTT assay. The expression of microRNA-20b in SW480/5-FU cells was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). SW480/5-FU cells were transfected with exogenous microRNA-20b, and their drug resistance, migration, and invasion were observed. Finally, we detected the changes of several members of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) signaling pathway by immunoblotting.

### METHODS

Compared with the normal colon cancer cell line (SW480), the drug-resistant cell line (SW480/5-FU) showed obvious resistance to 5-FU. The expression of microRNA-20b in SW480/5-FU cells was significantly down-regulated. When exogenous microRNA-20b was transfected into SW480/5-FU cells, the drug resistance, migration, and invasion of SW480/5-FU cells decreased significantly. Immunoblotting assay showed that the phosphorylation of JAK and STAT in SW480/5-FU cells transfected with microRNA-20b was decreased.

The JAK/STAT3 signaling pathway was inhibited after transfection with microRNA-20b.

## CONCLUSION

The resistance of SW480/5-FU to 5-FU is mediated by microRNA-20b, which may be related to the inhibition of the JAK-STAT signaling pathway.

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

Key Words: Colon cancer; 5-fluorouracil; Drug resistance; mir-20b; Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway

Yu LZ, Dai DP, Xiang XY. MiR-20b reverses 5-FU resistance in colon cancer cells by inhibiting JAK/STAT3 signaling pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2019; 27(9): 544-550  
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i9/544.htm>  
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i9.544>

## 摘要 背景

结肠癌是严重威胁人类生命健康的常见病。近年来, 结肠癌的发病率呈明显上升趋势, 其复发转移及化疗耐药则是影响结肠癌患者长期生存的首要障碍, 越来越多的研究提示表明miRNA参与了结肠癌的疾病与耐药。

## 目的

探讨miR-20b在结肠癌细胞耐药中的作用, 并对其机制进行了研究。

## 方法

通过细胞活性实验确认了普通结肠癌细胞(SW480)与耐药细胞(SW480/5-FU)对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的耐药性。通过逆转录实验, 检测SW480/5-FU细胞中miR-20b的表达水平。根据结果对SW480/5-FU细胞转染转入外源性miR-20b, 观察其耐药性, 转染和侵袭能力。最后我们通过免疫印迹法检测了几种Janus激酶/信号转导与转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of trans-ions, JAK/STAT)信号通路在其中的变化。

## 结果

在细胞活性实验中, 相比于SW480, SW480/5-FU表现出对5-FU明显的耐药性。在逆转录实验中, SW480/5-FU细胞中miR-20b表达水平明显下调, 将外源性miR-20b转染入SW480/5-FU细胞中后, 其耐药性明显下降, 并且其转染和侵袭能力明显下降。免疫印迹法实验显示, 转染miR-20b后的SW480/5-FU细胞酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)与转录因子(signal transducers

and activators of transcription, STAT)磷酸化比例下调, JAK/STAT3信号通路被抑制。

## 结论

SW480/5-FU对5-FU的耐药性可由miR-20b介导, 其机制可能与JAK-STAT信号通路表达下调相关。

关键词: 结肠癌; 5-氟尿嘧啶; 耐药性; miR-20b; Janus激酶/信号转导与转录激活子信号通路

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

**核心提要:** 结肠癌的复发转移及化疗耐药直接影响结肠癌患者寿命, 越来越多的研究提示miRNA参与了结肠癌的耐药过程。在本研究中, 我们对miR-20b在结肠癌细胞耐药中的作用进行了探讨。相比于普通结肠癌细胞, 耐药细胞系细胞中miR-20b表达水平明显下调。我们的结果表明耐药细胞系细胞对5-氟尿嘧啶的耐药性可由miR-20b介导, 其机制与Janus激酶/信号转导与转录激活子信号通路表达下调相关。

余灵芝, 戴丹平, 项秀瑶. miR-20b通过抑制JAK/STAT3信号通路逆转结肠癌细胞5-FU耐药性的研究. *世界华人消化杂志* 2019; 27(9): 544-550  
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i9/544.htm>  
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i9.544>

## 0 引言

结肠癌是一种常见的肿瘤, 在世界范围内均造成极大的公共健康问题负担。近几十年来, 我国结肠癌的发病率和死亡率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是广泛用于结肠癌治疗的主流化疗药物<sup>[2,3]</sup>。5-FU的药理作用是通过阻断胸腺嘧啶的合成来阻断DNA复制的<sup>[4,5]</sup>。5-FU可以影响细胞周期从而导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。然而许多结肠癌患者在使用5-FU化疗后表现出耐药性和高复发率。因此, 耐药性被认为是结肠癌化疗治疗中最大的障碍之一, 目前迫切需要提高结肠癌化疗治疗的敏感性和预防化疗耐药性的新策略。

miRNA是一类高度保守的小型非编码RNA, 通过抑制mRNA的翻译和降解来调节基因表达<sup>[7]</sup>。越来越多的证据表明, miRNA在细胞功能中起重要作用, 在结肠癌细胞中, 许多miRNAs的表达失调与结肠癌细胞对5-FU的耐药性有关<sup>[8-10]</sup>, 但具体机制并不清楚。先前的研究已经表明, 特异性靶向miRNA可以通过降低癌细胞耐药性从而改善化疗效果, 从而为癌症治疗开辟新的途径<sup>[11]</sup>。近年来研究发现, miR-20b在许多类型的癌组织中



表达下调. 此外, miR-20b通过介导细胞周期调控和SP-1介导的MMP-2表达抑制膀胱癌EJ细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[12]</sup>. 研究发现miR-20b在结肠癌中的表达比正常结肠组织低, 表明miR-20b在结肠癌细胞发展中起重要作用<sup>[13]</sup>. 然而, miR-20b在结肠癌细胞耐药中的作用及机制尚不清楚.

鉴于对耐药机制的更好理解可以为结肠癌的治疗提供新的见解, 我们使用对5-FU敏感或耐药的2个同源细胞系SW480进行了研究, 探讨了miR-20b在结肠癌细胞对5-FU化疗耐药中的作用. 我们的研究结果提示, miR-20b通过调节Janus激酶/信号转导与转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of trans-ions, JAK/STAT)信号通路从而调节了SW480对5-FU的耐药性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结肠癌细胞系SW480, 购自美国类型培养物收藏中心(ATCC; Manassas, VA, 美国), 细胞培养用5-FU、无血清培养基、胰岛素、表皮生长因子以及转铁蛋白均购自于美国Sigma-Aldrich. 细胞活力测定中MTT、McCoy5A无血清培养基和二甲基亚砷购自于美国Sigma-Aldrich, 细胞活力测定试剂盒CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay购自于美国Promega. RNA干扰实验中miR-20b模拟物及其阴性对照购自中国RiboBio, RNA寡核苷酸转染试剂Lipofectamine<sup>®</sup>2000购自于美国Invitrogen, Opti-MEM<sup>®</sup>培养基购自于美国Gibco. 逆转录实验中, TRIzol<sup>®</sup>试剂购自于美国Invitrogen, 逆转录试剂盒以及SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II购自于日本TaKaRa Bio, 寡聚体(dT)12-18和miRNA特异性引物由中国RiboBio合成. 免疫印迹实验中用到的RIPA裂解液购自于中国Solarbio, BCA试剂盒购自于美国Thermo, 其余相关试剂以及细胞迁移及侵袭相关试剂均购自于美国Sigma-Aldrich.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 结肠癌细胞系SW480对5-FU敏感, SW480/5-FU细胞系对5-FU具有抗性, 通过将SW480细胞与水平不断增加的5-FU共同孵育而产生. 在37 °C和5%CO<sub>2</sub>浓度下, McCoy5A无血清培养基培养两种细胞, 培养基中加入20 μg/mL胰岛素、10 ng/mL表皮生长因子和4 g/mL转铁蛋白. 持续药物处理耐药细胞系.

**1.2.2 细胞活力测定:** 将细胞以2×10<sup>4</sup>细胞/100 mL的浓度在96孔板中培养, 并用5-FU(分别为5、10、15和20 μg/mL)处理指定的时间以评估增殖. 培养72 h后存活的细胞用MTT染色2 h. 用分光光度计测定二甲基亚砷溶解在570 nm处的吸光度. 细胞活力测定使用CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

试剂盒, 根据说明将OD的比率计算出细胞存活率.

**1.2.3 miRNA和RNA干扰:** miR-20b模拟物及其阴性对照通过RiboBio公司合成. RNA寡核苷酸转染在Opti-MEM<sup>®</sup>培养基中利用Lipofectamine<sup>®</sup> 2000进行转染, 根据说明操作. miR-20b最终浓度为100 nmol/L, 48 h后测定其表达水平.

**1.2.4 RNA提取和逆转录PCR:** 根据说明, 用TRIzol<sup>®</sup>试剂从细胞培养物中提取总RNA. 使用PrimeScript<sup>™</sup>逆转录试剂盒进行逆转录. 加入寡聚体(dT)12-18或miRNA特异性引物启动cDNA合成. PCR在实时PCR系统(Applied Biosystems, 美国)中进行, PCR体系中添加SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II.

**1.2.5 免疫印迹试验:** 检测蛋白表达. 首先用RIPA裂解液裂解细胞, 取全蛋白. 利用BCA法将蛋白样品定量至统一浓度后, 取20 μg蛋白样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白. 电泳结束后, 将蛋白质转移至甲醇预活化的PVDF膜, 转膜条件为100 V/2 h. 转膜结束后利用5%脱脂牛奶室温下封闭1 h并以1:1000的稀释比例孵育一抗并4 °C过夜. 第二天, 以TBST洗涤后室温孵育相应的HRP标记的二抗1 h, 以TBST洗涤后利用化学发光成像仪显影.

**1.2.6 细胞迁移和侵袭能力实验:** 将Matrigel 1:8稀释包被在Transwell小室底部膜的上室面, 置于37 °C 30 min使Matrigel聚合成凝胶, 使用前将基底膜水化. 消化后的细胞离心弃去培养液并重悬, 调整细胞密度至5×10<sup>5</sup>/mL. 取悬液100 μL加入Transwell小室, 常规培养24 h. 取出Transwell小室, 弃去孔中培养液, PBS洗2遍后甲醇固定30 min. 0.1%结晶紫染色20 min, 400倍显微镜下计数.

**统计学处理** 使用Graphpad Prism 7.0软件对数据进行分析. 方差分析后进行单因素方差分析或非配对t检验. 数据表示为mean±SD. P<0.05认为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 SW480/5-FU细胞对5-FU具有耐药性** 为了解结肠癌细胞对5-FU耐药的机制, 我们测定了5-FU对SW480与SW480/5-FU细胞生长的影响, 发现5-FU以剂量依赖的方式降低了结肠癌细胞的活性, 5-FU对SW480细胞的抑制作用比SW480/5-FU细胞更为明显(图1). 两组细胞分别用5、10、15或20 μg/ml 5-FU处理SW480和SW480/5-FU细胞72 h后进行观察, 随着5-FU浓度的增加, SW480相比于SW480/5-FU细胞存活率下降明显. 当5-FU浓度为15 μg/mL和20 μg/mL时, SW480细胞存活率分别为SW480/5-FU细胞的31.56%和16.27%, 差异具有统计学意义(P<0.001).

**2.2 SW480/5-FU细胞中miR-20b表达量下降** 随后我们



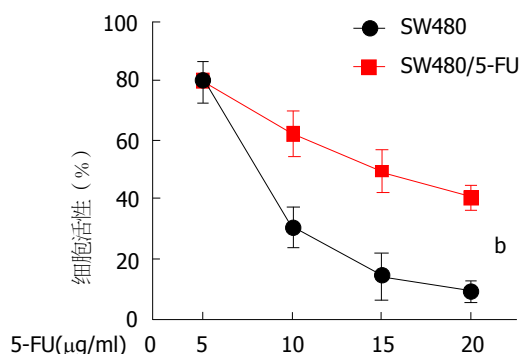


图1 5-FU以剂量依赖的方式降低了结肠癌细胞SW480的活性。<sup>b</sup> $P < 0.001$ , 与NC组相比。

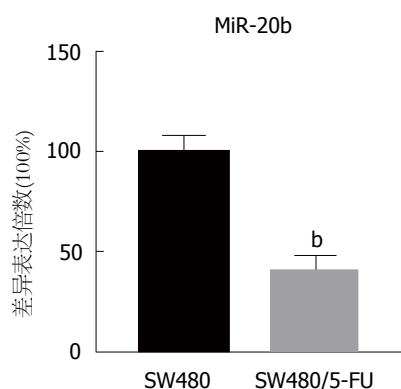


图2 miR-20b表达量在SW480与SW480/5-FU细胞中的差异。<sup>b</sup> $P < 0.01$ , 与SW480组相比。

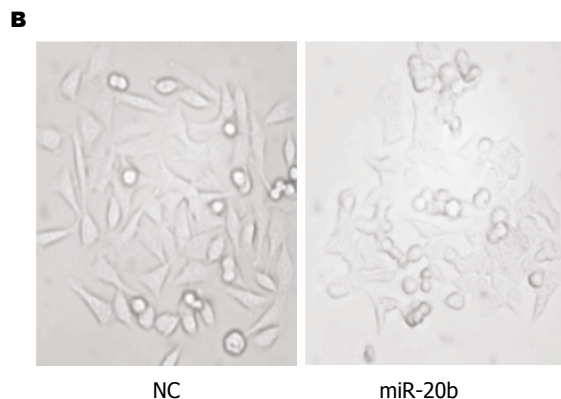
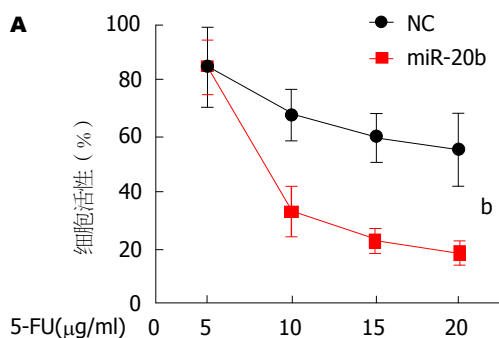


图3 转染外源性miR-20b类似物后细胞活性及形态的影响。A: 细胞活性比值, 转染miR-20b后, SW480/5-FU细胞存活率明显下降; B: 细胞形态示意图。 $n = 3$ 。<sup>b</sup> $P < 0.001$ , 与NC组相比。

检测了SW480与SW480/5-FU细胞中miR-20b表达量的差异, 结果显示, 相比于SW480细胞, SW480/5-FU细胞中miR-20b表达量明显下降, 具有统计学差异( $P < 0.01$ , 图2), 提示着miR-20b可能在SW480/5-FU细胞对5-FU的耐药性中发挥作用。

**2.3 转染外源性miR-20b后可使SW480/5-FU存活率下降** 为了进一步验证miR-20b在SW480/5-FU细胞耐药性中的作用, 我们将外源性miR-20b类似物转染进入SW480/5-FU细胞中, 相比于对照组, 转染miR-20b后的细胞活性明显降低(图3A)。观察细胞形态发现, 转染miR-20b后的SW480/5-FU细胞表现出轮廓皱缩, 突起减少等增殖能力减弱特征(图3B), 这些证据表明miR-20b的过表达可减弱细胞的增殖状态和活性。

**2.4 转染外源性miR-20b后可使细胞迁移和侵袭能力下降** 随后, 我们进一步观察了转染miR-20b后SW480/5-FU细胞迁移和侵袭能力的改变。将外源性miR-20b转染入SW480/5-FU细胞, 用Transwell法检测细胞迁移和侵袭。结果显示miR-20b抑制了SW480/5-FU细胞的迁移和侵袭, 相比于对照组, 细胞计数明显降低, 在细胞迁移实验中, 转染miR-20b组相比于对照组细胞计数下降了63.5%, 在细胞侵袭实验中, 转染miR-20b组下降了60.2%, 结果具有统计学差异(图4)。

**2.5 miR-20b对SW480/5-FU细胞JAK/STAT3信号通路的影响** JAK/STAT3在细胞的增殖及癌症耐药中发挥重要作用<sup>[14]</sup>, 为了探索miR-20b对调节SW480/5-FU细胞耐药性及影响增殖作用的机制, 我们对SW480/5-FU细胞中JAK/STAT3信号通路进行了检测。通过蛋白质免疫印迹实验发现, 转染了miR-20b后的SW480/5-FU细胞中, JAK/STAT3信号通路中的关键蛋白的磷酸化水平显著下降。我们发现相对于对照组, miR-20b过表达组JAK、STAT3含量基本无变化而p-JAK、p-STAT3表达均下调(图5A), 差异有统计学意义, 提示miR-20b抑制SW480/5-FU细胞的增殖和迁移可能是通过抑制JAK/STAT3信号通路激活而介导的。

### 3 讨论

结肠癌是常见的、病发于结肠部位的恶性肿瘤。5-FU被广泛认为是结肠癌治疗的标准疗法, 临床上通常与叶酸钙联合使用。虽然5-FU能使结肠癌患者的中位生存期提高近两年<sup>[15]</sup>, 但5-FU的耐药性是结肠癌治疗过程中的一个严重问题。为了探讨结肠癌细胞对5-FU的耐药机制, 我们从结肠癌细胞系SW480建立了对5-FU耐药细胞系SW480/5-FU, 我们的实验发现此细胞系对5-FU不敏感。随后, 我们通过逆转录实验发现, SW480/5-FU细胞中miR-20b表达量明显下降。

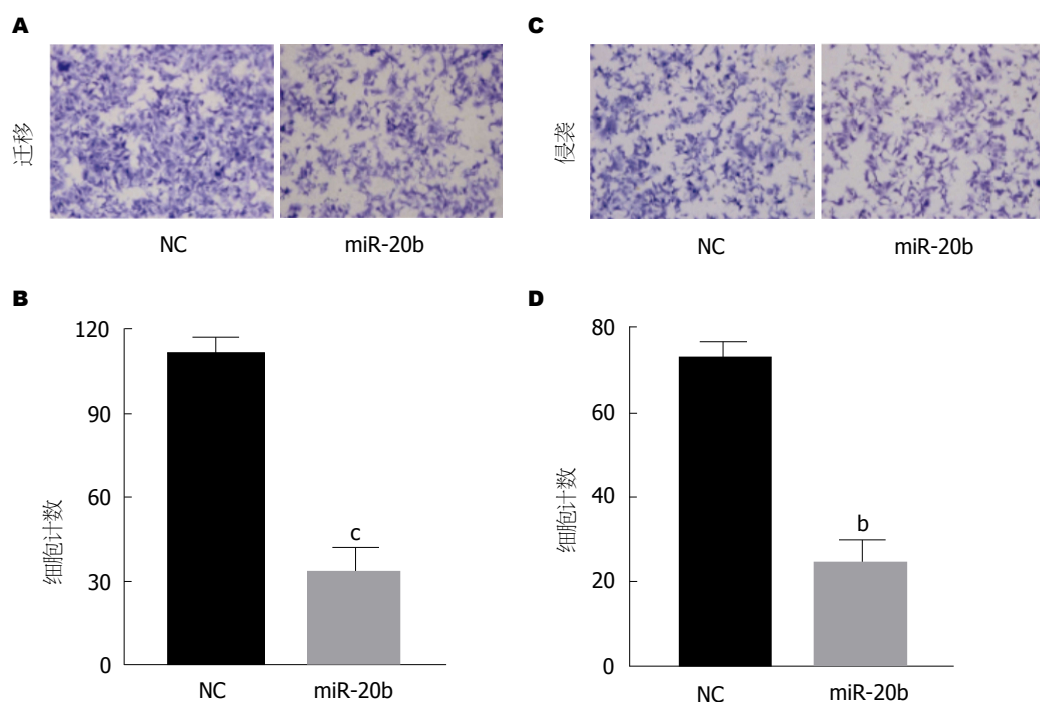


图4 细胞迁移侵袭实验及细胞计数. A: 细胞迁移实验; B: 细胞迁移实验统计结果; C: 细胞入侵实验; D: 入侵实验统计结果.  $n = 3$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ , 与NC组相比.

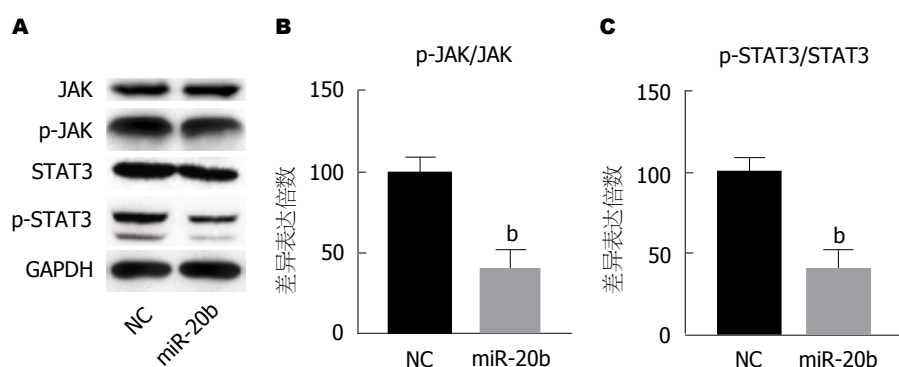


图5 miR-20b对SW480/5-FU细胞JAK/STAT3信号通路的影响. A: 蛋白质免疫印迹实验检测JAK/STAT3信号通路中关键蛋白含量变化; B: p-JAK/JAK蛋白表达统计图; C: p-STAT3/STAT3蛋白表达统计图.  $n = 3$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , 与NC组相比.

miRNA是一组含量丰富的内源性小分子非编码RNA, 通过翻译抑制或降解其靶mRNA来发挥蛋白编码基因的调节作用<sup>[16]</sup>. 近年来, 越来越多的证据表明, miRNA在癌症发生中起着重要作用, 这其中有许多在结肠癌细胞中异常表达<sup>[17-19]</sup>. 有报道认为, miRNA可以作为筛选结肠癌的标志物<sup>[20,21]</sup>. 关于miRNA在结肠癌耐药性方面的研究, 有人曾报道了microRNA-425-5p通过调节细胞程序性死亡来降低结肠癌细胞对5-FU耐药性<sup>[22]</sup>, 然而miR-20b在结肠癌中的耐药性研究却罕见报道. 为了探究miR-20b在SW480/5-FU细胞耐药性的作用, 我们将外源性miR-20b转染入SW480/5-FU细胞, 观察其细胞活性以及其对SW480/5-FU细胞迁移和侵袭的影响. 将外源性miR-20b转入SW480/5-FU细胞后我们发现, 相比

于对照组其耐药性降低, 细胞迁移和侵袭能力下降.

细胞内信号分子的异常激活是癌细胞的特性之一, 这其中就包括JAK/STAT信号通路. JAK/STAT信号通路主要调节胚胎发育, 参与干细胞维持、造血和炎症反应等过程. 活化后JAK激活STAT, STAT随后形成二聚体并转移到细胞核. STAT二聚体与特定的启动子序列结合并调节控制细胞增殖、分化和凋亡等细胞过程的基因转录<sup>[23]</sup>. 近些年, 有许多报道证明了JAK/STAT信号通路的异常激活与多种癌症发病具有相关性, 这其中就包括结肠癌<sup>[24,25]</sup>. 然而, JAK/STAT信号通路在结肠癌耐药性的作用并不明晰. 为了证明miR-20b是否通过JAK/STAT信号通路调控了SW480/5-FU细胞的耐药性, 我们检测了SW480/5-FU细胞中JAK/STAT3信号通路中相关蛋白

表达情况. 我们发现, 转染了外源性miR-20b的SW480/5-FU细胞中, p-JAK、p-STAT3的表达均下调, 而JAK、STAT3变化不大, 因此p-JAK/JAK、p-STAT3/STAT3比值显著下降, 说明此信号通路被抑制.

总之, 本研究发现SW480/5-FU细胞相比于SW480细胞miR-20b表达量明显下降, 转染外源性的miR-20b后, SW480/5-FU细胞耐药性明显下降, 细胞迁移和增殖能力相比于对照组明显降低. 因此, 我们有理由认为miR-20b可降低结肠癌细胞对5-FU的耐药性. 蛋白免疫印迹实验结果提示miR-20b可能通过抑制JAK/STAT3信号通路提高了SW480/5-FU细胞对5-FU的敏感性. 我们的研究结果提示了一种结肠癌细胞对5-FU耐药的新机制, 为结肠癌细胞耐药性的分子病理机制提供了新的解释, 并为其治疗提供了潜在靶点.

## 文章亮点

### 实验背景

结肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 虽然结肠癌的诊疗取得了较大的进展, 但化疗的耐药性仍是临床治疗的难点, 严重影响着患者预后.

### 实验动机

MiRNA可通过抑制相关蛋白mRNA的翻译和降解来调节基因表达. 越来越多的研究表明, miRNA在结肠癌细胞中发挥重要作用. 以往的研究发现, 通过调节miRNA可以改变癌细胞对化疗药物的敏感性从而改善化疗效果, 这为癌症的治疗提供了新思路. 研究发现miR-20b在多种肿瘤组织中表达下调. 在结肠癌中miR-20b的表达比正常结肠组织低, 提示miR-20b的抑癌作用. miRNA与结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的耐药性的具体作用及机制并不清楚.

### 实验目标

对耐药机制的新探索可以为结肠癌的治疗提供新的思路, 我们使用对5-FU敏感或耐药的2个同源细胞系SW480进行了研究, 探讨了miR-20b在结肠癌细胞对5-FU化疗耐药中的作用及机制.

### 实验方法

通过药物筛选筛选出普通结肠癌细胞(SW480)与耐药细胞(SW480/5-FU). 对两种细胞的miRNA水平进行检测, 寻找有差异的miRNA并进行干预. 在表对SW480/5-FU细胞转染转入外源性目标miRNA后, 观察对其耐药性及其他肿瘤生物特性的影响并寻找其中的机制.

## 实验结果

耐药细胞系对5-FU表现出明显的耐药性. 逆转录实验结果表明耐药细胞系miR-20b表达明显下调, 将miR-20b转染入耐药细胞后, 显著降低了其耐药性, 并且降低了其转移和侵袭能力. WB实验显示, 转染miR-20b后的耐药细胞酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)与转录因子(signal transduction and activator of transcription, STAT)磷酸化比例下调, JAK/STAT3信号通路被抑制.

## 实验结论

SW480/5-FU对5-FU的耐药性可由miR-20b介导, 其机制与JAK-STAT信号通路表达下调相关.

## 展望前景

结肠癌是美国癌症死亡的第三大原因. 早期结肠癌可以手术切除, 但晚期疾病则需要更多的靶向疗法. 研究结肠癌的研究人员长期以来被结肠癌的耐药性困扰, 传统化疗药物对阻断促进结肠癌进展的效果有限, 通过对miRNA调控这一新策略, 我们对结肠癌细胞耐药性的分子病理机制提供了新的解释, 并为其治疗提供了潜在靶点.

## 4 参考文献

- 1 李德录, 吴春晓, 郑莹, 仲伟鉴, 吴凡. 上海市2003-2007年大肠癌发病率和死亡率分析. 中国肿瘤 2011; 20: 413-418
- 2 赵建辉, 檀碧波, 吴胜春, 韩杰. 5-FU对结肠癌转移灶抑制率与耐药相关因子表达关系的实验研究. 中国普通外科杂志 2010; 19: 355-358
- 3 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330-338 [PMID: 12724731 DOI: 10.1038/nrc1074]
- 4 Murakami J, Lee YJ, Kokeguchi S, Tsujigiwa H, Asami J, Nagatsuka H, Fukui K, Kuroda M, Tanaka N, Matsubara N. Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17: 1461-1467 [PMID: 17487405 DOI: 10.3892/or.17.6.1461]
- 5 Ruddick JA, Runner MN. 5-FU in chick embryos as a source of label for DNA and a depressant of protein synthesis. *Teratology* 1974; 10: 39-45 [PMID: 4855451 DOI: 10.1002/tera.1420100107]
- 6 吴丽媛, 李恩, 彭锐, 龚舒, 徐柳, 邹方东. miR-21介导的结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶的耐药机制研究. 中华医学遗传学杂志 2015; 32: 620-624 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.05.003]
- 7 Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 321-333 [PMID: 25998712 DOI: 10.1038/nrc3932]
- 8 杨光磊, 胡岩芳, 胡延伟, 王钊, 张仕东, 葛国庆. 结肠癌细胞HIF-1 $\alpha$ 及MDR1 miRNA重组慢病毒干扰体系多药耐药研究. 实用癌症杂志 2017; 4: 545-547 [DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2017.04.007]
- 9 童锦禄, 冉志华, 陈翔, 徐锡涛, 聂芳, 萧树东. 应用芯片技术筛查人结肠癌羟基喜树碱多药耐药相关微RNA的研究. 中华消化杂志 2008; 28: 246-249 [DOI: 10.3760/j.issn.0254-1432.2008.04.008]
- 10 路丹, 王文秀, 曲迪, 孙文吉, 郭晓菲, 李逸文. 细胞因子诱导的

- 凋亡抑制因子1靶向miRNA预测及其在乳腺癌耐药细胞株中的表达. 肿瘤研究与临床 2016; 28: 735-738 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2016.11.004]
- 11 Park SL, Cho TM, Won SY, Song JH, Noh DH, Kim WJ, Moon SK. MicroRNA-20b inhibits the proliferation, migration and invasion of bladder cancer EJ cells via the targeting of cell cycle regulation and Sp-1-mediated MMP-2 expression. *Oncol Rep* 2015; 34: 1605-1612 [PMID: 26166554 DOI: 10.3892/or.2015.4119]
  - 12 吴巍芸, 周宇. miR-20 b对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制的研究. 实用癌症杂志 2015; 1: 20-24 [DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2015.01.006]
  - 13 陈红芳, 邓华瑜. JAK/STAT3和MAPK/ERK在乳腺癌细胞侵袭转移中的交互作用及意义. 肿瘤防治研究 2009; 36: 293-297 [DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2009.04.009]
  - 14 陈黎, 王争, 陈锦先. 术中使用缓释型5-FU对于进展期结肠癌的疗效研究. 外科理论与实践 2007; 12: 499-501 [DOI: 10.3969/j.issn.1007-9610.2007.05.027]
  - 15 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297 [PMID: 14744438]
  - 16 白桦, 张松, 肖鹏, 栗敏. miRNA-497过表达对人结肠癌细胞放疗敏感性的影响. 癌症进展 2018; 16: 1489-1493
  - 17 刘棣, 张寅斌, 宋玲琴, 闫婉君, 赵小瑶, 盛倩文, 许朋, 张淑群. miRNA-34a在胃癌细胞KATO III中对5-Fu的增敏作用. 西北药学杂志 2018; 33: 658-661 [DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2018.05.022]
  - 18 刘路, 王静, 王瑛, 廖前进, 刘珊, 欧阳佩琳. miRNA与宫颈癌细胞自噬的研究进展. 肿瘤药学 2018; 8: 675-679
  - 19 田晰晰, 珠珠, 黄鉴, 任俊宇, 王跃, 张楠, 陈明清, 董坚. 遗传性非息肉性大肠癌生物标志物的血清miRNAs的筛选. 世界华人消化杂志 2013; 11: 1040-1045 [DOI: 10.11569/wcjd.v21.i11.1040]
  - 20 曹锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞智. miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3615-3619 [DOI: 10.3969/j.issn.1009-3079.2009.35.009]
  - 21 Zhang Y, Hu X, Miao X, Zhu K, Cui S, Meng Q, Sun J, Wang T. MicroRNA-425-5p regulates chemoresistance in colorectal cancer cells via regulation of Programmed Cell Death 10. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 360-369 [PMID: 26647742 DOI: 10.1111/jcmm.12742]
  - 22 Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer* 2015; 113: 365-371 [PMID: 26151455 DOI: 10.1038/bjc.2015.233]
  - 23 王贻兵, 刘丹, 王佳贺. JAK2/STAT3信号转导通路在岩大戟内酯B诱导的前列腺癌细胞PC-3凋亡中的作用. 实用药物与临床 2016; 19: 1065-1068 [DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.201609002]
  - 24 张斌, 钟德珩, 王群伟, 苗雄鹰, 戴卫东, 刘春, 潘凯华. JAK/STAT信号通路及肝细胞性肝癌的肿瘤进展和预后的相关性研究. 细胞与分子免疫学杂志 2010; 26: 368-370; 373
  - 25 王五艺, 程勇, 万林. AGESi通过JAK2/STAT3信号通路诱导结肠癌SW 480细胞增殖、侵袭及上皮间质转化. 第三军医大学学报 2017; 39: 2390-2395 [DOI: 10.16016/j.1000-5404.201708199]

编辑: 崔丽君 电编: 刘继红



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2019 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

**本刊讯** 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (《世界华人消化杂志》编辑部)





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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

