



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.008
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.008
China Journal of General Surgery, 2023, 32(4):538-547.

· 基础研究 ·

环状RNA KIF4A在结直肠癌中表达与功能及其作用机制

吴明浩, 夏绿洲, 张渝

(湖南省人民医院/湖南师范大学第一附属医院 消化内科, 湖南 长沙 410005)

摘要

背景与目的: 环状RNA KIF4A (circKIF4A) 被发现在多种肿瘤的恶性进展中起到重要作用, 然而, circKIF4A在结直肠癌中的生物学作用尚未见报道。因此, 本研究探讨circKIF4A对结直肠癌生物学行为的影响及机制。

方法: 用qRT-PCR检测不同结直肠癌细胞系与结肠黏膜上皮细胞以及结直肠癌组织与癌旁正常组织中circKIF4A的表达; 用siRNA敲低结直肠癌SW620细胞中circKIF4A的表达后, 分别检测细胞生长、克隆形成及侵袭能力以及细胞内总谷胱甘肽(T-GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)比例与铁死亡抑制蛋白SLC7A11表达的变化; 通过生物信息学软件和双荧光素酶报告基因实验预测和分析circKIF4A的目标microRNA(miRNA)以及下游的靶基因并验证。

结果: 与正常结肠上皮细胞及癌旁组织比较, circKIF4A在不同直肠癌细胞系及癌组织中的表达均明显上调(均 $P<0.05$); 敲低circKIF4A后, SW620细胞的生长、克隆形成、侵袭能力、细胞内T-GSH/GSSG比例及SLC7A11蛋白表达均明显降低(均 $P<0.05$); 预测与分析结果显示, circKIF4A序列上存在miR-515-5p结合位点, SLC7A11是miR-515-5p的下游靶基因; 验证结果显示, 在不同处理中, 过表达miR-515-5p同时抑制circKIF4A对SW620细胞SLC7A11蛋白的表达的抑制最为明显($P<0.05$)。

结论: circKIF4A在结直肠癌细胞中表达升高, circKIF4A能促进结直肠癌细胞的生长与侵袭, 其机制可能与circKIF4A-miR-515-5p-SLC7A11轴介导的铁死亡有关。

关键词

结直肠肿瘤; RNA, 环状; 铁死亡; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.3

Expression and function of circular RNA KIF4A in colorectal cancer and its action mechanism

WU Minghao, XIA Luzhou, ZHANG Yu

(Department of Gastroenterology, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha 410005, China)

Abstract

Background and Aims: The circular RNA KIF4A (circKIF4A) has been found to play an important role in the malignant progression of various tumors. However, the biological role of circKIF4A in colorectal cancer has not been reported yet. Therefore, this study was conducted to investigate the effects and mechanisms of circKIF4A on the biological behavior of colorectal cancer.

收稿日期: 2022-04-26; 修订日期: 2023-04-20。

作者简介: 吴明浩, 湖南省人民医院/湖南师范大学第一附属医院主任医师, 主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通信作者: 吴明浩, Email: wuminghao1976@sina.com

Methods: The expressions of circKIF4A in different colorectal cancer cell lines and colonic mucosal epithelial cells as well as in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues were detected using qRT-PCR. After knocking down the expression of circKIF4A in colorectal cancer SW620 cells using siRNA, the cell growth, colony formation, invasion ability, as well as changes in the intracellular ratio of total glutathione (T-GSH) to oxidized glutathione (GSSG) and the expression of ferroptosis inhibitor protein SLC7A11 were detected. The target microRNAs (miRNAs) of circKIF4A and downstream target genes were predicted and analyzed using bioinformatics software and dual-luciferase reporter gene assay, and validation experiments were also performed.

Results: Compared to normal colonic epithelial cells and adjacent tissue, the expressions of circKIF4A were significantly upregulated in different colorectal cancer cell lines and cancer tissue (all $P<0.05$). Knockdown of circKIF4A resulted in significantly decreased cell growth, colony formation, invasion ability, intracellular T-GSH/GSSG ratio, and SLC7A11 protein expression in SW620 cells (all $P<0.05$). Prediction and analysis revealed the presence of a miR-515-5p binding site on the circKIF4A sequence, and SLC7A11 was identified as a downstream target gene of miR-515-5p. Validation results showed that miR-515-5p overexpression with simultaneous circKIF4A suppression had the most the inhibitory effect on SLC7A11 protein expression in SW620 cells among different treatments ($P<0.05$).

Conclusion: The expression of circKIF4A is upregulated in colorectal cancer cells and promotes the growth and invasion of colorectal cancer cells. Its mechanism may be associated with ferroptosis mediated by the circKIF4A-miR-515-5p-SLC7A11 axis.

Key words

Colorectal cancer; RNA, Circular; Ferroptosis; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

结直肠癌为美国癌症死亡的第二大常见原因, 其中青年的发病率呈逐年上升的趋势^[1]。研究^[2]表明, 早期结直肠癌患者的5年生存率超过90%, 但晚期结直肠癌患者的中位生存时间却不超过2年。目前, 结直肠癌的诊断及治疗已成为世界范围内的热点问题。若患者能够得到早期诊断和治疗, 结直肠癌患者的临床结局将得到显著的改善。对于结直肠癌的早期诊断, 结肠镜检查为一种常见的侵入性检查方法, 但其成本相对较高, 不适合人群筛查^[3]。因此, 寻找一种低侵袭性、高特异度和敏感度的生物诊断标志物将对结直肠癌的临床诊治具有重要意义。

环状RNA (circular RNA, circRNA) 为一种高丰度的非编码共价封闭RNA, 由外显子或内含子的前体mRNA反向剪接序列组成, 没有上游头或下游尾^[4]。与线性mRNA的转录相比, 其环状结构使其结构非常稳定且对RNA核酸外切酶具有抗性^[5]。作为一种新型的内源性非编码RNA, 其在组织和细胞中广泛表达, 并可作为microRNA (miRNA) 海绵来调节下游关键基因的表达^[6]。随着circRNA测

序和生物信息学技术的发展, 越来越多的circRNA被发现并研究^[7]。circRNA已被证明可参与心力衰竭、免疫疾病、糖尿病或癌症等多种疾病的生物学过程^[8]。circKIF4A被报道可促进乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌和膀胱癌的恶性进展^[9-13], 但circKIF4A在结直肠癌中的生物学作用尚未研究。因此, 本研究基于上述背景, 观察了circKIF4A对结直肠癌生长与侵袭的影响, 并探讨circKIF4A调控结直肠癌进展的可能机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本

临床标本收集了从2019年10月—2021年10月于湖南省人民医院/湖南师范大学第一附属医院肛肠科被确认为结直肠癌患者的20例新鲜肿瘤样本, 所有标本均术中获取。其中男性患者12例, 女性患者8例; 平均年龄为(35.24±11.37)岁。这项研究经我院伦理委员会批准, 所有样本的使用均获得所有患者的书面知情同意。

1.2 主要材料与仪器

正常结肠黏膜上皮细胞系 NCM460 以及结直肠癌细胞系 SW480、SW620、HCT-116、DLD-1、LoVo (中国科学院上海生命科学院生化细胞所); Lipofectamine 3000 转染试剂、TRIzol 试剂、DMEM 培养基、胎牛血清、抗生素 (Invitrogen, 美国); RNA 抽提试剂盒 (Applied Biosystems, 美国)、TaqMan 逆转录试剂盒、qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒、双荧光素酶活性检测试剂盒 (Qiagen, 美国), 血细胞计数板 (16×25 格), Transwell 小室 (0.8 nm) 和基质胶 (BD, 美国); 总谷胱甘肽 (T-GSH) /氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒 (碧云天公司, 中国); miR-515-5p 模拟物 (miR-515-5p) 及无关序列对照 (miR-CTR)、circKIF4A 敲除 siRNA (si-circKIF4A) 及其对照 (si-circCTR)、miR-515-5p 抑制剂及其对照均购买于 Invitrogen 公司。野生型的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 的荧光素酶报告载体 (circKIF4A-wt、SLC7A11-wt) 和突变型的 3'-UTR 的荧光素酶报告载体 (circKIF4A-mut、SLC7A11-mut) 由 GeneCopoeia 公司构建。紫外可见分光光度计 (Thermo, Nanodrop 2000, 美国), 奥林巴斯正置显微镜 OLYMPUS BX51 (Olympus 公司, UIS2 光学成像系统, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 结直肠癌细胞培养于含 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国) 和 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素 (Invitrogen, USA) 的 DMEM 培养基 (Sigma, 美国) 中, 细胞置于 37 °C, 含 5% CO₂ 的细胞培养箱内孵育。

1.3.2 circKIF4A 敲除及质粒转染 收集细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释, 吹打制成 10⁴ 个/mL 的细胞悬液, 6 孔板中每孔铺 2 mL 细胞, 置于细胞培养箱中。细胞汇合度约 60%~80% 时准备转染, 用无菌 EP 管配制 lipofectamin 3000 和转染试剂 (miR-515-5p, miR-CTR, si-circKIF4A, si-circCTR, miR-515-5p 抑制剂, miR-515-5p 抑制剂对照、circKIF4A-mut、circKIF4A-wt, SLC7A11-mut、SLC7A11-wt 等); 两者混匀并室温放置 20 min。将上述混合物加入无血清培养液 (不含抗生素) 中混匀, 加入到待转染的 6 孔中; 置于培养箱中, 6 h 后换成常规培养基。48 h 后, 收集细胞并抽提蛋白或进行其他实验。

1.3.3 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 每六孔板内加

100 μL TRIzol 裂解液, 室温静置 5 min, 加入 140 mL 氯仿并震荡 20 s 后室温放置 8 min, 以转速 15 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 转移上层液体至另一干净 EP 管内, 按异丙醇: TRIzol=1:2 的比例加入异丙醇, 混匀后室温放置 15 min, 离心去除上清。1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 转速 8 000 r/min, 4 °C 离心 8 min, 弃上清, 室温干燥后溶于 30 μL 无酶水。组织 RNA 的提取步骤同上, 每 100 mg 组织中加入 1 mL 的 TRIzol 裂解液, 经组织匀浆后其余步骤同细胞系 RNA 提取, 相应试剂的添加成比例增加。最后于紫外可见分光光度计上检测 A260/A280 比值, 检测合格后-20 °C 中保存备用。以提取的上述细胞总 RNA 为模板, 按逆转录试剂盒说明书进行操作, 逆转录生成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 按 qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒的说明书进行操作, 检测设备为 BioRad 实荧光定量系统 (IQTM5 Multicolor, 美国)。引物由 Invitrogen 公司合成, U6 为内参, 2^{-ΔΔCT} 用于计算相对表达量, ΔΔCT=(C_TmiRNA-C_TU₆) 目标-(C_TmiRNA-C_TU₆) 对照。反应体系为 20 μL, 每组实验设置 3 个复孔。

1.3.4 细胞生长曲线绘制 将结直肠癌细胞经 0.25% 的胰酶消化后, 将细胞密度调至 5×10³ 个/mL, 随后将其接种到 24 孔板中, 每孔 500 μL, 采用血细胞计数板 (16×25 格) 来统计细胞的数量, 每 mL 细胞数=400×每小格细胞数×10⁴×稀释倍数, 每 24 h 计数 1 次, 连续 4 d, 绘制细胞生长曲线。

1.3.5 细胞克隆形成实验 取对数生长期的结直肠癌细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞, 将细胞悬浮在完全培养基中。将细胞悬液以梯度倍数稀释, 每组设置 3 个平行样。每组细胞均在六孔板中接种, 每孔 100 个细胞, 轻轻晃动细胞使其均匀分散。置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养 3 周。当六孔板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃上清液, PBS 洗 2 次。随后取出加 0.1% 的结晶紫甲醇溶液, 染色 30 min 后, PBS 缓冲液清洗 3 次, 倒置晾干。在显微镜 (低倍镜) 计数 >10 个细胞的克隆数。克隆形成率=克隆数与接种细胞数的比值×100%。

1.3.6 细胞侵袭实验 在 Transwell 小室中铺加基质胶的稀释液, 放置 6 h 使其成膜。取 200 μL 的细胞稀释液接种到小室上腔层, 下腔层中加 400 μL 的完全培养基, 置于培养箱中孵育 36 h, 随后取出加 0.1% 的结晶紫甲醇溶液, 染色 30 min 后, 将上

室中内侧的细胞用棉签除去, PBS缓冲液清洗3次, 倒置小室并晾干。于倒置显微镜下进行细胞计数, 方法为随机选取4个高倍视野来进行细胞计数, 记录细胞数目并取平均值。

1.3.7 T-GSH/GSSG 比例检测 收集细胞, PBS冲洗, 胰酶消化并离心收集细胞。液氮中迅速冷冻细胞后, 置于37℃水浴中融化, 共冻融2次。10 000 r/min离心10 min后小心吸取上清。随后按说明书进行检测。

1.3.8 Western blot 分析 RIPA裂解液和PMSF用于从细胞中分离蛋白质, 蛋白质用SDS-PAGE凝胶进行分离。随后将蛋白质在300 mA下转膜2 h。将膜在4℃下用SLC7A11抗体处理过夜, 然后在室温下用特异性二抗孵育1 h。SLC7A11和GAPDH抗体用于检测蛋白质的表达量。

1.3.9 荧光素酶活性检测 验证miR-515-5p与circKIF4A结合的荧光素酶实验分为4组, 分别为: miR-515-5p与circKIF4A-wt、miR-CTR与circKIF4A-wt、miR-515-5p与circKIF4A-mut、miR-CTR与circKIF4A-mut; 验证miR-515-5p与SLC7A11结合的荧光素酶实验也分为4组, miR-515-5p与SLC7A11-wt、miR-CTR与SLC7A11-wt、miR-515-5p与SLC7A11-mut、miR-CTR与SLC7A11-mut。分别共转染上述8组到结直肠癌细胞株SW620中, 48 h后收集细

胞。根据实际上提供的试剂盒说明书进行操作, 在单光子检测仪上检测荧光素酶的活性。相对荧光素酶活性为萤火虫荧光素酶活性值于海肾荧光素酶活性值的比值, 每组实验设置3个复孔, 验证miR-515-5p与circKIF4A、circKIF4A与SLC7A11之间的结合关系。

1.4 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析。所有实验结果均为计量资料, 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式来表示, 两组间的数据比较采用成组t检验分析, 多组间数据的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circKIF4A在结直肠癌患者及细胞系中的表达

采用qRT-PCR检测结直肠癌及正常结肠上皮细胞中circKIF4A的表达水平, 结果显示, 相对正常结肠上皮细胞NCM460, circKIF4A在结直肠癌细胞系中均明显上调(均 $P < 0.05$) (图1A)。qRT-PCR检测circKIF4A在20例结直肠癌患者结直肠癌组织和癌旁组织中的表达, 结果显示, 相对癌旁组织, 结直肠癌组织中circKIF4A的表达明显上调($P < 0.05$) (图1B)。

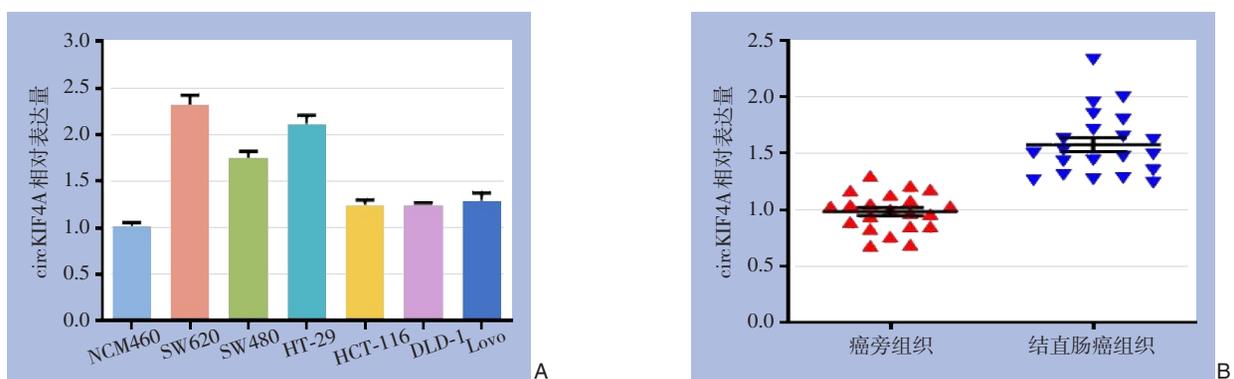


图1 qRT-PCR检测circKIF4A表达 A: circKIF4A在结肠上皮细胞及不同结直肠癌细胞系中的表达; B: circKIF4A在结直肠癌组织与癌旁组织中的表达

Figure 1 Detection of circKIF4A expression by qRT-PCR A: Expressions of circKIF4A in colorectal epithelial cells and different colorectal cancer cell lines; B: Expressions of circKIF4A in colorectal cancer tissue and adjacent non-cancerous tissue

2.2 circKIF4A对结直肠癌细胞生长的影响

为了分析circKIF4A对结直肠癌生长的影响, 使用靶向circKIF4A的siRNA来敲低结直肠癌细胞SW620中circKIF4A的表达。si-circKIF4A的敲低效率在SW620结直肠癌细胞系中得到验证(图2A)。

随后采用细胞计数法绘制SW620的细胞生长曲线, 结果显示, 与对照组(si-circCTR组)比较, si-circKIF4A组的结直肠癌细胞SW620的生长能力明显降低, 差有统计学意义($P < 0.05$) (图2B)。

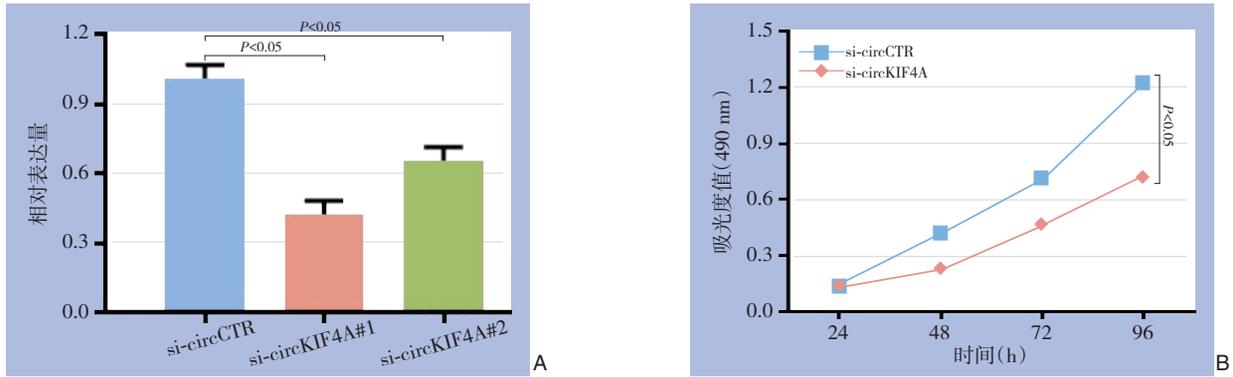


图2 circKIF4A对结直肠癌细胞生长能力的影响 A: qRT-PCR评估circKIF4A敲低效率; B: 敲低circKIF4A对SW620细胞生长的影响

Figure 2 Effect of circKIF4A on colorectal cancer cell growth A: Evaluation of circKIF4A knockdown efficiency using qRT-PCR; B: Impact of circKIF4A knockdown on growth of SW620 cells

2.3 circKIF4A对结直肠癌细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验结果显示, 与si-circCTR组比较, si-circKIF4A组的结直肠癌细胞SW620克隆形

成数量明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图3)。即外源性敲低circKIF4A的表达, 可降低结直肠癌细胞SW620的克隆形成能力。

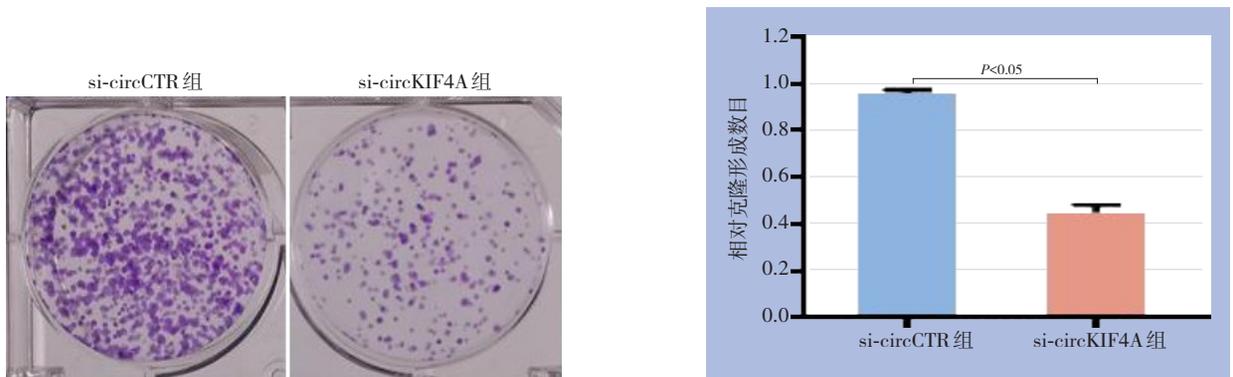


图3 克隆形成实验检测敲低circKIF4A对SW620细胞克隆形成能力的影响

Figure 3 Colony formation assay to evaluate the effect of circKIF4A knockdown on the colony forming ability of SW620 cells

2.4 circKIF4A对结直肠癌细胞侵袭能力的影响

细胞侵袭实验结果显示, 与si-circCTR组相比, si-circKIF4A组穿过基质胶的SW620细胞数量

明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图4)。即外源性敲低circKIF4A的表达, 可降低结直肠癌细胞SW620的侵袭能力。

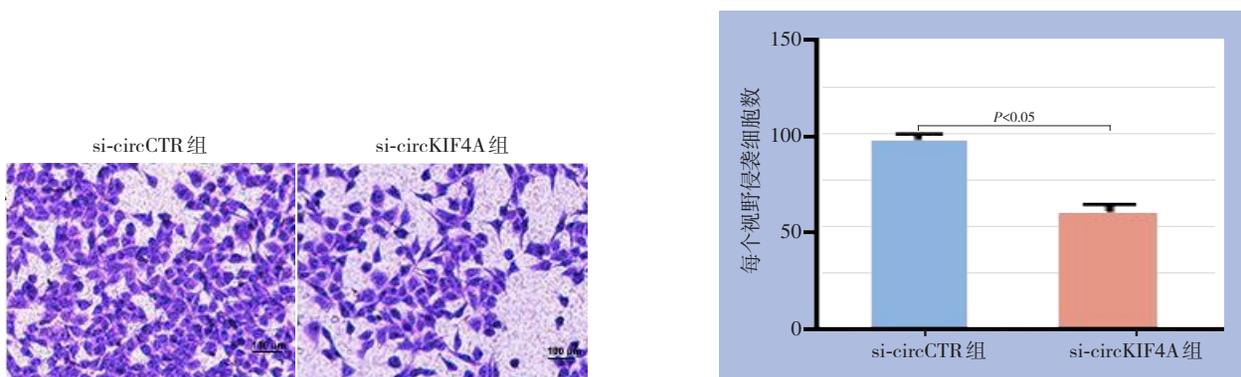


图4 Transwell实验检测敲低circKIF4A对SW620细胞侵袭能力的影响

Figure 4 Transwell assay to assess the effect of circKIF4A knockdown on the invasive ability of SW620 cells

2.5 抑制 circKIF4A 促进结直肠癌细胞发生铁死亡

对 SW620 细胞 T-GSH/GSSG 比例进行定量分析, 结果发现敲低 circKIF4A 明显降低细胞内 T-GSH/GSSG 比例 ($P<0.05$) (图 5A)。Western blot 对

SW620 细胞进行铁死亡标志物检测, 结果显示, 敲除 circKIF4A 后铁死亡抑制蛋白 SLC7A11 的表达水平明显下降 ($P<0.05$) (图 5B)。

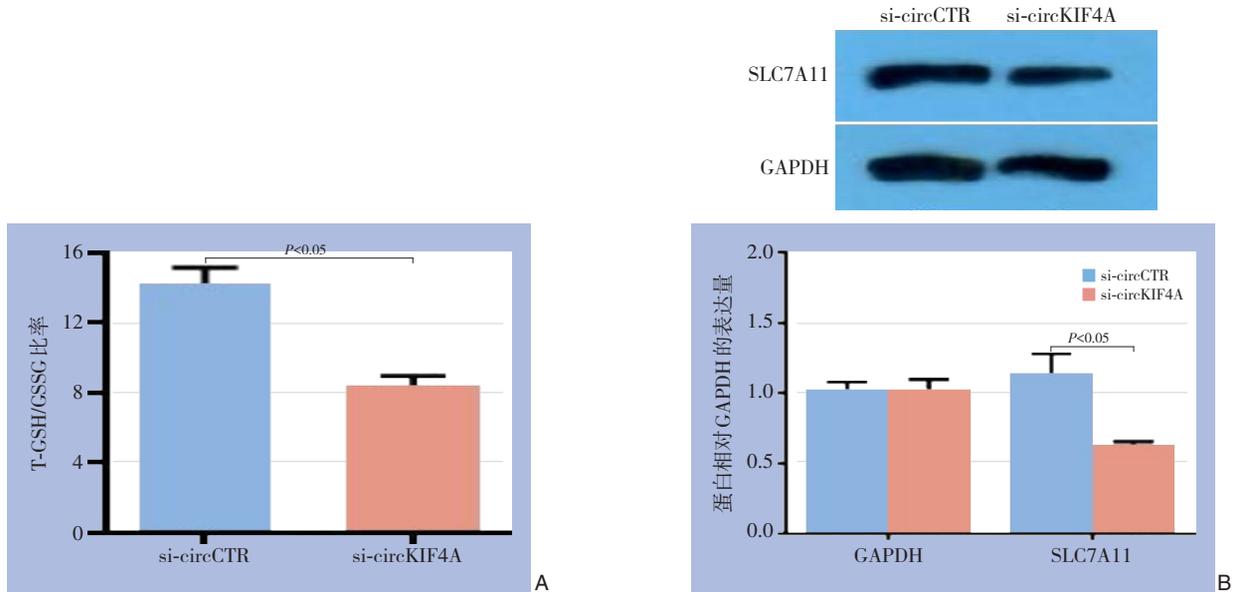


图5 抑制 circKIF4A 对 SW620 细胞铁死亡相关指标的影响
A: 敲低 circKIF4A 后细胞内 T-GSH/GSSG; B: Western blot 检测敲低 circKIF4A 后铁死亡标志物 SLC7A11 的变化

A: 敲低 circKIF4A 后细胞内 T-GSH/GSSG; B: Western blot 检测敲低 circKIF4A 后铁死亡标志物 SLC7A11 的变化

Figure 5 Effect of circKIF4A inhibition on ferroptosis-related indicators in SW620 cells A: Change in intracellular T-GSH/GSSG after circKIF4A knockdown; B: Western blot analysis of the changes in ferroptosis marker SLC7A11 after circKIF4A knockdown

2.6 circKIF4A 的目标 miRNA 以及下游的靶基因分析

根据生物信息学软件预测, circKIF4A 序列上存在 miR-515-5p 结合位点 (图 6A)。通过 TargetScan 以及 miRanda 软件预测 SLC7A11 是 miR-515-5p 的下游靶基因 (图 6B)。随后通过双荧光素酶报告基因实验, 将 miR-515-5p 与 WT 3'-circKIF4A 质粒共转染到 SW620 细胞中, 结果显示, 细胞的相对荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$), 但与 MUT 3'-circKIF4A 质粒共转染后无明显变化 ($P>0.05$); 将 miR-515-5p 与 WT 3'-UTR-SLC7A11 质粒共转染到 SW620, 细胞的荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$) (图 6C),

但与 MUT 3'-SLC7A11 质粒共转染后无明显变化 ($P>0.05$) (图 6C)。随后采用 Western blot 对 miR-515-5p 抑制剂对照, miR-CTR, miR-515-5p, miR-515-5p+si-circKIF4A, miR-515-5p 抑制剂+si-circKIF4A 不同转染组的铁死亡标志物 SLC7A11 的蛋白表达水平进行检测。结果显示, 与 miR-515-5p 抑制剂对照或 miR-CTR 转染组相比, miR-515-5p, miR-515-5p+si-circKIF4A, miR-515-5p 抑制剂+si-circKIF4A 转染组的 SLC7A11 蛋白表达水平均明显降低, 且 miR-515-5p+si-circKIF4A 组降低最为明显 (均 $P<0.05$) (图 6D)。

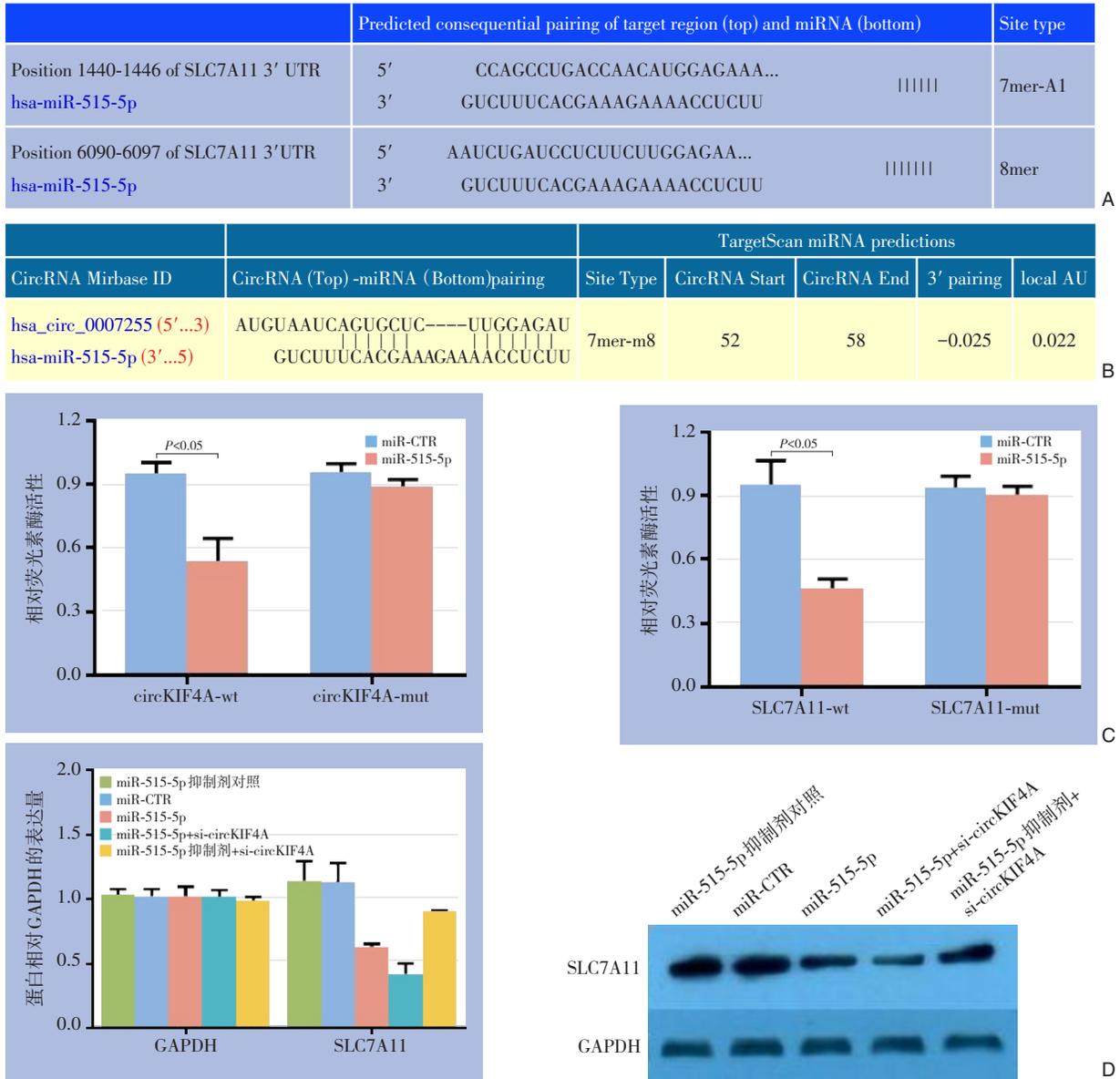


图 6 circKIF4A 的目标 miRNA 以及下游的靶基因分析 A: miR-515-5p 与 circKIF4A 的预测结合位点; B: miR-515-5p 与 SLC7A11 的预测结合位点; C: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-515-5p 与 circKIF4A、SLC7A11 之间的转录调控关系; D: 经不同处理的 SW620 细胞中 SLC7A11 蛋白表达情况

Figure 6 Analysis of target miRNA target of circKIF4A and downstream target gene A: Predicted binding sites of miR-515-5p with circKIF4A; B: Predicted binding sites of miR-515-5p with SLC7A11; C: Dual-luciferase reporter gene assay validating the transcriptional regulatory relationship between miR-515-5p, circKIF4A, and SLC7A11; D: Expressions of SLC7A11 protein in SW620 cells treated with different conditions

3 讨论

circRNA 在哺乳动物组织中常广泛表达, 其在组织或细胞中均表现出特异性^[14]。circRNA 并非 mRNA 预剪接的无用产物, 其共价闭环结构使其成为各种生物过程不可或缺的组成部分^[15]。随着高通量技术的发展, 越来越多的 circRNA 被发现并深入研究^[16]。circRNA 已被证实参与了癌症的多种生

物学过程。已有多种 circRNA 被证实是肿瘤的预测性生物标志物, 并有可能成为多种癌症的治疗靶点。如 circ133 及 circHIPK3 是结直肠癌中的重要调控因子^[17-18]; circFAM114A2 和 circITCH 被证实是癌症中的肿瘤抑制因子^[19-20], circFAM120A 被证实可通过抑制 FAM120A 与 IGF2BP2 的结合而促进细胞的增殖^[21]。circKIF4A 可促进乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌和膀胱癌的恶性进展^[9-14], 但 circKIF4A 在结直

肠癌中的作用及潜在生物学作用尚未过研究。

本研究分析了 circKIF4A 在结直肠癌细胞系及正常结直肠上皮细胞中的表达差异,同时也分析了 circKIF4A 在 6 例结直肠癌患者原发灶和癌旁组织中的表达,结果表明 circKIF4A 在结直肠癌中处于高表达的状态,提示 circKIF4A 可能与结直肠癌的进展密切相关。随后在结直肠癌细胞 SW620 中敲低 circKIF4A 的表达,与预测一致,结直肠癌细胞的生长、克隆形成及侵袭能力均受到了抑制。该研究结果与 circKIF4A 在三阴乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌等中的表达水平及恶性进展中的作用一致^[9-11]。

铁死亡为一种全新的细胞死亡模式,其生化调节机制、形态学特征及遗传学背景不同于以往的凋亡、自噬、焦亡和坏死等经典细胞死亡模式,其为一种由铁离子依赖的脂质过氧化物损伤所引起的程序性细胞死亡。发生铁死亡的细胞在电子显微镜下的形态学特征主要表现为线粒体皱缩、体积变小,线粒体双层膜密度增高、外膜破裂,线粒体嵴减少或消失,细胞核体积变化不明显,以及无染色质浓集^[22]。生化特征主要表现在铁离子与活性氧的堆积、胱氨酸/谷氨酸反向转运体被抑制,谷胱甘肽合成减少、NAPDH 被氧化、脂质过氧化物在细胞膜上堆积等^[23]。铁死亡发生的机制为细胞内游离铁离子与过氧化物发生芬顿反应,从而使生物膜上的多不饱和脂肪酸进一步过氧化,其发生受多种基因调控。System Xc⁻为细胞膜上的重要抗氧化系统,由 SLC7A11 和 SLC3A2 编码的 2 个亚单位构成,主要功能是从胞外摄取胱氨酸、向胞外排出谷氨酸,胱氨酸被 System Xc⁻摄取后经乙硫醇等途径进一步还原为半胱氨酸,参与谷胱甘肽的合成。谷胱甘肽随后在谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的参与下特异并高效地清除脂质过氧化物,从而抑制铁死亡的发生^[24]。当 SLC7A11 和 SLC3A2 受到抑制时,细胞内谷胱甘肽迅速耗竭,或者 GPX4 活性下降,脂质过氧化物将无法通过谷胱甘肽还原途径进行代谢,进而与亚铁离子发生芬顿反应产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 导致脂质过氧化物在细胞膜上堆积,诱导铁死亡的发生。多项研究显示通过抑制 SLC7A11 可减少谷胱甘肽的生成,进而促进肿瘤细胞发生铁死亡,达到抑制肿瘤生长与转移的目的^[25-26]。本研究发现结直肠癌细胞中的

T-GSH/GSSG 比例随 circKIF4A 的抑制而显著降低,同时铁死亡相关标志物 SLC7A11 蛋白的表达也受到了显著抑制。笔者推测 circKIF4A 可能通过某种机制促进铁死亡从而促进结直肠癌的恶性进展。

随后本研究进行 circKIF4A 促进结直肠癌分子机制的探讨。通过生物信息学软件预测,发现 circKIF4A 可与 miR-515-5p 结合,而 SLC7A11 是 miR-515-5p 的下游靶基因。根据竞争性内源性 RNA 理论, circRNA 通过与 miRNA 的竞争性结合来调节下游基因的表达。在本研究中, circKIF4A 被发现是结直肠癌中 miR-515-5p 的海绵。双荧光素酶报告基因实验证实, circKIF4A 与 miR-515-5p、SLC7A11 与 miR-515-5p 之间存在转录调控的关系。即 circKIF4A-miR-515-5p-SLC7A11 轴在结直肠癌的生长与侵袭中可能发挥重要作用,该作用可能是通过促进铁死亡而实现的。随后的 Western blot 实验中通过在加入 miR-515-5p 抑制剂及 miR-515-5p 模拟物的基础上,同时转染 si-circKIF4A 抑制 circKIF4A 的表达,通过多组间的对比发现,过表达 miR-515-5p 同时抑制 circKIF4A 时, SLC7A11 蛋白的表达水平降低最为显著,远低于单独抑制 circKIF4A 或促进 miR-515-5p 表达时。该结果进一步证实了 circKIF4A-miR-515-5p-SLC7A11 轴在结直肠癌中的作用及可能的机制。该结果与 circKIF4A 海绵吸附 miR-375/1231 上调 Notch2 表达从而促进膀胱癌的进展^[12], circKIF4A 通过 miR-152/ZEB1 轴促进乳腺癌细胞迁移、侵袭并抑制细胞凋亡等已有研究一致^[13]。

除了本文中所揭示的 circKIF4A 在结直肠癌铁死亡中发挥抑制剂的作用之外,已有研究还显示环状 RNA hsa_circ_0008367 在肝癌细胞中扮演铁死亡正向调节剂的角色,其可与 RNA 结合蛋白 ALKBH5 相互作用,调节铁死亡,抑制肝癌的进展^[27]。circIL4R 可通过 miR-541-3p/GPX4 轴促进肝癌的肿瘤发生并抑制铁死亡的过程^[28],另外 circTTBK2 也可在神经胶质瘤中充当铁死亡抑制剂,其通过 miR-761/ITGB8 轴调节胶质瘤细胞增殖、侵袭与铁死亡过程^[29]。研究^[30]显示 circRNA 与多种疾病的发生和发展关联密切,在多种人类肿瘤如肝癌、乳腺癌、胃癌、肺癌及结直肠癌中表现出差异表达谱,在癌症的发病机制及疾病转移进展中发挥重要作用, circRNA 具有作为肿瘤生物标志物或治疗靶点的潜在临床价值。因此本研究中对结

直肠癌中 circKIF4A 的表达及铁死亡相关作用机制的探究可能为结直肠癌临床标志物的开发提供了新的思路,若适用,将可能显著改善结直肠癌患者的早发现及治疗预后,当然该部分的验证也有赖于继续扩大临床样本进行验证。

本研究中,分析了 circKIF4A 在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响。并通过 T-GSH/GSSG 比例测定、铁死亡相关蛋白的表达检测、双荧光素酶检测探索其潜在分子机制。发现 circKIF4A-miR-515-5p-SLC7A11 轴在结直肠癌生长侵袭中的生物学作用,且该作用可能是通过促进铁死亡而实现的,该结果对于开发结直肠癌新的治疗策略很重要。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:吴明浩负责实验设计,文章撰写;夏绿洲负责实施实验,收集数据;张渝负责统计分析数据。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-164. doi: 10.3322/caac.21601.
- [2] Fakhri MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16):1809-1824. doi: 10.1200/JCO.2014.59.7633.
- [3] Buccafusca G, Proserpio I, Tralongo AC, et al. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 136: 20-30. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.01.023.
- [4] Zhou WY, Cai ZR, Liu J, et al. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):172. doi: 10.1186/s12943-020-01286-3.
- [5] Yi Y, Liu Y, Wu W, et al. Reconstruction and analysis of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathology of cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4): 2209-2225. doi: 10.3892/or.2019.7028.
- [6] Goodall GJ, Wickramasinghe VO. RNA in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(1):22-36. doi: 10.1038/s41568-020-00306-0.
- [7] Vo JN, Cieslik M, Zhang YJ, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. *Cell*, 2019, 176(4): 869-881. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.021.
- [8] Cheng X, Ai K, Yi L, et al. The mmu_circRNA_37492/hsa_circ_0012138 function as potential ceRNA to attenuate obstructive renal fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):207. doi: 10.1038/s41419-022-04612-3.
- [9] Lv WC, Tan YF, Xiong MC, et al. Analysis and validation of m6A regulatory network: a novel circBACH2/has-miR-944/HNRNPC axis in breast cancer progression[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):527. doi: 10.1186/s12967-021-03196-4.
- [10] Ding CY, Yi XH, Chen XR, et al. Warburg effect-promoted exosomal circ_0072083 releasing up-regulates NANGO expression through multiple pathways and enhances temozolomide resistance in glioma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):164. doi: 10.1186/s13046-021-01942-6.
- [11] Li S, Han L. Circular RNAs as promising biomarkers in cancer: detection, function, and beyond[J]. *Genome Med*, 2019, 11(1):15. doi: 10.1186/s13073-019-0629-7.
- [12] Chen YJ, Yang F, Fang EH, et al. Circular RNA circAGO2 drives cancer progression through facilitating HuR-repressed functions of AGO2-miRNA complexes[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(7):1346-1364. doi: 10.1038/s41418-018-0220-6.
- [13] Yang HO, Zhang HY, Yang YC, et al. Hypoxia induced exosomal circRNA promotes metastasis of Colorectal Cancer via targeting GEF-H1/RhoA axis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(18):8211-8226. doi: 10.7150/thno.44419.
- [14] Liu TY, Lu Q, Liu J, et al. Circular RNA FAM114A2 suppresses progression of bladder cancer via regulating Δ NP63 by sponging miR-762[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1):47. doi: 10.1038/s41419-020-2226-5.
- [15] Li Y, Ge YZ, Xu LW, et al. Circular RNA ITCH: a novel tumor suppressor in multiple cancers[J]. *Life Sci*, 2020, 254:117176. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117176.
- [16] Li SQ, Li X, Xue W, et al. Screening for functional circular RNAs using the CRISPR-Cas13 system[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(1):51-59. doi: 10.1038/s41592-020-01011-4.
- [17] Huo LW, Wang YF, Bai XB, et al. circKIF4A promotes tumorigenesis of glioma by targeting miR-139-3p to activate Wnt5a signaling[J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 29. doi: 10.1186/s10020-020-00159-1.
- [18] Sheng S, Hu Y, Yu FR, et al. circKIF4A sponges miR-127 to promote ovarian cancer progression[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(18):17921-17929. doi: 10.18632/aging.103389.
- [19] Shi YR, Wu Z, Xiong K, et al. Circular RNA circKIF4A sponges miR-375/1231 to promote bladder cancer progression by upregulating NOTCH2 expression[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 605. doi: 10.3389/fphar.2020.00605.
- [20] Jin Y, Yang L, Li X, et al. Circular RNA KIF4A promotes cell migration, invasion and inhibits apoptosis through miR-152/ZEB1

- axis in breast cancer[J]. Diagn Pathol, 2020, 15(1):55. doi: 10.1186/s13000-020-00963-7.
- [21] Chen W, Fu J, Chen Y, et al. Circular RNA circKIF4A facilitates the malignant progression and suppresses ferroptosis by sponging miR-1231 and upregulating GPX4 in papillary thyroid cancer[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(12):16500-16512. doi: 10.18632/aging.203172.
- [22] Smid M, Wilting SM, Uhr K, et al. The circular RNome of primary breast cancer[J]. Genome Res, 2019, 29(3):356-366. doi: 10.1101/gr.238121.118.
- [23] Xie YY, Wang L, Yang DF. CircEPSTI1 promotes the progression of non-small cell lung cancer through miR-145/HMGB3 axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 6827-6836. doi: 10.2147/CMAR.S252893.
- [24] Xie J, Wang SF, Li GL, et al. circEPSTI1 regulates ovarian cancer progression via decoying miR-942[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3597-3602. doi: 10.1111/jcmm.14260.
- [25] Gong D, Chen M, Wang Y, et al. Role of ferroptosis on tumor progression and immunotherapy[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 427. doi: 10.1038/s41420-022-01218-8.
- [26] Verduci L, Strano S, Yarden Y, et al. The circRNA-microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment[J]. Mol Oncol, 2019, 13(4):669-680. doi: 10.1002/1878-0261.12468.
- [27] Liu Z, Wang Q, Wang X, et al. Circular RNA cIARS regulates ferroptosis in HCC cells through interacting with RNA binding protein ALKBH5[J]. Cell Death Discov, 2020, 6:72. doi: 10.1038/s41420-020-00306-x.
- [28] Xu Q, Zhou L, Yang G, et al. CircIL4R facilitates the tumorigenesis and inhibits ferroptosis in hepatocellular carcinoma by regulating the miR-541-3p/GPX4 axis[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(11):2344-2356. doi: 10.1002/cbin.11444.
- [29] Zhang HY, Zhang BW, Zhang ZB, et al. Circular RNA TTBK2 regulates cell proliferation, invasion and ferroptosis via miR-761/ITGB8 axis in glioma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2585-2600. doi: 10.26355/eurev_202003_20528.
- [30] Lei B, Tian Z, Fan W, et al. Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(2): 292-301. doi: 10.7150/ijms.28047.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式:吴明浩,夏绿洲,张渝. 状RNA KIF4A在结直肠癌中表达与功能及其作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(4):538-547. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.008

Cite this article as: Wu MH, Xia LZ, Zhang Y. Expression and function of circular RNA KIF4A in colorectal cancer and its action mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2023, 32(4):538-547. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.008

本刊2023年各期重点内容安排

本刊2023年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第1期 肝癌基础与临床转化研究

第2期 胆道肿瘤基础与临床研究

第3期 胰腺癌早期诊断与综合治疗

第4期 胃肠肿瘤基础与临床研究

第5期 甲状腺肿瘤的诊断与综合治疗

第6期 血管疾病手术与腔内治疗

第7期 肝脏外科疾病临床与基础研究

第8期 胆道外科疾病临床与基础研究

第9期 胰腺外科临床与基础研究

第10期 胃肠外科临床与基础研究

第11期 甲状腺乳腺外科疾病临床与基础研究

第12期 血管外科疾病临床与基础研究

中国普通外科杂志编辑部