网络出版时间: 网络出版地址:

# 沉默 circFADS2 通过 miR-152-3p/SLC7A11 信号轴诱导结直肠癌细胞铁死亡

蒋良君<sup>1</sup>,卢先州<sup>2</sup>

(南华大学衡阳医学院附属南华医院<sup>1</sup>消化内科、<sup>2</sup>肝胆外科,衡阳 421002)

摘要 目的 探讨沉默 circFADS2 对结直肠癌(CRC)细胞铁死亡的影响及其机制。方法 以人结肠腺癌细胞系 SW480 作为 研究对象,分别将 circFADS2 siRNA 干扰质粒(si-circFADS2)及其阴性对照 si-NC、*miR-152-3p* inhibitor 及其阴性对照 inhibitor-NC、*miR-152-3p* mimics 及其阴性对照 mimics NC、*SLC7A11* 过表达质粒(oe-*SLC7A11*)及其阴性对照 vector 转染至 SW480 细胞 中,噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖活性;化学法检测细胞中亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、谷 胱甘肽(GSH)活性水平;二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针法检测细胞中活性氧(ROS)水平;实时荧光定量聚合酶链式反 应(qPCR)检测细胞中 *miR-152-3p* 和 *SLC7A11* mRNA 表达水平;Western blot 检测细胞中铁死亡相关蛋白 SLC7A11 之间的靶向 调控关系。结果 与 blank 组比较,si-circFADS2 组细胞增殖活性降低,细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 和 ROS 水平升高,SOD 和 GSH 水平 降低;同时,细胞中 *miR-152-3p* 表达水平升高,SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平降低(均 P < 0.05)。与 si-circFADS2 组比较, si-circFADS2 可诱导 CRC 细胞铁死亡,其机制可能是通过靶向调控 *miR-152-3p*/*SLC7A11* 是 *miR-152-3p* 的下游靶基因。结论 沉默 circ*FADS2* 可诱导 CRC 细胞铁死亡,其机制可能是通过靶向调控 *miR-152-3p*/*SLC7A11* 信号轴实现的。

关键词 circFADS2;结直肠癌;SW480 细胞;铁死亡;miR-152-3p;溶质载体家族7 成员 11

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)06-1000-09 doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.004

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在恶性肿瘤 相关死亡人数中排名第二,因其高发病率和病死率 而成为一个公共卫生问题<sup>[1]</sup>。多基因和信号通路 在 CRC 过程中发挥关键作用,近年来诱导 CRC 细 胞铁死亡为抑制肿瘤进展提供了新的策略和可 能<sup>[2]</sup>。MicroRNA(miRNA)是内源性表达的简短非 编码 RNA,与各种生物过程的调节有关,多种 miR-NA 在癌症患者组织中表达异常,其中 miR-152-3p 在 CRC 组织中低表达,上调 miR-152-3p 可通过自噬 途径调控心肌细胞铁死亡过程<sup>[3]</sup>,提示 miR-152-3p 可能是 CRC 的潜在生物标志物。circRNA 是一种

2025-04-13 接收

作者简介:蒋良君,硕士,副主任医师; 卢先州,硕士,主任医师,副教授,通信作者,E-mail: 13875732434@163.com 新型的环状非编码 RNA,可作为 miRNA 海绵通过 调节基因的表达、转录和翻译参与胃癌和 CRC 等多 种消化系统癌症的发展<sup>[4-5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明, circFADS2在 CRC 患者肠黏膜组织中上调最为显 著,沉默 circFADS2可通过海绵化 miR-498 促进 S100A16表达,进而抑制 CRC 细胞增殖和侵袭。然 而,circFADS2 是否可作为 miR-152-3p 的分子海绵 共同参与诱导 CRC 细胞铁死亡,目前尚不明确。该 研究拟探讨 circFADS2 是否通过靶向 miR-152-3p 调 控 CRC 细胞生长和铁死亡过程,并阐明其作用机 制,以期为 circFADS2 作为 CRC 临床治疗靶点提供 更多依据。

#### 1 材料与方法

1.1 细胞 人正常结肠上皮细胞系 NCM460 购自 上海赛百慷生物技术股份有限公司;人结肠癌细胞 系 HT-29、SW480、SW620、Caco-2 和 HCT-116 购自 美国 ATCC 公司。

**1.2 主要试剂和材料** circ*FADS2* siRNA 干扰质粒 (si-circ*FADS2*)及其阴性对照 si-NC、*miR-152-3p* in-

基金项目:湖南省科技创新计划社会化出资项目(编号: 2020SKC2009);湖南省自然科学基金(编号: 2024JJ7461);湖南省卫生健康委科研计划项目(编号: D202303038378);衡阳市科技局指导性计划(编号: 202222035832)

hibitor 及其阴性对照 inhibitor-NC、miR-152-3p mimics 及其阴性对照 mimics NC、SLC7A11 过表达质粒 (oe-SLC7A11)及其阴性对照 vector 由上海吉玛制药 技术有限公司合成;溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体、谷胱甘 肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗 体和 GAPDH 抗体(货号:#12691、#524558、#2118) 购自美国 CST 公司; Lipofectamine<sup>™</sup> 3000 转染试剂 (货号:L3000001)购自美国 ThermoFisher 公司; 噻 唑 蓝 ( methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)细胞增殖检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(货号: C0009、S0033)购自 上海碧云天生物技术有限公司;亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)检 测试剂盒(货号:M1217L)购自上海酶联生物科技有 限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物 歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘 肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(货号: A003、 A001、A006)购自南京建成生物工程研究所有限公 司;一步法实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)扩增 试剂盒(货号:B532441)购自上海生工生物工程股 份有限公司;双荧光素酶报告基因检测系统由美国 Promega 公司提供。

**1.3 主要仪器** CX33 型生物显微镜购自日本 O-LYMPUS 公司; Attune CytPix 型流式细胞仪、Varios-kan Flash3001 型酶标仪、QuantStudio<sup>™</sup> 1 Plus 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher 公司; ChemiDoc 全能型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

#### 1.4 方法

1.4.1 细胞培养与转染 分别使用 10% 胎牛血清 (FBS) +1% 青链霉素(P/S) + RPMI-1640 培养基培 养 NCM460 细胞,10% FBS + 1% P/S + McCoy's 5A 培养基培养 HT-29、HCT-116 细胞,10% FBS + 1% P/S + L15 培养基培养 SW480、SW620 细胞,10% FBS + 1% P/S + MEM 培养基培养 Caco-2 细胞,培 养箱湿度为 80%,温度为 37 ℃,气相条件为 95% 空 气和 5% CO<sub>2</sub>,按 1 : 2 传代。取对数生长期细胞,按 照试剂说明书操作,使用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 转染 试剂将 si-circ*FADS2* 及其阴性对照 si-NC、*miR-152-3p* mimics 及其阴性对照 mimics NC、*oe-SLC7A11* 及其 阴性对照 vector 分别转染至 SW480 细胞中。转染 48 h 后,采用 qPCR 和 Western blot 检测转染效率。 1.4.2 细胞分组与处理 取对数期生长的 SW480 细胞,接种于96孔板中,待细胞密度生长至70%时 进行如下分组和处理:① blank 组,不经任何转染; si-NC 组,将 si-NC 转染至 SW480 细胞中; sicircFADS2 组,将 si-circFADS2 转染至 SW480 细胞 中;② si-circFADS2 + inhibitor-NC 组,将 sicircFADS2 和 inhibitor-NC 共转染至 SW480 细胞中; si-circFADS2 + inhibitor 组,将 si-circFADS2 和 miR-152-3p inhibitor 共转染至 SW480 细胞中;③ mimics NC组,将 mimics NC 转染至 SW480 细胞中; miR-152-3p mimics 组,将 miR-152-3p mimics 转染至 SW480 细胞中; miR-152-3p mimics + vector 组,将 miR-152-3p mimics 和 vector 共转染至 SW480 细胞 中;miR-152-3p mimics + oe-SLC7A11 组,将 miR-152-3p mimics 和 oe-SLC7A11 共转染至 SW480 细胞中。 1.4.3 qPCR 检测 取对数期生长的 SW480 细胞, 按照分组要求处理后收集细胞沉淀至1.5 ml 离心 管中,使用TRIzol 试剂从细胞沉淀中提取总 RNA 并 定量,使用试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA(反应条 件:37 ℃、15 min,85 ℃、5 s),合成实时定量 PCR 引 物(表1)后配制如下反应体系:预混液 7.5 µl、上下 游引物1.5 µl、cDNA 2.0 µl 和无酶水 4.0 µl,上机 进行 PCR 扩增,扩增程序:95 ℃ 预变性 30 s、95 ℃ 变性 15 s、60 ℃退火/延伸 30 s,40 个循环。反应结 束后,确认扩增曲线和熔解曲线,并用 Prism9.0 软 件进行数据处理,分别以 U6 和 GAPDH 作为内参, 2<sup>-ΔΔC</sup>T法计算目的基因 miR-152-3p、circFADS2 和 SLC7A11 相对表达水平。

表1 引物序列 Tab 1 Primor sequences

	rub.r rinner sequences
Genes	Primer sequences (5'-3')
circFADS2	F:CACTTAAAGGGTGCCTCTG
	R:ATCCTTGTGGAAGATGTTAGG
miR-152-3p	F:TCGGCAGGTCAGTGCATGACAGAA
	R:CTCAACTGGTGTCGTGGA
SLC7A11	F:CATCGTCCTTTCAAGGTGC
	R:ATAGAGGGAAAGGGCAACC
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA
	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	F:CGACCACTTTGTCAAGCTCA
	R:AGGGGTCTACATGGCAACTG

**1.4.4** MTT 检测 取对数期生长的 SW480 细胞接种于 96 孔板中,调整细胞密度至 3×10<sup>3</sup> 个/孔,边缘孔用无菌 PBS 填充,待细胞贴壁后按照分组要求处理细胞,续孵育 24、48、72 h,每孔加入 20 μl 5%

MTT 溶液培养4h,弃去孔内培养基,加入150μl二 甲基亚砜低速震荡孔板以溶解结晶物,在酶标仪 490 nm 处测各孔吸光度值,计算各组细胞增殖活 性。

1.4.5 化学法检测 取对数期生长的 SW480 细胞 接种于 96 孔板中,调整细胞密度至 3 × 10<sup>3</sup> 个/孔, 边缘孔用无菌 PBS 填充,严格按照各试剂盒说明书 操作,检测各组细胞中 MDA、Fe<sup>2+</sup>含量以及 SOD、 CSH 活性水平。

1.4.6 DCFH-DA 探针法检测 取对数期生长的 SW480 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度至 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔,按照分组要求处理细胞,孵育 24 h,弃去 孔内培养基,加入 1 ml 提前配制好的荧光探针溶液 孵育 1 h,离心后弃去培养基,使用 PBS 重悬细胞沉 淀,流式细胞仪上检测各组细胞中 ROS 活性水平。

1.4.7 Western blot 检测 取对数期生长的 SW480 细胞,按照分组要求处理后收集到 1.5 ml 离心管 中,加入 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞,BCA 法测定 蛋白质浓度。取 30 µg 总蛋白质与 5 × SDS 上样缓 冲液充分混合后,加入到 SDS-PAGE 凝胶中进行电 泳分离,然后转移到 PVDF 膜上,置于 5% 的脱脂奶 粉中室温封闭 3 h。按照抗体说明书稀释比例加入 一抗(*SLC7A11*、GPX4、GAPDH,1 : 1 000 稀释),4 ℃孵育过夜,加入辣酸根过氧化物酶(HRP)标记的 二抗(1 : 5 000 稀释),室温孵育 1 h 后,使用 ECL 显色液孵育,凝胶成像仪成像,以 GAPDH 作为内 参,Image-Pro 软件分析灰度值。

1.4.8 双荧光素酶报告基因实验 使用 ENCORI 在线软件(https://rnasysu. com/encori/)预测 miR-152-3p 和 circFADS2 的海绵吸附结合位点,使用 TargetScanHuman 7.2 在线软件(https://www.targetscan. org/vert\_72/) 预测 miR-152-3p 和 SLC7A11 的靶向结合位点。按照双荧光素酶报告基因实验试 剂盒说明书操作,将 circFADS2 和 SLC7A11 的 3' UTR 区亚克隆到荧光素酶载体中,构建突变型 (MUT)和野生型(WT)荧光素酶报告基因载体,将 circFADS2-WT和 circFADS2-MUT分别与 mimic NC 和 miR-152-3p mimic 共转染至 SW480 细胞中, 将 SLC7A11-WT 和 SLC7A11-MUT 分别与 mimic NC 和 miR-152-3p mimic 共转染至 SW480 细胞中。转 染48h后,检测SW480细胞中的荧光素酶活性,结 果以萤火虫荧光素酶 RLU 值与海肾荧光素酶 RLU 值的比值表示。

1.5 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件

分析数据,所有实验均独立重复3次,结果以均数± 标准差(x±s)表示,多组间数据比较采用单因素方 差分析(ANOVA)和重复检测数据方差分析,两组间 数据比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计 学意义。

## 2 结果

# 2.1 沉默 circFADS2 对 CRC 细胞铁死亡的影响

qPCR 检测结果显示,与 NCM460 细胞比较,HT-29、SW480、SW620、Caco-2 和 HCT-116 细胞中 circ*FADS2* 表达水平均升高(P < 0.05),其中 SW480 细胞中 circ*FADS2* 表达水平最高,故选取 SW480 细 胞进行后续实验(图1A)。与 blank 组比较,随着作 用时间的延长,si-circ*FADS2* 组细胞增殖活性逐渐 降低(P < 0.05),细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 含量及 ROS 活 性水平升高(P < 0.05),3OD 和 GSH 活性水平降低 (均P < 0.05),同时,细胞中 SLC7A11 和 GPX4 蛋 白表达水平降低(P < 0.05);而 si-NC 组以上指标与 blank 组比较差异均无统计学意义(图1B~F)。上 述结果表明,沉默 circ*FADS2* 可促进 CRC 细胞铁死 亡。

2.2 circFADS2 与 miR-152-3p 之间的海绵吸附关系 如图 2 所示, miR-152-3p 和 circFADS2 之间存 在海绵吸附结合位点, 与 mimics NC 组比较, miR-152-3p mimics 组与 circFADS2-WT 组共转染后荧光 素酶活性降低(P < 0.05), 与 circFADS2-MUT 共转 染后荧光素酶活性改变差异无统计学意义。qPCR 检测结果显示, 与 blank 组比较, si-circFADS2 组 SW480 细胞中 miR-152-3p 表达水平升高(P < 0.05), 而 si-NC 组变化差异无统计学意义。上述结 果表明, circFADS2 是 miR-152-3p 的分子海绵。

2.3 抑制 *miR-152-3p* 对沉默 circFADS2 诱导 CRC 细胞铁死亡的影响 如图 3A 所示,共转染后, 与 si-circFADS2 组比较, si-circFADS2 + inhibitor 组 SW480 细胞中 *miR-152-3p* 表达水平降低(P < 0.05),而 si-circFADS2 + inhibitor-NC 组变化差异无 统计学意义。如图 3B ~ F 所示,与 si-NC 组比较, sicircFADS2 组 SW480 细胞增殖活性降低(P < 0.05),细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 含量及 ROS 活性水平升 高(均P < 0.05),SOD 和 GSH 活性水平降低(P < 0.05),且细胞中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平降 低(P < 0.05)。与 si-circFADS2 组比较, sicircFADS2 + inhibitor 组 SW480 细胞增殖活性升高 (P < 0.05),细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 含量及 ROS 活性水 平降低(*P* < 0.05), SOD 和 GSH 活性水平升高(*P* < 0.05), 同时细胞中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平 升高(*P* < 0.05), 而 si-circ*FADS2* + inhibitor-NC 组 以上指标变化差异均无统计学意义。上述结果表明,抑制 miR-152-3p 可逆转沉默 circFADS2 诱导的 CRC 细胞铁死亡。



图 1 沉默 circFADS2 对 CRC 细胞铁死亡的影响 Fig. 1 Effect of silencing circFADS2 on ferroptosis in CRC cells

A: circ*FADS2* expression levels in cells; B: Cell proliferation activity; C:  $Fe^{2+}$  content in cells; D: MDA, SOD, and GSH levels in cells; E: ROS levels in cells; F: Western blot map and protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 in cells; a: NCM460 group; b: HT-29 group; c: SW480 group; d: SW620 group; e: Caco-2 group; f: HCT-116 group; g: blank group; h: si-NC group; i: si-circ*FADS2* group; \*P < 0.05 vs NCM460 group; #P < 0.05 vs NCM460 group;



# 图 2 circFADS2 与 miR-152-3p 之间的海绵吸附关系

#### Fig. 2 Sponge adsorption relationship between circFADS2 and miR-152-3p/

A: Sponge adsorption binding site between circFADS2 and miR-152-3p; B: Cell dual luciferase activity; C: miR-152-3p expression levels in cells; a: blank group; b: si-NC group; c: si-circFADS2 group; \* P < 0.05 vs mimics NC group; #P < 0.05 vs blank group.



图 3 抑制 miR-152-3p 对沉默 circFADS2 诱导 CRC 细胞铁死亡的影响 Fig. 3 Effect of miR-152-3p inhibition on silencing circfADS2-induced ferroptosis in CRC cells

A: miR-152-3p expression levels in cells; B: Cell proliferation activity; C: Fe<sup>2+</sup> content in cells; D: MDA, SOD, and GSH levels in cells; E: ROS levels in cells; F: Western blot map and protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 in cells; a: si-NC group; b: si-circFADS2 group; c: si-circFADS2 + inhibitor group; \*P < 0.05 vs si-NC group; #P < 0.05 vs si-circFADS2 group.

### 2.4 SLC7A11 与 miR-152-3p 之间的靶向调控关系

如图 4 所示, miR-152-3p 和 SLC7A11 之间存在靶 向结合位点, 与 mimics NC 组比较, miR-152-3p mimics 组与 SLC7A11-WT 组共转染后荧光素酶活性降 低(P < 0.05), 与 SLC7A11-MUT 共转染后荧光素酶 活性变化差异无统计学意义。qPCR 和 Western blot 检测结果显示, 与 blank 组比较, miR-152-3p mimics 组 SW480 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平 降低(P < 0.05), 而 mimics NC 组以上指标变化差 异无统计学意义。上述结果表明, SLC7A11 是 miR-152-3p 的下游靶基因。

**2.5** *miR-152-3p* 通过靶向下调 *SLC7A11* 表达对 **CRC** 细胞铁死亡的影响 如图 5 所示,与 mimics NC 组比较,*miR-152-3p* mimics 组 SW480 细胞增殖 活性降低(*P* < 0.05),细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 含量及 ROS 活性水平升高,SOD 和 GSH 活性水平降低(均 *P* < 0.05),同时细胞中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水 平降低(均 *P* < 0.05)。与 *miR-152-3p* mimics 组比 较,*miR-152-3p* mimics + oe-*SLC7A11* 组 SW480 细胞

增殖活性升高(*P* < 0.05),细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 含量 及 ROS 活性水平降低,SOD 和 GSH 活性水平升高 (均 *P* < 0.05),同时细胞中 SLC7A11、GPX4 蛋白表 达水平升高(均 *P* < 0.05);而 *miR-152-3p* mimics + vector 组以上指标变化均无统计学意义(*P* > 0.05)。 上述结果表明,*miR-152-3p* 通过靶向下调 *SLC7A11* 表达诱导 CRC 细胞铁死亡。

### 3 讨论

迄今为止,CRC 的根治性治疗首推方法仍为外 科治疗,即将肉眼可见的肿瘤原发灶及引流区淋巴 结全部切除,但对于已有远处转移和病变部位近肛 门的患者,仅可做姑息性切除或封闭肛门后以"人 工肛门"解决排便问题,前者术后易复发,而后者则 严重影响患者术后的生活质量<sup>[7]</sup>。为此,放射疗法 和化学疗法等多种保守的治疗方法被更多地应用于 辅助治疗,虽在一定程度上减少了局部复发率,延长 了患者生存期,但其对正常细胞无差别攻击产生的 副作用也让人无法忽视<sup>[8]</sup>。因此,寻找特异性靶



Fig. 4 Targeted regulatory relationship between SLC7A11 and miR-152-3p

A: Targeted binding sites between *miR-152-3p* and *SLC7A11*; B: Cell dual luciferase activity; C: *SLC7A11* mRNA expression levels in cells; D: Western blot map and protein expression levels of *SLC7A11* in cells; a: blank group; b: mimics NC group; c: *miR-152-3p* mimics group; \* P < 0.05 vs mimics NC group; \*P < 0.05 vs blank group.



图 5 miR-152-3p 通过靶向下调 SLC7A11 表达对 CRC 细胞铁死亡的影响

#### Fig. 5 Effect of miR-152-3p on ferroptosis in CRC cells by targeted down-regulation of SLC7A11 expression

A: SW480 cell proliferation activity; B:  $Fe^{2+}$  content in cells; C: MDA, SOD and GSH levels in cells; D: ROS levels in cells; E: Western blot map and protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 in cells; a: mimics NC group; b: miR-152-3p mimics group; c: miR-152-3p mimics + vector group; d: miR-152-3p mimics + oe-SLC7A11 group; \* P < 0.05 vs mimics NC group; #P < 0.05 vs miR-152-3p mimics group.

点进行针对治疗显得尤为重要。铁死亡是一种异于 细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的新型细胞程序性死 亡方式,其主要机制是细胞内铁离子过载,导致 ROS 大量释放,催化细胞膜发生脂质过氧化,从而 诱导细胞死亡。目前,靶向铁死亡已成为一种有前 景的癌症治疗策略,为此多种铁死亡诱导剂在临床 上被运用于癌症治疗,例如索拉非尼和柳氮磺胺吡 啶通过作用于 *SLC7A11* 等相关基因,被用于诱导肝 癌和胶质瘤细胞铁死亡<sup>[9]</sup>。既往研究<sup>[10]</sup>表明,circRNA 是肿瘤起始和进展过程中的关键因子,具有 组织特异性表达特征,circRNA 的失调会导致 CRC、 肺癌、肝癌等多种癌症发展。同时,调控相关 circRNA 表达可通过介导铁死亡途径抑制肿瘤发 展<sup>[11]</sup>。其中 circ*FADS2* 与 CRC 关系密切,可通过海 绵调节相关 miRNA 促进 CRC 细胞增殖和侵袭,但 其是否诱导 CRC 细胞铁死亡,目前尚未见报道。本 研究分别对人正常结肠黏膜的上皮细胞系 NCM460 及 CRC 细胞系 HT-29、SW480、SW620、Caco-2 和 HCT-116 中的 circ*FADS2* 表达水平进行检测,结果显示,与 NCM460 细胞比较,所有 CRC 细胞中 circ*FADS2* 表达水平均显著升高,其中 SW480 细胞 最为显著,提示 circ*FADS2* 可能是 CRC 的潜在治疗 靶点。而沉默 circ*FADS2* 后,SW480 细胞增殖活性显著降低,细胞中 Fe<sup>2+</sup>含量和 ROS 水平显著升高,氧化平衡失调,同时细胞中 SLC7A11、GPX4 等铁死 亡相关蛋白表达水平显著降低,说明沉默 circ*FADS2* 

可诱导 CRC 细胞铁死亡。

circRNA 分子富含 miRNA 结合位点,通过竞争 性内源 RNA 机制在细胞中起到 miRNA 海绵的作 用。miR-152-3p 是一种肿瘤抑制因子,通过靶向相 关基因影响 CRC 的细胞增殖和转移,可受到 circRNA 调 控 进 而 调 节 细 胞 氧 化 应 激 水 平,而 circFADS2 和 miR-152-3p 之间是否存在靶向调控关 系暂未被验证<sup>[12-13]</sup>。本研究采用软件预测了 miR-152-3p 和 circFADS2 之间的海绵吸附结合位点,双 荧光素酶报告基因实验结果证实 circFADS2 是 miR-152-3p 的分子海绵,沉默 circFADS2 后 SW480 细胞 中 miR-152-3p 表达水平升高,而抑制 miR-152-3p 表 达可明显逆转沉默 circFADS2 对 SW480 细胞铁死 亡的促进作用。说明沉默 circFADS2 可能通过靶向 上调 miR-152-3p 诱导 CRC 细胞铁死亡。

细胞铁死亡受多基因通路调控,其中 SLC7A11 主要负责细胞内外谷氨酸和半胱氨酸的输出和转 运,而 GPX4 酶是细胞内唯一一个用于脂质过氧化 物还原的谷胱甘肽过氧化物酶,介导过氧化物的活 性抑制, SLC7A11 下调时细胞中 GSH 耗损, 进而抑 制 GPX4, 使细胞中过氧化物堆积引起细胞损伤<sup>[14]</sup>。 Wang et al<sup>[15]</sup>研究表明, SLC7A11 是 miR-152-3p 的 下游靶标,上调 miR-152-3p 可通过靶向下调 SLC7A11 增加前列腺肿瘤内蛋氨酸的依赖性,抑制 肿瘤生长。同时, Li et al<sup>[3]</sup>发现心肌细胞中 miR-152-3p 表达水平与心肌梗死中心肌细胞自噬相关铁 死亡关系密切。然而, miR-152-3p 是否通过靶向 SLC7A11 介导的铁死亡在 CRC 中发挥作用,目前尚 不明确。本研究结果显示, miR-152-3p 与 SLC7A11 存在靶向结合位点,二者为靶向负调控关系,过表达 SLC7A11 可显著抑制激活 miR-152-3p 对 SW480 细 胞铁死亡的促进作用。说明 miR-152-3p 通过靶向 下调 SLC7A11 表达诱导 CRC 细胞铁死亡。

综上所述,沉默 circFADS2 可抑制 CRC 发展, 其机制可能与靶向促进 miR-152-3p 表达,进而靶向 下调 SLC7A11 诱导 CRC 细胞铁死亡有关。该研究 揭示了 circFADS2 是 CRC 分子靶向治疗的潜在靶 点,有待在动物水平进一步进行验证。该研究结果 有望提高 CRC 诊断的精准度,以及为临床 CRC 治 疗提供重要依据,进而推动 CRC 前沿研究领域及相 关交叉学科领域的发展。

#### 参考文献

- Ionescu V A, Gheorghe G, Bacalbasa N, et al. Colorectal cancer: from risk factors to oncogenesis[J]. Medicina (Kaunas), 2023, 59(9): 1646. doi:10.3390/medicina59091646.
- Huang M, Gao T, Chen X, et al. Circ\_0087851 suppresses colorectal cancer malignant progression through triggering miR-593-3p/ BAP1-mediated ferroptosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2024, 150(4): 204. doi:10.1007/s00432-024-05643-3.
- Li R L, Fan C H, Gong S Y, et al. Effect and mechanism of LRP6 on cardiac myocyte ferroptosis in myocardial infarction [J].
   Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021; 8963987. doi:10.1155/ 2021/8963987.
- Xi Y, Shen Y, Wu D, et al. CircBCAR3 accelerates esophageal cancer tumorigenesis and metastasis via sponging miR-27a-3p[J].
  Mol Cancer, 2022, 21(1): 145. doi:10.1186/s12943 022 01615 8.
- [5] Deng C, Huo M, Chu H, et al. Exosome circATP8A1 induces macrophage M2 polarization by regulating the miR-1-3p/STAT6 axis to promote gastric cancer progression[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 49. doi:10.1186/s12943-024-01966-4.
- [6] Dong J X, Zhang L F, Liu D B, et al. Circular ribonucleic acid circ-FADS2 promotes colorectal cancer cell proliferation and invasion by regulating miR-498/S100A16 [J]. J Physiol Pharmacol, 2022, 73(4): 513 - 20. doi:10.26402/jpp.2022.4.04.
- [7] 张默然, 王 妮, 刘占伦, 等. 耳穴埋豆联合饮食疗法对老年 结肠造瘘患者排便情况的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(1): 35-8. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2024.01. 010.
- Zhang M R, Wang N, Liu Z L, et al. Effect of auricular point embedding beans combined with diet therapy on defecation of elderly patients with colostomy[J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(1): 35 8. doi:10.3969/j.issn.1005 9202.2024.01.010.
- [8] Mahmoud N N. Colorectal cancer: preoperative evaluation and staging[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2022, 31(2): 127 - 41. doi:10.1016/j.soc.2021.12.001.
- [9] Shen Z, Song J, Yung B C, et al. Emerging strategies of cancer therapy based on ferroptosis [J]. Adv Mater, 2018, 30(12): e1704007. doi:10.1002/adma.201704007.
- [10] Zhang Y, Luo J, Yang W, et al. CircRNAs in colorectal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets [J]. Cell Death Dis, 2023, 14: 353. doi:10.1038/s41419-023-05881-2.
- [11] Zhai H, Zhong S, Wu R, et al. Suppressing circIDE/miR-19b-3p/RBMS1 axis exhibits promoting-tumour activity through upregulating GPX4 to diminish ferroptosis in hepatocellular carcinoma
   [J]. Epigenetics, 2023, 18 (1): 2192438. doi: 10.1080/

15592294.2023.2192438.

- [12] Zhu X, Jin X, Li Z, et al. miR-152-3p facilitates cell adhesion and hepatic metastases in colorectal cancer via targeting AQP11
   [J]. Pathol Res Pract, 2023, 244: 154389. doi:10.1016/j. prp. 2023.154389.
- [13] Liang Y, Shen L, Ni W, et al. CircGNB1 drives osteoarthritis pathogenesis by inducing oxidative stress in chondrocytes[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(8): e1358. doi:10.1002/ctm2.1358.
- [14] Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2054 - 81. doi:10.1080/ 15548627.2020.1810918.
- [15] Wang X, Song Y, Shi Y, et al. SNHG3 could promote prostate cancer progression through reducing methionine dependence of PCa cells[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 13. doi:10.1186/ s11658-022-00313-z.

# Silencing circFADS2 induces ferroptosis in colorectal cancer cells through miR-152-3p/SLC7A11 signaling axis

Jiang Liangjun<sup>1</sup>, Lu Xianzhou<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Gastroenterology, <sup>2</sup>Dept of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421002)

**Abstract** *Objective* To investigate the effect and mechanism of silencing circ*FADS2* on ferroptosis in colorectal cancer (CRC) cells. Methods The human colon adenocarcinoma cell line SW480 was used as the research object. circFADS2 siRNA interference plasmid (si-circFADS2) and its negative control si-NC, miR-152-3p inhibitor and its negative control inhibitor-NC, miR-152-3p mimics and its negative control mimics NC, SLC7A11 overexpression plasmid (oe-SLC7A11) and its negative control vector were transfected into SW480 cells. Methylthiazolyldiphenvl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect cell proliferation activity; The contents of ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>), malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (CSH) in cells were detected by chemical method. Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in cells. Quantitative Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression levels of miR-152-3p and SLC7A11 mRNA in cells. Western blot was used to detect the expression levels of ferroptosis-related proteins such as SLC7A11 and GPX4 in cells. Dual luciferase reporter gene experiment was used to verify the sponge adsorption relationship between miR-152-3p and circFADS2, and the targeted regulation relationship between miR-152-3p and SLC7A11. Results Compared with blank group, the proliferation activity of si-circFADS2 group decreased, the levels of Fe<sup>2+</sup>, MDA and ROS increased, and the levels of SOD and GSH decreased; At the same time, the expression level of miR-152-3p increased, and the protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 decreased in cells (all P < 0.05). Compared with si-circFADS2 group, the proliferation activity of si-circFADS2 + inhibitor group increased, the levels of  $Fe^{2+}$ , MDA and ROS in cells decreased, and the levels of SOD and GSH increased; At the same time, the expression level of miR-152-3p decreased, and the protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 increased (all P < 0.05). The results of dual luciferase reporter gene experiment showed that SLC7A11 was a downstream target gene of miR-152-3p. Conclusion Silencing circFADS2 can induce ferroptosis in CRC cells possibly by targeting the miR-152-3p/SLC7A11 signaling axis.

**Key words** circ*FADS2*; colorectal cancer; SW480 cells; death of iron; *miR-152-3p*; solute carrier family 7 member 11

**Fund programs** Hunan Province Socialized Funding Projects for Science and Technology Innovation Plan(No. 2020SKC2009); Natural Science Foundation of Hunan Province(No. 2024JJ7461); General Guidance Project of Hubei Provincial Health Commission (No. D202303038378); Guiding Plan Project of Science and Technology Bureau of Hengyang(No. 202222035832)

Corresponding author Lu Xianzhou, E-mail:13875732434@163.com