

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¹, 卢先州²(南华大学衡阳医学院附属南华医院¹消化内科、²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^{2+})、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、GPX4 表达水平;双荧光素酶报告基因实验验证 *miR-152-3p* 与 *circFADS2* 之间的海绵吸附关系,以及 *miR-152-3p* 与 *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^{2+} 、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* + inhibitor 组细胞增殖活性升高,细胞中 Fe^{2+} 、MDA 和 ROS 水平降低,SOD 和 GSH 水平升高;同时,细胞中 *miR-152-3p* 表达水平降低,SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,*SLC7A11* 是 *miR-152-3p* 的下游靶基因。**结论** 沉默 *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* 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)在全世界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^[1]。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^[2]。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 miRNA 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^[3],提示 *miR-152-3p* 可能是 CRC 的潜在生物标志物。*circRNA*

是一种新型的环状非编码 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^[4-5]。研究^[6]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,以期以 *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 *circFADS2* siRNA 干扰质粒(si-*circFADS2*)及其阴性对照 si-NC、*miR-152-3p* in-

2025-04-13 接收

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)

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

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、#52455S、#2118) 购自美国 CST 公司;Lipofectamine™ 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^{2+}) 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 OLYMPUS 公司;Attune CytPix 型流式细胞仪、Varioskan Flash3001 型酶标仪、QuantStudio™ 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 °C, 气相条件为 95% 空气和 5% CO_2 , 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™ 3000 转染试剂将 si-circ*FADS2* 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、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; si-circ*FADS2* 组, 将 si-circ*FADS2* 转染至 SW480 细胞中; ② si-circ*FADS2* + inhibitor-NC 组, 将 si-circ*FADS2* 和 inhibitor-NC 共转染至 SW480 细胞中; si-circ*FADS2* + inhibitor 组, 将 si-circ*FADS2* 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 °C、15 min、85 °C、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 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 15 s、60 °C 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, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因 *miR-152-3p*、circ*FADS2* 和 *SLC7A11* 相对表达水平。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
circ <i>FADS2</i>	F: CACTTAAAGGGTGCCTCTG
	R: ATCCTTGTGGAAGATGTTAGG
<i>miR-152-3p</i>	F: TCGGCAGGTCAGTGCATGACAGAA
	R: CTCAACTGGTGTCTGGA
<i>SLC7A11</i>	F: CATCGTCCTTTCAAGGTGC
	R: ATAGAGGGAAAGGGCAACC
<i>U6</i>	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
<i>GAPDH</i>	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 3×10^3 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 4 h, 弃去孔内培养基, 加入 150 μl 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 3×10^3 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^{2+} 含量以及 SOD、GSH 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 1×10^5 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 $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶 (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 48 h 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 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 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 *circFADS2* 表达水平均升高 ($P < 0.05$), 其中 SW480 细胞中 *circFADS2* 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-*circFADS2* 组细胞增殖活性逐渐降低 ($P < 0.05$), 细胞中 Fe^{2+} 、MDA 含量及 ROS 活性水平升高 ($P < 0.05$), SOD 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 *circFADS2* 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, si-*circFADS2* 组 SW480 细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$), 细胞中 Fe^{2+} 、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, si-*circFADS2* + inhibitor 组 SW480 细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$), 细胞中 Fe^{2+} 、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-circFADS2 + 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。

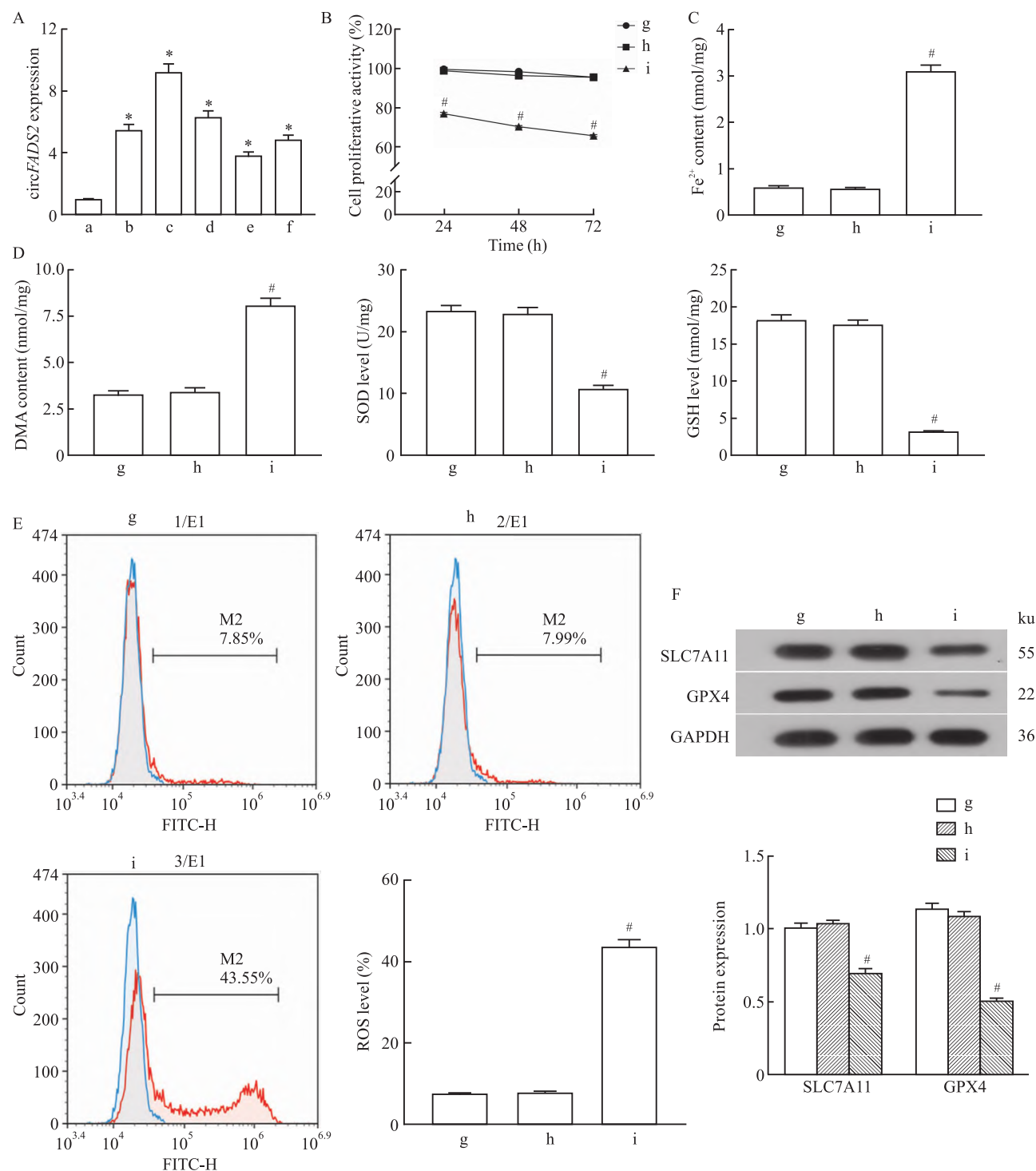


图1 沉默 circFADS2 对 CRC 细胞铁死亡的影响

Fig.1 Effect of silencing circFADS2 on ferroptosis in CRC cells

A: circFADS2 expression levels in cells; B: SW480 cell proliferation activity; C: Fe²⁺ 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-circFADS2 group; * $P < 0.05$ vs NCM460 group; # $P < 0.05$ vs blank group.

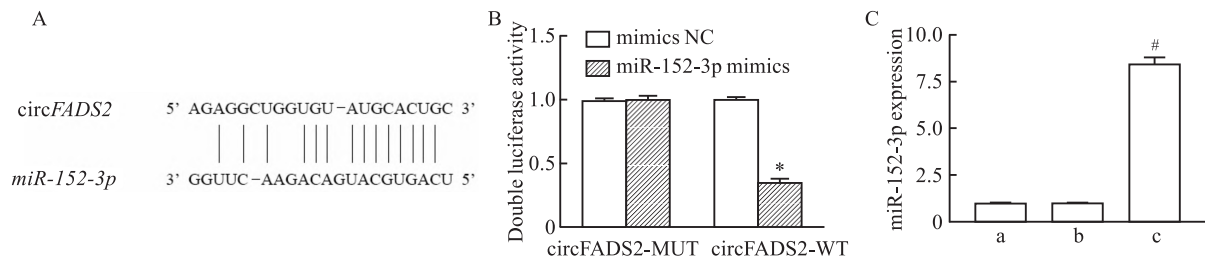


图2 circFADS2 与 miR-152-3p 之间的海绵吸附关系

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.

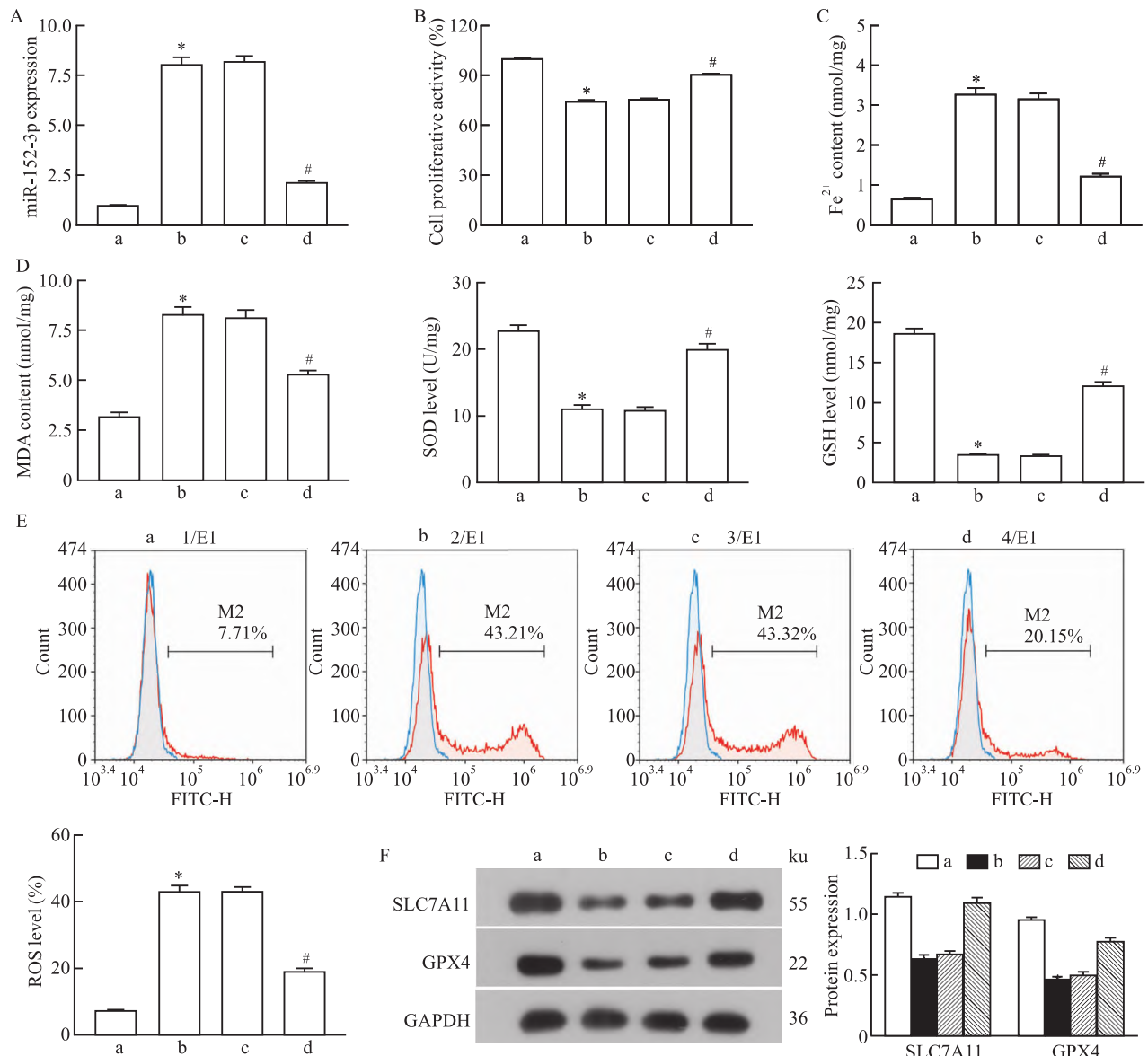


图3 抑制 miR-152-3p 对沉默 circFADS2 诱导 CRC 细胞铁死亡的影响

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: Fe²⁺ 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-NC group; d: 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^{2+} 、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^{2+} 、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^[7]。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^[8]。因此,寻找特异性靶

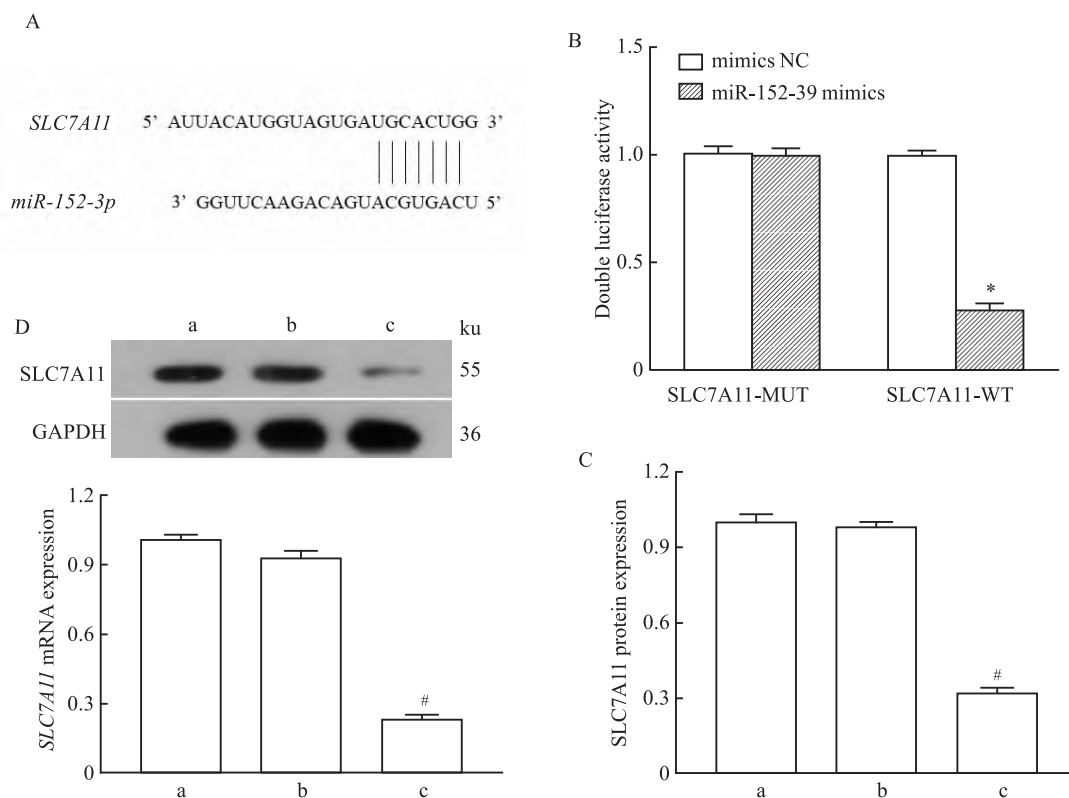
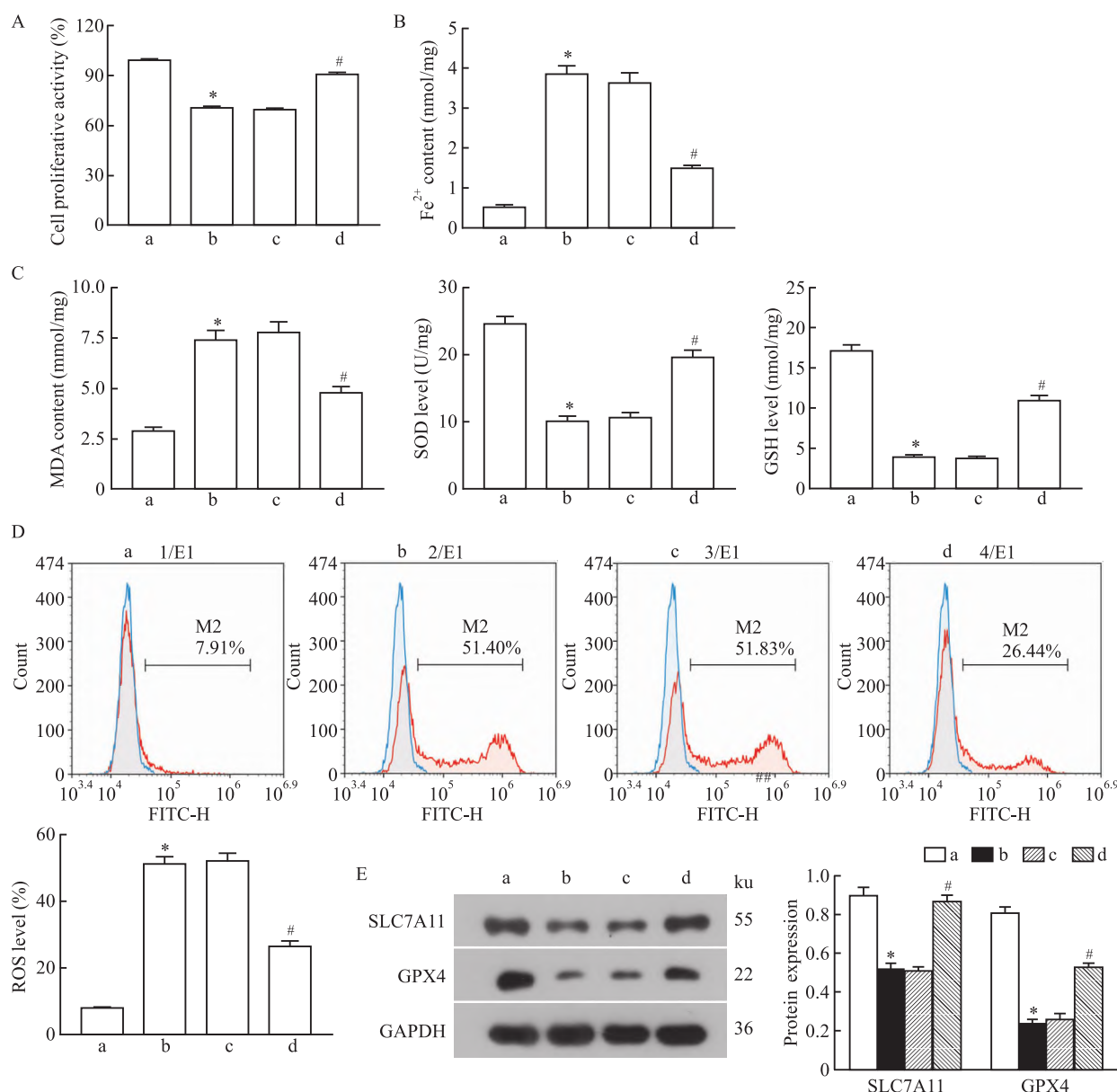


图 4 SLC7A11 与 miR-152-3p 之间的靶向调控关系

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 proliferative activity; B: Fe²⁺ 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^[9]。既往研究^[10]表明,cir-

cRNA 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^[11]。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 *circFADS2* 表达水平进行检测,结果显示,与 NCM460 细胞比较,所有 CRC 细胞中 *circFADS2* 表达水平均显著升高,其中 SW480 细胞最为显著,提示 *circFADS2* 可能是 CRC 的潜在治疗靶点。而沉默 *circFADS2* 后,SW480 细胞增殖活性显著降低,细胞中 Fe^{2+} 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 *circFADS2* 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^[12-13]。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^[14]。Wang et al^[15] 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^[3] 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

- [1] 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.
- [2] 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.
- [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.
- [4] 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.
- [7] 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. CircGMB1 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 Liangjun¹, Lu Xianzhou²

(¹Dept of Gastroenterology, ²Dept 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 *circFADS2* 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. Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect cell proliferation activity; The contents of ferrous ion (Fe^{2+}), malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) 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^{2+} , 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 *circFADS2*; 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