

CircXPO1/miR-5195-3p/RTKN 轴调控结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的机制研究

李 洁, 黎钟燕, 辜金莲

(广州市第一人民医院, 广东 广州 510180)

摘要: [目的] 探讨环状 RNA(circRNA)circXPO1 通过 miR-5195-3p/RTKN 轴调控结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的机制。[方法] 应用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 测定 circXPO1、miR-5195-3p、RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白的表达。SW620 细胞分为 si-NC 组、si-circXPO1 组、miR-NC 组、miR-5195-3p 组、si-circXPO1+anti-miR-5195-3p 组、si-circXPO1+pcDNA-RTKN 组, 依次转染 siRNA-NC (si-NC)、siRNA-circXPO1 (si-circXPO1)、mimic NC (miR-NC)、miR-5195-3p mimic、si-circXPO1、miR-5195-3p inhibitor(anti-miR-5195-3p)、si-circXPO1 和 pcDNA-RTKN。运用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)、流式细胞术检测 SW620 细胞增殖、凋亡。生物信息学分析与双荧光素酶报告实验测定 circXPO1 与 miR-5195-3p、miR-5195-3p 与 RTKN 的靶向关系。[结果] 与癌旁组织比较, 结直肠癌组织中 circXPO1 (4.55 ± 0.30 vs 4.55 ± 0.30)、RTKN mRNA (3.27 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.04) 和 RTKN 蛋白 (0.51 ± 0.06 vs 0.21 ± 0.03) 表达水平升高, miR-5195-3p (0.34 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.06) 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Si-circXPO1 组结直肠癌 SW620 细胞中 circXPO1 表达水平、细胞活性 (0.37 ± 0.03 vs 0.72 ± 0.05) 均比 si-NC 组低, 凋亡率 ($25.91\% \pm 2.51\%$ vs $6.73\% \pm 0.65\%$) 比 si-NC 组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CircXPO1 靶向调控 miR-5195-3p 的表达, miR-5195-3p 靶向调控 RTKN 的表达。MiR-5195-3p 组结直肠癌 SW620 细胞中 RTKN 蛋白、细胞活性 (0.43 ± 0.04 vs 0.74 ± 0.05) 比 miR-NC 组减少, 凋亡率 ($21.01\% \pm 2.11\%$ vs $7.17\% \pm 0.54\%$) 比 miR-NC 组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); si-circXPO1+anti-miR-5195-3p 组和 si-circXPO1+pcDNA-RTKN 组 RTKN 蛋白表达水平、细胞活性 (0.34 ± 0.03 、 0.38 ± 0.04 、 0.17 ± 0.02) 均高于 si-circXPO1 组, 凋亡率 ($13.83\% \pm 1.21\%$ 、 $10.19\% \pm 0.82\%$ 、 $27.53\% \pm 2.65\%$) 均低于 si-circXPO1 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] CircXPO1 通过 miR-5195-3p/RTKN 轴促进结直肠癌 SW620 细胞增殖, 和抑制其凋亡。

关键词: 结直肠肿瘤; SW620 细胞; circXPO1; miR-5195-3p; RTKN; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.3*5; R735.3*7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2021) 08-0615-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.08.B003

CircXPO1/miR-5195-3p/RTKN Axis in Regulating the Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells

LI Jie, LI Zhong-yan, GU Jin-lian

(Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of circular RNA(circRNA) circXPO1 in regulating the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells. [Methods] Surgical samples of cancer and adjacent tissue were collected from 41 patients with colorectal cancer. Human colorectal cancer SW620 cells were divided into si-NC group, si-circXPO1 group, miR-NC group, miR-5195-3p group, si-circXPO1+anti-miR-5195-3p and si-circXPO1+pcDNA-RTKN group, which were transfected with siRNA-NC(si-NC), siRNA-circXPO1 (si-circXPO1), mimic NC(miR-NC), miR-5195-3p mimic, si-circXPO1 and miR-5195-3p inhibitor(anti-miR-5195-3p), si-circXPO1 and pcDNA-RTKN, respectively. Real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) and Western blot were performed to determine the expression of circXPO1, miR-5195-3p, RTKN mRNA and RTKN protein. Cell counting kit 8(CCK-8) and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of SW620 cells. Bioinformatics analysis and dual luciferase report experiment were performed to determine the targeting relationship of circXPO1 with miR-5195-3p, miR-5195-3p and RTKN. [Results] Compared with adjacent tissues, the expression levels of circXPO1 (4.55 ± 0.30 vs 4.55 ± 0.30), RTKN mRNA (3.27 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.04) and RTKN protein (0.51 ± 0.06 vs 0.21 ± 0.03) in colorectal cancer tissues increased, miR-5195-3p (0.34 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.06) expression level decreased (all $P < 0.05$). The expression level of circXPO1 and cell viability (0.37 ± 0.03 vs 0.72 ± 0.05) in colorectal cancer SW620 cells of the si-circXPO1 group were lower than those in the si-NC group; and the apoptosis rate ($25.91\% \pm 2.51\%$ vs $6.73\% \pm 0.65\%$) was higher than that in the si-NC group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). CircXPO1 targets the expression of miR-5195-3p, and miR-5195-3p targets the expression of RTKN. The RTKN protein and cell activity (0.43 ± 0.04 vs 0.74 ± 0.05) of colorectal cancer SW620 cells in the miR-5195-3p group were lower than those in the miR-NC group, and the apoptosis rate ($21.01\% \pm 2.11\%$ vs $7.17\% \pm 0.54\%$) was higher than that in the miR-NC group (all $P < 0.05$). The expression level of RTKN protein and cell activity (0.34 ± 0.03 and 0.38 ± 0.04 vs 0.17 ± 0.02) of the si-circXPO1+anti-miR-5195-3p group and si-circXPO1+pcDNA-RTKN group were higher than those of the si-circXPO1 group, and the apoptosis rates ($13.83\% \pm 1.21\%$ and $10.19\% \pm 0.82\%$ vs $27.53\% \pm 2.65\%$) were lower than that of the si-circXPO1 group (all $P < 0.05$). [Conclusion] CircXPO1 promotes the proliferation of colorectal cancer SW620 cells and inhibits cell apoptosis through the miR-5195-3p/RTKN axis.

Subject words: colorectal cancer; SW620 cells; circXPO1; miR-5195-3p; RTKN; proliferation; apoptosis

基金项目: 广东省科技计划项目 (0445091120222076; 01548280218329060)

通信作者: 李洁, 副主任医师, 本科; 广州市第一人民医院老年病科消化内科, 广东省广州市越秀区盘福路 1 号 (510180);

E-mail: lijie19763@163.com

收稿日期: 2021-02-25; **修回日期:** 2021-04-14

由于结直肠癌肿瘤的异质性明显, 缺乏早期诊断标志物和有效的干预措施, 结直肠癌 5 年生存期仍然很差^[1-2]。因此, 有必要了解该病的关键分子机制, 早期诊断标志物, 并制定新的治疗策略。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种特殊的非编码 RNA, 由缺乏 5' 帽或 3' poly A 尾巴的共价闭合环状结构形成。CircRNA 最初被认为是剪接的副产物, 随后研究发现 circRNA 具有一系列重要的生物学作用, 例如通过海绵微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为竞争内源性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA), 蛋白质/肽转录本, 基因转录和 RNA 剪接因子^[3]。近年来, 越来越多的证据表明, circRNA 的失调可能干扰 ceRNA 网络的平衡, 并进一步影响包括结直肠癌在内的各种肿瘤发生^[4]。例如 circCAMSAP1 通过 miR-328-5p/E2F1 轴促进结直肠癌中的肿瘤生长^[5]。Circ_0008285 通过 miR-382-5p/ PTEN 轴抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移^[6]。Rhotekin (RTKN) 是一种 Rho 效应分子, 在结直肠癌组织中高表达, 沉默 RTKN 可抑制结直肠癌的进展和转移^[7], 使其成为结直肠癌机制中重要的调控位点。本研究以结直肠癌细胞株 SW620 为对象, 评价 circXPO1 对结直肠癌细胞增殖和凋亡的影响, 并进一步分析 circXPO1/miR-5195-3p/RTKN 轴在结直肠癌中的调控网络机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究经医院伦理委员会批准。结直肠癌和匹配的癌旁组织 (正常肠黏膜组织) 来自广州市第一人民医院经书面知情同意进行初次手术切除的 41 例结直肠癌患者。获得结直肠癌组织和癌旁组织, 立即在液氮冷冻并 -80 °C 保存。所有患者均未接受术前放疗、化疗、中西医结合治疗和免疫治疗, 也无其他肿瘤。

结直肠癌细胞株 SW620 (上海酶研生物科技有限公司), siRNA-NC (si-NC)、siRNA-circXPO1 (si-circXPO1)、mimic NC (miR-NC)、miR-5195-3p mimic、miR-5195-3p inhibitor (anti-miR-5195-3p)、pcDNA-RTKN (上海 GenePharma), 细胞计数试剂盒 8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8; 美国 ImmunoWay), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Sigma), Dual-Glo

荧光素酶测定系统 (美国 Promega), 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒 (大连 Takara)。

1.2 细胞培养与分组

在 37 °C、5% CO₂ 的潮湿培养箱中, SW620 细胞在有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 中培养。SW620 细胞分为 si-NC 组、si-circXPO1 组、miR-NC 组、miR-5195-3p 组、si-circXPO1+anti-miR-5195-3p 组、si-circXPO1+pcDNA-RTKN 组, 依次转染 si-NC、si-circXPO1、miR-NC、miR-5195-3p mimic、si-circXPO1、anti-miR-5195-3p、si-circXPO1 和 pcDNA-RTKN。将 SW620 细胞接种在 6 孔板中, 然后在 24 h 后以 60%~70% 的融合度使用 Lipofectamine 2000, 根据制造商的规程进行上述转染。转染 48 h 后检测细胞的 circXPO1、miR-5195-3p、RTKN mRNA、RTKN 蛋白表达及增殖、凋亡。另转染 pcDNA、pcDNA-circXPO1、anti-miR-NC、anti-miR-5195-3p 入 SW620 细胞, 用于检测 miR-5195-3p 和 RTKN 蛋白表达。

1.3 QRT-PCR 检测 circXPO1、miR-5195-3p 和 RTKN mRNA 表达

使用 TRIzol 试剂从结直肠癌组织或 SW620 细胞中分离总 RNA。为了定量 circRNA 和 mRNA 的量, 使用 PrimeScript RT Master Mix 从 500 ng RNA 合成了 cDNA。MiR-X miRNA First-Strand Synthesis 试剂盒用于 miRNA 反转录。使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒和罗氏 Light Cycler 480 II 实时 PCR 系统进行实时 PCR 分析。通过 2^{-ΔΔCt} 法计算 circXPO1、miR-5195-3p 和 RTKN mRNA 表达。β-肌动蛋白 (β-actin) 作为检测 circRNA 和 mRNA 表达水平的内源性对照, U6 作为 miRNA 表达分析的内源性对照。CircXPO1 引物由上海 GenePharma 合成。引物如下 (5'-3'): RTKN F: GCCGCTGCTTACTATTGC, R: GTGCTTCCCGACTTTCTG; β-actin F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT, R: GCTGTCACCTTCACCGT-TCC; miR-5195-3p F: GCCTGTAGGCATCATCGCCAG, R: GATAGAGTGACGTGAAGTAG; U6 F: GCTTCGG-CAGCA-CATATACTAAAAT, R: CGCTTCAGAAATTTG-CGTGT-CAT。

1.4 Western blot 检测 RTKN 蛋白表达

在冰上用 100 μl RIPA 裂解液裂解结直肠癌组织或 SW620 细胞 30 min。BCA 方法用于确定样品

中的蛋白质浓度。在电泳前,蛋白质于 100 ℃下变性,样品每孔上样加入 50 μg 蛋白质,并在 120 V 恒压下通过标记电泳分离,转膜 180 min。膜用 5%脱脂牛奶封闭后,用 RTKN(Abcam,1:3 000)兔多克隆抗体或抗 GAPDH 兔多克隆抗体 (Abcam,1:1 000)在 4 ℃下振荡过夜。然后将膜与 HRP-山羊抗兔 IgG (Abcam,1:2 000) 孵育 2 h,将其浸入发光液中 2 min 以检测反应条带。分析 RTKN 相对于 GAPDH 的表达。

1.5 细胞增殖检测

将转染后的 SW620 细胞以 5×10^3 /孔接种到 96 孔板中,并培养 48 h,每组 3 个复孔,进行 3 次生物学重复。使用 CCK-8(10 μl)测定细胞的增殖。然后在酶标仪上确定 CCK-8 反应 2 h 后的 OD 值 (450 nm),OD 值与细胞活性呈正比。

1.6 细胞凋亡检测

Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒用于 SW620 细胞染色。将 SW620 细胞用磷酸盐缓冲液洗涤两次,以 1×10^6 最终浓度重悬于 1×结合缓冲液中,然后将 500 μl 细胞悬液、5 μl Annexin V-FITC 缀合物和 10 μl 碘化丙啶(PI)溶液混合,室温下孵育 10 min 并避光。随后使用 BD FACS 分析仪分析细胞凋亡。

1.7 生物信息分析与双荧光素酶报告实验

将包含 miR-5195-3p 结合位点的野生型 circXPO1 序列(WT-circXPO1)或 RTKN 序列(WT-RTKN)融合到萤光素酶报告载体中,然后将 circXPO1 或 RTKN 序列中 miR-5195-3p 结合位点的突变型插入萤光素酶报告载体中(MUT-circXPO1 或 MUT-RTKN)。使用 Lipofectamine 2000 将 SW620 细胞与 miR-5195-3p mimic 或 miR-NC 与 WT-circXPO1 或 MUT-circXPO1 共转染,同样将 miR-5195-3p mimic 或 miR-NC 与 WT-RTKN 或 MUT-RTKN 共转染。转染后 48 h 使用 Dual-Glo 萤光素酶测定系统测定荧光活性。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计与分析,采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间数据比较采用独立样本 *t* 检

验,多组数据间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CircXPO1、miR-5195-3p 和 RTKN 在结直肠癌组织中的表达

41 例结直肠癌组织中 circXPO1、miR-5195-3p、RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白的表达水平分别是癌旁组织的约 4.55 倍、0.34 倍、3.27 倍、2.43 倍,结直肠癌与癌旁组织比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$) (Table 1, Figure 1)。

2.2 抑制 circXPO1 表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的影响

Si-circXPO1 组结直肠癌 SW620 细胞中 circXPO1 表达水平(0.24 ± 0.03)、细胞活性(0.37 ± 0.03)均比 si-NC 组(1.00 ± 0.07 、 0.72 ± 0.05)低,凋亡率($25.91\% \pm 2.51\%$)比 si-NC 组($6.73\% \pm 0.65\%$)高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(Table 2, Figure 2)。

2.3 CircXPO1 靶向调控 miR-5195-3p 的表达

CircXPO1 与 miR-5195-3p 的靶向结合位点示意图通过 StarBase 软件预测(Figure 3)。MiR-5195-3p 与 WT-circXPO1 共转染后 SW620 细胞的荧光活性比 miR-NC 与 WT-circXPO1 共转染低了约 58.42%,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 miR-5195-3p 与

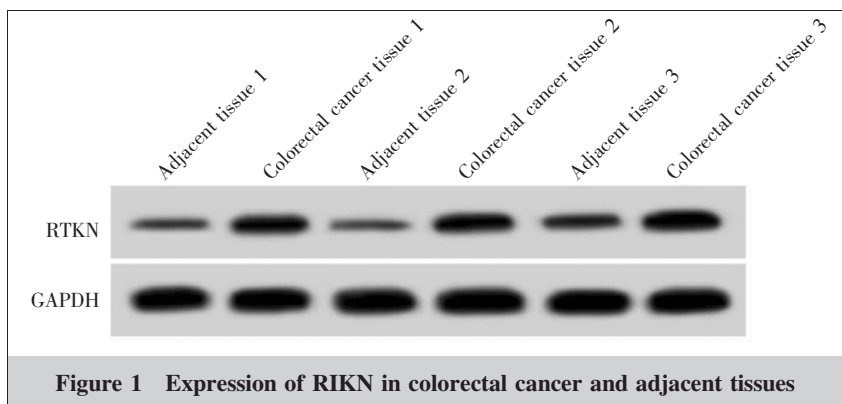


Figure 1 Expression of RTKN in colorectal cancer and adjacent tissues

Table 1 The expression of circXPO1, miR-5195-3p and RTKN in colorectal cancer and adjacent tissues

Groups	CircXPO1	MiR-5195-3p	RTKN mRNA	RTKN protein
Adjacent tissues	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04	0.21 ± 0.03
Colorectal cancer tissues	4.55 ± 0.30	0.34 ± 0.03	3.27 ± 0.29	0.51 ± 0.06
<i>t</i>	72.575	62.998	49.651	13.416
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

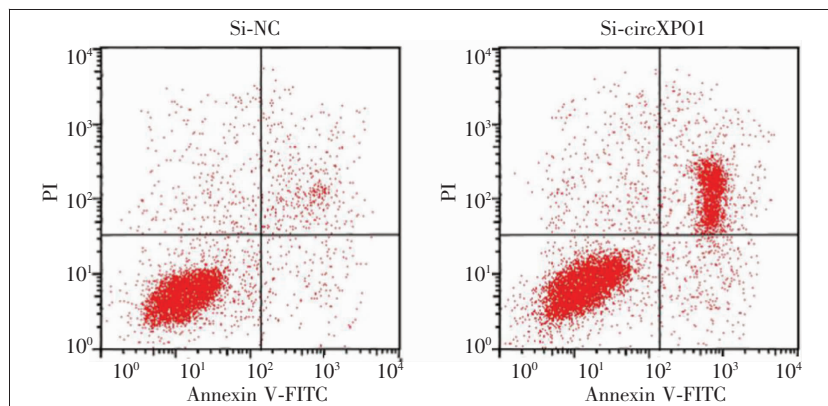


Figure 2 The effect of inhibiting the expression of circXPO1 on the apoptosis of coloectal cancer SW620 cells

Figure 2 The effect of inhibiting the expression of circXPO1 on the proliferation and apoptosis of coloectal cancer SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	CircXPO1	OD value(450 nm)	Apoptosis rate(%)
Si-NC	1.00±0.07	0.72±0.05	6.73±0.65
Si-circXPO1	0.24±0.03	0.37±0.03	25.91±2.51
<i>t</i>	29.938	18.007	22.192
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

MUT-circXPO1 共转染、miR-NC 与 MUT-circXPO1 共转染后, SW620 细胞的荧光活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)(Table 3)。PcDNA 组、pcDNA-circXPO1 组 miR-5195-3p 表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 0.33 ± 0.03 , 差异有统计学意义 ($P<0.05$); si-NC 组、si-circXPO1 组 miR-5195-3p 表达水平分别为 1.02 ± 0.08 、 3.06 ± 0.28 , 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.4 MiR-5195-3p 靶向调控 RTKN 的表达

RTKN 与 miR-5195-3p 的靶向结合位点示意图通过 TargetScan 软件预测(Figure 4)。MiR-5195-3p 与 WT-RTKN 共转染后 SW620 细胞的荧光活性比 miR-NC 与 WT-RTKN 共转染低了约 63.64%, 差异

Table 3 Dual luciferase report experiment between circXPO1 and miR-5195-3p

Groups	WT-circXPO1	MUT-circXPO1
MiR-NC	1.01±0.07	1.03±0.08
MiR-5195-3p	0.42±0.04	1.04±0.06
<i>t</i>	21.954	0.300
<i>P</i>	<0.001	0.768

WT-circXPO1 5' cuugauuUCAGCCAAAAACUGGAU 3'
miR-5195-3p 3' ucgggggagUUC - - - UCUUGACCUA 5'
MUT-circXPO1 5' cuugauuCUGACCACAGCUAUUCG 3'

Figure 3 The sequence of circXPO1 contains a nucleotide sequence complementary to miR-5195-3p

有统计学意义 ($P<0.05$); 而 miR-5195-3p 与 MUT-RTKN 共转染、miR-NC 与 MUT-RTKN 共转染后, SW620 细胞的荧光活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)(Table 4)。MiR-NC 组、miR-5195-3p 组 RTKN 蛋白表达水平分别为 0.40 ± 0.04 、 0.21 ± 0.03 , 差异有统计学意义 ($P<0.05$); anti-miR-NC 组、anti-miR-5195-3p 组 RTKN 蛋白表达水平分别为 0.38 ± 0.03 、 0.84 ± 0.05 , 差异有统计学意义 ($P<0.05$)(Figure 5)。

2.5 MiR-5195-3p 过表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的影响

MiR-5195-3p 组结直肠癌 SW620 细胞中 miR-5195-3p 表达水平比 miR-NC 组增加约 2.85 倍, RTKN 蛋白、细胞活性比 miR-NC

组减少约 46.51%、41.89%, 凋亡率比 miR-NC 组增加约 66.16%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)(Table 5, Figure 6)。

Table 3 Dual luciferase report experiment between RTKN and miR-5195-3p

Groups	WT-RTKN	MUT-RTKN
MiR-NC	0.99±0.06	0.98±0.06
MiR-5195-3p	0.36±0.04	0.97±0.05
<i>t</i>	26.210	0.384
<i>P</i>	<0.001	0.706

WT-RTKN 3'UTR 5' ccuuccuggAAGaaAACUGGAa 3'
miR-5195-3p 3 ucgggggaguUUC - - UUGACCUa 5'
MUT-RTKN 3'UTR 5' ccuuccuggGCAaaCGUCAUGa 3'

Figure 4 The 3'UTR of RTKN contains a nucleotide sequence complementary to miR-5195-3p

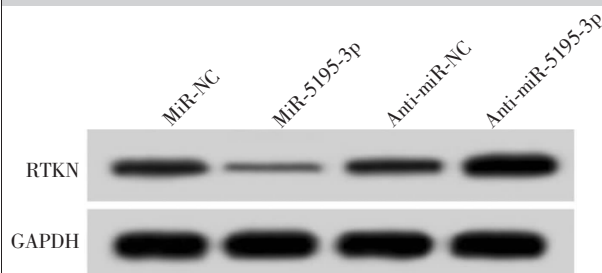


Figure 5 MiR-5195-3p regulates the expression of RTKN protein

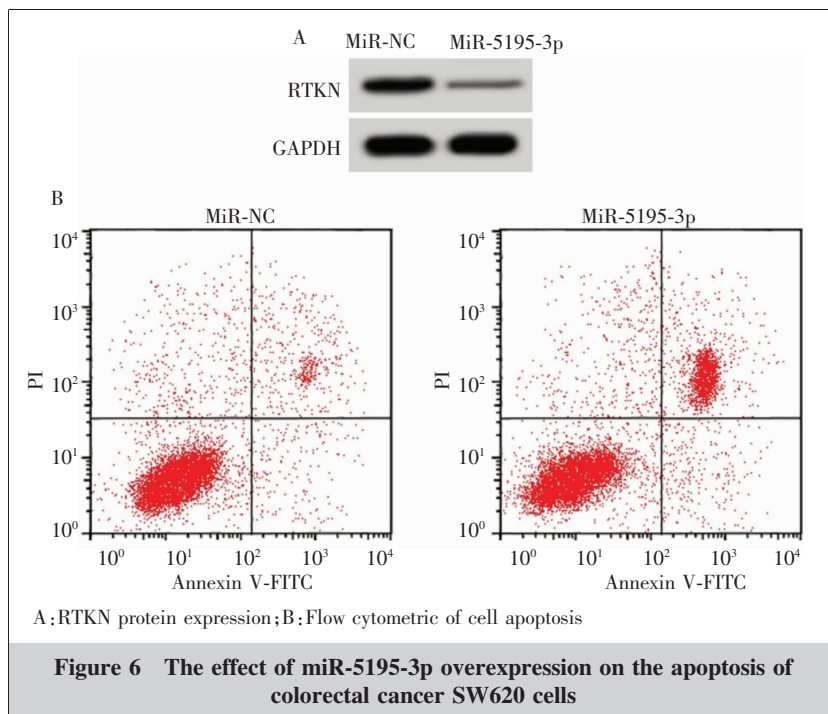


Figure 6 The effect of miR-5195-3p overexpression on the apoptosis of colorectal cancer SW620 cells

Table 5 The effect of miR-5195-3p overexpression on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW620 cells

Groups	miR-5195-3p	RTKN protein	OD value(450 nm)	Apoptosis rate(%)
MiR-NC	1.00±0.05	0.43±0.04	0.74±0.05	7.17±0.54
MiR-5195-3p	3.85±0.23	0.23±0.02	0.43±0.04	21.01±2.11
<i>t</i>	36.325	13.416	14.524	19.063
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.6 抑制 miR-5195-3p 表达或上调 RTKN 表达逆转了抑制 circXPO1 表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的作用

Si-circXPO1 组结直肠癌 SW620 细胞的 miR-5195-3p 表达水平高于 si-NC 组, RTKN 蛋白表达水平、细胞活性低于 si-NC 组, 凋亡率高于 si-NC 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Si-circXPO1+anti-miR-5195-3p 组结直肠癌 SW620 细胞的 miR-5195-3p 表达水平低于 si-circXPO1 组, si-circXPO1+anti-miR-5195-3p 组和 si-circXPO1+pcDNA-RTKN 组 RTKN 蛋白表达水平、细胞活性均高于 si-circXPO1 组, 并且这两组 SW620 细胞的凋亡率均低于 si-circXPO1 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 6, Figure 7)。

3 讨论

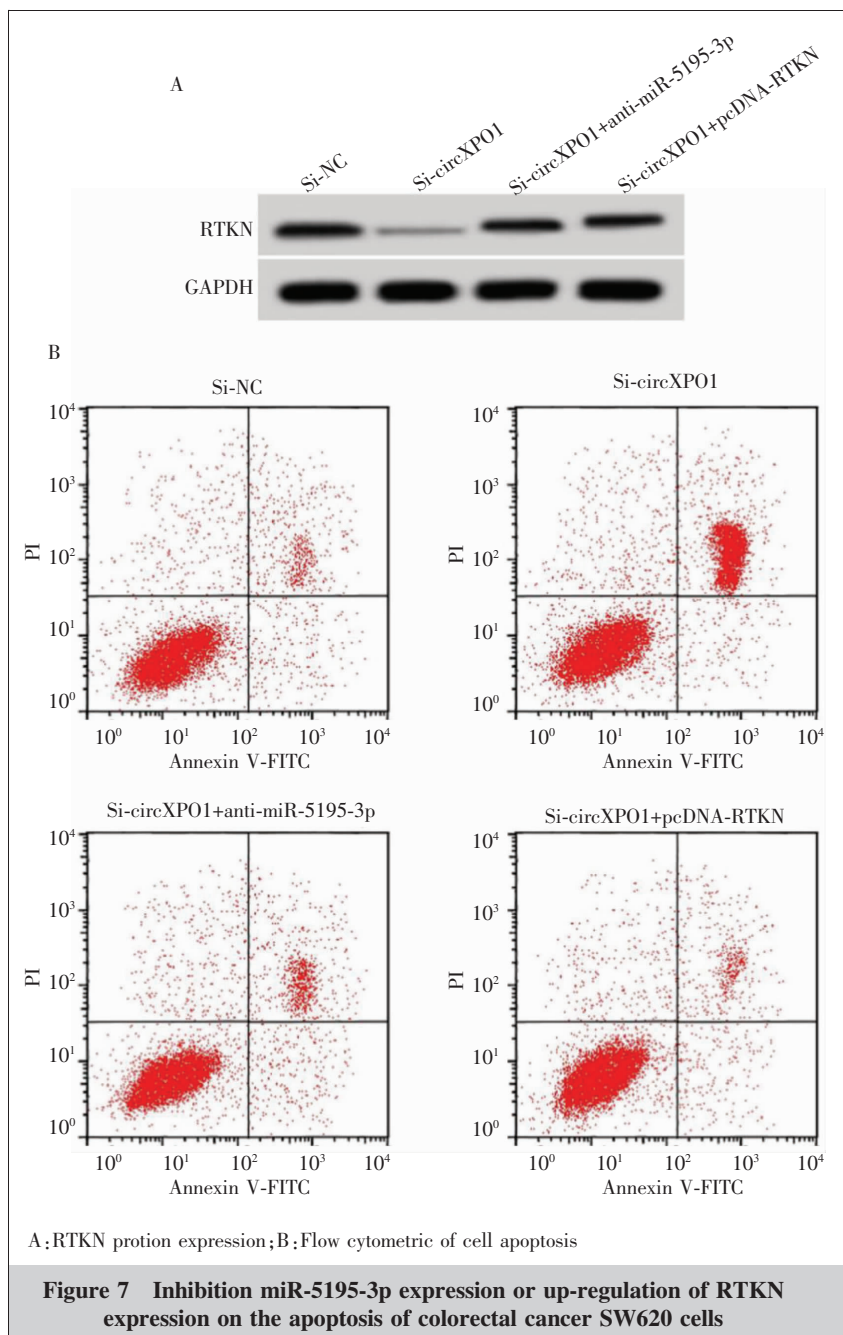
CircRNA 与结直肠癌的恶性进展密切相关, 可以用作治疗结直肠癌的分子靶标^[8]。Jiang 等^[9]在骨

肉瘤组织标本和细胞中鉴定到 circXPO1 的升高。在功能上, circXPO1 通过海绵化多个 miRNA, 促进骨肉瘤细胞的生长和侵袭, 抑制细胞凋亡。CircXPO1 在肺腺癌组织中高表达, 其高表达与总体生存率差相关, circXPO1 在体外促进肺腺癌细胞的增殖和侵袭, 降低细胞凋亡^[10]。本研究首先发现, circXPO1 在结直肠癌患者中高表达, 然后通过建立 si-circXPO1 在结直肠癌 SW620 细胞中的敲低来评估 circXPO1 对结直肠癌的作用。本研究使用 siRNA 方法敲除 circXPO1 使其丧失功能, 结果表明, 抑制 circXPO1 表达可以减弱结直肠癌细胞的活性, 而增强细胞凋亡。提示与前述研究^[9-10]相符, circXPO1 具有加速结直肠癌进展的功能, 这为 circXPO1 作为致癌 circRNA 提供了新的理论支持。

考虑到大多数 circRNA 都起 miRNA 海绵的作用, 本研究使用生物信息学在线工具 StarBase 来预测可能与 circXPO1 结合的潜在 miRNA, 并通过双荧光素酶报告实验证明了 circXPO1 包含 miR-5195-3p 的结合位点。QRT-PCR 结果还显示, circXPO1 过表达抑制 miR-5195-3p 表达, 干扰 circXPO1 促进 miR-5195-3p 表达。因此, 本研究确认 circXPO1 作为海绵可以靶向负调控 miR-5195-3p 的表达。MiRNA 是 18~25 个核苷酸的小型非编码 RNA, 通过特异地靶向 mRNA 在转录后修饰基因表达中发挥重要作用。现已发现, miR-5195-3p 可以通过靶向非小细胞肺癌^[11]、卵巢癌^[12]、膀胱癌^[13]等不同癌症中的各种基因来抑制肿瘤。例如, 在卵巢癌样品中观察到了 miR-5195-3p 的显著降低^[15], miR-5195-3p 在膀胱癌组织和细胞中下调表达, 上调其表达可抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭^[13]。Hsa-miR-5195-3p 诱导 TGFβR1、TGFβR2、SMAD3 和 SMAD4 下调来影响 SW480 和 HCT116 细胞系的周期进程^[14], 但 miR-5195-3p 在结直肠癌中的作用和机制仍有待探索。本研究发现 miR-5195-3p 在结直肠癌组织中低表达, 过表达 miR-5195-3p 表达可显著降低结直肠

Table 6 Inhibition of miR-5195-3p expression or up-regulation of RTKN expression reversed the effect of inhibiting circXPO1 expression on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Groups	MiR-5195-3p	RTKN protein	OD value (450 nm)	Apoptosis rate (%)
Si-NC	1.00±0.07	0.44±0.04	0.77±0.05	5.80±0.56
Si-circXPO1	3.11±0.26*	0.17±0.02*	0.35±0.03*	27.53±2.65*
Si-circXPO1+anti-miR-5195-3p	1.79±0.14 [#]	0.34±0.03 [#]	0.61±0.05 [#]	13.83±1.21 [#]
Si-circXPO1+pcDNA-RTKN	-	0.38±0.04 [#]	0.68±0.05 [#]	10.19±0.82 [#]
F	333.156	107.400	139.821	334.933
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with si-NC group, * $P < 0.05$; Compared with si-circXPO1 group, $^{\#}P < 0.05$ 

癌 SW620 细胞的增殖能力,提高凋亡率,与前述报告吻合。同时,一系列恢复实验表明,抑制 miR-5195-3p 表达逆转了抑制 circXPO1 表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的作用。

作为 miRNA 海绵, circRNA 可以将 miRNA 与其靶 mRNA 隔离开,从而减轻其介导的基因抑制^[15]。为了阐明 circXPO1/miR-5195-3p 通路在结直肠癌进程中的下游因子,本研究使用生物信息学分析和 qRT-PCR 预测显示 miR-5195-3p 对 RTKN 表达具有靶向负调控作用。RTKN 在许多癌症中均起着促进肿瘤发展的作用,其表达在包括胃癌^[16]、肝癌^[17]、肺癌^[18]和结直肠癌^[7]在内的多种癌症中过表达,已证明沉默 RTKN 可以抑制结直肠癌 LOVO 细胞的增殖,迁移,侵袭和阻滞细胞周期^[7]。RTKN 可以作为癌基因促进肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的增殖,抑制细胞凋亡,RTKN 还被确定为 miR-152 的直接靶标。本研究发现,结直肠癌组织中 RTKN mRNA 和 RTKN 蛋白的表达被上调,与前述研究一致。另外,RTKN 是结直肠癌病程中 circXPO1/miR-5195-3p 的靶标,因为抑制 miR-5195-3p 表达逆转了抑制 circXPO1 表达引起的 RTKN 蛋白表达的降低。结合随后的 si-circXPO1 与 pcDNA-RTKN 共转染结果,上调 RTKN 表达逆转了抑制 circXPO1 表达对结直肠癌 SW620 细胞增殖和凋亡的作用,证明 circXPO1 可通过靶向 miR-5195-3p 调节 RTKN 表达来影响结直肠癌细胞的增殖和凋亡。

总之,本研究揭示了 circX-

PO1 在结直肠癌进程中的关键功能。CircXPO1/miR-5195-3p/RTKN 调节结直肠肿瘤发生,为结直肠癌提供了一种基于 circRNA 的潜在诊断策略。

参考文献:

- [1] Grizzi F, Basso G, Borroni EM, et al. Evolving notions on immune response in colorectal cancer and their implications for biomarker development[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(5):375-389.
- [2] Li N. CircTBL1XR1/miR-424 axis regulates Smad7 to promote the proliferation and metastasis of colorectal cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2020, 11(5):918-931.
- [3] Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field [J]. *Oncogene*, 2018, 37(5):555-565.
- [4] Nie H, Wang Y, Liao Z, et al. The function and mechanism of circular RNAs in gastrointestinal tumours [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7):e12815.
- [5] Zhou C, Liu HS, Wang FW, et al. CircCAMSAP1 promotes tumor growth in colorectal cancer via the miR-328-5p/E2F1 axis[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3):914-928.
- [6] Wang J, Luo J, Liu G, et al. Circular RNA hsa_circ_0008285 inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration via the miR-382-5p/PTEN axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(2):503-510.
- [7] Qu GQ, Lu YM, Liu YF, et al. Effect of RTKN on progression and metastasis of colon cancer in vitro [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74:117-123.
- [8] Francavilla A, Turoczi S, Tarallo S, et al. Exosomal microRNAs and other non-coding RNAs as colorectal cancer biomarkers: a review[J]. *Mutagenesis*, 2020, 35(3):243-260.
- [9] Jiang Y, Hou J, Zhang X, et al. Circ-XPO1 upregulates XPO1 expression by sponging multiple miRNAs to facilitate osteosarcoma cell progression [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117:104553.
- [10] Huang Q, Guo H, Wang S, et al. A novel circular RNA, circXPO1, promotes lung adenocarcinoma progression by interacting with IGF2BP1 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12):1031-1043.
- [11] Yang Q. MicroRNA-5195-3p plays a suppressive role in cell proliferation, migration and invasion by targeting MYO6 in human non-small cell lung cancer [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(2):212-220.
- [12] Ebrahimi SO, Reisi S. Downregulation of miR-4443 and miR-5195-3p in ovarian cancer tissue contributes to metastasis and tumorigenesis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(5):1453-1458.
- [13] Jiang Z, Zhang Y, Cao R, et al. MiR-5195-3p inhibits proliferation and invasion of human bladder cancer cells by directly targeting oncogene KLF5 [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(7):1081-1087.
- [14] Jahangiri Moez M, Bjeije H, Soltani BM. Hsa-miR-5195-3P induces downregulation of TGFβR1, TGFβR2, SMAD3 and SMAD4 supporting its tumor suppressive activity in HCT116 cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 109:1-7.
- [15] Chen C, Huang Z, Mo X, et al. The circular RNA 001971/miR-29c-3p axis modulates colorectal cancer growth, metastasis, and angiogenesis through VEGFA [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):91-105.
- [16] Sun MY, Zhang H, Tao J, et al. Expression and biological function of rhotekin in gastric cancer through regulating p53 pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:1069-1080.
- [17] Zhou J, Zhang Y, Qi Y, et al. MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2):1227-1234.
- [18] Zhang W, Liang Z, Li J. Inhibition of rhotekin exhibits antitumor effects in lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5):2529-2534.