

• 论 著 •

circ-ITCH 抑制结直肠癌细胞增殖和转移的作用机制研究*

蔡沾煊, 陈 升, 苏学良

儋州市人民医院/海南医学院附属儋州医院普外科, 海南儋州 571700

摘 要:**目的** 研究环状 RNA Itchy E3 泛素蛋白连接酶(Circ-ITCH)在结直肠癌(CRC)细胞增殖和转移中的作用及通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥作用的机制。**方法** 采用实用荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 CRC 和癌旁组织中 Circ-ITCH 的表达水平,分析 Circ-ITCH 的表达水平与患者病理参数和预后的关系。qRT-PCR 检测细胞 SW480、SW620 和 HT29 及正常结肠细胞 NCM460 中 Circ-ITCH 的表达水平,筛选 Circ-ITCH 低表达水平的 CRC 细胞,分为对照组(NC 组)和 Circ-ITCH 组,构建空载质粒和 Circ-ITCH 过表达水平转染质粒,分别转染各组细胞。qRT-PCR 检测各组细胞中 Circ-ITCH 的表达水平;细胞计数试剂 8(CCK8)实验检测各组细胞增殖能力;Transwell 实验检测各组细胞转移能力;TOP/FOP 双荧光素酶实验检测各组细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性;Western blot 检测各组细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin 及其下游增殖相关蛋白 cyclinD1、cMyc 和转移相关蛋白基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 的表达水平。**结果** Circ-ITCH 在 CRC 组织中表达水平低于在癌旁组织中的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Circ-ITCH 低表达与患者淋巴结转移和 TNM 分期相关($P < 0.05$),Circ-ITCH 低表达水平的患者预后较差($P < 0.05$)。Circ-ITCH 在 CRC 细胞 SW480、SW620 和 HT29 中的表达均低于在正常结肠细胞 NCM460 中的表达,其中在 SW620 细胞中的表达水平最低。与 NC 组相比,Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 Circ-ITCH 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),Circ-ITCH 组 SW620 细胞增殖和转移能力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin 核表达及其下游增殖相关蛋白 cyclinD1、cMyc 和转移相关蛋白 MMP2、MMP9 的表达均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Circ-ITCH 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 CRC 增殖及转移能力,具有作为抗 CRC 治疗分子靶点的潜力。

关键词: 结直肠癌; 环形 RNA Itchy E3 泛素蛋白连接酶; 增殖; 转移; Wnt/ β -catenin 信号通路

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.016 **中图法分类号:**R735.34

文章编号:1673-4130(2023)02-0211-06 **文献标志码:**A

Mechanism of circ ITCH inhibiting proliferation and metastasis of colorectal cancer cells*

CAI Zhanhuan, CHEN Sheng, SU Xueliang

General of Surgery, Danzhou People's Hospital/Danzhou Hospital Affiliated to Hainan Medical College/Danzhou, Hainan 571700, China

Abstract:**Objective** To study the role and mechanism of Circular Rna Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase (Circ-ITCH) cell proliferation and metastasis and by regulating Wnt/ β -Catenin signaling in colorectal cancer (CRC). **Methods** Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of Circ-ITCH in CRC and paracancer tissues, and analyzes the relationship between the expression of Circ-ITCH and patient pathological parameters and prognosis. qRT-PCR was used to detect the expression level of Circ-ITCH in SW480, SW620, and HT29 cells and normal colon cells NCM460 expression levels, screening CIRC-ITCH low-expression CRC cells, divided into the control group and the Circ-ITCH group, construct airborne metals and Circ-ITCH expressed transfection, transfected into group cells. qRT-PCR was used to detect the expression level of Circ-ITCH in each group; Cell Counting Kit-8 (CCK8) experiment was used to detect by each group of cell proliferation abilities; Transwell experiments were used to detect cell metastasis capabilities of each group; TOP/FOP double phosphoridase experiment was was used to detect the activity of WNT/ β -catenin the signal pathway; Western Blot was used to detect the expression of key protein β -catenin signal pathway in each group of cells, and its downstream proliferative protein CyclinD1, CMYC and metastat-

* 基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目(18A200162)。
作者简介: 蔡沾煊, 男, 主治医师, 主要从事胃肠肿瘤临床及基础研究方面的研究。

ic associated protein Matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP9 expression. **Results** Circ-ITCH expression was significantly lower than expression in cancer tissue, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The low expression of Circ-ITCH correlated with the patient's lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$), patient prognosis was poor with Circ-ITCH low expression ($P < 0.05$). Expression of CIRC-ITCH in CRC cells SW480, SW620 and HT29 was significantly lower than the expression in NCM 460 in normal colon cells, where in the expression in SW620 cells was the lowest. Compared with the NC group, Circ-ITCH expression was significantly increased in Circ-ITCH group ($P < 0.05$), and the Circ-ITCH group SW620 cell proliferation and metastasis ability were significantly reduced, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The activity of the Wnt/ β -Catenin signal pathway is significantly reduced in Circ-ITCH group SW620 cells, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); Circ-ITCH group SW620 cells in Wnt/ β -catenin signal pathway key protein β -catenin nuclear expression and downstream proliferation related protein CyclinD1, cMyc and metastasis related protein MMP2 and MMP9 was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Circ-ITCH has a potential to be aimed to treat molecular targets for anti-CRC treatment by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: colorectal cancer; circ-itch; proliferation; transfer; Wnt / β -catenin signaling pathway

结直肠癌(CRC)是全世界最常见的恶性肿瘤之一,占男性恶性肿瘤发病率的第二位和女性的第三位,以及男性恶性肿瘤相关死亡的第三位和女性的第四位^[1]。随着诊断和治疗技术的不断提高,CRC患者的五年生存率有所改善,但是肿瘤患者的五年生存预后与疾病的进展阶段高度相关。晚期CRC患者通常伴有肿瘤转移,五年的存活率非常低^[2]。因此,本文迫切需要进一步研究CRC的发病机制和肿瘤转移中的未知分子机制。环状RNA(CircRNA) Itchy E3 泛素蛋白连接酶(Circ-ITCH)是新近发现的肿瘤抑制CircRNA之一,目前已经发现Circ-ITCH在常见恶性肿瘤乳腺癌^[3]和消化道常见恶性肿瘤胃癌、肝细胞肝癌等^[4-5]多种肿瘤中表达水平降低,抑制肿瘤细胞的增殖和转移能力,Circ-ITCH是否抑制CRC细胞的增殖和转移能力未知。Wnt/ β -catenin信号通路传导的异常激活与人类恶性肿瘤的进展有关,尤其是CRC^[6]。Circ-ITCH在乳腺癌、肝细胞肝癌和甲状腺乳头状癌中通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路发挥抑癌作用^[3,5],提示Circ-ITCH在CRC中可能与Wnt/ β -catenin信号通路相关。因此本文致力于研究Circ-ITCH通过调控Wnt/ β -catenin信号通路抑制CRC的恶性进展,以期发现Circ-ITCH作为干预CRC治疗分子靶点的重要实验室依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 纳入在本院确诊的CRC患者82例。患者组织标本新鲜,立即采用液氮冻存。纳入标准:(1)接受根治性疾病的CRC患者,包括收集肿瘤组织和相邻的正常组织(距离肿瘤5cm);(2)病理明确为CRC;(3)患者临床资料包括年龄、性别、肿瘤最大径、肿瘤分级、TNM分期的临床参数及预后资料;排除标准:(1)接受过全身治疗或局部治疗;(2)合并另一种恶性肿瘤;(3)患有严重威胁生命健康的基础疾病。本研究根据赫尔辛基宣言获得所有受试者书

面知情同意书,并已经获得本院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 Trizol 试剂(15596-018)和 Lipofectamine 2000 (11668)试剂购自美国 Invitrogen 公司;Circ-ITCH 和 GAPDH 引物均由广州 Ribobio 公司设计和合成;逆转录试剂盒(A3500)购自美国 Promega 公司;Sybr Green PCR 试剂盒(RR820A)购自日本 Takara 公司;SW480、SW620 和 HT29 及正常结肠细胞 NCM460 细胞购自美国 ATCC 细胞库;RP-MI-1640 培养基(61870036)和胎牛血清(10099141C)均购自 Thermo Fisher Scientific 公司;Leibovitz's L-15(MFCD00217482)购自美国 sigma 公司;McCoy/5A 培养基(FS-5045P)购自上海抚生试剂公司;胰酶(T8150)、青霉素(P8010)、链霉素(3810-74-0)、CCK8 试剂(CA1210)和细胞裂解缓冲液(DgcX8ocR)购自北京索莱宝科技有限公司;空载质粒和 Circ-ITCH 过表达转染质粒购自广州 Ribobio 公司;Transwell 小室(3413)购自美国 Corning 公司;增强型 ECL™ 检测试剂盒(KGP1128)购自中国南京 KeyGene 公司;BCA 蛋白检测试剂盒(23227)购自美国 Thermo 试剂公司;PVDF 膜(1620177)购自美国 BioRad 公司; β -catenin(ab32572)cyclinD1(ab16663)、cMyc(ab32072)、转移相关蛋白基质金属蛋白酶(MMP, ab92536) 2、MMP9(ab76003)、GAPDH(ab8245)和兔二抗(ab32072)、鼠二抗(ab279289)均购自英国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR) 使用 Trizol 试剂从组织中提取总 RNA,采用逆转录试剂盒并根据说明书进行 RNA 至 cDNA 的逆转录。以 cDNA 为模板使用 Sybr Green PCR 试剂盒配制 PCR 反应体系,选择 GAPDH 作为对照,采用 Applied Biosystems 7900HT 序列检测系统检测 Circ-ITCH 和 GAPDH 的表达水平。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法量化 Circ-ITCH 表达。引物序列:Circ-ITCH 正向引

物:5'-GTT GGT CAA TCG CCT GCT A-3',反向引物:5'-GGT CCC GCA CAG GGG TA-3';GAPDH 正向引物:5'-TCA AGA AGG TGG TGA AGC A-3',反向引物:5'-AGG TGG AGG AGT GGG TGT-3'。

1.3.2 细胞培养和转染 CRC 细胞 SW480 和 NCM460 在 RPMI-1640 培养基中培养;SW620 细胞在 Leibovitz's L-15 培养基中培养;HT29 在 McCoy'5A 培养基中培养。各种培养基中均含有 10% 的胎牛血清、100 U/mL 的青霉素和 100 mg/mL 的链霉素,放置在 37℃ 含有 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养。细胞长满后采用 qRT-PCR 检测各组细胞中 Circ-ITCH 的表达水平。

选择低表达 Circ-ITCH 的 SW620 细胞,计数 2×10⁵ 个/孔,接种至 6 孔板中培养。随机分为对照组(NC 组)和实验组(Circ-ITCH 组)。细胞贴壁后,采用 Lipofectamine 2000 按照说明书进行转染,首先将 Lipofectamine 2000 试剂与培养基混匀后静止 5 min,然后分别与空载质粒和 Circ-ITCH 过表达转染质粒混合后,转染至 NC 组和 Circ-ITCH 组中。放置在 37℃ 含有 5% CO₂ 的湿润培养箱中转染 48 h,qRT-PCR 检测 Circ-ITCH 过表达转染质粒转染效果。

1.3.3 细胞计数试剂 8(CCK8)实验 采用 CCK8 试剂检测细胞增殖能力。收集 NC 组和 Circ-ITCH 组细胞,在 200 μL 培养基中以 2×10³ 个细胞的密度接种至 96 孔板细胞中,设置 24、48 和 72 h,并每组设置 6 个平行复孔,放置在 37℃ 含有 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养。分别在对应的时间点更换 100 μL 培养基和 10 μL CCK8 试剂,混匀后在 37℃ 下处理 2 h。采用酶标仪检测各细胞在 450 nm 处测定吸光度值(A 值)。

1.3.4 Transwell 实验 采用 Transwell 小室检测细胞转移能力。收集 NC 组和 Circ-ITCH 组细胞,无血清培养基洗 3 次后,在 100 μL 无血清培养基中以 1×10⁶ 个细胞的密度接种至 24 孔板中的 Transwell 小室上。24 孔板的下室中加入含有 500 μL 的 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,每组设置 3 个平行复孔,放置在 37℃ 含有 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养 10 h。取出 Transwell 室,弃去孔中的培养基并用 PBS 洗涤。然后,将细胞用甲醇固定 30 min 并用

0.1% 晶体染色 20 min。使用棉拭子轻轻擦拭上未转移的细胞,并在显微镜下计数。

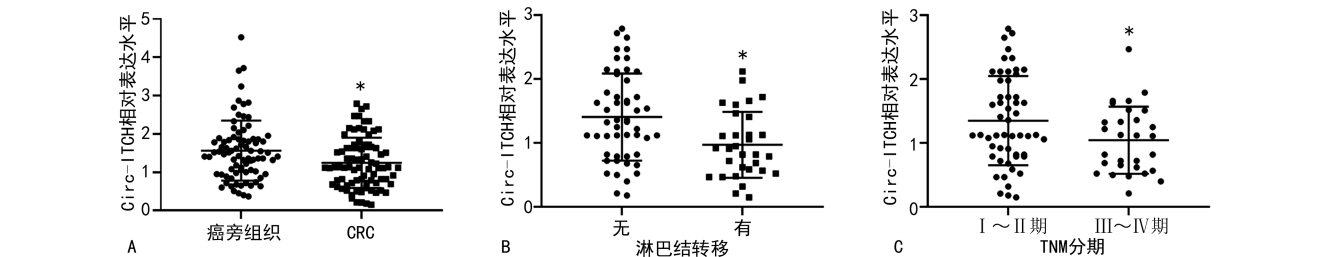
1.3.5 TOP/FOP 双荧光素酶实验 采用 TOP/FOP 双荧光素酶实验检测细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路的活性。收集 NC 组和 Circ-ITCH 组细胞,在 200 μL 培养基中以 2×10³ 个细胞的密度接种至 96 孔板细胞中,采用 PRL-TK 质粒(每孔 10 ng)和 TOP/FOP 质粒(每孔 200 ng)共转染。在转染 48 h 后,采用双荧光素酶报告器测定系统分析各组细胞中荧光素酶发光强度。

1.3.6 Western-blot 实验 采用含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解 RIPA 缓冲液提取各组细胞中的细胞总蛋白,并采用 BCA 蛋白检测试剂盒定量蛋白质浓度。蛋白质煮沸变性后,通过 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质并转移至 PVDF 膜。在用 5% 的非脂肪牛奶封闭后,将膜在 4℃ 下与初级抗体一起温育过夜。HRP 标记的二抗体用于在室温下孵育 2 h。通过增强型 ECLTM 检测试剂盒可视化蛋白质条带。一抗抗体稀释液:抗 β-catenin(1:500),抗 cyclinD1(1:1 000),抗 cMyc(1:500),抗 MMP2(1:1 000),抗 MMP9(1:1 000),抗 GAPDH(1:1 000)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验。计数资料采用例数或百分率表示,Kaplan-Meier 绘制生存曲线,Log-Rank 统计分析 Circ-ITCH 的表达水平与 CRC 患者预后的关系。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Circ-ITCH 表达与 CRC 患者病理参数的关系 qRT-PCR 检测 Circ-ITCH 在 CRC 组织中的表达水平(1.24±0.65)低于在癌旁组织中的表达水平(1.56±0.78),差异有统计学意义(*t* = 2.643,*P* = 0.010),见图 1A。*t* 检验分析 Circ-ITCH 与 CRC 患者病理参数的关系,结果显示高表达水平 Circ-ITCH 与 CRC 患者年龄、性别、肿瘤最大径、分化程度均无关(*P* > 0.05),与患者淋巴结转移和 TNM 分期相关(*P* < 0.05),见图 1B~C 和表 1。



注:A 为 Circ-ITCH 在 CRC 和癌旁组织中的表达,与癌旁组织相比,**P* < 0.05;B 为 Circ-ITCH 在有淋巴结转移 CRC 组织中的表达,与无淋巴结转移 CRC 组织相比,**P* < 0.05;C 为 Circ-ITCH 在不同 TNM 分期 CRC 组织中的表达,与 TNM I~II 期组织相比,**P* < 0.05。

图 1 qRT-PCR 检测结果

表 1 Circ-ITCH 蛋白在 CRC 组织中的表达水平与临床病理参数之间的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	n	Circ-ITCH 表达水平	t	P
年龄				
≤60 岁	31	1.29±0.61	0.553	0.582
>60 岁	51	1.21±0.65		
性别				
男	45	1.23±0.74	0.139	0.890
女	37	1.25±0.52		
肿瘤最大径(cm)				
≤5	49	1.31±0.58	1.248	0.216
>5	33	1.14±0.64		
肿瘤分化程度				
中高分化	52	1.32±0.67	1.615	0.111
低分化	30	1.10±0.43		
淋巴结转移				
有	31	0.97±0.51	3.061	0.003
无	51	1.41±0.67		
TNM 分期				
I~II 期	53	1.35±0.69	2.051	0.044
III~IV 期	29	1.05±0.52		

2.2 Circ-ITCH 的表达水平与 CRC 患者预后的关系 Log-Rank 法进行统计检验显示与低表达 Circ-ITCH 的 CRC 患者相比,高表达 Circ-ITCH 的 CRC 患者预后较差($\chi^2=4.195, P=0.041$),见图 2。

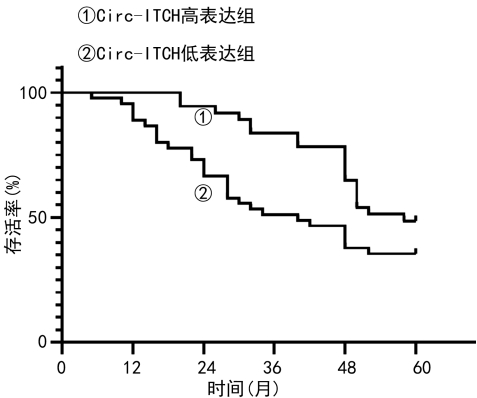


图 2 Log-Rank 检验分析 Circ-ITCH 在 CRC 组织中表达与患者预后的关系

2.3 Circ-ITCH 在 CRC 细胞中的表达水平 qRT-PCR 检测 Circ-ITCH 在 SW480、SW620 和 HT29 及正常结肠细胞 NCM460 中的表达水平分别为(0.31±0.10)、(0.18±0.04)、(0.53±0.08)和(1.00±0.01),Circ-ITCH 在 CRC 细胞中的表达水平低于在正常结肠细胞 NCM460 中的表达水平,在 SW620 细胞中的表达水平最低($P<0.041$),见图 3A。Circ-ITCH 在 NC 组和 Circ-ITCH 组 SW620 细胞中的表

达分别为(1.00±0.01)、(5.49±1.10),Circ-ITCH 在 Circ-ITCH 组 SW620 细胞中的表达水平增加($t=5.821, P=0.004$),见图 3B。

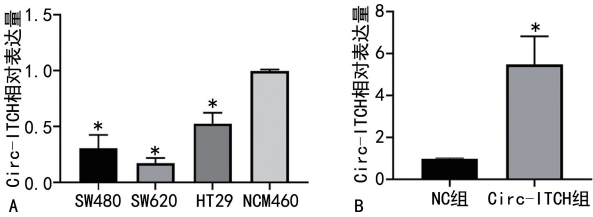
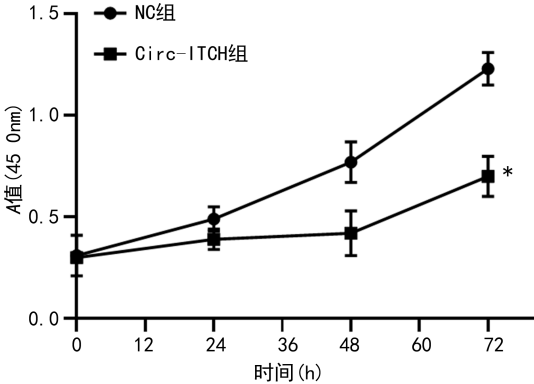


图 3 qRT-PCR 检测结果

2.4 细胞增殖能力检测 采用 CCK8 检测显示与 NC 组相比,Circ-ITCH 组 CRC 细胞 SW620 的增殖能力降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



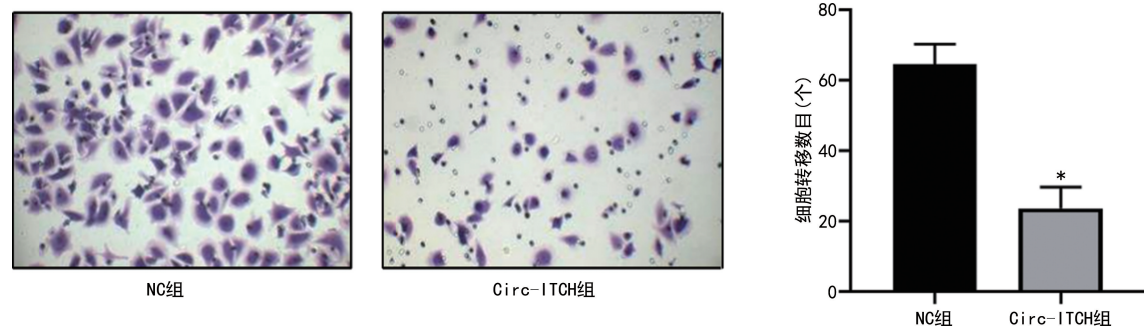
与 NC 组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 细胞增殖能力检测

2.5 细胞转移能力检测 采用 Transwell 实验检测显示 NC 组和 Circ-ITCH 组 SW620 细胞转移数目分别为(64.67±4.64)个和(23.67±4.99)个。与 NC 组相比,Circ-ITCH 组 SW620 细胞的转移能力降低,差异有统计学意义($t=8.508, P=0.001$),见图 5。

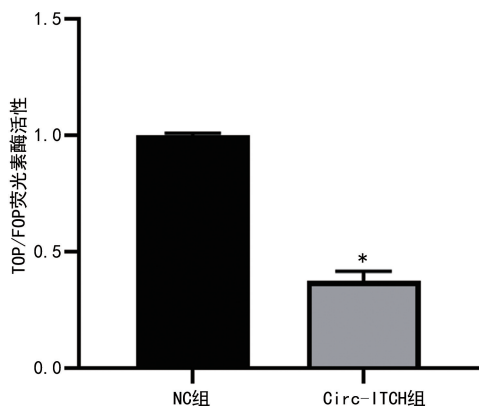
2.6 Wnt/ β -catenin 信号通路检测 采用 TOP/FOP 双荧光素酶实验检测显示 NC 组和 Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 TOP/FOP 双荧光素酶活性分别为(0.99±0.03)个和(0.47±0.08)个。与 NC 组相比, Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路活性降低,差异有统计学意义($t=25.220, P<0.001$),见图 6。

2.7 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白检测 采用 Western-blot 实验检测显示与 NC 组相比, Circ-ITCH 组 SW620 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 β -catenin 核表达水平及其下游增殖相关蛋白 cyclinD1、cMyc 和转移相关蛋白 MMP2、MMP9 的表达水平均降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。



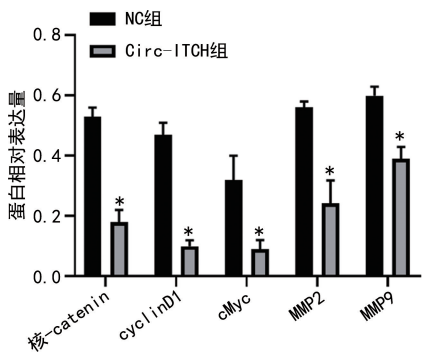
注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 细胞转移能力检测



注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 Wnt/ β -catenin 信号通路检测



注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白检测

3 讨 论

在人类基因组中存在大量的非编码 RNA,并且非编码 RNA 和人类疾病,尤其是恶性肿瘤之间存在的关系始终是研究的热点。CircRNA 是非编码 RNA 的重要成员,通过替代剪接形成内源性 RNA,具有共价闭合的环形结构,不存在 3' 和 5' 末端,使得 CircRNA 非常稳定,不易被内切核酸酶降解^[7]。目前已经在真核生物中检测到超过 20 000 个 CircRNA,并且随着高通量测序技术的发展,在不同的组织中越来越多的 CircRNA 被鉴定,其在疾病发展中的作用也逐渐被发现。目前研究结果已经表明 CircRNA 参与了几乎所有类型恶性肿瘤的发展,同时 CircRNA 可能是恶性肿瘤新的潜在生物标志物和治疗目标^[8]。然而大多数 CircRNA 在恶性肿瘤进展中的功能仍然是

未知的,因此研究 CRC 恶性进展中表达异常并发挥重要功能的 CircRNA,对寻求抗 CRC 治疗的分子靶点具有重要意义。

Circ-ITCH 是一种从位于 20 号 Q11. 22 染色体上的基因 Itchy E3 泛素蛋白质连接酶的几个外显子产生的 CircRNA,由 BERNASSOL 等^[9]首次研究并报道。Circ-ITCH 在乳腺癌及膀胱癌组织和细胞系中表达受到抑制,低表达 Circ-ITCH 的乳腺癌和膀胱癌患者的存活率降低^[3,10]。WANG 等^[11]报道 Circ-ITCH 低表达水平与前列腺癌 PSA、肿瘤分期和 GLEASON 分数高度相关。但是 Circ-ITCH 在 CRC 中的表达及临床意义未见有报道,本文收集 CRC 组织标本,检测结果显示 Circ-ITCH 在 CRC 组织中的表达水平低于癌旁组织,并且统计分析显示 Circ-ITCH 低表达水平与 CRC 患者淋巴结转移和 TNM 分期相关,且 Circ-ITCH 低表达水平的 CRC 患者预后较差,提示 Circ-ITCH 在 CRC 中发挥抑癌作用,可作为 CRC 患者预后不良的生物标志物。同时一项 Meta 分析显示 Circ-ITCH 低表达恶性肿瘤患者更容易发生淋巴结转移、肿瘤最大径更大、TNM 分期更晚、整体存活率更差,表明 Circ-ITCH 低表达与恶性肿瘤侵袭性临床病理特征和各种不利结果相关,可以用作人类恶性肿瘤中的分子治疗靶标和预后标志物^[12]。这表明研究 Circ-ITCH 在 CRC 中发挥具体的生物学功能具有重要的意义。在乳腺癌、胃癌和卵巢癌等恶性肿瘤中 Circ-ITCH 抑制细胞的增殖和转移能力^[3-4,13],那么 Circ-ITCH 是否抑制 CRC 细胞增殖和转移能力。首先检测 Circ-ITCH 在 CRC 细胞中的表达水平低于正常结肠细胞 NCM460,并且选择表达水平最低的 CRC 细胞转染 Circ-ITCH 过表达质粒,CKK8 和 Transwell 实验结果显示过表达 Circ-ITCH 后,CRC 细胞的增殖和转移能力降低,表明 Circ-ITCH 抑制 CRC 的恶性进展,与其他恶性肿瘤中的报道一致^[3-4,13]。但是 Circ-ITCH 在 CRC 中发挥作用的机制需要进一步研究。

CircRNA 广泛参与形成 RNA 蛋白复合物的形成,其充当 miRNA 海绵是作为调节靶基因转录的重

要作用机制,除此以外 CircRNA 可以通过调控信号传导途径和影响基因的表达发挥作用^[8]。在膀胱癌中 Circ-ITCH 通过调节 miR-17 和 miR-224 靶基因 P21 和 PTEN 在体外和体内抑制细胞增殖、迁移、侵袭和转移能力^[10]。而 Circ-ITCH 抑制乳腺癌、肝细胞肝癌和甲状腺乳头状癌恶性进展的作用机制均为抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[3,7]。经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在调节增殖、分化和细胞命运对肠道稳态进行至关重要的作用,其在 CRC 中异常激活,促进肿瘤恶性进展,是抗 CRC 治疗的重要关键靶点^[6]。TOP/FOP 双荧光素酶是检测 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的重要手段,本文通过 TOP/FOP 双荧光素酶检测发现过表达 Circ-ITCH 后,CRC 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性增加。研究显示 β -catenin 从细胞质中移至细胞核中,是激活 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键,且核 β -catenin 蛋白表达升高被认为是 CRC 侵袭的标志,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路相关的靶标,包括增殖相关蛋白 cMyc, Cyclin D1 和转移相关蛋白 MMP2、MMP9,从而促进细胞增殖和转移能力^[14-15]。本文采用 Western-blot 实验检测显示过表达 Circ-ITCH 后,CRC 细胞中核 β -catenin 蛋白表达水平降低,以及增殖相关蛋白 cMyc, cyclin D1 和转移相关蛋白 MMP2、MMP9 表达水平均降低。本研究表明 Circ-ITCH 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 CRC 的恶性进展。

综上所述,Circ-ITCH 在 CRC 组织和细胞中的表达水平降低,与 CRC 患者不良病理参数和预后相关。Circ-ITCH 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 CRC 细胞的增殖和转移能力。Circ-ITCH 具有作为 CRC 不良预后生物标志物和抗肿瘤治疗分子靶点的潜力。

参考文献

[1] TESTA U,PELOSI E,CASTELLI G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells[J]. Med Sci (Basel), 2018, 6(2): 31.

[2] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.

[3] WANG S T, LIU L B, LI X M, et al. Circ-ITCH regulates triple-negative breast cancer progression through the

Wnt/ β -catenin pathway[J]. Neoplasma, 2019, 66(2): 232-239.

[4] WANG Y, WANG H, ZHENG R, et al. Circular RNA ITCH suppresses metastasis of gastric cancer via regulating miR-199a-5p/Klotho axis[J]. Cell Cycle, 2021, 20(5/6): 522-536.

[5] ZHAO L, MA N, LIU G, et al. Lidocaine inhibits hepatocellular carcinoma development by modulating circ_ITCH/miR-421/CPEB3 Axis[J]. Dig Dis Sci, 2021, 66(12): 4384-4397.

[6] 焉秀章, 夏文龙, 夏俊伟, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在结直肠癌中的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(12): 1856-1861.

[7] SHI Y, JIA X, XU J. The new function of circRNA: translation[J]. Clin Transl Oncol, 2020, 22(12): 2162-2169.

[8] 陈彦豪, 张艳玲. circRNA 在肿瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(2): 346-351.

[9] BERNASSOLA F, KARIN M, CIECHANOVER A, et al. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development[J]. Cancer Cell, 2008, 14(1): 10-21.

[10] YANG C, YUAN W, YANG X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 19.

[11] WANG X, WANG R, WU Z, et al. Circular RNA ITCH suppressed prostate cancer progression by increasing HOXB13 expression via spongy miR-17-5p [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 328.

[12] SUN X D, HUAN C, SUN D W, et al. Prognostic and clinicopathological significance of circular RNA circ-ITCH expression in cancer patients: a meta-analysis [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 8828299.

[13] 梁杨焕. circ-ITCH 表达水平与上皮性卵巢癌患者临床病理特征及预后的关联及对卵巢癌细胞增殖和凋亡作用的影响[J]. 福建医科大学学报, 2019, 53(1): 13-18.

[14] VALLÉE A, LECARPENTIER Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ β -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 745.

[15] ZHANG M Y, WANG J, GUO J. Role of regenerating Islet-derived protein 3A in gastrointestinal cancer [J]. Front Oncol, 2019, 9: 1449.

(收稿日期: 2022-03-02 修回日期: 2022-06-20)