



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.011  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.011  
China Journal of General Surgery, 2023, 32(10):1522-1530.

· 基础研究 ·

## circRAD18/miR-516b/PDK1轴调节葡萄糖代谢重编程与结直肠癌增殖的关系

李威<sup>1</sup>, 唐云云<sup>2</sup>, 彭娟<sup>2</sup>, 蒋训归<sup>1</sup>

(1. 湖南省永州市中心医院 肛肠病外科, 湖南 永州 425006; 2. 永州职业技术学院 公共基础学部, 湖南 永州 425100)

### 摘要

**背景与目的:** 环状RNA circRAD18被发现在乳腺癌和甲状腺癌的进展中起了促进作用, 但在其他恶性肿瘤的表达及作用尚未被充分揭示。笔者前期通过生物信息学软件预测 circRAD18可与 miR-516b 互补结合, 而葡萄糖代谢关键调节酶丙酮酸脱氢酶激酶1 (PDK1)可能是 miR-516b的靶基因。因此, 本研究初步探讨 circRAD18在结直肠癌细胞中的表达及作用, 及其对靶 miRNA及下游靶基因的调控关系。

**方法:** 用 qRT-PCR 检测不同结直肠癌细胞系 (SW480、SW620、HT-29) 及正常结直肠上皮细胞 (NCM460) 中 circRAD18 的表达; 用 si-circRAD18 沉默结直肠癌细胞中 circRAD18 的表达后, 分别用 CCK-8 实验和相应的试剂盒检测细胞的增殖情况以及葡萄糖摄取量和乳酸产生量。用双荧光素酶报告基因实验与 RNA 免疫沉淀 (RIP) 实验分析 circRAD18、miR-516b 及 PDK1 之间的结合关系; 最后, 采用过表达/敲低实验进一步验证三者之间的关系。

**结果:** 与正常结直肠上皮细胞比较, circRAD18 在各结直肠癌细胞系中的表达均明显上调 (均  $P < 0.05$ ); 转染 si-circRAD18 后, 结直肠癌细胞增殖能力、葡萄糖摄取及乳酸产生量均明显降低 (均  $P < 0.05$ ); 双荧光素酶报告基因实验与 RIP 实验证实 circRAD18 可与 miR-516b 结合, 而 PDK1 是 miR-516b 的下游靶基因。miR-516b 模拟物及 si-circRAD18 的转染可明显抑制细胞葡萄糖摄取、乳酸产生及 PDK1 蛋白表达, 且补充 PDK1 可逆转该抑制作用 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** circRAD18 在结直肠癌细胞中表达上调, 并与结直肠癌细胞增殖能力的增强密切相关, 作用机制可能与 circRAD18 通过海绵样吸附 miR-516b 后, 上调 PDK1 表达, 从而导致结直肠癌细胞葡萄糖代谢重编程有关。

### 关键词

结直肠肿瘤; RNA, 环状; 代谢; 细胞增殖

中图分类号: R735.3

## Relationship between the glucose metabolism reprogramming regulation by the circRAD18/miR-516b/PDK1 axis and proliferation in colorectal cancer cells

LI Wei<sup>1</sup>, TANG Yunyun<sup>2</sup>, PENG Juan<sup>2</sup>, JIANG Xungui<sup>1</sup>

(1. Department of Anorectal Hernia Surgery, Yongzhou Central Hospital, Yongzhou, Hunan 425006, China; 2. Department of Public Fundamentals, Yongzhou Vocational and Technical College, Yongzhou, Hunan 425100, China)

收稿日期: 2021-10-29; 修订日期: 2023-04-22。

作者简介: 李威, 湖南省永州市中心医院主治医师, 主要从事胃肠道方面的研究。

通信作者: 蒋训归, Email: jxg1994@163.com

**Abstract**

**Background and Aims:** Circular RNA circRAD18 has been found to play a promoting role in the progression of breast cancer and thyroid cancer, but its expression and function in other malignant tumors have not been fully elucidated. In our previous study, we used bioinformatics software to predict that circRAD18 can interact with miR-516b through complementary binding, and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), a key regulator of glucose metabolism, may a target gene of miR-516b. Therefore, this study was conducted to preliminarily investigate the expression and function of circRAD18 in colorectal cancer cells and its regulatory relationship with the target miRNA and downstream target genes.

**Methods:** The expression of circRAD18 in different colorectal cancer cell lines (SW480, SW620, HT-29) and normal colorectal epithelial cells (NCM460) was detected using qRT-PCR. After silencing circRAD18 with si-circRAD18 in colorectal cancer cells, cell proliferation, glucose uptake, and lactate production were assessed using CCK-8 assay and corresponding kits. The binding relationship between circRAD18, miR-516b, and PDK1 was analyzed through dual-luciferase reporter gene assay and RNA immunoprecipitation (RIP) experiment. Finally, overexpression and knockdown experiments were conducted to further validate the relationships among them.

**Results:** Compared to normal colorectal epithelial cells, circRAD18 was significantly upregulated in all colorectal cancer cell lines (all  $P < 0.05$ ). Transfection with si-circRAD18 resulted in a significant decrease in colorectal cancer cell proliferation, glucose uptake, and lactate production (all  $P < 0.05$ ). Dual-luciferase reporter gene assay and RIP experiments confirmed the binding of circRAD18 to miR-516b, and PDK1 was identified as a downstream target gene of miR-516b. Transfection with miR-516b mimic or si-circRAD18 significantly inhibited cellular glucose uptake, lactate production, and PDK1 protein expression in colorectal cancer cells, and the supplementation of PDK1 could reverse this inhibitory effect (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** CircRAD18 is upregulated in colorectal cancer cells and is closely associated with enhanced cell proliferation. The underlying mechanism may involve circRAD18 adsorbing miR-516b through sponge uptake, leading to upregulation of PDK1 expression, and subsequently, reprogramming of glucose metabolism in colorectal cancer cells.

**Key words**

Colorectal Neoplasm; RNA, Circular; Metabolism; Cell Proliferation

**CLC number:** R735.3

结直肠癌为消化道常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 2020年全球结直肠癌新发病例数量超过193万例, 占全球新确诊恶性肿瘤例数的9.7%, 约占全球癌症死亡病例的9.4%<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>显示, 早期结直肠癌患者5年生存率可达90%, 但晚期患者的中位生存期往往不足2年。因此结直肠癌患者的早期诊断及治疗就显得格外重要, 近年来各种特异度高、敏感度高及侵袭性低的非编码RNA生物标志物被发现并运用于临床<sup>[5]</sup>, 该类生物标志物的功能研究及运用将对结直肠癌的临床诊治具有重要意义。

非编码RNA是一类重要的癌症生物学调节因子, 其中环状RNA (circular RNA, circRNA) 是近

年来新发现的一种细胞内非编码RNA<sup>[6]</sup>。circRNA无3'-头或5'-尾的结构, 该类环状结构在多种人类细胞中大量存在, 其具有数十万个碱基, 且可通过多种机制调控或改变多种重要基因的功能及表达, 包括与蛋白质结合、阻断微小RNA (microRNA, miRNA), 甚至编码低分子量蛋白质等<sup>[7]</sup>。随着现今circRNA测序技术和生物信息学方法的发展, 越来越多的circRNA被发现<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>显示circRAD18可促进三阴性乳腺癌的增殖、通过多条生物轴调控乳腺癌的进展, 也可促进甲状腺乳头状癌的恶性进展。目前circRAD18在结直肠癌中的功能及可能的生物学作用尚无报道。笔者前

期通过 circinteractome 和 TargetScan 数据库预测 circRAD18 与 miR-516b 存在结合位点, 而丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase 1, PDK1) 可能是 miR-516b 的靶基因。本研究以上述研究背景为基础, 初步探讨 circRAD18 在结直肠癌细胞中的表达及作用, 及其对靶 miR-516b 及 PDK1 的调控关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

Lipofectamine 3000 转染试剂、TRIzol 试剂、RIPA 裂解液、PMSF (Thermo, 美国, L3000001、15596026、89901、36978), DMEM 培养基、胎牛血清、抗生素 (Gibco, 美国, 11965092、10100147、15140122), PDK1 和  $\beta$ -actin 抗体 (Abcam, 美国, ab202468、ab8226), Anti-Ago2 抗体 (Millipore, USA, 03-110), RNA 抽提试剂盒 (Applied Biosystems, USA, AM1835)、TaqMan 逆转录试剂盒 (4366597)、qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒 (4349182), RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒 (Millipore, USA, 17-371), 双荧光素酶活性检测试剂盒 (Qiagen, USA, 59934), 葡萄糖/葡萄糖氧化酶检测试剂盒 Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen, USA, A22189)、乳酸检测试剂盒 (Sigma, 美国, MAK065), 血细胞计数板 (16×25 格), 紫外可见分光光度计 (Thermo, Nanodrop 2000, USA)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 结直肠癌细胞 SW480、SW620、HT-29 及正常结直肠上皮细胞 NCM460 (ATCC 来源) 均根据供应商提供的说明书培养于含 10% FBS 的培养基中。所有细胞均置于 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内孵育。miR-516b 模拟物及其对照 miR-CTR、circRAD18 敲除 siRNA (si-circRAD18) 及其对照 (si-circCON) 均由美国的 Invitrogen 公司设计、构建及合成。突变型 circRAD18-wt、PDK1-wt 及野生型 circRAD18-mut、PDK1-mut 的荧光素酶报告基因载体均由 GeneCopoeia 公司构建。

**1.2.2 circRAD18 敲除及质粒转染** 收集细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液稀释, 吹打制成 10<sup>4</sup>/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; 两者混匀并室温放置 20 min。将上述混合物加入到无

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。si-circRAD18 序列为: 5'-AAU CAG ACU GCU CUC UCU GUA-3'; 其对照序列 si-circCON 为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。

**1.2.3 RNA 提取和 qRT-PCR 检测** TRIzol 裂解液、氯仿、1:2 的异丙醇-TRIzol、75% 乙醇及 4 °C 离心机用于细胞及组织的 RNA 提取, 提取的 RNA 在紫外可见分光光度计上检测合格后置于 4 °C 冰箱中保存备用。以提取的细胞或组织总 RNA 为模板, 按逆转录试剂盒说明书及 qSYBR-Green-containing PCR 试剂盒的说明书进行操作, 进行相对定量 (BioRad IQTM5 Multicolor 实时荧光定量系统, 美国)。其中 miR-516b 引物由 Invitrogen 公司合成, U6 为内参,  $2^{-\Delta\Delta CT}$  用于相对表达量的计算, 其中  $\Delta\Delta CT = (C_T \text{miRNA} - C_T \text{U}_6) \text{靶基因} - (C_T \text{miRNA} - C_T \text{U}_6) \text{对照}$ 。反应体系为 20  $\mu$ L, 每组实验设置 3 个复孔。circRAD18 的引物碱基序列正向: 5'-CAG CTC ATT AAA AGG CAC CA-3', 反向: 5'-CAC ACA GCA AGT TGG ACA CTG-3'; 内参 U6 的引物序列正向: 5'-TTA TGG GTC CTA GCC TGA C-3', 反向: 5'-CAC TAT TGC GGG TCT GC-3'。

**1.2.4 CCK-8 细胞增殖** 将结直肠癌细胞经 0.25% 的胰酶消化后, 将 si-circRAD18 (细胞密度调至  $5 \times 10^3$ /mL) 和 si-circCON 细胞 (细胞密度调至  $5 \times 10^3$ /mL) 置于 96 孔板中。将培养板在 37 °C 下孵育一定时间, 然后加入 CCK-8 溶液 (10  $\mu$ L), 于 450 nm 波长下检测吸光度值。

**1.2.5 葡萄糖消耗和乳酸含量的测量** 将细胞接种到 12 孔板中, 每孔接种  $3 \times 10^5$  个细胞。24 h 后收集培养基, 并储存在 -20 °C 备用, 直到进行测定。分别根据葡萄糖/葡萄糖氧化酶检测试剂盒 Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit 和乳酸检测试剂盒的说明书进行操作, 检测结直肠癌细胞 HT-29 中上清液中葡萄糖的消耗量及乳酸的产生量。分别检测 563 nm 及 460 nm 波长处的吸光度值, 并将结果标准化为与对照细胞相比的总蛋白量。

**1.2.6 荧光素酶活性检测** 验证 miR-516b 与 circRAD18 结合的荧光素酶实验分为 4 组, 分别为: miR-516b 与 circRAD18-wt、miR-CTR 与 circRAD18-wt、miR-516b 与 circRAD18-mut、miR-CTR 与 circRAD18-mut; 验证 miR-516b 与 PDK1 结合的荧光素酶实验也分为 4 组, miR-516b 与 PDK1-wt、miR-CTR 与

PDK1-wt、miR-516b与PDK1-mut、miR-CTR与PDK1-mut。按上述分组分别转染HT-29细胞,48 h后收集细胞。根据试剂商提供的试剂盒说明书进行操作。相对荧光素酶活性为荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性值,每组实验设置3个复孔(Biorad单光子检测仪,美国),验证circRAD18与miR-516b及miR-516b与PDK1之间的结合关系。

**1.2.7 RNA免疫沉淀(RIP)** 在RIP分析之前,先使用MS2bs-circRAD18、MS2bs-circRAD18-mt和MS2bs-Rluc(对照载体)转染结直肠癌细胞。RIP实验根据RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒、anti-Ago2抗体的说明书进行操作,miR-516b需富集纯化后检测。也被使用,PDK1 mRNA、circRAD18和miR-516b均采用相对定量。

**1.2.8 Western blot分析** 从HT-29细胞中分离蛋白质(RIPA裂解液、PMSF),收集蛋白,用于SDS-PAGE凝胶分离。蛋白质在300 mA条件下进行转膜,2 h后将膜转移至4 °C冰箱,并用PDK1抗体处理过夜,次日于室温下使用特异性二抗孵育1 h。其中PDK1和 $\beta$ -actin抗体的使用浓度为1:1 000。

### 1.3 统计学处理

SPSS 20.0软件用于数据的记录与分析。实验

结果采用计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $t$ 检验用于组间数据比较,单因素方差分析用于多组间数据比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circRAD18在结直肠癌中的表达及功能

采用qRT-PCR检测结直肠癌及正常结直肠上皮细胞中circRAD18的表达水平,结果显示,相对正常结直肠上皮细胞NCM460,circRAD18在结直肠癌细胞系中的表达均明显上调(均 $P < 0.05$ ) (图1A)。为进一步探究circRAD18对结直肠癌细胞生长及代谢的影响,使用靶向circRAD18的siRNA来敲低结直肠癌细胞中circRAD18的表达。si-circRAD18的敲低效率在HT-29结直肠癌细胞系中得到验证(图1B)。CCK-8增殖检测实验显示circRAD18的下调抑制结直肠癌细胞的增殖能力(图1C)。另外通过检测葡萄糖摄取量和乳酸产生量,发现circRAD18的沉默可以明显抑制结直肠癌中的细胞葡萄糖摄取及乳酸产生,且其对正常结直肠上皮细胞NCM460则没有影响( $P > 0.05$ ) (图1D-E)。

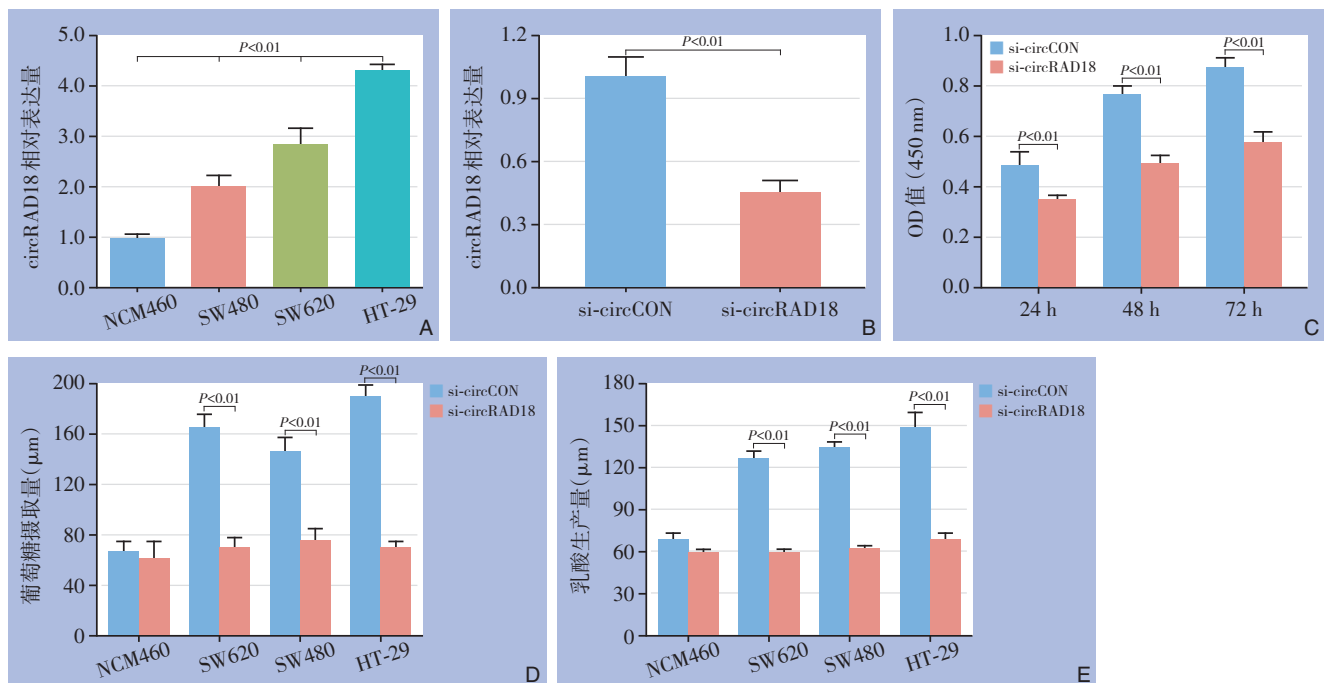


图1 circRAD18在结直肠癌中的表达及功能 A: circRAD18在结直肠癌细胞系中的相对表达; B: 转染si-circRAD18后的沉默效能分析; C: CCK-8检测细胞增殖; D: 细胞葡萄糖摄取量检测; E: 细胞乳酸产生量检测

Figure 1 Expression and function of circRAD18 in colorectal cancer A: Relative expression of circRAD18 in colorectal cancer cell lines; B: Analysis of silencing efficiency after transfection with si-circRAD18; C: Cell proliferation assessment using CCK-8 assay; D: Measurement of cellular glucose uptake; E: Measurement of cellular lactate production

## 2.2 结直肠癌中 circRAD18 对 miR-516b 的作用

在分离结直肠癌细胞 HT-29 的细胞质和细胞核部分后, 通过 qPCR 检测明确了 circRAD18 的亚细胞定位。结果显示 circRAD18 主要存在于结直肠癌细胞的胞质中, 也是 miRNA 所处的主要位置, 表明两者之间存在相互作用 (图 2A)。根据生物信息学软件预测, circRAD18 序列上可能存在 2 个与

miR-516b 结合的位点 (图 2B)。通过双荧光素酶报告基因实验证实 circRAD18 能够与 miR-516b 相互作用 (图 2C)。随后为进一步验证, 进行了 MS2 相关的 RIP 实验以验证 circRAD18 和 miR-516b 之间的直接相互作用关系, 结果显示 miR-516b 在 MS2bs-circRAD18 组明显富集 (图 2D)。

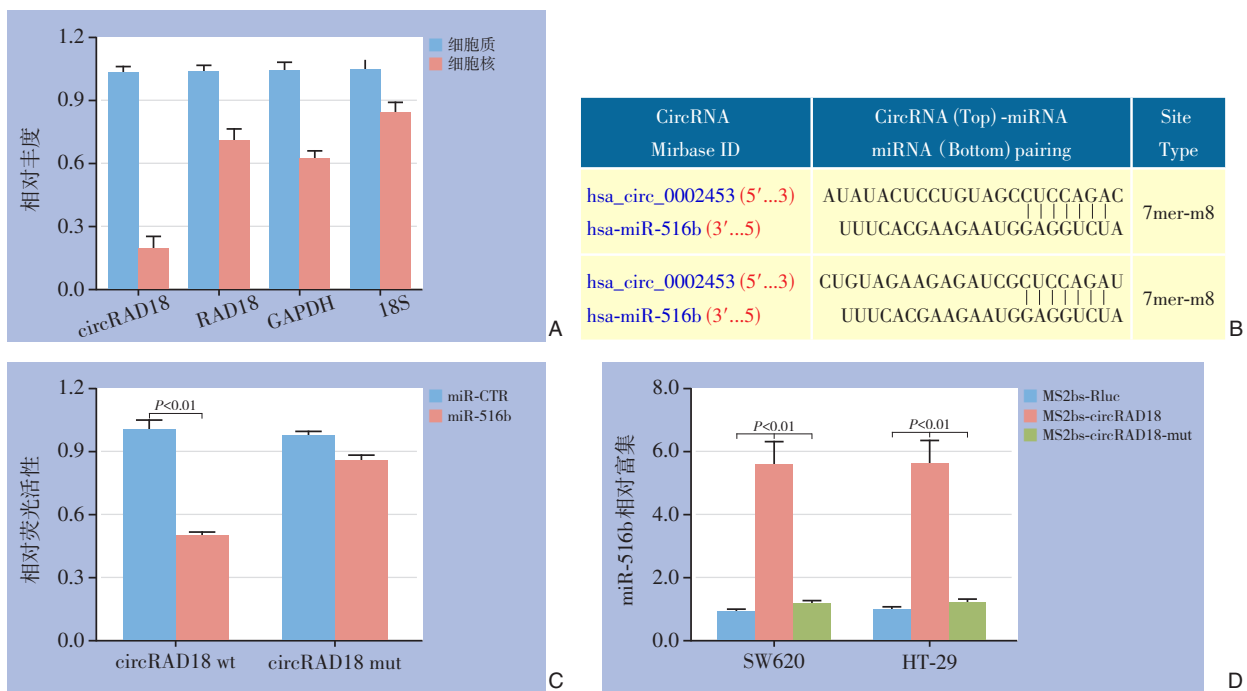


图2 circRAD18 与 miR-516b 的关系 A: 细胞不同部位中 circRAD18、RAD18 mRNA、GAPDH 和 18S 的相对比例; B: circRAD18 序列中 miR-516b 的预测结合位点; C: 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-516b 模拟物和 circRAD18 之间的相互作用; D: MS2 相关的 RIP 实验验证结合关系

**Figure 2 Relationship between circRAD18 and miR-516b** A: Relative proportions of circRAD18, RAD18 mRNA, GAPDH, and 18S in different cellular compartments; B: Predicted binding sites of miR-516b in the circRAD18 sequence; C: Dual-luciferase reporter gene assay to investigate the interaction between miR-516b mimic and circRAD18; D: MS2-related RIP experiment to validate the binding relationship

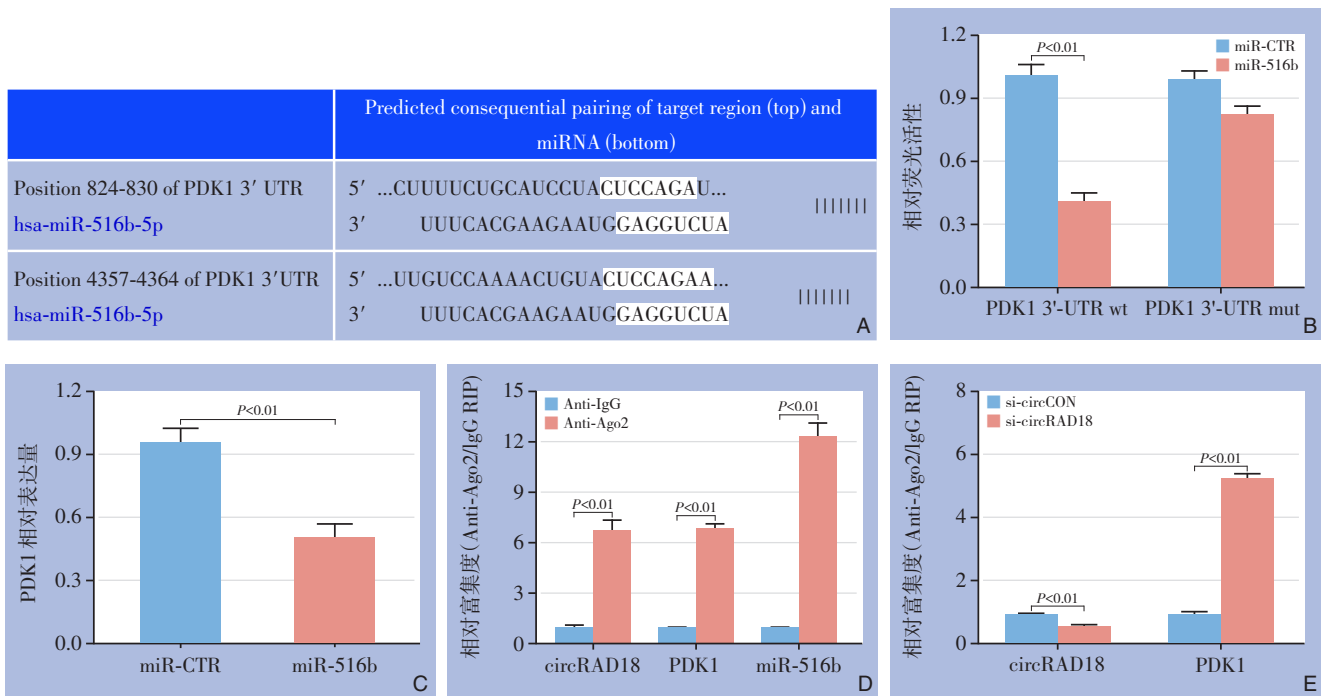
## 2.3 circRAD18 对下游 PDK1 的调节作用

TargetScan 数据库预测 PDK1 是 miR-516b 的下游靶基因 (图 3A)。PDK1 是葡萄糖摄取过程中的一种代谢蛋白, 多项研究证实其为一种癌基因, 并在多种恶性肿瘤中存在过度表达, 对癌症进展至关重要。荧光素酶报告基因实验证实 miR-516b 能够直接结合 PDK1 mRNA 的 3'-UTR (图 3B)。转染 miR-516b 模拟物后, 结直肠癌细胞 HT-29 中 PDK1 的相对表达量明显降低 (图 3C), 对 AGO2 蛋白相关的 RISC 复合物进行 RIP 检测, 结果显示 circRAD18、PDK1 和 miR-516b 均聚集在抗 Anti-Ago2 组中 (图 3D)。circRAD18 沉默可导致 PDK1 向的

RISC 聚集明显增加 (图 3E)。

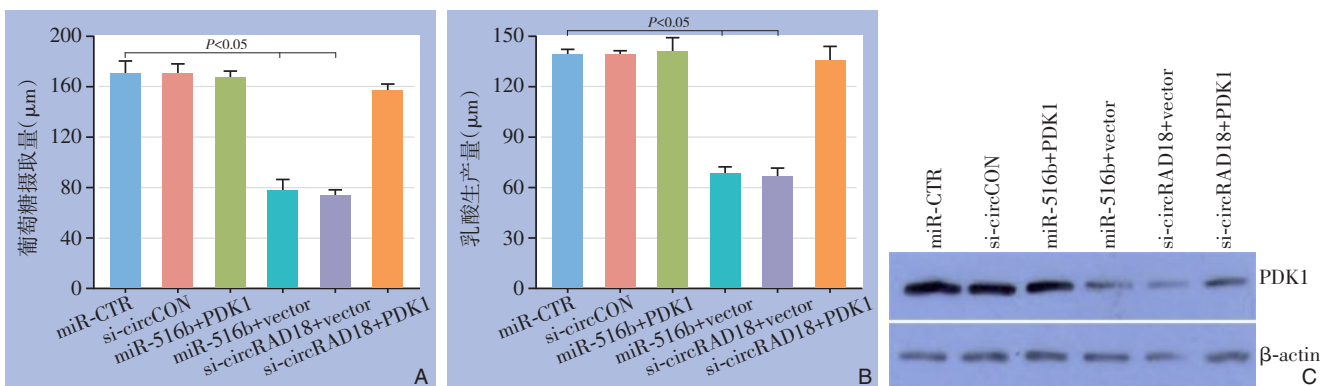
## 2.4 circRAD18-miR-516b-PDK1 轴对结直肠癌代谢重编程的影响

通过检测葡萄糖摄取量和乳酸产生量, 发现用 miR-516b 模拟物及 si-circRAD18 转染结直肠癌 HT-29 细胞, 可明显降低细胞葡萄糖的摄取率及乳酸产生量, 且这种降低均可被 PDK1 的补充所逆转 (均  $P < 0.05$ ) (图 4A-B)。另外, miR-516b 模拟物或 si-circRAD18 的引入可以明显降低 PDK1 的蛋白表达, 且该过程可通过补充 PDK1 蛋白来逆转 (均  $P < 0.05$ ) (图 4C)。



**图 3** miR-516b 与 PDK1 的关系及 circRAD18 的调节作用 A: TargetScan 数据库预测 PDK1 与 miR-516b 相互作用的 mRNA 3'-UTR 序列; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-516b 模拟物和 PDK1 之间的相互作用; C: qRT-PCR 分析 miR-516b 对 PDK1 的作用; D: circRAD18、PDK1 和 miR-516b 在 Ago2 上的聚集; E: circRAD18 沉默后, circRAD18 与 Ago2 结合的丰度降低, 而 PDK1 增加

**Figure 3** Relationship between miR-516b and PDK1 and the regulatory role of circRAD18 A: TargetScan database prediction of mRNA 3'-UTR sequences for the interaction between PDK1 and miR-516b; B: Dual-luciferase reporter gene assay to validate the interaction between miR-516b mimic and PDK1; C: qRT-PCR analysis of the effect of miR-516b on PDK1; D: Aggregation of circRAD18, PDK1, and miR-516b on Ago2; E: Decreased abundance of circRAD18 binding to Ago2 and increased PDK1 after circRAD18 silencing



**图 4** circRAD18-miR-516b-PDK1 轴在直肠癌细胞中的作用 A: miR-516b 模拟物及 si-circRAD18 的转染可抑制细胞葡萄糖摄取, PDK1 过表达后, 葡萄糖摄取水平可恢复; B: miR-516b 模拟物及 si-circRAD18 的转染可抑制细胞乳酸产生, PDK1 过表达后, 乳酸产生水平可恢复; C: miR-516b 模拟物及 si-circRAD18 的引入可以降低 PDK1 的蛋白表达, 补充 PDK1 可逆转

**Figure 4** The role of the circRAD18-miR-516b-PDK1 axis in colorectal cancer cells A: Transfection with miR-516b mimic and si-circRAD18 can inhibit cellular glucose uptake, and the overexpression of PDK1 can restore glucose uptake levels; B: Transfection with miR-516b mimic and si-circRAD18 can inhibit cellular lactate production, and the overexpression of PDK1 can restore lactate production levels; C: Introduction of miR-516b mimic and si-circRAD18 can reduce the protein expression of PDK1, and supplementation with PDK1 can reverse this effect

### 3 讨论

随着高通量测序等多种生物信息学前沿技术的不断发展,越来越多的 circRNA 被发现,并被深入研究<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12-13]</sup>显示,5.8%~23%的具有转录活性的人类基因可产生 circRNA,且这些 circRNA 在不同的组织及细胞类型间可保持动态平衡。circRNA 在哺乳动物中表达是高度保守的,其环状结构使其对 RNase R 具有抗性,且结构比相应的线性 RNA 要更稳定<sup>[14]</sup>。circRNA 可作为 miRNA 海绵发挥调节功能, circRNA 具有 miRNA 的结合位点,常作为 miRNA 的活性调节者参与多种癌症的发生与发展; circRNA 可与 RBPs 相互作用,其通过结合、储存或隔离 RBP 到特定的亚细胞位置从而发挥作用; circRNA 也可发挥转录和选择性剪接的调节的功能,其位于核内的 circRNA 及外显子-内含子环状 RNA (Exon-intron circular RNA, ElciRNA) 可在转录水平发挥功能;另外 circRNA 也可以直接发挥翻译功能,部分 circRNA 具有直接编码蛋白的能力,可翻译蛋白<sup>[15-18]</sup>。研究显示, circRNA 在血液及其他体液中均具有较高的稳定性,因此 circRNA 也是多种疾病诊断的潜在生物标志物。

研究<sup>[18]</sup>显示, circAGO2 可通过促进 RISC 而促进多种癌症的进展。circ133 及 circHIPK3 是结直肠癌中的重要调控因子<sup>[19-20]</sup>。circITCH 被证实是癌症中的肿瘤抑制因子<sup>[21]</sup>, circFAM120A 被证实可通过抑制 FAM120A 与 IGF2BP2 的结合而促进细胞的增殖<sup>[22]</sup>。但迄今为止,关于 circRNA 在结直肠癌中作用和功能的研究较少,关于 circRAD18 在结直肠癌中的研究目前未见报道。研究显示, circRAD18 在乳腺癌中高表达且敲除 circRAD18 可抑制乳腺癌的进展,该过程可能是通过调节 miR-613/HK2 轴来实现的<sup>[23]</sup>, circRAD18 也可通过海绵吸附 miR-208a/3164 调节 IGF1 和 FGF2 的表达来促进三阴性乳腺癌进展<sup>[24]</sup>。本研究发现 circRAD18 在结直肠组织及细胞系中表达上调,且敲除 circRAD18 显著抑制结直肠癌细胞的生长能力,该结果与上述乳腺癌中 circRAD18 高表达及对肿瘤的促进作用一致。研究显示 circRAD18 还可促进急性髓系白血细胞的增殖、迁移和侵袭过程,并抑制细胞凋亡和细胞周期停滞,在急性髓系白血病中扮演癌基因的结果<sup>[23]</sup>,另外 circRAD18 也可促进甲状腺乳头状癌的生长和转移能力<sup>[10]</sup>,说明 circRAD18 可在多

种恶性肿瘤中发挥促癌作用。

双荧光素酶报告基因实验及 RIP 实验验证证实 circRAD18 可与 miR-516b 结合,而 PDK1 是 miR-516b 的下游靶基因。即 circRAD18-miR-516b-PDK1 轴在结直肠癌的进展中发挥重要作用。此外,本研究发现 circRAD18 参与了结直肠癌的葡萄糖代谢重编程过程, circRAD18 的沉默显著抑制结直肠癌细胞的细胞葡萄糖摄取和乳酸产生,表明 circRAD18 可直接阻断其下游的 miR-516b,促进结直肠癌细胞通过刺激葡萄糖代谢蛋白 PDK1 的表达而促进结直肠癌的进展。上述结果与已有研究<sup>[10]</sup>上调的 circRAD18 通过甲状腺乳头状癌的葡萄糖代谢重编程促进肿瘤的进展相一致。

研究显示, miR-516b 是重要的肿瘤抑制因子,其在骨肉瘤中表达下调<sup>[25]</sup>,在神经胶质瘤中, circCDC45 的表达显著上调,其可通过阻断 miR-516b 而促进胶质瘤细胞的增殖和转移<sup>[26]</sup>。另外长链非编码 RNA Linc-01123 可通过 miR-516b-5p/Gli1 轴调控 Hedgehog 通路而影响骨肉瘤的进程<sup>[27]</sup>。在天然产物和传统中药提取物相关的研究中,作为一个已经被证实的 miR-516b 靶标, PDK1 被报道可调节葡萄糖和脂肪酸代谢以及体内平衡<sup>[28]</sup>。而 PDK1 也被证实可促进黑色素瘤细胞的有氧糖酵解和增殖<sup>[29]</sup>。根据本研究的研究结果, PDK1 被证实是 miR-516b 在结直肠癌中的下游靶基因,且 circRAD18 可以增强 PDK1 的蛋白表达水平。

综上,本研究探讨了 circRAD18 在结直肠癌生长及葡萄糖代谢中的功能,并揭示了 circRAD18/miR-516b/PDK1 轴在结直肠癌代谢重编程中的功能的分子机制,本研究可能对开发结直肠癌新的生物标志物及治疗策略具有重要意义。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:李威、蒋训归负责构思与设计;彭娟负责提供研究材料或患者;李威、唐云云负责数据收集和整理;李威、彭娟负责数据分析和解释;李威负责手稿写作;所有作者均审核并批准手稿。

### 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] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4):778–789. doi: 10.1002/ijc.33588.
- [3] Chen K, Collins G, Wang H, et al. Pathological features and prognostication in colorectal cancer[J]. *Curr Oncol*, 2021, 28(6): 5356–5383. doi: 10.3390/curroncol28060447.
- [4] Yue T, Chen S, Zhu J, et al. The aging-related risk signature in colorectal cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5):7330–7349. doi: 10.18632/aging.202589.
- [5] Wu Y, Xu XS. Long non-coding RNA signature in colorectal cancer: research progression and clinical application[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1):28. doi: 10.1186/s12935-023-02867-0.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Zhang H, Zhang B, Zhang Z, 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/eurrev\_202003\_20528.
- [9] Zang HL, Li YH, Zhang X, et al. Knockdown of circRAD18 mitigates breast cancer progression through the regulation of miR-613/HK2 axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 3661–3672. doi: 10.2147/CMAR.S243300.
- [10] Chen WK, Zhang TT, Bai YF, et al. Upregulated circRAD18 promotes tumor progression by reprogramming glucose metabolism in papillary thyroid cancer[J]. *Gland Surg*, 2021, 10(8): 2500–2510. doi: 10.21037/gs-21-481.
- [11] 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.
- [12] Yi Y, Liu Y, Wu WR, 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.
- [13] Goodall GJ, Wickramasinghe VO. RNA in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(1):22–36. doi: 10.1038/s41568-020-00306-0.
- [14] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. *Cell*, 2019, 176(4): 869–881. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.021.
- [15] 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.
- [16] Lv W, Tan Y, Xiong M, 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.
- [17] Ding C, Yi X, Chen X, 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.
- [18] 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.
- [19] Chen Y, Yang F, Fang E, 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.
- [20] Yang H, Zhang H, Yang Y, 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.
- [21] Li Y, Ge YZ, Xu L, 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.
- [22] Liu T, Lu Q, Liu J, et al. Circular RNA FAM114A2 suppresses progression of bladder cancer via regulating ΔNP63 by sponging miR-762[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1):47. doi: 10.1038/s41419-020-2226-5.
- [23] Wang YY, Guo T, Liu Q, et al. CircRAD18 accelerates the progression of acute myeloid leukemia by modulation of miR-206/PRKACB axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:10887–10896. doi: 10.2147/CMAR.S277432.
- [24] Zou Y, Zheng S, Xiao W, et al. circRAD18 sponges miR-208a/3164 to promote triple-negative breast cancer progression through regulating IGF1 and FGF2 expression[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(12):1469–1479. doi: 10.1093/carcin/bgz071.
- [25] Wang T, Zhang C, Wang S. Ginsenoside Rg3 inhibits osteosarcoma progression by reducing circ\_0003074 expression in a miR-516b-5p/KPNA4-dependent manner[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 724. doi: 10.1186/s13018-021-02868-7.
- [26] Liu J, Hou K, Ji H, et al. Overexpression of circular RNA circ-CDC45 facilitates glioma cell progression by sponging miR-516b and miR-527 and predicts an adverse prognosis[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1):690–697. doi: 10.1002/jcb.29315.
- [27] Pan X, Tan J, Tao T, et al. LINC01123 enhances osteosarcoma cell growth by activating the Hedgehog pathway via the miR-516b-5p/Gli1 axis[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(6):2260–2271. doi: 10.1111/



cas.14913.

- [28] Atas E, Oberhuber M, Kenner L. The implications of PDK1-4 on tumor energy metabolism, aggressiveness and therapy resistance[J]. Front Oncol, 2020, 10:583217. doi: 10.3389/fonc.2020.583217.
- [29] Huang WQ, Zhuang QR, He ZJ. ILF3-AS1 promotes the aerobic glycolysis and proliferation of melanoma cells by regulating miR-493-5p/PDK1 pathway [J]. Ital J Dermatol Venerol, 2022, 157(2): 173-181. doi: 10.23736/S2784-8671.21.06906-6.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:李威,唐云云,彭娟,等. circRAD18/miR-516b/PDK1轴调节葡萄糖代谢重编程与结直肠癌增殖的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(10): 1522-1530. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2023.10.011

Cite this article as: Li W, Tang YY, Peng J, et al. Relationship between the glucose metabolism reprogramming regulation by the circRAD18/miR-516b/PDK1 axis and proliferation in colorectal cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2023, 32(10): 1522-1530. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.10.011

## 本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC <sub>50</sub>	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸氨基转移酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO <sub>2</sub>
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素/脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO <sub>2</sub>	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO <sub>2</sub>	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒e抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒e抗原	HBeAg
辅助性T细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBeAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相pH梯度	IPG	双蒸水	ddH <sub>2</sub> O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天门冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机X线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		