DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250410.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250410.1332.004

miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin通路调控PKM2介导结直肠癌有氧糖酵解的研究

江 帆[1],范永吉[1],周晓欣[1],刘 宁[2]✉
(1.海南省人民医院/海南医科大学附属海南医院老年医学中心,海南 海口,570311;2.海南省人民医院/海南医科大学附属海南医院胃肠外科,海南 海口,570311)

[**摘要**] **目的**:探讨miR-370-3p通过靶向WNT7B调控Wnt/β-catenin信号通路及其对结直肠癌(colorectal cancer,CRC)细胞有氧糖酵解的影响。**方法**:采用RT-qPCR检测CRC及正常组织中*miR-370-3p*的表达,结合数据库分析其与患者预后的相关性。通过双荧光素酶报告实验验证miR-370-3p与WNT7B的靶向结合。使用CCK-8、细胞划痕实验、Transwell和流式细胞术评估miR-370-3p对CRC细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响,检测葡萄糖利用率、乳酸生成及糖酵解关键因子葡萄糖转运蛋白1(facilitative glucose transporter1,*GLUT1*)和乳酸脱氢酶A型(lactate dehydrogenase A,*LDHA*)的表达。通过Western blot检测Wnt/β-catenin通路相关蛋白(如β-catenin、TCF-4、c-Myc、CyclinD1)的表达,通过免疫共沉淀和免疫荧光观察β-catenin与丙酮酸激酶M2型(pyruvate kinase M2,PKM2)的结合及其核转位。采用Spearman相关分析方法评估β-catenin与糖酵解关键因子(GLUT1、LDHA)表达的相关性。**结果**:*miR-370-3p*在CRC组织中表达明显低于正常组织,且与患者的年龄、临床分期和淋巴结转移明显相关($P<0.05$)。功能实验结果表明,miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin信号通路,明显抑制CRC细胞的增殖、迁移、侵袭及有氧糖酵解,促进细胞凋亡($P<0.01$)。进一步研究发现,miR-370-3p通过降低β-catenin的活性,抑制其与PKM2在细胞核中的结合,下调*GLUT1*和*LDHA*的表达,从而抑制有氧糖酵解。**结论**:miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin信号通路,降低β-catenin与PKM2的核内结合,下调GLUT1和LDHA的表达,从而抑制CRC细胞的有氧糖酵解和增殖,促进凋亡。本研究为CRC的靶向治疗提供了新的潜在策略。

[**关键词**] miR-370-3p;WNT7B;结直肠癌;糖酵解;β-catenin
[**中图分类号**] R735.34 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 2097-5953(2026)18-1399-11

Study on miR-370-3p regulating PKM2-mediated aerobic glycolysis in colorectal cancer by targeting WNT7B to suppress the Wnt/β-catenin pathway

JIANG Fan[1], FAN Yongji[1], ZHOU Xiaoxin[1], LIU Ning[2]✉
(1. *Department of Geriatric Medicine Center, Hainan General Hospital / Hainan Medical University Hainan Hospital, Haikou* 570311, *China*; 2. *Department of Gastrointestinal Surgery, Hainan General Hospital / Hainan Medical University Hainan Hospital, Haikou* 570311, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Hainan Provincial Natural Science Foundation of China*(822*QN*448, 823*RC*564); *Hainan Provincial Health Industry Research Project*(22*A*200214).
[*Author*]: *JIANG Fan, Associate Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail: jiangfan*719@163.*com.*
[*Correspondence to*]: *LIU Ning, Ph.D., Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail: drliuning@hainmc.edu.cn.*
Received: 2025-01-03 *Revised*: 2025-03-26 *JHMU*, 2026;32(18):1399-1409

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the effects of miR-370-3p on aerobic glycolysis in colorectal cancer (CRC) cells by targeting WNT7B and regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Methods**: RT-qPCR was used to detect the expression levels

[基金项目]海南省自然科学基金(822QN448,823RC564);海南省卫生健康行业科研项目(22A200214)
[作者简介]江帆,副主任医师,硕士生导师,E-mail:jiangfan719@163.com。
[通讯作者]刘宁,博士,主任医师,硕士生导师,E-mail:drliuning@hainmc.edu.cn。
[收稿日期]2025-01-03 [修回日期]2025-03-26 网络出版时间:2025-04-10 14:19:33

of *miR-370-3p* in CRC and normal tissues, and database analysis was performed to assess its correlation with patient prognosis. A dual-luciferase reporter assay was conducted to verify the direct binding of miR-370-3p to WNT7B. The effects of miR-370-3p on CRC cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis were evaluated using CCK-8, wound healing assay, Transwell and flow cytometry assays. Glucose utilization, lactate production, and the expression levels of key glycolytic factors, including facilitative glucose transporter 1 (*GLUT1*) and lactate dehydrogenase A (*LDHA*) were assessed. Western blot was performed to examine the expression of Wnt/β-catenin pathway components, including β-catenin, TCF-4, c-Myc, and Cyclin D1. Co-immunoprecipitation and immunofluorescence assays were used to investigate the interaction between β-catenin and pyruvate kinase M2 (PKM2) and their nuclear localization. Finally, Spearman correlation analysis was conducted to evaluate the relationship between β-catenin and key glycolytic factors (GLUT1 and LDHA). **Results**: *miR-370-3p* was significantly downregulated in CRC tissues and showed a significant association with patient age, clinical stage, and lymph node metastasis ($P<0.05$). Functional experiments demonstrated that miR-370-3p inhibited the Wnt/β-catenin signaling pathway by targeting WNT7B, thereby suppressing CRC cell proliferation, migration, invasion, and aerobic glycolysis while promoting apoptosis ($P<0.01$). Further studies revealed that miR-370-3p reduced β-catenin activity, inhibited its nuclear interaction with PKM2, and downregulated *GLUT1* and *LDHA* expression, thereby suppressing aerobic glycolysis. **Conclusion**: miR-370-3p inhibits the Wnt/β-catenin signaling pathway, reduces the nuclear binding of β-catenin and PKM2 by targeting WNT7B, leads to the downregulation of GLUT1 and LDHA expression, thereby inhibiting aerobic glycolysis and proliferation of CRC cells and promoting apoptosis. These findings provide a potential therapeutic target for CRC treatment.

[**Key words**] miR-370-3p; WNT7B; Colorectal cancer; Glycolysis; β-catenin

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在各种恶性肿瘤中排名第3位,死亡率排名第2位,对人类健康构成严重威胁[1]。近年来,50岁以下年轻患者的发病率呈明显上升趋势[2]。由于早期症状不明显,大多数患者确诊时已处于中晚期或伴随远处转移,导致转移性CRC患者的5年生存率低于15%[3]。目前,晚期或转移性CRC的治疗手段仍然受限:手术难以根治,放化疗虽为常规治疗方式但疗效有限且伴随明显毒副作用,靶向治疗在特定基因型患者中有效,但耐药问题严重[4]。因此,CRC的治疗仍面临巨大挑战,特别是针对转移性CRC,亟需探索新的分子机制和靶向治疗策略,以提高患者的临床预后。因此,阐明CRC的发生和发展机制,寻找分子水平上的早期诊断和靶向治疗措施,已成为当前癌症研究的重点和难点。

研究表明,丙酮酸激酶M2型(pyruvate kinase M2,PKM2)介导的有氧糖酵解在肿瘤的发生和发展中发挥着重要作用[5]。Warburg效应指出[6,7],癌细胞需要获取足够的能量以维持生长和增殖,因而大多数癌组织主要依赖有氧糖酵解进行快速能量供应,这一过程在癌细胞增殖和恶性进展中起着关键作用[8,9]。同时,越来越多的研究发现,CRC细胞的有氧糖酵解与其增殖、凋亡、侵袭、迁移和药物耐受等生物行为密切相关[10,11]。与正常细胞主要依赖线粒体氧化磷酸化不同,肿瘤细胞即使在氧气充足的情况下,仍倾向于通过糖酵解获取能量,从而创造出有利于自身生长的酸性环境[12]。因此,阐明PKM2等关键酶调控有氧糖酵解的分子机制,对开发靶向肿瘤代谢的治疗策略具有重要意义[13]。

microRNA(miRNA)是一类非编码RNA,主要通过转录和表观遗传方式调控基因表达,从而影响多种生理过程。越来越多的研究表明,miRNAs在肿瘤细胞的有氧糖酵解中发挥关键作用[8]。已有研究显示,miR-370-3p在膀胱癌、乳腺癌等多种癌症中被报道为重要的癌症相关miRNA[14,15]。然而,miR-370-3p对CRC有氧糖酵解的具体影响仍不明确。

本研究表明,miR-370-3p通过靶向WNT7B介导的Wnt/β-catenin信号通路抑制PKM2,从而通过调控有氧糖酵解过程抑制CRC的侵袭和转移。本研究结果为进一步阐明CRC的分子机制提供了新的见解,并为未来CRC的靶向治疗策略奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据库分析

使用UALCAN数据库(http://ualcan.path.uab.edu/index.html)分析CRC中的mRNA和miRNA表达,并探讨其与临床病理参数(患者年龄、临床分期、淋巴结转移N分期)的关系。同时,利用Starbase数据库(https://starbase.sysu.edu.cn/)验证基因间的相关性。

1.2 伦理声明和临床样本

本研究已获得海南省人民医院临床伦理管理委员会的批准[编号:医伦研(2021)246号、医伦研(2022)240号]。在2022年8~11月期间,从海南省

人民医院胃肠外科收集30对CRC及癌旁正常组织（距肿瘤组织10 cm）的手术切除样本。

1.3 细胞培养和转染

人结肠癌SW480细胞在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，传代3～4 d后，取对数生长期细胞进行实验。将SW480细胞接种于6孔板中，密度为1×10^6个细胞/孔。培养24 h后，使用Lipofectamine® 2000（Invitrogen；Thermo Fisher Scientific，Inc.）转染miR-370-3p mimics（50 nmol/L；5′-GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU-3′）、miR-370-3p抑制剂（100 nmol/L；5′-ACCAGGUUCCACCCCAGCAGGC-3′）、miR-370-3p mimics对照（50 nmol/L；5′-UU GUACUACACAAAAGUACUG-3′）和miR-370-3p抑制剂对照（100 nmol/L；5′-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3′，均来自广州锐博生物技术有限公司）。*WNT7B*过表达质粒pcDNA3.1/WNT7B和*WNT7B*敲低质粒pcDNA3.1/sh-WNT7B分别用于*WNT7B*过表达和敲低，空pcDNA3.1载体或sh-NC作为相应的阴性对照。当细胞达到80%汇合度时，在37 ℃下用Lipofectamine 2000按照实验分组进行转染或共转染。

miR-370-3p功能实验分为miR-370-3p mimics阴性对照组（NC-mimics组）、miR-370-3p模拟物组（miR-370-3p mimics组）、miR-370-3p inhibitor阴性对照组（NC-inhibitor组）和miR-370-3p抑制剂组（miR-370-3p inhibitor组）。回复实验分为阴性对照组（NC组）、miR-370-3p mimics组、miR-370-3p模拟物＋*WNT7B*过表达组（miR-370-3p mimics＋ov-*WNT7B*组）、miR-370-3p inhibitor组和miR-370-3p抑制剂＋*WNT7B*敲低组（miR-370-3p inhibitor＋sh-*WNT7B*组）。

1.4 RT-qPCR检测

使用TRIzol（Invitrogen）提取各组细胞的总RNA，并测定其浓度。根据PrimeScript RT试剂盒（Takara Bio，Inc.）说明进行逆转录以获得cDNA。采用SYBR Premix Ex Taq（Takara Bio，Inc.）和ABI 7500快速实时PCR系统（Applied Biosystems；Thermo Fisher Scientific，Inc.）进行qPCR反应，以*β-actin*作为内参基因。相对表达量通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。所有引物由广州锐博生物技术有限公司合成。

1.5 双荧光素酶报告基因实验

使用Lipofectamine 2000分别将含有WNT7B 3′UTR的野生型荧光素酶报告载体（WT-WNT7B）和突变型荧光素酶报告载体（MUT-WNT7B）与miR-370-3p模拟物（miR-370-3p mimics）及阴性对照（miR-NC）共转染至细胞中。转染48 h后收集各组细胞，按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书测定荧光素酶活性。

1.6 Western blot检测

使用RIPA裂解液提取细胞总蛋白，并通过BCA蛋白浓度测定试剂盒（Pierce；Thermo Fisher Scientific，Inc.）测定总蛋白浓度。50 μg蛋白样品经过SDS-PAGE（10%凝胶）电泳后转移至PVDF膜（Millipore），用5% BSA进行封闭，随后加入一抗：β-actin（1∶5 000，Abcam）、WNT7B（1∶2 000，Abcam）、CTNNB1（1∶1 000，Abcam）、PKM2（1∶1 000，Abcam）、GLUT1（1∶1 000，Abcam）和LDHA（1∶1 000，Abcam），在4 ℃下孵育过夜。加入HRP标记的二抗后在室温下孵育1 h。使用ECL显影液进行显影，利用ImageJ软件（NIH）分析条带灰度值。

1.7 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡检测

采用CCK-8法检测细胞增殖：将细胞接种于96孔板中，加入10 μL CCK-8溶液，37 ℃孵育2 h，使用酶标仪（BioTek Instruments，Inc.）测定450 nm处的吸光度。通过划痕实验检测细胞迁移：将细胞接种于6孔板中，用移液器尖端刮伤细胞单层，使用PBS洗涤以去除悬浮细胞和碎片，随后在含2% FBS的RPMI-1640培养基中培养24 h。用倒置显微镜（Olympus Corporation）拍照并计算迁移距离。通过Transwell小室检测细胞侵袭：用Matrigel（BD Biosciences）包被Transwell小室（8 μm孔径），将细胞接种于上室，向下室添加含10% FBS的培养基，37 ℃孵育24 h。用棉签擦去上室未侵袭细胞，使用0.1%结晶紫染色下室细胞，在显微镜下计数侵袭细胞。采用流式细胞术检测细胞凋亡：用不含乙二胺四乙酸（EDTA）的胰酶消化各组细胞，磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤2次，离心后加入结合缓冲液重悬细胞，调整细胞浓度为1×10^6个/mL。取100 μL细胞悬液加入流式管，加入5 μL Annexin V-FITC，混匀后室温避光孵育10 min，再加入10 μL PI溶液，继续孵育5 min，最后补加PBS至500 μL，上机检测细胞凋亡情况。

1.8 β-catenin与PKM2相互作用及亚细胞定位检测

采用免疫共沉淀技术（Co-IP）检测蛋白相互作用：取500 μg细胞总蛋白，经山羊抗兔IgG（1∶2 000）和Protein G琼脂糖珠4 ℃预清除1 h后，分别加入β-catenin或PKM2抗体（1∶200）4 ℃孵育过夜，再与Protein G琼脂糖珠4 ℃结合4 h。用含0.5% NP-40

的NETN缓冲液(20 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0)梯度洗涤(900→100 mmol/L NaCl各3次),热变性后行Western blot检测。同时采用免疫荧光技术分析亚细胞定位:细胞接种于爬片培养24 h后,4%多聚甲醛固定15 min,0.2% Triton X-100通透5 min,5% BSA封闭30 min;分别加入β-catenin(1∶250)和PKM2(1∶100)抗体4 ℃孵育过夜,荧光二抗室温避光孵育1 h,DAPI染核5 min,封片后激光共聚焦显微镜观察。

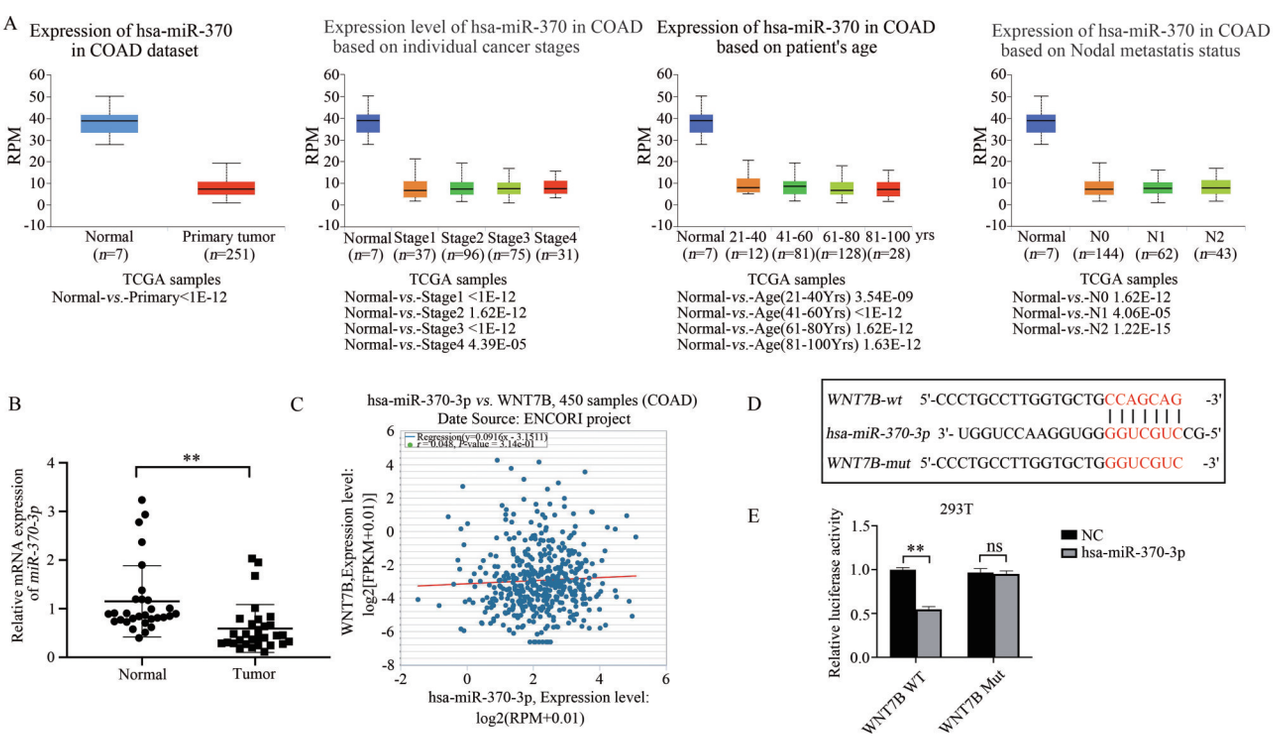
1.9　统计学处理

使用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。2组比较采用独立样本t检验,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),并进行Tukey两两比较。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　Hsa-miR-370-3p(miR-370-3p)在CRC中的表达及其与WNT7B的靶向关系

为明确miR-370-3p在CRC中的表达及其与WNT7B的调控关系,本研究利用UALCAN数据库中TCGA结肠腺癌(colon adenocarcinoma,COAD)队列的数据,对CRC组织与正常组织中的miR-370-3p表达进行了分析。结果显示,与正常组织相比,CRC组织中miR-370-3p的表达明显降低。此外,miR-370-3p的表达与CRC患者的年龄、临床分期和淋巴结转移密切相关(图1A),提示miR-370-3p可能在抑制CRC的恶性演变中发挥作用。随后,通过RT-qPCR实验进一步确认了*miR-370-3p*在CRC中的表达情况。结果表明,*miR-370-3p*在CRC中明显下调(图1B)。为探讨miR-370-3p与WNT7B的相关性,使用Starbase数据库进行分析,结果显示两者之间可能存在相关性($r=0.048$, $P=0.314$)(图1C)。进一步通过TargetScan数据库查询了miR-370-3p与WNT7B的结合位点,结果表明确实存在潜在的结合位点(图1D)。此外,双荧光素酶报告基因实验显示,转染miR-370-3p模拟物后,野生型(WT)WNT7B的荧光素酶活性明显下降,而突变型(MUT)WNT7B则无明显变化,进一步证明miR-370-3p能够靶向结合WNT7B(图1E)。



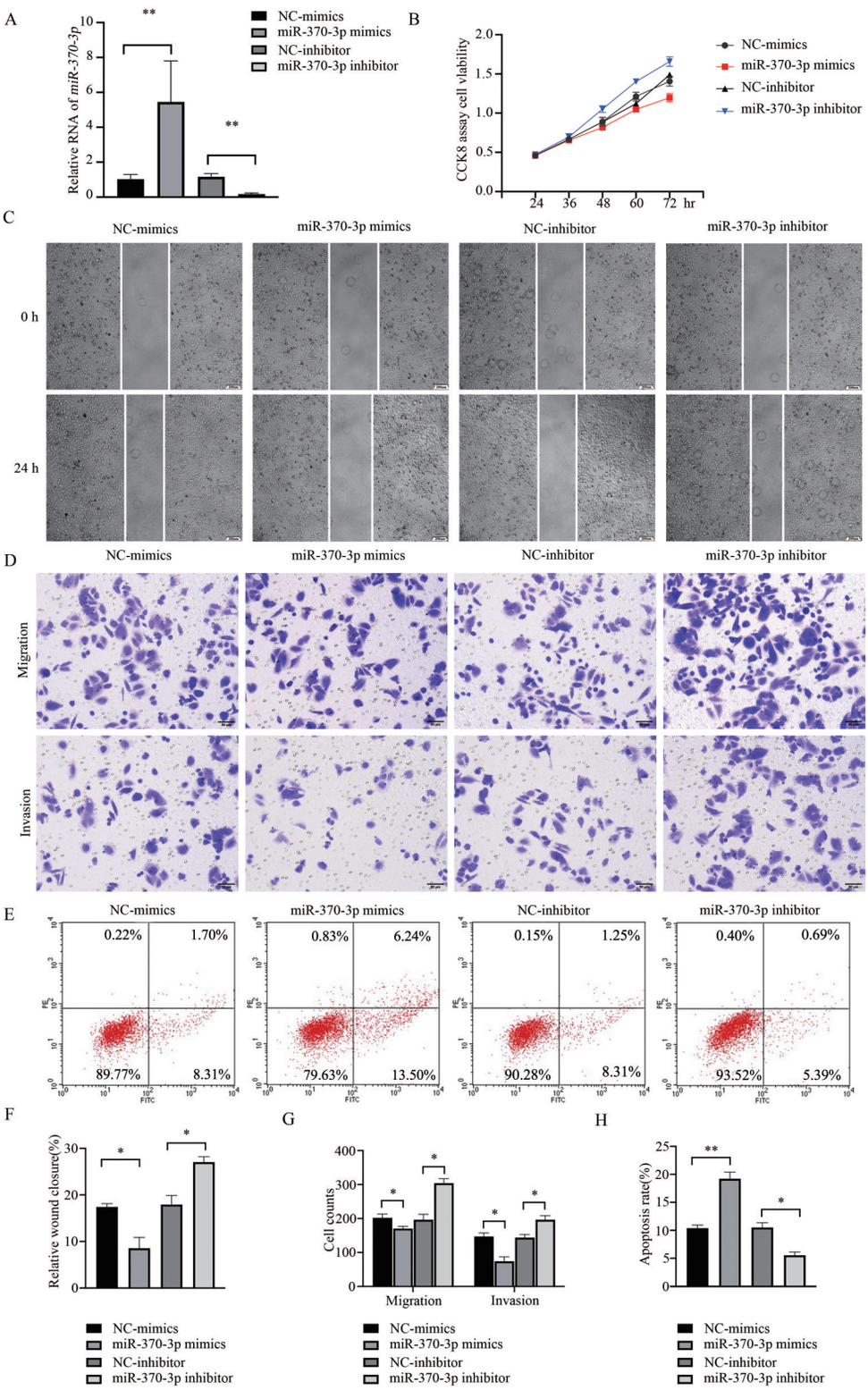
A:UALCAN分析miR-370-3p在CRC组织中的表达及其临床意义;B:RT-qPCR检测*miR-370-3p*的表达;C:Starbase分析miR-370-3p与WNT7B的相关性;D:TargetScan预测miR-370-3p与WNT7B的结合位点;E:双荧光素酶报告基因实验验证miR-370-3p与WNT7B的靶向结合;$^{**}P<0.01$;ns:无统计学意义

图1　miR-370-3p在CRC中低表达并与WNT7B存在靶向关系

Fig 1　miR-370-3p is downregulated in colorectal cancer and targets WNT7B

2.2 miR-370-3p对CRC细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡的影响

为评估miR-370-3p对CRC细胞的影响，进行了系列细胞功能实验。RT-qPCR结果显示，过表达*miR-370-3p*后，其表达明显增加；敲除*miR-370-3p*则导致表达明显降低（图2A）。CCK8实验结果表



A：RT-qPCR检测*miR-370-3p*表达；B：CCK-8检测细胞增殖；C、F：划痕实验检测细胞迁移（其中C图放大倍数为×40，比例尺200 μm）；D、G：Transwell检测细胞侵袭和迁移（其中D图放大倍数为×200，比例尺50 μm）；E、H：流式细胞术检测细胞凋亡；$^{**}P<0.01$，$^{*}P<0.05$

图2 miR-370-3p抑制CRC细胞的增殖、侵袭、迁移，促进凋亡

Fig 2 miR-370-3p suppresses proliferation, invasion, migration, and promotes apoptosis in colorectal cancer cells

明，过表达 *miR-370-3p* 明显抑制 CRC 细胞的增殖，而敲除 *miR-370-3p* 则明显促进细胞增殖（图 2B）。划痕实验结果显示，过表达 *miR-370-3p* 明显抑制了 CRC 细胞的迁移，敲除 *miR-370-3p* 则明显促进细胞迁移（图 2C、F）。Transwell 实验表明，过表达 *miR-370-3p* 明显抑制 CRC 细胞的侵袭和迁移，敲除 *miR-370-3p* 明显促进这些过程（图 2D、G）。此外，细胞凋亡实验结果显示，过表达 *miR-370-3p* 明显促进了 CRC 细胞的凋亡，而敲除 *miR-370-3p* 则明显抑制了细胞凋亡（图 2E、H）。这些结果表明，miR-370-3p 能够抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭，同时促进细胞凋亡。

2.3　miR-370-3p 通过调节 *GLUT1* 和 *LDHA* 表达抑制 CRC 细胞的有氧糖酵解

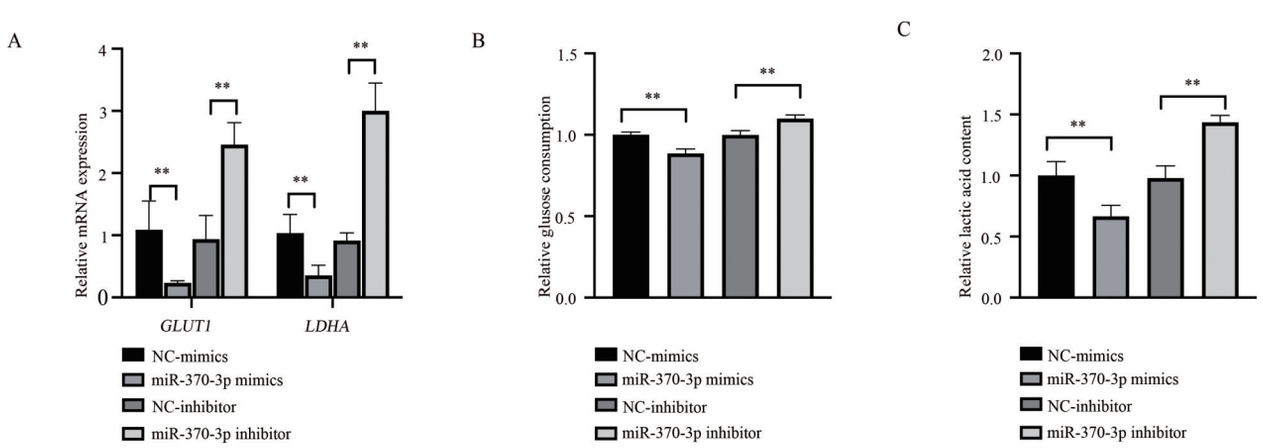
为进一步明确 miR-370-3p 对有氧糖酵解的影响，通过 RT-qPCR 检测了糖酵解途径关键因子 *GLUT1* 和 *LDHA* 的表达。结果显示，过表达 *miR-370-3p* 明显抑制了 CRC 细胞中 *GLUT1* 和 *LDHA* 的表达，敲除 *miR-370-3p* 明显促进了这 2 个因子的表达（图 3A）。此外，检测葡萄糖消耗和乳酸含量的结果显示，过表达 *miR-370-3p* 明显减少了 CRC 细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成，敲除 *miR-370-3p* 明显增加了葡萄糖消耗和乳酸含量（图 3B、C）。综上所述，miR-370-3p 可以有效抑制 CRC 细胞的有氧糖酵解。

2.4　miR-370-3p 通过靶向 WNT7B 抑制 Wnt/β-catenin 通路对 CRC 细胞有氧糖酵解的影响

为确定 miR-370-3p 靶向 WNT7B 对 Wnt/β-catenin 通路的影响，通过 Western blot 分析了细胞中与 Wnt/β-catenin 信号通路相关的 β-catenin、TCF-4、c-Myc 和 CyclinD1 的表达。结果显示，过表达 *miR-370-3p* 明显降低了这些因子的表达。进一步地，过表达 *WNT7B* 可以逆转 miR-370-3p 对 β-catenin、TCF-4、c-Myc 和 CyclinD1 的抑制作用。相反，敲除 *miR-370-3p* 后，这些因子的表达明显升高；敲除 *WNT7B* 则逆转了这一效应（图 4A、B）。此外，通过 RT-qPCR 检测了糖酵解途径关键因子 *GLUT1* 和 *LDHA* 的表达。结果表明，过表达 *miR-370-3p* 明显抑制了 CRC 细胞中 *GLUT1* 和 *LDHA* 的表达，而过表达 *WNT7B* 可逆转这一抑制效应；敲除 *miR-370-3p* 则明显促进了 *GLUT1* 和 *LDHA* 的表达，而敲除 *WNT7B* 同样逆转了这一效果（图 4C）。在葡萄糖消耗和乳酸含量的检测中，结果显示过表达 *miR-370-3p* 明显减少了 CRC 细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成，过表达 *WNT7B* 也能逆转这一现象；相反，敲除 *miR-370-3p* 则明显增加了葡萄糖消耗和乳酸含量，而敲除 *WNT7B* 同样恢复了这种变化（图 4D、E）。这些结果表明，miR-370-3p 通过靶向 WNT7B 抑制 Wnt/β-catenin 通路，从而影响 CRC 细胞的有氧糖酵解。

2.5　PKM2 与 β-catenin 相互作用及其与糖解解途径的关键因子 GLUT1 和 LDHA 表达的相关性

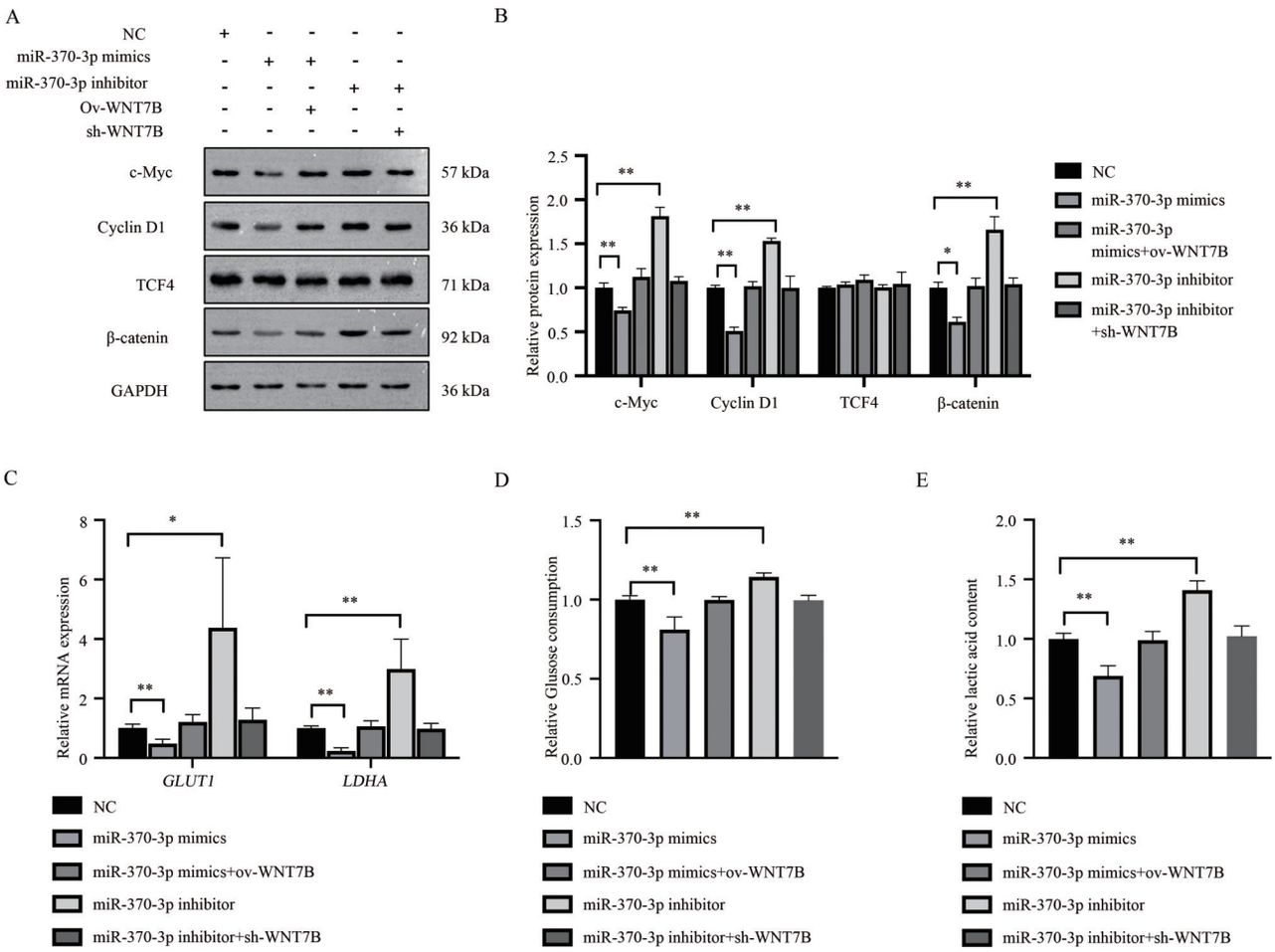
为验证 PKM2 与 β-catenin 之间的相互作用，采用免疫共沉淀（Co-IP）检测两者结合情况。结果显示，PKM2 可与 CRC 细胞中的 β-catenin 发生相互作用（图 5A）。已有研究表明，EGFR 信号通路的激活



A：RT-qPCR 检测 *GLUT1* 和 *LDHA* 的 mRNA 表达；B：葡萄糖消耗量；C：乳酸生成量；$^{**}P<0.01$，$^{*}P<0.05$

图 3　miR-370-3p 抑制 CRC 细胞的有氧糖酵解

Fig 3　miR-370-3p suppresses aerobic glycolysis in colorectal cancer cells



A、B：Western blot检测β-catenin、TCF-4、c-Myc和CyclinD1蛋白表达；C：RT-qPCR检测*GLUT1*和*LDHA*的mRNA表达；D：葡萄糖消耗量；E：乳酸生成量；$^{**}P<0.01$，$^{*}P<0.05$

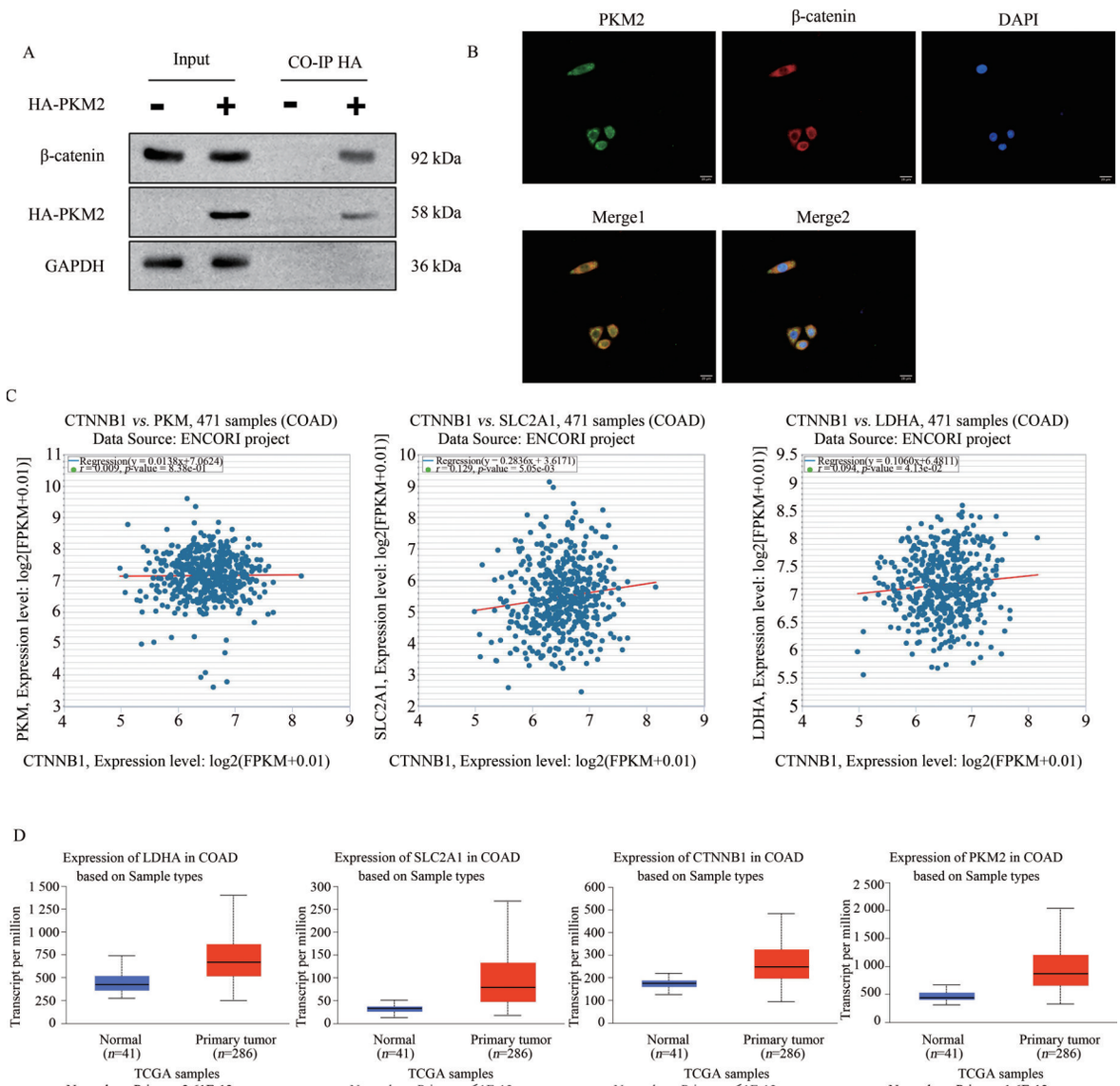
图4　miR-370-3p靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin通路从而抑制CRC细胞的有氧糖酵解

Fig 4　miR-370-3p suppresses aerobic glycolysis in colorectal cancer cells through targeting WNT7B and inhibiting the Wnt/β-catenin pathway.

可诱导PKM2转位至细胞核，其中PKM2的K433位点能够与c-Src介导磷酸化的β-catenin Y333位点结合[16]。为进一步明确PKM2与β-catenin的亚细胞定位，通过免疫荧光实验检测两者的表达情况，并利用激光共聚焦显微镜观察其定位模式。结果显示，PKM2和β-catenin主要共定位于细胞核内（图5B），支持PKM2可能作为β-catenin的核内协同因子，参与其转录调控功能。

为探讨PKM2与β-catenin及糖酵解关键分子SLC2A1（GLUT1）和LDHA之间的潜在关联，通过Starbase数据库分析了CTNNB1（β-catenin）和PKM2、SLC2A1（GLUT1）和LDHA之间的相关性。结果显示，CTNNB1（β-catenin）与PKM2（r=0.009，P=8.38e-01）、SLC2A1（GLUT1）（r=0.129，P=5.05e-03）和LDHA（r=0.094，P=4.13e-02）基因存在相关性（图5C）。接着通过UALCAN数据库验证了CTNNB1（β-catenin）和PKM2、SLC2A1（GLUT1）和LDHA在CRC中的表达。发现与正常组织相比，CRC组织中CTNNB1、PKM2、SLC2A1和LDHA的表达均明显上调（图5D）。提示β-catenin及其相关分子可能在CRC的糖代谢及肿瘤进展中发挥关键作用。

综上所述，miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin信号通路，减少PKM2与β-catenin的核内结合，从而下调GLUT1和LDHA的表达，最终抑制CRC细胞的有氧糖酵解。



A：Co-IP 检测 PKM2 与 β-catenin 的相互作用；B：免疫荧光检测显示 PKM2 与 β-catenin 在细胞核中共定位；C：Starbase 分析 CTNNB1 与 PKM2、GLUT1、LDHA 相关性；D：UALCAN 分析 CTNNB1、PKM2、GLUT1、LDHA 在 CRC 中的表达

图 5　PKM2 与 β-catenin 的结合，β-catenin 与 PKM2、GLUT1 和 LDHA 的相关性及其在 CRC 中的基因表达

Fig 5　Binding interaction between PKM2 and β-catenin, correlation analysis of β-catenin with PKM2, GLUT1 and LDHA, and their gene expression profiles in colorectal cancer

3　讨论

肿瘤细胞的能量代谢与正常细胞存在明显差异。德国生化学家奥托·海因里希·瓦尔堡(Otto Heinrich Warburg)于 1924 年首次描述了肿瘤细胞中的有氧糖酵解现象，即瓦尔堡效应[6]。目前，这种代谢重编程现象已在多种肿瘤中得到证实，包括乳腺癌[17]、肾癌[18]和 CRC[19]。此外有研究发现，miRNA 在肺癌的肿瘤代谢中发挥着重要的调控作用[20]。同时有研究表明，miR-370-3p 在乳腺癌[15,21]和膀胱癌[14,22,23]中表现出异常表达，但其在 CRC 中的研究相对较少。本研究发现，miR-370-3p 在 CRC 组织中的表达明显下调，而其靶标 WNT7B 则明显上调。体外实验结果显示，miR-370-3p 的过表达能够明显抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，而使用 miR-370-3p 抑制剂则明显促进了这些生物学行为的发生。

研究发现，miRNA 能够调节丙酮酸激酶亚型 1(PKM1)和 PKM2 的表达[24]，从而实现对糖酵解的调节。PKM2 是肿瘤发展中的重要组成部分，为肿瘤细胞提供了代谢优势。糖酵解中间体可以作为合成脂质、氨基酸和核酸的前体[25]。本课题组先前研究显示，miR-370-3p 能够靶向结合 WNT7B 基因[26]。WNT7B 作为 Wnt 配体，能够通过与细胞表面受体 Frizzled 和 LRP5/6 的相互作用启动经典的

Wnt/β-catenin信号转导[27]。在静息状态下，β-catenin与钙黏蛋白(E-cadherin)结合以维持正常的细胞间黏附，而少量游离的β-catenin则与含GSK-3β组成的蛋白降解复合体结合，进行磷酸化[27,28]。作为Wnt/β-catenin通路的核心成分，β-catenin能够与E-cadherin和α-catenin结合形成复合体，发挥细胞黏附作用，抑制细胞迁移[28,29]；同时，肿瘤细胞为维持快速增殖，通常需要通过代谢重编程满足能量及生物合成需求[30]。在肿瘤细胞中，Wnt信号异常激活，复合体被降解，导致β-catenin在细胞质中积累，当β-catenin达到一定水平时，它可以激活细胞核中的TCF-4，进而激活下游靶基因c-Myc和Cyclin D1，导致肿瘤细胞的过度增殖，并抑制凋亡[31]。此外，本课题组研究表明，WNT7B在CRC组织中的表达明显上调，且与患者的临床分期和淋巴结转移密切相关。双荧光素酶报告实验进一步确认，miR-370-3p通过直接靶向WNT7B的3′UTR区域抑制其表达，这一结果与本课题组先前的研究一致[26]。

本研究中，miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin信号通路，降低*GLUT1*和*LDHA*的表达，从而抑制CRC细胞的有氧糖酵解。这些结果表明，miR-370-3p在CRC的发生和发展中发挥了重要的抑癌作用。此外，本研究发现，*miR-370-3p*通过抑制Wnt/β-catenin信号通路明显降低CRC细胞的有氧糖酵解水平。具体而言，*miR-370-3p*的过表达明显下调了Wnt/β-catenin信号通路的关键因子，如β-catenin、TCF-4、c-Myc和CyclinD1。这些因子的下调减少了PKM2与β-catenin在细胞核中的结合，从而抑制了下游糖酵解关键因子*GLUT1*和*LDHA*的表达。这些结果表明，miR-370-3p抑制了CRC细胞的有氧糖酵解。

为了进一步探究miR-370-3p通过靶向WNT7B影响Wnt/β-catenin信号通路和有氧糖酵解的机制，本研究对miR-370-3p转染细胞中WNT7B的表达进行了上调和下调实验。结果表明，*WNT7B*过表达可逆转miR-370-3p对CRC细胞增殖、迁移及糖酵解的抑制作用，而*WNT7B*敲除则进一步增强了miR-370-3p的抑癌效果，显示出两者之间存在靶向关系。

此外，有研究表明，PKM2受到EGF或EGFR的调控，其表达上调并转位至细胞核，随后与β-catenin的相互作用促进了肿瘤细胞的增殖，OTUB2则可增强PKM2的稳定性和糖酵解活性[16,32]。既往研究发现，APC突变导致β-catenin增加，增强了β-catenin与TCF4的结合，进而增强其转录活性[33]。PKM2的增加进一步提升了其他糖酵解酶的表达[34]，诱导了Warburg效应和β-catenin的再激活[34,35]。本研究通过蛋白免疫共沉淀实验，确认了β-catenin与PKM2的结合，并通过免疫荧光实验检测到β-catenin和PKM2蛋白转位至细胞核。同时，利用Spearman相关性分析探讨了β-catenin与糖酵解酶PKM2、GLUT1和LDHA之间的相关性，结果表明β-catenin与糖酵解酶GLUT1和LDHA密切相关。

综上所述，本研究系统性地揭示了miR-370-3p在CRC中的抑癌作用及其分子机制。miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin信号通路，减少PKM2与β-catenin在细胞核中的结合，从而抑制下游糖酵解关键因子*GLUT1*和*LDHA*的表达，最终抑制CRC细胞的有氧糖酵解(图6)。这些发现为CRC的分子机制研究提供了新的视角，并可能为

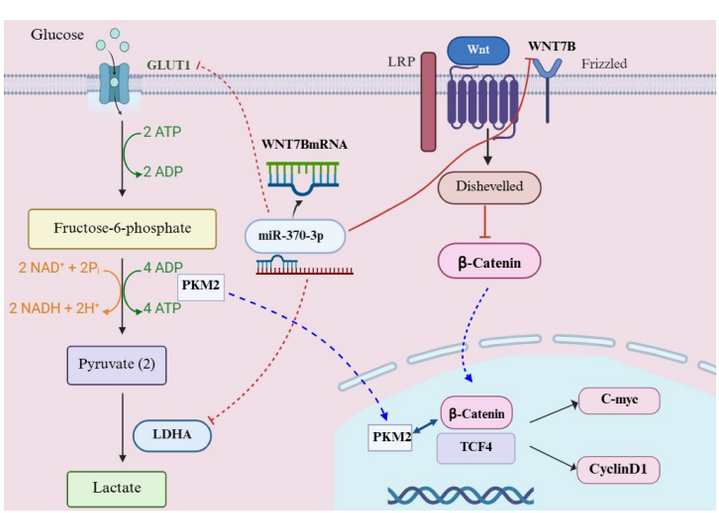


图6　miR-370-3p通过靶向WNT7B抑制Wnt/β-catenin通路调控CRC有氧糖酵解的分子机制

Fig 6　miR-370-3p inhibits the Wnt/β-catenin pathway through targeting WNT7B to regulate the molecular mechanism of aerobic glycolysis in colorectal cancer

未来的靶向治疗提供新的策略。

尽管本研究取得了重要进展，但仍存在一定的局限性。首先，本研究主要基于体外细胞实验，尚缺乏动物模型的体内验证，未明确miR-370-3p在生理环境下对CRC生长、代谢及肿瘤微环境的调控作用。因此，下一步研究将通过构建CRC动物模型，进一步验证miR-370-3p的抗肿瘤效应，探索其在肿瘤免疫微环境中的功能。并将继续扩大临床样本量，系统阐明miR-370-3p在代谢-免疫微环境协同调控中的分子网络，以推动其作为代谢靶向治疗策略的临床转化。此外，miR-370-3p在不同组织及细胞类型中的调控作用可能存在异质性，其在肿瘤耐药性、代谢重编程及免疫逃逸中的作用仍需深入探索。

作者贡献度说明：

江帆：文章设计、实验与论文撰写；范永吉，周晓欣：资料收集与查阅文献；刘宁：指导论文撰写并负责文章的审校。

所有作者声明不存在利益关系。

参考文献

1 Cao Q, Tian Y, Deng Z, et al. Epigenetic alteration in colorectal cancer: Potential diagnostic and prognostic implications[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(6): 3358.

2 Giardina C, Kuo A, Nito K, et al. Early onset colorectal cancer: Cancer promotion in young tissue[J]. Biochem Pharmacol, 2024, 226: 116393.

3 Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, et al. Colorectal cancer: A comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments [J]. Cancer Metastasis Rev, 2024, 43(2): 729-753.

4 Zhu M, Benson AB 3rd. An update on pharmacotherapies for colorectal cancer: 2023 and beyond[J]. Expert Opin Pharmacother, 2024, 25(1): 91-99.

5 Zahra K, Dey T, Ashish, et al. Pyruvate kinase M2 and cancer: The role of PKM2 in promoting tumorigenesis [J]. Front Oncol, 2020,10:159.

6 Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. Science, 1956,123(3191):309-314.

7 Fendt SM.100 years of the Warburg effect: A cancer metabolism endeavor[J]. Cell,2024,187(15):3824-3828.

8 Wang X, Zhang H, Yang H, et al. Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through the miR-122-PKM2 axis in colorectal cancer [J]. Mol Oncol, 2020, 14(3): 539-555.

9 Zhong ZW, Zhou WC, SUN XF, et al. Dezocine regulates the malignant potential and aerobic glycolysis of liver cancer targeting Akt1/GSK-3β pathway [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(7): 480.

10 Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate [J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 297-308.

11 Zhong X, He X, Wang Y, et al. Warburg effect in colorectal cancer: The emerging roles in tumor microenvironment and therapeutic implications [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1):160.

12 Schwartz L, Seyfried T, Alfarouk KO, et al. Out of Warburg effect: An effective cancer treatment targeting the tumor specific metabolism and dysregulated pH [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 43:134-138.

13 Liu Y, Murray-Stewart T, Casero RA Jr, et al. Targeting hexokinase 2 inhibition promotes radiosensitization in HPV16 E7-induced cervical cancer and suppresses tumor growth [J]. Int J Oncol, 2017, 50(6): 2011-2023.

14 Huang X, Zhu H, Gao Z, et al. Wnt7a activates canonical Wnt signaling, promotes bladder cancer cell invasion, and is suppressed by miR-370-3p [J]. J Biol Chem, 2018, 293(18): 6693-6706.

15 Mao J, Wang L, Wu J, et al. miR-370-3p as a novel biomarker promotes breast cancer progression by targeting FBLN5 [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021:4649890.

16 Yang W, Xia Y, Ji H, et al. Nuclear PKM2 regulates β-catenin transactivation upon EGFR activation [J]. Nature,2011, 480(7375):118-122.

17 Liu X, Liu H, Zeng L, et al. BRCA1 overexpression attenuates breast cancer cell growth and migration by regulating the pyruvate kinase M2-mediated Warburg effect *via* the PI3K/AKT signaling pathway[J]. PeerJ, 2022, 10:e14052.

18 Teng R, Liu Z, Tang H, et al. HSP60 silencing promotes Warburg-like phenotypes and switches the mitochondrial function from ATP production to biosynthesis in ccRCC cells [J]. Redox Biol, 2019, 24:101218.

19 Jing Z, Liu Q, He X, et al. NCAPD3 enhances Warburg effect through c-myc and E2F1 and promotes the occurrence and progression of colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022,41(1):198.

20 Iqbal MA, Arora S, Prakasam G, et al. MicroRNA in lung cancer: Role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance [J]. Mol Aspects Med, 2019, 70:3-20.

21 Jin Y, Zhang M, Duan R, et al. Long noncoding RNA FGF14-AS2 inhibits breast cancer metastasis by regulating the miR-370-3p/FGF14 axis [J]. Cell Death Discov, 2020, 6:103.

22 Scheunemann D, Pradhan AK, Das SK, et al. Wnt7a and miR-370-3p: New contributors to bladder cancer in-

vasion [J]. Biotarget, 2018, 2:14.

23 Zhang R, Wang J, Jia E, et al. lncRNA BCAR4 sponges miR-370-3p to promote bladder cancer progression *via* Wnt signaling [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(2): 578-588.

24 Taniguchi K, Uchiyama K, Akao Y. PTBP1-targeting microRNAs regulate cancer-specific energy metabolism through the modulation of PKM1/M2 splicing[J]. Cancer Sci, 2021,112(1):41-50.

25 Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. Nature, 2008, 452(7184): 230-233.

26 Liu N, Jiang F, Chen Z. A preliminary study on the pathogenesis of colorectal cancer by constructing a Hsa-circRNA-0067835-miRNA-mRNA regulatory network [J]. Onco Targets Ther, 2021, 14:4645-58.

27 Shi J, Li F, Luo M, et al. Distinct Roles of Wnt/β-catenin signaling in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:3520581.

28 van der Wal T, van Amerongen R. Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: A balancing act for β-catenin[J]. Open Biol, 2020, 10(12): 200267.

29 Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease[J]. Cell, 2012,149(6):1192-1205.

30 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324(5930):1029-1033.

31 Liu J, Xiao Q, Xiao J, et al. Wnt/β-catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022,7(1):3.

32 Yu S, Zang W, Qiu Y,et al. Deubiquitinase OTUB2 exacerbates the progression of colorectal cancer by promoting PKM2 activity and glycolysis[J]. Oncogene, 2022, 41(1):46-56.

33 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells[J]. Cell, 2002,111(2):241-250.

34 Cha PH, Hwang JH, Kwak DK, et al. APC loss induces Warburg effect *via* increased PKM2 transcription in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2021, 124(3): 634-644.

35 Pak JN, Lee HJ, Sim DY, et al. Anti-Warburg effect *via* generation of ROS and inhibition of PKM2/β-catenin mediates apoptosis of lambertianic acid in prostate cancer cells[J]. Phytother Res, 2023, 37(9):4224-4235.

[**本文编辑**] 朱金月