

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.08.003

circ_0001461 靶向抑制 miR-30a-5p 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响 *

范金柱¹ 从 飞¹ 张文韬¹ 田小宁¹ 宋 涛¹ 郭云山^{2Δ}

(1 西安交通大学附属红会医院骨显微修复外科 陕西 西安 710054; 2 西安交通大学附属红会医院脊柱外科 陕西 西安 710054)

摘要 目的:探讨 circ_0001461 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响及调控机制。方法:采用实时荧光定量聚合酶反应(qRT-PCR)检测检测 circ_0001461 在骨肉瘤组织和细胞中的表达水平。在 U2OS 和 HOS 细胞中转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后,采用 CCK8 检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,qRT-PCR 检测增殖相关分子 Ki-67 mRNA 的表达水平,Western Blot 检测凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平。采用双荧光素酶报告基因检测 circ_0001461 和 miR-30a-5p 的结合情况。结果:circ_0001461 在骨肉瘤组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织 ($P<0.05$),circ_0001461 在骨肉瘤细胞 U2OS 和 HOS 中的表达水平均明显高于成骨细胞 NHOst ($P<0.05$)。低表达 circ_0001461 能够抑制骨肉瘤细胞 U2OS 和 HOS 的增殖和增殖相关分子 Ki-67 的表达($P<0.05$);促进骨肉瘤细胞 U2OS 和 HOS 的凋亡和凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达($P<0.05$)。双荧光素酶结果显示 circ_0001461 能够靶向结合 miR-30a-5p。低表达 circ_0001461 能够促进 miR-30a-5p 的表达($P<0.05$),circ_0001461 和 miR-30a-5p 在骨肉瘤组织中的表达呈负相关($P<0.05$)。在 U2OS 细胞中共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p mimics 后能够进一步加强单独转染 sh-circ_0001461 对 U2OS 细胞增殖和凋亡的影响 ($P<0.05$);在 HOS 细胞中共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p inhibitors 后能够逆转单独转染 sh-circ_0001461 对 U2OS 细胞增殖和凋亡的影响($P>0.05$)。结论:circ_0001461 在骨肉瘤组织和细胞中明显高表达,低表达 circ_0001461 能够靶向促进 miR-30a-5p 的表达进而抑制骨肉瘤细胞增殖和促进细胞凋亡。

关键词:骨肉瘤;circ_0001461;miR-30a-5p;增殖;凋亡**中图分类号:**R-33;R738.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)08-1413-06

The Effect of Circ_0001461 Targeting Inhibition of miR-30a-5p on the Proliferation and Apoptosis of Osteosarcoma Cells*

FAN Jin-zhu¹, CONG Fei¹, ZHANG Wen-tao¹, TIAN Xiao-ning¹, SONG Tao¹, GUO Yun-shan^{2Δ}

(1 Department of Bone Microsurgery, Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 Department of Spinal Surgery, Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of circ_0001461 on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells and its regulatory mechanism. **Methods:** Real-time fluorescent quantitative polymerase reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of circ_0001461 in osteosarcoma tissues and cells. After transfection of sh-NC and sh-circ_0001461 in U2OS and HOS cells, CCK8 was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, qRT-PCR was used to detect the expression level of proliferation-related molecule Ki-67 mRNA, Western Blot was used to detect the expression level of apoptosis-related molecule Cleaved-caspase-3 protein. The dual luciferase reporter gene was used to detect the binding of circ_0001461 and miR-30a-5p. **Results:** The expression level of circ_0001461 in osteosarcoma tissue was significantly higher than that in normal adjacent tissues ($P<0.05$), and the expression level of circ_0001461 in osteosarcoma cells U2OS and HOS was significantly higher than that in osteoblast NHOst ($P<0.05$). Low expression of circ_0001461 could inhibit the proliferation of osteosarcoma cells U2OS and HOS and the expression of proliferation-related molecule Ki-67 ($P<0.05$); promote the apoptosis of osteosarcoma cells U2OS and HOS and the apoptosis-related molecule Cleaved-caspase-3 protein Expression ($P<0.05$). The results of dual luciferase showed that circ_0001461 could target miR-30a-5p. Low expression of circ_0001461 could promote the expression of miR-30a-5p ($P<0.05$), and the expression of circ_0001461 and miR-30a-5p in osteosarcoma tissues was negatively correlated ($P<0.05$). Co-transfection of sh-circ_0001461 and miR-30a-5p mimics in U2OS cells could further enhance the effect of single transfection of sh-circ_0001461 on the proliferation and apoptosis of U2OS cells ($P<0.05$); co-transfection of sh-circ_0001461 and miR-30a-5p inhibitors in HOS cells could reverse the effect of single transfection sh-circ_0001461 on the proliferation and apoptosis of U2OS cells ($P>0.05$). **Conclusion:** circ_0001461 was highly expressed in osteosarcoma tissues and cells. The low expression of circ_0001461 could target the expression of miR-30a-5p to inhibit the proliferation of osteosarcoma cells and promote cell apoptosis.

* 基金项目:西安交通大学基本科研业务费(xzy01201923);陕西省 2020 年自然科学基金基础研究计划(2020JM-687)

作者简介:范金柱(1987-),男,博士,主治医师,主要研究方向:骨质疏松,骨肿瘤,骨再生,电话:18710926943,E-mail:fmufjz@163.com

Δ 通讯作者:郭云山(1983-),男,博士,主治医师,主要研究方向:骨肿瘤,骨再生,电话:13474474504,E-mail:183869503@qq.com

(收稿日期:2021-10-31 接受日期:2021-11-27)

Key words: Osteosarcoma; circ_0001461; miR-30a-5p; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)08-1413-06

前言

骨肉瘤是青少年中最常见的骨肿瘤,具有较高的侵袭性和转移能力^[1]。研究显示早期骨肉瘤的5年生存率在69%左右,而转移性骨肉瘤生存率下降到15~30%^[2]。尽管手术治疗和新辅助化疗被广泛应用于骨肉瘤的治疗,但是治疗效果仍欠佳^[3]。因此进一步了解骨肉瘤发病机制,对新的治疗靶点干预具有重要作用。circRNA在真核生物中广泛表达,在外显子跳跃或反向剪接过程中形成的,具有闭环结构,稳定性较好。研究显示circRNA在基因调节、免疫性疾病、炎症性疾病和肿瘤中发挥重要作用^[4]。越来越多的研究证实circRNA在骨肉瘤中异常表达,并能发挥调控骨肉瘤进展的作用^[5,6]。近期研究显示circ_0001461(又名circFAT1)在骨肉瘤中明显高表达,并与患者预后相关,但具体作用机制尚未完全阐明^[7]。因此,本研究在骨肉瘤组织和细胞中验证circ_0001461的表达水平,并进一步在骨肉瘤细胞中低表达circ_0001461后探讨circ_0001461对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响及调控机制。

1 材料和方法

1.1 组织标本

选取2018年8月至2019年5月期间在我院住院的40名骨肉瘤患者,在手术中切取骨肉瘤组织以及对应的癌旁正常组织。所有患者均经病理学诊断明确,平均年龄13.2±4.9岁,男性22例,女性18例,其中24例伴有远处转移,患者在术前均未接受过放化疗和生物治疗等,术前签署知情同意书,标本采集后立即放入液氮保存。

1.2 主要试剂

DMEM/F12细胞培养基购自美国Gibco公司,CCK-8试剂盒中国上海碧云天生物技术有限公司,细胞凋亡试剂盒购自上海弗元生物科技有限公司;qRT-PCR试剂盒和TRIZol试剂购自日本TaKaRa公司,Cleaved-caspase-3和GAPDH抗体购自美国Sigma-Aldrich公司,lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,转染所用质粒由中国上海吉凯基因有限公司合成,引物由上海生工生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 成骨细胞NHOst、骨肉瘤细胞U2OS和HOS购自中国科学院上海细胞库。采用含10%胎牛血清的DMEM/F12细胞培养基在37℃、5%CO₂平衡湿度培养箱中培养。在U2OS和HOS细胞中分别转染sh-NC、sh-circ_0001461、miR-NC、miR-30a-5p mimics和miR-30a-5p inhibitors,细胞转染采用Lipofectamine 2000方法,其具体操作按照说明书进行。**1.3.2 qRT-PCR** 采用TRIZol试剂提取骨肉瘤组织和细胞中总RNA,参考试剂盒要求将总RNA合成cDNA。SYBR-Green实时荧光定量PCR检测circ_0001461、miR-30a-5p和Ki-67表达水平,使用GAPDH或U6为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。

1.3.3 CCK-8方法检测细胞增殖 按照试剂盒要求对细胞增殖能力进行检测。将细胞系接种到96孔,分别在24 h、48 h、72 h和96 h时,向培养孔中加入10 μL的CCK-8溶液,孵育2 h后采用酶标仪测量450 nm波长光密度值。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 使用异硫氰酸荧光素(Annexin-V-FITC)和碘化丙啶(PI)试剂检测细胞的凋亡水平。收集细胞,PBS清洗两次后,利用缓冲液重置,使用Annexin-V-FITC和PI对细胞在室温和避光条件下反应10 min,使用流式细胞仪检测细胞不同周期的凋亡率(凋亡率=早期凋亡比例+晚期凋亡比例)。

1.3.5 Western blot法 使用RIPA缓冲液提取各组细胞中蛋白质,采用BCA法测量各组蛋白的蛋白量。首先分离蛋白质SDS-PAGE转膜,在室温条件下脱脂奶粉处理1 h。随后加入Ki-67和GAPDH兔抗人多克隆抗体,于4℃温度条件下孵育过夜。最后在次日加入抗兔IgG二抗孵育2 h,使用发光液曝光显影。

1.3.6 双荧光素酶报告 将野生型(WT)或突变型(MUT)circ_0001461克隆到pmirGLO质粒受体中,同时将miR-30a-5p mimics或miR-NC导入U2OS细胞中,共培养48 h后采用双荧光素酶受体分析系统测量双荧光素酶活性。

1.4 统计学分析

数据采用SPSS21.0进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用配对t检验或两独立样本t检验,多组间比较使用方差分析。Pearson相关分析circ_0001461和miR-30a-5p在骨肉瘤中的表达相关性。 $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 circ_0001461在骨肉瘤组织和细胞中的表达水平

采用qRT-PCR检测circ_0001461在骨肉瘤组织、癌旁正常组织、成骨细胞NHOst、骨肉瘤细胞U2OS和HOS中的表达水平,结果显示circ_0001461在骨肉瘤组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织,差异具有统计学意义(图1A, $P < 0.05$),circ_0001461在骨肉瘤伴转移的患者的表达水平明显高于骨肉瘤不伴转移的患者,差异具有统计学意义(图1B, $P < 0.05$)。circ_0001461在骨肉瘤细胞U2OS和HOS中的表达水平明显高于成骨细胞NHOst,差异均具有统计学意义(图1C, $P < 0.05$)。

2.2 低表达circ_0001461对骨肉瘤细胞增殖的影响

在U2OS和HOS细胞中分别转染sh-NC和sh-circ_0001461后,采用CCK8检测细胞增殖情况,qRT-PCR检测增殖相关分子Ki-67 mRNA的表达水平。结果显示U2OS和HOS细胞中转染sh-circ_0001461后,circ_0001461的表达水平较转染sh-NC后明显下降,差异均具有统计学意义(图2A和2B, $P < 0.05$)。在U2OS和HOS细胞中转染sh-circ_0001461后,U2OS和HOS细胞的增殖能力和增殖相关分子Ki-67的表达水平明显低于转染sh-NC,差异均具有统计学意义(图2C-F, $P < 0.05$)。

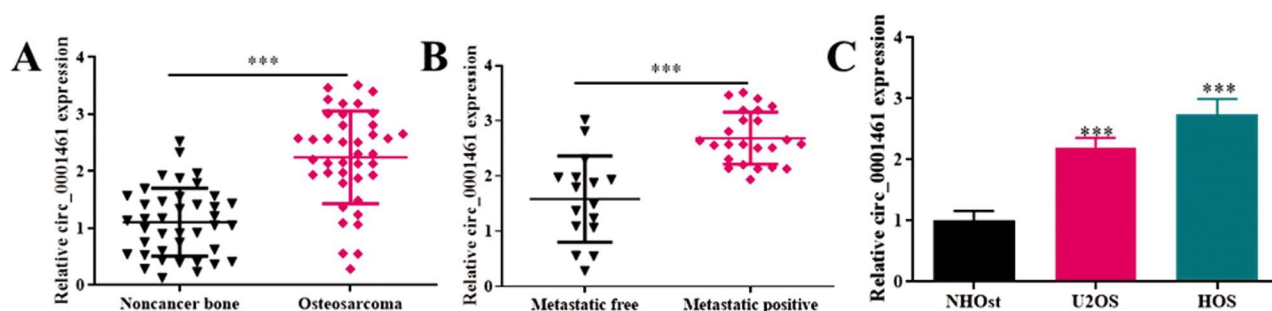


图1 circ_0001461 在骨肉瘤组织和细胞中的表达水平

注:A. qRT-PCR 检测 circ_0001461 在骨肉瘤组织和癌旁正常组织中的表达水平;B. qRT-PCR 检测 circ_0001461 在骨肉瘤伴或不伴转移患者中的表达水平;C. qRT-PCR 检测 circ_0001461 在成骨细胞 NHOst、骨肉瘤细胞 U2OS 和 HOS 中的表达水平。与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

Fig.1 The expression level of circ_0001461 in osteosarcoma tissues and cells

Note: A. The expression level of circ_0001461 in osteosarcoma tissues and adjacent normal tissues was detected by qRT-PCR; B. Expression level of circ_0001461 in osteosarcoma patients with or without metastasis was detected by qRT-PCR; C. The expression levels of circ_0001461 in osteoblasts NHOst and osteosarcoma cells U2OS and HOS were detected by qRT-PCR. Note: *** $P<0.001$, compared with group control.

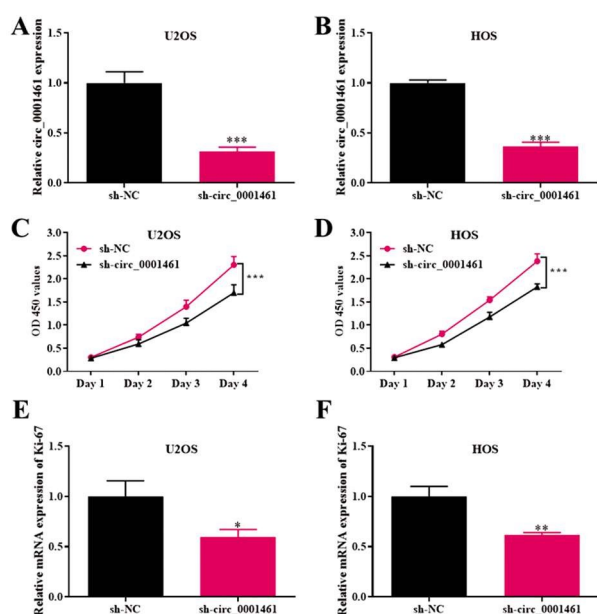


图2 低表达 circ_0001461 对骨肉瘤细胞增殖的影响

注: A 和 B. qRT-PCR 检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后 circ_0001461 的表达水平;C 和 D. CCK8 检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后细胞增殖情况;E 和 F. qRT-PCR 检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后增殖相关分子 Ki-67 mRNA 的表达水平。与对照组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

Fig.2 Effect of low expression of circ_0001461 on proliferation of osteosarcoma cells

Note: (A-B) The expression level of circ_0001461 after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection in U2OS and HOS cells was detected by qRT-PCR. (C-D) CCK8 were used to detect cell proliferation in U2OS and HOS cells after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection, respectively. (E-F) qRT-PCR was used to detect the expression level of Ki-67 mRNA after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection in U2OS and HOS cells. Note: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, compared with group control.

2.3 低表达 circ_0001461 对骨肉瘤细胞凋亡的影响

在 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后,采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western

Blot 检测凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平。结果显示 U2OS 和 HOS 细胞中转染 sh-circ_0001461 后,U2OS 和 HOS 细胞的凋亡率明显高于转染 sh-NC,差异均具有统计学意义(图 3A-D, $P<0.05$)。在 U2OS 和 HOS 细胞中转染 sh-circ_0001461 后,凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 的表达水平较转染 sh-NC 后明显升高,差异均具有统计学意义(图 3E 和 3F, $P<0.05$)。

2.4 在骨肉瘤细胞中 circ_0001461 靶向抑制 miR-30a-5p

circ_0001461 和 miR-30a-5p 的靶点结合情况,详见图 4A,双荧光素酶基因报告系统显示 WT-circ_0001461 细胞中转染 miR-30a-5p mimics 后,双荧光素酶活性明显下降,差异具有统计学意义(图 4B, $P<0.05$);MUT-circ_0001461 细胞中转染 miR-30a-5p mimics 后,双荧光素酶活性未见明显变化,差异无统计学意义(图 4B, $P>0.05$)。在 U2OS 和 HOS 细胞中转染 sh-circ_0001461 后,miR-30a-5p 的表达水平较转染 sh-NC 后明显升高,差异均具有统计学意义(图 4C, $P<0.05$)。miR-30a-5p 在骨肉瘤组织中的表达水平明显低于癌旁正常组织,差异具有统计学意义(图 4D, $P<0.05$),person 相关性分析显示 circ_0001461 和 miR-30a-5p 在骨肉瘤组织中的表达水平呈明显负相关(图 4E, $P<0.05$)。

2.5 circ_0001461 靶向调控 miR-30a-5p 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响

在 U2OS 细胞中转染 miR-30a-5p mimics 后 miR-30a-5p 的表达水平较转染 miR-NC 明显升高,差异具有统计学意义(图 5A, $P<0.05$),在 HOS 细胞中转染 miR-30a-5p inhibitors 后 miR-30a-5p 的表达水平较转染 miR-NC 明显降低,差异具有统计学意义(图 5B, $P<0.05$)。在 U2OS 细胞中共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p mimics 后,细胞增殖能力较单独转染 sh-circ_0001461 进一步下降(图 5C, $P<0.05$),细胞凋亡率较单独转染 sh-circ_0001461 进一步升高(图 5E, $P<0.05$)。在 HOS 细胞中共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p inhibitors 后,能够反转单独转染 sh-circ_0001461 对细胞增殖和凋亡的影响,与转染 sh-NC 后细胞的增殖能力和凋亡率未见明显差异(图 5D 和 5F, $P>0.05$)。

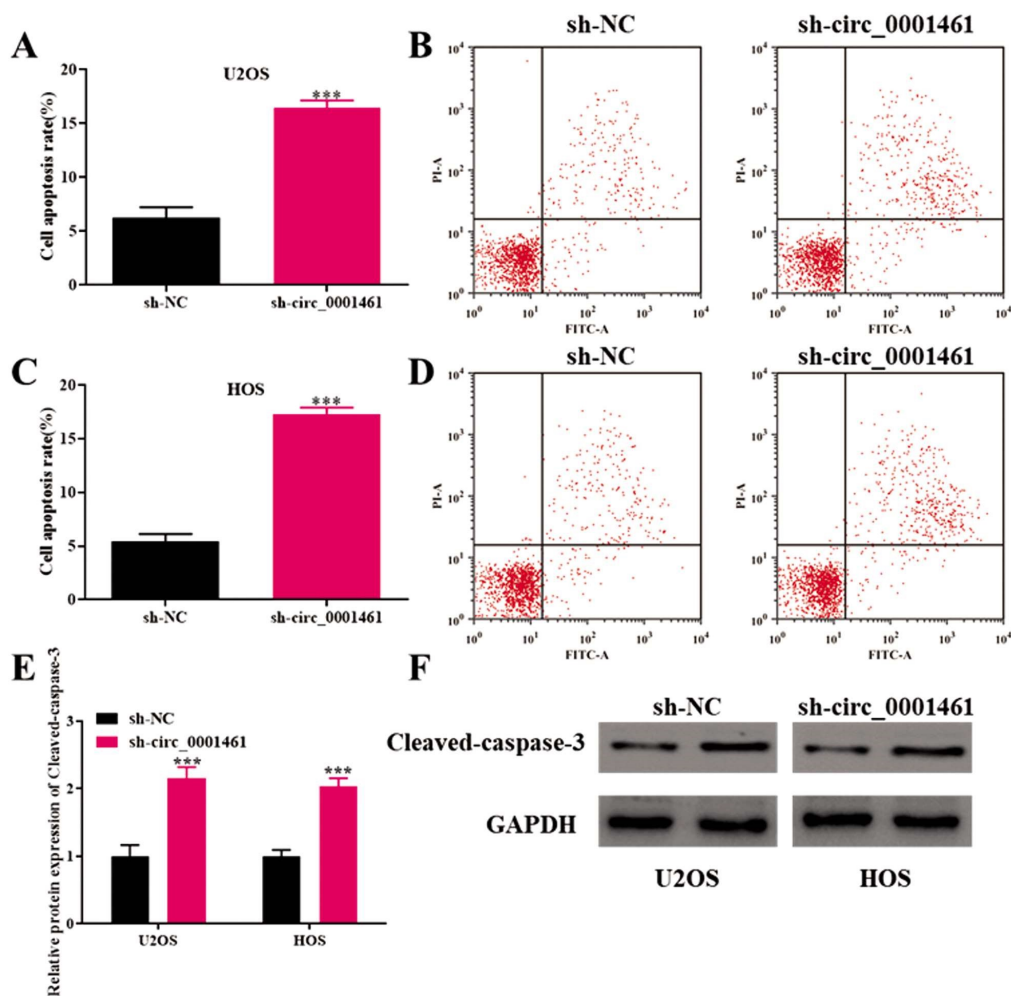


图3 低表达 circ_0001461 对骨肉瘤细胞凋亡的影响

注:A-D. 流式细胞术检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后细胞凋亡情况;E 和 F. Western Blot 检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平。与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

Fig.3 Effect of low expression of circ_0001461 on apoptosis of osteosarcoma cells

Note: (A-D) The apoptosis of U2OS and HOS cells after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection was detected by flow cytometry. (E-F) Western Blot were used to detect the expression levels of apoptotic Cleaved caspase-3 protein in U2OS and HOS cells after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection.

Note: *** $P<0.001$, compared with group control.

3 讨论

circRNA 是一种稳定和保守的非编码 RNA 类型,曾被视为生物过程的副产物。有证据表明 circRNA 与多种肿瘤的进展和转移有关,包括肝癌、脑癌、骨肉瘤、肺癌、膀胱癌和乳腺癌^[8-12]。研究显示在骨肉瘤中存在 132 个显著上调的 circRNA 和 127 个显著下调的 circRNA^[13,14]。Ma 等^[15] 研究显示 circUBAP2 在骨肉瘤中明显高表达,并能调控 miR-204-3p/HMGA2 轴参与骨肉瘤的进展。在本研究中 circ_0001461 在骨肉瘤组织和细胞中均明显高表达,同时在伴有转移的骨肉瘤患者中 circ_0001461 呈现更高的表达水平,提示 circ_0001461 在骨肉瘤中不仅高表达,还能参与骨肉瘤的进展。研究显示 circ_0001461 在肝癌、甲状腺癌和结直肠癌中均明显高表达,并与疾病的发生发展密切相关^[16-18]。然而,circ_0001461 在骨肉瘤中的作用和机制有待进一步研究。

本研究中,在 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461,结果显示低表达 circ_0001461 能够明显抑制

骨肉瘤细胞的增殖和增殖相关分子 Ki-67 的表达水平;促进骨肉瘤细胞的凋亡和凋亡相关分子 Cleaved-caspase-3 的表达。这提示低表达 circ_0001461 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖和促进细胞凋亡。然而也有研究显示 circ_0001461 在胃癌中低表达,并能调控 miR-548g/RUNX1 轴发挥抑癌作用^[19]。Liu 等^[17] 研究显示 circ_0001461 在甲状腺乳头状癌中高表达,并通过 miRNA-873/ZEB1 轴促进甲状腺乳头状癌的增殖、迁移和侵袭。这提示 circ_0001461 在不同肿瘤中可能发挥的作用不同,circRNA 能够发挥多种调控功能,其中最常见的是 miRNA 海绵吸附作用。在本研究通过生物学功能预测发现 circ_0001461 和 miR-30a-5p 存在结合靶点,进一步采用双荧光素酶报告基因证实 circ_0001461 能够靶向结合 miR-30a-5p。同时在低表达 circ_0001461 能够明显促进 miR-30a-5p 的表达水平,miR-30a-5p 在骨肉瘤组织中明显低表达,并与 circ_0001461 在骨肉瘤组织中的表达呈现明显负相关。这提示 circ_0001461 能够靶向结合 miR-30a-5p,抑制 miR-30a-5p 的表达,进而参与骨肉瘤的进展。研究显示 miR-30a-5p 能够靶向 FOXD1 抑制骨肉

瘤细胞的增殖和和迁移^[20]。miR-30a-5p 还能调控 FOXA1 的表达抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和迁移,以及促进骨肉瘤细胞的凋亡^[21]。

在进一步的回复实验中,在 U2OS 细胞共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p mimics 后,细胞增殖能力较单独转染 sh-circ_0001461 进一步下降,细胞凋亡率较单独转染 sh-circ_0001461 进一步升高;在 HOS 细胞中共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p inhibitors 后,能够反转单独转

染 sh-circ_0001461 对细胞增殖和凋亡的影响,这提示 circ_0001461 能够靶向抑制 miR-30a-5p 调控骨肉瘤细胞的增殖和凋亡。也有研究显示 circ_0001461 能够靶向抑制 miR-30a-5p 参与肝癌的进展^[16]。

综上所述,circ_0001461 在骨肉瘤组织和细胞中明显高表达,低表达 circ_0001461 能够靶向促进 miR-30a-5p 的表达进而抑制骨肉瘤细胞增殖和促进细胞凋亡。circ_0001461 可能成为骨肉瘤的治疗靶点。

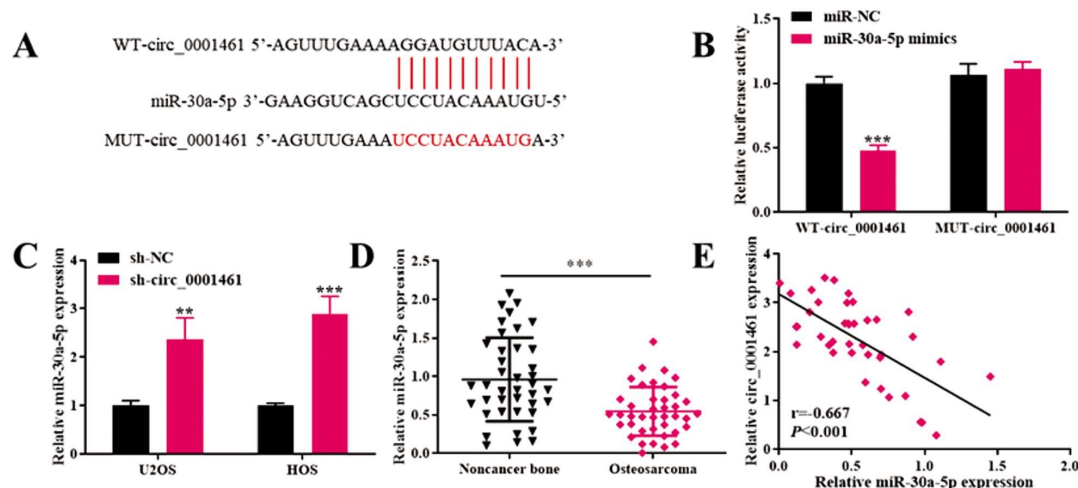


图4 circ_0001461 和 miR-30a-5p 结合情况

注:A. circ_0001461 和 miR-30a-5p 的靶点结合情况;B. 转染 miR-30a-5p mimics 后 WT-circ_0001461 和 MUT-circ_0001461 细胞双荧光素酶活性;C. qRT-PCR 检测 U2OS 和 HOS 细胞中分别转染 sh-NC 和 sh-circ_0001461 后 miR-30a-5p 的表达水平;D. qRT-PCR 检测 miR-30a-5p 在骨肉瘤组织和癌旁正常组织中的表达水平;E. person 相关性分析 circ_0001461 和 miR-30a-5p 在骨肉瘤组织中表达的相关性。

与对照组相比,** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

Fig.4 Binding of circ_0001461 and miR-30a-5p

Note: A. circ_0001461 and miR-30a-5p target binding; B. WT-circ_0001461 transfected with MiR-30a-5p mimics and MUT-circ_0001461 cells showed double luciferase activity. C. qRT-PCR was used to detect the expression level of miR-30a-5p in U2OS and HOS cells after sh-NC and sh-circ_0001461 transfection, respectively. D. qRT-PCR was used to detect the expression level of miR-30a-5p in osteosarcoma tissues and adjacent normal tissues.

E. Person correlation analysis of circ_0001461 and miR-30a-5p expression in osteosarcoma tissue.

Note: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, compared with group control.

参考文献(References)

- [1] Zhou Xiang, Wu Jun-long, Duan Chun-guang, et al. Retrospective Analysis of Adoptive TIL Therapy plus Anti-PD1 Therapy in Patients with Chemotherapy-Resistant Metastatic Osteosarcoma[J]. Journal of Immunology Research, 2020, 2020: 1-12
- [2] Papakonstantinou E, Stamatopoulos A, I Athanasiadis D, et al. Limb-salvage surgery offers better five-year survival rate than amputation in patients with limb osteosarcoma treated with neoadjuvant chemotherapy. A systematic review and meta-analysis [J]. Journal of Bone Oncology, 2020, 25: 100319
- [3] Birru B, Durthi C P, Pola M, et al. Stem Cells in Tumour Microenvironment Aid in Prolonged Survival Rate of Cancer Cells and Developed Drug Resistance: Major Challenge in Osteosarcoma Treatment [J]. Current Drug Metabolism, 2020, 21(1): 44-52
- [4] Chen Liang, Shan Ge. CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential[J]. Cancer Letters, 2021, 505
- [5] Li Zheng, Li Xing-ye, Xu De-rong, et al. An update on the roles of circular RNAs in osteosarcoma[J]. Cell Prolif, 2021, 54(1): e12936
- [6] Wu Xiang-kun, Ya Li-hua, Liu Yong-xi, et al. Circ_0000527 promotes osteosarcoma cell progression through modulating miR-646/ARL2 axis[J]. Aging, 2021, 13(4): 6091-6102
- [7] Gu Hui-jie, Cheng Xiang-yang, Xu Jun, et al. Circular RNA circFAT1 (e2) Promotes Osteosarcoma Progression and Metastasis by Sponging miR-181b and Regulating HK2 Expression [J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 1-7
- [8] Gan Hua, Lei Yu-he, Yuan Nai-jun, et al. Circular RNAs in depression: Biogenesis, function, expression, and therapeutic potential [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 137: 111244
- [9] Wang Man, Gu Bian-li, Yao Guo-liang, et al. Circular RNA Expression Profiles and the Pro-tumorigenic Function of CircRNA_10156 in Hepatitis B Virus-Related Liver Cancer [J]. Int J Med Sci, 2020, 17(10): 1351-1365
- [10] Wu Yi-zheng, Xie Zi-ang, Chen Jun-xin, et al. Circular RNA circTA-DA2A promotes osteosarcoma progression and metastasis by sponging miR-203a-3p and regulating CREB3 expression [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 73

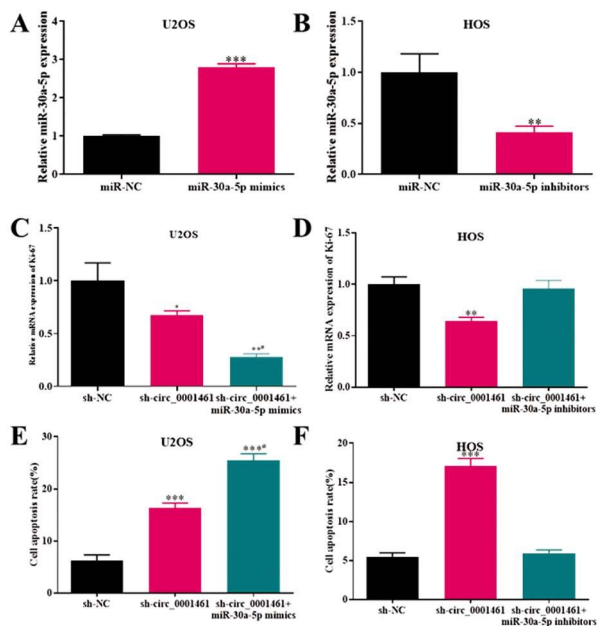


图5 circ_0001461 靶向调控 miR-30a-5p 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响

注:A. qRT-PCR 检测 U2OS 细胞中分别转染 miR-NC 和 miR-30a-5p mimics 后 miR-30a-5p 的表达水平;B. qRT-PCR 检测 HOS 细胞中分别转染 miR-NC 和 miR-30a-5p inhibitors 后 miR-30a-5p 的表达水平;C. qRT-PCR 检测 U2OS 细胞中分别转染 sh-NC、sh-circ_0001461 和共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p mimics 后增殖相关分子 Ki-67 mRNA 的表达水平;D. qRT-PCR 检测 HOS 细胞中分别转染 sh-NC、sh-circ_0001461 和共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p inhibitors 后增殖相关分子 Ki-67 mRNA 的表达水平;E. 流式细胞术检测 U2OS 细胞中分别转染 sh-NC、sh-circ_0001461 和共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p mimics 后细胞凋亡情况;F. 流式细胞术检测 HOS 细胞中分别转染 sh-NC、sh-circ_0001461 和共转染 sh-circ_0001461 和 miR-30a-5p inhibitors 后细胞凋亡情况。与对照组相比, ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

Fig.5 The effect of circ_0001461 targeting regulate miR-30a-5p on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells

Note:A. The expression level of miR-30a-5p after transfection of miR-NC and miR-30a-5p mimics in U2OS cells was detected by qRT-PCR; B. The expression level of miR-30a-5p after transfection of miR-NC and miR-30a-5p inhibitors in HOS cells was detected by qRT-PCR. C. qRT-PCR was used to detect the expression level of Ki-67 mRNA in U2OS cells after sh-NC, sh-circ_0001461 and sh-circ_0001461 and miR-30a-5p mimics were transfected, respectively. D. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of proliferation-related molecules Ki-67 after sh-NC, sh-circ_0001461 and sh-circ_0001461 and miR-30a-5p inhibitors were transfected respectively in HOS cells. E. Flow cytometry was used to detect apoptosis in U2OS cells after sh-NC, sh-circ_0001461 and sh-circ_0001461 and miR-30a-5p mimics were transfected respectively and co-transfected. F. Flow cytometry was used to detect apoptosis in HOS cells transfected with sh-NC, sh-circ_0001461, and co-transfected with sh-circ_0001461 and miR-30a-5p inhibitors.

Note: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, compared with group control.

- [11] Chen Li-jian, Nan A-ruo, Zhang Nan, et al. Circular RNA 100146 functions as an oncogene through direct binding to miR-361-3p and miR-615-5p in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2019,18 (1): 13
- [12] Dong Wei, Bi Jun-ming, Liu Hong-wei, et al. Circular RNA ACVR2A suppresses bladder cancer cells proliferation and metastasis through miR-626/EYA4 axis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 95
- [13] Zhang Yong, Li Jia-le, Wang Yin-sheng, et al. The Roles of Circular RNAs in Osteosarcoma[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 6378-6382
- [14] Xi Yi-zhe, Fowdur M, Liu Yun, et al. Differential expression and bioinformatics analysis of circRNA in osteosarcoma [J]. Bioscience Reports, 2019, 39(5)
- [15] Ma Wei-guo, Xue Ning, Zhan Jun-hua, et al. circUBAP2 regulates osteosarcoma progression via the miR-204-3p/HMGA2 axis[J]. International Journal of Oncology, 2021, 58(3): 298-311
- [16] Wei Hai-liang, Yan Shu-guang, Hu Yi, et al. CircFAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression via miR-30a-5p/REEP3 pathway [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2020, 24(24): 14561-14570
- [17] Liu Jia-zhe, Li Hong-chang, Wei Chuan-chao, et al. circFAT1 (c2) Promotes Papillary Thyroid Cancer Proliferation, Migration, and Invasion via the miRNA-873/ZEB1 Axis [J]. Comput Math Methods Med, 2020, 2020: 1459368
- [18] Hu Bang, Xian Zhen-yu, Zou Qi, et al. CircFAT1 Suppresses Colorectal Cancer Development Through Regulating miR-520b / UHRF1 Axis or miR-302c-3p / UHRF1 Axis [J]. Cancer biotherapy & radio-pharmaceuticals, 2021, 36(1): 45-57
- [19] Fang Jian, Hong Han, Xue Xiao-feng, et al. A novel circular RNA, circFAT1 (c2), inhibits gastric cancer progression by targeting miR-548g in the cytoplasm and interacting with YBX1 in the nucleus [J]. Cancer Letters, 2018, 442: 222-232
- [20] Tao Jun, Cong Hai-bo, Wang Hong-yan, et al. MiR-30a-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation and migration by targeting FOXD1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 503 (2): 1092-1097
- [21] Dai Jiang-hua, Huang Wen-zhou, Li Chen, et al. Silencing of long noncoding RNA SBF2-AS1 inhibits proliferation, migration and invasion and contributes to apoptosis in osteosarcoma cells by upregulating microRNA-30a to suppress FOXA1 expression [J]. Cell Cycle, 2019, 18(20): 2727-2741