

· 基础研究 ·

circ_0001246 调节 miRNA30a 对骨肉瘤化疗敏感性影响的机制研究

王娟¹, 吴涛², 何斌², 王伯尧², 魏新程², 范磊^{2*}¹南京医科大学第二附属医院超声科, ²骨科, 江苏 南京 210011

[摘要] 目的:探讨 circ_0001246 调节 miRNA30a 及影响骨肉瘤化疗敏感性的机制。方法:将骨肉瘤细胞随机分为3组,分别置于6孔板中,包括未转染组(空白组)、siRNA 阴性对照转染组(NC组)和 siRNA 转染组(circ_0001246 siRNA 转染组),转染后荧光倒置显微镜观察转染效率,检测各组细胞 circ_0001246、miRNA30a 的表达,用流式细胞 AnnexinV/7AAD 双染法检测各组细胞对化疗药物依托泊苷(etoposide -VP16)的敏感性,荧光素酶报告基因实验验证 circ_0001246 对 miRNA30a 的“吸附”作用。结果:circ_0001246 siRNA 转染组的细胞 miRNA30a 表达较 NC 组和空白组明显上调($P < 0.05$),骨肉瘤中 circ_0001246 和 miRNA30a 的表达呈现负反馈。circ_0001246 siRNA 转染组细胞凋亡率较 NC 组和空白组明显升高($P < 0.05$)。circ_0001246 可以通过直接碱基配对对吸附 miRNA30a 发挥调控作用。结论:circ_0001246 是骨肉瘤相关癌基因,靶向抑制骨肉瘤中 circ_0001246 表达可以增强肿瘤细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性,该作用可能是通过 circ_0001246 的吸附功能负调控 miRNA30a 表达而实现的。

[关键词] circ_0001246; miRNA30a; 化疗; 依托泊苷; 骨肉瘤**[中图分类号]** R738.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)02-198-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210208

The mechanism of effect of circ_0001246 on osteosarcoma chemotherapy sensitivity by regulating miRNA31a

WANG Juan¹, WU Tao², HE Bin², WANG Boyao², WEI Xincheng², FAN Lei^{2*}¹Department of Ultrasonic Diagnosis, ²Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the molecular mechanism of osteosarcoma chemotherapy sensitivity regulation of circ_0001246 via targeting miRNA30a. **Methods:** The MG63 and U2OS cells were randomly allocated into three groups in 6-well plates respectively, including non-transfection group (blank group), siRNA negative control transfection group (NC group), and siRNA transfection group (circ_0001246 siRNA). The transfection efficiencies were evaluated by fluorescence inverted microscope. Expression level of circ_0001246 and miRNA30a were detected. Osteosarcoma chemotherapy sensitivity were detected by annexin V-FITC/7AAD apoptosis double staining. Function of circ_0001246 to adsorb miRNA30a were verified by luciferase reporter gene assay. **Results:** MiRNA30a expression in the circ_0001246 siRNA transfection group were significantly up-regulated compared to the NC group and blank group ($P < 0.05$). We found circ_0001246 and miRNA30a were inversely expressed. Osteosarcoma chemotherapy sensitivity in the circ_0001246 siRNA transfection group were significantly up-regulated compared to the NC group and blank group ($P < 0.05$). circ_0001246 could adsorb miRNA30a by direct base pairs. **Conclusion:** Circ_0001246 is an osteosarcoma related oncogene. Targeted inhibition of circ_0001246 expression in osteosarcoma can enhance the chemotherapy sensitivity of tumor cells to etoposide-VP16. One of the mechanisms is the negative regulation of the miRNA30a expression by the adsorption function of circ_0001246.

[Key words] circ_0001246; miRNA30a; chemotherapy; etoposide; osteosarcoma

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(02):198-202]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20171092)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fanlei8839@126.com

骨肉瘤是原发性骨肿瘤中发病率最高的恶性肿瘤,其恶性程度甚高,预后极差,具有易侵袭转移、易耐药等生物学特性,即使采用手术联合化疗的治疗方案,患者5年生存率也仅为50%~60%,随着基因治疗等生物治疗技术的发展,骨肉瘤综合治疗有了新进展。而进一步提高骨肉瘤化疗的敏感性、探究骨肉瘤的分子调控机制并制定新的靶向治疗策略是骨肉瘤诊治的关键^[1-2]。环状RNA(circRNA)最早在RNA病毒中被发现,已经证实在哺乳动物的细胞质中大量存在,具有特异性强、结构稳定、表达丰度高等特点,可以参与转录和转录后基因的表达调控,在多种疾病和病理生理过程中具有重要的调控作用^[3-4]。目前研究表明,circRNA可作为竞争性内源RNA(ceRNA)发挥基因表达调控作用,即circRNA拥有miRNA应答元件(miRNA response element, MRE),可结合miRNA阻断后者对靶RNA的抑制作用,从而调控miRNA靶基因的表达水平,在胞浆内发挥了miRNA“海绵”功能,与很多种肿瘤的发生发展以及治疗有着密切关系^[5-6]。本团队一直致力于研究circRNA对于骨肉瘤的影响,发现circ_0001246在骨肉瘤的发生发展中发挥了重要作用,已通过实验证实circ_0001246在骨肉瘤组织和细胞中的表达上调,起到癌基因的作用^[7-8],然而其对骨肉瘤化疗的影响及具体机制还未有相关文献报道。本研究通过体外实验探讨了circ_0001246调节miRNA30a、影响骨肉瘤化疗敏感性的相关分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞株MG63和U2OS由华中科技大学同济医院骨科实验室提供。正常成骨细胞株OB3购于武汉细胞模式培养中心。MG63和U2OS细胞系在RPMI 1640培养基中培养(南京KeyGEN公司),并加入10%胎牛血清(Gibco公司,美国)。在37℃、5%CO₂条件下培养。

TaqMan miRNA分离试剂盒、TaqMan miRNA逆转录试剂盒、TaqMan miRNA分析试剂盒和TaqMan通用PCR master mix (Applied Biosystems公司,美国);miRNA30a模拟物、阴性对照(NC)和FAM标记的NC(上海Gima公司);circ_0001246 siRNA、siRNA阴性对照(NC)和FAM标记的siRNA NC(南京KeyGEN公司);荧光原位杂交试剂盒(广州RiboBio公司);pMIR-Report载体(Ambion公司,美国);限制性内切酶Spe I和Hind III(大连TaKaRa公司)。Dual-

Glo荧光素酶检测试剂盒(Promega公司,美国);脂质体3000和TRIzol(Invitrogen公司,美国);MTT试剂盒(Sigma公司,美国);Annexin V-FITC/7AAD凋亡双染色试剂盒(南京KeyGEN公司)。依托泊苷(etoposide-VP16)由南京医科大学第二附属医院药剂科提供。

1.2 方法

1.2.1 转染

细胞转染使用脂质体3000,按照试剂盒说明将MG63和U2OS细胞随机分为3组,分别置于6孔板中,包括未转染组(空白组)、siRNA阴性对照转染组(NC组)和siRNA转染组(circ_0001246 siRNA)。转染后通过FAM荧光标记水平评价转染效率。

1.2.2 转染后检测各组细胞circ_0001246、miRNA30a的表达

转染后48 h采用实时荧光定量qRT-PCR检测3组细胞circ_0001246、miRNA30a的表达。按TaqMan miRNA分离试剂盒说明书提取细胞总RNA,用分光光度计定量检测。RNA样品用逆转录反应合成cDNA后,用TaqMan miRNA分析试剂盒检测RNA含量。特异性引物序列:circ_0001246正向引物5'-TCTCATCTCATTCGCTCTGATTGGA-3',反向引物5'-ATCTTCATTCCGTGAGGCAATGTT-3';miRNA30a正向引物5'-TACAGTACTGTGATAACTGAA-3',反向引物5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';内参U6正向引物5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',反向引物5'-AACGCCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应条件为95℃ 10 min预变性;95℃ 15 s,60℃ 60 s,70℃ 1 s,40个循环。反应结束后得到各个标本和内参U6的基本循环数(C_t值),根据公式计算目的基因相对含量。

1.2.3 转染后检测各组细胞对依托泊苷的敏感性

转染后将骨肉瘤细胞MG63加到24孔板上,分为3组,加入100 μmol/L的依托泊苷,用流式细胞AnnexinV/7AAD双染法检测不同时间(6、12、24 h)肿瘤细胞凋亡情况。

1.2.4 荧光素酶报告基因实验验证circ_0001246的作用

构建荧光素酶报告基因,将circ_0001246的线性序列携带1个预测miRNA30a结合位点导入psiCHECK质粒。合成目的序列为5'-TCTTCAATGATTTTGTTTACA-3',用引物进行PCR扩增,经Spe I和Hind III酶切后连接到psiCHECK质粒。利用两步PCR法将突变的片段导入预测的miRNA30a结合位点,通过测序确定克隆产物的DNA序列。MG63

细胞与含有预测片段的 psiCHECK 质粒和 miRNA30a 模拟物或阴性对照共转染。转染 48 h 后使用双 Glo 荧光素酶测定系统测定荧光素酶活性。至少等待 10 min~2 h, 然后测量海肾萤光。海肾萤光的平板测量顺序应该与萤火虫萤光相同。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 13.0 进行数据分析。所有结果均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(ANOVA)、Dunnett-*t* 检验和 Student-*t* 检验比较各组实验数据的统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜下观察转染效率

倒置荧光显微镜下观察荧光信号,选择最佳的转染时间和条件,荧光标记对照组转染效率均在 60% 以上(图 1A)。

2.2 转染后各组细胞 circ_0001246 和 miRNA30a 的表达

circ_0001246 siRNA 转染组中 circ_0001246 表达明显低于 NC 组和空白组($P < 0.05$)。转染 circ_0001246 siRNA 组的 miRNA30a 表达较 NC 组和空白组明显上调($P < 0.05$, 图 1B)。发现 circ_0001246 和 miRNA30a 的表达呈现负反馈。这一结果提示 circ_0001246 在骨肉瘤细胞中可能对 miRNA30a 发挥了 miRNA“吸附”作用。

2.3 转染后各组细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性检测

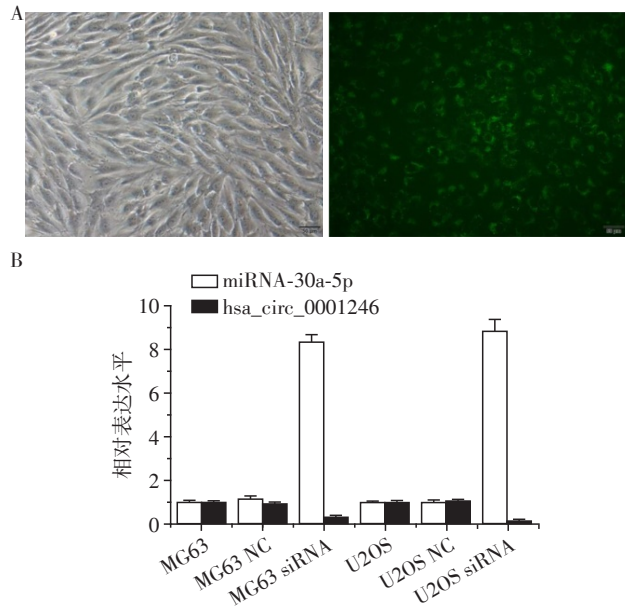
作用 6 h, 3 组细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$); 作用 12 h, circ_0001246 siRNA 转染组细胞凋亡率较 NC 组和空白组明显升高($P < 0.05$); 作用 24 h, circ_0001246 siRNA 转染组细胞凋亡率较 NC 组和空白组明显升高($P < 0.05$)。转染 circ_0001246 siRNA 后肿瘤细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性明显增高(图 2)。

2.4 荧光素酶报告基因实验

将 psiCHECK 载体和 miRNA30a 模拟物或阴性对照共转染 MG63 细胞, miRNA30a 过表达细胞与对照组相比, 荧光素酶活性显著下降($P < 0.05$, 图 3)。这些数据表明, circ_0001246 可以通过直接碱基对吸附 miRNA30a。

3 讨论

骨肉瘤起源于骨间叶细胞, 多见于长骨, 也可



A: 荧光显微镜下观察转染效率均在 60% 以上($\times 100$); B: 转染后 circ_0001246 表达下调, miRNA30a 表达上调, 两者呈负相关。

图 1 转染后骨肉瘤细胞 (MG63、U2OS) circ_0001246, miRNA30a 的表达

Figure 1 Expression of circ_0001246 and miRNA30a in osteosarcoma cells (MG63, U2OS) after transfection

见于股骨远端或胫骨近端, 是一种原发性的恶性骨肿瘤。骨肉瘤恶性程度高, 往往在术前就有了微小转移灶, 加上容易局部复发, 患者预后很差^[9]。虽然如今化疗技术进步, 但即使采用手术联合化疗的治疗方案, 患者 5 年生存率也不令人满意^[10-11]。骨肉瘤导致患者死亡的原因主要是病变转移迅速和对化疗的抵抗, 一旦出现肺转移, 正常情况下辅助化疗对其作用不大^[12]。随着基因治疗等生物治疗技术的发展, 骨肉瘤的综合治疗有了新的进展, 而怎样通过基因技术提高骨肉瘤化疗的敏感性也成为骨肉瘤治疗的关键。

随着生物信息学和分子生物学技术的革新, 证实了哺乳动物细胞中广泛存在着一种具有调控基因表达作用的内源性 circRNA^[13]。circRNA 主要来源于 pre-mRNA 的可变剪切, 由套索驱动的环化或内含子配对驱动的环化产生, 分为外显子、内含子、外显子与内含子混合等 3 类来源, 之前被认为是一类错误剪接而形成的低丰度 RNA 分子, 其表达水平和功能在之前受到了忽略。最新的研究表明一些 circRNA 可以 ceRNA 的角色发挥基因表达调控作用, 这些 circRNA 拥有 MRE, 可以作为结合 miRNA 的天然“海绵”来阻断后者对靶 RNA 的抑制作用,

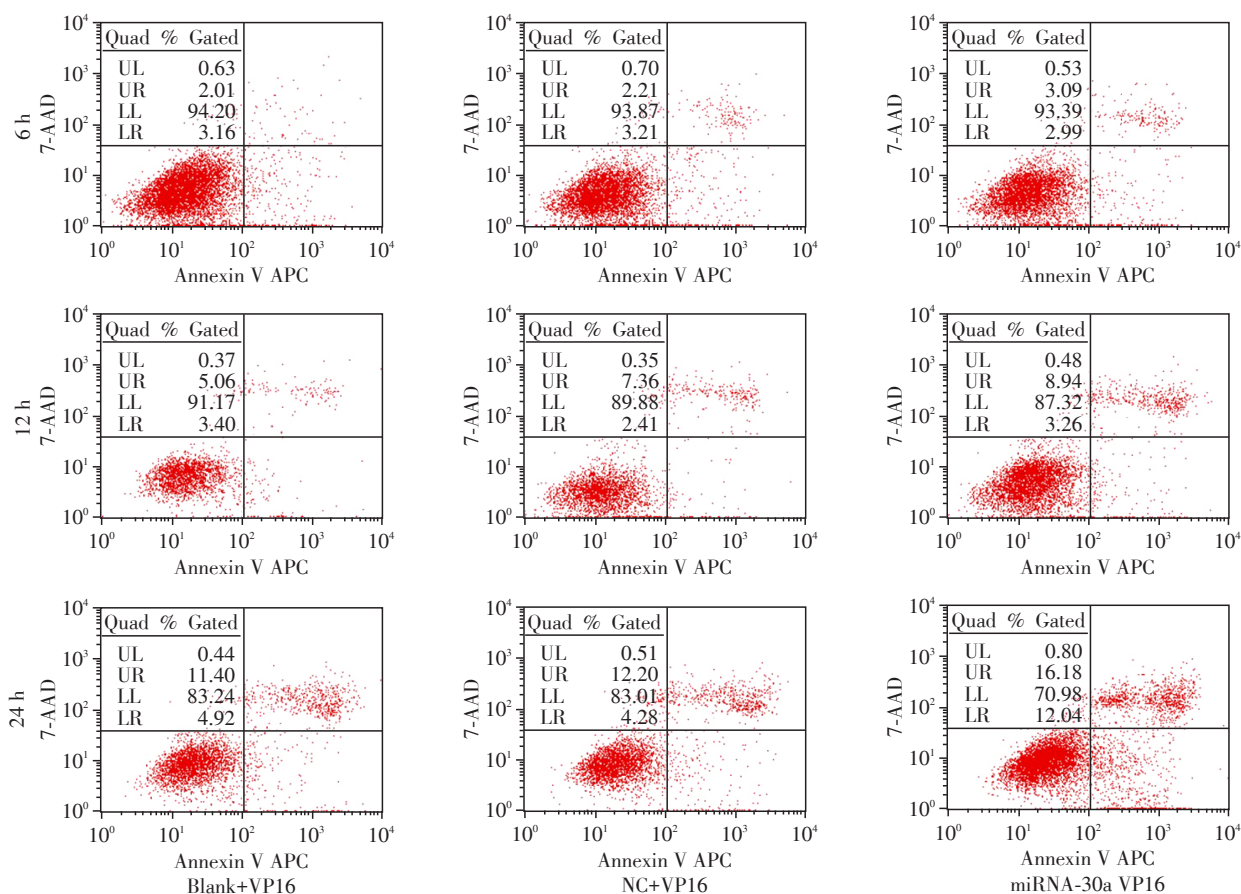
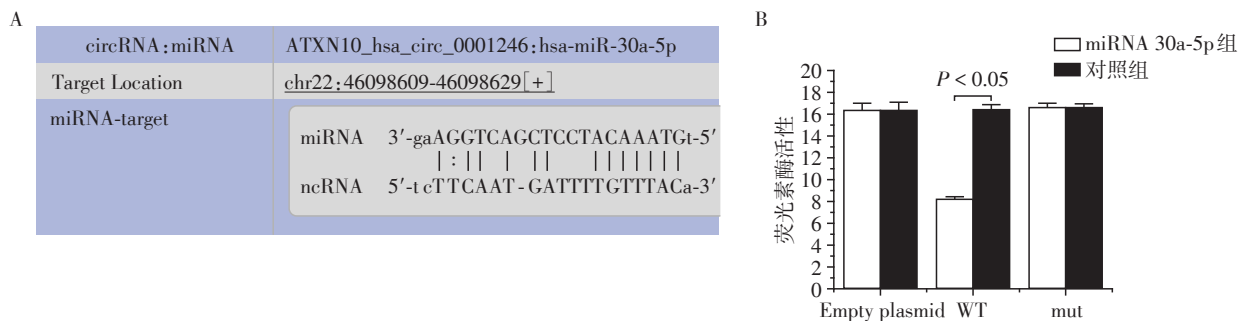


图2 转染 circ_0001246 siRNA 后 12 h、24 h 骨肉瘤细胞(MG63)对化疗药物依托泊苷的敏感性明显增高

Figure 2 The sensitivity of osteosarcoma cell(MG63) to the chemotherapy drug etoposide was significantly increased at 12 h and 24 h after transfected with circ_0001246-siRNA



A: 携带预测 miRNA30a 结合位点的 circ_0001246 的线性序列; B: 共转染骨肉瘤细胞(MG63)后观察 miRNA30a 过表达的细胞与对照组相比, 荧光素酶活性显著下降。

图3 Circ_0001246 可以通过直接碱基配对吸附 miRNA30a

Figure 3 Circ_0001246 can adsorb miRNA30a by direct base pairing

从而调控 miRNA 靶基因的表达水平,与很多疾病的发生发展密切相关^[14-15]。有相关文献报道, circRNA 还可以调控选择性拼接和基因转录、作为生物标志物发挥调控作用^[16]。根据基因预测数据库^[17-18], 我们筛选了与骨肉瘤细胞和组织相关的 circRNA, 发现在基因 ATXN10 转录编码区过程中产生的 hsa_circ_0001246 表达明显上调, 而在骨肉瘤中 miRNA30a 表达下调。这一发现证明了 circ_

0001246 是一种促肿瘤基因, 并且我们验证了 circ_0001246 可以促进骨肉瘤的增殖转移, 参与了骨肉瘤的发生发展^[8]。

本研究中, 通过 siRNA 抑制 circ_0001246 在骨肉瘤细胞中的表达, 检测 circ_0001246 和 miRNA30a 在骨肉瘤细胞中的表达, 发现 miRNA30a 的表达与 circ_0001246 呈显著负相关, 这一结果表明 circ_0001246 在骨肉瘤中的作用可能是通过 miRNA30a

实现的。进一步检测转染后各组细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性,作用6 h,3组细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$);作用12 h,circ_0001246 siRNA转染组细胞凋亡率较NC组和空白组明显升高($P < 0.05$);作用24 h,circ_0001246 siRNA转染组细胞凋亡率较NC组和空白组明显升高($P < 0.05$)。转染circ_0001246 siRNA后肿瘤细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性明显增高。和本课题组之前circ_0001246可以促进骨肉瘤增殖转移的结果相吻合。基于以上结果和相关文献报道的数据可以有把握地预测,circ_0001246可以通过吸附miRNA30a分子从而调节骨肉瘤的发生发展。为了进一步探讨circ_0001246调节骨肉瘤细胞生物学行为的分子机制,进行了荧光素酶报告基因实验。将psiCHECK载体和miRNA30a模拟物或阴性对照共转染后,观察到miRNA30a过表达组细胞与对照组相比,荧光素酶活性显著下降($P < 0.05$)。这些数据表明,circ_0001246可以通过直接碱基对结合miRNA30a抑制其功能,这一结果与之前国外报道的circRNA的作用机制一致^[19-20]。

综上所述,circ_0001246是骨肉瘤相关癌基因,靶向抑制骨肉瘤中circ_0001246表达可以增强肿瘤细胞对化疗药物依托泊苷的敏感性。其机制之一是通过circ_0001246的吸附功能负调控miRNA30a的表达而实现的。在此基础上,提出circ_0001246可能是一种骨肉瘤基因治疗靶点,具有较高的临床和科研价值。

[参考文献]

- [1] FAISHAM W I, MAT SAAD A Z, ALSAIGH L N, et al. Prognostic factors and survival rate of osteosarcoma: a single-institution study[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2017, 13(2): e104-e110
- [2] YUAN T Z, WANG J, WEI X C, et al. MicroRNA-30a inhibits proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by modulating autophagy[J]. *J Biobased Materials Bioenergy*, 2016, 10(4): 265-271
- [3] HARPER K L, MCDONNELL E, WHITEHOUSE A. Circrnas: from anonymity to novel regulators of gene expression in cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(6): 1183-1193
- [4] PAMUDURTI N R, BARTOK O, JENS M, et al. Translation of circRNAs[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 9-21
- [5] LI Z, CHEN Z, HU G, et al. Roles of circular RNA in breast cancer: present and future[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 3945-3954
- [6] SONG T, XU A, ZHANG Z, et al. CircRNA hsa_circRNA_101996 increases cervical cancer proliferation and invasion through activating TPX2 expression by restraining miR-8075[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 14296-14305
- [7] 羊俊亦, 范磊. 环状RNA在骨肉瘤中的研究进展[J]. *检验医学和临床*, 2019, 16(11): 1597-1599
- [8] CHEN Q, WANG J, FAN L, et al. The molecular mechanism of autophagy regulation of osteosarcoma specific CircRNAs via targeting miRNA30a[J]. *Nanosci Nanotechnol Lett*, 2019, 11(3): 375-383
- [9] 胡华, 周忠. miRNA1247对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 200-204
- [10] 范磊, 邵增务. 小分子干扰RNA基因沉默与骨肉瘤治疗[J]. *国际骨科学杂志*, 2011, 32(1): 30-32
- [11] 范磊, 袁同洲, 陈琦, 等. miRNA145抑制骨肉瘤生长以及血管形成的动物实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(2): 160-163
- [12] 童晨曦, 宋银宏. 嵌合抗原受体基因修饰的T细胞免疫治疗骨肉瘤的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(7): 1012-1015
- [13] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338
- [14] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388
- [15] JIANG X, WU X, CHEN F, et al. The profiles and networks of miRNA, lncRNA, mRNA, and circRNA in benzo(a)pyrene-transformed bronchial epithelial cells[J]. *J Toxicol Sci*, 2018, 43(4): 281-289
- [16] CHEN Y G, CHEN R, AHMAD S, et al. N6-methyladenosine modification controls circular RNA immunity[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(1): 96-109
- [17] CHEN X, HAN P, ZHOU T, et al. circRNADb: a comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34985
- [18] GHOSAL S, DAS S, SEN R, et al. Circ2 traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits[J]. *Front Genet*, 2013, 4: 283
- [19] WANG X B, LI P B, GUO S F, et al. circRNA_0006393 promotes osteogenesis in glucocorticoid induced osteoporosis by sponging miR 1455p and upregulating FOXO1[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2851-2858
- [20] ZHU X, SHAO P, TANG Y, et al. hsa_circRNA_100533 regulates GNAS by sponging hsa_miR_933 to prevent oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 19159-19171

[收稿日期] 2020-04-30