doi:10.11659/jjssx.04E022087

·基础研究·

circ ANKIB1 通过 miR-217/DKK1 轴调控骨肉瘤恶性生物学行为的机制研究

刘汉涛,赵良虎,秦宏敏 (攀枝花学院附属医院骨科,四川 攀枝花 617000)

[摘 要] **目的** 探讨 circ ANKIB1 在骨肉瘤中的确切作用和调控机制。**方法** 采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测骨肉瘤组织中 circ ANKIB1、miR-217 和 DKK1 的表达水平。将质粒 si-circ ANKIB1、pcDNA-circ ANKIB1、miR-217 inhibitor、miR-217 mimics、si-DKK1 转染至骨肉瘤细胞,分别上调或下调 circ ANKIB1、miR-217 和 DKK1 的表达,集落形成实验检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡率,细胞划痕愈合实验检测细胞迁移能力。Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白水平。通过 miRanda 或 TargetScan 预测 miR-217 与 circ ANKIB1 或 DKK1 之间的靶向关系,并通过双荧光素酶报告基因检测证实。**结果** 在骨肉瘤组织中,circ ANKIB1 和 DKK1 高表达,而 miR-217 低表达。敲低 circ ANKIB1 通过诱导细胞凋亡抑制细胞增殖、迁移和上皮间质转化,从而抑制骨肉瘤的进展。miR-217 是 circ ANKIB1 的直接靶点,其抑制逆转了 circ ANKIB1 敲低对骨肉瘤细胞进展的抑制作用,且敲低 miR-217 促进了骨肉瘤细胞增殖、迁移和上皮间质转化。DKK1 是 miR-217 的直接靶点,在骨肉瘤细胞中发挥促癌作用。此外,circ ANKIB1 通过海绵吸收 miR-217 正向调控 DKK1 的表达。**结论** circ ANKIB1 的下调通过miR-217/DKK1 轴抑制骨肉瘤的进展。

[关键词] circ ANKIB1;miR-217;DKK1;骨肉瘤;增殖;凋亡

[中图分类号] R738.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-21

Mechanism of circ ANKIB1 regulating malignant biological behavior of osteosarcoma through miR-217/DKK1 axis

LIU Han-tao, ZHAO Liang-hu, QIN Hong-min (Department of Orthopedic, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua Sichuan 617000, China)

Abstract: Objective To investigate the exact role and regulatory mechanism of circ ANKIB1 in osteosarcoma. **Methods** The expression levels of circ ANKIB1, miR-217 and DKK1 in osteosarcoma tissues were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The plasmids si-circ ANKIB1, pcDNA-circ ANKIB1, miR-217 inhibitor, miR-217 mimics, and si-DKK1 were transfected into osteosarcoma cells to up-regulate or down-regulate the expression of circ ANKIB1, miR-217 and DKK1. The cell proliferation ability was detected by colony formation method, the cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the cell migration ability was detected by cell scratch wound healing assay. The levels of E-cadherin and N-cadherin proteins were detected by Western blot. The targeting relationships between miR-217 and circ ANKIB1 or DKK1 were predicted by miRanda or TargetScan, and were confirmed by dual luciferase reporter gene system. **Results** In osteosarcoma tissues, circ ANKIB1 and DKK1 were overexpressed, while miR-217 was underexpressed. Knockdown of circ ANKIB1 inhibited the progression of osteosarcoma by inducing apoptosis and reducing cell proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition. miR-217 was the direct target of circ ANKIB1, and its inhibition reversed the inhibitory effect of circ ANKIB1 knockdown on the progress of osteosarcoma cells, and knockdown of miR-217 promoted proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells. DKK1 was the direct target of miR-217 that played a cancer promoting role in osteosarcoma cells. In addition, circ ANKIB1 positively regulated DKK1 expression by sponge absorption of miR-217. **Conclusion** Down-regulation of circ ANKIB1 inhibited the progression of osteosarcoma through miR-217/DKK1 axis.

Keywords: circ ANKIB1; miR-217; DKK1; osteosarcoma; proliferation; apoptosis

骨肉瘤是最常见的原发性骨肿瘤之一,主要发生于青少年人群。高度恶性和极强的转移能力是这类肿瘤的重要特征[1]。骨肉瘤患者常发生肺转移,而且很多患者在 1 年内便出现肺症状,如结节、气喘、憋气、呼吸困难以及胸腔积液等。对于晚期骨肉瘤患者,尽管采用手术、化疗、放疗的联合治疗有一定效果,但其 5 年生存率仍不理想[2]。明确骨肉瘤发生发展的潜在分子机制,可为其早期诊断和改善患者预后提供帮助。环状 RNAs(circRNAs)是一类具有共价闭合连续环状结构的内源性非编码 RNA,通常由反向剪接蛋白编码基因的外显子生成,在多种生物中异常表达,并通过竞争性内源性 RNAs(ceRNAs)来调控靶基因表达,在多种生物学过程中发挥重要作用[3-5]。有研究表明,circRNAs 在骨肉瘤、乳腺癌和肺癌等多种人类疾病中表达出现失调[6]。circRNAs 可能参与骨肉瘤的发生发展。Jin 等[7]发现 circRNA_100876 下调通过靶向 microRNA-136 抑制骨肉瘤细胞的增殖;Gao 等[8]报道 circRNA circ_0001721 通过 miR-372-3p/MAPK7 轴促进骨肉瘤的进展;Lei 等[9]研究表明,circRNA hsa_circ_

[基金项目] 四川省卫生健康委员会科研课题(19PJ496)

[通信作者] 赵良虎,E-mail:1157336748@qq.com

0003074是骨肉瘤患者可靠的诊断和预后标志物。circRNA锚蛋白重复和IBR结构域蛋白1(ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1, ANKIB1)是ANKIB1 mRNA间接的产物。有研究表明,circ ANKIB1通过调控miR-19b/SOCS3/STAT3轴促进骨肉瘤细胞增殖和侵袭[10]。此外,还有研究发现,circular RNA ANKIB1通过结合microRNA-26b-5p和调控zeste同源物2增强剂加速骨肉瘤的化疗耐药[11]。circular RNA circ ANKIB1通过调控miR-217/PAX3轴促进骨肉瘤的进展[12]。circ ANKIB1与骨肉瘤的发展密切相关,但其在骨肉瘤中的确切作用和调控机制尚未完全阐明。因此,本文拟探讨circ ANKIB1在骨肉瘤增殖、迁移和上皮间质转化中的具体作用机制。近年来,有研究发现miR-217广泛参与非小细胞肺癌、结直肠癌、卵巢癌等肿瘤的恶性发展[13]。还有研究报道,HOTAIR通过海绵吸收miR-217促进骨肉瘤的发展[14]。miR-217通过靶向SETD8促进骨肉瘤细胞增殖[15]。以上研究均表明,miR-217与骨肉瘤的发展息息相关。在骨肉瘤U2OS和HOS细胞中,circ ANKIB1与miR-217具有明显的靶向作用,但在MG63细胞中二者是否具有相同的靶向关系尚不明确,且miR-217的下游作用靶点也尚不清楚。因此,本研究以miR-217/DKK1轴为靶点,探讨circ ANKIB1对骨肉瘤MG63细胞的影响,以揭示骨肉瘤恶性发展的可能机制。

1 材料与方法

1.1 样本、试剂及仪器

收集于我院2019年10月至2021年10月行手术切除的50例骨肉瘤患者的肿瘤组织标本和相邻正常骨组织标本(经病理形态学检验),于-80 ℃保存,标本收集经患者知情同意。患者术前未接受过任何治疗。本研究已获得我院医学伦理委员会批准(20190822095)。DMEM培养基(美国Gibco公司,批号:12100046),E-cadherin(批号:ab40772)、N-cadherin(批号:ab18203)抗体(英国Abcam);TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase(日本TaKaRa,批号:RR370A);双荧光素酶活性检测试剂盒(上海碧云天,批号:RG027);细胞恒温培养箱(赛默飞,批号:51033770);荧光定量PCR仪(赛默飞,批号:4347824)。

1.2 细胞培养和转染

骨肉瘤细胞系MG63及其正常成骨NHOst细胞购自中国科学院上海细胞库。将这些细胞置于含10%胎牛血清(美国Invitrogen)的Dulbecco's改良培养基,并在37 ℃、5% CO_2孵育箱中培养。circ ANKIB1下调质粒(si-circ ANKIB1)、circ ANKIB1过表达质粒(pcDNA-circ ANKIB1)、miR-217模拟物(miR-217 mimics)、miR-217抑制剂(miR-217 inhibitor)、DKK1下调质粒(si-DKK1)及其阴性对照[si-NC、pcDNA-3.1(+)、mimics-NC、inhibitor-NC]均购自上海Genechem,将MG63细胞接种至12孔板中,采用Lipofectamine 3000 Reagent(美国Invitrogen)进行瞬时转染。si-circ ANKIB1和pcDNA-circ ANKIB1分别转染细胞后实现circ ANKIB1的下调和过表达,miR-217 mimics和miR-217 inhibitor分别转染细胞后实现miR-217的过表达和低表达,si-DKK1转染细胞后实现DKK1的低表达,收集转染细胞的RNA进行实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR),检测过表达及下调效果。

1.3 qRT-PCR检测相关基因的表达

用TRIzol试剂提取组织标本和细胞系总RNA,使用Primescript RT试剂逆转录成cDNA,用于分析circ ANKIB1和DKK1,或使用microRNA第一链cDNA合成试剂盒检测miR-217。然后使用SYBR Green PCR Kit(日本TaKaRa)在CFX96 Touch Real-Time PCR检测系统(美国Bio-Rad)上进行qRT-PCR,定量PCR引物均由上海生工生物工程有限公司合成,反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,40个循环,引物序列见表1。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法检测circ ANKIB1、DKK1和miR-217的表达水平,并将其归一化为β-actin(circ ANKIB1和DKK1的内参基因)或U6(miR-217的内参基因),所有实验重复3次。

表1 引物序列

基因		引物序列
circ ANKIB1	F	5'-GGACACCTCTTCTGCTGACT-3'
	R	5'-GAACACCT GATCGTTGGCAG-3'
miR-217	F	5'-TACTCAACTCACTACTGCATCAGGA-3'
	R	5'-TATGGTTGTTCTGCTCTCTGTGTC-3'
DKK1	F	5'-TCACGCTATGTGCTGCCCCG-3'
	R	5'-TGAGGCACAGTCTGATGACCGGA-3'
β-actin	F	5'-GACCTCTATGCCAACACAGT-3'
	R	5'-AGTACTTGCGCTCAGGAGGAG-3'
U6	F	5'-GTGCGTGTCGTGGAGTCG-3'
	R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.4 Western blot检测相关蛋白表达水平

细胞在含蛋白酶抑制剂的RIPA蛋白裂解缓冲液中裂解30 min,然后在4 ℃下以12 000 r/min离心20 min。使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。总蛋白提取液经10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,浓缩胶80 V 30 min,分离胶120 V 60 min;以250 mA 90 min转移蛋白到PVDF膜。用5%的脱脂牛奶封闭膜2 h,然后用E-cadherin一抗(1∶10 000稀释)和N-cadherin一抗(1∶5 000稀释)在4 ℃下孵育过夜。随

后,用 PBST 清洗膜 3 次,并与羊抗鼠二抗(1∶4 000 稀释)孵育 2 h,用 PBST 清洗膜 3 次,然后进行蛋白显色,统计相关蛋白表达,以 GAPDH 为内参蛋白。

1.5 细胞集落形成实验检测细胞增殖能力

转染 48 h 后,将 MG63 细胞置于 6 孔板中培养 14 d。然后,用 4% 多聚甲醛(江苏 Beyotime)固定细胞 30 min,用 0.1% 结晶紫(美国 Sigma-Aldrich)染色2 h。对菌落(50 个以上为 1 个菌落)进行拍照和分析。

1.6 细胞划痕愈合实验检测 MG63 细胞的迁移能力

将 MG63 细胞接种至 12 孔板,待细胞融合度为 80% 左右时,将重组质粒转染细胞,在转染 0 h 和 24 h 后,使用 200 μL 的吸管尖进行细胞划痕,并用 PBS 清洗。使用莱卡显微镜采集图像,利用 Image J 软件检测细胞迁移距离。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

通过 miRanda 或 TargetScan 预测 circ ANKIB1 和 DKK1 中 miR-217 的潜在结合位点。将野生型(WT)或突变型(MUT)circ ANKIB1 和 DKK1 3'UTR 克隆到 pmirGlO 荧光素酶报告载体中,分别命名为 WT-circ ANKIB1、MUT-circ ANKIB1、WT-DKK1、MUT-DKK1,分别与 miR-NC mimics 或 miR-217 mimics 转染至 MG63 细胞中。转染48 h 后,采用双荧光素酶报告系统(Promega)检测细胞裂解液中的荧光素酶活性。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况

细胞转染48 h后,先用PBS冲洗细胞,然后用 500 μL 1×结合缓冲液重悬细胞。加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,室温暗置 20 min。采用流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)根据说明书检测细胞凋亡率。

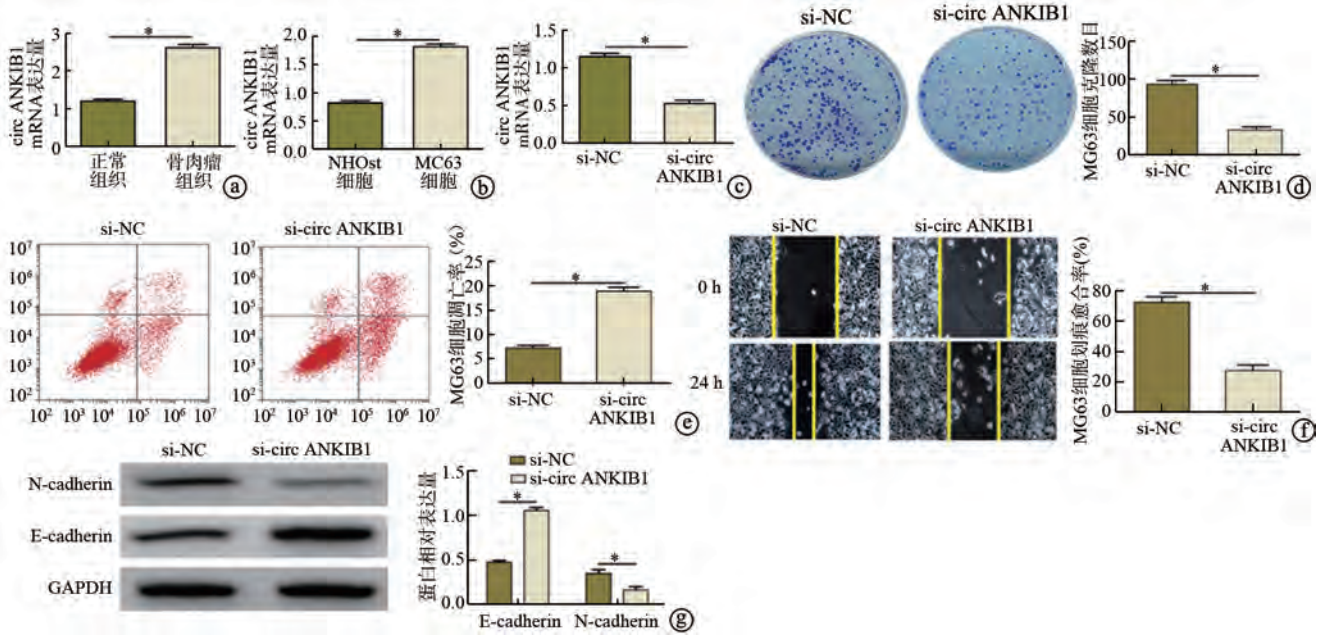
1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下调 circ ANKIB1 抑制 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

qRT-PCR 结果显示,与相邻正常组织相比,骨肉瘤组织中 circ ANKIB1 mRNA 水平升高($P<0.01$),见图 1a。与 NHOst 细胞相比,MG63 细胞中 circ ANKIB1 mRNA 表达上调($P<0.01$),见图 1b。转染 si-circ ANKIB1 后,circ ANKIB1 mRNA 的表达显著降低($P<0.01$),见图 1c。细胞集落形成实验结果显示,敲低 circ ANKIB1 抑制 MG63 细胞增殖($P<0.01$),见图 1d。流式细胞术结果显示,敲低 circ ANKIB1 可诱导 MG63 细胞凋亡($P<0.01$),见图 1e。细胞划痕愈合实验结果显示,敲低 circ ANKIB1 抑制了 MG63 细胞的迁移($P<0.01$),见图 1f。Western blot 结果显示,敲低 circ ANKIB1 表达后,上皮标记蛋白 E-cadherin 表达水平升高($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin 表达水平降低($P<0.01$),见图 1g。以上数据表明,敲低 circ ANKIB1 可以抑制 MG63 细胞的增殖、迁移和上皮间质转化。



a:qRT-PCR 分析正常组织和骨肉瘤组织中 circ ANKIB1 mRNA 表达;b:qRT-PCR 分析 NHost 和 MG63 细胞中 circ ANKIB1 表达;c:qRT-PCR 分析 MG63 细胞中 circ ANKIB1 mRNA 表达;d:细胞集落形成实验分析 MG63 细胞克隆数目;e:流式细胞仪分析 MG63 细胞凋亡情况;f:细胞划痕愈合实验分析 MG63 细胞迁移情况;g:Western blot 分析 MG63 细胞上皮间质转化情况 *:$P<0.01$

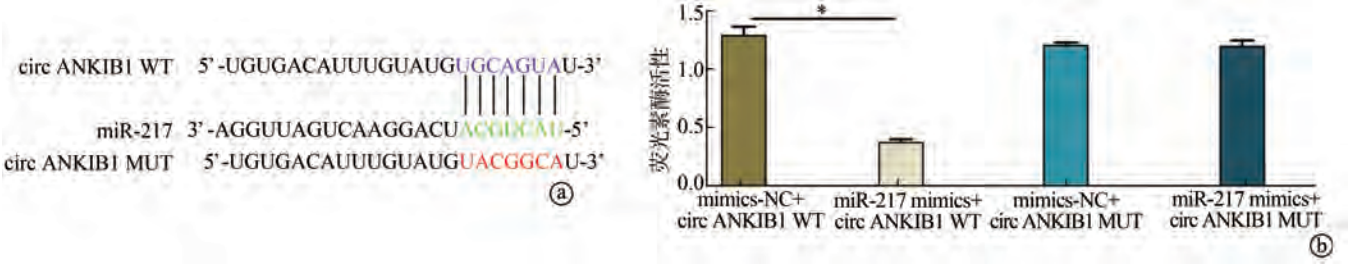
图 1 敲低 circ ANKIB1 抑制 MG63 细胞生长、迁移和上皮间质转化

2.2 circ ANKIB1 与 miR-217 的关系

miRanda 预测了结果显示,circ ANKIB1 和 miR-217 之间存在结合位点,表明 miR-217 可能是 circ ANKIB1 的靶点(图 2a)。为了确认 circ ANKIB1 是否能直接与 miR-217 结合,我们进行了双荧光素酶报告基因检测,结果显示,在 MG63 细胞中转染 miR-217 mimics 后,circ ANKIB1 WT 的荧光素酶活性明显降低($P<0.01$),而 circ ANKIB1 MUT 的荧光素酶活性未受影响(图 2b)。表明 circ ANKIB1 与 miR-217 之间具有直接的靶向关系。

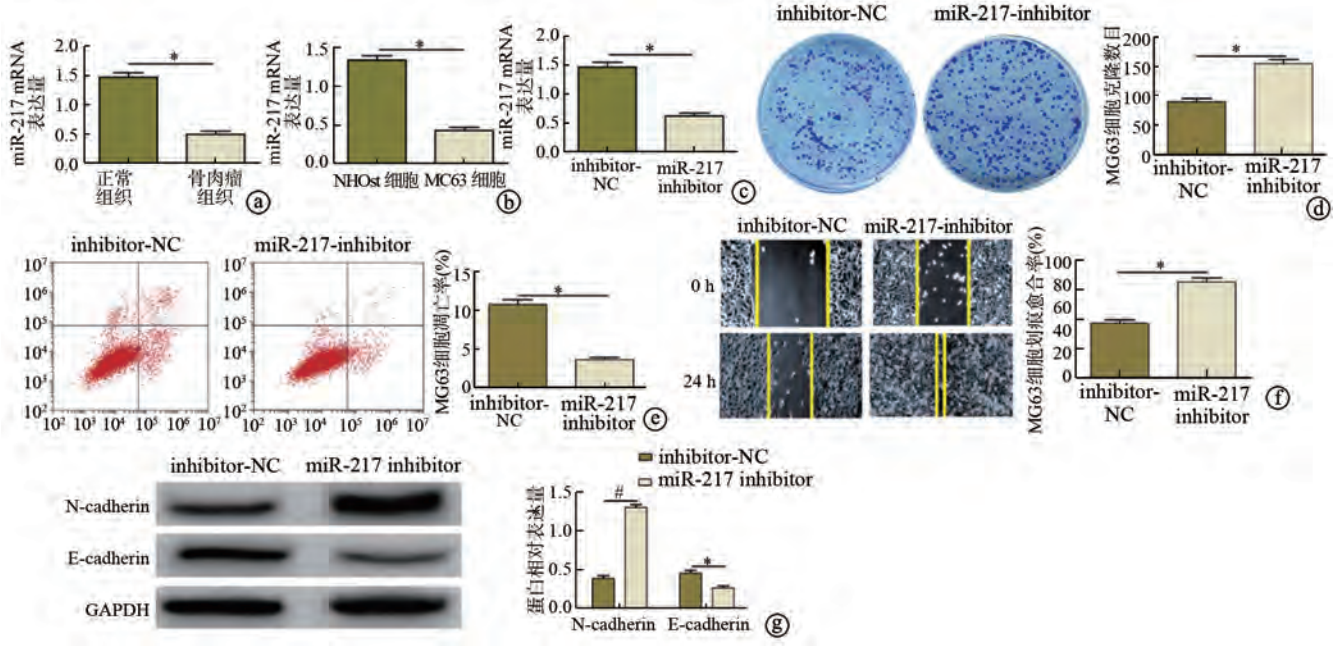
2.3 下调 miR-217 促进 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

qRT-PCR 结果显示,与相邻正常组织相比,骨肉瘤组织中 miR-217 mRNA 表达降低($P<0.01$),见图 3a。与 NHOst 细胞相比,MG63 细胞中 miR-217 mRNA 表达降低($P<0.01$),见图 3b。转染 miR-217 inhibitor 后,MG63 细胞中 miR-217 mRNA 的表达显著降低($P<0.01$),见图 3c。细胞集落形成实验结果显示,敲低 miR-217 后,MG63 细胞增殖数目明显增加($P<0.01$),见图 3d。流式细胞术结果显示,敲低 miR-217抑制了 MG63 细胞凋亡($P<0.01$),见图 3e。细胞划痕愈合实验结果显示,敲低 miR-217 促进了 MG63 细胞的迁移($P<0.01$),见图 3f。Western blot 结果显示,敲低 miR-217 表达后,上皮标记蛋白 E-cadherin表达水平降低($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin表达水平上升($P<0.01$),见图 3g。以上数据表明,敲低miR-217可以促进 MG63 细胞的增殖、迁移和上皮间质转化。



a:miRanda 软件分析 circ ANKIB1 与靶基因 miR-217 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验检测结果 *:$P<0.01$

图 2 circ ANKIB1 与 miR-217 的关系

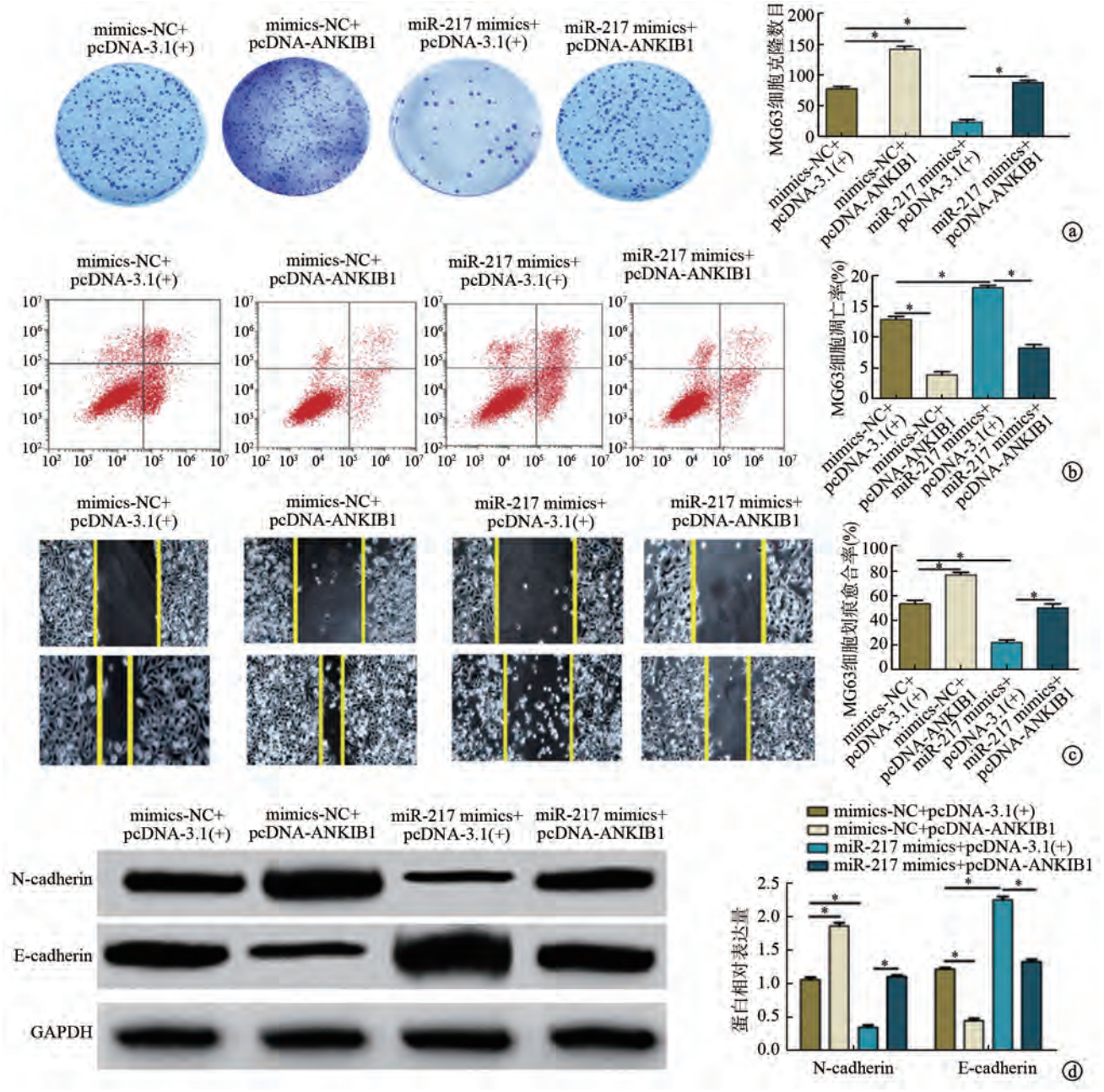


a:qRT-PCR 分析正常组织和骨肉瘤组织中 miR-217 表达;b:qRT-PCR 分析 NHOst 和 MG63 细胞中 miR-217 表达;c:qRT-PCR 分析 MG63 细胞中 miR-217 的下调效果;d:细胞集落形成实验分析 MG63 细胞克隆数目;e:流式细胞仪分析 MG63 细胞凋亡情况;f:细胞划痕愈合实验分析 MG63 细胞迁移情况;g:Western blot 分析 MG63 细胞上皮间质转化情况 *:$P<0.01$;#:$P<0.001$

图 3 下调 miR-217 促进 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

2.4 上调 circ ANKIB1 通过 miR-217 促进 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

与 mimics-NC + pcDNA-3.1(+)组相比,mimics-NC + pcDNA-ANKIB1 组 MG63 细胞克隆数目显著增加($P<0.01$),细胞凋亡率降低($P<0.01$),MG63 细胞划痕愈合率明显上升($P<0.01$),上皮标记蛋白 E-cadherin表达水平降低($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin表达水平升高($P<0.01$);miR-217 mimics + pcDNA-3.1(+)组 MG63 细胞克隆数目显著减少($P<0.01$),细胞凋亡率增加($P<0.01$),MG63 细胞划痕愈合率明显降低($P<0.01$),上皮标记蛋白 E-cadherin表达水平升高($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin表达水平降低($P<0.01$)。与 miR-217 mimics + pcDNA-3.1(+)组相比,miR-217 mimics + pcDNA-ANKIB1 组 MG63 细胞克隆数目显著增加($P<0.01$),细胞凋亡率降低($P<0.01$),MG63 细胞划痕愈合率明显上升($P<0.01$),上皮标记蛋白 E-cadherin表达水平降低($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin表达水平升高($P<0.01$),见图 4。



a:细胞集落形成实验分析 MG63 细胞克隆数目;b:流式细胞仪分析 MG63 细胞凋亡情况;c:细胞划痕愈合实验分析 MG63 细胞迁移情况;d:Western blot 分析 MG63 细胞上皮间质转化情况 *:$P<0.01$

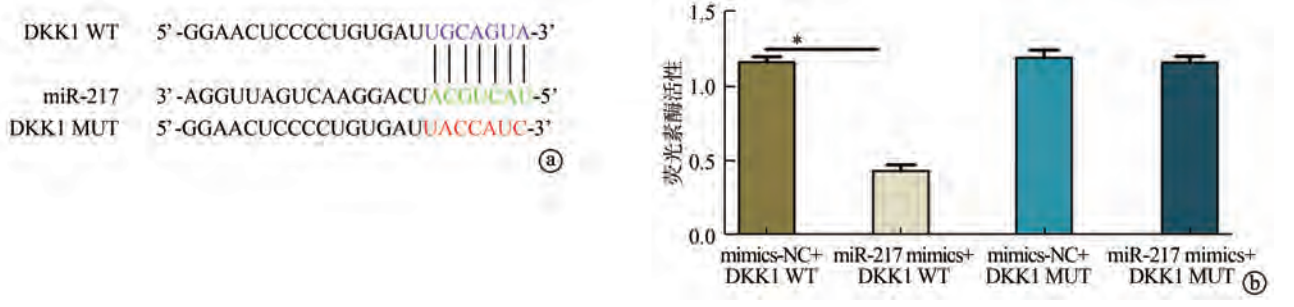
图 4 上调 circ ANKIB1 通过 miR-217 促进 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

2.5 miR-217 与 DKK1 的关系

使用 TargetScan 预测 miR-217 与 DKK1 之间的结合位点,见图 5a。为了确认 DKK1 是否能直接与 miR-217 结合,我们进行了双荧光素酶报告基因检测,结果显示,MG63 细胞转染 miR-217 mimics 后,DKK1 WT 的荧光素酶活性明显降低($P<0.01$),而 DKK1 MUT 的荧光素酶活性未受影响(图 5b)。表明 miR-217 与 DKK1 之间具有直接的靶向关系。

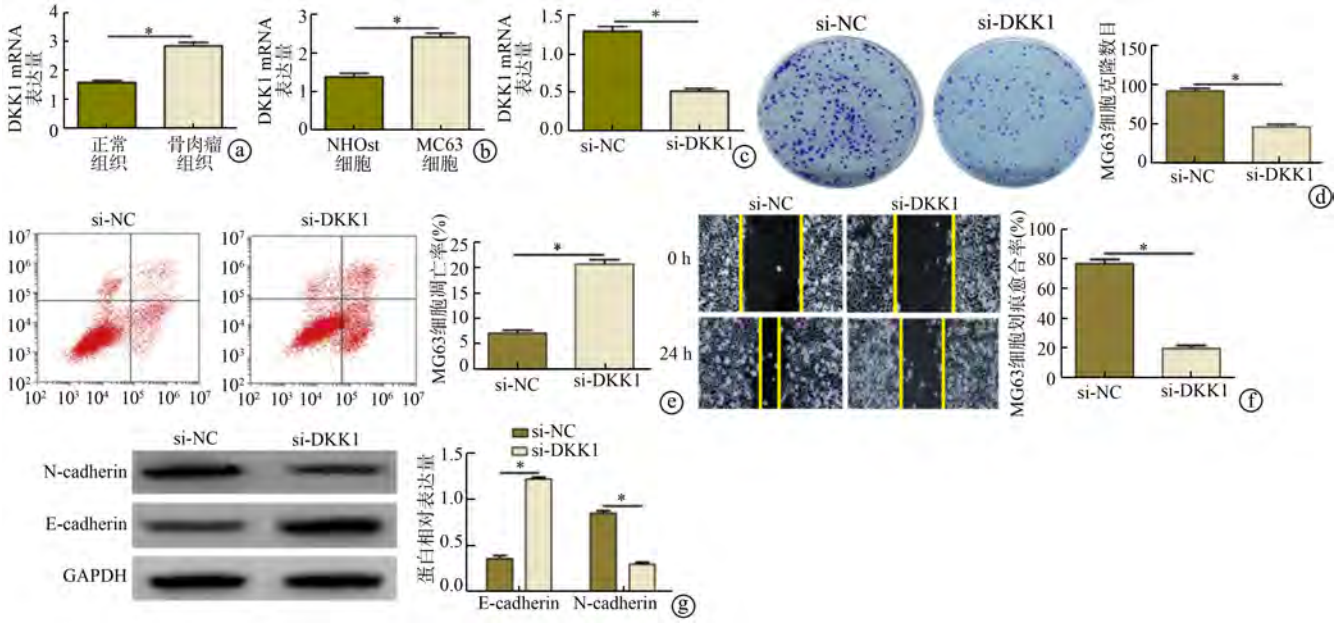
2.6 下调 DKK1 抑制 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

qRT-PCR 结果显示,与相邻正常组织相比,骨肉瘤组织中 DKK1 mRNA 水平升高($P<0.01$),见图 6a;与 NHOst 细胞相比,MG63 细胞中 DKK1 mRNA 表达上调($P<0.01$),见图 6b。进一步将 si-NC 或 si-DKK1 转染至 MG63 细胞,并通过 qRT-PCR 验证 si-DKK1 转染的有效性,结果显示,转染 si-DKK1 后,DKK1 mRNA 的表达显著减少($P<0.01$),见图 6c。细胞集落形成实验结果显示,敲低 DKK1 后,MG63 细胞增殖数目明显减少($P<0.01$),见图 6d。流式细胞术结果显示,敲低 DKK1 后 MG63 细胞凋亡率增加($P<0.01$),见图 6e。细胞划痕愈合实验结果显示,DKK1 下调抑制了 MG63 细胞的迁移($P<0.01$),见图 6f。Western blot 结果显示,敲低 DKK1 表达后,上皮标记蛋白 E-cadherin表达水平升高($P<0.01$),间质标记蛋白 N-cadherin表达水平降低($P<0.01$),见图 6g。以上数据表明,敲除 DKK1 可以抑制 MG63 细胞的恶性进展。



a:生物信息学软件预测 miR-217 与 DKK1 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验 *:$P<0.01$

图 5 miR-217 与 DKK1 的关系



a:qRT-PCR 实验分析正常组织和骨肉瘤组织中 DKK1 表达;b:qRT-PCR 分析 NHOst 和 MG63 细胞中 DKK1 表达;c:qRT-PCR 分析 MG63 细胞中 DKK1 的下调效果;d:集落形成实验分析 MG63 细胞克隆数目;e:流式细胞仪分析 MG63 细胞凋亡情况;f:细胞划痕愈合实验分析 MG63 细胞迁移情况;Western blot 分析 MG63 细胞上皮间质转化情况 *:$P<0.01$

图 6 下调 DKK1 表达抑制 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化

2.7 circ ANKIB1 通过海绵吸收 miR-217 调节 DKK1 的表达

与 mimics-NC + pcDNA-3.1(+)组相比,mimics-NC + pcDNA-ANKIB1 组 MG63 细胞中 DKK1 表达量上升($P<0.01$),miR-217-mimics + pcDNA-3.1(+)组 MG63 细胞中 DKK1 表达量降低($P<0.01$);此外,与 miR-217 mimics + pcDNA-3.1(+)组相比,miR-217 mimics + pcDNA-ANKIB1 组 MG63 细胞中 DKK1 表达量上升($P<0.01$),见图 7。表明 circ ANKIB1 通过靶向 miR-217 正向调控 DKK1 表达。

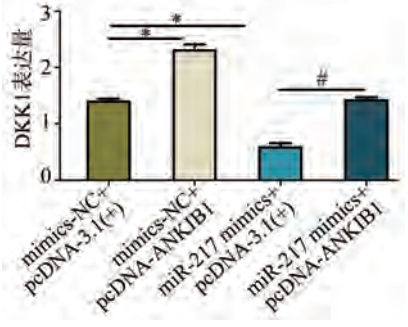


图 7 circ ANKIB1 通过海绵吸收 miR-217 调节 DKK1 的表达

3 讨论

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤之一[16]。最近,有研究表明 circRNAs 在癌症的发生发展中具有重要作用[17]。但是 circRNAs 在骨肉瘤中的作用尚未完全明确。本研究证实 circ ANKIB1 在骨肉瘤中过表达,并且敲低 circ ANKIB1 通过调控 miR-217/DKK1 轴抑制骨肉瘤的进展。circRNAs 大量存在于真核细胞中,最初被认为是 pre-mRNA 剪接的副产物。然而,多项研究表明 circRNAs 在多种病理环境中发挥着重要的调控作用,是肿瘤预后的重要生物标志物。如 circRNA-104718 作为竞争性内源性 RNA,通过 microRNA-218-5p/TXNDC5 信号通路促进肝癌进展[18]。circRNA_010763 通过作为 miR-715 的分子海绵,诱导 c-Myc 表达,促进肺癌的增殖和侵袭[19]。此外,Du 等[20]发现 circ ANKIB1 的干扰抑制了骨肉瘤细胞的增殖和侵袭,并通过调节 SOCS3/STAT3 通路上的 miR-19b 促进骨肉瘤细胞凋亡。因此,我们推测 circ ANKIB1 在骨肉瘤组织和细胞系中过表达,是一种致癌基因。而本研究结果证实了这一点,且沉默 circ ANKIB1 可通过诱导细胞凋亡抑制细胞增殖、迁移和上皮间质转化。

目前普遍认为,circRNAs 可作为 miRNA 海绵与 miRNA 相互作用,影响靶基因的表达。如 circRNA_0005075 通过调控 miR-431/p53/上皮间质转化轴抑制胃癌发生[21]。circRNA PIP5K1A 通过抑制 miR-123a 促进结肠癌的发展[22]。生物信息学分析表明,circ ANKIB1 可能与 miR-217 结合,本研究双荧光素酶报告基因检测证实了这一点。一些研究表明,miR-217 在肝癌、卵巢癌和肺癌等肿瘤中发挥抑癌作用。如 Hsa-miR-217 通过靶向 SIRT1 和 P53/KAI1 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[23-24]。miR-217 通过抑制卵巢癌白细胞介素-6 分泌进而抑制 M2 样巨噬细胞极化[25]。此外,有研究表明 miR-217 在骨肉瘤细胞中能够作为肿瘤抑制基因发挥作用。He 等[26]研究证明,miR-217 在骨肉瘤组织谱和细胞系中低表达,上调 miR-217 可以通过靶向 SIRT1 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究结果与上述研究结果一致,上调 miR-217 逆转了过表达 circ ANKIB1 介导的骨肉瘤细胞增殖、凋亡和转移。本研究结果显示,circ ANKIB1 通过海绵吸收 miR-217 在骨肉瘤发展过程中发挥癌基因作用。越来越多的证据表明,在许多疾病中,miRNAs 通过抑制其靶基因发挥生物学功能。DKK1 被鉴定为 miR-217 的下游靶基因,在多种肿瘤中发挥着关键作用。Shailesh 等[27]发现,PRMT5 通过沉默 DKK1 和 DKK3 调控乳腺癌细胞增殖。此外,Hu 等[28]还证实了 NBAT1 通过 PRC2 调控 DKK1 抑制乳腺癌转移。本研究结果显示,在骨肉瘤组织和细胞系中 DKK1 表达增加,而下调 DKK1 表达可抑制 MG63 细胞增殖、迁移和上皮间质转化,促进细胞凋亡;此外,circ ANKIB1 通过海绵吸收 miR-217,正向调控 DKK1 的表达,进而促进骨肉瘤的进展。

综上所述,骨肉瘤组织和细胞中 circ ANKIB1 和 DKK1 表达上调,miR-217 表达下调。circ ANKIB1 沉默通过上调 miR-217 和下调 DKK1 抑制骨肉瘤的进展。circ ANKIB1/miR-217/DKK1 轴可能为骨肉瘤的治疗提供新视角。

[参考文献]

[1] 陈瑞玲,王刚阳,孙梦熊,等. 骨肉瘤精准医学的实践与进展[J]. 中华实验外科杂志,2018,35(6):1190 - 1194. doi:10.3760/cma.j.issn.1001 - 9030.2018.06.064.

[2] 宋 羡,黎志宏. 基于 SEER 数据库骨肉瘤患者预后影响因素分析[J]. 中国医师杂志,2019,21(4):525 - 531. doi:10.3760/cma.j.issn.1008 - 1372.2019.04.011.

[3] Zang J,Lu D,Xu A. The interaction of circRNAs and RNA binding proteins:an important part of circRNA maintenance and function[J]. J Neurosci Res,2020,98(1):87 - 97. doi:10.1002/jnr.24356.

[4] Kristensen LS,Andersen MS,Stagsted LVW,et al. The biogenesis,biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet,2019,20(11):675 - 691. doi:10.1038/s41576 - 019 - 0158 - 7.

[5] Harper KL, Mcdonnell E, Whitehouse A. CircRNAs: from anonymity to novel regulators of gene expression in cancer (review)[J]. Int J Oncol, 2019,5(6):1183 - 1193. doi:10.3892/ijo.2019.4904.

[6] Chen X, Yang T, Wang W, et al. Circular RNAs in immune responses and immune diseases[J]. Theranostics, 2019, 9(2):588 - 607. doi: 10.7150/thno.29678.

[7] Jin J, Chen A, Qiu W, et al. Dysregulated circRNA_100876 suppresses proliferation of osteosarcoma cancer cells by targeting microRNA-136 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9):15678 - 15687. doi:10.1002/jcb.28837.

[8] Gao Y, Ma H, Gao Y, et al. CircRNA circ_0001721 promotes the progression of osteosarcoma through miR-372-3p/MAPK7 axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 11 (12): 8287 - 8302. doi: 10.2147/CMAR.S244527.

[9] Lei S, Xiang L. Up-regulation of circRNA hsa_circ_0003074 expression is a reliable diagnostic and prognostic biomarker in patients with osteosarcoma[J]. Cancer Manag Res, 2020, 29(12):9315 - 9325. doi:10.2147/CMAR.S262093.

[10] Du YX, Guo LX, Pan HS, et al. Circ_ANKIB1 stabilizes the regulation of miR-19b on SOCS3/STAT3 pathway to promote osteosarcoma cell growth and invasion[J]. Hum Cell, 2020, 33(1):252 - 260. doi:10.1007/s13577 - 019 - 00298 - 6.

[11] Tang J, Duan G, Wang Y, et al. Circular RNA_ANKIB1 accelerates chemo-resistance of osteosarcoma via binding microRNA-26b-5p and modulating enhancer of zeste homolog 2 [J]. Bioengineered, 2022, 13(3):7351 - 7366. doi:10.1080/21655979.2022.2037869.

[12] Zhu X, Liu C, Shi J, et al. Circular RNA circANKIB1 promotes the progression of osteosarcoma by regulating miR-217/PAX3 axis[J]. J Bone Oncol, 2021, 14(27):100347. doi:10.1016/j.jbo.2021.100347.

[13] Bian Y, Gao G, Zhang Q, et al. KCNQ1OT1/miR-217/ZEB1 feedback loop facilitates cell migration and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(6):886 - 896. doi: 10.1080/15384047.2019.1579959.

[14] Wang B, Qu XL, Liu J, et al. HOTAIR promotes osteosarcoma development by sponging miR-217 and targeting ZEB1 [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5):6173 - 6181. doi:10.1002/jcp.27394.

[15] Yang G, Wang J, Huang B. Loss of miR-217 promotes osteosarcoma cell proliferation through targeting SETD8[J]. Pharmazie, 2018, 73(12): 711 - 714. doi:10.1691/ph.2018.8644.

[16]周珈右,李一鸣,何岚奇,等. 钙通道蛋白 Orai1 在骨肉瘤细胞转移中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(6):1033 - 1038. doi:10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.007.

[17] Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(3): 188 - 206. doi:10.1038/s41571 - 021 - 00585 - y.

[18] Yu J, Yang M, Zhou B, et al. CircRNA-104718 acts as competing endogenous RNA and promotes hepatocellular carcinoma progression through microRNA-218-5p/TXNDC5 signaling pathway[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(13):1487 - 1503. doi:10.1042/CS20190394.

[19] Zhang P, Xue XF, Ling XY, et al. CircRNA_010763 promotes growth and invasion of lung cancer through serving as a molecular sponge of miR-715 to induce c-Myc expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(13):7310 - 7319. doi: 10.26355/eurrev_202007_21892.

[20] Du YX, Guo LX, Pan HS, et al. circ ANKIB1 stabilizes the regulation of miR-19b on SOCS3/STAT3 pathway to promote osteosarcoma cell growth and invasion[J]. Hum Cell, 2020, 33(1):252 - 260. doi:10.1007/s13577 - 019 - 00298 - 6.

[21] Wu J, Chen Z, Song Y, et al. CircRNA_0005075 suppresses carcinogenesis via regulating miR-431/p53/epithelial-mesenchymal transition axis in gastric cancer[J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(7):932 - 942. doi:10.1002/cbf.3519.

[22] Zhang Q, Zhang C, Ma JX, et al. Circular RNA PIP5K1A promotes colon cancer development through inhibiting miR-1273a[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(35):5300 - 5309. doi: 10.3748/wjg.v25.i35.5300.

[23] Zhang M, Li M, Li N, et al. miR - 217 suppresses proliferation, migration and invasion promoting apptosis via targeting MTDH in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2017, 37(3):1772 - 1778. doi:10.3892/or.2017.5401.

[24] Jiang W, Hou L, Wei J, et al. Hsa-miR-217 inhibits the proliferation, migration, and invasion in non-small cell lung cancer cells via targeting SIRT1 and P53/KAI1 signaling[J]. Balkan Med J, 2020, 37(1):208 - 214. doi:10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2019.9.91.

[25] Jiang B, Zhu SJ, Xiao SS, et al. MiR-217 inhibits M2-like macrophage polarization by suppressing secretion of interleukin-6 in ovarian cancer [J]. Inflammation, 2019, 42(5):1517 - 1529. doi:10.1007/s10753 - 019 - 01004 - 2.

[26] He S, Wang Z, Tang H, et al. MiR-217 inhibits proliferation, migration, and invasion by targeting SIRT1 in osteosarcoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2019, 34(4):264 - 270. doi:10.1089/cbr.2017.2394.

[27] Shailesh H, Siveen KS, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) activates WNT/β-catenin signalling in breast cancer cells via epigenetic silencing of DKK1 and DKK3[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(3):1583 - 1600. doi:10.1111/jcmm.16260.

[28] Hu P, Chu J, Wu Y, et al. NBAT1 suppresses breast cancer metastasis by regulating DKK1 via PRC2[J]. Oncotarget, 2015, 6(32):32410 - 32425. doi:10.18632/oncotarget.5609.

(编辑:龙小芬)