

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.001

# Hsa\_circ\_0004674 通过 miR-1254 调控 EGFR 对骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响研究<sup>\*</sup>

张 帆<sup>1</sup>,林家民<sup>1</sup>,马小虎<sup>1</sup>,李 娟<sup>2</sup>,余 天<sup>3△</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,武汉 430030;2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院血液内科,武汉 430030;3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科,武汉 430030)

**[摘要]** **目的** 探讨环形 RNA(circRNA)检测 hsa\_circ\_0004674 通过微 RNA-1254(miR-1254)调控表皮生长因子受体(EGFR)对骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响。**方法** 通过微阵列分析筛选 MG63 细胞中差异表达的 circRNA,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测 hsa\_circ\_0004674 在骨肉瘤细胞 MG63 和正常成骨细胞 NHOst 中的表达情况,分析 hsa\_circ\_0004674 对 MG63 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响;miRanda 预测 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 之间的结合位点,双荧光素酶报告基因检测 hsa\_circ\_0004674 与 miR-1254 的相互作用,分析 hsa\_circ\_0004674 作为 miR-1254 的海绵对 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移的影响;TargetScan 预测 miR-1254 和 EGFR 之间的结合位点,双荧光素酶报告基因检测 miR-1254 与 EGFR 的相互作用,分析 EGFR 对 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移的影响。细胞增殖、侵袭和迁移能力分别用细胞克隆形成实验、细胞侵袭实验和细胞划痕实验检测。CCK-8 法检测过表达 EGFR 对 MG63 细胞活力的影响,Western blot 法检测 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 对 EGFR 表达的影响及过表达 EGFR 对 MG63 细胞中 Bax、Bcl-2 表达的影响。**结果** 与 NHOst 细胞比较,MG63 细胞中 hsa\_circ\_0004674 的表达水平上调( $P<0.01$ ),miR-1254 的表达水平下调( $P<0.01$ ),EGFR mRNA 表达水平上调( $P<0.01$ ),干扰 hsa\_circ\_0004674 或 EGFR 表达可使 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移受抑制。miR-1254 过表达也可抑制 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移,而干扰 miR-1254 表达可促进 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移;与仅干扰 miR-1254 表达比较,同时干扰 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 的表达后,hsa\_circ\_0004674 表达的下调能部分逆转 miR-1254 表达下调对细胞功能的影响。hsa\_circ\_0004674 3' UTR 与 miR-1254 特异性结合,调控 miR-1254 的表达活性。miR-1254 与 EGFR 3' UTR 特异性结合,调控 EGFR 的表达。miR-1254 过表达降低 MG63 细胞的活力,EGFR 过表达增加 MG63 细胞的活力。miR-1254 过表达促进 MG63 细胞中 Bax 的表达,抑制 Bcl-2 的表达,而 EGFR 过表达抑制了 MG63 细胞中 Bax 的表达,促进 Bcl-2 的表达。**结论** hsa\_circ\_0004674 通过 miR-1254 调控 EGFR 表达,从而调控骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

**[关键词]** hsa\_circ\_0004674;微 RNA-1254;受体,表皮生长因子;MG63 细胞;细胞增殖;肿瘤浸润;细胞运动

**[中图分类号]** R738.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)18-2965-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Hsa\_circ\_0004674 regulates the proliferation, migration and invasion by regulating the expression of miR-1254 target EGFR in osteosarcoma cells<sup>\*</sup>

ZHANG Fan<sup>1</sup>, LIN Jiamin<sup>1</sup>, MA Xiaohu<sup>1</sup>, LI Juan<sup>2</sup>, YU Tian<sup>3△</sup>

(1. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 3. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of has\_circ\_0004674 on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and the underlying mechanism. **Methods** Microarray analysis was performed to detect the differential expression of circRNA in MG63 cells. RT-PCR was used to detect the expression level of hsa\_circ\_0004674 in MG63 and NHOst cells. The effects of hsa\_circ\_0004674 on the proliferation, invasion and

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金项目(81202093)。 作者简介:张帆(1980—),主治医师,博士,主要从事骨科方向研究。 △ 通信作者, E-mail:441271491@qq.com。

migration of MG63 cells were analyzed. The miRanda was used to analyze the correlation between hsa\_circ\_0004674 and miR-1254. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect hsa\_circ\_0004674 interaction with miR-1254. The effect of hsa\_circ\_0004674 as a miR-1254 sponge on the proliferation, invasion and migration of MG63 cells was analyzed. The TargetScan database was used to analyze the correlation between miR-1254 and EGFR. Dual luciferase reporter gene was used to detect miR-1254 interaction with EGFR. The effect of EGFR on the proliferation, invasion and migration of MG63 cells were analyzed. Cell proliferation, invasion, and migration capabilities were measured by using cell clone formation experiment, cell invasion experiment, and cell scratch experiment, respectively. CCK-8 assay was used to detect the effect of EGFR overexpression on the viability of MG63 cells. The effect of EGFR overexpression on the expression level of Bax and Bcl-2 in MG63 cells was detected by Western blot. **Results** In MG63 cells, the expression level of hsa\_circ\_0004674 was up-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression level of miR-1254 was down-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression level of EGFR was up-regulated when compared with NHOst cells ( $P < 0.01$ ). Silencing of the expression of hsa\_circ\_0004674 or EGFR inhibited the proliferation, invasion and migration of MG63 cells. Overexpression of miR-1254 inhibited proliferation, invasion and migration of MG63 cells; down-regulation of miR-1254 promoted proliferation, invasion and migration of MG63 cells. Compared with down-regulation of miR-1254 only, inhibiting the expression of hsa\_circ\_0004674 and miR-1254 partially reversed the effect on cell function which influenced by down-regulation of miR-1254. hsa\_circ\_0004674 3'UTR specifically bonded to the miR-1254 and regulated the expression activity of miR-1254. miR-1254 specifically bonded to the EGFR 3'UTR and regulated the expression activity of EGFR. Overexpression of miR-1254 reduced the viability of MG63 cells, and overexpression of EGFR increased the viability of MG63 cells. Overexpression of miR-1254 promoted the expression level of Bax in MG63 cells and inhibited the expression level of Bcl-2; Overexpression of EGFR inhibited the expression level of Bax and promoted the expression level of Bcl-2 in MG63 cells. **Conclusion** hsa\_circ\_0004674 regulates EGFR expression through miR-1254, thereby regulating the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells.

**[Key words]** hsa\_circ\_0004674; miR-1254; receptor, epidermal growth factor; MG63 cells; cell proliferation; neoplasm invasiveness; cell movement

骨肉瘤是由间质细胞系发展形成的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,其发病率高,进展速度快,儿童和青少年极易发病。针对骨肉瘤患者,现多采用外科病灶切除、辅助化疗和术后化疗等方法进行治疗<sup>[2]</sup>。然而,当患者确诊为骨肉瘤时,其中有约 15% 的患者可诊断出不同程度的远处转移<sup>[3]</sup>,30%~40% 的患者会复发<sup>[4]</sup>,其容易转移和复发的特点导致病死率很高,因此深入研究骨肉瘤的发病机制至关重要。环形 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类非编码 RNA,有特殊闭合环状结构,而且在生物体内广泛存在<sup>[5-6]</sup>,circRNA 能够通过调控微 RNA (microRNA, miRNA) 和靶基因的结合而发挥生物学作用,且许多疾病发生过程与其有关<sup>[7-8]</sup>。研究表明 circRNA 在骨肉瘤中的异常表达会引起骨肉瘤的发生发展<sup>[9-11]</sup>,如 hsa\_circ\_0009910 作为 miR-449a 的海绵并上调 miR-449a 功能性靶标 IL-6R,从而导致骨肉瘤的发生<sup>[12]</sup>。最近的研究发现 hsa\_circ\_0004674 在骨肉瘤细胞中高表达<sup>[13]</sup>,但 hsa\_circ\_0004674 在骨肉瘤细胞中发挥的作用及其机制尚不明。因此,本文拟探讨其在骨肉瘤细胞生物学行为中的作用,为进一步阐明 hsa\_circ\_0004674 在骨肉

瘤中发挥的调控作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

骨肉瘤细胞 MG63 和正常成骨细胞 NHOst 购自上海生物细胞研究所。RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,PrimeScript™ II 1st Strand、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase cDNA Synthesis 试剂盒和点突变试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。hsa\_circ\_0004674 阴性对照质粒 [hsa\_circ\_0004674 siRNA NC、pcDNA-3.1 (+)], hsa\_circ\_0004674 siRNA、pcDNA-hsa\_circ\_0004674、miRNA-1254 (miR-1254) 阴性对照质粒 [miR-1254 模拟物 (miR-1254 mimic) NC、miR-1254 抑制剂 (miR-1254 inhibitor) NC]、miR-1254 mimic、miR-1254 inhibitor、pcDNA-miR-1254、miR-1254 siRNA 和表皮生长因子受体 (EGFR) 阴性对照质粒 (EGFR siRNA NC)、EGFR siRNA、pcDNA-EGFR 由北京擎科生物有限公司合成,后续实验分组根据 MG63 细胞转染的相应质粒命名,另设不做任何处理的 MG63 细胞为空白对照。双

荧光素酶活性检测试剂盒和 Turbofect 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, Transwell 小室购自武汉巴菲尔生物技术服务有限公司, 羊抗兔 IgG 二抗(HRP)、羊抗鼠 IgG 二抗(HRP)购自北京义翘神州科技有限公司, ECL 化学发光试剂盒和苯甲基磺酰氟(PMSF)购自上海碧云天生物技术有限公司, Bax、 $\beta$  淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、 $\beta$ -actin 和 EGFR 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MG63 细胞用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, NHOst 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 根据实验要求将细胞按相应数量接种于所需的细胞培养皿或细胞培养板中。

1.2.2 生物信息学分析

分析 MG63、NHOst 细胞的 circRNA、miRNA, 利用 TRIzol 试剂提取两种细胞中的总 RNA, 并用 Multispecies miRNA-4 阵列分析, 用 limma 软件分析数据。以热图的形式表示结果。

1.2.3 细胞转染

MG63 细胞按  $1 \times 10^5$ /孔铺于 12 孔板, 待细胞密度生长至约 70% 时, 按照 Tubofect 转染试剂的说明书将各组质粒(浓度为 50 nmol/L)转染到 MG63 细胞中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后收集各组细胞进行后续实验。

1.2.4 CCK-8 法测定细胞活力

将 MG63 细胞按  $1 \times 10^5$ /mL 的密度铺于 96 孔板中, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞密度生长至约 75% 时, 按 1.2.3 转染各组质粒, 每组设 5 个复孔, 培养 48 h 后, 去除上清液, 每个孔加入 100  $\mu$ L 混合培养液(CCK-8 工作液和培养基比例为 1:10), 继续于培养箱中培养 2 h 后, 用酶标仪读取各孔细胞在 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.2.5 细胞克隆形成实验

将生长良好的细胞制成细胞悬液, 按  $1 \times 10^3$ /孔接种于细胞培养板里, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 14 d 左右, 每 4 天换液 1 次, 观察细胞生长状态, 去除培养基, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min,

结晶紫染色 5 min, 计数细胞数大于或等于 30 个的集落, 在显微镜下拍照。

1.2.6 细胞侵袭实验

将-20℃保存的 matrigel 于 4℃过夜融化, 在冰上用无 FBS 的培养基稀释 matrigel 至终浓度 1 mg/mL, 每个 Transwell 小室上室加入 100  $\mu$ L 稀释后的 matrigel, 37℃培养箱中放置 5 h 使其干成胶状。各组细胞长满后, PBS 洗两次, 胰酶消化后, 用无 FBS 的培养基重悬细胞, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$ /mL, 取细胞悬液 100  $\mu$ L 加入 Transwell 小室上室, 下室中加入完全培养基, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 取出小室, 弃去上室培养基, PBS 洗两次, 4%多聚甲醛固定 20 min, 0.1%结晶紫染色 20 min, 用棉签小心擦掉上层未迁移细胞, PBS 洗 2 次, 显微镜下选取 5 个视野观察细胞并计数。

1.2.7 细胞划痕实验

各组细胞消化后制成单细胞悬液, 按  $3 \times 10^5$ /孔细胞铺于 6 孔板里, 细胞铺满板底后, 用 200  $\mu$ L 枪头垂直于孔板制造细胞线性划痕, 吸去细胞培养液, PBS 洗 2 次, 洗去细胞碎片, 加入无 FBS 的培养基, 用显微镜进行拍照, 48 h 后观察迁移的距离。根据收集图片数据使用 ImageJ 软件分析实验结果。

1.2.8 双荧光素酶报告基因检测

miRanda 预测 hsa\_circ\_0004674 的潜在靶基因, TargetScan 数据库分析 miR-1254 的潜在靶基因。利用 PCR 扩增 hsa\_circ\_0004674 3'UTR 片段和 EGFR 3'UTR 片段, hsa\_circ\_0004674 克隆到 psiCHECK2 质粒中, EGFR 克隆到 pGL3 质粒中, 构建 psiCHECK2-hsa\_circ\_0004674-wt 和 pGL3-EGFR-wt 载体。用点突变试剂盒构建 psiCHECK2-hsa\_circ\_0004674-mut 和 pGL3-EGFR-mut 载体。将以上重组质粒转染至 MG63 细胞 48 h 后, 应用双荧光素酶活性检测试剂盒测定 MG63 细胞的荧光素酶活性。

1.2.9 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

按照实验要求收集细胞, 利用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA, 测定浓度后, 参照 TaKaRa 公司两步法反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA, 使用 Applied Biosystems 7300 实时 PCR 系统完成 RT-PCR, 用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法定量分析结果。实验所用的引物见表 1。

表 1 引物序列及产物大小

| 基因               | 方向 | 引物序列(5'-3')                   | 产物大小(bp) |
|------------------|----|-------------------------------|----------|
| hsa_circ_0004674 | 正向 | GTTGACCAAGCAAGCTTCCAG         | 143      |
|                  | 反向 | GGTACTTGCAGGTTTACTGGG         |          |
| miR-1254         | 正向 | AGCCUGAPDHGGAAGCUGGAGCCUGCAGU | 187      |



| 续表 1 引物序列及产物大小 |    |                          |          |
|----------------|----|--------------------------|----------|
| 基因             | 方向 | 引物序列(5′-3′)              | 产物大小(bp) |
| EGFR           | 反向 | UGCAGGCUCCAGCUUCCAGGCUUU | 297      |
|                | 正向 | AGGCACGAGTAACAAGCTCAC    |          |
| GAPDH          | 反向 | ATGAGGACATAACCAGCCACC    | 122      |
|                | 正向 | CAAGGACCTCTACGCCAACAC    |          |
|                | 反向 | GGTGCTAGGCTATGGTATCGTTC  |          |

1.2.10 Western blot

各组细胞培养 48 h 后,收集细胞,加入 RIPA,冰上裂解细胞 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,通过 BCA 法测定上清液中蛋白的浓度,按照目的蛋白大小配置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,以浓缩胶 80 V、0.5 h,分离胶 120 V、1.5 h 的程序进行电泳,结束后根据蛋白大小湿转或半干转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,室温下用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,用 TBST 按比例稀释特异性一抗,将封闭后的 PVDF 膜转移至一抗稀释液中 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,再将 PVDF 膜转移至 TBST 稀释好的二抗中,37 ℃ 孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,将 PVDF 膜置于 ECL 发光成像仪中显影照相,分析结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件分析数据,至少取 3 次独立实验结果,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  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;计数资料以百分率表示,比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

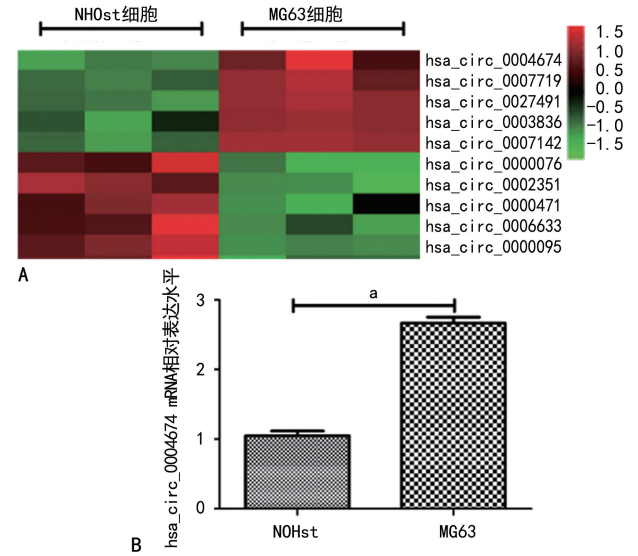
2.1 hsa\_circ\_0004674 在 MG63 细胞中的表达上调

根据热图结果可知,在 MG63 细胞中表达上调的 circRNAs 包括 hsa\_circ\_0004674、hsa\_circ\_0007719、hsa\_circ\_0027491、hsa\_circ\_0003836 和 hsa\_circ\_0007142,下调的 circRNAs 包括 hsa\_circ\_0000076、hsa\_circ\_0002351、hsa\_circ\_0000471、hsa\_circ\_0006633 和 hsa\_circ\_0000095,见图 1A。其中 hsa\_circ\_0004674 在 MG63 细胞中高表达。RT-PCR 结果显示, MG63 细胞中 hsa\_circ\_0004674 mRNA 的相对表达水平明显高于 NHOst 细胞( $P<0.01$ ),见图 1B。

2.2 hsa\_circ\_0004674 影响 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移

RT-PCR 结果显示,与 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC 组比较, hsa\_circ\_0004674 siRNA 组 hsa\_circ\_0004674 mRNA 的相对表达水平明显降低( $P<0.01$ ),见图 2。 hsa\_circ\_0004674 siRNA 组细胞增殖克隆数明显低于 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC 组

( $P<0.01$ ),见图 3A、B; hsa\_circ\_0004674 siRNA 组细胞侵袭数明显低于 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC 组( $P<0.01$ ),见图 3C、D; hsa\_circ\_0004674 siRNA 组细胞的划痕愈合率明显低于 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC 组( $P<0.01$ ),见图 3E、F。



A:热图分析 MG63、NHOst 细胞中差异表达的 circRNAs; B: RT-PCR 检测 MG63 和 NHOst 细胞中 hsa\_circ\_0004674 mRNA 的相对表达水平; <sup>a</sup>:  $P<0.01$ 。

图 1 hsa\_circ\_0004674 在 MG63 和 NHOst 细胞中的表达分析

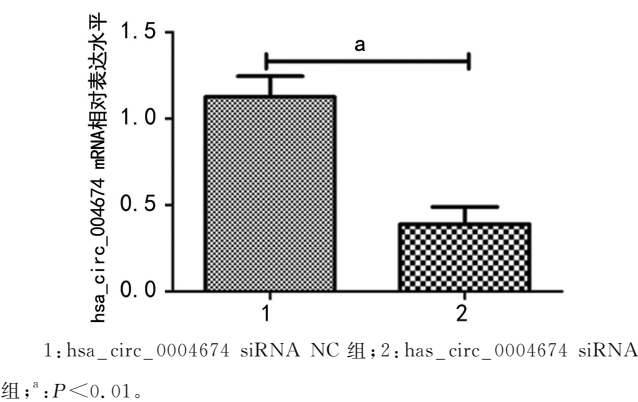


图 2 RT-PCR 检测 hsa\_circ\_0004674 mRNA 的表达情况

2.3 has\_circ\_0004674 和 miR-1254 之间的关系

miRanda 预测 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 之间的结合位点,结果显示 has\_circ\_0004674 3'UTR 与

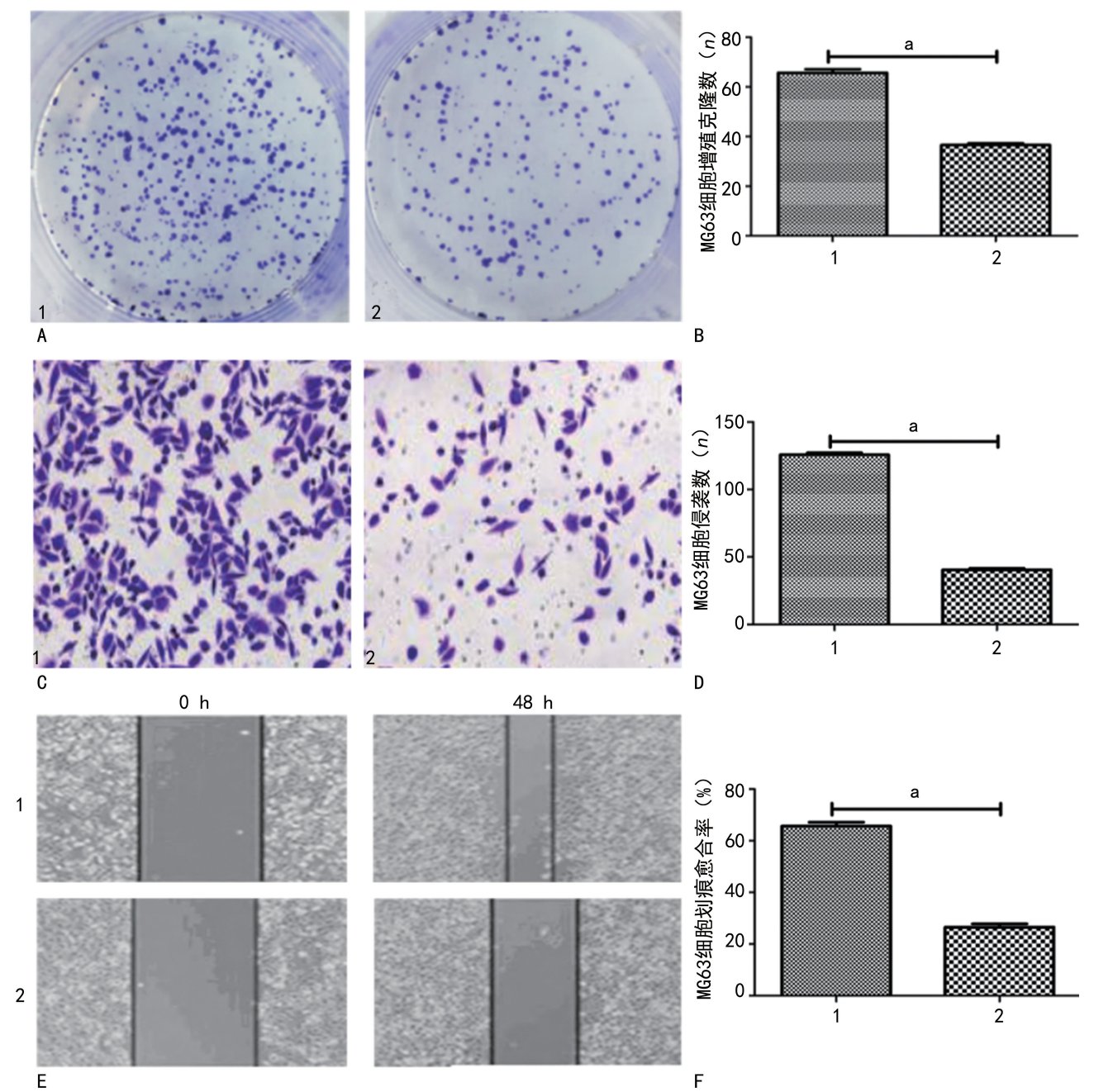


miR-1254 有结合位点,见图 4A;双荧光素酶报告系统测定 psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics NC 组、psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics 组、psiCHECK2-has\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics NC 组、psiCHECK2-hsa\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics 组中荧光素酶活性,结果显示,与 psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics NC 组比较,psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics 组荧光素酶活性显著降低( $P<0.05$ );与 psiCHECK2-has\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics NC 组比较,psiCHECK2-has

\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics 组荧光素酶活性无明显变化( $P>0.05$ ),见图 4B。

2.4 miR-1254 在 MG63 细胞中的表达

根据热图结果可知,在 MG63 细胞中表达上调的 miRNAs 包括 miR-449a、miR-181a-3p、miR-3910、miR-34b-3p 和 miR-214-3p,下调的 miRNAs 包括 miR-378i、miR-944、miR-30b-3p、miR-3158-5p 和 miR-1254,见图 5A。RT-PCR 结果显示,MG63 细胞 miR-1254 mRNA 的相对表达水平明显低于 NHOst 细胞( $P<0.01$ ),见图 5B。

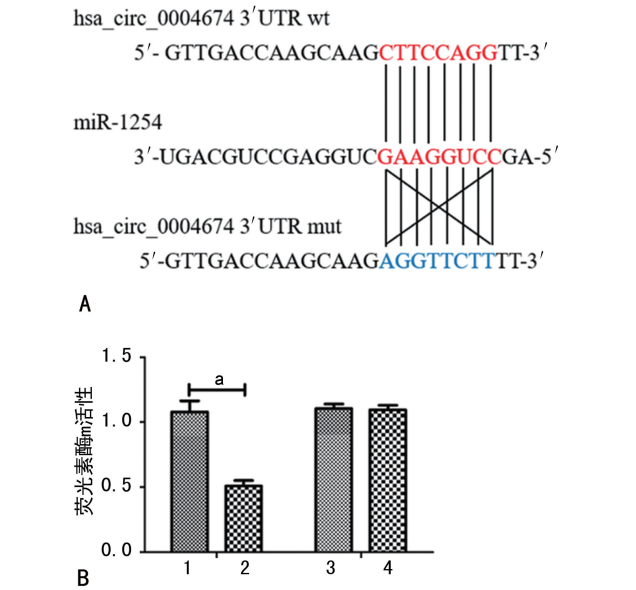


A:细胞克隆形成实验;B:细胞克隆形成实验分析图;C:细胞侵袭实验;D:细胞侵袭实验分析图;E:细胞划痕实验;F:细胞划痕实验分析图;1: hsa\_circ\_0004674 siRNA NC 组;2: hsa\_circ\_0004674 siRNA 组;<sup>a</sup>: $P<0.01$ 。

图 3 has\_circ\_0004674 对 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移的影响

2.5 has\_circ\_0004674 作为 miR-1254 的海绵对 MG63 细胞增殖、侵袭与迁移的影响

RT-PCR 结果显示,与 miR-1254 mimics NC 组比较,miR-1254 mimics 组 miR-1254 mRNA 的相对表达水平上升( $P<0.01$ ),与 miR-1254 inhibitor NC 组比较,miR-1254 inhibitor 组 miR-1254 mRNA 的相对表达水平降低( $P<0.05$ ),见图 6A。与 miR-1254 mimics NC 组比较,miR-1254 mimics 组的细胞增殖克隆数下降( $P<0.01$ ),细胞侵袭数下降( $P<0.01$ ),细胞划痕愈合率下降( $P<0.01$ );与 miR-1254 inhibitor NC 组比较,miR-1254 inhibitor 组的细胞增殖克隆数上升( $P<0.01$ ),细胞侵袭数上升( $P<0.01$ ),细胞划痕愈合率提高( $P<0.01$ );与 miR-1254 inhibitor 组比较,has\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor 组细胞增殖克隆数下降( $P<0.01$ ),细胞侵袭数下降( $P<0.01$ ),细胞划痕愈合率下降( $P<0.01$ ),见图 6B~G。



A:miRanda 预测 has\_circ\_0004674 和 miR-1254 之间的结合位点; B:荧光素酶活性; 1:psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics NC 组; 2:psiCHECK2-has\_circ\_0004674-wt+miR-1254 mimics 组; 3:psiCHECK2-has\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics NC 组; 4:psiCHECK2-has\_circ\_0004674-mut+miR-1254 mimics 组;<sup>a</sup>: $P<0.05$ 。

图 4 has\_circ\_0004674 和 miR-1254 之间的关系分析

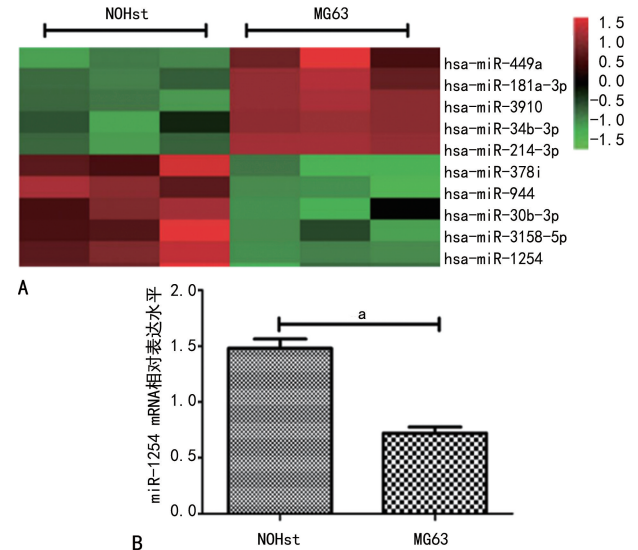
2.6 miR-1254 与 EGFR 之间的关系

RT-PCR 结果显示,与 miR-1254 mimics NC 组比较,miR-1254 mimics 组 EGFR mRNA 的相对表达水平下降( $P<0.05$ )。与 miR-1254 inhibitor NC 组比较,miR-1254 inhibitor 组 EGFR mRNA 的相对表达水平上升( $P<0.01$ ),见图 7A。TargetScan 预测 miR-1254 和 EGFR 之间的结合位点,结果显示 miR-1254 与 EGFR 3'UTR 有结合位点,见图 7B。双荧光素酶报告基因检测结果显示,与 pGL3-EGFR-wt + miR-1254 mimics NC 组比较,pGL3-EGFR-wt +

miR-1254 mimics 组荧光素酶活性明显降低( $P<0.05$ );与 pGL3-EGFR-mut + miR-1254 mimics NC 组比较,而 pGL3-EGFR-mut + miR-1254 mimics 组荧光素酶活性无明显变化( $P>0.05$ ),见图 7C。

2.7 EGFR 对 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移的影响

RT-PCR 结果显示,MG63 细胞中 EGFR mRNA 的相对表达水平高于 NHOst 细胞( $P<0.01$ ),见图 8。EGFR siRNA 组细胞增殖克隆数明显低于 EGFR siRNA NC 组( $P<0.01$ ),见图 9A、B;EGFR siRNA 组细胞侵袭数明显低于 EGFR siRNA NC 组( $P<0.01$ ),见图 9C、D;EGFR siRNA 组细胞划痕愈合率明显低于 EGFR siRNA NC 组( $P<0.01$ ),见图 9E、F。



A:热图分析 MG63 和 NHOst 细胞中差异表达的 miRNAs; B: RT-PCR 检测 MG63 和 NHOst 细胞中 miR-1254 mRNA 的相对表达水平;<sup>a</sup>: $P<0.01$ 。

图 5 miR-1254 在 MG63 和 NHOst 细胞中的表达分析

2.8 EGFR 过表达逆转 miR-1254 过表达对 MG63 细胞活力、凋亡的作用

由 CCK-8 实验结果可知,与 miR-1254 mimics NC 组比较,miR-1254 mimics 组的细胞活力降低( $P<0.05$ )。与 miR-1254 mimics 组比较,miR-1254 mimics+pcDNA-EGFR 组细胞活力上升( $P<0.05$ )。EGFR 过表达逆转了 miR-1254 过表达对 MG63 细胞活力的影响,见图 10A。Western blot 检测结果显示,与 miR-1254 mimics NC 组比较,miR-1254 mimics 组 Bax 表达水平升高,Bcl-2 表达水平降低;与 miR-1254 mimics 组比较,miR-1254 mimics + pcDNA-EGFR 组 Bax 表达水平降低,Bcl-2 表达水平升高,EGFR 过表达逆转了 miR-1254 过表达对 MG63 细胞凋亡相关蛋白的影响,见图 10B。



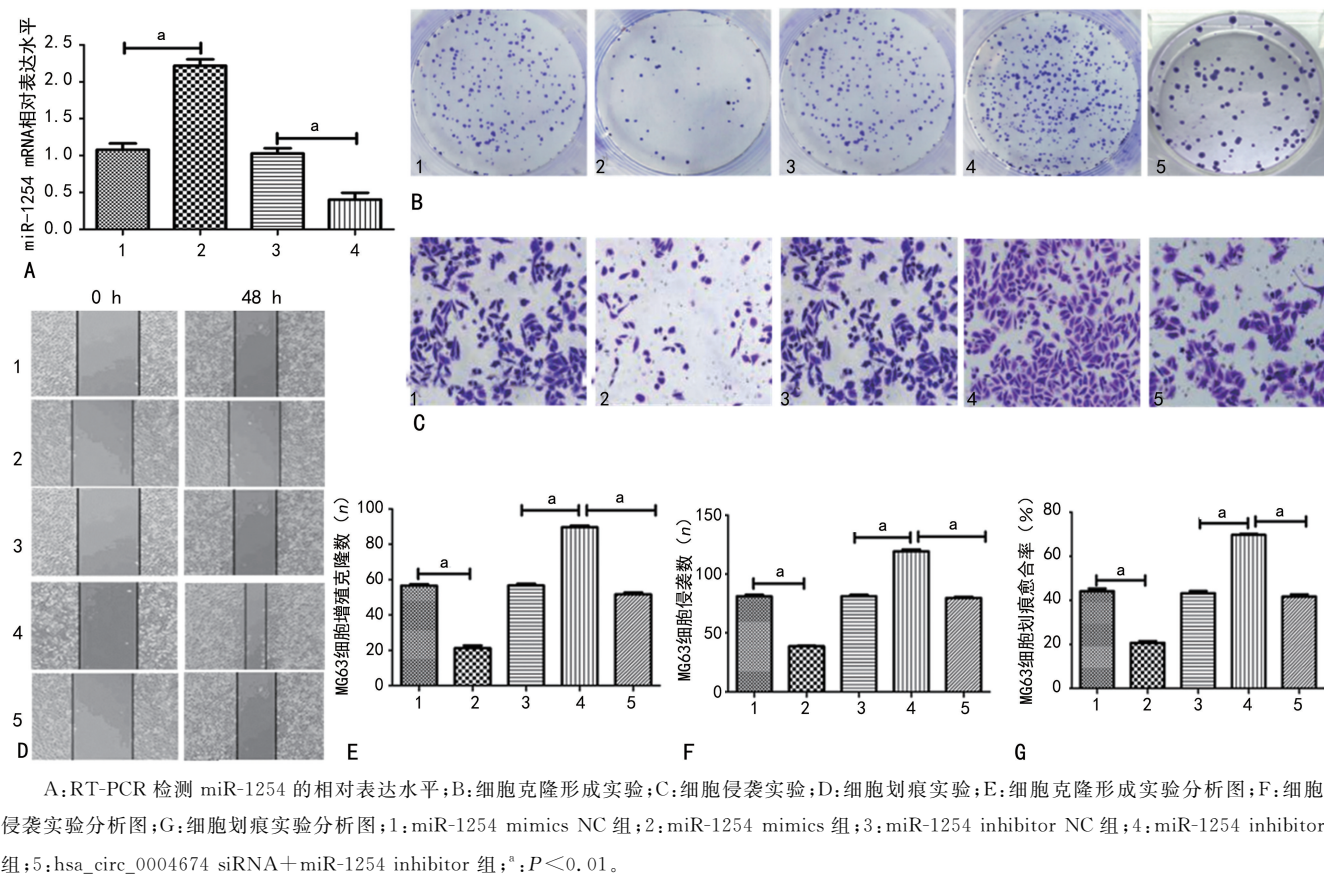


图 6 hsa\_circ\_0004674 作为 miR-1254 的海绵对 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移的影响

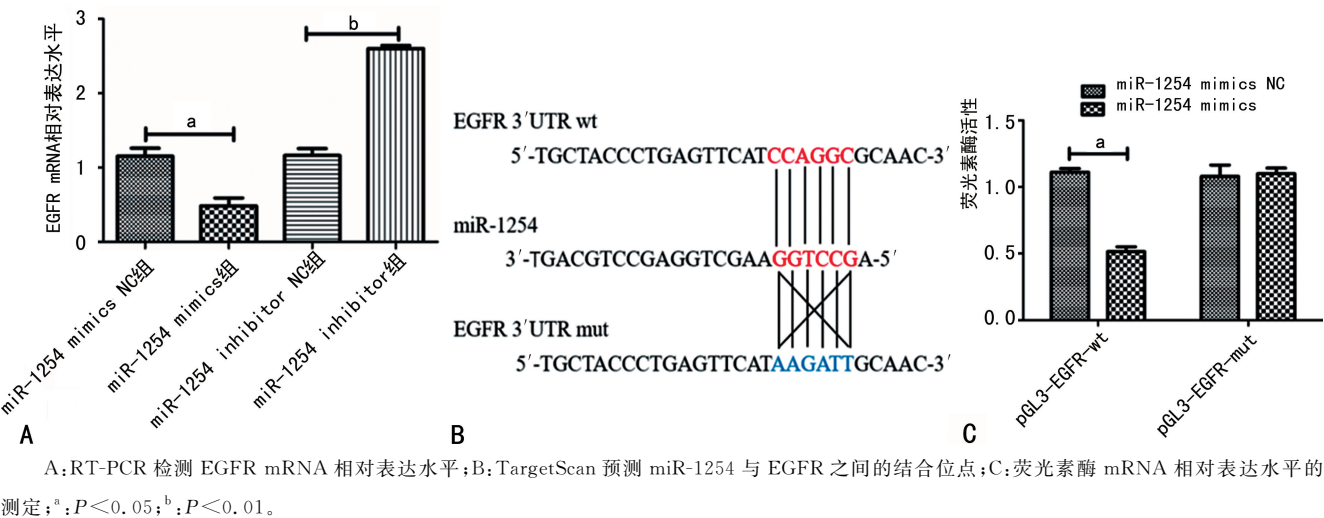


图 7 miR-1254 与 EGFR 之间的关系

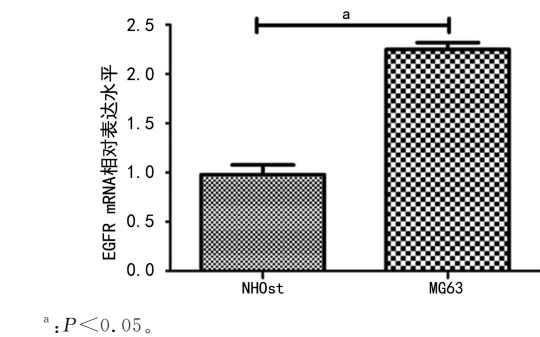


图 8 RT-PCR 检测 EGFR mRNA 的相对情况

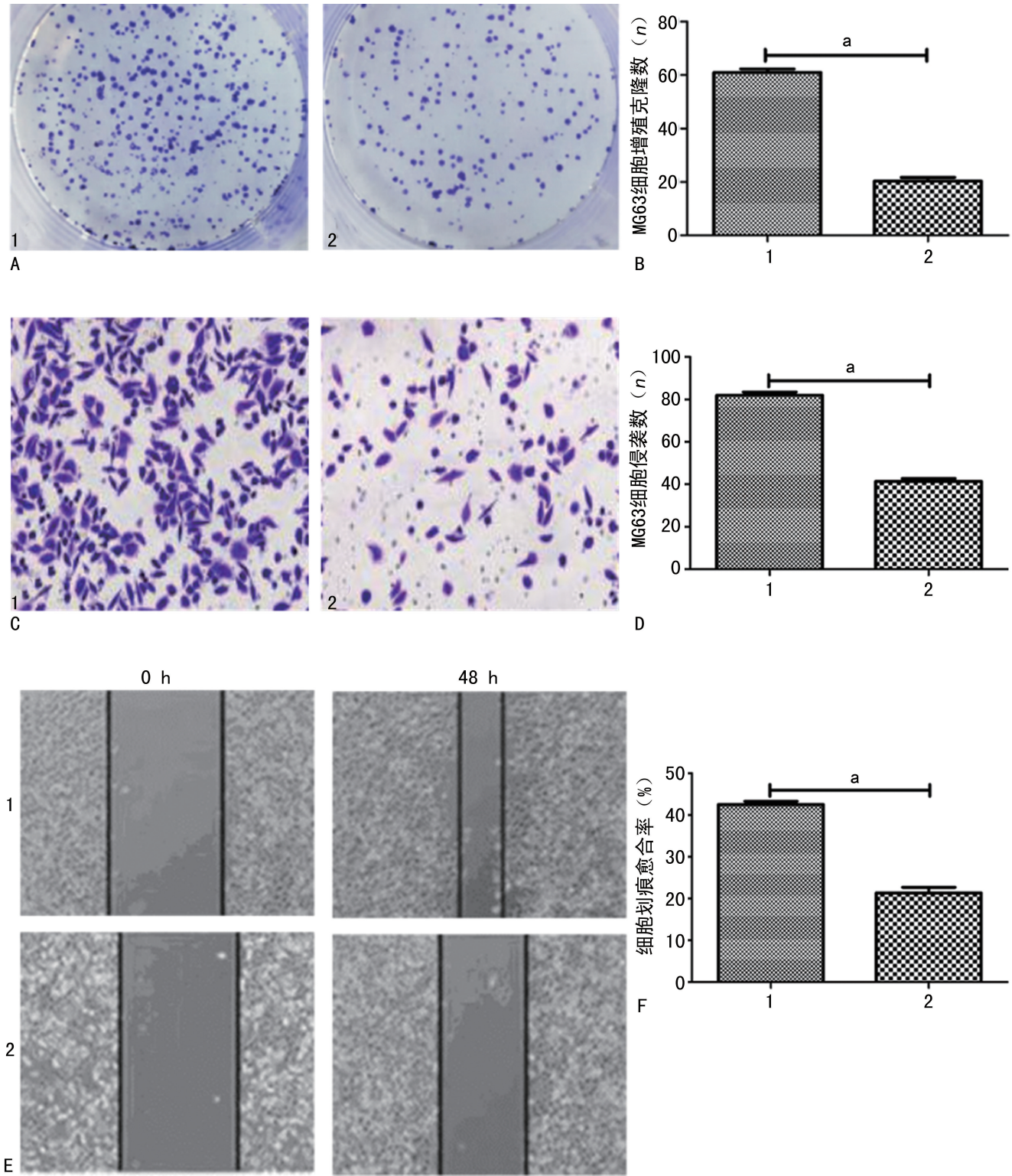
2.9 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 对 EGFR 表达的影响

Western-blot 检测 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 对 EGFR 表达的影响。与 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor NC 组比较,hsa\_circ\_0004674 siRNA + miR-1254 inhibitor NC 组 EGFR 表达水平明显降低,hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor 组 EGFR 表达水平明显升高;与 pcDNA-3.1 (+)+miR-1254 mimics NC 组比较,pcDNA-hsa\_circ\_0004674+miR-1254 mimics NC 组



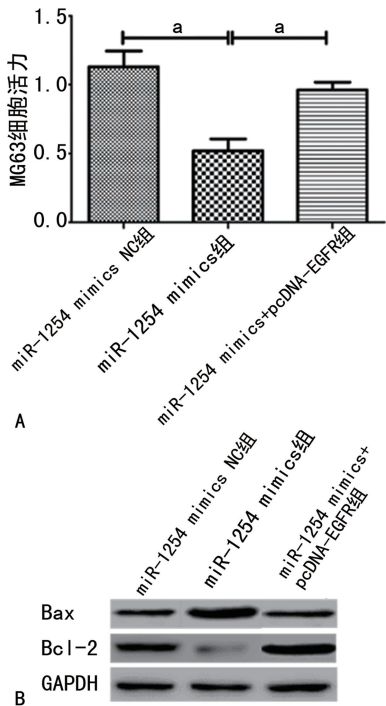
EGFR 表达水平明显升高, pcDNA-3.1(+)+miR-1254 mimics 组 EGFR 表达水平明显降低, 见图 11A。与 hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor NC 组比较, hsa\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor NC 组 EGFR 表达水平明显降低, hsa\_circ\_

0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor 组 EGFR 表达水平明显升高; 和 hsa\_circ\_0004674 siRNA+inhibitor NC 组比较, hsa\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor 组 EGFR 表达水平明显升高, 见图 11B。



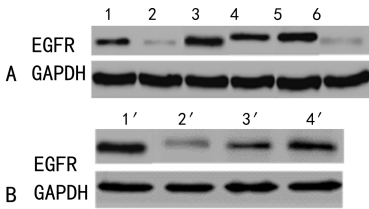
A: 细胞克隆形成实验; B: 细胞克隆形成实验分析图; C: 细胞侵袭实验; D: 细胞侵袭实验分析图; E: 细胞划痕实验; F: 细胞划痕实验分析图; 1: EGFR siRNA NC 组; 2: EGFR siRNA 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ 。

图 9 EGFR 对 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移的影响



A: CCK-8 法检测 MG63 的细胞活力; B: Western blot 检 MG63 细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达情况; <sup>a</sup>:  $P<0.05$ 。

图 10 EGFR 过表达逆转 miR-1254 过表达对 MG63 细胞活力、凋亡的作用



1: hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor NC 组; 2: hsa\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor NC 组; 3: hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor 组; 4: pcDNA-3.1(+)+miR-1254 mimics NC 组; 5: pcDNA-hsa\_circ\_0004674+miR-1254 mimics NC 组; 6: pcDNA-3.1(+)+miR-1254 mimics 组; 1': hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor 组; 2': hsa\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor NC 组; 3': hsa\_circ\_0004674 siRNA NC+miR-1254 inhibitor NC 组; 4': hsa\_circ\_0004674 siRNA+miR-1254 inhibitor 组。

图 11 Western blot 检测 hsa\_circ\_0004674 和 miR-1254 对 EGFR 表达的影响

3 讨 论

骨肉瘤是临床最常见的恶性肿瘤之一,近些年来其发病率不断上升,危害性很大,且易转移和复发,患者出现转移后生存率仅有 20% 或者更低<sup>[14]</sup>。手术切除和术后放化疗等方法都无法有效解决术后局部复发和转移的问题,因此深入研究骨肉瘤的致病机制至关重要。

circRNA 是非编码 RNA,呈环状结构,在转录及转录后水平参与基因表达调控<sup>[15]</sup>。近年研究发现, circRNA 与细胞分化、凋亡等肿瘤生物学行为密切相关,如 has\_circ\_100876 能够结合 miR-136,抑制 miR-

136 的生物学功能,进而促进骨肉瘤细胞的增殖<sup>[16]</sup>。研究表明 has\_circ\_000467 在骨肉瘤细胞中高表达,是骨肉瘤化疗的候选靶点<sup>[17]</sup>,因此, circRNA 在骨肉瘤发生发展中发挥着重要作用。本研究中,笔者通过微阵列分析筛选发现 hsa\_circ\_0004674 在 MG63 细胞中高表达,且 has\_circ\_000467 影响 MG63 细胞的增殖、侵袭和迁移,随后笔者使用 miRanda 预测出 hsa\_circ\_0004674 的作用靶点是 miR-1254。研究报道 miRNA 与肿瘤发生发展密切相关,如 miR-1254 可以抑制 n340790 对甲状腺癌细胞的增殖和侵袭作用<sup>[18]</sup>,且 circRNA 上具有与 miRNA 结合的位点,能够作为 miRNA 的分子海绵在肿瘤发生发展过程中发挥作用<sup>[19-20]</sup>。本研究发现 hsa\_circ\_0004674 能够调控 miR-1254 的表达,从而对 MG63 细胞的增殖、侵袭与迁移产生影响。随后笔者通过 TargetScan 分析和双荧光素酶报告基因检测,发现 miR-1254 和 EGFR 特异性结合。

EGFR 是原癌基因的表达产物,研究表明 EGFR 在肿瘤发生过程中具有一定作用,如 EGFR 与骨肉瘤的发生发展有关,其表达能够作为判断骨肉瘤恶化程度的指标<sup>[21]</sup>。EGFR 信号传导调节颅咽管瘤中的肿瘤细胞迁移<sup>[22]</sup>。EGFR 受 c-Jun 的调节,而 c-Jun 控制皮肤肿瘤的形成<sup>[23]</sup>。EGFR 和 SGLT1 的共表达与口腔鳞状细胞癌的肿瘤分化有关<sup>[24]</sup>。EGFR 在肝癌中过表达,且其过表达与肝细胞癌变相关<sup>[25]</sup>。EGFR 的阻断能够抑制多种人类癌细胞系的生长<sup>[26]</sup>。当笔者研究 EGFR 在骨肉瘤中的作用时发现,EGFR 在 MG63 细胞中高表达,EGFR 过表达可逆转 miR-1254 过表达对 MG63 细胞活力及凋亡的影响,且 miR-1254 能够靶向 EGFR 调控骨肉瘤细胞的增殖、侵袭与迁移。最后笔者通过 Western blot 检测发现敲低 hsa\_circ\_0004674 可抑制 EGFR 表达,而 miR-1254 抑制剂可逆转这一现象,表明三者调控骨肉瘤细胞的增殖、侵袭与迁移过程中关系密切。

综上所述, hsa\_circ\_0004674 通过 miR-1254 调控 EGFR 的表达,从而调控骨肉瘤细胞的增殖、侵袭与迁移。然而此作用机制可能仅仅是一方面,有关 hsa\_circ\_0004674、miR-1254 和 EGFR 三者间的关系需要进一步探讨,为其在骨肉瘤的临床靶向治疗中的应用提供更多的理论依据。

参考文献

[1] DAVID J P, JEAN-PIERRE J, MEHIC D, et al. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development [J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 664-672.  
[2] CHOU A J, GELLER D S, GORLICK R. Ther-

- apy for osteosarcoma; where do we go from here? [J]. *Pediatr Drugs*, 2008, 10(5):315-327.
- [3] JAWAD M U, CHEUNG M C, CLARKE J, et al. Osteosarcoma: improvement in survival limited to high-grade patients only [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4):597-607.
  - [4] KEMPF-BIELACK B. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the cooperative osteosarcoma study group (COSS) [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 23(3):559-568.
  - [5] THOMAS B H, ERIK D W, JESPER B B, et al. miRNA-dependent gene silencing involving ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21):4414-4422.
  - [6] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e30733.
  - [7] 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.
  - [8] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 495(7441):384-388.
  - [9] KUSHLINSKII N E, FRIDMAN M V, BRAGA E A, et al. Molecular mechanisms and microRNAs in osteosarcoma pathogenesis [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(4):315-328.
  - [10] SAMPSON V B, YOO S, KUMAR A, et al. MicroRNAs and potential targets in osteosarcoma: review [J]. *Front Pediatr*, 2015(3):69-82.
  - [11] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, et al. Cell-Type specific features of circular RNA expression [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9):32-47.
  - [12] DENG N, LI L, GAO J, et al. Hsa\_circ\_0009910 promotes carcinogenesis by promoting the expression of miR-449a target IL6R in osteosarcoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017;495(1):189-196.
  - [13] 朱昆鹏, 张春林, 马小龙. 高通量测序筛选与骨肉瘤化疗耐药相关的环状 RNA 分子表达谱 [J]. *中华骨科杂志*, 2019, 39(6):336-345.
  - [14] KAGER L, ZOUBEK A, PÖTSCHGER U, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(10):2011-2018.
  - [15] 王坚, 黄嘉楠, 宋元林, 等. 环状 RNA 的研究新进展 [J]. *生命科学*, 2017, 29(11):1141-1148.
  - [16] 金健. 环状 RNA circRNA\_100876 通过抑制 miRNA-136 调控骨肉瘤细胞的增殖能力 [D]. 广州:南方医科大学, 2019.
  - [17] ZHU K P, MA X L, ZHANG L, et al. Screening circular RNA related to chemotherapeutic resistance in osteosarcoma by RNA sequencing [J]. *Epigenomics*, 2018, 10(10):1327-1346.
  - [18] LI Q, SHEN W, LI X, et al. The lncRNA n340790 accelerates carcinogenesis of thyroid cancer by regulating miR-1254 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(5):2181-2194.
  - [19] 翟乃祥, 任秀智, 鲁艳芹, 等. CircRNA 与骨相关疾病 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(6):836-840.
  - [20] 陈明达, 胡万宁, 孙国贵. 环状 RNA 的研究意义和功能及与肿瘤的关系 [J]. *医学综述*, 2017, 23(1):21-24.
  - [21] 杜振广, 肖明明, 景士兵. EGFR 在骨肉瘤中的表达、基因扩增及其临床意义 [J]. *实用骨科杂志*, 2015, 22(4):328-330, 375.
  - [22] HÖLSKEN A, GEBHARDT M, BUCHFELDER M, et al. EGFR signaling regulates tumor cell migration in craniopharyngiomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13):4367-4377.
  - [23] ZENZ R, SCHEUCH H, MARTIN P, et al. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling [J]. *Dev Cell*, 2003, 4(6):879-889.
  - [24] HANABATA Y, NAKAJIMA Y, MORITA K, et al. Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma [J]. *Odontology*, 2012, 100(2):156-163.
  - [25] 余深平, 杨建勇, 陈伟, 等. 经下腔静脉肝内穿刺介入操作的临床应用 [J]. *中山医科大学学报(医学版)*, 2006, 16(1):79-82.
  - [26] NORMANNO N, BIANCO C, LUCA A D, et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(1):1-21.