



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research New Technology of Tumor Diagnosis and Treatment—Article

敲低特异性环状非编码 RNA 显著抑制骨肉瘤的进展

王世东^{a,b,#}, 张红亮^{c,#}, 李博^d, 陈成龙^{a,b}, 任婷婷^{a,b}, 黄怡^{a,b}, 刘凯^{d,e,*}, 李敬敬^{d,*}, 郭卫^{a,b,*}

^a Musculoskeletal Tumor Center, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

^b Beijing Key Laboratory of Musculoskeletal Tumor, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

^c Department of Spine Surgery and Musculoskeletal Tumor, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

^d State Key Laboratory of Rare Earth Resource Utilization, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

^e Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 October 2021

Revised 24 November 2021

Accepted 8 December 2021

Available online 4 January 2022

关键词

非编码 RNA

骨肉瘤

circRNA

分子机制

敲低

摘要

骨肉瘤是一种间充质组织来源的恶性肿瘤,好发于儿童和青少年,发生肺转移常导致患者死亡。关于骨肉瘤进展的机制仍不清楚。因此,迫切需要开发新的骨肉瘤治疗靶点和治疗模式。异常表达的非编码环状 RNA (circRNA) 对骨肉瘤的发生和发展至关重要。本研究的目的是探索一种新的 circRNA circ_000203 在骨肉瘤中的表达和作用,阐明其潜在机制。我们发现,在骨肉瘤细胞系和组织中 circ_000203 高表达,并且 circ_000203 敲低显著抑制了体外和体内的骨肉瘤进展。此外,我们发现 circ_000203 是 miR-26b-5p 的海绵,而 miR-26b-5p 是骨形态发生蛋白受体 2 (BMP2) 的上游调节因子。因此, BMP2 的过表达可以减轻对骨肉瘤进展的抑制作用。这表明,敲低 circ_000203 可通过 miRNA 介导的 BMP2 下调抑制骨肉瘤的进展。我们的发现为理解骨肉瘤的发生和发展提供了重要的见解。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

骨肉瘤是一种好发于儿童和青少年的恶性间叶组织肿瘤[1–3]。尽管近年来生存率显著提高,但许多患者的预后仍然不尽如人意[4]。此外,骨肉瘤存在多药耐药、肺转移和肿瘤复发等多种挑战[5]。因此,迫切需要开发骨肉瘤的新治疗靶点和治疗模式。

环状 RNA (circRNAs) 具有独特的环状结构,异常表达的 circRNAs 是调节各种肿瘤中多种生物学过程的关键基因[6–9]。例如, circ0001320 可以通过 miR-558 的海

绵样作用调节肿瘤坏死因子 (TNF) - α 诱导的蛋白 1 和肌动蛋白 1, 抑制肺癌细胞的生长和转移[10]。据报道, circRNA 001306 通过 miR-584-5p 的海绵样作用增加细胞周期依赖性激酶 16 (CDK16) 的表达, 促进肝细胞癌 (HCC) 的生长[11]。Peng 等[12]最近报道了 circCUL2 通过 miR-142-3p/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 2 (ROCK2) 激活自噬来调节胃癌的恶性转化和顺铂耐药。此外,越来越多的证据表明 circRNAs 在骨肉瘤的进展中起着关键作用[13–14]。Shen 等[15]揭示了环状内皮素转化酶 1 (circECE1) 通过癌基因 *c-Myc* 调节骨肉瘤的能量代谢。Li 等[16]报道了

* Corresponding authors.

E-mail addresses: kailiu@tsinghua.edu.cn (K. Liu), jjingli@ciac.ac.cn (J. Li), bonetumor@163.com (W. Guo).

These authors contributed equally to this work.

circ_0000282 通过 miR-192/X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP) 轴调节骨肉瘤细胞增殖。Pan 等[17]证明了 circ_0028171 可以通过 miR-218-5p/ κ B 激酶 β (IKK β) 轴促进骨肉瘤进展。然而, 一些 circRNAs 在骨肉瘤中的表达和作用仍然不清楚。

circ_000203 是一种 685 个核苷酸 (nt) 长的环状 RNA, 位于 chr10:888871~931700, 并从 La 核糖核蛋白 4B (*LARP4B*) 基因的外显子中剪切[18]。*LARP4B* 已被报道在多种肿瘤类型中发挥重要作用[19]。此外, circ_000203 的异常表达已与心肌纤维细胞中的心肌肥厚和纤维化相关联[18,20]。然而, circ_000203 在骨肉瘤中的表达和作用仍需进一步阐明。我们前期观察到, 与对照组的组织相比, circ_000203 在骨肉瘤组织和细胞中高表达。因此, 本研究的目的是探索 circRNA (circ_000203) 在骨肉瘤中的表达和作用, 并阐明其潜在机制。

2. 材料和方法

2.1. 研究参与者和样本采集

本研究共收集了来自北京大学人民医院的 20 例健康骨组织和 40 例普通型骨肉瘤组织。我们获得了所有研究参与者的书面知情同意, 并获得了北京大学人民医院伦理委员会的批准。

2.2. 细胞培养和转染

骨肉瘤细胞系 143 B、KHOS、HOS、U2OS、SAOS2 和 MG63 细胞系以及健康人骨母细胞 (hFOB) 细胞系均从美国菌种保藏中心 (ATCC) 购买。143 B 和 hFOB 细胞在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 中培养。其他细胞系在含 10% FBS 的 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养基中培养, 并在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下孵育。miR-26b-5p mimic/inhibitor、shRNA-circ_000203 和过表达骨形成蛋白受体 2 (BMPR2) 的质粒载体均购自吉玛基因公司, 并使用脂质体 3000 进行转染。shRNA-circ_000203 序列为: (F) 5'-GUC-GUGUGUGAAUAUCCUACG-3', (R) 5'-UAUAAUAUCACACAGCACUG-3'; shRNA- 阴性对照序列为: (F) 5'-TTCTCCGAACGTGTACGTAA-3', (R) 5'-TTACGTGACACGTTCCGAGAA-3'。miR-26b-5p mimic 序列为: 5'-UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU-3'; miR-26b-5p inhibitor 序列为: 5'-ACCUAUCCUGAAUACUUGAA-3'。

2.3. 定量反转录聚合酶链反应

使用 RNeasy Plus 通用试剂盒 (Qiagen, 德国) 提取 RNA, 并使用无核酸酶 (RNase) 的去氧核糖核酸酶 (DNase) (Qiagen) 去除基因组 DNA。然后, 根据生产厂家的说明, 使用 iTaq 通用单步 RT-qPCR 试剂盒 (Bio-Rad, 美国) 进行定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析。U6 小核 RNA 和 β -actin 分别用作 microRNA (miRNA) 和其他 mRNA 的内源控制。使用 Bio-Rad CFX96 软件分析数据, 并将其表示为三次独立实验的平均值, 每次实验重复测量三次。引物序列列于表 1 中。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Primers	Direction	Sequences (5'-3')
circ_000203	F	AAGAGAAGTACAGATTGCTTCA
	R	CTCTTCTTAACTTCTAATAATTC
BMPR2	F	CACCTCCTGACACAACACCACTC
	R	TGCTGCTGCCTCCATCATGTTC
β -actin	F	GTCAGGTCATCACTATCGGCAAT
	R	AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT
miR-26b-5p	F	TTCAAGTAATTCAGGATAGGT
	R	GTGCGTGTCTGGAGTC
U6	F	CTCGCTTCGGCAGCACACA
	R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.4. 蛋白质印迹法

蛋白质印迹法 (Western blotting) 是按此前描述过的方法[21]进行的。使用抗人 BMPR2 (1:1000; Abcam, 英国) 和抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH; 1:1000; Santa Cruz, 美国) 抗体。使用美国国立卫生研究院 (NIH) ImageJ 软件 (Bethesda, 美国) 定量条带的灰度。所有实验均进行了三次。数据以三次独立实验的平均值呈现。

2.5. 细胞活性检测和克隆形成实验

转染后的骨肉瘤细胞被分散到 96 孔板中 (每孔 5×10^3 个细胞)。根据使用说明, 连续三天每日使用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, Dojindo, 日本) 评估细胞的活力。对于克隆形成实验, 转染的骨肉瘤细胞在完全培养基中培养 5 天。PBS 冲洗和固定后, 使用 0.1% 的结晶紫染料进行细胞染色。所有实验均重复三次。

2.6. Transwell 实验和划痕愈合实验

对于 Transwell 实验, 将 5×10^4 个转染的骨肉瘤细胞种植在涂/未涂基质胶的上层室 (BD Biosciences, 美国) 中。24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞三次, 然后使用 4% 的多聚甲醛进行固定。然后, 用 0.1% 的结晶紫染色并在倒置显

显微镜下观察。对于划痕愈合实验，将转染的骨肉瘤细胞接种到6孔板中，然后在板上进行划痕。随后对细胞进行培养，并在0和24 h拍照。所有实验均重复三次。

2.7. 双荧光素酶报告实验

将 *BMP2* 或 *circ_000203* 3'-未翻译区域的序列克隆到 *PmirGLO* 荧光素酶报告载体中，含有突变或野生型 (WT) *miR-206* 结合位点，如先前所述[22]。然后，将载体和 *miRNA mimic* 或 *NC* 共转染到骨肉瘤细胞中，并评估荧光素酶活性。所有实验均重复三次。

2.8. 免疫组织化学

实验方案如先前所述[2,21]。本研究使用抗人 *BMP2* (1:80) 抗体，并由两名独立病理学家评估结果。所有实验均重复三次。

2.9. RNA 印迹法和 RNase R 实验

RNA 印迹法 (Northern blotting): 使用 *TRIzol* (*Invitrogen*, 美国) 从骨肉瘤组织中提取 RNA。用 *Biotin RNA Labeling Mix* (*Roche Applied Science*, 德国) 制备 *circ_000203* 和 18S 探针，用于 Northern blotting。RNase R 处理: 将 10 μ g RNA 与 40 单位 (U) RNase R 混合，于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。使用 qRT-PCR 评估 *circ_000203* 和 *LARP4B* mRNA 的表达水平和稳定性。所有实验均重复三次。

2.10. 肿瘤异种移植实验

随机选取 10 只雌性 BALB/c 裸鼠，分成两组 ($n=5$) 来评估 *circ_000203* 在体内骨肉瘤细胞中的作用。简单来说，将 5×10^6 个 shRNA-*circ_000203* 或 shRNA-NC 转染的 143 B 细胞皮下注射到小鼠的左侧。然后，我们使用游标卡尺测量肿瘤大小，每隔 5 d 测量一次，持续 15 d。最后，所有小鼠被处死并用于进一步实验。所有动物实验均获得北京大学人民医院动物护理和使用委员会的批准。

2.11. 统计分析

数据分析使用 *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, Inc.*, 美国) 进行，所有结果均表示为平均值 \pm 标准偏差。组间差异采用 Student's *t* 检验分析，当 *p* 值小于 0.05 或 0.01 时，结果被视为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. *circ_000203* 敲低通过调控 *miR-26b-5p/BMP2* 阻止骨肉瘤进展

简而言之，将 shRNA-*circ_000203* 转染到骨肉瘤细

胞中，显著下调了 *circ_000203* 的表达，从而释放大量的与其竞争结合的 *miR-26b-5p*。*miR-26b-5p* 的过度表达抑制了 *BMP2* 的表达，该基因已知能够诱导肿瘤增殖标志物 *Ki67* 的下调、肿瘤转移相关蛋白 N 端黏附蛋白的下调以及新血管生成生物标志物 *CD31* 群集的下调 [23]。因此，*circ_000203* 敲低显著抑制了骨肉瘤的进展 (图 1)。

3.2. *circ_000203* 基因沉默抑制体外骨肉瘤细胞的恶性进展

如图 2 (a) 所示，*circ_000203* 起源于 *LARP4B* 基因的 6 个外显子，成熟长度为 685 nt。qRT-PCR 结果表明，与正常组织相比，骨肉瘤组织中 *circ_000203* 的表达水平较高 [图 2 (b)]。随后，我们选择三对骨肉瘤组织样本进行 Northern 印迹，发现肿瘤组织中 *circ_000203* 显著过表达 [图 2 (c)]。接着，我们使用 6 种不同的骨肉瘤细胞系通过 qRT-PCR 检测 *circ_000203* 的表达 [图 2 (d)]。选择的骨肉瘤细胞表达的 *circ_000203* 比成骨细胞 hFOB 更多。由于这些骨肉瘤细胞系来源于表现出不同恶性程度的骨肉瘤患者，因此 *circ_000203* 的表达水平倾向于有所变化。具体来说，143 B 和 KHOS 表现出最高的 *circ_000203* 表达水平，因此选择这些细胞系进行进一步实验。此外，我们使用 RNase R 验证 *circ_000203* 的闭环结构，发现 *circ_000203* 不会被 RNase R 消化，而线性的 *LARP4B* 则被消化 [图 2 (e) 和附录 A 的图 S1]。然后，使用 shRNA 进行 *circ_000203* 基因沉默，并通过 qRT-PCR 进行评估 [图 2 (f)]。CCK-8 实验 (附录 A 的图 S2) 和克隆形成实验 (附录 A 的图 S3) 表明 *circ_000203* 的沉默抑制了骨肉瘤细胞的增殖。根据划痕实验的结果，*circ_000203* 的沉默抑制了 143 B 和 KHOS 细胞的迁移 [图 2 (g) 和附录 A 的图 S4]。此外，Transwell 实验的结果显示，*circ_000203* 的沉默抑制了骨肉瘤细胞的迁移和侵袭 [图 2 (h) 和附录 A 的图 S5]。

3.3. 敲低 *circ_000203* 在体内抑制骨肉瘤进展

为了评估 *circ_000203* 在体内对骨肉瘤发生的作用，利用转染 shRNA-*circ_000203* 或 shRNA-NC 的 143 B 细胞建立了小鼠异种移植模型。如图 3 (a) ~ (c) 和附录 A 中的图 S6 所示，shRNA-*circ_000203* 表现出明显的抗肿瘤行为并减缓了肿瘤生长速率。此外，还在收集的异种移植瘤中评估了 *circ_000203*、*Ki67*、N-cadherin、E-cadherin 和 *CD31* 的表达水平。与 NC 组相比，*circ_000203* 在敲低组的肿瘤中显著下调 [图 3 (d)]。此外，免疫组织化学实验表明，肿瘤转移相关蛋白 N-cadherin、肿瘤增殖标志物

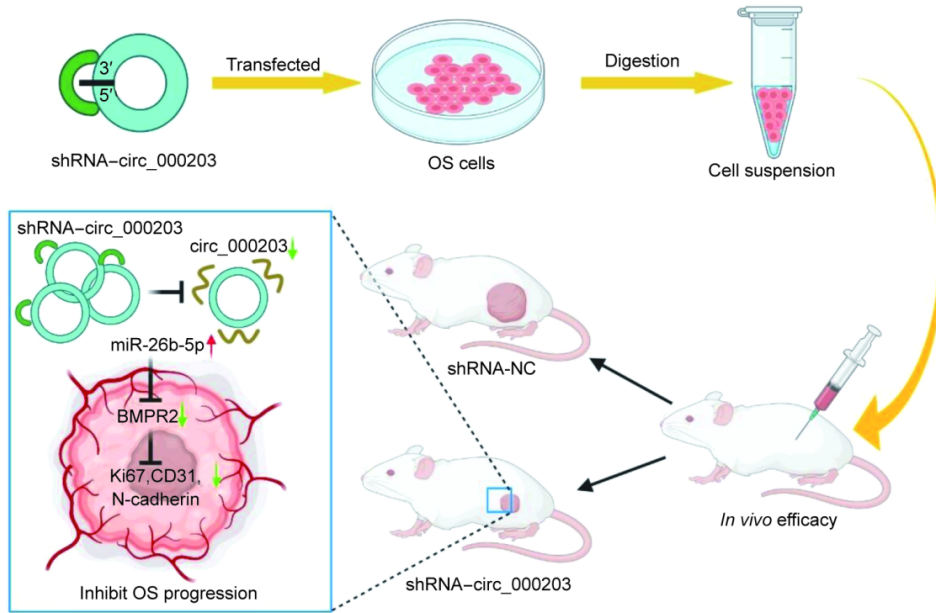


图 1. shRNA-circ_000203 基因沉默的示意图，通过 miR-26b-5p/BMRP2 通路抑制骨肉瘤的发展。将 shRNA-circ_000203 转染到骨肉瘤细胞中，沉默 circ_000203 或 NC 细胞后，将其消化并皮下植入裸鼠体内形成异种移植模型。两周后，shRNA-circ_000203 的基因沉默显著抑制骨肉瘤的进展。在骨肉瘤细胞中，shRNA-circ_000203 显著下调 circ_000203，其海绵吸附的 miR-26b-5p 被大量释放。miR-26b-5p 的过度释放显著降低靶基因 BMRP2 的表达，进一步导致肿瘤增殖标志物 Ki67、肿瘤转移相关蛋白 N-钙黏蛋白和新生血管生物标记 CD31 的表达下调，从而抑制骨肉瘤的进展。

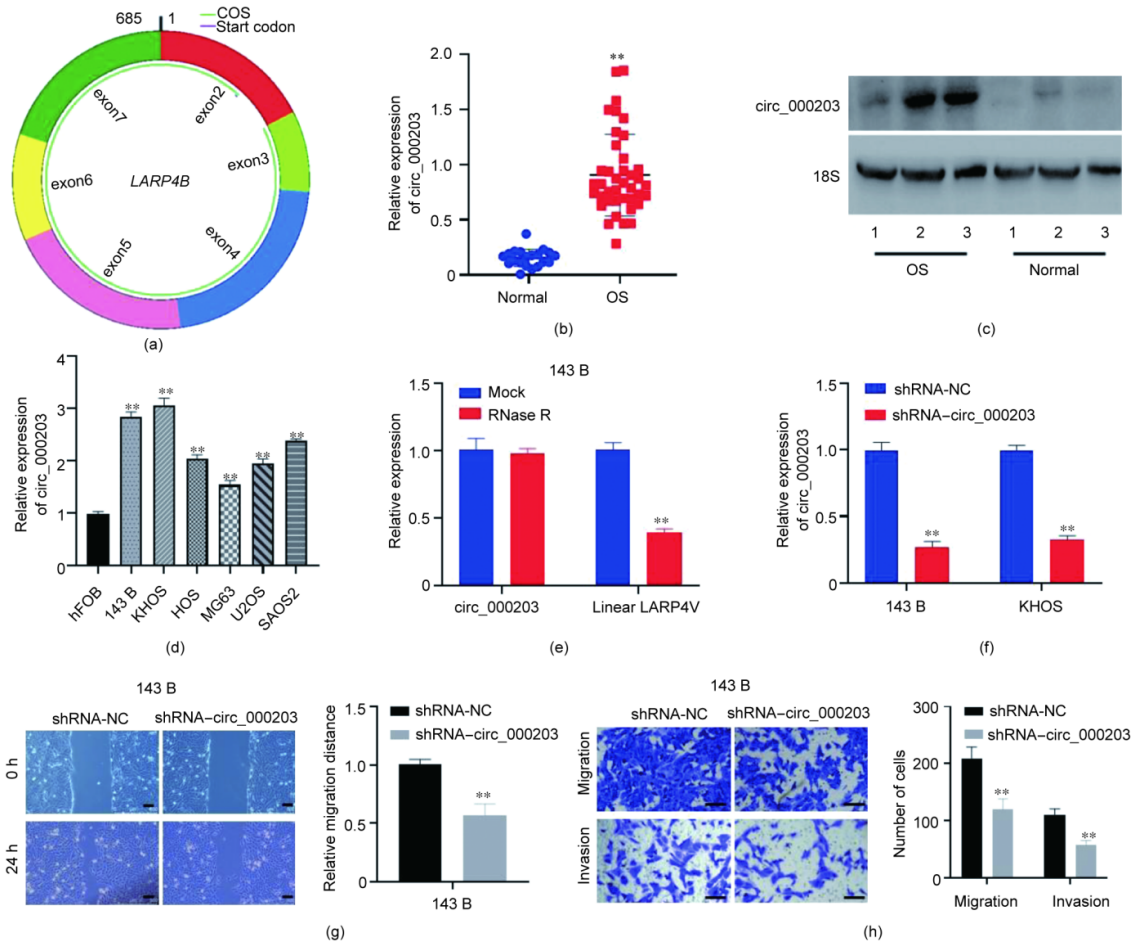


图 2. circ_000203 在骨肉瘤中高表达，circ_000203 敲除抑制骨肉瘤细胞的恶性进展。(a) circ_000203 的示意图；(b) circ_000203 的表达情况；(c) Northern 印迹；(d) 骨肉瘤细胞比 hFOB 细胞表达更高水平的 circ_000203；(e) RNase R 验证了 circ_000203 的闭环结构；(f) 通过 qRT-PCR 检测到的骨肉瘤细胞中 circ_000203 的敲除；(g) 划痕愈合实验的结果；(h) Transwell 实验结果。比例尺=100 μm。***p* < 0.01。CDS: 编码域序列。

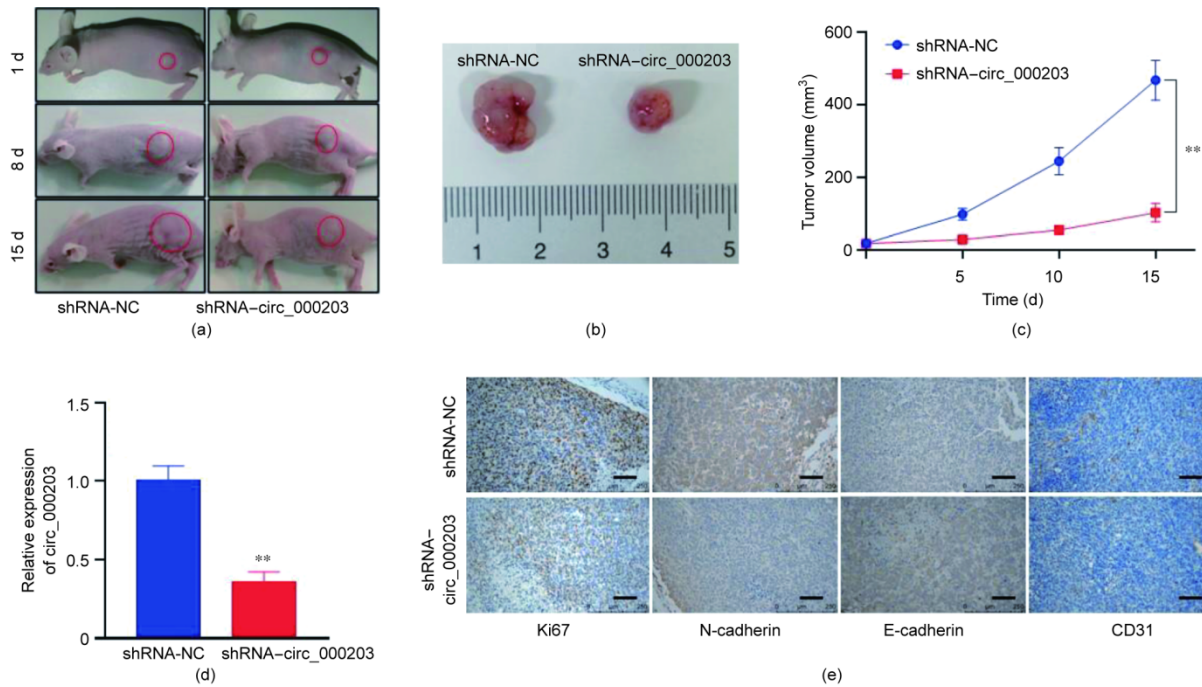


图3. circ_000203敲低抑制了骨肉瘤的进展。(a) 左后腿肿瘤异种移植小鼠的照片。红色圆圈表示肿瘤部位。(b) 分离的皮下异种移植瘤的照片。(c) 异种移植模型的生长曲线。(d) 肿瘤中circ_000203的表达。(e) 免疫组化检测肿瘤进展相关蛋白标记在异种移植样本中的表达。比例尺为100 μm 。** $p < 0.01$ 。

Ki67和新生血管标志物CD31在circ_000203敲低组中明显受到抑制[图3(e)], 而E-cadherin的表达显著上调[图3(e)]。这些结果表明, circ_000203敲低可以显著抑制骨肉瘤的生长和转移。

3.4. circ_000203靶向miR-26b-5p释放抑制BMPR2表达从而抑制骨肉瘤进展

使用DIANA-LncBase v2工具[†]预测miR-26b-5p是circ_000203的一个潜在下游靶点。然后, 使用生物信息学工具ENCORI[‡]预测BMPR2是miR-26b-5p的靶基因。双荧光素酶报告基因实验表明, 与突变组(MUT)相比, miR-26b-5p抑制了circ_000203或BMPR2 WT的荧光素酶活性[图4(a)~(c)], 证实它们之间的直接相互作用。使用qRT-PCR发现miR-26b-5p在骨肉瘤细胞和组织中表达较低(附录A中的图S7)。此外, 我们观察到miR-26b-5p和circ_000203的表达呈负相关[图4(d)]。circ_000203敲减可增加骨肉瘤细胞中miR-26b-5p的表达[图4(e)], 并且miR-26b-5p模拟物抑制BMPR2的表达[图4(f)和(g)]。此外, 通过同时转染miR-26b-5p抑制剂(序列详见第2.2节)和shRNA-circ_000203进入骨肉瘤细胞, 实现了miR-26b-5p和circ_000203的双重敲减(附录A中的图S8)。根据qRT-PCR分析, 在shRNA-circ_

000203转染的骨肉瘤细胞中, BMPR2的下调表达可在双重敲减细胞中得到逆转(图S8)。这些结果表明, circ_000203通过miR-26b-5p进行调控, 进而调节BMPR2的表达。

此外, 我们转染了一个针对BMPR2的过表达载体至骨肉瘤细胞中(附录A中的图S9), 并进行了功能实验以进一步验证circ_000203通过调节miR-26b-5p吸附BMPR2的表达来促进骨肉瘤细胞的发展。集落形成实验显示, 增加BMPR2表达可以逆转circ_000203敲低导致的抑制细胞增殖的现象(附录A中的图S10)。划痕和Transwell实验显示circ_000203敲低导致的细胞迁移受到了一定程度的缓解, 这部分缓解是通过BMPR2过表达而实现的(附录A中的图S11和S12)。结合miR-26b-5p过表达可以抑制骨肉瘤细胞恶性进展的结果(附录A中的图S13), 我们证实, 敲低circ_000203通过miR-26b-5p介导调控BMPR2表达降低, 从而抑制了骨肉瘤的发展。

我们还检测了收集的移植瘤中的miR-26b-5p和BMPR2的表达情况, 并发现circ_000203敲低肿瘤中miR-26b-5p显著上调, BMPR2下调(附录A中的图S14), 这表明circ_000203敲低可以通过作用于miR-26b-5p/BMPR2通路来阻止骨肉瘤的进展。

[†] <https://starbase.sysu.edu.cn/>.

[‡] <http://www.microrna.gr/LncBase>.

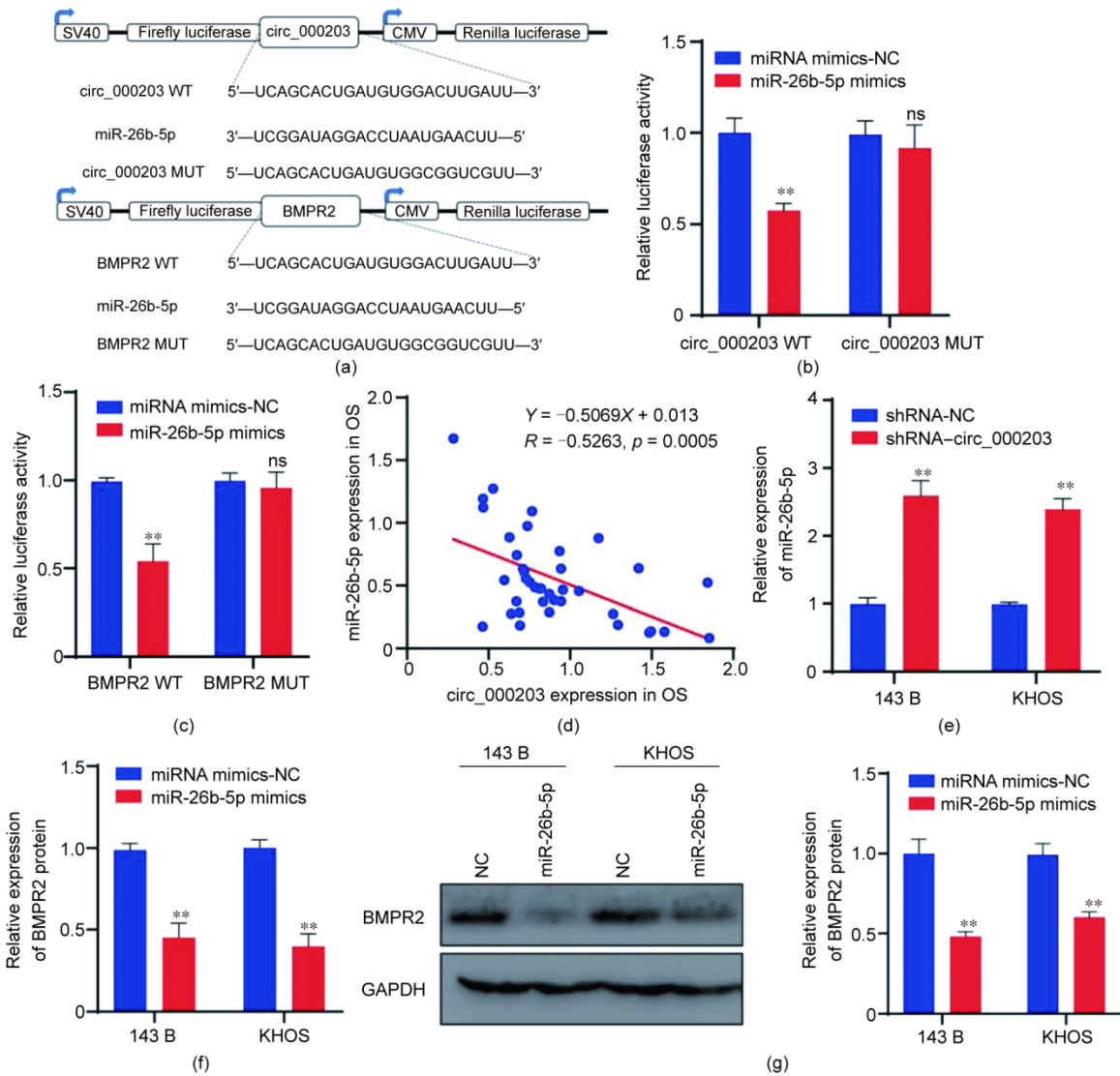


图4. 敲低 circ_000203 通过释放 miR-26b-5p 介导下调 BMPR2 表达抑制骨肉瘤进展。(a) miR-26b-5p 和 circ_000203/BMPR2 结合位点的示意图；(b) 检测 miR-26b-5p 和 circ_000203 双荧光素酶报告基因；(c) 检测 miR-26b-5p 和 BMPR2 双荧光素酶报告基因；(d) qRT-PCR 结果表明，在骨肉瘤组织中，circ_000203 和 miR-26b-5p 的表达呈负相关；(e) qRT-PCR 结果显示，在 circ_000203 敲低的骨肉瘤细胞中 miR-26b-5p 增加；(f) miR-26b-5p 降低 BMPR2 表达；(g) BMPR2 蛋白表达的 Western blot。* $p < 0.01$ 。

4. 讨论

多项研究表明，环状 RNA 在多种肿瘤的发展中发挥着至关重要的作用，包括骨肉瘤。circ_000203 是一种新型的环状 RNA，在肿瘤中尚未被发现[18]。本研究观察到，与对照组相比，circ_000203 在骨肉瘤组织和细胞中高表达。因此，我们旨在探讨 circ_000203 的功能角色及其在骨肉瘤中的作用机制。我们发现 circ_000203 的沉默显著抑制了骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

竞争性内源性 RNA (ceRNA) 是循环 RNA 的关键调控机制[24]，循环 RNA 可以作为 ceRNA 吸附下游靶向 miRNA，从而影响自由 miRNA 表达并实现靶基因的转录后调控。在这里，我们使用 DIANA-LncBase v2 预测 miR-

26b-5p 作为 circ_000203 的潜在下游靶向。生物信息学工具 ENCORI 预测 BMPR2 是 miR-26b-5p 的靶基因。

miR-26b-5p 已在多种肿瘤的研究中被报道[25]。Han 等[26]发现，在肝细胞癌中，miR-26b-5p 通过调节内在微孔聚合物 (PIM) -2 来增强 T 细胞反应。Wu 等[27]揭示了 miR-26a 通过靶向程序性细胞死亡 10 (PDCD10) 抑制膀胱癌细胞的进展。此外，Niu 等[28]报道，miR-26b-5p 可以通过靶向核蛋白 $\alpha 2$ (KPNA2) 来抑制 Burkitt 淋巴瘤细胞的增殖。然而，miR-26b-5p 在骨肉瘤中的作用仍不清楚。在本研究中，miR-26b-5p 在骨肉瘤细胞和组织中表达较低，miR-26b-5p 过表达显著抑制了骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

BMPR2 是骨形态发生蛋白 (BMP) 信号转导的重要

成员, 据报道其可能是多种肿瘤进展的关键基因, 比如胃癌、前列腺癌和乳腺癌[23,29–31]。我们的既往研究发现BMPR2通过Ras同源基因家族成员A (RhoA) -Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK) -LIM结构域激酶2 (LIMK2) 途径促进人骨肉瘤细胞的侵袭和转移[23]。在本研究中, 我们进一步证明了circ_000203的沉默抑制了细胞的增殖、迁移和侵袭, 这可以部分地通过BMPR2过表达缓解。这些结果表明circ_000203通过靶向miR-26b-5p/BMP2轴促进了骨肉瘤细胞的发展。总之, 这些发现有助于建立对骨肉瘤进展调节机制的详细理解。

5. 结论

circRNA在骨肉瘤的发展中起着重要作用, 但其潜在机制仍未被探索。本研究揭示了circ_000203通过调节miR-26b-5p/BMP2轴促进骨肉瘤的发展。在骨肉瘤细胞中, circ_000203的沉默特异性诱导miR-26b-5p的释放, 这是BMPR2表达的上游抑制因子, 从而降低BMPR2水平并抑制骨肉瘤细胞的进展。此外, 我们证明了通过操纵circRNA可以在体内抑制骨肉瘤异种移植物的可行性。我们的研究结果为骨肉瘤发病的分子机制提供了有价值的探索, 表明circ_000203有潜在作为骨肉瘤的新生物标志物和治疗靶点的作用。

致谢

本研究得到了北京大学人民医院研究与发展基金(RDY2018-13)、国家重点研究与发展计划(2020YFA0908900)、国家自然科学基金(22107097)和中国科学院青年创新促进会(2021226)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Shidong Wang, Hongliang Zhang, Bo Li, Chenglong Chen, Tingting Ren, Yi Huang, Kai Liu, Jingjing Li, and Wei Guo declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.12.007>.

References

- [1] Niu J, Yan T, Guo W, Wang W, Zhao Z. Insight into the role of autophagy in osteosarcoma and its therapeutic implication. *Front Oncol* 2019;9:1232.
- [2] Wang S, Li Bo, Zhang H, Chen J, Sun X, Xu J, et al. Improving bioavailability of hydrophobic prodrugs through supramolecular nanocarriers based on recombinant proteins for osteosarcoma treatment. *Angew Chem Int Ed Engl* 2021;60(20):11252–6.
- [3] Yan Q, Dong H, Su J, Han J, Song B, Wei Q, et al. A review of 3D printing technology for medical applications. *Engineering* 2018;4(5):729–42.
- [4] Zhang H, Wang J, Ren T, Huang Y, Liang X, Yu Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-206 inhibits osteosarcoma progression by targeting TRA2B. *Cancer Lett* 2020;490:54–65.
- [5] Yang C, Tian Y, Zhao F, Chen Z, Su P, Li Y, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):21.
- [6] Rajappa A, Banerjee S, Sharma V, Khandelia P. Circular RNAs: emerging role in cancer diagnostics and therapeutics. *Front Mol Biosci* 2020;7:577938.
- [7] Li S, Qian T, Wang X, Liu J, Gu X. Noncoding RNAs and their potential therapeutic applications in tissue engineering. *Engineering* 2017;3(1):3–15.
- [8] Husser C, Dentz N, Ryckelynck M. Structure-switching RNAs: from gene expression regulation to small molecule detection. *Small Struct* 2021;2(4):2000132.
- [9] Abou-Alfa GK, Wu L, Villanueva A. Novel non-protein biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma. *Engineering* 2021;7(10):1369–74.
- [10] Mao Y, He JX, Zhu M, Dong YQ, He JX. circ0001320 inhibits lung cancer cell growth and invasion by regulating TNFAIP1 and TPM1 expression through sponging miR-558. *Hum Cell* 2021;34(2):468–77.
- [11] Liu Q, Wang C, Jiang Z, Li S, Li F, Tan HB, et al. circRNA 001306 enhances hepatocellular carcinoma growth by up-regulating CDK16 expression via sponging miR-584-5p. *J Cell Mol Med* 2020;24(24):14306–15.
- [12] Peng L, Sang H, Wei S, Li Y, Jin D, Zhu X, et al. circCUL2 regulates gastric cancer malignant transformation and cisplatin resistance by modulating autophagy activation via miR-142-3p/ROCK2. *Mol Cancer* 2020;19(1):156.
- [13] Li Z, Li X, Xu D, Chen X, Li S, Zhang L, et al. An update on the roles of circular RNAs in osteosarcoma. *Cell Prolif* 2021;54(1):e12936.
- [14] Feng J, Li B, Ying J, Pan W, Liu C, Luo T, et al. Liquid biopsy: application in early diagnosis and monitoring of cancer. *Small Struct* 2020;1(3):2000063.
- [15] Shen S, Yao T, Xu Y, Zhang D, Fan S, Ma J. circECE1 activates energy metabolism in osteosarcoma by stabilizing c-Myc. *Mol Cancer* 2020;19(1):151.
- [16] Li H, He L, Tuo Y, Huang Y, Qian B. Circular RNA hsa_circ_0000282 contributes to osteosarcoma cell proliferation by regulating miR-192/XIAP axis. *BMC Cancer* 2020;20(1):1026.
- [17] Pan F, Zhang J, Tang B, Jing L, Qiu B, Zha Z. The novel circ_0028171/miR-218-5p/IKBKB axis promotes osteosarcoma cancer progression. *Cancer Cell Int* 2020;20(1):484.
- [18] Tang CM, Zhang M, Huang L, Hu ZQ, Zhu JN, Xiao Z, et al. circRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts. *Sci Rep* 2017;7(1):40342.
- [19] Koso H, Yi H, Sheridan P, Miyano S, Ino Y, Todo T, et al. Identification of RNA-binding protein LARP4B as a tumor suppressor in glioma. *Cancer Res* 2016;76(8):2254–64.
- [20] Li H, Xu JD, Fang XH, Zhu JN, Yang J, Pan R, et al. Circular RNA circRNA_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR-26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4. *Cardiovasc Res* 2020;116(7):1323–34.
- [21] Zhang H, Yang K, Ren T, Huang Y, Tang X, Guo W. miR-16-5p inhibits chordoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting Smad3. *Cell Death Dis* 2018;9(6):680.
- [22] Zhang H, Yang K, Ren T, Huang Y, Liang X, Yu Y, et al. miR-100-5p inhibits malignant behavior of chordoma cells by targeting IGF1R. *Cancer Manag Res* 2020;12:4129–37.
- [23] Wang S, Ren T, Jiao G, Huang Y, Bao X, Zhang F, et al. BMP2 promotes invasion and metastasis via the RhoA – ROCK – LIMK2 pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* 2017;8(35):58625–41.
- [24] Liang ZZ, Guo C, Zou MM, Meng P, Zhang TT. circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in human lung cancer: an update. *Cancer Cell Int* 2020;20(1):173.
- [25] Lin Y, Jian Z, Jin H, Wei X, Zou X, Guan R, et al. Long non-coding RNA DLGAP1-AS1 facilitates tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via the feedback loop of miR-26a/b-5p/IL-6/JAK2/STAT3 and Wnt/b-catenin pathway. *Cell Death Dis* 2020;11(1):34.
- [26] Han W, Li N, Liu J, Sun Y, Yang X, Wang Y. microRNA-26b-5p enhances T

- cell responses by targeting PIM-2 in hepatocellular carcinoma. *Cell Signal* 2019;59:182–90.
- [27] Wu K, Mu X, Jiang J, Tan M, Wang R, Zhou W, et al. miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit the proliferation of bladder cancer cells by regulating PDCD10. *Oncol Rep* 2018;40(6):3523–32.
- [28] Niu F, Kazimierska M, Nolte IM, Terpstra MM, de Jong D, Koerts J, et al. The miR-26b-5p/KPNA2 axis is an important regulator of burkitt lymphoma cell growth. *Cancers* 2020;12(6):1464.
- [29] Kim IY, Lee DH, Lee DK, Ahn HJ, Kim MM, Kim SJ, et al. Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23(46):7651–9.
- [30] Owens P, Pickup MW, Novitskiy SV, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, et al. Disruption of bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2) in mammary tumors promotes metastases through cell autonomous and paracrine mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(8):2814–9.
- [31] Peng CW, Yue LX, Zhou YQ, Tang S, Kan C, Xia LM, et al. miR-100-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through targeting to BMPR2. *Cancer Cell Int* 2019;19(1):354.