

• 论 著 •

结肠癌组织中差异表达 circRNA 的筛选与验证*

孙 林¹, 沈永奇^{2△}, 孙一帆¹, 龙海华³, 陈建林¹, 易青群⁴, 龚敏珍³, 莫远群²

广西医科大学附属柳铁中心医院: 1. 检验科; 2. 肿瘤科; 3. 消化内科; 4. 胃肠外科, 广西柳州 545007

摘 要:目的 筛选结肠癌组织中差异表达的环状 RNA(circRNA), 分析其在结肠癌发生、发展中的作用。

方法 选取该院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月收治的 3 例结肠癌患者的肿瘤组织标本及配对癌旁正常组织标本, 用 Arraystar Human circRNA Arrays V2 芯片检测、筛选差异表达的 circRNA; 采用聚类分析筛选出表达水平有明显差异的 circRNA。另选取同期 9 例结肠癌肿瘤组织标本及配对癌旁组织标本用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测进行初步验证。筛选到的差异表达 circRNA 进行 GO 基因功能富集分析(GO 分析)及 KEGG 信号通路富集分析(KEGG 分析)。**结果** 结肠癌组织与癌旁组织比较, 按照 $P < 0.05$ 且差异表达倍数(FC) > 1.5 筛选标准, 筛选出 114 个差异表达 circRNA, 其中 62 个 circRNA 上调表达, 52 个 circRNA 下调表达, 经过聚类分析筛选出在结肠癌中显著下调的 8 个 circRNA: hsa_circRNA_404686、hsa_circRNA_102293、hsa_circRNA_000367、hsa_circRNA_104270、hsa_circRNA_001729、hsa_circRNA_100790、hsa_circRNA_105039、hsa_circRNA_102049。qPCR 检测结果显示, 这 8 个 circRNA 在结肠癌组织中表达水平降低。GO 分析显示, 被富集的基因主要参与转录调节、RNA 结合、蛋白质结合、细胞周期调控等。KEGG 分析显示, 主要参与调节干细胞多能性的信号通路、FOXO 信号通路、p53 信号通路等。**结论** 在结肠癌组织筛选到 8 个显著下调的 circRNA, 经基因功能注释分析其参与肿瘤的发生、发展, 可能会成为结肠癌诊断及预后评估的生物标志物。

关键词: 结肠癌; 差异表达; 环状 RNA; 生物标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.13.005

中图法分类号: R446.8

文章编号: 1673-4130(2022)13-1556-06

文献标志码: A

Screening and verification of differentially expressed circRNA in colon cancer tissues*

SUN Lin¹, SHEN Yongqi^{2△}, SUN Yifan¹, LONG Haihua³, CHEN Jianlin¹,

YI Qingqun⁴, GONG Minzhen³, MO Yuanqun²

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oncology; 3. Department of Gastroenterology;

4. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Liutie Central Hospital of Guangxi

Medical University, Liuzhou, Guangxi 545007, China

Abstract: Objective To screen out the differentially expressed circular RNA (circRNA) in colon cancer

tissues and analyze their possible role in the development of colon cancer. **Methods** The cancer tissues and matched adjacent tissues of 3 patients with colon cancer were collected from January 2018 to December 2019 in the hospital. Differentially expressed circRNAs were detected and screened by using Arraystar Human circRNA Arrays V2 chip. Cluster analysis was performed to screen out circRNAs with significantly different expression levels. Tissues and matched adjacent tissues from 9 patients with colon cancer admitted from January 2018 to December 2019 were collected to preliminary verify the differentially expressed circRNA by using real-time quantitative PCR (qPCR) method. The screened differentially expressed circRNAs were analyzed by using annotation of circRNA, GO pathway analysis and KEGG pathway analysis. **Results** A total of 114 differentially expressed circRNAs were detected in colon cancer tissues with > 1.5 fold change (FC) in their matched adjacent tissues ($P < 0.05$); 62 circRNAs were up-regulated and 52 circRNAs were down-regulated. After cluster analysis, 8 circRNAs that were significantly down-regulated in colon cancer were screened out: hsa_circRNA_404686, hsa_circRNA_102293, hsa_circRNA_000367, hsa_circRNA_104270, hsa_circRNA_001729, hsa_circRNA_100790, hsa_circRNA_105039, hsa_circRNA_102049. Compared with adjacent tissues, qPCR test showed that these 8 circRNAs were significantly down-regulated in colon cancer tissues. GO analysis revealed

* 基金项目: 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281034); 柳州市科技重点研发计划项目(2018BJ10506)。

作者简介: 孙林, 男, 主管技师, 主要从事分子诊断的相关研究。 △ 通信作者, E-mail: gxnnsyq@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220602.1448.002.html\(2022-06-06\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220602.1448.002.html(2022-06-06))

that numerous target genes were involved in transcription regulation, RNA binding, protein binding, cell cycle. KEGG analysis revealed that numerous target genes were involved in signaling pathways regulating pluripotency of stem cell, FOXO signaling pathways, p53 signaling pathways. **Conclusion** There are 8 circRNAs expression significantly down-regulated in colon cancer tissue. Gene function annotation analysis indicates that the 8 circRNAs may be related to the occurrence and development of tumors, and may become markers for the diagnosis and prognostic evaluation of colon cancer.

Key words: colon cancer; differential expression; circular RNA; biomarker

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在全国恶性肿瘤中均居前 5 位^[1],早期诊断尤为重要。目前对结肠癌的早期筛查主要依靠糖类抗原检测,其特异性较高,但灵敏度较差,导致早期诊断率较低,急需寻找一种更为有效的筛查方法。随着 RNA 测序技术的高速发展,环状 RNA(circRNA)已被认为是细胞分化以及疾病发展的重要调控因子^[2]。研究发现, circRNA 在肿瘤发生、发展中发挥重要的调控作用,可能会成为结肠癌早期筛查的一种新型生物标志物^[3]。本研究通过对临床结肠癌组织及配对癌旁组织的样本 circRNA 表达进行比较,筛选具有表达差异的 circRNA,并分析其在结肠癌发生、发展中的作用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在柳州市柳铁中心医院进行手术治疗的术前未进行过放疗或化疗的 50 例结肠癌患者纳入研究。收集上述患者手术治疗中取得的病变组织(经病理学检查确诊为结肠癌组织)及相应癌旁组织(距离癌变部位边界>2.0 cm)冻存标本。患者及家属对本研究均知情同意并签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审核通过。

1.2 试剂与仪器 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;Arraystar Super RNA Labeling Kit、Arraystar Human circRNA Arrays V2 芯片(8×15K)为 Arraystar 公司产品;逆转录试剂盒购自 Qiagen 公司;实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒购自 Takara 公司;Agilent Hybridization Oven、Agilent Scanner G2505C 为 Agilent 公司产品;核酸蛋白定量仪 Nanodrop ND-1000 为 Nanodrop 公司产品;AB7500 qPCR 仪为 Applied Biosystems 公司产品。qPCR 所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

1.3 方法

1.3.1 结肠癌组织及癌旁组织总 RNA 的提取 使用 Trizol 试剂在液氮冷冻状态下研磨组织,用总 RNA 提取试剂盒获得总 RNA,然后用 Nanodrop ND-1000 检测 RNA 的质量和浓度。

1.3.2 筛选结肠癌 circRNA 差异表达数据 从纳入研究的结肠癌病例中随机选取 3 例肿瘤组织及配对癌旁组织标本提取总 RNA,使用 8×15K 的 Human

circRNA Arrays V2 芯片进行 circRNA 杂交检测,用 Agilent Scanner G2505C 仪器对杂交、洗片后的基因芯片进行扫描,获取 circRNA 芯片原始图像资料检测数据。应用图像分析软件对获得的图像资料进行数据提取,进一步采用 R 软件包 limma 依据算法 Quantile 对 circRNA 原始芯片信号数据进行标准化和均一化处理,以 $P<0.05$ 且差异表达倍数(FC)>1.5 的条件筛选结肠癌差异表达的 circRNA,然后在筛选的 circRNA 中选择上调或下调差异表达倍数排在前 8 位的 8 个 circRNA 做进一步的验证。

表 1 qPCR 的引物设计

名称	引物序列(5'-3')
hsa_circRNA_404686	正向:GTCAAGTGACTGCCATCGGT
	反向:GGGGCAACCGGTATTGTAGT
hsa_circRNA_102293	正向:GAAAAGCGCGCTAAAGCTGA
	反向:TCCATCTCAGCACGGAGTTCA
hsa_circRNA_000367	正向:GCACTCATCGAAGACTGGCG
	反向:CGTATGGAATGGACCTGGACA
hsa_circRNA_104270	正向:ATCCTGGGAACCCACTGAGG
	反向:CCGGGAAAGGATCTGGAATGG
hsa_circRNA_100790	正向:CATGCAAACGGTTCCCTTTGGT
	反向:TGTGGTCGTTGCTCTGTAGC
hsa_circRNA_105039	正向:ACGTCATCTGTGTGCGCTTT
	反向:GCCTTCGGGATCCGTCACCT
hsa_circRNA_102049	正向:TGCTGACACAGCCATTCCAT
	反向:GTCCACTAGGCAGGACAAC
hsa_circRNA_001729	正向:GACCAITTCATTCTGGCTACAGT
	反向:CAGGGGAAGGTCCTGCGGTA

1.3.3 qPCR 检测验证 circRNA 的表达 按照逆转录试剂使用说明书上的操作将结直肠癌组织及其癌旁组织提取的总 RNA 逆转录为 cDNA;再按照 qPCR 试剂盒的操作说明书进行 qPCR 检测,每孔均设 3 个复孔,取平均 Ct 值作为该样本最后 Ct 值,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来反映 circRNA 的相对表达水平。

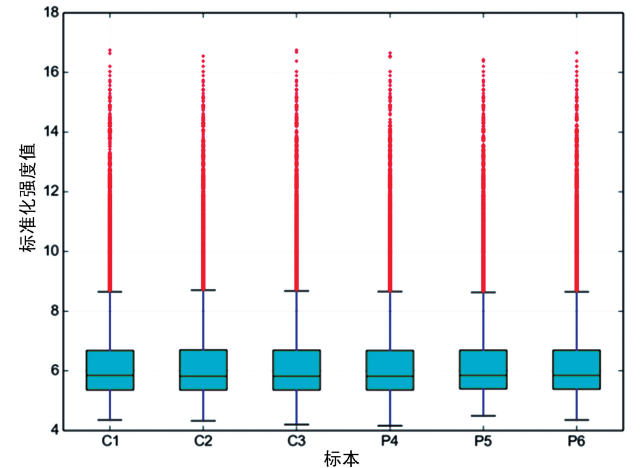
1.3.4 差异表达 circRNAs 的生物信息学分析 通过生物信息相关数据库对差异表达的 circRNA 进行 GO 数据库(<http://amigo.geneontology.org/amigo>)基因功能富集分析(GO 分析)和 KEGG 数据库(ht-

tps://www.kegg.jp/)信号通路分析(KEGG 分析),预测差异表达的 circRNA 相关的生物学功能。

1.4 统计学处理 应用统计学软件 SPSS19.0 对结果进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本之间比较使用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

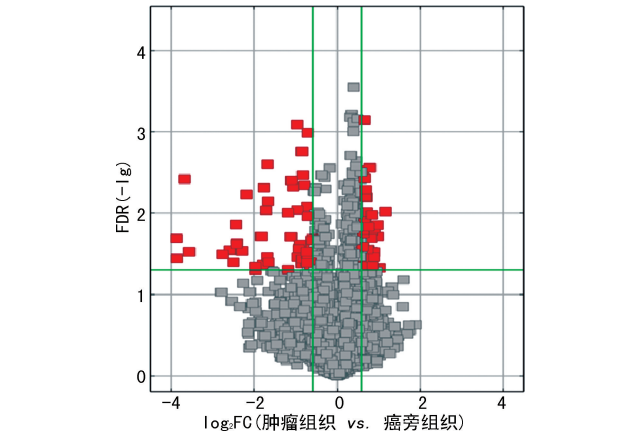
2.1 基因芯片原始数据均一化 经过重新标准化和均一化后消除了染色偏差和点样针头带来的空间差异引起的基因表达量的不同,癌组织和癌旁组织样本的 circRNA 表达谱标准化后的荧光信号强度均基本一致,从而使得到的基因表达量的差异以及变化具有生物学意义,可用于进一步表达谱分析,见图 1。



注:C1~C3 为癌组织标本;P4~P6 为癌旁组织标本;C1 与 P4 配对,C2 与 P5 配对,C3 与 P6 配对。

图 1 组织样本 circRNA 芯片质控箱式图

2.2 表达谱芯片数据进行差异基因筛选分析 基因芯片在结肠癌组织和癌旁组织中共检出 5 990 个 circRNAs,以 $FC > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为筛选标准,筛选出 114 个差异表达 circRNA,其中 62 个 circRNA 上调表达,52 个 circRNA 下调表达;前 8 位明显上调和明显下调的 circRNAs,见表 2。绘制差异表达 circRNAs 火山图,见图 2,图中两侧深色点即代表癌组织及癌旁组织存在差异表达的 circRNAs,左侧的深色点代表在结肠癌组织下调表达的 circRNAs,右侧的深色点代表在结肠癌组织上调表达的 circRNAs;从图 2 中发现在结直肠癌中下调表达的 circRNAs 比上调表达的 circRNAs 离散程度较大,结合表 2 中下调表达的 circRNAs FC 较大。因此,在结肠癌中低表达的 circRNAs FC 可能更大。



注:FDR 表示伪发现率。

图 2 差异表达 circRNAs 火山图

表 2 在结肠癌组织中表达上调和下调的 circRNA(前 8 个)

circRNA ID	P	FC	变化趋势	Chrom	Strand	circRNA 类型	来源母基因名称
hsa_circRNA_058191	0.009 4	2.237	上调	chr2	+	外显子	RPL37A
hsa_circRNA_000675	0.047 2	2.032	上调	chr2	+	反义核酸	NDUFA10
hsa_circRNA_043415	0.019 2	1.977	上调	chr17	—	外显子	MED1
hsa_circRNA_077109	0.013 9	1.961	上调	chr6	+	外显子	IRAK1BP1
hsa_circRNA_100635	0.015 3	1.859	上调	chr10	+	外显子	TSPAN14
hsa_circRNA_407051	0.029 8	1.849	上调	chr8	—	外显子	INTS9
hsa_circRNA_050998	0.034 6	1.836	上调	chr19	—	外显子	RPS16
hsa_circRNA_032377	0.048 3	1.829	上调	chr14	—	外显子	MAP3K9
hsa_circRNA_404686	0.020 4	14.613	下调	chr1	+	外显子	GPR137B
hsa_circRNA_102293	0.036 1	14.560	下调	chr18	+	外显子	MTCL1
hsa_circRNA_000367	0.003 7	12.820	下调	chr11	—	外显子	SIAE
hsa_circRNA_104270	0.029 6	11.836	下调	chr6	+	外显子	FAM120B
hsa_circRNA_001729	0.031 9	6.822	下调	chr16	—	反义核酸	ZNF646
hsa_circRNA_100790	0.028 3	5.996	下调	chr11	+	外显子	CAPRIN1
hsa_circRNA_105039	0.039 8	5.690	下调	chrX	—	外显子	FLNA
hsa_circRNA_102049	0.013 7	5.417	下调	chr17	+	外显子	TADA2A

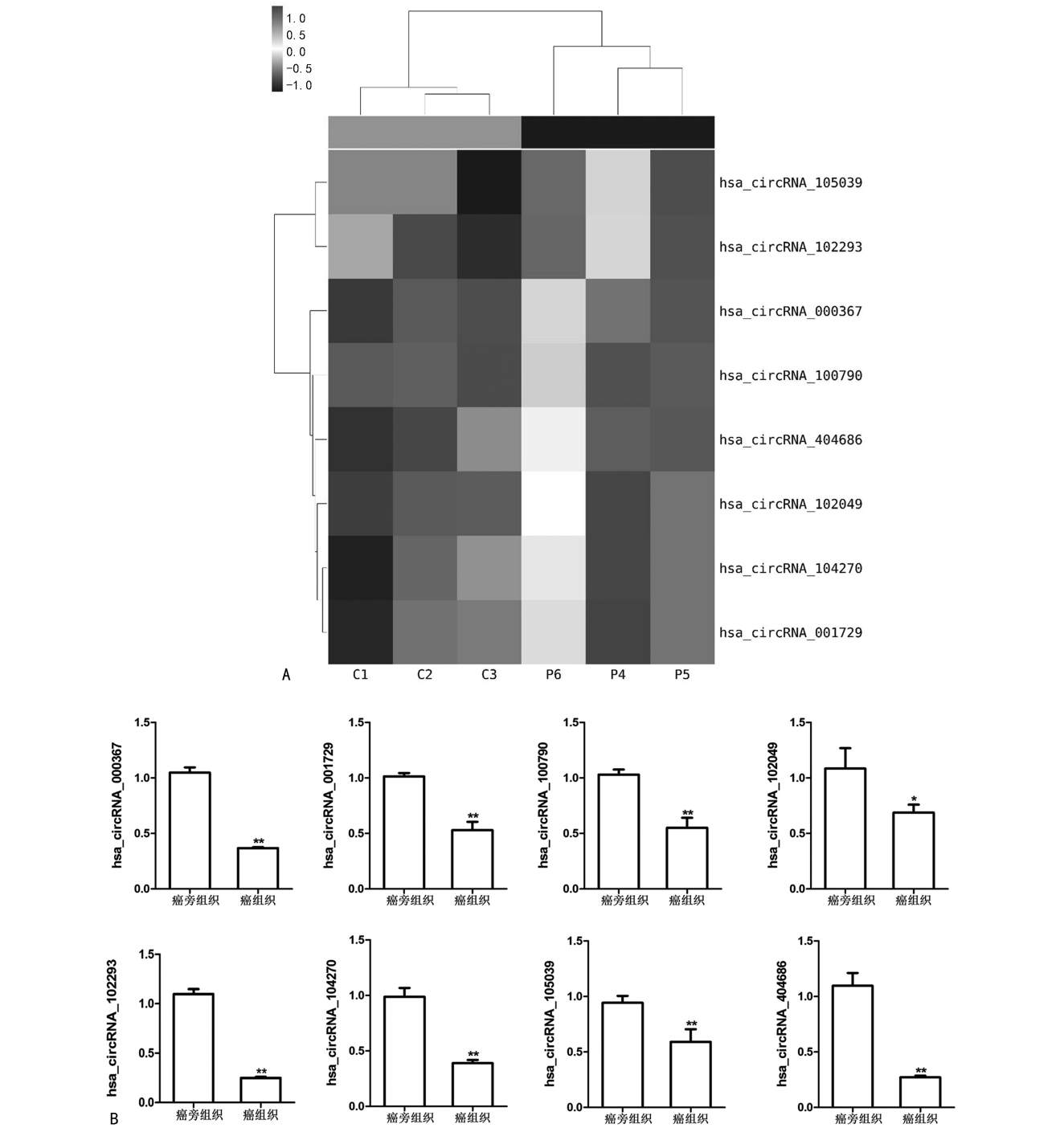
注:circRNA ID 为 Circbase 数据库中基因 ID;Chrom 为 circRNA 来源染色体;Strand 为 circRNA 序列正、负链来源。

2.3 在结肠癌组织中验证低表达 circRNAs 在结肠癌组织和癌旁组织中对所筛选的 circRNAs 表达量

进行聚类分析,研究发现在结肠癌中以低表达 circRNAs 为主,笔者挑选了其中 FC 较大的 8 个表达下调

的 circRNAs,见表 2。将它们的数据进行聚类分析,聚类热图见图 3A:右边代表该基因在组织中高表达,左边代表该基因在组织中低表达,颜色越深代表差异表达的程度越大。结果显示,hsa_circRNA_404686、hsa_circRNA_102293、hsa_circRNA_000367、hsa_circRNA_104270、hsa_circRNA_001729、hsa_circRNA_100790、hsa_circRNA_105039、hsa_circRNA_102049 在结肠癌组织中比癌旁组织中表达明显下调,这之前分析得到的结果相一致。接着笔者从纳入研究的

病例中,随机选取了 9 例结肠癌组织及配对癌旁组织标本进行 qPCR 检测验证,见图 3B,显示 hsa_circRNA_404686、hsa_circRNA_102293、hsa_circRNA_000367、hsa_circRNA_104270、hsa_circRNA_001729、hsa_circRNA_100790、hsa_circRNA_105039、hsa_circRNA_102049 8 个 circRNA 在结肠癌组织中的表达水平相比在癌旁组织的中表达水平显著下降,这之前生物信息学预测分析的结果一致。



注:A为筛选的8个 circRNA 的热图分析结果;B是用 qPCR 方法验证 8 个 circRNA 在肿瘤组织中的表达;两组间比较,*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.001$;C1~C3 为癌组织标本;P4~P6 为癌旁组织标本;C1 与 P4 配对,C2 与 P5 配对,C3 与 P6 配对。

图 3 结肠癌组织中下调表达 circRNAs 验证

2.4 差异表达 circRNA 的 GO 分析和 KEGG 分析

GO 分析显示:结肠癌组织下调表达的 8 个 circRNA 的宿主基因可能参与的生物学过程(BP)主要富集在转录调控、神经营养蛋白 TRK 受体信号通路、表皮生长因子受体信号通路、转化生长因子受体信号通路、基因表达的负调控等;可能涉及的细胞成分(CC)主要富集在核质、细胞质、细胞膜、核仁等;可能参与的分子功能(MF)主要富集在 RNA 结合、蛋白质结合、转录因子激活、poly(A)RNA 结合、泛素蛋白连接酶结合等。KEGG 分析发现,结肠癌组织下调表达的这 8 个 circRNA 的宿主基因与病毒致癌作用、FOXO 信号通路、p53 信号通路、调节干细胞多能性的信号通路、蛋白多糖在肿瘤中的作用、细胞周期、结肠癌发生等相关。

3 讨论

circRNA 是由 5' 和 3' 末端首尾环化形成一个特殊环状结构,通过套索驱动环化和内含子配对驱动环化形成的环形 RNA^[4-5]。circRNA 广泛存在于不同生物的细胞质中,具有多样性和高度的稳定性,在真核生物的生长发育中发挥重要的作用^[6-7]。研究发现, circRNA 还具有与 RNA 结合蛋白相互作用,作为转录调节因子、RNA 媒介基因表达的表现遗传调控产物等生物学功能^[8-10],参与肿瘤的生长发育。

在结肠癌的研究发现, circRNA₁₀₄₉₁₆ 可通过抑制上皮间质转化进而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭作用^[11]。circPIP5K1A 可以抑制 miR-1273a 的表达促进细胞的侵袭和迁移,调节肿瘤的发展^[12]。circRNA 在结肠癌中可通过“海绵”吸附作用调节 miRNA 的表达进而调节肿瘤的发展, circPPP1R12A 经“海绵”吸附结合 miR-375 调节靶基因 CTNNB1 的表达进而促进结肠癌的发展^[13]; circRNA₁₀₀₈₅₉ 可作为一个致癌基因经“海绵”吸附作用于 miR-217, 调节靶基因 HIF-1 α 的表达,因此通过 circRNA₁₀₀₈₅₉—miR-217—HIF-1 α 轴可调控结肠癌的发展^[14]。研究发现 circRNA 不仅可以调控结肠癌的发展还可调节对药物的抵抗作用, circ₀₀₂₀₀₉₅ 可直接与 miR-487a-3p 结合靶向调节 SOX9 基因活性,促进结肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭,促进肿瘤的发生、发展;增强结肠癌对顺铂药物的抵抗^[15]。circRNA 在结肠癌中的生物功能多样化,因此 circRNA 可作为结肠癌临床诊断及预后评估的生物标志物。

本研究通过 3 例配对结肠癌及癌旁组织样本的 circRNAs 表达谱进行全面测序,按 FC>1.5 且 P<0.05 为筛选标准,筛选出 114 个差异表达 circRNA,其中 62 个 circRNA 上调表达,52 个 circRNA 下调表达。通过火山图、聚类热图等分析,在结肠癌组织中筛选出差异表达显著下调的前 8 个 circRNA,并通过 qPCR 验证 hsa_circRNA_404686、hsa_circRNA_102293、hsa_circRNA_000367、hsa_circRNA_

104270、hsa_circRNA_001729、hsa_circRNA_100790、hsa_circRNA_105039、hsa_circRNA_102049 在肿瘤组织中表达水平降低。

对这 8 个差异表达的 circRNAs 进行 GO 和 KEGG 分析。GO 分析显示:BP 主要富集在转录调控、神经营养蛋白 TRK 受体信号通路、表皮生长因子受体信号通路、转化生长因子受体信号通路等;CC 主要富集在核质、细胞质、细胞膜等;MF 主要富集在 RNA 结合、蛋白质结合、转录因子激活等。KEGG 分析显示:主要与 FOXO 信号通路、p53 信号通路、调节干细胞多能性的信号通路、蛋白多糖在肿瘤中的作用、细胞周期等相关。细胞周期是细胞分裂和复制的过程,与细胞的增殖分化密切相关,而不受控的细胞增殖是癌症发生、发展的特征之一^[16]。p53 信号通路是细胞凋亡信号通路之一,与胃癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠癌等的发生、发展相关^[17-21]。

综上所述,经筛选与分析,本研究发现 hsa_circRNA₄₀₄₆₈₆、hsa_circRNA₁₀₂₂₉₃、hsa_circRNA₀₀₀₃₆₇、hsa_circRNA_104270、hsa_circRNA_001729、hsa_circRNA_100790、hsa_circRNA_105039、hsa_circRNA_102049 8 个在结肠癌组织中表达下调的 circRNA,可能影响结肠癌发生、发展,有可能成为潜在的标志物,为今后研究结肠癌发生机制提供理论依据。同时,本研究存在一些不足,由于临床病例数和实验时间的限制,未进行后续验证,相关作用机制仅为预测结果;实验分组还需要进一步细化,纳入各临床病理分期的组织样本;需要收集更多的临床组织样本。本研究对癌组织中上调表达的 circRNAs 没有进行初步验证,是因为发现其 FC 没有下调表达的 circRNAs 大,笔者认为下调表达的 circRNAs 更值得去研究。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADDE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] ZHOU Z, SUN B, HUANG S, et al. Roles of circular RNAs in immune regulation and autoimmune diseases[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 503.
- [3] CHEN Y, LI C, TAN C, et al. Circular RNAs: a new frontier in the study of human diseases[J]. J Med Genet, 2016, 53(6): 359-365.
- [4] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. Rna, 2013, 19(2): 141-157.
- [5] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148.
- [6] ZHANG Y, TIAN Z, YE H, et al. Emerging functions of circular RNA in the regulation of adipocyte metabolism and obesity[J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 268.

- [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] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-264.
- [9] VERDUCI L, STRANO S, YARDEN Y, et al. The circRNA-microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(4): 669-680.
- [10] ABDELMOHSEN K, PANDA AC, MUNK R, et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 361-369.
- [11] MIN L, WANG H AND ZENG Y. CircRNA_104916 regulates migration, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 24(5): 819-832.
- [12] ZHANG Q, ZHANG C, MA J X, et al. Circular RNA PIP5K1A promotes colon cancer development through inhibiting miR-1273a[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(35): 5300-5309.
- [13] WEI Z, TIAN Z, ZHANG L. CircPPP1R12A promotes the progression of colon cancer through regulating CTNBN1 via sponging miR-375[J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 32(6): 635-646.
- [14] ZHOU P, XIE W, HUANG H L, et al. circRNA_100859 functions as an oncogene in colon cancer by sponging the miR-217-HIF-1 α pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13): 13338-13353.
- [15] SUN Y, CAO Z, SHAN J, et al. Hsa_circ_0020095 promotes oncogenesis and cisplatin resistance in colon cancer by sponging miR-487a-3p and modulating SOX9[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 604869.
- [16] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [17] LIU Y, LI L, LIU Y, et al. RECK inhibits cervical cancer cell migration and invasion by promoting p53 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4): 3058-3066.
- [18] RICHARDSON C, ZHANG S, HERNANDEZ BORRERO L J, et al. Small-molecule CB002 restores p53 pathway signaling and represses colorectal cancer cell growth[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(18): 1719-1725.
- [19] WEI G H, WANG X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3850-3856.
- [20] ZHANG H, ZHANG X, LI X, et al. Effect of CCNB1 silencing on cell cycle, senescence, and apoptosis through the p53 signaling pathway in pancreatic cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 619-631.
- [21] DU Y, WEI N, MA R, et al. A miR-210-3p regulon that controls the Warburg effect by modulating HIF-1 α and p53 activity in triple-negative breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 731.

(收稿日期: 2021-11-13 修回日期: 2022-03-11)

(上接第 1555 页)

- [12] 赵会荣, 李思源, 李军, 等. 低密度脂蛋白相关蛋白 5 基因 rs682429 和 rs3781590 位点多态性及突变与绝经后女性骨代谢关系的研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2020, 40(12): 1020-1023.
- [13] 周高晋, 邓力军, 王莲朋, 等. 绝经后 2 型糖尿病女性骨代谢与脂代谢间的差异性[J]. *中国临床研究*, 2020, 33(11): 1463-1467.
- [14] 金泽旭, 唐芳, 马武开, 等. Wnt 信号通路抑制因子骨硬化蛋白在骨质疏松症中的作用探讨[J]. *风湿病与关节炎*, 2020, 9(4): 45-48.
- [15] 高群, 李军, 李思源, 等. 新疆 2 型糖尿病绝经后女性 LRP5rs41494349、rs2306862 位点基因多态性及突变与骨代谢的关系[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(5): 646-649.
- [16] 何丽, 李皓云, 秦贵军, 等. 2 型糖尿病绝经后女性患者血尿酸水平与骨密度和骨折的相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(6): 799-803.
- [17] 刘荣梅, 张延祠, 柴雪娇, 等. II 型糖尿病患者并发骨质疏松症的患病情况及 Logistic 回归性分析[J]. *颈腰痛杂志*, 2019, 40(3): 383-385.
- [18] 李宇, 逢曙光, 张艳艳, 等. 济南市某社区 65 岁以上女性 2 型糖尿病并发骨质疏松患者与 BMI、受教育程度、血脂的相关性研究[J]. *预防医学论坛*, 2019, 25(3): 201-203.
- [19] 周婷婷, 冯正平. 绝经后女性 2 型糖尿病伴骨质疏松患者骨密度与骨代谢指标的相关性分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(1): 29-32.
- [20] 张树东, 祝孟海, 李世飞, 等. 骨硬化蛋白与骨质疏松: 治疗的新方向[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(36): 5847-5854.
- [21] 陈福宇, 李海涛, 孟德峰, 等. 石河子地区中老年人群 LRP5 基因 Q89R 位点多态性与骨质疏松的关联性分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(4): 421-427.
- [22] 韩冠军, 马宁. 探讨老年 2 型糖尿病(T2DM)女性骨质疏松状况及影响因素[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(A0): 40.
- [23] 周明旺, 李盛华, 陈娴, 等. 膝骨性关节炎患者低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因与中医体质相关性研究[J]. *西部中医药*, 2016, 29(10): 5-7.

(收稿日期: 2021-09-12 修回日期: 2022-03-11)