

• 论 著 •

Circ-CDYL 通过 miR-223-3p/PHF19 轴调节多发性骨髓瘤对硼替佐米的敏感性*

周 燕¹, 唐云龙^{1△}, 刘佳琦², 吴蕾蕾¹, 孙乃同¹

1. 南京医科大学盐城临床医学院/盐城市第三人民医院血液内科, 江苏盐城 224000;

2. 南通大学医学院, 江苏南通 226000

摘要:目的 探讨环状 RNA Circ-CDYL 调节多发性骨髓瘤(MM)对硼替佐米(BTZ)的敏感性,以及对 miR-223-3p/PHD 锌指蛋白 19(PHF19)轴的影响。方法 收集盐城市第三人民医院 118 例 MM 患者血清标本,其中 60 例患者未接受任何化疗(BTZ 敏感组),58 例患者接受 BTZ 治疗并产生化疗耐药性(BTZ 耐药组),比较两组 Circ-CDYL 及 miR-223-3p、PHF19 的表达情况。将 MM1. R 细胞根据细胞转染情况分为 C 组、sh-Circ-C 组、sh-Circ-CDYL 组、sh-Circ-CDYL+anti-miR-223-3p 组和 sh-Circ-CDYL+pcDNA-PHF19 组,对 5 组细胞进行相应转染。采用荧光定量 PCR(RT-qPCR)测定 Circ-CDYL、miR-223-3p 和 PHF19 mRNA 水平,CKK-8 法测定 MM1. R 细胞活性。采用克隆形成实验和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡情况,采用免疫印迹法(Western blotting)检测凋亡蛋白[增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki67、剪切化半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶 3(C-caspase 3)]及 PHF19 蛋白的表达水平,采用双荧光素酶报告基因实验检测 Circ-CDYL 与 miR-223-3p/PHF19 的靶向关系。结果 Circ-CDYL 和 PHF19 在 BTZ 耐药组患者血清标本和 MM1. R 细胞中均呈高表达($P<0.05$),miR-223-3p 呈低表达($P<0.05$)。下调 Circ-CDYL 表达可明显降低 MM1. R 细胞对 BTZ 的半数抑制浓度(IC₅₀),抑制增殖活力,使凋亡蛋白 PCNA、Ki67 表达水平均下调,细胞凋亡率、C-caspase 3 蛋白表达水平上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。抑制 miR-223-3p 或过表达 PHF19 可部分逆转敲低 Circ-CDYL 后的 MM1. R 细胞对 BTZ 敏感性($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示,miR-223-3p 可抑制 Circ-CDYL、PHF19 的表达,Circ-CDYL、PHF19 是 miR-223-3p 的靶基因。结论 敲低 Circ-CDYL 可通过 miR-223-3p/PHF19 轴而提高 MM1. R 细胞对 BTZ 的敏感性。

关键词: Circ-CDYL; miR-223-3p; PHD 锌指蛋白 19; 多发性骨髓瘤; 硼替佐米

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2023. 10. 016

中图法分类号: R733. 3

文章编号: 1673-4130(2023)10-1229-06

文献标志码: A

Circ-CDYL regulates the sensitivity of multiple myeloma to bortezomib via the miR-223-3p/PHF19 axis*

ZHOU Yan¹, TANG Yunlong^{1△}, LIU Jiaqi², WU Leilei¹, SUN Naitong¹

1. Department of Hematology, Yancheng Clinical College of Medicine, Nanjing Medical University/Yancheng Third People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224000, China;

2. Medical School, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China

Abstract: Objective To explore the regulation of the sensitivity of multiple myeloma (MM) to bortezomib (BTZ) and the influence of Circ-CDYL on miR-223-3p/PHD finger protein 19 (PHF19) axis. **Methods** Serum samples were collected from 118 MM patients in Yancheng Third People's Hospital, among which 60 patients did not receive any chemotherapy treatment (BTZ-sensitive group) and 58 patients received BTZ treatment and developed chemotherapy resistance (BTZ-resistance group). The expressions of Circ-CDYL, miR-223-3p and PHF19 in the two groups were compared. The mRNA levels of Circ-CDYL, miR-223-3p and PHF19 were determined by fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), and the activity of MM1. R cells was determined by CCK-8 method. Clone formation assay and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis, while the expression levels of apoptosis-related proteins (PCNA, Ki67, C-caspase 3) and PHF19 protein were detected by Western blotting. Meanwhile, double luciferase reporting experiments was used to detect the targeting relationship between Circ-CDYL and miR-223-3p/PHF19. **Results** Circ-

* 基金项目: 2019 年盐城市医学科技发展计划项目(YK2019097)。

作者简介: 周燕, 女, 副主任医师, 主要从事血液内科临床研究。 △ 通信作者, E-mail: interboy1314@163. com。

CDYL and PHF19 were highly expressed in serum specimens of BTZ resistant group and MM1. R cells ($P < 0.05$), while miR-223-3p was low expressed ($P < 0.05$). Down-regulation of Circ-CDYL expression significantly reduced the median inhibition concentration (IC_{50}) of MM1. R cells to BTZ, inhibited the proliferation activity, down-regulated the expression levels of apoptotic proteins PCNA and Ki67, and up-regulated the apoptosis rate and C-caspase 3 protein expression levels, with statistical significance ($P < 0.05$). Inhibition of miR-223-3p or overexpression of PHF19 could partially reverse the sensitivity of MM1. R cells to BTZ after Circ-CDYL knockdown ($P < 0.05$). Double luciferase reporting experiments showed that miR-223-3p could inhibit the expression of Circ-CDYL and PHF19, and Circ-CDYL and PHF19 were target genes of miR-223-3p. **Conclusion** Knocking down Circ-CDYL can increase the sensitivity of MM1. R cells to BTZ through miR-223-3p/PHF19 axis.

Key words: Circ-CDYL; miR-223-3p; PHD finger protein 19; multiple myeloma; bortezomib

多发性骨髓瘤(MM)是临床上常见的血液系统恶性肿瘤^[1]。硼替佐米(BTZ)是一种蛋白酶体抑制剂,作为常用的化疗药物之一,BTZ可以改善MM的预后和治疗,但由于机体内在和获得性化学抗性,其治疗效果受到很大影响^[2-3]。因此,研究BTZ的耐药机制对耐药MM患者的治疗具有积极意义。环状RNA(CircRNA)是一类特殊的RNA分子,在人类癌症(包括MM)的发生和化学抗性中的重要作用,其通过调控肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,从而影响化疗效果^[4]。研究显示,Circ-CDYL是一种新发现的CircRNA,已被证实在MM组织和血浆标本中呈高表达,对MM具有良好的诊断和预后预测价值^[5]。然而,目前尚不清楚Circ-CDYL是否与MM的耐药机制调节有关。研究显示,miR-223-3p在MM肿瘤细胞系中处于低表达状态,其参与MM细胞增殖和凋亡调控,并且与BTZ的敏感性相关^[6-7]。此外,生物学信息学分析预测miR-223-3p很可能与CircRNA存在相互作用。有研究表明,PHD 锌指蛋白 19 (PHF19)是miR-223-3p的下游靶基因之一,敲低PHF19可在体外和体内抑制肿瘤生长,其有望成为MM新型治疗靶点^[8]。基于此,本研究主要探索Circ-CDYL的功能和Circ-CDYL/miR-223-3p/PHF19内源竞争性RNA网络在BTZ耐药中的调控作用,从而了解MM的耐药机制,为耐药MM患者新疗法的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 血清标本收集 收集2018年10月至2021年10月于盐城市第三人民医院(以下简称本院)接受治疗的118例MM患者的血清标本。将未接受任何治疗的60例患者作为BTZ敏感组,接受BTZ治疗产生化疗耐药性的58例MM患者作为BTZ耐药组。排除接受其他类型治疗的MM患者。所有患者均签署知情同意书,本研究已获得本院伦理委员会批准(2021023)。

1.2 细胞、主要试剂与仪器 亲本MM细胞系MM1. S细胞(货号:C1713)和耐BTZ细胞系

MM1. R细胞(货号:C1811)均购自上海WHELAB。RPMI-1640购自武汉Procell(货号:PM150110);BTZ购自上海源叶(货号:B34605),高效液相色谱法(HPLC)≥98%;Lipofectamine™ 3000转染试剂购自美国Invitrogen(货号:L3000015)。Beyozol总RNA抽提试剂购自上海Beyotime(货号:R0011);QuantiTect Reverse Transcription试剂盒(货号:DXT-205314)、QuantiTect SYBR® Green PCR Kit(货号:204145)购自美国Qiagen;CCK-8试剂盒(货号:CK04)和Annexin V-FITC/PI试剂盒(货号:AD10-2)均购自日本同仁化学;LucPair™ Duo-Luciferase HS Assay试剂盒购自美国GeneCopoeia(货号:LF005);PHF19、增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki67、剪切化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(C-caspase 3)、GAPDH一抗及二抗均购自美国Cell Signaling Technology。构建稳定细胞系所用Circ-CDYL短发夹RNA(shRNA)的慢病毒载体(sh-Circ-CDYL)和含有阴性对照shRNA的慢病毒载体(sh-Circ-NC),以及miR-223-3p抑制剂(anti-miR-223-3p)、miR-223-3p模拟物(miR-223-3p mimics)、阴性对照(miR-NC)均购自GenePharma;pcDNA-PHF19重组慢病毒载体购自美国Invitrogen。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 将MM1. S和MM1. R细胞接种于RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清,100 U/L青霉素及100 mg/L链霉素),于饱和湿度培养箱(37℃,5% CO₂)中培养。MM1. R细胞在转染前使用10 nmol/L BTZ处理24 h。根据转染情况将MM1. R细胞分为C组、sh-Circ-C组、sh-Circ-CDYL组、sh-Circ-CDYL + anti-miR-223-3p组和sh-Circ-CDYL + pcDNA-PHF19组。其中,C组未转染,sh-Circ-C组转染sh-Circ-NC慢病毒载体,sh-Circ-CDYL组转染sh-Circ-CDYL慢病毒载体,sh-Circ-CDYL + anti-miR-223-3p组转染sh-Circ-CDYL慢病毒载体及anti-miR-223-3p慢病毒载体,sh-Circ-CDYL + pcDNA-PHF19组转染sh-Circ-CDYL慢病

毒载体及 pcDNA-PHF19 重组慢病毒载体。细胞培养 48 h 后用于后续研究,使用荧光定量 PCR(RT-qPCR)和免疫印迹法(Western blotting)检测转染效率。

1.3.2 RT-qPCR 检测 根据试剂盒说明书要求提取总 RNA,并进行纯化,然后通过 QuantiTect Re-

verse Transcription 试剂盒合成 cDNA。以 GAPDH 为内参,使用 QuantiTect SYBR® Green PCR 试剂盒通过特异性引物和 cDNA 进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。反应条件:90 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 15 s,65 °C 退火 30 s,70 °C 延伸 30 s,连续循环 40 次。然后,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达水平计算。

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
GAPDH	5'-ACCCAGAAGA CTGTGGATGG-3'	5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'
Circ-CDYL	5'-ACCCACTAGTGCCTCAGGTG-3'	5'-CTGTTGAAGTCGTGGATGT-3
miR-223-3p	5'-CGCUAUCUUUCUAUUAACUGACCAUAA-3'	5'-CGCUAUCUUUCUAUUAUGACUCCAUA-3'
PHF19	5'-ACTCGGGACTCTATGGTGC-3'	5'-CCTCCGTCAGTTTGGACATCA-3'

1.3.3 蛋白质检测 5 组细胞经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,加入细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取总蛋白,将待测蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE,10%)电泳,电泳分离后转移至 PVDF 膜,以 5%脱脂牛奶封闭,取膜,清洗,加入 PHF19、PCNA、Ki67、C-caspase 3 一抗(稀释倍数 1:400)4 °C 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h 后,TBST 洗涤 3 次,最后滴加 ECL 发光液曝光显影,检测蛋白质条带。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析各条带灰度值,计算蛋白相对表达量。

1.3.4 细胞活力测定 采用不同浓度的 BTZ(0、1、5、10、20、40、80、160 nmol/L)对 5 组细胞处理 24 h,添加 10 mL 的 CCK-8 试剂处理 120 min,于 490 nm 波长下检测上清吸光度(A)值。当细胞活力降低为 50%时的 BTZ 浓度即为 BTZ 的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.3.5 克隆形成实验 将不同处理的 MM1. R 细胞以 500 个/孔的密度接种于六孔板,饱和湿度培养箱(37 °C,5% CO₂)中培养 2 周。使用结晶紫对细胞进行染色后对细胞克隆进行计数。

1.3.6 细胞凋亡测定 采用 Annexin V-FITC 染色观察细胞凋亡情况。收集 5 组细胞,PBS 洗涤 3 次,采用 1×Binding buffer 将待测细胞制成 1×10⁶/mL 的细胞悬液,接着加入 Annexin V-FITC,避光、室温孵育 10 min,加入 PI 染色液(10 μL)进行染色,大约 15 min 后采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验 通过生物信息学网站 StarBase(<https://starbase.sysu.edu.cn>)和 TargetScan(https://www.targetscan.org/vert_80/)预测 miR-223-3p、circ-CDYL 或 PHF19 的结合。按照转染试剂 TurboFect Transfection Regent 说明书将 anti-miR-223-3p 野生型(WT)或突变型(MUT)荧光素酶报告基因质粒载体单独转入细胞中,或同时添加 circ-CDYL、PHF 19 mimic 转入 MM1. R 细胞,获

得 circ-CDYL-野生型/突变型(WT/MUT)细胞及 PHF 19-WT/MUT 细胞,培养 48 h 后移去培养液。采用 PBS 洗涤细胞,弃去洗涤液后,每孔中加入 1×细胞裂解液,振荡 10 min,3 000 r/min 离心 5 min,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测上清荧光素酶活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Circ-CDYL、miR-223-3p 和 PHF19 在不同血清标本和细胞中的表达情况 与 BTZ 敏感组比较,BTZ 耐药组 Circ-CDYL 和 PHF19 mRNA 表达明显升高,miR-223-3p 表达明显降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。与 MM1. S 细胞比较,MM1. R 细胞 Circ-CDYL 和 PHF19 mRNA 表达明显升高,miR-223-3p 表达明显降低,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 3。

表 2 Circ-CDYL、miR-223-3p 和 PHF19 mRNA 在不同血清标本中的表达

组别	<i>n</i>	Circ-CDYL	miR-223-3p	PHF19 mRNA
BTZ 敏感组	60	1.03±0.29	1.02±0.27	1.05±0.30
BTZ 耐药组	58	1.75±0.54	0.42±0.13	1.68±0.46
<i>t</i>		9.065	15.295	8.841
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

表 3 Circ-CDYL、miR-223-3p 和 PHF19 mRNA 在不同细胞中的表达情况

细胞系	Circ-CDYL	miR-223-3p	PHF19 mRNA
MM1. S 细胞	1.03±0.06	1.09±0.03	1.02±0.04
MM1. R 细胞	1.86±0.12	0.38±0.04	1.75±0.11
<i>t</i>	10.715	24.595	10.802
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 各组 MM1.R 细胞转染效率 与转染 sh-Circ-C 的细胞相比,转染 sh-Circ-CDYL 的 MM1.R 细胞 Circ-CDYL 和 PHF19 mRNA 表达水平明显降低,miR-223-3p 表达明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 sh-Circ-CDYL 组比较,sh-Circ-

CDYL+ anti-miR-223-3p 组、sh-Circ-CDYL + pcDNA-PHF19 组 PHF19 mRNA 表达水平均明显降低($P<0.05$),sh-Circ-CDYL+ anti-miR-223-3p 组 miR-223-3p 表达明显下调($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组 MM1.R 细胞 Circ-CDYL、miR-223-3p 和 PHF19 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	Circ-CDYL	miR-223-3p	PHF19 mRNA	PHF19 蛋白
C 组	1.04±0.06	1.03±0.05	1.05±0.02	0.87±0.08
sh-Circ-NC 组	1.05±0.04	1.04±0.02	1.01±0.06	0.94±0.07
sh-Circ-CDYL 组	0.31±0.03 ^a	1.82±0.10 ^a	0.37±0.04 ^a	0.41±0.05 ^a
sh-Circ-CDYL+ anti-miR-223-3p 组	0.28±0.04	1.47±0.09 ^b	0.59±0.06 ^b	0.68±0.06 ^b
sh-Circ-CDYL+ pcDNA-PHF19 组	0.32±0.03	1.76±0.11	0.66±0.05 ^b	0.71±0.05 ^b

注:与 sh-Circ-NC 组比较,^a $P<0.05$;与 sh-Circ-CDYL 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.3 MM1.R 细胞的增殖、凋亡及蛋白表达情况 与 sh-Circ-NC 组比较,sh-Circ-CDYL 组中 MM1.R 细胞对 BTZ 的 IC₅₀、集落形成数量均明显降低,细胞凋亡率明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);细胞凋亡蛋白 PCNA、Ki67 的蛋白表达水平均下调,C-caspase 3 蛋白表达水平上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 sh-Circ-CDYL 组比较,sh-Circ-

CDYL+ anti-miR-223-3p 组或 sh-Circ-CDYL + pcDNA-PHF19 组中 MM1.R 细胞对 BTZ 的 IC₅₀、集落形成数量均明显增加,细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);细胞 PCNA、Ki67 蛋白水平均上调,C-caspase 3 蛋白水平下调,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1、2 和表 5。结果表明敲低 Circ-CDYL 可提高 MM1.R 细胞对 BTZ 的敏感性。

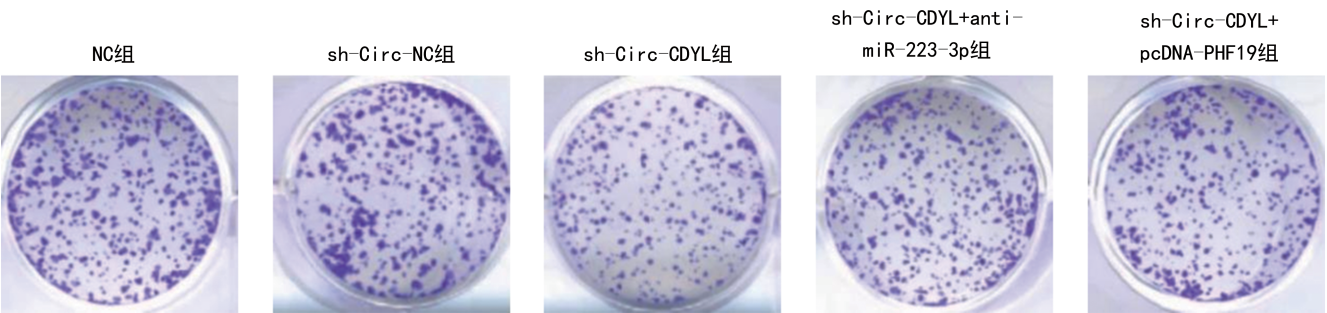


图 1 克隆形成实验检测各组 MM1.R 细胞增殖情况

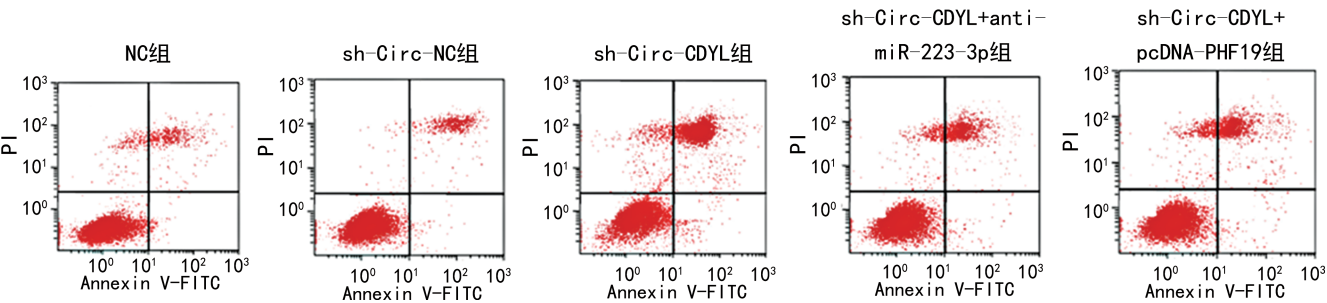


图 2 流式细胞术检测各组 MM1.R 细胞凋亡

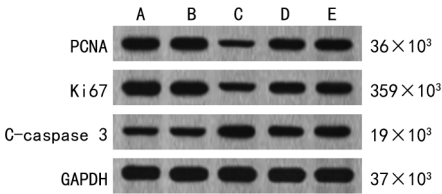
表 5 各组 MM1.R 细胞 IC₅₀、细胞增殖和凋亡能力检测

组别	IC ₅₀ (nmol/L)	集落形成数量 (个)	细胞凋亡率 (%)	PCNA	Ki67	C-caspase 3
NC 组	65.26±5.78	165.23±12.18	4.98±0.46	0.76±0.09	0.95±0.07	0.33±0.04
sh-Circ-NC 组	62.15±6.02	174.35±15.64	5.985±0.65	0.82±0.07	0.84±0.08	0.36±0.04
sh-Circ-CDYL 组	23.15±2.08 ^a	98.37±9.65 ^a	21.35±2.87 ^a	0.25±0.03 ^a	0.36±0.04 ^a	0.79±0.05 ^a

续表 5 各组 MM1. R 细胞 IC₅₀、细胞增殖和凋亡能力检测

组别	IC ₅₀ (nmol/L)	集落形成数量 (个)	细胞凋亡率 (%)	PCNA	Ki67	C-caspase 3
sh-Circ-CDYL+anti-miR-223-3p 组	39.11±3.62 ^b	124.62±11.20 ^b	14.34±1.23 ^b	0.59±0.04 ^b	0.67±0.05 ^b	0.48±0.06 ^b
sh-Circ-CDYL+pcDNA-PHF19 组	41.68±4.25 ^b	129.76±10.34 ^b	15.02±1.19 ^b	0.62±0.03 ^b	0.60±0.04 ^b	0.55±0.04 ^b

注：与 sh-Circ-NC 组比较，^a*P*<0.05；与 sh-Circ-CDYL 组比较，^b*P*<0.05。



注：A—E 依次代表 NC 组、sh-Circ-NC 组、sh-Circ-CDYL 组、sh-Circ-CDYL+anti-miR-223-3p 组和 sh-Circ-CDYL+pcDNA-PHF19 组。

图 3 Western blotting 检测各组 MM1. R 细胞 PCNA、Ki67 和 C-caspase 3 蛋白水平

2.4 miR-223-3p 与 Circ-CDYL 或 PHF19 相互作用

miRNA	MatchGeneID	MatchGeneName	GeneType	TargetSite	Alignment	Class	AgoExpNum	CleaveExpNum
hsa-miR-223-3p	NM_004824	CDYL	circRNA	chr6:4955555-4955574[+]	Target: 5' guuaUACUU-A-GAACUGACo 3' ↑ : miRNA : 3' accccAUAAACUGUUGACUGu 5'	7mer-m8	1	0

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}
Position 1399-1405 of PHF19 3' UTR	5' ...UCCAGAGAUUUAGA--AACUGACU... 3' ACCCCAUAACUGUUGACUGU	7mer-m8	-0.24	90	-0.24	4.764	0.43

图 4 生物信息学分析网站预测 miR-223-3p 可与 Circ-CDYL 或 PHF19 结合

表 6 双荧光素酶报告基因实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Circ-CDYL		PHF19	
	WT	MUT	WT	MUT
miR-NC 组	1.02±0.05	0.98±0.08	1.03±0.07	1.02±0.03
miR-223-3p mimics 组	0.37±0.03	0.95±0.07	0.43±0.02	0.97±0.05
<i>t</i>	19.308	0.489	14.275	1.485
<i>P</i>	<0.001	0.651	<0.001	0.212

3 讨 论

肿瘤复发、转移和化疗耐药性是导致 MM 预后差的重要因素^[10]。BTZ 是 MM 的一线化疗药物，BTZ 耐药是导致 MM 化疗失败的常见原因^[11]。因此，寻找新的靶点和了解 BTZ 耐药的分子机制对于 MM 的治疗极为重要。

CircRNA 因其闭环结构而具有 RNA 酶消化抗性，在真核细胞中呈高表达，具有良好的稳定性，可作为癌症生物标志物^[4-5]。研究发现，多种 CircRNA 可作为 MM 耐药性的调节因子，例如，circPSAP 可调控海绵调节组蛋白乙酰化酶 4 的表达，进而影响 MM 细胞增殖、凋亡和 BTZ 敏感性^[7]。

分析 生物信息学分析网站预测结果显示：在 Circ-CDYL 或 PHF19 中存在 miR-223-3p 的互补作用位点(图 4)。MM1. R 细胞的双荧光素酶报告基因实验结果显示，相对于 miR-NC 的转染，miR-223-3p mimics 转染明显抑制 Circ-CDYL-WT 或 PHF19-WT 质粒中的荧光素酶活性(*P*<0.05)，但对 Circ-CDYL-MUT 或 PHF19-MUT 质粒中的荧光素酶活性变化无影响(*P*>0.05)，见表 6。结果表明 miR-223-3p 可抑制 Circ-CDYL、PHF19 的表达。

Circ-CDYL 又称 circ0075517，在肿瘤发生和恶性发展中具有多种功能。研究显示，Circ-CDYL 在肝癌细胞癌组织中表达上调，与肝癌患者的预后不良显著相关^[12-13]。Circ-CDYL 已被证明可通过抑制 miR-1180，削弱其对 yes 相关蛋白的抑制，最终导致 MM 不受控制^[5]。然而，关于 Circ-CDYL 与 MM 耐药的相关性尚鲜见报道。本研究结果证实，Circ-CDYL 在耐 BTZ MM 患者血清和 MM1. R 细胞(耐 BTZ 细胞系)中高表达，提示 Circ-CDYL 的高表达可能与 MM 对 BTZ 的敏感性有关，进一步研究显示，敲低 Circ-CDYL 可明显下调 MM1. R 细胞对 BTZ 的 IC₅₀，同时抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡。本研究结果表明，敲

低 Circ-CDYL 可显著提高 MM1. R 细胞对 BTZ 的敏感性。

本研究通过生物信息学分析网站预测了 miR-223-3p 在 Circ-CDYL 序列中的结合位点,并验证了 Circ-CDYL 与 miR-223-3p 之间的分子结合。此外,本研究发现,抑制 miR-223-3p 可部分逆转敲低 Circ-CDYL 的 MM1. R 细胞对 BTZ 敏感性($P < 0.05$)。CircRNA 可作为 miRNA 的海绵参与调节各种生物行为,例如, circ-ATP10A 作为 miR-6758-3p、miR-3977 等多个 miRNA 的海绵,调控其下游 mRNA,进而促进 MM 的血管生成^[4]。此外, circRNA-102231 通过靶向结肠癌 HT-29 细胞 miR-145,上调 ABCB1,进而降低顺铂敏感性^[14]。以上研究提示, Circ-CDYL 可能作为 miR-223-3p 的海绵,进而调节 MM 细胞的 BTZ 抗性。PHF19 已被证明是 miR-223-3p 的下游靶标,据报道, PHF19 是一种表观遗传调控因子, PHF19 过表达与晚期和侵袭性 MM 疾病阶段显著相关^[15]。 PHF19 过表达与 MM 患者较差的生存率显著相关^[8]。本研究结果表明, PHF19 在耐 BTZ MM 患者血清和 MM1. R 细胞中呈高表达, Circ-CDYL 可通过海绵化 miR-152-3p 来调控 PHF19 的表达水平,并且 PHF19 过表达可部分抵消 Circ-CDYL 敲低引起的 MM1. R 细胞 BTZ 敏感性降低趋势。多种 CircRNA/miRNA/mRNA 轴均参与了 MM 的 BTZ 抗性调控,如 CircRERE 通过海绵吸收 miR-152-3p 以调节 CD47 的表达,进而诱导癌变和激发 BTZ 抗性^[16]。因此,推测 miR-223-3p/PHF19 轴可能是 Circ-CDYL 调节 MM 的 BTZ 敏感性的原因之一。

本研究结果显示, Circ-CDYL 通过靶向 miR-223-3p/PHF19 轴进而调节 MM 的 BTZ 敏感性,提示下调 Circ-CDYL 可能是克服 MM 患者 BTZ 耐药的治疗策略。但本研究结果为临床及体外细胞水平的探索,随后将构建 Circ-CDYL 敲除动物模型,探索 Circ-CDYL 在体内是否具有同等的作用机制,以便进一步明确 Circ-CDYL 在 MM 化疗耐药中的作用机制。

参考文献

- [1] 彭千涯,马瑞娟,郭睿娜,等. 淋巴细胞/单核细胞比率与校正血钙作为新诊断多发性骨髓瘤预后标志物的意义[J]. 中国实验血液学杂志,2022,30(1):152-157.
- [2] RICHARDSON P G, SCHJESVOLD F, WEISEL K, et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone at first relapse in lenalidomide-pretreated myeloma: a subanalysis of OPTIMISMM by clinical characteristics[J]. Eur J Haematol, 2022, 108(1): 73-83.
- [3] 程灵灵,魏晓晶,庄婧,等. miR-21 与多发性骨髓瘤患者预后的关系及其对化疗耐药的影响和机制[J]. 山东医药, 2020, 60(2): 14-17.
- [4] YU M, YU J, ZHANG Y, et al. A novel circRNA-miRNA-mRNA network revealed exosomal circ-ATP10A as a biomarker for multiple myeloma angiogenesis[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 667-683.
- [5] CHEN F, WANG X, FU S, et al. Circular RNA circ-CDYL sponges miR-1180 to elevate yes-associated protein in multiple myeloma[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(11): 925-932.
- [6] LI J L, LIU X L, GUO S F, et al. Long noncoding RNA UCA1 regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting miR-331-3p/IL6R axis for the activation of JAK2/STAT3 pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(21): 9238-9250.
- [7] MA H, SHEN L, YANG H, et al. Circular RNA circP-SAP functions as an efficient miR-331-3p sponge to regulate proliferation, apoptosis and bortezomib sensitivity of human multiple myeloma cells by upregulating HDAC4[J]. J Pharmacol Sci, 2022, 149(1): 27-36.
- [8] SCHINKE C D, BIRD J T, QU P, et al. PHF19 inhibition as a therapeutic target in multiple myeloma[J]. Curr Res Transl Med, 2021, 69(3): 103290-103297.
- [9] ZHANG L, RASTGOO N, WU J, et al. MARCKS inhibition cooperates with autophagy antagonists to potentiate the effect of standard therapy against drug-resistant multiple myeloma[J]. Cancer Lett, 2020, 480(25): 29-38.
- [10] 王歆雅,刘爱春,郭秀臣,等. CD27 在多发性骨髓瘤微环境 T 细胞中表达与预后的相关性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(6): 649-655.
- [11] 刘兰婷,邓书会,藏美蓉,等. Cdc37 调控细胞自噬参与骨髓瘤细胞对硼替佐米耐药的研究[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(7): 583-588.
- [12] MEI M, WANG Y, WANG Q, et al. CircCDYL serves as a new biomarker in mantle cell lymphoma and promotes cell proliferation[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 10215-10221.
- [13] 王海雨,王然. 环状 RNA circCDYL 对肝细胞癌迁移和侵袭的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(7): 827-831.
- [14] 王培培,周静,李铮,等. 环状 RNA-102231 增加结肠癌 HT-29 细胞对顺铂耐药性的作用及其机制[J]. 中华普通外科杂志, 2020, 35(7): 558-562.
- [15] MASON M J, SCHINKE C, ENG C L P, et al. Multiple myeloma DREAM challenge reveals epigenetic regulator PHF19 as marker of aggressive disease[J]. Leukemia, 2020, 34(7): 1866-1874.
- [16] FANG W, MU J, YANG Y, et al. CircRERE confers the resistance of multiple myeloma to bortezomib depending on the regulation of CD47 by exerting the sponge effect on miR-152-3p[J]. J Bone Oncol, 2021, 30(24): 100381-100497.

(收稿日期:2022-10-12 修回日期:2023-02-16)