

• 论 著 •

环状 RNA circ-TNRC6A 靶向 miR-494-3p 抑制膀胱癌细胞增殖和迁移*

翁彪¹, 唐迪¹, 彭善君^{1△}, 李洋²

1. 梁平区人民医院泌尿外科, 重庆 405200; 2. 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 安徽合肥 230022

摘要:目的 探讨环状 RNA circ-TNRC6A 在膀胱癌组织中的表达水平及其调控膀胱癌细胞增殖和迁移的作用机制。方法 采用癌症基因组图谱数据库分析 circ-TNRC6A 在膀胱癌组织中的表达水平及其与膀胱癌患者临床分期的关系。实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析 circ-TNRC6A 在人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 和膀胱癌细胞系 (MGH-U3、5637、RT-4、T24、J82) 中的表达水平。在膀胱癌 5637 细胞中分别转染 circ-TNRC6A 质粒 (circ-TNRC6A 组) 和对照质粒 (NC 组), 细胞克隆形成实验和细胞划痕实验分别检测 circ-TNRC6A 对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响。生物信息学技术预测并采用荧光素酶报告基因实验证实 circ-TNRC6A 和微小 RNA (miR)-494-3p 的靶向关系。qPCR 检测 circ-TNRC6A 对 miR-494-3p 表达的影响。蛋白质印迹法检测 circ-TNRC6A 对 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路关键蛋白表达的影响。结果 与癌旁组织比较, circ-TNRC6A 在膀胱癌组织中低表达 ($P < 0.01$)。circ-TNRC6A 表达水平与膀胱癌患者临床分期有关 ($P < 0.05$)。与 SV-HUC-1 细胞比较, circ-TNRC6A 在膀胱癌细胞系中低表达 (均 $P < 0.05$)。5637 细胞中 circ-TNRC6A 表达水平最低 ($P < 0.01$)。与 NC 组比较, 过表达 circ-TNRC6A 可抑制 5637 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 并降低细胞的迁移能力 ($P < 0.01$)。circ-TNRC6A 能够靶向结合 miR-494-3p ($P < 0.01$)。与 NC 组比较, 过表达 circ-TNRC6A 组降低 miR-494-3p 表达水平 ($P < 0.01$), 并抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活 ($P < 0.01$)。结论 circ-TNRC6A 靶向下调 miR-494-3p 抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移, circ-TNRC6A 可能成为膀胱癌新的治疗靶点。

关键词: 膀胱癌; circ-TNRC6A; 微小 RNA-494-3p; 细胞增殖; 细胞迁移

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.11.003

中图法分类号: R737.14

文章编号: 1673-4130(2024)11-1289-06

文献标志码: A

Circular RNA circ-TNRC6A targets miR-494-3p to inhibit bladder cancer cell proliferation and migration*

WENG Biao¹, TANG Di¹, PENG Shanjun^{1△}, LI Yang²

1. Department of Urology, People's Hospital of Liangping District, Chongqing 405200, China; 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of circular RNA circ-TNRC6A in bladder cancer tissues and its mechanism of regulating the proliferation and migration of bladder cancer cells. **Methods** The expression level of circ-TNRC6A in bladder cancer tissues and its relationship with clinical stage of patients with bladder cancer were analyzed using the Cancer Genome Atlas database. The expression levels of circ-TNRC6A in human normal bladder epithelial cell SV-HUC-1 and bladder cancer cell lines (MGH-U3, 5637, RT-4, T24, J82) were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR). The circ-TNRC6A plasmid (circ-TNRC6A group) and the control plasmid (NC group) were transfected into 5637 bladder cancer cells, respectively. The effects of circ-TNRC6A on the proliferation and migration of bladder cancer cells were detected by colony formation assay and cell scratch assay, respectively. The targeting relationship between circ-TNRC6A and microRNA (miR)-494-3p was predicted by bioinformatics technology and confirmed by lu-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81872313)。

作者简介: 翁彪, 男, 助理研究员, 主要从事环状 RNA 对膀胱癌恶性生物学的抑制作用研究。△ 通信作者, E-mail: 15023808731@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20240523.2102.002.html\(2024-05-27\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20240523.2102.002.html(2024-05-27))

ciferase reporter gene assay. qPCR was used to detect the effect of circ-TNRC6A on miR-494-3p expression. Western blot was used to detect the effect of circ-TNRC6A on the expression of key proteins in Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Results** circ-TNRC6A was down-regulated in bladder cancer tissues compared with adjacent tissues ($P<0.01$). The expression level of circ-TNRC6A was correlated with the clinical stage of bladder cancer ($P<0.05$). Compared with SV-HUC-1 cells, the expression of circ-TNRC6A was lower in bladder cancer cell lines (all $P<0.05$), and the expression level of circ-TNRC6A was the lowest in 5637 cells ($P<0.01$). Compared with the NC group, overexpression of circ-TNRC6A inhibited the proliferation of 5637 cells ($P<0.01$) and reduced the migration ability of 5637 cells ($P<0.01$). circ-TNRC6A could target miR-494-3p ($P<0.01$). Compared with NC group, overexpression of circ-TNRC6A significantly reduced the expression level of miR-494-3p ($P<0.01$) and inhibited the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway ($P<0.01$). **Conclusion** circ-TNRC6A inhibits the proliferation and migration of bladder cancer cells by down-regulating miR-494-3p. circ-TNRC6A may be a new therapeutic target for bladder cancer.

Key words: bladder cancer; circ-TNRC6A; microRNA-494-3p; cell proliferation; cell migration

膀胱癌是泌尿系统恶性肿瘤中致死率最高的肿瘤之一,其发病率逐年增加^[1]。早期膀胱癌患者主要采用手术配合化疗,5 年生存率能够达到 72%^[2]。中晚期膀胱癌患者的手术机会明显减少,5 年生存率大约 20%^[3]。近年来膀胱癌的靶向治疗成为研究者广泛关注的热点,探究合适的分子治疗靶点对安全有效地治疗膀胱癌至关重要。环状 RNA(circRNA)是一种长度不确定的闭环状单链 RNA 分子,在转录本剪切过程中丢失了编码蛋白的功能^[4]。研究表明, circRNA 参与细胞各种生物学功能如细胞周期、细胞分化、细胞衰老等,是细胞中重要的调控性 RNA^[5]。circRNA 被证实能够促进或抑制膀胱癌细胞的凋亡、迁移、侵袭、化疗敏感性等行为,参与膀胱癌的发展^[6]。circ-TNRC6A 基因定位在人 16 号染色体,其基因能够编码 18 个转录本, circ-TNRC6A 由第 4 和第 5 外显子反向剪接形成。circ-TNRC6A 在细胞中的作用报道很少,其在膀胱癌组织中的表达及其影响膀胱癌进展的机制并不清楚。本研究旨在探究 circ-TNRC6A 在膀胱癌组织和细胞中的表达水平,分析其与膀胱癌患者临床分期的相关性,通过体外实验分析 circ-TNRC6A 对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响及其对下游靶基因的调控,为膀胱癌的靶向诊断和治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 和膀胱癌细胞系 MGH-U3、5637、RT-4、T24、J82 均购自中国北纳生物公司, RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自瑞士 Lonza 公司, DMEM 培养基和 Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Model Culture Institute 公司, Trizol 试剂和 PCR Master 试剂盒均购自美国 Thermo Scientific 公司, circ-TNRC6A 质粒和对照质粒均购自中国宝日医生物技术公司, 微小 RNA

(miR)-NC mimic、miR-494-3p mimic 和双荧光素酶检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司, 超敏发光试剂盒和 BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 MCE 公司, 一抗连环蛋白 β 样 1(CTNBL1)、 β -微管蛋白(β -Tubulin)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)、cyclin D1 和二抗山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 购自美国 BD 公司。

1.2 生物信息学分析 由癌症基因组图谱(TCGA)数据库得到膀胱癌 circ-TNRC6A(癌症标本 137 个, 癌旁标本 165 个)的相对表达水平数据。利用 lncRNAmap 软件对目标 circ-TNRC6A 进行靶向预测。

1.3 细胞培养和转染 人膀胱癌细胞系 MGH-U3、5637、RT-4、T24、J82 在添加 13% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养, SV-HUC-1 细胞在添加了 13% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 所有细胞均置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中常规培养。5637 细胞生长至 40% 比例, 分别将 200 nmol/L 的 circ-TNRC6A 质粒和对照质粒使用 Lipofectamine 2000 转染, 命名为 circ-TNRC6A 组和 NC 组, 培养 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 circ-TNRC6A 和 miR-494-3p 表达水平 采用 Trizol 试剂裂解培养的细胞, 提取的 RNA 通过分光光度计进行定量。选择 RNA 纯度高的标本, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA。qRT-PCR 分析不同组细胞中 circ-TNRC6A 和 miR-494-3p 表达水平, qRT-PCR 引物序列如下: circ-TNRC6A 上游引物为 CTTGTTTTTTTTTCATGTTGT, 下游引物为 AGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC; rRNA18S 上游引物为 ATTCCGATAACGAACGAGAC, 下游引物为 TCACAGACCTGTTATTGCTC; miR-494-3p 上游引物为 CGGCTGAAACATACACGGGA, 下游引

物 为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT; GAPDH 上游引物为 CCAGGTGGTCTCTCTGA, 下游引物为 GCTGTAGCCAAATCGTTGT。circ-TNRC6A 以 GAPDH 为内参基因, miR-494-3p 以 rRNA18S 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法归一化处理计算 circ-TNRC6A 和 miR-494-3p 的相对表达水平, 实验重复 4 次。

1.5 细胞克隆形成实验检测 5637 细胞的增殖情况 将 circ-TNRC6A 组和 NC 组 5637 细胞接种至 6 孔板, 每孔 2 000 个。恒温培养箱内培养 13 d, 观察克隆形成变化。在第 13 天, 加入 3% 多聚甲醛在 26℃ 固定 20 min, 加入 0.2% 结晶紫染液在 26℃ 染色 20 min。肉眼下观察、统计每孔的克隆数量, 实验重复 4 次。

1.6 细胞划痕实验检测 5637 细胞的迁移情况 将 circ-TNRC6A 组和 NC 组细胞消化为单细胞悬液, 以每孔 1 mL 接种到 24 孔板(每毫升 3×10^5 个)。待细胞铺满 12 孔板底部后, 通过 10 μ L 枪头在孔板底部中心划直线, 用磷酸盐缓冲液洗掉刮下的细胞, 在显微镜下拍照并用 Image J 软件记录划痕宽度 N1, 吸去磷酸盐缓冲液, 加入不含血清的基础培养基, 在培养箱中继续常规培养 24 h, 在显微镜下拍照并用 Image J 软件记录划痕宽度 N2。愈合百分比 = $(N1 - N2) / N1 \times 100\%$, 实验重复 4 次。

1.7 双荧光素酶报告基因实验检测 circ-TNRC6A 和 miR-494-3p 靶向关系 以荧光素酶载体 pRL-TK 为模版构建野生型 circ-TNRC6A 质粒 (circ-TNRC6A-WT) 和突变型 circ-TNRC6A 质粒 (circ-TNRC6A-Mut)。5637 细胞生长至 50% 比例, 分别将 200 nmol/L 的 circ-TNRC6A-WT、circ-TNRC6A-Mut 与 miR-NC mimic、miR-494-3p mimic 共同转染至 5637 细胞, 转染使用 Lipofectamine 2000 试剂。转染 42 h 后, 通过双荧光素酶检测试剂盒裂解细胞, 采用化学发光仪检测各组的荧光素酶活性, 实验重复 4 次。

1.8 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达水平情况 配制含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液, 低温裂解细胞, 通过 BCA 检测试剂盒分析每组蛋白的浓度。取等量蛋白通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳分离, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜, 采用 6% 脱脂牛奶在 26℃ 中封闭 4 h, 在 5℃ 下孵育一抗 CTNBL1 (1 : 1 500)、 β -Tubulin (1 : 5 000)、GSK3 β (1 : 3 000)、 β -catenin (1 : 3 000)、cyclin D1 (1 : 3 000)。洗膜 5 次, 加入二抗山羊抗兔 IgG (1 : 8 000) 在 26℃ 下孵育 2 h。洗膜 5 次, 在硝酸纤维素膜表面加超敏化学试剂, 于化学发光仪中曝

光、扫描, 实验重复 4 次。
1.9 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件分析所有数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 circ-TNRC6A 的表达情况 circ-TNRC6A 由第 4 和第 5 外显子反向剪接形成, 见图 1。基于 TC-GA 数据库下载的膀胱癌环状 RNA 表达水平分析, circ-TNRC6A 在膀胱癌组织中明显低表达 ($P < 0.01$), 见图 2。随后通过分析 circ-TNRC6A 表达水平与膀胱癌患者临床分期的关系, 结果显示 circ-TNRC6A 表达水平与膀胱癌患者临床分期有关 ($P < 0.05$), 见图 3。

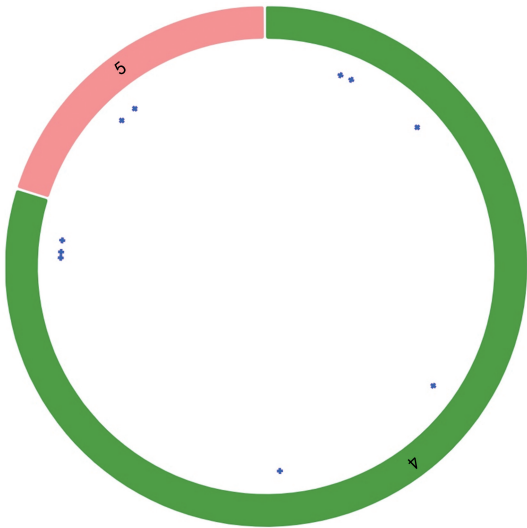
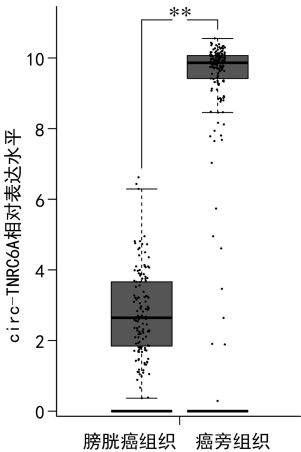


图 1 circ-TNRC6A 结构示意图



注: 与癌旁组织比较, ** $P < 0.01$

图 2 circ-TNRC6A 在膀胱癌组织和癌旁组织中的表达情况

2.2 circ-TNRC6A 在膀胱癌细胞系中低表达 qRT-PCR 检测结果显示, 与 SV-HUC-1 细胞比较, 膀胱癌细胞系 MGH-U3、5637、RT-4、T24、J82 中 circ-TNRC6A 表达水平降低 (均 $P < 0.05$), 在后续实验

中选择 circ-TNRC6A 表达水平最低的 5637 细胞进行研究,见图 4。

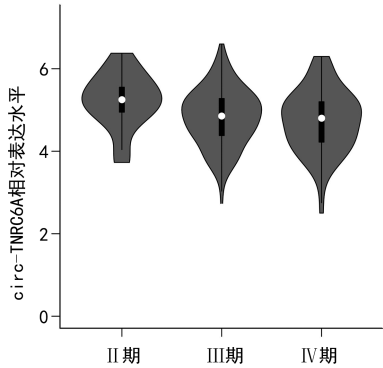
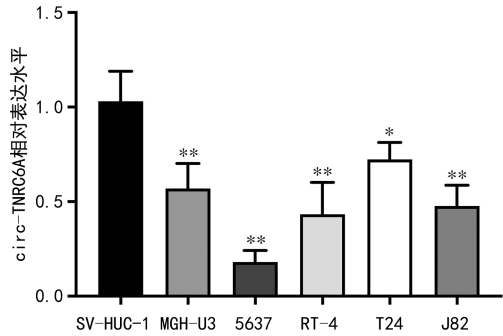


图 3 circ-TNRC6A 表达水平与膀胱癌患者临床分期的关系

2.3 circ-TNRC6A 质粒的转染效率 NC 组和 circ-TNRC6A 组 5637 细胞中 circ-TNRC6A 表达水平分别为 0.99 ± 0.33 和 9.57 ± 2.07 , NC 组 circ-TNRC6A 表达水平低于 circ-TNRC6A 组 ($P < 0.01$)。

2.4 过表达 circ-TNRC6A 抑制 5637 细胞的增

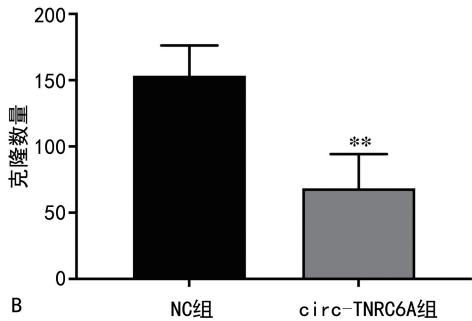
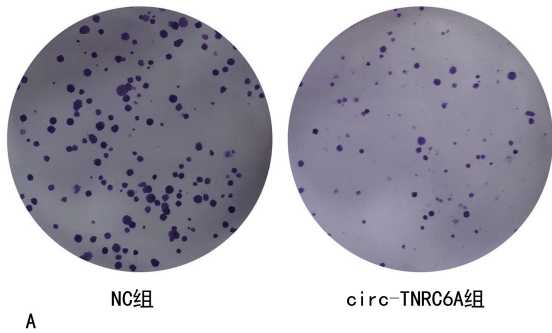
殖 细胞克隆形成实验显示,NC 组和 circ-TNRC6A 组 5637 细胞克隆数量分别为 (153.40 ± 11.42) 个、 (68.35 ± 12.93) 个,NC 组 5637 细胞克隆数量明显高于 circ-TNRC6A 组 ($P < 0.01$),见图 5。



注:与 SV-HUC-1 细胞比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

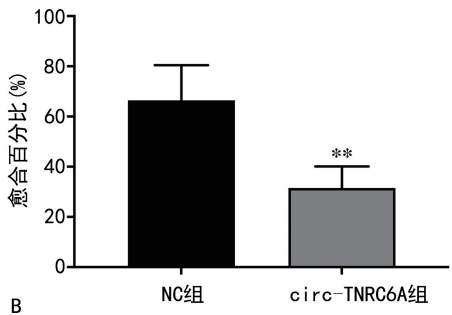
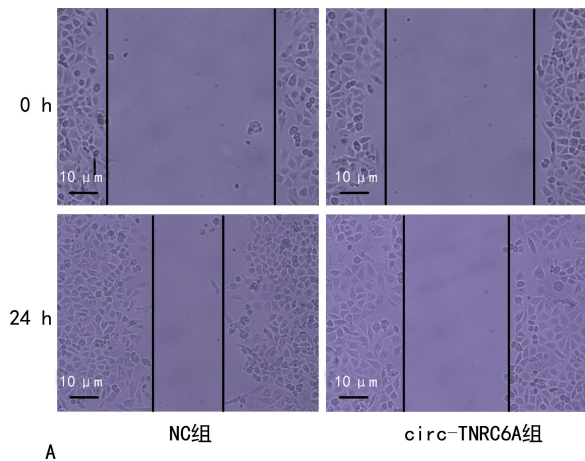
图 4 circ-TNRC6A 在膀胱癌细胞系中的表达情况

2.5 过表达 circ-TNRC6A 抑制 5637 细胞的迁移 细胞划痕实验显示,NC 组和 circ-TNRC6A 组 5637 细胞愈合百分比分别为 $(66.42 \pm 7.02)\%$ 、 $(31.47 \pm 4.27)\%$,NC 组 5637 细胞愈合百分比高于 circ-TNRC6A 组 ($P < 0.01$),见图 6。



注:A 为 5637 细胞克隆肉眼观察效果图;B 为细胞克隆数量统计图,与 NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

图 5 细胞克隆形成实验检测 5637 细胞增殖能力



注:A 为 5637 细胞划痕效果图;B 为细胞愈合百分比统计图,与 NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

图 6 细胞划痕实验检测 5637 细胞迁移能力

2.6 膀胱癌细胞中 circ-TNRC6A 靶向结合 miR-494-3p 为了明确 circ-TNRC6A 与 miR-494-3p 之间

的调控关系,本研究利用 lncRNAmapper 软件预测 circ-TNRC6A 与 miR-494-3p 之间的结合位点, circ-

TNRC6A 与 miR-494-3p 之间存在互补结合位点,见图 7。双荧光素酶报告基因检测显示,含有 circ-TNRC6A 野生型序列的荧光素酶报告载体 circ-TNRC6A-WT 和 miR-494-3p 共转染组的荧光素酶活性明显降低($P<0.01$),含有 circ-TNRC6A 突变型序列的荧光素酶报告载体 circ-TNRC6A-Mut 和 miR-494-3p 共转染组的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),见图 8。

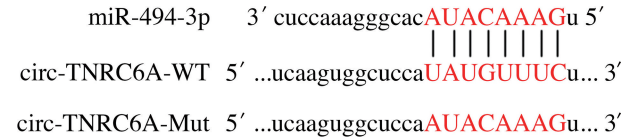
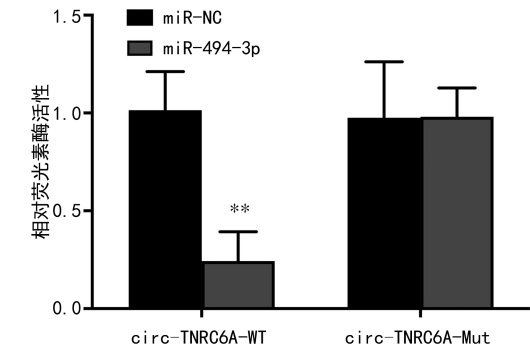


图 7 circ-TNRC6A 与 miR-494-3p 的靶向结合位点



注:与 miR-NC 比较, ** $P<0.01$ 。

图 8 双荧光素酶实验检测各组 5637 细胞的荧光素酶活性

2.7 过表达 circ-TNRC6A 抑制 miR-494-3p 表达 NC 组和 circ-TNRC6A 组 5637 细胞中 miR-494-3p 表达水平分别为 5.88 ± 0.45 、 1.04 ± 0.23 ,转染 circ-TNRC6A 的 5637 细胞中 miR-494-3p 表达水平明显降低($P<0.01$)。

2.8 过表达 circ-TNRC6A 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活 与 NC 组比较,过表达 circ-TNRC6A 的 5637 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白 CTNNBL1、GSK3 β 、 β -catenin、cyclin D1 表达水平降低,见图 9。

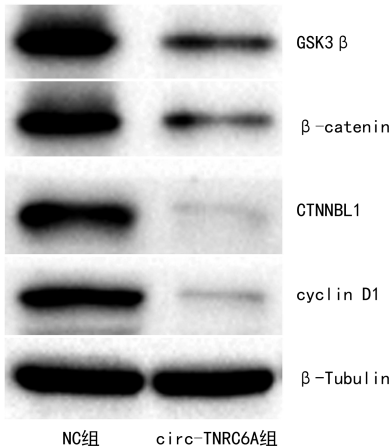


图 9 Western blot 检测各组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达

3 讨 论

膀胱癌的发病机制尚不清楚,相关研究证明膀胱癌的发病与多种抑癌基因表达沉默及癌基因的异常激活相关^[7]。circRNA 是近年来发现的在肿瘤细胞中呈现癌基因或抑癌基因作用的环状小 RNA,参与肿瘤细胞的代谢、发育、形态变化^[8]。circRNA 与多数肿瘤的发病具有相关性,其对于肿瘤的临床诊断、发现新的治疗靶点具有重要意义^[9]。目前已有报道,在膀胱癌中存在大量异常高表达或低表达的 circRNA,发挥肿瘤抑制因子或促进因子的作用^[10]。circSETD3 主要分布在细胞质中,其在膀胱癌临床组织和细胞系中表达降低,并且在临床分期较晚、淋巴结转移阳性和预后较差的膀胱癌患者组织中表达更低,circSETD3 作为肿瘤抑制因子抑制膀胱癌细胞上皮间充质转化和细胞干性^[11]。膀胱癌组织和细胞系中 circVANG1 表达水平明显升高,敲低 circVANG1 在体内和体外可抑制膀胱癌细胞的活力,同时促进细胞凋亡并增加膀胱癌细胞对多柔比星的敏感性^[12]。circ-TNRC6A 是一个闭环 RNA,本研究目的在于探讨 circ-TNRC6A 在膀胱癌发展中的作用机制。

本研究发现 circ-TNRC6A 在膀胱癌组织中表达下调,并且 circ-TNRC6A 表达水平与膀胱癌患者临床分期有关。细胞学研究表明,circ-TNRC6A 在膀胱癌细胞系中表达下调,过表达 circ-TNRC6A 可以抑制膀胱癌 5637 细胞的增殖和迁移。以上研究结果证实,circ-TNRC6A 在膀胱癌细胞中发挥癌基因作用。有研究表明,circRNA 通过与 miRNA 上的位点互补配对结合,从而导致 miRNA 表达降低或者功能抑制^[13]。本研究采用靶基因预测软件 lncRNAmapper 分析,miR-494-3p 可能是 circ-TNRC6A 的下游靶点。研究发现,miR-494-3p 是 miR-494 的一种亚型,其在非小细胞肺癌、肝癌等多种癌症中高表达,与癌症的发生、发展有关^[14-15]。XU 等^[16]研究显示,miR-494-3p 在膀胱癌组织和细胞系中高表达,沉默 miR-494-3p 能够减弱膀胱癌细胞的增殖和迁移能力。本研究采用双荧光素酶报告基因实验证实,miR-494-3p 能够靶向结合 circ-TNRC6A,同时发现 circ-TNRC6A 能够下调 miR-494-3p 表达,miR-494-3p 是 circ-TNRC6A 的下游靶点。Wnt/ β -catenin 信号通路是调控细胞功能的重要信号通路,其在膀胱癌的发生、发展中起到关键作用,可以促进膀胱癌细胞的增殖和迁移^[17]。而 miR-494-3p 已被证明可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路提高肿瘤细胞的活力和转移能力^[18]。本研究发现,过表达 circ-TNRC6A 可以抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,进一步证明了 circ-

TNRC6A 通过调控 miR-494-3p 发挥作用。

综上所述, circ-TNRC6A 作为膀胱癌中的肿瘤抑制因子, 通过下调 miR-494-3p 表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活, 进而抑制膀胱癌 5637 细胞增殖和迁移, 本研究为膀胱癌中 circ-TNRC6A 的靶向治疗应用提供新的理论基础。

参考文献

[1] PETKOVIC S, GRAFF S, FELLER N, et al. Circular versus linear RNA topology: different modes of RNA-RNA interactions in vitro and in human cells[J]. RNA Biol, 2021, 18(Suppl 2):S674-S683.

[2] WEI W J, SUN J Y, ZHANG H, et al. Circ0008399 interaction with WTAP promotes assembly and activity of the m(6)a methyltransferase complex and promotes cisplatin resistance in bladder cancer[J]. Cancer Res, 2021, 81(24):6142-6156.

[3] YE W X, CHEN L, FENG C, et al. CircMYLK promotes the growth, migration, invasion, and survival of bladder cancer cells by upregulating CCND3 level via competitively binding to miR-34a[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(8):1206-1216.

[4] CHEN P, CHEN J, HE L, et al. Identification of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in bladder cancer by integrated analysis[J]. Urol Int, 2021, 105(7/8):705-715.

[5] DENG G, WANG R H, SUN Y, et al. Targeting androgen receptor (AR) with antiandrogen Enzalutamide increases prostate cancer cell invasion yet decreases bladder cancer cell invasion via differentially altering the AR/circRNA-ARC1/miR-125b-2-3p or miR-4736/PPAR γ /MMP-9 signals[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(7):2145-2159.

[6] DUBOIS J, RUEGER J, HAUBOLD B, et al. Transcriptome analyses of urine RNA reveal tumor markers for human bladder cancer: validated amplicons for RT-qPCR-based detection[J]. Oncotarget, 2021, 12(10):1011-1023.

[7] MU C, WANG X L, RUAN Y, et al. Recent advances in the contribution of circRNAs to cisplatin chemotherapy resistance in cancers[J]. Neoplasma, 2021, 68(6):1119-1131.

[8] FENG L W, FU D M, GAO L, et al. Circular RNA_0001495 increases Robo1 expression by sponging microRNA-527 to promote the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(8):1046-1055.

[9] CHEN Y, WANG D, SHU T, et al. Circular RNA_0000326 promotes bladder cancer progression via microRNA-338-3p/ETS Proto-Oncogene 1/phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(2):11410-11422.

[10] LI G, GUO B Y, WANG H D, et al. CircRNA hsa_circ_0014130 function as a miR-132-3p sponge for playing oncogenic roles in bladder cancer via upregulating KCNJ12 expression[J]. Cell Biol Toxicol, 2022, 38(6):1079-1096.

[11] TIAN Y, GAO P, DAI D, et al. Circular RNA circSETD3 hampers cell growth, migration, and stem cell properties in bladder cancer through sponging miR-641 to upregulate PTEN[J]. Cell Cycle, 2021, 20(16):1589-1602.

[12] ZHU J H, ZHANG F. Circular RNA VANG1 knock-down suppressed viability, promoted apoptosis, and increased doxorubicin sensitivity through targeting miR-145-5p to regulate SOX4 in bladder cancer cells[J]. Open Med (Wars), 2021, 16(1):1010-1021.

[13] LIN S Q, WANG L, SHI Z M, et al. Circular RNA circ-FLNA inhibits the development of bladder carcinoma through microRNA miR-216a-3p/BTG2 axis[J]. Bioengineered, 2021, 12(2):11376-11389.

[14] YANG Y, YANG T, ZHAO Z F, et al. Down-regulation of BMAL1 by miR-494-3p promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis by increasing GPAM-mediated lipid biosynthesis[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(16):6129-6144.

[15] KAŹMIERCZAK D, EIDE I J Z, GENCHEVA R, et al. Elevated expression of miR-494-3p is associated with resistance to osimertinib in EGFR T790M-positive non-small cell lung cancer[J]. Transl Lung Cancer Res, 2022, 11(5):722-734.

[16] XU X H, SUN J M, CHEN X F, et al. MicroRNA-494-3p facilitates the progression of bladder cancer by mediating the KLF9/RGS2 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(11):1070-1079.

[17] ZHANG W, LIU Z H. MiRNA-139-3p inhibits malignant progression in urothelial carcinoma of the bladder via targeting KIF18B and inactivating Wnt/beta-catenin pathway[J]. Pharmacogenet Genomics, 2023, 33(1):1-9.

[18] FU C B, WANG S C, JIN L, et al. CircTET1 inhibits retinoblastoma progression via targeting miR-492 and miR-494-3p through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Curr Eye Res, 2021, 46(7):978-987.