·生命科学与新药探索·

circCSPP1 调控 miR-495-3p/XIAP 轴对顺铂耐药骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭的影响

陈立喜，卓泽铭*，符林雄，蒲博强

（中南大学湘雅医学院附属海口市人民医院骨科，海南 海口 570208）

[摘要] 目的 探讨环状 RNA 中心体和纺锤体极相关蛋白 1（circular RNA centrosome and spindle pole-associated protein 1，circCSPP1）调控 miR-495-3p/X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白（X-linked inhibitor of apoptosis protein，XIAP）轴对顺铂耐药骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**方法** 采用细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）法检测顺铂对骨肉瘤细胞（U2OS）、顺铂耐药骨肉瘤细胞（U2OS/DDP）的半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）值。通过双荧光素酶报告实验、RNA 免疫沉淀实验和 RNA pull-down 实验分析 circCSPP1、miR-495-3p 与 XIAP 的靶向关系。将 U2OS/DDP 细胞分为 control 组（未转染）、si-circCSPP1 组（转染 circCSPP1 siRNA）、si-NC 组（转染 siRNA 阴性对照）、miR-NC 组（转染模拟物阴性对照）、miR-495-3p mimic 组（转染 miR-495-3p 模拟物）、si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor 组（转染 circCSPP1 siRNA 和 miR-495-3p 抑制物）、pcDNA-NC 组（转染过表达阴性对照）、pcDNA-circCSPP1 组（转染 circCSPP1 过表达载体质粒）。以实时荧光定量聚合酶链反应检测 circCSPP1、miR-495-3p 和 XIAP mRNA 表达；蛋白质免疫印迹检测 XIAP 蛋白表达；CCK-8 法检测 U2OS/DDP 细胞存活率；集落形成实验检测 U2OS/DDP 细胞克隆能力；Transwell 实验检测 U2OS/DDP 细胞迁移和侵袭情况。**结果** 第 1、3、5 代 U2OS/DDP 细胞的 IC_{50} 分别为 23.44、20.38、17.38 μg·mL^{-1}，显著高于 U2OS 细胞的 3.17、3.06、2.79 μg·mL^{-1}，前者分别是后者的 7.39、6.66、6.23 倍。circCSPP1 与 miR-495-3p 存在直接相互作用，miR-495-3p 与 XIAP 存在直接相互作用。相较于 control 组、si-NC 组，si-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞高表达 miR-495-3p（$P < 0.05$），XIAP mRNA 和蛋白表达水平、细胞存活率、集落形成数、侵袭数、迁移数均降低（$P < 0.05$）。相较于 control 组、miR-NC 组，miR-495-3p mimic 组 U2OS/DDP 细胞 XIAP mRNA 和蛋白表达水平、细胞存活率、集落形成数、迁移数、侵袭数均降低（$P < 0.05$）。相较于 si-circCSPP1 组，si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor 组 U2OS/DDP 细胞 XIAP mRNA 和蛋白表达水平、细胞存活率、集落形成数、迁移数、侵袭数均升高（$P < 0.05$）。相较于 control 组、pcDNA-NC 组，pcDNA-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞存活率、集落形成数、侵袭数、迁移数均升高（$P < 0.05$）。**结论** 干扰 circCSPP1 通过调控 miR-495-3p/XIAP 轴可抑制顺铂耐药骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 顺铂；骨肉瘤；环状 RNA 中心体和纺锤体极相关蛋白 1；微小 RNA-495-3p；X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白；耐药

[中图分类号] R979.1；R969；R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094（2026）08-0737-10

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.202506120389

Effect of circCSPP1 on the Proliferation, Migration and Invasion of Cisplatin-Resistant Osteosarcoma Cells by Regulating miR-495-3p/XIAP Axis

CHEN Lixi, ZHUO Zeming, FU Linxiong, PU Boqiang

(Department of Orthopedics, Haikou People's Hospital Affiliated to Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China)

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect of circular RNA centrosome and spindle pole-associated protein 1 (circCSPP1) regulating miR-495-3p/X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) axis on the proliferation, migration and invasion of cisplatin-resistant osteosarcoma cells. **Methods** Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of cisplatin on osteosarcoma cells (U2OS) and cisplatin-resistant osteosarcoma cells (U2OS/DDP). Dual-luciferase reporter assay, RNA immunoprecipitation assay and RNA pull-down assay were utilized to analyze the targeting relationship among circCSPP1, miR-495-3p, and XIAP. The U2OS/DDP cells were divided into control group (untransfected), si-circCSPP1 group (transfected with circCSPP1 siRNA), si-NC group (transfected with siRNA negative control), miR-NC group (transfected with mimic negative control), miR-495-3p mimic group (transfected with miR-495-3p mimic), si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor group (transfected with circCSPP1 siRNA and miR-495-3p inhibitor), pcDNA-NC group (transfected with overexpression negative control), and pcDNA-circCSPP1 group (transfected with circCSPP1 overexpression plasmid). Subsequently, real-time quantitative polymerase chain reaction detected the expression of circCSPP1, miR-495-3p, and XIAP mRNA; while Western blot was used to detect XIAP protein expression; CCK-8 method was used to detect the survival rate of U2OS/DDP cells; colony formation assays was used to detect the cloning ability of U2OS/DDP cells. Transwell experiment was used to detect migration and invasion of U2OS/DDP cells. **Results** The IC_{50} values for the 1st, 3rd and 5th generations of U2OS/DDP cells were 23.44, 20.38 and 17.38 μg·mL^{-1} respectively, which were

接受日期： 2026-03-05

***通信作者：** 卓泽铭，副主任医师 **研究方向：** 肩、髋、膝关节方面的诊治，创面修复等 **E-mail：** 66215103@qq.com

significantly higher than those of U2OS cells (3.17, 3.06 and 2.79 μg·mL^{-1}), and the former were 7.39, 6.66 and 6.23 times those of the latter. Mechanistically, circCSPP1 directly interacted with miR-495-3p, and miR-495-3p directly interacted with XIAP. Compared with the control group and the si-NC group, miR-495-3p expression of U2OS/DDP cells in the si-circCSPP1 group was significantly increased ($P < 0.05$), and XIAP mRNA and protein expression, cell survival rate, colony formation number, migration number and invasion number were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the control group and the miR-NC group, the XIAP mRNA and protein expression, cell survival rate, colony formation number, invasion number and migration number of U2OS/DDP cells in the miR-495-3p mimic group were significantly reduced ($P < 0.05$). compared with the si-circCSPP1 group, the XIAP mRNA and protein expression, cell survival rate, colony formation number, invasion number and migration number of U2OS/DDP cells in the si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor group were significantly increased ($P < 0.05$). Furthermore, compared with the control group and the pcDNA-NC group, the survival rate, colony formation number, invasion number and migration number of U2OS/DDP cells in the pcDNA-circCSPP1 group were all increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Interfering with circCSPP1 could inhibit the proliferation, migration and invasion of cisplatin-resistant osteosarcoma cells by regulating the miR-495-3p/XIAP axis.

[Key words] cisplatin; osteosarcoma; circular RNA centrosome and spindle pole-associated protein 1; miR-495-3p; X-linked inhibitor of apoptosis protein; drug resistance

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤，也是导致儿童和青年癌症相关死亡的主要原因之一[1]。顺铂作为一类广泛应用于实体瘤治疗的铂类抗肿瘤化疗药物，在骨肉瘤的联合治疗方案（手术和化疗）中占重要地位，能显著提高患者的长期生存率。然而，肿瘤细胞对顺铂产生的耐药性严重制约了其临床疗效[2]。环状 RNA（circular RNA，circRNA）是一类以共价闭环为特征的非编码 RNA 分子，已被证实在多种癌症的发生发展与化疗耐药中发挥关键作用[3-4]。circRNA 中心体和纺锤体极相关蛋白 1（circRNA centrosome and spindle pole-associated protein 1，circCSPP1）是近年发现的一种具有致癌特性的 circRNA。研究表明，在肾细胞癌中 circCSPP1 高表达，并通过靶向 miR-493-5p 促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移[5]。在结直肠癌中，下调 circCSPP1 通过 miR-944/卷曲蛋白 7（frizzled-7，FZD7）轴减弱肿瘤细胞对阿霉素的耐药性并抑制疾病进展[6]。然而，circCSPP1 在骨肉瘤中的功能及其是否参与调控骨肉瘤顺铂耐药，目前尚未阐明。此外，miR-495-3p 是一种在骨肉瘤中发挥抑癌作用的微小 RNA（microRNA，miRNA），其过表达可诱导细胞周期阻滞和凋亡，从而抑制肿瘤细胞恶性表型[7]。X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白（X-linked inhibitor of apoptosis protein，XIAP）为凋亡抑制剂家族的重要成员，具有较强的抗凋亡功能。研究显示，XIAP 在骨肉瘤中表达上调，LncRNA hotairm1 通过竞争性结合 miR-106a-5p 以解除其对 XIAP 的抑制，从而发挥致癌作用[8]。Starbase、TargetScan 数据库预测显示，miR-495-3p 与 circCSPP1 及 XIAP 的 3'UTR 区域均存在潜在结合位点，但 circCSPP1 是否通过调控 miR-495-3p/XIAP 轴介导骨肉瘤的顺铂耐药，仍有待进一步实验验证。因此，本研究旨在探讨 circCSPP1 对顺铂耐药骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响，重点从 miR-495-3p/XIAP 轴角度阐释其潜在分子机制，为临床靶向该信号通路逆转骨肉瘤顺铂化疗耐药研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

骨肉瘤细胞 U2OS（中国科学院上海细胞库，批号：TCHu88）；顺铂（批号：824510）、EZ-Magna RIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒（批号：17-701）均购自美国 Sigma-Aldrich 公司；Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix（批号：11137ES10）、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix（批号：11201ES03）均购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；Trizol 试剂（上海碧云天生物公司，批号：R0016）；山羊抗兔 IgG（批号：ab205718）、兔磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）多克隆抗体（批号：ab245355）、兔源 XIAP 多克隆抗体（批号：ab21278）均购自上海艾博抗贸易公司；Lipofectamine 2 000（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号：11668019）；小干扰 RNA（siRNA）、miRNA 模拟物、重组荧光素酶报告载体、miRNA 抑制物均购自上海生工公司；细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）（美国 GlpBio 公司，批号：GK10001）；Transwell 小室（美国 corning 公司，批号：3450）；增强型化学发光试剂盒（广州左克生物公司，批号：BF06053-100）。SpectraMax i3x 酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；RCK-40C 显微镜（上海蔡康光学仪器有限公司）；CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪、GelDoc XR+凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U2OS 细胞于 10% 胎牛血清+

RPMI-1640培养基上培养，传代比例1∶3。U2OS/DDP细胞系由亲本细胞系U2OS建立，以间歇浓度梯度（1、3、5、7 μg·mL^{-1}）进行U2OS细胞培养[9]，诱导期内每隔2 d按时按对应浓度更新含顺铂的培养基，细胞稳定生长7 d改为下一筛选浓度，至细胞于7 μg·mL^{-1}下稳定生长。每次实验前，U2OS/DDP细胞在无药RPMI-1640培养基中培养2周。

1.2.2 测定U2OS和U2OS/DDP对顺铂半数抑制浓度 取第1、3、5代U2OS或U2OS/DDP细胞，以5 × 10^{3}个/孔接种于96孔板，每组设置3个复孔，实验独立重复3次（n = 9）。细胞贴壁后，加入含不同浓度（0、0.5、1、2、4、8、16 μg·mL^{-1}）顺铂的培养基孵育48 h，随后每孔加入10 μL CCK-8溶液，继续在培养箱内孵育2 h。450 nm处以酶标仪对各孔吸光度（absorbance，A）进行检测，细胞存活率=（$A_{实验孔}-A_{空白孔}$）/（$A_{对照孔}-A_{空白孔}$）×100%。计算U2OS和U2OS/DDP细胞的半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测U2OS、U2OS/DDP细胞中circCSPP1、miR-495-3p和XIAP mRNA表达 用Trizol试剂从第5代U2OS、U2OS/DDP细胞中分离总RNA。用Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix合成cDNA，实时荧光定量聚合酶链反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）采用Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix在荧光定量PCR仪上完成。每组设置3个复孔，实验独立重复3次（n = 9）。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算circCSPP1、miR-495-3p和XIAP mRNA相对表达水平。circCSPP1上游5′-CCATCCCATCAGTTCATCCT-3′，下游5′-CCCTGCAAAAGGACTACAGG-3′；内参GAPDH上游5′-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3′，下游5′-GCCATCACGCCACAGTTTC-3′；miR-495-3p上游5′-ACACTCCAGCTGGGAAACAAACATGGTGCA-3′，下游5′-TGGTGTCGTGGAGTCG-3′；内参U6上游5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′，下游5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′；XIAP上游5′-TGGGGTTCAGTTTCAAGGAC-3′，下游5′-CGCCTTAGCTGCTCTTCAGT-3′。

1.2.4 蛋白质免疫印迹检测U2OS、U2OS/DDP细胞中XIAP蛋白表达 用放射免疫沉淀测定裂解缓冲液，提取第5代U2OS、U2OS/DDP细胞总蛋白。定量后，取蛋白样品30 μg，完成十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳，对其蛋白进行分离，然后将分离出的蛋白置于聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上。封闭PVDF膜2 h，内参GAPDH、XIAP加入一抗后，4 ℃条件下对膜孵育过夜。随后，加入山羊抗兔免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）二抗，室温下孵育PVDF膜1 h。采用增强型化学发光试剂盒显影，以Image J 6.0软件对XIAP蛋白表达情况进行检测。每组设置3个复孔，实验独立重复3次（n = 9）。GAPDH抗体按1∶3 000稀释，山羊抗兔IgG二抗按1∶2 000稀释，XIAP抗体按1∶1 000稀释。

1.2.5 实验分组 按照1 × 10^{4}个/孔的密度将第5代U2OS/DDP细胞接种24孔板，于细胞40%汇合时完成瞬时转染，操作步骤依据Lipofectamine 2 000说明书。根据转染序列不同分为si-circCSPP1组（转染circCSPP1 siRNA）、si-NC组（转染siRNA阴性对照）、miR-NC组（转染模拟物阴性对照）、miR-495-3p mimic组（转染miR-495-3p模拟物）、si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor组（转染circCSPP1 siRNA和miR-495-3p抑制物）、pcDNA-NC组（转染过表达阴性对照）、pcDNA-circCSPP1组（转染circCSPP1过表达载体质粒）。收集转染48 h的细胞，参照方法“1.2.3”“1.2.4”步骤检测circCSPP1、miR-495-3p、XIAP mRNA和蛋白表达水平。未转染的U2OS/DDP细胞纳入control组。

1.2.6 双荧光素酶报告实验 通过Starbase、TargetScan数据库在线预测，miR-495-3p与circCSPP1、XIAP均具有潜在结合位点。将含有miR-495-3p结合位点的XIAP（或circCSPP1）的突变型（mut）序列或野生型（wt）序列分别插入pmirGLO荧光素酶报告载体，构建重组载体wt-XIAP、wt-circCSPP1、mut-XIAP、mut-circCSPP1。构建完成后将其与miR-495-3p mimics、miR-NC共转染至U2OS/DDP细胞，转染48 h后采用双荧光素酶报告检测系统分析其相对荧光素酶活性，每组设置3个复孔，实验独立重复3次（n = 9）。

1.2.7 RNA结合蛋白免疫沉淀测定 使用EZ-Magna RNA结合蛋白免疫沉淀（RNA-binding protein immunoprecipitation，RIP）试剂盒进行RIP检测。取偶联有阴性对照正常IgG（稀释比例1∶5 000）或抗Ago2抗体（稀释比例1∶5 000）的磁珠，与细胞裂解液在室温条件下共同孵育4 h。为明确结合靶标的富集程度，后续对免疫沉淀获得的RNA进行提取，并通过RT-qPCR检测circCSPP1、miR-495-3p水平，每组设置3个复孔，实验独立重复3次（n = 9）。

1.2.8 RNA pull-down测定 生物素标记的miR-495-

3p 及其对照探针均由上海生工生物技术有限公司制备。探针包被微珠的制备过程为：将上述探针与链霉亲和素包被的微珠在 25 ℃条件下共同孵育 2 h。实验中，先收集 U2OS/DDP 细胞并进行裂解处理，随后加入 miR-495-3p 探针，在 4 ℃环境下孵育过夜。孵育完成后，收集微珠，采用 TRIzol 试剂对形成的复合物进行纯化。之后，通过 RT-qPCR 分析 circCSPP1 的水平，每组设置 3 个复孔，实验独立重复 3 次（$n = 9$）。

1.2.9 CCK-8 法检测细胞增殖 取 96 孔板，按每孔 5×10^3 个细胞数量接种各组 U2OS/DDP 细胞，每组设置 3 个复孔，实验独立重复 3 次（$n = 9$）。待细胞贴壁后按每孔 10 μL 的标准加入 CCK-8 溶液，于培养箱内孵育 2 h。以酶标仪于 450 nm 处对各孔 A 值进行检测，计算细胞存活率。

1.2.10 集落形成实验检测细胞克隆能力 取 6 孔板，按每孔 3×10^2 个细胞数量接种各组 U2OS/DDP 细胞，每组设置 3 个复孔，实验独立重复 3 次（$n = 9$）。置于培养箱培养 12 ~ 14 d，培养至细胞集落。然后以多聚甲醛（4%）固定，结晶紫（0.5%）染色。显微镜下观察记录 > 50 个细胞集落形成数。

1.2.11 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭情况 各组 U2OS/DDP 细胞经无血清培养基重悬，取细胞悬液 200 μL（约含 1×10^5 个细胞），转移至 Transwell 装置上室，将补充胎牛血清（10%）的细胞培养液 500 μL 加入 24 孔板下室，孵育 24 h，擦净 Transwell 小室膜上表面的细胞，以多聚甲醛（4%）固定、结晶紫（0.1%）染色 Transwell 小室膜下表面细胞。于显微镜下观察并拍照，迁移细胞数为随机选取 3 个视野的细胞数均值。每组设置 3 个复孔，实验独立重复 3 次（$n = 9$）。侵袭检测时先以基质胶（稀释比例 1 ∶ 8）包被 Transwell 小室膜，其他操作同细胞迁移测定步骤。

1.3 统计学分析

统计分析使用 GraphPad Prism 9 软件。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）或中位数（四分位数间距）[$M(P_{25}, P_{75})$]表示；2 组间比较行独立样本 t 检验、校正 t 检验或 Mann-Whitney U 秩和检验。多组间比较若满足正态性且方差齐行单因素方差分析，事后多重比较行 Tukey's 检验；若方差不齐，采用 Welch 方差分析，事后多重比较行 Dunnett's T3 检验。若数据不符合正态分布，行 kruskal-wallis 秩和检验，事后进行 Bonferroni 法两两比较。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度顺铂对 U2OS 及 U2OS/DDP 细胞存活率的影响

随着顺铂浓度增加，U2OS 细胞、U2OS/DDP 细胞的存活率逐渐降低（$P < 0.05$）。第 1、3、5 代 U2OS/DDP 细胞的 IC_{50} 分别为 23.44、20.38、17.38 μg·mL^{-1}，显著高于 U2OS 细胞的 3.17、3.06、2.79 μg·mL^{-1}，前者分别是后者的 7.39、6.66、6.23 倍。结果显示，即便连续传代至第 5 代，U2OS/DDP 细胞仍保持稳定且显著的耐药特性（耐药倍数均 ≥ 6 倍），完全符合耐药细胞株的建立标准，证实 U2OS/DDP 耐药细胞模型构建成功（见图 1）。

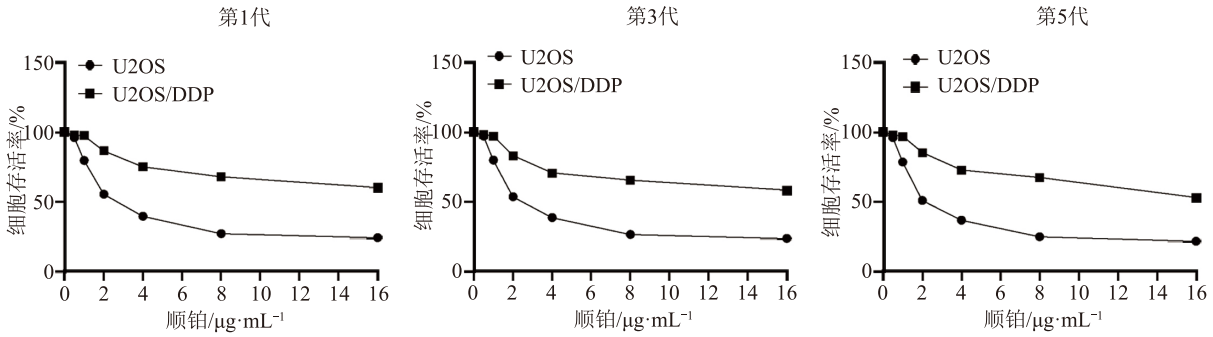


图 1 U2OS 及 U2OS/DDP 细胞存活率曲线

2.2 各组细胞 circCSPP1、miR-495-3p 及 XIAP 表达变化

与 U2OS 细胞比较，U2OS/DDP 细胞中 circCSPP1、XIAP mRNA 和蛋白水平均高表达（$P < 0.05$），miR-495-3p 低表达（$P < 0.05$），见图 2 和表 1。与 control 组、si-NC 组比较，si-circCSPP1 A/B 组 U2OS/DDP 细胞 circCSPP1 低表达（$P < 0.05$），见表 2，故选择 circCSPP1 表达水平较低的 si-circCSPP1 B 组进行实验。相较于 control 组、si-NC 组，si-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞 miR-495-3p 高

表达，XIAP mRNA 和蛋白水平均低表达（$P < 0.05$）；相较于 miR-NC 组，miR-495-3p mimic 组 U2OS/DDP 细胞 miR-495-3p 高表达，XIAP mRNA 和蛋白水平均低表达（$P < 0.05$）；相较于 si-circCSPP1 组，si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor 组 U2OS/DDP 细胞 miR-495-3p 低表达（$P < 0.05$），XIAP mRNA 和蛋白水平均高表达（$P < 0.05$），见图 3 和表 3。

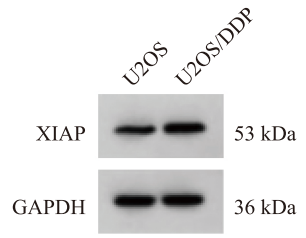


图 2 U2OS 及 U2OS/DDP 细胞中 XIAP 蛋白表达

表 1 U2OS 和 U2OS/DDP 细胞中 circCSPP1、miR-495-3p、XIAP mRNA 和蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	circCSPP1	miR-495-3p	XIAP mRNA	XIAP 蛋白
U2OS	0.99 ± 0.02	0.65 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.32 ± 0.02
U2OS/DDP	1.68 ± 0.11	0.33 ± 0.02	0.78 ± 0.06	0.68 ± 0.06
t/t'	18.515	17.827	16.547	17.076
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表 2 U2OS/DDP 细胞中 circCSPP1 表达比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	circCSPP1
control	1.00 ± 0.01
si-NC	0.99 ± 0.02
si-circCSPP1 A	0.25 ± 0.02*#
si-circCSPP1 B	0.13 ± 0.01*#
F	7 863.300
P	< 0.001

*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 si-NC 组相比，$P < 0.05$

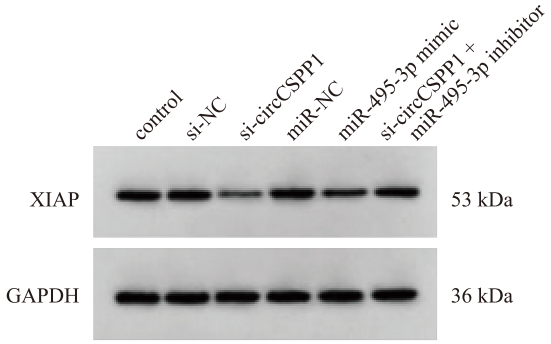


图 3 各组 U2OS/DDP 细胞中 XIAP 蛋白表达

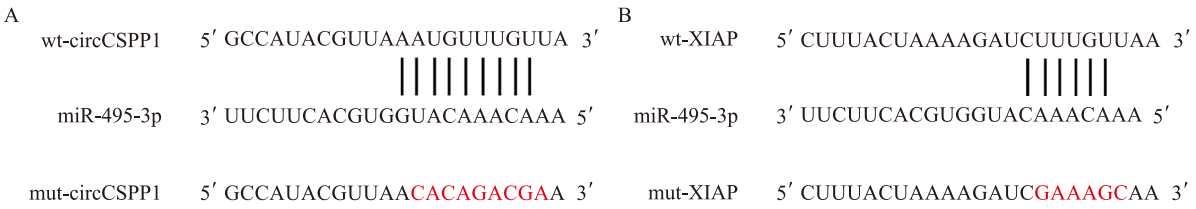
表 3 各组 U2OS/DDP 细胞中 miR-495-3p、XIAP mRNA 和蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	miR-495-3p	XIAP mRNA	XIAP 蛋白
control	1.00 ± 0.01	0.83 ± 0.06	0.70 ± 0.06
si-NC	0.99 ± 0.01	0.81 ± 0.05	0.68 ± 0.06
si-circCSPP1	4.02 ± 0.05*#	0.31 ± 0.03*#	0.17 ± 0.01*#
miR-NC	1.01 ± 0.02	0.80 ± 0.05	0.67 ± 0.05
miR-495-3p mimic	5.23 ± 0.08*△	0.46 ± 0.03*△	0.23 ± 0.02*△
si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor	1.31 ± 0.04▲	0.65 ± 0.04▲	0.57 ± 0.05▲
F/W	10 143.039	208.740	441.516
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001

*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 si-NC 组相比，$P < 0.05$；△与 miR-NC 组相比，$P < 0.05$；▲与 si-circCSPP1 组相比，$P < 0.05$

2.3 circCSPP1 靶向 miR-495-3p 及 miR-495-3p 靶向 XIAP

经 Starbase 预测，miR-495-3p 和 circCSPP1 具有互补序列，见图 4A。经 TargetScan 预测，miR-495-3p 和 XIAP 具有互补序列，见图 4B。和 wt-circCSPP1（或 wt-XIAP）共转染，转染 miR-495-3p mimics 与转染 miR-NC 比较 U2OS/DDP 细胞相对荧光素酶活性降低（$P < 0.05$）；和 mut-circCSPP1（或 mut-XIAP）共转染，转染 miR-495-3p mimics 与转染 miR-NC 比较 U2OS/DDP 细胞相对荧光素酶活性变化无差异（$P > 0.05$），见表 4。与 Anti-IgG 组相比，Anti-Ago2 组中 circCSPP1 和 miR-495-3p 的富集显著增加（$P < 0.05$），见图 5A 和表 5。Biotin-miR-495-3p 组中 circCSPP1 的富集量显著高于 Biotin-NC 组（$P < 0.05$），见图 5B 和表 6。



A：circCSPP1 和 miR-495-3p 互补序列；B：miR-495-3p 和 XIAP 互补序列

图 4 circCSPP1 和 miR-495-3p 互补序列及 miR-495-3p 和 XIAP 互补序列

表 4 双荧光素酶报告实验结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	wt-circCSPP1	mut-circCSPP1	wt-XIAP	mut-XIAP
miR-NC	0.96 ± 0.08	0.98 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.09
miR-495-3p mimics	0.26 ± 0.02	0.99 ± 0.09	0.14 ± 0.01	0.98 ± 0.08
t/t'	25.466	0.263	28.491	0.997
P	< 0.001	0.796	< 0.001	0.334

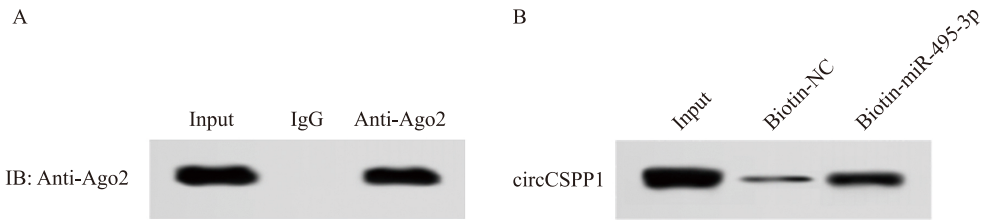


图 5 RIP（A）与 RNA pull-down（B）结果图

表 5 RIP 实验结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	circCSPP1	miR-495-3p
Anti-IgG	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.06
Anti-Ago2	5.68 ± 0.61	6.31 ± 0.65
t'	23.004	24.404
P	<0.001	< 0.001

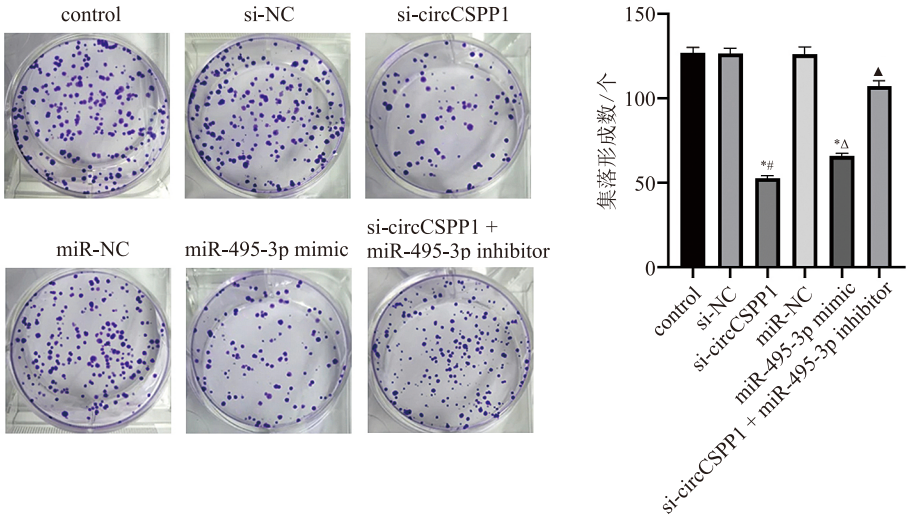
表 6 RNA pull-down 实验结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	circCSPP1
Input	1.00 ± 0.12
Biotin-NC	0.12 ± 0.02
Biotin-miR-495-3p	0.31 ± 0.03*
W	316.536
P	< 0.001

*与 Biotin-NC 组相比，$P < 0.05$

2.4 敲低 circCSPP1 或过表达 miR-495-3p 对 U2OS/DDP 细胞克隆、增殖的影响

si-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞克隆形成数、存活率均低于 control 组和 si-NC 组（$P < 0.05$）；miR-495-3p mimic 组 U2OS/DDP 细胞集落形成数、存活率均低于 control 组和 miR-NC 组（$P < 0.05$）；si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor 组 U2OS/DDP 细胞集落形成数、存活率均高于 si-circCSPP1 组（$P < 0.05$），见图 6 和表 7。



*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 si-NC 组相比，$P < 0.05$；△与 miR-NC 组相比，$P < 0.05$；▲与 si-circCSPP1 组相比，$P < 0.05$

图 6 各组 U2OS/DDP 细胞克隆情况

表 7 各组 U2OS/DDP 细胞存活率的检测（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	细胞存活率/%
control	100.00 ± 0.89
si-NC	99.84 ± 0.31
si-circCSPP1	42.37 ± 1.05*#
miR-NC	99.61 ± 0.96
miR-495-3p mimic	61.47 ± 2.00*△
si-circCSPP1+miR-495-3p inhibitor	83.10 ± 2.83▲
F/*W*	4 868.486
P	< 0.001

*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 si-NC 组相比，$P < 0.05$；△与 miR-NC 组相比，$P < 0.05$；▲与 si-circCSPP1 组相比，$P < 0.05$

2.5 敲低 circCSPP1 或过表达 miR-495-3p 对 U2OS/DDP 细胞迁移、侵袭的影响

si-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞侵袭、迁移数量均低于 control 组和 si-NC 组（$P < 0.05$）；miR-495-3p mimic 组 U2OS/DDP 细胞侵袭、迁移数量均低于 control 组和 miR-NC 组（$P < 0.05$）；si-circCSPP1 + miR-495-3p inhibitor 组 U2OS/DDP 细胞侵袭、迁移数量均高于 si-circCSPP1 组（$P < 0.05$），见图 7。

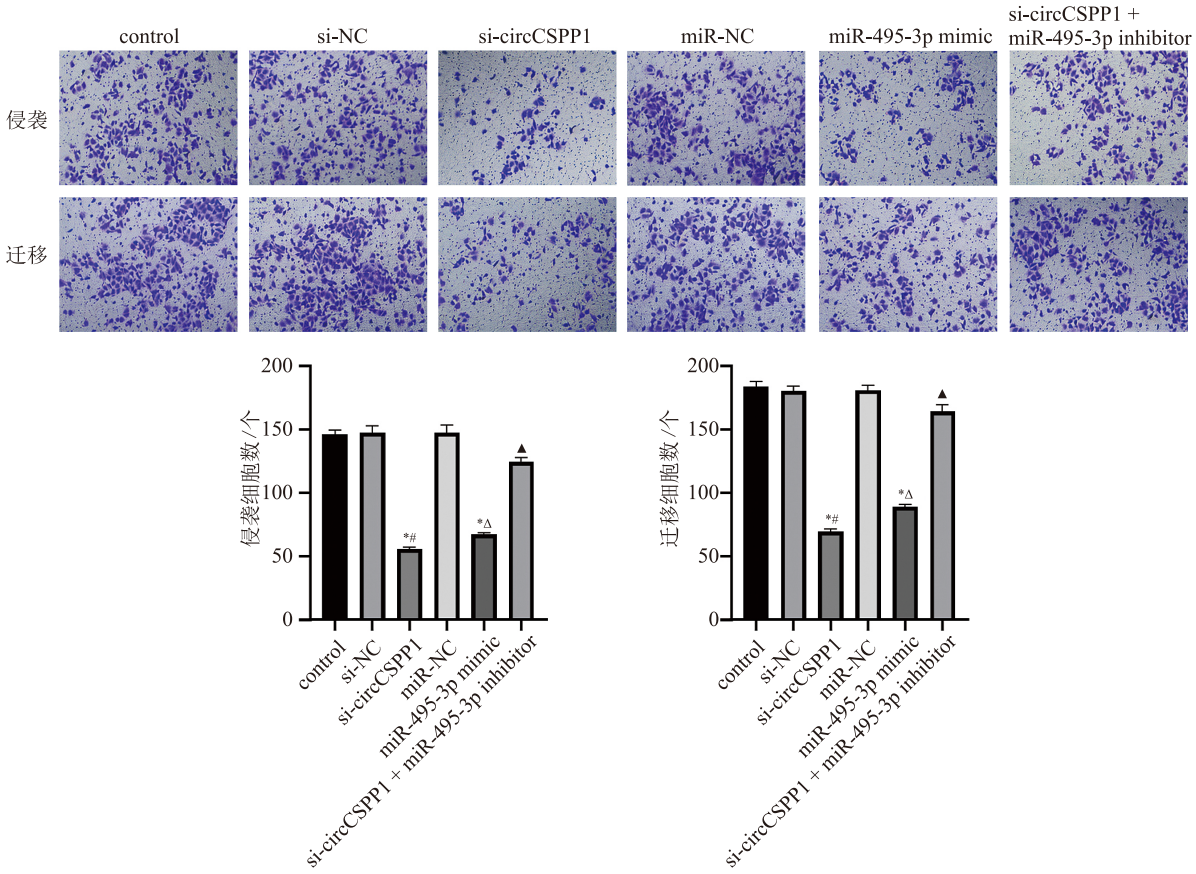
2.6 circCSPP1 过表达对 U2OS/DDP 细胞克隆、增殖、迁移、侵袭的影响

pcDNA-circCSPP1 组 U2OS/DDP 细胞 circCSPP1 表达、集落形成数、细胞存活率及侵袭、迁移数量均高于 control 组和 pcDNA-NC 组（$P < 0.05$），见图 8 和表 8。

3 讨论

顺铂耐药是骨肉瘤有效化疗的主要临床障碍之一。circRNA 的异常表达已被证实与骨肉瘤的发生、进展及化疗耐药密切相关。例如，circ-CHI3L1.2 通过调控 miR-340-5p/LPAATβ 轴促进骨肉瘤细胞增殖和顺铂耐药[10]。本研究进一步探讨了 circCSPP1 在骨肉瘤细胞顺铂耐药中的作用，结果显示，U2OS/DDP 细胞对顺铂的 IC_{50} 值显著高于 U2OS 细胞，且 circCSPP1 在 U2OS/DDP 细胞中呈高表达，提示

circCSPP1 可能参与骨肉瘤顺铂耐药性的形成。在功能上，干扰 circCSPP1 可显著抑制 U2OS/DDP 细胞的克隆形成、存活、迁移及侵袭能力；而过表达 circCSPP1 则产生相反效应，表明 circCSPP1 在骨肉瘤中发挥致癌作用。这一发现与既往研究一致：敲减 circCSPP1 可抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭[11]；在结直肠癌中，干扰 circCSPP1 同样可抑制阿霉素耐药细胞的恶性行为并增强其化疗敏感性[6, 12]。以上结果共同支持了 circCSPP1 作为骨肉瘤潜在治疗靶点的价值。



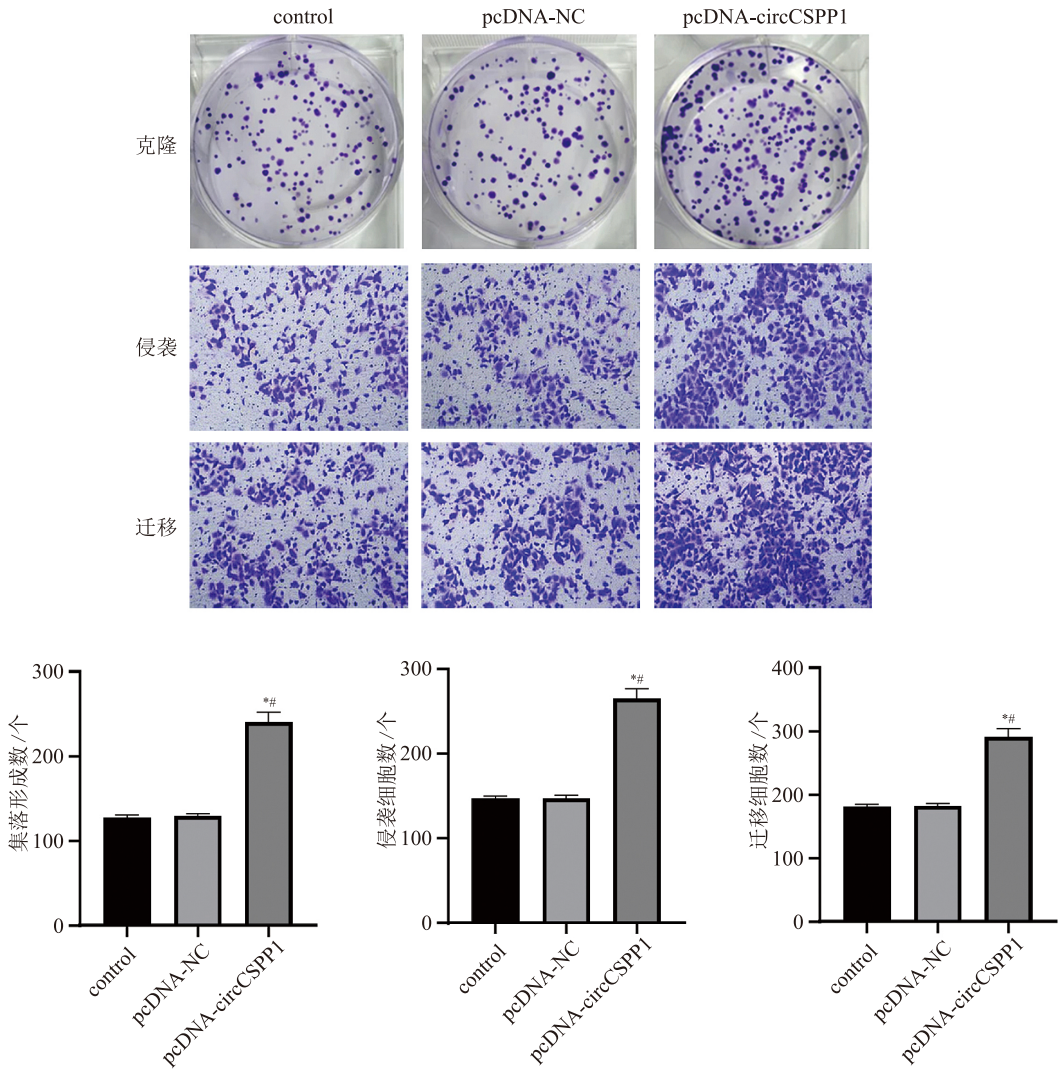
*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 si-NC 组相比，$P < 0.05$；△与 miR-NC 组相比，$P < 0.05$；▲与 si-circCSPP1 组相比，$P < 0.05$

图 7 各组 U2OS/DDP 细胞侵袭、迁移情况（× 200）

越来越多的研究表明，circRNA 可通过竞争性内源 RNA 网络调控肿瘤进程，即通过吸附 miRNA 影响下游靶 mRNA 的表达与功能[13]。本研究证实，miR-495-3p 为 circCSPP1 的直接作用靶点。既往研究表明，miR-495-3p 在乳腺癌中表达下调，并通过靶向 *GRP78* 抑制细胞增殖并逆转吡柔比星的化疗耐药性[14]；在肾细胞癌中，miR-495-3p 也可作为 circRNA 丝氨酸/苏氨酸蛋白扰动样激酶 1（circRNA tousled-like kinase 1，circTLK1）的下游分子，诱导细胞凋亡并抑制增殖和转移[15]。本研究发现，miR-495-3p 在 U2OS/DDP 细胞中显著下调，而其过表达可明显抑制细胞克隆形成、存活、侵袭与迁移，该效应与 circCSPP1 敲低表型一致，进一步支持了两者在功能上的关联。

作为重要的凋亡抑制蛋白，XIAP 在多种肿瘤中高表达并促进疾病进展。在胃癌中，XIAP 高表达可加速病情恶化[16]；在骨肉瘤中，抑制 XIAP 可降低细胞增殖并诱导凋亡[17]。此外，XIAP 为竞争性内源 RNA 网络中的关键下游靶标，如 miR-212-5p 通过下调 XIAP 抑制骨肉瘤细胞的恶性行为[18]，而 circ_0000282 则通过吸附 miR-192 上调 XIAP 促进肿瘤进展[19]。本研究通过生物信息学预测与实验验证，*XIAP* 是 miR-495-3p 在骨肉瘤中的直接靶基因。干扰 circCSPP1 可上调 miR-495-3p，而过表达 miR-495-3p 和干扰 circCSPP1 均能下调 XIAP 蛋白水平，提示 circCSPP1/miR-495-3p/XIAP 轴参与调控骨肉瘤进展。挽救实验进一步证实，抑制 miR-495-3p 可部分逆转由 circCSPP1 敲低所引起的细胞表型抑制，表明 miR-495-3p 是 circCSPP1 发挥功能的关键下游效应分子。上述结果显示，circCSPP1

通过吸附 miR-495-3p 解除其对 XIAP 的抑制作用，进而激活下游抗凋亡与促生存信号通路，最终驱动骨肉瘤顺铂耐药。值得注意的是，miR-495-3p 抑制并未完全恢复 circCSPP1 敲低所导致的表型变化，提示 circCSPP1 可能还存在其他非 miR-495-3p 依赖的调控机制，如与蛋白质相互作用或调控亲本基因转录等，这将是笔者课题组未来的重点研究方向。



*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 pcDNA-NC 组相比，$P < 0.05$

图 8 各组 U2OS/DDP 细胞克隆、侵袭、迁移情况（× 200）

表 8 各组 U2OS/DDP 细胞增殖检测（$\bar{x} \pm s$，$n = 9$）

分组	circCSPP1	细胞存活率/%
control	1.00 ± 0.09	100.00 ± 0.96
pcDNA-NC	1.02 ± 0.11	100.11 ± 1.25
pcDNA-circCSPP1	3.12 ± 0.19*#	181.65 ± 10.02*#
F/W	711.751	283.295
P	< 0.001	< 0.001

*与 control 组相比，$P < 0.05$；#与 pcDNA-NC 组相比，$P < 0.05$

总之，干扰 circCSPP1 可通过调控 miR-495-3p/XIAP 轴抑制顺铂耐药骨肉瘤细胞恶性生物学行为。本研究结果为难治性骨肉瘤的临床治疗提供参考。然而，尚未在敏感细胞中系统验证该通路的作用；机制

验证仅在 U2OS/DDP 细胞中开展，在其他骨肉瘤顺铂耐药系中是否也存在此通路调控效应尚不明确。因此，未来将优化方案设计，纳入敏感细胞株及其他骨肉瘤顺铂耐药系，同时开展动物实验进一步探讨，以期阐明其在骨肉瘤顺铂耐药进展中的具体作用机制，为开发精准靶向治疗提供更充分的实验依据。

[参考文献]

[1] Li S, Zhang H, Liu J, *et al*. Targeted therapy for osteosarcoma: a review[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(9): 6785−6797.

[2] Liu B, Li W, Zhang W, *et al*. PKMYT1 kinase ameliorates cisplatin sensitivity in osteosarcoma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 165.

[3] Wang M H, Liu Z H, Zhang H X, *et al*. Hsa_circRNA_000166 accelerates breast cancer progression *via* the regulation of the miR-326/ELK1 and miR-330-5p/ELK1 axes[J]. *Ann Med*, 2024, 56(1): 2424515.

[4] Chen J J, Shi P, Cui Z C, *et al*. CircRNA_0044556 affects the sensitivity of triple-negative breast cancer cells to paclitaxel by regulating miR-665[J]. *J Chemother*, 2025, 37(3): 238−246.

[5] Zhang D, Yang X, Luo Q, *et al*. Circular RNA CSPP1 motivates renal cell carcinoma carcinogenesis and the Warburg effect by targeting RAC1 through microRNA-493-5p[J]. *Acta Biochim Pol*, 2023, 70(3): 693−701.

[6] Xi L, Liu Q, Zhang W, *et al*. Circular RNA circCSPP1 knock-down attenuates doxorubicin resistance and suppresses tumor progression of colorectal cancer *via* miR-944/FZD7 axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 153.

[7] Zhao G, Zhang L, Qian D, *et al*. miR-495-3p inhibits the cell proliferation, invasion and migration of osteosarcoma by targeting C1q/TNF-related protein 3[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6133−6143.

[8] 陈卓远. LncRNA hotairm1 通过海绵吸附 miR-106a-5p 调控 XIAP 促进骨肉瘤进展的机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2022.

[9] 李玉椿. 长链非编码 RNA H19 对骨肉瘤顺铂化疗敏感性的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6043−6046.

[10] Zhang Z, Zhou Q, Luo F, *et al*. Circular RNA circ-CHI3L1.2 modulates cisplatin resistance of osteosarcoma cells *via* the miR-340-5p/LPAATβ axis[J]. *Hum Cell*, 2021, 34(5): 1558−1568.

[11] Xue Y F, Li M, Li W, *et al*. Roles of circ-CSPP1 on the proliferation and metastasis of glioma cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(10): 5519−5525.

[12] Li M, Zhuang J, Kang D, *et al*. Identification of circRNA circ-CSPP1 as a potent driver of colorectal cancer by directly targeting the miR-431/LASP1 axis[J]. *Open Life Sci*, 2021, 16 (1): 523−536.

[13] Zhu X, Wan J, You X, *et al*. Circular non-coding RNA circ_0072088 serves as a *CeRNA*, targeting the miR-1225-5p/WT1 axis to regulate non-small cell lung cancer cell malignant behavior[J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(20): 1969−1979.

[14] Liu M, Yang J, Lv W, *et al*. Down-regulating GRP78 reverses pirarubicin resistance of triple negative breast cancer by miR-495-3p mimics and involves the p-AKT/mTOR pathway[J]. *Biosci Rep*, 2022, 42: BSR20210245.

[15] Lei X, Yang M, Xiao Z, *et al*. circTLK1 facilitates the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by regulating miR-495-3p/CBL axis[J]. *Open Life Sci*, 2021, 16 (1): 362−374.

[16] Pei M, Zhang J, Yu Z, *et al*. LINC02139 interacts with and stabilizes XIAP to regulate cell proliferation and apoptosis in gastric cancer[J]. *Commun Biol*, 2024, 7: 1497.

[17] Qian H, Huang T, Chen Y, *et al*. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibitor Embelin induces apoptosis *via* PI3K/Akt pathway and inhibits invasion in osteosarcoma cells[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(S3): S648−S655.

[18] Guan J, Mo H, He J, *et al*. MicroRNA-212-5p targeted xiap inhibits malignant behavior of osteosarcoma cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2020, 13(5): 2966−2975.

[19] Li H, He L, Tuo Y, *et al*. Circular RNA hsa_circ_0000282 contributes to osteosarcoma cell proliferation by regulating miR-192/XIAP axis[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1026.

（责任编辑：康银花）