

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.05.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221122.0931.004.html\(2022-11-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221122.0931.004.html(2022-11-22))

hsa_circ_0000073 对骨肉瘤脂质代谢的影响*

任智晶¹, 杨震², 杨丹¹, 田晓滨^{3△}(1. 贵州省人民医院临床检验科, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院骨科, 贵阳 550002;
3. 贵州医科大学附属医院骨科, 贵阳 550000)

[摘要] **目的** 探讨 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤组织中的表达及其对骨肉瘤细胞脂质代谢的影响。**方法** 收集 2020 年 1 月至 2022 年 1 月贵州省人民医院就诊且经病理证实的 10 例骨肉瘤患者的肿瘤组织及癌旁组织, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 hsa_circ_0000073 的表达水平。骨肉瘤细胞转染 sh-NC 和 sh-hsa_circ_0000073, 通过 G418 构建稳转细胞株, 荧光显微镜和 qRT-PCR 验证干扰效率。使用 GeneChip 基因芯片筛选出差异常表达基因并进行 GO 分析, R 语言 (3.6.3 版本) 的“clusterProfiler”包用于数据分析, “ggplot2”包用于数据可视化。骨肉瘤细胞和裸鼠异种移植双重模型上进行油红实验、尼罗红实验评估 hsa_circ_0000073 对骨肉瘤细胞脂质代谢的影响。**结果** 与癌旁组织比较, 骨肉瘤组织 hsa_circ_0000073 表达水平升高 ($P < 0.05$)。转染 sh-RNAs 后, circ_0000073 干扰组 hsa_circ_0000073 表达水平低于对照组 ($P < 0.05$)。干扰 hsa_circ_0000073 后, GeneChip 表达谱芯片筛选出的差异基因主要富集于有丝分裂核分裂、纺锤体、染色体、着丝粒区, 而“代谢通路”是富集到的主要通路。circ_0000073 干扰组的骨肉瘤细胞和裸鼠异种移植瘤体中的红色脂质和尼罗红荧光强度均低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** hsa_circ_0000073 在骨肉瘤中高表达并与脂质代谢有关。

[关键词] 骨肉瘤; hsa_circ_0000073; 基因芯片; 代谢通路; 脂质代谢**[中图分类号]** R738.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)05-0641-07

Effect of hsa_circ_0000073 on lipid metabolism in osteosarcoma*

REN Zhijing¹, YANG Zhen², YANG Dan¹, TIAN Xiaobin^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of Orthopedics, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of hsa_circ_0000073 in osteosarcoma tissues and its effect on lipid metabolism in osteosarcoma cells. **Methods** Tumor tissues and paracancer tissues of 10 patients with osteosarcoma confirmed by pathology were collected from Guizhou Provincial People's Hospital from January 2020 to January 2022. The expression level of hsa_circ_0000073 was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Osteosarcoma cells were transfected with sh-NC and sh-hsa_circ_0000073. Stable cell lines were constructed by G418, and the interference efficiency was verified by fluorescence microscopy and qRT-PCR. The GeneChip microarray was used to screen out differentially expressed genes and perform GO and KEGG enrichment analysis was carried out. The “clusterProfiler” package in R language (version 3.6.3) was used for data analysis, and the “ggplot2” package was used for data visualization. The effects of hsa_circ_0000073 on lipid metabolism of osteosarcoma cells were evaluated by oil red assay and Nile red assay in dual model of osteosarcoma cell and nude mice xenotransplantation. **Results** Compared with paracancer tissue, the expression level of hsa_circ_0000073 in osteosarcoma tumor tissue was increased ($P < 0.05$). After transfection with sh-RNAs, the expression level of hsa_circ_0000073 in circ_0000073 interference group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). After interference with hsa_circ_0000073, the differential genes screened

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960208, 81960536); 贵州省人民医院青年基金项目 [GZSYQN(2019)15]。 作者简介: 任智晶 (1988—), 主管技师, 博士, 主要从事肿瘤相关研究。 △ 通信作者, E-mail: txb1216@126.com。

by GeneChip expression profile microarray were mainly enriched in mitotic mitosis, spindle, chromosome and centromeric region, and the “metabolic pathway” was the main pathway enriched. The fluorescence intensity of red lipids and Nile red in osteosarcoma cells and xenografts of nude mice in circ_0000073 interference group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** hsa_circ_0000073 is highly expressed in osteosarcoma and is associated with lipid metabolism.

[Key words] osteosarcoma; hsa_circ_0000073; gene chips; metabolic pathway; lipid metabolism

骨肉瘤是一种来源于间充质干细胞的恶性肿瘤,年发病率为 1/100 万~4/100 万,5 年生存率为 37.5%~77.6%^[1-5],了解骨肉瘤致病过程中的分子机制将有助于促进和发展更有效的治疗策略。最近的研究发现,能量代谢的重编程被认为是恶性转化的标志^[6]。其中,脂质代谢失调在癌症进展中具有至关重要的作用,靶向脂质代谢已被视为一种新的肿瘤治疗策略^[7-10]。环状 RNA (circRNA) 是一类非编码 RNA,与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力、细胞周期、凋亡及自噬等密切相关^[11-13]。同时,circRNA 也被证实可以参与调控肿瘤的脂质代谢^[14-15]。本课题组前期研究证实了 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤细胞系中高表达,并可促进骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[16]。然而 hsa_circ_0000073 是否可以影响骨肉瘤细胞代谢,国内外尚无研究报道。因此,本研究旨在探索 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤组织中的表达及其对骨肉瘤细胞及裸鼠异种移植瘤体中脂质代谢的影响,以为骨肉瘤的诊断和治疗提供潜在的靶点,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 骨肉瘤组织标本

收集 2020 年 1 月至 2022 年 1 月贵州省人民医院就诊且经病理证实的 10 例骨肉瘤患者的肿瘤组织和癌旁组织。10 例患者中男 6 例,女 4 例;年龄 >18 岁 2 例,<18 岁 8 例;均无高血压、糖尿病等其他基础疾病。本研究经过贵州省人民医院伦理委员会批准[伦预审(2019)030],所有研究对象签署知情同意书。

1.1.2 动物与细胞

12 只 BALB/C-nu 小鼠购自西普尔-比凯实验动物科技公司,4 周龄,平均体重约 15 g,分为两组,每组 6 只。骨肉瘤细胞系 MG-63 和 Saos-2 购自中国科学院细胞库。

1.1.3 试剂与仪器

引物、shRNA(安徽通用生物有限公司),MEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),McCoy's 5a 培养基(美国 Invitrogen 公司),LipofectamineTM3000(美国 Thermo 公司),TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司),油红 O 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),尼罗红荧光染色溶液(上海源叶生物科技有限公司),Gene Chip miRNA Array 4.0(美国 Affymetrix 公司),荧光定量 PCR(qRT-PCR)仪(杭州博日科技股份有限公司),倒置荧光显微镜(德国莱卡公司),自动酶标仪(中安生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组

根据细胞转染 hsa_circ_0000073 或随机序列的 shRNA,分为 circ_0000073 干扰组及对照组。

1.2.2 qRT-PCR

使用 Trizol 作为总 RNA 的抽提试剂。采用酸性酚-氯仿混合液纯化 RNA,异丙醇沉淀浓缩,乙醇洗涤沉淀。PrimeScript RTase 逆转录试剂盒和 SYBR Green PCR 试剂盒用于 qRT-PCR 检测,根据试剂说明书操作。使用 GAPDH 的表达水平进行标准化,并按公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达水平。引物序列见表 1。

1.2.3 细胞培养和稳转细胞株构建

MG-63 和 Saos-2 骨肉瘤细胞在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。培养基中添加 10% 胎牛血清。使用 LipofectamineTM3000 将 sh-NC(随机序列的 shRNA,对照)及 sh-hsa_circ_0000073 转染细胞,shRNAs 序列见表 2。48 h 后加入 500~800 μg/mL G418 进行筛选。4 周后,加入 200~300 μg/mL G418 维持培养。由于载体中带有绿色荧光蛋白,成功转染目的基因的细胞在荧光显微镜中会呈现绿色荧光。取对数生长期的各组细胞荧光显微镜下观察,待大部分细胞在荧光显微镜下呈现绿色荧光后,通过 qRT-PCR 检测确认转染效率。

表 1 qRT-PCR 所使用引物序列

引物	序列
hsa_circ_0000073	正向:5'-TGTGCCAGTGGATACAGTCT-3' 反向:5'-TCCTTATGCCCTTTGCAGC-3'
GAPDH	正向:5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3' 反向:5'-GCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'

表 2 shRNA 序列

项目	序列
sh-hsa_circ_0000073	5'-GCUGCAAAGGGGCAUAAGGAATT-3'
sh-NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

1.2.4 基因表达谱分析和生物信息学分析

为了揭示 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤中的作用及其机制,本研究使用了表达谱芯片对干扰 hsa_circ_0000073 后的差异基因进行筛选,并将筛选结果通过生物信息学方法进行富集分析。具体方法如下:细胞转染 sh-NC 或 sh-hsa_circ_0000073,使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。使用 GeneChip WT Pico Reagent Kit 检测基因表达谱,以 FC>1.5 为条件筛选差异表达基因。使用 GO 分析对差异基因进行富集分析,设置条件为:p. adj<0.05 和 q value<0.2。R 语言(3.6.3 版本)的“clusterProfiler”包用于数据分析,“ggplot2”包用于数据可视化。

1.2.5 油红染色

为了探索 hsa_circ_0000073 对骨肉瘤细胞脂质代谢的影响,本研究进行了油红实验检测细胞内脂质情况。细胞计数后加入 12 孔板,适宜条件下生长 48 h,各组细胞用 4% 多聚甲醛固定 1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次后,加入 3 mg/mL 油红染液于室温下染色 30 min,倒置显微镜下观察结果并拍照,异丙醇提取细胞内脂质,酶标仪检测吸光度值。

1.2.6 尼罗红荧光染色

由于不同实验方法的灵敏度及特异度不同,为了进一步验证 hsa_circ_0000073 对骨肉瘤细胞脂质代谢的影响,本研究还使用了尼罗红荧光染色实验对油红染色的实验结果进行验证。各组细胞计数后适宜条件下培养,脂肪固定液固定 24 h,1 mg/mL 尼罗红染色用 PBS 1:500 稀释成工作液,滴加到细胞爬片上,37℃ 下染色 30 min,PBS 洗涤后,荧光显微镜下观察结果,并测定荧光强度。

1.2.7 裸鼠异种移植实验

为了验证 hsa_circ_0000073 对在体生长的骨肉瘤细胞脂质代谢的影响,本研究使用了 BALB/C-nu 小鼠侧腋注射 2×10⁷ 个稳定转染的 MG-63 细胞。适宜条件下饲养 5 周后,处死小鼠,将瘤体冰冻切片后进行油红和尼罗红染色。

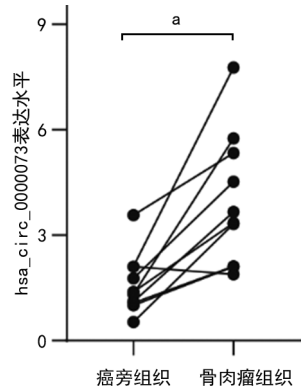
1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立样本 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤组织和癌旁组织的表达情况

hsa_circ_0000073 在骨肉瘤组织中的表达水平高于癌旁组织,差异有统计学意义(P<0.05),见图 1。



^a: P<0.05。

图 1 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤组织和癌旁组织的表达情况

2.2 细胞培养和稳转细胞株构建情况

通过 G418 筛选后,对数生长期的大部分细胞在荧光显微镜下呈现绿色荧光。与对照组比较,circ_0000073 干扰组 hsa_circ_0000073 表达水平降低(P<0.05),提示 sh-NC 和 sh-hsa_circ_0000073 的稳转细胞株建立成功,可以用于后续实验,见图 2~3。

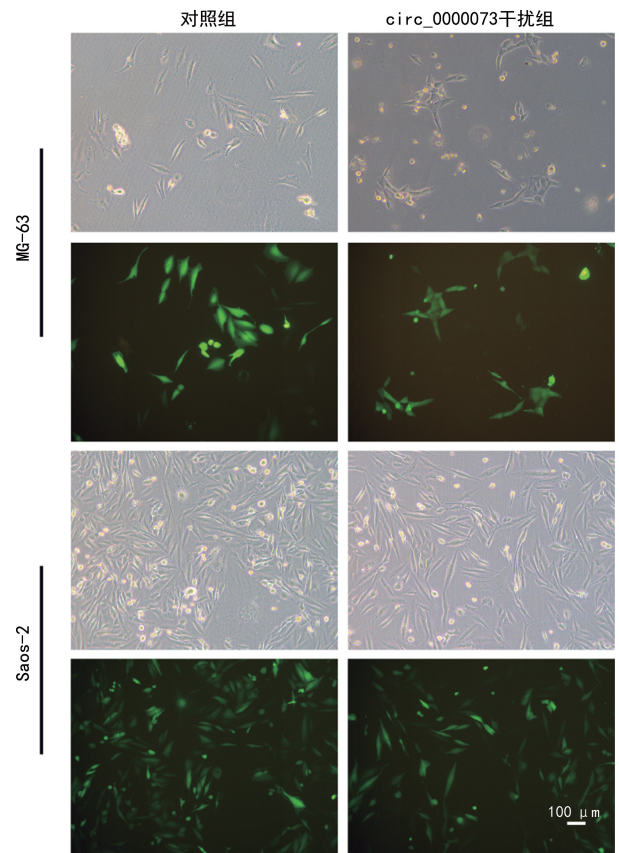


图 2 荧光显微镜观察结果

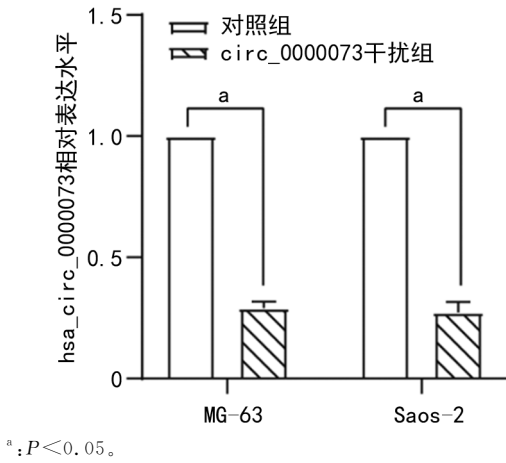


图3 sh-hsa_circ_0000073 相对表达水平

2.3 干扰 hsa_circ_0000073 后的基因表达谱分析

干扰 hsa_circ_0000073 后, MG-63 细胞和 Saos-2 细胞中分别有 1 838 和 1 255 个下调基因。通过韦恩分析, 共筛选出 398 个共同下调的差异基因。GO 分析结果显示这 398 个差异基因主要富集于有丝分裂核分裂、纺锤体、染色体、着丝粒区。KEGG 通路分析发现“代谢通路”是两种细胞干扰 hsa_circ_0000073 后富集到的主要通路, 见图 4~5。

2.4 hsa_circ_0000073 可影响骨肉瘤细胞脂质代谢

与对照组比较, circ_0000073 干扰组骨肉瘤细胞内脂质减少, 吸光度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 6~7。与对照组比较, circ_0000073 干扰组骨肉瘤细胞内尼罗红荧光强度减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 8~9。

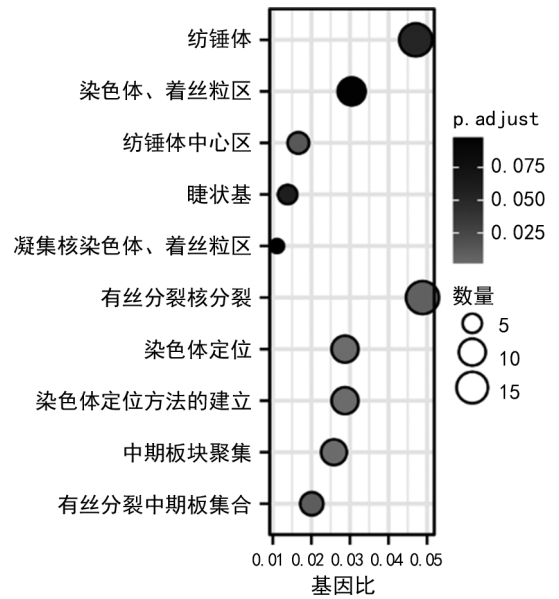


图4 差异基因的 GO 富集分析

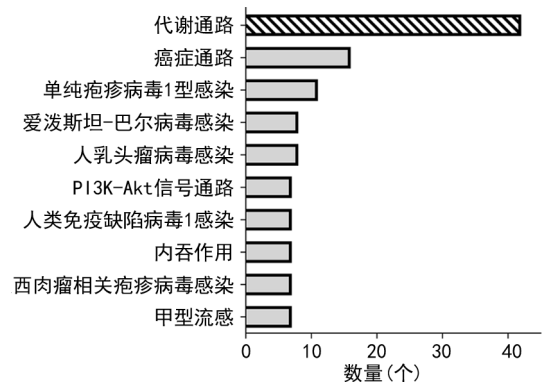


图5 KEGG 通路分析

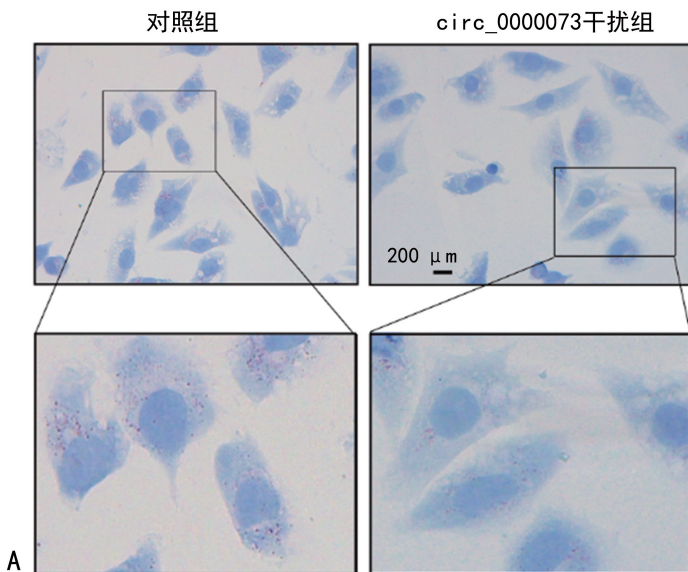
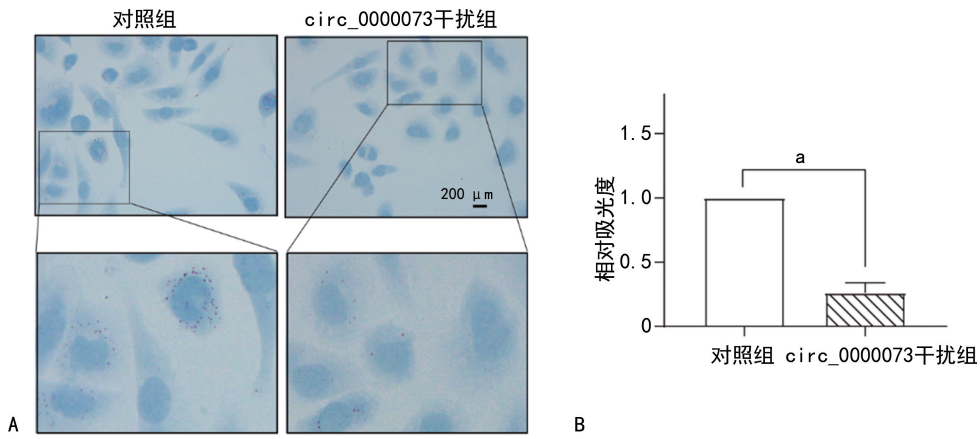


图6 MG-63 骨肉瘤细胞油红实验结果

2.5 hsa_circ_0000073 可影响裸鼠异种移植瘤中骨肉瘤细胞脂质代谢

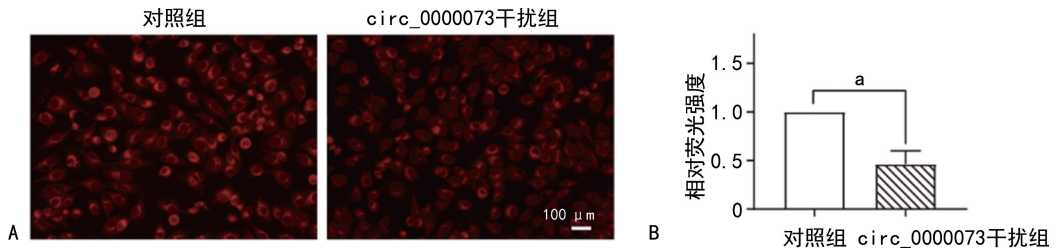
裸鼠移植瘤体组织的油红和尼罗红染色结果显

示, 与对照组比较, circ_0000073 干扰组脂质减少, 荧光强度减弱, 提示干扰 hsa_circ_0000073 可以降低在体骨肉瘤细胞的脂质代谢, 见图 10~11。



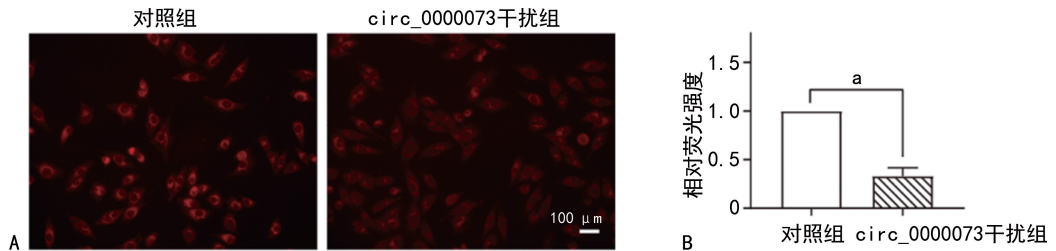
A: 两组油红染色图片; B: 两组脂质相对水平比较; ^a: $P < 0.05$ 。

图 7 Saos-2 骨肉瘤细胞油红实验结果



A: 两组尼罗红染色图片; B: 两组尼罗红荧光相对强度比较; ^a: $P < 0.05$ 。

图 8 MG-63 骨肉瘤细胞尼罗红实验结果



A: 两组尼罗红染色图片; B: 两组尼罗红荧光相对强度比较; ^a: $P < 0.05$ 。

图 9 Saos-2 骨肉瘤细胞尼罗红实验结果

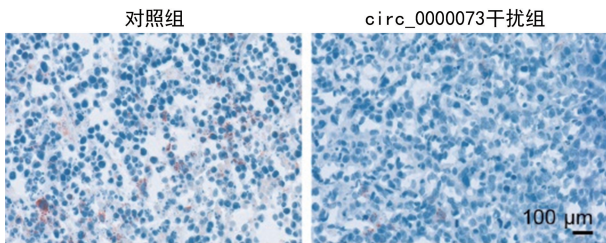


图 10 裸鼠异种移植油红实验结果

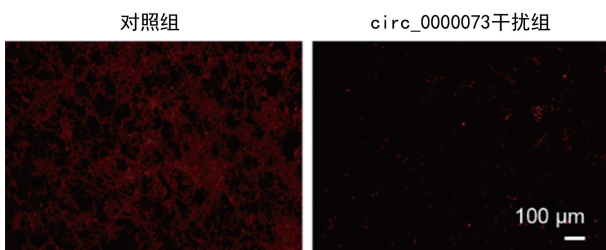


图 11 裸鼠异种移植尼罗红实验结果

稳定性引起的肿瘤标志^[6]。脂质作为重要的信号分子、维持结构完整性和储存能量的细胞成分,经常在癌症状态下重新编程^[17]。例如,肿瘤细胞中脂质代谢酶的表达及活性改变,内源性脂肪酸合成激活,脂肪动员异常等,均可导致脂质代谢失调,帮助肿瘤细胞以脂质为原料维持其快速增殖和转移行为,或促进异常的癌细胞-基质细胞通信,触发致癌信号以促进生长,从而导致疾病进展^[7-9]。在骨肉瘤中,有研究者以高通量的方式研究了转移性(143B)和非转移性(HOS)骨肉瘤细胞与正常胎儿成骨细胞(FOB)的总体脂质代谢差异,发现许多脂质种类在骨肉瘤的转移中存在较大差异^[17]。而另一项研究报告,抑制脂肪酸合酶(FASN)可通过下调 HER2/PI3K/AKT 信号通路活性影响骨肉瘤细胞转移^[18]。因此,靶向脂质代谢等代谢途径可能将有助于发展现有的骨肉瘤治疗策略。

3 讨论

最近的研究发现,能量代谢重编程是由基因组不

circRNA 是一种共价闭合环状结构的非编码

RNA。由于缺乏 3'端多聚腺苷酸化尾及 5'端帽结构, circRNA 可以避免外切核酸酶降解, 半衰期较长, 具有临床应用的潜能^[19]。越来越多的 circRNA 被发现参与肿瘤的脂质代谢。例如, 在 HepG2 细胞培养物和肝组织中, circRNA_0046367 表达被发现与甘油三酯水平呈负相关^[20]。另一则研究报道发现, circRNA_0057558 的表达与前列腺癌患者的甘油三酯水平呈正相关, 可能通过调节脂质水平以促进前列腺癌进展^[21]。在机制上, circGFRA1 被证实可通过 ceRNA 机制促进 GFRA1 的表达, 从而诱导三阴性乳腺癌细胞中脂质改变^[22]。而肺腺癌中高表达的 circFARSA 也被发现可能通过 miR-330-5p 和 miR-326 与 FASN 相互作用影响肿瘤进展^[14]。

本课题组前期研究分析了来自基因表达汇编(GEO)数据库 GSE96964 circRNA 芯片数据, 从中筛选出了 hsa_circ_0000073 作为目标分子, 并证实了其在骨肉瘤细胞系中高表达^[16]。该芯片数据是 2017 年 LIU 等^[23]为了将人骨肉瘤细胞系与人成骨细胞 hFOB1.19(对照)中的 circRNA 表达进行比较分析所获得的 circRNA 表达谱。自从该数据上传 GEO 数据库以来, 已被多名研究者下载使用, 并从中筛选出了多个对骨肉瘤进程具有重要作用的 circRNA, 为骨肉瘤的诊断和治疗研究提供了帮助^[24-25]。

本文在前期研究的基础上收集了 10 例骨肉瘤患者及其癌旁组织标本, 通过 qRT-PCR 分析, 发现 hsa_circ_0000073 在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织, 该结果与 LI 等^[26]报道一致。为进一步研究 hsa_circ_0000073 在骨肉瘤中的作用, 本研究使用了 Affymetrix 基因芯片分析干扰 hsa_circ_0000073 后的基因表达谱改变。考虑到生物信息学方法对于处理和大量信息至关重要, 本研究首先将基因芯片获得的差异基因进行了 GO 分析, 结果发现两种细胞的差异基因主要富集于有丝分裂核分裂、纺锤体、染色体、着丝粒区。KEGG 通路分析发现“代谢通路”是两种细胞干扰 hsa_circ_0000073 后富集到的主要通路。提示 hsa_circ_0000073 的功能可能与细胞的生长和分化有关, 尤其与细胞代谢关系密切。随后, 通过骨肉瘤细胞和裸鼠异种移植瘤双重模型, 证实了 hsa_circ_0000073 对骨肉瘤细胞脂质代谢的影响, 提示 hsa_circ_0000073 可能通过影响骨肉瘤细胞脂质代谢促进骨肉瘤进展。

综上所述, hsa_circ_0000073 在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织。通过基因芯片、生物信息学分析, 表明 hsa_circ_0000073 的功能可能与细胞的生长和分化有关, 尤其与细胞代谢关系密切。随后的体内外实验进一步证实了干扰 hsa_circ_0000073 可以影响

骨肉瘤细胞的脂质代谢, 该发现为骨肉瘤的诊断和治疗提供了新的思路, 丰富了骨肉瘤发病机制的理论依据。然而, 尽管有初步的证据表明 hsa_circ_0000073 在调节骨肉瘤脂质代谢中具有重要作用, 但未来仍需纳入更多的临床相关性研究, 同时还需要深入探讨 hsa_circ_0000073 影响骨肉瘤脂质代谢的分子机制, 以期相应分子的转化应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):7-30.
- [2] HARRISON D J, GELLER D S, GILL J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1):39-50.
- [3] ZHANG B, ZHANG Y, LI R, et al. The efficacy and safety comparison of first-line chemotherapeutic agents (high-dose methotrexate, doxorubicin, cisplatin, and ifosfamide) for osteosarcoma: a network meta-analysis[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1):51.
- [4] CHEN K, JIAO J, XUE J, et al. Ginsenoside CK induces apoptosis and suppresses proliferation and invasion of human osteosarcoma cells through the PI3K/mTOR/p70S6K1 pathway[J]. Oncol Rep, 2020, 43(3):886-896.
- [5] OTOUKESH B, BODDOUHI B, MOGHTA-DAEI M, et al. Novel molecular insights and new therapeutic strategies in osteosarcoma[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18:158.
- [6] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1):31-46.
- [7] BELORIBI D S, VASSEUR S, GUILLAUMOND F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells[J]. Oncogenesis, 2016, 5(1):e189.
- [8] BAENKE F, PECK B, MIESS H, et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development[J]. Dis Model Mech, 2013, 6(6):1353-1363.
- [9] MARTINEZ O U E, SOTGIA F, LISANT M P. Power surge: supporting cells “fuel” cancer cell mitochondria[J]. Cell Metab, 2012, 15(1):4-5.
- [10] VISWESWARAN M, ARFUSO F, WARRIER

- S, et al. Aberrant lipid metabolism as an emerging therapeutic strategy to target cancer stem cells[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(1): 6-14.
- [11] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [12] CHEN R, LEI S, JIANG T, et al. Roles of lncRNAs and circRNAs in regulating skeletal muscle development [J]. *Acta Physiol*, 2020, 228(2): e13356.
- [13] WU P, MO Y, PENG M, et al. Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 22.
- [14] HANG D, ZHOU J, QIN N, et al. A novel plasma circular RNA circFARSA is a potential biomarker for non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2783-2791.
- [15] DEEP G, SCHLAEPFER I R. Aberrant lipid metabolism promotes prostate cancer: role in cell survival under hypoxia and extracellular vesicles biogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1061.
- [16] REN Z, YANG Q, GUO J, et al. Circular RNA hsa_circ_0000073 enhances osteosarcoma cells malignant behavior by sponging miR-1252-5p and modulating CCNE2 and MDM2[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 714601.
- [17] ROY J, DIBAEINIA P, FAN T M, et al. Global analysis of osteosarcoma lipidomes reveal altered lipid profiles in metastatic versus non-metastatic cells[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(2): 375-387.
- [18] WANG T F, WANG H, PENG A F, et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses U-2 OS cell invasion and migration via downregulating the activity of HER2/PI3K/AKT signaling pathway in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(2): 229-234.
- [19] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 453-461.
- [20] GUO X Y, CHEN J N, SUN F, et al. circRNA_0046367 prevents hepatotoxicity of lipid peroxidation: an inhibitory role against hepatic steatosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3960197.
- [21] XIA Q, DING T, ZHANG G, et al. Circular RNA expression profiling identifies prostate cancer-specific circRNAs in prostate cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1903-1915.
- [22] HE R, LIU P, XIE X, et al. circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 145.
- [23] LIU W, ZHANG J, ZOU C, et al. Microarray expression profile and functional analysis of circular rnas in osteosarcoma. cellular physiology and biochemistry[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 969-985.
- [24] ZHANG Z, PU F, WANG B, et al. Hsa_circ_0000285 functions as a competitive endogenous RNA to promote osteosarcoma progression by sponging hsa-miRNA-599 [J]. *Gene therapy*, 2020, 27(5): 186-195.
- [25] XU Y, YAO T, NI H, et al. Circular RNA circ-SIPA1L1 contributes to osteosarcoma progression through the miR-411-5p/RAB9A signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 642605.
- [26] LI X, LIU Y, ZHANG X, et al. Circular RNA hsa_circ_0000073 contributes to osteosarcoma cell proliferation, migration, invasion and methotrexate resistance by sponging miR-145-5p and miR-151-3p and upregulating NRAS [J]. *Aging*, 2020, 12(14): 14157-14173.