

文章编号 1006-8147(2023)03-0265-07

论著

GADD45A 通过端粒替代延长途径调控骨肉瘤细胞增殖

韩鑫宇,李婷芳,王峰

(天津医科大学基础医学院医学遗传学系,天津 300070)

摘要 目的:探讨 GADD45A 对骨肉瘤细胞的增殖和端粒调控功能。方法:应用 siRNA 和 shRNA 处理骨肉瘤细胞 U2OS,观察骨肉瘤细胞增殖、端粒功能和端粒延长替代途径的变化。qPCR 检测 GADD45A 敲低后 mRNA 水平。CCK-8 实验和克隆形成实验检测骨肉瘤细胞增殖情况。细胞中期分裂相-荧光原位杂交实验检测端粒功能变化。免疫荧光-荧光原位杂交实验和 C-circle 实验检测端粒损伤情况和端粒延长替代途径相关表型。结果:qPCR 结果表明,siRNA 敲低 GADD45A 后 mRNA 水平降低($t=25.96, P<0.0001$);shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 GADD45A 的 mRNA 水平降低($t=21.12, 18.37$, 均 $P<0.0001$)。对应的 CCK-8($t=5.051, 6.192, 3.775, 14.86, 22.93, 3.013, 14.61, 20.93$, 均 $P<0.05$)和克隆形成实验($t=46.68, 23.73, 24.98$, 均 $P<0.0001$)结果表明,敲低 GADD45A 抑制了骨肉瘤细胞增殖。细胞中期分裂相-荧光原位杂交实验结果显示,GADD45A 缺失会加重端粒多信号($t=24.04, 7.243, 27.93$, 均 $P<0.01$)和端粒信号缺失现象($t=8.222, 16.61, 6.781$, 均 $P<0.01$)。免疫荧光-荧光原位杂交实验结果表明,siRNA 敲低 GADD45A 后 H2AX 组蛋白变体和早幼粒细胞白血病体与端粒的共定位增加($t=19.16, 10.65$, 均 $P<0.0001$);shGADD45A-1、shGADD45A-2 也证实了 H2AX 组蛋白变体和早幼粒细胞白血病体与端粒共定位的比例升高($t=14.71, 24.03, 16.69, 18.10$, 均 $P<0.0001$)。C-circle 实验结果表明,siRNA 敲低 GADD45A 以及 shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 两细胞系中染色体外端粒 DNA 环 C-circle 水平升高($t=41.27, 14.06, 4.539$, 均 $P<0.05$)。结论:GADD45A 调控端粒延长替代途径、保护端粒功能并促进骨肉瘤细胞增殖。

关键词 GADD45A;骨肉瘤;端粒;端粒替代延长途径

中图分类号 R394.2

文献标志码 A

GADD45A regulates the proliferation of osteosarcoma cell through alternative lengthening of telomeres

HAN Xin-yu, LI Ting-fang, WANG Feng

(Department of Genetics in Medicine, School of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of GADD45A on the proliferation and telomere regulation of osteosarcoma cells. **Methods:** Osteosarcoma cell U2OS was treated with siRNA and shRNA to observe changes in cell proliferation, telomere function, and alternative lengthening of telomeres in osteosarcoma cells. The mRNA level of GADD45A knockdown was detected by qPCR. The proliferation of osteosarcoma cells was detected by CCK-8 assay and clone formation assay. Changes in telomere function were detected by metaphase phase-fluorescence in situ hybridization. Immunofluorescence fluorescence in situ hybridization and C-circle assay were used to detect telomere damage and phenotypes associated with alternative telomere lengthening pathways. **Results:** qPCR results showed that compared with NC group, mRNA level decreased after siRNA knockdown of GADD45A($t=25.96, P<0.0001$). Compared with shscramble group, the mRNA level of GADD45A in shGADD45A-1 and shGADD45A-2 decreased($t=21.12, 18.37$, both $P<0.0001$). The corresponding CCK-8($t=5.051, 6.192, 3.775, 14.86, 22.93, 3.013, 14.61, 20.93$, all $P<0.05$) and colony formation assay($t=46.68, 23.73, 24.98$, all $P<0.0001$) showed that deficiency of GADD45A inhibited the proliferation of osteosarcoma cells. The results of metaphase division phase fluorescence in situ hybridization showed that the loss of GADD45A could worsen the phenomenon of telomere multisignal($t=24.04, 7.243, 27.93$, all $P<0.01$) and telomere signal loss($t=8.222, 16.610, 6.781$, all $P<0.01$). The results of immunofluorescent-fluorescence in situ hybridization showed that the co-localization of γ -H2AX and PML with telomere increased after siRNA treatment of GADD45A($t=19.16, 10.65$, both $P<0.0001$); shGADD45A-1 and shGADD45A-2 also confirmed the proportion of γ -H2AX, PML and telomere co-localization increased($t=14.71, 24.03, 16.69, 18.10$, all $P<0.0001$). The results of C-circle assay showed that the level of C-circle in the outer telomere DNA circle increased among siGADD45A, shGADD45A-1 and shGADD45A-2 cell lines($t=41.27, 14.06, 4.539$, all $P<0.05$). **Conclusion:** GADD45A regulates the alternative lengthening of telomere, protects telomere function and promotes the proliferation of osteosarcoma cells.

Key words GADD45A; osteosarcoma; telomeres; alternative lengthening of telomeres

骨肉瘤是一种起源于类骨质组织,常见于儿童和青少年的恶性骨肿瘤,具有极强的侵袭性并且常常在早期发生转移,主要涉及股骨、胫骨和肱骨^[1-2]。端粒延长是肿瘤生长所必需的关键过程,不同于绝大多数肿瘤通过激活端粒酶来维持端粒,以骨肉瘤为代表的 10%~15% 的人类肿瘤通过端粒延长替代途径(alternative lengthening of telomeres pathway,ALT)来维持端粒。使用 ALT 延长端粒的肿瘤细胞具有独特的 ALT 相关表型,例如含有端粒 DNA 的大型早幼粒细胞白血病体(promyelocyte leukemia,PML),称为 ALT 相关 PML 小体(ALT-related PML bodies,APBs)以及染色体外端粒 DNA 环(C-circle)等^[3-4]。

生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a(GADD45A)定位于细胞核,其水平受周期调控,在 G1 期最高而 S 期显著降低。GADD45A 在细胞应激反应中起重要作用^[5-6]。此外还有研究表明,GADD45A 参与了小鼠干细胞端粒 DNA 损伤反应^[7]。GADD45A 在细胞周期进展和停滞、DNA 修复和表观遗传修饰等多方面的作用与 ALT 阳性肿瘤频繁的 DNA 损伤等特点高度相关^[7-8]。因此本文旨在探讨 GADD45A 对骨肉瘤细胞生长、端粒功能和端粒延长替代途径的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人骨肉瘤细胞 U2OS 为本实验室保存,DMEM 培养基(美国 Corning 公司),Opti-MEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),胎牛血清(乌拉圭 Lonsera 公司),ChamQ Mix、逆转录试剂盒、dNTP Mix(南京诺维赞生物科技有限公司),DNA 提取试剂盒(Biomiga 倍沃医学科技有限公司),RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司),无水乙醇、无水甲醇、异丙醇、冰乙酸(天津康科德生物化工公司),4% 多聚甲醛、1 mol/L Tris-HCl(pH7.2)、牛血清白蛋白(BSA)、6×DNA loading buffer(北京索莱宝生物技术公司),国产甲酰胺、秋水仙素(上海生工生物科技股份有限公司),进口甲酰胺、TritonX-100、TWEEN-20、Gelatin from cold water fish(美国 Sigma 公司),Blocking Reagent、DIG Easy Hyb Granules、CD-Star Ready-to-use solution、Anti-DIG-AP 抗体(瑞士 Roche 公司),TelC-FITC PNA 探针 488/CY3(韩国 Panagene 公司),DAPI、Anti-γH2AX 抗体(德国 Millipore 公司),Anti-PML 抗体(C-5)(Santa Cruz),Alexa 555 goat anti-Mouse 抗体、Lipofectamine RNAi-Max(美国 Thermo 公司),siRNA(苏州吉玛基因有限公司),Phi 29 DNAPolymerase(美国 NEB 公司),DNase/RNase free water(天根生化科技有限公司),细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK-8(兰杰柯科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 U2OS 细胞接种于 10 cm 培养皿中,以 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养于 37℃,5%CO₂ 的培养箱中,待细胞密度达 70%~80% 时进行传代。

1.2.2 siRNA 转染 将 U2OS 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至密度为 40%时进行转染。取两支离心管加入 Opti-MEM 后分别加入 siRNA 和 Lipofectamine RNAi-Max,震荡混匀后将两管混合,室温静置 5 min 后逐滴加入对应细胞中,反应 24 h 后弃去转染液每孔加入 2 mL 培养基,48 h 后收取细胞用于后续实验。对应 siRNA 序列见表 1。

表 1 目的基因 siRNA 序列

Tab 1 siRNA sequences of the target gene

基因名称	siRNA 序列(5'→3')
GADD45A	UUGCCGGGAAAGUCCCUACAU
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGU

注:GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a;Negative control:阴性对照

1.2.3 稳定敲低细胞系构建 使用 pLKO.1 质粒构建 shGADD45A 敲低细胞系。shRNA 序列见表 2。用 293T 细胞对质粒进行包被,吸取过滤病毒上清感染 U2OS 细胞构建稳定敲低细胞系。

表 2 shRNA 序列

Tab 2 Sequence of shRNA

引物名称	引物序列(5'→3')
shscramble	CAACAAGATGAAGAGACCAAA
shGADD45A-1	GAACACTGTGTACCACTGTT
shGADD45A-2	GATCGCACCTTACTCTGTT

注:GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a;shscramble:无义序列对照

1.2.4 实时荧光定量 PCR 收取细胞,试剂盒提取 RNA。测量 RNA 浓度后根据逆转录试剂盒将 1 μg RNA 逆转合成 cDNA,稀释 5 倍后用于后续实时荧光定量 PCR。按照 primer F 0.4 μL、primer R 0.4 μL、ChamQ Mix 10 μL、无核酸酶水 7.2 μL 的体系按照程序进行扩增(表 3)。根据荧光曲线的 ct 值用 2^{-ΔΔct} 计算 siRNA 敲低效率。

表 3 PCR 引物序列

Tab 3 Primer sequence for PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
GADD45A-forward	TGACAACGAATTTGGCTACA
GADD45A-reverse	GTGCTCCAGGGCTTACTCTC
GAPDH-forward	TGTAATCCTTGCATCACTGT
GAPDH-reverse	ATCTCCCTGAACGGTGAT

注:GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a;GAPDH:内参基因

1.2.5 CCK-8 增殖实验 牛鲍汁计数板计数 U2OS 细胞,96 孔板每孔接种 1 000 个细胞,每个处理组设置 6 组重复。分别测量转染后第 1、3、5、7 天的 450 nm 处吸光度值。

1.2.6 克隆形成实验 牛鲍汁计数板计数 U2OS 细胞,6 cm 皿接种 5 000 个细胞,每 3 天换 1 次液,第 7 天收取培养皿。吸弃培养基并用超纯水润洗,然后加 4%组织固定液固定 20 min。洗净固定液后加入 0.5%结晶紫染液,染色 20 min。洗净多余染液,在吸水纸上倒扣沥干水分,拍照保存用于后续分析。

1.2.7 细胞中期分裂相-荧光原位杂交(Metaphase-FISH) 直接接种稳定敲低细胞或将 U2OS 接种于 6 cm 培养皿,进行 siRNA 转染,收取细胞前 10 h 更换含秋水仙素的 DMEM 培养基(秋水仙素:培养基=1:100)。细胞沉淀加入 PBS 重悬,边震荡边加入 10 mL 37℃预热的 0.075 mol/L KCl,37℃水浴孵育 30 min,然后加入 5 滴预冷固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),室温静置 5 min,900 r/min 离心 8 min。吸弃上清液,边震荡边加入 10 mL 预冷固定液,室温静置 30 min,900 r/min 离心 8 min。吸弃上清液,加 1 mL 固定液重悬并取 50 μ L 滴片,静置 1 晚。第 2 天用 4%多聚甲醛固定细胞,脱水后用 TelC-FITC PNA 探针 CY3 杂交端粒 3 h,洗涤封片,-20℃保存用于后续拍摄统计。

1.2.8 免疫荧光-荧光原位杂交(IF-FISH) 将无菌盖玻片放入六孔板中,直接接种稳定敲低细胞或接种 U2OS 细胞并进行 siRNA 转染。收取盖玻片洗涤固定,脱水后用 TelC-FITC PNA 探针 488 杂交端粒 3 h,PBG 封闭 1 h(PBS:BSA:Gelatin=1:1:100),加入一抗室温孵育 1 h(PML:PBG=1:1 000, γ H2AX:PBG=1:1 000),洗涤后二抗室温孵育 30 min(Alexa 555 goat anti-Mouse:PBG=1:1 000),DAPI 封片,荧光显微镜拍摄并进行统计。

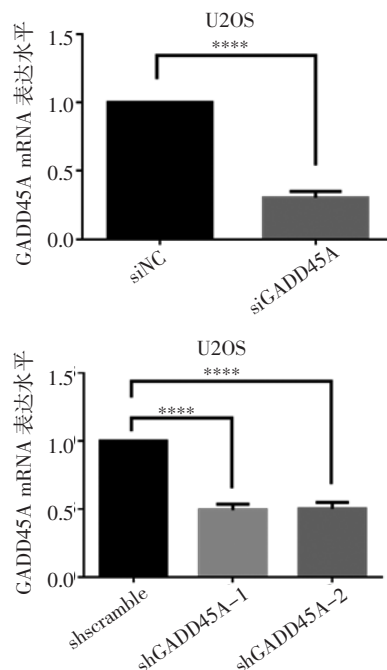
1.2.9 C-circle 实验 收取细胞提取 DNA,测浓度后稀释至 30 ng/ μ L 并按 DNA template 1 μ L、BSA 0.4 μ L、dNTP Mix 2 μ L、Phi 29 DNA Polymerase 0.5 μ L、Phi 29 buffer 0.4 μ L、无核酸酶水 14.1 μ L 的体系进行 PCR 反应扩增,反应程序为 30℃,8 h;65℃,20 min。将扩增产物进行斑点杂交,紫外交联固定后杂交过夜。第 2 天回收杂交液并洗膜、封闭,孵育 DIG 抗体 8~10 h。孵育结束后洗膜最后用 CD-Star 显色液曝光。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 和 Image J 软件进行统计学分析和作图,所有实验数据为重复 3 次实验结果。统计结果采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GADD45A 对骨肉瘤细胞生长增殖的影响 实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 和 shRNA 对 GADD45A 的敲低效率。与对照组相比,siRNA 敲低 GADD45A 后 mRNA 水平显著降低($t=25.96, P<0.000 1$);与 shscramble 组相比,shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 两细胞系 GADD45A 的 mRNA 水平下降($t=21.12、18.37$,均 $P<0.000 1$)(图 1)。CCK-8 增殖实验结果表明,在 siRNA 敲低 GADD45A 后或稳定敲低细胞系 shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 中,与对照组相比,骨肉瘤细胞存活率明显下降($t=5.051、6.192、3.775、14.86、22.93、3.013、14.61、20.93$,均 $P<0.05$)(图 2A、2B)。克隆形成实验结果表明,在 siRNA 敲低 GADD45A 后以及 shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 两组稳定敲低细胞系中,骨肉瘤细胞增殖能力受到明显抑制,克隆形成减少($t=46.68、23.73、24.98$,均 $P<0.000 1$),见图 2C~2D。

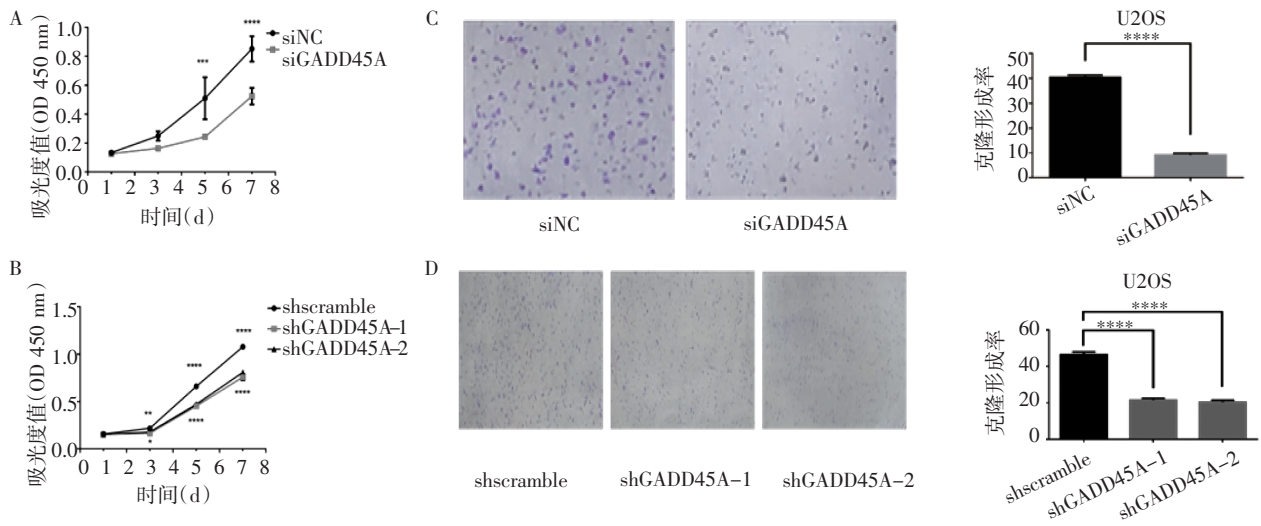
2.2 GADD45A 对骨肉瘤端粒功能的影响 细胞中期分裂相-荧光原位杂交实验显示,siRNA 敲低 GADD45A 与 shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 稳定敲低处理后结果相同,染色体末端多端粒信号(Multiple Telomere Signals,MTSs)比例明显升高($t=24.04、7.243、27.93$,均 $P<0.01$),端粒信号丢失(Telomere Signal Free Ends,SFEs)频率也相应增加($t=8.222、16.61、6.781$,均 $P<0.01$)(图 3)。



注:与 siNC 组相比,**** $P<0.000 1$;与 shscramble 组相比,**** $P<0.000 1$;GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a

图 1 实时荧光定量 PCR 检测 GADD45A mRNA 水平

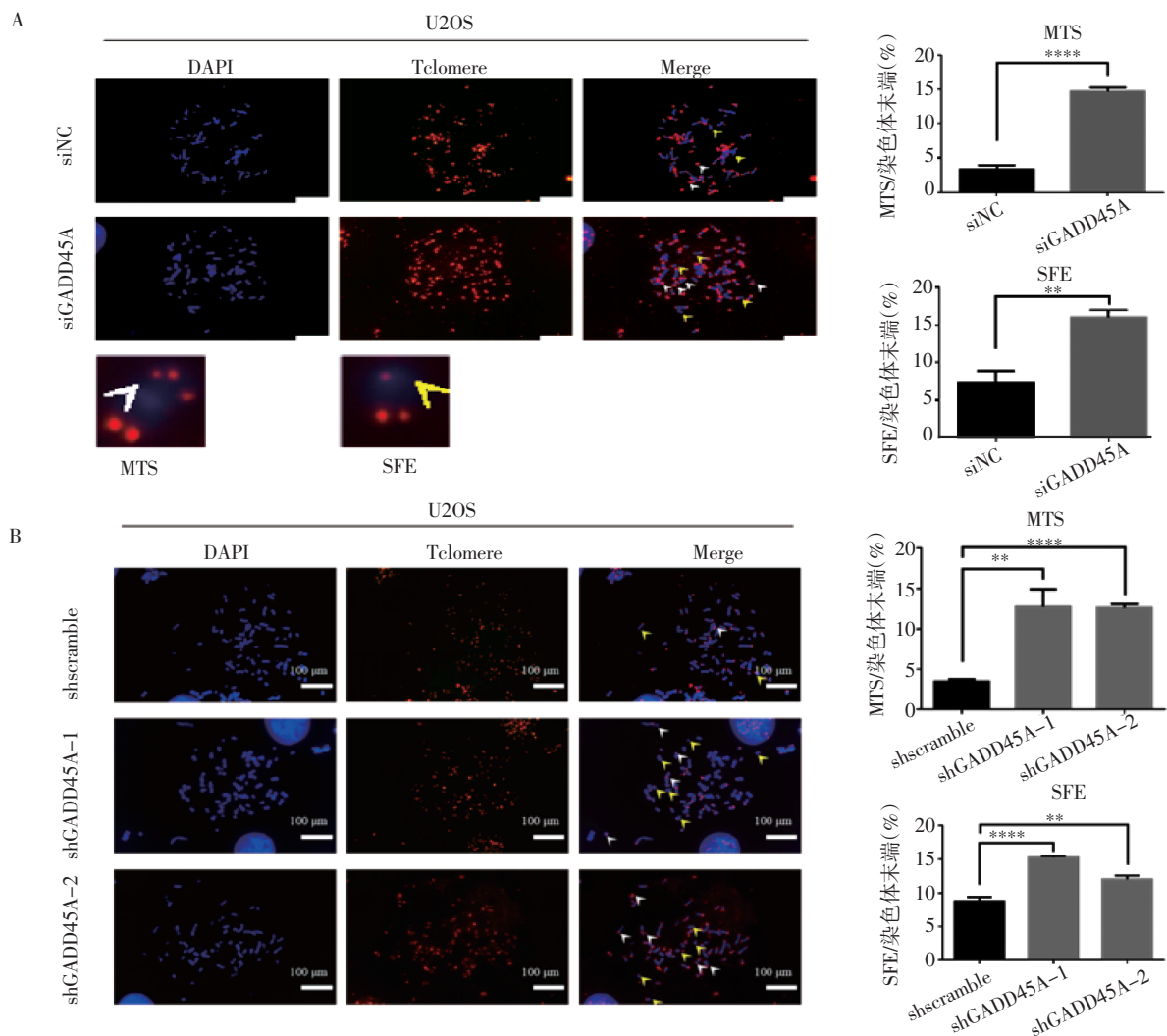
Fig 1 Expression of GADD45A mRNA detected by real-time fluorescence quantitative PCR



注:A:siRNA 敲低 GADD45A 对骨肉瘤细胞增殖的影响;B:shRNA 敲低 GADD45A 对骨肉瘤细胞增殖的影响;C:siRNA 敲低 GADD45A 影响骨肉瘤细胞克隆形成;D:shRNA 敲低 GADD45A 影响骨肉瘤细胞克隆形成;与 siNC 组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与 shscramble 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.0001$;GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a

图 2 GADD45A 对骨肉瘤细胞增殖的影响

Fig 2 The effect of GADD45A on the proliferation of osteosarcoma cells



注:A:siGADD45A 影响骨肉瘤端粒功能;B:shGADD45A 影响骨肉瘤端粒功能;与 siNC 组相比,**** $P<0.0001$;** $P<0.01$;与 shscramble 组相比,**** $P<0.0001$;** $P<0.01$;比例尺=500 μm ;GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a

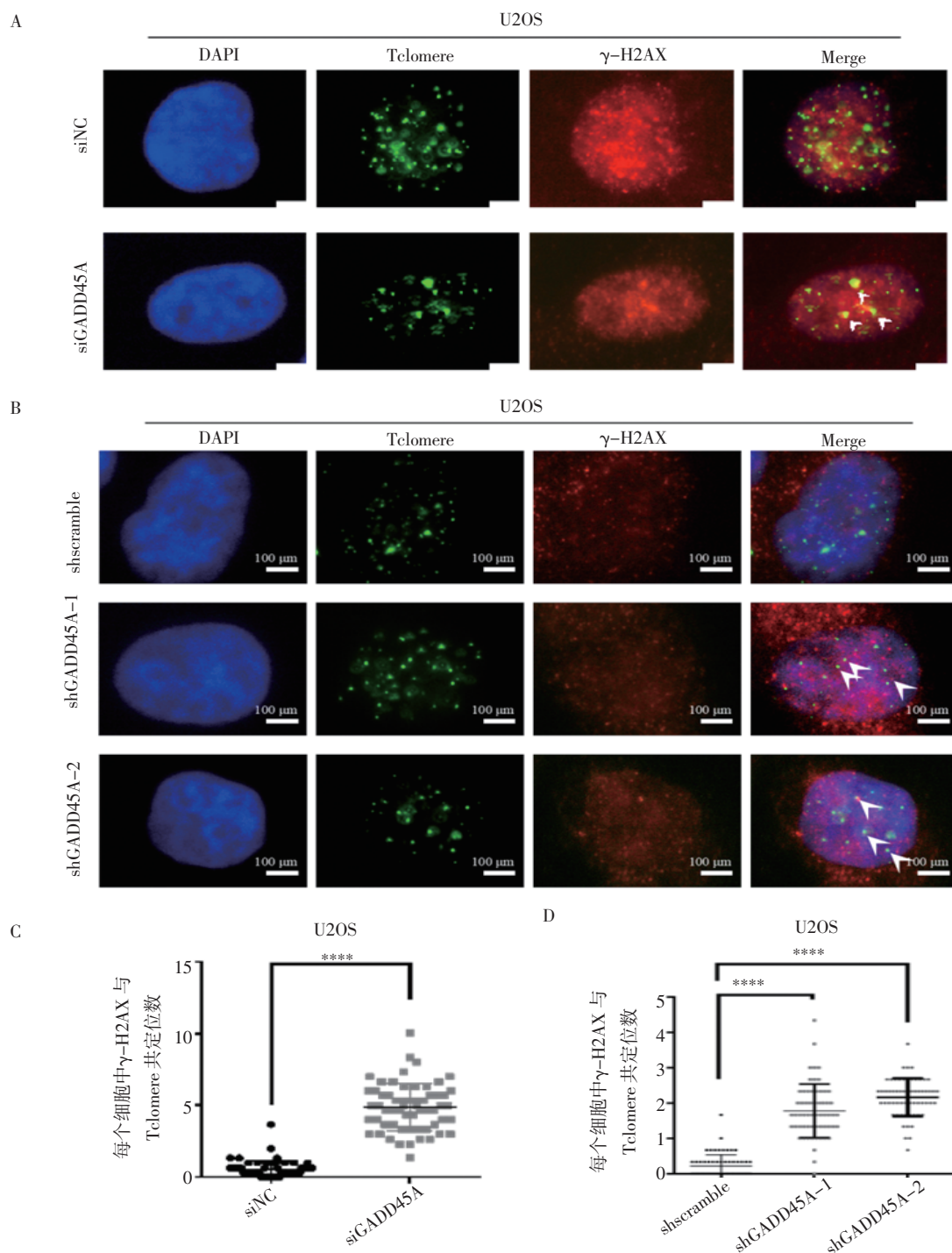
图 3 GADD45A 对骨肉瘤细胞端粒功能的影响

Fig 3 The effect of GADD45A on the telomere function of osteosarcoma cells

2.3 GADD45A 对骨肉瘤端粒损伤造成的影响 免疫荧光-荧光原位杂交实验结果显示,在使用 siRNA 敲低 GADD45A 和 shGADD45A-1、shGADD45A-2 两细胞系中,DNA 损伤指标 γ -H2AX 与端粒共定位均上调($t=19.16$ 、 14.71 、 24.03 ,均 $P<0.000\ 1$)(图 4)。

2.4 GADD45A 对骨肉瘤细胞 ALT 活性的影响 C-circle 实验结果表明,使用 siRNA 敲低

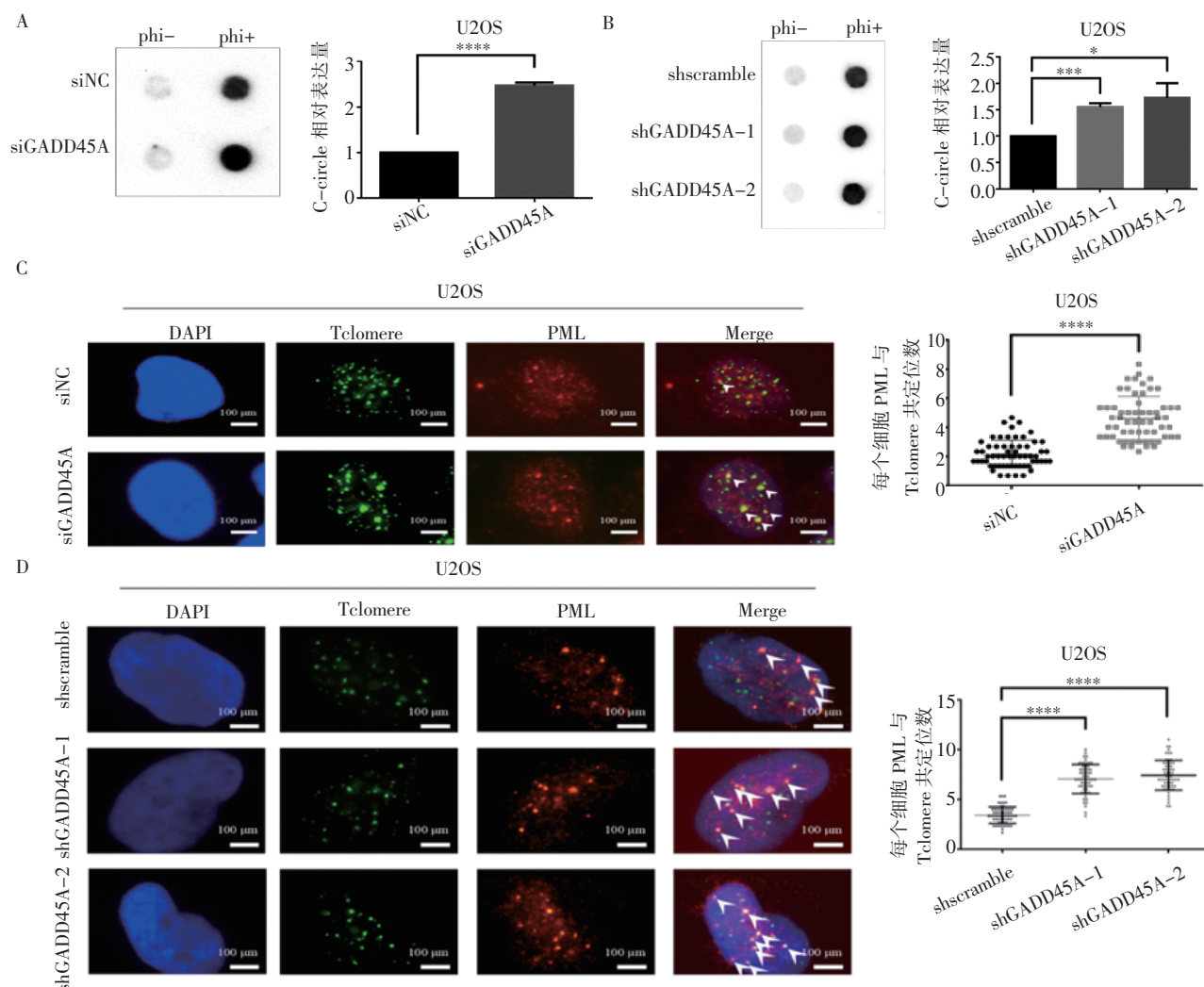
GADD45A 时,骨肉瘤细胞中 C-circle 水平明显上升($t=41.27$, $P<0.000\ 1$)(图 5A)。采用 shGADD45A-1 和 shGADD45A-2 两细胞系也显示 C-circle 水平升高($t=14.06$ 、 4.539 ,均 $P<0.05$)(图 5B)。另一方面,通过免疫荧光-荧光原位杂交实验,siRNA 和 shRNA 的处理均导致 PML 与端粒共定位显著增多($t=10.65$ 、 16.69 、 18.10 ,均 $P<0.000\ 1$),见图 5C~5D。



注:A:siGADD45A 影响骨肉瘤端粒损伤;B:shGADD45A 影响骨肉瘤端粒损伤;C:图 A 的量化;D:图 B 的量化;与 siNC 组相比,**** $P<0.000\ 1$;与 shscramble 组相比,**** $P<0.000\ 1$;比例尺=100 μ m;GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a

图 4 GADD45A 对骨肉瘤端粒损伤造成的影响

Fig 4 The effect of GADD45A on the telomere damage of osteosarcoma cells



注:A:siGADD45A 影响骨肉瘤 C-circle 水平;B:shGADD45A 影响骨肉瘤 C-circle 水平;C:siGADD45A 影响骨肉瘤端粒与 PML 定位;D:shGADD45A 影响骨肉瘤端粒与 PML 定位;与 siNC 组相比,**** $P<0.0001$;与 shscramble 组相比,**** $P<0.0001$,*** $P<0.001$,* $P<0.05$;比例尺=100 μm ;GADD45A:生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45a;ALT:端粒延长替代途径

图 5 GADD45A 对骨肉瘤细胞 ALT 活性的影响

Fig 5 The effect of GADD45A on the ALT activity of osteosarcoma cells

3 讨论

本研究发现敲低 GADD45A 后抑制了骨肉瘤细胞的增殖,导致骨肉瘤细胞存活率下降。而端粒延长是肿瘤细胞维持增殖所必需的关键特征^[9]。与端粒酶阳性肿瘤不同,ALT 阳性肿瘤端粒存在频繁的 DNA 损伤。并且已有文献报道 GADD45A 参与了造血干细胞的 DNA 损伤反应^[10]。因此,本文通过 H2AX 组蛋白变体(γ -H2AX)与端粒的定位来表征端粒损伤信号,首次发现敲低 GADD45A 会引起骨肉瘤端粒损伤加剧。另一方面,本研究首次发现敲低 GADD45A 会引起骨肉瘤细胞 MTS 和 SFE 显著升高,表明 GADD45A 缺失会导致骨肉瘤端粒功能紊乱和复制性衰老并且引起端粒不稳定,加重脆性端粒的产生。

目前已有的研究表明,在间充质来源的肿瘤中,如中枢神经系统肿瘤和多种亚型的肉瘤,往往存在更高比例、更高水平的 ALT 表型,这之中又以骨肉瘤

最为突出^[11]。APBs 是由早幼粒细胞白血病体(PML)、成簇聚集的端粒和一系列与 DNA 复制、重组等功能相关的蛋白形成的复合体,是 ALT 途径延长端粒的场所。PML 是 ALT 细胞形成 APBs 并进一步维持端粒长度,造成端粒长度异质性的必要组分^[12]。为了探究 GADD45A 对 ALT 的影响,笔者通过免疫荧光观察 PML 与端粒的共定位,发现在敲低 GADD45A 后,PML 与端粒的共定位明显增多,说明 GADD45A 抑制了端粒到 PML 的聚集,在 ALT 途径中发挥了负向调控作用。除此之外,C-circle 作为 ALT 阳性肿瘤中的一种特异性且可定量的指标,可以更清晰地反映 ALT 活性的变化。C-circle 是染色体外的 CCCTAA 重复序列,来自于端粒的后随链,与端粒 TTAGGG 重复序列相对应^[13]。本研究首次发现在敲低 GADD45A 后,C-circle 水平显著升高,与前面结果一致,说明 GADD45A 抑制骨肉瘤细胞 C-circle

形成,限制了ALT途径发生。有文献报道,ALT途径的过度激活会抑制ALT细胞的生长^[13-14]。本研究结果发现,敲低GADD45A后,ALT表型明显增加,ALT活性增加,细胞增殖受到抑制,有可能是因为GADD45A的缺失导致ALT被过度激活,这也会导致ALT细胞的死亡。

目前研究认为,ALT是一种以类似于同源重组的断裂诱导复制(BIR)的方式进行端粒延长的途径^[15]。在端粒DNA损伤断裂后会激活RFC-PCNA-Pol δ 轴来促进APB的组装,开始后续RAD52依赖和不依赖的两种BIR通路,整个过程还涉及BRCA1、RAD51等多个同源重组相关蛋白^[16-18]。本文已经证实GADD45A确实参与了骨肉瘤的ALT进程,结合以往文献报道GADD45A与PCNA存在相互作用,提示其可能影响了DNA损伤反应进而抑制骨肉瘤ALT活性^[19]。此外,已有研究表明GADD45A可以与R-loop结合介导CpG岛的局部去甲基化^[20]。亚端粒区丰富的CG含量提示这一过程在亚端粒位置同样有可能实现^[21]。GADD45A介导的去甲基化过程可能抑制端粒区的异染色质化,使染色质收缩,从而阻碍ALT相关蛋白与端粒的结合。这与过往研究中提到的ALT端粒处松弛的染色质结构这一特点有所呼应^[22]。另一方面,笔者推测GADD45A与BRCA1的相互作用也有助于GADD45A与R-loop的结合,R-loop进一步刺激同源重组过程也是引起ALT相关表型变化的原因^[19,23],后续笔者会对GADD45A如何调控ALT进行深入的探究。

综上所述,GADD45A缺失能够抑制骨肉瘤增殖,并通过参与骨肉瘤ALT途径影响端粒功能,造成端粒功能紊乱,加剧端粒DNA损伤。

参考文献:

- [1] BRARD C,PIPERNO-NEUMANN S,DELAYE J,et al. Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(5): e025877.
- [2] OH J Y, KIM E H, LEE Y J, et al. Synergistic autophagy effect of mir-212-3p in zoledronic acid-treated *in vitro* and orthotopic *in vivo* models and in patient-derived osteosarcoma cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1812-1832.
- [3] LOE T K, LI J S Z, ZHANG Y, et al. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres[J]. *Genes Dev*, 2020, 34(9/10): 650-662.
- [4] CHEN Y Y, DAGG R, ZHANG Y, et al. The C-circle biomarker is secreted by alternative-lengthening-of-telomeres positive cancer cells inside exosomes and provides a blood-based diagnostic for ALT activity[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(21): 5369-5392.
- [5] SHENG G, GAO Y, YANG Y, et al. Osteosarcoma and metastasis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 780264.
- [6] JANG H J, YANG J H, HONG E, et al. Chelidone induces apoptosis via GADD45a-p53 regulation in human pancreatic cancer cells[J]. *Integr Cancer Ther*, 2021, 20: 15347354211006191.
- [7] DIAO D, WANG H, LI T, et al. Telomeric epigenetic response mediated by Gadd45a regulates stem cell aging and lifespan[J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(10): e45494.
- [8] ROSEMARY SIAFAKAS A, RICHARDSON D R. Growth arrest and DNA damage-45 alpha(GADD45alpha)[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(5): 986-989.
- [9] YUAN X, DAI M, XU D. Telomere-related markers for cancer[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(6): 410-432.
- [10] WINGERT S, RIEGER M A. Terminal differentiation induction as DNA damage response in hematopoietic stem cells by GADD45A[J]. *Exp Hematol*, 2016, 44(7): 561-566.
- [11] GONCALVES T, ZOUMPOULIDOU G, ALVAREZ-MENDOZA C, et al. Selective elimination of osteosarcoma cell lines with short telomeres by ataxia telangiectasia and Rad3-related inhibitors[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(6): 1253-1264.
- [12] ZHANG J M, GENOIS M M, OUYANG J, et al. Alternative lengthening of telomeres is a self-perpetuating process in ALT-associated PML bodies[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(5): 1027-1042.
- [13] YADAV T, ZHANG J M, OUYANG J, et al. TERRA and RAD51AP1 promote alternative lengthening of telomeres through an R- to D-loop switch [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(21): 3985-4000.
- [14] SHI G, HU Y, ZHU X, et al. A critical role of telomere chromatin compaction in ALT tumor cell growth[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(11): 6019-6031.
- [15] ZHANG J M, ZOU L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks[J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 30-38.
- [16] DILLEY R L, VERMA P, CHO N W, et al. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance[J]. *Nature*, 2016, 539(7627): 54-58.
- [17] SHEN M, YOUNG A, AUTEXIER C. PCNA, a focus on replication stress and the alternative lengthening of telomeres pathway[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2021, 100: 103055.
- [18] ZHANG J M, YADAV T, OUYANG J, et al. Alternative lengthening of telomeres through two distinct break-induced replication pathways [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(4): 955-968.
- [19] ZHAN Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage[J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1/2): 133-143.
- [20] ARAB K, KARAUANOV E, MUSHEEV M, et al. GADD45A binds R-loops and recruits TET1 to CpG island promoters[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 217-223.
- [21] TOUBIANA S, SELIG S. Human subtelomeric DNA methylation: regulation and roles in telomere function[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2020, 60: 9-16.
- [22] EPISKOPOU H, DRASKOVIC I, VAN BENEDEN A, et al. Alternative lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(7): 4391-4405.
- [23] PIETRASIK S, ZAJAC G, MORAWIEC J, et al. Interplay between BRCA1 and GADD45A and its potential for nucleotide excision repair in breast cancer pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 870-891.