

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.003

· 基础研究 ·

circ_0000615通过靶向miR-432-5p调控胆管癌细胞的增殖、迁移和侵袭

关沧海^{ab}, 王海存^a, 于少博^a, 高欣^a, 姜兴明^a, 孙东升^a(哈尔滨医科大学附属第二医院 a. 普通外科; b. 心肌缺血重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] **目的:** 探讨 circ_0000615 在胆管癌细胞中的表达及其对胆管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响和可能的调控机制。**方法:** 通过 qPCR 检测 circ_0000615 在正常胆管上皮 HIBEC 细胞和胆管癌 CCLP-1、QBC939、TFK-1 和 RBE 细胞中的表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 circ_0000615 与 miR-432-5p 的靶向关系。将 si-NC、si-circ_0000615 (si-circ-1、si-circ-2)、inhibitor-NC 和 inhibitor-miR-432-5p 转染至 CCLP-1 和 QBC939 细胞, 转染细胞分为 si-NC 组、si-circ-1 组、si-circ-2 组、si-NC+inh-NC 组、si-NC+inh-miR-432-5p 组和 si-circ-1+inh-miR-432-5p 组, 通过 CCK-8、EdU 和 Transwell 实验检测各转染组胆管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。**结果:** 在胆管癌细胞中 circ_0000615 呈高表达而 miR-432-5p 呈低表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 双荧光素酶报告基因实验证实 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间存在靶向关系 ($P<0.01$); 敲减 circ_0000615 可明显抑制 CCLP-1、QBC939 细胞的增殖、侵袭和迁移能力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 下调 miR-432-5p 可部分逆转敲减 circ_0000615 对胆管癌 CCLP-1 和 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。 **结论:** circ_0000615 通过靶向 miR-432-5p 调控胆管癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

[关键词] 胆管癌; CCLP-1 细胞; QBC939 细胞; 环状 RNA_0000615; miR-432-5p; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.8; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)06-0527-07

circ_0000615 regulates proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma cells by targeting miR-432-5p

GUAN Canghai^{ab}, WANG Haicun^a, YU Shaobo^a, GAO Xin^a, JIANG Xingming^a, SUN Dongsheng^a (a. Department of General Surgery, b. Key Laboratory of Myocardial Ischemia, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of circular circ_0000615 in cholangiocarcinoma cells and its effect on the proliferation, migration and invasion ability of tumor cells as well as the possible regulatory mechanism. **Methods:** The expression level of circ_0000615 in cholangiocarcinoma cells (TFK-1, RBE, CCLP-1 and QBC939) and normal bile duct epithelium HIBEC cells was detected by qPCR. The targeting relationship between circ_0000615 and miR-432-5p was verified by the Dual-luciferase reporter gene assay. si-NC, si-circ_0000615 (si-circ-1, si-circ-2), inhibitor-NC and inhibitor-miR-432-5p were separately or jointly transfected into CCLP-1 and QBC939 cells, namely si-NC group, si-circ-1 group, si-circ-2 group, si-NC+inh-NC group, si-NC+inh-miR-432-5p group, and si-circ-1+inh-miR-432-5p group. The proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma cells in each group were detected by CCK-8, EdU and Transwell experiments. **Results:** circ_0000615 was highly expressed while miR-432-5p was lowly expressed in cholangiocarcinoma tumor cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). Dual-luciferase reporter gene assay confirmed that there was a targeting relationship between circ_0000615 and miR-432-5p ($P<0.01$). Silencing circ_0000615 significantly inhibited the proliferation, invasion, and migration ability of CCLP-1 and QBC939 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). Silencing miR-432-5p partially reversed the inhibitory effects of circ_0000615 knockdown on proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma CCLP-1 and QBC939 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** circ_0000615 regulates the proliferation, invasive and migration of cholangiocarcinoma by targeting miR-432-5p.

[Key words] cholangiocarcinoma; CCLP-1 cell; QBC939 cell; circ_0000615; miR-432-5p; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(6): 527-533. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.003]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81602088); 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. LH2020H058); 湖北陈孝平科技发展基金资助项目(No. CXPJJH12000002-2020015)

[作者简介] 关沧海(1997—), 男, 本科, 硕士生, 主要从事肝胆胰外科的工作, E-mail: hmuguan@126.com

[通信作者] 姜兴明, E-mail: xmjiang@hrbmu.edu.cn

胆管癌是一种可发生在胆管任何部位的消化系统恶性肿瘤^[1-4], 患者的5年生存率不足30%, 其原因包括患者早期症状不明显、肿瘤解剖位置不易明确以及缺乏特异性的分子标志物等^[5-6]。环状RNA (circular RNA, circRNA) 是由前体 mRNA 经反向剪切形成的闭合环状的RNA, 许多 circRNA 在人体多种生理病理过程, 特别是在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[7-10]。有研究^[11-13]发现, circ_0000615 在乳腺癌、肾癌和胃癌等肿瘤中呈高表达, 并通过吸附 miRNA 进而调控肿瘤细胞的恶性生物学行为, 然而 circ_0000615 在胆管癌中的表达及其在胆管癌中的作用和相关机制尚少见报道。既往研究^[14-15]发现, miR-432-5p 在乳腺癌和肝癌中呈低表达并发挥抑癌作用。本研究通过生物信息学方法预测 circ_0000615 与 miR-432-5p 间是否存在互补序列并用实验验证两者的靶向关系, 同时探索 circ_0000615 是否通过靶向 miR-432-5p 调控胆管癌细胞的增殖、侵袭和迁移及其分子机制, 以期对胆管癌的诊断和治疗提供新的潜在的治疗靶点和分子标志物。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

本实验所用细胞, 包括正常胆管上皮 HIBEC 细胞和胆管癌 CCLP-1、QBC939、TFK-1 和 RBE 细胞, 其中除 RBE 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心外, 其余细胞均为本实验室保存。DMEM 培养基、胎牛血清及细胞转染试剂 Lipofectamine[®]3000 均购自美国 Invitrogen 公司, si-NC、si-circ_0000615 (si-circ-1、si-circ-2)、miR-NC、miR-432-5p mimic、inhibitor-NC 和 inhibitor-miR-432-5p 均购自上海吉玛公司, TRIzol 试剂、cDNA 逆转录试剂盒和 SYBR Green Master 试剂盒均购自瑞士 Roche 公司, RNase R 购自上海碧云天公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司, EdU 试剂盒购自广州 Ribobio 公司, 基质胶 (matrigel) 购自美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 细胞培养、分组和转染

将 CCLP-1、QBC939、RBE 和 TFK-1 细胞等胆管癌细胞和正常胆管上皮 HIBEC 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 的条件下进行培养, 当细胞生长至汇合度约 70% 时, 进行传代培养。转染前将 CCLP-1 和 QBC939 细胞 (500 个细胞/孔) 接种于 6 孔板, 待细胞汇合度达 40%~50% 时进行转染。

细胞分组及转染: si-NC 组 (转染 si-circ NC), si-circ-1 组 (转染 si-circ-1), si-circ-2 组 (转染 si-circ-1), si-NC+inh-NC 组 (转染 si-circ NC+inhibitor NC), si-NC+inh-miR-432-5p 组 (转染 si-circ NC+inhibitor-miR-432-5p), si-circ-1+inh-miR-432-5p 组 (转染 si-circ-1+inhibitor-miR-432-5p)。用 Lipofectamine[®]3000 将不同组合的质粒转染至 CCLP-1 和 QBC939 细胞。转染后继续培养细胞至对数生长期, 收集细胞进行后续实验。

1.3 qPCR 检测转染前后 CCLP-1 和 QBC939 细胞中 circ_0000615、miR-432-5p 的表达

用 TRIzol 试剂盒提取转染前后细胞总 RNA, 电泳验证完整性后, 通过逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 利用 SYBR Green 试剂进行 qPCR 实验。引物序列: circ_0000615 正向引物为 5'-GCGCTCAATCCT TTGGGAAC-3', 反向引物为 5'-GGACAACATCAT TGCTTTTCAGAC-3'; miR-432-5p 正向引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTCTTGGAGTAGGTCA-3', 反向引物为 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'; GAPDH 正向引物为 5'-GGGAGCCAAAAGGGTTCAT-3', 反向引物为 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAA-3'; U6 正向引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 反向引物为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。PCR 扩增条件: 95 °C 10 min, 95 °C 12 s、50 °C 30 s、72 °C 30 s, 共 40 个循环。每个样本设 3 个复孔。以 GAPDH 和 U6 作为内参基因, 用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 circ_0000615、miR-432-5p 的相对表达量。

1.4 RNase R 酶切 circ_0000615 实验

从胆管癌 CCLP-1、QBC939 细胞中抽提出总 RNA, RNase R 组 RNA 样本与 RNase R 酶混合反应 15 min, NC 组 RNA 样本经稀释缓冲液处理 15 min, 之后两组 RNA 样本按 1.3 方法, 用 qPCR 检测细胞中 GAPDH 和 circ_0000615 的表达水平。

1.5 双荧光素酶报告基因实验验证 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间的靶向关系

通过在线生物信息学分析网站 (Circinteractome) 预测 circ_0000615 和 miR-432-5p 之间存在互补结合位点, 将含有 miR-432-5p 与 circ_0000615 互补结合部位的序列插入双荧光素酶报告基因载体 pmirGLO 构建野生型质粒 (circ_0000615-WT), 将上述序列突变序列构建突变型质粒 (circ_0000615-MUT)。用 Lipofectamine[®]3000 将报告基因质粒与 miR-432-5p mimic 或 miR-NC 共转染至对数生长期的 CCLP-1、QBC939 细胞, 转染 48 h 后收集细胞, 用双荧光素酶报告实验试剂盒检测细胞中荧光素酶活性。

1.6 CCK-8法检测转染后各组CCLP-1和QBC939细胞的增殖能力

将转染后处对数生长期的各组细胞用胰酶消化后,以 1×10^3 个细胞/孔接种于96孔板中,每组设5个复孔,培养至0、24、48和72 h时加入10 μ L的CCK-8溶液,继续培养4 h,用酶标仪在450 nm波长处检测每孔的光密度(D)值,以D值表示细胞的增殖能力。

1.7 EdU实验检测转染后各组CCLP-1、QBC939细胞的增殖能力

将转染后的各组细胞以 1×10^4 个细胞/孔接种到96孔板,培养24 h后在每个孔中加入100 μ L EdU溶液,继续培养2 h,用多聚甲醛固定细胞,随后在避光条件下用Apollo 567和Hoechst 33342进行染色。用倒置荧光显微镜观察、计算EdU阳性细胞数量并拍照,将Apollo 567阳性细胞与Hoechst 33342标记细胞数量的比值作为EdU阳性细胞率。

1.8 Transwell实验检测转染后各组CCLP-1、QBC939细胞的迁移、侵袭能力

细胞迁移实验:将含 1×10^5 个细胞的悬液(200 μ L)接种于Transwell上室,随后在下室加入800 μ L含10%胎牛血清的DMEM培养基。培养24 h后用棉签擦去上室中的细胞,并依次进行甲醛固定以及结晶紫染色。细胞侵袭实验:在加入细胞悬液前在Transwell上室预铺基质胶,后续实验步骤同迁移实验。实验最后,在光学显微镜下随机选取5个视野进

行观察、计数迁移或侵袭细胞并拍照。

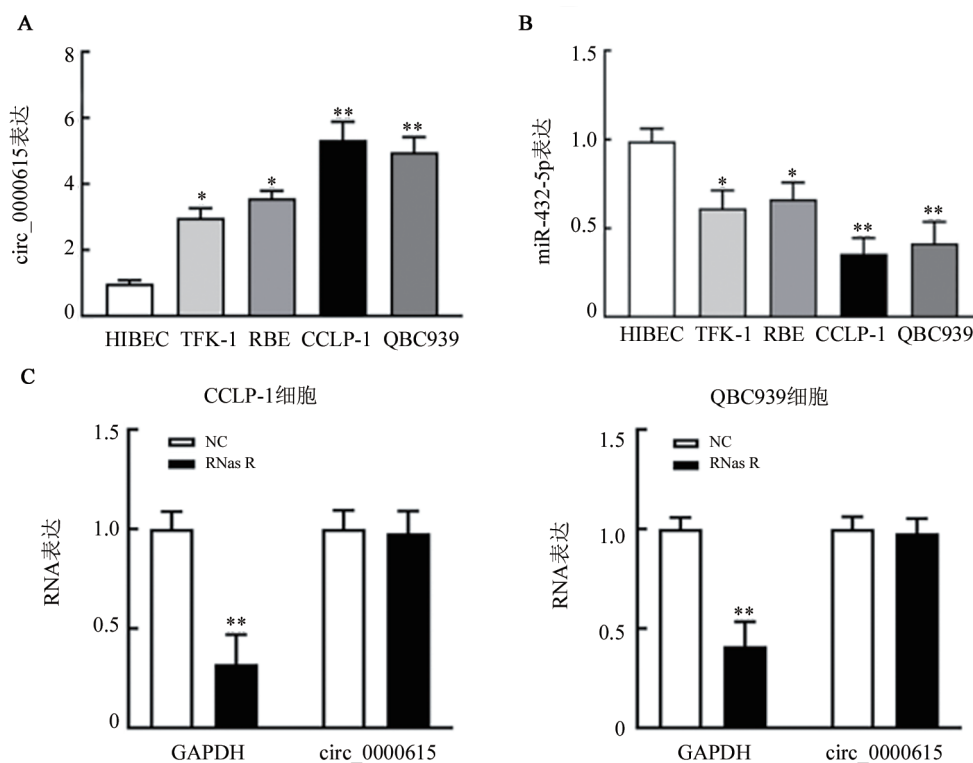
1.9 统计学处理

以上实验均独立重复3次。使用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析,用GraphPad Prism 6.0软件绘制相关图像。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对数据采用配对t检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在胆管癌细胞中circ_0000615呈高表达而miR-432-5p呈低表达

qPCR检测结果显示,与HIBEC细胞比较,CCLP-1、QBC939、RBE和TFK-1细胞中circ_0000615呈高水平表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图1A),CCLP-1和QBC939细胞中表达水平较其他细胞更高,故选取这2种细胞进行后续实验;与HIBEC细胞比较,miR-432-5p在CCLP-1、QBC939、RBE和TFK-1细胞中呈低水平表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图1B)。RNase R酶切实验结果(图1C)显示,与NC组样本比较,RNase R处理的样本中,虽然GAPDH含量明显降低($P < 0.01$),但circ_0000615含量无明显变化($P > 0.05$),说明circ_0000615可以抵抗RNase R酶切,上述结果证明circ_0000615具有比线性RNA更稳定的环状结构。



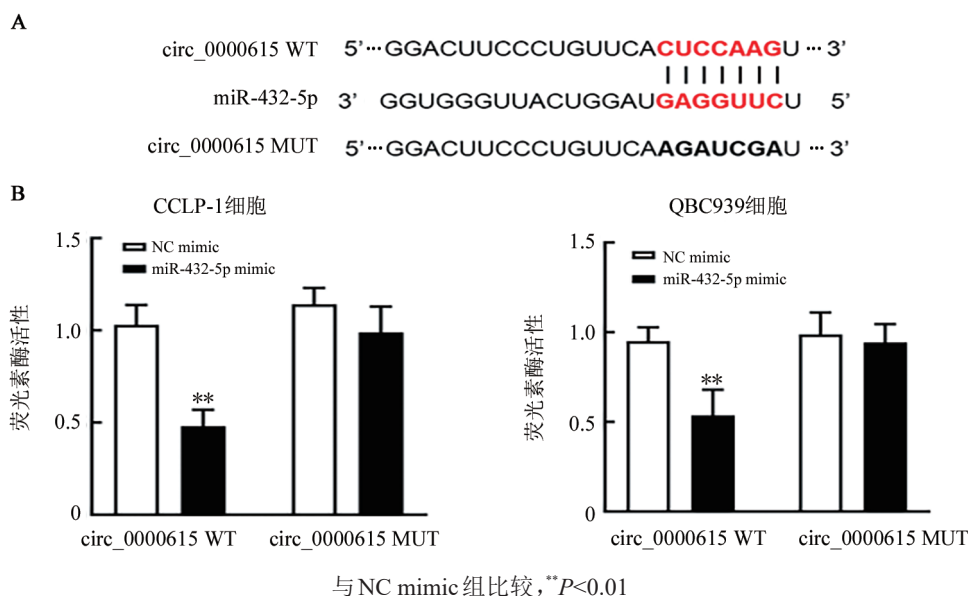
与HIBEC细胞比较或NC组样本比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图1 circ_0000615(A)和miR-432-5p(B)在正常胆管上皮细胞及胆管癌细胞中的表达和RNase R酶切实验结果(C)

2.2 双荧光素酶报告基因实验证实 circ_0000615 与 miR-432-5p 间存在靶向关系

根据生物信息学数据库(Circinteractome)的预测显示, circ_0000615 与 miR-432-5p 之间存在互补结合序列(图 2A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 2B)显示, 与 miR-432-5p NC 比较, miR-432-5p

mimic+circ_0000615 WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$), miR-432-5p mimic+circ_0000615 MUT 组细胞的荧光素酶活性无显著变化 ($P > 0.05$), 这一结果证实 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间存在靶向结合关系。



A: Circinteractome 数据库预测显示 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间的结合位点;
B: 双荧光素酶报告基因实验验证 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间的靶向关系

图 2 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间靶向关系的验证

2.3 敲减 circ_0000615 可抑制 CCLP-1、QBC939 细胞的增殖、侵袭和迁移能力

qPCR 检测结果(图 3A、B)显示, 与 si-NC 组比较, si-circ-1 和 si-circ-2 两组中两种细胞中的 circ_0000615 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-432-5p 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 说明敲减 circ_0000615 的实验成功; 同时还发现敲减 circ_0000615 后 miR-432-5p 表达升高, 说明前者负调控后者的表达。CCK-8 法(图 3C)和 EdU 实验(图 3D)结果显示, 与 si-NC 组相比, si-circ_0000615 组的细胞增殖能力明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Transwell 侵袭实验(图 3E)和迁移实验(图 3F)结果显示, 与 si-NC 组相比, si-circ_0000615 组细胞的迁移和侵袭能力明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。上述结果说明, 敲减 circ_0000615 可抑制 CCLP-1、QBC939 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

2.4 下调 miR-432-5p 可部分逆转由敲减 circ_0000615 产生的对 CCLP-1 和 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的促进作用

qPCR(图 4A)、CCK-8 法(图 4B)、EdU 增殖实验

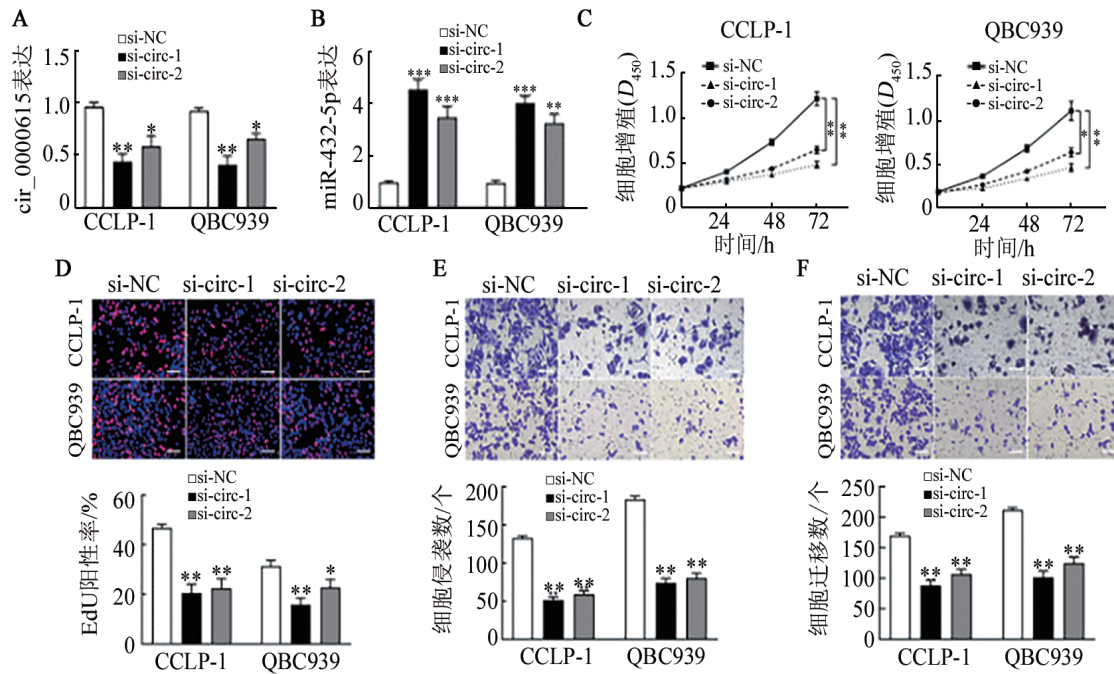
(图 4C)、Transwell 迁移(图 4D)和侵袭实验(图 4E)结果显示: 与 si-NC+inh-NC 组相比, si-NC+inh-miR-432-5p 组 miR-432-5p 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 说明 inhibitor-miR-432-5p 转染成功后显著抑制了 miR-432-5p 的表达; 同时, CCLP-1 和 QBC939 细胞的增殖、迁移、侵袭能力明显升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 说明下调 miR-432-5p 可增强 CCLP-1 和 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 此外, si-circ-1+inh-miR-432-5p 组细胞的增殖、迁移、侵袭能力明显弱于 si-NC+inh-miR-432-5p 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但又高于 si-NC+inh-NC 组 ($P < 0.05$), 说明下调 miR-432-5p 可部分逆转由敲减 circ_0000615 产生的对 CCLP-1 和 QBC939 细胞的恶性生物学行为的促进作用。

3 讨论

手术切除是目前治疗胆管癌最有效的手段, 但大多数胆管癌患者直到晚期才被诊断, 难以通过手术进行根治切除。因此, 探索胆管癌发生发展的分子机制以及有效的生物学标志物是十分必要的。circRNA 在肿瘤发生和发展中的关键作用已成为研

究焦点^[16-18]。circ_0000615在乳腺癌中表达上调并通过海绵吸附miR-145-5p促进细胞增殖、迁移和侵袭^[11]；circ_0000615通过miR-138-5p/FoxP4轴促进肾癌的发生发展^[12]。然而，circ_0000615在胆管癌中的表达及其能否调控胆管癌的发生发展，目前尚不清

楚。此外，miRNA在肿瘤发生发展过程中也起重要作用^[19-22]。例如，miR-432-5p在胶质瘤中通过抑制下游促癌基因RAB10的表达从而起到抑癌作用^[23]。目前，尚无研究指出miR-432-5p在胆管癌中能否发挥调控作用。



与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A: qPCR 检测转染效率; B: qPCR 检测敲减 circ_0000615 后胆管癌细胞 miR-432-5p 的表达水平;

C、D: CCK-8 和 EdU 实验检测敲减 circ_0000615 后胆管癌细胞的增殖能力($\times 200$);

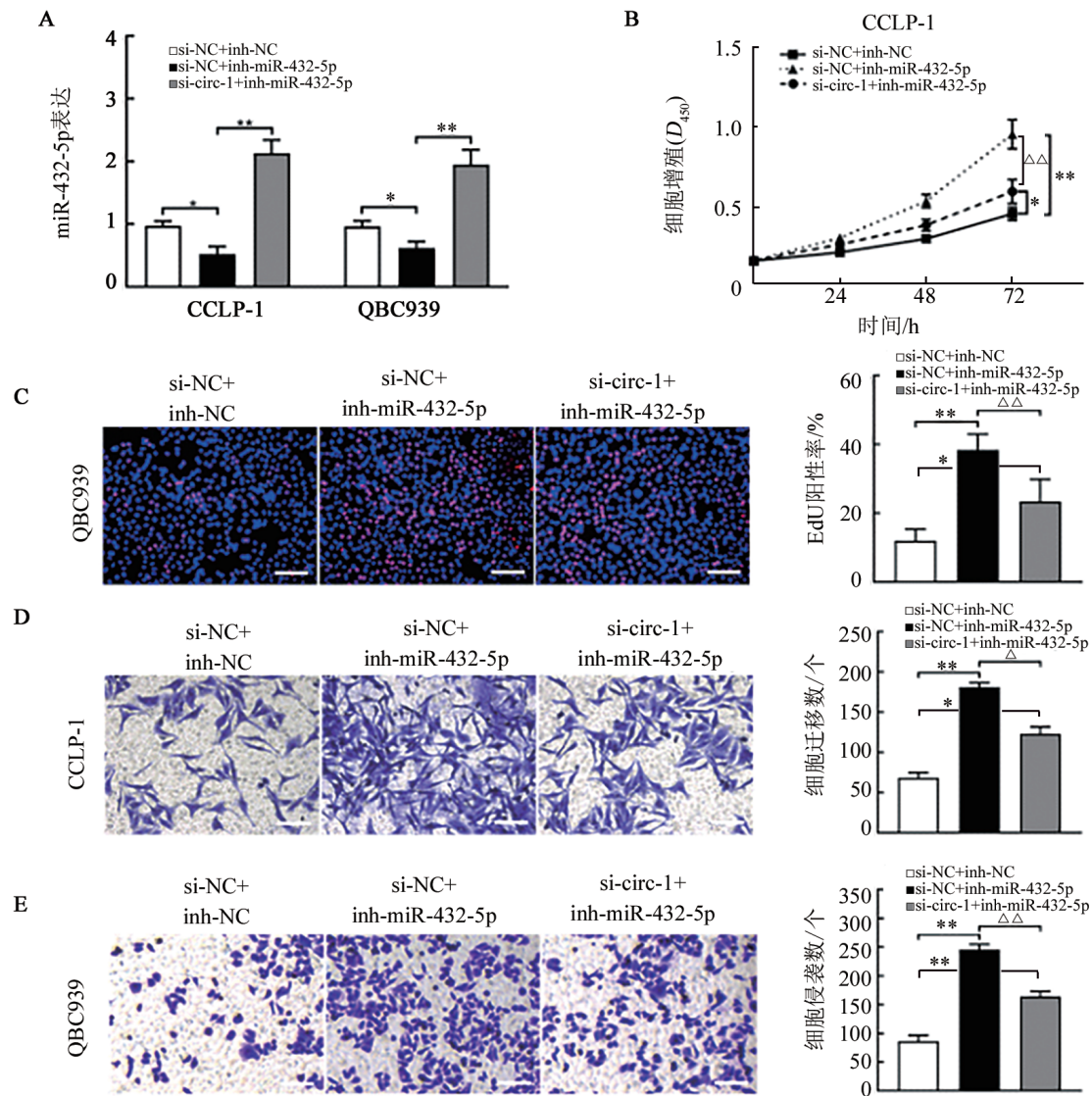
E、F: Transwell 实验检测敲减 circ_0000615 后胆管癌细胞的侵袭和迁移能力($\times 200$)

图3 敲减 circ_0000615 表达对胆管癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

本研究首次发现 circ_0000615 和 miR-432-5p 在胆管癌细胞中呈异常表达，qPCR 检测结果表明胆管癌 CCLP-1、QBC939、RBE 和 TFK-1 细胞中 circ_0000615 的表达水平明显高于正常胆管上皮 HIBEC 细胞；miR-432-5p 在胆管癌细胞中明显低表达。值得注意的是，circRNA 可以与 mRNA 竞争性结合 miRNA，miRNA 也能直接结合 circRNA 或通过影响相关转录因子的表达间接调控 circRNA，从而促进或抑制肿瘤的发生发展^[11-13]。本研究通过在线生物信息学分析网站预测发现 circ_0000615 与 miR-432-5p 之间存在结合位点，并用双荧光素酶报告基因实验证实 circ_0000615 与 miR-432-5p 存在靶向结合关系。本研究体外转染实验发现，敲减 circ_0000615 表达后可使 CCLP-1、QBC939 细胞中 miR-432-5p 表达水平升高，细胞的增殖、侵袭和迁移能力降低，说明 miR-432-5p 可能是一个抑癌基因，上调其表达水平可以抑制

胆管癌细胞的恶性生物学行为；在未经干预的胆管癌细胞中 circ_0000615 呈高表达状态，circ_0000615 抑制了 miR-432-5p 在胆管癌细胞中的表达，后者的抑癌效应没有显示出来，在敲减 circ_0000615 后，miR-432-5p 的抑癌作用就表现出来了。

综上所述，本研究证实 circ_0000615 在胆管癌细胞中呈高水平表达，而 miR-432-5p 呈低水平表达；circ_0000615 促进胆管癌细胞的增殖、侵袭、迁移等恶性生物学行为，这一结果与靶向抑制 miR-432-5p 的表达有关。这些结果提示，circ_0000615 可能成为胆管癌诊断和治疗的分子靶标，敲减 circ_0000615 或过表达 miR-432-5p 有望作为胆管癌的治疗有效措施，进而为临床转化提供理论基础，但 circ_0000615/miR-432-5p 轴如何调控胆管癌细胞的恶性生物学行为的上下游分子机制仍然需要深入探索。



与 si-NC+inh-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 si-NC+inh-miR-432-5p 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$
 A: qPCR 检测下调 miR-432-5p 或同时下调 miR-432-5p 和 circ_0000615 后胆管癌细胞 miR-432-5p 的表达;
 B、C、D、E: CCK-8、EdU (图 C, $\times 200$) 和 Transwell (图 D、E, $\times 200$) 实验检测下调 miR-432-5p 或同时下调
 miR-432-5p 和 circ_0000615 对胆管癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

图 4 下调 miR-432-5p 或同时下调 miR-432-5p 和敲降 circ_0000615 表达对胆管癌 CCLP-1 和 QBC939 细胞的增殖、侵袭和迁移能力的影响

[参考文献]

[1] BI Y Y, MAO Y H, SU Z P, *et al.* HOXB-AS1 accelerates the tumorigenesis of glioblastoma *via* modulation of HOXB2 and HOXB3 at transcriptional and posttranscriptional levels[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(1): 93-106. DOI:10.1002/jcp.29499.

[2] LABIB P L, GOODCHILD G, PEREIRA S P. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 185[2021-12-8]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30819129/>. DOI: 10.1186/s12885-019-5391-0.

[3] ZHU K, MIAO C K, TIAN Y, *et al.* lncRNA MIR4435-2HG promoted clear cell renal cell carcinoma malignant progression *via* miR-513a-5p/KLF6 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 10013-10026. DOI:10.1111/jcmm.15609.

[4] WANG J, ILYAS S. Targeting the tumor microenvironment in cholangiocarcinoma: implications for therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2021, 30(4): 429-438. DOI:10.1080/13543784.2021.1865308.

[5] VOGEL A, BATHON M, SABOROWSKI A. Immunotherapies in clinical development for biliary tract cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2021, 30(4): 351-363. DOI:10.1080/13543784.2021.1868437.

[6] RAZUMILAVA N, GORES G J. Cholangiocarcinoma[J]. *Lancet*, 2014, 383(9935): 2168-2179. DOI:10.1016/S0140-6736(13)61903-0.

[7] AISHANJIANG K, WEI X D, FU Y, *et al.* Circular RNAs and hepatocellular carcinoma: new epigenetic players with diagnostic and prognostic roles[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 653717[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33959506/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.653717.

[8] 郑建兴, 刘晓刚, 吴东洋. circ_0005075 通过海绵吸附 miR-335 促进肝癌 HCC9810 细胞的增殖和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(3): 267-272. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.009.

- [9] HUANG Z K, YAO F Y, LIU J, *et al.* Up-regulation of circRNA-0003528 promotes mycobacterium tuberculosis associated macrophage polarization *via* down-regulating miR-224-5p, miR-324-5p and miR-488-5p and up-regulating CTLA4[J]. *Aging*, 2020, 12(24): 25658-25672. DOI:10.18632/aging.104175.
- [10] LI Y J, PAN D Y, LIU S, *et al.* Identification of circ-FAM169A sponges miR-583 involved in the regulation of intervertebral disc degeneration[J]. *J Orthop Translat*, 2020, 26: 121-131. DOI: 10.1016/j.jot.2020.07.007.
- [11] WANG S T, XUE X K, WANG R, *et al.* CircZNF609 promotes breast cancer cell growth, migration, and invasion by elevating p70S6K1 *via* sponging miR-145-5p[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 3881-3890. DOI:10.2147/CMAR.S174778.
- [12] XIONG Y H, ZHANG J B, SONG C. CircRNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXP4 expression by sponging miR-138-5p in renal carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10646-10654. DOI:10.1002/jcp.27744.
- [13] LIU Z, PAN H M, XIN L, *et al.* Circ-ZNF609 promotes carcinogenesis of gastric cancer cells by inhibiting miRNA-145-5p expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(21): 9411-9417. DOI:10.26355/eurrev_201911_19433.
- [14] LIU H Y, XUE L, SONG C Y, *et al.* Overexpression of circular RNA circ_001569 indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and metastasis by sponging miR-411-5p and miR-432-5p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2659-2665. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.08.020.
- [15] LIU Y H, LU C T, ZHOU Y Z, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0008039 promotes breast cancer cell proliferation and migration by regulating miR-432-5p/E2F3 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(3): 358-363. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.05.166.
- [16] GAO W Q, HU X M, ZHANG Q, *et al.* Downregulation of circFASTKD1 ameliorates myocardial infarction by promoting angiogenesis[J]. *Aging*, 2020, 13(3): 3588-3604. DOI: 10.18632/aging.202305.
- [17] WANG Q, YANG L L, FAN Y X, *et al.* Circ-ZDHHC5 accelerates esophageal squamous cell carcinoma progression *in vitro via* miR-217/ZEB1 axis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 570305. DOI: 10.3389/fcell.2020.570305.
- [18] RAO X, LAI L L, LI X P, *et al.* N 6-methyladenosine modification of circular RNA circ-ARL3 facilitates hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma *via* sponging miR-1305[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(2): 408-417. DOI:10.1002/iub.2438.
- [19] 赵俞乔, 刘浪, 王健岗, 等. lncRNA PCAT6通过靶向miR-185-5p对胰腺癌增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(5): 620-625. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2021.05.013.
- [20] HU Z T, HUANG L N, WANG W N, *et al.* Long non-coding RNA FOXD2-AS1 promotes proliferation, migration, and invasion in cholangiocarcinoma through regulating miR-760/E2F3 axis[J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(2): 546-558. DOI:10.1007/s10620-021-06876-9.
- [21] WANG Y P, YANG C Q, LIU X B, *et al.* Transcription factor AP-4 (TFAP4)-upstream ORF coding 66 aa inhibits the malignant behaviors of glioma cells by suppressing the TFAP4/long noncoding RNA 00520/microRNA-520f-3p feedback loop[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(3): 891-906. DOI:10.1111/cas.14308.
- [22] ZHAO X H, LIU Y M, LI Z H, *et al.* Linc00511 acts as a competing endogenous RNA to regulate VEGFA expression through sponging hsa-miR-29b-3p in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 655-667. DOI:10.1111/jcmm.13351.
- [23] ZHANG X Y, WANG S Y, LIN G H, *et al.* Down-regulation of circ-PTN suppresses cell proliferation, invasion and glycolysis in glioma by regulating miR-432-5p/RAB10 axis[J]. *Neurosci Lett*, 2020, 735: 135153[2021-12-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32629066/>. DOI:10.1016/j.neulet.2020.135153.

[收稿日期] 2022-03-25

[修回日期] 2022-04-15

[本文编辑] 向正华, 沈志超