

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.007

Circ-COL5A1 受 TDP-43 调控并抑制肝细胞癌转移的研究 *

王 硕¹ 孔睿佼² 井 杰¹ 刘海东¹ 贾 音¹ 刘善荣^{1Δ}

(1 海军军医大学附属长海医院实验诊断科 上海 200433; 2 同济大学附属第四人民医院检验医学科 上海 200081)

摘要 目的:探索 Circ-COL5A1 的生物学功能、调控机制和作用机制,进而为 HCC 转移的干预提供候选分子并进一步了解 HCC 转移。**方法:**通过前期工作基础选定目标分子 Circ-COL5A1。通过慢病毒转染在 HCC 细胞系中过表达 Circ-COL5A1,进而通过划痕愈合实验、transwell 实验观察 Circ-COL5A1 的生物学功能。通过生物信息学分析、表达干扰实验和 RNA 免疫共沉淀(RIP)实验探究目标分子的调控机制。通过 western blot 技术、实时定量 PCR(qRT-PCR)技术对目标分子的下游作用机制进行初步探索。**结果:**Circ-COL5A1 在肝癌干细胞中表达下调,而且 Circ-COL5A1 过表达的 HCC 细胞系侵袭和迁移能力减弱。在 Circ-COL5A1 生物学合成过程中, RNA 结合蛋白 TDP-43 可以富集其线性前体,并在环化结构形成后解离。Circ-COL5A1 还可以降低其亲本基因 V 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (COL5A1) 的蛋白质表达水平,这可能会影响多个信号通路进而干预 HCC 的转移过程。**结论:**内源性的 Circ-COL5A1 可以抑制 HCC 的转移能力,可以为阻断 HCC 转移提供候选分子。TDP-43 的促进环状 RNA 形成提示 RNA 结合蛋白是环状 RNA 生物学合成过程中的重要调控因子。Circ-COL5A1 可以通过转录后调控抑制其亲本基因 COL5A1 的表达。

关键词:肝细胞癌;环状 RNA;RNA 结合蛋白;Circ-COL5A1; TDP-43

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)11-2036-06

Circ-COL5A1 is Regulated by TDP-43 and Inhibit HCC Metastasis*

WANG Shuo¹, KONG Rui-jiao², JING Jie¹, LIU Hai-dong¹, JIA Yin¹, LIU Shan-rong^{1Δ}

(1 Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Department of Laboratory Medicine, The Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, 200081, China)

ABSTRACT Objective: To explore the biological function, mechanism and regulation factor of circ-COL5A1, providing candidate molecules for the intervention and further understanding of HCC metastasis. **Methods:** The target molecule Circ-COL5A1 were selected based on the preliminary work. The biological function of circ-COL5A1 is verified through transwell assay and wound healing assay. Bioinformatic analysis, gene expression interference and RNA immunoprecipitation (RIP) experiments were employed to explore the regulation mechanism of circ-COL5A1. Western blot and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were employed to explore the downstream pathway of circ-COL5A1. **Result:** The expression of Circ-COL5A1 is down-regulated in HCC cancer stem cells. And Circ-COL5A1 overexpressed inhibit the invasion and migration ability in Huh7 and HCC-LM3 cell lines. The result of RIP experiments showed that RNA-binding protein (RBP) TDP-43 can enrich the linear precursor and dissociate after the formation of the circular structure. Circ-COL5A1 can also reduce the protein expression of its maternal gene COL5A1, which may affect multiple signaling pathways and thus interfere with the metastasis process of HCC. **Conclusion:** Endogenous Circ-COL5A1 can inhibit the metastasis ability of HCC cell lines, and may provide candidate molecules for blocking HCC metastasis. TDP-43 promotes the biogenesis of Circ-COL5A1, suggesting that RBPs are important regulators in the process of circRNA biogenesis. Circ-COL5A1 inhibits protein expression of its maternal genes COL5A1 through post-transcription regulation.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Circular RNA; RNA binding protein; Circ-COL5A1; TDP-43

Chinese Library Classification(CLC): R-33;R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2036-06

前言

肝细胞癌(HCC)是世界上第五大最常见的癌症,也是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。虽然治疗手段取得进展,但 HCC 的

致死率仍然很高^[2]。HCC 的复发与转移一直是影响 HCC 远期疗效的重要因素,约 90%的肿瘤患者死亡是因为转移而不是原发病灶引起的,转移性疾病在很大程度上是不可治愈的^[3,4]。因此阻断 HCC 的远处转移是降低 HCC 死亡率、改善患者预后

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81730076)

作者简介:王硕(1994-),男,硕士研究生,研究方向:肿瘤转移基础研究,E-mail: docwang13166003267@163.com

Δ 通讯作者:刘善荣(1971-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤转移和早期诊断,E-mail: lssbiomed@163.com

(收稿日期:2020-02-23 接受日期:2020-03-18)

的关键。肿瘤的转移是一个多步骤的细胞生物学过程的最终产物^[9]。有很多理论体系试着从不同角度去系统阐述这一过程,其中包括肿瘤干细胞学说^[6]。根据这一学说,肿瘤实体具有多个细胞亚群构成,其中肿瘤干细胞(CSC)群体由于具有自我更新的能力被认为是造成肿瘤转移的主要原因^[7,8]。在肿瘤干细胞的转化、播散、定植并形成转移灶的每一个步骤中都涉及复杂的调控机制,包括基因水平的改变与表观遗传学的调控^[9,10]。这些都给 HCC 转移的机制研究和攻克带来了巨大的挑战和机遇。环状 RNA 属于非编码 RNA 中的一类,是一类重要的表观遗传学调控因子。很多环状 RNA 被发现可以影响 HCC 的进展与转移,如 cSMARCA5, circ-CDYL, circMALAT1, circASAP1 等,这提示环状 RNA 是我们深入探索 HCC 发生和转移的一个强有力的切入点^[11,12]。此外,有研究证实 circRNA 是 EMT 过程的重要参与者,例如在永生化人乳腺上皮细胞发生 EMT 过程中,几百种 circRNA 被 TGF- β 所调控,这提示肿瘤干细胞中可能有大量异常表达的环状 RNA^[13]。我们在前期工作中发现对比于普通肿瘤细胞而言, Circ-COL5A1 在肿瘤干细胞中表达显著下调^[14]。但是, Circ-COL5A1 在肿瘤转移过程中起到的生物学作用和作用机制、Circ-COL5A1 的生物学合成中受到的调控机制等问题还都需要进一步的探索。本研究通过探索 Circ-COL5A1 对于 HCC 细胞侵袭和迁移能力的影响,以及 Circ-COL5A1 的调控方式和作用机制揭示了 Circ-COL5A1 对 HCC 转移的作用,为 HCC 转移干预药物的开发提供了候选分子,同时进一步加深对环状 RNA 的调控机制和作用机制的了解。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 Huh7, HCC-LM3 和 SMMC-7721 购买于 ATCC(美国);高糖 DMEM 培养基购买于美国 Corning 公司;胎牛血清购买于 Gibco 公司;用于转染的慢病毒购买于和元生物技术(上海)有限公司;RIP 免疫沉淀试剂盒购买于 Millipore 公司;Trizol 购买于 Invitrogen 公司;PrimeScriptTMRT Master Mix 和 SYBR[®]Premix Ex TaqTMII 试剂盒购买自日本 TAKARA 公司;LightCycler[®]480 II 来自于瑞士罗氏公司;电泳、转膜设备购买自美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司;显影设备使用的是美国通用电气医疗公司所生产的 ImageQuant LAS4000。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞培养均使用 DMEM 培养基 +10% 的胎牛血清,并置于 37℃, 5% 的 CO₂ 培养箱中。

1.2.2 慢病毒转染 将 1×10^5 huh7 或 HCC-LM3 细胞接种在 24 孔培养板上,放置于培养箱中过夜使其贴壁。将慢病毒以 MOI=20(对于 Huh7)或 MOI=40(对于 HCC-LM3)感染细胞,并在培养基中添加浓度为 5 μ g/mL 的 Polybrene。将细胞与慢病毒一起孵育 12-24 小时后用 PBS 洗涤并更换为新鲜培养基。

1.2.3 划痕愈合实验 用无菌 200 μ L 移液枪头沿培养皿中线将细胞划出痕迹,用 PBS 洗涤 3 次以洗去脱落的细胞,并使用无血清培养基进行培养。在 0 h, 24 h, 48 h 和 72 h 分别观察划痕愈合面积。

1.2.4 小室迁移实验 将 $5-10 \times 10^4$ 个细胞添加到小室上室中,并加入无血清培养基培养,在下室使用添加 10%胎牛血清

的 DMEM 培养基起到诱导作用,培养 12-16 h 后,将穿过小室底部膜并迁移至底面的细胞固定并染色,随机选取五个高倍镜视野进行拍照。

1.2.5 RNA-蛋白质免疫共沉淀(RIP)实验 根据操作手册,等待 SMMC-7721 细胞融合度达 90%时将细胞消化下来,用 RIP 裂解缓冲液将细胞样品均匀重悬,冰上孵育并在 4℃条件下离心。在细胞裂解之前,将 TDP-43 抗体或抗兔二抗添加到磁珠悬液中,并在室温下旋转孵育 30 分钟,然后洗涤磁珠-抗体复合物,并使用 RIP 免疫沉淀缓冲液将磁珠-抗体复合物重悬。取细胞上清液的 5%作为对照转移到新 EP 管中,保存在 -80℃。在剩余的上清液加入 RIP 免疫沉淀缓冲液中并平均加入磁珠-抗体复合物中,4℃旋转孵育过夜。第二天,使用 RIP 清洗缓冲液充分清洗后使用蛋白酶 K 缓冲液重悬,并在 55℃振荡孵育 30 分钟以消化蛋白质。孵育完成后弃去磁珠,将上清液转移至新的无 RNase 的试管中,并进行 RNA 分离和纯化。

1.2.6 RNA 提取 使用 Trizol 并根据操作手册提取细胞中的总 RNA,使用 NanoDrop1000 评估 RNA 的浓度和纯度,将提取出的总 RNA 储存在 -80℃下直到进行反转录或分析。

1.2.7 反转录和实时定量 PCR 我们使用 PrimeScriptTMRT Master Mix 试剂盒并根据产品操作手册将 RNA 反转录合成 cDNA。我们使用 SYBR[®]Premix Ex TaqTMII 试剂盒依照操作手册配制反应体系,使用 GAPDH 或 β -肌动蛋白用作内参。

1.3 统计分析

本课题使用 SPSS 22.0 进行统计学差异的分析,各组间差异采用独立样本 t 检验,课题中数据使用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)进行展示,以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 Circ-COL5A1 在 Huh7 和 HCCLM3 细胞系中降低细胞的侵袭和迁移能力

为了探索 Circ-COL5A1 对 HCC 细胞的生物学作用,我们采用了划痕愈合实验、transwell 细胞迁移实验来探索其对 HCC 细胞转移相关能力的影响。我们构建了 pLCDH-GFP-Circ-COL5A1 载体,并利用慢病毒感染 Huh7 和 HCCLM3 细胞系,通过荧光显微镜观察 GFP 的表达和实时定量 PCR 检测 Circ-COL5A1 的表达,我们确定了过表达的效果(图 1A)。划痕愈合实验和 transwell 细胞迁移实验显示 Circ-COL5A1 过表达后划痕愈合速度和细胞迁移能力减弱(图 C-D),这些结果提示 Circ-COL5A1 抑制 HCC 细胞的侵袭和迁移能力,起到抑制转移的作用。

2.2 RNA 结合蛋白 TDP-43 调控 Circ-COL5A1 的生成

为了进一步探索 Circ-COL5A1 的生物学合成调控机制,我们通过生物信息学门户网站 CircInteractome 预测分析,发现 Circ-COL5A1 存在与 EIF4A3、FUS、TDP-43 这三个 RNA 结合蛋白的结合位点。siRNA 表达干扰实验显示 TDP-43 敲低后 Circ-COL5A1 的表达水平也降低(图 2A-B),而其余 RNA 结合蛋白则没有影响,这提示 TDP-43 可能促进 Circ-COL5A1 的形成。为了进一步明确调控关系,我们采用了 RIP 实验,结果显示 TDP-43 可以明显富集 Circ-COL5A1 的线性前体,但对 Circ-COL5A1 没有明显富集作用(图 2C),这提示 TDP-43 可以促进 Circ-COL5A1 的环化并在形成环状结构后与其解离。

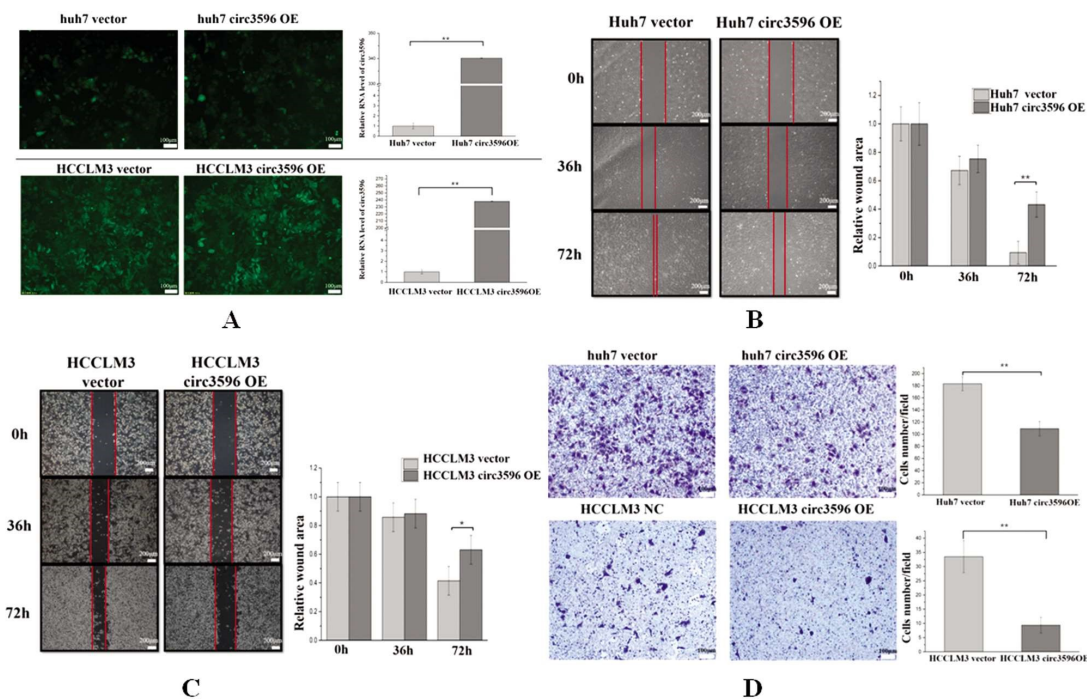


图 1 Circ-COL5A1 抑制 HCC 细胞系的转移能力

Fig.1 The ability of Circ-COL5A1 to inhibit the metastasis of HCC cell line

Note: A: The overexpression of Circ-COL5A1 was verified by fluorescence microscope and qRT-PCR(100 μ m), ** P <0.01. B: Effect of overexpression of Circ-COL5A1 on the invasiveness of Huh7 cells by using scratch healing test(200 μ m), ** P <0.01. C: The effect of overexpression of Circ-COL5A1 on the invasiveness of HCC-LM3 cells by scratch test(200 μ m), * P <0.05. D: The effect of overexpression of Circ-COL5A1 on the migration ability of Huh7 and HCC-LM3 cell lines was observed by cell migration experiment(100 μ m), ** P <0.01.

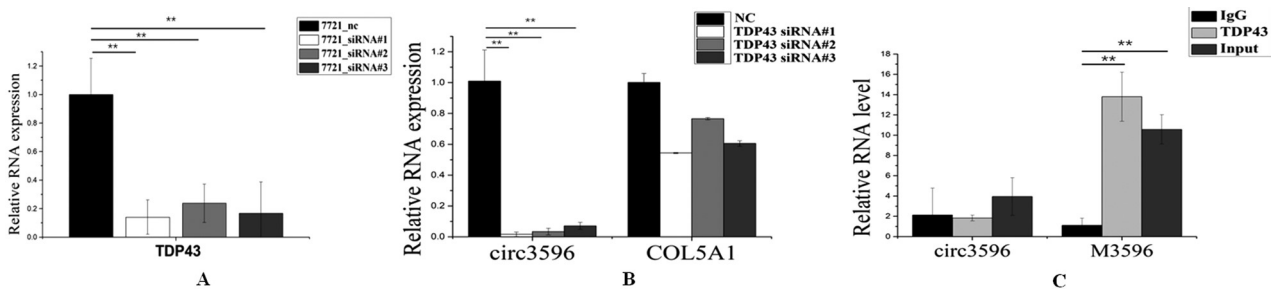


图 2 TDP-43 促进 Circ-COL5A1 的生物合成

Fig.2 TDP-43 promotes the biological synthesis of Circ-COL5A1

Note: A: In SMMC-7721, siRNA targeting TDP-43 can significantly interfere with the expression level of TDP-43, ** P <0.01. B: Changes of circ3596 and its maternal gene COL5A1 expression after siRNA interference with TDP-43 expression, ** P <0.01; C: TDP-43 can obviously enrich the linear precursor of circ3596, but not for circ3596, ** P <0.01.

2.3 Circ-COL5A1 可影响亲本基因 COL5A1 的蛋白表达水平

在探索 Circ-COL5A1 的作用机制时, 我们发现 Circ-COL5A1 过表达后其亲本基因 COL5A1 的蛋白质水平下调, 但是 mRNA 水平没有明显变化 (图 3A-B), 这提示 Circ-COL5A1 可以在翻译过程中抑制 COL5A1 的表达。通过 Oncomine 分析 Wurmbach 肝癌数据集我们得知 COL5A1 在 HCC 患者的肿瘤组织中表达量增高 (图 3C), 进一步对 COL5A1 的共表达基因进行 GO 分析和 KEGG 分析提示 COL5A1 可能与包括 EMT 信号通路和整合素家族相关信号通路在内的多个肿瘤相关信号通路有密切联系(图 4A-D)。

3 讨论

随着对肿瘤研究的不断深入, 肿瘤组织不再是传统认知上

的具有一致性的细胞群体, 而是由异质性的细胞亚群混合而成^[15]。在肿瘤内各亚群组成的层次结构中, 肿瘤干细胞则被认为是处于层次结构的最顶层^[16,17]。此外近些年来研究人员在实体肿瘤中也发现了肿瘤干细胞的存在, 其中包括肝癌^[18]。同时他们在肿瘤的发生发展中的作用也被越来越多的揭示出来, 甚至有研究提示只有肿瘤干细胞才具有形成转移灶的功能^[19,20]。环状 RNA 是一类重要的表观遗传调控分子, 其在 HCC 中的重要作用也是越来越多的被揭示出来, 例如 Circ-CDYL 可以在 HCC 的极早期就开始表达上调, 并作为 miRNA 海绵通过吸附 miR-892a 和 miR-328-3p 来促进 HCC 的发生发展^[21]。但是关于肿瘤干细胞内的环状 RNA 分子对 HCC 转移的作用研究不多。本研究发现 Circ-COL5A1 可以抑制 HCC 的侵袭、迁移能力, 提示 Circ-COL5A1 可以抑制 HCC 的转移, 为开发 HCC 的干预药物提供潜在的目标分子。

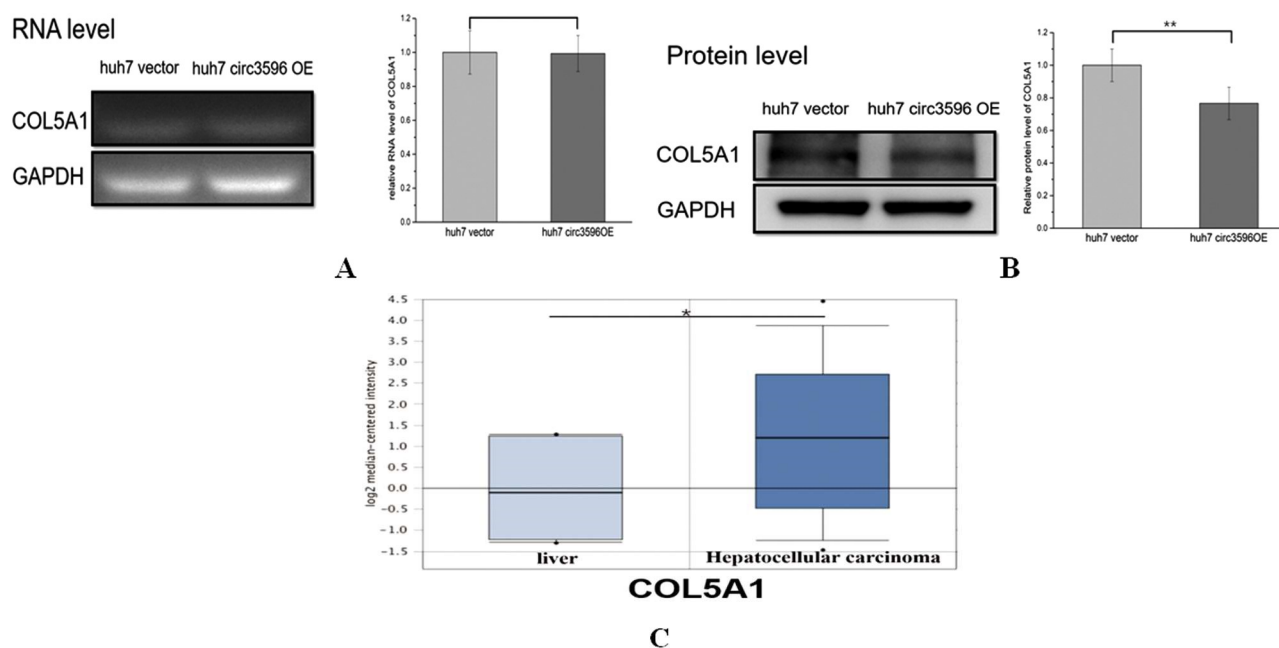


图3 Circ-COL5A1 在 huh7 HCC 细胞系中过表达后对 COL5A1 表达水平的影响

Fig.3 The effect of Circ-COL5A1 on the expression of COL5A1 after overexpression in huh7 cell line

Note: A: Circ-COL5A1 have no effect on the expression level of COL5A1 mRNA. B: Circ-COL5A1 down-regulates the expression of COL5A1 protein, $**P < 0.01$. C: Base on Oncomine database analysis, we found that the expression of COL5A1 in HCC cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissue, $*P < 0.05$.

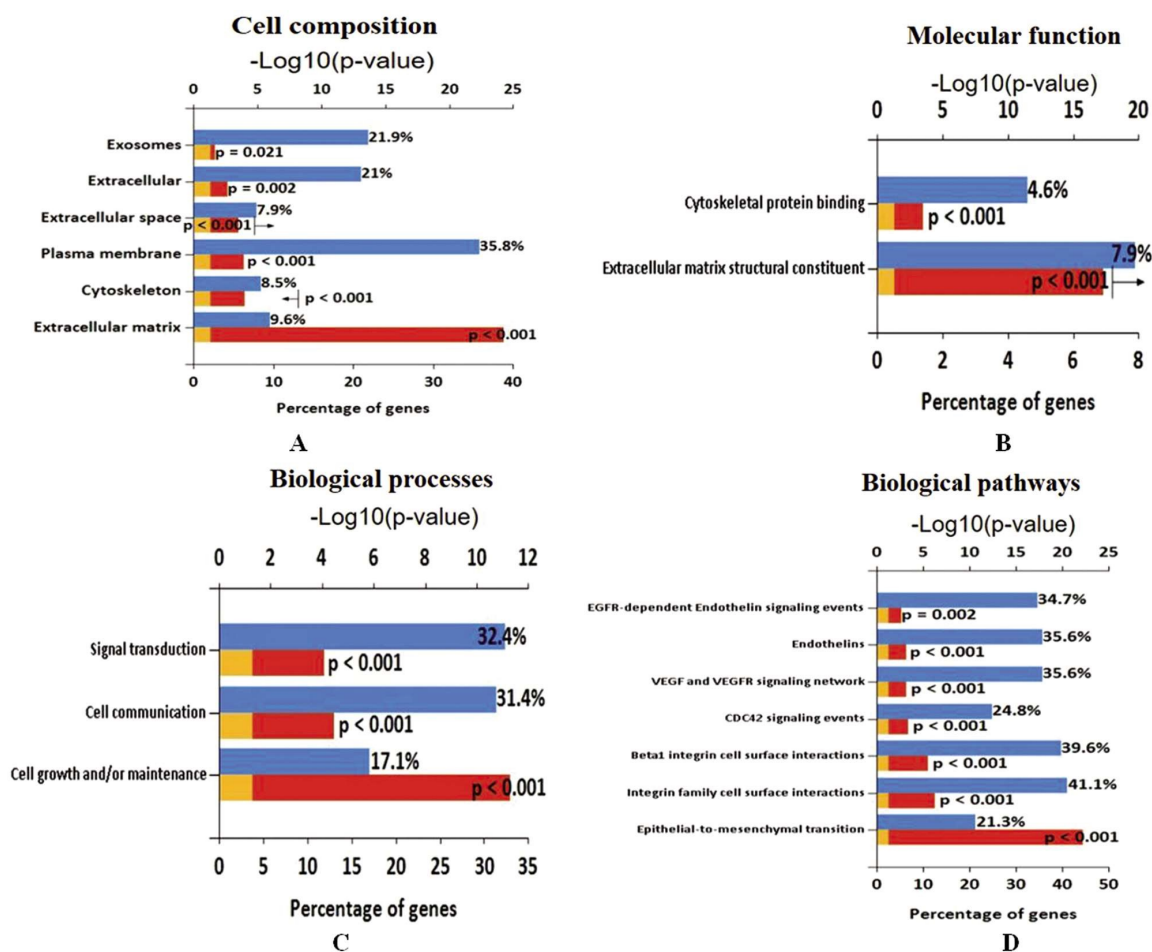


图4 使用 FunRich 软件对 COL5A1 的共表达基因进行 GO 分析与 KEGG 分析

Fig.4 GO analysis and KEGG analysis of co expression gene of COL5A1 using FunRich software

Note: A: cell composition; B: molecular function; C: biological processes; D: biological pathways.

环状 RNA 表达异常过程中,自身也会受到多种调控机制的影响,在这之中内含子两侧的序列和剪接体发挥了重要的作用^[22,23]。从内含子中的互补序列角度来看,形成环状 RNA 的外显子两侧内含子中特殊的碱基互补配对序列对环状 RNA 的形成有很大影响,例如 ALU 重复序列,与不形成环状 RNA 的外显子相比,形成环状 RNA 的外显子两侧的内含子中 ALU 重复序列出现的可能性达两倍以上^[24]。但也有研究人员在酵母中发现即使缺少互补序列环状 RNA 也可以产生,这提示互补序列对环状 RNA 的形成还需要进一步研究,同时也从侧面提示 RNA 结合蛋白在环状 RNA 的生物合成中有重要的作用^[25]。我们的研究中首次报道了 RNA 结合蛋白 TDP-43 可以促进环状 RNA 的环化,为环状 RNA 的调控分子增加了新的可能新,此外,我们 TDP-43 在促进环状结构形成后随即解离,相比较始终位于外显子两侧的特殊序列而言,这提示 RNA 结合蛋白的调控方式更为灵活可控,更有助于增强细胞自身的适应能力。但是关于 TDP-43 对 Circ-COL5A1 的调控在其他肿瘤中是否存在还需要进一步研究。

环状 RNA 的作用机制研究近年来取得了很大的进展,例如发现最早的环状 RNA 之一 CDR1as 可以作为分子海绵吸附 miRNA 从而抵消 miRNA 对下游靶基因的调控,这一调控机制在多种生理及病理过程中都起到了重要作用^[26-28]。此外,如 circ-SHPRH、Circ β -catenin 等环状 RNA 可以作为翻译过程中的模板,通过其编码肽来发挥生物学功能^[29,30]。本研究中发现 Circ-COL5A1 虽然对其亲本基因 COL5A1 的 mRNA 表达量没有影响,但是可以抑制 COL5A1 的蛋白质表达水平,这一调控机制发生在转录后水平,这种调控机制是否是普遍存在也需要进一步的研究。

综上所述,本研究为 Circ-COL5A1 抑制 HCC 的转移提供了证据,同时本研究中还发现了 RNA 结合蛋白 TDP-43 可以促进环状 RNA 的环化,这为环状 RNA 的生物学合成调控机制提供了新的证据。Circ-COL5A1 抑制亲本基因的蛋白质表达水平,这也为环状 RNA 的作用机制提供了新的方向。

参考文献(References)

- [1] Sharma SA, Kowgier M, Hansen BE, et al. Toronto HCC risk index: A validated scoring system to predict 10-year risk of HCC in patients with cirrhosis[J]. J Hepatol, 2017, pii: S0168-8278(17)32248-1
- [2] Xu XF, Xing H, Han J, et al. Risk Factors, Patterns, and Outcomes of Late Recurrence After Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study From China [J]. JAMA Surg, 2019, 154(3): 209-217
- [3] Liao Z, Chen L, Zhang X, et al. PTPRepsilon Acts as a Metastatic Promoter in Hepatocellular Carcinoma by Facilitating Recruitment of SMAD3 to TGF-beta Receptor 1[J]. Hepatology, 2020[Epub ahead of print]
- [4] Steinbichler TB, Savic D, Dudas J, et al. Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 148-156
- [5] Agliano A, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis[J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44: 25-42
- [6] Rossetto A, De Re V, Steffan A, et al. Carcinogenesis and Metastasis in Liver: Cell Physiological Basis[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(11). pii: E1731
- [7] Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications[J]. Annu Rev Pathol, 2016, 11: 47-76
- [8] Malladi S, Macalinao DG, Jin X, et al. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT[J]. Cell, 2016, 165(1): 45-60
- [9] Zhou JN, Zeng Q, Wang HY, et al. MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4[J]. Hepatology, 2015, 62(3): 801-815
- [10] Liu J, Wu Z, Han D, et al. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Liver Cancer Through Small Ubiquitin-Related Modifier (SUMO)ylation-Related Suppression of NF-kappaB/Snail Signaling Pathway and Epithelial-Mesenchymal Transition [J]. HepatologyHepatology, 2020, 71(4): 1262-1278
- [11] Hu ZQ, Zhou SL, Li J, et al. Circular RNA Sequencing Identifies CircASAP1 as a Key Regulator in Hepatocellular Carcinoma Metastasis [J]. Hepatology, 2019, doi: 10.1002/hep.31068[Epub ahead of print]
- [12] Yu J, Xu QG, Wang ZG, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2018, 68(6): 1214-1227
- [13] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. Cell, 2015, 160(6): 1125-1134
- [14] Chen L, Kong R, Wu C, et al. Circ-MALAT1 Functions as Both an mRNA Translation Brake and a microRNA Sponge to Promote Self-Renewal of Hepatocellular Cancer Stem Cells [J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 7(4): 1900949
- [15] Hayashi N, Sasaki S, Takahashi H, et al. Identification of Arabidopsis thaliana upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(15): 8844-8858
- [16] Zhou B, Yu JW. A novel identified circular RNA, circRNA_010567, promotes myocardial fibrosis via suppressing miR-141 by targeting TGF-beta1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(4): 769-775
- [17] Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 41
- [18] Zhang C, Huang S, Zhuang H, et al. YTHDF2 promotes the liver cancer stem cell phenotype and cancer metastasis by regulating OCT4 expression via m6A RNA methylation [J]. Oncogene, 2020,doi: 10.1038/s41388-020-1303-7[Epub ahead of print]
- [19] Witt K, Ligtenberg MA, Conti L, et al. Cripto-1 Plasmid DNA Vaccination Targets Metastasis and Cancer Stem Cells in Murine Mammary Carcinoma[J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6(11): 1417-1425
- [20] Liu C, Liu L, Chen X, et al. LSD1 Stimulates Cancer-Associated Fibroblasts to Drive Notch3-Dependent Self-Renewal of Liver Cancer Stem-like Cells[J]. Cancer Res, 2018, 78(4): 938-949
- [21] Wei Y, Chen X, Liang C, et al. A Noncoding Regulatory RNAs Network Driven by Circ-CDYL Acts Specifically in the Early Stages

- Hepatocellular Carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 130-147
- [22] Geng X, Jia Y, Zhang Y, et al. Circular RNA: biogenesis, degradation, functions and potential roles in mediating resistance to anticarcinogens[J]. *Epigenomics*, 2020, 12(3): 267-283
- [23] Chen LL, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388
- [24] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157
- [25] Barrett SP, Wang PL, Salzman J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor [J]. *Elife*, 2015, 4: e07540
- [26] Su Y, Feng W, Shi J, et al. circRIP2 accelerates bladder cancer progression via miR-1305/Tgf-beta2/smad3 pathway [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 23
- [27] Li Q, Pan X, Zhu D, et al. Circular RNA MAT2B Promotes Glycolysis and Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Through the miR-338-3p/PKM2 Axis Under Hypoxic Stress[J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1298-1316
- [28] Ma Z, Han C, Xia W, et al. circ5615 functions as a ceRNA to promote colorectal cancer progression by upregulating TNKS [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 356
- [29] Zhang M, Huang N, Yang X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13): 1805-1814
- [30] Liang WC, Wong CW, Liang PP, et al. Translation of the circular RNA circbeta-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 84

(上接第 2113 页)

- [19] Liu BH, Li YG, Liu JX, et al. Assessing inflammation in Chinese subjects with subtypes of heart failure: an observational study of the Chinese PLA Hospital Heart Failure Registry [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2019, 16(4): 313-319
- [20] Gombos T, Föhrész Z, Pozsonyi Z, et al. Long-Term Survival and Apolipoprotein A1 Level in Chronic Heart Failure: Interaction With Tumor Necrosis Factor α -308 G/A Polymorphism [J]. *J Card Fail*, 2017, 23(2): 113-120
- [21] 程冕, 严金华, 翟茂才, 等. 盐酸曲美他嗪对老年慢性心力衰竭患者疗效及血清 BNP 和 IL-6 水平的影响 [J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(9): 865-868
- [22] 胡黎文, 杜怡雯, 王皓霖, 等. 真武汤合桂枝茯苓丸对慢性心力衰竭患者 hs-CRP、TNF- α 、IL-6 的影响 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(5): 830-833
- [23] Ridker PM. From CRP to IL-6 to IL-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection [J]. *Circ Res*, 2016, 118(1): 145-156
- [24] 刘云, 梁生. 阿托伐他汀对不稳定型心绞痛患者 hs-CRP、Hcy 及 cTnI 水平的影响研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(4): 400-402
- [25] Lourenço P, Pereira J, Ribeiro A, et al. C-reactive protein decrease associates with mortality reduction only in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2019, 20(1): 23-29
- [26] 李晓丽, 曹国良. 动脉粥样硬化患者血清微小 RNA-181b 的异常表达及其作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(6): 516-520
- [27] 谢岩, 王月香, 席燕, 等. MicroRNA-181b 和 microRNA-130a 在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血浆中的表达及临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(22): 42-46
- [28] Zhang W, Shen X, Xie L, et al. MicroRNA-181b regulates endotoxin tolerance by targeting IL-6 in macrophage RAW264.7 cells [J]. *J Inflamm*, 2015, 12(1): 1-9
- [29] Huo X, Zhang K, Yi L, et al. Decreased Epithelial and Plasma miR-181b-5p Expression Associates with Airway Eosinophilic Inflammation in Asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2016, 46(10): 1281-1290
- [30] Sun P, Li L, Liu YZ, et al. MiR-181b regulates atherosclerotic inflammation and vascular endothelial function through Notch1 signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 3051-3057