

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.009

· 基础研究 ·

## circ\_0005075 通过海绵吸附 miR-335 促进肝癌 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭

郑建兴, 刘晓刚, 吴东洋(唐山市工人医院 肝胆外科, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 circ\_0005075 对肝癌细胞增殖和侵袭的影响及其作用机制。**方法:** 收集唐山市工人医院 2015 年 3 月至 2018 年 3 月收治的 35 例肝癌患者手术切除的肝癌及其相应癌旁组织, 采用 qPCR 检测肝癌、癌旁组织及细胞系 (HCCC9810、HepG2、HLE 肝癌细胞和 THLE-3 肝上皮细胞) 中 circ\_0005075 和 miR-335 的表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 circ\_0005075、miR-335 及 CCND1 三者间的靶向关系。采用脂质体介导方法将 sh-circ\_0005075、miR-335 mimics、miR-335 mimics+pcDNA-CCND1、sh-circ\_0005075+pcDNA-CCND1、pcDNA-circ\_0005075+miR-335 mimics、sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 转染肝癌细胞 HCCC9810, 应用 MTT 和 Transwell 法检测 circ\_0005075/miR-335/CCND1 分子轴正向和回复作用对 HCCC9810 细胞增殖和侵袭的影响。**结果:** circ\_0005075 在肝癌组织及细胞系中高表达 (均  $P < 0.01$ ), 且在 HCCC9810 细胞中表达水平最高 ( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告基因实验结果显示, circ\_0005075 靶向负调控 miR-335 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 且 CCND1 是 miR-335 的靶基因 ( $P < 0.05$ )。正向和回复实验证明, 敲降 circ\_0005075 或过表达 miR-335 都通过调控 CCND1 抑制 HCCC9810 细胞增殖和侵袭 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** circ\_0005075 通过海绵吸附 miR-335 上调 CCND1 的表达水平, 进而促进 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭。

**[关键词]** circ\_0005075; miR-335; 肝癌; HCCC9810 细胞; CCND1; 增殖; 侵袭

**[中图分类号]** R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0267-06

## circ\_0005075 promotes proliferation and invasion of liver cancer HCCC9810 cells by sponging miR-335

ZHENG Jianxing, LIU Xiaogang, WU Dongyang (Department of Hepatobiliary Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of circ\_0005075 on the proliferation and invasion of liver cancer cells and its underlying mechanism. **Methods:** A total of 35 cases of cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues from liver cancer patients, who underwent surgical resection in Tangshan Workers' Hospital from March 2015 to March 2018, were collected for this study. qPCR was used to detect the expression levels of circ\_0005075 and miR-335 in liver cancer tissues, para-cancerous tissues, liver cancer cell lines (HCCC9810, HepG2, HLE and hepatic epithelial THLE-3 cells). Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship among circ\_0005075, miR-335 and CCND1. By using liposome-mediated method, Sh-circ\_0005075, miR-335 mimics, miR-335 mimics+pcDNA-CCND1, sh-circ\_0005075+pcDNA-CCND1, pcDNA-circ\_0005075+miR-335 mimics, sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 were transfected into HCCC9810 cells, respectively. The effects of circ\_0005075/miR-335/CCND1 molecular axis on the proliferation and invasion of HCCC9810 cells were detected by MTT and Transwell methods. **Results:** circ\_0005075 was highly expressed in liver cancer tissues and cell lines ( $P < 0.01$ ), and the highest expression in HCCC9810 cells ( $P < 0.05$ ). Dual luciferase reporter gene results showed that circ\_0005075 negatively regulated miR-335 ( $P < 0.05$ ), and CCND1 was a target gene of miR-335 ( $P < 0.05$ ). Further experiments proved that knockdown of circ\_0005075 or overexpression of miR-335 could inhibit the proliferation and invasion of HCCC9810 cells by regulating CCND1 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Circ\_0005075 upregulates the expression level of CCND1 by sponging miR-335, thereby promoting the proliferation and invasion of HCCC9810 cells.

**[Key words]** circ\_0005075; miR-335; liver cancer; HCCC9810 cells; CCND1; proliferation; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 267-272. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.009]

**[作者简介]** 郑建兴(1976-),男,硕士,副主任医师,主要从事肝胆胰疾病的外科基础与临床研究,E-mail: jianxingzh@163.com

**[通信作者]** 刘晓刚(LIU Xiaogang, corresponding author),硕士,主任医师,主要从事肝癌的基础与临床研究,E-mail: tsgrylxg@163.com

肝癌是我国高发且危害极大的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 其高转移性严重影响患者预后<sup>[2]</sup>。大量研究指出, 环状 RNA (circRNA) 在肝癌的发生发展中扮演着重要的角色。例如, circ\_0078710 通过海绵吸附 miR-31 促进肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移及肿瘤生长<sup>[3]</sup>。ZHANG 等<sup>[4]</sup>报道, circ\_0001445 在肝癌组织中低表达, 且与肿瘤灶数量呈负相关, 过表达 circ\_0001445 可抑制肝癌细胞增殖、侵袭及迁移并诱导凋亡。研究<sup>[5]</sup>发现, circ\_0005075 可作为潜在的肝癌生物标志物, 但具体机制还有待研究。circRNA 主要通过调控 miRNAs 参与肝癌的发展进程。例如, circ\_0005986 通过海绵吸附 miR-129-5p 抑制肝癌增殖、侵袭及迁移, 并可作为肝癌的生物标志物<sup>[6]</sup>。circ\_0067934 通过海绵吸附 miR-1324 上调 FZD5 的表达水平, 进而激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 从而促进肝癌的增殖、侵袭及迁移<sup>[7]</sup>。DOHI 等<sup>[8]</sup>发现, miR-335 在肝癌组织中低表达, 且在远处转移肝癌组织中的表达水平更低。因此, 本研究主要探究 circ\_0005075 通过海绵吸附 miR-335 对肝癌细胞增殖和侵袭的影响及其可能的作用机制, 为寻找诊治肝癌的生物标志物提供有意义的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

人肝上皮细胞 THLE-3 (货号: CRL-11233) 购自上海信裕生物科技有限公司, 人肝癌细胞系 HePG2 (货号: CBP60199)、HLE (货号: CBP60200) 及 HCCC9810 (货号: CBP60195) 均购自南京科佰生物科技有限公司, sh-circ\_0005075/pcDNA-circ\_0005075、miR-335 mimics 及 sh-CCND1/pcDNA-CCND1 均购自上海吉玛公司, DMEM 和胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司, 青霉素和链霉素购自北京雷根生物技术有限公司, Lipofectamine™ 2000、高纯总 RNA 快速提取试剂盒和逆转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, 全蛋白提取试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司, 免疫印迹一抗和二抗均购自美国 CST 公司, 双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自 Promega 公司, MTT 试剂盒购于 sigma 公司, Transwell 小室购自美国康宁公司。

### 1.2 临床样本收集

收集 2015 年 3 月至 2018 年 3 月唐山市工人医院肝胆外科收治的 35 例肝癌患者手术切除的癌组织及其相应的距离癌灶边缘 2 cm 以上癌旁组织, 其中男性 17 例, 女性 18 例; 年龄 37~68 岁, 平均 (49±10) 岁;

按照 NCCN 指南 TNM 肿瘤分期标准均为 III 期及以上患者。全部研究对象均签署知情同意书, 本研究经本院伦理委员会批准。肝癌组织标本严格按照以下纳入和排除标准进行收集, 纳入标准: (1) 有完整的临床及病历资料; (2) 病例结果明确为原发性肝癌患者; (3) 术前未进行放疗及化疗。排除标准: (1) 其他肿瘤转移到肝脏上的患者; (2) 之前进行任何放疗或化疗; (3) 患者不同意样本的采集。

### 1.3 细胞培养

将人正常肝上皮细胞 THLE-3 及人肝癌细胞系 HePG2、HLE 和 HCCC9810 置于含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (0.1 g/ml) 的 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养待用。

### 1.4 细胞转染

取对数生长期 HCCC9810 细胞, 用胰酶进行消化处理并计数, 将细胞密度调整至 1×10<sup>5</sup> 个/ml; 然后, 将细胞悬液接种到 6 孔板中 (2 ml/孔), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 培养好的细胞悬液按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书的步骤分别将 sh-circ\_0005075、miR-335 mimics、miR-335 mimics+pcDNA-CCND1、sh-circ\_0005075 + pcDNA-CCND1、pcDNA-circ\_0005075+miR-335 mimics、sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 转染 HCCC9810 细胞, 转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

### 1.5 qPCR 法检测肝癌组织及细胞系中 circ\_0005075 和 miR-335 的表达水平

按 TRIzol 试剂说明书操作, 提取肝癌组织、相应癌旁组织和细胞系的总 RNA, 紫外吸收法测定总 RNA 的浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书步骤将 RNA 反转录成 cDNA。随后按照荧光定量 PCR 试剂盒检测 circ\_0005075 及 miR-335 mimics 的表达水平, 以 U6 作为参照, 引物序列见表 1。PCR 反应体系 (20  $\mu$ l): 2  $\mu$ l 反转录产物, 10  $\mu$ l SYBR Green Mix, 0.4  $\mu$ l ROX Reference Dye, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8, 6  $\mu$ l DH<sub>2</sub>O。PCR 热循环参数为 95 °C、5 min, 然后 3 步反应: 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 进行 45 个循环。检测结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 公式进行计算。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

Target	Sequence
miR-335	F: 5'-TCAAGAGCAATAACGAAAATGT-3'
	R: 5'-GCTGTCAACGATACGATACGT-3'
circ_0005075	F: 5'-CAAATCTTGCGGCAACGC-3'
	R: 5'-GCGGGAGTGAAGATTCGA-3'
U6	F: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	R: 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'

### 1.6 WB法检测HCCC9810肝癌细胞中CCND1的表达水平

收集转染细胞,使用RPMI裂解液提取细胞中的蛋白,98℃恒温金属浴变性10 min,15 000×g离心2 min,BCA试剂盒测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE分离蛋白,然后电转法转移至PVDF膜上,5% BSA封闭1 h后加入一抗(1:1 000),4℃过夜孵育。TBST洗膜3次,每次10 min,加入二抗(1:10 000)室温孵育2 h后,ECL显色后在凝胶成像仪上观察拍照,并根据蛋白条带的灰度值计算相对表达量。

### 1.7 双荧光素酶实验验证circ\_0005075、miR-335及CCND1三者间的靶向关系

采用PCR扩增circ\_0005075与miR-335以及miR-335与CCND1结合片段并导入pmir-GLO luciferase表达载体中构建野生型质粒,将结合片段的部分核苷酸进行突变构建突变型质粒。按照Lipofectamine™ 2000说明书操作步骤,将pGLO、circ\_0005075/CCND1野生型载体和circ\_0005075/CCND1突变型载体、miR-335模拟物及阴性对照组分别与Lipofectamine™ 2000脂质体混合后转染HEK 293T细胞,转染48 h后根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书步骤检测荧光素酶活性。

### 1.8 MTT法检测转染后HCCC9810细胞的增殖情况

取对数生长期HCCC9810细胞,用常规胰酶消化处理细胞且调整细胞密度至 $3 \times 10^3$ 个/孔后,接种于96孔板,每组设置3个复孔。放置于培养箱培养72 h后,每孔依次加入20 μl(5 mg/ml)MTT溶液,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育5 h弃去上清液后加入200 μl DMSO,避光静置10 min后在酶标仪上

测定波长为570 nm处的光密度(D)值。

### 1.9 Transwell法检测转染后HCCC9810细胞的侵袭能力

将Matrigel基质胶在无血清培养基按1:3比例稀释后,取200 μl铺于Transwell小室中,4℃风干。取对数生长期HCCC9810细胞,用常规胰酶处理细胞,无血清培养基重悬细胞并调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。上室加入200 μl细胞悬液,下室加入600 μl含有10%血清的培养基。培养箱培养24 h后,4%多聚甲醛固定15 min,用棉签擦去基质胶和上层细胞。染色洗净后,在40倍光镜下观察并计数,计算其均值。

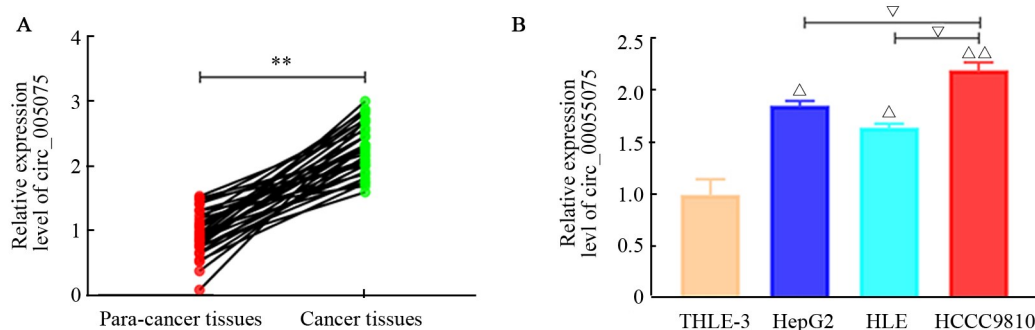
### 1.10 统计学处理

qPCR、WB、双荧光素酶报告基因、MTT、Transwell等实验均重复3次。采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较采用t检验,多组样本均数间比较先行方差齐性检验,再行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circ\_0005075在肝癌组织及肝癌细胞系中均呈高表达

qPCR检测结果显示,circ\_0005075在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织( $P < 0.01$ ,图1A);同时,circ\_0005075在各肝癌细胞系中的表达水平均显著高于人正常肝上皮细胞THLE-3( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ,图1B),且在HCCC9810细胞中表达水平最高( $P < 0.05$ ,图1B),故选取HCCC9810细胞进行后续实验。上述结果表明,circ\_0005075的异常高表达与肝癌的发生发展有关。



\*\* $P < 0.01$  vs para-cancer tissues;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs THLE-3 cells;  $\nabla P < 0.05$  vs HCCC9810 cells

图1 circ\_0005075在肝癌组织及肝癌细胞系中均异常高表达

Fig.1 circ\_0005075 exhibited abnormally high expression in liver cancer tissues and cell lines

### 2.2 敲降circ\_0005075显著抑制肝癌HCCC9810细胞的增殖和侵袭能力

转染sh-circ\_0005075后,qPCR检测结果(图2A)显示,在HCCC9810细胞中circ\_0005075的表达水平

显著低于NC组( $P < 0.01$ )。MTT检测结果(图2B)显示,与NC组相比,敲降circ\_0005075可显著下调HCCC9810细胞的增殖活力( $P < 0.05$ )。Transwell实验检测结果(图2C、D)显示,相比于NC组,敲降circ\_

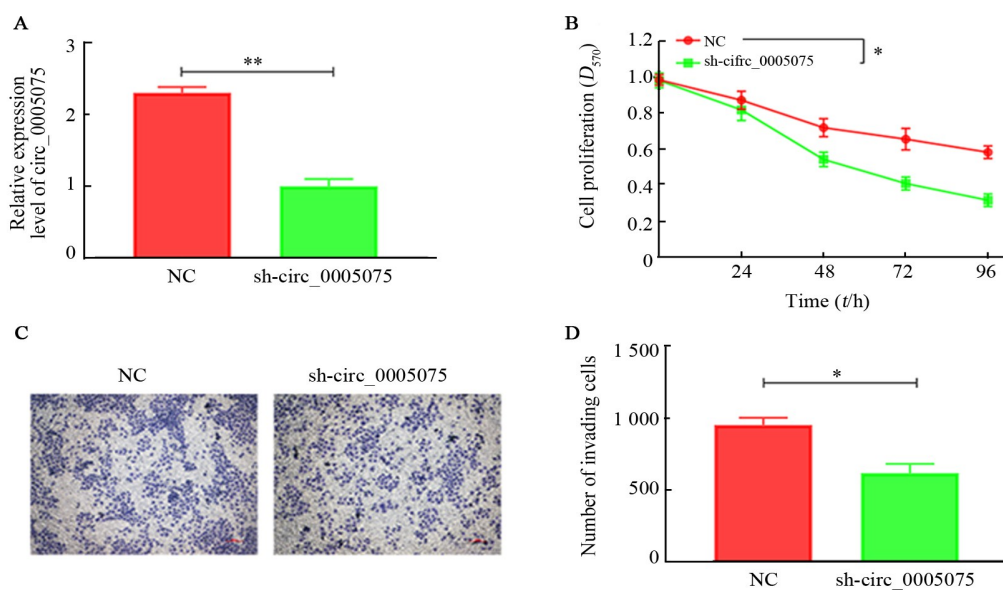


0005075 显著抑制 HCCC9810 细胞侵袭 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明, 敲降 circ\_0005075 能够显著抑制肝癌 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭。

### 2.3 circ\_0005075 和 CCND1 靶向结合 miR-335

circular RNA Interactome 及 Starbase 生物信息学数据库查询结果显示, circ\_0005075 与 miR-335、miR-335 与 CCND1 结合位点碱基序列相同。双荧光素酶报告基因实验验证结果(图 3B、D)表明, 过表达 miR-335 可以显著抑制 CCND1 3'-UTR 和 circ\_0005075 3'-UTR 野

生型质粒内荧光强度 ( $P < 0.05$ ), 而对 CCND1 3'-UTR 和 circ\_0005075 3'-UTR 突变型质粒的荧光强度抑制作用无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。qPCR 检测结果(图 3C)显示, 过表达 circ\_0005075 显著抑制 miR-335 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 同时 WB 检测结果(图 3E)显示, 过表达 miR-335 显著抑制 CCND1 的表达 ( $P < 0.05$ )。上述实验结果表明, circ\_0005075 靶向负调控 miR-335 的表达水平, 且 CCND1 是 miR-335 的靶基因。

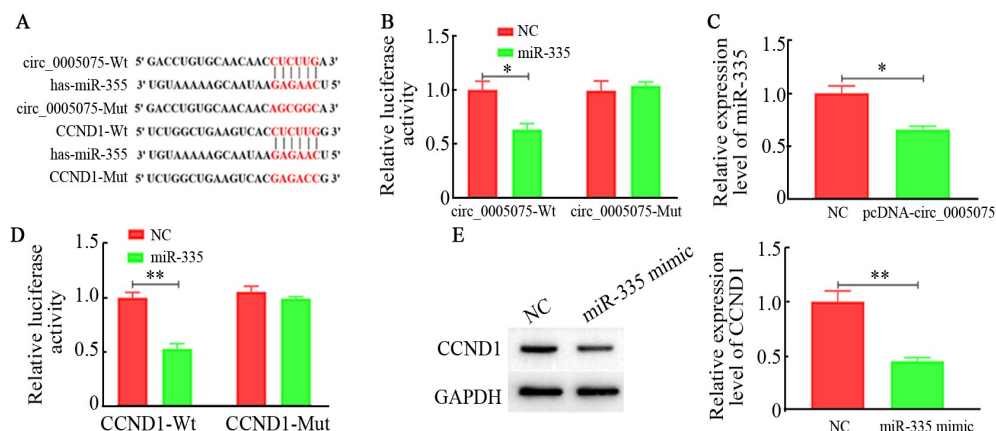


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group

A: The expression of circ\_0005075 in HCCC9810 cells was detected by qPCR; B: The proliferation of HCCC9810 cells was measured by MTT assay; C and D: Number of invading HCCC9810 cells was detected by Transwell assay ( $\times 40$ )

图2 敲降 circ\_0005075 抑制 HCCC9810 细胞增殖和侵袭

Fig.2 Knockdown of circ\_0005075 inhibited proliferation and invasion of HCCC9810 cells



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group

A: The binding site between circ\_0005075 and miR-335, miR-335 and CCND1 was verified by circRNA Interactome and starBase database; B and D: The luciferase activity was detected by Dual luciferase reporter gene assay; C: The regulated relationship of circ\_0005075 and miR-335 was measured by qPCR; E: The expression of CCND1 was verified by WB

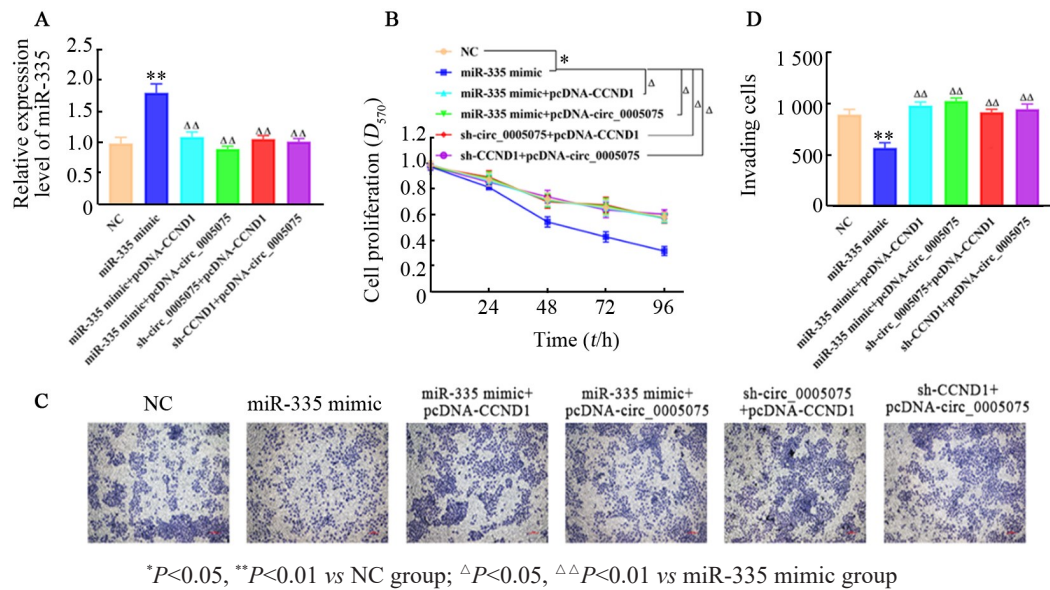
图3 circ\_0005075 和 CCND1 靶向结合 miR-335

Fig.3 circ\_0005075 and CCND1 targetedly bound to miR-335

### 2.4 circ\_0005075 通过 miR-335/CCND1 分子轴促进 HCCC9810 细胞增殖和侵袭

qRT-PCR 检测结果(图 4A)显示,转染 miR-335 mimic 后,miR-335 的表达水平显著高于 NC 组( $P<0.01$ ),而 miR-335 mimic+pcDNA-CCND1 组、miR-335 mimic+pcDNA-circ\_0005075 组、sh-circ\_0005075+pcDNA-CCND1 组及 sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 组中 miR-335 的表达水平与 NC 组相比差异无统计学意义(均  $P>0.05$ )。MTT 及 Transwell 检测结果(图 4B、C、D)显

示,过表达 miR-335 显著抑制 HCCC9810 细胞增殖和侵袭(均  $P<0.01$ ),且 miR-335 mimic+pcDNA-CCND1 组、miR-335 mimic+pcDNA-circ\_0005075 组、sh-circ\_0005075+pcDNA-CCND1 组及 sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 组中 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭能力与 NC 组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。上述结果表明,circ\_0005075 可通过竞争性结合 miR-335 上调 CCND1 的表达水平,进而促进 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭。



A: The expression of miR-335 in HCCC9810 cells was detected by qPCR; B: The proliferation of HCCC9810 cells was measured by MTT assay; C and D: Number of invading HCCC9810 cells was detected by Transwell assay( $\times 40$ )

图 4 circ\_0005075 通过 miR-335/CCND1 分子轴促进 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭

Fig.4 circ\_0005075 promoted proliferation and invasion of HCCC9810 cells via miR-335/CCND1 axis

### 3 讨论

美国癌症协会指出全球除肝癌以外的恶性肿瘤发病率及病死率均有所下降,但肝癌发病率及病死率仍逐年上升<sup>[9]</sup>。因此进一步探究肝癌发生的分子机制对于肝癌的临床治疗至关重要。circRNA 是一类首尾共价结合呈环状的 RNA 分子,最先在 RNA 病毒中被发现<sup>[10]</sup>,其主要存在于哺乳动物细胞中,并在转录和转录后水平调控基因表达<sup>[11]</sup>。circRNA 参与调控肝癌的恶性生物学行为,例如 circ\_001569 在肝癌组织及细胞系中高表达,与肿瘤大小、晚期 TNM 分期和 HCC 患者的不良预后相关<sup>[12]</sup>。circ\_0000567 在肝癌组织中异常低表达并抑制肝癌细胞增殖和侵袭<sup>[13]</sup>。此外,LI 等<sup>[5]</sup>报道,circ\_0005075 在肝癌组织中异常高表达,该研究结果与本研究结果一致。本研究还发现,敲降 circ\_0005075 能显著抑制 HCCC9810 细胞的增殖和侵袭。

miRNA 是一类非编码小 RNA,circRNA 可通过“海

绵吸附”机制结合 miRNA 影响其下游蛋白的表达水平,参与肿瘤的发生发展。例如,circ-Vav3 通过竞争性结合 gga-miR-375 上调 YAP1 的表达,从而影响 EMT 标记物的表达水平,进而促进肝癌细胞的 EMT 进程<sup>[14]</sup>。circ\_0000673 海绵吸附 miR-767-3p,从而上调 SET 蛋白的表达水平,进而促进肝癌增殖和侵袭<sup>[15]</sup>。此外,YANG 等<sup>[16]</sup>报道,circ\_0005075 通过海绵吸附下调 miR-335 促进肝癌细胞的增殖。本研究通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因检测结果证实过表达 miR-335 显著抑制 HCCC9810 细胞增殖和侵袭。但 miR-335 下游调控机制还需进一步研究。G1/S 特异性周期蛋白-D1(cyclin D1,CCND1)是细胞周期中一个重要的调控因子,当 CCND1 异常过表达时会影响正常的细胞周期,从而引起包括肝癌在内的多种肿瘤疾病的发展<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>发现,CCND1 和 CDK6 能形成细胞周期依赖性复合物 CDK6/CCND1,进而调节癌细胞周期并促进癌细胞增殖。如 WU 等<sup>[19]</sup>发现,当下调 CCND1 时,CDK6 和 cMET 的表达水平也随之下调,进而抑制肝癌的增殖。此外,

CHEN 等<sup>[20]</sup>研究证实,敲降 CCND1 的表达水平,通过抑制 PI3K/AKT 信号通路进而抑制结直肠癌的增殖及侵袭。但目前 CCND1 在肝癌发展中的具体作用机制并不完全清楚。本研究发现 CCND1 在 HCCC9810 细胞中高表达,并通过生物信息学软件和双荧光素酶报告基因实验发现 CCND1 是 miR-335 的下游靶基因。

综上,本研究发现,敲降 circ\_0005075 或过表达 miR-335 能显著抑制 HCCC9810 细胞增殖和侵袭;转染 miR-335 mimic+pcDNA-CCND1、miR-335 mimic+pcDNA-circ\_0005075、sh-circ\_0005075+pcDNA-CCND1 及 sh-CCND1+pcDNA-circ\_0005075 后,能够逆转过表达 miR-335 对 HCCC9810 细胞增殖和侵袭的抑制作用。本研究结果并结合临床分析证实, circ\_0005075 通过海绵吸附 miR-335 上调 CCND1 的表达水平,进而促进 HCCC9810 细胞增殖和侵袭,为探寻诊治肝癌的生物标志物提供了有意义的实验依据。

#### [参考文献]

- [1] SUN Y, WANG Y, LI M, et al. Long-term trends of liver cancer mortality by gender in urban and rural areas in China: an age-period-cohort analysis[J/OL]. *BMJ Open*, 2018, 8(2): e020490[2019-10-06]. <https://bmjopen.bmj.com/content/8/2/e020490>. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020490.
- [2] 张小路, 杜梅红, 陈红跃, 等, et al. miR-375 靶向调控 YAP 表达对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(1): 79-84. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.013.
- [3] XIE B, ZHAO Z, LIU Q, et al. CircRNA has\_circ\_0078710 acts as the sponge of microRNA-31 involved in hepatocellular carcinoma progression[J]. *Gene*, 2019, 683:253-261.DOI:10.1016/j.gene.2018.10.043.
- [4] ZHANG X, ZHOU H, JING W, et al. The circular RNA hsa\_circ\_0001445 regulates the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma and may serve as a diagnostic biomarker[J/OL]. *Dis Markers*, 2018, 3073467[2019-09-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896272/>. DOI: 10.1155/2018/3073467.
- [5] LI M F, LI Y H, HE Y H, et al. Emerging roles of hsa\_circ\_0005075 targeting miR-431 in the progress of HCC[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 848-858. DOI:10.1016/j.biopha.2018.01.150.
- [6] FU L Y, CHEN Q Q, YAO T, et al. Hsa\_circ\_0005986 inhibits carcinogenesis by acting as a miR-129-5p sponge and is used as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 43878-43888[2019-10-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5546447/>. DOI:10.18632/oncotarget.16709.
- [7] ZHU Q, LU G, LUO Z, et al. CircRNA circ\_0067934 promotes tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma through regulation of miR-1324/FZD5/Wnt/beta-catenin axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(2): 626-632. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.119.
- [8] DOHI O, YASUI K, GEN Y, et al. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Int J Oncol*, 2013, 42(2): 411-418[2019-11-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583616/>. DOI:10.3892/ijo.2012.1724.
- [9] RYERSON A B, EHEMAN C R, ALTEKRUSE S F, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer[J/OL]. *Cancer*, 2016, 122(9): 1312-1337[2019-11-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840031/>. DOI:10.1002/ncr.29936.
- [10] SANGER H L, KLOTZ G, RIESNER D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73(11): 3852-3856[2019-11-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431239/>. DOI:10.1073/pnas.73.11.3852.
- [11] U S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148. DOI: DOI:10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [12] LIU H, XUE L, SONG C, 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.
- [13] XU L L, FENG X F, HAO X Y, et al. CircSETD3 (Hsa\_circ\_0000567) Acts as a sponge for microRNA-421 inhibiting hepatocellular carcinoma growth[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 98[2019-11-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6385474/>. DOI:10.1186/s13046-019-1041-2.
- [14] ZHANG X H, YAN Y M, LIN W C, et al. Circular RNA Vav3 sponges gga-miR-375 to promote epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *RNA Biol*, 2019, 16(1): 118-132[2019-11-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6380338/>. DOI:10.1080/15476286.2018.1564462.
- [15] JIANG W, WEN D, GONG L, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0000673 promotes hepatocellular carcinoma malignance by decreasing miR-767-3p targeting SET[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2):211-216. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.041.
- [16] YANG X Y, SONG H, ZI Z G, et al. Circ\_0005075 promotes hepatocellular carcinoma progression by suppression of microRNA-335[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21937-21946. DOI:10.1002/jcp.28757.
- [17] VICTORIA J G, TIMOTHY J S, AMY R R, et al. Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(40): E9298-e9307[2019-10-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176615/>. DOI: 10.1073/pnas.1807704115.
- [18] LI N, ZENG J, SUN F, et al. p27 inhibits CDK6/CCND1 complex formation resulting in cell cycle arrest and inhibition of cell proliferation[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(19/20): 2335-2348. DOI: 10.1080/15384101.2018.1526598.
- [19] WU H, TAO J Y, LI X L, et al. MicroRNA-206 prevents the pathogenesis of hepatocellular carcinoma by modulating expression of met proto-oncogene and cyclin-dependent kinase 6 in mice[J/OL]. *Hepatology*, 2017, 66(6): 1952-1967[2019-11-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5696004/>. DOI:10.1002/hep.29374.
- [20] CHEN Y Y, JIANG J W, ZHAO M Y, et al. microRNA-374a suppresses colon cancer progression by directly reducing CCND1 to inactivate the PI3K/AKT pathway[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 41306-41319[2019-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5173061/>. DOI:10.18632/oncotarget.9320.

[收稿日期] 2019-12-20

[修回日期] 2020-02-09

[本文编辑] 阮芳铭