

肝癌细胞系中 circAMOTL1 的表达及对肝前体细胞增殖和恶性转化的影响*

朱恺¹ 李江伟² 刘蓉蓉³ 王茜^{1,3} 冯俊侨¹ 李韧² 李宗芳^{1,2,3}

(西安交通大学第二附属医院 1. 生物诊断治疗国家地方联合工程研究中心; 2. 干部病房普通外科; 3. 精准医疗研究院, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的 探讨环状 RNA circAMOTL1 在肝癌细胞系中的表达及其对肝前体细胞(HPCs)系 WB-F344 的增殖迁移及恶性转化的影响。方法 通过实时荧光定量 PCR 检测 circAMOTL1 在 5 种肝癌细胞系和正常肝细胞系 L-02 以及 HPCs 系 WB-F344 中的表达;同时构建过表达和敲除 circAMOTL1 的 WB-F344 的细胞系;通过 CCK-8 实验检测过表达或敲除 circAMOTL1 后 HPCs 的增殖变化;细胞划痕实验验证细胞迁移的变化;通过蛋白免疫印迹实验验证过表达或敲除 circAMOTL1 后对肝癌干细胞(LCSCs)标志物 CD133 的表达影响。结果 5 种肝癌细胞系中 circAMOTL1 的表达水平均高于 L-02($P < 0.05$);过表达 circAMOTL1 后 HPCs 的增殖能力显著提高($P < 0.01$),敲除 circAMOTL1 后细胞的增殖能力显著下降($P < 0.001$);过表达 circAMOTL1 后显著提升了细胞的迁移能力($P < 0.01$),敲除后细胞的迁移能力明显下降($P < 0.01$);过表达 circAMOTL1 后可以检测到 CD133 的表达。结论 circAMOTL1 在 5 种肝癌细胞系中高表达,过表达 circAMOTL1 可以促进 HPCs 的增殖和迁移能力,诱导其向 LCSCs 方向恶性转化。

【关键词】 环状 AMOTL1;肝前体细胞;肝癌干细胞;增殖;恶性转化

【中图分类号】 R735.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 11. 002

Expression of circAMOTL1 in hepatocellular carcinoma cell lines and its effect on proliferation and malignant transformation of hepatic progenitor cells

ZHU Kai¹, LI Jiangwei², LIU Rongrong³, WANG Qian^{1,3}, FENG Junqiao¹, LI Ren², LI Zongfang^{1,2,3}

(1. National & Local Joint Engineering Research Center of Biodiagnostics and Biotherapy, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

2. General Surgery of Cadre Ward, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

3. Institute of Precision Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of circAMOTL1 in liver cancer cell lines and its effect on the proliferation, migration and malignant transformation of liver precursor cell line WB-F344. **Methods** The expression of circAMOTL1 in five liver cancer cell lines, normal liver cell line L-02 and hepatic progenitor cell line WB-F344 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The WB-F344 cell line with overexpression or knockdown of circAMOTL1 was constructed separately. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of hepatic progenitor cells after circAMOTL1 overexpression or knockdown. Cell scratch test was used to verify the changes in cell migration. Western blot was used to verify the effect of overexpression or knockdown of circAMOTL1 on the expression of liver cancer stem cell marker CD133. **Results** The expression level of circAMOTL1 in the five HCC cell lines was higher than that in L-02 ($P < 0.05$). The proliferation ability of hepatic progenitor cells was significantly increased after circAMOTL1 overexpression ($P < 0.01$), and the cell proliferation ability was significantly decreased after knocking out circAMOTL1 ($P < 0.001$). Overexpression of circAMOTL1 significantly promoted cell migration ($P < 0.01$), knockout ($P < 0.01$), the migration ability of the cells was significantly decreased ($P < 0.01$). CD133 expression was detected after circAMOTL1

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81802784);陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目(青年)(2019JQ-508)

通讯作者:李韧, E-mail: doctorliren@126.com

引用本文:朱恺,李江伟,刘蓉蓉,等.肝癌细胞系中 circAMOTL1 的表达及对肝前体细胞增殖和恶性转化的影响[J].西部医学,2024,36(11):

1565-1570. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 11. 002

overexpression. **Conclusion** circAMOTL1 was highly expressed in five HCC cell lines. Overexpression of circAMOTL1 can promote the proliferation and migration ability of hepatic progenitor cells and induce their malignant transformation into liver cancer stem cells.

【Key words】 circAMOTL1; Hepatic progenitor cells; Liver cancer stem cells; Proliferation; Malignant transformation

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要类型,是全球癌症相关死亡的第三大原因^[1]。由于发病隐匿,早期诊断困难,导致其发病率和死亡率不断上升,已经成为日益严重的全球卫生问题。但是目前为止肝癌的治疗手段有限,传统的手术切除、放疗和化疗易复发,患者预后较差。肝前体细胞(Hepatic progenitor cell, HPCs)又称为卵圆细胞(Hepatic oval cell, HOC),可能是肝癌发生的细胞来源。环状 RNA(circular RNAs, circRNAs)是由前体 mRNA(pre-mRNA)反向剪接产生的一类单链共价闭合环状结构的 RNA。作为一种新的非编码 RNA, circRNAs 在物种间具有一定的保守性。过往的研究表明 circRNAs 参与了包括癌症发生在内的多个生物学过程^[2]。但在 HPCs 恶性转化向肝癌发生过程中 circRNAs 是否发挥作用目前尚不清楚。本研究旨在研究 circAMOTL1 在 HCC 中的表达以及在 HPCs 中的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂 HPCs 系 WB-F344 细胞购自武汉普诺赛公司;肝癌细胞系(Hep-3B, MHCC-97L, MHCC-97H, SMMC-7721, Bel-7402)以及正常肝细胞 L-02 均来自中国科学院细胞库;CCK-8 试剂盒购自日本东仁公司;MEM、DMEM 和 RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;CD133(货号 ab19898), CK7(货号 ab181598)和 GAPDH(货号 ab8245)抗体均购自美国 Abcam 公司;RNAzol 购自美国 GeneCopoeia;反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;细胞转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国赛默飞世尔科技公司。所有用到的引物均在广州瑞博生物公司合成。

1.2 细胞培养和转染 所有的细胞株均在 37 °C, 5% CO₂ 浓度的细胞培养箱中培养,且所有用到的细胞株均在 25 代以内。SMMC-7721, Bel-7402 和 L-02 细胞株用 RPMI-1640 培养基进行培养, WB-F344、MHCC-97L 和 MHCC-97H 细胞株采用 DMEM 培养基培养, Hep-3B 则采用 MEM 培养基培养。待 WB-F344 细胞生长到 70% 密度时根据 Lipofectamine 3000 的说明书进行转染, 6 孔板中进行过表达或者敲除的转染: 125 μL Opti-MEM 加 5 μL Lipofectamine

3000, 125 μL Opti-MEM 加 2 μg RNA 再加 5 μL P3000, 分别轻弹混匀后,再次混合在一起,室温孵育 10 min, 加入更换了无血清培养基的细胞中。

1.3 RNA 的抽提、反转录和荧光定量 PCR

1.3.1 Total RNA 的抽提 用 RNAzol RT 试剂对细胞的 total RNA 进行抽提,吸走培养基,用冰冷的 PBS 洗细胞 2 次, 6 孔板的一个孔加入 500 μL 的 RNAzol 裂解细胞,冰上孵育 5 min,收集裂解液到 1.5 mL 的 EP 管中,加入 0.2 mL 的无 RNase 的超纯水,震荡混匀 30 s,室温静置 15 min, 12 000 转离心 5 min,小心的吸取上清到新的 1.5 mL EP 管中,按照 1 mL 上清加 0.4 mL 异丙醇的比例加入后,室温静置 10 min, 12 000 转离心 8 min, 0.4 mL 的 75% 乙醇清洗两遍, 8 000 g 离心 3 min,开盖晾干 5 min,加入无 RNase 的超纯水溶解 RNA。Nanodrop 测定浓度后, -80 °C 分装保存。

1.3.2 去除线性 RNA 反转录 RNase R 进行消化去掉线性 RNA,另外一份不消化作为对照。Prime-Script RT 反转录试剂盒进行反转录, 10 μL 反应体系, 1 μg 的 RNA, 37 °C 15 min 反转录后 85 °C 5 s 灭活酶,终止反转录反应。

1.3.3 荧光定量 PCR 根据文献中验证过的 circAMOTL1 的引物^[3](5'-GATGGTCAAGCCCTAC-CCTG-3', 5'-CCCTGATGCTACTGGTTGCC-3')进行荧光定量 PCR,内参基因用 GAPDH(5'-GATGCT-GGTGCTGAGTATGCG-3', 5'-GTGGTGCAGGAT-GCATTGCTCTGA-3'),采用大连宝生物公司的 TB Green® Premix Ex Taq 试剂盒 20 μL 反应体系进行检测(2× mix 10 μL,上下游混合引物 0.8 μL, ROX Dye II 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 6.8 μL),反应程序为 95 °C 5 min 热启动, (95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 10 s) × 40 循环,结束后收集溶解曲线。采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 circAMOTL1 的相对表达水平。

1.4 细胞增殖能力测定 96 孔板的一个孔中加入 5 × 10³ 个细胞,细胞生长到 50% 融合时, CCK-8 试剂盒检测细胞的增殖能力,每孔中加入 10 μL 的 CCK-8, 37 °C 孵育 1~2 h,酶标仪检测 450 nm 的吸收峰。隐形对照组设定为 0%。

1.5 细胞划痕实验 待细胞生长到对数生长期融合

面积 80% 时传代到 6 孔板中, 24 h 后, 吸走培养基, 用 10 μ L 枪头比着直尺划痕, 枪头要垂直于孔板, 不能倾斜。用 PBS 轻轻的清洗细胞 2 次, 除去漂浮的细胞, 加入无血清的培养基。按照 0、6、12、24 h 的时间点拍照。用 Image J 软件对图片的划痕进行统计分析。

1.6 蛋白免疫印迹实验

1.6.1 蛋白提取和处理 吸走培养基, PBS 清洗细胞 2 次。加入 RIPA 蛋白裂解液(6 孔板 1 个孔加入 0.5 mL), 冰上放置 5 min。收集到 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 转离心 10 min, 吸取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 调整到相同浓度后, 加入四分之一体积的 5 \times loading buffer。95 $^{\circ}$ C 煮蛋白 5 min。

1.6.2 组装好蛋白电泳的 10% 浓度的梯度 SDS PAGE 蛋白胶, 加入 running buffer, 室温平衡 30 min。蛋白上样, 每孔加入 10 μ L 蛋白样品, 没有加样的孔道用 1 \times loading buffer 补齐。80 V 电泳 30 min, 带到蛋白进入浓缩胶和分离胶的交汇处, 电压提升至 110 V 电泳 1 h。拆除胶板, 做成三明治, 按照湿转法转移蛋白到 PVDF 膜上(200 mA 恒流, 2 h), TBST 洗掉膜上的残胶, 牛奶室温封闭 30 min。TBST 洗 3 遍, 加入适当一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。第二天回收一抗, TBST 洗 3~5 遍, 每次 5 min。加入二抗室温孵育 1 h。TBST 洗 3 次。ECL 化学发光液显影, 伯乐凝胶成像仪采集成像图片。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件和 PRISM 6.0 软件(GraphPad 公司)进行统计学分析。所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间的显著差异采用 Fisher 精确检验, 本研究涉及的所有实验和分析至少独立重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circAMOTL1 在肝癌细胞系和正常肝细胞系中的表达水平 采用荧光定量 PCR 的方法检测了 circAMOTL1 在 5 种肝癌细胞系 Hep-3B, MHCC-97L, MHCC-97H, SMMC-7721, Bel-7402 中的表达水平, 结果显示, 和对照组正常肝细胞 L-02 相比, circAMOTL1 在 5 种肝癌细胞系中均高表达, 其中 Hep-3B 的表达水平最高(比 L-02 高出 13 倍), 表达最低的 MHCC-97L 也有两倍的上调表达, 转移潜能高的 MHCC-97H 中 circAMOTL1 的表达水平明显高于转移潜能低的 MHCC-97L 细胞, 且经过统计分析这种上调差异表达均具有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 过表达或敲除 circAMOTL1 的表达效率 为了研究 circAMOTL1 在肝癌细胞系中的作用, 本研究选取大鼠 HPCs 系 WB-F344 作为研究对象, 在 WB-F344

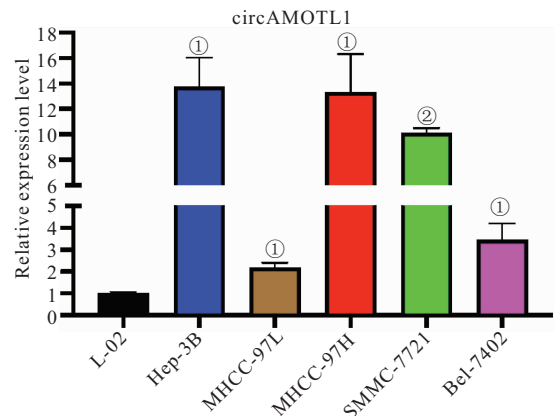


图 1 circAMOTL1 在肝癌和正常肝细胞系中的表达

Figure 1 The expression of circAMOTL1 in hepatocellular carcinoma cell lines and liver cell line

注: 与对照组 L-02 比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.001$ 。

中分别过表达和敲除 circAMOTL1。过表达采用购买自恒恒生物公司 HB-circ-EnhancedTM circRNA 环化载体。通过在线网站 Circular RNA Interactome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html>) 设计 circAMOTL1 的 si-RNA 的序列(ATGGGGTA-ACGAGTTGAAGAT)转染 WB-F344 细胞 48 h 后, 荧光定量 PCR 检测 circAMOTL1 的表达水平发现, 过表达载体 circAMOTL1 的表达水平显著升高(15.6 倍, $P < 0.001$), si-RNA 组敲除效率很高, 能达到 90%, 两个对照组空载体和阴性对照组的表达没有差异, 见图 2。

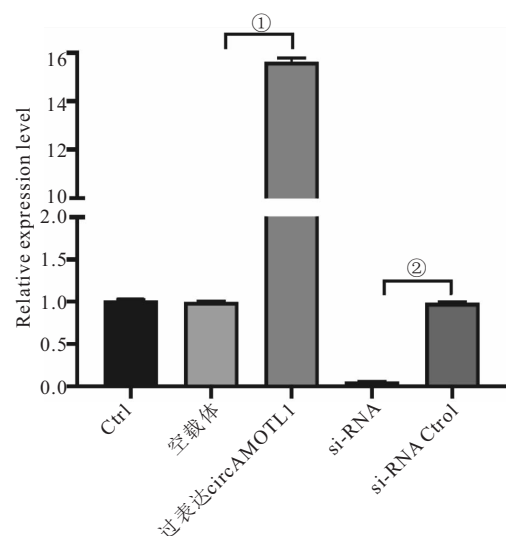


图 2 过表达和沉默 circAMOTL1 后的相对表达水平

Figure 2 Relative expression level of each cell lines after overexpression and silencing of circAMOTL1

注: 两组比较, ① $P < 0.001$; ② $P < 0.01$ 。

2.3 过表达或沉默 circAMOTL1 后 HPCs 的增殖能力 转染过表达 circAMOTL1 的载体或者 si-RNA

进入 WB-F344 细胞之后,每隔 24 h 用 CCK-8 检测细胞的增殖活力,结果显示转染 72 h 后过表达 circAMOTL1 的细胞的 OD 吸光值为(1.11±0.04),相较转染空载体的对照组(0.79±0.02)显著升高($P=0.003$),转染 96 h 后,这种升高的幅度更加显著,过表达 circAMOTL1 后细胞的增殖能力十分活跃。同时转染 si-RNA 的 HPCs 的增殖活力,从转染的第二天起就显著低于对照组 si-RNA Ctrl,且随着观察实验的延长,细胞的增殖活力呈现出逐步下降的趋势,这表明有部分细胞可能出现了凋亡的情况,见图 3。

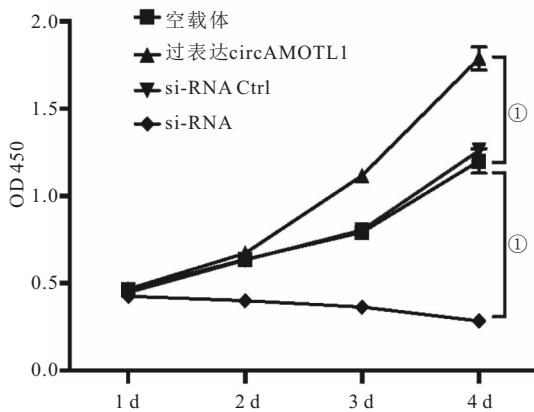


图 3 过表达或沉默 circAMOTL1 后增强 HPCs 的增殖能力

Figure 3 Proliferation ability of hepatic progenitor cells after overexpression or silencing of circAMOTL1

注:两组比较,① $P<0.01$ 。

2.4 过表达 circAMOTL1 后显著提升 HPCs 的迁移能力 过表达 circAMOTL1 后 HPCs 的增殖能力得到了显著提升,为了鉴定过表达 circAMOTL1 后对 HPCs 的迁移能力的影响,本研究进行了细胞划痕实验。实验结果表明过表达 circAMOTL1 之后,细胞的划痕愈合能力增强($P<0.01$,通过 Image J 软件计算过表达 circAMOTL1 后划痕的变化率为 24%,对照组空载体的变化率为 12%),见图 4。

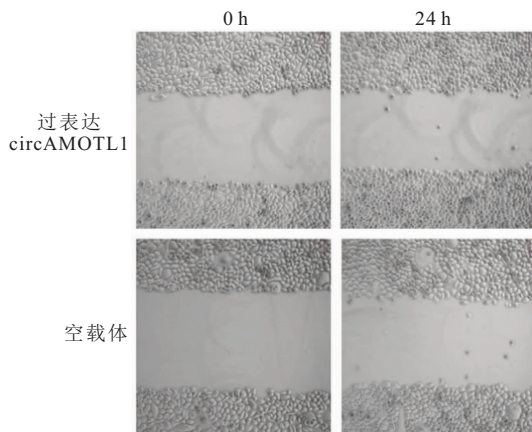


图 4 过表达 circAMOTL1 后细胞划痕实验(100×)

Figure 4 Wound scratch assay after overexpression circAMOTL1

2.5 过表达 circAMOTL1 后 HPCs 表达肝癌干细胞(Liver cancer stem cells, LCSCs)的标志物 CD133 CD133 是公认的 LCSCs 的标志物,肝细胞如果表达 CD133 就说明它具有部分 LCSCs 的特性^[4],根据这一特性,本研究通过蛋白免疫印迹实验检测过表达 circAMOTL1 后 HPCs 是否表达 CD133。结果显示,转染过表达 circAMOTL1 后的第 2 天开始出现 CD133 的表达,且 CD133 的表达水平随着转染时间的延长逐渐增强。表明过表达 circAMOTL1 后,HPCs 开始表现出 LCSCs 的部分特性,同时 HPCs 的标志物 CK7 一直有所表达,也说明 HPCs 的特性并没有随着 circAMOTL1 的表达而消失,见图 5。

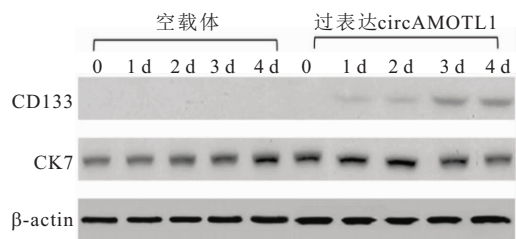


图 5 过表达 circAMOTL1 对 HPCs 中 LCSCs 标志物的影响

Figure 5 Effect of circAMOTL1 overexpression on HCC stem cell markers in hepatic progenitor cells

3 讨论

原发性肝癌是全球第六大确诊癌症和第三大癌症死亡原因^[1]。原发性肝癌的男性患者比女性更常见。原发性肝癌主要的组织学类型是 HCC,约占所有肝癌病例的 75%^[5]。尽管近年来在肝癌的预防、监测、诊断、治疗和多学科协作方面取得了长足进展,但肝癌仍然具有高致死率和高复发率,超过一半的新确诊患者已经是晚期或者不适合手术。HCC 患者死亡主要原因是肿瘤进展、复发、转移和化疗耐药。

HPCs 又称为 HOC,可以在慢性肝损伤时分化为肝细胞和胆管细胞进而促进损伤肝脏的修复^[6]。正常生理状态下几乎观察不到 HPCs,只有在慢性损伤或者炎症状态下,它才被激活。在小鼠动物模型中,HPCs 可以作为 HCC 的祖/干细胞来源^[7]。值得注意的是,将从肝硬化或 HCC 分离出的 HPCs 皮下植入免疫缺陷小鼠体内可以导致肿瘤的发生^[8],但是从非肝硬化或非癌性肝脏分离出的 HPCs 则不会^[9-10]。越来越多的研究表明 HPCs 可能是原发性肝癌的主要细胞来源^[11-13]。但是 HPCs 是如何转化成 LCSCs 的机制目前为止并不十分清楚^[8]。

circRNAs 是一种特殊的非编码 RNA,与传统的线性 RNA 相比,circRNAs 由于其共价闭环状结构,不受 RNA 外切酶的影响,更稳定,更难降解^[14]。

由于 circRNAs 具有很长的半衰期和组织特异性特征,因此其功能十分复杂^[15]。迄今为止, circRNAs 与其线性 mRNA 之间的关系仍存在争议。有研究表明 circRNAs 与亲本 mRNA 竞争^[16],也有研究表明 circRNAs 可以顺式促进亲本基因的转录^[17]。此外,一些 circRNAs 在大脑中具有高度特异性,与其亲本基因产生的线性亚型无关^[18]。近来的研究证实 circRNAs 参与了包括细胞增殖,迁移,凋亡,药物抵抗,肿瘤发生等多种生物学过程^[19-22]。但是目前为止有关 circRNAs 是否参与调节 LCSCs 自我更新的证据很少^[23]。因此 circRNAs 是否可以作为治疗肝癌的一类潜在分子靶标具有十分重要的研究价值。

circAMOTL1 位于人的 11 号染色体上,长度为 922 nt。已有研究证实 circAMOTL1 可以作为一种癌基因参与乳腺癌、前列腺癌和宫颈癌等多个癌症^[3,24-25]。然而 circAMOTL1 是否和 HCC 的发生有关,目前并不十分清楚。

本研究结果显示, circAMOTL1 在肝癌细胞系中的表达水平显著高于正常肝细胞系,这一发现与先前的研究一致,指出 circRNAs 在肿瘤发生和发展中可能扮演重要角色^[1]。此外,本研究还发现过表达 circAMOTL1 能够显著促进 HPCs 的增殖和迁移能力,并诱导其表达 LCSCs 标志物 CD133,这表明 circAMOTL1 可能参与了 HPCs 向 LCSCs 的恶性转化过程。

在肝癌的发展过程中,细胞的增殖和迁移是两个关键的生物学特性。本研究实验数据显示,过表达 circAMOTL1 的 HPCs 显示出增强的增殖能力,这可能与 circAMOTL1 影响细胞周期调控有关。先前的研究表明, circRNAs 可以通过多种机制影响细胞周期相关基因的表达,从而调控细胞增殖^[3,25]。在本研究中,过表达 circAMOTL1 还增强了 HPCs 的迁移能力,这可能是由于 circAMOTL1 影响了与细胞迁移相关的信号通路,如调控上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程或细胞黏附分子的表达^[26-27]。

值得注意的是,本研究还观察到过表达 circAMOTL1 的细胞开始表达 LCSCs 标志物 CD133。CD133 是已知的 LCSCs 标志物,与肿瘤的自我更新能力和化疗抗性密切相关^[4]。这一发现提示 circAMOTL1 可能通过促进 HPCs 获得 LCSCs 特性,从而参与肝癌的发生和发展。然而, circAMOTL1 如何精确调控 LCSCs 特性的分子机制仍需进一步研究。此外,本研究也存在一些局限性。首先,本研究主要基于体外细胞实验,尚未在体内模型中验证 cir-

cAMOTL1 的功能。其次,本研究尚未完全阐明 circAMOTL1 在肝癌发展中的上游调控因子和下游效应基因。未来的研究还需包括体内实验验证和更深入的分子机制探索,以便更好地理解 circAMOTL1 在肝癌中的作用。

4 结论

circAMOTL1 在肝癌的发生和发展中可能起到了关键的促进作用。通过影响 HPCs 的增殖、迁移和恶性转化, circAMOTL1 可能为肝癌的发展提供了一种新的分子机制。因此, circAMOTL1 有潜力成为肝癌诊断和治疗的新的分子靶标。

【参考文献】

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] CONN V M, CHINNAIYAN A M, CONN S J. Circular RNA in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2024, 24(9):597-613.
- [3] SUN Z, NIU S, XU F, *et al.* CircAMOTL1 Promotes Tumorigenesis Through miR-526b/SIK2 Axis in Cervical Cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 568190.
- [4] XIA P, LIU D H. Cancer stem cell markers for liver cancer and pancreatic cancer[J]. Stem Cell Res, 2022, 60: 102701.
- [5] MARQUARDT J U, ANDERSEN J B, THORGEIRSSON S S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(11): 653-667.
- [6] ROSENBERG N, VAN HAELE M, LANTON T, *et al.* Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma derives from liver progenitor cells and depends on senescence and IL-6 trans-signaling [J]. J Hepatol, 2022, 77(6): 1631-1641.
- [7] THORGEIRSSON S S. Stemness and reprogramming in liver cancer[J]. Hepatology, 2016, 63(4): 1068-1070.
- [8] LOBO J, GAMA J, LUIS R, *et al.* Hepatic Progenitor Cells in the Form of Ductular Structures within a GIST Liver Metastasis; Supporting a Putative Role in the Hepatic Metastatic Niche [J]. Pathobiology, 2023, 90(6): 417-421.
- [9] LI X F, CHEN C, XIANG D M, *et al.* Chronic inflammation-elicited liver progenitor cell conversion to liver cancer stem cell with clinical significance [J]. Hepatology, 2017, 66 (6): 1934-1951.
- [10] KHOSLA R, RASTOGI A, RAMAKRISHNA G, *et al.* EpCAM+ Liver Cancer Stem-Like Cells Exhibiting Autocrine Wnt Signaling Potentially Originate in Cirrhotic Patients[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(3): 807-818.
- [11] HOU X J, YE F, LI X Y, *et al.* Immune response involved in liver damage and the activation of hepatic progenitor cells during liver tumorigenesis[J]. Cell Immunol, 2018, 326: 52-59.
- [12] LI X Y, YANG X, ZHAO Q D, *et al.* Lipopolysaccharide promotes tumorigenicity of hepatic progenitor cells by promoting proliferation and blocking normal differentiation [J]. Cancer Lett, 2017, 386: 35-46.
- [13] TUMMALA K S, BRANDT M, TEIJEIRO A, *et al.* Hepato-

- cellular Carcinomas Originate Predominantly from Hepatocytes and Benign Lesions from Hepatic Progenitor Cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(3): 584-600.
- [14] ZHANG X O, WANG H B, ZHANG Y, *et al.* Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*, 2014, 159(1): 134-147.
- [15] SZABO L, SALZMAN J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(11): 679-692.
- [16] XU X, ZHANG J, TIAN Y, *et al.* CircRNA inhibits DNA damage repair by interacting with host gene[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 128.
- [17] LI Z, HUANG C, BAO C, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-264.
- [18] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-490.
- [19] LIU C X, LI X, NAN F, *et al.* Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity[J]. *Cell*, 2019, 177(4): 865-880. e21.
- [20] XIA P, WANG S, YE B, *et al.* A Circular RNA Protects Dormant Hematopoietic Stem Cells from DNA Sensor cGAS-Mediated Exhaustion[J]. *Immunity*, 2018, 48(4):688-701. e7.
- [21] DAI T, QIU S, GAO X, *et al.* Circular RNA circWnk1 inhibits the progression of gastric cancer via regulating the miR-21-3p/SMAD7 axis[J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(3): 974-988.
- [22] LIU D, DONG Y, GAO J, *et al.* Role of the circular RNA regulatory network in the pathogenesis of biliary atresia[J]. *Exp Ther Med*, 2024, 27(3): 95.
- [23] LEE T K, GUAN X Y, MA S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(1): 26-44.
- [24] MA J, FANG L, YANG Q, *et al.* Posttranscriptional regulation of AKT by circular RNA angiomin- like 1 mediates chemoresistance against paclitaxel in breast cancer cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 11369-11381.
- [25] OU R, LV J, ZHANG Q, *et al.* circAMOTL1 Motivates AMOTL1 Expression to Facilitate Cervical Cancer Growth[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 50-60.
- [26] GAO L, SHAO X, YUE Q, *et al.* circAMOTL1L Suppresses Renal Cell Carcinoma Growth by Modulating the miR-92a-2-5p/KLLN Pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9970272.
- [27] 石永杰,陈旖鹏,黄思聪,等. SRPK1 激活 Wnt/ β -catenin 通路促进肝癌细胞上皮间充质转化[J]. *西部医学*, 2023, 35(7): 951-958.

(收稿日期:2024-02-27;修回日期:2024-06-07;编辑:刘灵敏)

(上接第 1564 页)

- [6] YANG M, WANG Y, DU B, *et al.* Clinical phenotypes of euthyroid, hyperthyroid, and hypothyroid thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2023, 261(7): 1995-2002.
- [7] FANG Z J, ZHANG J Y, HE W M. CT features of exophthalmos in Chinese subjects with thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6(2): 146-149.
- [8] 杨梅,王钰娇,何为民. 甲状腺相关眼病的影像学检查[J]. *国际眼科杂志*, 2021, 26(6):1025-1028.
- [9] 杨梅,杜白雪,王钰娇,等. 2170 例眼外肌受累甲状腺相关眼病的临床分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(3):510-515.
- [10] LI Y, MA J, XIAO J, *et al.* Use of extreme gradient boosting, light gradient boosting machine, and deep neural networks to evaluate the activity stage of extraocular muscles in thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2024, 262(1): 203-210.
- [11] 罗耀升,沈洁.《中国甲状腺相关眼病诊断和治疗指南(2022 年)》诊断和内科治疗解读[J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(11):890-892,897.
- [12] BARTLEY G B, GORMAN C A. Diagnostic Criteria for Graves' Ophthalmopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 1995, 119(6): 792-795.
- [13] BARTALENA L, PIANTANIDA E, GALLO D, *et al.* Epidemiology, Natural History, Risk Factors, and Prevention of Graves' Orbitopathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 615993.
- [14] 欧路雨,何为民,王钰娇. 甲状腺相关眼病严重度分级和分期现状及存在的问题[J]. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40(11): 1114-1118.
- [15] WANG Y, DU B, YANG M, *et al.* Peribulbar injection of glucocorticoids for thyroid-associated ophthalmopathy and factors affecting therapeutic effectiveness: A retrospective cohort study of 386 cases[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2031-2038.

(收稿日期:2024-07-14;修回日期:2024-08-11;编辑:刘灵敏)