DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.008

circ－0002133/miR－182/Bcl2L12轴影响细胞凋亡与肝癌发生发展及绞股蓝皂苷的干预作用

王柏山[1],孙小扉[1],杨莹[1],朱敬轩[1],高浩[1],赵宇琪[1],王嘉鑫[1],杨潇[2],崔鹏[1]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属第二医院,辽宁 沈阳 110034)

摘要:目的 探究circ－0002133/miR－182/Bcl2L12轴影响细胞凋亡与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的发生发展及绞股蓝皂苷(gypenosides,GPs)干预作用。方法 在TCGA数据库中获取肝癌相关数据,进行Bcl2样蛋白12(Bcl2 like protein 12,Bcl2L12)的差异分析、生存分析及基因表达与临床相关性分析;分别使用miRanda和targetscan数据库与circAtlas和circRNADisease预测肝癌相关且与Bcl2L12能够建立ceRNA网络的circ－0002133miRNA、miR－182;并采用qRT－PCR进行临床标本验证;再将HepG2肝癌细胞予以GPs干预后,CCK－8法检测GPs对HepG2细胞抑制率,划痕实验观察细胞迁移能力;qRT－PCR检测细胞Caspase－3、Caspase－7、Bcl2L12 mRNA表达;Western Blot法检测细胞Caspase－7、Caspase－3、Bcl2L12蛋白表达。结果 TCGA数据库结果显示,Bcl2L12在LIHC组织中表达显著升高,高Bcl2L12与年龄、性别和TNM分期异常相关,高Bcl2L12 HCC患者的生存时间比低Bcl2L12 HCC患者短;与癌旁组比较,肝癌组circ－0002133 mRNA降低($P<0.01$),miR－182、Bcl2L12 mRNA升高($P<0.01$);划痕实验结果表明,与Control组相比,GPs组对HepG2肝癌细胞有明显的抑制作用;与Control组比较,GPs组细胞中Caspase－7、Caspase－3 mRNA升高($P<0.01$),Bcl2L12 mRNA降低($P<0.01$);与Control组比较,GPs组细胞中Caspase－7、Caspase－3蛋白水平升高($P<0.01$),Bcl2L12蛋白水平降低($P<0.01$)。结论 GPs可以抑制肝癌细胞的增殖,其作用机制可能与circ－0002133/miR－182/Bcl2L12轴介导细胞凋亡途径有关。

关键词:绞股蓝皂苷;肝癌;circRNA;miR－182;细胞凋亡
中图分类号:R273.357;R282.71 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0035-08

Circ－0002133/miR－182/Bcl2L12 Axis Influences Apoptosis and Development of Liver Cancer and Intervention of Gypenosides

WANG Baishan[1],SUN Xiaofei[1],YANG Ying[1],ZHU Jingxuan[1],GAO Hao[1],ZHAO Yuqi[1],WANG Jiaxin[1],YANG Xiao[2],CUI Peng[1]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110034,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To explore the effect of circ－0002133/miR－182/Bcl2L12 axis on cell apoptosis and the occurrence and development of hepatocellular carcinoma(HCC) and the intervention of gypenosides(GPs). *Methods* The relevant data of liver cancer were obtained from TCGA database, and the difference analysis, survival analysis, gene expression and clinical correlation analysis of Bcl2 like protein 12(Bcl2L12) were performed. Circ－0002133miRNA and miR－182, which were associated with circAtlas and circRNADisease and were able to establish ceRNA networks with BCL2L12, were respectively predicted using miRanda and targetscan databases. The clinical specimens were verified by qRT－PCR. HepG2 hepatoma cells were then interfered with by GPs, the inhibition rate of GPs on HepG2 cells was detected by CCK－8 method, and the migration ability of HepG2 cells was observed by scratch test. The mRNA expressions of Caspase－3, Caspase－7 and Bcl2L12 were detected by qRT－PCR. The expressions of Caspase－7, Caspase－3 and Bcl2L12 were detected by Western Blot. *Results* The results of TCGA database showed that the expression of Bcl2L12 was significantly increased in LIHC tissues, and high Bcl2L12 was associated with abnormal age, sex and TNM stage. The survival time of high Bcl2L12 HCC patients was shorter than that of low Bcl2L12 HCC patients. Compared with paracuncinoma group, circ－0002133 mRNA decreased($P<0.01$), while miR－182 and Bcl2L12 mRNA increased($P<0.01$). The scratch test results showed that compared with the control group, GPs group had

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274455);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk－2023034)
作者简介:王柏山(1975－),男,辽宁葫芦岛人,主任技师,硕士,研究方向:中西医结合基础。
通讯作者:杨潇(1981－),女,辽宁大连人,主任医师,博士,研究方向:中医药防治代谢性疾病。E-mail:17924948@qq.com。
崔鹏(1981－),男,辽宁沈阳人,讲师,硕士,研究方向:中西医结合临床。E-mail:29099778@qq.com。

obvious inhibitory effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Compared with those of the control group, the mRNA levels of Caspase-7 and Caspase-3 in GPs group were increased ($P<0.01$), and the mRNA levels of Bcl2L12 were decreased ($P<0.01$). Compared with those of the control group, the protein levels of Caspase-7 and Caspase-3 in GPs group were increased ($P<0.01$), and the protein levels of Bcl2L12 were decreased ($P<0.01$). *Conclusion* GPs can inhibit the proliferation of hepatoma cells, and the mechanism of action may be related to the apoptosis pathway mediated by circ-0002133/miR-182/Bcl2L12 axis.

Keywords: gypenosides; HCC; circRNA; miR-182; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内最常见的癌症之一[1-2]。这种恶性肿瘤每年导致很大比例的癌症相关死亡,特别是在中国[3]。在过去的几十年里,肝癌的治疗取得了很大的进展,主要的治疗方法包括治疗性切除和化疗。然而,由于肿瘤复发转移频率高,HCC 患者的 5 年生存率仍然很低,每年约有 60 万 HCC 患者死亡[1,4-5]。因此,这些严峻的挑战使得寻找新的 HCC 诊断生物标志物和确定有效的治疗靶点变得非常迫切。最近的研究表明,环状 RNA(circular RNA, circRNA)在许多癌症的发生和进展中起着至关重要的作用,并具有良好的预后和治疗潜力[6-7]。据报道,circRNAs 通过充当微小 RNA(microRNA, miRNA)海绵或调节其同源 mRNA 的基因转录来发挥其功能[8-9]。然而,circRNA 在 HCC 中的表达谱和潜在的分子机制在很大程度上仍然未知。阐明 circRNA 及其与 miRNA 联合作用理解 HCC 的发病机制和识别潜在的新生物标志物或治疗靶点至关重要。

肝癌因肿瘤进展过快,有着高复发和高转移率,多数患者在中、晚期阶段接受治疗,预后相对较差[10]。而作为我国传统医学,中医有着整体观念和辨证论治的理论优势,对 HCC 的治疗有独到的见解。中医将肝癌归于“胁痛”“积聚”“黄疸”“臌胀”等范畴,认为肝癌发病的基本前提是正气亏虚,则内外之邪损伤机体,引起脏腑功能失调,气血津液失去固摄,痰、湿、热、瘀、毒结聚于内,聚之不散,故而发之为病[11]。中药对减轻肝癌患者的临床症状,提高患者的生存质量和免疫功能、预防复发和转移都具有重要作用[12]。根据肝癌的中医病机可知,具有健脾益气、燥湿化痰、清热解毒的中药将对肝癌有较好的疗效。而绞股蓝是我国传统中药材,有清热解毒、益气健脾作用,其主要成分群是绞股蓝皂苷(gypenosides, GPs)。现代药理实验发现,GPs 具有抗癌、抗氧化、降血糖、降血脂、抗血栓、保肝以及增强免疫力等作用[13]

近年来研究发现,Bcl-2 家族蛋白中的 Bcl2 样蛋白 12(Bcl2 like protein 12, Bcl2L12),与原型 Bcl-2 家族成员不同,由于其对细胞死亡信号的独特影响,Bcl2L12 表型具有高级别影响凋亡倾向[14-15]。课题组前期研究发现,GPs 可影响 Bcl2L12 介导的细胞凋亡进而缓解肝脏脂质沉积作用[16],而肝脏脂代谢异常与肝癌的发生发展密不可分,那么课题组提出是否 GPs 能够通过影响 Bcl2L12 及上游调控机制发挥抗肝癌的作用。由此,本研究旨在探究 circRNA-miRNA-mRNA 轴与细胞凋亡对肝癌发生发展的影响以及绞股蓝皂苷对其的干预作用。

1 材料与方法

1.1 Bcl2L12 的差异分析、生存分析及基因表达与临床相关性分析 为了测试 Bcl2L12 是否与 HCC 相关,首先在 TCGA 数据库中检索肝癌患者相关数据集,包含 374 例原发性肝癌组织(LIHC)和 50 例非肿瘤组织。剔除将年龄、性别、分期、转移等缺失对应数据的病例。将获得的数据中的临床数据部分导入 R 3.6.3 软件中,应用“limma”“beeswarm”及“survival”程序集对 Bcl2L12 表达进行差异分析、生存分析,以及对高表达 Bcl2L12 与年龄、性别和 TNM 分期的相关性进行分析。

1.2 ceRNA 网络构建 首先,我们使用 miRanda 和 targetscan 数据库预测了前 10 个结合 BCL2L12 的 miRNA。然后使用 circAtlas 和 circRNADisease 预测了肝癌中可以与上述 miRNA 结合的 circRNA。最后,用 cytoscape 软件绘制 ceRNA 网络图。

1.3 肝细胞癌样本采集 收集 2020 年 6 月—2021 年 4 月期间在辽宁省肿瘤医院肝胆普外科确诊并接受外科手术治疗的肝癌患者 9 例,其中 HCC 组织和对应癌旁组织新鲜样本 9 对,分别取材于肝癌及距肿瘤 2 cm 的非肿瘤肝组织,置于液氮保存,分为癌旁组与肝癌组进行后续实验。9 例肝癌患者中,男 5 例,女 4 例,年龄 42~71 岁,中位年龄 56 岁,按照 Edmondson-Steiner 标准,Ⅰ+Ⅱ、Ⅲ+Ⅳ级分别有 4、5 例,所有患者术前均未接受放、化疗等抗肿瘤治疗,治疗方式均为根治性手术切除。本研究通过辽宁省肿瘤医院伦理委员会批准,伦理审批号:20220661。

1.4 药物 GPs,西安天丰生物科技有限公司(批号:NF-201910),提取来源为绞股蓝,纯度 98%,规格 UV98%。

1.5 主要试剂及仪器 cDNA 反转录试剂盒(批号:W0008,北京天根生化科技有限公司);qRT-PCR 试剂盒(批号:962103H27W36,武汉爱博泰克生物科技有限公司);miRNA cDNA Synthesis Kit、miRNA qPCR Assay Kit(康为世纪生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:20210425,杭州弗德生物科技有限公司);Caspase-7 一抗(批号:9492S)、Caspase-3 一抗(批号:9662S),均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;Bcl2L12 一抗(批号:AB11305623,北京博奥森生物技术有限公司);GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);兔二抗(批号:SE134,北京索莱宝科技有限公司)。全自动生化分析仪(型号:7180 型,日本日立公司);PCR 扩增仪(型号:QuantStudio 3,美国 Applied Biosystems 公司);电泳仪(型号:PowerPac1645050,美国 Bio-rad 公司);转膜仪(型号:Trans-Blot Turbo1704150,美国 Bio-rad 公司);显影仪(型号:Tanon-5200,上海天能科技有限公司)。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测肝癌组织 circ-0002133、miR-182、Bcl2L12 mRNA 表达 Trizol 处理各组肝脏组织,用 miRNeasyMinii 试剂盒提取各组肝脏组织总 RNA,按 miScript Ⅱ RT 试剂盒说明进行基因组 DNA 去除后反转录,按 miScript SYBR Green PCR 试剂盒配制扩增反应体系后进行 40 个循环的扩增

反应。结果相对定量分析采用△△Ct 法,最后使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行定量分析。实验所需引物序列见表 1。

1.7 细胞培养、传代及分组 HCC 细胞系(HepG2)购自美国菌种保藏中心(ATCC),在添加 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 5% CO_2 培养箱中 37 ℃培养。观察细胞贴壁生长至 80% ~90%,将细胞培养液倒入废液缸,沿着瓶身侧面加入少量的 PBS,轻轻晃动瓶身使 PBS 充分接触细胞,冲洗后将 PBS 倒入废液缸,剩余的少量 PBS 用枪吸干净,重复 3 次;加入 1 mL 胰蛋白酶消化,镜下观察细胞加入 3 mL 培养液终止消化,反复吹打瓶底和细胞,使其充分悬浮并吸取到离心管中。在 1000 r/min 条件下离心 3 min,弃上清,加入适量完全细胞培养液,混匀细胞完成细胞传代。细胞分为 Control 组与 GPs 组,肝癌细胞加入完全 DMEM 培养基,GPs 组用 250 μg/mL 含药培养基培养。

1.8 CCK-8 法检测 GPs 对 HepG2 细胞抑制率并筛选药物浓度 制备 HepG2 细胞悬液,在 96 孔板中接种细胞悬液,每孔约 200 mL,每孔细胞数≥1×10^5 个,每组设置 6 个复孔。待细胞贴壁后,分别于 12、24、48 h 在每孔加入 10 mL CCK-8 检测液,培养板放入培养箱中预培养 2 h(37 ℃, 5% CO_2)。用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值,根据 OD 值计算细胞抑制率。细胞活力% =(OD 加药组 - OD 空白组)/(OD 对照组 - OD 空白组)×100%;细胞抑制率% = 1 - 细胞活力。根据结果计算 IC_{50} 并筛选药物浓度。

1.9 划痕实验测各组细胞迁移能力 通过胰酶消化细胞 1 ~ 2 min,加入培养基终止消化反应,然后轻轻吹打混匀细胞,将细胞均匀种于 6 孔板。将细胞置于含 5% CO_2 的 37 ℃温箱中孵育至贴壁后。用无菌移液管尖刮花。PBS 洗涤后,细胞根据不同分组加入不同培养基中孵育。在相差显微镜下获得 0、12、24 h 的图像。创面愈合百分率的测定方法为:[1 -(空区 X h/空区 0 h)]×100% 计算。

1.10 qRT-PCR 检测各组细胞中 Caspase-3、Caspase-7、Bcl2L12 mRNA 表达 采用 qRT-PCR 法检测 RNA 表达。用 miRNeasyMinii 试剂盒提取各组肝脏组织总 RNA,按 miSeript Ⅱ RT 试剂盒说明进行基因组 DNA 去除后反转录,按 miSeript SYBR Green PCR SYBRGreenMaterMix 试剂盒配制扩增反应体系后进行 40 个循环的扩增反应。用 TRIzol 试剂(Invitrogen)按照说明书进行 HepG2 细胞的 RNA 提取。然后,遵循逆转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录成 cDNA。并分别检测待测基因的 mRNA 水平,在以下反应体系中扩增:95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共 40 次循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min。结果相对定量分析采用△△Ct 法,然后使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行定量分析。实验所需引物序列见表 1。

1.11 Western Blot 法检测各组细胞 Caspase-7、Caspase-3、Bcl2L12 蛋白表达 PBS 分别清洗各组细胞 3 次,蛋白裂解液适量加入各培养瓶中,冰上裂解 30 min;多次吹打后转移至 1.5 mL 离心管中,于 4 ℃,12 500 r/min 离心 15 min。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定 HepG2 细胞蛋白浓度。首先将蛋白变性,后在泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,遵循比例配制一抗,4 ℃封闭过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗。配制化学发光液,将膜放在曝光板上,膜上滴适量的发光液,进行曝光。显影和定影后利用凝胶自动分析成像软件扫描分析结果,以 GAPDH 为内参照,对蛋白条带进行分析。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列
miR-182	5′-TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT-3′
U6	5′-CGCTTCGGAGCACATATAC-3′
circ-0002133	F:5′-CCTTGTTTCAGGGTTCATAGTGGCG-3′
	R:5′-AGACCCTCTGGGCACAGGACAAC-3′
Caspase-7	F:5′-GTTTTCCCAAAGCTGCCCTC-3′
	R:5′-GCACAGTCCTGATCATCGGT-3′
Caspase-3	F:5′-GAGCTTGGAACGGTACGCTA-3′
	R:5′-GAGTCCACTGACTTGCTCCC-3′
Bcl2L12	F:5′-CTGGCCCAGCCTCTTCC-3′
	R:5′-GCACAGTCCTGATCATCGGT-3′
GAPDH	F:5′-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′
	R:5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′

1.12 统计学方法 所有结果均为至少 3 个独立实验的平均值 ± 标准差。应用 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析,采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bcl2L12 基因在 HCC 中表达情况差异及预后分析 TCGA 数据库结果显示,Bcl2L12 在 LIHC 组织中表达显著升高(插页Ⅻ图 1A)。在临床上,高 Bcl2L12 与年龄、性别和 TNM

表 2 Bcl2L12 基因表达与肝细胞癌多重分析

临床特征	总数/(例)	P 值
年龄	370	0.048
性别(男 vs 女)	401	0.037
分期	347	0.035
Ⅱ vs Ⅰ	257	0.009
Ⅲ vs Ⅰ	256	0.072
Ⅳ vs Ⅰ	176	0.527
Ⅲ vs Ⅱ	171	0.481
Ⅳ vs Ⅱ	91	0.192
Ⅳ vs Ⅲ	90	0.306
G	366	1.033 e-04
G2 vs G1	232	0.159
G3 vs G1	177	8.993 e-04
G4 vs G1	67	0.004
G3 vs G2	299	0.001
G4 vs G2	189	0.007
G4 vs G3	134	0.115
T	368	0.011
T2 vs T1	275	0.021
T3 vs T1	261	0.056
T4 vs T1	194	0.069
T3 vs T2	174	0.782
T4 vs T2	107	0.022
T4 vs T3	93	0.026
N		
N1 vs N0	256	0.868
M		
M1 vs M0	270	0.608

分期异常相关(表 2)。高 Bcl2L12 HCC 患者的生存时间比低 Bcl2L12 HCC 患者短(插页Ⅻ图 1B)。

2.2 ceRNA 网络 miRanda 和 targetscan 数据库预测了前 10 个结合 BCL2L12 的 miRNA;circAtlas 和 circRNADisease 预测了 13 个与 miRNA 结合的 circRNA;cytoscape 软件绘制 ceRNA 网络图如插页Ⅻ图 2 所示。

2.3 临床肝癌组织 circ－0002133、miR－182、Bcl2L12 mRNA 表达水平 与癌旁组比较,肝癌组 circ－0002133 mRNA 降低($P<0.01$);miR－182、Bcl2L12 mRNA 升高($P<0.01$)。见图 3。

2.4 不同浓度 GPs 对 HepG2 细胞活力的影响 CCK－8 法检测不同时间内(12、24、48 h) GPs 对细胞活力的影响。与 Control 组相比,GPs 组细胞活力明显降低,且 250 μL/mg GPs 干预 24 h 后,抑制细胞活力效果最好。见插页Ⅻ图 4。

2.5 GPs 对 HepG2 细胞迁移能力的影响 划痕实验结果表明,与 Control 组相比,GPs 组对 HepG2 肝癌细胞有明显的抑制作用。见插页Ⅻ图 5。

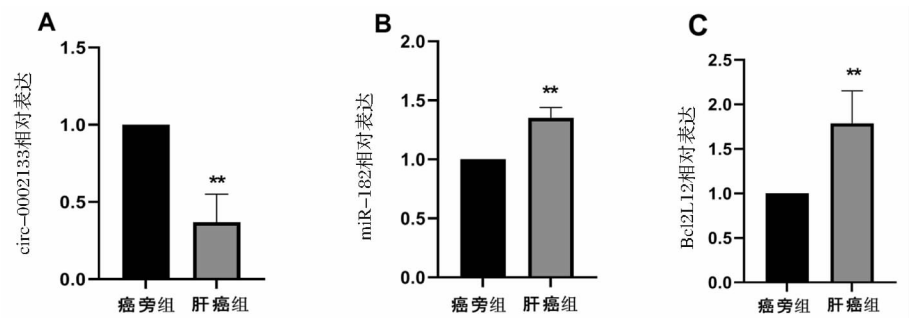
2.6 各组细胞中 Caspase－7、Caspase－3、Bcl2L12 mRNA 表达水平 与 Control 组比较,GPs 组细胞中 Caspase－7、Caspase－3 mRNA 升高($P<0.01$),Bcl2L12 mRNA 降低($P<0.01$)。见图 6。

2.7 各组细胞中 Caspase－7、Caspase－3、Bcl2L12 蛋白表达水平 与 Control 组比较,GPs 组细胞中 Caspase－7、Caspase－3 蛋白水平升高($P<0.01$),Bcl2L12 蛋白水平降低($P<0.01$)。见图 7。

3 讨论

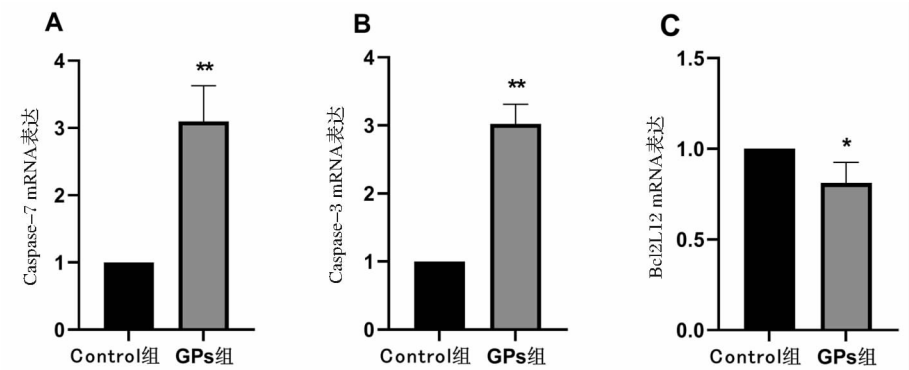
据 2020 年的估计,HCC 是第六大最常诊断的癌症,也是第三大最常见的癌症死亡原因,同时也是癌症导致过早死亡的第二大常见原因[17]。大量研究在 HCC 患者的组织和血清等中发现,miRNA 存在异常表达,这对 HCC 的诊断、治疗及预后,尤其通过其作用的靶基因对调节临床靶向药有着重要意义[18]。而由于共价环结构,circRNA 比线性 RNA 更稳定,并且能够抵抗外核溶解性 RNA 衰变[19]。新出现的证据表明,环状 RNA 可能在许多疾病中发挥重要作用,因为其进化的保守性和在生物体中的丰度,也使其有希望成为包括癌症在内的疾病诊断生物标志物[20－21]。

circRNAs 是一类新的调节性非编码 RNA(Non－coding RNA,ncRNA)分子,它们是由特定外显子的环状化产生的,因此具有共价闭环结构,这意味着它们没有 5′到 3′极性和 Poly(A)尾巴[9,22]。高通量 RNA 测序(RNA－seq)和新型生物信息学工具的改进已经实现在各种生物体中鉴定数千种 circRNAs。因其在与 miRNA 功能发挥作用中充当 miRNA 海绵起到调节作用,信号通路中 circRNA－miRNA－mRNA 轴的失调与几种癌症类型有关。例如,circPLEKHM3 在卵巢癌中通过调控 miR－9/BRCA1/DNAJB6/KLF4/AKT1 轴发挥抑瘤作用[23]。在 HCC 中,一些研究也揭示了大量 circRNA 的存在,它们作为 miRNA 的有效海绵,与 miRNA 相互作用,调节基因表达。环状 RNA circMTO1 作为 miRNA－9 的海绵抑制 HCC 进展[24]。SOX9 诱导的环状 RNA circ－FOXP1 通过海绵 miR－875－3p 和 miR－421 促进肝细胞癌的进展[25]。miRNA 的失调和功能



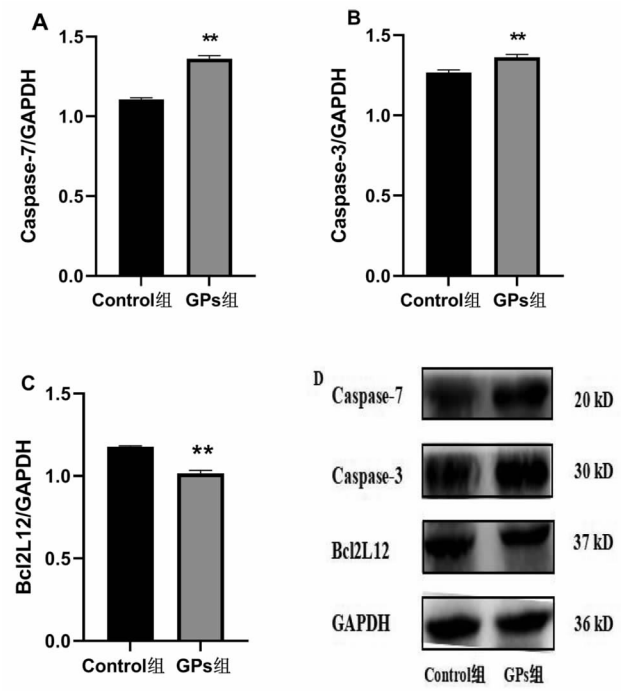
注:* * 与癌旁组比较,$P<0.01$($n=9$)。

图 3 各组 circ－0002133、miR－182、Bcl2L12 mRNA 表达水平



注:* 与 Control 组比较,$P<0.05$;* * 与 Control 组比较,$P<0.01$($n=3$)。

图 6 各组 Caspase－7、Caspase－3、Bcl2L12 mRNA 表达水平



注：* * 与 Control 组比较，$P<0.01$（$n=3$）。

图 7 各组细胞 Caspase－7、Caspase－3、Bcl2L12 蛋白表达水平

在几乎所有生物过程中都得到了广泛的研究，然而，新发现的 circRNAs 在 HCC 中特异性生物活性的表达谱和功能仍需进一步研究。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子，它们在动植物中参与转录后基因表达调控，在发育和病理过程中至关重要。早有研究发现 miRNA 是癌症生物学中潜在的诊断及预后的重要生物标志物。而最近越来越多的证据表明 miR－182 参与癌症的发生和发展，包括促进细胞增殖、血管生成、侵袭以及各种癌症类型的远处转移。相关实验结果表明 miR－182 表达升高在人类 HCC 组织和癌细胞系中非常常见[26]。且研究结果表示。肝癌小鼠肝脏中存在差异表达的 miRNA，其中以 miR－182－5p 的表达增加差异最为显著[27]。miR－182 在多种肿瘤中异常表达，并与肿瘤转移密切相关[28－30]。miR－182 下调转移抑制因子 1（MTSS1）参与肝细胞癌（HCC）的转移[31]。鉴于 miR－182 现已被证明在胶质瘤中靶向 Bcl2L12[32]，并且 Bcl2L12 可以在线粒体后效应物 Caspase－3/7 激活水平上抑制细胞凋亡，这一过程不同于之前肝癌的线粒体凋亡。因此，在以上研究的基础上，我们将关注点放在了这一调控机制是否能对肝癌的发生发展产生影响。

Bcl2L12 具有与 Caspase－7 相互作用和中和的能力，可以在 Caspase－3/7 激活的水平上抑制线粒体后凋亡信号通路[33]。细胞凋亡是细胞程序性死亡，是多细胞生物维持体内平衡的重要自我调节机制。在肝癌疾病中，细胞增殖和凋亡的失调经常发生并导致恶性表型[34]，因此对通路的调控，是抗癌的关键分子机制。线粒体介导的细胞凋亡是细胞凋亡的两大途径之一，主要通过细胞色素 c 的传递和 Caspase－9 的激活来调控，Caspase－9 切割下游 Caspase－3 和 Caspase－7 进一步导致细胞凋亡。而国外研究发现[31]，Bcl2L12 表达不影响 CytC 的释放或 Caspase－9 的激活，而是通过直接抑制 Caspase－7 活化以及上调 Caspase－3 特异性抑制剂 αB－晶体蛋白，间接抑制 Caspase－3 活化，致使线粒体能量障碍，细胞死亡途径从凋亡转向坏死。大量研究表明，中药及有效成分可通过线粒体依赖途径诱导癌细胞凋亡。而绞股蓝（gynostemma pentaphyllum）是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物，除五加科植物外，其是含有人参皂苷成分的植物资源之一[35]。绞股蓝是我国中医传统药材，据《本草纲目》记载其有清热解毒、益气健脾、生津止渴和化浊降脂等功效。绞股蓝含有多种化学成分，包含皂苷类、黄酮类、多糖类、氨基酸类及微量元素等，其主要的活性成分是 GPs 和黄酮[36]。此外，有研究表示 GPs 水解物可显著抑制离体培养的人非小细胞肺癌 A549 细胞和人肝癌 Hep3B 细胞的增殖[37]。

因此，本研究以 circ－0002133/miR－182/Bcl2L12 轴为切入点，进一步探究其介导的细胞凋亡对 HCC 的影响及 GPs 对其的干预作用。我们的实验结果表明，肝癌组织中 circ－0002133 mRNA 降低；miR－182、Bcl2L12 mRNA 升高，证明在肝癌疾病中 circ－0002133 可能通过充当 miR－182 海绵或调节其同源 mRNA 的基因转录来发挥其功能，进而调控其下游靶基因 Bcl2L12。HepG2 细胞中，经 GPs 给药后，其 Caspase－7、Caspase－3 mRNA 及蛋白水平升高，Bcl2L12 mRNA 及蛋白水平降低，证实 GPs 可能通过抑制 Bcl2L12 对 Caspase－7 和 Caspase－3 线粒体后效应激活的抑制作用，进而促进癌症细胞的凋亡。

综上所述，GPs 可以改善肝癌的发生与发展，其作用机制可能与 circ－0002133/miR－182/Bcl2L12 轴介导细胞凋亡途径有关。本研究首次证明了 circ－0002133/ miR－182 可能是治疗肝癌的潜在靶点并在肿瘤的诊断和预后中具有巨大潜能。而 GPs 可通过对该轴介导的细胞凋亡途径，进一步干预肝癌的治疗与预后。

参考文献

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2015, 65(2): 87－108.
[2] YANG J D, ROBERTS L R. Hepatocellular carcinoma: a global view [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(8): 448－458.
[3] JEMAL A, BRAY E, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69－90.
[4] EL－SERAG H B. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118－1127.
[5] HAO K, LUK J M, LEE N P, et al. Predicting prognosis in hepatocellular carcinoma after curative surgery with common clinicopathologic parameters[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 389.
[6] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis[J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981－984.
[7] ZHANG S J, CHEN X, LI C P, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in dia-

betes retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(14): 6500 - 6509.

[8] CHEN L, ZHANG S, WU J, et al. circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR - 29 family[J]. Oncogene, 2017, 36(32): 4551 - 4561.

[9] ASHWAL - FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre - mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2014, 56(1): 55 - 66.

[10] SIMPSON H N, MCGUIRE B M. Screening and detection of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Liver Dis, 2015, 19 (2): 295 - 307.

[11] LI Y C, ZHANG H X. Research overview on the mechanism of traditional Chinese medicine in preventing and treating liver cancer[J]. Pract Tradit Chin Intern Med, 2023, 37(2): 12 - 14.

[12] HU B, AN H M, WANG S S, et al. Preventive and therapeutic effects of Chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma[J]. Molecules, 2016, 21(2): 142.

[13] YU W, ZHANG B, ZHANG X, et al. Protective Effect of gypenoside on peripheral nerve toxicity induced by oxaliplatin in rats and lts mechanism[J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 30(10): 1782 - 1786.

[14] CHERNOVA O, COWELL J K. Molecular definition of chromosome translocations involving 10q24 and 19q13 in human malignant glioma cells[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1998, 105(1): 60 - 68.

[15] MAGNANI I, CHIARIELLO E, CONTI A M, et al. A recurrent 19q11 - 12 breakpoint suggested by cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization analysis of three glioblastoma cell lines[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1999, 110(2): 82 - 86.

[16] ZHAO Z, GAO H, YANG Y, et al. Gypenosides improve liver lipid deposition in ApoE - / - AS mice by inhibiting the Bcl2L12 apoptosis pathway[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2023, 43(10): 1221 - 1227.

[17] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. J Hepatol, 2022, 77(6): 1598 - 1606.

[18] ZHAO J Y, WANG Y H, SU H H, et al. Non - coding RNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma - a systematic review[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2021, 45(6): 101736.

[19] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441): 333 - 338.

[20] BAHN J H, ZHANG Q, LI F, et al. The landscape of microRNA, Piwi - interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 221 - 230.

[21] CHEN L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(4): 205 - 211.

[22] WILUSZ J E, SHARP P A. Molecular biology: A circuitous route to noncoding RNA[J]. Science, 2013, 340(6131): 440 - 441.

[23] ZHANG L, ZHOU Q, QIU Q Z, et al. CircPLEKHM3 acts as a tumor suppressor through regulation of the miR - 9/BRCA1/DNAJB6/KLF4/AKT1 axis in ovarian cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 144.

[24] HAN D, LI J X, WANG H M, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA - 9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. Hepatology, 2017, 66(4): 1151 - 1164.

[25] WANG W, LI Y, LI X L, et al. Circular RNA circ - FOXP1 induced by SOX9 promotes hepatocellular carcinoma progression *via* sponging miR - 875 - 3p and miR - 421[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109517.

[26] HU J W, WANG Z Y, WANG J J, et al. microRNA - 182 promotes cell migration by targeting programmed cell death 4 in hepatocellular carcinoma cells[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 9159 - 9167.

[27] JIANG Y, CHEN J H, YUE C, et al. The role of miR - 182 - 5p in hepatocarcinogenesis of trichloroethylene in mice[J]. Toxicol Sci, 2017, 156(1): 208 - 216.

[28] LIU Z J, LIU J S, SEGURA M F, et al. miR - 182 overexpression in tumourigenesis of high - grade serous ovarian carcinoma[J]. J Pathol, 2012, 228(2): 204 - 215.

[29] KONG W Q, BAI R, LIU T, et al. microRNA - 182 targets cAMP - responsive element - binding protein 1 and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma[J]. FEBS J, 2012, 279(7): 1252 - 1260.

[30] SUN Y H, FANG R, LI C G, et al. Hsa - mir - 182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396 (2): 501 - 507.

[31] WANG J, LI J W, SHEN J L, et al. microRNA - 182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 227.

[32] JIANG L L, MAO P, SONG L B, et al. miR - 182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival [J]. Am J Pathol, 2010, 177(1): 29 - 38.

[33] STEGH A H, KIM H, BACHOO R M, et al. Bcl2L12 inhibits post - mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma[J]. Genes Dev, 2007, 21(1): 98 - 111.

[34] SCHATTENBERG J M, SCHUCHMANN M, GALLE P R. Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(Suppl 1): 213 - 219.

[35] WANG J, YANG J L, ZHOU P P, et al. Further new gypenosides from Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(29): 5926 - 5934.

[36] XIE Z H, HUANG H Q, ZHAO Y, et al. Chemical composition and anti - proliferative and anti - inflammatory effects of the leaf and whole - plant samples of diploid and tetraploid *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino[J]. Food Chem, 2012, 132(1): 125 - 133.

[37] LI N, WU C F, XU X Y, et al. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Eur J Med Chem, 2012, 50: 173 - 178.

circ－0002133/miR－182/Bcl2L12 轴影响细胞凋亡与肝癌发生发展及绞股蓝皂苷的干预作用

（正文见 35－40 页）

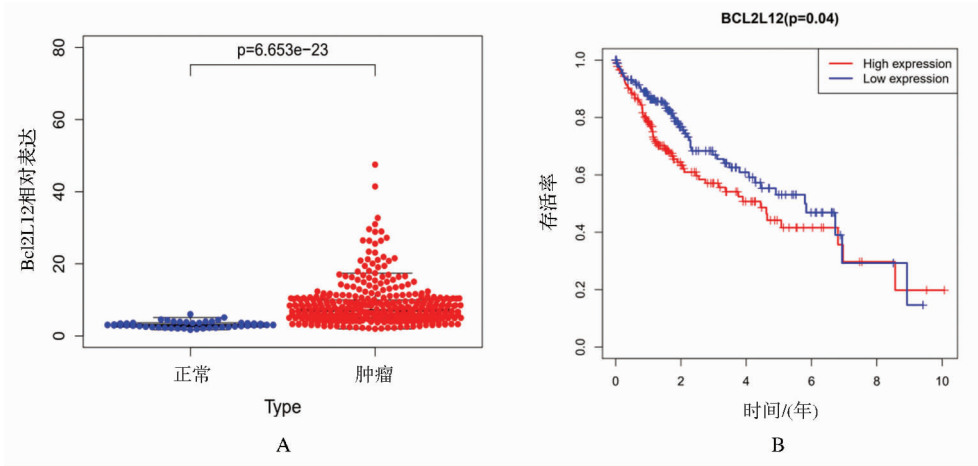


图 1　Bcl2L12 基因在 HCC 中表达差异（A）及生存分析（B）

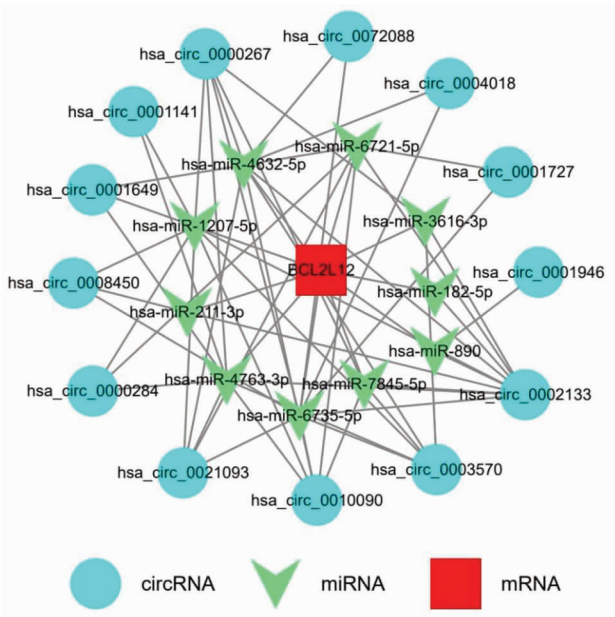


图 2　ceRNA 网络构建

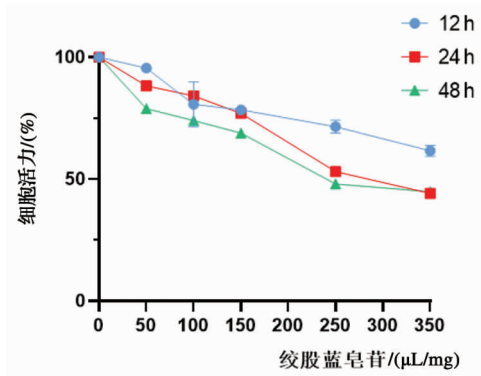


图 4　不同浓度绞股蓝皂苷对 HepG2 细胞活力影响

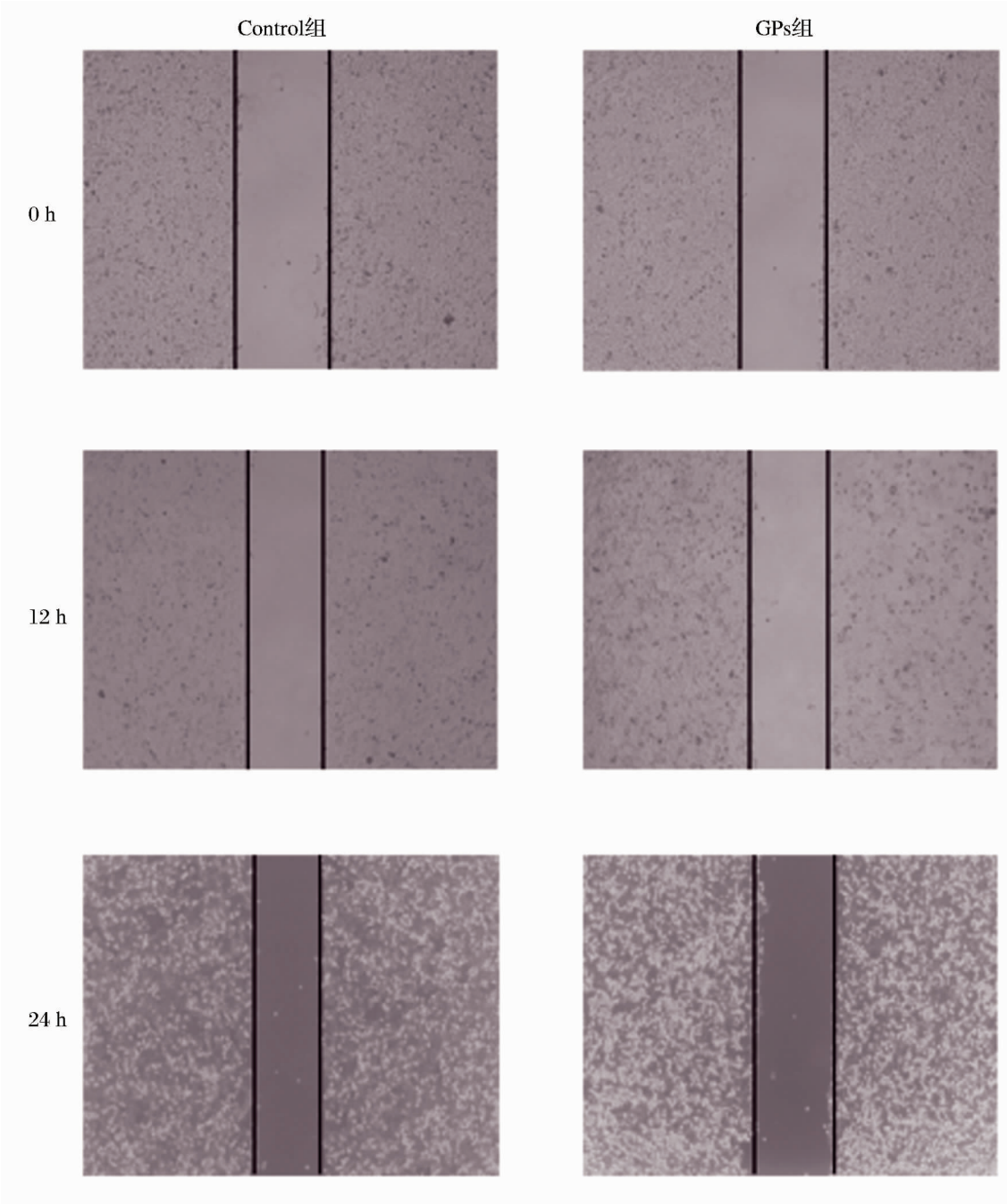


图 5 GPs 对各组细胞迁移能力的影响