

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.05.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250211.0958.004\(2025-02-11\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250211.0958.004(2025-02-11))

## circVAPA 通过 miR-101a-3p/TEAD3 轴促进 Hippo 通路抑制肝再生的机制研究\*

赵 健<sup>1</sup>, 代云红<sup>2</sup>, 党彦丽<sup>3△</sup>

(1. 云南大学附属医院普外二科, 昆明 650021; 2. 云南大学附属医院急诊医学部, 昆明 650021; 3. 云南省第一人民医院产科, 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨环状 RNA(circ)VAPA 通过 miR-101a-3p/TEAD3 轴促进 Hippo 通路抑制肝再生的分子机制。**方法** 构建 70% 肝切除再生小鼠模型, 分析 circVAPA、miR-101a-3p、TEAD3 表达; 利用 siRNA 或过表达质粒转染小鼠胚胎肝细胞 BNL CL<sub>2</sub> 细胞, 分为 VAPA-NC 组、VAPA-NC + miR-101a-3p mimic 组、VAPA-NC + miR-101a-3p mimic-NC 组、VAPA-OE 组、VAPA-OE + miR-101a-3p mimic 组和 VAPA-OE + miR-101a-3p mimic-NC 组。CCK-8 法和流式细胞术分析肝细胞增殖、凋亡和细胞周期变化, 免疫荧光染色分析 YAP1 核移位, 实时荧光定量逆转录-PCR(qRT-PCR) 分析 Hippo 通路关键基因表达, 双荧光素酶报告基因实验验证 circVAPA 与 miR-101a-3p、miR-101a-3p 与 TEAD3 的靶向关系。**结果** 肝再生过程中 circVAPA 水平逐渐升高( $P < 0.05$ ), miR-101a-3p 则先升高后下降( $P < 0.05$ )。miR-101a-3p 过表达时细胞增殖速率最高( $P < 0.05$ ), 但不影响细胞凋亡率( $P > 0.05$ ); 过表达 circVAPA 对增殖速率和细胞凋亡无影响( $P > 0.05$ ), 同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时细胞增殖速率明显下降, 而细胞凋亡明显增加( $P < 0.05$ ); 过表达 miR-101a-3p 时细胞大量进入 S 期, 同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时细胞大量阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期。Hippo 上游基因 YAP1 磷酸化水平在肝再生 6 h 明显升高( $P < 0.05$ ), 随后快速下降, 但过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 不影响 p-YAP1 水平和 YAP1 核移位情况( $P > 0.05$ )。Hippo 下游基因 CTGF 和转录因子 TEAD3 表达水平在肝再生过程中先升高后下降( $P < 0.05$ ), CYR61 无明显变化( $P > 0.05$ ); 同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 后 CTGF 表达水平升高( $P < 0.05$ ); 敲低或过表达 circVAPA 均不影响 TEAD3 的表达( $P > 0.05$ ), 而过表达 miR-101a-3p 可明显抑制 TEAD3 表达水平( $P < 0.05$ )。双荧光素酶报告基因实验证实 circVAPA 与 miR-101a-3p、miR-101a-3p 与 TEAD3 存在靶向关系。**结论** circVAPA 通过 miR-101a-3p/TEAD3 轴促进 Hippo 通路抑制肝再生。

**[关键词]** 环状 RNA; circVAPA; miR-101a-3p/TEAD3 轴; Hippo 通路; 肝再生

**[中图分类号]** R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)05-1050-09

## Mechanistic study on circVAPA promoting the Hippo signaling pathway to inhibit liver regeneration via miR-101a-3p/TEAD3 axis\*

ZHAO Jian<sup>1</sup>, DAI Yunhong<sup>2</sup>, DANG Yanli<sup>3△</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming, Yunnan 650021, China; 2. Department of Emergency Medicine, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming, Yunnan 650021, China; 3. Department of Obstetrics, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the molecular mechanism of circular RNA (circ) VAPA promoting the Hippo pathway to inhibit liver regeneration through the miR-101a-3p/TEAD3 axis. **Methods** A mouse model of 70% partial hepatectomy-induced liver regeneration was constructed, and the expressions of circVAPA, miR-101a-3p, and TEAD3 were analyzed. Mouse embryonic hepatocyte BNL CL<sub>2</sub> cells were transfected with siRNA or overexpression plasmids and divided into the VAPA-NC group, the VAPA-NC + miR-101a-3p mimic group, the VAPA-NC + miR-101a-3p mimic-NC group, the VAPA-OE group, the VAPA-OE + miR-101a-3p mimic group and the VAPA-OE + miR-101a-3p mimic-NC group. CCK-8 method and flow cytometry were used to analyze the proliferation, apoptosis, and cell cycle changes of hepatocytes. Immunofluorescence

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82460516); 云南省科技厅科技计划项目(202101AY070001-282, 202401AT070456); 云南大学医学科研基金项目(YDYXJJ2024-0006)。△ 通信作者, E-mail: happylife210@163.com。

staining was used to analyze the nuclear translocation of YAP1. Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expressions of key genes in the Hippo pathway. The dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationships between circVAPA and miR-101a-3p, as well as between miR-101a-3p and TEAD3. **Results** The level of circVAPA gradually increased during liver regeneration ( $P < 0.05$ ), while the level of miR-101a-3p first increased and then decreased ( $P < 0.05$ ). When miR-101a-3p was overexpressed alone, the cell proliferation rate was the highest ( $P < 0.05$ ), but it had no effect on the cell apoptosis rate ( $P > 0.05$ ). When circVAPA was overexpressed alone, it had no effect both on the cell proliferation rate and apoptosis ( $P > 0.05$ ). After co-overexpression of circVAPA and miR-101a-3p, the cell proliferation rate significantly decreased, and the cell apoptosis significantly increased ( $P < 0.05$ ). When miR-101a-3p was overexpressed alone, a large number of cells entered into the S phase. After co-overexpression of circVAPA and miR-101a-3p, a large number of cells were blocked in the G<sub>2</sub>/M phase. The phosphorylation level of the Hippo upstream gene YAP1 significantly increased at 6 hours after liver regeneration ( $P < 0.05$ ) and then rapidly decreased. However, co-overexpression of circVAPA and miR-101a-3p did not affect the level of p-YAP1 and the nuclear translocation of YAP1 ( $P > 0.05$ ). The expression levels of the Hippo downstream gene CTGF and the transcription factor TEAD3 first increased and then decreased during liver regeneration ( $P < 0.05$ ), and there was no significant change in CYR61 ( $P > 0.05$ ). After co-overexpression of circVAPA and miR-101a-3p, the expression level of CTGF increased ( $P < 0.05$ ). Knocking down or overexpressing circVAPA did not affect the expression of TEAD3 ( $P > 0.05$ ), while overexpressing miR-101a-3p could significantly inhibit the expression level of TEAD3 ( $P < 0.05$ ). The dual-luciferase reporter gene assay confirmed the targeting relationships between circVAPA and miR-101a-3p, as well as between miR-101a-3p and TEAD3. **Conclusion** circVAPA promotes the Hippo pathway to inhibit liver regeneration through the miR-101a-3p/TEAD3 axis.

**[Key words]** circular RNA; circVAPA; miR-101a-3p/TEAD3 axis; Hippo signaling pathway; liver regeneration

肝再生是人体最重要的保护性生理过程之一,是肝脏受损或切除后能够快速恢复的生理基础,但对于调控肝再生启动和终止的分子机制尚不清楚。环状 RNA(circle RNA, circRNA/circ)是一类结构稳定、序列保守、特异性表达的非编码 RNA。多个研究表明, circRNA 通过吸附微 RNA(microRNA, miRNA/miR)在肝再生过程中发挥关键调控作用,但具体调控机制仍不明确<sup>[1-5]</sup>。Hippo 通路是一种经典、保守的细胞信号通路,在细胞增殖、维持凋亡平衡、调控器官大小和肿瘤发生、发展等方面起重要作用。研究表明, Hippo 通路的开关影响了肝再生重塑和肿瘤发病<sup>[6-7]</sup>,多个 circRNA 参与了 Hippo 通路的调节<sup>[8-9]</sup>,但相关机制及调控网络仍有待深入研究。

已有研究证实,肝癌中 circVAPA 通过 miR-377-3p 和抑制 pSAP 促进肿瘤细胞增殖<sup>[10]</sup>。本课题组在前期研究中发现,小鼠肝部分切除再生模型中也存在 circVAPA 过表达,可能通过负调控 miR-101a-3p 影响 Hippo 通路开关,进而调节肝再生,但具体机制尚未见报道。因此,本研究旨在探讨 circVAPA 通过 miR-101a-3p 影响肝再生的作用机制,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

90 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 8~12 周龄, 体重 20~25 g, 购自重庆恩斯维尔生物技术有限公司;

小鼠胚胎肝细胞 BNL CL. 2 购自上海中国科学院细胞库。circVAPA 小干扰 RNA(si-VAPA)及其对照(si-NC)、miR-101a-3p 模拟物(miR-101a-3p mimics)及其对照(miR-101a-3p mimics-NC)、circVAPA 过表达载体(VAPA-OE)及其对照(VAPA-NC)、双荧光素酶报告基因载体、PCR 引物序列由重庆生命知源科技有限公司提供。动物饲养、建模和其他实验设备由云南大学附属医院中心实验室提供。本研究经云南大学实验动物福利伦理委员会批准(审批号: YNU20220190)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 70%肝切除再生(PHx)小鼠模型构建

采用 2%异氟烷和 2.0 L/min 氧气流量诱导麻醉,对照小鼠行剖腹探查后关腹作为假手术处理。PHx 小鼠参考 Higgins & Anderson 法建立 70% PHx 模型,开腹后结扎切除小鼠肝左叶及中叶,0.2 mL 5%葡萄糖腹腔注射后关腹。PHx 小鼠于术后 6、72、144 h 处死,术后时间作为肝再生时间,取肝组织用于后续实验。

#### 1.2.2 细胞培养、分组与转染

复苏小鼠胚胎肝细胞 BNL CL. 2 并接种到培养瓶,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 2 天更换 1 次培养液,取对数生长的细胞用于实验。根据 Lipofectamine™2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)转染细胞,分

为对照组、VAPA-NC+miR-101a-3p mimic 组、VAPA-NC+miR-101a-3p mimic-NC 组、VAPA-OE+miR-101a-3p mimic 组、VAPA-OE+miR-101a-3p mimic-NC 组。

**1.2.3 实时荧光定量逆转录-PCR**(quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 circVAPA、miR-101a-3p、Hippo 通路下游基因 CTGF、

CYR61 及转录因子 TEAD3 表达情况

取目标细胞加入 1 mL Trizol 裂解液裂解细胞, 提取总 RNA, 逆转录得到 cDNA 模板后进行荧光定量 PCR 扩增, 内参为 GAPDH 和 U6, 分别对 circVAPA、miR-101a-3p、CTGF、CYR61、TEAD3 进行扩增,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算细胞中上述 RNA 相对表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列设计

基因	方向	序列(5'-3')
GAPDH	正向	CAA CGA CCC CTT CAT TGA CC
	反向	CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT
U6	正向	CTC GCT TCG GCA GCA CA
	反向	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
circVAPA	正向	TGG AAG CTG TGT GGA AAG AAG
	反向	CGA GGT GCT GTA GTC TTC AC
miR-101a-3p-RT		GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT TCA GT
miR-101a-3p	正向	GCG CGC GTA CAG TAC TGT GAT A
	反向	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
CYR61	正向	TGC TGT AAG GTC TGC GCT AAA C
	反向	GCT GTC TTC ATC ACA AAC CCA CT
CTGF	正向	GGC ATC TCC ACC CGA GTT AC
	反向	CAC ACC CCG CAG AAC TTA GC
TEAD3	正向	GGT TCG GGA ATA CCA GGT TG
	反向	AGA GAC GAT TTG GGC AGA CG

**1.2.4 双荧光素酶报告基因实验验证 circVAPA 与 miR-101a-3p、miR-101a-3p 与 TEAD3 的靶向关系**

circBase、RegRNA2.0 数据库分析预测 circVAPA 的 3'-UTR 端与 miR-101a-3p 存在碱基互补结合位点, TargetsCan7.2 数据库分析预测 TEAD3 的 3'-UTR 端与 miR-101a-3p 存在碱基互补结合位点。设计野生型-circVAPA 3'-UTR/TEAD3 3'-UTR 和突变型-circVAPA 3'-UTR/TEAD3 3'-UTR, 构建双荧光素酶报告基因载体及其突变型载体。用 Lipofectamine™3000 将野生型-circVAPA/野生型-TEAD3、突变型-circVAPA/突变型-TEAD3 分别与 miR-NC 或 miR-101a-3p 质粒共同转染至目标细胞, 48 h 后检测其荧光素酶活性。qRT-PCR 检测 miR-101a-3p 和 TEAD3 相对表达水平。

**1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况**

按 1.2.2 分组培养细胞, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$ /mL。接种于 96 孔板中培养 24 h, 按不同时间点处理细胞。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 酶标仪测定 450 nm 的吸光度。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况和细胞周期比例**

(1) 细胞凋亡检测处理: 吸出细胞培养液并消化细胞, 离心后加入膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素结合液、10  $\mu$ L 碘化丙啶染色液, 孵育 10~20 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。(2) 细胞周期检测处理: 收集细胞, 离心后加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 温浴

30 min。流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光, 做细胞 DNA 含量分析和光散射分析。

**1.2.7 Western blot 检测细胞中磷酸化(p)-YAP1、p-LATS1 蛋白表达情况**

细胞中加入 RIPA 裂解液, 收集上清液提取总蛋白, 用 BCA 法检测蛋白浓度。配置 BCA 标准品溶液, 将蛋白样品与  $5 \times$  十二烷基硫酸钠上样缓冲液按 4:1 混合, 煮沸使蛋白变性, 在胶孔中分别加入样品蛋白, 电泳 10 min 后转膜。孵育、封闭、转移到聚偏氟乙烯膜, 加入一抗、二抗, 继续孵育 2 h。曝光仪检测聚偏氟乙烯膜并成像。

**1.2.8 免疫荧光染色检测 YAP1 核移位**

制备石蜡切片, 脱蜡, 乙醇浸泡, 加入多聚甲醛固定, 加入 0.5% Triton X-100、山羊血清(磷酸盐缓冲液配制)室温封闭 1 h。一抗孵育, 二抗孵育, DAPI 避光染色 5 min。抗荧光猝灭剂封片后, 荧光显微镜下观察并采集图像。

**1.3 统计学处理**

采用 GraphPad Prism8.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验或 one-way ANOVA 单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 构建 70% PHx 小鼠模型**

构建 70% PHx 小鼠模型 90 只, 成功 83 只, 成模率为 92.2%, 见图 1。

## 2.2 肝再生过程中 circVAPA、miR-101a-3p 表达情况

qRT-PCR 结果显示,肝再生过程中 circVAPA 表达水平逐渐升高( $P < 0.05$ ),miR-101a-3p 表达水平则先升高后下降( $P < 0.05$ ),见图 2。



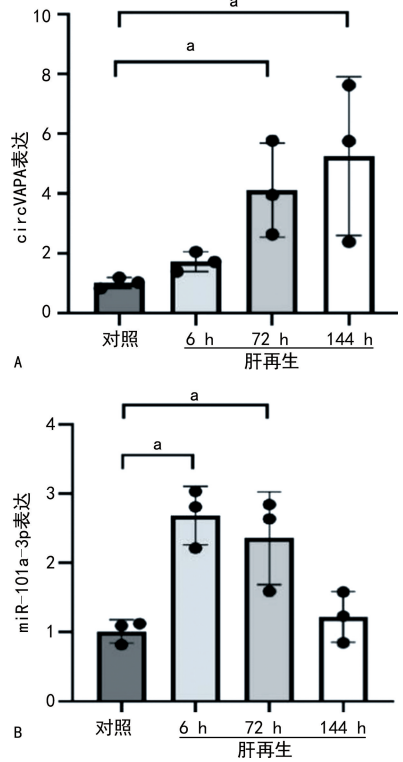
A:建模过程;B:建模后缝合。

图 1 成功构建 70% PHx 小鼠模型

## 2.3 敲低或过表达 circVAPA 对 miR-101a-3p 表达的影响

构建 2 条 si-circVAPA 顺转质粒,转染 BNL CL. 2 后 circVAPA 表达水平降低,但敲低 circVAPA 后 miR-101a-3p 表达水平升高( $P < 0.05$ )。circVA-

PA 过表达载体转染 BNL CL. 2 后,circVAPA 表达水平升高,但过表达 circVAPA 后 miR-101a-3p 表达水平降低( $P < 0.05$ ),见图 3。



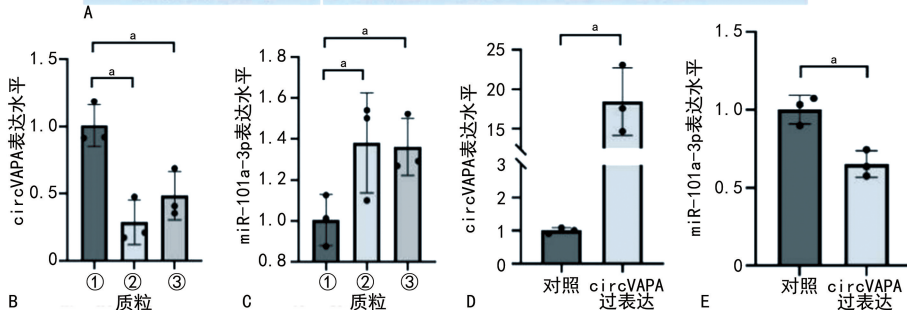
A:circVAPA 表达水平;B:miR-101a-3p 表达水平;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ 。

图 2 肝再生过程中 circVAPA、miR-101a-3p 表达情况

## 2.4 circVAPA 竞争性抑制 miR-101a-3p 的表达

双荧光素酶报告基因实验结果显示,转染野生型-circVAPA 时,miR-101a-3p 荧光素酶活性明显低于对照( $P < 0.05$ );转染突变型-circVAPA 时,miR-101a-3p 及其对照的荧光素酶活性无差异( $P > 0.05$ ),见图 4。

基因	序列
si-NC	5'-TACGGCATGTAGCTAGCTAGC-3'
si-circVAPA#1	5'-ATGATAAGCTGGCCCTTCAC-3'
si-circVAPA#2	5'-TAAGCTGGCCCTTCACAGAT-3'



A:si-circVAPA 引物序列;B:敲低 circVAPA 后 circVAPA 表达情况;C:敲低 circVAPA 后 miR-101a-3p 表达情况;D:过表达 circVAPA 后 circVAPA 表达情况;E:过表达 circVAPA 后 miR-101a-3p 表达情况;①:si-NC;②:si-circVAPA #1;③:si-circVAPA #2;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ 。

图 3 敲低或过表达 circVAPA 对 miR-101a-3p 表达的影响

## 2.5 circVAPA、miR-101a-3p 对肝细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响

miR-101a-3p mimics 转染 BNL CL. 2 后,miR-

101a-3p 表达水平升高( $P < 0.05$ )。过表达 miR-101a-3p 时细胞增殖速率最快( $P < 0.05$ ),同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时及过表达 circVAPA



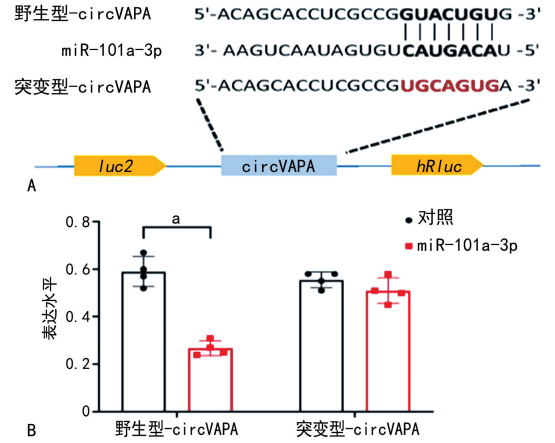
时增殖速率无变化( $P > 0.05$ )。CCK-8 法分析 48 h 细胞增殖率也得出相同结果,见图 5A~C。

流式细胞术结果显示,过表达 miR-101a-3p 时不影响细胞凋亡率( $P > 0.05$ ),同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ )。过表达 miR-101a-3p 时细胞大量进入 S 期,而同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时细胞大量阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,见图 5D、E、F。

### 2.6 circVAPA/miR-101a-3p 轴对 Hippo 通路上游基因的影响

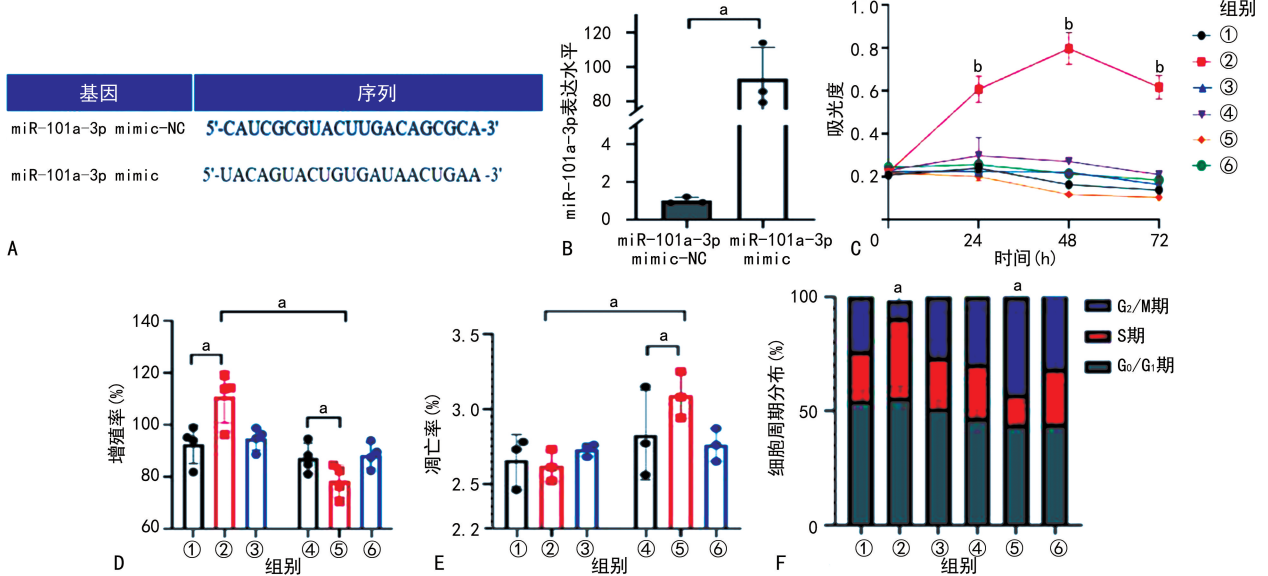
Western blot 结果显示,肝再生 6 h p-YAP1 表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),随后快速降低;p-LATS1 表达水平极低,提示可能未参与肝再生过程。而敲低/过表达 circVAPA 或 miR-101a-3p 不影响 p-YAP1 表达水平( $P > 0.05$ ),见图 6。免疫荧光染色结果显示,肝再生 6、72 h 有明显的 YAP1 核移位( $P < 0.05$ ),之后降至正常;而敲低/过表达 circVA-

PA 或 miR-101a-3p 不影响 BNL CL.2 的 YAP1 核移位( $P > 0.05$ ),见图 7、8。



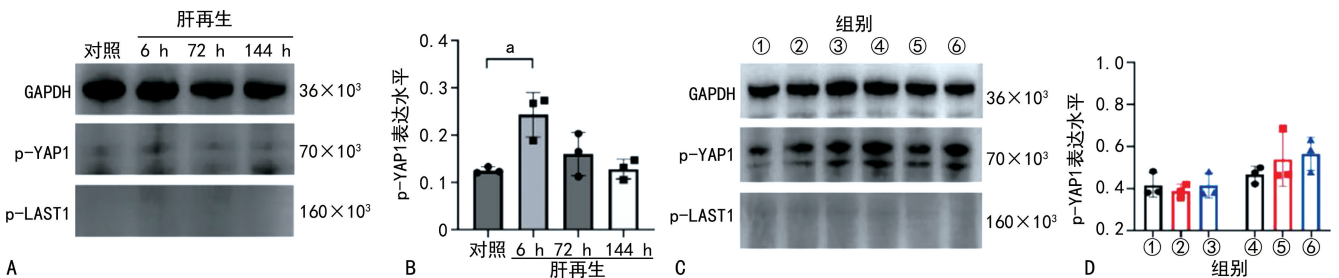
A: 双荧光素酶报告基因实验突变型-circVAPA 序列设计; B: 野生型-circVAPA、突变型-circVAPA 对 miR-101a-3p 表达水平的影响; a:  $P < 0.05$ 。

图 4 双荧光素酶报告基因实验结果



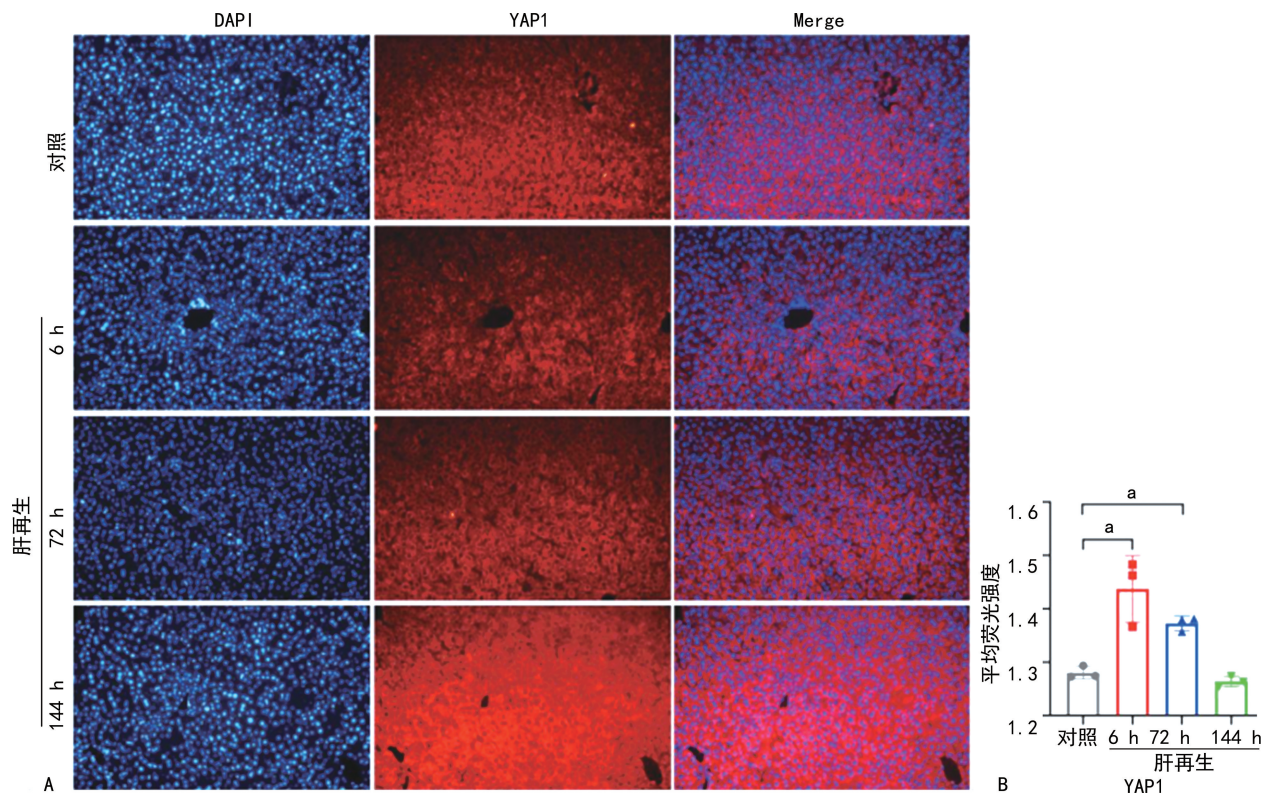
A: 引物序列; B: 成功构建 miR-101a-3p mimics; C: 比较各组细胞增殖速率; D: 流式细胞术分析细胞凋亡率; E: CCK-8 法比较 48 h 细胞增殖率; F: 流式细胞术分析细胞周期分布; ①: VAPA-NC 组; ②: VAPA-NC+miR-101a-3p mimic 组; ③: VAPA-NC+miR-101a-3p mimic-NC 组; ④: VAPA-OE 组; ⑤: VAPA-OE+miR-101a-3p mimic 组; ⑥: VAPA-OE+miR-101a-3p mimic-NC 组; a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.05$ , 与其他组比较。

图 5 circVAPA、miR-101a-3p 对肝细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响



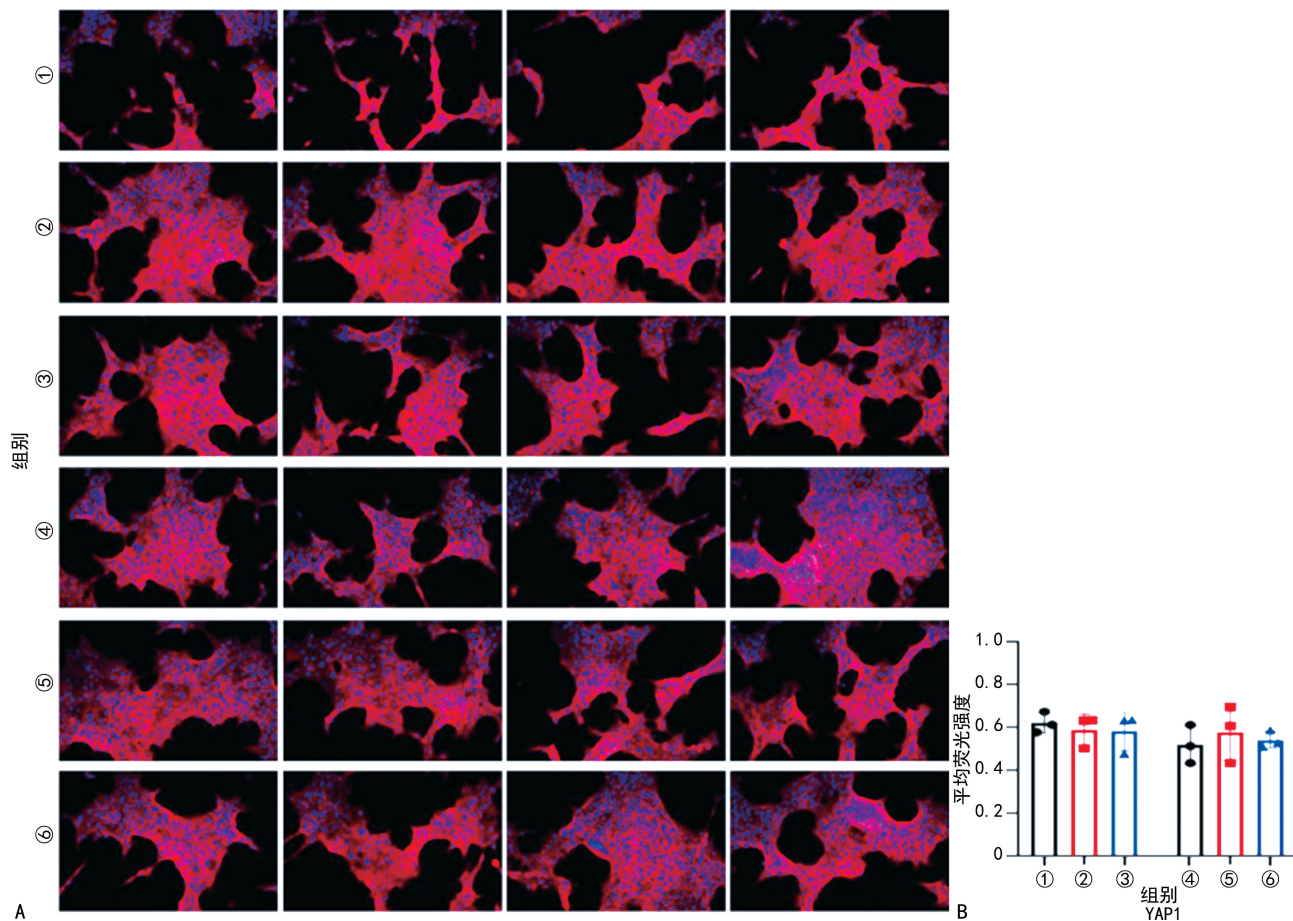
A: Western blot 检测肝再生不同时间点 p-YAP1、p-LATS1 的表达情况; B: 肝再生不同时间点 p-YAP1 表达水平比较; C: Western blot 检测过表达 circVAPA 或/和 miR-101a-3p 时 p-YAP1、p-LATS1 的表达情况; D: 过表达 circVAPA 或 miR-101a-3p 时 p-YAP1 表达水平比较; ①: VAPA-NC 组; ②: VAPA-NC+miR-101a-3p mimic 组; ③: VAPA-NC+miR-101a-3p mimic-NC 组; ④: VAPA-OE 组; ⑤: VAPA-OE+miR-101a-3p mimic 组; ⑥: VAPA-OE+miR-101a-3p mimic-NC 组; a:  $P < 0.05$ 。

图 6 肝再生过程中 Hippo 通路上游基因 p-YAP1、p-LATS1 表达情况



A: 肝再生不同时间点 YAP1 核移位(免疫荧光染色,100×);B: 荧光定量分析; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 7 肝再生过程中 YAP1 核移位情况



A: 过表达 circVAPA 或/和 miR-101a-3p 后 YAP1 核移位(免疫荧光染色,100×);B: 荧光定量分析;①: VAPA-NC 组;②: VAPA-NC + miR-101a-3p mimic 组;③: VAPA-NC + miR-101a-3p mimic-NC 组;④: VAPA-OE 组;⑤: VAPA-OE + miR-101a-3p mimic 组;⑥: VAPA-OE + miR-101a-3p mimic-NC 组。

图 8 过表达 circVAPA 或 miR-101a-3p 后 BNL CL.2 的 YAP1 核移位情况



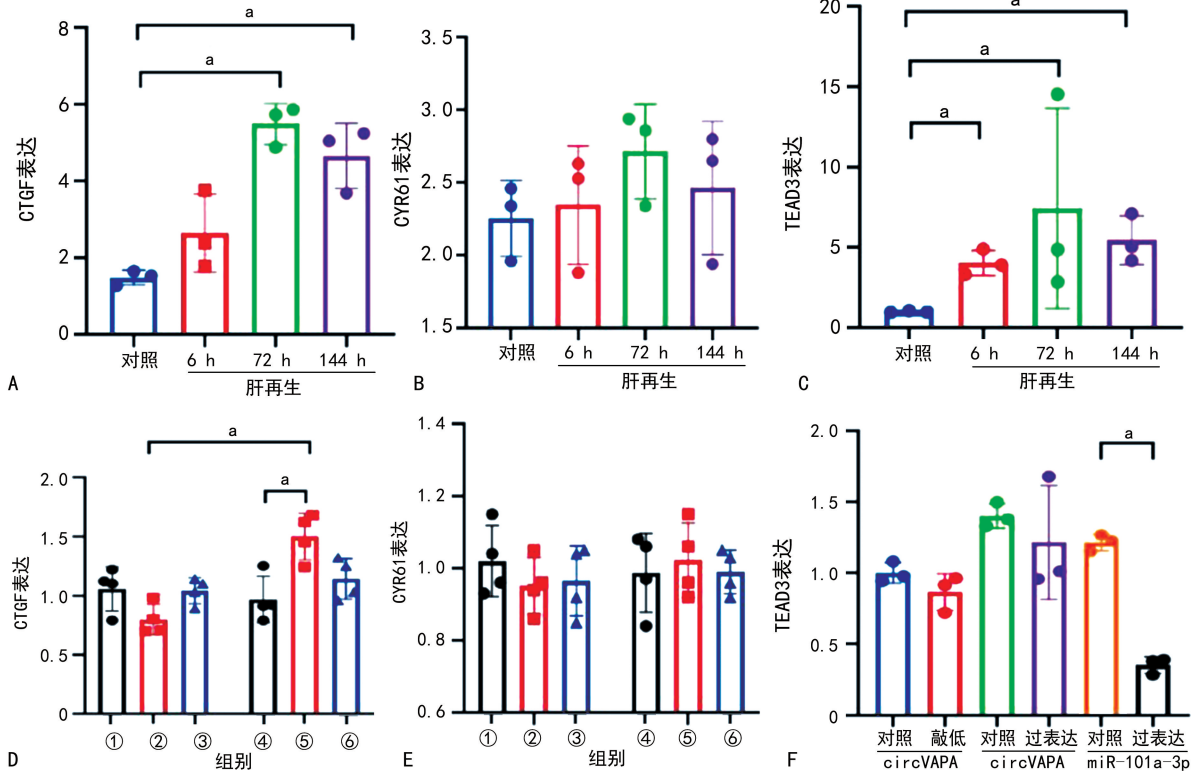
### 2.7 circVAPA/miR-101a-3p 轴促进了 Hippo 通路下游基因表达

qRT-PCR 结果显示,肝再生过程中 CTGF、TEAD3 表达水平先升高后下降( $P < 0.05$ ),CYR61 表达水平无明显变化( $P > 0.05$ );同时过表达 circVAPA 和 miR-101a-3p 时 CTGF 表达水平上升( $P < 0.05$ );敲低或过表达 circVAPA 均不影响 TEAD3 表达水平( $P > 0.05$ ),过表达 miR-101a-3p 则

可明显抑制 TEAD3 表达水平( $P < 0.05$ ),见图 9。

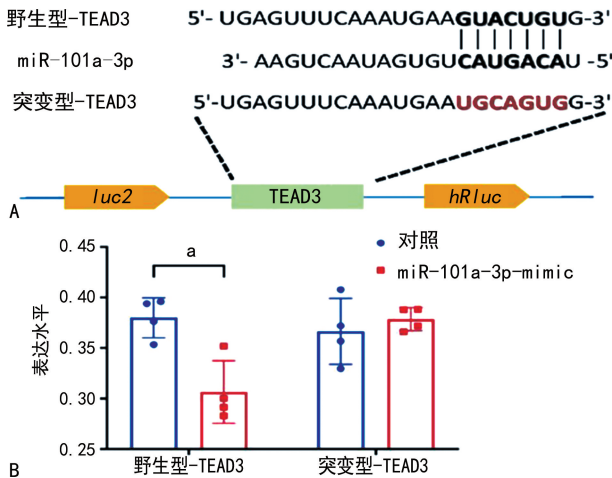
### 2.8 circVAPA/miR-101a-3p 轴通过负调控 TEAD3 影响 Hippo 通路

双荧光素酶报告基因实验结果显示,转染野生型-TEAD3 时,miR-101a-3p 荧光素酶活性明显低于对照( $P < 0.05$ );转染突变型-TEAD3 时,miR-101a-3p 及其对照的荧光素酶活性无差异( $P > 0.05$ ),见图 10。



A~C:肝再生不同时间点 CTGF、CYR61 和 TEAD3 表达水平;D~F:过表达 circVAPA 或/和 miR-101a-3p 对 CTGF、CYR61 和 TEAD3 表达水平的影响;①:VAPA-NC 组;②:VAPA-NC+miR-101a-3p mimic 组;③:VAPA-NC+miR-101a-3p mimic-NC 组;④:VAPA-OE 组;⑤:VAPA-OE+miR-101a-3p mimic 组;⑥:VAPA-OE+miR-101a-3p mimic-NC 组;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ 。

图 9 肝再生过程中 Hippo 通路下游基因表达情况



A:双荧光素酶报告基因实验突变型 TEAD3 序列设计;B:野生型-TEAD3、突变型-TEAD3 对 miR-101a-3p 表达水平的影响;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ 。

图 10 双荧光素酶报告基因实验结果

### 3 讨论

肝脏是人体唯一可再生的实质脏器,承担重要的合成、代谢、解毒等功能。动物实验表明,肝切除后肝再生分为 3 个过程:启动(肝切除后 0.5~6.0 h)、增殖(肝切除后 12~72 h)和终止(肝切除后 72~168 h)<sup>[11-12]</sup>。正常情况下,肝细胞处于稳定状态并不发生有丝分裂;肝再生启动阶段细胞迅速从 G<sub>0</sub> 期向 G<sub>1</sub> 期转化,增殖阶段通过 1~2 个细胞周期的有丝分裂快速回复肝细胞数量和体积,终止阶段细胞又恢复到初始状态<sup>[13]</sup>。然而,对于调控肝再生启动和终止的分子机制尚不明确。

Hippo 通路是一条由一系列保守蛋白激酶和转录因子组成的激酶链,在细胞增殖与肝再生重塑、维持凋亡平衡、调控肿瘤发生、发展等方面起重要作用<sup>[14]</sup>,通过激活经典 Hippo-YAP-LATS1/2 激酶途径抑制细胞增殖<sup>[15]</sup>。当肝损伤后,p-YAP 水平迅速

下降, YAP 在细胞核中累积, 与 TEAD 家族蛋白结合后关闭 Hippo 通路并促进肝细胞增殖<sup>[16]</sup>。最新研究显示, VGLL4 能与 YAP 竞争性结合 TEAD, 干扰 YAP 与 TEAD 结合并抑制 Hippo 通路下游靶基因表达<sup>[17]</sup>。因此, Hippo 通路的开关可能受一系列转录因子的影响, 相关机制仍有待深入研究。

circRNA 是一类环形结构稳定、序列保守、特异性表达的非编码 RNA<sup>[18]</sup>, 含有大量 miRNA 结合位点, 通过海绵化吸附 miRNA 解除 miRNA 对 mRNA 的抑制作用, 间接调控 miRNA 下游靶基因表达<sup>[19]</sup>。近年来相继发现多个 circRNA 直接参与了 miRNA 介导的肝细胞增殖调控<sup>[20-25]</sup>。本研究发现, 肝再生过程中 circVAPA 通过负调控(或吸附) miR-101a-3p 表达促进肝细胞增殖和抑制凋亡。研究报道 circVAPA 可与多种 miRNA 结合发挥肿瘤增殖调控作用<sup>[26-30]</sup>, 但对肝再生的影响及机制尚未有报道, 相关分子机制仍不清楚。

为验证 circVAPA/miR-101a-3p 轴影响肝再生的分子机制, 本研究分析了其对 Hippo 通路上下游关键基因的影响, 发现 circVAPA/miR-101a-3p 轴仅影响 Hippo 通路下游基因 CTGF 而非 CYR61 的表达, 并不影响 Hippo 通路上游基因及转录因子。这种影响是通过 miR-101a-3p 对 Hippo 通路下游转录因子 TEAD3 的竞争性结合起作用, 最终调控了 Hippo 通路的开关。因此, circVAPA/miR-101a-3p/TEAD3 轴在肝再生终止阶段发挥了更为重要的调节作用。

综上所述, circVAPA 通过 miR-101a-3p/TEAD3 轴促进 Hippo 通路并最终抑制肝再生。本研究丰富了肝再生调控的分子机制, circVAPA/miR-101a-3p/TEAD3 轴可能成为新的肝再生干预靶点, 这为开发新的治疗方法和药物研发提供了科学依据和理论基础。

## 参考文献

- [1] LI P, MA X, HUANG D, et al. Exploring the roles of non-coding RNAs in liver regeneration [J]. *Noncoding RNA Res*, 2024, 9(3): 945-953.
- [2] XU L, ZHANG J, LI L, et al. A circular RNA produced by LRBA promotes cirrhotic mouse liver regeneration through facilitating the ubiquitination degradation of p27 [J]. *Liver Int*, 2023, 43(7): 1558-1576.
- [3] WANG Q, LONG Z, ZHU F, et al. Integrated analysis of lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA in the proliferative phase of liver regeneration in mice with liver fibrosis [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 417.
- [4] ROWE M M, KAESTNER K H. The role of non-coding RNAs in liver disease, injury, and regeneration [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 359.
- [5] 李冠彤, 韩涛, 张钰, 等. 非编码 RNA 与肝再生关系的研究进展 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(5): 480-483.
- [6] ZHANG L, YANG Y Y, XIE L, et al. JCAD deficiency delayed liver regenerative repair through the Hippo-YAP signalling pathway [J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(3): e1630.
- [7] XU C Y, JIANG J, AN Y, et al. Angiotensin II type-2 receptor signaling facilitates liver injury repair and regeneration via inactivation of Hippo pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(6): 1201-1213.
- [8] WANG D, YANG S, LYU M, et al. Circular RNA HSDL2 promotes breast cancer progression via miR-7978 ZNF704 axis and regulating hippo signaling pathway [J]. *Breast Cancer Res*, 2024, 26(1): 105.
- [9] LI H, TANG Y, RUAN X, et al. N6-methyladenosine-modified circTEAD1 stabilizes Yap1 mRNA to promote chordoma tumorigenesis [J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(4): e1658.
- [10] ELY A, BLOOM K, MAEPA M B, et al. Recent update on the role of circular RNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 1-17.
- [11] GUO X, XI L, LI L, et al. CircRNA-14723 promotes hepatocytes proliferation in rat liver regeneration by sponging rno-miR-16-5p [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8176-8186.
- [12] MATCHETT K P, WILSON-KANAMORI J R, PORTMAN J R, et al. Multimodal decoding of human liver regeneration [J]. *Nature*, 2024, 630(8015): 158-165.
- [13] XU J, GUO P, HAO S, et al. A spatiotemporal atlas of mouse liver homeostasis and regeneration [J]. *Nat Genet*, 2024, 56(5): 953-969.
- [14] RUSSELL J O, CAMARGO F D. Hippo signaling in the liver: role in development, regeneration and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(5): 297-312.
- [15] YU T, MA X, CHENG Y, et al. Amelioration of NAFLD by sleeve gastrectomy-triggered hepatocyte regeneration in mice: experimental research [J]. *Int J Surg*, 2024, 110(6): 3307-3325.
- [16] MOKHTARI R B, ASHAYERI N, BAGHAIE L, et al. The Hippo pathway effectors YAP/TAZ-TEAD oncoproteins as emerging thera-



- peutic targets in the tumor microenvironment [J]. *Cancers*, 2023, 15(13):3468.
- [17] CAI J, CHOI K, LI H, et al. YAP-VGLL4 antagonism defines the major physiological function of the Hippo signaling effector YAP [J]. *Genes Dev*, 2022, 36(21):1119-1128.
- [18] CONN V M, CHINNAIYAN A M, CONN S J. Circular RNA in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(9):597-613.
- [19] SHEN F, LIU P, XU Z, et al. CircRNA\_001569 promotes cell proliferation through absorbing miR-145 in gastric cancer [J]. *J Biochem*, 2019, 165(1):27-36.
- [20] LIU C, ZHONG X, LI J, et al. Circular RNA circVAPA promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2019, 30(4):152-159.
- [21] WANG G, GUO X, CHENG L, et al. An integrated analysis of the circRNA-miRNA-mRNA network reveals novel insights into potential mechanisms of cell proliferation during liver regeneration [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):3873-3884.
- [22] 谢群, 王玲玲, 王理, 等. 环状 RNA 在非酒精性脂肪性肝病进展中的调控机制及潜在价值 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2022, 30(11):1270-1275.
- [23] 社会卿, 江勇, 张志广, 等. 环状 RNA 与肝脏疾病的关系 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2021, 29(5):488-492.
- [24] 沈彩红, 孙林, 黄文杰, 等. 肝癌细胞来源的外泌体作用正常肝细胞后差异表达环状 RNA 的筛选 [J]. *重庆医学*, 2021, 50(21):3606-3611.
- [25] ZENG Q, LIU C H, WU D, et al. LncRNA and circRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(3):560.
- [26] ZHAO Y, DAI Q, FU X, et al. CircVAPA exerts oncogenic property in non-small cell lung cancer by the miR-876-5p/WNT5A axis [J]. *J Gene Med*, 2021, 23(6):e3325.
- [27] 吕飞飞, 李昆珊, 胡燕, 等. circVAPA 通过 miR-125b/HOXA7 轴逆转口腔癌细胞化疗耐药的机制研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(8):1398-1404.
- [28] HUA J, WANG X, MA L, et al. CircVAPA promotes small cell lung cancer progression by modulating the miR-377-3p and miR-494-3p/IGF1R/AKT axis [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):123.
- [29] YANG B, WANG Y W, ZHANG K. Interactions between circRNA and protein in breast cancer [J]. *Gene*, 2024, 895:148019.
- [30] ZHANG Y, LUO J, YANG W, et al. CircRNAs in colorectal cancer: potential biomarkers and therapeutic targets [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(6):353.

(收稿日期:2024-09-24 修回日期:2024-12-28)

(编辑:袁皓伟)

(上接第 1049 页)

- [21] SONG X Q, ZHANG Y, YANG N N, et al. Molecular mechanism of celastrol in the treatment of systemic lupus erythematosus based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Life Sci*, 2020, 240:117063.
- [22] 李楚, 荆文光, 莫小路, 等. 广藿香化学成分和药理作用研究进展及潜在质量标志物预测分析 [J]. *中国药学杂志*, 2023, 58(11):954-965.
- [23] 闫晓琪, 刘媛媛. 广藿香抗肿瘤的研究进展 [J]. *广东化工*, 2024, 51(6):80-81, 111.
- [24] EDIRIWEERA M K, TENNEKOON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: biological and therapeutic significance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59:147-160.
- [25] 张婕, 高晓晴, 吴宏进, 等. 基于网络药理学和实验验证分析半枝莲-山慈菇治疗卵巢癌的分子机制 [J]. *国际中医中药杂志*, 2023, 45(12):1532-1541.

(收稿日期:2024-09-30 修回日期:2025-01-18)

(编辑:姚雪)