

米碎花药效微小核糖核酸的鉴定及其靶基因功能分析

方杰^{1,2}, 胡毅翔², 应华忠², 俞文英², 金晓音², 余陈欢^{2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 浙江 杭州 310013

摘要: 目的 筛选米碎花 *Eurya chinensis* 茎叶的微小核糖核酸 (MicroRNAs, miRNAs) 类药效物质及其靶基因功能分析。方法 采用高通量测序法, 测定米碎花、正常小鼠和喂食米碎花匀浆液小鼠肝组织及血浆中 miRNAs 的表达丰度, 并与 GeneBank 上的植物 miRNAs 数据库比对, 结合实时荧光定量 PCR (RTFQ-PCR) 验证, 鉴定吸收进入体内的米碎花 miRNAs。以人类 mRNA 为靶标, 采用 TargetScan 与 MiRanda 预测米碎花 miRNAs 的靶基因, 并通过基因功能聚类 (GO) 与 KEGG 分析靶基因的相关功能。结果 共鉴定出 5 个米碎花 miRNAs 可吸收进入体内, 其主要在生化过程、细胞成分和分子功能 3 大区域发挥作用, 并影响肿瘤、代谢、炎症等相关信号通路。结论 miRNAs 可能是一类新型的中药药效物质。

关键词: 药效物质; 米碎花; 微小核糖核酸; MAPK 信号通路; 高通量测序

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0080-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.016

Identification of MicroRNAs from *Eurya chinensis* and function analysis on their target genes

FANG Jie^{1,2}, HU Yi-xiang², YING Hua-zhong², YU Wen-ying², JIN Xiao-yin², YU Chen-huan²

1. Pharmacy College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacodynamic MicroRNAs (miRNAs) in *Eurya chinensis* and the functions of their target genes. **Methods** The miRNA profiles of *E. chinensis* in liver and plasma of normal mice and *E. chinensis* extract-treated mice were detected using high-flux sequencing, and then the miRNAs which took into the organism were validated by RTFQ-PCR using plant miRNA database in GeneBank. Human mRNA database as target was used to predict the target genes of miRNAs by TargetScan and MiRanda analysis, while the target gene functions were considered by GO and KEGG analyses. **Results** Five pharmacodynamic microRNAs were identified and took part in biological processes, cellular components, and molecular functions, which affected tumor, metabolism, and inflammation-related signal pathways. **Conclusion** The miRNAs might act as new pharmacodynamic materials of Chinese materia medica.

Key words: pharmacodynamic material; *Eurya chinensis* R. Brown; microRNAs; MAPK signal pathway; high-flux sequencing

中药药效物质的阐明是揭示中药作用奥秘的关键, 是中药质量控制、药效评价的基础与核心, 也是中药研究的重点和难点。尽管对于中药药效物质基础的科学定义, 目前学术界尚有分歧, 然而从药理学角度看, 中药药效的发挥必定是药效物质基础中的各个化学成分独立作用以及各个成分之间的相互作用所产生合力的结果^[1]。单味中药的成分可能

成百上千, 但由于服用药量的限制, 一味特定中药经胃肠道吸收后到达人体特定的靶器官、靶组织, 且发挥药理作用的成分数目非常有限^[2]。因此药物中含量适宜、吸收好、能在体内达到一定效应浓度的、具有生物活性的化学物质必定是其药效物质基础的组成部分。

微小核糖核酸 (MicroRNAs, miRNAs) 是一

收稿日期: 2014-10-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202977, 81473339); 浙江省卫生高层次创新人才项目

作者简介: 方杰 (1989—), 男, 浙江宁波人, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15158191046 E-mail: fangjie3318@163.com

*通信作者 余陈欢 (1982—), 男, 浙江绍兴人, 副研究员, 从事药效物质及抗肿瘤药效机制研究。Tel: (0571)88215497 E-mail: yuchenhuan2002@163.com

类特殊的非编码单链小分子 RNA, 由 19~25 个核苷酸组成, 是近 10 年来生物学研究的热点。大量研究证实, miRNAs 可通过抑制靶 mRNA 翻译而降低相应蛋白合成, 在生命活动中起着重要的作用^[3-5], 可作为疾病早期诊断及预后的生物标志物, 亦可作为药物干预的新靶点和新途径。近年来, 植物 miRNAs 被证实是一类新的药效物质, 可跨界调控人体基因^[6], 但在中药研究领域尚属空白。

米碎花为山茶科柃木属多年生植物米碎花 *Eurya chinensis* R. Brown 的茎叶, 又名矮茶、岗茶, 广泛分布于浙江、福建、广东、广西东南沿海等地。现代研究表明, 其主要含有白桦酸、羽扇豆醇、邻羟基苯甲醛^[7], 具有抗炎、抗肿瘤和抗血管生成等活性^[8-9]。但其药效物质基础及作用机制尚不清楚。本研究采用高通量测序的方法, 从 miRNAs 角度揭示米碎花的药效物质基础, 探讨米碎花核酸类物质对机体生理功能的影响, 拓展现有以次生代谢产物为主体的药效物质研究模式, 为目前药效物质尚不明确的中药研究提供一种有益的尝试, 也为具有中国特色的中药 miRNAs 新药研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药材

雄性清洁级 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

米碎花采自杭州市西湖区满觉陇村, 经浙江中医药大学俞冰副教授鉴定为米碎花 *E. chinensis* R. Br. 新鲜茎叶。

1.2 实验仪器与试剂

Hiseq 2500 高通量测序仪 (Illumina, 美国); Bioanalyzer 2100 生物分析仪 (Agilent, 美国); Qubit 2.0 核酸定量仪 (Life technologies, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国)。

RNA 质检试剂盒 (Agilent, 美国); 总 RNA 纯化试剂盒、动物 RNA 纯化试剂盒 (LC Science, 美国); Trizol reagent (Invitrogen, 美国); 高通量测序试剂盒 (Illumina, 美国)。

1.3 分组及样品制备

实验分 3 组, 米碎花原植物组、正常小鼠组和喂食米碎花小鼠组。其中, 正常小鼠组和喂食米碎花小鼠组, 每组各 25 只小鼠。

取 2 g 新鲜采集的米碎花茎叶迅速置-80 °C 冰箱冻存, 用于后续的米碎花 miRNAs 提取。另取 50 g

新鲜采集的米碎花茎叶, 在冰浴中碾磨, 制成生药 1 g/mL 的匀浆。将米碎花匀浆按生药 10 g/kg (相当于临床等效剂量) ig 给予小鼠 (预先禁食 12 h)。分别于给药后 0.5、1.0、2.0、3.0、6.0 h 随机取 5 只喂食米碎花的小鼠, 取血分离血浆, 摘取肝脏置于-80 °C 保存。同时, 分别于上述各时间点随机取 5 只正常小鼠, 分离血浆和肝脏, 进行后续高通量测序。

1.4 miRNAs cDNA 文库构建及高通量测序

采用 Illumina 试剂盒, 将总 RNA 样品经富集、纯化、cDNA 合成及 PCR 扩增后, 获得小 RNA 文库, 经文库质量检测合格后上机进行高通量测序分析。针对测序获得的原始数据, 选取 35 个核苷酸以下的 reads, 通过去接头序列, 低质量序列, 污染及序列统计等过程完成初级分析, 然后与美国国家生物技术信息中心 GeneBank 上山茶科植物 560 271 条 RNA 数据作为查询库, 滤除非 miRNAs 的小核酸序列, 最后只保留 16~30 个核苷酸的高质量 miRNAs 序列。对于剩余序列, 则分别截取完全一致的 RNA 匹配序列位点上游或下游各 300 个核苷酸的序列, 用 RNAfold 软件 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) 进行二级结构预测。当候选 miRNAs 位于二级茎环结构的臂上, 并满足 miRNAs 的判断要求, 则确认为米碎花特有的 miRNAs^[10]。

经过质量控制程序处理和一系列非目标序列过滤处理后, 分别构建米碎花 miRNAs 文库、喂食米碎花小鼠血浆和肝脏 miRNAs 文库及正常小鼠血浆和肝脏 miRNAs 文库^[11], 用于后续数据分析。

1.5 米碎花药效 miRNAs 的实时荧光定量 PCR (RTFQ-PCR) 验证

筛选喂食米碎花与不喂食米碎花小鼠血浆和肝脏中的差异 miRNAs, 并与米碎花 miRNAs 作比对, 获得通过喂食进入血液的米碎花 miRNAs, 即米碎花药效 miRNAs。采用 RTFQ-PCR 法^[12], 检测米碎花 miRNAs、喂食米碎花小鼠血浆 miRNAs 和正常小鼠血浆 miRNAs 的表达丰度, 验证小鼠体内检出的米碎花 miRNAs。

1.6 miRNAs 靶基因预测及其功能分析

使用 TargetScan 和 miRanda 软件对筛选出的 miRNAs 分别进行靶基因预测。对 2 款软件预测出的靶基因分别按照每款软件的评分标准进行筛选。TargetScan 算法中去除 context score percentile 小于 50 的靶基因, miRanda 算法中去除最大自由能

(max-energy) 大于-10 的靶基因。最后取交集作为目标 miRNAs 的最终靶基因^[13]。最后对各个 miRNAs 的靶基因分别进行基因功能聚类 (gene ontology, GO) 和 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway 分析, 构建 miRNAs 与靶基因的网络信号图。

2 结果

2.1 样本保守 miRNAs 鉴定及米碎花新 miRNAs 发现

依据 miRNAs 基因在动植物中广泛保守这一特性, 按照生物信息分析流程, 将米碎花、小鼠全血和肝组织样本高通量测序获得的原始数据与 miRBase

数据库及相关基因组序列比对, 筛选分析后获得样本已知 miRNAs 及全新的 miRNAs 基因共 3 545 个。

依据实验原则, 分析鉴定喂食米碎花与不喂食米碎花小鼠血浆和肝脏中的差异 miRNAs, 并与米碎花 miRNAs 作比对, 从上述差异 miRNAs 中筛选得到 15 个米碎花 miRNAs (表 1)。进一步采用 RTFQ-PCR 法, 验证得到的 15 个 miRNAs 在米碎花及喂食米碎花小鼠血浆和肝脏中的表达丰度, 最终鉴定出 5 个米碎花 miRNAs (MiR001、MiR002、MiR003、MiR004 和 MiR005), 可在米碎花及喂食米碎花小鼠血浆和肝脏中稳定表达, 相对表达量见图 1。

表 1 鉴定得到的米碎花 miRNAs

Table 1 Identified miRNAs of *E. chinensis*

miRNAs	miRNAs 序列	长度/nt	二级结构长度/nt	碳端	GC/%	自由能/(kJ·mol ⁻¹)
MiR001	TGGTAGTAGGTGGTAGTGGTAG	22	108	3'	46.3	-38.7
MiR002	TGTCAGTTTGTCAAATAAG	19	128	5'	39.9	-37.0
MiR003	GTAGGTGAGTGTGTGGTAGGT	21	95	3'	41.4	-44.7
MiR004	GGGTGCAGAGACAGCCAGG	19	50	3'	55.4	-22.2
MiR005	GTTTGGTTGGAGGATTGG	19	104	5'	25.9	-17.9
MiR006	AACTTCGGGAAAAGGATT	18	117	5'	40.7	-31.9
MiR007	CGAGACAGCAGTAGACCC	18	128	5'	38.1	-38.5
MiR008	AGAGATGCGTAGCTGATGG	19	86	3'	50.6	-33.4
MiR009	GGGTGGTGATTGGAGGAGC	19	146	3'	38.2	-44.5
MiR010	ATGTTGAGCTCCCGGAGGC	19	58	3'	62.5	-28.2
MiR011	GTAAACAGGAAGAGAAGTC	19	91	3'	49.5	-29.3
MiR012	ATGTGAATGTGAATGTGAATGTGA	24	180	5'	41.4	-51.0
MiR013	GCACGAGAGACTTCTGGGAG	20	127	3'	51.9	-46.7
MiR014	CTCGGATTGTGCCTTGGGCC	20	70	3'	61.3	-25.9
MiR015	GGAGGGAAGCGGATGGGGG	19	76	5'	54.9	-31.3

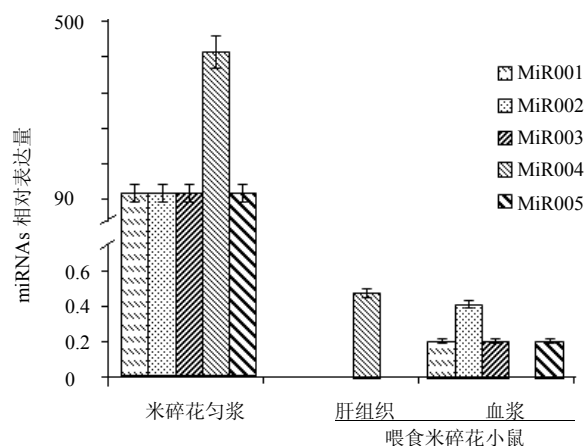


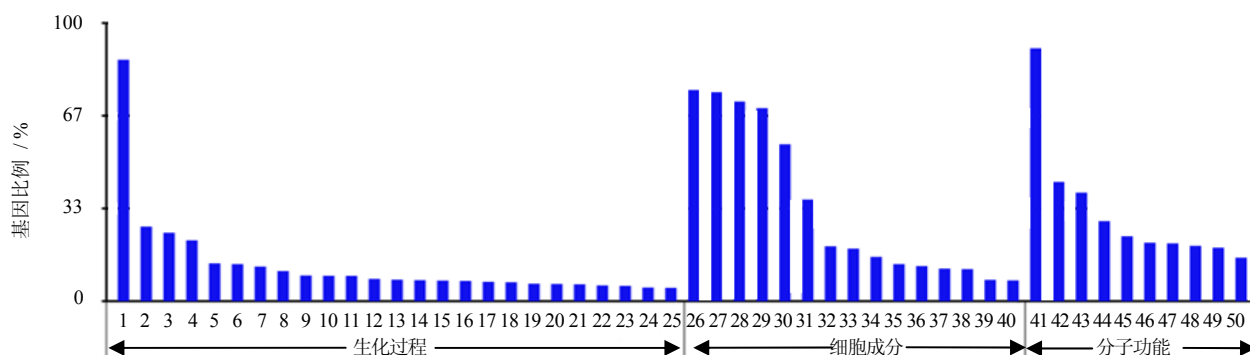
图 1 米碎花及喂食米碎花小鼠血浆和肝脏中稳定表达的 5 个 miRNAs 相对表达量

Fig. 1 Relative expression of five stable expressed miRNAs in *E. chinensis* and liver and plasma of mice administered by extract from *E. chinensis*

2.2 药效 miRNAs 的靶基因预测及其功能分析

对上述鉴定所得的 5 个米碎花 miRNAs 采用 TargetScan 与 MiRanda 软件, 以人类 mRNA 为靶标, 进行靶基因预测, 共预测得到这 5 个米碎花 miRNAs 可能调控的 2 596 个靶基因, 并进一步对这些靶基因经 GO 分析, 可知鉴定所得的 5 个米碎花 miRNAs 可能调控的靶基因的宏观功能范畴。发现这些靶基因主要在生化过程、细胞成分和分子功能三大区域发挥功能 (图 2), 参与基因转录、信号转导、细胞周期等重要的生物学过程, 发挥蛋白结合、转录因子活化、受体结合及活化、核酸结合、DNA 结合和转移酶活化等生物学功能。

KEGG 通路数据库可提供生物物质相互转化所有可能的代谢途径, 通过 pathway 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信



1-生化过程 2-DNA 依赖的转录调控 3-DNA 依赖的转录 4-转运 5-信号转导 6-代谢过程 7-多细胞组织发展 8-磷酸化 9-RNA 多聚酶 2 转录的正向调控 10-蛋白磷酸化 11-氧化还原过程 12-DNA 依赖的转录正向调控 13-细胞分化 14-RNA 多聚酶 2 转录的逆向调控 15-细胞周期 16-离子转运 17-凋亡 18-蛋白转运 19-蛋白水解 20-DNA 依赖的转录逆向调控 21-G 蛋白偶联受体信号通路 22-细胞黏附 23-跨膜转运 24-细胞增殖正向调控 25-凋亡逆向调控 26-细胞膜 27-细胞成分 28-细胞质 29-细胞核 30-膜的完整性 31-细胞膜 32-线粒体 33-胞内区 34-胞外区 35-内质网 36-高尔基体 37-细胞质基质 38-细胞骨架 39-细胞外隙 40-细胞连接 41-分子功能 42-蛋白结合 43-金属离子结合 44-核苷酸结合 45-DNA 结合 46-转移酶活性 47-ATP 结合 48-锌离子结合 49-水解酶活性 50-受体活性

1-biological process 2-regulation of transcription dependent by DNA 3-transcription dependent by DNA 4-transport 5-signal transduction 6-metabolic process 7-multicellular organismal development 8-phosphorylation 9-positive regulation of transcription of RNA polymerase 2 10-protein phosphorylation 11-oxidation-reduction process 12-positive regulation of transcription dependent by DNA 13-cell differentiation 14-negative regulation of transcription of RNA polymerase 2 15-cell cycle 16-ion transport 17-apoptosis 18-protein transport 19-proteolysis 20-negative regulation of transcription dependent by DNA 21-G protein coupled receptor signaling pathways 22-cell adhesion 23-transmembrane transport 24-positive regulation of cell proliferation 25-negative regulation of apoptosis 26-membrane 27-cellular components 28-cytoplasm 29-nucleus 30-integrity of membrane 31-plasma membrane 32-mitochondria 33-intracellular region 34-extracellular region 35-endoplasmic reticulum 36-Golgi apparatus 37-cytosol 38-cytoskeleton 39-extracellular space 40-cell junction 41-molecular function 42-protein binding 43-metal ion binding 44-nucleotide binding 45-DNA binding 46-transferase activity 47-ATP binding 48-zinc ion binding 49-hyrolase activity 50-receptor activity

图 2 GO 分析获得的靶基因功能
Fig. 2 Functions of target microRNAs by GO analysis

号转导途径^[14]。采用 DAVID 程序对 5 个米碎花 miRNAs 进行预测靶基因的生物学通路 KEGG 分析,以 F 检验 $P < 0.001$ 为基准,筛选出 5 个米碎花 miRNAs 主要参与的 24 条信号通路,其中显著的通路 ($P < 1 \times 10^{-6}$) 有 7 个,分别是急性髓性白血病、前列腺癌、T 细胞受体、丙型肝炎、ErbB、子宫内膜癌和 MAPK 信号通路(图 3)。可知,米碎花药效 miRNAs 主要参与肿瘤、代谢和炎症等信号通路。

图 4 为 MAPK 信号通路示意图(灰色标记部分为 miRNAs 可能干预的靶点),是米碎花药效 miRNAs 抗炎效应的主要作用通路。

3 讨论

核酸是生命的最基本物质之一,具有贮存和传递遗传信息的生物功能。早在 1990 年 Ellington 等^[15]和 Tuerk 等^[16]即发表了有关核酸药物的科研成果,而核酸类成分也是很多中药的活性成分,其广泛存在于冬虫夏草、板蓝根、灵芝等中药材中,其量的多少已作为此类中药材的质量控制指标。

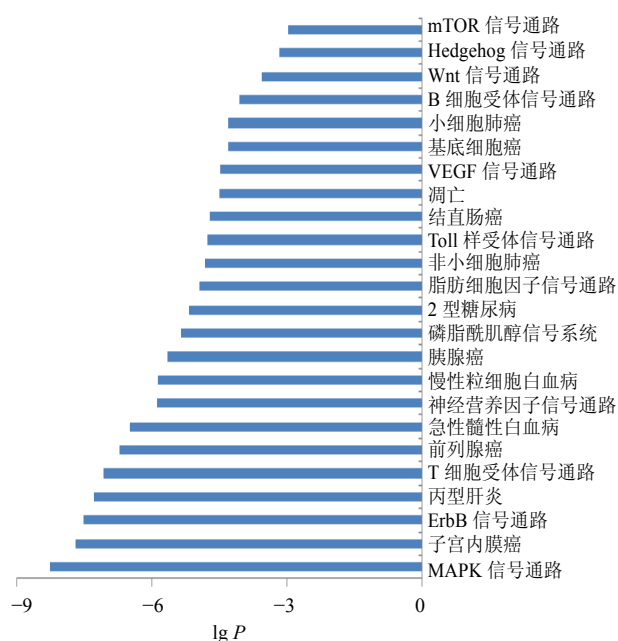


图 3 米碎花药效 miRNAs 主要参与的信号通路
Fig. 3 Main signal pathways of pharmacodynamic miRNAs of *E. chinensis*

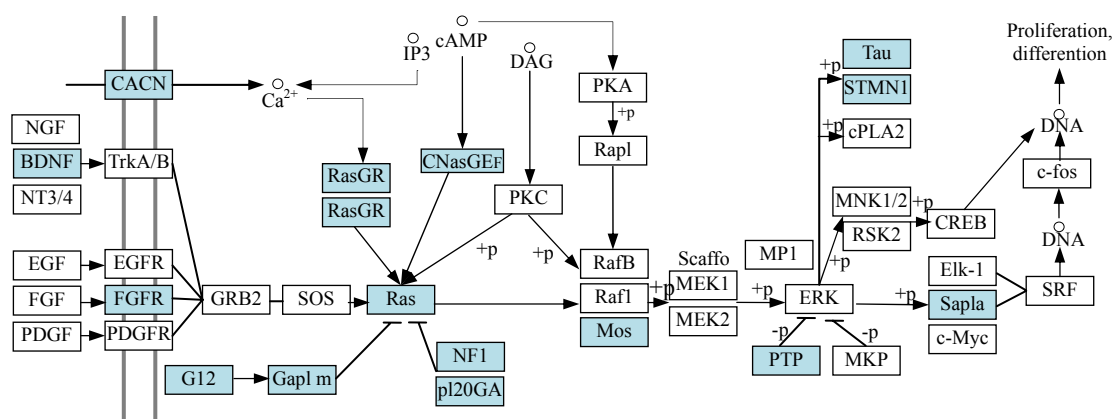


图 4 MAPK 信号通路示意图

Fig. 4 Schematic diagram of MAPK signal pathway

由于核酸类化合物特殊的药理活性，在医药领域已受到越来越多的重视。随着基因工程技术的不断进步，核酸药物研发愈趋成熟，已有大量的医药企业及技术公司提供核酸合成、结构鉴定及活性评估等一系列商品化服务。尽管其药效显著，但由于受到核酸编码长度及结构稳定性的影响，该类药物多采用 iv 方式给药，鲜有口服制剂。

2011 年南京大学 Zhang 等^[6]的研究首次提出：外源性的植物 miRNAs 可以通过进食的方式摄入体内。其中，miR-168a 是一种稻米中富含的同时也是中国人血清中量最为丰富的一种植物 miRNAs。它可与人或小鼠的低密度脂蛋白受体接头蛋白 1 (LDLRAP1) 的 mRNA 结合，抑制其在肝脏的表达，进而减缓低密度脂蛋白从血浆中的清除，说明食物中的外源性植物 miRNAs 可以通过调控哺乳动物体内靶基因表达的方式影响摄食者的生理功能。这一发现除了拓展 miRNAs 的功能、揭示动植物间相互作用的新途径以外，也可能提示 miRNAs 是植物药存在的一类新的药效活性成分。随后，Zhang 等^[17]发现，大豆、玉米（根、叶及种子）、大枣中的一些 miRNAs 均可以通过日常饮食吸收进入血内，并具有一定的组织分布选择性。

由于植物的 miRNAs 与动物的基因组的序列没有 100% 的一致序列，因此动物血清中发现的植物 miRNAs 绝对是植物的^[6]，而不是动物内源性 miRNAs 或动物内源性 RNA 碎片。植物来源的 miRNAs 由于其基因编码末端本身是 2-O-甲基化修饰的，其化学结构更为稳定，即使采用高碘酸钠、福尔马林等强氧化剂、强腐蚀剂进行处理，其结构

亦不产生影响；即使经过了高温蒸煮、消化系统的代谢等过程，植物来源 miRNAs 结构依然未有降解，仍然可在血液中检出，表明了植物 miRNAs 结构的高度稳定性^[18]。本研究以米碎花 miRNAs 为模版，在喂食米碎花的小鼠肝脏及全血中共检测获得 5 个全新的米碎花 miRNAs，且均具有中度以上表达（拷贝数 10 为中度表达，10 以上为高度表达）。采用 RTFQ-PCR，确证了上述米碎花 miRNAs 可在灌食米碎花匀浆的小鼠肝脏或血浆中检测获得，即证明上述米碎花 miRNAs 可在种间“穿梭”，通过饮食途径、消化吸收进入体内。并进一步通过靶基因预测及 GO 与 KEGG pathway 分析判定，发现其作用的靶基因主要在生化过程、细胞成分和分子功能三大区域发挥功能，米碎花 miRNAs 主要参与了细胞间信号转导、细胞周期、生长、凋亡等重要的生物学过程，可对 MAPK 受体、细胞凋亡、肿瘤增殖等信号通路多个转录因子具有调控作用，提示米碎花 miRNAs 可能具有潜在的药效作用。证明 miRNAs 可能是一类新型的中药药效物质。然而，植物 miRNAs 作为外源性基因进入体内不得不考虑类似于转基因食品安全性的问题；由于其药效靶标的多样性，是否会对机体的正常功能产生影响，以及其药效作用的确认还有待于进一步的实验论证。

参考文献

- [1] 陈修平, 寻克丽, 王一涛. 中药复方药效物质基础的系统药理学评价 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 1-5.
- [2] Potts M B, Kim H S, Fisher K W, *et al.* Using functional signature ontology (fusion) to identify mechanisms of action for natural products [J]. *Sci Signal*, 2013, 6(297):

- ra90.
- [3] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. MiRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay [J]. *Science*, 2012, 336(6078): 237-240.
- [4] 周芳名, 白志川, 卢善发. 药用植物 microRNA [J]. 中草药, 2013, 44(2): 232-237.
- [5] Chapman E J, Carrington J C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways [J]. *Nat Rev Gene*, 2007, 8(11): 884-896.
- [6] Zhang L, Hou D, Chen X, *et al.* Exogenous lant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2011, 22(1): 107-126.
- [7] 刘新红, 黄日明, 李干龙, 等. 米碎花茎枝的化学成分研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(6): 572-576.
- [8] 余陈欢, 应华忠, 钟宇森, 等. 茶树来源的 3 种 MciRNA 及其应用: 中国, CN 103816549 A [P]. 2014-05-28.
- [9] Lan, Zhang D M, Chen W M, *et al.* Advances in the study of structural modifications and biological activities of betulinic acids [J]. *Acta Harma Sin B*, 2010, 45(11): 1339-1345.
- [10] Meyers B C, Axtell M J, Bartel B, *et al.* Criteria for annotation of lant MicroRNAs [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3186-3190.
- [11] Yuan Z, Liu H, Nie Y, *et al.* Identification of novel microRNAs in rimates by using the syntenic information and small RNA deep sequencing data [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10): 20820-20832.
- [12] 赵春丽, 李先恩, 都晓伟, 等. 地黄 microRNAs 和靶基因的生物信息学预测及验证 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1129-1135.
- [13] Rao Z, He W, Liu L, *et al.* Identification, expression and target gene analyses of MicroRNAs in *Spodoptera litura* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37730.
- [14] 平军娇, 张 珍, 蔡振锋, 等. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 557-561.
- [15] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822.
- [16] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
- [17] Zhang Y, Wiggins B E, Lawrence C, *et al.* Analysis of lant-derived miRNAs in animal small RNA datasets [J]. *BMC Genomics*, 2012, 8(13): 381-388.
- [18] Liang H, Zen K, Zhang J, *et al.* New roles for microRNAs in cross-species communication [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(3): 367-370.