

## 降解组测序技术对人参 miRNA 靶基因的分析鉴定

王颖芳<sup>1,2</sup>, 王文娟<sup>1</sup>, 彭朦媛<sup>1</sup>, 陈艳琳<sup>1</sup>, 何枝华<sup>1</sup>, 曹晶晶<sup>1</sup>, 戴王强<sup>1</sup>, 林志云<sup>1</sup>, 杨泽民<sup>3</sup>, 龚梦鹃<sup>1</sup>, 尹永芹<sup>1</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 广东药科大学基础学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 分析鉴定人参 miRNA 靶基因。方法 采用降解组测序技术对石柱参 (Shizhu ginseng)、园参 (Yuan ginseng) 的 miRNA 及靶基因进行检测; 利用公共数据库 KEGG/NR/GO 数据库对降解组基因进行功能注释; 通过荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术验证石柱参、园参的 miRNA 及靶基因表达量。结果 共得到 8 个 miRNA 家族的 13 个靶基因; 利用 KEGG/NR/GO 数据库分析发现该 miRNA 的靶基因类型主要是转录因子、应答因子及信号转导通路等。对 5 个差异表达 miRNAs: aqc-miR-159、bdi-miR162、cpa-miR319、pgi-miR4376、smo-miR396 及其靶基因进行的 qRT-PCR 验证结果与降解组测序结果一致。结论 明确了部分人参 miRNA 的靶基因, 为进一步研究人参 miRNA 的可能功能奠定基础。

**关键词:** 人参; 石柱参; 园参; miRNA; 靶基因; 降解组测序

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0945-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.023

## Identification of miRNA target genes in *Panax ginseng* by degradome sequencing analysis

WANG Ying-fang<sup>1,2</sup>, WANG Wen-juan<sup>1</sup>, PENG Meng-yuan<sup>1</sup>, CHEN Yan-lin<sup>1</sup>, HE Zhi-hua<sup>1</sup>, CAO Jing-jing<sup>1</sup>, DAI Wang-qiang<sup>1</sup>, LIN Zhi-yun<sup>1</sup>, YANG Ze-min<sup>3</sup>, GONG Meng-juan<sup>1</sup>, YIN Yong-qin<sup>1</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Engineering&Technology Research Center of topical precise drug delivery system, Guangzhou 510006, China

3. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To analyze and identify ginseng miRNA. **Methods** The miRNA and target genes of Shizhu ginseng and Yuan ginseng were detected by the degradation sequencing technology; Functional annotation of Degradome genes was carried out using public databases of KEGG/NR/GO database; The expression of miRNA and target genes of Shizhu ginseng and Yuan ginseng was determined by real time fluorescence quantitative PCR technique. **Results** A total of 13 target genes of eight miRNA families were obtained; The target gene type of miRNA was mainly transcriptional factor, response factor, and signal transduction pathway by means of KEGG/NR/GO database analysis. The results of real time fluorescence quantitative PCR verification of aqc-miR-159, bdi-miR162, cpa-miR319, pgi-miR4376, smo-miR396 and its target genes were basically consistent with the expression of miRNA and target genes from the degradation group. **Conclusion** The target genes of partial *Panax ginseng* miRNA is clarified, which lays the foundation for further study of the possible function of ginseng miRNA.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Mey.; Shizhu ginseng; Yuan ginseng; miRNA; target gene; degradation sequence analysis

microRNA (miRNA) 是一类内源性非编码小 RNA, 长度为 20~24 个核苷酸<sup>[1]</sup>。miRNA 在植物中广泛存在, 并通过剪切靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译, 对基因表达发挥调节作用。降解组测序技

术 (degradome sequencing) 能够高通量鉴定植物 miRNA 的靶基因<sup>[2-3]</sup>, 并对靶基因的功能进行系统全面注释。

人参是应用历史悠久的名贵中药, 具有提高免

收稿日期: 2018-09-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81403195); 广东省自然科学基金项目 (S2013010015418)

作者简介: 王颖芳, 博士/博士后, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药方剂学研究。E-mail: 150306757@qq.com

疫力<sup>[4]</sup>、增强记忆力<sup>[5]</sup>、改善心血管<sup>[6]</sup>、延缓衰老<sup>[7]</sup>和抗肿瘤<sup>[8]</sup>等多种药理作用。目前对人参主要有效成分研究较多的是人参皂苷和多糖等,尚不能全面揭示人参在临床上的疗效机制。

本实验室前期研究已检测到新鲜人参中含有大量的 miRNAs<sup>[9]</sup>。本研究采用降解组测序的方法,分别对新鲜石柱参(*Shizhu ginseng*)、园参(*Yuan ginseng*)进行测序分析,鉴定出两者差异相关 miRNAs 的靶基因并进行验证,为进一步研究人参 miRNAs 的可能作用奠定基础。

## 1 材料

选用长白山新鲜 15 年生石柱参、6 年生园参均来自吉林抚松万良长白山人参市场,经广东药科大学中药学院马鸿雁副教授鉴定为人参属草本植物 *Panax ginseng* C. A. Mey.。将 2 种新鲜人参的主体根分别于自来水下冲洗去除黏附的泥土,置 70%乙醇中消毒 1 min,再经无菌水冲洗后,置于消毒滤纸上吸干水分,切碎成块,经液氮速冻后,分装后放入-80 °C 冰箱中保存。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取及纯化

**2.1.1 总 RNA 提取** 用液氮将已经切块备用的(各约 200 mg)石柱参和园参样品分别在不同的研钵中研磨至细碎,转移到无菌无酶的 1.5 mL Eppendorf 管中,按 Trizol 法提取总 RNA,加入 20~30 μL 经 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA,-80 °C 保存备用,或紧接着进行 DNase I 处理。

**2.1.2 总 RNA 纯化** 取 20~50 μg RNA 样品,5 μL 10×DNase I Buffer,2 μL(10 units)Recombinant

DNase I, 1 μL(20 units)RNase Inhibitor,最后加入 DEPC 处理的去离子水至 50 μL 的反应体系,于 37 °C 反应 20~30 min,热处理使 Recombinant DNase I 失活。加入 10 μL 3 mol/L 醋酸钠和 250 μL 冷乙醇,混匀后-80 °C 放置 20 min。4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清(不要触底部)。加入 1 mL 的 70%冷乙醇洗净,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。干燥沉淀。用适量的 DEPC 处理的去离子水溶解 RNA,并采用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

### 2.2 文库构建与测序

将检测合格的总 RNA 委托上海欧易生物公司进行 Illumina HiSeq TM2000 测序。

### 2.3 数据分析

高通量测序得到的数据,去接头,去低质量 reads,去污染等得到干净的目的序列(clean tags)。选取 Rfam 和 Genbank 数据库检索 clean tags 序列信息,尽可能去除注释上的 ncRNA: rRNA、scRNA、snoRNA 等,选用未注释上的 tags 与参考基因组(Unigenes)进行比对,获得 cDNAsense,进行 miRNA 降解组位点的预测与分析。应用 CleaveLand3<sup>[10]</sup>软件分析( $P < 0.05$ ),确定 miRNA 靶基因。

### 2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证差异表达 miRNAs 及其靶基因

选取石柱参、园参中 5 个差异表达 miRNA: aqc-miR-159、bdi-miR162、cpa-miR319、pgi-miR4376、smo-miR396,对 5 条 miRNAs 及其靶基因进行 qRT-PCR 验证(表 1)。按照 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)进行。

表 1 qRT-PCR 验证的 miRNAs 的引物序列  
Table 1 Primer sequence of miRNAs verified by qRT-PCR

| miRNA      | 序列 (5'→3')                                   | 产物长度/bp |
|------------|----------------------------------------------|---------|
| miR159-F   | ACACTCCAGCTGGGTTTGGATTGAAGGGAGCT             | 71      |
| miR159-RT  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTAGAGCTC | 71      |
| miR162-F   | ACACTCCAGCTGGGTCGATAAACCTCTGCATC             | 71      |
| miR162-RT  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTGGATGC | 71      |
| miR319-F   | ACACTCCAGCTGGGTTGGACTGAAGGGAGCTC             | 71      |
| miR319-FT  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGGGAGCT | 71      |
| miR396-F   | ACACTCCAGCTGGGTTCCACAGCTTTCTTGAA             | 71      |
| miR396-RT  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAGTTCAA | 71      |
| miR4376-F  | ACACTCCAGCTGGGTTGGCATTCTGTCCACC              | 71      |
| miR4376-FT | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGAGGTGG | 70      |

### 3 结果与分析

#### 3.1 人参 RNA 的提取与鉴定

结果如图 1 所示,石柱参与园参提取的总 RNA 在凝胶上的位置,总 RNA 28 S 和 18 S 2 条特征条带清晰,亮度比接近 2:1,5 S 条带显示模糊,表明总 RNA 较完整,没有降解,也无明显的基因组 DNA 污染。Nanodrop 检测结果显示,总 RNA 在 260 nm 处有正常单峰,  $A_{260}/A_{280}$  均在 1.8~2.2。Agilent2100 检测结果显示,28 S/18 S 均大于 1.5, RNA 完整性指数 (RNA Integrity number, RIN) 均大于 8,检测结果为 A,表明样品总 RNA 的降解程度较低,完整性较好,能够满足下一步的建库及测序要求。

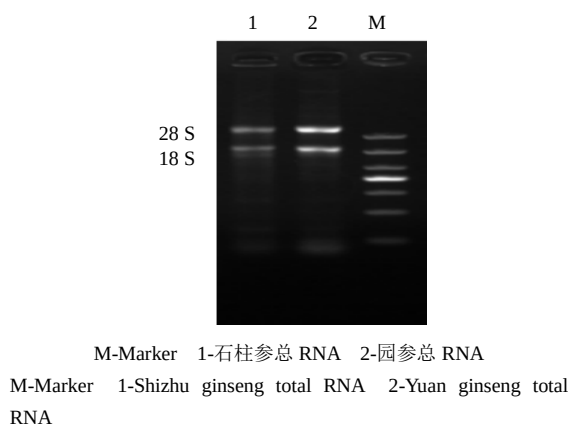


图 1 石柱参与园参总 RNA 电泳图

Fig. 1 RNA electrophoresis of Shizhu ginseng and Yuan ginseng

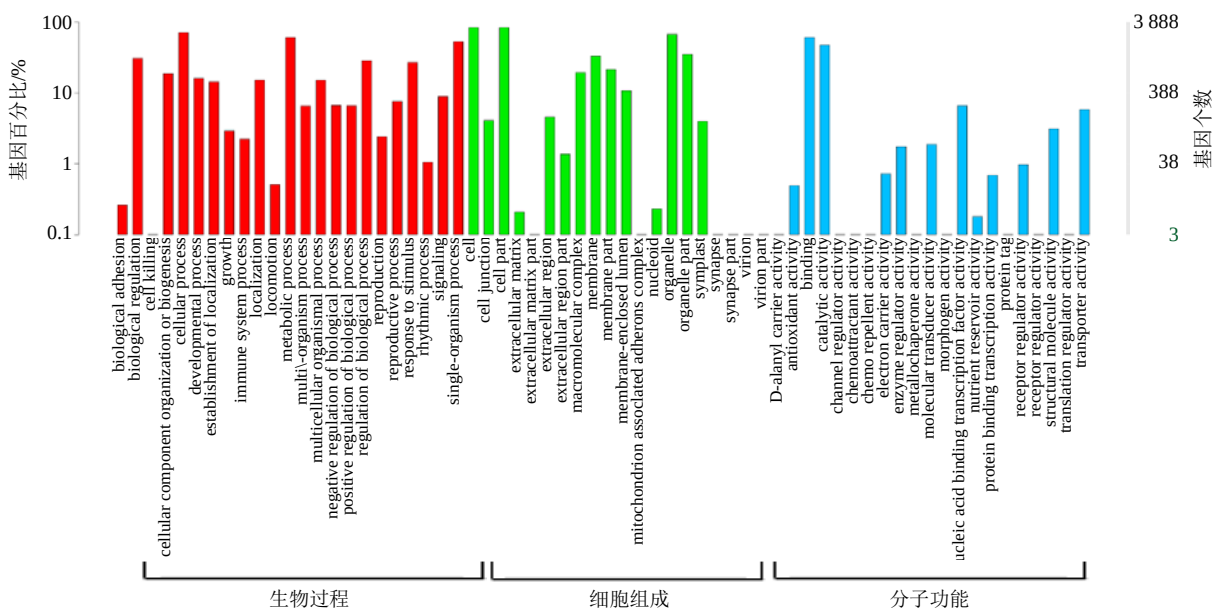


图 3 石柱参与园参 miRNA 靶基因的 GO 注释统计

Fig. 3 Classification of GO function of ginseng miRNA target gene of Shizhu ginseng and Yuan ginseng

#### 3.2 降解基因功能注释

对降解组文库注释到的 2 样本共有及特有基因进行分析 (表 2 和图 2、3), 鉴定到 miR156 的靶基因共有 3 个, 分别为 SPL17\_ORYSJ、SPL7\_ORYSI、DNJH\_CUCSA, 这 3 个靶基因功能分别为 SPL 转录因子、SBP (squamosa promoter-binding-like protein) 蛋白家族及调节蛋白 DnaJ, 与已报道的拟南芥 miR156 的靶基因同源。

表 2 石柱参与园参降解基因功能注释统计

Table 2 Statistics results of gene functional annotation of Shizhu ginseng and Yuan ginseng

| 注释数据库 | 基因数目   |
|-------|--------|
| Nr    | 11 767 |
| KEGG  | 11 655 |
| GO    | 10 705 |
| 总数    | 12 915 |

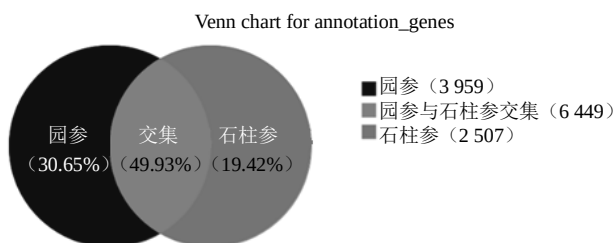


图 2 石柱参与园参共有及特有降解基因

Fig. 2 Common and specific degradation genes of Shizhu ginseng and Yuan ginseng

鉴定 miR164 的 5 个靶基因中有 3 个编码 NAC 功能域的转录因子, 还有一些编码非特征性蛋白, 这些靶基因的验证与已有报道基本吻合 (表 3), 说明了本降解组文库的真实性。

### 3.3 保守 miRNA 的靶基因

将 miRNA 序列与 mRNA 序列的配对预测和降解组密度文件 (degradome density file) 结果相结合进行靶基因的精确预测, 共发现 8 个 miRNAs 对应的 13 个靶基因 (表 4)。

### 3.4 qRT-PCR 验证差异表达 miRNAs 和靶基因

选中 aqc-miR159、bdi-miR162、cpa-miR319、pgi-miR4376、smo-miR396 5 个差异表达 miRNAs, 采用 qRT-PCR 技术验证其在园参与石柱参中的表达。包括 smo-miR396 调控的 GRF1\_ARATH; bdi-miR162 调控的 DCL1\_ARATH; pgi-miR4376 调控的 ACA8\_ARATH 和 aqc-miR159/cpa-miR319 调控的 GAM1\_ORYSI。结果显示, 大多数靶基因的表

达模式与对应的 miRNA 呈负调控关系; pgi-miR4376 调控的 ACA8\_ARATH 结果显示呈负性调控关系, 说明不同品种存在着复杂的 miRNA 调控; 由于 smo-miR396 的靶基因有多条, 选取其中一条靶基因验证, 结果显示不呈负调控关系, 可见 GRF1\_ARATH 并非人参 miR396 的靶基因 (图 4)。5 条 miRNAs 验证结果与高通量测序基本一致, 说明本研究高通量测序结果的准确性高。

## 4 讨论

伴随着高通量测序技术的发展, 降解组测序技术可以成功鉴定出低表达丰度的 miRNA 靶基因<sup>[11-12]</sup>, 在预测植物 miRNA 靶基因中被广泛应用<sup>[13-14]</sup>。本实验在降解组测序后, 根据分析将 miRNA 序列与 mRNA 序列的配对预测和降解组密度文件 (degradome density file) 的结果相结合, 进行靶基因的精确预测, 共发现 8 个 miRNAs 对

表 3 降解组测序获得的靶基因注释

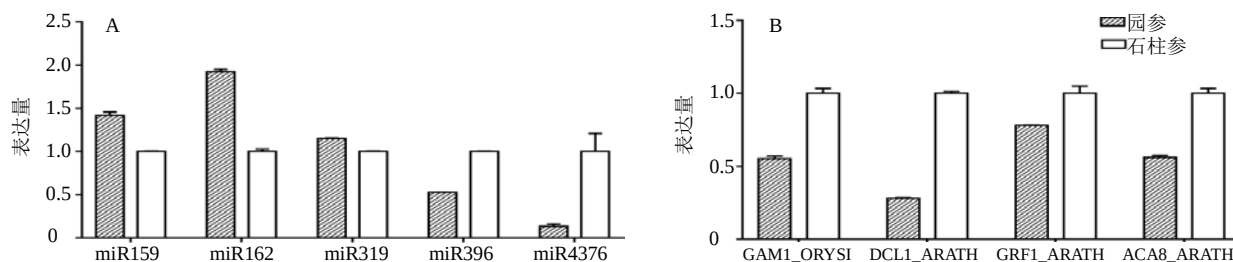
Table 3 Annotation of degradome sequencing

| 靶基因          | 靶基因注释                                                                 | 切割位点  | 分值  | 类别 | cDNA 长度/bp |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|-------|-----|----|------------|
| SPL17_ORYSJ  | promoter-binding protein SPL9                                         | 1 405 | 0.5 | 0  | 1 944      |
| SPL7_ORYSI   | squamosa promoter-binding protein                                     | 13    | 1.5 | 0  | 503        |
| DNJH_CUCSA   | DnaJ                                                                  | 1 185 | 4.0 | 4  | 1 946      |
| GAM1_ORYSI   | transcription factor GAMYB                                            | 1 699 | 2.0 | 0  | 2 712      |
| TCP24_ARATH  | TCP transcription factor                                              | 2 017 | 3.5 | 0  | 2 920      |
| ARFR_ORYSJ   | auxin response factor                                                 | 2 085 | 1.5 | 0  | 3 295      |
| NC100_ARATH  | NAC domain-containing protein                                         | 93    | 2.0 | 0  | 683        |
| NAC98_ARATH  | protein CUP-SHAPED                                                    | 848   | 2.5 | 0  | 1 339      |
| NAC22_ARATH  | NAC domain-containing protein                                         | 805   | 2.5 | 0  | 984        |
| ATB15_ARATH  | DNA binding protein                                                   | 1 635 | 3.5 | 0  | 3 786      |
| ARFF_ARATH   | auxin response factor                                                 | 3 808 | 3.0 | 0  | 4 230      |
| AGO1_ARATH   | AGO1                                                                  | 833   | 3.0 | 0  | 3 919      |
| TIF6B_ARATH  | JAZ3                                                                  | 1 129 | 4.0 | 0  | 1 525      |
| NFYA1_ARATH  | CCAAT-box binding factor HAP2 homolog                                 | 1 519 | 4.5 | 0  | 2 059      |
| AP2_ARATH    | ethylene-responsive transcription factor                              | 2 291 | 3.0 | 0  | 2 643      |
| DAPB3_PSEMX  | uncharacterized protein                                               | 1 897 | 4.0 | 2  | 2 850      |
| RH46_ARATH   | DEAD-box ATP-dependent RNA helicase                                   | 1 997 | 4.5 | 2  | 2 395      |
| AFB2_ARATH   | protein auxin signaling F-BOX                                         | 2 206 | 3.0 | 0  | 2 620      |
| TIR1_ARATH   | transport inhibitor response 1                                        | 1 913 | 4.0 | 0  | 2 607      |
| GRF6_ORYSJ   | uncharacterized protein                                               | 1 107 | 3.0 | 0  | 2 498      |
| GRF3_ORYSJ   | growth-regulating factor 3                                            | 836   | 2.0 | 0  | 2 009      |
| UBC24_ARATH  | ubiquitin-conjugating enzyme E2                                       | 771   | 0.5 | 2  | 4 443      |
| CLPAA_SOLLIC | ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4A      | 1 467 | 3.0 | 2  | 3 419      |
| ETO1_ARATH   | ethylene-overproduction                                               | 1 419 | 3.0 | 0  | 3 625      |
| TMVRN_NICGU  | TMV resistance protein N                                              | 998   | 3.0 | 2  | 3 607      |
| TMVRN_NICGU  | ATP binding protein                                                   | 211   | 3.0 | 4  | 717        |
| R13L4_ARATH  | disease resistance RPP13-like protein 4-like                          | 897   | 2.0 | 2  | 3 196      |
| R13L1_ARATH  | putative disease resistance protein At3g14460                         | 576   | 2.5 | 4  | 4 273      |
| CAR11_ARATH  | probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD11-like | 341   | 2.5 | 4  | 1 101      |
| ACA8_ARATH   | autoinhibited calcium ATPase                                          | 328   | 3.0 | 0  | 739        |
| GAE6_ARATH   | UDP-glucuronate 4-epimerase                                           | 189   | 3.5 | 0  | 892        |
| DNAJH_SYNY3  | hypothetical protein PRUPE                                            | 294   | 4.5 | 0  | 2 443      |

表 4 降解组鉴定人参 miRNA 靶基因信息

Table 4 Identification of ginseng miRNA target gene information by degradome sequencing

| miRNA       | 靶基因注释                                  | 靶基因         | 切割位点  | 分值  | 类别 | cDNA 长度/bp |
|-------------|----------------------------------------|-------------|-------|-----|----|------------|
| aqc-miR159  | transcription factor GAMYB             | GAM1_ORYSI  | 1 699 | 2.5 | 0  | 2 712      |
| bdi-miR162  | endoribonuclease Dicer homolog1        | DCL1_ARATH  | 4 288 | 1.5 | 0  | 6 288      |
| cpa-miR319  | transcription factor GAMYB             | GAM1_ORYSI  | 1 699 | 1.0 | 0  | 2 712      |
| cme-miR166  | homeobox-leucinezipper protein         | REV_ARATH   | 1 105 | 2.0 | 0  | 3 470      |
|             | DNA binding protein                    | ATB15_ARATH | 1 635 | 2.0 | 0  | 3 786      |
| pgi-miR4376 | auto-inhibitedcalcium ATPase           | ACA8_ARATH  | 328   | 3.0 | 0  | 739        |
| smo-miR396  | hypothetical protein                   | GRF1_ARATH  | 120   | 2.0 | 0  | 1 386      |
|             | growth-regulating factor               | GRF3_ORYSJ  | 836   | 2.0 | 0  | 2 009      |
|             | unnamed protein product                | GRF4_ORYSJ  | 848   | 2.0 | 0  | 2 239      |
|             | growth-regulating factor               | GRF6_ORYSJ  | 1 107 | 2.0 | 0  | 2 498      |
|             | uncharacterized protein                | RPD1_ARATH  | 1 849 | 2.0 | 0  | 3 153      |
| comp46638   | SPX domain-containing membrane protein | SPXM3_ARATH | 376   | 1.5 | 0  | 3 251      |
| comp65451   | tir-nbs-lrr resistance protein         | TMVRN_NICGU | 852   | 1.5 | 2  | 1 834      |



A-差异 miRNA qRT-PCR 验证 B-差异靶基因 qRT-PCR 验证  
A-qRT-PCR validation of differentially expressed miRNAs B-qRT-PCR validation of differentially expressed target genes

图 4 差异 miRNA 及靶基因 qPCR 验证

Fig. 4 Validation of differential miRNAs and target genes by qPCR

应的 13 个靶基因。包括 6 个已知 miRNAs: aqc-miR-159、bdi-miR162、cpa-miR319、cme-miR166i、pgi-miR4376、smo-miR396, 以及 2 个新 miRNAs: comp65451、comp46638。

利用 Nr、KEGG、GO 等数据库对这些靶基因进行功能注释及代谢通路分析, 发现这些 miRNA 的靶基因类型主要是转录因子、应答因子及信号转导通路等, 与 miRNA 主要在基因转录后水平进行调控基本一致。miR159 和 miR319 共同靶向 MYB 结构域蛋白家族<sup>[15]</sup>; miR396 的 5 个靶基因主要为 GRF 生长因子 (growth-regulating factor), 与拟南芥中的靶基因同源; 人参特有的非保守 pgi-miR4376 靶基因为 ACA8\_ARATH, 属于编码钙通道阻滞剂类型; 新 miRNA comp65451 靶基因与 TIR NBS-LRR 抗病蛋白的调控有关, 可能是人参物种特异的新 miRNA, 有待进一步研究。

已有研究表明, 外源 miRNA 可被吸收并能从哺乳动物组织检测到<sup>[16-17]</sup>。丹参、地黄等中药中一些 miRNA 可通过口服水煎液进入人体内, 呈现显著的生物活性及组织靶向性。金银花水煎液中的 miR2911 可以通过灌胃进食的方式进入小鼠体内, 对流感病毒发挥直接作用<sup>[18]</sup>。药用植物中的 miRNA 可能是中药发挥疗效的作用机制之一。

由此, 人参 miRNA 可能进入机体发挥调控作用, 成为人参临床疗效的有效物质基础之一。为了验证这一假说, 本研究通过降解组测序分析, 鉴定出新鲜人参 miRNA 的靶基因, 并通过 qRT-PCR 验证, 得出一致的结果。为进一步揭示人参 miRNA 及其靶基因的在机体内的可能调控作用打下基础。

#### 参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis,

- mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Fang Y N, Zheng B B, Wang L, *et al.* High-throughput sequencing and degradome analysis reveal altered expression of miRNAs and their targets in a male-sterile cybrid pummelo (*Citrus grandis*) [J]. *BMC Genom*, 2016, 17(1): 591-605.
- [3] Yang X, Wang L, Yuan D, *et al.* Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis [J]. *J Exper Bot*, 2013, 64(6): 1521-1536.
- [4] Yu X T, Wang S P. Clinical observation ontreatment for postoperative gastric cancer by ginsenoside Rg<sub>3</sub> combined with chemotherapy [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2010, 17(10): 779-781.
- [5] Zhang G, Liu A, Zhou Y, *et al.* *Panax ginseng* ginsenoside-Rg<sub>2</sub> protects memory impairment via antiapoptosis in a rat model with vascular dementia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 441-448.
- [6] Sui D Y, Yu X F, Qu S C, *et al.* Effects of *Panax quinquefolium* 20S-2 protopanaxdiol saponins on experimental ventricular remodeling in rat [J]. *Chin Pharm J*, 2007, 42(2): 108-112.
- [7] William C S, Chung W S, Sally K W, *et al.* Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possess significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharm*, 2006, 550(1/3): 173-179.
- [8] Kim S E, Lee Y H, Park H J, *et al.* Ginsenoside-Rs<sub>4</sub>, a new type of ginseng saponin concurrently induces apoptosis and selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 in human hepatoma SK-HEP-1 cells [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(3): 507-511.
- [9] Wang W J, He Z H, Chen Y L, *et al.* Comparison of two miRNA methods for extraction of ginseng decoction [J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(5): 595-599.
- [10] Addo-Quaye C, Miller W, Axtell M J. CleaveLand: A pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets [J]. *Bioinformatics*, 2008, 25(1): 130-131.
- [11] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
- [12] Li B, Duan H, Li J, *et al.* Global identification of miRNAs and targets in *Populus euphratica* under salt stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(6): 525-539.
- [13] Lu S, Sun Y H, Shi R, *et al.* Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2186-2203.
- [14] Jiang J, Lv M, Liang Y, *et al.* Identification of novel and conserved miRNAs involved in pollen development in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis [J]. *BMC Genom*, 2014, 15(1): 146.
- [15] Palatnik J F, Allen E, Wu X, *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs [J]. *Nature*, 2003, 425(6955): 257-267.
- [16] Zhang L, Hou D X, Chen X, *et al.* Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22(22): 107-126.
- [17] Li J, Zhang Y J, Li D M, *et al.* Small non-coding RNAs transfer through mammalian placenta and directly regulate fetal gene expression [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(6): 391-396.
- [18] Zhou Z, Li X H, Liu J X, *et al.* Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 39-49.