

• 药材与资源 •

药用植物藤石松生药和饮片中的微小 RNA 差异表达研究

陈 刚, 董彦彦, 邹一平*

宜春学院 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000

摘 要: 目的 拟利用藤石松 *Lycopodium casuarinoides* 生药与饮片微小 RNA (miRNA) 表达谱, 鉴定其中热稳定存在的 miRNA, 为今后藤石松 miRNA 生物药效研究奠定基础。方法 选取藤石松的 2 种加工形态生药与饮片全株样品 (包含茎、叶、分枝), 采用 Illumina HiSeq™ 2500 高通量测序方法, 根据 miRNA 家族在不同物种中的保守性, 将 miRBase 数据库中的已知植物 miRNA 与通过高通量测序获得的藤石松 miRNA 序列进行比对, 利用生物信息学方法, 注释藤石松中的所有 miRNA 序列, 并鉴定生药与饮片之间的差异表达 miRNA 分子, 同时完成它们相应的人类靶基因预测, 此外, 对这些 miRNA 及靶基因进行 GO 和 KEGG 功能注释分析。结果 生药组与饮片组分别获得 9 898 332、10 099 918 条序列, 其长度基本呈正态分布, 而且均在 21、24 nt 的位置上形成 2 个峰值。两组显著差异表达的 miRNA 共计 25 个, 其中 22 个表达上调, 3 个表达下调。GO 分析结果表明 miRNA 靶基因涉及富集与结合、催化、分子转导等分子功能以及细胞调控、代谢过程等生物过程。KEGG 通路富集分析表明靶基因多集中于癌症与免疫相关通路, 如 pathways in cancer、proteoglycans in cancer 等信号通路。结论 首次揭示了藤石松生药与饮片的 miRNA 表达谱, 存在潜在的可利用的植物来源的稳定 miRNA 分子, 为进一步研究藤石松中与癌症或免疫相关的 miRNAs 分子药理功能奠定基础。

关键词: 藤石松; 生药; 饮片; 小 RNA 测序; 微小 RNA; 差异表达

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)24-5230-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.027

Differential microRNA analysis of crude drugs and processed products in *Lycopodium casuarinoides* by using high-throughput sequencing technologies

CHEN Gang, DONG Yan-yan, ZOU Yi-ping

Key Laboratory of Natural Active Pharmaceutical Constituents, Yichun University, Yichun 336000, China

Abstract: Objective To detect the differential expression profile of miRNAs (microRNAs) in crude drugs and processed products of *Lycopodium casuarinoides* and identify potential bioactive herbal-derived miRNAs. **Methods** The samples of the whole aerial tissues (including stems, leaves, branches) were collected in Yichun area of Jiangxi Province and were authenticated by relevant experts. General RNA was extracted from the crude drugs and processed products of *L. casuarinoides*, respectively. High-qualified small RNAs (sRNA) were isolated to be constructed the sRNA sequencing library. Then, the single-ended sequencing was conducted by using Illumina HiSeq™ 2500 sequencing method. MiRNA characteristic of *L. casuarinoides* was analyzed by relevant bioinformatics. **Results** 9 898 332 and 10 099 918 clean reads were obtained from crude drugs group and processed products group, respectively. A total of 25 microRNAs were differentially expressed between crude drugs group and processed products groups with statistical significance, among which 22 were up regulated and three were down-regulated in processed products group compared to those in the crude drugs group. GO (gene ontology) analysis showed that their *homo sapiens* targets were enriched in catalytic binding, molecular transducer and KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) analysis was shown for the target genes enriched in cancer and immunity-related pathways, such as pathways in cancer, proteoglycans in cancer. **Conclusion** The differential expression profile of microRNAs is first revealed by two processing forms of *L. casuarinoides*. This study suggests that the crude drugs and processed products miRNAs identified in this study will lay a foundation for exploring the pharmaceutical function of miRNAs in *L. casuarinoides*.

Key words: *Lycopodium casuarinoides* (Spring) Holub; crude drugs; processed products; sRNA sequencing; microRNAs; differential expression

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 江西省对外科技合作重大项目 (20151BDH80020); 江西省博士后基金课题 (JX2016RC40)

作者简介: 陈 刚 (1983—), 男, 博士后, 研究方向为中药分子药理等研究。E-mail: chengang_0318@163.com

*通信作者 邹一平 (1966—), 男, 博士, 教授, 主要从事中药药理学等方面研究。E-mail: zyping66@163.com

微小 RNA (microRNA、miRNA) 是一类在真核生物中发现的内源性非编码单链小分子 RNA, 长度为 18~24 个核苷酸。它们来源于 miRNA 初级转录产物 (primary transcripts miRNA, pri-miRNAs), 具有 1 个发夹性结构^[1]。细胞内 miRNA 与靶标基因 3'UTR 结合, 通过降解 mRNA 或抑制其翻译, 从而在转录后对靶标基因的表达水平进行调控。在植物中, miRNA 能直接降解转录物调节靶基因^[2-3]或抑制其转录水平^[4]。因此, 它通常作为植物中重要的一类转录后调节因子, 参与了植物器官的形态建成、生长发育、逆境胁迫应答、次生代谢等调控^[5]。此外, 从 miRNAs 生物合成与发生机制来看, 植物同动物的 miRNA 在序列和功能机制上具有高度的保守性^[1]。

2012 年, Zhang 等^[6]报道了植物 miR168a 能在人和小鼠血液里稳定存在, 并且小鼠吃了大米后, 血液里 miR168a 水平明显增加, 并能调控体内脂类代谢。这首次证明了植物来源的小分子 miRNA 能被肠道吸收进入血循环, 并对人和动物生理功能起到调节作用。近年来, 一些食用兼药用植物如金银花^[7]、西兰花^[8]等已经明确报道了植物来源的 miRNA 参与到动物体内的跨界调控功能。Zhou 等^[7]研究表明口服金银花汤药或者人工合成 miR2911 能特异性地抑制流感病毒的复制。Chin 等^[8]报道西兰花中的 miR159 能结合到促癌基因 TCF7 转录因子 mRNA 的 3'UTR 区域, 降解 TCF7 mRNA, 从而达到抗乳腺癌的功效。以上例子表明, 药用植物中 miRNAs 很可能是一种新药效物质来源。然而, 目前为止, 关于跨界调控功能的药用植物来源的 miRNA 报道信息仍十分有限。

藤石松 *Lycopodiastrium casuarinoides* (Spring) Holub 为石松科 (Lycopodiaceae) 藤石松属 *Lycopodium* L. 蕨类草本植物, 民间俗名“舒筋草”, 主要分布在我国华南地区^[9-10]。其全草具有祛风除湿、舒经活血等功效, 民间常被用于治疗风湿麻痹、跌打损伤、筋骨疼痛等症状^[11-12]。有研究表明, 藤石松富含 lycodine 型生物碱^[13-16], 具有抗乙酰胆碱酯酶活性^[13,16]、抗炎活性^[17], 但其药效物质基础及作用机制还不甚了解。本研究采用 Illumina 二代测序方法, 从 miRNAs 角度揭示藤石松的药效物质基础, 利用藤石松生药与饮片炮制的前后差异, 利用生物信息学方法鉴定藤石松饮片中热稳定、保守的 miRNAs, 并寻找其作用的人体靶基因, 为进一步

研究藤石松 miRNAs 的分子药理功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

藤石松于 2015 年采集于江西省宜春明月山地区 (北纬 27°36'21.97", 东经 114°15'12.08"), 经江西省天然活性成分研究重点实验室嵇长久副教授鉴定为石松科藤石松属植物藤石松 *Lycopodiastrium casuarinoides* (Spring) Holub。新鲜的藤石松经液氮野外采集后, 全程用干冰运输到实验室, 一部分新鲜藤石松在 -80 °C 低温储存。另一部分其经过去除杂质、炮制加工成饮片组, 后续实验备用。

1.2 总 RNA 的提取和检测

采用 PEG 8000 (Polyethylene glycol 8000, 聚乙二醇) 试剂从样本中提取总 RNA。然后将 RNA 样品在冰上融化, 混匀 4 °C 离心, 然后按一定比例稀释, 然后分别用 NanoDrop ND 2000 微量分光光度计和 Agilent 2100 Bioanalyzer 及 Agilent RNA 6000 Nano kit 对总 RNA 的纯度和浓度以及完整性进行检测, 同时建立起样本的质量控制报告。

1.3 小 RNA 文库构建和高通量测序

总 RNA 经电泳琼脂糖凝胶电泳分离, 将长度范围在 18~30 nt 的小 RNA (sRNA) 切胶回收, 然后连接 3'接头, 连接产物以 15%变性 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶) 电泳分离, 切胶选择 36~44 nt 目的条带。回收切胶产物, 连接 5'接头, 然后对连接了两侧接头的小 RNA 样本进行反转录 PCR。反转录产物以 3.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶选择 140~160 bp 区域条带, 胶回收产物即为终文库。建好的文库上机测序, 测序采用 Illumina HiSeq™ 2500, 测序以 SE 策略, 读长 (Read) 控制在 140~160 bp, 由广州基迪奥生物科技有限公司 (Gene Denovo Biotechnology Co., 中国) 完成藤石松新鲜生药组和饮片组两文库构建及高通量测序工作。

1.4 sRNA 数据处理和信息分析

测序得到的原始图像数据经 base calling 转化为序列数据 (raw reads), 结果以 FASTQ 文件格式存储, 包含 reads 的序列以及碱基的测序质量。对于本次研究的 sRNA 测序, 测序所得长度为 51 nt 的 sRNA 序列, 通过去接头、去除低质量及污染序列, 最终获得 16~35 nt 的高质量 sRNA 序列。统计 sRNA 的种类、数量及长度分布, 初步判断 sRNA 质量。将 clean tags (reads) 序列分别与 GenBank (Release 209.0) 和 Rfam (11.0) 数据库进行比对,

鉴定出小分子 RNA 序列并分类注释,为后续生物信息分析做准备。

1.5 保守 miRNA 的鉴定及靶基因预测

将所有高质量读数(clean tags)与 miRBase 数据库(Release 21)进行比对,鉴定其收录的已存在的 miRNA。由于 miRBase 中没有收录藤石松此物种,本研究根据 miRNA 在不同物种中的保守型,通过比对的方式,获得藤石松的 miRNA 成熟序列。对于判断藤石松 miRNA 是否在其他物种中存在,采用“+”或“-”来标记它的存在或不存在。

此外,由于目前藤石松缺乏参考基因组测序信息,新型的 miRNAs 无法与参考基因组做比对,因此,在本研究中不予以考虑藤石松新型 miRNAs 的预测。

在 miRNA 靶基因预测方面,使用 RNAhybrid(v2.1.2)+Svm_light(v6.01)、Miranda(v3.3a)、TargetScan(Version:7.0)3 种方法进行靶基因预测,选取人类 *Homo sapiens_hg19* 为参考基因组对照,然后取 3 种方法得到的靶基因预测的结果的交集作为 miRNA 靶基因预测的结果。

1.6 miRNA 表达谱及其差异表达分析

藤石松生药组与饮片组样本中的保守 miRNA 表达量标准化为 TPM [transcripts per million, $\text{TPM} = (\text{实际的 miRNAs 数量}) / (\text{所有 clean tags}) \times 10^6$]。然后应用 EdgeR 软件对 2 组样本已知 miRNA 表达差异分析统计。差异的筛选标准:表达量变化 2 倍以上[即 $|\log_2 \text{FC}| > 1$, FC 为差异表达(fold change)]并且 $P < 0.05$ 定义为差异显著的 miRNA。差异倍数 $= \log_2(\text{生药组 miRNA 标准化的表达} / \text{饮片组 miRNA 标准化的表达量})$ 。

1.7 GO 和 KEGG 富集分析

Gene ontology(简称 GO)是一个国际化的基因功能分类体系,提供了一套动态更新的标准词汇表(controlled vocabulary)来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个 ontology(本体),分别描述基因的分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)、参与的生物过程(biological process)。GO 的基本单位是 term(词条、节点),每个 term 都对应一个属性。GO 功能分析一方面给出差异表达基因的 GO 功能分类注释;另一方面给出差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析。首先,将差异表达基因向 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各 term 映射,

并计算每个 term 的基因数,从而得到具有某个 GO 功能的基因列表及基因数目统计。然后应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著富集的 GO 条目,该假设检验的 P 值计算公式:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

N 为所有 Unigene 中具有 GO 注释的基因数目; n 为 N 中差异表达基因的数目; M 为所有 Unigene 中注释为某特定 GO term 的基因数目; m 为注释为某特定 GO term 的差异表达基因数目

计算得到的 P 值通过 Bonferroni 校正之后,以校正 $P \leq 0.05$ 为阈值,满足此条件的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能。同时利用 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库,将差异 miRNA 的靶基因进行映射,采用与 GO 相同的计算方法获得 KEGG 分析结果。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行处理,剂量资料以平均数±标准差表示,两组间比较采用 Student- t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 藤石松生药与饮片的总 RNA 提取和检测

利用 NanoDrop 2000 测定仪检测提取的藤石松生药组与饮片组两者的总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值,两样本都在 2.0~2.1,表示两者总 RNA 样品纯度较好。 A_{260}/A_{230} 值在 2.0 附近,表明提取的 RNA 较为纯净、无污染。同时,利用 Agilent 2100 生物分析仪检测两样本的 RIN 值均大于 8.0(表 1),说明样本无 RNA 降解和蛋白质污染。此外,两者的 25 S/18 S^{*} rRNA 值都接近 2.0,表示两者 RNA 完整性较好,基本无降解(图 1)。这表明 2 样本总 RNA 质量符合后续小 RNA 测序建库实验要求。

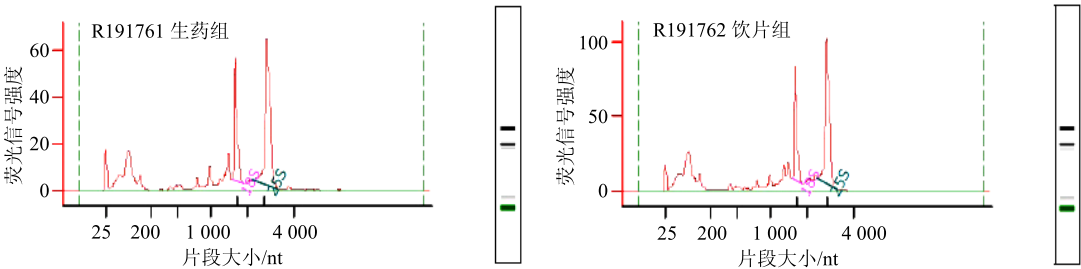
2.2 sRNA 文库的测序

为了鉴定热稳定的藤石松 miRNAs,应用 Illumina 测序技术对生药组和饮片组 2 个 small RNA 文库进行测序,对所得两组样品的原始数据进行纯化处理,得到高质量的序列信息(表 2),并对其进行长度分布统计(图 2),从图 2 可以得出,经过去除低质量序列、接头序列和小于 18 nt 的序列,2

表 1 藤石松生药与饮品总 RNA 质量浓度与质量

Table 1 Concentration and quality of total RNA of <i>L. casuarinoides</i> derived from crude drug and processed products						
样品名称	样品编号	质量浓度/(ng·μL ⁻¹)	<i>A</i> ₂₆₀ / <i>A</i> ₂₈₀	<i>A</i> ₂₆₀ / <i>A</i> ₂₃₀	25 S/18 S*	RIN*
藤石松生药	R191762	537	2.1	2.3	1.9	8.1
藤石松饮片	R191763	831	2.0	1.8	1.8	8.3

* RNA 完整性指数
* refers to RNA Integrity Number, representing the standardization of the RNA quality control



采用 Agilent 2100 仪器检测，其中横坐标表示 RNA 片段大小，纵坐标表示荧光信号强度
Crude drug (R191761) processed products group (R191762) two samples were checked using by Agilent 2100 Bioanalyzer system, and X-axis indicates the size of the RNA fragment, Y-axis indicates the fluorescence signal intensity; The right images refer to the capillary electrophoresis

图 1 藤石松生药组 (R191761) 与饮片组 (R191762) RNA 质量检测

Fig. 1 Analysis of RNA quality of *L. casuarinoides* derived from crude drug (R191761) and processed products (R191762)

表 2 藤石松生药组和饮片组测序处理及片段长度统计分析

Table 2 Sequencing treatment and fragment length statistical analysis of *L. casuarinoides* derived from crude drug and processed products

读长	数量		百分比/%	
	生药	饮片	生药	饮片
total reads	12 610 888	13 095 130	100.000 0	100.000 0
high_quality	12 230 863	12 709 477	96.986 5	97.055 0
3' adapter_null	6 077	7 058	0.049 7	0.055 5
insert null reads	25 878	18 600	0.211 6	0.146 3
5' adapter contaminants	11 261	13 979	0.092 1	0.110 0
smaller_than_18nt	418 128	295 888	3.418 6	2.328 1
polyA	156	110	0.001 3	0.000 9
clean reads	9 898 332	10 099 918	80.929 1	79.467 6

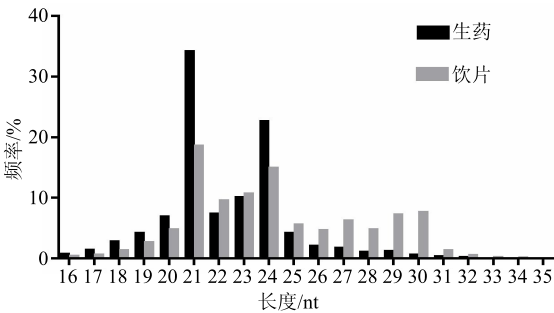


图 2 藤石松生药组和饮片组下的小分子 RNA 长度分布

Fig. 2 Length distribution of small RNA of *L. casuarinoides* derived from crude drug and processed products

个文库分别产生了 9 898 332 和 10 099 918 高质量的序列 (clean reads)，其长度基本呈正态分布，而且均在 21、24 nt 的位置上形成 2 个峰值，这符合一般植物 miRNA 的分布规律^[18]。在藤石松的生药和饮片下，21 nt 小 RNA 均为主要类型，所占比例分别为 34.09%和 18.47%。由图 2 可知，2 文库以 20~24 nt 的序列占总序列的绝大部分。其中饮片组和生药组下达 20~24 nt 序列所占比例分别为 80.7%和 57.99%。说明深度测序获得的序列质量较高，藤石松生药组和饮片组中以 miRNA 片段为主，但饮片组中的 miRNA 比例有明显下降，非 miRNA 片段逐

渐增多,这可能与部分热不稳定 miRNA 发生降解有关。从总体上看,这为后续对保守候选 miRNA 的分析提供了有力证据。

2.3 sRNA 的分类注释

对 2 个文库分别获得高质量片段(clean reads),通过在 Rfam (10.1) 数据库进行比对注释、及去除其中的一些结构性的 sRNA,包括 rRNAs、snRNAs、snoRNAs 和 tRNAs,将剩余的 sRNA 序列与 miRbase (21) 数据库中所有动植物的 miRNAs 序列进行同源性比对,最终将测序所得的 miRNAs 序列进行分类整理。从表 3 可以看出,对应于藤石松生药组和

饮片组得到的 9 898 332 和 10 099 918 条序列,分别代表了 509 862 和 568 231 种类型的小分子 RNA。饮片组中的 rRNA、snRNA、tRNA 的种类和数量上要明显高于生药组中的对应含量,而饮片组中 snoRNA 种类和数量要低于生药组。值得注意的是,比对筛选出的饮片组中已知 miRNA (738 288) 在数量上明显低于生药组 (3 082 713),在种类上,饮片组 (3 225) 比生药组 (4 745) 也有所减少。此外,还有相当部分的 sRNA 序列未被注释,分别为生药组 (64.11%) 和饮片组 (84.11%)。这表明藤石松仍有很多的未知的 miRNAs 有待发现。

表 3 藤石松生药组和饮片组文库中小分子 RNA 的类型和数量

Table 3 The type and number of small RNAs in *L. casuarinoides* derived from crude drug and processed products library respectively

类型	特异 sRNA		百分比/%		总的 sRNA		百分比/%	
	生药	饮片	生药	饮片	生药	饮片	生药	饮片
total	509 862	568 231	100.000 0	100.000 0	9 898 332	10 099 918	100.000 0	100.000 0
known_miRNA	4 745	3 225	0.930 6	0.567 6	3 082 713	738 288	31.143 8	7.309 8
rRNA	14 405	23 758	2.825 3	4.181 0	342 787	472 012	3.463 1	4.673 4
snRNA	361	559	0.070 8	0.098 4	4 144	5 980	0.041 9	0.059 2
snoRNA	128	107	0.025 1	0.018 8	1 733	926	0.017 5	0.009 2
tRNA	2 998	5 274	0.588 0	0.928 1	121 030	388 181	1.222 7	3.843 4
unannotated	487 225	535 308	95.560 2	94.206 1	6 345 925	8 494 531	64.111 1	84.105 0

2.4 差异性表达 miRNA 的分析

为了了解藤石松生药与饮片 2 组中的 miRNA 表达谱,首先将两组样品已知的 miRNA 进行汇总(表 4),从表 4 可以得知,通过与 miRBase 数据库的比对,生药组与饮片组共鉴定获得 74 个 miRNA 成熟序列,其中两样品中共表达的 miRNA 有 45 个,仅在生药中出现的 miRNA 有 20 个,仅在饮片中出现 miRNA 有 9 个。从表达上看,两者共有的 miRNAs 大部分都高丰度表达,而各自的(非重叠)miRNA 表达丰度非常低,仅有 5~10 reads。这表明藤石松新鲜生药经过炮制加工之后,一些 miRNA 分子将降解消失(如 miR5185-x、miR9498-x、miR399-y、miR5057-x 等),同时,一些新型的 miRNA 分子重新产生(如 miR2637-x、miR7995-x、miR6231-y、miR5523-y 等)。此外,有许多热稳定的 miRNAs 炮制之后仍然存在,其中以 miR166-x、miR319-x、miR2950-x 量排名前 3。

为了预测这 74 个 miRNA 分子是存在热力学稳定的种子结构区域,根据文献标准^[19-20]预测了其中

热稳定性 miRNA。发现仅有 miRNA156-z、miRNA5523-y 具有种子结构区(seed region),见表 4 方框序列。

为了进一步获得藤石松生药与饮片两组之间的差异表达的 miRNAs 表达情况,应用 EdgeR 软件对 2 组样本已知 miRNA 进行差异显著性分析统计(表 5)。从中可以得出,25 个差异表达的 miRNAs 中,22 个 miRNAs 表达上调,其中有 9 个仅在饮片新出现的 miRNAs(表 5 中下划线);3 个 miRNAs(miR166-5p、miR171-3p 和 miR5168-3p)表达下调。

植物在进化过程中,绝大多数不同植物中相同家族内的 miRNA 序列具有高度的保守性。本研究调查了藤石松生药组与饮片组中差异表达的 miRNAs 在不同物种的保守性,列举的常见 16 种植物的保守序列种类,着重分析饮片中上调的 7 种 miRNAs,发现藤石松中的 Lc-MIR156、Lc-MIR396、Lc-MIR403 在植物中广泛存在。而有些藤石松 miRNAs,仅匹配在一些特定的植物中,如 Lc-MIR1095(与卷柏匹配)、Lc-MIR6300(与大豆

表 4 藤石松生药组与饮片组的 miRNA 的表达谱

Table 4 miRNAs profiling information in *L. casuarinoides* derived from crude drug and processed products libraries

miRNA 名称	长度/nt	miRNA 成熟序列 (5'→3')	总读数	读数		标准化后的表达量	
				生药	饮片	生药	饮片
MIR166-y	21	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	3 358 934	2 760 613	598 321	895 514.100 0	810 416.800 0
MIR319-y	20	CTTGGACTGAAGGGAGCTCC	193 116	139 302	53 814	45 188.120 0	72 890.250 0
MIR2950-x	21	TTCCATCTCTTGACACTGTG	35 646	27 509	8 137	8 923.633 0	11 021.440 0
MIR159-y	20	CTTGGATTGAAGGGAGCTCC	26 785	20 356	6 429	6 603.275 0	8 707.984 0
MIR1095-y	21	CAGGTTCCCTTGTTCCTCAAAT	26 700	13 594	13 106	4 409.752 0	17 751.880 0
MIR894-x	21	CGTTTCACGTCAGGTTACCA	24 264	16 611	7 653	5 388.435 0	10 365.870 0
MIR1113-x	21	TGAGCAGTCATAAGGTAGCCT	23 960	17 126	6 834	5 555.496 0	9 256.550 0
MIR156-x	21	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	21 240	14 375	6 865	4 663.100 0	9 298.539 0
MIR157-x	21	TTGACAGAAGATAGAGAGCAC	20 735	14 023	6 712	4 548.915 0	9 091.303 0
MIR165-y	21	TCGGACCAGGCTTCATGCCCC	20 420	18 040	2 380	5 851.988 0	3 223.674 0
MIR171-y	21	TTGAGCCGCGCCAATATCACG	18 123	17 548	575	5 692.389 0	778.828 9
MIR5139-x	18	AACCTGGCTCTGATACCA	7 675	4 997	2 678	1 620.975 0	3 627.311 0
MIR408-y	21	TGCACTGCCTCTCCCTGGCT	6 084	4 883	1 201	1 583.994 0	1 626.736 0
MIR8155-y	18	AACCTGGCTCTGATACCA	5 833	4 043	1 790	1 311.507 0	2 424.528 0
MIR1511-y	18	AACCTGGCTCTGATACCA	4 455	3 285	1 170	1 065.620 0	1 584.747 0
MIR171-z	21	TTGAGCCGCGCCAATATCATT	4 007	2 488	1 519	807.081 3	2 057.463 0
MIR6300-y	19	GTCGATGTAGTATAGTGGT	3 799	1 831	1 968	593.957 3	2 665.626 0
MIR166-z	21	TCGGACCAGGCTTCATTCCCT	3 370	2 877	493	933.268 8	667.761 1
MIR1084-x	22	TAACTCAGGTGGTATGCTCCCA	3 163	2 519	644	817.137 4	872.288 3
MIR8175-y	22	TCGTTCCCCGGCATCGGCGCCA	1 876	1 007	869	326.660 3	1 177.047 0
MIR1082-x	21	GTATTGGCCCGCTGGCCGGCG	799	702	97	227.721 5	131.385 0
MIR3630-y	20	TGGGAATCTCTCTGATGCAG	742	492	250	159.599 7	338.621 2
MIR160-x	21	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	691	533	158	172.899 7	214.008 6
MIR5168-y	21	TCGGACCAGGCTTCAATCCCC	688	622	66	201.770 3	89.396 0
MIR3699-y	19	TTGACAGAAGATAGAGATT	584	454	130	147.272 9	176.083 0
MIR6478-x	20	CCGACTTTAGCTCAGTTGGT	297	219	78	71.041 3	105.649 8
MIR5072-x	19	ATCCCCAGTGGAGTCGCCA	230	186	44	60.336 5	59.597 3
MIR5368-y	18	AGGGACAGTCTTAGGTAC	210	82	128	26.599 9	173.374 1
MIR535-x	21	TGACAGCGAGAGAGAGCACGC	207	175	32	56.768 2	43.343 5
MIR845-y	24	ACGCTCTGATACCAATATGTTGGA	86	61	25	19.787 8	33.862 1
MIR6173-y	21	TAGCCGTAAACGATGGATACC	81	49	32	15.895 1	43.343 5
MIR396-x	21	TTCCACAGCTTCTTGAACCT	67	44	23	14.273 1	31.153 2
MIR156-y	22	TGCTTACTCTCTATTGTGACG	51	37	14	12.002 4	18.962 8
MIR7782-y	18	AAACCTGCTCTGATACCA	46	26	20	8.434 1	27.089 7
MIR166-x	23	TCGGACCAGGCTTCATTTTGT	46	43	3	13.948 8	4.063 5

匹配)、Lc-MIR7082 (与二穗短柄草匹配)等,表明这些 miRNA 在其他物种中很少有,可能意味着这些 miRNA 是松柏类植物中特有的,如从藤石松物种与

亲缘关系最近的江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron 的 miRNA 比对结果发现, Lc-miR1095 可能是藤石松特异的 miRNA 分子。见表 6。

续表 4

miRNA 名称	长度/nt	miRNA 成熟序列 (5'→3')	总读数	读数		标准化后的表达量	
				生药	饮片	生药	饮片
MIR398-y	21	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG	35	27	8	8.758 5	10.835 9
MIR403-y	21	TTAGATTCACGCACAAACTCG	32	19	13	6.163 4	17.608 3
MIR5077-x	19	GTTACAGTCAGGTTACCA	32	25	7	8.109 7	9.481 4
MIR7767-x	20	CCCCAAGATGAGTGCTCTCC	20	16	4	5.190 2	5.417 9
MIR4995-x	22	AGGCAGTGGCCTGGTTAAGGGA	20	15	5	4.865 8	6.772 4
MIR167-x	22	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	12	7	5	2.270 7	6.772 4
MIR5185-y*	18	GGAGGTTGGCTTAGAAGC	9	9	0	2.919 5	0.010 0
<u>MIR2637</u> -x	21	TCAATACTTCCTCTGATCTCT	8	0	8	0.010 0	10.835 9
MIR9498-x*	19	CGTCAAGTAGGTGTTGAGA	7	7	0	2.270 7	0.010 0
MIR5761-z	19	TTTTGTGTCGTCAAGTTT	7	5	2	1.621 9	2.709 0
MIR399-y*	21	CGCCAAAGGAGAGTTGCCCTT	6	6	0	1.946 3	0.010 0
MIR5057-x*	24	AAAACCTTGAAATCATTTTGACAAA	6	6	0	1.946 3	0.010 0
MIR156-z	19	T <u>TGACA</u> GAAGAGAGAGCAC	5	2	3	0.648 8	4.063 5
MIR3954-x*	21	TTGGACAGAGAAATCACGGTC	5	5	0	1.621 9	0.010 0
MIR7995-x	21	TTACACGTAGACTCGTTGACC	5	0	5	0.010 0	6.772 4
MIR6231-y	21	TTTGTGGACTCTTGGACCTGC	5	0	5	0.010 0	6.772 4
MIR7725-y*	18	ATGTGCTTTCGTCAAGAG	5	5	0	1.621 9	0.010 0
MIR482-y*	22	TCTTGCCAACTCCGCCATACC	4	4	0	1.297 6	0.010 0
MIR168-x*	21	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGAA	4	4	0	1.297 6	0.010 0
MIR8024-x	19	TCGAAGATTTTAAAGACTT	4	0	4	0.010 0	5.417 9
MIR419-y*	18	CTGAATGATGACGATTTA	4	4	0	1.297 6	0.010 0
MIR9656-y	18	TGCATTGAGACTCTGAAC	4	2	2	0.648 8	2.709 0
MIR1882-y*	19	AATGATCCCGGACGTAATC	3	3	0	0.973 2	0.010 0
MIR4348-y*	20	TTTAAATTGACTATTAGAT	3	3	0	0.973 2	0.010 0
MIR9668-x*	18	CCATGACAAGTATTTTGG	3	3	0	0.973 2	0.010 0
MIR1510-y*	20	TTGTTTTACCAATACCACCC	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR1533-y*	19	TAATAAAAATAAGAAGGAT	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR477-x*	18	CTCCCTCAAAGGAATCCT	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR5523-y	20	TGGGGAGGAACAT <u>ATTACT</u>	2	0	2	0.010 0	2.709 0
MIR7731-y*	18	TTTGCCTGGACTTTGAA	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR5565-y*	20	ATCACATGTGGATTGATATG	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR8569-y*	18	ATCCGGTAGGTCGGACCA	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR837-x*	18	CCTTGTTTCTTGTTTCT	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR5225-x	22	CGTCGCAGGAGAGATGGCACCT	2	0	2	0.010 0	2.709 0
MIR1873-x	21	TCTCAACTTGGTATCAGAGCT	2	0	2	0.010 0	2.709 0
MIR8171-x	18	GGTGGTCCATTGGTAGGA	2	0	2	0.010 0	2.709 0
MIR6293-x*	18	GATAACAGGCTGATGACT	2	2	0	0.648 8	0.010 0
MIR535-z	20	TTGACAAAGATAGAGAGCAC	2	0	2	0.010 0	2.709 0

miRNA-x, 表示 5 p, miRNA-y 表示 3 p, miRNA-z 表示不确定来自 5 p 或 3 p; 方框内为种子区域 Boxes indicate seed region; *表示仅在生药中的 miRNA; 下划线表示饮片中新型的 miRNA

x represents the 5p direction of miRNA; y represents the 3p direction of miRNA; z indicates that it is not determined, either 5p or 3p; The rectangle box means the miRNA seed regions, * means the miRNA is uniquely expressed in the crude drug, while the underscore character refers to the novel miRNA in the processed products

表 5 藤石松生药与饮片差异表达的 miRNAs

Table 5 Differentially expressed miRNAs in two groups

miRNA 名称	生药-标准化后的表达量	饮片-标准化后的表达量	log ₂ (FC)	P 值	表达变化
miR-1095-3p	4 409.752	17 751.88	2.009 202 36	0	上调
miR-156-z	0.648 8	4.063 5	2.646 877 17	0.029 927 524	上调
miR-162-3p	1.946 3	8.126 9	2.061 971 04	0.011 475 132	上调
miR-166-5p	13.948 8	4.063 5	-1.779 346 21	0.024 621 35	下调
miR-171-3p	5 692.389	778.828 9	-2.869 655 80	0	下调
miR-171-z	807.081 3	2 057.463	1.350 080 36	4.89×10^{-164}	上调
miR-1873-5p	0.01	2.709	8.081 616 58	0.014 426 998	上调
miR-2637-5p	0.01	10.835 9	10.081 603 27	7.51×10^{-7}	上调
miR-3630-3p	159.599 7	338.621 2	1.085 214 36	2.32×10^{-20}	上调
miR-396-5p	14.273 1	31.153 2	1.126 081 65	0.002 928 533	上调
miR-403-3p	6.163 4	17.608 3	1.514 457 30	0.003 948 269	上调
miR-5139-5p	1 620.975	3 627.311	1.162 038 70	1.69×10^{-224}	上调
miR-5168-3p	201.770 3	89.396	-1.174 431 64	3.37×10^{-12}	下调
miR-5225-5p	0.01	2.709	8.081 616 58	0.014 426 998	上调
miR-535-z	0.01	2.709	8.081 616 58	0.014 426 998	上调
miR-5368-3p	26.599 9	173.374 1	2.704 395 67	3.99×10^{-40}	上调
miR-5523-3p	0.01	2.709	8.081 616 58	0.014 426 998	上调
miR-6173-3p	15.895 1	43.343 5	1.447 233 56	2.02×10^{-5}	上调
miR-6231-3p	0.01	6.772 4	9.403 523 38	0.000 104 069	上调
miR-6300-3p	593.957 3	2 665.626	2.166 043 47	0	上调
miR-7782-3p	8.434 1	27.089 7	1.683 438 38	0.000 132 447	上调
miR-7995-5p	0.01	6.772 4	9.403 523 38	0.000 104 069	上调
miR-8024-5p	0.01	5.417 9	9.081 589 96	0.000 538 609	上调
miR-8171-5p	0.01	2.709	8.081 616 58	0.014 426 998	上调
miR-8175-3p	326.660 3	1 177.047	1.849 309 38	3.42×10^{-154}	上调

z 表示不确定 miRNA 方向是 5 p 还是 3 p; 下划线表示饮片中新出现的 miRNA

z represents that the direction of miRNA is not determined, either 5p or 3p; underscore character means the novel miRNA in the processed products

表 6 藤石松已知 miRNA 与其他物种匹配情况

Table 6 Conserved miRNAs of *L. casuarinoides* matched with other species

药材	MIR1095	MIR156	MIR162	MIR1873	MIR2637	MIR3630	MIR396
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	-	+	+	-	-	-	+
二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	-	+	+	-	-	-	+
油菜 <i>Brassica napus</i>	-	+	+	-	-	-	+
水稻 <i>Oryza sativa</i>	-	+	+	+	-	-	+
人参 <i>Panax ginseng</i>	-	-	-	-	-	-	-
小立碗藓 <i>Physcomitrella patens</i>	-	+	-	-	-	-	-
挪威云杉 <i>Picea abies</i>	-	-	-	-	-	-	+
高山松 <i>Pinus densata</i>	-	-	+	-	-	-	+
火炬松 <i>Pinus taeda</i>	-	+	-	-	-	-	+
杨树 <i>Populus trichocarpa</i>	-	+	+	-	-	-	+
地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	-	+	+	-	-	-	+
江南卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i>	+	+	-	-	-	-	+
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	-	+	+	-	-	-	+
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	-	+	+	-	-	-	+
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	-	+	-	-	-	-	+

“+”表示匹配;“-”表示不匹配

“+” means match;“-” means mismatch

2.5 GO 和 KEGG 功能显著性富集分析

对上述鉴定所得的 74 个藤石松生药与饮片中的差异表达 miRNAs, 采用 RNA hybrid (v2.1.2) + Svm_light (v6.01)、Miranda (v3.3a), TargetScan (Version: 7.0) 3 种软件, 以人类 mRNA 为靶标, 进行靶基因预测, 共预测得到 46 591 个靶基因, 涉及到 164 842 靶基因位点。并进一步利用 GO 及 KEGG 对这些 miRNA 靶基因进行功能注释分析。

miRNA 靶基因 GO 分析结果表明, 在分子功能

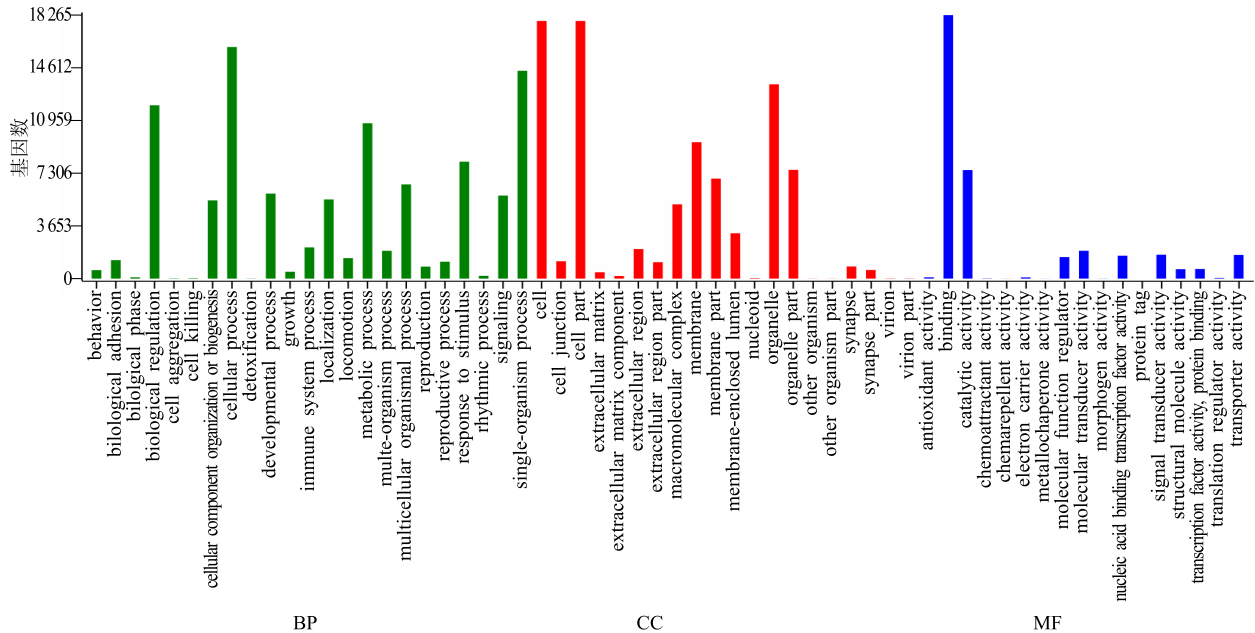


图 3 差异 miRNAs 的靶基因 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO analysis of target genes of differential expressed miRNAs

条靶基因涉及 307 条信号通路 (pathways)。值得注意的是, 从富集比较显著的通路 P 值和 Q 值水平来看, 富集度前 10 个通路 (top 10 pathways) 为催产素信号通路 (oxytocin signaling pathway)、G 蛋白 Rap1 信号通路 (rap1 signaling pathway) 及肌动蛋白细胞骨架调控通路 (regulation of actin cytoskeleton)、癌症通路 (pathways in cancer) 等富集较多, 如表 7 所示。

2.6 药效 miRNA 的靶基因预测及其功能分析

藤石松对治疗风湿关节炎、关节疼痛有很好的治疗效果。本课题组结合前期药效研究成果, 试图寻找与癌症或免疫有关的 miRNA 及靶基因通路。通过对表 4 中藤石松中生药组与饮片组 miRNA 表达量排名前 10 位的 miRNA, 进行 targetscan 和 miRanda 靶基因筛选分析, 结果发现有 6 种 miRNAs: miR159、miR319、miR894、

(molecular function, MF) 中, 结合活性 (binding) 所占比例最多、其次为催化活性 (catalytic binding); 在细胞组分 (cellular components, CC) 分类上, 细胞构件 (cell part) 所占比例较多, 其次为细胞器 (organelle); 在生物过程 (biological processes, BP) 中, 细胞过程 (cellular process) 所占比例最多、其次为细胞调控 (biological regulation) 及单生物过程类别 (single-organism process) (图 3)。

同时, KEGG 通路富集分析表明, 共有 10 544

miR1095、miR1113、miR156 参与癌症通路 (pathways in cancer); 有 7 种 miRNAs: miR159、miR319、miR2950、miR157、miR894、miR1113、miR156 参与癌症中的多糖 (proteoglycans in cancer) 通路, 其中 miR159、miR319、miR894、miR1113、miR156 共同参与上述两类癌症信号通路, 而 miR319、miR894、miR1095 与免疫因子如 T 细胞 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1, TIAM1)、B 细胞 (B-cell CLL/lymphoma 2, BCL2)、细胞因子 (TNF- α , TNF receptor associated factor) 以及凋亡信号途径 (如 Fas ligand、toll like receptor 4) 等有关, 见表 8。

3 讨论

目前为止, 人们根据直接克隆方法, 高通量测序、生物信息及计算机预测方法已经从 72 种植物中鉴定的成熟 miRNA 数量达到 7 385 条 (miRbase-

表 7 差异 miRNAs 的靶基因富集前 10 位 KEGG 通路列表

Table 7 Top 10 ranking KEGG pathways of target genes of differential expressed miRNAs

通路 ID	信号通路	目标靶基因数	背景基因数	P 值	Q 值
ko04921	催产素信号通路	362 (3.43%)	946 (2.47%)	1.35×10^{-8}	2.48×10^{-6}
ko04015	G 蛋白 Rap1 通路	478 (4.53%)	1 310 (3.42%)	2.35×10^{-7}	1.60×10^{-6}
ko04810	肌动蛋白细胞骨架调控	486 (4.61%)	1 338 (3.50%)	1.02×10^{-7}	3.66×10^{-6}
ko04722	神经营养因子的信号转导通路	327 (3.10%)	855 (2.23%)	1.27×10^{-7}	4.54×10^{-6}
ko04010	丝裂原活化蛋白激酶信号通路	598 (5.67%)	1 728 (4.52%)	4.51×10^{-7}	3.30×10^{-6}
ko04020	钙信号通路	378 (3.58%)	1 039 (2.72%)	7.43×10^{-7}	2.25×10^{-6}
ko05200	癌症通路	844 (8.00%)	2 585 (6.76%)	1.58×10^{-7}	2.10×10^{-6}
ko04072	磷脂酶 D 信号通路	336 (3.19%)	927 (2.42%)	3.15×10^{-7}	9.14×10^{-6}
ko04550	干细胞多能性信号调控	271 (2.57%)	724 (1.89%)	4.48×10^{-7}	7.45×10^{-6}
ko04022	环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G 信号通路	366 (3.47%)	1 025 (2.68%)	7.45×10^{-7}	8.35×10^{-5}

P 值就是对前景基因相比于背景基因是否显著的检验方法,在做富集分析的时候,排列顺序是按照 P 值的大小来排列的, P 值越小,说明富集的通路越显著,通常的阈值标准是 $P < 0.05$; 括号中百分数表示前景或背景基因的数目与 KEGG 所有注释基因总数的比值; Q 值是对 P 值更严格的检验,阈值是 $Q < 0.05$

The calculated P value is a test method for the foreground genes comparing to the background genes in the Pathway enrichment analysis. The smaller the P value, the more significant the pathway enrichment, In general, it is taken $P < 0.05$ as a threshold. Percentage represents the ratio of the number of foreground or background genes to the total number of annotation genes; Q value is a more rigorous test of P value, its threshold value is 0.05

表 8 藤石松中与癌症或免疫相关的 miRNA 候选靶基因预测

Table 8 Target gene prediction of candidate miRNAs related to cancer and immune pathways

信号通路	候选 miRNAs	靶基因举例及描述	P 值
pathways in cancer	miR159-3p	MAPK10 (Mitogen-activated protein kinase 10)	2.71×10^{-8}
		WNT2B (Wnt family member 2B)	2.71×10^{-8}
	miR319-3p	BCL2L1 (BCL2 like 1)	2.71×10^{-8}
		TP53 (Tumor protein p53)	2.71×10^{-8}
	miR894-5p	TRAF3 (TNF receptor associated factor 3)	2.71×10^{-8}
		BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)	2.71×10^{-8}
	miR1095-3p	TRAF4 (TNF receptor associated factor 4)	2.71×10^{-8}
		TRAF5 (TNF receptor associated factor 5)	2.71×10^{-8}
	miR1113-5p	BCL2(B-cell CLL/lymphoma 2)	2.75×10^{-8}
		TP63 (Tumor protein p63)	2.75×10^{-8}
proteoglycans in cancer	miR156-5p	TP63 (Tumor protein p63)	2.75×10^{-8}
		BMF (Bcl2 modifying factor)	0.999 99
	miR159-3p	MET (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)	2.75×10^{-8}
		HGF (Hepatocyte growth factor)	2.75×10^{-8}
	miR2950-5p	AKT1 (V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)	2.75×10^{-8}
		TIAM1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1)	2.75×10^{-8}
	miR157-5p	TLR4 (Toll like receptor 4)	2.75×10^{-8}
		FASLG (Fas ligand)	2.75×10^{-8}
	miR894-5p	SMAD2 (SMAD family member 2)	2.75×10^{-8}
		FAS (Fas cell surface death receptor)	2.75×10^{-8}
immunity-related pathways	miR1113-5p	TLR4 (Toll like receptor 4)	2.75×10^{-8}
		CBL (Cbl proto-oncogene)	2.75×10^{-8}

20)^[21-22]。虽然许多名贵中药材如人参^[23]、红豆杉^[24]、金银花^[25]、甘草^[26]的 miRNA 序列被鉴定,但它们的研究都集中在植物内源性的 miRNA 如何参与植物生长发育、次生代谢合成、胁迫应答等过程研究,而关于这些中药来源的 miRNA 如何参与动物体内的药效机制研究鲜有报道。近年来,药用植物中的 miRNA 作为一种有活性的药效物质,参与到人体和动物靶基因的调控已经有许多研究报道^[3]。

本研究基于药用植物的 miRNA 药效理论,通过构建藤石松生药与饮片的 2 个 cDNA 文库并进行高通量测序,鉴定藤石松生药与饮片中的潜在热稳定 miRNA 小分子,本课题组的研究表明相对于生药,虽然饮片组中的 miRNA 总数量和比例有所降低,但在 21~24 nt 的 miRNA 均为总的小分子 RNA 主要类型,这表明藤石松 miRNA 在经过炮制、存储、风干等处理后仍然具有非常高的稳定性,这与甘草水煎剂中的 miRNA 提取^[27]、黄芩 miRNA 的干燥处理测序^[28]研究结果相似。这些植物干燥或煎煮后的 miRNA 能够稳定存在的原因,可能与其微小 RNA 分子自身结构有很大的关系。如沈朝斌等^[20]报道黄芩饮片煎煮液中含有 3'端种子区热力稳定的 miRNA 分子。Zhang 等^[6]报道 MIR2911 能抵抗煎煮和 RNase 处理,与其高 GC 量有关。

研究发现,藤石松饮片中表达丰度排名前 10 位的 miRNA 分子:miR166、miR319、miR3950、miR159、miR1095、miR894、miR1113、miR156、miR157、miR165 是感兴趣的候选 miRNA,因为它们的靶基因都能找到与癌症或免疫相关途径,这与藤石松抗炎、抗癌的相关功能直接关联。其中,有文献报道西兰花和菠菜中富含 miR159,并且在健康人体和乳腺癌患者的血清里检测到,起到抗乳腺癌的功效^[8]。这为今后对藤石松开展相应的 miRNA 药理研究提供了必要的信息。

本实验利用基因高通量深度测序方法,首次明确了藤石松生药与饮片中的 miRNA 表达谱,鉴定了其中差异表达 miRNA 的种类与丰度,并预测与藤石松抗炎药效相关的 miRNA 分子及对应的人类靶基因。这些稳定存在的 miRNA 鉴定,为下一步探索真实并且能进入人体的活性小分子 RNA 的研究提供基础性数据。虽然本实验获得了藤石松生药与饮片的 miRNA 表达谱,但未成功对藤石松的饮片的煎煮液进行建库测序。因此,藤石松中候选 miRNAs 在煎煮药汤内的稳定和有效性,尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 19-53.
- [3] Xie W, Weng A, Melzig M F. MicroRNAs as new bioactive components in medicinal plants [J]. *Planta Med*, 2016, 82(13): 1153-1162.
- [4] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, *et al*. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs [J]. *Science*, 2008, 320(5880): 1185-1190.
- [5] 张松莲, 曾富华, 喻宁华, 等. 植物 miRNA 的功能及其作用机制 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(5): 444-450.
- [6] Zhang L, Hou D, Chen X, *et al*. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107-126.
- [7] Zhou Z, Li X, Liu J, *et al*. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 39-49.
- [8] Chin A R, Fong M Y, Somlo G, *et al*. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159 [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2): 217-228.
- [9] 吴兴德. 蛇足石杉及其两种近缘亲属植物的化学成分研究 [D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- [10] 姚振生, 杨武亮. 江西药用蕨类植物的地理分布及区系特征 [J]. *武汉植物学研究*, 1996(3): 207-212.
- [11] 《四川中药志》协作编写组. 四川中药志 (第 1 卷) [M]. 成都: 四川人民出版社, 1979.
- [12] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [13] Hirasawa Y, Kato E, Kobayashi J, *et al*. Lycoparins A-C, new alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* inhibiting acetylcholinesterase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(11): 6167-6171.
- [14] Tang Y, Fu Y, Xiong J, *et al*. Casuarinines A-J, lycodine-type alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(8): 1475-1484.
- [15] Wang Z, Wu J, Zhao N, *et al*. Two new lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(2): 241-245.
- [16] Zhang D B, Chen J J, Song Q Y, *et al*. Lycodine-type alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* and their acetylcholinesterase inhibitory activity [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9999-10010.

- [17] Pan K, Xia X, Guo W H, *et al.* Suppressive effects of total alkaloids of *Lycopodium casuarinoides* on adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 17-22.
- [18] Zhang B, Stellwag E J, Pan X. Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs [J]. *Gene*, 2009, 443(1/2): 100-109.
- [19] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, *et al.* Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(3): 936-48.
- [20] 沈朝斌, 蔡红, 郁兰. 黄芪饮片 miRNA 谱及热力学的稳定性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3079-3085.
- [21] Griffiths-Jones S, Saini H K, van Dongen S, *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Suppl1): D154-D158.
- [22] Griffiths-Jones S. The microRNA Registry [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Suppl1): D109-D111.
- [23] Wu B, Wang M, Ma Y, *et al.* High-throughput sequencing and characterization of the small RNA transcriptome reveal features of novel and conserved microRNAs in *Panax ginseng* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44385.
- [24] Hao D C, Yang L, Xiao P G, *et al.* Identification of *Taxus* microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis [J]. *Physiol Plant*, 2012, 146(4): 388-403.
- [25] Xia H, Zhang L, Wu G, *et al.* Genome-wide identification and characterization of MicroRNAs and target genes in *Lonicera japonica* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164140.
- [26] 李华云, 王宁, 韦春香, 等. 甘草 microRNA 及其靶基因的生物信息学预测 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2506-2514.
- [27] 邵红伟, 何免, 陈嘉斯, 等. 甘草水煎剂中 miRNA 的提取及其对人外周血单个核细胞的影响研究 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1449-1453.
- [28] 韦春香, 肖自华, 黄曦, 等. 黄芪 miRNA 的预测及其干旱表达模式分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 155-164.