

鼠妇 miRNA-2863 调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭

郭倩倩¹, 王若宇^{2#}, 卢林竹¹, 谭年花¹, 易 纯^{3*}, 田雪飞^{1*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南中医药大学方证转化湖南省重点实验室, 湖南省中医药防治肿瘤机理重点实验室, 湖南 长沙 410208
2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007
3. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探讨鼠妇 *Armadillidium vulgare* miRNA-2863 (avu-miR-2863) 对肝癌 HepG2 细胞和 MHCC97H 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及相关机制。方法 基于 small RNA 测序筛选鼠妇的 miRNA, 将 HepG2 细胞和 MHCC97H 细胞分为对照组和 avu-miR-2863 组, 采用 CCK-8 法、划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力; 3D 肿瘤球模拟体内肿瘤微环境研究肿瘤细胞的增殖; Western blotting 法检测细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、细胞性骨髓细胞瘤原癌基因 (cellular myelocytomatosis oncogene, C-Myc)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-Ca)、N-Ca、波形蛋白 (vimentin, Vim) 和基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14) 的表达; 利用生信分析预测 avu-miR-2863 的靶基因, 京都基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析和基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析探讨 avu-miR-2863 的作用机制, Western blotting 法检测活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartic protease-3, cleaved Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 关联 X 蛋白单克隆抗体 (monoclonal antibody to Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白的表达; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Mito-Tracker Red、Hoechst 染色和 2,7 二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 分别进行线粒体荧光和细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测; qRT-PCR 检测 avu-miR-2863 在小鼠血液中的表达情况。结果 通过高通量测序技术从鼠妇中挖掘并筛选鉴定出 avu-miR-2863; 与对照组比较, avu-miR-2863 可抑制 HepG2 和 MHCC97H 细胞的增殖、迁移和侵袭 ($P < 0.01$), 抑制 3D 肿瘤球体积的增大 ($P < 0.01$); 可显著降低 Cyclin D1、C-Myc、N-ca、Vim、MMP14 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01) 并显著升高 E-ca 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。生信分析预测 avu-miR-2863 可能通过调控 Bcl-2 家族蛋白介导的凋亡通路发挥抗肝癌的作用; 与对照组比较, avu-miR-2863 可显著升高 cleaved Caspase-3、Bax 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01) 并降低 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$); 进一步的实验结果显示, 与对照组比较, 转染 avu-miR-2863 后, 细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$), 线粒体荧光强度减弱 ($P < 0.01$), 细胞 ROS 升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); qRT-PCR 检测显示, avu-miR-2863 可通过胃肠道吸收进入小鼠血液 ($P < 0.01$)。结论 avu-miR-2863 可能通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制肝癌细胞 HepG2 和 MHCC97H 的增殖、迁移和侵袭, 从而发挥抗肝癌的作用。
关键词: 鼠妇; microRNA; 肝癌; 增殖; 迁移; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8445-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.013

Armadillidium vulgare miRNA-2863 inhibits liver cancer cell proliferation, migration and invasion via Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway

GUO Qianqian¹, WANG Ruoyu², LU Linzhu¹, TAN Nianhua¹, YI Chun³, TIAN Xuefei¹

1. College of Integrative Chinese and Western Medicine, Hunan Provincial Key Laboratory of Translational Medicine in Chinese

收稿日期: 2024-06-30

基金项目: 2022 年度“刘良院士工作站”指导项目 (22YS002); 中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目 (2022 FTKFJ116); 湖南省自然科学基金青年基金项目 (2023JJ40487); 湖南省教育厅科学研究项目 (21B0392); 湖南省教育厅优秀青年项目 (22B0392); 湖南省中医药科研计划一般项目 (B2023009); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20230820)

作者简介: 郭倩倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治肿瘤的临床与基础研究。E-mail: 20223836@stu.hnucm.edu.cn

#共同第一作者: 王若宇, 男, 博士研究生, 研究方向为中西医结合防治肿瘤。E-mail: wrysky@live.com

***通信作者:** 田雪飞, 教授, 博士 (博士后), 博士生导师, 从事中西医结合防治肿瘤研究。E-mail: 003640@hnucm.edu.cn

易 纯, 讲师, 博士, 从事肿瘤学防治研究。E-mail: 004078@hnucm.edu.cn

Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor Mechanism in Hunan, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

3. Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore effects and underlying mechanisms of miRNA-2863 derived from the traditional Chinese medicine *Armadillidium vulgare*, on the proliferation, migration, and invasion of HepG2 and MHCC97H liver cancer cells. **Methods** Small RNA sequencing identified miRNAs from *A. vulgare*, followed by screening candidate miRNAs. HepG2 and MHCC97H cells were divided into control group and avu-miR-2863 group. Cell proliferation, migration, and invasion were assessed using CCK-8, scratch, and Transwell invasion assays. 3D tumor sphere model was used to simulate the tumor microenvironment and evaluate tumor cell proliferation. Western blotting was performed to detect the expression of cyclin D1, cellular myelocytomatosis oncogene (C-Myc), E-cadherin (E-ca), N-ca, vimentin (Vim), and matrix metalloproteinase 14 (MMP14). Bioinformatics analysis was conducted to predict target genes of avu-miR-2863, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment and Gene Ontology (GO) function enrichment analyses were performed to explore its mechanism of action. The protein expression of cleaved cysteine-aspartic protease-3 (cleaved Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and monoclonal antibody to Bcl-2 associated X protein (Bax) were also detected by Western blotting. Cell apoptosis was assessed using flow cytometry, while mitochondrial fluorescence and intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected using Mito-Tracker Red, Hoechst staining, and DCFH-DA assays. The expression of avu-miR-2863 in blood was measured by qRT-PCR. **Results** High-throughput sequencing identified and screened avu-miR-2863. Compared with the control group, avu-miR-2863 inhibited the proliferation, migration, and invasion of HepG2 and MHCC97H cells ($P < 0.01$) and reduced the size of 3D tumor spheres ($P < 0.01$). avu-miR-2863 downregulated the expression of Cyclin D1, C-Myc, N-ca, Vim, and MMP14 ($P < 0.05, 0.01$), while upregulating E-ca expression ($P < 0.01$). Bioinformatics analysis suggested that avu-miR-2863 may exert its anti-liver cancer effects by regulating the Bcl-2 family-mediated apoptosis pathway. Compared to the control group, avu-miR-2863 increased cleaved Caspase-3 and Bax expression ($P < 0.05, 0.01$) and decreased Bcl-2 expression ($P < 0.01$). Further experimental results indicated that, compared with the control group, transfection with avu-miR-2863 led to enhanced apoptosis ($P < 0.01$), reduced mitochondrial fluorescence intensity ($P < 0.01$), and elevated ROS levels ($P < 0.05, 0.01$). qRT-PCR analysis demonstrated that avu-miR-2863 could be absorbed through the gastrointestinal tract and enter the bloodstream of mice ($P < 0.01$). **Conclusion** The avu-miR-2863 may inhibit the proliferation, migration, and invasion of liver cancer cells HepG2 and MHCC97H by regulating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway, thereby exerting potent anti-liver cancer effects.

Key words: *Armadillidium vulgare* Latreille; microRNA; liver cancer; proliferation; migration; apoptosis

在全球范围内，肝癌的发病率居所有恶性肿瘤的第 6 位，死亡率排第 3 位，每年大约有 83 万人死于肝癌^[1-3]。肝癌的临床治疗方法主要包括手术、放化疗、介入、分子靶向和免疫药物。因其恶性程度高、增殖侵袭能力强，仅有 5%~15% 患者适合早期手术治疗^[4]，而化疗及分子靶向药物因其产生的不良反应及肿瘤耐药性导致临床效果不佳。近年来，中医药在治疗肿瘤方面作用突出，其中，中草药等天然药物作为抗肝癌药物具有独特的优势，在临床中改善肝癌患者的症状、提高其生存质量等方面效果显著^[5]。目前，以天然药物为研究对象寻求抗肝癌有效成分及治疗靶点已成为治疗肝癌研究的热点^[6]。

鼠妇 *Armadillidium vulgare* Latreille 味酸、性咸凉，有破瘀消癥、解毒、止痛的功效，是医圣张仲景鳖甲煎丸中的臣药^[7]。研究发现，鳖甲煎丸可以

通过逆转上皮-间质转化、调控肿瘤细胞生物学行为以及改善肿瘤微环境等途径发挥抗肝癌作用^[8]。鼠妇在鳖甲煎丸方中旨在破瘀消坚、散结化郁，用治癥瘕积聚、经闭痛经之瘀血重证^[9-11]，在原发性肝癌及肝转移癌的治疗中，起到软坚散结、松动癌根的作用^[12]。

目前对于鼠妇等虫类药的功能成分研究主要集中在多肽和蛋白质方面^[13]。与这些大分子物质相比，短链 RNA 片段结构简单、易合成、特异性强、安全性高。核酸类物质，尤其是 microRNA (miRNA)，参与肝癌细胞的生长、凋亡、分化、侵袭及转移等过程^[14]。研究发现，植物来源的 miR159 可以抑制裸鼠乳腺癌的生长；miR-2911、miR167e-5p 可以抑制结肠癌细胞的增殖^[15-17]。以上研究表明，miRNA 可能是中药发挥疗效的物质基础，也具有潜

在的抗肿瘤生物活性。因此,本研究从鼠妇中挖掘 miRNA,探讨其在抗肝癌过程中的作用及潜在机制,为中医药防治肝癌提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞株及动物

人肝癌 HepG2 细胞株(批号 202200302-09)由上海赛百慷生物技术股份有限公司提供;人肝癌 MHCC97H 细胞株(批号 230529E302)由苏州海星生物科技有限公司提供。

4~6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只,由斯莱克景达(湖南)实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2019-0004,动物饲养于斯莱克景达(湖南)实验动物中心,温度 22~26℃、光照 12 h 明暗交替、相对湿度 50%~60%。饲养期间动物自由饮水,普通饮食。本研究动物实验经斯莱克景达(湖南)实验动物管理(伦理)委员会审查批准(批号 IACUC-SJA202400301-04)。

1.2 药品与试剂

鼠妇购自长沙杏元春堂中医药产业有限公司(批号 20230305),经湖南中医药大学第一附属医院中心实验室刘林和湖南中医药大学第一附属医院药剂科鉴定为平甲虫科动物平甲虫 *A. vulgare* Latreille 的干燥体;DMEM 培养基(批号 M21SN1101)、双抗(青霉素-链霉素)灭菌液(批号 M24S012604)购自浙江美森细胞科技有限公司;特级胎牛血清(批号 SA230818)购自武汉普诺赛生物科技有限公司;Lipofectamine 3000™ 购自美国 Invitrogen 公司(批号 2533465)、减血清培养基 Opti-MEM(批号 2537152)购自美国 Gibco 公司;Hochest33342 工作液(批号 C1022)、Mito-Tracker Red CMXRos 工作液(批号 C1035)、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062L)均购自上海碧云天生物技术有限公司;2.5%结晶紫染色液(批号 G1061)购自北京索莱宝科技有限公司;Matrigel® Basement Membrane Matrix(批号 2342002)购自美国 CORNING 公司;Transwell 小室(批号 3422)购自上海 Coster 公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 E-BC-K138-F)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;RNA isolater(批号 7E782H3)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;异弗烷(批号 2023101602)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;β-actin 抗体(批号

66009-1-Ig)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号 68103-1-Ig)、Bcl-2 关联 X 蛋白单克隆抗体(monoclonal antibody to Bcl-2 associated X protein, Bax, 批号 50599-2-Ig)、N-钙黏蛋白抗体(N-cadherin, N-ca, 批号 66219-1-Ig)、E-ca(批号 20874-1-AP)、波形蛋白(vimentin, Vim, 批号 60330-1-Ig)、细胞性骨髓细胞瘤原癌基因(cellular myelocytomatosis oncogene, C-Myc)抗体(批号 67447-1-Ig)、周期蛋白 D1(cyclin D1, 批号 26939-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;基质金属蛋白酶 14(matrix metalloproteinase 14, MMP14, 批号 AF0212)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteine-aspartic protease-3, cleaved Caspase-3)抗体(批号 AF7022)购自 Affinity 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 BL003A)、HRP 标记山羊抗小鼠二抗(批号 BL001A)、cell counting kit-8(CCK-8, 批号 BS350B)试剂盒、ECL 化学发光底物(批号 BL520A)、RIPA 裂解液(批号 BL504A)、PMSF(100 mmol/L, 批号 BL507A-1)均购自美国 Biosharp 公司;磷酸酶抑制剂(批号 P003)购自苏州新赛美生物科技有限公司;BCA 定量试剂盒(批号 CW0014S)购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;全血 RNA 分离试剂盒(批号 5201050)购自杭州新景生物试剂开发有限公司;TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit(批号 20020594)、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit(批号 20020594)购自美国 Illumina 公司;miRNA cDNA 第一链合成预混液(茎环法,批号 AG11748)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit(批号 V0818)、MicrON™ novel-41 mimic(批号 V1117)、MicrON mimic NC #22(批号 U0910)均购自广州锐博生物技术有限公司。

1.3 仪器

DH-160I 型 CO₂ 培养箱(上海三藤仪器设备有限公司);DSZ2000X 型荧光显微镜(北京中显恒业有限公司);MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳汇松科技发展有限公司);Centrifuge 5425 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Light Cycler 96 型 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);QuantStudio™ 3 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Micro Drop SE 超微量分光光度计(中国上

海宝予德科学仪器有限公司)；Illumina NovaSeq 6000 基因测序仪(美国 Illumina 公司)；Cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTER 公司)；DYCZ-24DH 型电泳仪、DYY-7C 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司)；ChemiScope 6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 基于 small RNA 测序挖掘鼠妇 miRNA

提取鼠妇总 RNA，采用 qRT-PCR 进行准确定量(文库有效浓度 >2 nmol/L)，Illumina 高通量测序对鼠妇 miRNA 进行转录组测序，将检测的 miRNA 序列与 Rfam、miRBase 的基因组序列进行比对，并整合 miREvo 和 miRDeep2 进行新 miRNA 的分析，获得表达量 count 值并进行统计，Transcripts Per Million (TPM) 进行表达量的均一化处理，构建鼠妇 miRNA 表达谱。

2.2 制备转染复合物 mimics

将 miRNA mimics 使用 DEPC 水配制成 20 μ mol/L 保存液，转染时取 mimics 及 lipofectamine 3000TM 分别和 opti-MEM 培养基稀释，混合均匀后，将稀释的 lipofectamine 3000TM 与 mimics 混和，室温静置 15 min。当细胞密度达到 50%~70%时，将转染复合物加入含有 HepG2 和 MHCC97H 细胞及培养液的孔中，所有细胞均在对数生长期，以确保在转染前处于良好的增殖状态。

2.3 细胞培养、分组及处理

肝癌 HepG2 和 MHCC97H 细胞培养在含 1% 双抗溶液+89% DMEM 基础培养基+10%胎牛血清配成的完全培养基中，培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度。每天观察细胞生长状况，2~3 d 传代 1 次。细胞随机分为对照组、avu-miR-2863 组(100 nmol/L)，根据实验要求配置转染复合物，转染后收集细胞检测。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖

肝癌 HepG2 和 MHCC97H 细胞以 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板，分别于转染 24、48、72 h 加入含 10% CCK-8 试剂的完全培养基，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，450 nm 波长处检测吸光度(A)值，计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 细胞划痕实验

HepG2 和 MHCC97H 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板，待细胞融合率达到 100%时，使用 200 μ L 的移液枪头垂直于底部划直线，去除漂浮细胞，加

入无血清培养液。显微镜下观察记录转染 0、24、48 h 的划痕中细胞迁移情况，采用 Image-J 软件检测划痕面积，计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (\text{0 h 划痕面积} - \text{待测时间点划痕面积}) / \text{0 h 划痕面积}$$

2.6 Transwell 侵袭实验

Matrigel 基质胶包被 Transwell 小室，调整细胞浓度，取 2×10^4 个 HepG2 和 MHCC97H 细胞加入到上室，下室加入含 15% FBS 的 DMEM 完全培养基。转染 48 h 后，取出 Transwell 小室加入 4%组织固定液固定，0.1%结晶紫染色，显微镜下观察拍照，采用 Image-J 软件计算迁移细胞数量。

2.7 3D 肿瘤球形成实验

HepG2 和 MHCC97H 细胞以 5×10^3 个/孔接种于超低吸附圆底 96 孔培养板，培养 72 h 形成 3D 肿瘤球球体，转染后继续培养 48 h，采用显微镜观察肿瘤球的形态和大小，拍摄照片，采用 Image-J 软件测量肿瘤球的平面面积及横直径，计算肿瘤球体积。

$$\text{肿瘤球体积} = (\pi \times \text{最大直径} \times \text{最小直径}) / 6$$

2.8 靶基因预测及功能分析

通过 miRDB 和 miRanda 软件预测 avu-miR-2863 的靶基因，将 2 个软件所预测到的靶基因取交集，自 TCGA 数据库中下载肝癌的研究数据，将 avu-miR-2863 的靶基因和 TCGA UP 数据库进行比对分析获得交集靶基因群，并进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析，统计显著性的阈值设定为 $P < 0.05$ 。

2.9 Western blotting 检测相关蛋白表达

取细胞加入 RIPA 裂解液及蛋白酶、磷酸酶抑制剂，提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，使用 5%脱脂奶粉封闭处理 1 h，分别加入 Bcl-2 (1:5 000)、Bax (1:1 000)、cleaved Caspase-3 (1:1 000)、N-Ca (1:10 000)、E-Ca (1:20 000)、Vim (1:20 000)、MMP14 (1:2 000)、Cyclin D1 (1:20 000)、C-Myc (1:20 000) 和 β -actin (1:20 000) 一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h，TBST 缓冲液洗涤 3 次，用 ECL 发光液避光显影，采用 Image-J 图像分析软件计算条带的灰度值。

2.10 流式细胞术检测细胞凋亡率

HepG2 和 MHCC97H 细胞以 5×10^5 个/孔接

种于 6 孔板, 转染后收集细胞, PBS 清洗, 加入 AnnexinV-FITC 液、PI 液各 5 μ L 双染细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 计算各组细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 总细胞数

2.11 荧光染色检测细胞线粒体损伤

细胞转染 48 h 时, 使用 Mito-Tracker Red CMXRos 储存液和 Hoechst33342 染色液进行染色孵育, 荧光显微镜下观察拍照。Mito Tracker Red 标记的线粒体呈红色, Hoechst33342 染色的细胞核呈蓝色, 采用 Image-J 软件检测荧光强度。

2.12 流式细胞术检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平

将转染后的 2 组细胞与 DCFH-DA 探针在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min, 胰酶消化离心后收集细胞, 使用流式细胞仪进行检测。

2.13 动物分组与给药

将 6 只 C57BL/6J 小鼠采用随机数字表法分为模型组和给药组, 每组 3 只。依据《湖南省中药

材质量标准》^[18]鼠妇用量标准及参照《药理实验方法学》^[19]计算出 C57BL/6J 小鼠每日 ig 的剂量为 0.78 g/kg, 1 次/d, 给药体积为 0.2 mL。

取鼠妇, 将其水分焙干, 粉碎后过 60 目筛备用, 称取适量鼠妇粉末, 加入 PBS 后混匀获得鼠妇悬液 (0.078 g/mL)。模型组小鼠 ig 等体积生理盐水, 各组小鼠连续 ig 14 d, 末次给药后 2 h 麻醉小鼠摘眼球取血。

2.14 qRT-PCR 检测 avu-miR-2863 在小鼠血液中的表达

取小鼠血液, 使用全血 RNA 分离试剂盒从全血中分离总 RNA, miRNA cDNA 第一链合成预混液和 Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit 逆转录 cDNA 及 qRT-PCR。PCR 程序预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 2 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s 和 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 40 个循环; 熔解曲线变性 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 用于 qRT-PCR 的引物由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成, 将 U6 作为内参, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

序列名称	引物序列 (5'-3')	扩增片段/bp
avu-miR-2863 茎环法引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTGAG	88
avu-miR-2863 上游引物	CGCGGTTGTGGACTGTGG	
avu-miR-2863 下游引物	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
U6 茎环法引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATATGG	111
U6 上游引物	CGCTTCGGCAGCACATATAC	
U6 下游引物	TTCACGAATTTGCGTGTTCATC	

2.15 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据可视化, 计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐时多组样本比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐时采用 Games-Howell 检验, 若多组均数不符合正态分布, 则采用多样本秩和检验 (KruskalWallis H 检验)。

3 结果

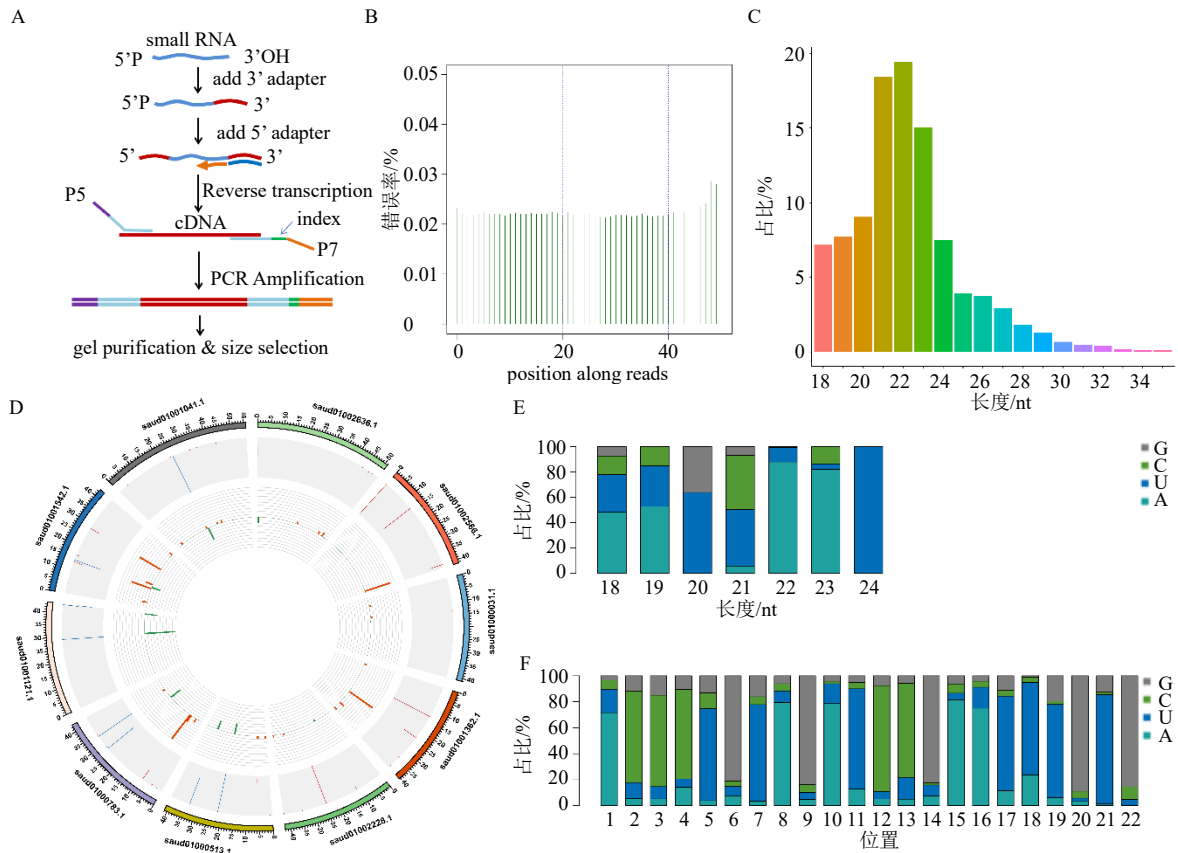
3.1 基于 small RNA 测序挖掘 avu-miRNA

运用高通量测序技术, 建立 cDNA 文库, 挖掘 avu-miRNA, 测序所得的 miRNA 中, read count 在 100 以上的 miRNA 共有 21 个, 100 以下有 24

个。经 TPM 归一化后, 表达量前 5 位的新 miRNA 的序列、read counts、TPM 见图 1 和表 2。将表达量前 5 位 miRNA 的序列输入 miRbase 进行检索^[20], 未发现数据库中与 Novel-41 序列一致的人类 miRNA 序列。基于此, 说明 Novel-41 是鼠妇特有的 miRNA, 作为候选的 miRNA 进行研究。根据 miRNA 命名原则^[21-22], 将 Novel-41 命名为 avu-miR-2863。

3.2 对抑制 HepG2 和 MHCC97H 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

与对照组比较, 2D 细胞实验 CCK-8 结果 (图 2-A、B) 发现, avu-miR-2863 可以抑制 HepG2 及 MHCC97H 细胞的增殖, 且 100 nmol/L 浓度下作



A-中药鼠妇文库构建流程; B-测序错误率分布图, 横坐标为 reads 的碱基位置, 纵坐标为单碱基错误率; C-sRNA 片段的长度分布统计; D-鼠妇染色体的密度分布, 图中最外圈是选择展示的各条染色体, 中间的灰色背景区是抽取了其中 10 000 条 reads 的分布情况, 红色比对照正链, 蓝色比对照负链, 最里面的圆圈区是比对到该染色体上的所有 reads, 橘黄色为正链测序覆盖度, 绿色为负链测序覆盖度, 超过所有测序覆盖度均值+3 倍标准差的奇异点将被舍弃; E、F-新的 miRNA 首位及各位置碱基的偏好性。

A-workflow of *A. vulgare* library construction for traditional Chinese medicine; B-distribution of sequencing error rates, where the x-axis represents the base position of reads, and the y-axis represents the error rate per base; C-length distribution statistics of sRNA fragments; D-density distribution of *A. vulgare* chromosomes, where the outermost circle represents the selected chromosomes displayed. The gray background area in the middle shows the distribution of 10 000 sampled reads, with red representing alignment to the positive strand and blue to the negative strand. The innermost circle indicates all reads aligned to the chromosome, with orange showing the sequencing coverage of the positive strand and green the coverage of the negative strand. Outliers exceeding the mean sequencing coverage plus three times the standard deviation are excluded; E, F-preference for bases at the first and other positions of novel miRNAs.

图 1 鼠妇 small RNA 的高通量测序
Fig. 1 High-throughput sequencing of *A. vulgare* small RNA

表 2 表达量前 5 位的新 miRNAs
Table 2 Top five newly identified miRNAs with highest expression levels

miRNA	miRNA 序列 (5'-3')	核苷酸	序列读取计数	每百万转录本
Novel-1	ACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	22	5 521	54 421.969 880
Novel-34	UGGACGGAGAACUGAUAAGGG	21	758	7 471.808 217
Novel-16	UUUUGAUUGUUGCUCAGAAGGC	22	357	3 519.044 239
Novel-29	CUUGGCACUGAAAGAAUUCACA	22	137	1 350.445 548
Novel-41 (avu-miR-2863)	GUUGUGGACUGUGGCUCAGC	20	124	1 222.301 080

用 48 h 效果较显著 ($P<0.01$)。因此, 后续实验给药浓度及时间为 100 nmol/L、48 h。通过 3D 肿瘤球模型实验 (图 2-C、D) 发现, 与对照组比较, avu-miR-2863 能够抑制 HepG2 和 MHCC97H 细胞 3D 肿瘤球面积及体积的增大 ($P<0.01$)。划痕实验和 Transwell 侵袭实验结果 (图 2-E~G)

表明,与对照组比较,avu-miR-2863 对 HepG2 及 MHCC97H 细胞的迁移和侵袭能力均有抑制作用 ($P<0.01$)。

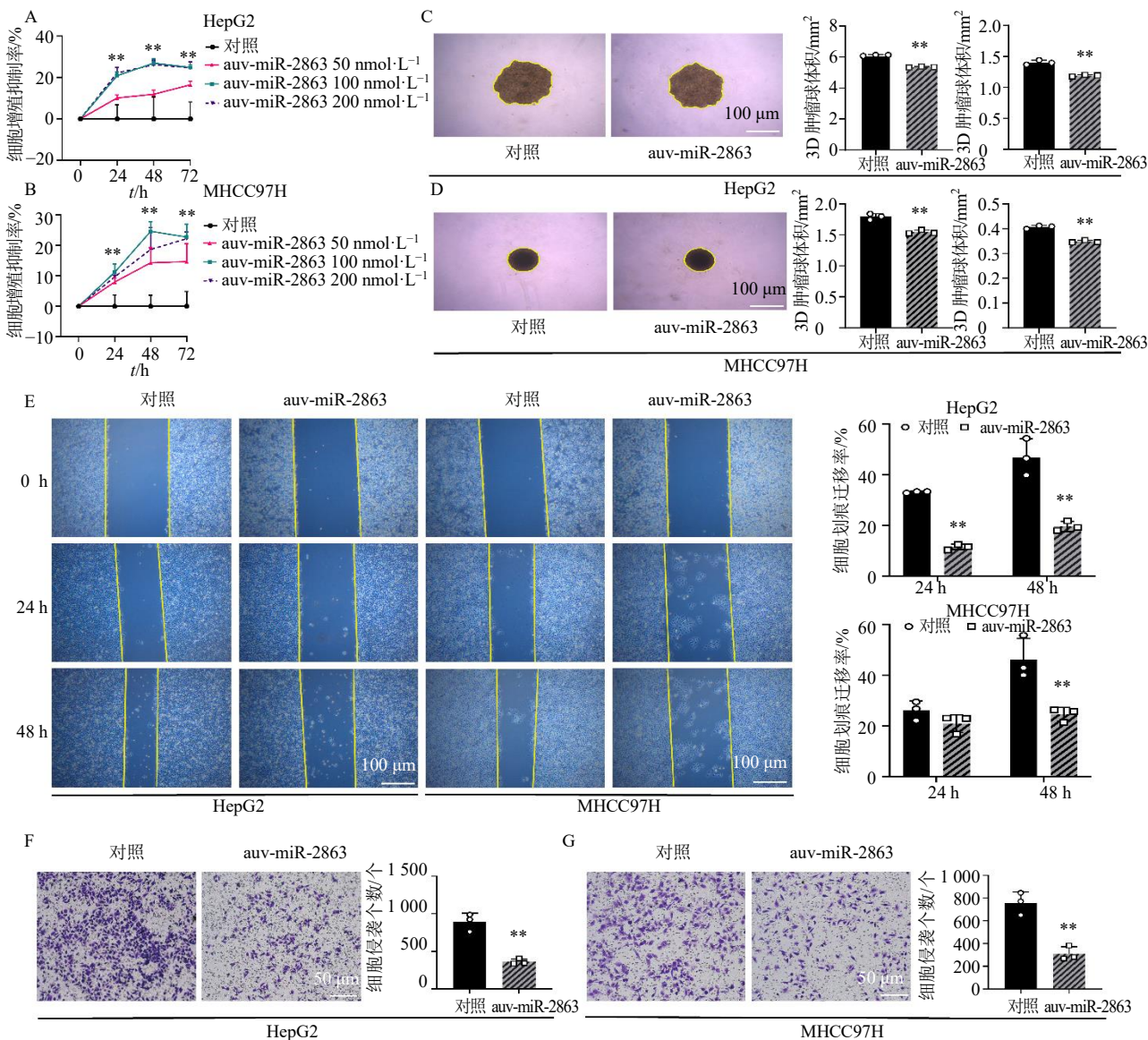
3.3 对 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果 (图 3) 显示,与对照组比较,avu-miR-2863 组 Cyclin D1、c-Myc、N-Ca、Vim、

MMP14 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01), E-Ca 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。

3.4 avu-miR-2863 靶基因预测和 Western blotting 验证

通过 miRanda 预测到 avu-miR-2863 的靶基因 2 236 个, miRDB 预测到 443 个, 2 个数据库交集靶基因有 385 个。使用 TCGA 数据库基因与 avu-miR-



A、B-CCK-8 检测 avu-miR-2863 对 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖的影响 ($n=6$)；C、D-3D 肿瘤球形成实验评估转染 avu-miR-2863 后肿瘤细胞的增殖情况 ($n=3$)；E-划痕实验分析转染 avu-miR-2863 后 HepG2 和 MHCC97H 细胞迁移能力 ($n=3$)；F、G-Transwell 检测 avu-miR-2863 干预后 HepG2 和 MHCC97H 细胞的侵袭能力 ($n=3$)；与对照组比较： $*P<0.05$ $**P<0.01$ ，下图同。

A, B-CCK-8 assay showing the effect of avu-miR-2863 on the proliferation of HepG2 and MHCC97H cells ($n=6$); C, D-3D tumor sphere formation assay evaluating tumor cell proliferation after transfection with avu-miR-2863 ($n=3$); E-scratch assay analyzing the migration ability of HepG2 and MHCC97H cells after transfection with avu-miR-2863 ($n=3$); F, G-transwell assay assessing the invasion ability of HepG2 and MHCC97H cells after avu-miR-2863 intervention ($n=3$); $*P<0.05$ $**P<0.01$ vs control group, same as below figures.

图 2 对 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects on proliferation, migration, and invasion of HepG2 and MHCC97H cells ($\bar{x} \pm s$)

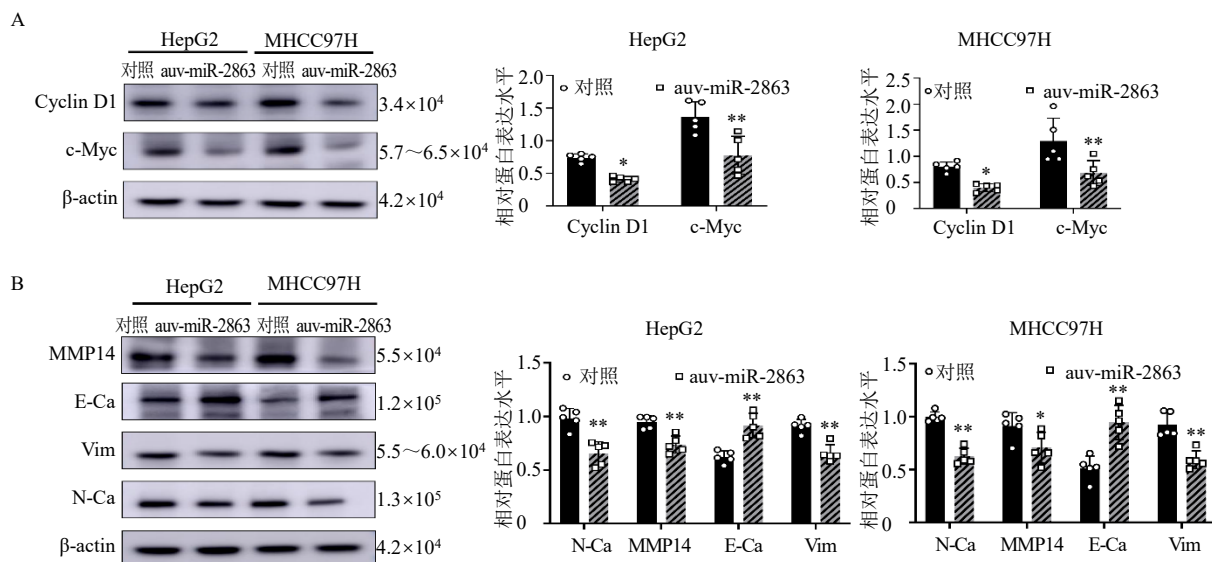


图 3 对 HepG2 和 MHCC97H 细胞增殖 (A)、迁移和侵袭 (B) 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects on expression of proteins related to proliferation (A), migration, and invasion (B) in HepG2 and MHCC97H cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2863 预测的交集 230 个靶基因进行 KEGG 富集分析和 GO 分析 (图 4-A~D)。从生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 方面进行 GO 分析, 在 BP 方面, 主要参与腺体发育、细胞增殖等过程; 在 CC 方面, 主要涉及调控凋亡过程的 Bcl-2 家族蛋白, 与生长和存活信号有关; 在 MF 方面, 主要发挥 GTP 酶激活蛋白结合等作用。KEGG 分析结果显示 avu-miR-2863 的靶基因富集到凋亡通路。因此, 选取与 Bcl-2 相关的细胞凋亡及有关生物过程进行验证, Western blotting 结果 (图 4-E) 显示, 使用 avu-miR-2863 转染 HepG2 及 MHCC97H 细胞后, cleaved Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), Bcl-2 的蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.01$)。

3.5 对 HepG2 及 MHCC97H 细胞凋亡、线粒体和 ROS 的影响

使用 avu-miR-2863 转染干预 HepG2 及 MHCC97H 细胞后, 如图 5-A、B 所示, 与对照组比较, 线粒体红色荧光强度显著减弱、信号减少 ($P < 0.01$)。如图 5-C、E 所示, avu-miR-2863 干预后 HepG2 和 MHCC97H 细胞 ROS 荧光强度及凋亡率显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.6 avu-miR-2863 在血液中的表达

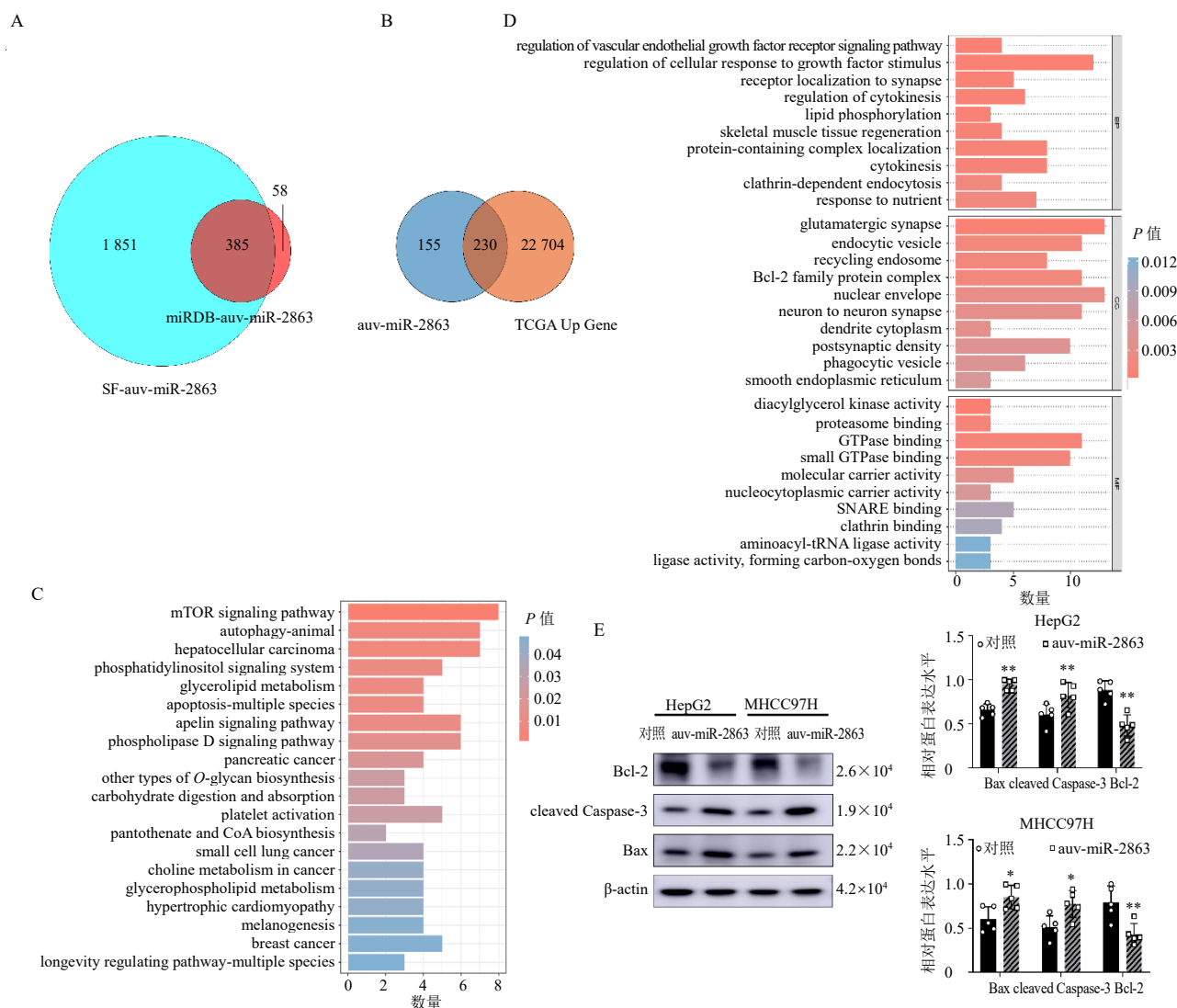
为验证 avu-miR-2863 是否能够跨物种吸收入

血, 依据 avu-miR-2863 序列结构 (图 6-A), 采用 qRT-PCR 检测, 结果如图 6-B 所示, 可在小鼠体内检测到 avu-miR-2863 的表达 ($P < 0.01$)。

4 讨论

原发性肝癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 具有起病隐匿、恶性程度高、进展迅速等特点^[23]。近年来, 中医药在肿瘤治疗中的作用日益受到重视。作为抗癌药物的新来源, 中药及其成分的多靶点治疗机制为肝癌治疗提供了新的有效策略。研究表明, 中药活性成分通过多靶点机制, 抑制肝癌细胞的增殖、转移、侵袭和诱导凋亡, 展现出抗肿瘤活性^[5,24-25]。中药活性成分中的药用昆虫也是癌症治疗药物的重要组成部分^[26], 研究证实, 鼠妇、鳖甲、壁虎等虫类药物可以入络搜邪, 改善局部微环境, 甚至引诸药直达病所, 展现出良好的抗癌活性^[27]。其中鼠妇乙醇回流提取物对肝癌、乳腺癌等多种癌细胞均有抑制作用, 这为进一步探索其新的活性成分的抗肿瘤机制提供了依据^[28]。

miRNA 是一类重要的小分子非编码 RNA, 其不具有翻译功能蛋白的作用, 但能通过识别特定 mRNA 3'非翻译区 (3'untranslated region, 3'UTR) 上的位点对靶基因切割或者抑制翻译转录后水平发挥负调控作用来靶向调控基因的表达^[29-30], 参与细胞分化、炎症、凋亡、免疫和代谢等多种细胞过程, 与恶性肿瘤等多种疾病的发生密切相关^[31-34]。



A-miRanda 和 miRDB 数据库 avu-miR-2863 靶基因预测交集韦恩图; B-auv-miR-2863 靶基因和 TCGA 数据库基因交集韦恩图; C-auv-miR-2863 靶基因和 TCGA 数据库基因交集靶基因 KEGG 分析; D-auv-miR-2863 靶基因和 TCGA 数据库基因交集靶基因 GO 分析; E-auv-miR-2863 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响。

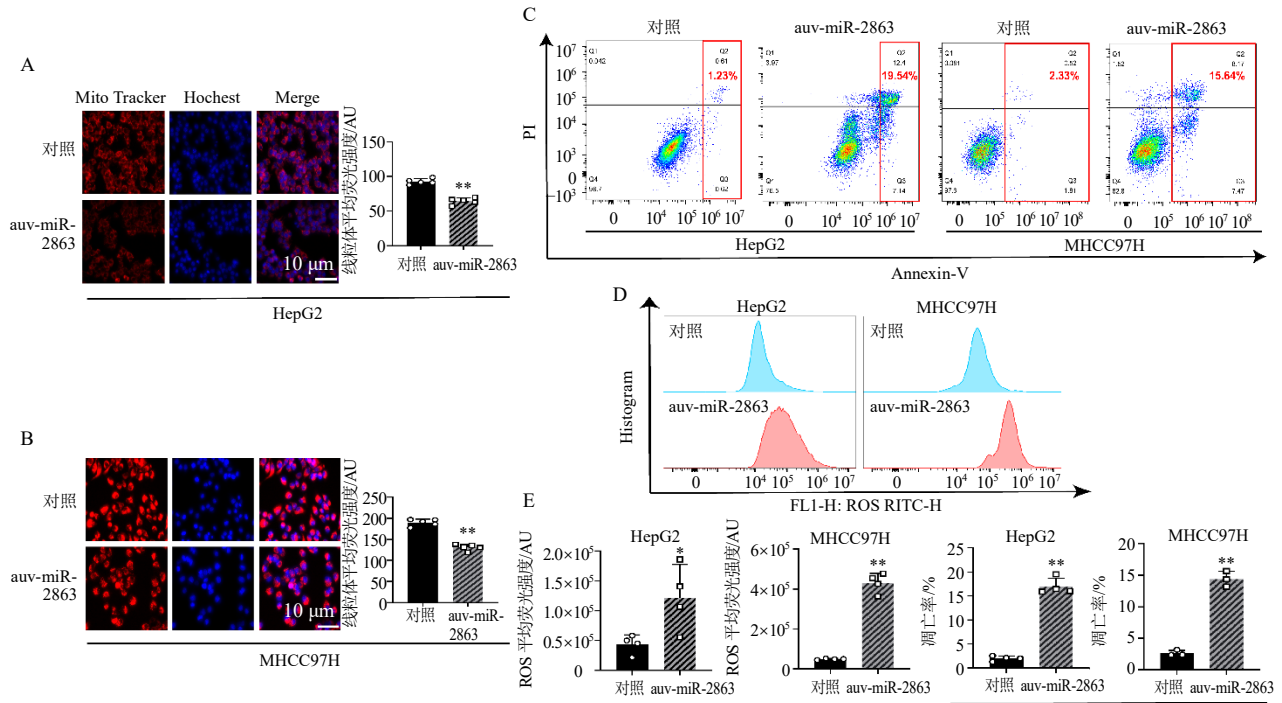
A-venn diagram showing the intersection of avu-miR-2863 target genes predicted by miRanda and miRDB databases; B-venn diagram showing the intersection of avu-miR-2863 target genes with genes from the TCGA database; C-KEGG analysis of the intersecting target genes between avu-miR-2863 and TCGA database genes; D-GO analysis of the intersecting target genes between avu-miR-2863 and TCGA database genes; E-effects of avu-miR-2863 on the expression of apoptosis-related proteins.

图 4 avu-miR-2863 靶基因预测及 Western blotting 验证 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Prediction of avu-miR-2863 target genes and validation by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

研究通过使用高通量测序技术, 挖掘筛选出 avu-miR-2863 进行实验。恶性肿瘤以其快速的增殖及高迁移、高侵袭的能力而具有进展迅速、广泛转移和高复发的特性。研究选择 HepG2 和 MHCC97H 2 种人肝癌细胞系, 利用它们在表征肝癌不同恶性程度和细胞行为方面的优势, 验证 avu-miR-2863 的抗肿瘤活性。通过 2D 细胞实验 CCK-8、细胞划痕和 Transwell 侵袭实验, 结果表明, 在 100 nmol/L 浓度

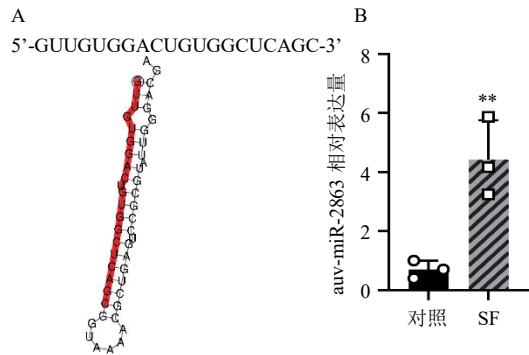
处理 48 h, avu-miR-2863 能够有效抑制肝癌细胞的增殖、减慢迁移速度并减少细胞侵袭。此外, 通过 3D 肿瘤球模拟体内肿瘤的三维结构和微环境, 发现 avu-miR-2863 可以抑制 HepG2 和 MHCC97H 细胞肿瘤球体积和面积的增大。Western blotting 结果显示, avu-miR-2863 能够通过调控关键蛋白, 抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。avu-miR-2863 下调增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 c-Myc 的表达, 阻碍细胞



A、B-Mito-Tracker Red 和 Hoechst 荧光检测 HepG2 和 MHCC97H 细胞线粒体损伤情况 ($n=5$)；C、E-流式细胞术检测 avu-miR-2863 对 HepG2 ($n=4$) 和 MHCC97H 细胞凋亡的影响 ($n=3$)；D-DCFH DA 探针检测 avu-miR-2863 对 HepG2 和 MHCC97H 细胞 ROS 水平的影响 ($n=4$)。A, B-Mito-Tracker Red and Hoechst fluorescence assays to detect mitochondrial damage in HepG2 and MHCC97H cells ($n=5$); C, E-flow cytometry analysis of the effect of avu-miR-2863 on apoptosis in HepG2 ($n=4$) and MHCC97H cells ($n=3$); D-DCFH-DA probe assay to assess the effect of avu-miR-2863 on ROS levels in HepG2 and MHCC97H cells ($n=4$).

图 5 avu-miR-2863 对 HepG2 及 MHCC97H 细胞线粒体、ROS 和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Effects of avu-miR-2863 on mitochondria, ROS, and apoptosis in HepG2 and MHCC97H cells ($\bar{x} \pm s$)



A-avu-miR-2863 的前体二级结构和成熟体序列；B-qRT-PCR 验证 avu-miR-2863 在小鼠血液中的表达。

A-secondary structure of the avu-miR-2863 precursor and the sequence of the mature form; B-qRT-PCR validation of avu-miR-2863 expression in mice blood.

图 6 avu-miR-2863 在血液中的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Expression of avu-miR-2863 in blood ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

周期进程，抑制肝癌细胞的增殖，同时，降低上皮-间质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 标志物 N-Ca 和 Vim 的表达，并上调 E-Ca，抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭，MMP14 的下调进一步显示

avu-miR-2863 能够削弱肝癌细胞的基质降解能力，限制其侵袭，抑制肿瘤细胞的恶性行为。

为进一步探讨 avu-miR-2863 的抗肝癌分子机制，使用 miRanda 和 miRDB 数据库预测其靶基因，通过 KEGG 和 GO 通路富集分析发现，avu-miR-2863 可能通过调控 Bcl-2 家族蛋白介导的凋亡途径发挥作用。研究发现，Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡调控中至关重要。Bcl-2 过度表达或异常激活可以促进癌细胞的存活和生长，并与多种癌症的发生、进展、转移和复发密切相关。通过降低 Bcl-2 水平或抑制其活性，可以增强恶性肿瘤细胞对凋亡的敏感性，从而发挥抗肿瘤作用^[35-39]。Bax 是一种促凋亡蛋白，通过与线粒体膜上的 Bcl-2 结合，增加线粒体外膜的通透性，释放细胞色素 C，激活凋亡执行蛋白 cleaved Caspase-3，引发细胞凋亡^[40-41]。在本研究中，avu-miR-2863 显著下调了蛋白 Bcl-2 的表达，同时上调了蛋白 cleaved Caspase-3 和 Bax 的表达，表明 avu-miR-2863 可以通过解除 Bcl-2 对 Bax 的抑制作用，增强 Bax 介导的凋亡信号通路，促进

肿瘤细胞凋亡,同时活化的 Caspase-3 抑制了细胞周期进程,并通过破坏细胞骨架结构,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[42]。Mito-Tracker Red 和 DCFH-DA 探针检测结果进一步验证了 avu-miR-2863 对线粒体功能的影响,avu-miR-2863 使具有生物活性的线粒体减少,肝癌细胞内 ROS 增加,损伤肝癌细胞并导致其死亡。这些结果表明 avu-miR-2863 可能通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路并影响线粒体功能,来抑制肝癌细胞的恶性行为,发挥抗肝癌的作用。

miRNA 不仅可以靶向生物体内源性基因,还可以跨界调控其他种属基因的表达^[43],2012 年,张辰宇团队首次报道水稻来源的 MIR168a 能够经过小鼠的消化系统进入血液循环和多个组织器官,抑制肝脏中 LDLRAP1 的表达,此研究揭示了异源性 miRNA 可以跨界调控哺乳动物靶基因的表达^[44]。《中药大辞典》^[45]和《中华本草》^[46]显示鼠妇含有粘多糖及复杂的脂类成分,包括不皂化物、丙酮不溶脂和多种脂肪酸等。与传统的多糖类、蛋白质和多肽类成分相比,miRNA 具有精确的基因调控、多靶点效应、易于传递、调控灵活以及潜在的靶向治疗应用等优势^[47-50]。qRT-PCR 检测结果表明,avu-miR-2863 能够通过胃肠道进入小鼠血液,表明 avu-miR-2863 可以跨物种进入小鼠体内,且具有一定的生物利用度和体内活性,为其在体内发挥抗肿瘤作用提供了重要依据。

综上,本研究揭示了 avu-miR-2863 在抑制肝癌细胞增殖、迁移、侵袭方面的作用,并初步阐明了其可能通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路实现这一作用的机制。这为开发基于天然产物的肝癌治疗策略提供了新的思路。然而,本研究主要在体外细胞实验进行,未来的研究将进一步完善体内实验,并深入探讨 avu-miR-2863 在调控线粒体功能和凋亡途径中的具体交互作用及其分子机制,以期为肝癌的临床治疗提供更多的理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kim E, Viatour P. Hepatocellular carcinoma: Old friends and new tricks [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(12): 1898-1907.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Li Z, Hao E, Cao R, et al. Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 479-493.
- [4] Yang J D, Hainaut P, Gores G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- [5] Sundarraj K, Raghunath A, Panneerselvam L, et al. Fisetin, a phytopolyphenol, targets apoptotic and necroptotic cell death in HepG2 cells [J]. *Biofactors*, 2020, 46(1): 118-135.
- [6] Anwanwan D, Singh S K, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314.
- [7] 董石, 祁烁, 李忠. 鼠妇药理作用研究与临床应用进展 [J]. *中医学报*, 2018, 33(10): 1996-1998.
- [8] 黄晶晶, 钟瑞熙, 朱荣火, 等. 《金匱要略》鳖甲煎丸研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(4): 15-19.
- [9] 朱胜典. 鼠妇临床应用二则 [J]. *四川中医*, 1987, 1987(3): 25.
- [10] 王红玲. 张锡纯运用虫类药物的学术思想探讨 [J]. *河南中医学院学报*, 2009, 24(1): 95-96.
- [11] 吴立明, 程晓卫. 张仲景方剂中虫类药功用探析 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(12): 3372-3373.
- [12] 顾恪波, 王逊, 何立丽, 等. 孙桂芝教授治疗恶性肿瘤“取象比类”用药经验浅析 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2014, 23(36): 4066-4067.
- [13] 李军, 刘嘉利, 李尧锋, 等. 鼠妇化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2020, 48(3): 74-76.
- [14] Wu H, Tao J Y, Li X L, et al. MicroRNA-206 prevents the pathogenesis of hepatocellular carcinoma by modulating expression of met proto-oncogene and cyclin-dependent kinase 6 in mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66(6): 1952-1967.
- [15] Liu C Y, Xu M Z, Yan L C, et al. Honeysuckle-derived microRNA2911 inhibits tumor growth by targeting TGF- β 1 [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 49.
- [16] Li M, Chen T, He J J, et al. Plant MIR167e-5p inhibits enterocyte proliferation by targeting β -catenin [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1385.
- [17] 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.
- [18] 湖南省食品药品监督管理局编. 湖南省中药材标准 2009 年版 [M]. 湖南科学技术出版社, 2010: 261.
- [19] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1184.
- [20] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: From microRNA sequences to function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D155-D162.
- [21] Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, et al. miRNA

- nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants [J]. *Trends Genet*, 2015, 31(11): 613-626.
- [22] Ambros V, Bartel B, Bartel D P, *et al*. A uniform system for microRNA annotation [J]. *RNA*, 2003, 9(3): 277-279.
- [23] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [24] Smagula S F, Zhang G H, Gujral S, *et al*. Association of 24-hour activity pattern phenotypes with depression symptoms and cognitive performance in aging [J]. *JAMA Psychiatry*, 2022, 79(10): 1023-1031.
- [25] Li Y Y, Li Y, Zhang J H, *et al*. Current perspective of traditional Chinese medicines and active ingredients in the therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2022, 9: 41-56.
- [26] 韦桂宁, 韦玉茹, 李冬梅. 药用昆虫药理活性研究进展 [J]. 广西科学, 2019, 26(5): 477-483.
- [27] 彭涛. 鳖甲煎丸在肝癌治疗中的临床应用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(6): 481-483.
- [28] 刘文静, 杨稳, 刘飞, 等. 鼠妇抗肿瘤活性物质初步探究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(10): 15-18.
- [29] Wang S D, Talukder A, Cha M Y, *et al*. Computational annotation of miRNA transcription start sites [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(1): 380-392.
- [30] Kalogianni D P, Kalligiosfyri P M, Kyriakou I K, *et al*. Advances in microRNA analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(3): 695-713.
- [31] Budakoti M, Panwar A S, Molpa D, *et al*. Micro-RNA: The darkhorse of cancer [J]. *Cell Signal*, 2021, 83: 109995.
- [32] Shi Y, Liu Z H, Lin Q, *et al*. MiRNAs and cancer: Key link in diagnosis and therapy [J]. *Genes*, 2021, 12(8): 1289.
- [33] Ali Syeda Z, Langden S S S, Munkhzul C, *et al*. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1723.
- [34] Yaghoubi N, Zahedi Avval F, Khazaei M, *et al*. MicroRNAs as potential investigative and predictive biomarkers in colorectal cancer [J]. *Cell Signal*, 2021, 80: 109910.
- [35] Letai A, Sorcinelli M D, Beard C, *et al*. Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 241-249.
- [36] Goff D J, Court Recart A, Sadarangani A, *et al*. A Pan-BCL2 inhibitor renders bone-marrow-resident human leukemia stem cells sensitive to tyrosine kinase inhibition [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(3): 316-328.
- [37] Davids M S, Letai A. ABT-199: Taking dead aim at BCL-2 [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(2): 139-141.
- [38] Delbridge A R, Grabow S, Strasser A, *et al*. Thirty years of BCL-2: Translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(2): 99-109.
- [39] Kitada S, Pedersen I M, Schimmer A D, *et al*. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies [J]. *Oncogene*, 2002, 21(21): 3459-3474.
- [40] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, *et al*. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [41] Alam M, Alam S, Shamsi A, *et al*. Bax/bcl-2 cascade is regulated by the EGFR pathway: Therapeutic targeting of non-small cell lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 869672.
- [42] Mok E H K, Leung C O N, Zhou L, *et al*. Caspase-3-induced activation of SREBP2 drives drug resistance via promotion of cholesterol biosynthesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(17): 3102-3115.
- [43] Chen X M, Rechavi O. Plant and animal small RNA communications between cells and organisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(3): 185-203.
- [44] 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(1): 107-126.
- [45] 卫生报馆编辑部. 中药大辞典 [M]. [影印本]. 上海: 上海交通大学出版社, 2018: 407.
- [46] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-5 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 111-113.
- [47] Kim T, Croce C M. MicroRNA: Trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(7): 1314-1321.
- [48] Kubeczko M, Tudrej P, Tyszkiewicz T, *et al*. Liquid biopsy utilizing miRNA in patients with advanced breast cancer treated with cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors [J]. *Oncol Lett*, 2024, 27(4): 181.
- [49] Chen Z, Ge C D, Zhu X K, *et al*. A novel nanoprobe for visually investigating the controversial role of miRNA-34a as an oncogene or tumor suppressor in cancer cells [J]. *Anal Methods*, 2024, 16(5): 667-675.
- [50] Shang R, Lee S, Senavirathne G, *et al*. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(12): 816-833.

[责任编辑 罗 曦]