

高表达 miR-3682-3p 是肝细胞癌患者的不良预后因素

刘绍华¹, 温莹浩^{2,3}, 全兵⁴, 蔺军⁵, 朱泽文², 汤江林², 韩思源⁴

萍乡市人民医院¹普外科,²肿瘤科,³重症监护室,江西萍乡 337000;³南方医科大学中西医结合医院肿瘤中心,广东广州 510220;⁴东莞市松山湖中心医院肿瘤科,广东东莞 523000

摘要:目的 分析 miR-3682-3p 在 HCC 中的表达及其与临床参数和预后的相关性。方法 生物信息学分析 miR-3682-3p 在 HCC 中的表达以及与其生存相关性;实时荧光定量 PCR 和原位杂交分别检测 miR-3682-3p(miR-3682) 在 18 对 HCC 与癌旁新鲜肝组织以及 90 对石蜡包埋 HCC 及其癌旁组织中的表达差异。统计分析 miR-3682-3p 在 HCC 中的表达与患者临床参数和预后之间的关系。利用多因素回归分析探讨 miR-3682-3p 表达作为肝细胞癌预后独立因素的可能性。结果 生物信息分析显示,miR-3682-3p 在 HCC 组织中高表达,且与 HCC 患者综合生存时间有统计学关联($\chi^2=8.793, P<0.001$)。实时荧光定量 PCR 分析 18 组配对的 HCC 和癌旁肝组织显示,miR-3682-3p 在癌组织中表达明显上调($t=3.073, P=0.007$)。原位杂交分析 90 组配对的 HCC 和癌旁组织中 miR-3682-3p 的表达,显示其在癌与癌旁组织的细胞浆中表达,并且在癌组织中表达上调($t=2.659, P=0.009$)。miR-3682-3p 表达的高低在美国癌症联合委员会(AJCC)第八版分期($\chi^2=4.272, P=0.039$)、HBV 表面抗原状态($\chi^2=5.143, P=0.023$)、复发($\chi^2=4.593, P=0.032$)、肿瘤大小($\chi^2=4.580, P=0.032$)和 Edmondson-Steiner 分级($\chi^2=4.068, P=0.044$)方面差异存在统计学意义;Kaplan-Meier 分析显示,miR-3682-3p 表达越高,患者总生存时间(Log rank $\chi^2=4.169, P=0.041$)和无病生存时间(Log rank $\chi^2=4.078, P=0.043$)越短。多变量分析显示,miR-3682-3p 表达是评估 HCC 患者预后独立因子。结论 miR-3682-3p 在 HCC 组织中表达上调,是促进 HCC 发病和预后不良的重要因子。

关键词:肝细胞癌;miR-3682-3p;预后

High expression of miR-3682-3p is an unfavorable prognostic factor of hepatocellular carcinoma

LIU Shaohua¹, WEN Yinghao^{2,3}, QUAN Bing⁴, LIN Jun⁵, ZHU Zewen², TANG Jianglin², HAN Siyuan⁴

¹Department of General Surgery, ²Department of Oncology, ³Intensive Care Unit, Pingxiang People's Hospital, Pingxiang 337000, China; ³Cancer Center, Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510220, China; ⁴Department of Oncology, Songshanhu Central Hospital of Dongguan, Dongguan 523000, China

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-3682-3p in hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with clinical parameters and prognosis of HCC. **Methods** We conducted a bioinformatics analysis of the expression of miR-3682-3p in HCC and its correlation with the patients' survival, and examined its expression in 18 pairs of fresh and 90 pairs of paraffin-embedded HCC and adjacent tissues using real-time fluorescence quantitative PCR and *in situ* hybridization, respectively. The correlation of miR-3682-3p expression in HCC with the clinical parameters and prognosis of the patients was analyzed. Multivariate regression analysis was used to explore the possibility of miR-3682-3p expression as an independent prognostic factor of HCC. **Results** Bioinformatics analysis showed that miR-3682-3p was highly expressed in HCC and significantly correlated with the survival time of HCC patients ($\chi^2=8.793, P<0.001$). The expression of miR-3682-3p was significantly up-regulated in fresh HCC tissues as compared with the adjacent liver tissues ($t=3.073, P=0.007$). In paraffin-embedded samples, *in situ* hybridization revealed positive miR-3682-3p expression in the cytoplasm of HCC and adjacent tissues, and its expression was significantly up-regulated in HCC tissues ($t=2.659, P=0.009$). The expression level of miR-3682-3p was significantly correlated with American Joint Commission on Cancer (AJCC; 8th edition) stage ($\chi^2=4.272, P=0.039$), HBV surface antigen status ($\chi^2=5.143, P=0.023$), recurrence ($\chi^2=4.593, P=0.032$), tumor size ($\chi^2=4.580, P=0.032$) and Edmondson Steiner grade ($\chi^2=4.068, P=0.044$). Kaplan-Meier analysis showed that a higher expression of miR-3682-3p was associated with a shorter overall survival time ($\chi^2=4.169, P=0.041$) and disease-free survival time ($\chi^2=4.078, P=0.043$) of the patients. Multivariate analysis suggested that miR-3682-3p expression was an independent predictor of the prognosis of HCC patients. **Conclusion** MiR-3682-3p is up-regulated in HCC to serve as a significant factor that contributes to the occurrence and a poor prognosis of HCC.

Keywords: hepatocellular carcinoma; miR-3682-3p; prognostic factor

肝细胞癌(HCC)是一种异质性癌症,已有多种已

知病因,如乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒感染或黄曲霉毒素暴露,这些因素单独或联合长期作用于肝脏,可导致基因表达的慢性失衡^[1-3],并最终促进了肝癌的发生和发展。MicroRNA(miRNA)参与包括HCC在内的多种肿瘤的发病机制^[4-13]。MiR-3682-3p是一个与肿瘤发病相关的miRNA,研究发现miR-3682-3p在食管癌中高表达^[14]。在HCC中,外泌体中miR-3682-3p

收稿日期:2021-08-19

基金项目:江西省科技厅自然科学基金(20192BAB205060);东莞市社会科学发展计划(20195071524201)

作者简介:刘绍华,副主任医师,E-mail: jxpxlsh20@163.com

通信作者:温莹浩,主任医师,E-mail: jxpxwyh@163.com;韩思源,主任医师,E-mail: Hansiyuan2002@163.com

通过改变 Ras-MEK1/2-ERK1/2 信号转导途径靶向血管生成素 1(Ang-1),从而抑制血管生成,外泌体中 miR-3682-3p 在 HCC 发病中可能发挥了候选肿瘤抑制因子^[15]作用。然而,在另一项肝癌研究中,实时定量 PCR 的检测结果显示,miR-3682-3p 在 HCC 中高表达,其表达增加促进了 HCC 发病和不良预后^[16],提示其在 HCC 中发挥了肿瘤促进作用。这两项研究结果相互矛盾,且相对较短的随访时间可能导致结论存在偏差^[16]。因此需要对 miR-3682-3p 在 HCC 中的作用进行进一步验证。本研究对 miR-3286-3p 在 HCC 中的表达及其与临床参数和预后的关系进行了检测和分析,以明确 miR-3286-3p 在 HCC 发病过程中的作用。

1 资料和方法

1.1 生物信息学分析

使用 UALCAN (TCGA 数据)网站(<http://ualcan.path.uab.edu/>)确定 miR-3682(miR-3682-3p)的表达及其与肝癌患者预后的相关性。

1.2 临床样本

18 配对肝细胞癌组织和癌旁组织来自贵州医科大学附属医院(液氮新鲜保存),其中男性 12 例,女性 6 例,发病年龄 27~82 岁,中位年龄 53.5 岁。90 对石蜡包埋的 HCC 标本和其癌旁组织芯片[上海芯超生物技术有限公司(中国上海)] HLivH180Su15,病理类型均为肝细胞癌(<http://www.superchip.com.cn/biology/tissue.html>),样本收集于 2007~2008 年,随访至 2016 年。所有病例均为手术切除,术前未经任何放化疗和其他治疗,并分别获得贵州医科大学附属医院和上海芯超生物技术有限公司伦理委员会的批准(2020025;SHY-JS-1901001)。

1.3 原位杂交 (ISH)

应用 ISH 对石蜡包埋的 90 对肝癌和癌旁组织芯片标本进行检测^[17]。切片在二甲苯中脱蜡,并在不同乙醇浓

度下进行梯度脱水处理。用蛋白酶 K 处理 37 °C、30 min,冲洗、固定切片,然后预混合 2 h。将样品与 BersinBio (中国广州)设计和合成的 miRCURY miR-3682-3p 地高辛标记探针杂交。冲洗载玻片,在室温下与与辣根过氧化物酶结合的抗地高辛抗体的 Fab 片段孵育 1 h。添加 3,3'-二氨基联苯胺(中国福州美新生物科技有限公司)观察信号,并按照文献^[4]方法由两位经验丰富的病理医师进行双盲阅片,分别对染色强度和染色面积进行评分:阳性着色面积<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,25%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,75%~100%为 4 分;染色强度:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者计分的乘积为阳性等级:6 分以下为低表达,6 分及 6 分以上为高表达。

1.4 统计分析

所有数据均使用 SPSS 20.0 进行分析。使用配对 *t* 检验分析基因差异表达;通过卡方检验评估基因表达与临床病理参数之间的相关性。Kaplan-Meier 生存曲线用于分析基因表达与患者总生存率之间的关系。使用 Cox 比例风险回归模型进行单变量和多变量生存分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析 miR-3682(miR-3682-3p)的表达与预后相关性

基于 TCGA 数据,使用 UALCAN 网站上的算法进行的分析显示,与邻近组织相比,miR-3682 在 HCC 中明显高表达($t=4.149, P < 0.001$,图 1A)。生存分析显示,miR-3682 表达越高,患者的综合生存时间越短($\chi^2=8.793, P < 0.001$,图 1B)。

2.2 RT-PCR 检测 miR-3682-3p 在肝癌中的表达

为验证生物信息学结果,应用 RT-PCR 检测 18 对癌组织与它们匹配的癌旁组织中 miR-3682-3p 的表达。

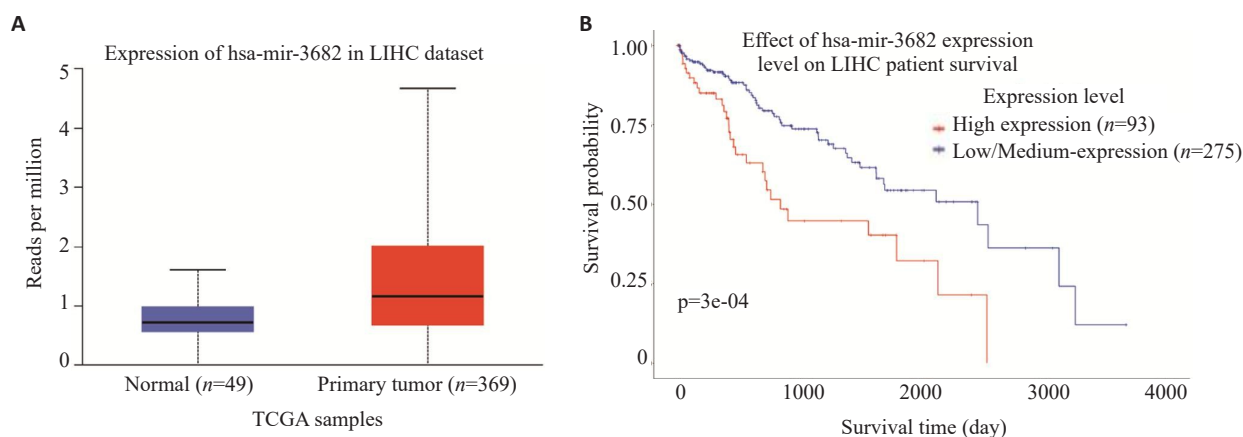


图1 生物信息学分析 miR-3682-3p 表达水平与患者的预后的关系

Fig.1 Bioinformatics analysis of miR-3682-3p expression levels in relation to the patients' prognosis. A: MiR-3682 expression in HCC tissues and adjacent tissues based on data from TCGA database ($P < 0.001$). B: Relationship between miR-3682 expression and the patients' prognosis based on data from TCGA database.

配对 *t* 检验显示, 与 18 个非癌对照组织相比, miR-3682-3p 在 18 个肝癌组织中总体表达水平升高 ($t=3.073, P=0.007$, 图 2)。

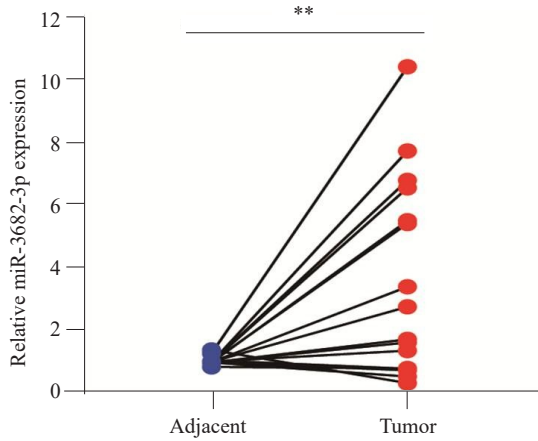


图 2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-3682-3p 在 18 对配对新鲜肝癌组织和它们邻近癌旁组织中的表达水平 (蓝点和红点分别代表癌旁组织和癌组织)

Fig.2 MiR-3682-3p mRNA expression level in 18 pairs of fresh HCC tissues (red dots) and adjacent tissues (blue dots) detected by real-time fluorescence quantitative PCR (** $P<0.01$).

2.3 miR-3682-3p 的原位杂交及亚细胞定位

原位杂交技术检测组织芯片中 90 例 HCC 和癌旁组织中 miR-3682-3p 的表达, 并分析其亚细胞定位, 结

果显示, miR-3682-3p 定位于 HCC 和癌旁组织的细胞浆中 (图 3A)。与癌旁组织相比, miR-3682-3p 在 HCC 中上调 ($t=2.659, P=0.009$, 图 3B)。

2.4 miR-3682-3p 的表达与肝癌临床进展的相关性

miR-3682-3p 表达的高低在美国癌症联合委员会 (AJCC) 第八版分期 ($\chi^2=4.272, P=0.039$)、HBV 表面抗原状态 ($\chi^2=5.143, P=0.023$)、复发 ($\chi^2=4.593, P=0.032$)、肿瘤大小 ($\chi^2=4.580, P=0.032$) 和 Edmondson-Steiner 分级 ($\chi^2=4.068, P=0.044$) 方面差异存在统计学意义, 但在年龄、性别、肿瘤数量、甲胎蛋白、总胆红素、丙氨酸转氨酶和谷氨酰转肽酶方面差异无统计学意义 ($P>0.05$, 表 1)。

2.5 miR-3682-3p 表达与 HCC 患者不良预后的关系

在 90 例有预后信息的肝癌患者中, miR-3682-3p 表达越高, 患者总生存时间越短 ($\chi^2=4.169, P=0.041$, 图 4A), 无病生存时间越短 ($\chi^2=4.078, P=0.043$, 图 4B)。单变量分析显示, 患者生存率也与 miR-3682-3p 表达 (HR=0.242 [95%CI 0.111-0.525], $P<0.001$)、Edmondson-Steiner 分级 (HR=7.860 [95%CI 3.479-3.497], $P<0.001$)、GGT 水平 (HR=0.386 [95%CI 0.159-0.937], $P=0.035$)、肿瘤大小 (HR=0.169 [95%CI 0.084-0.342], $P<0.001$) 和 AJCC 分期 (HR=3.088 [95%CI 1.535-6.212], $P=0.002$) 有关。为了确定 miR-3682-3p 是否是 HCC 的独立预后因素, 对 HCC 患者中 miR-3682-3p 的表达进行了多变量分析, 并根据 Edmondson-Steiner 分级、肿瘤大小、

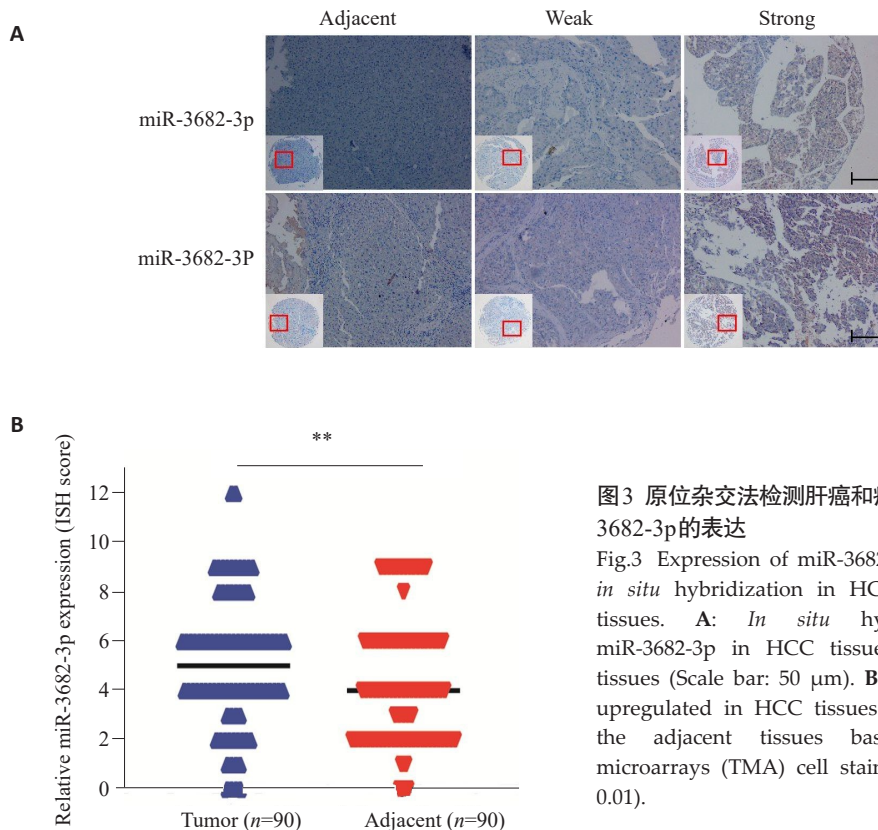


图 3 原位杂交法检测肝癌和癌旁组织中 miR-3682-3p 的表达

Fig.3 Expression of miR-3682-3p detected by *in situ* hybridization in HCC and adjacent tissues. A: *In situ* hybridization of miR-3682-3p in HCC tissues and adjacent tissues (Scale bar: 50 μ m). B: MiR-3682-3p is upregulated in HCC tissues compared with the adjacent tissues based on tissue microarrays (TMA) cell staining score (** $P<0.01$).

表1 MiR-3682-3p表达与HCC患者临床参数之间的关系

Tab.1 Correlations between miR-3682-3p expression and clinicopathological features of HCC patients

Characteristics	n	miR-3682-3p Expression		χ^2	P
		Low	High		
Age (year)					
≤50	68	35 (51.47%)	33 (48.53%)	0.388	0.533
>50	22	13 (59.09%)	9 (40.91%)		
Gender					
Male	80	42 (52.50%)	38 (47.50%)	0.013	0.911
Female	10	6 (60.00%)	4 (40.00%)		
AJCC Staging					
I	67	40 (59.70%)	27 (40.30%)	4.272	0.039
II-III	23	8 (34.78%)	15 (65.22%)		
HBsAg					
Negative	15	12 (80.00%)	3 (20.00%)	5.143	0.023
Positive	75	36 (48.00%)	39 (52.00%)		
Recurrence					
No	43	28 (65.11%)	15 (34.89%)	4.593	0.032
Yes	47	20 (42.55%)	27 (57.45%)		
AFP (ng/L)					
>400	33	17 (51.52%)	16 (48.48%)	0.069	0.792
≤400	57	31 (54.39%)	26 (45.61%)		
Total bilirubin (μmol/L)					
>20	15	8 (53.33%)	7 (46.67%)	0.000	1.000
≤20	75	40 (53.33%)	35 (46.67%)		
ALT (U/L)					
>45	32	14 (43.75%)	18 (56.25%)	1.832	0.176
≤45	58	34 (58.62%)	24 (41.38%)		
GGT (U/L)					
>40	59	29 (49.15%)	30 (50.85%)	1.203	0.273
≤40	31	19 (61.29%)	12 (38.71%)		
Edmondson-Steiner					
I-II	57	35 (61.40%)	22 (38.60%)	4.068	0.044
III-IV	33	13 (39.39%)	20 (60.61%)		
Tumor Number					
Single	80	43 (53.75%)	37 (46.25%)	0.000	1.000
Multiple	10	5 (50.00%)	5 (50.00%)		
Tumor size (cm)					
>5	19	6 (31.60%)	13 (68.40%)	4.580	0.032
≤5	71	42 (59.20%)	29 (40.80%)		

GTT水平和AJCC分期进行调整。结果显示,miR-3682-3p表达水平是影响肝癌预后的独立预后因素[HR=0.368 (95%CI 0.161-0.842),P=0.018,表2]。

3 讨论

许多miRNAs参与了HCC的发病机制^[4-10],包括最近发现的miR-3682-3p。目前,关于miR-3682-3p在肿瘤中作用的研究仅限于食管癌和HCC,研究结论也存

在矛盾^[14-16],提示miR-3682-3p在肿瘤中可能发挥了相当复杂的作用。有研究对OncoMir数据库的数据进行分析,发现miR-3682-3p在HCC中表达显著增加,qPCR检测也获得了一致的结果^[16],并且miR-3682-3p高表达与临床进展呈明显正相关,而与不良预后呈明显负相关,表明miR-3682-3p作为候选癌基因促进HCC的发病过程^[16]。而有研究显示,HCC外泌体中的miR-3682-3p能抑制Ras-MEK1/2-ERK1/2信号,降低Ang-1

表2 肝癌患者临床病理变量的单因素和多因素生存分析

Tab.2 Univariate and multivariate survival analysis of clinicopathological variables of HCC patients

Characteristics	Overall survival					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
miR-3682-3p expression						
Low vs. High	0.242	0.111-0.525	<0.001	0.368	0.161-0.842	0.018
Age (year)						
≤50 vs. >50	0.771	0.356-1.667	0.508			
Gender						
Male vs. Female	0.520	0.124-2.176	0.371			
AJCC Staging						
I vs. II-III	3.088	1.535-6.212	0.002	1.678	0.803-3.507	0.168
HBsAg						
Negative vs. Positive	0.642	0.224-1.845	0.411			
Recurrence						
No vs. Yes	0.054	0.264-1.086	0.083			
AFP (ng/mL)						
≤400 vs. >400	0.888	0.434-1.818	0.746			
Total bilirubin (μmol/L)						
≤20 vs. >20	1.113	0.428-2.893	0.826			
ALT (U/L)						
≤45 vs. >45	0.935	0.457-1.912	0.853			
GGT (U/L)						
≤40 vs. >40	0.386	0.159-0.937	0.035	0.489	0.190-1.259	0.138
Edmondson-Steiner grade						
I-II vs. III-IV	7.860	3.497-3.497	<0.001	5.269	1.985-13.990	0.001
Tumor number						
Single vs. Multiple	2.084	0.852-5.095	0.108			
Tumor size (cm)						
≤5 vs. >5	0.169	0.084-0.342	<0.001	0.368	0.161-0.842	0.633

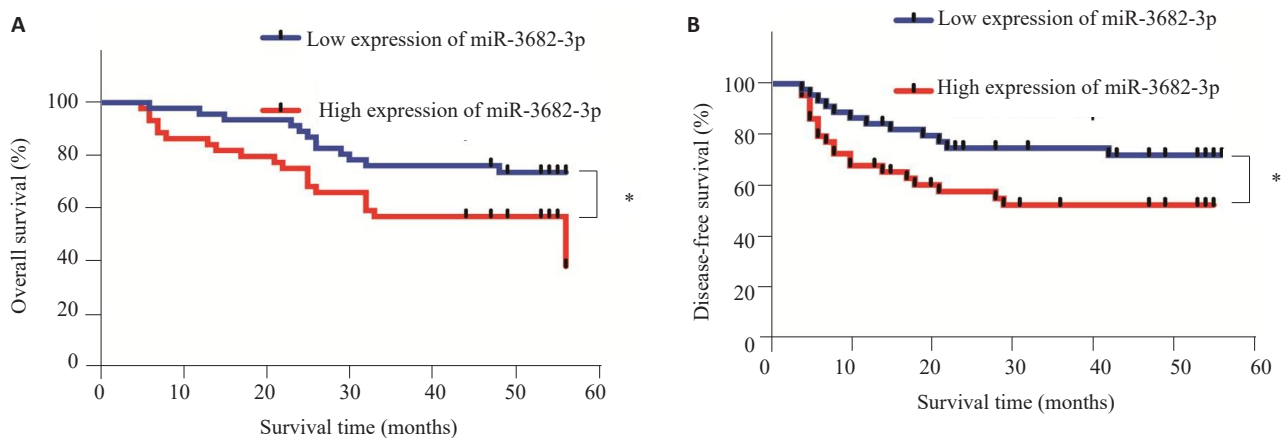


图4 Kaplan-Meier生存曲线分析miR-3682-3p表达与肝癌患者总生存率和无病生存率的关系

Fig.4 Kaplan-Meier survival analysis of the correlation of miR-3682-3p expression with the overall survival and disease-free survival of HCC patients. **A:** Overall survival rate was markedly lower in patients with high miR-3682-3p expression level than in those with low miR-3682-3p expression ($P=0.041$, log-rank test). **B:** Disease-free survival rate was markedly lower in patients with high miR-3682-3p expression level than in those with low miR-3682-3p expression level ($P=0.043$, log-rank test).

的生成,从而抑制血管生成,提示外泌体中 miR-3682-3p 在 HCC 发病发挥了候选抑癌基因作用^[15],该结论与 Yao 等^[16]结果存在明显不同,提示 miR-3682-3p 在 HCC 发病中的复杂性,有必要进一步明确 miR-3682-3p 在 HCC 中作用。因此,本研究应用多种方法检测了 miR-3682-3p 在 HCC 和肝组织样本中 miR-3682-3p 的表达,并重新分析了 miR-3682-3p 在 HCC 表达与临床参数及预后的关系。

本研究对 TCGA 数据进行分析的结果显示,miR-3682-3p 在肝癌组织中的表达明显升高,实时荧光定量检测也显示了同样的结果,这与部分报道相一致^[16],支持了 miR-3682-3p 在 OncoMir 数据库中结果的可靠性。因既往研究的方法仅限于实时荧光定量 PCR,本研究进一步应用原位杂交方法对 miR-3682-3p 的表达情况进行了验证,结果同样显示为 miR-3682-3p 在 HCC 中的表达明显升高。本研究明确回答了既往存在争议的问题,支持 miR-3682-3p 在 HCC 中呈高表达,为进一步评估 miR-3682-3p 表达在 HCC 中的意义提供了前提和依据。

HBV 感染是 HCC 发病机制的关键因素^[18-20],本研究发现 miR-3682-3p 高表达与 HBV 感染有关,HBV 感染可能参与了对 miR-3682-3p 的诱导表达。此外,miR-3682-3p 的表达与 AJCC 分期、肿瘤复发、肿瘤大小以及 Edmondson-Steiner 分级等多个因素存在统计学关联,而肿瘤复发和生长等被认为与肿瘤干性增加有关^[21-23],提示 miR-3682-3p 的表达可能促进对 HCC 肿瘤干性信号的调节,从而诱导 HCC 复发、细胞增殖和恶性进展。这些数据进一步支持 miR-3682-3p 作为刺激 HCC 发病的潜在癌基因的结论。

前期有研究报告了 miR-3682-3p 表达与肝癌患者 3 年生存时间的相关性^[16]。本研究进行长期随访发现,miR-3682-3p 表达越高,肝癌患者总生存时间越短。并且,高表达 miR-3682-3p 的 HCC 患者的无病生存时间明显低于低表达患者,表明 miR-3682-3p 高表达是促进 HCC 患者预后不良因素。本研究多变量分析显示,经调整了 AJCC 分期、肿瘤大小、Edmondson-Steiner 分级和 GGT 水平,miR-3682-3p 表达增加是肝癌患者预后不良的重要独立预测因子。

综上所述,本研究通过多种检测方法,证明了 miR-3682-3p 在 HCC 组织中表达上调,是促进 HCC 发病和预后不良的重要因子,明确回答了这个问题,为研究 miR-3682-3p 在肿瘤中的作用提供了新的证据。然而,关于 miR-3682-3p 在 HCC 中的作用机制仍未阐明,今后需要进一步开展相关机制方面的研究,为 miR-3682-3p 真正应用于肿瘤的临床治疗提供依据和方向。

参考文献:

- [1] Xie YH. Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1018: 11-21.
- [2] Plissonnier ML, Herzog K, Levrero M, et al. Non-coding RNAs and hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma [J]. *Viruses*, 2018,10(11):591-9.
- [3] Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2013, 22(3): 305-10.
- [4] Lin X, Zuo S, Luo R, et al. HBX-induced miR-5188 impairs FOXO1 to stimulate β -catenin nuclear translocation and promotes tumor stemness in hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7583-98.
- [5] Li D, Zhang J, Li J. Role of miRNA sponges in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 10-9.
- [6] Zheng YL, Li L, Jia YX, et al. LINC01554-mediated glucose metabolism reprogramming suppresses tumorigenicity in hepatocellular carcinoma via downregulating PKM2 expression and inhibiting Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Theranostics*, 2019, 9(3): 796-810.
- [7] Lin Z, Xia S, Liang Y, et al. Theranostics LXR activation potentiates sorafenib sensitivity in HCC by activating microRNA-378a transcription[J]. *Theranostics*, 2020, 10(19): 8834-50.
- [8] Ye Y, Guo J, Xiao P, et al. Macrophages-induced long noncoding RNA H19 up-regulation triggers and activates the miR-193b/MAPK1 axis and promotes cell aggressiveness in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 310-22.
- [9] Huang JL, Fu YP, Gan W, et al. Hepatic stellate cells promote the progression of hepatocellular carcinoma through microRNA-1246-ROR α -Wnt/ β -Catenin axis[J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 140-51.
- [10] Liu Y, Feng J, Sun M, et al. Long non-coding RNA HULC activates HBV by modulating HBx/STAT3/miR-539/APOBEC3B signaling in HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2019, 454: 158-70.
- [11] Fu Q, Song X, Liu Z, et al. miRomics and proteomics reveal a miR-296-3p/PRKCA/FAK/ras/c-myc feedback loop modulated by HDGF/DDX5/ β -catenin complex in lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(20): 6336-50.
- [12] Li Y, Liu X, Lin X, et al. Chemical compound cinobufotalin potently induces FOXO1-stimulated cisplatin sensitivity by antagonizing its binding partner MYH9[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 48-56.
- [13] Liu Y, Jiang Q, Liu X, et al. Cinobufotalin powerfully reversed EBV-miR-BART22-induced cisplatin resistance via stimulating MAP2K4 to antagonize non-muscle myosin heavy chain IIA/glycogen synthase 3/ β -catenin signaling pathway [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 386-404.
- [14] Zhao Y, Xu L, Wang X, et al. A novel prognostic mRNA/miRNA signature for esophageal cancer and its immune landscape in cancer progression[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(4): 1088-109.
- [15] Dong SS, Dong DD, Yang ZF, et al. Exosomal miR-3682-3p suppresses angiogenesis by targeting ANGPT1 via the RAS-MEK1/2-ERK1/2 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 633358-67.
- [16] Yao BW, Niu YS, Li YZ, et al. High-matrix-stiffness induces

- promotion of hepatocellular carcinoma proliferation and suppression of apoptosis via miR-3682-3p-PHLDA1-FAS pathway [J]. *J Cancer*, 2020, 11(21): 6188-203.
- [17] Tang ZB, Chen WF, Xu Y, et al. MiR-4721, induced by EBV-miR-BART22, targets GSK3 β to enhance the tumorigenic capacity of npc through the WNT/ β -catenin pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 557-71.
- [18] Lin X, Li AM, Li YH, et al. Silencing MYH9 blocks HBx-induced GSK3 β ubiquitination and degradation to inhibit tumor stemness in hepatocellular carcinoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 13-21.
- [19] Jia L, Gao Y, He Y, et al. HBV induced hepatocellular carcinoma and related potential immunotherapy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104992-9.
- [20] Yao L, Zhou Y, Sui Z, et al. HBV-encoded miR-2 functions as an oncogene by downregulating TRIM35 but upregulating RAN in liver cancer cells [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 117-29.
- [21] Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8381-95.
- [22] Liu YC, Yeh CT, Lin KH. Cancer stem cell functions in hepatocellular carcinoma and comprehensive therapeutic strategies [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1331-40.
- [23] Curry JM, Tuluc M, Whitaker-Menezes D, et al. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(9): 1371-84.

(编辑:林萍)