

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.005

瑞戈非尼通过 miR-122 调控人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖和凋亡

陈巍, 韩峥, 邹艳丽, 黄莎莎, 田霞(武汉市第三医院 消化内科, 湖北 武汉 430062)

[摘要] **目的:** 探究瑞戈非尼(regorafenib, Rego)对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的机制。**方法:** 将 SMMC-7721 细胞分为对照组及 Rego 组, 分别用 0、10 $\mu\text{mol/L}$ Rego 处理 48 h 后, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, qPCR 检测细胞中 miR-122 的表达。采用脂质体转染的方法将合成的 hsa-miR-122-5p 模拟物转染 SMMC-7721 细胞构建 miR-122 过表达的 overExp-miR-122 细胞, 并将细胞分为对照组、Rego 组、overExp-NC 组、overExp-NC+Rego 组、overExp-miR-122 组及 overExp-miR-122+Rego 组, 采用 MTT 法检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡率、WB 法检测细胞中 Bcl2、cleaved caspase-3、RAS、RAF1、p-ERK1 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组相比, Rego 处理后细胞凋亡率显著升高($P<0.05$), 且 miR-122 表达量显著上升($P<0.01$); 与 overExp-NC 组比较, overExp-miR-122 组细胞增殖抑制率、凋亡率和 cleaved caspase-3 表达均显著升高(均 $P<0.01$), RAS 蛋白表达显著下降($P<0.05$), Bcl2、RAF、p-ERK1 蛋白表达均显著下降(均 $P<0.01$); 与 overExp-miR-122 组相比, overExp-miR-122+Rego 组细胞中各检测指标变化进一步显著增加($P<0.01$)。**结论:** Rego 可抑制 SMMC-7721 细胞增殖、促进凋亡, 其作用可能与调控 miR-122、凋亡相关因子的表达和抑制 RAS/RAF/ERK 信号通路有关。

[关键词] 肝癌; SMMC-7721 细胞; 瑞戈非尼; miR-122; 凋亡; 增殖; RAS/RAF/ERK 信号通路

[中图分类号] R735.7; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)08-0796-07

Regorafenib regulates the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells through miR-122

CHEN Wei, HAN Zheng, ZOU Yanli, HUANG Shasha, TIAN Xia (Department of Gastroenterology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430062, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of regorafenib (Rego) on proliferation and apoptosis of human liver cancer SMMC-7721 cells and the possible mechanism. **Methods:** SMMC-7721 cells were divided into control group and Rego group (10 $\mu\text{mol/L}$ Rego). After the treatment for 48 h, Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate, and qPCR was used to determine the level of miR-122 in two groups of cells. hsa-miR-122-5p mimics were transfected into SMMC-7721 cells by lipofection to construct the miR-122 overexpressing cell line (overExp-miR-122). Then, the cells were divided into control group, Rego group, overExp-NC group, overExp-NC+Rego group, overExp-miR-122 group and overExp-miR-122+Rego group. MTT and Flow cytometry were used to detect cell viability and apoptosis rate, respectively. The protein expression levels of Bcl2, cleaved caspase-3, RAS, RAF1 and p-ERK1 in cells were detected by WB assay. **Results:** Compared with control group, the cell apoptosis rate was significantly increased after Rego treatment ($P<0.05$), and miR-122 expression level was significantly increased in Rego group ($P<0.01$). Compared with overExp-NC group, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate in the cells of overExp-miR-122 group were significantly increased ($P<0.01$), the expression level of cleaved caspase-3 was significantly upregulated, while the protein expressions of Bcl2, RAS, RAF and p-ERK were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with overExp-miR-122 group, the changes in above detected indicators of overExp-miR-122+Rego group were more obvious ($P<0.01$). **Conclusion:** Regorafenib can inhibit the proliferation and promote apoptosis of SMMC-7721 cells, which may be achieved by regulating the expression of miR-122, thereby regulating the expression of apoptosis related factors and inhibiting RAS/RAF/ERK signaling pathway.

[Key words] liver cancer; SMMC-7721 cell; regorafenib (Rego); miR-122; apoptosis; proliferation; RAS/RAF/ERK signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(8):796-802. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.005]

[基金项目] 湖北省中央引导地方科技发展专项资助(No. 2019ZYD067)。Project supported by the Local Science and Technology Development Special Project Guided by the Central Government from Hubei Province (No. 2019ZYD067)

[作者简介] 陈巍(1981—),男,硕士,主治医师,主要从事消化道疾病与微生态研究, E-mail: 39773049@qq.com

[通信作者] 田霞(TIAN Xia, corresponding author), 硕士,主任医师,主要从事消化道肿瘤的临床与基础研究, E-mail: hewy100@163.com

目前,肝癌的发病率高,预后较差,虽然常规化疗具有一定疗效,但多数患者对化疗药物的毒副作用不耐受因而无法使用其有效剂量进行治疗^[1-2]。瑞戈非尼(regorafenib, Rego)是继索拉非尼之后首个获得成功的分子靶向药物,为多激酶抑制剂,于2017年12月经中国国家食品药品监督管理总局批准用于不可切除肝癌患者的治疗^[3]。研究^[4-5]证明,诸多化疗药物可以引起包括肝癌在内的多种恶性肿瘤细胞 miRNA 表达谱的改变,提示肿瘤化疗药物的作用机制在一定程度上与调控 miRNA 有关。促进肿瘤细胞凋亡是各种抗癌药物发挥抗癌作用的主要方式^[6]。miR-122 在调节肝细胞发育、分化、脂质代谢和应激反应中发挥关键作用,可靶向多种通路,抑制肝癌发生,具有抑制癌细胞增殖、促进凋亡的作用^[7-8]。TEUFEL 等^[9]发现,包括 miR-122 在内的多个 miRNA 与 Rego 治疗后肝癌患者的总生存率相关。本研究通过体外细胞实验探讨 Rego 对 miR-122 表达的影响,以及 miR-122 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖和凋亡的影响及其机制,旨在探究 Rego 治疗肝癌的作用机制,以便在临床上更加合理有效地使用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞 SMMC-7721 购自美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。DMEM 培养基(货号:SH30022.01B)购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清(货号:10270-106)购自美国 Gibco 公司,MTT 溶液(货号:PAB180013)、RIPA(强)组织细胞快速裂解液(货号:PAB180006)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:PAB180007)、羊抗兔 IgG 抗体(货号:PAB15001)及羊抗鼠 IgG 抗体(货号:PAB15009)和 Annexin V -FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号:PAB180012)均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司,TRIzol 试剂盒(货号:15596026)购自美国 Ambion 公司,hsa-miR-122-5p 模拟物(mimic)(货号:miR10000421-1-5)由广州市锐博生物科技有限公司合成,逆转录试剂盒(货号:639505)购自宝生物工程(大连)有限公司,SYBR Green PCR 试剂盒(货号:KM4101)购自美国 KAPA Biosystems 公司,兔抗天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved caspase-3)抗体(货号:Ab32042)、大鼠肉瘤(rat sarcoma, RAS)蛋白抗体(货号:52939)、RAF1 抗体(货号:137435)、B 细胞白血病/淋巴瘤 2(B cell leukemia/lymphoma 2, Bcl2)抗体、ERK1/2 抗体(货号:Ab32124)和鼠抗磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)抗体均购自英国 Abcam 公司,兔抗 GAPDH 抗体(货号:2118)购自美国 CST 公司。酶标

仪(型号:Multiskan FC)购自美国 Thermo 公司,全自动化学发光分析仪(型号:Tanon-5200)购自上海天能科技有限公司,流式细胞仪(型号:FC500 MCL)购自美国 Beckman 公司。

1.2 MTT 法筛选 Rego 最适作用剂量和时间

参照 CARR 等^[10]报道的方法进行细胞培养。取对数生长期的 SMMC-7721 细胞,调整细胞密度为 3.0×10^5 个/ml,并接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,分别加入不同浓度的 Rego(0、1、5、10、15 μ mol/L)^[11],各浓度 3 复孔,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h,每孔分别加入 10 μ l MTT 溶液,置于 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,离心后弃上清液,向细胞中加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,使用酶标仪检测各孔在波长 490 nm 处的光密度(D)值,根据公式计算细胞增殖率。细胞增殖率=(实验组 D 值/对照组 D 值) \times 100%,并由此筛选 Rego 的最佳作用剂量和时间并用于后续实验。

1.3 qPCR 检测 Rego 对 SMMC-7721 细胞 miR-122 表达的影响

采用 TRIzol 试剂盒提取对照组和 10 μ mol/L Rego 组 SMMC-7721 细胞总 RNA,各组取 1 μ g RNA,分别根据逆转录试剂盒说明进行逆转录,获得 cDNA。基于 cDNA 模板,用 qPCR 方法检测 miR-122 表达量。采用 Primer premier 5.0 设计引物序列。miR-122-F: GGGTGGAGTGTGACAAT, miR-122-R: AACTGGT-GTCGTGGAGTCGGC; U6-F: CTCGCTTCGGCAG-CACA, U6-R: AACGCTTCACGAATTTGCGT。qPCR 反应体系(20 μ l): 10 μ l 带有荧光染料的 Taq 酶复合物,各 0.50 μ mol/L 引物, (0.2 \pm 0.02) μ g cDNA 模板。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 25 s, 共进行 39 个循环; 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 50 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-122 相对表达量。

1.4 miR-122-5p 过表达细胞株构建与实验分组处理

将 hsa-miR-122-5p 模拟物采用脂质体介导的方法转染 SMMC-7721 细胞,构建 overExp-miR-122 细胞株,同时转染 hsa-miR-NC 作为对照。首先,分别将 100 pmol hsa-miR-122-5p 模拟物稀释于 250 μ l 血清培养基中,同时将 5 μ l RNAi 特异性阳离子脂质体转染试剂稀释于 250 μ l 血清培养基中,将两者混合后室温孵育 20 min,并将 500 μ l 复合物加到含有细胞和换有 1.5 ml 新鲜培养基的培养板孔中,来回轻柔摇晃细胞培养板,将细胞板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中转染 4 h 后,更换新鲜培养基培养 48 h,收集细胞并通过 qPCR 检测 miR-122 过表达效率。

miR-122-5p 过表达细胞构建成功后,将细胞分为对照组、Rego 组、overExp-NC 组、overExp-NC+Rego 组、overExp-miR-122 组及 overExp-miR-122+Rego 组。所

有Rego组均采用10 μmol/L Rego处理48 h。

1.5 MTT法检测Rego和miR-122对SMMC-7721细胞增殖的影响

使用MTT法测定各组细胞增殖水平。取各组对数期细胞,参照方法1.2.1进行检测。细胞增殖抑制率=(1-实验组D值/对照组D值)×100%

1.6 流式细胞术检测Rego和miR-122对SMMC-7721细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI检测试剂盒分析Rego诱导细胞凋亡的能力。收集各组细胞,使用缓冲液重悬细胞,各组分别加入Annexin V-FITC及PI溶液各5 μl,避光静置15 min,加入400 μl缓冲液,上机检测细胞凋亡情况。

1.7 WB法检测Rego和miR-122对SMMC-7721细胞中蛋白表达的影响

收集并裂解各组细胞,12 000×g离心20 min,用BCA试剂盒提取细胞总蛋白并测定蛋白质量。各组分别取30 μg蛋白上样,10% SDS-PAGE分离后,将蛋白转移至PVDF膜,用含5%脱脂牛奶室温封闭2 h,分别加入一抗Bcl2(1:1 000)、cleaved caspase-3(1:500)、RAS(1:20 000)、RAF1(1:5 000)、ERK1/2(1:1 000)、p-ERK1/2(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)抗体稀释液4℃孵育过夜。Tris缓冲液洗涤后,加入二抗(羊抗兔IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体,1:10 000稀释)稀释液室温孵育2 h,洗涤后加入ECL发光液显色,将膜置于全自动化学发光分析仪中检测,使用Tanon Gis 4.2软件分析蛋白条带灰度值并计算蛋白相对表达量。

1.8 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用LSD法。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rego对SMMC-7721细胞的作用

2.1.1 Rego抑制细胞增殖 MTT法检测结果(图1)显示,与对照组相比,Rego处理后细胞增殖受到了抑制,并呈剂量和时间依赖性。因剂量增加至15 μmol/L和时间增加至72 h时对细胞增殖率的影响不再明显,后续实验选择Rego作用剂量和时间分别是10 μmol/L和48 h。

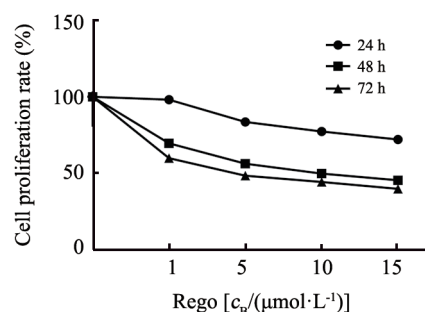


图1 MTT法检测SMMC-7721细胞增殖

Fig.1 The proliferation of SMMC-7721 cells detected by MTT

2.1.2 Rego促进SMMC-7721细胞凋亡 流式细胞术检测结果(图2)显示,与对照组相比,10 μmol/L Rego处理48 h后,SMMC-7721细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。

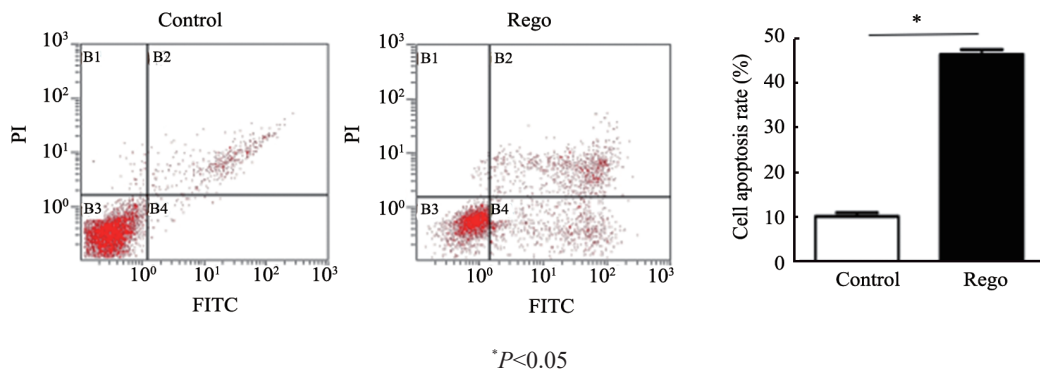


图2 10 μmol/L Rego处理48 h后SMMC-7721细胞凋亡率升高

Fig.2 The apoptosis rate of SMMC-7721 cells increased after treatment with 10 μmol/L Rego for 48 h

2.1.3 Rego促进SMMC-7721细胞中miR-122的表达 qPCR检测结果(图3)显示,与对照组相比,10 μmol/L Rego处理48 h后,SMMC-7721细胞中miR-122的表达量显著增加($P<0.01$)。

2.2 过表达miR-122对SMMC-7721细胞的作用

2.2.1 成功构建miR-122过表达的SMMC-7721细胞 qPCR检测结果(图4)显示,对照组与overExp-NC组SMMC-7721细胞中miR-122的表达量差异无统计

学意义 ($P>0.05$), 而 overExp-miR-122 组细胞中 miR-122 表达量显著高于对照组和 overExp-NC 组 (均 $P<0.05$), 说明转染 hsa-miR-122-5p 模拟物后 SMMC-7721 细胞中 miR-122 明显过表达。

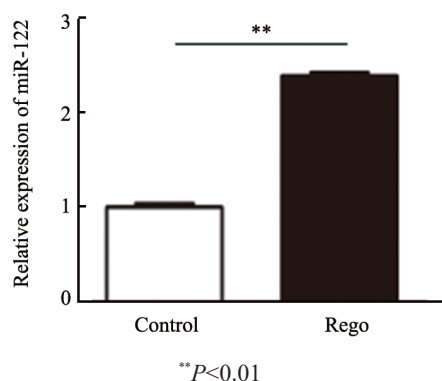


图3 10 $\mu\text{mol/L}$ Rego 处理 48 h 后 SMMC-7721 细胞中 miR-122 表达水平升高

Fig.3 Relative expression of miR-122 in SMMC-7721 cells increased after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ Rego for 48 h

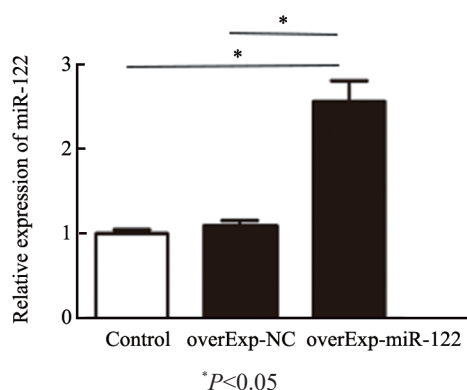


图4 qPCR 检测 SMMC-7721 细胞 miR-122 过表达效率
Fig.4 Overexpression efficiency of miR-122 in SMMC-7721 cells detected by qPCR

2.2.2 miR-122 过表达抑制 SMMC-7721 细胞增殖并促进凋亡 流式细胞术 (图 5A、B)、MTT 法 (图 5C) 和 WB 实验 (图 6) 检测结果显示, 与对照组相比, Rego 组的细胞凋亡率和细胞增殖抑制率均显著升高 (均 $P<0.01$)、Bcl2 表达水平显著下调 ($P<0.01$)、cleaved caspase-3 表达水平显著上调 ($P<0.01$), overExp-NC 组与对照组无显著差异; 与对照组和 overExp-NC 组相比, overExp-NC+Rego 组、overExp-miR-122 组和 overExp-miR-122+Rego 组的细胞凋亡率均显著升高 (均 $P<0.01$), overExp-NC+Rego 组、overExp-miR-122 组细胞增殖抑制率显著升高 (均 $P<0.05$), overExp-miR-122+Rego 组的细胞增殖抑制率显著升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达水平显著下调 ($P<0.01$), cleaved caspase-3 表达水平显著上调 ($P<0.01$); 与

overExp-NC+Rego 组相比, overExp-miR-122+Rego 组的细胞凋亡率和细胞增殖抑制率均显著升高 (均 $P<0.01$), Bcl2 表达水平显著下调 ($P<0.01$), cleaved caspase-3 表达水平显著上调 ($P<0.01$); 与 overExp-miR-122 组相比, overExp-miR-122+Rego 组的细胞凋亡率和细胞增殖抑制率均显著升高 ($P<0.01$), Bcl2 表达水平显著下调 ($P<0.01$), cleaved caspase-3 表达水平显著上调 ($P<0.01$)。

2.2.3 miR-122 抑制 RAS/RAF/ERK 信号通路 WB 法检测 RAS/RAF/ERK 信号通路相关蛋白表达的结果 (图 7) 显示, 与对照组相比, Rego 组中 RAS、RAF1、p-ERK1 表达水平均显著下调 (均 $P<0.01$), 而 overExp-NC 组中蛋白表达无显著差异 (均 $P>0.05$); 与 overExp-NC 组和对照组相比, overExp-NC+Rego 组、overExp-miR-122 组和 overExp-miR-122+Rego 组中 RAS、RAF1 和 p-ERK1 表达水平均显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 overExp-NC+Rego 组相比, overExp-miR-122+Rego 组中这些蛋白的表达均显著下调 (均 $P<0.01$); 与 overExp-miR-122 组相比, overExp-miR-122+Rego 组中这些蛋白的表达均显著下调 (均 $P<0.01$)。

3 讨论

肝癌为世界范围内病死率上升最快的癌症相关死亡原因之一^[12], 在中国其患者病死率居世界首位^[13]。近年来, 随着各种新药物的研发及技术的进步, 早期和中期肝癌的生存率有所改善, 但晚期肝癌患者的预后情况仍很差^[2]。Rego 为获批的肝癌二线治疗药物^[2], 为在临床上更好地应用, 了解其治疗机制尤为重要。本研究通过体外细胞实验探索了 Rego 治疗肝癌的作用机制。

血液中循环的 miRNA 是一类非常有前途的疾病标志物。Rego 是一种广谱激酶抑制剂, 已获批用于结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的治疗, 通过 Rego 治疗 CRC 患者的血清检测分析发现循环 miR-21、miR-141、miR-601、miR-652-3-p 的上调和 miR-3614-3-p 的下调均与患者无进展生存期 (progression free survival, PFS) 和总生存期 (overall survival, OS) 的降低相关, 可用作 Rego 治疗患者前期筛选的生物标志物, 用于跟踪和预测获得性治疗耐药^[14-15]。Rego 也可提高肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者的 OS, 其治疗有效性与血清中 9 种 miRNA (miR-30a、miR-122、miR-125b、miR-200a、miR-374b、miR-15b、miR-107、miR320 和 miR645) 的表达水平密切相关^[9]。而经证实 miR-371-5p、miR-373 和 miR-543 在 HCC 组织中也呈高表达, 上调这些 miRNA 的表达可显著下调 caspase-8 的表达, 并显著增强 Z-VAD/TNF- α 诱导的 HCC 细胞坏死, 可作为

HCC潜在的诊断、预后和治疗靶点^[6]。本研究发现,Rego处理或miR-122过表达均促进SMMC-7721细胞凋亡,且Rego处理后miR-122的表达上调;同时overExp-miR-122+Rego组细胞的凋亡率和凋亡相关蛋白表达水平较单纯miR-122过表达组进一步升高,推测Rego诱导

SMMC-7721细胞凋亡的作用机制可能与上调miR-122表达有关,miR-122或许可作为Rego治疗的生物标志物之一。同时,Rego治疗过程中可能还会有其他的分子参与癌细胞的发生发展,研发新的生物标志物是HCC临床治疗和预后评估的一个重要需求。

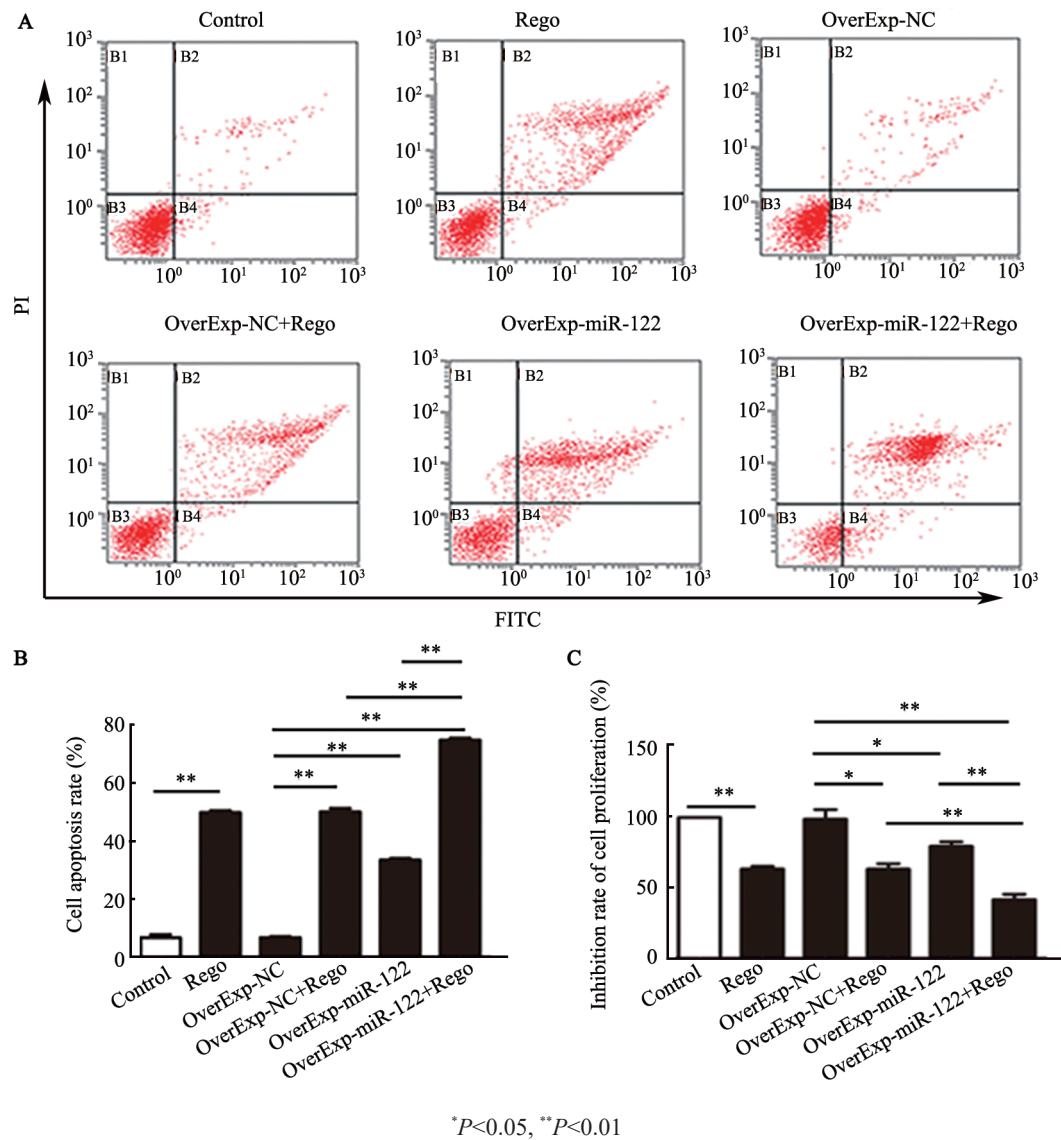


图5 miR-122过表达对SMMC-7721细胞的凋亡(A、B)、增殖(C)的影响

Fig.5 Effects of miR-122 overexpression on the apoptosis (A, B) and proliferation (C) of SMMC-7721 cells

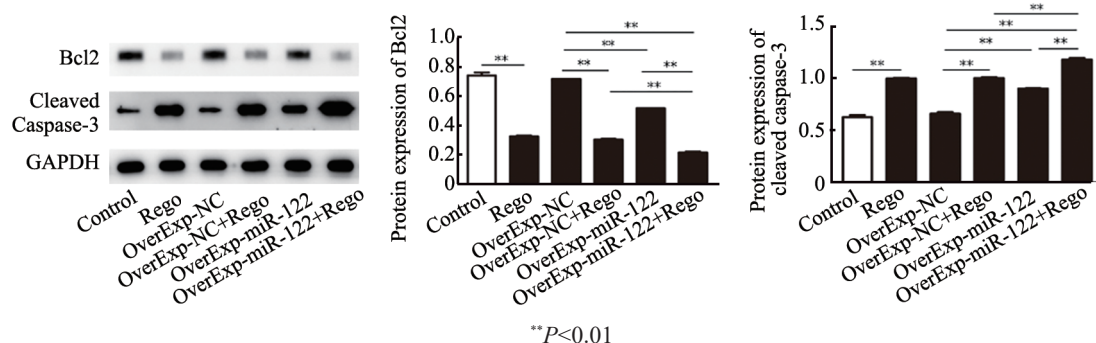


图6 miR-122过表达对SMMC-7721细胞中Bcl2和cleaved caspase-3蛋白表达水平的影响

Fig.6 Effects of miR-122 overexpression on relative protein expressions of Bcl2 and cleaved caspase-3 in SMMC-7721 cells

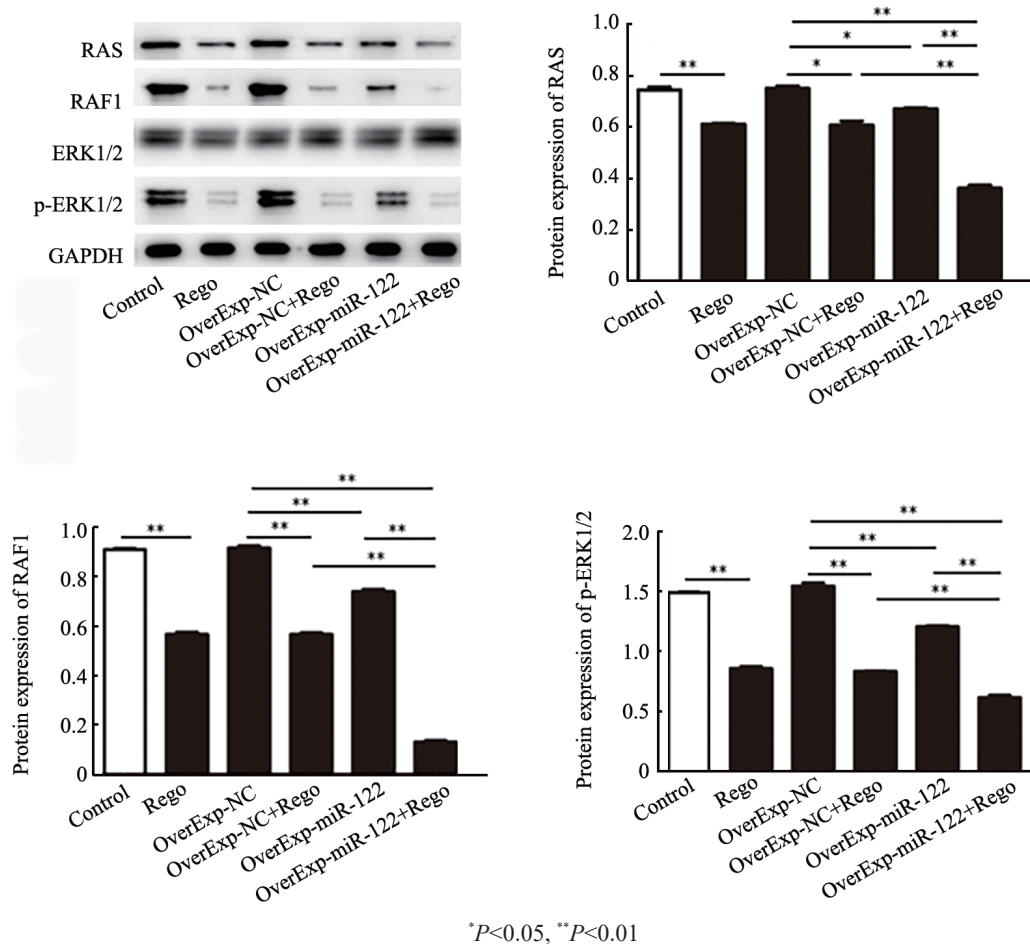


图7 miR-122 过表达下调 SMMC-7721 细胞中 RAS/RAF/ERK 信号蛋白表达

Fig. 7 miR-122 overexpression decreased the expression levels of RAS/RAF/ERK signaling pathway related protein in SMMC-7721 cells

miR-122 与肝癌患者的 OS 直接相关, 参与调控肝癌细胞的增殖、侵袭和凋亡, miR-122 阴性表达的肝癌患者 3 年生存率差, 且发生癌症转移患者的肝癌组织中 miR-122 表达低于未发生转移者, 血清中 miR-122 表达水平高可延长患者的 OS, 血清 miR-122 与肝坏死性炎症临床化学参数、肝功能和合成能力相关^[17-18], 提示 miR-122 与肝癌的发生和发展密切相关。LI 等^[19]在研究离子液体对人肝癌 HepG2 细胞的毒性时发现, 离子液体在诱导细胞凋亡时上调了 miR-122 的表达, 加入 miR-122 抑制剂后可抑制离子液体对 HepG2 细胞的促凋亡作用。Bcl2 蛋白家族为细胞凋亡的调节因子, 其中 Bcl2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein, BAX) 为促凋亡蛋白, 而 Bcl2 蛋白则参与凋亡抑制性调节; Bcl2 下调将导致 BAX/Bcl2 比上调, 该比值的增加促使细胞色素 c 从线粒体膜间/嵴间间隙释放到细胞质, 细胞色素在细胞质中与 A-Raf-1 结合, 导致 caspase-9 和下游效应子 caspase-3 的激活, 从而促进凋亡^[20-21]。本研究结果显示, 过表达 miR-122 促进了 SMMC-7721 细胞的凋亡,

同时下调 Bcl2 的表达、上调 cleaved caspase-3 的表达, 提示上调 miR-122 可通过调节凋亡相关蛋白的表达从而促进 SMMC-7721 细胞凋亡, 与虞佳等^[8]的报道一致。RAS/RAF/ERK 通路为肝癌治疗的关键靶点之一^[22-23]。XU 等^[24]研究发现, miR-122 下调表达有助于 RAS/RAF/ERK 信号通路的激活, 提示 miR-122 可调控 RAS/RAF/ERK 信号通路。本研究过表达 miR-122 后 SMMC-7721 细胞中 RAS、RAF1 及 p-ERK1 的表达显著降低, 同样证实了 miR-122 对 RAS/RAF/ERK 信号通路的调控作用。

综上所述, 本研究通过体外细胞实验证实了 Rego 能够抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、诱导凋亡, 而其作用机制可能与 miR-122 表达上调进而促进凋亡相关因子的表达和抑制 RAS/RAF/ERK 信号通路有关。

[参考文献]

[1] RASTOGI A. Changing role of histopathology in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol,

- 2018, 24(35): 4000-4013. DOI:10.3748/wjg.v24.i35.4000.
- [2] 琚皇进, 罗莉, 龙奉玺, 等. 中医药改善化疗毒副作用的临床运用概况[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(1): 179-181. DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2016.01.098.
- [3] BANGARU S, MARRERO J A, SINGAL A G. Review article: new therapeutic interventions for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, 51(1): 78-89. DOI: 10.1111/apt.15573.
- [4] PALMER R D, MURRAY M J, SAINI H K, et al. Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2911-2923. DOI:10.1158/0008-5472.can-09-3301.
- [5] YANG N, EKANEM N R, SAKYI C A, et al. Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 81: 62-74. DOI:10.1016/j.addr.2014.10.029.
- [6] 徐珩. 靶向肿瘤凋亡相关靶标的先导化合物发现及作用机制研究[D]. 上海: 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2020.
- [7] NING Q, LIU Y F, YE P J, et al. Delivery of liver-specific miRNA-122 using a targeted macromolecular prodrug toward synergistic therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(11): 10578-10588. DOI:10.1021/acsami.9b00634.
- [8] 虞佳, 唐正午, 杨晓燕, 等. miRNA-122对5-氟尿嘧啶诱导BEL-7402/5-FU细胞凋亡的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(2): 137-140. DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2015.02.004.
- [9] TEUFEL M, SEIDEL H, KÖCHERT K, et al. Biomarkers associated with response to regorafenib in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(6): 1731-1741. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.01.261.
- [10] CARR B I, CAVALLINI A, LIPPOLIS C, et al. Fluoro-sorafenib (regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence, and recovery[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(2): 292-297. DOI:10.1002/jcp.24148.
- [11] LI Y H, LIN Q M, PANG N H, et al. Functional characterization of 27 CYP3A4 protein variants to metabolize regorafenib in vitro[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 125(4): 337-344. DOI:10.1111/bcpt.13246.
- [12] WEI Y, CHEN X, LIANG C, et al. A noncoding regulatory RNAs network driven by circ-CDYL acts specifically in the early stages hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 130-147. DOI:10.1002/hep.30795.
- [13] 沈宗毅, 李卯晨, 白素杭, 等. 肝癌免疫治疗的研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(12): 2326-2338. DOI:10.13345/j.cjb.190339.
- [14] HEDAYAT S, KHAN K, CUNNINGHAM D, et al. PO-472 MicroRNA as biomarkers of resistance to regorafenib in metastatic colorectal cancer patient[J]. *ESMO Open*, 2018, 3: A415. DOI: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.977.
- [15] SCHIRRIPIA M, BORELLI B, D'AURIZIO R, et al. Early modifications of circulating microRNAs levels in metastatic colorectal cancer patients treated with regorafenib[J]. *Pharmacogenomics J*, 2019, 19(5): 455-464. DOI:10.1038/s41397-019-0075-3.
- [16] VISALLI M, BARTOLOTTA M, POLITO F, et al. miRNA expression profiling regulates necroptotic cell death in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 771-780. DOI:10.3892/ijo.2018.4410.
- [17] XU Q R, ZHANG M Q, TU J F, et al. MicroRNA-122 affects cell aggressiveness and apoptosis by targeting PKM2 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 2054-2064. DOI:10.3892/or.2015.4175.
- [18] KÖBERLE V, KRONENBERGER B, PLELI T, et al. Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(16): 3442-3449. DOI:10.1016/j.ejca.2013.06.002.
- [19] LI A L, GAO S S, GUO M L, et al. CYP3A4 and microRNA-122 are involved in the apoptosis of HepG2 cells induced by ILs 1-decyl-3-methylimidazolium bromide[J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(1): e22419 [2021-02-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31702098/>. DOI:10.1002/jbt.22419.
- [20] WU Y J, SU T R, DAI G F, et al. Flaccidoxide-13-acetate-induced apoptosis in human bladder cancer cells is through activation of p38/JNK, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic Reticulum stress regulated pathway[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): 287. DOI: 10.3390/md17050287.
- [21] HUANG K, O'NEILL K L, LI J, et al. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis[J]. *Cell Res*, 2019, 29(11): 942-952. DOI:10.1038/s41422-019-0231-y.
- [22] YANG S F, LIU G H. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1041-1047. DOI:10.3892/ol.2017.5557.
- [23] ZHOU K, LUO X, WANG Y, et al. MicroRNA-30a suppresses tumor progression by blocking Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1025-1032. DOI:10.1016/j.biopha.2017.07.029.
- [24] XU Y M, HUANG J, MA L N, et al. MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by targeting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(2): 171-181. DOI:10.1016/j.canlet.2015.11.034.

[收稿日期] 2021-03-04

[修回日期] 2021-08-02

[本文-编辑] 黄静怡, 沈志超