

# piR-020829 通过胰岛素样生长因子结合蛋白-3 调控肝癌增殖的机制

徐静怡<sup>1</sup>, 宋彦威<sup>1</sup>, 王丽婧<sup>1</sup>, 主余华<sup>1</sup>, 马铭泽<sup>1</sup>, 刘欣欣<sup>2</sup>

(1. 山东第一医科大学附属省立医院感染性疾病科, 山东 济南 250021;

2. 山东第一医科大学附属省立医院消化内镜中心, 山东 济南 250021)

**摘要:** **目的** 探讨 piR-020829 调控原发性肝癌恶性增殖的作用及相关分子机制。 **方法** 采用实时定量 PCR 法检测肝癌和癌旁肝组织 piR-020829 表达水平的差异;采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 piR-020829 表达水平与肝癌患者总生存期、无进展生存期的关系;采用短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 干扰技术敲低 SNU387 细胞中 piR-020829 的表达(敲低组),并以转染阴性对照载体的 SNU387 细胞为敲低对照组;采用 piR-020829 模拟物处理 Hep3B 细胞实现过表达(piR-020829 过表达组),并以转染模拟物阴性对照的 Hep3B 细胞为过表达对照组。采用 CCK-8 法检测 piR-020829 敲低表达/过表达后对肝癌细胞 SNU387/Hep3B 增殖活力的影响;采用肝癌细胞裸鼠皮下移植瘤实验,将 32 只裸鼠均分为拮抗剂组(尾静脉注射 piR-020829 Antagomir)、拮抗剂对照组(注射 Antagomir NC)、模拟物组(注射 piR-020829 mimic)和模拟物对照组(注射 mimic NC);至实验结束,观察不同处理组对裸鼠皮下成瘤瘤体质量的影响;采用克隆形成实验检测 piR-020829 敲低表达/过表达后对肝癌细胞 SNU387/Hep3B 体外增殖能力的影响。 **结果** 相较于癌旁组织,piR-020829 在肝癌组织表达水平升高。生存分析显示,piR-020829 相对高表达的肝癌患者总生存时间、无进展生存时间较低表达患者缩短,提示 piR-020829 高表达肝癌患者预后差。体外实验证实,piR-020829 敲低表达后导致肝癌细胞增殖活力下降,克隆形成数目减少( $P<0.05$ );piR-020829-mimic 处理后导致肝癌细胞增殖活性升高,克隆形成数目增加。裸鼠皮下移植瘤实验证实,piR-020829 Antagomir 处理后导致肝癌细胞裸鼠皮下成瘤质量低于拮抗剂对照组;piR-020829-mimic 处理后导致肝癌细胞裸鼠皮下成瘤质量高于模拟物对照组。拮抗剂组裸鼠移植瘤体免疫组织化学染色显示,Ki-67 阳性率低于拮抗剂对照组( $P<0.05$ )。piR-020829 敲低表达导致凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-x1(B cell lymphoma-x1, Bcl-x1)表达下调,半胱天冬酶-3(cysteine-aspartic protease 3, Caspase3)表达上调( $P<0.05$ );piR-020829 敲低表达导致细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、细胞周期蛋白 D1(G1/S-specific cyclin-D1, Cyclin D1)表达下调( $P<0.05$ );piR-020829 敲低表达导致其靶分子胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor-binding protein 3, IGFBP3)表达上调( $P<0.05$ )。 **结论** piR-020829 通过靶向抑制 IGFBP3 表达而促进肝癌细胞恶性增殖,该分子有望成为抗肝癌靶向治疗新的分子靶标。

**关键词:** Piwi 相互作用 RNA;胰岛素样生长因子结合蛋白-3;肝癌;增殖;凋亡

**中图分类号:** R735.7

**文献标志码:** A

## Mechanism of piR-020829 in regulating hepatocellular carcinoma proliferation via insulin-like growth factor-binding protein 3

XU Jingyi<sup>1</sup>, SONG Yanwei<sup>1</sup>, WANG Lijing<sup>1</sup>, ZHU Yuhua<sup>1</sup>, MA Mingze<sup>1</sup>, LIU Xinxin<sup>2</sup>

(1. Department of Infectious Diseases, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Digestive Endoscopy Center, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong

First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China)

收稿日期:2025-08-11

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH240);国家自然科学基金青年项目(82000579)

通信作者:刘欣欣。E-mail:1017838633@qq.com

马铭泽。E-mail:mavictoryming@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the role of piRNA-020829 (piR-020829) in regulating malignant proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) and its underlying molecular mechanism. **Methods** Quantitative real-time PCR was used to detect the expression levels of piR-020829 in HCC tissues and adjacent non-tumor liver tissues. Kaplan-Meier survival analysis was performed to evaluate the correlation between piR-020829 expression and overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in HCC patients. Short hairpin RNA interference technology was employed to knock down piR-020829 expression in SNU387 cells (knockdown group), with SNU387 cells transfected with negative control vector serving as negative control group. piR-020829 mimic was used to overexpress piR-020829 in Hep3B cells (overexpression group), with Hep3B cells transfected with mimic negative control serving as overexpression negative control group. CCK-8 assay was used to detect cell proliferation viability in SNU387/Hep3B cells after piR-020829 knockdown or overexpression. For *in vivo* experiments, 32 nude mice were randomly divided into 4 groups: antagomir group (tail vein injection of piR-020829 Antagomir), antagomir control group (injection of Antagomir NC), mimic group (injection of piR-020829 mimic), and mimic control group (injection of mimic NC); tumor weight was observed in each group at the end of the experiment. Colony formation assay was used to detect the *in vitro* proliferative capacity of SNU387/Hep3B cells after piR-020829 knockdown or overexpression. **Results** Compared with adjacent normal tissues, the expression level of piR-020829 was significantly elevated in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. Survival analysis showed that HCC patients with relatively high expression of piR-020829 had significantly shorter overall survival and progression free survival than those with low expression, indicating that high piR-020829 expression predicts a poor prognosis in HCC patients. *In vitro* experiments confirmed that knockdown of piR-020829 led to a significant decrease in the proliferation viability and colony formation ability of HCC cells ( $P < 0.05$ ), while treatment with piR-020829 mimic increased HCC cell proliferation activity and colony formation. Nude mouse subcutaneous xenograft experiments demonstrated that treatment with piR-020829 Antagomir resulted in a significantly lower tumor weight compared with the antagomir control group, whereas treatment with piR-020829 mimic led to a significantly higher tumor weight compared with the mimic control group. Immunohistochemical staining of xenograft tumors from the antagomir group showed a significantly lower Ki-67 positive rate than that in the antagomir control group ( $P < 0.05$ ). Knockdown of piR-020829 downregulated the expression of the apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and B-cell lymphoma-x1 (Bcl-x1), and upregulated the expression of cysteine-aspartic protease 3 (Caspase-3) ( $P < 0.05$ ). Knockdown of piR-020829 also downregulated the expression of the cell cycle-related proteins CDK4 and Cyclin D1 ( $P < 0.05$ ). Furthermore, mechanistic investigation revealed that knockdown of piR-020829 significantly upregulated the expression of its target molecule insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** piR-020829 promotes malignant proliferation of HCC cells by targeting and inhibiting IGFBP3 expression, and this molecule may serve as a novel molecular target for anti-HCC targeted therapy.

**Key words:** Piwi-interacting RNA; Insulin-like growth factor-binding protein 3; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; Apoptosis

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。在过去二十年里,肝癌已经成为国内实体肿瘤死亡的第三大原因<sup>[2-3]</sup>。尽管外科手术、经肝动脉介入栓塞治疗、放疗以及系统治疗的开展,显著改善了肝癌患者的临床预后,但患者总体生存率仍然较低,在国内肝癌患者约有 64% 在初诊时已处于中晚期<sup>[4]</sup>,上述治疗手段疗效十分有限,且现有肝癌诊断生物标志物的特异性和敏感性均有待提高。早发现、早治疗是提高肝癌患者生存率的关键因素,临床亟需开发用于鉴定晚期癌症诊断和预后的新型生物标志物,并探索有效治疗干预新靶点。

非编码 RNA (如 miRNA、lncRNA) 与癌症恶性进展的关系已得到广泛研究,但 piRNA 作为非编码 RNA 家族的重要成员,其在肿瘤发生发展中的作用

尚不明确,相关研究较少。piRNA 于 2001 年首次在果蝇睾丸中被发现,可维持男性生育能力<sup>[5]</sup>。迄今为止,在人类细胞中已收录近 900 万条 piRNA 序列<sup>[6]</sup>。piRNA 由 24 至 31 个核苷酸组成,其中 5'-末端尿苷或 10th-腺苷位,缺乏清晰的二级结构序列<sup>[7]</sup>。研究表明,piRNA 可以与 PIWI 蛋白结合形成 piRNA/piwi 复合物,影响转座子沉默、精子发生、基因组重排、表观遗传调控、蛋白质调控以及生殖干细胞维持<sup>[8]</sup>。近年研究发现,piRNA 在某些癌症中表达异常,表明 piRNA 可能在肿瘤发生中发挥重要作用,并与癌症预后相关<sup>[9-13]</sup>。

既往研究表明,piRNA 家族在肝癌组织中显著异常表达。其中 piR-15254、piR-1029、piR-32132 和 piR-43597 等 piRNA 分子在肝癌组织表达水平显著

高于非肿瘤组织<sup>[14]</sup>。piR-017724 可通过沉默 PLIN3 表达发挥抑制肝癌细胞增殖、侵袭的作用,而既往研究显示,piR-020829 在正常肝组织、肝硬化组织和肝癌组织中的表达水平,随着疾病进展而显著升高<sup>[15]</sup>。上述研究结果提示,piR-020829 在肝癌进展中可能发挥调控作用,但其具体功能及分子机制的研究报道较少。研究结合前期甲基化筛选结果,将 IGFBP3 确定为 piR-020829 的潜在靶基因。胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (insulin-like growth factor-binding protein 3, IGFBP3) 是 IGFBP 家族中血清含量最为丰富的成员,体内约 90% 以上的胰岛素样生长因子-I 与 IGFBP3 结合形成复合物<sup>[16]</sup>。IGFBP3 不仅是血液中 IGF 的主要转运蛋白,还可通过 IGF 依赖性和非依赖性两种途径调控细胞增殖与凋亡<sup>[2]</sup>。大量研究表明,IGFBP3 在多种恶性肿瘤中发挥抑癌作用,其表达下调与肿瘤进展及不良预后密切相关<sup>[17]</sup>。在肝癌中,IGFBP3 被证实可通过抑制 IGF 信号通路、促进细胞凋亡等机制发挥抗肿瘤效应<sup>[18]</sup>。然而,IGFBP3 在肝癌中的上游调控机制尚不完全清楚,探讨其表观遗传调控网络有望为肝癌靶向治疗提供新的思路。

本研究通过选择 piR-020829 作为靶分子,探讨其在肝癌恶性增殖中的作用,并揭示其靶向调控 IGFBP3 的分子机制,以期为肝癌的临床研究提供参考和新的治疗方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

人肝癌细胞 HepG2、Hep3B、Huh7、SNU387 均属于细胞实验常用肝癌细胞系。均得到美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)认证,并经过中国科学院细胞库细胞株信息(Authenticated by Short Tandem Repeat, STR)鉴定。

#### 1.1.2 实验动物及肝组织标本

6 周龄雄性裸鼠 32 只,体质量 16~20 g,均由山东第一医科大学实验动物学院(山东省实验动物中心)提供。本研究通过山东第一医科大学附属省立医院动物伦理委员会审批(批准文号: NSFC-2023-119)。

正常肝组织由我院肝移植科提供,来源于正常人类供肝术中修剪出的正常肝脏;肝硬化组织和肝癌组织由我院肝胆外一科外科肝癌切除手术获得的肝癌标本以及癌旁肝硬化组织。正常肝组织、肝硬化组织、肝癌组织获取后经组织病理切片,由两名病理医生阅片,并通过病理确定组织符合诊断标准。手术患者随访由 3 名硕士研究生连续性长达 3 年的

电话及门诊随访并记录在册,本研究经山东第一医科大学附属省立医院医学伦理委员会批准(NSFC: No.2020-127)。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

Hank 平衡液、DMEM 细胞购自美国 Gibco 公司;转染试剂脂质体 lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;细胞培养用胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RIPA 裂解液购自江苏碧云天生物公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;Bcl-2 抗体(货号 ab182858)、Bcl-xl 抗体(货号 ab32370)、Caspase3 抗体(货号 ab32351)、CDK4 抗体(货号 ab108357)、Cyclin D1 抗体(货号 ab16663)、P-Rb 抗体(phosphoS807,货号: ab184796)、IGFBP3 抗体(货号 ab220429)、GAPDH 抗体(货号 ab8245)均购自英国 Abcam 公司;正置光学显微镜购自日本 Olympus 公司;正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;Bio-Rad 化学发光显色仪(Bio-Rad GelDoc XR)购自上海木森生物科技有限公司;实时定量 PCR 仪器(型号: ABI7500)购自美国 Thermo 赛默飞公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 采用实时荧光定量 PCR 法检测 piR-020829 的表达

实时荧光定量 PCR 法检测正常肝组织、肝硬化组织、肝癌组织、癌旁组织以及 4 种肝癌细胞系中 piR-020829 表达量的变化。使用 TRizol 超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,每 30~50 mg 组织和每 10 cm<sup>2</sup> 面积贴壁细胞各加入 1 mL TRizol 试剂。使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒纯化总 RNA 并逆转录,以制备 cDNA 样品。采用 SYBR<sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒(货号: AG11701)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(总体积 20  $\mu$ L)如下: 2X SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS 预混液 10  $\mu$ L, cDNA 模板(100 ng) 2  $\mu$ L, 上游引物 0.4  $\mu$ L, 下游引物(Primer R) 0.4  $\mu$ L, 剩余体积用无 RNase 水补足至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预热变性 1 min, 95  $^{\circ}$ C 反应 5 s, 60  $^{\circ}$ C 反应 30 s, 2 次, 40 个循环, 最后进入解离阶段。

#### 1.2.2 慢病毒质粒转染

慢病毒敲低表达质粒转染实验: 复能基因公司设计针对 piR-020829 敲低表达的慢病毒载体质粒, 将载体分为阴性对照载体和 piR-020829 敲低载体。首先 SNU387 细胞培养, 在转染前 1 d (20~24 h) 将肝癌细胞以  $5 \times 10^4$  /mL 密度接种至 12 孔细胞培养板内, 第 2 天细胞生长密度达到约 70%~80% 且贴壁。将细胞分为空白对照组(未做任何处理的细胞)、敲低对照组(转染阴性对照载体的细胞)和敲低组(转染 piR-020829-shRNA 载体的细胞)。在敲低对照组和敲低组中分别加入相应的阴性对照病毒

液和 piR-020829-shRNA 病毒液,通过脂质体 2000 转染试剂进行病毒质粒转染,细胞培养箱内培养 6 h 后,去除含有脂质体和病毒液的培养液。每孔加入 1 mL 新鲜细胞培养液继续培养,用于后续实验。慢病毒过表达质粒转染实验:取对数生长期 293T 细胞,吸净细胞培养液,通过脂质体 2000 转染 piR-020829 表达质粒、混合 pPACK-REV、pPACK-VSV 和 pPACK-GAG 包装质粒共同转染 293T 细胞。分别于转染 24、48、72 h 收集细胞培养上清,经无菌细胞滤器过滤除菌后即得到病毒液。应用上述病毒液转染目的细胞(Hep3B),并进行嘌呤霉素筛选培养。筛选培养存活的目的细胞进行 PCR 实验验证过表达效果。

### 1.2.3 采用 CCK-8 法检测 piR-020829 调控肝癌细胞增殖

取对数生长期肝癌细胞进行实验,分为敲低组(SNU387 细胞,转染 piR-020829-shRNA)和敲低对照组(SNU387 细胞,转染阴性对照载体);过表达组(Hep3B 细胞,转染 piR-020829 模拟物)和过表达对照组(Hep3B 细胞,转染无功能序列的模拟物阴性对照)。肝癌细胞按  $3 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中,每孔终体积为 100  $\mu$ L 细胞悬液,培养过夜贴壁。次日,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液避光反应。加好 CCK-8 的 96 孔板在细胞培养箱内继续孵育 0.5 ~ 4.0 h。在酶标仪中于 450 nm 处测定吸光度。

### 1.2.4 采用细胞克隆形成实验检测 PiR-020829 干扰敲低表达和模拟过表达

将对数生长期 SNU387 肝癌细胞分为 piR-020829 干扰敲低表达组和空白敲低对照组;对数生长期 Hep3B 细胞分为过表达组和过表达对照组;肝癌细胞按  $2 \times 10^3$  个/孔的数量接种于 6 孔板中,将接种好的细胞于培养箱中继续培养至 14 d,中途每 3 d 进行细胞换液并观察细胞状态。实验终止时每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛,固定细胞 30 ~ 60 min, PBS 洗涤细胞 1 次。每孔加入洁净、无杂质结晶紫染液 500  $\mu$ L,染细胞 10 ~ 20 min。用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤细胞数次,晾干,单反数码相机拍照整理,进行克隆计数。每个实验组设 3 个复孔。

### 1.2.5 肝癌细胞荷瘤裸鼠体内动物模型建立

6 周龄裸鼠随机分成拮抗剂组(接种 SNU387 细胞,尾静脉注射 piR-020829 拮抗剂)、拮抗剂对照组(接种 SNU387 细胞,尾静脉注射拮抗剂阴性对照)、模拟物组(接种 Hep3B 细胞,尾静脉注射 piR-020829 模拟物)和模拟物对照组(接种 Hep3B 细胞,尾静脉注射无功能序列的模拟物阴性对照),每组 8 只。在无菌条件下,胰酶消化细胞,将处于对数生长期的 SNU387 细胞计数后将其重悬于生理盐水

中,每只裸鼠皮下注射  $1 \times 10^7$  个细胞。模型建立后,拮抗剂组和拮抗剂对照组裸鼠于皮下成瘤后(接种后 2 周),尾静脉注射相应试剂:拮抗剂组注射 piR-020829 拮抗剂,拮抗剂对照组注射等剂量生理盐水,每周 2 次,连续注射至实验结束。模拟物组和模拟物对照组裸鼠于皮下接种 Hep3B 细胞 2 周后,分别尾静脉注射 piR-020829 模拟物和无功能序列的模拟物阴性对照,每周 2 次,连续注射至实验结束。实验期间定期测量肿瘤体积,实验结束时采用颈椎脱臼法处死裸鼠,剥离皮下瘤体,拍照后使用分析天平称重,记录瘤质量。实验过程中,每日观察裸鼠一般状态及肿瘤生长情况,记录各组动物存活数量。至实验结束时,模拟物组和模拟物对照组各有 3 只裸鼠死亡,5 只裸鼠纳入瘤体质量统计分析;拮抗剂组和拮抗剂对照组全部存活,纳入最终分析。

### 1.2.6 采用免疫组织化学染色法检测裸鼠瘤体组织 Ki-67 的表达

切取裸鼠皮下肿瘤,4% 中性多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋,5  $\mu$ m 病理切片。将组织切片在 60 ~ 65  $^{\circ}$ C 电热恒温箱中烘烤 1 h 后,使用全自动脱蜡机进行脱蜡处理。脱蜡后使用柠檬酸修复液进行抗原修复,自然冷却至室温后,加入 3% 过氧化氢溶液清除内源性过氧化物酶活性,用 5% BSA 于 37  $^{\circ}$ C 封闭抗原 60 min。吸弃封闭液,滴加 Ki-67 特异性 I 抗抗体于湿盒中 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天室温复温湿盒中的切片 15 min, PBS 缓冲液清洗 3 次,5 min/次,滴加相应二抗,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 清洗 3 次后, DAB 溶液显色至出现明显棕黄色,将切片用自来水中止反应。将切片置于苏木精染核 2 ~ 5 min, ddH<sub>2</sub>O 洗去多余苏木精,迅速使用酸性分化液分化 20 s,自来水流水冲洗,返蓝 10 min 后取出切片,脱水,中性树脂封片。待干燥后在显微镜下观察染色结果。

### 1.2.7 采用 Aipathwell 图像分析系统进行免疫组化染色定量检测

①循迹:自动定位并沿待测组织圈定待测区域;②选色:根据 HSI 自动进行阳性判断;③运算:自动定位细胞核并扩展胞质范围,计算弱、中、强阳性细胞数量以及面积、累积光密度(integrated optical density, IOD)、组织面积等不同参数;④分析:高倍下逐步计算待测区域。本实验评价项目包括:阳性细胞比率、阳性细胞密度、平均光密度值、H-SCORE =  $\sum (pi \times i) =$  (弱阳性细胞百分比  $\times 1$ ) + (中阳性细胞百分比  $\times 2$ ) + (强阳性细胞百分比  $\times 3$ )、IRS = 阳性强度评分  $\times$  阳性细胞百分比。其中阳性强度评分可分为 5 级:0 级无阳性着色;1 级淡黄色弱阳性;2 级棕黄色中阳性;3 级棕褐色强阳性;阳性细胞百分比可分为 4 级:

0 级 0%~5%;1 级 6%~25%;2 级 26%~50%;3 级 51%~75%;4 级>75%。

1.2.8 采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白、周期相关蛋白和 IGFBP3 的表达

使用 RIPA 缓冲液裂解刮下肝癌细胞并收集。4℃,15 000 r/min 离心 5 min。收集细胞裂解物并确定蛋白质提取物的浓度。蛋白质样品(每个泳道 30 μg)通过 10%SDS-PAGE 电泳,后通过电转方式转移到 NC 膜上。用含有 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 NC 膜 1 h,4℃下分别过夜孵育一抗 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-xl(B cell lymphoma-xl, Bcl-xl)、半胱天冬酶-3(cysteine-aspartic protease 3, Caspase3)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、细胞周期蛋白 D1(G1/S-specific cyclin-D1, Cyclin D1)、磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(phosphorylated retinoblastoma protein, P-Rb)、IGFBP3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),次日使用 TBST 将膜洗涤 3 次,10 min/次。在常温下孵育相应的二抗,孵育条件,室温 1 h。使用 HRP 蛋白发光液于 iBright 蛋白免疫印迹成像系统中显影成像并分析蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算 Bcl-2、Bcl-xl、Caspase3、CDK4、Cyclin D1、P-Rb、IGFBP3

蛋白的表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件。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,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,不同分组间肿瘤患者总生存时间、无进展生存时间以生存曲线方式呈现数据,生存分析采用 Kaplan-Meier 分析法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 piR-020829 在肝癌组织中的表达水平及其与患者预后的关系

与肝硬化组织和正常肝组织相比,piR-020829 在肝癌组织(肝细胞癌)表达水平升高。与配对的癌旁组织相比,piRNA-020829 在肝癌组织中的表达水平升高( $P<0.05$ )(图 1A、B)。Kaplan-Meier 生存分析显示,piR-020829 相对高表达与 piR-020829 相对低表达的肝癌患者相比,总生存时间缩短(图 1C);与 PiR-020829 相对低表达的肝癌患者相比,piR-020829 相对高表达的肝癌患者无进展生存时间缩短(图 1D)。

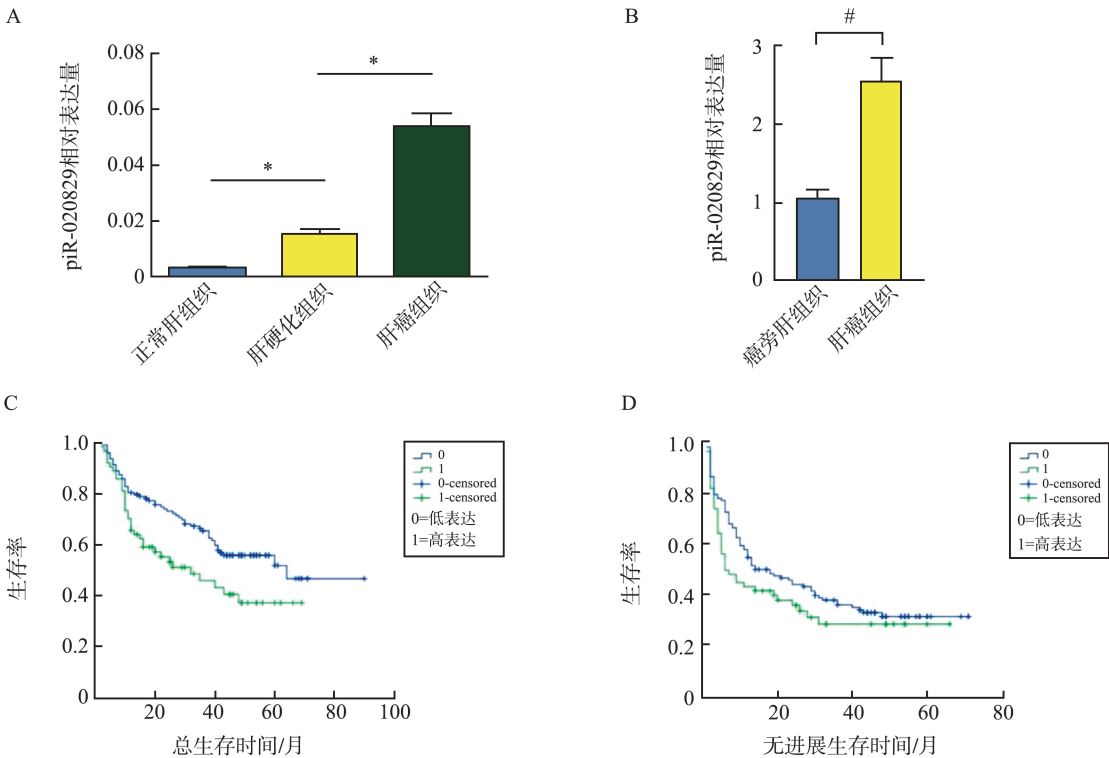


图 1 piR-020829 在肝癌组织和非肝癌组织中的表达水平(A、B)及其在肝癌患者中表达水平对生存时间的影响(C、D)( $*P<0.05$ ;  $\#P<0.01$ )  
Figure 1 Expression levels of piR-020829 in liver cancer tissue and non-liver cancer tissue (A, B) and its impact on survival time in liver cancer patients (C, D)( $*P<0.05$ ;  $\#P<0.01$ )

2.2 piR-020829 对肝癌细胞增殖能力的影响

在 SNU387 细胞中, piR-020829 相对表达量最高, Hep3B 细胞中相对表达量最低(图 2A)。细胞内 shRNA 干扰抑制 piR-020829 的表达水平(图 2B)。与敲低对照组相比, 敲低组 A450 吸光度值降低, 表明肝癌细胞增殖活性下降; 过表达组肝癌细胞

Hep3B 的增殖活性增强 ( $P<0.01$ ), 见图 2C。在 piR-020829 干扰敲低表达( shRNA) 后, 肝癌细胞的体外克隆形成数目减少, 表明肝癌细胞增殖能力下降 ( $P<0.05$ ), 过表达组与过表达对照组相比, 肝癌细胞克隆形成能力增强 ( $P<0.05$ ), 见图 2D。

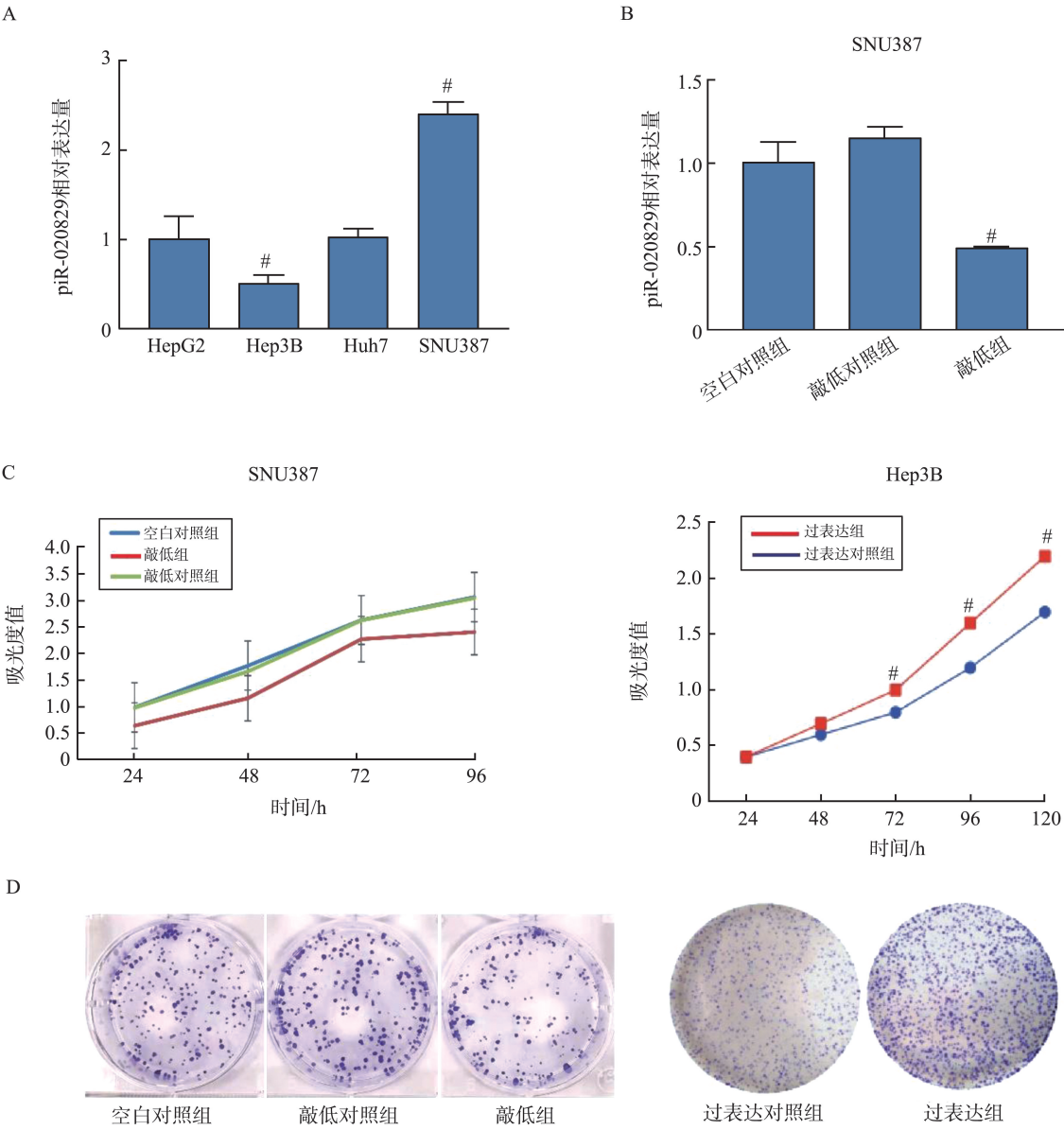


图 2 piR-020829 对肝癌细胞增殖能力的影响  
A: 4 种肝癌细胞系中 piR-020829 的表达 ( $^{*}P<0.01$ ) ; B: SNU387 细胞中 piR-020829 的敲低效果 ( $^{*}P<0.01$ ) ; C: CCK-8 检测 piR-020829 敲低组和模拟物处理组对肝癌细胞增殖活性的影响 ( $^{*}P<0.01$ ) ; D: 克隆形成实验检测 piR-020829 敲低组和模拟物处理组对肝癌细胞克隆形成能力的影响 ( $^{*}P<0.01$ )。

Figure 2 Effects of piR-020829 on the proliferation ability of hepatocellular carcinoma cells  
A: Expression of piR-020829 in four hepatocellular carcinoma cell lines ( $^{*}P<0.01$ ) ; B: Knockdown efficiency of piR-020829 in SNU387 cells ( $^{*}P<0.01$ ) ; C: CCK-8 assay showing the effects of piR-020829 knockdown and mimic treatment on the proliferation activity of hepatocellular carcinoma cells ( $^{*}P<0.01$ ) ; D: Colony formation assay showing the effects of piR-020829 knockdown and mimic treatment on the colony formation ability of hepatocellular carcinoma cells ( $^{*}P<0.01$ ) .

2.3 piR-020829 对小鼠皮下成瘤能力的影响

与拮抗剂对照组相比, 拮抗剂组成瘤能力降低;

与模拟物对照组相比, 模拟物组肝癌细胞 Hep3B 体内成瘤能力增强, 见图 3。实验结束后, 留取裸鼠皮

下瘤体进行称重,相较于对照组,模拟物组裸鼠皮下成瘤质量增加;拮抗剂组皮下成瘤的瘤体质量减轻。与对照组相比, Ki-67 在拮抗剂组裸鼠瘤体组织表达水平降低(图 3B),提示成瘤能力下降。

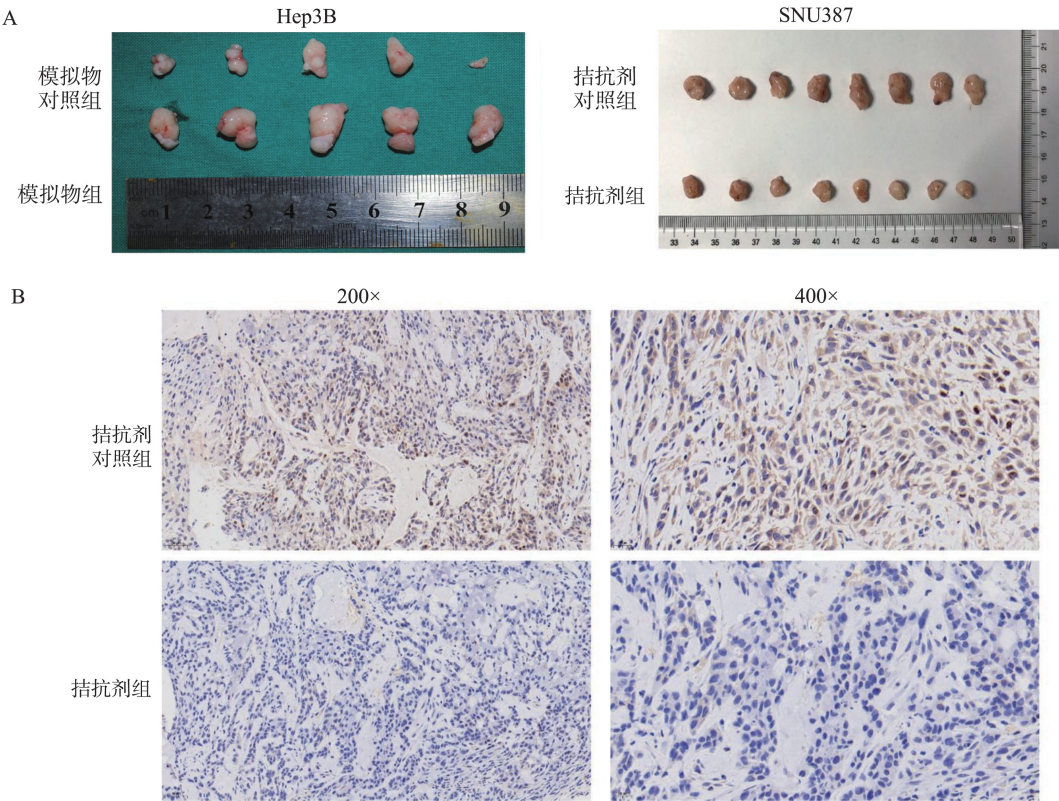


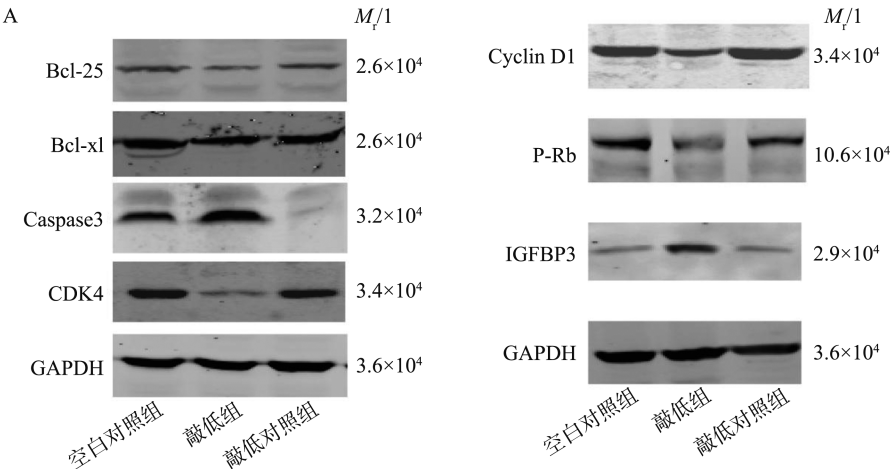
图 3 piR-020829 对裸鼠肝细胞癌细胞致瘤性的影响  
A: 各组裸鼠皮下瘤体比较; B: 裸鼠瘤体组织中 Ki-67 的表达。

Figure 3 Effects of piR-020829 on the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells in nude mice  
A: Comparison of subcutaneous tumor masses in nude mice among different groups; B: Expression of Ki-67 in tumor tissues of nude mice.

## 2.4 piR-020829 对细胞增殖/凋亡调控信号分子表达水平的影响

与敲低对照组相比, 敲低组 Bcl-2、Bcl-xl、CDK4、Cyclin D1、p-Rb 等蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); Caspase3 蛋白酶、抑癌基因蛋白 IGFBP3 在敲低组表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。灰度值半定量分

析显示, 与敲低对照组相比, 敲低组 Bcl-2、Bcl-xl、CDK4、Cyclin D1、p-Rb 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), 而 Caspase3 和 IGFBP3 蛋白表达水平升高 (均  $P < 0.05$ )。与拮抗剂对照组相比, IGFBP3 在拮抗剂组表达水平升高, 与细胞实验结果一致。见图 4。



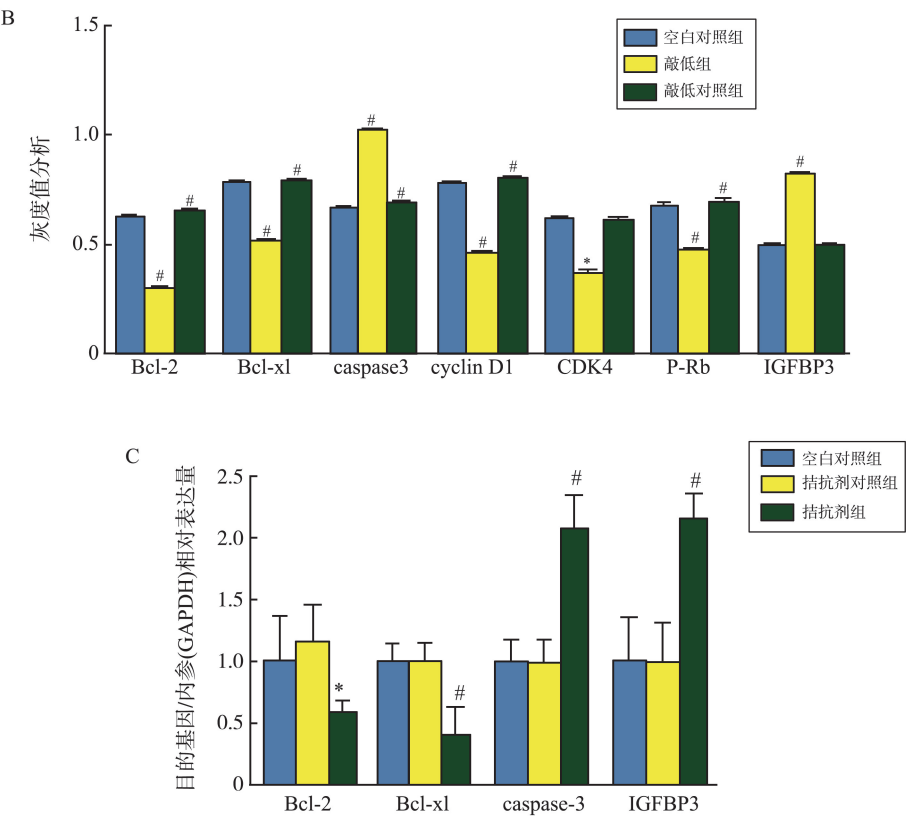


图 4 piR-020829 对细胞增殖/凋亡调控信号分子表达水平的影响  
A: piR-020829 敲低组和阴性对照中 Bcl-2、Bcl-xl、Caspase3、CDK4、p-Rb 及 IGFBP3 蛋白的表达; B: 各蛋白灰度值的半定量分析结果 ( \* $P<0.05$ ; # $P<0.01$  ); C: 裸鼠瘤体组织中拮抗剂组与拮抗剂对照组 IGFBP3 的表达 ( \* $P<0.05$ ; # $P<0.01$  )。

Figure 4 Effects of piR-020829 on the expression levels of cell proliferation/apoptosis regulatory signaling molecules  
A: Expression of Bcl-2, Bcl-xl, Caspase3, CDK4, p-Rb, and IGFBP3 proteins in the piR-020829 knockdown group and the negative control group; B: Results of the semi-quantitative analysis of the grey scale values of each protein ( \* $P<0.05$ ; # $P<0.01$  ); C: Expression of IGFBP3 in xenograft tumor tissues of nude mice in the antagonomir group and the antagonomir-NC control group ( \* $P<0.05$ ; # $P<0.01$  )。

3 讨 论

非编码 RNAs 是重要的表观遗传调控分子,参与调控了多种疾病的发生<sup>[19-21]</sup>。其中,非编码 RNA 家族中的微小 RNA 调控肝癌等实体瘤增殖的相关研究被广泛报道<sup>[22-24]</sup>。然而,piRNA 作为非编码 RNA 家族的重要成员,其在肝癌中的生物学功能及分子机制尚不明确<sup>[18,25-26]</sup>。

piRNA 分子与肝癌关系的研究报道较少,既往研究显示,piR-1029、piR-15254、piR-35395、piR-32132 等分子在肝癌组织表达水平显著高于癌旁组织<sup>[27]</sup>,且上述分子调控肝癌生物学行为的相关研究较少。本研究结果显示,piR-020829 在肝癌组织中表达水平显著高于癌旁和正常肝组织,且其高表达与患者总生存期和和无进展生存期缩短密切相关。与既往报道 piRNA 在肝癌中异常表达的趋势一致<sup>[15]</sup>,提示

piR-020829 可能作为促癌因子参与肝癌进展。  
piRNAs 分子在肝癌生物学行为调控中发挥不同的作用效应。例如,piR-017724 在肝癌组织显著低表达,且体外实验证实沉默 piR-017724 表达会导致肝癌细胞 SMMC-7721 增殖、侵袭能力下降<sup>[28]</sup>; piR-43597 分子在肝癌组织高表达,且发挥促进肝癌细胞恶性生物学功能的调控效应<sup>[29]</sup>。然而,关于 piR-020829 在肝癌进展中的调控作用相关研究报道较少。为进一步验证其功能,本研究通过体外细胞增殖等实验和体内裸鼠成瘤实验发现,敲低 piR-020829 表达可显著抑制肝癌细胞增殖活力、克隆形成能力及皮下成瘤能力,而过表达 piR-020829 则产生相反效应。由此表明,piR-020829 在肝癌中发挥促癌基因的作用,其高表达是肝癌恶性增殖的重要驱动因素。  
piRNA 分子调控靶基因通常显示抑制性调控效应。例如,piR-017724 调控肝癌增殖、侵袭等恶性

生物学行为是通过抑制靶基因 PLIN3 表达实现的<sup>[28]</sup>。探索 piR-020829 调控的靶基因成为揭示其调控肝癌增殖分子机制的重要方法,本研究结合前期甲基化筛选结果,将 IGFBP3 确定为 piR-020829 的潜在靶基因。IGFBP3 作为重要的肿瘤调控基因被广泛研究。IGFBP3 基因同其他“抑癌基因”一样,其启动子甲基化及其引起的基因转录沉默可见于多种肿瘤发生过程,包括肝癌、早期非小细胞肺癌、前列腺癌、膀胱癌。IGFBP3 在胃癌中表达下调,其低表达与淋巴结转移和 TNM 分期进展相关,且与患者预后不良有关<sup>[30]</sup>。非小细胞肺癌研究中证实,IGFBP3 的恢复表达可以抑制 PI3K/AKT 通路和肿瘤增殖<sup>[31]</sup>。肝癌研究证实,IGFBP3 高表达患者预后优于低表达患者,且该基因抑制肝癌细胞增殖、侵袭,piRNA 是调控靶基因启动子甲基化的重要非编码 RNA 家族<sup>[32]</sup>。本研究结果显示,piR-020829 通过抑制 IGFBP3 表达,解除其对细胞增殖和凋亡的负向调控,进而促进肝癌细胞恶性增殖。IGFBP3 作为胰岛素样生长因子结合蛋白家族成员,已被多项研究证实具有抑癌作用,可通过 IGF 依赖性 & 非依赖性通路调控肿瘤细胞增殖与凋亡<sup>[17,33-36]</sup>。本研究进一步明确了 piR-020829/IGFBP3 轴在肝癌中的调控关系,丰富了肝癌表观遗传调控网络的内涵。与既往研究对比,piRNA 在不同肿瘤中可能发挥截然不同的功能。例如,piR-823 在胃癌中表现为抑癌因子,而在乳腺癌中则发挥促癌作用<sup>[6,16,37-39]</sup>。本研究中 piR-020829 在肝癌中呈现促癌效应,提示 piRNA 的功能具有组织特异性,其作用机制需结合特定肿瘤微环境进行分析。此外,piRNA 作为新型生物标志物的潜力已在多种肿瘤中得到初步验证<sup>[39-40]</sup>,本研究为 piR-020829 在肝癌诊断及预后评估中的应用提供了实验依据。

综上所述,本研究阐明了 piR-020829 通过靶向抑制 IGFBP3 表达,调控凋亡与周期相关蛋白,从而促进肝癌细胞恶性增殖的分子机制。该发现不仅为理解肝癌发生发展的表观遗传调控提供了新视角,也为开发基于 piR-020829/IGFBP3 轴的靶向治疗策略奠定了理论基础。未来研究将进一步扩大临床样本验证,并探索其在肝癌早期诊断、疗效监测及靶向治疗中的转化应用前景。

## 参考文献:

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Feng R M, Su Q L, Huang X Y, et al. Cancer situation in China: what does the China cancer map indicate from the first national death survey to the latest cancer registration? [J]. *Cancer Commun*, 2023, 43(1): 75-86.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024 年版) [J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(4): 475-530.  
Department of Medical Administration, National Health Commission of the People's Republic of China. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2024 edition) [J]. *China Journal of General Surgery*, 2024, 33(4): 475-530.
- [4] 中国抗癌协会肝癌专业委员会转化治疗协作组. 肝癌转化治疗中国专家共识(2021 版) [J]. *中华消化外科杂志*, 2021, 20(6): 600-616.
- [5] Aravin A A, Naumova N M, Tulin A V, et al. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. Melanogaster* germline [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(13): 1017-1027.
- [6] Wang J J, Shi Y R, Zhou H H, et al. piRBase: integrating PiRNA annotation in all aspects [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): 265-272.
- [7] Liu P W, Dong Y Q, Gu J B, et al. Developmental PiRNA profiles of the invasive vector mosquito *Aedes albopictus* [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1): 524. DOI: 10.1186/s13071-016-1815-8
- [8] Han Y N, Li Y, Xia S Q, et al. PIWI proteins and PIWI-interacting RNA: emerging roles in cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 1-20.
- [9] Li P H, Xue Y, Gu X Y. Regulatory mechanisms and clinical implications of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in major digestive tract cancers [J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 25(1): 244. DOI: 10.1186/s12935-025-03889-6
- [10] Ye Y S, Wu F, Li B W, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomal piR-35462 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via FTO/Twist1 pathway [J]. *BMC Oral Health*, 2025, 25(1): 840. DOI: 10.1186/s12903-025-06082-3
- [11] Silvia B J, Shetty S, Behera R, et al. A comprehensive review on the role of PIWI-interacting RNA (PiRNA) in gynecological cancers [J]. *Life Sci*, 2024, 357: 123065. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.123065
- [12] Tan L P, Mai D M, Zhang B L, et al. PIWI-interacting RNA-36712 restrains breast cancer progression and chemoresistance by interaction with SEPW1 pseudogene SEPW1P RNA [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 9. DOI: 10.1186/s12943-019-0940-3
- [13] 马兴媛, 王浙, 王帅阳, 等. piRNAs 表达失调作为癌症潜在诊断标志物的价值: 一项系统评价和 Meta 分析 [J]. *中国循证医学杂志*, 2024, 24(2): 164-174.

Ma Xingyuan, Wang Zhe, Wang Shuaiyang, et al. Dys-regulated expression of piRNAs serve as diagnostic markers in cancers: a systematic review and meta-analysis [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2024, 24(2): 164-174.

[14] 缪沛真, 杨怡, 陈二宝. piRNA 在肝细胞癌组织中的差异表达分析 [J]. 中华肝胆病杂志, 2018, 26(11): 842-846.

[15] Ng K W, Anderson C, Marshall E A, et al. Piwi-interacting RNAs in cancer: emerging functions and clinical utility [J]. Mol Cancer, 2016, 15: 5. DOI:10.1186/s12943-016-0491-9

[16] Cheng J, Deng H X, Xiao B X, et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates *in vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity in human gastric cancer cells [J]. Cancer Lett, 2012, 315(1): 12-17.

[17] Regel I, Eichenmüller M, Joppien S, et al. IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors [J]. Mol Cancer, 2012, 11: 9. DOI:10.1186/1476-4598-11-9

[18] Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence [J]. Nature, 2009, 457(7228): 413-420.

[19] Guo B, Li D, Du L, et al. piRNAs: biogenesis and their potential roles in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(2): 567-575.

[20] 卢瑞慧, 朱靛雯, 薛晴. 表观遗传学在子宫内膜异位症中的研究进展 [J]. 中国医学科学院学报, 2023, 45(1): 124-128.

Lu Ruihui, Zhu Jingwen, Xue Qing, Research progress on epigenetics in endometriosis [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2023, 45(1): 124-128.

[21] 孔雪, 李娟, 段伟丽, 等. 长链非编码 RNA AC012073.1 对乳腺癌细胞迁移侵袭的影响及临床价值 [J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(4): 70-78.

Kong Xue, Li Juan, Duan Weili, et al. Effects of lncRNA AC012073.1 on the migration and invasion of human breast cancer cells and its clinical significance [J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2021, 59(4): 70-78.

[22] Ma L N, Wu L N, Liu S W, et al. miR-199a/b-3p inhibits HCC cell proliferation and invasion through a novel compensatory signaling pathway DJ-1/Ras/PI3K/AKT [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 224. DOI:10.1038/s41598-023-48760-8

[23] Zhang S R, Liu S Q, Dong H, et al. CD63-high macrophage-derived exosomal miR-6876-5p promotes hepatocellular carcinoma stemness via PTEN/Akt-mediated EMT pathway [J]. Hepatol Commun, 2025, 9(1): e0616. DOI:10.1097/hc9.0000000000000616

[24] 黄湘俊, 张文兴. 肝细胞癌中 microRNA-888 基因家族的表达特征及临床意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(1): 119-122.

Huang Xiangjun, Zhang Xingwen. Expression features and clinical significance of the microRNA-888 gene family in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2019, 35(1): 119-122.

[25] Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes [J]. Genes Dev, 2008, 22(7): 908-917.

[26] Saito K, Nishida K M, Mori T, et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome [J]. Genes Dev, 2006, 20(16): 2214-2222.

[27] Tierno D, Grassi G, Scaggiante B. New challenges in hepatocellular carcinoma: a role for PIWI-interacting RNAs? [J]. World J Gastroenterol, 2024, 30(22): 2843-2848.

[28] Wu Y J, Wang J, Zhang P, et al. PIWIL1 interacting RNA piR-017724 inhibits proliferation, invasion, and migration, and inhibits the development of HCC by silencing PLIN3 [J]. Front Oncol, 2023, 13. DOI:10.3389/fonc.2023.1203821

[29] Rui T, Wang K, Xiang A, et al. Serum exosome-derived piRNAs could be promising biomarkers for HCC diagnosis [J]. Int J Nanomed, 2023, 18: 1989-2001. DOI:10.2147/IJN.S398462

[30] Ansari A, Gheysarzadeh A, Sharifi A, et al. Clinico-pathological correlation of insulin-like growth factor binding protein 3 and their death receptor in patients with gastric cancer [J]. Res Pharm Sci, 2024, 19(1). DOI:10.4103/1735-5362.394819

[31] Cortés-Sempere M, de Miguel M P, Pernía O, et al. IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer [J]. Oncogene, 2012, 32(10): 1274-1283.

[32] Hanafusa T, Shinji T, Shiraha H, et al. Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation [J]. BMC Cancer, 2005, 5(1). DOI:10.1186/1471-2407-5-9

[33] Zhang Q, Zhu Y Z, Cao X Y, et al. The epigenetic regulatory mechanism of PIWI/piRNAs in human cancers [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 45. DOI:10.1186/s12943-023-01749-3

[34] Torng P L, Lin C W, Chan M W, et al. Promoter methylation of IGFBP-3 and p53 expression in ovarian endometrioid carcinoma [J]. Mol Cancer, 2009, 8: 120. DOI:10.1186/1476-4598-8-120

- guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(1): 64-84.
- [17] Marth C, Landoni F, Mahner S, et al. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2017, 28: iv72-iv83. DOI:10.1093/annonc/mdx220
- [18] Gopu P, Antony F, Cyriac S, et al. Updates on systemic therapy for cervical cancer[J]. Indian J Med Res, 2021, 154(2): 293-302.
- [19] Yang X M, Chen S B, Li Y H, et al. Laparoscopic radical hysterectomy with Karez technique for stage IB3 and IIA2 cervical cancer: a multicenter retrospective cohort study[J]. Int J Surg, 2025, 111(7): 4516-4527.
- [20] Pahisa J, Martínez-Román S, Torné A, et al. Comparative study of laparoscopically assisted radical vaginal hysterectomy and open wertheim-meigs in patients with early-stage cervical cancer eleven years of experience [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(1): 173-178.
- [21] 申沛, 朱前勇, 郭伟平, 等. 腹腔镜下宫颈癌根治术致泌尿系统脏器损伤的原因及预防[J]. 中国内镜杂志, 2014, 20(11): 1168-1171.
- Shen Pei, Zhu Qianrong, Guo Weiping, et al. The reason and prevention of genitourinary organ secondary to laparoscopic radical hysterectomy in the early cervical cancer[J]. China Journal of Endoscopy, 2014, 20(11): 1168-1171.
- [22] 王家飞, 赵卫东. 腹腔镜下宫颈癌根治术的学习曲线的分析[J]. 安徽医药, 2015, 19(1): 61-65.
- Wang Jiafei, Zhao Weidong. Learning curve analysis of peritoneoscopic radical hysterectomy of cervical cancer [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2015, 19(1): 61-65.
- [23] Kim S, Min K J, Lee S, et al. Learning curve could affect oncologic outcome of minimally invasive radical hysterectomy for cervical cancer [J]. Asian J Surg, 2021, 44(1): 174-180.
- [24] 陈卉. 手术医师成长曲线对宫颈癌手术并发症及规范性的影响 [D]. 甘肃中医药大学, 2024.
- [25] 张瑜, 范丽丝, 郭楠楠, 等. 手术频率对腹腔镜下宫颈癌根治术学习曲线的影响[J]. 实用医药杂志, 2017, 34(10): 881-882.
- Zhang Yu, Fan Lisi, Guo Nannan, et al. Influence of operation frequency on the learning curve of laparoscopic radical resection of cervical cancer[J]. Practical Journal of Medicine & Pharmacy, 2017, 34(10): 881-882.
- (编辑:李伟)
- (上接第 10 页)
- [35] Wang H W, Wang H, Li K, et al. IGFBP-3 is the key target of sanguinarine in promoting apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 1007-1015. DOI:10.2147/cmar.S234291
- [36] Yan J J, Yang X, Li L, et al. Low expression levels of insulin-like growth factor binding protein-3 are correlated with poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3395-3402.
- [37] Cui L, Lou Y R, Zhang X J, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers [J]. Clin Biochem, 2011, 44(13): 1050-1057.
- [38] 中国抗癌协会肝癌专业委员会转化治疗协作组. 原发性肝癌转化及围手术期治疗中国专家共识(2024 版) [J]. 中华消化外科杂志, 2024, 23(4): 492-513.
- [39] Ding X, Li Y, Lü J H, et al. piRNA-823 is involved in cancer stem cell regulation through altering DNA methylation in association with luminal breast cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 641052. DOI:10.3389/fcell.2021.641052
- [40] Cordeiro A, Navarro A, Gaya A, et al. PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 46002-46013.
- (编辑:徐苗蓁)