·基础研究·

基于癌症基因组图谱数据库构建肝细胞癌相关 miRNA-mRNA 调控网络

孔祥宇[1,2],李怡君[1,2],周灏澈[1,2],伍维康[2,3],付婷[2],贺真[2],邵中军[2],张维璐[2*]
([1]包头医学院公共卫生学院,内蒙古自治区 包头 014040;[2]空军军医大学军事预防医学系军队防疫与流行病学教研室,特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室,西安 710032;[3]甘肃中医药大学公共卫生学院,兰州 730000)

【摘 要】 **目的** 探讨肝细胞癌(HCC)发病机制,为 HCC 的诊断和临床治疗提供依据。**方法** 基于癌症基因组图谱数据库,鉴定 HCC 样本与癌旁组织样本之间差异表达的 miRNA 与 mRNA。通过 miRDB、TargetScan 数据库预测差异表达 miRNA 的靶基因,并与差异 mRNA 取交集确定目标基因。使用 FunRich 软件预测在 HCC 差异表达 miRNA 中的潜在转录因子。利用 Bioconductor 中的 clusterProfiler 包进行功能注释和途径富集分析。通过 STRING 数据库构建了蛋白质-蛋白质相互作用网络,对前 20 个枢纽基因进行表达验证和生存分析。**结果** 对 375 例 HCC 样本、50 例癌旁样本进行差异 miRNA 分析,共鉴定出 300 个差异表达的 miRNA。对 374 例 HCC 样本、50 例癌旁样本进行差异 mRNA 分析,共鉴定出 1 106 个差异表达的 mRNA。分别在上调的和下调的 miRNA 中选择 20 个差异表达最显著的 miRNA 预测其靶基因。对 131 个候选基因进行功能富集分析,结果显示主要与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,碳代谢以及催乳素信号通路等途径有关。**结论** 在肝细胞癌中异常表达的 miRNA-mRNA 通路可能成为肝细胞癌诊断的新型生物标志物,为诊断和临床治疗提供依据。

【关键词】 肝细胞癌;microRNA;靶基因
【中图分类号】 R735.7;R181.13 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2023.03.041

Construction of hepatocellular carcinoma-related miRNA-mRNA regulatory network based on TCGA database

Kong Xiangyu[1,2], Li Yijun[1,2], Zhou Haowei[1,2], Wu Weikang[2,3], Fu Ting[2], He Zhen[2], Shao Zhongjun[2], Zhang Weilu[2*]
([1]School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia Autonomous Region, China; [2]Department of Epidemic Prevention and Epidemiology, Ministry of Education Key Laboratory of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, School of Public Health, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; [3]School of Public Health, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) and provide the basis for its diagnosis and clinical treatment. **Methods** Differentially expressed miRNA and mRNA between HCC samples and adjacent tissue samples were identified based on the cancer genome atlas (TCGA) database. The target genes with differentially expressed miRNA were predicted by miRDB and TargetScan databases, and the intersection of miRNA with differentially expressed mRNA was determined. Prediction of potential transcription factors in differentially expressed miRNA in HCC using FunRich software. Functional annotation and pathway enrichment analysis were performed using the clusterProfiler package in Bioconductor. The protein-protein interaction network was constructed using a STRING database, and the miRNA-mRNA regulatory network was mapped by Cytoscape. Twenty miRNA with the most significant differential expression was verified and correlated survival analysis was performed. **Results** A total of 300 differentially expressed miRNA was identified in 375 HCC samples and 50 paracancerous samples by differential miRNA analysis. Totally 1 106 differentially expressed mRNA was identified in differential mRNA analysis on 374 HCC samples and 50 paracancerous samples. Twenty miRNA with the most significant differential expression was selected from the up-regulated and down-regulated miRNA for target gene prediction. Functional enrichment analysis indicated that 131 candidate genes were mainly related to the regulation of valine, leucine and isoleucine degradation, carbon metabolism and prolactin signaling pathway. **Conclusion** The abnormally expressed miRNA-mRNA pathway in HCC may become a new biomarker for the diagnosis and provide the basis for diagnosis and clinical treatment.

【**Key words**】 hepatocellular carcinoma; microRNA; target genes
This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81773488) *and the Natural Science*

收稿日期:2022-07-15;**接受日期**:2022-09-28
基金项目:国家自然科学基金面上项目(81773488));陕西省自然科学基金青年项目(2021 JQ-341)
通信作者:张维璐,E-mail:zhangweilu@126.com

Foundation for Young Scholars of Shaanxi Province (2021JQ-341).
Corresponding author: *Zhang Weilu*, *E-mail*: *zhangweilu@126.com*

原发性肝癌是 2020 年全球第六大常见癌症[1]。其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌类型之一,占原发性肝癌病例的 75%~85%[1]。我国是原发性肝癌的高发地区,全世界近一半的肝癌新发病例(41.0 万/90.6 万)和死亡病例(39.1 万/83.0 万)发生在中国[1,2]。HCC 早期症状不明显,不易被发现。许多 HCC 患者在确诊时已进入中晚期,错过了最佳治疗时机。因此,探索准确的 HCC 诊断方法具有重要的临床意义。

目前,肝癌的诊断主要依靠影像学检查、活检和血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)[3,4]。但是,它们具有一定局限性。近年来,微小核糖核酸(microRNA, miRNA)在肿瘤疾病中得到了广泛的研究,它可以引起细胞过程的重大改变,如细胞增殖、迁移和凋亡[5]。因此,本研究通过癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)在线数据库研究 HCC 相关 miRNA 及其潜在的作用机制,旨在通过筛选及鉴定肝细胞癌的关键基因和通路,为肝细胞癌的诊断和治疗提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

在 TCGA 数据库(https://portal.gdc.cancer.gov/)中分别下载肝细胞癌和非肝细胞癌的 miRNA、mRNA 表达数据及其临床数据。

1.2 差异表达 miRNA 与差异表达 mRNA

通过 Perl 语言和 R 包“limma”进行数据提取,通过 R 包“limma”进一步筛选差异表达的 miRNA 与 mRNA 并绘制火山图。设置|logFoldChange|≥1,校正后 $P<0.05$。

1.3 差异表达 miRNA 下游靶基因的预测

通过 miRDB、TargetScan 这 2 个生物信息学网站预测每个 miRNA 的下游 mRNA。结果以 2 个数据库均能预测到的 mRNA 为靶基因。

1.4 差异表达 miRNA 上游的潜在转录因子

采用 FunRich 软件预测 HCC 差异表达 miRNA 中的潜在转录因子。分别输入上调和下调的差异表达 miRNA,获得前 10 个最显著的预测转录因子。

1.5 HCC 候选基因的筛选

对 miRNA 预测的靶基因和 TCGA 数据库差异表达基因进行筛选,鉴定出共同的 mRNA 为候选 mRNA。

1.6 功能注释和通路富集分析

基因本体(gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析由 Bioconductor 中的 clusterProfiler 包进行,设置 $P<0.05$。

1.7 蛋白质-蛋白质相互作用网络的建立与分析

为了进一步了解候选基因表达的蛋白之间的关系,采用 STRING(11.5)数据库(http://string-db.org),建立蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。并由 Cytoscape 3.9.1 可视化,筛选出 PPI 网络中前 20 个基因为枢纽基因。

1.8 候选靶基因的表达和生存分析

将下载的临床数据通过使用 R 包“limma”“beeswarm”“survival”来分析并绘制 20 个枢纽基因在 HCC 中的表达水平和生存曲线。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 差异表达 miRNA

对 TCGA 数据集的 375 例 HCC 样本、50 例癌旁样本进行差异 miRNA 分析,共鉴定出 300 个差异表达的 miRNA(differentially expressed miRNA, DE-miRNA),其中包括 260 个上调的 miRNA,40 个下调的 miRNA,详见图 1。分别在上调的和下调的 miRNA 中选择 20 个差异表达最显著的 miRNA 作为候选 miRNA 进一步分析,详见表 1。

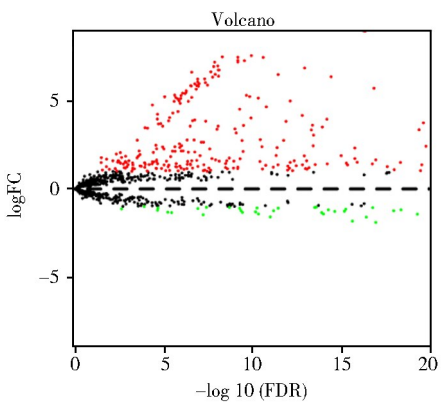


图 1 HCC 组与对照组差异表达 miRNAs 的火山图

Figure 1 Volcano map of differentially expressed miRNA in HCC group and control group

Up-regulated miRNA is indicated by the red dots in the volcano map, and the down-regulated miRNA by the green dots

HCC: hepatocellular carcinoma; FDR: false discovery rate; FC: fold change.

表1 差异表达的候选miRNA

Table 1 Differentially expressed candidate miRNA

UpregulatedmiRNA	Downregulated miRNA
hsa-miR-767-5p	hsa-miR-1258
hsa-miR-105-5p	hsa-miR-490-3p
hsa-miR-512-3p	hsa-miR-424-5p
hsa-miR-520f-3p	hsa-miR-139-3p
hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-1248
hsa-miR-3923	hsa-miR-144-3p
hsa-miR-519a-5p	hsa-miR-33b-5p
hsa-miR-372-3p	hsa-miR-369-5p
hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-376a-2-5p
hsa-miR-520b-3p	hsa-miR-139-5p
hsa-miR-518f-5p	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-214-3p
hsa-miR-520g-3p	hsa-miR-424-3p
hsa-miR-4652-5p	hsa-let-7c-3p
hsa-miR-520h	hsa-miR-337-5p
hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-33b-3p
hsa-miR-516b-5p	hsa-miR-5589-5p
hsa-miR-517-5p	hsa-miR-199b-3p
hsa-miR-518b	hsa-miR-199a-3p
hsa-miR-1269b	hsa-miR-326

2.2 差异表达miRNA下游靶基因的预测

通过miRDB、TargetScan数据库预测了40个候选miRNA的靶基因，分别获得4 032和5 936个靶基因。有8个miRNA的靶基因没有同时被2个靶基因数据库预测，故排除。

2.3 差异表达miRNA上游的潜在转录因子

分别对候选miRNA上游的潜在转录因子进行预测，获得差异较明显的前10个转录因子。12个上调候选miRNA前10个转录因子分别是SP4、FOXJ2、NKX6-1、NKX2-1、POU3F2、FOXA1、FOXO1、EGR1、SP1、POU2F1（图2A）；20个下调候选miRNA前10个转录因子分别是MEF2A、SOX1、YY1、NFIC、NKX6-1、POU2F1、FOXA1、SP4、EGR1、SP1（图2B）。

2.4 差异表达基因的筛选

对TCGA数据集的374例HCC样本、50例癌旁样本进行差异mRNA分析，共鉴定出1 106个差异表达的mRNA（differentially expressed mRNA，DE-mRNA），其中包括268个上调的mRNA，837个下调的mRNA（图3）。我们将预测的miRNA靶基因和DE-mRNA之间的重叠基因确定为候选mRNA，即：上调的DE-miRNA靶基因和下调的mRNA取交集，下调的DE-miRNA靶基因和上调的mRNA取交集，分别得到91及40个目标基因（图4）。

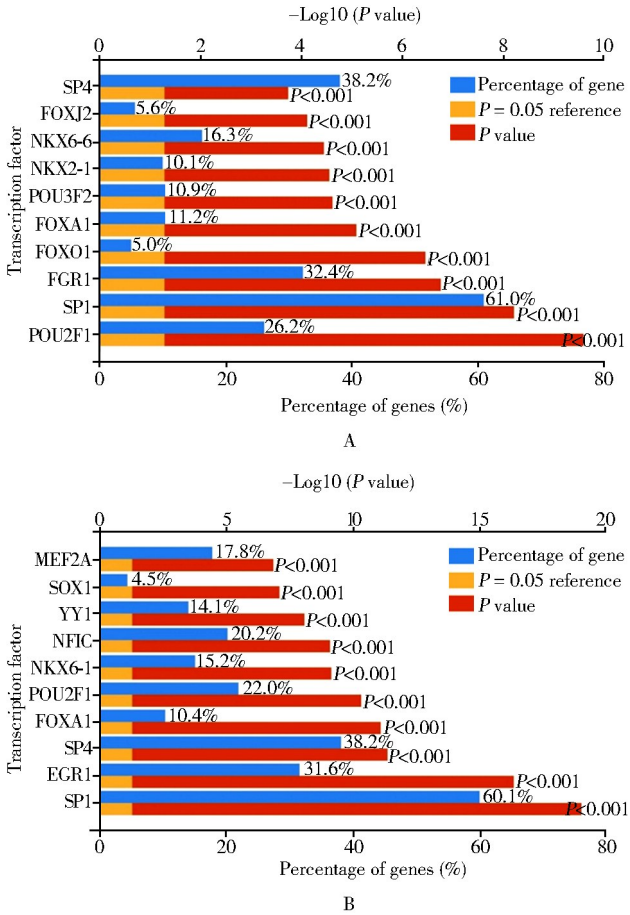


图2 候选miRNA上游转录因子

Figure 2 Candidate miRNA upstream transcription factors

A: up-regulated 12 transcription factors differentially expressing miRNA; B: down-regulated 20 transcription factors differentially expressing miRNA.

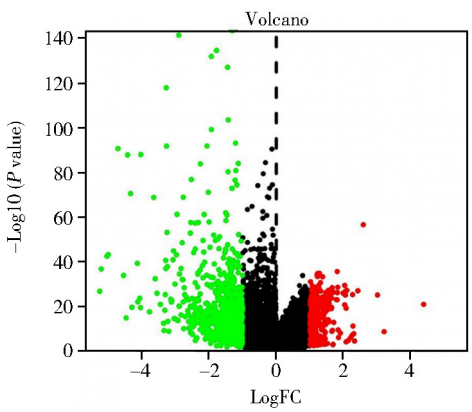


图3 基于TCGA数据的HCC差异表达基因火山图

Figure 3 Volcano map of differentially expressed genes in HCC based on TCGA data

Up-regulated mRNA is indicated by the red dots in the volcano map, and the down-regulated miRNA by the green dots.

TCGA: the cancer genome atlas; HCC: hepatocellular carcinoma; FC: fold change.

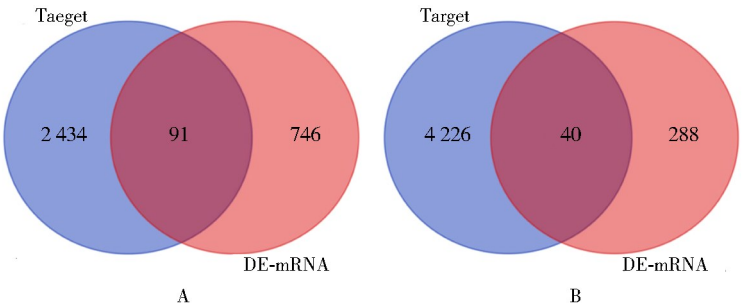


图 4 DE-miRNA 靶基因和 DE-mRNA 交叉点的韦恩图

Figure 4 Venn diagram of the crossing point of DE-miRNA target gene and DE-mRNA

A: intersection of up-regulated DE-miRNA target gene and down-regulated mRNA; B: intersection of down-regulated DE-miRNA target gene and up-regulated mRNA. DE-mRNA: differentially expressed mRNA.

2.5 GO 注释和信号通路富集分析

为了评估 131 个目标基因潜在的生物学功能，进行 GO 功能注释和 KEGG 途径富集分析。由此来了解所预测目标的系统特征和生物学意义。基因本体生物学过程包括生物过程（biological process，BP）、细胞成分（cellular component，CC）和分子功能（molecular function，MF），前 5 个高度浓缩的 GO 术语如图 5A 所示，生物过程揭示目标基因在血管运输、跨上皮运输、受体再循环等方面显著富集；细胞成分分析主要富集于刷状缘、早期内体、含胶原的细胞外基质；分子功能表明目标基因在细胞外基质结合、氧化还原酶活性、层粘连蛋白结合等方面较为丰富。

前 10 个 KEGG 途径主要富集于碳代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、催乳素信号通路、细胞外基质（extracellular matrix，ECM）受体相互作用等通路。靶基因的前 10 种富集 KEGG 途径分别如图 5B 所示。

2.6 PPI 网络的建立与分析

将候选目标基因进行蛋白质-蛋白质相互作用分析，最终获得了 131 个靶基因节点的 PPI 网络。对 PPI 网络中排名前 20 个枢纽基因进行预测，详见表 2。为了更好地可视化，采用 cytoscape 构建了一个 hub 基因网络，来描述候选基因之间的联系，详见图 6。

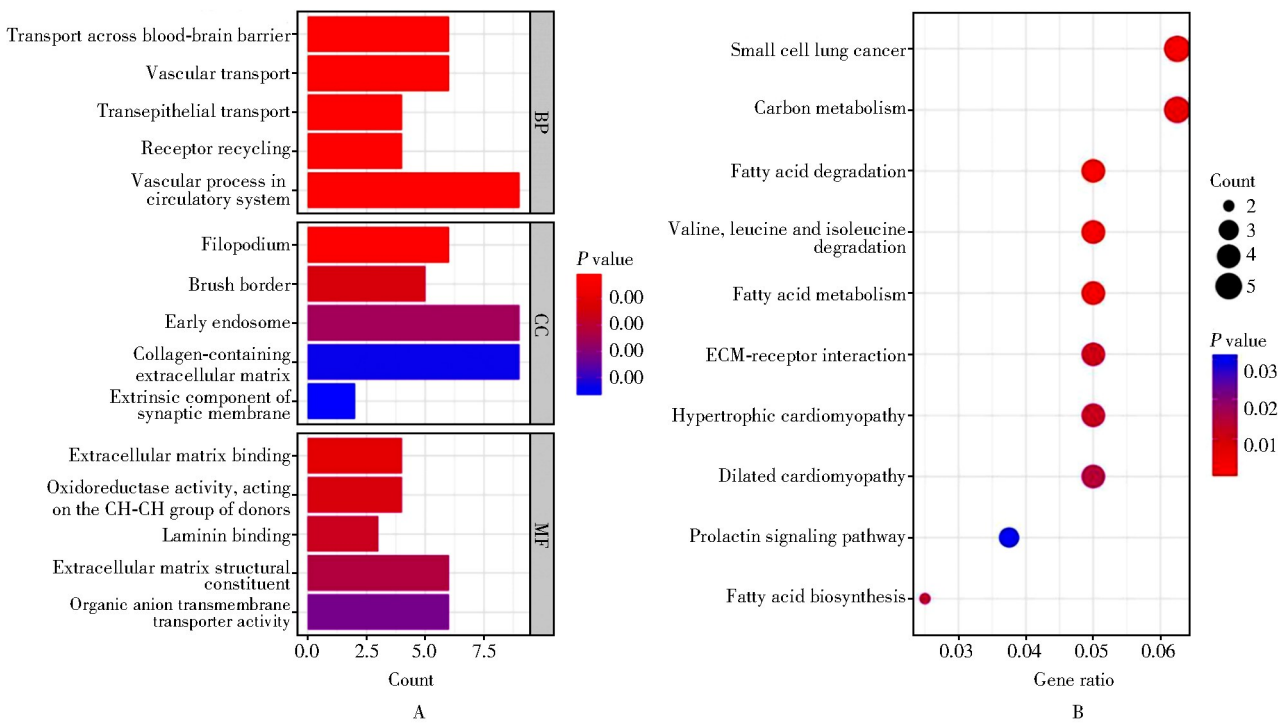


图 5 候选基因的 GO 功能注释和 KEGG 富集

Figure 5 Gene ontology and KEGG enrichment of candidate genes

A: gene ontology; B: KEGG pathway enrichment analysis. GO: gene ontology; KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes; BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.

表 2 PPI 网络中鉴定的 Hub 基因

Table 2 Hub genes identified in PPI networks

Upregulated DE-miRNA		Downregulated DE-miRNAs	
Gene symbol	Degree	Gene symbol	Degree
FASN	36	*ESR1*	47
CCNE1	30	*CD4*	36
G6PD	29	*EGR1*	34
TOP2A	27	*KLF4*	34
COL4A1	27	*SLC2A2*	32
PLK1	26	*ABCG2*	28
ITGA6	24	*EPHA2*	25
DKK1	23	*RND3*	23
MKI67	23	*DUSP1*	22
KPNA2	22	*TRIB1*	22

PPI: protein-protein interaction; DE-mRNA: differentially expressed mRNA.

2.7 潜在基因的鉴定

随后,为了进一步验证这 20 个枢纽基因,通过 TCGA 数据库分析它们在 HCC 中的表达水平和预后作用。HCC 组织中 10 个上调的 DE-miRNA 的枢纽基因的表达水平显著低于正常组织。HCC 组织中所有 10 个下调的 DE-miRNA 枢纽基因全部明显上调(图 7)。

在生存分析中,在 20 个枢纽基因中,只有 3 个下调的 DE-mRNA 和 6 个上调的 DE-mRNA 的表达与患者的整体生存显著相关,可能是介导肝细胞癌进展和导致不良预后的关键基因。这些 mRNA 被鉴定为最终候选的差异表达 mRNA。其他 11 种差异表达 mRNA 的表达量与 HCC 病患者的预后没有显著相关性(图 8)。

2.8 HCC 中几种潜在的 miRNA-mRNA 调控途径的鉴定

通过确定 miRNA 和靶基因,我们建立了一个潜在的 miRNA-mRNA 调控网络:*miR*-105-5*p*-*CD4* 途径、*miR*-512-3*p*-*SLC2A2* 途径、*Let*-7*c*-3*p*-*PLK1* 途径、*miR*-144-3*p*-*TOP2A*/*KPNA2* 途径、*miR*-520*f*-3*p*-*ESR1* 途径、*miR*-517-5*p*-*ESR1* 途径、*miR*-424-5*p*-*CCNE1*/G6PD 途径和 *miR*-33*b*-3*p*-*MKI67* 途径,详见图 9。

3 讨 论

近年来 HCC 因死亡率高,预后不良受到广泛关注,随着肝细胞癌相关研究的开展,对其疾病发展的认识取得了重大进展,但其具体发生发病机制尚不明确。在之前的研究中,也有研究基于 TCGA 数据库中肝细胞癌数据集进行 miRNA-mRNA 网络分析。然而,miRNA 的筛选方式、靶基因的预测方法、靶基因的分析方法都不尽相同,同时,测序技术和生物信息学技术的发展为改进诊断方法和预防癌症提供了新途径[6]。

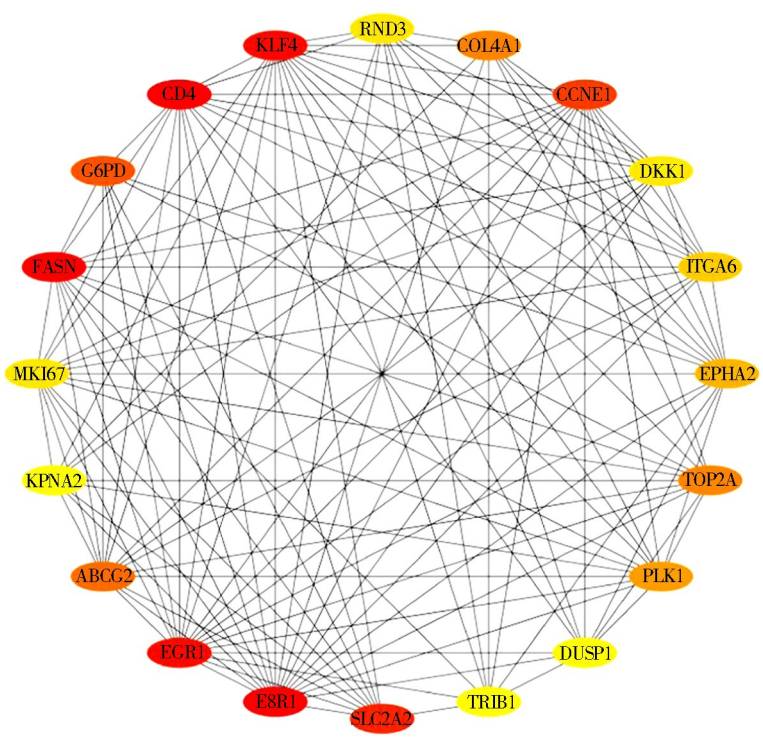


图 6 预测靶基因的蛋白质-蛋白质相互作用网络中的前 20 个中心基因

Figure 6 Top 20 center genes in protein-protein interaction network of predicted target genes

The deeper the red, the higher the score, the more significant the biostatistical significance.

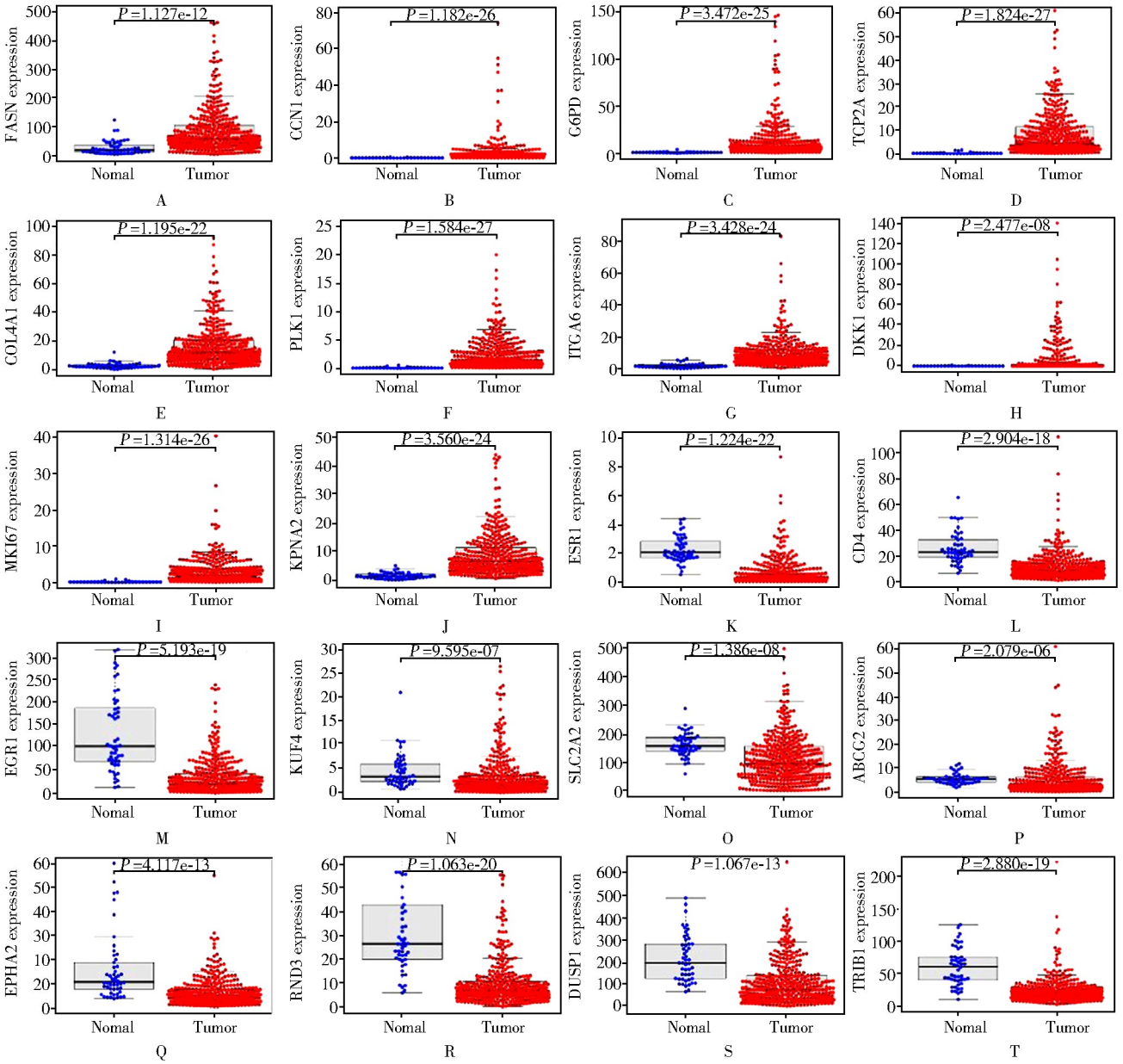


图 7　20 个枢纽基因在 TCGA 数据库肝细胞癌中的表达水平

Figure 7　Expression level of 20 pivotal genes in hepatocellular carcinoma of TCGA database

TCGA: the cancer genome atlas.

因此,本研究基于 TCGA 数据库,鉴定了 HCC 样本与癌旁组织样本之间差异表达的 miRNA,关注上调与下调 miRNA 中差异最显著的前 20 个 miRNA,试图寻找出与 HCC 疾病相关的更有价值的 miRNA。通过对候选 miRNA 靶基因的预测以及 TCGA 数据库 HCC 样本与癌旁组织样本之间 DE-mRNA 的鉴定,最终确定了 8 个 miRNA,9 个 mRNA 作为潜在 miRNA 和 mRNA,并绘制了 miRNA-mRNA 调控网络。

这些 miRNA 中有许多是已被广泛研究的 HCC 相关 miRNA。*miR*-512-3*p* 部分介导了缺氧的促瘤效应,通过靶向 *LATS*2 和抑制 Hippo/yes 相关蛋白 1 通路促进 HCC 细胞增殖[7]。*miR*-105-5*p* 诱导了 *PES*1 在 C3A-ICSC 中的表达,从而促进肝癌细胞增殖[8]。*miR*-424-5*p* 在 HCC 细胞中下调,通过靶向 *E2F*7 调节细胞周期,进而抑制 HCC 细胞的增殖[9]。Li 等[10]通过荧光素酶报告基因分析和染色实验发现 *miR*-144-3*p* 介导 *EIF*4*G*2 表达失调,通过 *ERK* 途径促进肝细胞癌的发展。*miR-let*-7*c* 抑制 *Bach*1 表达以刺激丙型肝炎病毒复制子和感染系统中 HO-1 的表达[11]。*miR*-33*b* 在肝细胞癌组织和细胞系中下调,*miR*-33*b* 的过表达显著抑制 HCC 肿瘤细胞增殖和细胞迁移[12]。

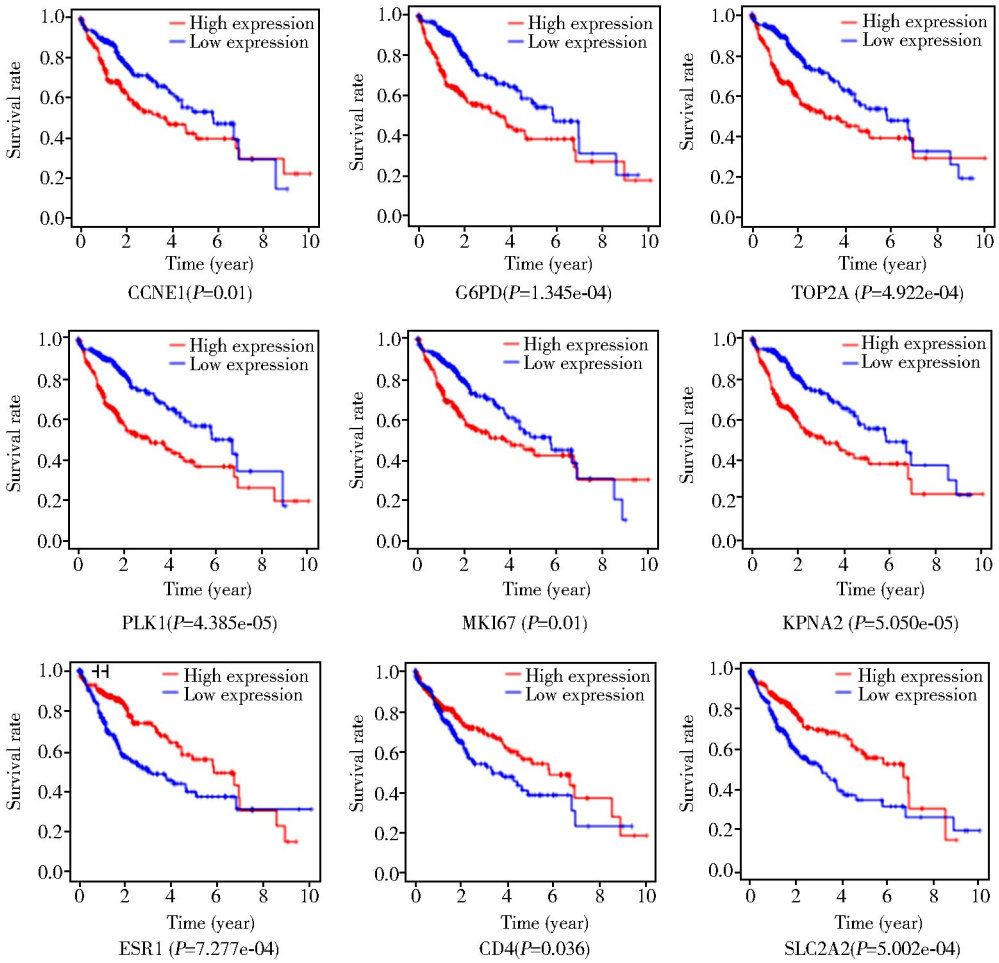


图 8 枢纽基因在 TCGA 数据库肝细胞癌中的生存曲线

Figure 8 Survival curve of hinge genes in hepatocellular carcinoma of TCGA database

TCGA: the cancer genome atlas.

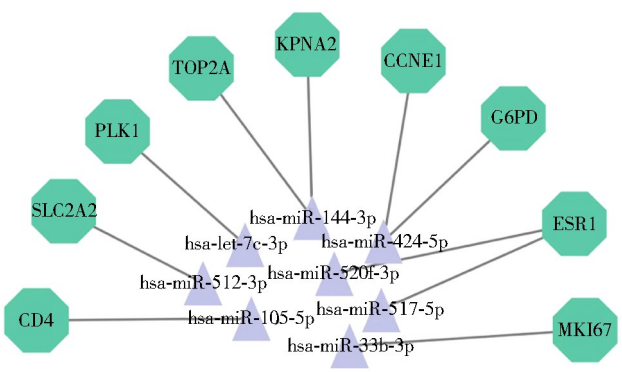


图 9 潜在的 miRNA-mRNA 调控网络

Figure 9 Potential miRNA-mRNA regulatory network

miR-520*f*-3*p* 与 *miR*-517-5*p* 在 HCC 中的研究较少,但它们的特异表达与其他肿瘤密切相关。例如:*miR*-520*f*-3*p* 通过抑制 *SOX*9 的表达,从而阻断 Wnt/β-连环蛋白信号,损害胃癌细胞的生长、增殖和存活[13]。*miR*-520*f*-3*p* 在胶质瘤组织中的表达高于正常脑组织[14]。这些研究表明 *miR*-520*f*-3*p* 与 *miR*-517-5*p* 的异常表达有可能也与 HCC 有关,需要在 HCC 样本中进一步验证。

随后,对 mRNA 数据进行了差异表达分析。最终确定了 91 个下调的候选 mRNA 和 40 个上调的候选 mRNA。通过 GO 和 KEGG 分析,进一步分析了 DE-mRNA 参与的途径和功能。在之前的研究中,一些通路已经被证明与癌症有关。如支链氨基酸是一组必需氨基酸,包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。血浆支链氨基酸与芳香族氨基酸的低比率是肝硬化的生理标志[15]。有证据表明,一碳代谢中涉及的营养素缺乏会导致免疫反应受损,并且免疫缺陷是已知的 HCC 危险因素[16]。也有研究提示雌激素反应性垂体激素催乳素通过在转运体水平抑制 *c-Myc* 的激活来抑制肿瘤促进的肝脏炎症[17]。这些不同的途径均可能是肝细胞癌的潜在作用机制。

接下来通过表达分析和生存分析进一步对这 PPI 网络所鉴定的 20 个基因进行筛选,结果显示 *ESR*1、*CD*4、*CCNE*1 等 9 个基因具有统计学意义,其在肝细胞癌中起关键作用。例如:*ESR*1 编码雌激素受体,研究表明肝脏是激素敏感器官,因此受性腺激

素如雌激素的影响[18]。有证据表明雌激素在肝脏中既有致癌作用又有保护作用[19,20]。CD4 细胞是人体免疫系统中的一种重要免疫细胞,CD4 调节性 T 细胞被认为有助于慢性乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染期间的免疫反应受损[21]。Xu 等[22]发现 *SCUBE*3 可能通过调节 *CCNE*1 的表达来促进 HCC 细胞的增殖。在 HepG2 细胞、HepG215 细胞和肝癌患者中,*SLC*2*A*2 的表达水平下调[23]。*G6PD* 是戊糖磷酸途径的限速酶,*G6PD* 的过度表达增加了脂质积累,促进了肿瘤细胞增殖[24]。

尽管本研究成功构建了一个在 HCC 疾病进程中的潜在 miRNA-mRNA 调控网络。但仍存在一些局限性:miRNA 及靶基因都由数据库挖掘分析,进一步的实验研究是必要的;选取 TCGA 数据集中对照组样本量较小,应扩大对照组的样本量,减小误差。

综上,本研究针对这 8 个 miRNA 和 9 个枢纽基因,构建了一个 miRNA-mRNA 调控网络。发现 *miR*-105-5*p*、*miR*-512-3*p*、*Let*-7*c*-3*p*、*miR*-144-3*p*、*miR*-520*f*-3*p*、*miR*-517-5*p*、*miR*-424-5*p* 和 *miR*-33*b*-3*p* 可能调节 9 个基因的表达。他们之间的线性调控网络为 HCC 发病机制提供了证据,有希望作为 HCC 的生物标志物,并可能为诊断和临床治疗提供依据。

【参考文献】

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *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. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读[J/OL]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14. DOI: 10.12151/JMCM.2021.02-01.
Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, *et al*. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020[J]. J Mult Cancer M, 2021, 7(2): 1-14. DOI: 10.12151/JMCM.2021.02-01.

[3] 丁惠国, 屠红, 曲春枫, 等. 原发性肝癌的分层筛查与监测指南(2020 版)[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(2): 83-99. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20201109-00970.
Ding HG, Tu H, Qu CF, *et al*. Guideline for stratified screening and surveillance of primary liver cancer (2020 Edition)[J]. Chin J Oncol, 2021, 28(2): 83-99. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20201109-00970.

[4] Jia P, Mao Y, Liu K, *et al*. The value of color Doppler ultrasound and CT combined with serum AFP examination in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. J Healthc Eng, 2022, 2022: 4147753. DOI: 10.1155/2022/4147753.

[5] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 199-227. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222.

[6] Tomczak K, Czerwinska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2015, 19(1a): A68-A77. DOI: 10.5114/wo.2014.47136.

[7] Zhang B, Huang L, Tu J, *et al*. Hypoxia-induced placenta-specific microRNA (miR-512-3p) promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting large tumor suppressor kinase 2[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 6073-6083. DOI: 10.2147/ott.S254612.

[8] Wei S, Liu K, He Q, *et al*. PES1 is regulated by CD44 in liver cancer stem cells *via* miR-105-5p[J]. FEBS Lett, 2019, 593(14): 1777-1786. DOI: 10.1002/1873-3468.13459.

[9] Zhao Y, Zhu C, Chang Q, *et al*. MiR-424-5p regulates cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F7[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242179. DOI: 10.1371/journal.pone.0242179.

[10] Li S, Shao J, Lou G, *et al*. MiR-144-3p-mediated dysregulation of EIF4G2 contributes to the development of hepatocellular carcinoma through the ERK pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 53. DOI: 10.1186/s13046-021-01853-6.

[11] Chen WC, Wei CK, Lee JC. MicroRNA-let-7c suppresses hepatitis C virus replication by targeting Bach1 for induction of haemoxygenase-1 expression[J]. J Viral Hepat, 2019, 26(6): 655-665. DOI: 10.1111/jvh.13072.

[12] Wang H, Lin X, Liu E, *et al*. MicroRNA-33b regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation, apoptosis, and mobility *via* targeting Fli-1-mediated Notch1 pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(10): 7635-7644. DOI: 10.1002/jcp.29673.

[13] Chen JQ, Huang ZP, Li HF, *et al*. MicroRNA-520f-3p inhibits proliferation of gastric cancer cells *via* targeting SOX9 and thereby inactivating Wnt signaling[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6197. DOI: 10.1038/s41598-020-63279-y.

[14] 李霞, 任玉嫄, 姜忠彩, 等. 胶质瘤组织和胶质瘤干细胞 miR-520f-3p 表达及临床意义[J]. 山东医药, 2020, 60(4): 48-52. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2020.04.012.
Li X, Ren YY, Jiang ZC, *et al*. Expression and clinical significance of miR-520f-3p in glioma tissues and glioma stem cells[J]. Shandong Med J, 2020, 60(4): 48-52. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2020.04.012.

[15] Kawaguchi T, Izumi N, Charlton MR, *et al*. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease[J]. Hepatology, 2011, 54(3): 1063-1070. DOI: 10.1002/hep.24412.

[16] Zhang H, Liu C, Han YC, *et al*. Genetic variations in the one-carbon metabolism pathway genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma risk: a case-control study[J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 997-1002. DOI: 10.1007/s13277-014-2725-z.

[17] Hartwell HJ, Petrosky KY, Fox JG, *et al*. Prolactin prevents hepatocellular carcinoma by restricting innate immune activation of c-Myc in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(31): 11455-11460. DOI: 10.1073/pnas.1404267111.

[18] Wang AG, Lee KY, Kim SY, *et al*. The expression of estrogen receptors in hepatocellular carcinoma in Korean patients[J]. Yonsei Med J, 2006, 47(6): 811-816. DOI: 10.3349/ymj.2006.47.6.811.

[19] Farinati F, Cardin R, Bortolami M, *et al*. Estrogens receptors and oxidative damage in the liver[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 193(1-2): 85-88. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00100-4.

[20] De MN, Manno M, Villa E. Sex hormones and liver cancer[J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 193(1-2): 59-63. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00096-5.

[21] Granito A, Muratori L, Lalanne C, *et al*. Hepatocellular carcinoma in viral and autoimmune liver diseases: role of $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ regulatory T cells in the immune microenvironment[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(22): 2994-3009. DOI: 10.3748/wjg.v27.i22.2994.

[22] Xu P, Luo A, Xiong C, *et al*. SCUBE3 downregulation modulates hepatocellular carcinoma by inhibiting CCNE1 *via* TGFβ/PI3K/AKT/GSK3β pathway[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 1. DOI: 10.1186/s12935-021-02402-z.

[23] Peng Q, Hao LY, Guo YL, *et al*. Solute carrier family 2 members 1 and 2 as prognostic biomarkers in hepatocellular carcinoma asso ciated with immune infiltration[J]. World J Clin Cases, 2022, 10(13): 3989-4019. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i13.3989.

[24] Wang A, Chen B, Jian S, *et al*. miR-206-G6PD axis regulates lipogenesis and cell growth in hepatocellular carcinoma cell[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(5): 508-516. DOI: 10.1097/cad.0000000000001069.

(编辑: 温玲玲)