

芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对肝癌细胞 HCCLM3 生长和侵袭的影响

章 涵, 赵玉霞, 杨惠然, 董 雪

(河南省信阳职业技术学院, 信阳职业技术学院附属医院, 河南 信阳 464000)

摘要:目的 研究芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对肝癌细胞 HCCLM3 生长和侵袭的影响和机制。方法 RT-qPCR 检测各种肝癌细胞中 miR-4326 表达变化; MTT 检测芒柄花黄素对 HCCLM3 细胞增殖影响; 在 HCCLM3 细胞中转染 miR-4326 抑制物, 并给予芒柄花黄素处理, MTT 检测细胞增殖, Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移, Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、 β -catenin、c-Myc 蛋白表达; 用 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂处理转染 miR-4326 抑制物后的 HCCLM3 细胞, 检测细胞增殖、迁移、侵袭变化。结果 miR-4326 在 HCCLM3 肝癌细胞中表达较高; 芒柄花黄素处理后的 HCCLM3 细胞增殖能力降低; 转染 miR-4326 抑制物和芒柄花黄素处理能够协同抑制肝癌细胞增殖、侵袭和迁移, 提高细胞中 E-cadherin 蛋白表达, 降低细胞中 Vimentin、 β -catenin、c-Myc 蛋白表达; Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂可以逆转芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用。结论 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 抑制肝癌细胞 HCCLM3 生长和侵袭, 作用机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。

关键词: 芒柄花黄素; HCCLM3 肝癌细胞; miR-4326; Wnt/ β -catenin; 侵袭

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)05-1636-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.049

肝癌已经成为世界范围内影响人类生命健康的恶性肿瘤之一, 其发展速度快、恶性程度高, 很多肝癌患者在确诊时已经发生了远端转移, 手术切除、放疗等是目前肝癌治疗的常见手段, 这些技术手段虽然已经取得了明显的成效, 但远远不能满足需求^[1]。近些年来, 随着人们对肿瘤分子发生机制的不断研究发现, 基因靶向治疗具有准确性高、副作用小等特点, 已经成为肿瘤研究中的热点^[2]。中草药提取物来源广泛、不良反应较小, 也是抗肿瘤中的研究重点, 芒柄花黄素是从豆科植物红色车轴草中提取的一种雌激素, 有抗炎、降血压等功效^[3]。芒柄花黄素具有抗肿瘤作用, 其可以降低膀胱癌、卵巢癌等肿瘤细胞恶性生长能力^[4-5]。miRNA 在人体内有多种生物学作用, 广泛参与细胞生长、运动、代谢等过程^[6], 还与肿瘤的关系密切, 可能是肿瘤治疗的分子靶点^[7]。既往的研究表明, miR-4326 在肺癌进展中发挥促进作用, 下调其表达可以抑制肺癌细胞的侵袭和迁移能力^[8]。现阶段对于 miR-4326 和芒柄花黄素在肝癌进展中的作用尚不明确, 本实验探讨下调 miR-4326 联合芒柄花黄素干预对肝癌细胞生长、侵袭和迁移的影响和机制, 为提高肝癌患者生存时间的用药提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞 肝癌细胞 HuH-7、SNU-449、HCCLM3 购自上海赛默飞生物科技有限公司; 正常肝细胞 HL7702 购自北

京晶莱华科生物技术有限公司。

1.2 试剂与药物 芒柄花黄素对照品(纯度>98%, 批号 MB1978)购自大连美仑生物技术有限公司。E-cadherin 抗体购自武汉艾美捷科技有限公司; β -catenin 抗体、c-Myc 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; miR-4326 抑制物、抑制物阴性对照购自苏州吉玛基因股份有限公司; Vimentin 抗体购自上海研晶生物技术有限公司; miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

2 方法

2.1 RT-qPCR 检测肝癌细胞中 miR-4326 表达 用 Trizol 试剂提取肝癌细胞 HuH-7、SNU-449、HCCLM3 和正常肝细胞 HL7702 中总 RNA, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间。根据 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 逆转录反应体系为 0.5 μ L Quant RTase、2 μ L RT primer、1 μ L Super pure dNTPs、2 μ L Poly (A) 反应溶液、1 μ L RNasin、2 μ L RT Buffer, 用 RNase-free ddH₂O 补充至总体积为 20 μ L, 充分混合以后, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育结合 60 min, 将合成的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存。取 cDNA, 放在冰上配制 PCR 反应体系, 1 μ L cDNA、10 μ L miRcure miRNA premix、0.4 μ L 正向引物、0.4 μ L 反向引物, 用 RNase-free ddH₂O 补充至总体积为 20 μ L, 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-4326 表达, 内参为 U6。引物序列为 miR-4326 正向 5'-

收稿日期: 2020-08-14

作者简介: 章 涵(1978—), 男, 硕士, 副教授, 副主任医师, 研究方向为中医教学临床科研。Tel: 13673070008, E-mail: qst650@163.com

GCCCGCTGTTCTCTGTCTCCC-3', 反向 5'-GTGCAGGGTCC GAGGT-3'。

2.2 MTT法检测细胞增殖 将 HCCLM3 细胞密度调整为 $4 \times 10^5/\text{mL}$, 吸取 100 μL 细胞悬液接种到 96 孔板, 在细胞中加入含浓度为 0、15、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素的细胞培养液, 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内继续培养 24 h, 加入 10 μL MTT 溶液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中反应 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 反应 10 min, 采用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值 (A), 以 A 值表示细胞增殖能力。

2.3 细胞分组及处理 HCCLM3 细胞分成对照组 (不作处理)、anti-miR-NC 组 (转染抑制物阴性对照)、anti-miR-4326 组 (转染 miR-4326 抑制物)、anti-miR-NC+芒柄花黄素组 (转染抑制物阴性对照+30 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素)、anti-miR-4326+芒柄花黄素组 (转染 miR-4326 抑制物+30 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素)。对照组、anti-miR-NC 组、anti-miR-4326 组细胞培养 24 h 后, RT-qPCR 法检测 miR-4326 表达; 对照组、anti-miR-NC 组、anti-miR-4326 组、anti-miR-NC+芒柄花黄素组、anti-miR-4326+芒柄花黄素组细胞培养 24 h 后, MTT 法检测细胞增殖。转染试剂为 Lipofectamine 2000, 按照转染试剂操作说明进行转染。

2.4 Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移 各组细胞分别悬浮在不含胎牛血清的细胞培养液内, 细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。侵袭实验前在 Transwell 小室内加入 Matrigel 将小室湿化 2 h, 接着取 200 μL 上述细胞悬液至 Transwell 小室的上室, 同时在下室内加入 500 μL 含胎牛血清的细胞培养液, 放在培养箱内继续培养 24 h 后, 取出小室, 用棉签将没有穿膜的细胞擦掉, 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 在显微镜下观察细胞穿膜数目, 随机选择 6 个视野, 计数分析。

2.5 Western blot 检测细胞中 E-cadherin、Vimentin、 β -catenin、c-Myc 蛋白表达 收集培养 24 h 的各组细胞, 预冷的 PBS 溶液重复洗涤细胞 2 次, 加入细胞裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 12 000 $\times g$ 离心 20 min, 吸取上清, 即为总蛋白, 蛋白定量后和上样缓冲液均匀混合, 煮沸 5 min 进行变性, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。常规方法分别制备 10% 分离胶、5% 浓缩胶, 吸取蛋白样品加入到上样孔内, 每孔 30 μg 蛋白样品, 设置电压 80 V、100 V, 半干式方法进行转膜, 设置 2.5 mA/cm^2 恒定电流冰浴转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 置于一抗溶液 (E-cadherin、Vimentin、c-Myc 均以 1:1 000 稀释) 中结合反应 2 h, 然后放在二抗溶液 (1:4 000 稀释) 中结合反应 2 h, ECL 显色试剂盒显色, 用 Image J 软件分析条带 A 值, GAPDH 为内参蛋白, 计算蛋白的相对表达。

2.6 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂对 HCCLM3 细胞增殖、迁移、侵袭影响 取转染 miR-4326 抑制物后的 HCCLM3 细胞, 用含有 30 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素和 30 mmol/L Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂 LiCl 的细胞培养液培养, 命名为

anti-miR-4326+芒柄花黄素+LiCl 组。以 anti-miR-4326+芒柄花黄素组为参照, MTT 检测细胞增殖, Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移, Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、 β -catenin、c-Myc 蛋白表达。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 miR-4326 在肝癌细胞中表达上调 如表 1 所示, 肝癌细胞 HuH-7、SNU-449、HCCLM3 中 miR-4326 表达高于正常肝细胞 HL7702 ($P < 0.05$)。本研究选择 miR-4326 相对表达最高的肝癌细胞 HCCLM3 进行后续实验。

表 1 miR-4326 在肝癌细胞 HuH-7、SNU-449、HCCLM3 和正常肝细胞 HL7702 中的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

细胞	miR-4326
HL7702	1.00 $\pm$ 0.11
HuH-7	1.56 $\pm$ 0.13 [*]
SNU-449	1.95 $\pm$ 0.17 [*]
HCCLM3	2.36 $\pm$ 0.20 ^{*#}

注: 与 HL7702 比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 HuH-7 或 SNU-449 比较, [#] $P < 0.05$ 。

3.2 芒柄花黄素对 HCCLM3 细胞增殖的影响 如表 2 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素) 比较, 芒柄花黄素干预后, HCCLM3 细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$), 30 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素干预后, 肝癌细胞存活率接近 50%, 选用 30 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素进行后续实验。

表 2 芒柄花黄素处理后 HCCLM3 细胞增殖活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

芒柄花黄素浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	增殖活性
0	0.68 $\pm$ 0.05
15	0.49 $\pm$ 0.03 [*]
30	0.33 $\pm$ 0.02 [*]
60	0.22 $\pm$ 0.02 [*]
120	0.17 $\pm$ 0.01 [*]

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3.3 miR-4326 抑制物对 HCCLM3 细胞中 miR-4326 表达的影响 如表 3 所示, 与 anti-miR-NC 组比较, 转染 miR-4326 抑制物后, HCCLM3 细胞中 miR-4326 表达降低 ($P < 0.05$)。提示, miR-4326 抑制物能下调 HCCLM3 细胞中 miR-4326 表达。

表 3 miR-4326 抑制物转染后 HCCLM3 细胞中 miR-4326 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

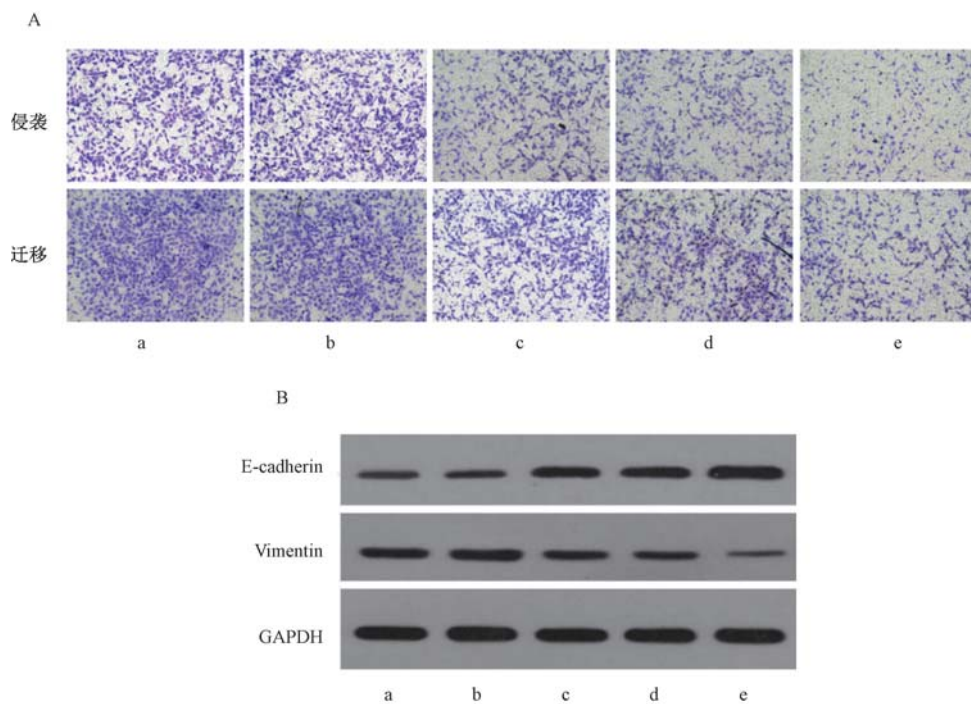
组别	miR-4326
对照组	1.00 $\pm$ 0.08
anti-miR-NC 组	0.99 $\pm$ 0.11
anti-miR-4326 组	0.45 $\pm$ 0.03 [*]

注: 与 anti-miR-NC 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3.4 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞增殖、侵袭和迁移的影响 如图 1、表 4 所示, 与 anti-miR-NC 组比较, 下调 miR-4326 或芒柄花黄素处理后, HCCLM3 细胞增殖活性、侵袭数目、迁移数目均降低 ($P < 0.05$), 细胞

中 E-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.05$), Vimentin 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与 anti-miR-4326 组或 anti-miR-NC+芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 能够协同降

低肝癌细胞增殖、迁移和侵袭能力 ($P<0.05$), 提高细胞中 E-cadherin 蛋白表达 ($P<0.05$), 降低细胞中 Vimentin 蛋白表达 ($P<0.05$)。



注: a~e 分别为对照组、anti-miR-NC 组、anti-miR-4326 组、anti-miR-NC+芒柄花黄素组、anti-miR-NC+芒柄花黄素组。

图 1 各组 HCCLM3 细胞侵袭、迁移能力 (A) 和 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达 (B)

表 4 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	增殖活性	侵袭数目/个	迁移数目/个	E-cadherin	Vimentin
对照组	0.70±0.07	115.36±10.25	138.64±12.56	0.23±0.02	0.67±0.06
anti-miR-NC 组	0.69±0.08	114.84±9.64	135.47±12.67	0.24±0.03	0.68±0.07
anti-miR-4326 组	0.39±0.05 [*]	82.02±7.63 [*]	99.42±8.89 [*]	0.68±0.07 [*]	0.35±0.06 [*]
anti-miR-NC+芒柄花黄素组	0.36±0.04 [*]	80.46±8.31 [*]	92.31±7.50 [*]	0.65±0.05 [*]	0.37±0.04 [*]
anti-miR-4326+芒柄花黄素组	0.22±0.02 ^{*#}	52.20±6.35 ^{*#}	75.11±5.82 ^{*#}	0.84±0.08 ^{*#}	0.25±0.03 ^{*#}

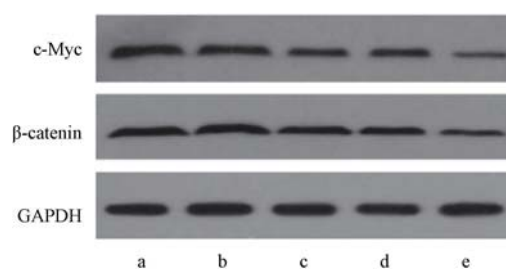
注: 与 anti-miR-NC 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 anti-miR-4326 组或 anti-miR-NC+芒柄花黄素组比较, [#] $P<0.05$ 。

3.5 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路激活的影响 如图 2、表 5 所示, 与 anti-miR-NC 组比较, 下调 miR-4326 或芒柄花黄素干预后, HCCLM3 细胞中 β -catenin、c-Myc 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与 anti-miR-4326 组或 anti-miR-NC+芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 能够协同降低 HCCLM3 细胞中 β -catenin、c-Myc 蛋白表达 ($P<0.05$)。提示, 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 能抑制 HCCLM3 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活。

表 5 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞 β -catenin、c-Myc 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	β -catenin	c-Myc
对照组	0.45±0.05	0.70±0.07
anti-miR-NC 组	0.44±0.06	0.71±0.08
anti-miR-4326 组	0.30±0.04 [*]	0.49±0.05 [*]
anti-miR-NC+芒柄花黄素组	0.31±0.02 [*]	0.46±0.06 [*]
anti-miR-4326+芒柄花黄素组	0.21±0.03 ^{*#}	0.22±0.04 ^{*#}

注: 与 anti-miR-NC 组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 anti-miR-4326 组或 anti-miR-NC+芒柄花黄素组比较, [#] $P<0.05$ 。



注: a~e 分别为对照组、anti-miR-NC 组、anti-miR-4326 组、anti-miR-NC+芒柄花黄素组、anti-miR-NC+芒柄花黄素组。

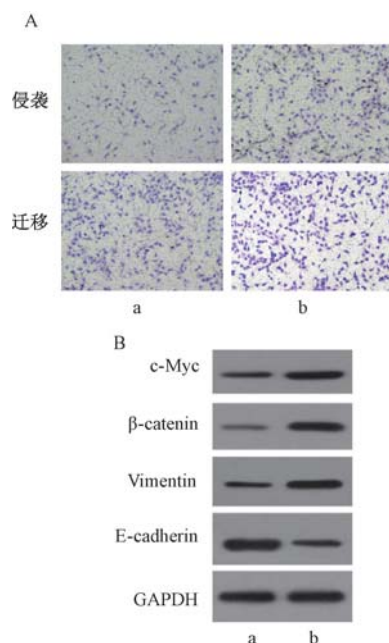
图 2 各组 HCCLM3 细胞中 β -catenin、c-Myc 蛋白表达

3.6 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂对 HCCLM3 细胞增殖、侵袭、迁移及相关蛋白的影响 如图 3、表 6 所示, 与未经 LiCl 处理的细胞比较, LiCl 处理提高了芒柄花黄素联合下调 miR-4326 处理的 HCCLM3 细胞增殖、侵袭和迁移能力 ($P<0.05$), 提高了细胞中 β -catenin、c-Myc、Vimentin 蛋白表达 ($P<0.05$), 降低了细胞中 E-cadherin 蛋白表达 ($P<0.05$)。

表 6 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂对 HCCLM3 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	增殖活性	侵袭数目/个	迁移数目/个	E-cadherin	Vimentin	β -catenin	c-Myc
anti-miR-4326+芒柄花黄素组	0.24 $\pm$ 0.03	58.61 $\pm$ 7.10	76.24 $\pm$ 6.20	0.89 $\pm$ 0.09	0.29 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.06
anti-miR-4326+芒柄花黄素+LiCl 组	0.35 $\pm$ 0.04*	79.62 $\pm$ 6.34*	90.54 $\pm$ 7.72*	0.26 $\pm$ 0.04*	0.87 $\pm$ 0.06*	0.56 $\pm$ 0.07*	0.69 $\pm$ 0.09*

注:与 anti-miR-4326+芒柄花黄素组比较, * $P<0.05$ 。



注: a 为 anti-miR-4326+芒柄花黄素组, b 为 anti-miR-4326+芒柄花黄素+LiCl 组。

图 3 各组 HCCLM3 细胞侵袭、迁移 (A) 和 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达 (B)

4 讨论

芒柄花黄素又名刺芒柄花素,是我国传统中药黄芪的主要活性成分之一,有调节免疫、改善炎症等作用^[9],还具有抗肿瘤作用,可以抑制宫颈癌、结直肠癌、胃癌等肿瘤细胞的恶性生长和转移^[10-12]。本实验结果显示,芒柄花黄素处理后,HCCLM3 肝癌细胞增殖能力降低,细胞侵袭和迁移能力降低,提示芒柄花黄素抑制 HCCLM3 细胞生长、侵袭和迁移。

miRNA 是一类没有编码能力的小分子 RNA,在自然界的真核生物体内存在,参与调控细胞分化、胚胎发育、能量代谢等过程。miRNA 与人类多种疾病有关,参与疾病的病理进展,可能是疾病治疗的靶向调节分子^[13]。miR-4326 是近些年来发现的与肿瘤有关的 miRNA,在肺癌、多发性骨髓瘤等肿瘤中表达上调,并且下调 miR-4326 表达可以抑制肿瘤细胞的生长、迁移、侵袭^[8,14]。本实验结果表明,miR-4326 在肝癌细胞中的表达高于正常肝细胞,下调 miR-4326 可以降低肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,提示 miR-4326 在肝癌进展中可能扮演类似癌基因的作用,靶向抑制 miR-4326 可能是肝癌治疗的有效途径。

肿瘤的转移是一个复杂的过程,不仅与肿瘤细胞的侵袭、迁移能力等有关,还与肿瘤细胞 EMT 有关^[15]。研究表明,发生 EMT 的肿瘤细胞的侵袭、迁移能力明显增加,

EMT 被认为是肿瘤转移的早期标志^[16]。Vimentin 是间质细胞标志蛋白, E-cadherin 是上皮细胞标志蛋白,二者的表达是 EMT 水平的标志^[17]。本实验结果显示,下调 miR-4326 和芒柄花黄素均可降低 HCCLM3 细胞中 Vimentin 表达,提高 E-cadherin 表达,并且二者联合作用效果更好,提示芒柄花黄素联合下调 miR-4326 抑制 HCCLM3 细胞增殖和转移潜能。

Wnt/ β -catenin 是经典 Wnt 信号通路,在人体组织中广泛表达,参与多种病理和生理过程^[18]。Wnt/ β -catenin 影响细胞生长、代谢等过程,与动脉粥样硬化、关节炎等疾病有关^[19-20]。Wnt/ β -catenin 在肿瘤进展中过度激活,其活化后诱导肿瘤转移和生长,抑制其激活具有抵抗肿瘤细胞增殖、迁移的作用^[21]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键蛋白, c-Myc 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶点^[22]。以往研究发现,芒柄花黄素调控肿瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路^[23]。本实验结果显示,芒柄花黄素和下调 miR-4326 后,HCCLM3 细胞中 β -catenin、c-Myc 蛋白表达均降低,并且激活 Wnt/ β -catenin 通路可以逆转芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对 HCCLM3 细胞的抑制作用,这提示芒柄花黄素联合下调 miR-4326 通过 Wnt/ β -catenin 影响 HCCLM3 细胞生长、侵袭和迁移。

综上所述,芒柄花黄素联合下调 miR-4326 可能是肝癌治疗的途径之一,可以抑制 HCCLM3 细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT,其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关。这为临床上提高肝癌患者生活质量提供了参考,为研究芒柄花黄素和下调 miR-4326 抗肿瘤机制提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Golabi P, Rhea L, Henry L, et al. Hepatocellular carcinoma and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(6): 688-694.
- [2] Wong C M, Tsang F H, Ng I O. Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(3): 137-151.
- [3] 王茹月, 叶雨. 芒柄花黄素应用于抗癌药物开发的研究进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2019, 46(2): 183-187.
- [4] Park S, Bazer F W, Lim W, et al. The O-methylated isoflavone, formononetin, inhibits human ovarian cancer cell proliferation by sub G0/G1 cell phase arrest through PI3K/AKT and ERK1/2 inactivation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9): 7377-7387.
- [5] Wu Y Y, Zhang X, Li Z Z, et al. Formononetin inhibits human bladder cancer cell proliferation and invasiveness via regulation

- of miR-21 and PTEN [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3): 1061-1066.
- [6] Liu G, Li B. Role of miRNA in transformation from normal tissue to colorectal adenoma and cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(2): 278-285.
- [7] Samec M, Liskova A, Kubatka P, et al. The role of dietary phytochemicals in the carcinogenesis via the modulation of miRNA expression[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(7): 1665-1679.
- [8] Xu G, Zhang Z, Zhang L, et al. miR-4326 promotes lung cancer cell proliferation through targeting tumor suppressor APC2 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 443(1-2): 151-157.
- [9] 袁长威, 熊媛媛, 张青兰, 等. 芒柄花黄素对白血病 HL-60 细胞增殖、凋亡和 miR-21/PTEN/AKT 信号通路的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(7): 1062-1066.
- [10] 高咏梅, 仵妍, 徐晖, 等. 芒柄花黄素对宫颈癌细胞放疗敏感性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(16): 4066-4069.
- [11] Zhang L, Gong Y Z, Wang S, et al. anti-colorectal cancer mechanisms of formononetin identified by network pharmacological approach [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7709-7714.
- [12] 董陈诚, 钟漓, 张广钰, 等. 芒柄花黄素对人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠模型的抑制作用及机制研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(32): 4482-4483; 4486.
- [13] Terlecki-Zaniewicz L, Lämmermann I, Latreille J, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(5): 1103-1132.
- [14] Jiang Y X, Luan Y J, Chang H, et al. The diagnostic and prognostic value of plasma microRNA-125b-5p in patients with multiple myeloma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 4001-4007.
- [15] Zhao L, Zhang P, Su X J, et al. The ubiquitin ligase TRIM56 inhibits ovarian cancer progression by targeting vimentin [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2420-2425.
- [16] Naumova L A, Osipova O N, Klinnikova M G. Immunistochemical analysis of the expression of TGF β , Galectin-1, Vimentin, and Thrombospondin in gastric cancer associated with systemic undifferentiated connective tissue dysplasia[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 166(6): 774-778.
- [17] Amaral C B, Leite J D S, Fonseca A B M, et al. Vimentin, osteocalcin and osteonectin expression in canine primary bone tumors: diagnostic and prognostic implications [J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45(5): 1289-1296.
- [18] Cho I H, Park S J, Lee S H, et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling in the restoration of induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium after laser photocoagulation [J]. *Lasers Med Sci*, 2019, 34(3): 571-581.
- [19] Wang F, Liu Z, Park S H, et al. Myeloid β -Catenin deficiency exacerbates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(7): 1468-1478.
- [20] Huang X H, Chen Z X, Shi W M, et al. TMF inhibits miR-29a/Wnt/ β -catenin signaling through upregulating Foxo3a activity in osteoarthritis chondrocytes[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2009-2019.
- [21] Dzobo K, Thomford N E, Senthane D A. Targeting the versatile Wnt/ β -Catenin pathway in cancer biology and therapeutics: from concept to actionable strategy[J]. *OMICS*, 2019, 23(11): 517-538.
- [22] Peng K S, Su G Q, Ji J M, et al. Histone demethylase JMJD1A promotes colorectal cancer growth and metastasis by enhancing Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(27): 10606-10619.
- [23] 曹峻, 张幸, 梁梅花, 等. 芒柄花黄素对膀胱癌细胞凋亡作用及对 β -catenin 通路的影响[J]. *广东医学*, 2016, 37(21): 3189-3192.