

miR-485-3p调控肝癌细胞铁死亡的分子机制研究

孙文胜¹, 刘之谦², 李新章¹, 姜继康³, 李杰^{1*}

¹山东大学齐鲁医学院, 山东 济南

²山东第一医科大学第一附属医院肝胆外科, 山东 济南

³孝昌县第一人民医院检验科, 湖北 孝感

收稿日期: 2023年2月21日; 录用日期: 2023年3月16日; 发布日期: 2023年3月23日

摘要

目的: 探讨miR-485-3p调控肝癌细胞系HepG2铁死亡的分子机制。方法: 使用转染试剂transfect-mate分别转染miR-485-3p模拟物或抑制物至肝癌细胞HepG2中并通过qPCR验证转染效果。加入铁死亡诱导剂索拉非尼(SF), 通过CCK-8法检测肝癌细胞增殖水平。通过RT-qPCR验证铁死亡诱导剂作用下肝癌细胞内miR-485-3p表达水平。通过脂质过氧化物试剂盒(MDA)、C11-BODIPY、铁离子检测试剂盒、分别检测肝癌细胞内过氧化物、铁离子积累水平。Western blot测定转染miR-485-3p模拟物或抑制物后核受体共激活因子4 (NCOA4)的表达水平。结果: 与“NC + SF”组相比, “Mimics + SF”组肝癌细胞活力减弱, “Inhibitor + SF”组肝癌细胞活力显著增强。qPCR结果显示索拉非尼诱导后, 肝癌细胞内miR-485-3p表达水平较对照组升高。“Mimics + SF”组肝癌细胞内丙二醛(MDA)、铁离子水平较“NC + SF”组显著升高。共聚焦显微镜下观察到“Mimics + SF”组肝癌细胞内ROS累积显著, “Inhibitor + SF”组相对较低。Western blot结果显示转染miR-485-3p模拟物后肝癌细胞内NCOA4表达增强, 而转染抑制物后NCOA4表达显著下降。结论: miR-485-3p可以通过调控NCOA4影响肝癌细胞铁死亡。

关键词

肝细胞癌, miR-485-3p, 核受体共激活因子4, 铁死亡

Research on Molecular Mechanism of miR-485-3p Regulation on Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells

Wensheng Sun¹, Zhiqian Liu², Xinzhang Li¹, Jikang Jiang³, Jie Li^{1*}

¹Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan Shandong

*通讯作者。

文章引用: 孙文胜, 刘之谦, 李新章, 姜继康, 李杰. miR-485-3p 调控肝癌细胞铁死亡的分子机制研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 4320-4327. DOI: 10.12677/acm.2023.133620

²Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan Shandong

³Clinical Laboratory Department, Xiaochang First People's Hospital, Xiaogan Hubei

Received: Feb. 21st, 2023; accepted: Mar. 16th, 2023; published: Mar. 23rd, 2023

Abstract

Objective: To investigate the molecular mechanism of miR-485-3p on ferroptosis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Methods:** Transfect-Mate was used to transfect miR-485-3p mimics or inhibitors into HepG2 cells, and the transfection effect was verified by qPCR. Adding Sorafenib (SF) as ferroptosis inducer, the proliferation of hepatocellular carcinoma cells was detected by CCK-8 assay. RT-qPCR was used to verify the expression level of miR-485-3p in hepatocellular carcinoma cells under the effect of ferroptosis inducer. The accumulation levels of superoxide and iron in HCC cells were detected by Lipid Peroxidation MDA Assay Kit (MDA), C11-BODIPY and Iron assay Kit respectively. Western blot was used to determine the expression level of nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) after transfection with miR-485-3p mimic or inhibitor. **Results:** Compared with "NC + SF" group, the viability of hepatocellular carcinoma cells in "Mimics + SF" group was decreased, while that in "Inhibitor + SF" group was significantly increased. qPCR results showed that after sorafenib induction, the expression level of miR-485-3p in hepatocellular carcinoma cells was higher than that in the control group. The levels of malondialdehyde (MDA) and intracellular iron in the "Mimics + SF" group were significantly higher than those of "NC + SF" group. It was observed under confocal microscope that ROS accumulation in hepatocellular carcinoma cells of the "Mimics + SF" group was significant, while the "Inhibitor + SF" group was relatively low. Western blot results showed that the expression of NCOA4 in hepatocellular carcinoma cells was enhanced after transfection with miR-485-3p mimics, while the expression of NCOA4 was significantly decreased after transfection with inhibitor. **Conclusion:** miR-485-3p affects ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells by regulating NCOA4.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, miR-485-3p, Nuclear Receptor Coactivator 4, Ferroptosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

据国家癌症中心数据,我国肝癌的发病率排名第四,死亡率排名第二,仅次于肺癌[1]。因此寻找新的潜在的治疗肝癌的靶点具有非常重要的意义。铁死亡是一种以脂质过氧化物、铁离子累积为主要特征的程序性死亡,现有研究表明,铁死亡与肝癌的发展有关[2]。miR-485-3p位于染色体14q32.31,研究表明miR-485-3p在结直肠癌[3][4]、宫颈癌[5]、和乳腺癌[6]等恶性肿瘤中可以作为肿瘤抑制因子。相反,研究显示miR-485-3p可作为促癌因子在胃癌[7]和肝癌中发挥作用。在肝癌中,miR-485-3p能与LinC00052形成互补碱基对,降低神经营养酪氨酸激酶受体(NTRK3)对肝癌细胞增殖和转移的抑制作用,从而促进肝癌细胞增殖和转移[8]。另有研究显示,在HepG2细胞中,敲除miR-485-3p可以相对提高MAT1A的mRNA和蛋白质水平, MAT1A的表达水平与肝细胞癌的发生呈负相关, MAT1A表达升高,抑制了肝癌

细胞生长和侵袭[9]。有研究证实 miR-485-3p 可以通过介导铁转运蛋白影响细胞内铁的代谢, 过表达 miR-485-3p 能降低铁转运蛋白的活性, 造成细胞内铁累积[10]。然而, miR-485-3p 是否参与调控肝癌细胞铁死亡, 仍待进一步研究。本研究以肝癌细胞系 HepG2 为研究对象, 探讨 miR-485-3p 在肝癌细胞铁死亡过程中的影响及作用机制, 为肝癌的综合治疗提供潜在的靶点。

2. 材料与方法

2.1. 主要材料和试剂

肝癌细胞系 HepG2 购自塞库生物。模拟物(hsa-miR-485-3p mimics)、抑制物(hsa-miR-485-3p inhibitor)、阴性对照(Negative control)、转染试剂(transfect-mate)均购自上海吉玛制药技术有限公司基因。MEM 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液、PBS 均购自上海源培生物科技股份有限公司。胎牛血清购自 Gibco 美国赛默飞世尔科技有限公司。RT-qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。脂质氧化(MDA)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。铁离子比色法检测试剂盒采购于北京普利莱基因技术有限公司。引物采购于上海吉玛制药技术有限公司。C11-BODIPY581/591 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。GAPDH 抗体、NCOA4 抗体、FTH1 抗体、SLC7A11 抗体、抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司(CST)。TBST 缓冲液、30%丙烯酰胺、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)均购自武汉塞维尔生物技术有限公司。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养与分组

肝癌细胞系 HepG2 在含 10%胎牛血清及 1%青链霉素混合液的 MEM 培养基中培养。细胞培养箱保持 5% CO₂、37℃的恒温条件。细胞复苏、细胞传代均在生物安全柜中进行。细胞每培养 15 代, 更换 1 次细胞。HepG2 细胞共分为 6 组, 分别为“NC + DMSO”组(阴性对照组)、“NC + SF”组(索拉非尼诱导组)、“Mimics + DMSO”组(miR-485-3p 过表达组)、“Mimics + SF”组(miR-485-3p 过表达 + 索拉非尼诱导组)。“Inhibitor + DMSO”组(miR-485-3p 抑制组)、“Inhibitor + SF”组(miR-485-3p 抑制 + 索拉非尼诱导组)。

2.2.2. CCK-8 (Cell Counting Kit-8)实验

细胞活力检测: 转染后的 HepG2 细胞, 按照细胞传代步骤进行消化吹打混匀, 显微镜下计数(5×10^3 /well)接种于 96 孔板中, 总培养基体积 100 μ L。24 h 后加药, 加药处理 24 h 后更换培养基, 避光条件下加入提前配制好的 CCK-8 检测试剂, 总体积 100 μ L, 培养箱中孵育 2 h。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值, 记录实验数据。

2.2.3. 克隆形成实验

将转染处理过的 HepG2 细胞(6×10^2 /well)接种于 12 孔板中。细胞在添加 10%胎牛血清的培养基中培养 2 周, 每 4 天更换一次培养基。待形成肉眼可见细胞团时, 加药处理 24 h, 室温下用 4%的多聚甲醛细胞固定液固定细胞 20 min, 然后用 0.1%的结晶紫染色。双蒸水冲洗 3~5 次, 自然晾干后拍照保存。

2.2.4. PCR 实验

预先处理好的细胞清洗 3 遍, 提取细胞总 RNA。测定 RNA 浓度后, 参照产品说明书反转录生成 cDNA, 以上操作均在冰上进行。使用伯乐 CFX-96 荧光定量 PCR 仪行实时荧光定量 PCR。2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 miRNA 实时水平。

2.2.5. 丙二醛(MDA)检测

裂解液充分裂解细胞后, 4℃ 12,000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加入配制好的 MDA 检测工作液, 溶液充分混匀, 100℃ 孵育 15 min, 水浴冷却至室温, 室温 1000 r/min 离心 10 min, 最后取 200 μL 样品加入 96 孔板中, 每样本重复 3 次, 酶标仪 532 nm 波长测定吸光度。依据标准浓度曲线及样品蛋白浓度计算细胞内 MDA 水平。

2.2.6. 铁离子检测

向培养好细胞的 6 孔板中加入 400 μL/孔铁离子检测试剂裂解液, 室温下置于摇床上裂解 2 h 充分裂解细胞。吸取样品至 1.5 ml 离心管, 根据说明书加入各组样品及所需试剂, 充分混匀, 60℃ 孵育 1 h, 冷却至室温后瞬时离心, 加入 30 μL 铁离子检测剂, 室温孵育 30 min, 取 200 μL 于 96 孔板, 550 nm 测定吸光度值。依据标准浓度曲线及样品蛋白浓度计算细胞内铁离子水平。

2.2.7. C11-BODIPY 实验

C11-BODIPY 用于检测细胞内脂质过氧化。HepG2 细胞(15×10^4 /well)六孔板种板, 细胞融合度 40% 左右进行转染, 转染后 24 h 加药, 加药处理 24 h 后用含 50 μmol/L C11-BODIPY 试剂培养基按说明书进行培养, 所得各组样品用激光共聚焦显微镜进行测定。

2.2.8. Western Blot 实验

RIPA 裂解细胞 20 min 后, 刮匙刮下细胞, 转移至 1.5 mL 样品管中。4℃ 离心机 12,000 r/min 离心 15 min, 取上清液提取细胞总蛋白。使用 BCA 试剂盒测定细胞蛋白浓度, 按照 1:4 体积比添加蛋白电泳上样缓冲液充分混匀后, 95℃ 金属浴中加热 5 min, -20℃ 保存备用。取 10 μg 蛋白上样, 电泳 80 V、30 min, 120 V、60 min, 转膜。脱脂牛奶封闭 2 h。TBST 缓冲液清洗条带 3 遍, 孵育一抗过夜。所用抗体均按照说明书 1:1000 稀释。二抗 1:3000 稀释, 常温下孵育 1 h, TBST 缓冲液清洗条带 3 遍。加入超敏显影液, 显影仪下发光显影。

2.3. 统计学处理

所获数据应用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本间差异的比较采用独立样本 t 检验。所有实验均重复 3 次。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. miR-485-3p 对 HepG2 细胞铁死亡的影响

通过 CCK-8 实验测定加入索拉非尼前后肝癌细胞的活力, 结果显示“Mimics + DMSO”组细胞活力相比“NC + DMSO”组明显升高, 而“Mimics + SF”组肝癌细胞活力相比于“NC + SF”组显著降低(图 1(a))。细胞克隆形成实验结果显示: 在索拉非尼的诱导下, miR-485-3p 表达增强后, HepG2 的细胞活力显著下降, 而敲低 miR-485-3p 后, HepG2 的细胞活力明显增强(图 1(b))。PCR 结果显示, 索拉非尼诱导组的 miR-485-3p 表达水平较 NC 组显著升高(图 1(c))。这些结果提示 miR-485-3p 在调控肝癌细胞铁死亡中发挥了作用。我们通过检测细胞内铁离子水平、丙二醛(MDA)水平发现“Mimics + SF”组的 MDA 和铁离子水平较“NC + SF”组明显升高(图 1(d)、图 1(e)), “Inhibitor + SF”组铁离子水平较“NC + SF”组明显降低(图 1(f))。共聚焦显微镜下观察到, 索拉非尼诱导后的各组细胞 ROS 水平均有明显升高; 且“Mimics + SF”组荧光强度显著高于“NC + SF”组, 而“Inhibitor + SF”组细胞内 ROS 水平较“NC + SF”组下降(图 1(g))。

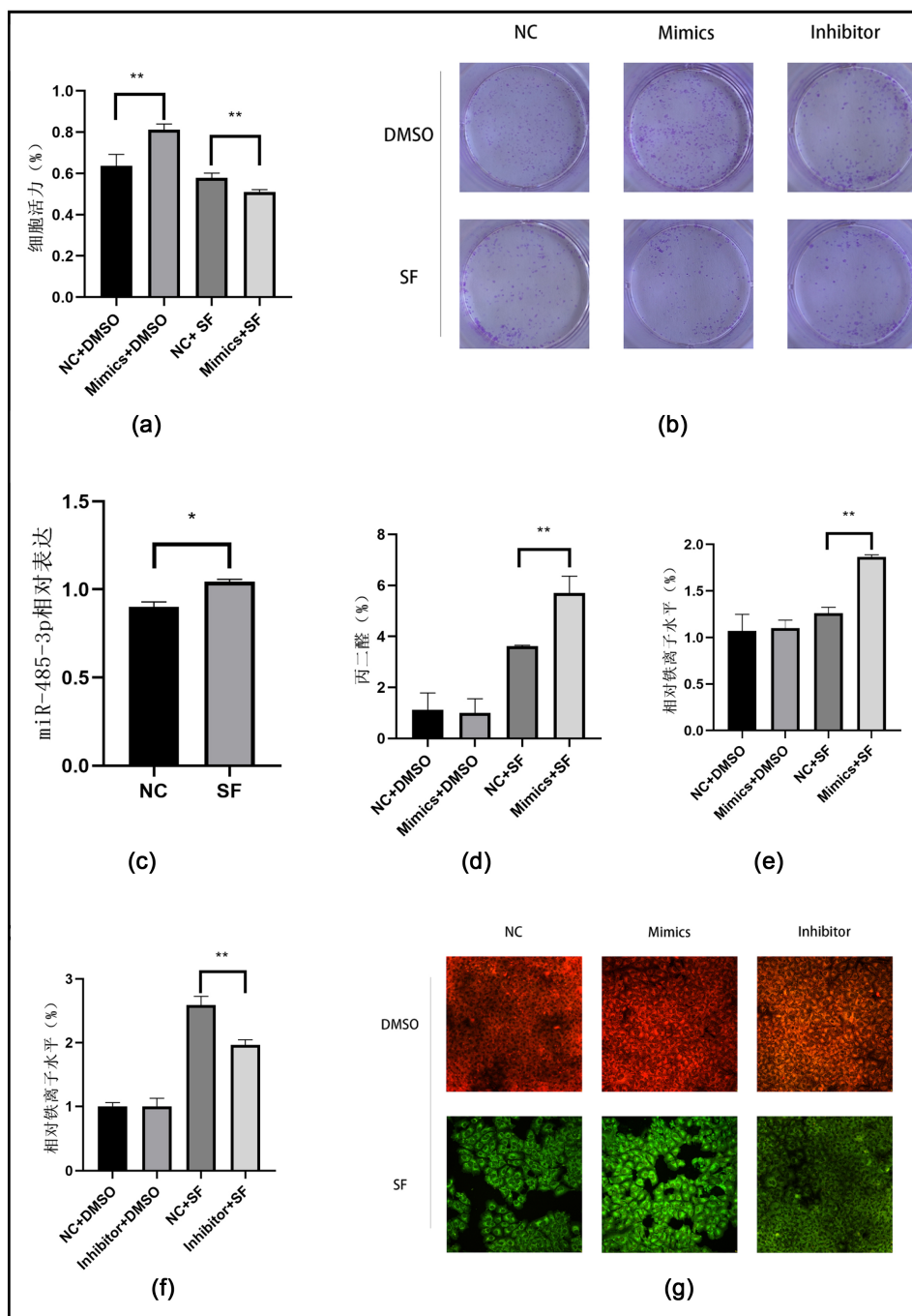


Figure 1. Effect of miR-485-3p on ferroptosis of HepG2 cells. (a) Changes in cell viability after overexpression of miR-485-3p; (b) Cell growth and proliferation in different groups; (c) The expression of miR-485-3p after sorafenib induction was detected by RT-qPCR; (d) Comparison of malondialdehyde levels in cells of different groups; (e) Comparison of intracellular iron levels in different groups after overexpression of miR-485-3p; (f) Comparison of intracellular iron levels in different groups after inhibition of miR-485-3p; (g) ROS fluorescence signals in cells of each group were observed under confocal microscope. The green fluorescence was oxidation state and the red fluorescence was non-oxidation state *P < 0.05, **P < 0.01

图 1. miR-485-3p 对 HepG2 细胞铁死亡的影响。(a) 过表达 miR-485-3p 后细胞活力变化；(b) 不同组别细胞生长增殖情况；(c) RT-qPCR 检测索拉非尼诱导后 miR-485-3p 的表达变化；(d) 不同组别细胞内丙二醛水平比较；(e) 过表达 miR-485-3p 后不同组别细胞内铁离子水平比较；(f) 抑制 miR-485-3p 后不同组别细胞内铁离子水平比较；(g) 共聚焦显微镜下观察各组细胞内 ROS 荧光信号，绿色荧光为氧化态，红色荧光为非氧化态 *P < 0.05, **P < 0.01

3.2. miR-485-3p 调控 HepG2 细胞铁死亡的机制

为了进一步探索 miR-485-3p 调控肝癌细胞铁死亡的机制, 我们预测了 miR-485-3p 在铁死亡通路中可能的靶基因, 首先, 我们使用铁死亡数据库 FerrDb, 分别筛选出“铁死亡驱动基因”和“铁死亡抑制基因”中评分前 10 位的基因, 使用 miRWalk 数据库筛选得到上述基因中与 miR-485-3p 具有结合位点且评分前 5 位的基因: TP53、IREB2、NCOA4、FTH1、SLC7A11。本研究选取 NCOA4、FTH1、SLC7A11 作为预选基因进行 Western blot 验证。结果显示: NCOA4、SLC7A11 和 FTH1 在索拉非尼诱导铁死亡后表达都有所下降, 但在非诱导铁死亡组过表达或抑制 miR-485-3p 后, 只有 NCOA4 的表达量出现了显著变化。“Mimics + DMSO”组 NCOA4 表达量较“NC + DMSO”组明显升高, “Mimics + SF”组 NCOA4 表达量较“NC + SF”组也有轻度升高(图 2(a)、图 2(b))。“Inhibitor + DMSO”组较“NC + DMSO”组 NCOA4 表达量明显下降, “Inhibitor + SF”组较“NC + SF”组 NCOA4 表达量也有轻度下降(图 2(c)、图 2(d))。以上结果提示, miR-485-3p 可以通过正向调控 NCOA4 的表达影响铁死亡。

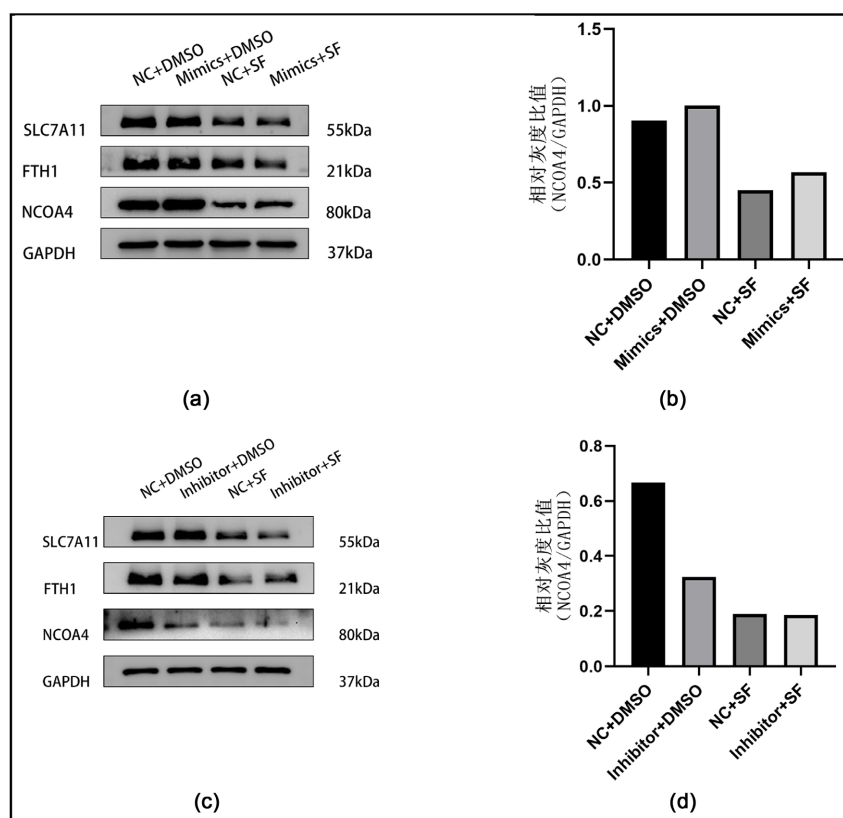


Figure 2. miR-485-3p positively regulates NCOA4 and affects ferroptosis of HepG2 cells. (a) Western blot detection of changes in the expression of ferroptosis related proteins after overexpression of miR-485-3p were detected by Western blot; (b) Changes of NCOA4 expression in different groups of cells after overexpression of miR-485-3p; (c) Western blot detection of changes in the expression of ferroptosis related proteins after the inhibition of miR-485-3p; (d) Changes in the expression of NCOA4 in different groups of cells after the inhibition of miR-485-3p

图 2. miR-485-3p 正向调控 NCOA4 影响 HepG2 细胞铁死亡。(a) Western blot 检测过表达 miR-485-3p 后铁死亡相关蛋白的表达变化; (b) 过表达 miR-485-3p 后不同组别细胞 NCOA4 表达的变化; (c) Western blot 检测抑制 miR-485-3p 后铁死亡相关蛋白的表达变化; (d) 抑制 miR-485-3p 后不同组别细胞 NCOA4 表达的变化

4. 讨论

铁死亡是一种以铁离子、脂质过氧化物累积为主要特征的程序性死亡, 与肿瘤、神经系统疾病、缺

血-再灌注损伤、肾损伤、血液疾病等多种疾病的病理生理过程密切相关[11]。铁死亡通过调节细胞内谷胱甘肽(GSH)、细胞内脂质过氧化物及其他相关物质的水平影响肝癌的发展[12]。索拉非尼是第一个被批准用于肝癌晚期全身治疗的药物, 研究认为索拉非尼作为铁死亡诱导剂, 可以作用于 system XC⁻, 消耗肝癌细胞内谷胱甘肽, 导致脂质过氧化, 最终引起肝癌细胞铁死亡, 其作用与 erastin 相似[13]。然而在肝癌的临床治疗中, 使用索拉非尼后很快便可产生耐药性。因此寻找新的铁死亡靶点对治疗肝癌具有重要意义。MicroRNAs (miRNAs)是一类进化上保守的非编码 RNA, 作为基因表达的转录后调节因子, 参与细胞增殖、凋亡等多种生物学过程[14]。过去的研究认为, miRNA 的作用机制是作为负调控因子在胞质中与靶 mRNA 结合导致靶 mRNA 的翻译抑制或引起靶 mRNA 的降解[15]。最新的研究证实, miRNA 同样存在于细胞核中。核内 miRNA 可通过结合增强子, 改变增强子的染色质状态, 从而激活基因的转录表达[16]。诺贝尔奖得主菲利普·夏普(Phillip Allen Sharp)最新的研究也证实 miRNA 激活理论[17], 说明 miRNA 具有双重功能, 在胞质中作为负向调控因子抑制基因表达, 在细胞核内作为正向调控因子激活基因的转录。多项研究证实, miRNAs 在肝癌的发生、发展中发挥着重要作用, 并被认为是可能成为新的肝癌治疗靶点[18]。核受体共激活因子 4 (Nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)是一种选择性货物受体, 与铁蛋白自噬关系紧密。NCOA4 可以直接识别和结合 FTH1 介导铁蛋白自噬降解, 释放大量游离铁, 最终引起铁死亡[19]。据报道, NCOA4 表达水平同样受细胞内铁离子水平的影响, 在铁充足的条件下, NCOA4 可以与 HERC2 稳定结合。促进 NCOA4 蛋白酶体转换并降低细胞内 NCOA4 水平, 促进铁蛋白积累和铁储存, 在缺铁条件下, NCOA4-HERC2 结合减弱, NCOA4 的蛋白酶体转换减少导致 NCOA4 水平升高, 加快铁蛋白自噬降解, 从而增加游离铁[20]。本研究中发现, 过表达 miR-485-3p 后, 促进了 HepG2 细胞的生长增殖, 这与之前 miR-485-3p 促进肝癌进展的报道相符。有意思的是, 我们研究发现在索拉非尼诱导下, 过表达 miR-485-3p 后, HepG2 细胞铁死亡指标出现了升高, 抑制 miR-485-3p 的表达后细胞铁死亡指标出现了下降。说明 miR-485-3p 在 HepG2 细胞铁死亡的过程中起到了促进作用。过表达 miR-485-3p 后 HepG2 细胞中 NCOA4 的表达量升高, 抑制 miR-485-3p 的表达后 NCOA4 的表达量出现降低。研究证实, NCOA4 是铁死亡正向调控因子, 敲低 NCOA4 抑制了 erastin 诱导的铁死亡, 而 NCOA4 的过表达促进了铁死亡[21]。说明 miR-485-3p 可以正向调控 NCOA4 的表达影响肝癌细胞 HepG2 的铁死亡, 这引起了我们的兴趣。我们推测 miR-485-3p 正向调控 NCOA4 的机制可能有两种。一是 miR-485-3p 在细胞核内与增强子结合后, 激活了转录表达, 使得 NCOA4 表达升高。二是 miR-485-3p 在细胞质内起作用, 通过沉默或降低某种分子的表达, 间接地使 NCOA4 表达升高。然而, 由于围绕正向 miRNA 调控机制的研究刚刚起步, 其生物学意义和具体功能仍需要进一步的研究证实。

5. 结论

综上, 我们证实了 miR-485-3p 可以正向调控 NCOA4 的表达并最终影响 HepG2 细胞的铁死亡。但是对于 miR-485-3p 调控 NCOA4 的具体机制以及该通路是否受其他分子的调控, 仍需要进一步的研究证实。我们期待更深一步的研究能为肝癌的治疗提供新的可能的方案。

基金项目

国家自然科学基金资助项目, 项目编号: 81802414。

参考文献

- [1] Chen, W.Q., Sun, K.X., Zheng, R.S., et al. (2018) Cancer Incidence and Mortality in China, 2014. *Chinese Journal of Cancer Research*, 30, 1-12. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.01>
- [2] 付宇, 黄桂芹, 王英迪, 程润, 刘伟洁, 缪明星, 颜天华. 肿瘤细胞的铁死亡机制[J]. 生命的化学, 2022, 42(11):

- 1961-1967.
- [3] 殷军锋, 顾明. 沉默 circ_0007385 对结肠癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. 临床外科杂志, 2022, 30(8): 762-766.
- [4] Taherdangkoo, K., Kazemi, N.S.R., Hajjari, M.R., *et al.* (2020) miR-485-3p Suppresses Colorectal Cancer via Targeting TPX2. *Bratislavske Lekarske Listy*, **121**, 302-307. https://doi.org/10.4149/BLL_2020_048
- [5] 祁海云, 王荣兰, 聂伟. miR-485-3p 靶向 NR1D2 调控宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29(5): 618-623.
- [6] 艾尼·沙塔尔, 闫焕英, 丁伟, 阿迪力江, 苏鹏程. 长链非编码 RNA MALAT1 靶向 miR-485-3p 调控乳腺癌细胞对紫杉醇的耐药性[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(5): 698-702.
- [7] Wang, H., Wang, N., Zheng, X.L., *et al.* (2021) Circular RNA hsa_circ_0009172 Suppresses Gastric Cancer by Regulation of microRNA-485-3p-Mediated NTRK3. *Cancer Gene Therapy*, **28**, 1312-1324. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00280-7>
- [8] Xiong, D.M., Sheng, Y.R., Ding, S.J., *et al.* (2016) LINC00052 Regulates the Expression of NTRK3 by miR-128 and miR-485-3p to Strengthen HCC Cells Invasion and Migration. *Oncotarget*, **7**, 47593-47608. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10250>
- [9] Yang, H.P., Cho, M.E., Li, T.W.H., *et al.* (2013) MicroRNAs Regulate Methionine Adenosyltransferase 1A Expression in Hepatocellular Carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*, **123**, 285-298. <https://doi.org/10.1172/JCI63861>
- [10] Sangokoya, C., Doss, J.F. and Chi, J.-T. (2013) Iron-Responsive miR-485-3p Regulates Cellular Iron Homeostasis by Targeting Ferroportin. *PLOS Genetics*, **9**, e1003408. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003408>
- [11] Li, J., Cao, F., Yin, H.-L., *et al.* (2020) Ferroptosis: Past, Present and Future. *Cell Death & Disease*, **11**, Article No. 88. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>
- [12] 潘亚芳, 郭玮. 肝癌中铁死亡的调控因素及潜在应用进展[J]. 中国临床医学, 2021, 28(6): 1050-1055.
- [13] 刘静, 刘文天. 铁死亡在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2022, 38(3): 331-333.
- [14] Yates, L.A., Norbury, C.J. and Gilbert, R.J.C. (2013) The Long and Short of MicroRNA. *Cell*, **153**, 516-519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.003>
- [15] Towler, B.P., Jones, C.I. and Newbury, S.F. (2015) Mechanisms of Regulation of Mature miRNAs. *Biochemical Society Transactions*, **43**, 1208-1214. <https://doi.org/10.1042/BST20150157>
- [16] Xiao, M., Li, J., Li, W., *et al.* (2017) MicroRNAs Activate Gene Transcription Epigenetically as an Enhancer Trigger. *RNA Biology*, **14**, 1326-1334. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1112487>
- [17] Suzuki, H.I., Young, R.A. and Sharp, P.A. (2017) Super-Enhancer-Mediated RNA Processing Revealed by Integrative MicroRNA Network Analysis. *Cell*, **168**, 1000-1014.E15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.015>
- [18] Khare, S., Khare, T., Ramanathan, R. and Ibdah, J.A. (2022) Hepatocellular Carcinoma: The Role of MicroRNAs. *Biomolecules*, **12**, 645. <https://doi.org/10.3390/biom12050645>
- [19] Fang, Y.Y., Chen, X.C., Tan, Q.Y., *et al.* (2021) Inhibiting Ferroptosis through Disrupting the NCOA4-FTH1 Interaction: A New Mechanism of Action. *ACS Central Science*, **7**, 980-989. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01592>
- [20] Santana, C.N., Gikandi, A. and Mancias, J.D. (2021) The Role of NCOA4-Mediated Ferritinophagy in Ferroptosis. In: Florez, A.F. and Alborzina, H., Eds., *Ferroptosis: Mechanism and Diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 1301, Springer, Berlin, 41-57. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62026-4_4
- [21] Gryzik, M., Asperti, M., Denardo, A., *et al.* (2021) NCOA4-Mediated Ferritinophagy Promotes Ferroptosis Induced by Erastin, but Not by RSL3 in HeLa Cells. *BBA—Molecular Cell Research*, **1868**, Article ID: 118913. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118913>