

• 妇儿临床诊断与实验医学专题 •

DNA 荧光编码微球技术的建立及其在肝母细胞瘤 miRNA 多重检测中的应用分析*

李怀远¹, 潘秋辉¹, 柯苑^{2△}

1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心检验科, 上海 200127;

2. 南京红十字血液中心, 江苏南京 210000

摘要:目的 建立基于 DNA 荧光编码微球技术的多重微小核糖核酸(miRNA)检测方法, 验证其在肝母细胞瘤(HB)相关 miRNA 多重检测中的临床应用价值。方法 基于计算机辅助设计(CAD)的四发夹杂交链式反应(qHCR)系统, 构建四色荧光(Pacific Blue、FAM、TAMRA、Cy5)编码微球体系, 通过激光共聚焦显微镜对微球的荧光编码性能、形态特征进行表征; 以 HB 相关的 7 种 miRNA(miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-122、miR-192、miR-801、miR-223)为靶标, 评估方法的检出限、线性范围及特异性; 并进一步在血清模拟样本中, 采用该方法进行 7 种 miRNA 同时检测, 验证其多重分析性能。结果 成功构建四色 DNA 荧光编码微球体系, 微球粒径均一, 荧光信号稳定性良好。该方法对 HB 相关 miRNA 的检出限为 1.99 pmol/L($R^2 > 0.97$), 且能同时检测 HB 组中 7 种 miRNA。结论 基于 DNA 荧光编码微球的多重 miRNA 检测技术具有高灵敏度、高特异性及多重分析能力, 可实现 HB 相关 miRNA 的快速多重检测, 为 HB 的早期诊断和病情监测提供新的技术支持。

关键词: DNA 荧光编码; 肝母细胞瘤; 微小核糖核酸; 多重检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2026.09.003

中图法分类号: R446.7

文章编号: 1673-4130(2026)09-1041-07

文献标志码: A

Establishment of DNA fluorescent-encoded microsphere technology and its application analysis in multiplex detection of hepatoblastoma-associated miRNAs*

LI Huaiyuan¹, PAN Qiuhui¹, KE Yuan^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Nanjing Red Cross Blood Center,

Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract: Objective To establish a multiplex microRNA (miRNA) detection method based on DNA fluorescent-encoded microsphere technology, and verify its clinical application value in the multiplex detection of hepatoblastoma (HB)-associated miRNAs. **Methods** A four-color fluorescent (Pacific Blue, FAM, TAMRA, Cy5)-encoded microsphere system was constructed based on a computer-aided design (CAD)-enabled quadruplex hybridization chain reaction (qHCR) system. The fluorescent encoding performance and morphological characteristics of the microspheres were characterized using a laser confocal microscope. Seven HB-associated miRNAs (miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-122, miR-192, miR-801, miR-223) were used as targets to evaluate the method's limit of detection (LOD), linear range, and specificity. Furthermore, simultaneous detection of the seven miRNAs was performed using this method in serum-mimetic samples to verify its multiplex analysis performance. **Results** The four-color DNA fluorescent-encoded microsphere system was successfully constructed, with uniform microsphere particle size and excellent fluorescent signal stability. For HB-associated miRNAs, the method exhibited a LOD of 1.99 pmol/L ($R^2 > 0.97$) and could simultaneously detect the seven miRNAs in HB-related samples. **Conclusion** The multiplex miRNA detection technology based on DNA fluorescent-encoded microspheres possesses high sensitivity, high specificity, and multiplex analysis capability. It enables rapid multiplex detection of HB-associated miRNAs and provides new technical support for the early diagnosis and disease monitoring of HB.

* 基金项目: 国家自然科学基金重大项目(82293662)。

作者简介: 李怀远, 男, 主任技师, 主要从事临床检验诊断学、生物化学相关研究。△ 通信作者, E-mail: 578767152@qq.com。

Key words: DNA fluorescent encoding; hepatoblastoma; microRNA; multiplex detection

肝母细胞瘤(HB)作为儿童期最常见的肝脏恶性肿瘤,占儿童肝脏原发性恶性肿瘤的 70%~85%,其发病率在全球范围内呈逐年上升趋势,严重威胁儿童生命健康^[1]。HB 的发病机制复杂,而微小核糖核酸(miRNA)作为一类长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子,在 HB 的发生、发展中扮演着关键调控角色,其表达谱的异常改变已成为 HB 分子诊断与病情监测的重要生物学标志物^[2-3]。miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)特异性结合,调控基因转录后表达,进而影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭及耐药等核心生物学过程^[4]。在 HB 中,多种 miRNA 的表达异常与疾病进展密切相关。例如通过 miR-21 上调靶向 PTEN、PDCD4 等抑癌基因,促进肿瘤细胞增殖、侵袭和耐药^[5],miR-122 通过调控肝脏代谢酶参与 HB 的侵袭转移等^[6]。此外,研究表明,单一 miRNA 的检测易受个体差异、样本质量等因素影响,而同时检测多种 HB 相关 miRNA 可显著提高诊断准确性,减少假阳性或假阴性结果,为 HB 的早期筛查与病情评估提供更全面的分子依据^[7]。

然而,当前常用的 HB 相关 miRNA 检测方法主要包括四类,各有明确优劣势:一是基于核酸杂交的方法,如 RNA 印迹技术作为经典方法,可直接验证 miRNA 大小与表达,结果直观,但操作烦琐、样本需求量大且灵敏度低^[8];原位杂交优势在于能定位 miRNA 的空间表达分布,劣势是定量能力弱、信号易受组织背景干扰^[9]。二是基于扩增的方法,传统实时荧光定量 PCR(qPCR)虽具有较高的灵敏度与特异度,但该方法一次反应仅能检测 1~2 种 miRNA,单次需 2~3 h,多靶点检测则需 1~2 d,无法适应临床快速诊断的需求^[10]。三是基于高通量的方法,RNA 测序可一次性检测全基因组 miRNA,但成本高、数据分析复杂,且低丰度 miRNA 检测重复性易受测序深度影响^[11]。四是基于生物传感器的方法,荧光传感器灵敏度高、信号直观易读,劣势是部分荧光探针易受

光漂白影响,长期稳定性较差^[12]。

值得注意的是,在成人肝癌(如肝细胞癌)的研究中,研究者已发现 7 种 miRNA(miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-122、miR-192、miR-223、miR-801)的表达谱异常与肿瘤的发生发展、疗效监测密切相关,这 7 种 miRNA 可通过调控细胞周期、代谢通路及免疫应答等过程,共同参与肝癌的病理机制^[13-14]。鉴于 HB 与成人肝癌在肝脏组织起源、部分分子通路异常上存在共性(如 Wnt/ β -catenin 信号通路激活)^[15-16],且目前针对 HB 特异性 miRNA 标志物的研究仍有待完善,本研究推测上述 7 种肝癌相关 miRNA 在 HB 中可能同样具有潜在的诊断价值,对其进行多重检测有望为 HB 的分子诊断提供新的靶点组合。因此本研究拟开发一种 DNA 荧光编码微球技术,通过四发夹杂交链式反应(qHCR)系统的信号放大与四色荧光编码的多重识别,利用“信号转换-信号编码-信号解码”三步实现多重 miRNA 的精准检测,弥补传统方法的不足。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 900),qPCR 仪(Life Technologies QuantStudio 5),酶标仪(BioTek Synergy H1);链霉亲和素修饰磁性微球(MMPs, New England Biolabs);Pacific Blue(Ex/Em = 410/455 nm),FAM(Ex/Em = 494/518 nm),TAMRA(Ex/Em = 552/570 nm),Cy5(Ex/Em = 643/667 nm)标记的 DNA 发夹探针(H1~H4,上海生工生物工程股份有限公司);miRNA 核酸序列及相关引物(miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-122、miR-192、miR-801、miR-223)及逆转录试剂盒(广州达安基因股份有限公司),引物序列见表 1;N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, Sigma-Aldrich);胎牛血清(FBS, Biological Industries)。

表 1 核酸引物序列

名称	引物序列(5'-3')	序列长度(nt)
primer-miR-122	AATAGCACGCCTGAAGAGATCCA(polyT)CA	25
primer-miR-192	ATTAGTGATCCGCGGATACCTTG(polyT)GG	25
primer-miR-21	TAACTGGGCAATCCTCGATATC(polyT)CA	25
primer-miR-223	TACAGTGGGGATCACATGTTGG(polyT)GG	24
primer-miR-26a	ACTCGGTAAGTGTACCATCTACC(polyT)AG	25
primer-miR-27a	TCGCATTTTCGTAGCTCTTCATCC(polyT)GC	25
primer-miR-801	ATACATGCGCGTGTCAATTCAGC(polyT)CC	25
miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	22

续表 1 核酸引物序列

名称	引物序列(5'-3')	序列长度(nt)
miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	21
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	22
miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	22
miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	21
miR-801	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	22
C-miR-122	Biotin-AATGGAGTGTGACAATGGTGTTTG	24
C-miR-192	Biotin-AACTGACCTATGAATTGACAGCC	23
C-miR-21	Biotin-AATAGCTTATCAGACTGATGTTGA	24
C-miR-223	Biotin-AATGTCAGTTTGTCAAAATACCCCA	24
C-miR-26a	Biotin-AATTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	24
C-miR-27a	Biotin-AATTCACAGTGGCTAAGTTCCGCG	23
C-miR-801	Biotin-AATGTAACAGCAACTCCATGTGGA	24
miR-21-H1	FAM-GATATCGAGGATTGGCCCAGTTAAAACACGTAACCTGGGCCAATCCT	46
miR-21-H2	TAACCTGGGCCAATCCTAGTGGTTAGGATTGGCCCAGTTACGTGTTT	46
miR-21-H3	AACCACTAGGATTGGCCCAGTTATATGGACTAACTGGGCCAATCCT	46
miR-21-H4	TAACCTGGGCCAATCCTCGATATCAGGATTGGCCCAGTTAGTCCATA	46
miR-26a-H1	Cy5-GGTAGATGGTACACTTACCGAGTACCGTTAACTCGGTAAGTGTACC	46
miR-26a-H2	ACTCGGTAAGTGTACCTCTACCAGGTACACTTACCGAGTTAACGGT	46
miR-26a-H3	TGGTAGAGGTACACTTACCGAGTTATAGCGACTCGGTAAGTGTACC	46
miR-26a-H4	ACTCGGTAAGTGTACCATCTACCGGTACACTTACCGAGTCGCTATA	46
miR-27a-H1	FAM-TCGCATTTTCGTAGCTCAGCTTCTGAGCTACGAAATGCGACAAAACC	46
miR-27a-H2	AGAAGCTGAGCTACGAAATGCGATGTTGCTTCGCATTTTCGTAGCTC-Cy5	46
miR-27a-H3	TCGCATTTTCGTAGCTCTTCATCCGAGCTACGAAATGCGAAGCAACA	46
miR-27a-H4	TCGCATTTTCGTAGCTCTTCATCCTTTGCGGAACCTAGCCACTGTGAA	46
miR-122-H1	TAMRA-TGGATCTCTTCAGGCGTGCTATTATTGGAGAATAGCACGCCTGAAG	46
miR-122-H2	AATAGCACGCCTGAAGATTCTCGCTTCAGGCGTGCTATTCTCCAAT-Pacific Blue	46
miR-122-H3	CGAGAATCTTCAGGCGTGCTATTATAGTCCAATAGCACGCCTGAAG	46
miR-122-H4	AATAGCACGCCTGAAGAGATCCACTTCAGGCGTGCTATTGGACTAT	46
miR-192-H1	FAM-CAAGGTATCCGCGGATCACTAATAATCGTGATTAGTGATCCGCGGA	46
miR-192-H2	ATTAGTGATCCGCGGAAAGTAGGTCCGCGGATCACTAATCACGATT-TAMRA	46
miR-192-H3	Pacific Blue-CCTACTTTCCGCGGATCACTAATTAAGTCGATTAGTGATCCGCGGA	46
miR-192-H4	ATTAGTGATCCGCGGATACCTTGTCGCGGATCACTAATCGACTTA	46
miR-801-H1	Cy5-GCTGAATTGACACGCGCATGTATTACCTTGATACATGCGCGTGTCA	46
miR-801-H2	ATACATGCGCGTGTTCATGGACAATGACACGCGCATGTATCAAGGTA-TAMRA	46
miR-801-H3	Pacific Blue-TTGTCATGACACGCGCATGTATACCTCAAATACATGCGCGTGTCA	46
miR-801-H4	ATACATGCGCGTGTCAATTCAGCTGACACGCGCATGTATTTGAGGT	46
miR-223-H1	FAM-ACCAACATGTGATCCCCACTGTAACGTTGATACAGTGGGGATCACA	46
miR-223-H2	TACAGTGGGGATCACATGAGGATTGTGATCCCCACTGTATCAACGT-Cy5	46
miR-223-H3	TAMRA-ATCCTCATGTGATCCCCACTGTATTCTGACTACAGTGGGGATCACA	46
miR-223-H4	TACAGTGGGGATCACATGTTGGTTGTGATCCCCACTGTAGTCAGAA-Pacific Blue	46

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 荧光编码微球体系构建 基于 CAD 技

术设计 qHCR 系统,将发卡探针(H1~H4)分为环区(Loop,7 nt,G/C 含量 3 nt,序列相似度 ≤ 4 nt)和茎区(Stem,16 nt,G/C 含量 8 nt,序列相似度 ≤ 6 nt),构建 Loop 序列数据库(7 nt)和 Stem 序列数据库(16 nt);采用 EDC/sulfo-NHS 法将四色荧光标记的 H1~H4 分别偶联至 MMPs 表面,通过调整 H1~H4 的荧光组合,实现荧光编码,构建 DNA 荧光编码微球检测体系。

1.2.2 DNA 荧光编码微球的表征 采用激光共聚焦显微镜观察荧光分布和强度,评估编码性能及特异性。

1.2.3 检测性能评估 将 HB 相关 miRNA 核酸模拟序列分别稀释为 1、10、50、100、250、500 pmol/L,经逆转录为互补 DNA(cDNA)后,采用 DNA 荧光编码微球体系检测,以相对荧光值进行回归分析,计算出限(LOD,3 倍信噪比)和线性范围;

1.2.4 HB miRNA 多重检测 将 7 种 HB 相关 miRNA 置于 FBS,模拟临床血清样本,按逆转录试剂盒说明书将 miRNA 逆转录为 cDNA;取 25 μ L cDNA 与 25 μ L 荧光编码微球混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,利用共聚焦显微镜进行拍摄,观察 DNA 荧光编码微球体系的多重检测能力。

1.3 数据处理 采用 SPSS26.0 软件进行数据分析,共聚焦拍摄结果利用 ImageJ 软件进行分析。

2 结 果

2.1 基于 DNA 荧光编码微球技术的多重 miRNA 检测原理 经典的 HCR 由触发链(T 链)和处于亚稳态的发夹链(H 链)构成,其中,T 链用于打破 H 链的亚稳态平衡,引发各发夹链之间的级联反应,从而产生具有重复结构的长双链 DNA 结构。基于上述基本原理,笔者尝试将 HCR 体系的设计规则转换为计算机语言,以此来替代人工设计,实现问题的快速、高质量求解,相关计算机辅助设计(CAD)的程序语言在本团队的前期研究工作中呈现,在其设计的序列库中笔者对应选择 T 链和 HCR 发夹体系^[17-18]。以 HCR 技术为核心辅以荧光编码,可以突破通量限制,本研究创新性地拓展了杂交链式反应体系,构建了由四条发夹链建立的 qHCR,在 T 链 DNA 触发下,启动杂交链式反应,当 H2 发夹打开后,会进一步诱导 H3 打开,再诱导 H4 打开,随后接替诱导 H1 打开,最终在四条发夹结构之间交替进行,形成 T-(H1-H2-H3-H4)_n 的杂交结构,实现基于 DNA 荧光编码的微球技术(图 1A、B)。

将该 DNA 荧光编码微球应用于 HB 相关 miRNA 多重检测,具体可分为信号转换、信号编码和信号解码 3 个过程(图 1C)。具体地,在输入 miRNA 序列后,通过逆转录将信号转换为其互补序列,并进一步

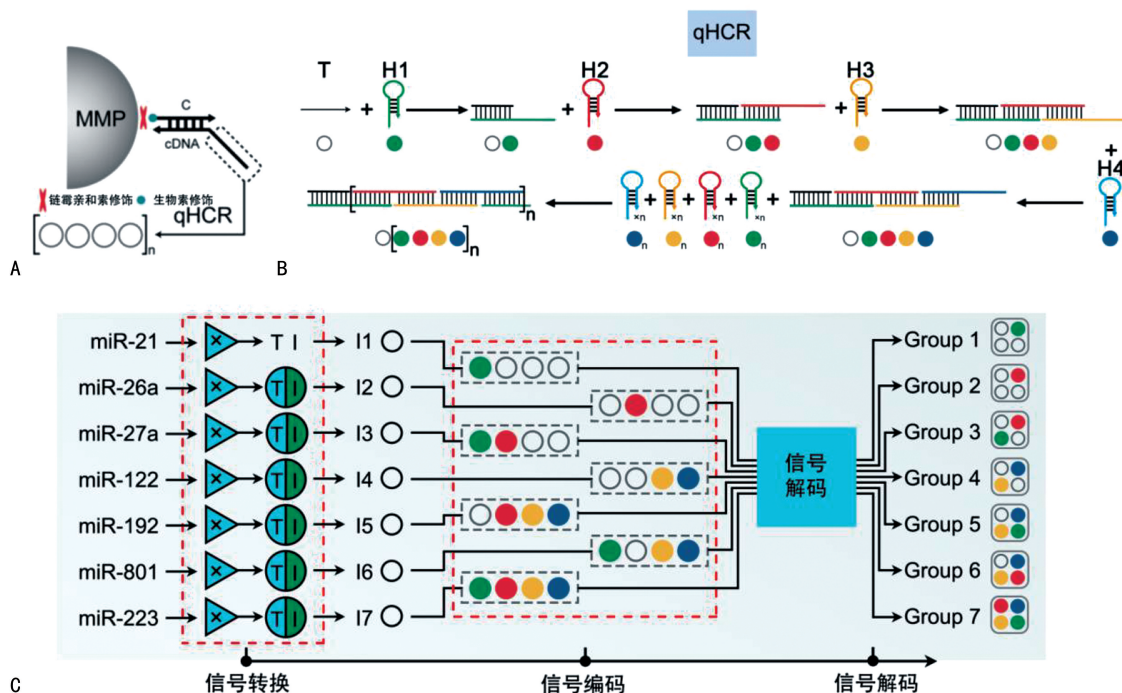
触发 HCR 编码,通过后续的图像解读实现信号解码。该 DNA 荧光编码微球技术可以为自下而上构建、靶标响应放大和精确控制的颜色编码系统提供理论框架。其次,CAD 可以提高序列的设计精度和降低设计复杂度。最后,为了提高特异性和稳定性,选择具有分子内二级结构的发夹序列作为编码元件。总体来说,通过利用基于 CAD 的 DNA 自组装,DNA 荧光编码微球技术可以在 4 种荧光通道内实现多种不同的颜色编码结果,达到同时多重检测的目的。

2.2 DNA 荧光编码微球的性能表征 本研究在磁珠界面进行 qHCR 荧光编码的应用,通过对 4 条 H 链修饰不同的荧光基团,利用颜色编码可获得不同的组合。理论上,单色分别有红 R/黄 Y/绿 G/蓝 B 4 种组合,四色则仅有红黄绿蓝 1 种组合。对于双色和三色编码,需要额外的比例排列。对于从 G、R、Y 和 B 4 种颜色中选择的双色编码组合,总共存在 6 种可能性,即 GR、GY、GB、RY、RB 和 YB。每种双色编码组合根据比例可以进一步划分为 3:1、2:1、1:1、1:2 和 1:3 的 5 种子集,因此总共出现了 $6 \times 5 = 30$ 种编码。类似地,三色编码有 4 种可能性,即 GRY、GRB、GYB 和 RYB。而每种三色编码组合根据比例可分为 1:1:1、2:1:1、1:2:1 和 1:1:2 的 4 种可能性,总共 $4 \times 4 = 16$ 种编码。综合上述各种可能性,可知笔者所构建的 DNA 荧光编码微球可以获取 $4 + 1 + 30 + 16 = 51$ 种编码组合,可以满足大多数应用的需求。在此,笔者分别选择单编码至四编码的不同颜色组合情况进行了可行性和特异性分析。如图 2 所示,激光共聚焦显微镜下可见微球表面荧光分布均匀,无局部聚集,共聚焦成像图中可以准确反映各编码组别下的情况,表明编码稳定性良好。仅在正确触发链存在下可以发生 HCR 反应,即各组 qHCR 表现出高度的正交性。上述结果表明 DNA 荧光编码微球技术构建成功,且表现出高度的反应特异性和编码可行性,为后续多重研究提供基础。

2.3 DNA 荧光编码微球技术的检测性能 进一步地,本研究发现 DNA 荧光编码微球技术在检测性能评估中展现出优异的分析特性,尤其在定量准确度和灵敏度方面表现突出。以目标分析物 miRNA 浓度(X,单位:pmol/L)为横坐标、检测体系的荧光信号强度(Y,单位:相对荧光值)为纵坐标进行线性回归分析,得到回归方程为 $Y = 0.001319 \times X + 0.1596$,决定系数 $R^2 > 0.97$,表明在检测范围内(10 ~ 500 pmol/L)荧光信号强度与目标物浓度呈现高度线性相关,定量结果具有可靠的稳定性和一致性,可满足临床样本中宽浓度范围的精准定量需求(图 3)。该技术的检测灵敏度同样显著,通过计算 3 倍信噪比(3SD)确定其检出限低至 1.99 pmol/L。这一灵敏度水平

远优于传统酶链免疫吸附试验(通常在 nmol/L 级别),甚至优于部分常规 qPCR 检测体系,能够有效捕

捉临床样本中低丰度目标标志物的表达变化,为疾病的早期诊断和微小病灶监测提供了关键技术支撑。



注:A为荧光编码微球示例图;B为 qHCR 反应原理示意图;C为多重 miRNA 检测信号编码与解码示意图。

图 1 基于 DNA 荧光编码微球技术的多重 miRNA 检测原理示意图

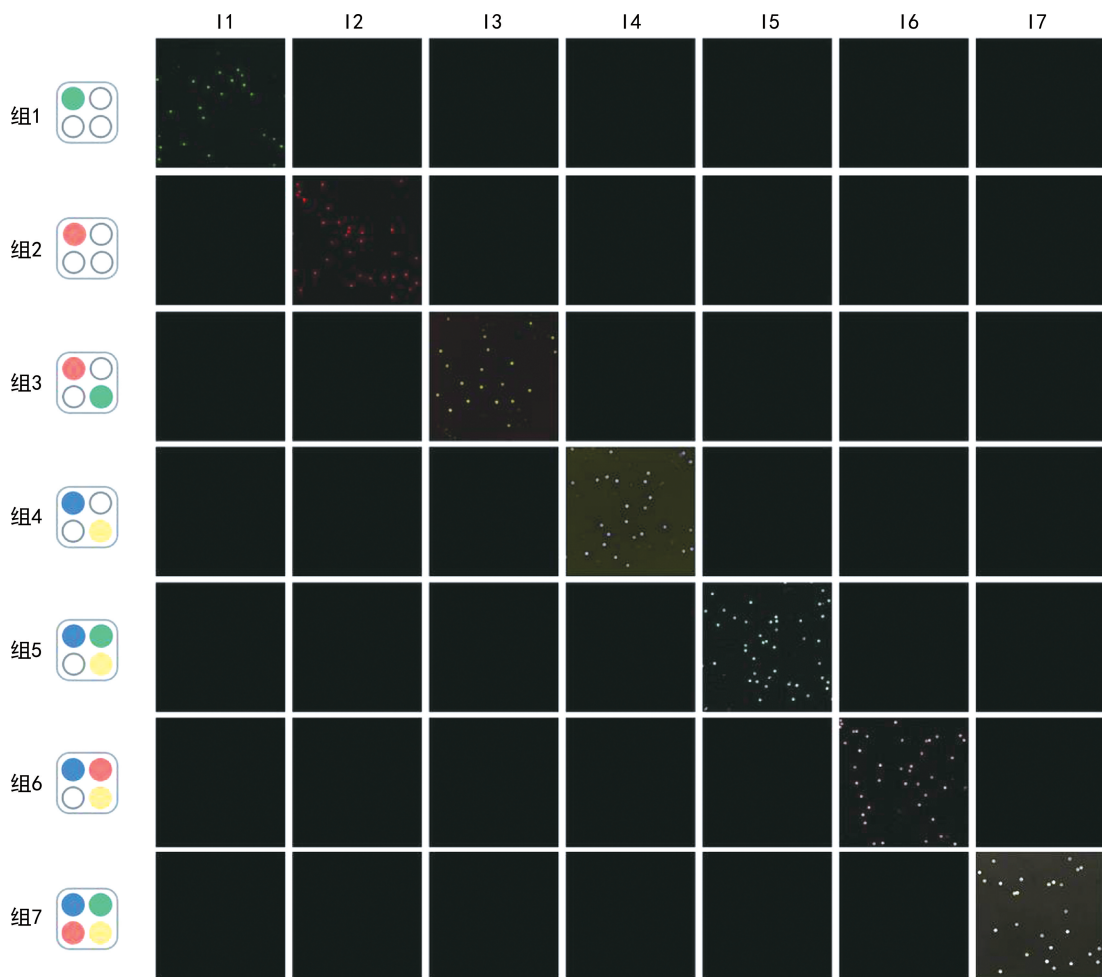


图 2 基于 DNA 荧光编码微球技术的可行性和正交性分析

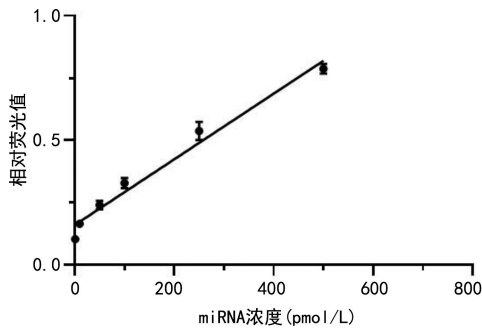
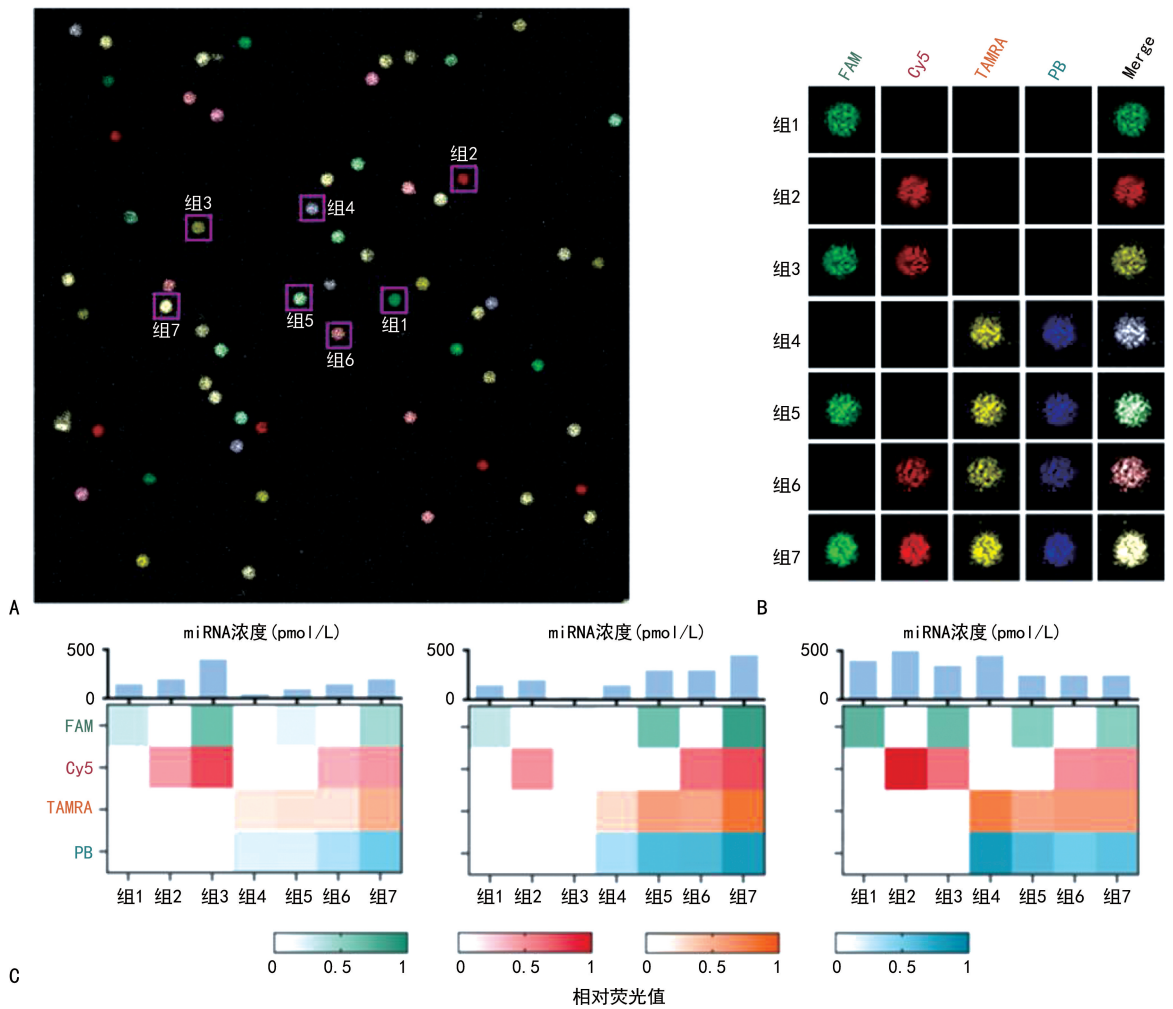


图 3 DNA 荧光编码微球技术的工作浓度曲线

2.4 DNA 荧光编码微球技术用于 HB miRNA 多重检测 最后,本研究以 HB 相关的 7 种 miRNA (miR-21、miR-26a、miR-27a、miR-122、miR-192、miR-801、miR-223)为靶标,与胎牛血清混合,模拟临床血清样本,利用 DNA 荧光编码微球技术进行观察,分别用单编码至四编码的不同组合进行标记:miR-21 (FAM)、miR-26a (Cy5)、miR-27a (FAM+Cy5)、miR-

122 (TAMRA + PB)、miR-192 (FAM + TAMRA + PB)、miR-801 (Cy5 + TAMRA + PB)、miR-223 (FAM+Cy5+TAMRA+PB),依次对应组 1~7。在进行靶标与触发信号之间的识别转换后,利用四荧光通道成像,成功拍摄出带有多种不同组合颜色标识的磁珠形态,即可以在视野中同时获取 7 种 miRNA 的检测情况(图 4A、B)。举例来说,如果一个标本为 [miR-21(+),miR-26a(+),miR-27a(-)],则通过拍摄会得到绿色和红色两种编码微球结果(对应图 4 的组 1 和 2),若另外一个标本为 [miR-21(-),miR-26a(-),miR-27a(+)],则通过拍摄会得到黄色编码微球结果(对应图 4 的组 3)。进一步地,设定不同的 miRNA 浓度在同一混合体系下,通过编码可以进行荧光的相对分析,根据浓度曲线可以反映 miRNA 的不同浓度,检测结果与实际情况保持一致(图 4C)。



注:A 为基于 DNA 荧光编码微球技术用于 7 种 miRNA 同时成像的荧光图;B 为 7 种 miRNA 的荧光编码微球实际荧光图,组 1 为 miR-21、组 2 为 miR-26a、组 3 为 miR-27a、组 4 为 miR-122、组 5 为 miR-192、组 6 为 miR-801、组 7 为 miR-223;C 为 DNA 荧光编码微球技术对混合体系下不同浓度 7 种 miRNA 的定量分析。

图 4 基于 DNA 荧光编码微球技术的 7 种 miRNA 同时成像分析

3 讨 论

本研究开发了一种基于 DNA 荧光编码的微球技术,利用计算机辅助设计构建新型杂交链式反应 qH-CR,具有三大优势:(1)编码多样性,通过 Loop/Stem 序列的精准设计,实现多种荧光编码,远超传统双色编码,可满足更多靶标的多重检测需求;(2)信号稳定性,四色荧光探针的茎区序列相似度 ≤ 6 nt,荧光基团使用广泛稳定,解决了量子点微球易渗漏、荧光波动的技术瓶颈;(3)操作简便性,无需酶促反应,37 °C 恒温孵育 1.5 h 即可完成检测,适配临床实验室常规设备。进一步检测性能评估显示,该方法的检出限为 1.99 pmol/L,显著低于传统 qPCR 法(约 10 pmol/L)。此外,该技术采用磁性微球作为载体,可有效排除血清中蛋白质、脂质的干扰,进一步验证了其临床适用性。

当然,本研究仍存在一定局限性,例如目前仅在血清模拟样本中进行分析,后续需扩大中心临床实际样本验证方法的普适性,并需结合 HB 患儿的临床分期、预后数据,进一步验证该方法在病情监测中的价值。

综上所述,基于 DNA 荧光编码微球的多重 miRNA 检测技术具有高灵敏度、高特异性及多重分析能力,为 HB 的分子诊断提供了新的技术平台,有望在儿童肝脏肿瘤的精准诊疗中推广应用。

参考文献

[1] PIO L, O'NEILL A F, WOODLEY H, et al. Hepatoblastoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11:36.

[2] GYUGOS M, LENDVAI G, KENESSEY I, et al. MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma[J]. Virchows Arch, 2014, 464(4):419-427.

[3] DE LA CRUZ-OJEDA P, PARRAS-MARTÍNEZ E, REY-PÉREZ R, et al. In silico analysis of lncRNA-miRNA-mRNA signatures related to Sorafenib effectiveness in liver cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2025, 31(3):95207.

[4] NASIMI SHAD A, AKHLAGHIPOUR I, ALSHAKARCHI H I, et al. Role of microRNA-363 during tumor progression and invasion [J]. J Physiol Biochem, 2024, 80(3):481-499.

[5] LIU L, WANG L, LI X, et al. Effect of miR-21 on apoptosis in hepatoblastoma cell through activating ASPP2/p38 signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):3729-3736.

[6] YUAN M X, JI C Y, GAO H Q, et al. lncRNA TUG1 regulates angiogenesis via the miR-204-5p/JAK2/STAT 3 axis in

hepatoblastoma[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2):77.

- [7] AWAD A M, DABOUS E, ALALEM M, et al. MicroRNA-141-regulated KLK10 and TNFSF-15 gene expression in hepatoblastoma cells as a novel mechanism in liver carcinogenesis[J]. Sci Rep, 2024, 14(1):13492.
- [8] ALKAILANI M I. Northern blotting of endogenous full-length human-specific LINE-1 RNA [J]. Biol Methods Protoc, 2024, 9(1):bpae036.
- [9] GOUDA M A, GONUGUNTA A, DUMBRAVA E E, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 loss following treatment with trastuzumab deruxtecan in patients with metastatic breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2025, 31(7):1268-1274.
- [10] CLEVELAND M H, HE H J, MILAVEC M, et al. Digital PCR for the characterization of reference materials[J]. Mol Aspects Med, 2024, 96:101256.
- [11] MANZOOR F, TSURGEON C A, GUPTA V. Exploring RNA-seq data analysis through visualization techniques and tools: a systematic review of opportunities and limitations for clinical applications[J]. Bioengineering, 2025, 12(1):56.
- [12] SRINIVASAMURTHY S K, MITTAL P, SALEEM S, et al. Advances in Immunoassays for detection of pancreaticitis biomarkers[J]. Clin Chim Acta, 2026, 578:120492.
- [13] HUANG A, GUO D Z, WANG Y P, et al. Plasma microRNA panel predicts early tumor recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. J Cancer, 2021, 12(23):7190-7200.
- [14] ZHOU J, YU L, GAO X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(36):4781-4788.
- [15] PIRE A, HIRSCH T Z, MORCRETTE G, et al. Mutational signature, cancer driver genes mutations and transcriptomic subgroups predict hepatoblastoma survival [J]. Eur J Cancer, 2024, 200:113583.
- [16] KLUIVER T A, LU Y, SCHUBERT S A, et al. Divergent WNT signaling and drug sensitivity profiles within hepatoblastoma tumors and organoids [J]. Nat Commun, 2024, 15(1):8576.
- [17] LIU X, MAO D, SONG Y, et al. Computer-aided design of reversible hybridization chain reaction (CAD-HCR) enables multiplexed single-cell spatial proteomics imaging [J]. Sci Adv, 2022, 8(2):eabk0133.
- [18] MAO D, TANG X, ZHANG R, et al. DNA-programmed four-bit quaternary fluorescence encoding (FLUCO) enables 51-colored bioimaging analysis[J]. J Am Chem Soc, 2024, 10:1021