

文章编号: 1001-6325(2023)09-1417-06

临床研究

## 血浆 hsa\_circ\_005230 在原发性肝细胞癌诊断和预后评估中的临床价值

依马木买买提江·阿布拉, 帕哈尔丁·白克热, 易超, 佟庆\*

新疆医科大学第三临床医学院肝胆胰外科, 新疆乌鲁木齐 830000

**摘要:**目的 检测原发性肝细胞癌(HCC)血浆中环状RNA(circRNA) hsa\_circ\_005230 表达水平,探讨其在HCC诊断和预后评估的临床价值。方法 利用GEO数据库中的非编码RNA高通量测序数据筛选HCC(癌组织/癌旁组织)的circRNA表达情况。RT-qPCR检测60例HCC、30例乙型肝炎和30名健康人血浆中 hsa\_circ\_005230 表达水平,并分析其与HCC患者临床病理特征的关系。应用受试者工作特征(ROC)曲线评估 hsa\_circ\_005230 诊断HCC的临床价值。应用Kaplan-Meier法进行生存分析,Cox回归进行预后多因素分析。结果 从GEO数据库中筛选出上调表达最明显的为 hsa\_circ\_005230, HCC患者血浆中 hsa\_circ\_005230 表达水平显著高于乙型肝炎组和健康人组( $P<0.01$ ); Hsa\_circ\_005230表达的增加值与肿瘤大小( $P<0.05$ )和肿瘤淋巴结转移阶段密切相关( $P<0.01$ ); ROC分析显示,血浆 hsa\_circ\_005230鉴别HCC与健康人的曲线下面积(AUC)为0.69,敏感度为70%,特异度为82%。高 hsa\_circ\_005230水平患者的总生存率显著低于低 hsa\_circ\_005230水平患者。单因素分析显示,甲胎蛋白(AFP)( $P<0.01$ )和 hsa\_circ\_005230( $P<0.01$ )为影响HCC预后的相关因素。Cox多变量分析显示 hsa\_circ\_005230是HCC患者的独立预后指标。结论 Hsa\_circ\_005230可能作为诊断HCC和预后评估的新的生物学标志物。

**关键词:** 肝细胞癌;环状RNA; hsa\_circ\_005230; 诊断; 预后

中图分类号: R622; R73 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.09.1417

## Clinical value of plasma hsa\_circ\_005230 in the diagnosis and prognosis evaluation of primary hepatocellular carcinoma

Yimamaimaitijiang · ABRA, Pakhardin · BAIKERE, YI Chao, TONG Qing\*

Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Third Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

**Abstract: Objective** To detect the expression level of circular RNA (circRNA) hsa\_circ\_005230 in the plasma of primary hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore its clinical value in the diagnosis and prognosis of HCC.

**Methods** The non-coding RNA high-throughput sequencing data in the GEO database was used to screen the circRNA expression in HCC (cancer tissue/paracancerous tissue). RT-qPCR was used to detect hsa\_circ\_005230 in the plasma of 60 HCC patients, 30 hepatitis B patients and 30 healthy people. Expression levels and their relationship with clinicopathological characteristics of HCC patients were evaluated. The receiver operating characteristic (ROC) curve to evaluate the clinical value of hsa\_circ\_005230 in the diagnosis of HCC. Survival analysis was performed by Kaplan-Meier method, and multivariate prognostic analysis was performed by Cox regression. **Results** The most significant up-regulated expression was found in hsa\_circ\_005230 from the GEO database. The expression level of hsa\_circ\_005230 in plasma of HCC patients was significantly higher than that of hepatitis B group and healthy control group ( $P<0.01$ ); The increase of hsa\_circ\_005230 expression was related to tumor size ( $P<0.05$ ) and to the stage of tumor lymph node metastasis ( $P<0.01$ ); ROC analysis showed that the area under the ROC curve (AUC) of plasma hsa\_circ\_005230 in differentiating HCC from healthy people was 0.69, the sensitivity was 70%,

收稿日期: 2022-04-02 修回日期: 2022-11-13

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2020D01C216)

\* 通信作者 (corresponding author): tongqing2001@126.com

and the specificity was 82 %. The overall survival rate of patients with high hsa\_circ\_005230 level was significantly lower than that of patients with low hsa\_circ\_005230 level. Univariate analysis showed that alpha-fetoprotein (AFP) ( $P < 0.01$ ) and hsa\_circ\_005230 ( $P < 0.01$ ) were related factors affecting the prognosis of HCC. Cox multivariate analysis revealed that hsa\_circ\_005230 was an independent prognostic indicator in HCC patients. **Conclusions** The hsa\_circ\_005230 may be used as a new biological marker for the diagnosis and prognostic evaluation of HCC.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; circular RNA; hsa\_circ\_005230; diagnosis; prognosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球最常见的恶性肿瘤, 其 5 年总生存率不到 5%<sup>[1]</sup>。传统上甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 广泛用于 HCC 的临床诊断。但 AFP 的临床诊断价值有限 (尤其是早期诊断)<sup>[2-3]</sup>。因此揭示 HCC 发生的机制, 并探索新的靶点或生物标志物, 对 HCC 的早期诊断和治疗有重要意义。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 广泛存在于血液、脑脊液、尿液等体液中, 由于其特殊的稳定结构, 已成为竞争性内源性 RNA 研究的最新焦点<sup>[4]</sup>。研究证实, circRNA 通过调节多生物过程如增殖、侵袭和分化等影响疾病的进展<sup>[5]</sup>。如 circ\_0001649 和 circ-MTO1 可作为 HCC 进展相关的生物标志物<sup>[6]</sup>。前期研究发现, hsa\_circ\_005230 显著高表达于 HCC 癌组织中 (未发表)。因此, 本研究旨在检测 hsa\_circ\_005230 在 HCC 血浆中的表达水平, 探讨其在 HCC 诊断及预后评估的临床价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象: 该研究经新疆医科大学第三附属医院伦理委员会批准, 所有实验程序均根据赫尔辛基原则宣言进行。收集 2016 年 1 月至 2016 年 5 月在新疆医科大学第三附属医院诊治的行 HCC 切除术且病理诊断为 HCC 的患者共 60 例, 患者术前均未接受放射治疗和化学治疗 (放化疗), 收集 60 例患者术前的空腹静脉血, 随访至 2021 年 6 月。同时期健康人群和乙型肝炎人群各 30 名/例。所有患者均在入组前知情, 并在收集患者样本进行实验前签署知情同意书。

1.1.2 试剂: RNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); GoScript 反转录 (RT) 试剂盒, GoTaq qPCR Master 试剂 (普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司); hsa\_circ\_005230 (靶基因), 甘油醛 3-磷酸脱氢酶

(GAPDH, 内参基因) 引物 (上海生工生物有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 HCC 组织中 circRNA 表达谱分析: 首先从美国国立生物技术信息中心公共数据平台 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE94508>) 下载基因芯片数据集, 下载完成后借助 limma 包对上述所查询出的数据进行标准化处理。使用 R 语言 DESeq2 包基于贝叶斯函数鉴定数据集的差异表达 circRNA。差异基因需满足以下条件:  $\log_{2}FC$  绝对值  $> 1$ ,  $P < 0.05$ , 所得的差异基因用火山图进行可视化处理。

1.2.2 血液及组织样本采集: 用含 EDTA 抗凝剂的采血管空腹从所有受试者获得的静脉血样品, 4 °C 静置一夜后, 16 000×g 离心 10 min 后分离得到血浆。相邻正常和 HCC 组织分离后 -80 °C 保存直至使用。

1.2.3 RT-qPCR 检测 mRNA: 按照试剂盒说明书提取血液和组织中的总 RNA。SmartSpecPlus 分光光度计 (Bio-Rad, Hercules, CA) 测量总 RNA 样品的浓度和纯度。按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA: 包括 2 μg 总 RNA、1 μL 随机引物、1 μL oligo (dT) 15 引物、2 μL MgCl<sub>2</sub>、4 μL GoScript 5× reaction buffer、1 μL 核苷酸混合物、0.5 μL 重组 RNasin ribonuclease 和 1 μL GoScript 反转录酶, 42 °C 孵育 1 h。在 Mx3005P 实时 PCR 系统上使用 GoTaq qPCR Master (Promega) 进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。引物使用 Primer5 (<http://www-genome.wi.mit.edu>) 设计并由生工生物技术公司合成。引物序列如下: hsa\_circ\_005230 (靶基因): 5'-TCAACCTTTTGCC CCACACT-3' 和 5'-AAGACACGTCTGTGTGTGT-3'; GAPDH, 5'-TCGA CAGTCAGCCGCATCTCTTT-3' 和 5'-ACCAAATCCGTT GACTCCGACCTT-3'。通过熔解曲线分析确认扩增特异性。RT-qPCR 的数据通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行分析。

### 1.3 统计学分析

数据结果以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。通过

Statistical Product and Service Solutions (SPSS) 16.0 软件包 (IBM, Chicago, IL) 和 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, LaJolla, CA) 中的 Student's *t* 检验或单因素方差分析评估组间的定量数据差异。通过 Fisher 精确检验评估 hsa\_circ\_005230 表达与临床特征之间的关系。根据 HCC 血浆中 hsa\_circ\_005230 表达中位值将所有患者分为高和低表达组, 通过单变量和多变量分析分析了 hsa\_circ\_005230 的预后价值。建立受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线以评估诊断能力。

## 2 结果

### 2.1 HCC 组织中 circRNA 表达谱分析

6 个配对的人类 HCC 和肿瘤旁组织组间差异表达的具有统计学意义的 circRNA (图 1A)。HCC 组织和肿瘤旁组织之间的 circRNA 表达模式有显著差异。共发现 316 个 circRNA 表达变化超过两倍。其中, 在肿瘤组织中上调和下调 circRNA 分别为 185 个和 131 个 (图 1B)。列出了 (表 1), 其中上调表达最明显的为 hsa\_circ\_005230。

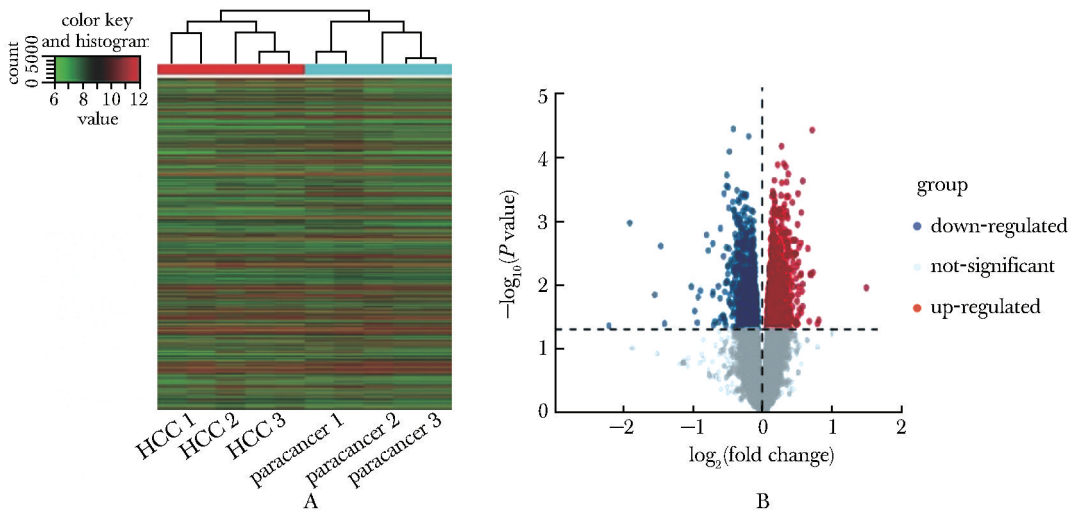


图 1 HCC 及癌旁组织差异 circRNAs 筛选

Fig 1 Screening of differential circRNAs in HCC and adjacent tissues

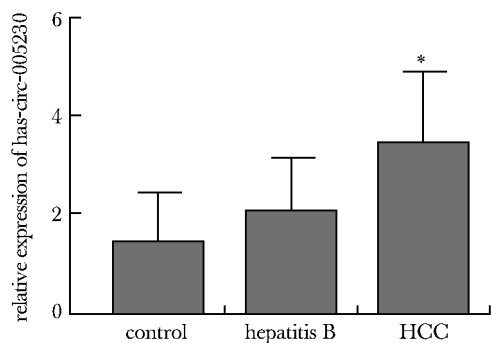
表 1 HCC 组织中前 20 位上调和下调 circRNAs 信息

Table 1 Information of the top 20 up- and down-regulated circRNAs in HCC tissues

gene name	logFC	P value	gene name	logFC	P value
hsa_circ_005230	12.34083976	1.99E-59	hsa_circ_0007976	-7.743929472	2.59E-05
hsa_circ_0003060	11.13184308	9.98E-38	hsa_circ_0046964	-7.391445495	7.28E-05
hsa_circ_0005657	8.544439643	8.19E-11	hsa_circ_0057908	-7.110448478	0.000181231
hsa_circ_0017615	7.956154119	5.31E-07	hsa_circ_0004439	-7.06009967	0.000185511
hsa_circ_0004846	8.140521898	2.87E-06	hsa_circ_0006288	-7.090377937	0.00019625
hsa_circ_0007282	7.048131085	0.000289826	hsa_circ_0007961	-6.943011567	0.000241038
hsa_circ_0027862	6.9573909	0.000309241	hsa_circ_0008764	-7.010086333	0.000253507
hsa_circ_0001647	4.490927671	0.000362005	hsa_circ_0073659	-6.997533256	0.000270997
hsa_circ_0002104	6.736422582	0.000433341	hsa_circ_0065230	-7.100584092	0.000307278
hsa_circ_0060263	6.782335702	0.000516428	hsa_circ_0057553	-6.988858465	0.00035157
hsa_circ_0023736	6.730744216	0.000555709	hsa_circ_0061774	-6.865610428	0.000458742
hsa_circ_0002473	3.951044465	0.000618706	hsa_circ_0078210	-6.971793348	0.00051519
hsa_circ_0048687	6.867049806	0.00064231	hsa_circ_0005229	-6.79336975	0.000546123
hsa_circ_0008668	6.818583783	0.000693807	hsa_circ_0000378	-1.774527202	0.000557572
hsa_circ_0023275	6.610351117	0.00070505	hsa_circ_0003579	-6.73081106	0.000629516
hsa_circ_0013587	6.508006236	0.000718586	hsa_circ_0004817	-6.876931763	0.000689366
hsa_circ_0006132	1.65980133	0.000728751	hsa_circ_0037897	-6.499802746	0.000700422
hsa_circ_0065617	6.686151773	0.000752421	hsa_circ_0019240	-6.738144642	0.000714032
hsa_circ_0009105	6.366485007	0.000972775	hsa_circ_0002658	-6.508949059	0.000810554
hsa_circ_0069191	6.366484963	0.00097662	hsa_circ_0088023	-6.57338499	0.000824345

## 2.2 不同分组血浆中 hsa\_circ\_005230 的表达水平

HCC 患者血浆中 hsa\_circ\_005230 表达水平显著高于乙型肝炎组和健康人组 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。



\* $P < 0.01$  compared with control and hepatitis B group.

图 2 Hsa\_circ\_005230 在 HCC、乙型肝炎和健康人中表达

Fig 2 Hsa\_circ\_005230 is expressed in HCC, hepatitis B and healthy people ( $\bar{x} \pm s, n = 30/30/60$ )

## 2.3 血浆 hsa\_circ\_005230 表达水平与 HCC 临床病理特征的相关性

Hsa\_circ\_005230 表达的增加与肿瘤大小 ( $P < 0.05$ ) 和肿瘤淋巴结转移阶段 ( $P < 0.01$ ) 密切相关。其他临床特征,如吸烟状况、酒精性肝硬化、乙型肝炎病毒感染、甲胎蛋白水平和分化程度,与 hsa\_circ\_005230 表达无关 (表 2)。

## 2.4 血浆 hsa\_circ\_005230 的诊断价值

HCC 区别于健康人的 ROC 曲线结果显示, AUC 为 0.69, 敏感度为 70%, 特异度为 82%, 表明 hsa\_circ\_005230 具有较好的临床诊断 HCC 的价值 (图 3)。

## 2.5 血浆 hsa\_circ\_005230 的预后价值

高 hsa\_circ\_005230 水平患者的 5 年总生存率显著低于低 hsa\_circ\_005230 水平患者 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

## 2.6 HCC 患者总生存时间预后因素的单变量和多变量分析

单因素分析显示, AFP ( $P < 0.05$ ) 和 hsa\_circ\_005230 ( $P < 0.01$ ) 为影响 HCC 预后的相关因素。Cox 多变量分析影响 HCC 预后的相关因素, 结果显示 hsa\_circ\_005230 是 HCC 患者的独立风险预后指标 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

## 3 讨论

肝细胞癌是世界范围内最常见的肝脏恶性肿瘤

表 2 HCC 患者 hsa\_circ\_005230 的表达及临床病理特征  
Table 2 Expression and clinicopathological characteristics of hsa\_circ\_005230 in HCC patients

clinicopathological features	case (n = 60)	hsa_circ_005230 expression		P value
		high	low	
gender				
man	35	19	16	0.520
woman	25	10	15	
age/year				
<60	24	13	10	0.148
≥60	36	16	20	
smoking status				
smoking	34	19	15	0.252
no smoking	26	10	16	
alcoholic cirrhosis				
present	17	9	8	0.981
absent	43	20	23	
HBV infection				
positive	23	14	9	0.280
negative	37	17	20	
tumor size/cm				
≤5	38*	19	17	<b>0.011</b>
>5	22	10	12	
TNM stage				
I - II	38*	20	26	<b>0.005</b>
III - IV	22	9	13	
AFP (ng/mL)				
positive	46	20	26	0.354
negative	14	9	5	
differentiation grade				
well/moderate	35	18	17	0.257
poor/undifferentiated	25	11	14	

Abbreviations: AFP. alpha-fetoprotein; hsa\_circ\_005230. hsa\_circular\_005230; HCC. hepatocellular carcinoma; HBV. hepatitis B virus; TNM. tumor lymph node metastasis; \* $P < 0.05$  compared with tumor size >5 or TNM stage III - IV.

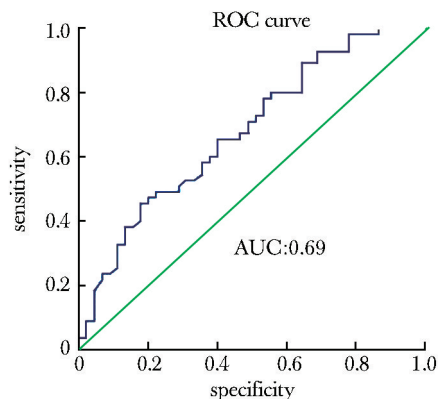


图 3 Hsa\_circ\_005230 诊断原发性肝细胞癌的临床价值  
Fig 3 Clinical value of hsa\_circ\_005230 in the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma

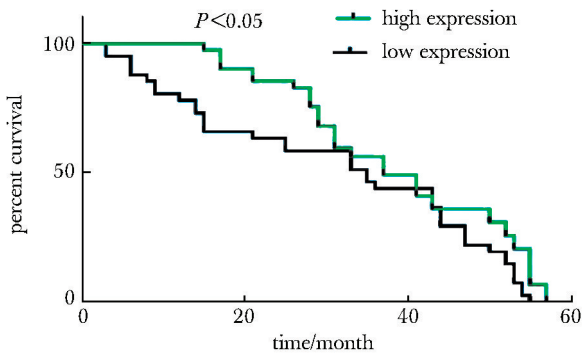


图 4 Hsa\_circ\_005230 表达水平与 HCC 患者预后生存时间的关系

Fig 4 Relationship between the expression level of hsa\_circ\_005230 and the prognosis and survival time of HCC patients

之一,病死率较高<sup>[7]</sup>。尽管现有的临床干预措施,包括手术和栓塞治疗,显著提高了治疗效果,但高水平的复发和转移仍然是基础和临床领域的挑战<sup>[8]</sup>。因此,探索肝癌发生的机制变得越来越迫切。最新研究表明,circRNA 在基因组中广泛转录,并与人类疾病相关。CircRNA 以复杂的组织、细胞或发育阶段特异性方式表达,可能作为人类癌的潜在生物标志物发挥作用。如 circ-0000502、circ-PRMT5、circ-SPINK1、circ-0103552 和 Circs-7 分别被报道有希望成为成骨肉瘤、膀胱癌、HCC、乳腺癌、和结直肠癌的预后生物标志物<sup>[9-12]</sup>。

本研究通过生物信息学方法分析揭示了 6 个配

对的人类 HCC 和肿瘤旁组织中的 circRNA 表达谱。结果显示 HCC 样本中的 circRNA 表达水平与癌旁组织不同,在 3 对肝细胞癌患者样本中进行比较和分析,结果肿瘤组织中上调最明显的 circRNA 为 hsa\_circ\_005230。研究证实,hsa\_circ\_005230 是从基因 DN3OS (DNM3 对链/反义 RNA,基因 ID: 10062831) 剪接而来,该基因产生一种非编码 RNA (ncRNA),参与 miR-199a2 和 miR-214 的形成。已有的报道证实了这些 miRNA 在肝细胞癌中表达下调<sup>[13]</sup>。

由于 circRNA 是无末端的,其对传统 RNA 降解途径的消化具有抵抗力,故作为疾病诊断和监测的生物标志物更加可靠<sup>[14]</sup>。AFP 是肝细胞癌监测和诊断中最常用的血清检测方法。但大量临床研究表明,即使以 10~20μg/L 作为 AFP 临界值,诊断敏感性也在 60%左右<sup>[15]</sup>。本研究中血浆 hsa\_circ\_005230 的诊断价值分析,敏感度和特异性为 70%和 82%。这些结果表明,hsa\_circ\_005230 具有更好的临床诊断 HCC 的价值。进一步对 hsa\_circ\_005230 作为 HCC 潜在的诊断及预后分子标志物进行了初步评价,结果显示血浆 hsa\_circ\_005230 在用于区别 HCC 与乙型肝炎及健康人时,具有较好的诊断价值。预血浆 hsa\_circ\_005230 高表达后分析发现,hsa\_circ\_005230 和 AFP 是影响 HCC 患者预后的独立危险因素,患者的总生存时间显著短于低表达患者。这些数据表明 hsa\_circ\_005230 是 HCC 中

表 3 HCC 患者总生存时间预后因素的单变量和多变量分析

Table 3 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors for overall survival time in HCC patients

parameter	single factor analysis			multifactor analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
gender (male vs female)	0.871	0.461-1.578	0.837			
age/year(≥60 vs <60)	0.814	0.448-1.421	0.650			
smoking status (smoking vs no smoking)	1.138	0.575-1.778	0.504			
alcoholic cirrhosis (present vs absent)	1.001	0.528-1.893	0.861			
HBV infection (positive vs negative)	1.064	0.550-1.667	0.668			
tumor size (>5 vs ≤5)	0.940	0.458-1.480	0.737			
TNM stage(III-IV vs I-II)	1.855	1.083-3.157	0.492			
AFP (positive vs negative)*	0.775	0.505-1.562	<b>0.009</b>			0.345
differentiation grade (poorly/undifferentiated vs well/moderately)	1.004	0.471-1.556	0.823			
hsa_circ_005230expression (high vs low)*	2.252	1.360-3.785	<b>0.002</b>	1.827	1.021-3.471	<b>0.035</b>

AFP. alpha-fetoprotein; HBV. hepatitis B virus; HR. Hazard ratio.

失调的 circRNA,可能与 HCC 的发病机制密切相关。

综上所述,hsa\_circ\_005230 不仅可能成为肝细

胞癌诊断的潜在生物标志物,而且在肝癌的发生和转移过程中可能发挥作用。

### 参考文献:

- [1] Yang L, Song C, Chen Y, *et al.* Circular RNA circ\_0103552 forecasts dismal prognosis and promotes breast cancer cell proliferation and invasion by sponging miR-1236[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120:15553-15560.
- [2] Zhao M, Dong G, Meng Q, *et al.* Circ\_OMER1 enhances the inhibition of miR22 on CXCL6 to regulate the growth and aggressiveness of hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121:4440-4449.
- [3] Afrin R, Arumugam S, Rahman A, *et al.* Curcumin ameliorates liver damage and progression of NASH in NASH-HCC mouse model possibly by modulating HMGB1-NF- $\kappa$ B translocation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44:174-182.
- [4] Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, *et al.* CircRNA: a novel type of biomarker for cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018, 25:1-7.
- [5] 赵钰珊,冀梦蝶,董昱诚,等.肝细胞癌中 EZH2 基因相关的表观遗传调控机制[J].*基础医学与临床*,2022, 42:864-870.
- [6] Yao T, Chen Q, Fu L, *et al.* Circular RNAs: biogenesis, properties, roles, and their relationships with liver diseases[J]. *Hepatol Res*, 2017, 47:497-504.
- [7] Meng S, Zhou H, Feng Z, *et al.* CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16:94-101.
- [8] 黄海良,丁伟伟,李冬雪. CRNDE 过表达促进人肝癌细胞系 HepG2 增殖和迁移[J].*基础医学与临床*, 2020, 40:219-223.
- [9] Qi H, Sun Y, Jiang Y, *et al.* Upregulation of circular RNA circ\_0000502 predicts unfavorable prognosis in osteosarcoma and facilitates cell progression via sponging miR-1238[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 5:11-19.
- [10] Zhang LW, Wang B, Yang JX, *et al.* Circ-PRMT5 stimulates migration in esophageal cancer by binding miR-203[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24:9965-9972.
- [11] Yang L, Song C, Chen Y, *et al.* Circular RNA circ\_0103552 forecasts dismal prognosis and promotes breast cancer cell proliferation and invasion by sponging miR-1236[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120:15553-15560.
- [12] Shen GQ, Girelli D, Li L, *et al.* A novel molecular diagnostic marker for familial and early-onset coronary artery disease and myocardial infarction in the LRP8 gene.[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7:514-520.
- [13] Shaohang, Cai, Zejin, *et al.* Risk factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis B patient with component of metabolic syndrome:[J]. *United European Gastroenterol J*, 2018, 6:558-566.
- [14] Frisk P, Aggefors K, Cars T, *et al.* Introduction of the second-generation direct-acting antivirals ( DAAs ) in chronic hepatitis C: a register-based study in Sweden[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2018, 74:971-978.
- [15] Mónica G, Sandra G, Miguel HK, *et al.* Differential roles, crosstalk and response to the antifungal protein AfpB in the three mitogen-activated protein kinases ( MAPK ) pathways of the citrus postharvest pathogen *penicillium digitatum*. [J]. *Fungal Genet Biol*, 2018, 124: 17-28.