

文章编号:1000-5404(2013)20-2191-04

论著

## HBx 介导 miR-221 上调-ER $\alpha$ 下调致 HepG2 细胞恶性增殖

陈娟娟,艾剑刚,黄世峰,曹 炬,张莉萍 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科)

**[摘要]** 目的 探讨 microRNA221(miR-221)在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染相关性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的促癌功能以及 HBV 基因编码的 X 蛋白(HBx)诱导 miR-221 上调促进 HepG2 细胞异常增殖的分子机制。方法 重组 HBx 腺病毒(Ad-HBx)感染人肝癌 HepG2 细胞,荧光定量 PCR 检测 HepG2-HBx 细胞中 miR-221 和 ER $\alpha$  mRNA 表达的变化;流式细胞术检测细胞周期,Western blot 检测雌激素受体  $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )蛋白表达水平变化,分别用 miR-221 mimic 和 miR-221 inhibitor 转染 HepG2 细胞后,荧光定量 PCR 检测 HepG2-HBx 细胞中 miR-221 和 ER $\alpha$  mRNA 表达变化;Western blot 检测 ER $\alpha$  蛋白水平表达变化。结果 RT-PCR 实验证实,adv-HBx 感染 HepG2 细胞后,HBx 在 HepG2 细胞中高效表达;感染 48 h 后,HBx 蛋白可显著上调 miR-221 [(495.84  $\pm$  61.16) vs (239.25  $\pm$  21.15),  $P < 0.05$ ]并抑制 ER $\alpha$  蛋白 [(0.24  $\pm$  0.01) vs (0.61  $\pm$  0.02),  $P < 0.05$ ]的表达水平,同时促进 HepG2 细胞异常增殖 [(31.73  $\pm$  3.53)% vs (56.08  $\pm$  1.56)%,  $P = 0.01$ ]。miRNA 转染实验及 Western blot 证实:miR-221 抑制 ER $\alpha$  蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ),miR-221 抑制剂促进 ER $\alpha$  蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。结论 HBx 可能通过上调 miR-221 进而下调 ER $\alpha$  对肝癌的保护性效应而促进肝癌细胞异常增殖,靶向 miR-221 的策略具有抑制肝癌细胞增殖的治疗潜能。

**[关键词]** HBx 蛋白;miR-221;雌激素受体  $\alpha$ ;HepG2 细胞;增殖

**[中图分类号]** R394.3;R730.23;R735.7

**[文献标志码]** A

## HBx protein-induced up-regulation of miR-221 promotes HepG2 cell malignant proliferation by targeting ER $\alpha$

Chen Juanjuan, Ai Jiangang, Huang Shifeng, Cao Ju, Zhang Liping (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanisms that microRNA221 (miR-221) promotes cancer development in hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC) as well as HBx protein promotes HepG2 cells aberrant proliferation through up-regulation of miR-221. **Methods** Recombinant adenovirus with HBx gene (adv-HBx) was used to transfect HepG2 cells. The changes of miR-221 and estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) mRNA were validated by real-time fluorescence quantitative PCR, and the protein levels of ER $\alpha$  were quantified by Western blotting. Cell cycle was detected by flow cytometry. miR-221 mimic and miR-221 inhibitor were used to transfect HepG2 cells respectively. The changes of miR-221 and ER $\alpha$  mRNA in HBx-HepG2 cells were determined by real-time fluorescence quantitative PCR, and ER $\alpha$  protein levels were quantified by Western blotting. **Results** RT-PCR results confirmed that HBx was highly expressed in HepG2 cells after adv-HBx transfection. In 48 h after transfection, HBx protein enhanced the expression of miR-221 (495.84  $\pm$  61.16 vs 239.25  $\pm$  21.15,  $P < 0.05$ ), decreased ER $\alpha$  at protein level (0.24  $\pm$  0.01 vs 0.61  $\pm$  0.02,  $P < 0.05$ ), and promoted aberrant proliferation of HepG2 cells [(31.73  $\pm$  3.53)% vs (56.08  $\pm$  1.56)%,  $P = 0.01$ ]. Cell transfection and Western blotting results indicated that miR-221 decreased the expression of ER $\alpha$  protein ( $P < 0.05$ ) while miR-221 inhibitor increased it ( $P < 0.05$ ), which suggested that ER $\alpha$  might be an important target of miR-221. **Conclusion** HBx may decrease the protective effects of ER $\alpha$  against HCC by up-regulation of miR-221, and then promote aberrant proliferation of hepatocarcinoma cells. miR-221 may be a potential target for hepatocarcinoma therapy.

**[Key words]** HBx protein; miR-221; estrogen receptor  $\alpha$ ; HepG2 cells; malignant proliferation

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81071621,30973378,81101826,81272545);国家临床重点专科建设项目[财社(2010)305号];重庆市自然科学基金(2010BB5390);重庆市卫生局课题(2010-2-090)

**[通信作者]** 张莉萍,E-mail:Liuzhangcq@yahoo.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1557.017.html>(2013-06-19)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071621, 30973378, 81101826, 81272545), the Construction Project of National Clinical Key Subject (2010-305), the Natural Science Foundation of Chongqing (2010BB5390) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-090). Corresponding author: Zhang Liping, E-mail: Liuzhangcq@yahoo.com

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)与肝细胞肝癌发生的关系密切,是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生的主要危险因素之一<sup>[1]</sup>。在我国,慢性HBV感染已成为HCC的首要原因,各种遗传学和表观遗传学失调均可致HBV感染相关性肝癌<sup>[2-3]</sup>。HBV基因编码的X蛋白(HBx)作为HBV最重要的致癌蛋白之一,具有调节转录、影响细胞增殖、介导细胞凋亡等多种功能,在HBV感染致癌过程中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>,但其具体分子机制尚未明了。因此,深入理解HBx致癌机制是控制HBV感染致癌的关键因素。

HCC的发生具有明显的性别偏好:男性HCC的发生率高于女性,HCC在男性和女性的发生率之比为1.5~11:1,HCC发生中明显的性别偏好被认为部分与雌激素对HCC的保护性效应有关<sup>[7]</sup>,且这种保护作用需在雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导下才能完成。相关研究显示,雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )是雌激素发挥对HCC保护性效应的ER亚型<sup>[8]</sup>。ER $\alpha$ 还可与HBV病毒基因相互作用:ER $\alpha$ 可通过肝细胞核因子-4 $\alpha$ (HNF-4 $\alpha$ )抑制HBV基因的转录,而HBV编码的X蛋白又可以一种浓度依赖的方式降低ER $\alpha$ 转录活性<sup>[9-10]</sup>。此外,研究发现口服避孕药或者绝经后采用激素替代疗法的女性HBV携带者,发展成HCC的风险降低<sup>[11]</sup>。

MicroRNA(miRNA)是一类长20~25个核苷酸的非编码RNA,通过结合于靶基因mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)、降解其mRNA或抑制其翻译而负调控基因表达<sup>[12-13]</sup>。越来越多的研究结果提示,HBV感染相关性HCC中HBV的存在与miRNA异常表达显著相关<sup>[14]</sup>。新近研究报道了HBx蛋白与miRNA失调之间的相关性<sup>[3]</sup>,提示致癌性或抑瘤性miRNA功能失调与HBV感染相关性HCC的发生、发展密切相关。此外已有研究证实miR-221可通过与ER $\alpha$  mRNA 3'-UTR结合而在转录后水平上下调乳腺癌细胞内ER $\alpha$ 的表达<sup>[15-16]</sup>。

本实验拟通过HBx腺病毒感染HepG2细胞,观察miR-221和ER $\alpha$ 表达的变化,探讨HBV感染相关性肝癌的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌细胞株(HepG2)由香港中文大学陶谦教授惠赠。MEM细胞培养基和胎牛血清均购自美国HyClone公司,HBx腺

病毒(PFU为 $1.0 \times 10^{11}$ )、对照蛋白GFP(含荧光标签,PFU为 $1.25 \times 10^{11}$ )由上海生博医学生物工程科技有限公司合成,总RNA提取试剂盒购自Promega公司,SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II及ROX Reference Dye II购自TaKaRa公司,PCR引物在上海英俊公司合成。PI(Propidium Iodide, )染液及RNase A(RNA酶A)购自Sigma公司,ER $\alpha$ 一抗购自美国R&D公司,microRNA提取试剂盒、microRNA反转录试剂盒、TaqMan MicroRNA Assays检测试剂盒及TaqMan Gene Expression Master Mix II购自Life Technologies<sup>™</sup>公司,miR-221 mimic、mimic negative、miR-221 inhibitor、inhibitor negative及转染试剂(HiPerFect Transfection Reagent)购自QIAGEN公司。

### 1.2 细胞培养和HBx腺病毒感染HepG2细胞

HepG2细胞用含10%胎牛血清的MEM培养基,于含5%CO<sub>2</sub>、37℃孵箱培养。每孔 $1.5 \times 10^5$ 细胞铺6孔板,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养24h后按操作说明进行细胞感染,48h后观察感染GFP组细胞荧光蛋白表达情况,推测感染效率并进行后续实验。

### 1.3 RNA提取和RT-PCR检测HBx mRNA的表达

分别提取HBx腺病毒、GFP对照腺病毒感染及空白对照(简称CO组)HepG2细胞的总RNA,进行RT-PCR。引物由Primer 5软件设计,内参基因GAPDH的上游引物:5'-GAGT-CAACGGATTGGTCGT-3',下游引物:5'-TTGATTTTGGAGG-GATCTCG-3',产物长度为217 bp。HBx基因上游引物:5'-AC-CGACCTTGAGGCCTACTT-3',下游引物:5'-GCTTGGCAGAGGT-GAAAAAG-3',产物长度为179 bp。提取总RNA,进行RT-PCR。PCR反应条件:95℃预变性,5 min;94℃,30 s;60℃,30 s;72℃,30 s,共35个循环,72℃,10 min。

### 1.4 流式细胞仪检测HBx腺病毒对HepG2细胞增殖

收集感染HBx腺病毒、对照GFP腺病毒及CO组HepG2细胞,1×PBS洗2次后,70%预冷的乙醇4℃固定过夜。上机前弃去乙醇,1×PBS洗2次细胞,加入含50 μg/mL PI(碘化丙啶)、100 μg/mL RNase A(RNA酶A,现加)的1×PBS 500 μL,混匀,4℃避光孵育30 min。用BD流式细胞仪检测,通过Modifit软件分析计算细胞各个时期的百分率,通常计数 $2 \times 10^4$ 细胞。

### 1.5 荧光定量PCR检测ER $\alpha$ mRNA的表达

荧光定量PCR的内参引物同上面RT-PCR,ER $\alpha$ 的引物由Primer 5软件设计,ER $\alpha$ 的上游序列:5'-GCACCCT-GAAGTCTCTGGA-3',下游序列5'-GATGTGGGAGAGGATGAG-GA-3'。先将RNA反转录成cDNA,反转录条件:37℃,15 min,85℃,5 s。然后进行荧光定量PCR,PCR反应条件:95℃,30 s;95℃,5 s;60℃,34 s;40个循环。

### 1.6 microRNA提取和荧光定量PCR检测miR-221的表达

分别提取HBx腺病毒、GFP对照腺病毒感染及CO组HepG2细胞的microRNA并进行microRNA的反转录,反转录条

件如下:16℃, 30 min;42℃, 30 min;85℃, 5 min;然后用ABI Prism7500型荧光定量PCR仪进行荧光定量PCR扩增,条件如下:95℃, 10 min;95℃, 15 s;60℃, 60 s;40个循环。PCR反应结束后,分析各组miR-221和U6的Ct值,最后数据用 $2^{-\Delta Ct}$ ( $\Delta Ct$ =目的基因miR-221的Ct值-内参U6的Ct值)法分析miR-221的相对表达。

### 1.7 Western blot 检测感染前后 ER $\alpha$ 蛋白表达情况

收集感染HBx腺病毒、对照GFP腺病毒及CO组HepG2细胞的总蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,然后进行Western blot。分别用鼠抗人ER $\alpha$ (4:10 000)和山羊抗鼠二抗(1:3 500)经化学发光法检测ER $\alpha$ 蛋白表达情况。

### 1.8 miR-221 mimic 和 inhibitor 转染 HepG2 细胞并检测 ER $\alpha$ 蛋白表达

HepG2细胞以每孔 $3 \times 10^5$ 细胞铺6孔板,铺板后立即进行HepG2细胞转染,按照转染试剂说明书6  $\mu$ L转染试剂+4.5  $\mu$ L miRNA(miRNA终浓度为2  $\mu$ mol/L),分别转染miR-221 mimic、mimic negative、miR-221 inhibitor、inhibitor negative,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养48 h后,提取细胞总蛋白,Western blot检测ER $\alpha$ 蛋白表达情况。

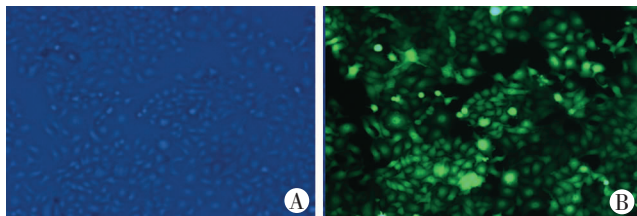
### 1.9 统计学分析

所有的实验至少重复3次,实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,两实验组均数比较用成组t检验,3组实验组均数的比较用方差分析及q检验,所有的统计学分析均在SPSS 17.0软件上进行。

## 2 结果

### 2.1 腺病毒感染效果及观察 HBx 在 HepG2 细胞中的表达

GFP对照腺病毒感染HepG2细胞48 h后,荧光显微镜下观察发现细胞感染效率在85%以上(图1)。

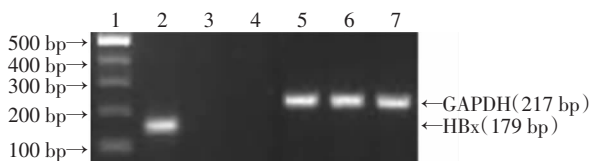


A:普通光镜观察;B:荧光观察

图1 重组腺病毒感染 HepG2 细胞 48 h 后显微观察 ( $\times 100$ )

### 2.2 HBx 在 HepG2 细胞内的表达

RT-PCR证实HBx腺病毒感染后,HBx mRNA(0.80  $\pm$  0.02)在HepG2细胞内高效表达,结果见图2。



1:标准;2:HepG2-HBx mRNA;3:HepG2-GFP;4:HepG2;5~7:GAPDH

图2 RT-PCR 检测 HBx mRNA 在 HepG2 中的表达

### 2.3 HBx 腺病毒对 HepG2 细胞周期的调控

HBx和GFP腺病毒感染HepG2 48 h后,BD流式细胞仪检

测发现:与CO组细胞比,感染GFP腺病毒的细胞G<sub>1</sub>期无明显变化,G<sub>2</sub>期无明显变化,S期也无明显变化( $P > 0.05$ )。由此可知,对照腺病毒对HepG2细胞周期的变化无影响,从而排除腺病毒本身对细胞周期的影响;与GFP感染组相比,感染HBx腺病毒的细胞S期明显增加( $P < 0.05$ ),G<sub>1</sub>期明显减少( $P < 0.05$ ),而G<sub>2</sub>期无变化,提示HBx可促进肝癌细胞增殖,结果见表1。

表1 HBx 腺病毒对 HepG2 细胞周期的影响 [n=18, ( $\bar{x} \pm s$ ) %]

组别	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	S
HBx 组	35.92 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	8.00 $\pm$ 0.00	56.08 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>
GFP 组	60.34 $\pm$ 3.41	8.00 $\pm$ 0.00	31.73 $\pm$ 3.53
CO 组	59.61 $\pm$ 2.59	7.97 $\pm$ 0.05	32.41 $\pm$ 1.48

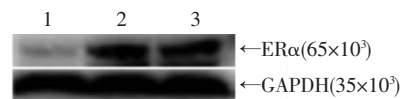
a:  $P < 0.05$ , 与 GFP 组比较

### 2.4 HBx 腺病毒感染促进 miR-221 表达

HBx和GFP腺病毒分别感染HepG2细胞后,经FQ-PCR检测证实,GFP腺病毒感染组(239.25  $\pm$  21.15)与CO组(206.50  $\pm$  37.84)miR-221的表达无明显变化( $P > 0.05$ ),从而可以排除腺病毒本身对miR-221表达的影响;HBx腺病毒感染组miR-221的表达明显高于GFP腺病毒感染组[(495.84  $\pm$  61.16) vs (239.25  $\pm$  21.15),  $P < 0.05$ ]。

### 2.5 HBx 腺病毒感染抑制 ER $\alpha$ 在蛋白水平的表达变化

HBx、GFP腺病毒感染后,GFP组[(3.34  $\pm$  0.91)  $\times 10^{-5}$ ] 和CO组[(4.71  $\pm$  0.97)  $\times 10^{-5}$ ],HBx组[(4.38  $\pm$  0.85)  $\times 10^{-5}$ ]细胞ER $\alpha$ 在mRNA水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而Western blot检测发现HBx抑制ER $\alpha$ 在蛋白水平的表达[(0.24  $\pm$  0.01) vs (0.61  $\pm$  0.02),  $P < 0.05$ ],结果见图3。

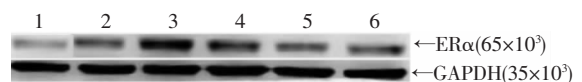


1:HepG2-HBx;2:HepG2-GFP;3:HepG2

图3 Western blot 检测 HBx 腺病毒转染 HepG2 细胞后 ER $\alpha$  在蛋白水平的表达

### 2.6 miR-221 的 mimic 和 inhibitor 转染前后 ER $\alpha$ 的表达变化

miR-221 mimic 转染 HepG2 细胞后,ER $\alpha$  在蛋白水平表达下调[(0.20  $\pm$  0.15) vs (0.02  $\pm$  0.04),  $P < 0.05$ ],转染 miR-221 inhibitor 后,ER $\alpha$  在蛋白水平表达上调[(0.61  $\pm$  0.03) vs (0.41  $\pm$  0.02),  $P < 0.05$ ]。见图4。



1:miR-221 模拟物;2:miR-221 模拟物阴性对照;3:miR-221 抑制剂;4:miR-221 抑制剂阴性对照;5:转染试剂对照;6:空白对照

图4 转染 miR-221 的 mimic 和 inhibitor 后 ER $\alpha$  的表达

## 3 讨论

本研究结果提示,HBx蛋白可上调miR-221并抑制ER $\alpha$ 蛋白的表达,miRNA转染实验进一步提示:ER $\alpha$ 可能是miR-221的一个重要靶基因。此外,感染HBx腺病毒可显著促进HepG2细胞由G<sub>1</sub>期向S期进

展,提示 HBx 可能通过上调 miR-221 进而下调 ER $\alpha$  对肝癌的保护性效应而促进肝癌细胞异常增殖,靶向 miR-221 的策略具有抑制肝癌细胞增殖的治疗潜能。

本研究结果提示,重组 HBx 腺病毒感染 HepG2 细胞后可促进细胞发生 G<sub>1</sub>~S 期进展,提示 HBx 蛋白可通过某种途径促进 HepG2 细胞增殖,这与先前报道的 HBx 蛋白通过抑制 miR-148a 表达促进 HepG2 细胞异常增殖<sup>[3]</sup>的结果是一致的。本研究进一步证实:HBx 蛋白可上调 miR-221 的表达。鉴于已有研究证实:人 HCC 中 miR-221/222 表达上调;miR-221 过表达可促进肝肿瘤发生,同时在 HepG2 细胞中,过表达的 miR-221 促进 HepG2 细胞的增殖<sup>[17]</sup>;而胆固醇修饰的 anti-miR-221 则可抑制 HCC 细胞增殖、促进其凋亡,并延长 HCC 小鼠生存期<sup>[18]</sup>。我们推测:HBx 蛋白可能通过上调 miR-221 的表达诱导 HepG2 细胞发生恶性增殖而促进肝癌发生、发展。

后续实验进一步证实:重组 HBx 腺病毒感染 HepG2 细胞后可下调 ER $\alpha$  蛋白表达,这与前期的研究报道 HBx 可以一种浓度依赖的方式下调 ER $\alpha$  的表达是一致的<sup>[11]</sup>。我们推测:在 HBx 诱导肝癌发生、发展的过程中,HBx 蛋白可能通过某种途径抑制 ER $\alpha$  蛋白的表达,通过抑制 ER $\alpha$  蛋白对肝癌的保护作用而促进肝癌发生。进一步通过靶基因预测软件分析得知,ER $\alpha$  基因 mRNA 3'-UTR 上含有两个 miR-221 结合位点,而来自美国国立癌症研究所的实验也证实,miR-221 可通过与 ER $\alpha$  mRNA 3'-UTR 结合而在转录后水平上下调 ER $\alpha$  表达,通过促进 G<sub>1</sub>~S 进展而加速 ER $\alpha$  阳性乳腺癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>。由此我们推测:在 HepG2 细胞中 ER $\alpha$  可能是 miR-221 的一个重要靶基因。后续实验进一步证实,miR-221 mimic 可在蛋白水平上下调 ER $\alpha$  的表达,而 miR-221 inhibitor 可上调 ER $\alpha$  蛋白表达水平。以上结果提示:在肝癌细胞中,miR-221 可能调节 ER $\alpha$  表达。miR-221 可能通过与 ER $\alpha$  的 3'-UTR 相结合而阻碍 ER $\alpha$  翻译,从而使 ER $\alpha$  在蛋白水平上表达下调,但关于 miR-221 下调 ER $\alpha$  蛋白表达的具体机制仍有待进一步研究。

本研究在细胞水平证明了 HBx 可通过诱导 miR-221 表达而下调 ER $\alpha$  表达,从而可能通过下调 ER $\alpha$  对肝癌的保护性效应而促进肝癌发生。本研究结果为进一步研究 HBV 感染相关性 HCC 的发生机制提供了一个新的切入点,同时也为 HBV 感染相关 HCC 的分子治疗策略提供了潜在的靶点。

#### 参考文献:

[1] Perz J F, Armstrong G L, Farrington L A, *et al.* The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary

liver cancer worldwide[J]. *J Hepatol*, 2006, 45(4): 529-538.

[2] Zhao J, Wu G, Bu F, *et al.* Epigenetic silencing of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region-containing protein 1 (ASPP1) and ASPP2 genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 142-153.

[3] Xu X, Fan Z, Kang L, *et al.* Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 630-645.

[4] Bouchard M J, Schneider R J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(23): 12725-12734.

[5] Neuveut C, Wei Y, Buendia M A. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2010, 52(4): 594-604.

[6] Ng S A, Lee C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(8): 974-990.

[7] Yeh S H, Chen P J. Gender disparity of hepatocellular carcinoma; the roles of sex hormones[J]. *Oncology*, 2010, 78(Suppl 1): 172-179.

[8] Naugler W E, Sakurai T, Kim S, *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. *Science*, 2007, 317(5834): 121-124.

[9] Wang S H, Yeh S H, Lin W H, *et al.* Estrogen receptor  $\alpha$  represses transcription of HBV genes via interaction with hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 989-998.

[10] Han J, Ding L, Yuan B, *et al.* Hepatitis B virus X protein and the estrogen receptor variant lacking exon 5 inhibit estrogen receptor signaling in hepatoma cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(10): 3095-3106.

[11] Hwang G Y, Lin C Y, Huang L M, *et al.* Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5598-5603.

[12] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857-866.

[13] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.

[14] Huang J, Wang Y, Guo Y, *et al.* Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1[J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 60-67.

[15] Zhao J J, Lin J, Yang H, *et al.* MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45): 31079-31086.

[16] Di-Leva G, Gasparini P, Piovan C, *et al.* MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(10): 706-721.

[17] Pineau P, Volinia S, McJunkin K, *et al.* miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1): 264-269.

[18] Park J K, Kogure T, Nuovo G J, *et al.* miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24): 7608-7616.

(收稿:2013-04-08;修回:2013-05-21)

(编辑 张 维)