

文章编号:1000-5404(2013)20-2191-04

论著

HBx 介导 miR-221 上调-ER α 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 α 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 α (estrogen receptor α , ER α)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 α mRNA 表达变化;Western blot 检测 ER α 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 α 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 α 蛋白的表达 ($P < 0.05$),miR-221 抑制剂促进 ER α 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。结论 HBx 可能通过上调 miR-221 进而下调 ER α 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 α ;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 α

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 α (ER α) mRNA were validated by real-time fluorescence quantitative PCR, and the protein levels of ER α 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 α mRNA in HBx-HepG2 cells were determined by real-time fluorescence quantitative PCR, and ER α 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 α 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 α protein ($P < 0.05$) while miR-221 inhibitor increased it ($P < 0.05$), which suggested that ER α might be an important target of miR-221. **Conclusion** HBx may decrease the protective effects of ER α 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 α ; 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^[1]。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^[2-3]。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^[4-6],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^[7],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 α (ER α)是雌激素发挥对HCC保护性效应的ER亚型^[8]。ER α 还可与HBV病毒基因相互作用:ER α 可通过肝细胞核因子-4 α (HNF-4 α)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 α 转录活性^[9-10]。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^[11]。

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^[12-13]。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^[14]。新近研究报道了HBx蛋白与miRNA失调之间的相关性^[3],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 α mRNA 3'-UTR结合而在转录后水平上下调乳腺癌细胞内ER α 的表达^[15-16]。

本实验拟通过HBx腺病毒感染HepG2细胞,观察miR-221和ER α 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 1.0×10^{11})、对照蛋白GFP(含荧光标签,PFU为 1.25×10^{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[®] Premix Ex Taq[™] 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 α 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[™]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%CO₂、37℃孵箱培养。每孔 1.5×10^5 细胞铺6孔板,5%CO₂、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 2×10^4 细胞。

1.5 荧光定量PCR检测ER α mRNA的表达

荧光定量PCR的内参引物同上面RT-PCR,ER α 的引物由Primer 5软件设计,ER α 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 $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{目的基因 miR-221 的 Ct 值} - \text{内参 U6 的 Ct 值}$) 法分析 miR-221 的相对表达。

1.7 Western blot 检测感染前后 ER α 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 α (4:10 000) 和山羊抗鼠二抗 (1:3 500) 经化学发光法检测 ER α 蛋白表达情况。

1.8 miR-221 mimic 和 inhibitor 转染 HepG2 细胞并检测 ER α 蛋白表达

HepG2 细胞以每孔 3×10^5 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 μL 转染试剂 + 4.5 μL miRNA (miRNA 终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$), 分别转染 miR-221 mimic、mimic negative、miR-221 inhibitor、inhibitor negative, 5% CO $_2$ 、37℃ 培养 48 h 后,提取细胞总蛋白,Western blot 检测 ER α 蛋白表达情况。

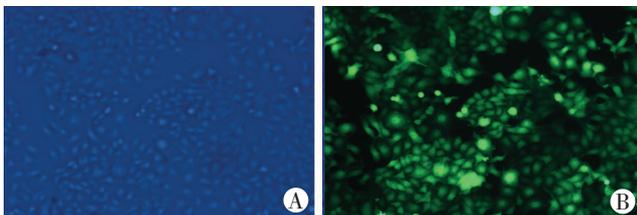
1.9 统计学分析

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)。

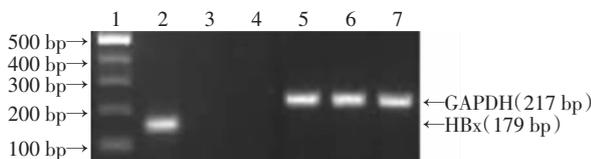


A: 普通光镜观察; B: 荧光观察

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 $_1$ 期无明显变化,G $_2$ 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 $_1$ 期明显减少 ($P < 0.05$),而 G $_2$ 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 $_1$	G $_2$	S
HBx 组	35.92 \pm 1.56 ^a	8.00 \pm 0.00	56.08 \pm 1.56 ^a
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

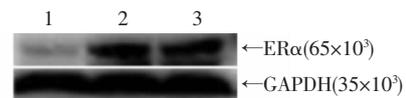
a: $P < 0.05$, 与 GFP 组比较

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 α 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 α 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 α 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。

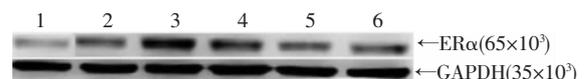


1: HepG2-HBx; 2: HepG2-GFP; 3: HepG2

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

2.6 miR-221 的 mimic 和 inhibitor 转染前后 ER α 的表达变化

miR-221 mimic 转染 HepG2 细胞后,ER α 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 α 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 α 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 α 蛋白的表达,miRNA 转染实验进一步提示:ER α 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 $_1$ 期向 S 期进

展,提示 HBx 可能通过上调 miR-221 进而下调 ER α 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 G₁~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^[3]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^[17];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^[18]。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 α 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 α 的表达是一致的^[11]。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 α 蛋白的表达,通过抑制 ER α 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 α 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 α mRNA 3'-UTR 结合而在转录后水平上下调 ER α 表达,通过促进 G₁~S 进展而加速 ER α 阳性乳腺癌细胞的增殖^[16]。由此我们推测:在 HepG2 细胞中 ER α 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 α 的表达,而 miR-221 inhibitor 可上调 ER α 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 α 表达。miR-221 可能通过与 ER α 的 3'-UTR 相结合而阻碍 ER α 翻译,从而使 ER α 在蛋白水平上表达下调,但关于 miR-221 下调 ER α 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 α 表达,从而可能通过下调 ER α 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特异性靶点。

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 α represses transcription of HBV genes via interaction with hepatocyte nuclear factor 4 α [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)