

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.007

· 基础研究 ·

腺病毒介导 microRNA-99a 过表达抑制肝癌细胞生长

张敬磊¹, 金华君², 刘辉¹, 吕赛群², 杨远¹, 傅思源¹, 钱其军², 周伟平¹(1. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 肝外三科, 上海 200438; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 基因与病毒治疗实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 利用腺病毒介导 miRNA-99a(miR-99a)的过表达, 观察 miR-99a 对肝癌细胞生长的抑制作用, 探讨一种腺病毒介导 miRNA 治疗肿瘤的新方法。 **方法:** qRT-PCR 检测正常肝细胞系 L-02 和肝癌细胞系 HepG2、SMMC-7721、Hep3B 和 Huh7 细胞中 miR-99a 的表达, 构建含 miR-99a 的重组 5 型腺病毒 Ad5-miR-99a。用空载腺病毒 Ad-blank 和 Ad5-miR-99a 分别感染 Huh7 细胞, MTT 法和集落形成实验检测 miR-99a 过表达对 Huh7 细胞生长的抑制作用。 **结果:** 与正常肝细胞 L02 和其他肝癌细胞相比, miR-99a 在肝癌 Huh7 细胞中表达量相对最低($P < 0.01$)。成功构建重组腺病毒 Ad5-miR-99a, Ad5-miR-99a 感染 Huh7 细胞后, miR-99a 可在 Huh7 细胞中稳定高表达。集落形成实验和 MTT 实验显示, 相对于 Ad-blank 组, Ad5-miR-99a 可显著抑制 Huh7 细胞的生长和集落形成($P < 0.01$)。 **结论:** 成功构建重组腺病毒 Ad5-miR-99a, miR-99a 能有效抑制肝癌细胞的增殖, Ad5-miR-99a 有可能成为治疗肝癌的新药物。

[关键词] miRNA-99a; 5 型腺病毒; 肝细胞癌; 靶向基因治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0267-05

Adenovirus mediated overexpression of miR-99a inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells

ZHANG Jing-lei¹, JIN Hua-jun², LIU Hui¹, LÜ Sai-qun², YANG Yuan¹, FU Si-yuan¹, QIAN Qi-jun², ZHOU Wei-ping¹(1. Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Laboratory of Virus Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of adenovirus-mediated-miR-99a overexpression on proliferation of hepatocellular carcinoma cells (HCCs) and find a new kind of adenovirus mediated miRNA treatment for cancer. **Methods:** The expression of miR-99a was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in human liver cell line L-02 and HCC cell lines HepG2, SMMC-7721, Hep3B and Huh7. The type 5 adenovirus vector containing miR-99 (Ad5-miR-99a) was constructed. Huh7 cells were infected with empty adenovirus vector (Ad-blank) or Ad5-miR-99a, and MTT and colony formation assay were used to examine the inhibitory effect of miR-99a on the growth of Huh7 cells. **Results:** miRNA-99a was markedly decreased in the Huh7 cell line compared with that in L02 cell line ($P < 0.01$). Ad5-miR-99a adenovirus vector was successfully constructed, and miR-99a was stably high expressed in Huh7 cells after infection with Ad5-miR-99a. MTT and colony formation assay showed that Ad5-miR-99a could inhibit the growth and colony formation of Huh7 cells compared with Ad-blank ($P < 0.01$). **Conclusion:** Adenovirus Ad5-miR-99a is successfully constructed, which can effectively suppress the growth of HCC. Ad5-miR-99a might be a prospective therapeutic approach for HCC in the near future.

[Key words] miRNA-99a; Type 5 adenovirus; hepatocellular carcinoma; target gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 267-271]

[基金项目] 国家重大传染病防治科技专项基金资助项目(No. 2008ZX10002-018)。Project supported by the Key Science and Technology Project for the Prevention and Treatment of Major Infectious Diseases of China (No. 2008ZX10002-018)

[作者简介] 张敬磊(1984-),男,山东省聊城市人,硕士,主要从事肝脏肿瘤的临床和基础研究。zhangjinglei2008@126.com

[通信作者] 周伟平(ZHOU Wei-ping, corresponding author), E-mail: ephwp@126.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120529.1520.002.html>

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肿瘤之一,是全球仅次于肺癌和结肠癌的第3大常见癌症死因^[1]。手术切除肝癌是目前已知的治疗肝癌最有效实用的方法^[2],但是只有不到20%的肝癌患者有机会接受手术治疗。放疗和化疗有一定的抑瘤效果,但特异性差,限制了它们的应用范围^[3]。因此,寻求癌症的特异性治疗靶点和开发有效的替代方法治疗肝癌,显得尤为重要。微小RNA(microRNA, miRNA)是生物体内一类由19~25个核苷酸组成的单链非编码小分子RNA,成熟的miRNA会选择性地整合入RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中,形成miRISC复合物,识别靶mRNA 3'-UTR上的靶序列,通过诱导靶mRNA切割降解或抑制其翻译来调节靶基因的表达,在基因表达调控中起重要作用^[4,5]。miRNA的异常表达与肿瘤的发生密切相关,肿瘤细胞在miRNA表达谱上的特异性为肿瘤的诊断提供了一项生物标志物,同时也为调控miRNA表达治疗肿瘤提供了新的靶点^[6,7]。

腺病毒是肿瘤生物治疗的新型载体^[8],至今已有十余种不同类型的病毒先后进入临床试验,但更多的只是处于临床前的动物实验研究^[9]。5型腺病毒是一种十分有效的基因治疗载体,广泛应用于体内体外的基因治疗实验^[10-11],因此本课题选用5型腺病毒作为microRNA-99a(miR-99a)的载体。

miR-99a在舌鳞状细胞癌^[12]、肺癌^[13]、浆膜卵巢癌^[14]、膀胱癌^[15]、儿童肾上腺皮质肿瘤^[16]、前列腺癌^[17]和肝癌^[18]等多种肿瘤中低表达,并且对这些肿瘤的生长有明显的抑制作用。本研究选择在多种肿瘤中低表达的miR-99a,通过重组腺病毒载体使miR-99a在肝癌细胞株Huh7中过表达,研究miR-99a对肝癌细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人胚肾细胞株293细胞(HEK293)和肝癌细胞系HepG2、Hep3B和Huh7从美国ATCC公司购买,人正常肝细胞系L-02(HL-7702)和肝癌细胞系SMC-7721从中国科学院上海细胞生物学研究所购买。以EF1 α 为启动子的载体pDC-329、空载的腺病毒载体Ad-blank均由第二军医大学附属东方肝胆外科医院基因病毒治疗实验室提供。限制性内切酶KpnI、SpeI和XhoI购自NEB公司,胶回收试剂盒购自Macherey-Nagel公司,Lipofectamine 2000试剂盒购自Inxiprogen公司,QIAamp DNA Blood Mini

Kit试剂盒购自Qiagen公司。

1.2 qRT-PCR检测miR-99a在肝癌细胞系的表达

用Qiagen公司的miRNeasy mini kit试剂盒抽提细胞RNA,然后用天根公司的miRcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒,进行逆转录合成cDNA,miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)检测miR-99a在肝癌细胞系的表达,详细步骤见试剂盒使用说明书。以U6作为内参,L02细胞作为对照。miR-99a的上游引物为5'-GCAACCCGTAGATCCGAT-3',下游引物为试剂盒提供。U6的上游引物是5'-GTGGACCGCACAAAGCTCGCT-3',下游引物是5'-TTGTTGAACGGCACTGTGTATAGCA-3'。以相对定量RQ = 2^{- $\Delta\Delta$ CT}为标准比较肝癌细胞与人正常肝细胞系L-02的表达差异,并进行数据分析。

1.3 腺病毒的构建与制备

1.3.1 腺病毒穿梭载体pDC-329-miR-99a的构建与鉴定 以miR-99a在GeneBank中的序列为模板,设计巢式PCR扩增pri-miR-99a的引物,第一对上游引物为5'-GCCATTATCGTGCCATTTAG-3',下游引物为5'-TTGGTTTTCCAGCATAGGTC-3';第二对上游引物为5'-GTCCTCGAGTGAACAAAAGCAGTTCGTG-3',下游引物为5'-GTCACTAGTGAGAATTGAAGCCTGCCTTG-3'(划线部分分别为Xho I和Spe I酶切位点)。以人基因组DNA为模板,通过巢式PCR第一对引物扩增pri-miR-99a的第一段基因片段,再以含有酶切位点的第二对引物扩增出目的片段,扩增产物经Xho I和Spe I酶切,DNA回收试剂盒回收后,将回收产物与经相同酶切回收的pDC-329载体片段16℃过夜连接,连接产物转化E. coli DH5 α 菌株,挑取阳性克隆扩增后提取质粒,通过PCR鉴定重组质粒。鉴定正确的pDC-329-miR-99a由北京六合华大基因科技股份有限公司上海分公司测序,确定目的片段序列及读码框的正确性。

1.3.2 腺病毒Ad5-miR-99a的构建及鉴定 将质粒pDC-329-miR-99a和Lipofectamine 2000试剂共转染至293细胞,共转染后9~14d出现多个病毒空斑,从中挑取3个空斑病毒克隆,即3个5型非增殖型腺病毒Ad5-miR-99a克隆。参考Qiagen公司操作说明,应用QIAamp DNA blood mini kit试剂盒抽提腺病毒DNA后,进一步用2组引物进行PCR法鉴定:一组引物是合成pri-miR-99a基因的第二对引物,用来鉴定pri-miR-99a是否成功重组进病毒;另一组上游引物为5'-GGGCGTAACCGAGTAGATTTG-3',下游引物为5'-TGGAAGATTATCAGC-CAGTAC-3',用来鉴定是否存在野生型病毒。PCR

扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,选取纯度高、特异性高的重组腺病毒克隆,在 293 细胞中进行大量扩增,然后用氯化铯密度梯度离心法纯化病毒,用 50% 组织培养感染剂量法 (TCID₅₀) 测定病毒滴度。

1.4 MTT 法检测 Huh7 细胞的生长

取对数生长期的 Huh7 细胞,铺 96 孔板,每孔 5×10^3 个细胞,37 °C、5% CO₂ 孵箱培养,24 h 后 Huh7 细胞完全贴壁,转染病毒,在指定的时间吸取培养液,每孔加入 10 μl 的 MTT 和 100 μl 无血清培养液,继续培养 4 ~ 6 h,每孔加入 100 μl 含有 10% SDS 的 0.01 mol/L HCl 后,孵箱过夜。以酶标仪测定 570 nm 波长的光密度值,其校正波长为 655 nm。

1.5 细胞集落形成实验检测 Ad5-miR-99a 抑制 Huh7 细胞的增殖

Huh7 细胞 5×10^3 个/孔,悬浮在 1 ml 0.3% 的琼脂糖中,铺在 2 ml 的 0.6% 琼脂糖基底上,用 6 孔板分组培养;每 5 d 更换 1 次培养基;15 d 后用 Leica 公司倒的置显微镜 DMI3000B 拍照。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS18.0 统计学软件,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-99a 在肝癌细胞株的表达

qRT-PCR 检测 miR-99a 在正常肝细胞系 L-02、肝癌细胞系 HepG2、SMMC-7721、Hep3B 和 Huh7 细胞中的表达,结果(图 1)表明,以 L-02 为参照细胞,肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721、Hep3B 和 Huh7 中成熟的 miR-99a 均为低表达 ($P < 0.01$),其中 Huh7 细胞中表达量最低 ($RQ = 0.34 \pm 0.007, P < 0.01$),因此,本课题选取 Huh7 细胞进行下一步的研究。

2.2 重组腺病毒 Ad5-miR-99a 的构建与鉴定

构建病毒穿梭载体 pDC-329-miR-99a,用巢式 PCR 合成 pri-miR-99a 的第 2 对引物进行 PCR,从而鉴定 pri-miR-99a 的表达(图 2A)。同时,测序结果也表明 pri-miR-99a 序列正确,无移码突变。结果表明,重组质粒构建成功,可用于下一步病毒包装。

病毒包装完成后,应用特异性引物分别 PCR 扩增,鉴定重组腺病毒 Ad5-miR-99a 的 3 种单克隆,载体 pDC-329-miR-99a 作为目的基因 pri-miR-99a 的阳性对照。电泳结果(图 2B)显示,Ad5-miR-99a 的 3 种单克隆样品都扩增出目的基因 pri-miR-99a (475 bp);野生型腺病毒 pXC1 作为野生病毒鉴定的阳性

对照(748 bp)。电泳结果(图 2C)显示,Ad5-miR-99a 的单克隆样品 1 和 2 均混杂少量野生病毒,样品 3 无混杂病毒,纯度较高,故选择样品 3 进行大规模扩增重组腺病毒。

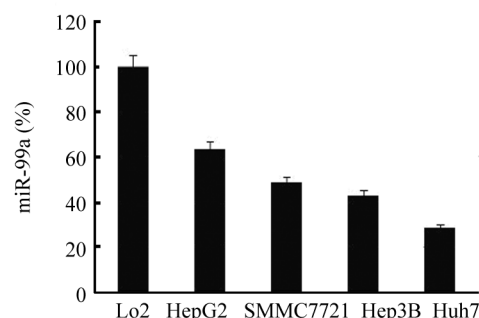


图 1 miR-99a 在肝癌细胞株中的表达

Fig. 1 Expression of miR-99a in HCC cell lines

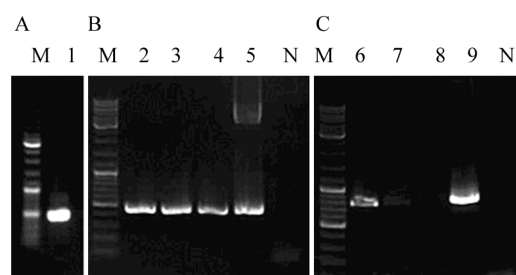


图 2 PCR 鉴定 pDC-329-miR-99a 和 Ad5-miR-99a

Fig. 2 Identification of pDC-329-miR-99a and Ad5-miR99a by PCR

M: Marker; 1: pri-miR-99a; 2, 3, 4: Ad5-miR-99a; 5: pDC-329-miR-99a; N: Negative
6, 7, 8: Ad5-miR-99a; 9: pXC1; N: Ad5-blank

2.3 MTT 法检测 Ad5-miR-99a 对 Huh7 细胞生长的抑制

Ad-blank 和 Ad5-miR-99a 处理肝癌细胞 Huh7, 病毒滴度 MOI 按梯度分为 0、1、2、5、10、20、50、100 和 200, 处理 7 d 后, 比较 Ad-blank 和 Ad5-miR-99a 在相同滴度下对 Huh7 的抑制作用。结果显示(图 3), 7 d 后, 取滴度值 20、50、100 和 200 组, Ad5-miR-99a 组细胞活力显著低于 Ad-blank 组(均 $P < 0.01$), 其中滴度取值 100 和 200 组效果较好。又因 MOI = 200 时, Ad-blank 对 Huh7 细胞也有明显抑制作用, 因此选取 MOI = 100 继续研究 Ad5-miR-99a 对 Huh7 细胞的影响。

在进行 MTT 实验中, 在加入 MTT 溶液前, 选取 MOI = 0 组 (PBS 组) 作为对照, 以 MOI = 100 的 Ad-blank 组和 Ad5-miR-99a 组进行生长状态比较, 在显

显微镜下观察细胞形态,同时拍取照片(×400)。结果(图3)显示,空白对照组细胞状态良好,加入 Ad-blank 对细胞有轻微抑制作用,加入 Ad5-miR-99a 后对细胞有明显的抑制效果。

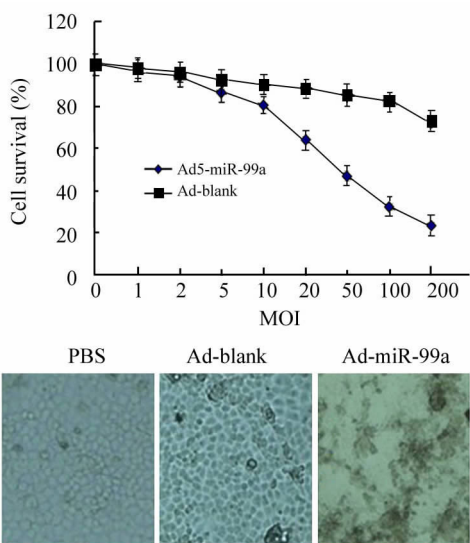


图3 Ad5-miR-99a 抑制肝癌细胞的生长(×400)

Fig.3 Ad5-miR-99a inhibited the growth of HCC cells(×400)

2.4 感染 Ad5-miR-99a 对肝癌细胞中 miR-99a 表达的影响

腺病毒 Ad5-miR-99a(MOI = 100)感染 Huh7 细胞 48 h 后,收集 Huh7 细胞,用 qRT-PCR 检测 miR-99a 的表达量。结果显示,Ad5-miR-99a 可高效率转染肝癌细胞, RQ = 1761.35 ± 23, 显著高于未转染组 (P < 0.01)。

2.5 miR-99a 对肝癌细胞 Huh7 集落形成的影响

分 3 组处理 Huh7 细胞,分别是 PBS 组、Ad-blank(MOI = 100)组和 Ad5-miR-99a(MOI = 100)组,培养 15 d 后观察。结果(图 4)显示,对照 PBS 组 Huh7 细胞集落比较密集,Ad-blank 组 Huh7 细胞集落数稍有减少,Ad5-miR-99a 组 Huh7 细胞集落数有明显减少,说明 miR-99a 可抑制 Huh7 细胞集落的形成。

3 讨论

miRNA 在肝癌的发生发展中具有重要意义。大多数 miRNA 在肝癌中高表达,起着促进肝癌的发生、发展的作用,包括 miR-21、miR-224、miR-23-a ~ 27a ~ 24、miR-17-29、miR-221, miR-146a 和 miR-18a^[19-21]; 其中 miR-21 抑制了 PTEN(phosphatase and tensin homolog)等抑癌基因,从而促进肝癌的发生、发展、侵袭和转移^[22-23], miR-224 和 miR-23a ~

27a ~ 24 的高表达则抑制了肝癌细胞的凋亡^[21]。

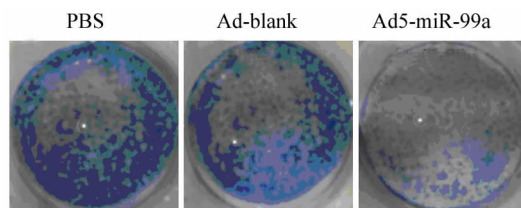


图4 过表达 miR-99a 对 Huh7 细胞集落形成的影响
Fig.4 Effect of miR-99a overexpression on colony formation ability of Huh7 cells

最近报道较多的是在肝癌中低表达的 miRNA, 主要起着抑制肝癌细胞生长的作用, miR-199a/b-3p 靶向调控蛋白激酶 PAK4, 通过调控 PAK4/Raf/MEK/ERK 信号通路, 抑制肝癌的发生、发展^[18]。miR-22 在肝癌组织和细胞中低表达, 并且与肝癌患者预后相关。研究^[24]证实, miR-22 通过靶向调控 HDAC, 抑制肝癌细胞的增殖。miR-99a 与肝癌患者预后相关, 并且通过靶向调控 IGF-R 和 mTOR 抑制肝癌的发生、发展^[25]。miR-375 靶向调控 AEG-1, 从而抑制肝癌细胞的生长^[26]。miR-125b^[27]、miR-1 和 miR-101 等^[28]在肝癌中低表达, 恢复表达后能够抑制肝癌细胞循环周期, 从而抑制其生长。

本课题选择了在肝癌和多种肿瘤细胞中低表达的 miR-99a, 检测了 miR-99a 在多种肝癌细胞株中的表达。通过重组腺病毒 Ad5-miR-99a 感染肝癌细胞株 Huh7, 观察了 miR-99a 对肝癌细胞的抑制作用。与之前关于 miR-99a 在肝癌中研究相比, 本课题采用的 5 型腺病毒具有 II 型启动子 EF1α, 能更稳定地使 miR-99a 在肝癌细胞中长时间高效表达, 有利于基因治疗由细胞实验和动物实验向临床试验的过渡, 为 miR-99a 在临床中应用打下基础。在检测 Ad5-miR-99a 对肝癌细胞的生长抑制方面, 选用了 MTT 实验和细胞集落形成实验, 结果均显示 Ad5-miR-99a 对肝癌细胞的生长具有明显的抑制作用。

综上所述, 本研究证实 Ad5-miR-99a 可以有效抑制肝癌细胞生长, 今后很有可能成为肝癌靶向基因治疗的一种新药物。对于 miR-99a 抑制肝癌细胞生长的机制, 目前尚未完全明确, 本课题将继续深入研究。

[参 考 文 献]

[1] Sia D, Villanueva A. Signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Oncology, 2011, 81(1): 18-23.
 [2] Poon RTP, Fan ST, Wong J, et al. Risk factors, prevention, and

- management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg*, 2000, 232(1): 10.
- [3] Lo CM, Ngan H, Tso WK et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2002, 35(5): 1164-1171.
- [4] Law PTY, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3): 437-449.
- [5] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. *Nucl Ac Res*, 2006, 34(Suppl 1): D140-D144.
- [6] Krutovskikh VA, Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers [J]. *Bioessays*, 2010, 32(10): 894-904.
- [7] Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ, et al. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 543-550.
- [8] Cerullo V, Pesonen S, Diaconu I, et al. Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4297.
- [9] Jin H, Lv S, Yang J, et al. Use of microRNA Let-7 to control the replication specificity of oncolytic adenovirus in hepatocellular carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21307.
- [10] Koski A, Kangasniemi L, Escutenaire S, et al. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GM-CSF [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(10): 1874-1884.
- [11] Dash R, Dmitriev I, Su Z, et al. Enhanced delivery of mda-7/IL-24 using a serotype chimeric adenovirus (Ad. 5/3) improves therapeutic efficacy in low CAR prostate cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(7): 447-456.
- [12] Wong TS, Liu XB, Wong BYH, et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2588-2592.
- [13] Gao W, Shen H, Liu L, et al. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4): 557-566.
- [14] Vaksman O, Stavnes HT, Kærn J, et al. miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(7): 1593-1602.
- [15] Song T, Xia W, Shao N, et al. Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11(4): 905-911.
- [16] Doghman M, Wakil AEL, Cardinaud B, et al. Regulation of IGF-mTOR signalling by miRNA in childhood adrenocortical tumors [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4666-4675.
- [17] Sun D, Lee YS, Malhotra A, et al. miR-99 family of microRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1313-1324.
- [18] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(2): 232-243.
- [19] Wang Y, Lee CG. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: A tool for possible therapeutic intervention? [J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 235-243.
- [20] Huang S, He X, Ding J, et al. Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(4): 972-978.
- [21] 赵越, 贾户亮, 周海军, 等. 肝癌转移相关的微小 RNAs 在不同转移潜能肝癌细胞系的定量研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(7): 526-530.
- [22] Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2): 136-142.
- [23] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 647-658.
- [24] Zhang J, Yang Y, Yang T, et al. MicroRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity [J]. *Brit J Cancer*, 2010, 103(8): 1215-1220.
- [25] Li D, Liu X, Lin L, et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36677-36685.
- [26] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [J]. *J Human Genetics*, 2011, 56(8): 595-601.
- [27] Liang L, Wong CM, Ying Q, et al. MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2 [J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1731-1740.
- [28] Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression [J]. *British J Cancer*, 2010, 104(2): 235-240.

[收稿日期] 2012 - 02 - 23

[修回日期] 2012 - 04 - 13

[本文编辑] 韩丹