

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.006

CCl₄ 诱导大鼠纤维化肝组织 microRNA 差异表达及其初步分析*

刘业方¹, 张传涛², 李白雪¹, 郭尹玲^{1△}, 王宝家¹, 唐洪屈³, 王政¹, 张凤¹, 杨宇¹

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院感染科, 成都 610072; 3. 重庆市垫江县中医院肿瘤科 408300)

[摘要] **目的** 探索 microRNA 在四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠纤维化肝组织中的差异表达及其意义。**方法** 采用 microRNA 高通量测序分析技术检测对照组($n=10$)与模型组($n=10$)肝脏组织 microRNA 表达,对差异 microRNA 进行靶基因预测,对靶基因进行基因本(GO)分析、pathway 分析。**结果** 对照组与模型组间筛选出 37 个差异 microRNA,上调 29 个,下调 8 个;从 microRNA-基因网络图中发现关键上调为 miR-184、miR-10b-5p、miR-199a-3p 等;关键下调为 miR-200b-3p、miR-199a-5p、miR-125b-5p 等。**结论** 模型组 microRNA 表达谱变化明显,肝纤维化的形成与 microRNA 调控细胞增殖、凋亡、细胞周期等有关。

[关键词] 微小 RNA; 肝纤维化; 四氯化碳; 差异表达

[中图分类号] R363; R575

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3473-04

Differentially expressed and preliminary analysis of microRNA profiles in liver tissue of rat induced by carbon tetrachloride*

Liu Yefang¹, Zhang Chuantao², Li Baixue¹, Guo Yinling^{1△},

Wang Baojia¹, Tang Hongqu³, Wang Zheng¹, Zhang Feng¹, Yang Yu¹

(1. Basic Medic Colleges, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China;

2. Department of Infectious, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China; 3. Department of Oncology, Chinese Medical Hospital of Dianjian County, Chongqing 408300 China)

[Abstract] **Objective** To explore the differences of expression profiles and significance of the microRNA in liver tissue of rat induced by carbon tetrachloride(CCl₄). **Methods** The microRNA differential expression analysis between normal group($n=10$) and model group($n=10$) was conducted on high-throughput methods. Gene ontology enrichment analysis and kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway analysis of the targets of miRNA were carried out in this study. **Results** Some differentially expressed microRNA with 29 up-regulated and 8 down-regulated were identified in our study. Through evaluating the value of microRNA in the network, we find that the key microRNA of rising are miR-184, miR-10b-5p, miR-199a-3p, and the key microRNA of cutting are miR-200b-3p, miR-199a-5p, miR-125b-5p and so on. **Conclusion** The microRNA expression level in the model group has a significant change. Therefore, the courses of liver fibrosis is related to some process which microRNA control the regulation of cell proliferation, cell apoptosis, cell cycle, and so on.

[Key words] microRNA; liver fibrosis; carbon tetrachloride; differentially expressed

MicroRNA 是一种大小约 21~23 个碱基的单链小分子 RNA, microRNA 可调控细胞增殖、凋亡、脂代谢/脂肪酸代谢等相关通路,在肝纤维化的发生发展过程中发挥重要作用^[1-2]。肝纤维化发生发展的中心环节是肝星状细胞(HSC)的激活与增殖;microRNA 可协同细胞因子如血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)、过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)等促进 HSC 活化增殖或凋亡,从而绘制成复杂的纤维化调控基因网络图^[3-4],提示 microRNA 可能参与调控 HSC 生物学行为从而影响肝纤维化的发生发展^[5]。因此,本研究采用高通量测序分析技术研究四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠纤维化肝脏中 microRNA 的差异表达及初步功能,旨在揭示肝纤维化发生的机制,为今后开展防治研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用体质量 120 g 左右的 Wistar 雄性大鼠 20 只,由成都中医药大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 橄榄油(分析纯)和 CCl₄(分析纯)购自成都俱进生物技术有限公司;总 miRNA 提取试剂盒(Ca # t, AM1560 Austin TX, US)、单端测序簇生成试剂盒(Illumina, GD-300-2001)、英杰公司 SYBR 金色 II 核苷酸胶体染料(Invitrogen, 719644)、6% 尿素缓冲液聚丙烯酰胺凝胶(Invitrogen, 11041164)、Qubit® dsDNA HS 分析试剂盒(Invitrogen, Q32854)、安捷伦高灵敏度试剂盒(Agilent, 5067-4626)等。

1.1.3 主要仪器 艾本德公司微型离心机(Eppendorf, 5418)、美国 ABI 公司® GeneAmp® 9700 型 PCR 系统、英杰公司 Qubit® 2.0 荧光仪(Invitrogen, Q32866)、Agilent 2100 生物分析仪等。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模 20 只大鼠随机分为对照组($n=10$)及模型组($n=10$)。采用 CCl₄ 复制大鼠肝纤维化动物模型,CCl₄ 与橄榄油之比为 2:5。模型组大鼠首次皮下注射 40% CCl₄ 油剂 0.5 mL/100 g,以后每次皮下注射 40% CCl₄ 油剂 0.2

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373530);教育部博士点基金(20125132120011);四川省教育厅科研项目(132B0321);成都中医药大学校基金(ZRMS201230)。 作者简介:刘业方(1989—),硕士,主要从事中医临床基础温病学研究。 △ 通讯作者, E-mail: 85582190@qq.com。

mL/100 g,每周 2 次,根据体质量调整 CCl₄ 用量;共注射 8 周。
1.2.2 样品采集与处理 取 1.5 cm×1.5 cm×0.2 cm 大小肝组织 2 块,1 块脱蜡 HE 染色;其余肝组织液氮冻存,用于 microRNA 基因测序检测。

1.2.3 microRNA 提取 取肝组织,抽提总 RNA,所得总 RNA 经使用 Qubit[®] 2.0 仪光仪,应用 Qubit[™] dsDNA HS 试剂盒检测文库浓度。质控标准为:对于 Agilent microRNA Chip & qPCR;RIN≥6.0 and 28 s/18 s>0.7;其他:RIN≥7.0 and 28 s/18 s>0.7。

1.2.4 建库测序 使用 small RNA Sample Pre Kit 构建文库,选用 single-read 1×50 nt multiplex 程序进行测序。并对测序结果进行质控。

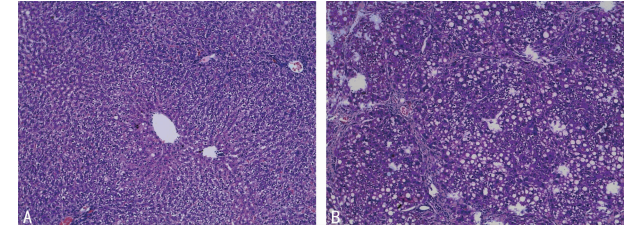
1.2.5 质控情况 测序结果的质控标准为每个样品提供测序后原始 reads(Rawreads)数不少于 5 M;每向碱基质量大于 20 (Q20)的比例不小于 85%(注:Q20 为 bases of Q≥20/all bases of sequencing)。

1.2.6 测序数据分析 (1)对样本小 RNA 测序数据进行常规小 RNA 测序分析、样品间表达差异分析等。(2)应用 DAVID Bioinformatics Resources6.7(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)进行基因本(GO)、pathway 分析、功能注释聚类分析获得差异基因相关功能的功能富集类。(3)差异性明显的 GO、Pathway 分析所包含的靶基因取交集,绘制基因网络图,得到核心调控作用的 microRNA 和被 microRNA 调控的关键靶基因^[6]。网络图中基因用三角形来表示,microRNA 用圆形来表示,相互作用用直线来表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学处理,对照组与模型组比较采用配对 *t* 检验,microRNA 表达组间比较采用方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肝组织 HE 染色 对照组肝细胞,形态完整,未见炎症细胞浸润、变性坏死,未见纤维化增生(图 1A);模型组肝脏可见点灶状炎细胞浸润,局灶或成片空泡变性或肝细胞点灶性坏死,大多数粗大纤维间隔形成包绕假小叶结构(图 1B)。



A:对照组肝细胞;B:模型组肝细胞。

图 1 HE 染色结果(×200)

2.2 microRNA

2.2.1 microRNA 差异谱 用火山图推断出差异 microRNA 的整体分布情况,从差异倍数(Fold change>1)和显著水平(*P*<0.05)两个方面进行评估,对差异 microRNA 进行筛选。共筛选到 37 个差异 microRNA,其中模型组与对照组相比,上调 29 个(表 1),下调 8 个(表 2)。

2.2.2 microRNA 靶基因的 GO 分析 模型组上调 microRNA 所对应的靶基因共参与 84 项显著性功能(表 3),包括有机物质的应答、细胞凋亡的负向/正向调控、细胞增殖、细胞生长/发育/正向调控、细胞周期等;下调 microRNA 所对应的靶基因共参与 55 项显著性功能(表 4),包括细胞体内化学、离子平

衡、蛋白质的运输与定位、信号转导的负向/正向调控、细胞通讯、细胞增殖、负调控凋亡等。

表 1 模型组较对照组表达上调的 microRNA

microRNA 序列	对照组	模型组	Fold_change	<i>P</i>	FDR
miR-184	4.43	72.94	-4.04	<0.01	<0.001
miR-212-5p	1.79	14.21	-2.99	<0.01	<0.01
miR-449a-5p	0.94	6.25	-2.73	<0.05	0.10
miR-582-3p	6.50	37.70	-2.53	<0.01	<0.001
miR-147	1.89	10.42	-2.47	<0.01	<0.05
miR-223-3p	37.71	207.25	-2.46	<0.01	<0.001
miR-10b-5p	249.07	1 281.79	-2.36	<0.01	<0.001
miR-132-3p	2.73	13.36	-2.29	<0.01	<0.05
miR-411-5p	2.07	9.85	-2.25	<0.05	0.10
miR-146b-5p	348.81	1 530.16	-2.13	<0.01	<0.001
miR-130b-3p	2.73	11.94	-2.13	<0.01	<0.05
miR-127-3p	14.05	58.54	-2.06	<0.01	<0.001
miR-6216	5.19	16.48	-1.67	<0.01	<0.05
miR-199a-3p	326.56	981.61	-1.59	<0.01	<0.001
miR-155-5p	15.56	46.60	-1.58	<0.01	<0.001
miR-222-3p	4.05	12.12	-1.58	<0.05	0.12
miR-214-3p	14.33	42.63	-1.57	<0.01	<0.001
miR-21-3p	107.66	304.06	-1.50	<0.01	<0.001
miR-199a-5p	157.91	432.03	-1.45	<0.01	<0.001
miR-363-3p	14.99	40.35	-1.43	<0.01	<0.001
miR-34a-5p	26.96	67.63	-1.33	<0.01	<0.001
miR-3585-5p	6.50	15.63	-1.26	<0.05	0.08
miR-181b-5p	146.69	328.78	-1.16	<0.01	<0.001
miR-204-5p	35.92	77.58	-1.11	<0.01	<0.001
miR-92b-3p	18.85	40.54	-1.10	<0.01	<0.01
miR-335	62.03	129.58	-1.06	<0.01	<0.01
let-7i-5p	672.36	1 392.05	-1.05	<0.05	<0.001
miR-6329	5.94	12.12	-1.03	<0.05	0.15
miR-152-5p	6.88	13.83	-1.01	<0.05	0.18

表 2 模型组较对照组表达下调的 microRNA

microRNA 序列	对照组	模型组	Fold_change	<i>P</i>	FDR
miR-203a-3p	465.33	127.69	1.87	<0.01	<0.001
miR-203b-3p	50.72	14.68	1.79	<0.01	<0.01
miR-200b-3p	690.55	203.65	1.76	<0.01	<0.001
miR-193-3p	37.71	11.75	1.68	<0.01	<0.05
miR-99a-5p	4 491.10	1 605.84	1.48	<0.01	<0.001
miR-455-3p	50.15	19.32	1.38	<0.01	<0.05
miR-365-3p	155.27	63.56	1.29	<0.01	<0.001
miR-125b-5p	4 594.15	2 124.64	1.11	<0.01	<0.001

表 3 模型组较对照组表达上调的 microRNA 的靶基因 GO 分析

Category ID	Category name	Count	P	Enrichment	FDR
0044459	plasma membrane part	783	1.33E-33	1.358089766	2.06E-30
0007242	intracellular signaling cascade	548	5.02E-30	1.431307287	9.78E-27
0005829	cytosol	651	2.91E-29	1.37153113	4.52E-26
0009719	response to endogenous stimulus	359	1.04E-25	1.51367934	2.02E-22
0042592	homeostatic process	425	7.86E-24	1.438085724	1.53E-20
0048878	chemical homeostasis	310	7.74E-23	1.522266352	1.51E-19
0005783	endoplasmic reticulum	456	6.51E-22	1.389478506	1.01E-18
0015031	protein transport	336	1.17E-21	1.478635026	2.29E-18

表 4 模型组较对照组表达下调的 microRNA 的靶基因 GO 分析

Category ID	Category name	Count	P	Enrichment	FDR
0005886	plasma membrane	718	9.62E-29	1.390698537	1.45E-25
0043167	ion binding	773	2.42E-20	1.295739182	4.13E-17
0031090	organelle membrane	280	5.67E-10	1.380904915	8.58E-07
0008219	cell death	139	8.54E-10	1.61752965	1.63E-06
0009725	response to hormone stimulus	164	1.08E-09	1.545472116	2.06E-06
0031982	vesicle	199	1.84E-09	1.463588824	2.78E-06
0045184	establishment of protein localization	174	2.33E-09	1.509478687	4.46E-06
0006915	apoptosis	124	7.03E-09	1.619426972	1.34E-05

2.2.3 microRNA 靶基因参与的 Pathway 分析 模型组上调的 microRNA 靶基因参与的显著性信号通路 71 条(图 2),包括 PPAR 信号通路、GnRH 信号通路、癌症的相关通路、氨基酸的代谢、脂肪细胞因子的信号通路等;而下调靶基因参与的显著性信号通路 44 条(图 3),包括钙信号通路、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路、胰岛素信号通路、ABC 转运受体等。

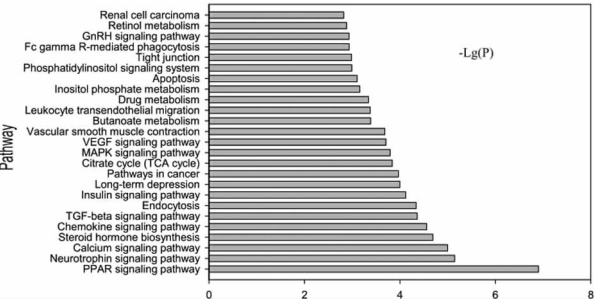


图 2 模型组较对照组表达上调的 microRNA 的靶基因 Pathway 分析

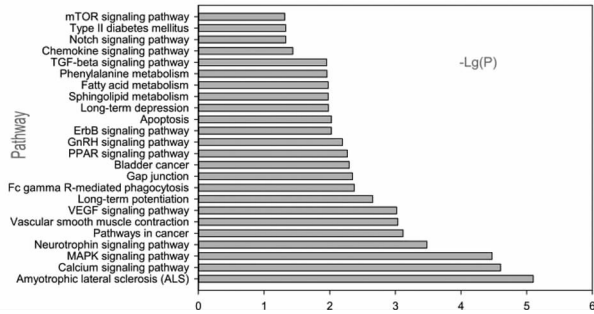


图 3 模型组较对照组表达下调的 microRNA 的靶基因 Pathway 分析

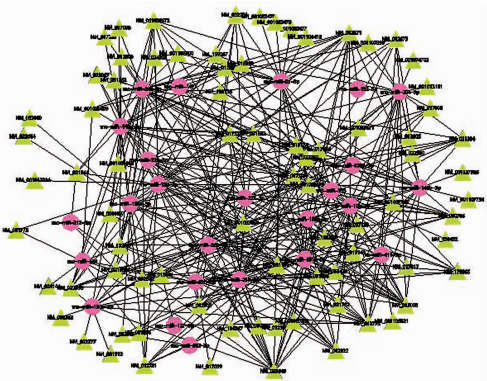


图 4 模型组较对照组表达上调的 microRNA 靶基因网络图

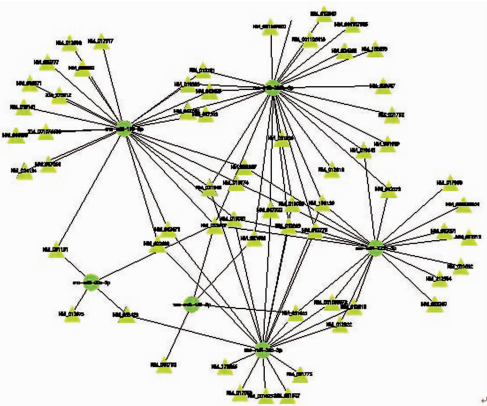


图 5 模型组较对照组表达下调的 microRNA 靶基因网络图

2.2.4 差异 microRNA 与交集靶基因的调控网络构建 通过靶基因的功能显著性分析和信号通路的显著性分析,得到显著性 GO 和 Pathway 及其所属的靶基因,取显著性 GO 所属靶基因与显著性 Pathway 所属靶基因的交集,利用 microRNA 与靶基因之间的靶向调控关系,构建 microRNA-基因网络图(图 4、5)。发现上调的关键 microRNA 主要包括 miR-184、miR-10b-5p、miR-199a-3p 等,其调控的关键靶基因主要包括 NM_012671、NM_021843、NM_012775、NM_013095、NM_178866 (gene bank accession number)等;下调的关键 microRNA 主要包括 miR-200b-3p、miR-199a-5p、miR-125b-5p 等,其调控的关键靶基因主要包括及 NM_053679、NM_013095、NM_031055、NM_012775、NM_017322 等。

3 讨 论

本实验通过比较正常大鼠与肝纤维化大鼠肝组织 microRNA 表达谱,模型组大鼠筛选出 37 个差异 microRNA(差异倍数在 2 倍以上),上调 29 个,下调 8 个。其中 miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-222-3p、miR-335 等^[7-10] 目前已有研究报道与肝纤维化的形成密切相关。而 let-7i-5p、miR-125b-5p、miR-155-5p 等虽未查见与肝纤维化直接相关的报道,但有研究报道与其他脏器的纤维化相关,如 let-7i-5p、miR-125b-5p 与肺间质纤维化相关^[11-12],miR-155-5p 与原发性骨髓纤维化增生有密切联系^[13]。本实验结果显示 miR-223-3p 在对照组与模型组中的表达谱差异显著,提示该因子有可能与肝纤维化的形成相关。而目前的临床报道提示 miR-223-3p 可以明显作为丙肝肝癌早期和多种肝脏疾病导致的肝硬化的非侵入性生物标志物^[14],而对其与肝纤维化形成的关系却未见报道。

本实验中发现的一些对照组与模型组表达谱有明显差异的 microRNA,如 miR-130b-3p、miR-181b-5p、miR-204-5p、miR-193-3p、miR-152-5p、miR-375、miR-214-3p、miR-127-3p 等,目前未见报道发现与纤维化有关,而在其他疾病领域有一定的研究和报道。如 miR-130b-3p 是在非小细胞肺癌中异常表达的小分子核糖核酸^[15],miR-181b-5p 可以作为星形细胞瘤肿瘤抑制基因^[16],miR-375 和 miR-214-3p 可以早期预测口腔鳞状细胞癌^[17]等。此外,本实验还发现了一些鲜有报道的 microRNA,如 miR-203a-3p、miR-203b-3p、miR-582-3p、miR-411-5p、miR-92b-3p、miR-6329、miR-6216 等,这些 microRNA 是否与肝纤维化形成有关尚不明确,值得进一步研究。

作者对筛选的差异 microRNA 靶基因功能进行 GO 分析发现,差异 microRNA 能够调控细胞增殖、凋亡、细胞周期等,还可能调控有机物质的应答、细胞体内化学、离子平衡、蛋白质的运输与定位等。Pathway 分析结果提示,差异 microRNA 主要涉及增殖和凋亡相关信号通路、肝纤维化微循环相关通路两类,这两类信号通路与目前相关文献报道是一致的。其中增殖和凋亡相关信号通路,如细胞凋亡、Wnt 信号通路、TGF-beta 信号通路、Notch 信号通路等已有大量研究报道证实其与肝纤维化形成密切相关^[18-20];而本实验结果中提示肝纤维化微循环相关信号通路,如黏附连接、紧密连接、白细胞跨内皮迁移、磷脂酰肌醇信号系统等,虽有报道提示其在肝纤维化发病机制中起着重要作用,但相关研究报道比较少,值得进一步研究。此外,本次分析结果还发现了一些其他的信号通路,如趋化因子信号通路、T 细胞信号通路、脂肪细胞因子的信号通路、胰岛素信号通路、ABC 转运蛋白等;这些信号通路与肝纤维化发生的关系目前未见报道,而本次实验结果提示差异 microRNA 也有可能通过这些通路调控肝纤维化的发生,但需进一步实验

研究。

利用图论的方法对网络中 microRNA 和基因在网络中的调控地位进行评价;发现在网络图中显著性最高的基因在信号通路中可能起着最显著的作用;如上调的 microRNA 调控的关键靶基因 NM_021843 受 17 个 microRNA 共同调控;NM_012671 受 16 个 microRNA 共同调控;下调的 microRNA 调控的关键靶基因 NM_053679(DFFA)、NM_012775(TGF-β1)位于基因调控网络的中心,受 5 个 microRNA 共同调控;TGF-β1 是细胞因子 TGF-β 超家族成员之一,因其能促进成纤维细胞的转化生长而得名;microRNA 可能靶向 DFFA、TGFβ1 调控肝纤维化进程相关信号通路。

总之,肝纤维化发生十分复杂,本研究初步从 microRNA 角度发现一些可能与肝纤维化相关的新机制,不仅从 microRNA 调控角度进一步丰富了肝纤维化发病机制,还为今后开展肝纤维化防治研究提供了新方向,为肝纤维化的早期干预提供新的思路,具有重要现实意义和学术价值。

参考文献

[1] Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA[J]. Trends Genet, 2006, 22(3): 165-173.

[2] Brennecke J, Cohen SM. Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes[J]. Genome Biol, 2003, 4(9): 228.

[3] Li G, Cai G, Li D, et al. MicroRNAs and liver disease: viral hepatitis, liver fibrosis and hepatocellular carcinoma[J]. Postgrad Med J, 2014, 90(160): 106-112.

[4] Noetel A, Kwiecinski M, Elfimova N, et al. microRNA are central players in anti- and profibrotic gene regulation during liver fibrosis[J]. Front Physiol, 2012, 3(49): 49.

[5] Guo CJ, Pan Q, Cheng T, et al. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways[J]. FEBS J, 2009, 276(18): 5163-5176.

[6] Joung JG, Hwang KB, Nam JW, et al. Discovery of microRNA-mRNA modules via population-based probabilistic learning[J]. Bioinformatics, 2007, 23(9): 1141-1147.

[7] Lee CG, Kim YW, Kim EH, et al. Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1[J]. Gastroenterology, 2012, 142(5): 1206-1217, e7.

[8] Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, et al. miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1[J]. PLoS Genet, 2013, 9(2): e1003291.

[9] Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, et al. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis[J]. Gut, 2012, 61(11): 1600-1609.

[10] Chen C, Wu CQ, Zhang ZQ, et al. Loss of expression of miR-335 is implicated in hepatic stellate cell migration and activation[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(12): 1714-1725.

[11] Huang Y, Dai Y, Zhang J, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for smoking-(下转第 3480 页)

对 L02 细胞的促再生活性在感染后 3 d 最强,之后有所减弱。这可能与细胞本身的老化有关。还采用细胞免疫化学方法,以 L02 细胞为对象,研究 IL-22 重组慢病毒对 L02 细胞的 PCNA 表达的影响,从另一个方面探讨 IL-22 对肝细胞再生的促进作用。PCNA 是存在于细胞核内的一种蛋白质,相对分子质量约为 36 KD。其表达的高峰在细胞周期的 G/S 期,是细胞 DNA 合成所必需的蛋白质,是判断再生细胞生物活性及所处生长状态的重要指标。本研究结果显示,感染 IL-22 重组慢病毒组有较多 PCNA 阳性细胞,经统计分析该组 PCNA 阳性细胞显著高于感染空慢病毒组及未感染组。虽然感染空慢病毒组也有少数 PCNA 阳性细胞,但与未感染组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),故认为慢病毒本身不会引起 PCNA 大量表达。

综上所述,IL-22 可以促进 L02 细胞结合珠蛋白 mRNA 及 PCNA 的表达,并能增强 L02 细胞的再生活性,故认为 IL-22 可能对肝细胞再生有促进作用。这一实验结果为本课题组后续进行的体内实验研究 IL-22/REG 生物轴与肝脏再生的关系提供了细胞实验数据。

参考文献

- [1] Dumoutier LJ. IL-TIF, a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9[J]. J Immunol, 2000, 164(4):1814-1819.
- [2] Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues[J]. Immunity, 2004, 21(2):241-254.
- [3] Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(5):367-380.
- [4] Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts[J]. Gastroenterology, 2005, 129(3):969-984.
- [5] Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis[J]. Eur J Immunol, 2006, 36

(5):1309-1323.

- [6] Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, et al. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22[J]. J Immunol, 2001, 166(12):7090-7095.
- [7] Weiss B, Wolk K, Grünberg BH, et al. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart[J]. Genes Immun, 2004, 5(5):330-336.
- [8] Brand S, Dambacher J, Beigel F, et al. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(4):G1019-1028.
- [9] Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005, 12(3):181-189.
- [10] Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, et al. Liver regeneration[J]. J Am Coll Surg, 2003, 197:634-659.
- [11] Ren XD, Hu B, Colletti L. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy[J]. Surgery, 2008, 143(6):790-802.
- [12] Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, et al. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes[J]. Genes Immun, 2000, 1(8):488-494.
- [13] Ren X, Hu B, Colletti LM. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(1):G74-80.
- [14] Ki SH, Park O, Zheng M, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3[J]. Hepatology, 2010, 52(4):1291-1300.

(收稿日期:2015-04-07 修回日期:2015-06-17)

(上接第 3476 页)

- related interstitial fibrosis[J]. Biomarkers, 2012, 17(5):435-440.
- [12] Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(7):4513-4519.
- [13] Norfo R, Zini R, Pennucci V, et al. miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34⁺ cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis[J]. Blood, 2014, 124(13):e21-32.
- [14] Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, et al. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(3):713-720.
- [15] Mitra R, Edmonds MD, Sun J, et al. Reproducible combinatorial regulatory networks elucidate novel oncogenic microRNAs in non-small cell lung cancer[J]. RNA, 2014, 20(9):1356-1368.

- [16] Zhi F, Wang Q, Deng D, et al. MiR-181b-5p downregulates NOVA1 to suppress proliferation, migration and invasion and promote apoptosis in astrocytoma[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e109124.
- [17] Yoon AJ, Wang S, Shen J, et al. Prognostic value of miR-375 and miR-214-3p in early stage oral squamous cell carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2014, 6(5):580-592.
- [18] Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2012, 44(6):694-698.
- [19] Zender L, Villanueva A, Tovar V, et al. Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2010, 52(6):921-929.
- [20] Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2010, 29(36):4989-5005.

(收稿日期:2015-04-01 修回日期:2015-06-08)