基于靶基因比较 microRNAs 与 HBV 蛋白的作用模式

杨琳琳^{①②}, 叶浩^{①②}, 唐凯临^{②*}, 曹志伟^{①②③*}

① 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

② 上海生物信息技术研究中心, 上海 200235;

③ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

* 联系人, E-mail: kltang@scbit.org; zwcao@tongji.edu.cn

2011-11-22 收稿, 2012-02-29 接受

国家自然科学基金(30900832)、肝肾疾病病证教育部重点实验室(上海中医药大学)开放课题、上海市教委“曙光计划”(07SG22)、教育部新世纪优秀人才计划(NCET-08-0399)和国家科技重大专项(2012ZX10005001)资助

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是当前严重威胁人类健康的病毒性疾病之一。近年来许多研究证实 microRNA (miRNA)可以介导宿主与病毒之间的相互作用, 阐明 miRNA 在 HBV 感染中的作用有助于新型治疗策略的提出。然而, miRNA 的多靶点特性限制了其功能研究。为了研究 miRNA 对 HBV 的调节机制, 本文在靶基因水平上比较了 HBV 相关 miRNA 和 HBV 蛋白的功能谱、采用半定量手段进行分析并从网络层面挖掘其潜在作用模式。结果表明, 在靶基因上, miRNA 功能较为集中, HBV 蛋白的作用效应可能更为广泛; 在网络拓扑结构上, miRNA 主要通过直接作用于 HBV 蛋白的靶基因及其邻居节点达到其调节作用; 在生理效应上, miRNA 在凋亡、细胞周期以及体液免疫的调节上呈现出拮抗 HBV 蛋白效应的趋势。本研究不仅为 miRNA 的功能研究提供了一种良好的方法, 而且 miRNA 在 HBV 感染中的作用模式有助于今后基于 miRNA 的乙肝治疗方案的提出。

关键词

乙肝
microRNA
HBV 蛋白
靶基因
GO
网络

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是当前严重威胁人类健康的病毒性疾病之一。HBV 感染肝细胞后不仅极易引起急性肝炎、慢性肝炎和肝硬化等疾病, 而且还会提高肝癌的发生率。据世界卫生组织统计, 全球有约 20 亿人感染 HBV, 平均每年约有 60 万人死于 HBV 引起的急性或慢性肝病, 而我国正处于乙型肝炎的高发时期。尽管针对乙肝的治疗手段发展迅速, 但目前仍以干扰素和抗病毒治疗为主且难以做到根除 HBV^[1,2]。

microRNA 亦称微小 RNA (miRNA), 是一种广泛存在于真核生物中的大小约 20~22 个核苷酸(nt)的内源性单链小分子 RNA。它可以与靶基因序列进行特异性地结合, 在转录或翻译水平实现负调控。miRNA 在许多癌症研究中已成为热点, 如 B 细胞淋巴瘤、原发性胶质母细胞瘤、肺癌、乳腺癌以及卵巢

癌等, 一些相关的癌症特异性的 miRNA 指纹图谱也已确立^[3~7]。此外, 近年来许多研究证实 microRNAs 不仅参与调控肿瘤发生过程, 而且在病毒感染中也起到了关键的调节作用, 并可以介导宿主与病毒之间的相互作用^[8~10]。由于分子小、缺乏免疫原性、功能灵活, microRNAs 可作为病毒的理想靶点^[10]。目前已发现一些 microRNAs 可以影响 HBV 的感染过程, 如 miR-199a-3p 和 miR-210 可以有效降低乙肝表面抗原(HBsAg)的表达^[11]。但是受 microRNAs 多靶点特性的限制, 即单个 microRNA 可调节几十到几百个靶基因, 除一些可能的结合位点以外, 它们与 HBV 之间的调节机制仍不明确。研究 microRNA 在发病机制中的作用有助于基于 microRNA 的新型治疗策略的提出以及诊断/预后生物标志物的发现^[12]。因此, 本文在靶基因水平上研究了 HBV 蛋白和 HBV 相关

英文引用格式: Yang L L, Ye H, Tang K L, et al. Interaction pattern between microRNA and HBV proteins in target genes (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2012, 57: 1755–1762, doi: 10.1360/972011-2386

miRNA 的功能谱, 并从网络层面对其潜在作用模式进行挖掘, 以期找到 microRNA 在 HBV 感染中的一些作用特点.

1 数据

1.1 HBV 蛋白和 HBV 相关 miRNA 的靶基因

HBV 蛋白及其靶点相互作用关系均来自 Wu 等人^[13]的研究, 共收集 5 个 HBV 蛋白和 146 个相应的靶基因. HBV 相关的 miRNA (以下简称 HBV-miRNA) 则通过文献检索得到: 在 PubMed 中搜索关键字 (“miRNA” OR “microRNA”) AND “hbv”, 得到 49 篇文献, 收集到 40 个 HBV-miRNA. 通过检索 TarBase (version 5)^[14], miRecords (version 2)^[15] 以及 miR2Disease (2010 年 2 月)^[16] 3 个数据库得到 459 个 HBV-miRNA 的靶基因. 这里收集到的所有 HBV 蛋白和 HBV-miRNA 的靶基因均来自于其宿主——人. 表 S1 和 S2 分别列出了所有收集到的 HBV 蛋白靶基因以及 HBV-miRNA.

1.2 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 表达水平的确定

虽然目前有关 HBV 参与调控人体基因或 miRNA

报道很多, 但是由于受实验材料、环境和技术等因素的限制, 同一基因或 miRNA 受 HBV 干扰后的表达水平在不同的文献报道中会有所区别. 因此, 为了确定 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 的表达水平, 本文采取了“投票规则”(统计结果详见表 S1 和 S2):

(i) 多篇文献一致报道为上调(或下调)的, 记为“上调”(或“下调”);

(ii) 文献中上下调关系不明确的记为“不确定”;

(iii) 多篇文献报道不一致的, 服从多数原则并且忽略不明确的报道; 若上调和下调的文献报道同样多, 则记为“不确定”.

由此可以确定上调或下调的 HBV 蛋白的靶基因有 77 个, 可以确定上调或下调的 HBV-miRNA 有 32 个, 相应的靶点有 444 个.

2 方法

本文的工作流程如图 1 所示.

2.1 GO 富集分析

GO 数据库^[17]对基因做了大量的功能注释, 一般单个基因可以找到多个相应的 GO 条目. 本文中的两组靶点都对应有上百条(500~700) GO 分子功能注释和上千条(~3000)GO 生物过程注释, 然而其中有一些

图1 工作流程图

条目属于噪音,并不能够有效地揭示靶点功能,因此有必要通过GO富集分析对这些条目进行筛选.本文对所有靶点相关的GO条目进行了统计,通过超几何分布算法计算相应的 P 值,并以bonferroni family-wise error rate (FWER) correction方法^[18]进行校正,校正后的 P 值($P\text{-corr}$) <0.05 的GO条目可以认为被靶点显著富集.

2.2 GO谱相似性比对

不同基因之间GO谱的相似性可以反映其功能相似程度.本文对Jacard系数进行了改进,用于计算不同基因GO谱之间的相似性(公式1).计算方法如下:

(i) 将HBV蛋白靶基因和HBV-miRNA靶基因分别富集的GO条目进行合并,以此作为GO条目的背景集;

(ii) 统计GO背景集中所有GO条目 G 上的所富集到的靶基因及其总数(n_G);

(iii) 取上述GO条目背景集内所有被基因 i 映射到的条目作为基因 i 的GO谱(G_i),同理可得基因 j 的GO谱(G_j);

(iv) 根据公式1对基因 i 和基因 j 的GO谱相似性进行打分(Jacard_(i,j)),并转换为基因 i 和基因 j 之间的距离(Distance_(i,j)),公式2).

$$\text{Jacard}_{(i,j)} = \frac{\sum_{G \in (G_i \cap G_j)} \frac{1}{n_G}}{\sum_{G \in (G_i \cup G_j)} \frac{1}{n_G}}, \quad (1)$$

$$\text{Distance}_{(i,j)} = 1 - \text{Jacard}_{(i,j)}. \quad (2)$$

2.3 判定靶点作用模式

HBV蛋白靶点和HBV-miRNA靶点对生理功能的作用模式反映了它们对疾病状态的调节机制.本文根据收集到的HBV蛋白对靶基因以及HBV对miRNA的上下调信息,对它们的作用模式进行了半定量分析.

(i) HBV蛋白对靶GO的调节. HBV蛋白对某一GO条目 G 的调节效应可以表示为其所有靶基因的表达水平在该GO条目中的比重之和(公式3).

$$R_G = \sum_{i=1}^n \frac{g_i}{N_i}. \quad (3)$$

其中, R_G 为HBV蛋白对GO条目 G 的调节效应; n 为GO条目 G 中的HBV蛋白靶基因的总数; g_i 为HBV蛋白对靶基因 i 的调节效应,上调记为+1,下调记为-1; N_i 为基因 i 相对应的GO条目总数.

(ii) HBV-miRNA对靶GO的调节. 由于HBV-miRNA并不直接参与到GO生理过程条目中,所以其对靶GO的调节效应的计算则复杂一些.首先,需要通过HBV-miRNA的表达水平确定其靶基因的表达状态(公式4).然后,与确定HBV蛋白对GO条目 G 的调节效应类似,HBV-miRNA靶点对GO条目 G 的调节效应便可以表示为其所有靶基因的表达水平在该GO条目中的比重之和(公式5).

$$g'_i = -\sum_{j=1}^m \frac{g_j}{N_j}, \quad (4)$$

$$R'_G = \sum_{i=1}^n \frac{g'_i}{N_i}. \quad (5)$$

其中, g_i 为HBV对miRNA j 的调节效应,上调记为+1,下调记为-1; N_j 为miRNA j 的靶点总数; m 为调节靶基因 i 的miRNA总数; g'_i 为HBV-miRNA对靶基因 i 的调节效应. g'_G 为HBV-miRNA靶点对GO条目 G 的调节效应; n 为GO条目 G 中的HBV-miRNA靶基因总数; N_i 为HBV-miRNA的靶基因 i 相对应的GO条目总数.

(iii) 作用模式. 若 R_G 和 R'_G 同为正值或同为负值,可以认为HBV蛋白靶点和HBV-miRNA靶点对生理功能 G 的作用模式一致,即呈顺式作用,否则呈反式作用.

(iv) 作用模式成立的条件. 本文中2组靶基因对同一生理过程的作用模式成立的条件有2个:一是2组靶基因同时富集在靶GO上;二是靶GO描述中有明确的促进(正调控)或抑制(负调控)效应标识.

2.4 构建蛋白-蛋白相互作用网络

为了进一步确定HBV蛋白的靶基因和HBV相关miRNA的靶基因之间的作用模式,本文根据HPRD数据库^[19]构建了蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络作为上述2组靶基因的背景网络.该网络具有6969个节点和25517条边,涵盖297个(64.71%)HBV相关miRNA的靶基因以及128个(87.67%)HBV蛋白的靶基因.

3 结果

3.1 GO 富集分析

经统计, 分别有 141 个 HBV 蛋白靶基因和 395 个 HBV-miRNA 靶基因在 GO 数据库中具有功能注释. 将 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因分别进行 GO 富集分析, 前者富集在 444 个 GO 生理功能条目和 36 个 GO 分子功能条目上, 而后者富集在 201 个 GO 生理功能条目和 30 个 GO 分子功能条目上. HBV-miRNA 的靶基因数目远多于 HBV 蛋白靶基因(~2.8 倍), 但是富集的 GO 数目少于 HBV 蛋白富集的 GO 数目, 分别是其 GO 生理功能和 GO 分子功能的 ~45.3% 和 83.3% (详见图 S1). 这一现象表明, HBV-miRNA 靶基因的生理功能更为集中, 而 HBV 蛋白的生理效应则较为分散.

3.2 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因 GO 谱的相似性

将 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因所富集的 GO 条目进行合并, 分别得到 475 个 GO 生理过程条目和 47 个 GO 分子功能条目, 以此为背景计算 HBV 蛋白靶点和 HBV-miRNA 靶点的 GO 谱之间的距离, 得到的距离矩阵用 MEGA 软件^[20,21]建立聚类结构树状图, 如图 2 所示. 虽然两组靶基因共同参与的 GO 条目很多, 分别有 438 (~92.2%) 个生物过程和 44 (~93.6%) 个分子功能, 但是它们的 GO 谱有所不同. HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因根据生物过程 GO 谱(图 2(a))的相似性可以明显聚集成两簇, 而

图 2 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因基于 GO 谱的相似性

(a) HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因基于生物过程类 GO 谱的相似性; (b) HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因基于分子功能类 GO 谱的相似性; 红色分支表示 HBV-miRNA 的靶基因, 绿色分支表示 HBV 蛋白的靶基因, 粉色分支表示 HBV-miRNA 和 HBV 蛋白共同的靶基因

在分子功能 GO 谱(图 2(b))中则没有这种趋势, 说明这两组靶基因虽然分子功能相似, 但它们对生物过程的调控可能有所偏好.

3.3 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因对 GO 生理过程的作用模式统计

本文通过计算确定了两组靶基因作用模式成立的 GO 条目(详见图 S2), 共计 52 个, 分别涵盖了 72.0% 的 HBV 蛋白靶基因和 45.6% 的 HBV-miRNA 靶基因. 这些 GO 条目中, 两组靶基因呈顺式作用的有 11 个(21.2%), 呈反式作用的则有 41 个(78.8%), 说明在 HBV 感染过程中 HBV-miRNA 有拮抗 HBV 病毒效应的趋势. 值得注意的是, 单个生理过程的激活或抑制不仅取决于其调控基因的表达水平, 而且还受到这些基因之间相互调节关系的影响. 因此, 为了确定这两组靶基因对不同生理过程的作用模式, 除统计相应 GO 生理过程的基因表达量的变化以外, 本文还在网络层面重点考察了靶基因之间的相互作用关系.

3.4 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因的网络特征

蛋白在 PPI 网络中的拓扑特性可以反映不同蛋白之间的作用特点. 本文将两组靶基因映射到 PPI 网络中, 以期通过研究它们的网络特征得到一些提示.

首先, 本文统计了两组靶点在网络中的度数(degree). 一般网络中度数越高的节点参与的生理过程也越广泛. 两组靶基因的平均度数均显著高于 ($P < 0.01$, wilcoxon 检验) 网络平均水平(7.32), 其中 HBV 蛋白靶基因的平均度数(29.73)显著高于 ($P < 0.01$, wilcoxon 检验) HBV-miRNA 靶基因的平均度数(14.52), 这可能是 HBV 蛋白靶基因的 GO 生理过程相对分散的一个原因.

此外, 这里还统计了 HBV 相关 miRNA 的靶基因与 HBV 蛋白靶基因之间的距离, 并与随机情况(随机 100000 次)进行比较, 结果如图 3 所示. 据统计, 87.5% 的 HBV-miRNA 的靶基因多分布在 HBV 蛋白靶基因的 0~2 步距离以内, 并且在 0~1 步距离内的分布数目显著高于随机 ($P < 0.01$, 超几何分布). 这说明 HBV-miRNA 可能通过直接作用于 HBV 蛋白的靶基因或其邻居节点来影响 HBV 的感染过程.

图3 HBV-miRNA 靶基因与 HBV 蛋白靶基因的距离分布
★示 HBV-miRNA 的靶基因分布在该距离范围内的数目高于随机基因($P<0.01$)

3.5 HBV 蛋白靶基因和 HBV-miRNA 靶基因的作用机制

虽然 PPI 网络可以全面地反映蛋白之间的相互作用关系,但是该网络缺乏蛋白之间具体的调节信息. 目前为止,KEGG PATHWAY 数据库^[22~24]是全球使用最为广泛的人工注释的通路数据库之一. 因此,

为了确定两组靶点之间具体的相互作用以及调节机制,本文根据 KEGG 构建了 HBV-miRNA 靶基因以及 HBV 蛋白靶基因的最小子网络(详见图 S3). 在该子网络中,HBV 蛋白靶基因与其他节点的连接较为紧密、度数较高,而 HBV 相关 miRNA 靶基因则度数较低,说明这两组靶基因在 PPI 网络上的拓扑特征也同样适用于该子网络. 图4整合了子网络中所有节点富集的 TOP 10 pathways 中的非疾病通路. 如图4所示,两组靶点的相互作用主要集中在对凋亡、细胞周期以及体液免疫的调节上.

在凋亡方面,HBx 可以通过扩增 Fas-L^[25]、诱导 TNF α 及其受体 TNF-R1 基因表达^[26],并且上调 IL-1^[27]而激活凋亡通路,同时 HBx 还可以下调 IGF-BP3^[28]的表达,从而解除 IGF-BP3 对 IGF 的抑制作用. 另一方面,HBx 可以刺激基因 IKK 和 NF κ B 表达,从而加速细胞组分的降解. 一般来说,HBV 可以通过刺激宿主的免疫系统间接地导致肝损伤^[25,29],这里的证据表明凋亡通路的激活可能也是 HBV 感染引起肝损伤的原因之一. 有趣的是,HBV 蛋白也可以通过调

图4 HBV 相关 miRNA 靶基因与 HBV 蛋白靶基因的相互作用模式

蓝色点为 HBV-miRNA 靶基因,绿色点为 HBV 蛋白靶基因;上三角为上调基因,下三角为下调基因;实线为直接作用,虚线为间接作用

节靶基因促进细胞存活,如 *MyD88* 和 *p53*,这可能与受感染的细胞所处的病理阶段有关.研究表明,HBV感染会提高患者罹患肝癌的风险^[30],这些基因可能是HBV使肝细胞癌化的潜在靶点.相比之下,HBV-miRNA对凋亡的负调节效应则更加明显一些.虽然HBV-miRNA可以抑制存活基因 *Bcl-2* 的表达,但是它们更多地抑制 *Fas*, *Apaf-1*, *IGF* 和 *p53* 等促凋亡基因的表达,并且可以降低 *IRAK*, *TRAF6* 和 *TRAF3* 基因水平以减少细胞组分的降解.这暗示了HBV-miRNA可以减少肝损伤的发生,但是同时也会增加肝细胞癌化的风险.

在免疫方面,HBV蛋白可以通过上调 *IL-1*, *IL-6*^[27], *IL-18*^[25] 和 *TNF α* ^[26] 基因的表达从而直接加强免疫反应. HBV-miRNA 则可以降低 T 细胞受体信号通路中的 *PI3K*, *p38*, *RasGRP* 和 *Ras* 以及 *PI3K* 的上游基因 *IGF* 和 *RTK* 的表达,进而抑制白介素和 TNF 等细胞因子的产生.不仅如此,据报道,包括 *IL-1*^[31], *IL-6*^[32] 和 *IL-18*^[33] 在内的一些白介素以及 *TNF α* ^[34] 都具有显著的促炎症效应.而炎症则是人体免疫系统对外界感染做出的一种抵御反应^[35].因此在免疫途径中,HBV蛋白可以产生加强效应,从而促进炎症发生.而HBV-miRNA则展现出一定的减弱免疫的效应,很可能有助于降低炎症反应,进而减少肝损伤的发生.

在对细胞周期的调控方面,HBV蛋白可以下调 *cyclin B*, *cyclin D*, *CDK2* 和 *CDK4*^[36],从而减慢细胞周期.另外,HBx还可以通过增加 *GSK-3 β* 的活性减弱细胞增殖. HBV-miRNA 则可以上调细胞周期因子 *cyclin E* 和 *cyclin D* 的表达并降低 *p21* 对它们的抑制作用,进而加速细胞有丝分裂.这与凋亡途径中观察到的结果相一致,即在HBV感染的宿主体内,HBV-miRNA有增加肝细胞癌化的风险.

4 讨论和结论

通过对比HBV蛋白靶基因和HBV相关 micro-

RNA 靶基因的功能可以看出: (i) HBV-miRNA 以较多的靶点富集在较少的生理过程上,即调节的生物过程更为集中; (ii) 虽然两者的分子功能相近,但是它们调节的生理过程似乎有所偏好; (iii) miRNA 主要通过直接作用于HBV蛋白的靶基因及其邻居节点达到其调节作用.进一步的半定量分析提示这两组靶基因有相反的作用效应,HBV-miRNA有拮抗HBV蛋白效应的趋势,这一点在网络水平得到了支持.这两组靶基因共同富集在对凋亡、细胞周期以及体液免疫的调节上.尽管两组靶基因对同一生理过程可能同时存在正调控和负调控效应,但是调控的力度有所不同. HBV 蛋白的靶基因既有促凋亡的效应,如 *Fas-L*, *TNF α* , *TNF-R1*, *IL-1*, *IGF-BP3*, *IKK* 和 *NF κ B*, 这些可能是HBV引起肝损伤的潜在位点,同时也有一些促进细胞存活的效应基因,如 *TRAIL-R*, *DR5*, *MyD88* 和 *p53*, 这些则可能是肝细胞癌化的潜在位点.而HBV-miRNA则主要表现为对凋亡生理过程的抑制,一方面可以阻止肝损伤的发生,另一方面也不可避免地增加了肝细胞癌化的风险.两者对免疫反应的调节则是截然相反,HBV蛋白可以通过细胞因子直接加强免疫反应,而HBV-miRNA则是通过抑制上游信号通路来减弱免疫反应.并且HBV蛋白可以减慢细胞周期、抑制细胞增殖,而HBV-miRNA则可以加速细胞有丝分裂.由此可以看出,HBV主要通过表达其病毒蛋白诱发炎症、造成肝损伤,可能通过影响宿主 miRNA 的表达水平产生不同的疾病表型:在宿主细胞感染HBV的早期阶段,宿主 miRNA 可以拮抗HBV蛋白以减少肝损伤,但同时也会增加后期癌化的风险.

本文在靶基因水平上研究HBV-miRNA与HBV蛋白的作用模式,不仅为miRNA的功能研究提供了一种良好的方法,而且miRNA在HBV感染中的作用模式可以有助于今后基于miRNA的乙肝治疗方案的提出.

参考文献

- 1 Chen Y, Cheng G, Mahato R I. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res*, 2008, 25: 72–86
- 2 Tang L, Pu Y, Wong D K, et al. The hepatitis B virus-associated estrogen receptor alpha (ER α) was regulated by microRNA-130a in HepG2.2.15 human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43: 640–646
- 3 Calin G A, Croce C M. microRNA-cancer connection: The beginning of a new tale. *Cancer Res*, 2006, 66: 7390–7394
- 4 Ciafre S A, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334: 1351–1358

- 5 Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065–7070
- 6 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64: 3753–3756
- 7 Iorio M V, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 8699–8707
- 8 Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007, 449: 682–688
- 9 Scaria V, Jadhav V. microRNAs in viral oncogenesis. *Retrovirology*, 2007, 4: 82
- 10 Gottwein E, Cullen B R. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe*, 2008, 3: 375–387
- 11 Zhang G L, Li Y X, Zheng S Q, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res*, 2010, 88: 169–175
- 12 Li M, Li J, Ding X, et al. microRNA and cancer. *AAPS J*, 2010, 12: 309–317
- 13 Wu Z J, Zhu Y, Huang D R, et al. Constructing the HBV-human protein interaction network to understand the relationship between HBV and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 146
- 14 Papadopoulos G L, Reczko M, Simossis V A, et al. The database of experimentally supported targets: A functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D155–158
- 15 Xiao F, Zuo Z, Cai G, et al. miRecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D105–D110
- 16 Jiang Q, Wang Y, Hao Y, et al. miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D98–D104
- 17 Carbon S, Ireland A, Mungall C J, et al. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*, 2008, 25: 288–289
- 18 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate—A practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B Met*, 1995, 57: 289–300
- 19 Keshava Prasad T S, Goel R, Kandasamy K, et al. Human Protein Reference Database—2009 update. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D767–D772
- 20 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- 21 Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008, 9: 299–306
- 22 Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 27–30
- 23 Kanehisa M, Goto S, Hattori M, et al. From genomics to chemical genomics: New developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: D354–357
- 24 Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: D355–D360
- 25 Lee M O, Choi Y H, Shin E C, et al. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): A potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol*, 2002, 37: 380–386
- 26 Wang W H, Gregori G, Hullinger R L, et al. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase pathways by hepatitis B virus X protein mediates apoptosis via induction of Fas/FasL and tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF-alpha expression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 10352–10365
- 27 Lu H, Zhou J. HBV X gene transfection upregulates *IL-1beta* and *IL-6* gene expression and induces rat glomerular mesangial cell proliferation. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2008, 28: 247–250
- 28 Shon J K, Shon B H, Park I Y, et al. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription. *Virus Res*, 2009, 139: 14–21
- 29 Na B, Huang Z, Wang Q, et al. Transgenic expression of entire hepatitis B virus in mice induces hepatocarcinogenesis independent of chronic liver injury. *PLoS ONE*, 2011, 6: e26240
- 30 Anzola M. Hepatocellular carcinoma: Role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat*, 2004, 11: 383–393
- 31 Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6: 232–241
- 32 Pedroza M, Schneider D J, Karmouty-Quintana H, et al. Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PLoS ONE*, 2011, 6: e22667
- 33 Chikano S, Sawada K, Shimoyama T, et al. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. *Gut*, 2000, 47: 779–786

- 34 Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al. The role of TNF- α in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): A study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41: 329–337
- 35 Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 2006, 7: 131–137
- 36 Kuo C Y, Wang J C, Wu C C, et al. Effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on cell-growth inhibition in a CCL13-HBx stable cell line. *Intervirology*, 2008, 51: 26–32

Interaction pattern between microRNA and HBV proteins in target genes

YANG LinLin^{1,2}, YE Hao^{1,2}, TANG KaiLin² & CAO ZhiWei^{1,2,3}

¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China;

² Shanghai Center for Bioinformation Technology, Shanghai 200235, China;

³ School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

Hepatitis B virus (HBV) infection has become one of the most serious viral diseases threatening human health. In recent years, many studies have proved that microRNA (miRNA) can mediate the interaction between host and virus. Clarifying miRNA's role in HBV infection could help to propose new treatment strategies. However, functional study of miRNA was found to be blocked by its multi-target property. Aiming to learn miRNA's regulation mechanism during HBV infection, the functional profiles of HBV related miRNA and HBV protein were compared from the perspective of their targeted genes. A semi-quantitative analysis was performed and the potential interaction pattern was investigated at a network level as well. The results indicated that HBV related miRNA's function may be more concentrated than HBV protein at target gene level. Furthermore, miRNA could regulate HBV's pathogenesis by directly targeting HBV proteins' target genes and their neighbors. In this paper, it was suggested that HBV related miRNA may tend to antagonize HBV proteins' effects in the regulation process of apoptosis, cell cycle and humoral immunity. This study not only provides a network method for miRNA's function study, but also can give a better understanding of miRNA's role in HBV infection which would further facilitate the treatment of HBV based on miRNA.

hepatitis b, microRNA, HBV protein, target gene, GO, network

doi: 10.1360/972011-2386

补充材料

表 S1 HBV 蛋白的靶基因及相应的表达水平

表 S2 HBV 相关 microRNA 及相应的表达水平

图 S1 HBV 蛋白和 HBV-miRNA 的靶基因和 GO 分布

图 S2 HBV 蛋白靶基因与 HBV-miRNA 靶基因作用模式成立的 GO 生理过程条目分布

图 S3 HBV 蛋白靶基因与 HBV-miRNA 靶基因的最小子网络

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.