

بررسی اثر پروتئین core ویروس هپاتیت C (HCV) بر روی بیان miR-150

صیاد خانی زاده^۱، کیانا شاه زمانی^۲، هادی رضوی نیکو^۳، حامد اسمعیل لشگریان^{۴*}

۱- استادیار، گروه میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- استادیار، گروه ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

۴- استادیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

یافته / دوره هجدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۵ / مسلسل ۶۸

چکیده

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۵/۴/۲۴

*** مقدمه:** ویروس هپاتیت C (HCV) به عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری زا برای بیماری‌های مزمن کبدی محسوب می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئین‌های ویروس HCV می‌توانند با شبکه‌های تنظیمی ژن از قبیل microRNAs میانکنش برقرار کنند. هدف از این مقاله بررسی اثر پروتئین core ویروس HCV بر روی بیان miR-150 در یک مدل کشت سلولی بود.

*** مواد و روش‌ها:** پلاسمیدهای بیان کننده طول کامل پروتئین Core ویروس HCV به داخل رده سلولی Huh7 ترانسفکت گردیدند، در حالیکه در کنار آن از یک پلاسمید بیان کننده GFP خالی به عنوان یک گروه کنترل منفی استفاده شد. سپس RNA تام استخراج شده و Real-Time PCR جهت اندازه‌گیری سطح بیان miR-150 انجام شد. علاوه بر این، تست trypan blue exclusion جهت بررسی اثر پروتئین core بر روی زنده‌مانی سلولی نیز انجام گرفت.

*** یافته‌ها:** آنالیز بیان ژن miR-150 در سلول‌های Huh7 نشان داد که پروتئین core درون زاد ویروس HCV می‌تواند به‌طور معناداری باعث کاهش بیان miR-150 در قیاس با پلاسمید کنترل بیان کننده GFP و سلول طبیعی شود ($P < 0.01$). در کنار این، پروتئین core هیچگونه اثرات کشندگی سلولی یا تحریک کننده‌ای را بر روی سلول‌های کبدی پس از انجام تست trypan blue exclusion نشان نداد ($P < 0.05$).

*** بحث و نتیجه‌گیری:** مطالعه ما نشان می‌دهد که پروتئین core ویروس HCV می‌تواند منجر به کاهش بیان miR-150 شود. این نتایج بیانگر آنست که میانکنش پروتئین‌های HCV با ماشین تنظیمی سلولی ممکن است در پاتوژنز مزمن بیماری‌های کبدی نقش داشته باشد.

*** واژه‌های کلیدی:** ویروس هپاتیت C، هپاتیت، core، میکرو RNA.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات هپاتیت.

پست الکترونیک: hamedesmaili@gmail.com

مقدمه

ویروس هیپاتیت C (HCV) یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل هیپاتیت‌های ویروسی می‌باشد که بیش از ۱۷۰ میلیون نفر را در سرتاسر دنیا به شکل عفونت مزمن مبتلا کرده است. بیشتر عفونت‌های ناشی از ویروس به یک عفونت مزمن پیشرفت می‌کنند که این می‌تواند در طی ۲۰ تا ۳۰ سال منجر به پیامدهای بالینی وخیمی از قبیل سیروز و سرطان سلول‌های کبدی (HCC) شود (۱،۲).

موفقیت در ایجاد عفونت پایدار ناشی از ویروس به دلیل طفره رفتن ویروس از سیستم ایمنی و میانکش و تداخل پروتئین‌های ویروس با مسیرهای سیگنال دهنده و همچنین مسیرهای تنظیمی سلولی می‌باشد. HCV دارای چندین پروتئین ساختاری و غیر ساختاری از قبیل core، NS3/4، E1/2 و NS5 می‌باشد که می‌توانند در مهار پاسخ ایمنی ذاتی تأثیر گذار باشند (۳،۴).

microRNAs مولکول‌های RNA کوچک غیر کد کننده‌ای می‌باشند که بیان آن‌ها در سطح بسیار بالایی تنظیم شده است، این مولکول‌ها می‌توانند از طریق تنظیمات پس از رونویسی و با اتصال به قسمت ۳' ناحیه غیرقابل ترجمه (UTR ۳') رونوشت مربوط به ژن‌های سلولی باعث تنظیم بیان ژن‌های سلولی شوند. این مولکول‌ها با خیلی از فرایندهای سلولی پایه از قبیل مرگ سلولی، تکثیر و تمایز در ارتباط می‌باشند (۵).

مطالعات گسترده نشان داده است که microRNAs در پاتوژنز بیماری ناشی از HCV می‌توانند نقش ایفا کرده و پروتئین‌های ویروس می‌توانند با ماشین microRNA سلول ارتباط برقرار کنند (۵). به عنوان مثال نشان داده شده است که افزایش بیان miR-122 طی عفونت HCV می‌تواند از طریق در دسترس قرار دادن ماشین ریبوزومی سلول به RNA ویروسی باعث تحریک ترجمه پروتئین‌های ویروسی و در واقع افزایش تکثیر ویروس و عفونت ناشی از آن شود (۶). مشخص شده است که اختلال در تنظیم بیان microRNAs با طیف

گسترده‌ای از بیماری‌ها به خصوص سرطان در ارتباط بوده می‌باشد (۵).

گزارشات نشان داده است که miR-150 نقش بسیار مهمی را در سرکوب سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند، همچنین مشاهده شده است که miR-150 می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های کبدی نقش داشته باشد، به طوری که اختلال در بیان این microRNA در پاتوژنز بیماری‌های کبدی تأثیرگذار بوده است (۷،۸). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر پروتئین core مربوط به ویروس HCV بر روی سطح بیان miR-150 در شرایط آزمایشگاهی در یک مدل کشت سلولی بود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و ترانسفکت پلاسمیدها

رده سلولی هپاتوما‌ی انسانی Huh7 (موسسه پاستور ایران) در محیط کشت (DMEM, Gibco USA) همراه با ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر محیط کشت (FBS, Sigma, St. Louis, USA)، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر محیط کشت آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Gibco)، ۲ میکرو مول آل-گلوتامین و در شرایط اتمسفری ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ درجه رشد داده شدند. در روز قبل از ترانسفکشن، حدود ۴۰۰ هزار سلول Huh7 بر روی فلاسک‌های کشت سلولی ۶ خانه‌ای رشد داده شدند. بعد از ۳۶ ساعت از رشد سلولی و در تراکم رشد سلولی ۷۰٪ سلول‌های Huh7 توسط پلاسمیدهای بیان کننده (pAAV/Full core) توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) بر طبق دستورالعمل سازنده آن ترانسفکت شدند. پلاسمید pAAV یک پلاسمید از نوع Adeno-associated virus با طول ۹۳۸۰ جفت باز و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد، پلاسمید مورد نظر دربردارنده توالی نوکلئوتیدی با طول ۳۶۱ جفت باز جهت بیان طول کامل پروتئین core ویروس هیپاتیت سی می‌باشد که از آقای دکتر حسینی، مرکز تحقیقات

۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر آنزیم ریپولاک (۲۰ U) و ۱ میکرولیتر آنزیم RT (۵۰ U) به آن اضافه گردید. سپس تیوب واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه و ۷۲ درجه (جهت غیرفعال شدن آنزیم پلیمرز) به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. در پایان cDNA ساخته شده جهت ادامه کار در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

Real-Time PCR

بعد از مرحله ساخت cDNA مربوط به miR-150، تکنیک RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) miR-150 طبق پروتکل زیر انجام گرفت. توالی پرایمری مربوط به miR-150 با مراجعه به پایگاه اطلاعاتی miRBase (www.mirbase.org) و همچنین استفاده از نرم افزار الیگو آنالیز طراحی گردیدند و صحت اتصال آن‌ها به توالی‌های هدف از طریق مراجعه به قسمت BLAST پایگاه اطلاعاتی NCBI تأیید شد. برای انجام این مرحله بر روی یخ و در داخل یک میکرو تیوب استریل مقدار ۲ میکرولیتر cDNA به ۱۰ میکرولیتر (master mix, syber Real Time-PCR) (Amplicon corporation) اضافه گردید، سپس با آب به حجم ۱۹ میکرولیتر رسانیده شد و در پایان مقدار ۰/۵ میکرو مول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت به تیوب واکنش اضافه شده، سپس واکنش تحت شرایط دمایی زیر: ۹۵ درجه اولیه به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه (مرحله واسرشت سازی)، ۶۰ درجه به مدت ۳۵ ثانیه (مرحله اتصال)، گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه، تعداد ۴۰ سیکل انجام گرفت. جهت جلوگیری از تغییرات اندازه‌گیری میزان بیان miR-150 از پرایمرهای اختصاصی ژن U6 snRNA (جدول ۱) به عنوان کنترل داخلی در واکنش Real-Time PCR استفاده شد.

بررسی بیوانفورماتیک

جهت پیش بینی توالی‌های هدف miR-150 با استفاده از نرم افزار Target scan 6.1

گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز هدیه گرفته شد. همزمان از یک پلاسمید خالی بین کننده GFP به عنوان یک کنترل منفی استفاده شد. ۸ ساعت پس از ترانسفکشن محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید، سپس سلول‌ها تا ۱۸ ساعت انکوبه گردیدند.

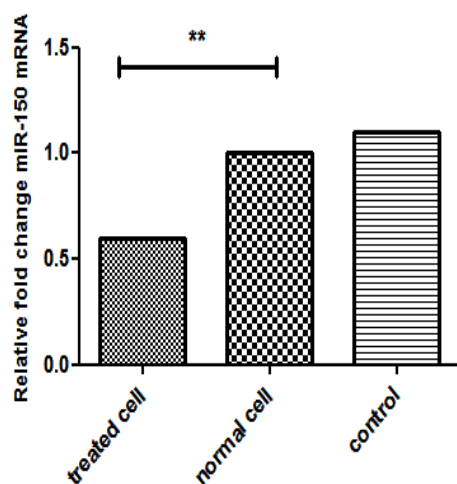
تست زنده‌مانی سلولی

جهت پی بردن به اثر پلاسمید بیان کننده پروتئین core ویروس هیاتیت سی بر روی زنده ماندن یا میزان مرگ سلولی سلول‌های ترانسفکت شده تست trypan blue exclusion cell viability در کنار مشاهده فنوتیپ سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری معکوس انجام شد. برای انجام این تست تعداد ۱۰۰ سلول در طی شمارش سلولی توسط رنگ حیاتی trypan blue بررسی شده و نسبت سلول‌های زنده به بدون رنگ تقسیم بر تعداد کل سلول‌ها (سلول‌های رنگ گرفته مرده + سلول‌های بدون رنگ زنده) شده و بین گروه‌های مختلف مقایسه شد.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس

RNA تام از سلول‌ها با استفاده از محلول تریزول (Invotrogen) بر طبق دستورالعمل سازنده آن استخراج گردید. سپس RNA استخراج شده جهت ساخت cDNA مربوط به miR-150 با استفاده از کیت سنتز کننده cDNA (Thermo Fisher Scientific, USA) توسط روش stem-loop با استفاده از پرایمر معکوس رونویسی اختصاصی microRNA (جدول ۱)، تحت رونویسی معکوس قرار گرفته و جهت بررسی‌های کمیتی به cDNA تبدیل شد. برای انجام این مرحله ابتدا ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده به ۱/۵ میکرولیتر پرایمر RT (۵۰ nM) و ۴ میکرولیتر آب مقطر در درون یک میکرو تیوب ۰/۲ عاری از نوکلئاز استریل اضافه شد، سپس مخلوط واکنش در داخل دستگاه ترموسایکلر در دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از آن تیوب بر روی یخ قرار داده شد و به آن به ترتیب: ۴ میکرولیتر بافر ۵X،

سلول‌های Huh7 را توسط پلاسمید pAAV بیان کننده پروتئین core ویروس هیپاتیت سی ترانسفکت کردیم، آنالیز بیان ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR نشان داد که پروتئین core ویروس هیپاتیت سی می‌تواند به‌طور معناداری باعث کاهش بیان ژن miR-150 شود. همان‌طور که در (شکل ۱) نشان داده شده است، سلول‌های Huh7 ترانسفکت شده توسط پلاسمید pAAV بیان کننده پروتئین core ویروس هیپاتیت سی در قیاس با سلول‌های تیمار نشده (سلول طبیعی) و سلول‌های Huh7 ترانسفکت شده با پلاسمید بیان کننده پروتئین GFP خالی کاهش معناداری آماری را از نظر میزان بیان ژن miR-150 نشان می‌دهند $P < 0.01$. این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین core دارای اثرات مهار کننده بر روی بیان miR-150 بوده و این پروتئین توانسته است میزان بیان miR-150 را تحت تأثیر قرار بدهد.



شکل ۲. اثر پروتئین core ویروس هیپاتیت سی بر روی میزان بیان miR-150. آنالیز بیان ژن پس از انجام Real Time PCR نشان داد که پروتئین core ویروس هیپاتیت سی به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش بیان miR-150 شده است. هر bar بیانگر افزایش یا کاهش Relative fold change در مقایسه با بیان سلول‌های کنترل می‌باشد. $P < 0.01$ نشان دهنده تغییر معنادار fold change گروه تست با گروه‌های کنترل می‌باشد.

توالی پیش بینی شده اهداف بیولوژیک miR-150 جهت پیش بینی توالی‌های هدف miR-150 نرم افزار TargetsScan 6.1 بکار گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، نتایج این آنالیز نشان داد که miR-150

نواحی هیبرید اهداف بیولوژیک مربوط به miR-150 آنالیز شد. (<http://www.targetscan.org>)

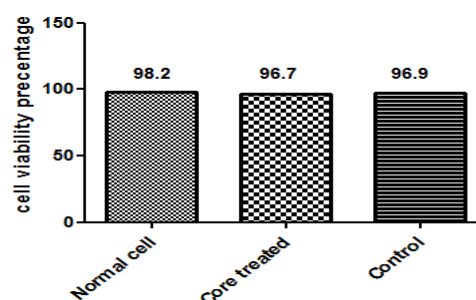
آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism انجام گرفت. برای ارزیابی بین تفاوت داده‌ها از روش one-way ANOVA استفاده گردید. تفاوت آماری بین گروه‌های کنترل و تست توسط روش Tukey post-test تعیین شد و $P \leq 0.05$ تفاوت معنادار آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

عدم اثر سمیتی و کشندگی سلولی پلاسمید pAAV/Full core بیان کننده پروتئین core ویروس هیپاتیت سی

در این مطالعه از تست trypan blue exclusion جهت بررسی اثر وکتور بیان کننده پروتئین core ویروس هیپاتیت سی بر روی زنده‌مانی سلولی استفاده شد. نتایج این تست در گروه‌های مختلف نشان داد که تفاوت معناداری از نظر زنده‌مانی سلولی در بین سلول‌های Huh7 ترانسفکت شده و غیر ترانسفکت وجود ندارد $P < 0.01$ (شکل ۱) شده است.



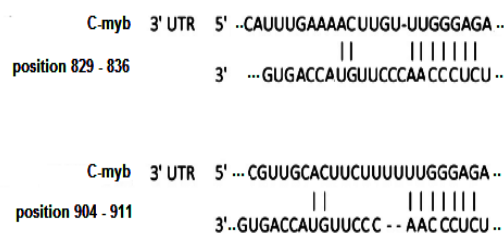
شکل ۱. اثر پلاسمید بیان کننده پروتئین core بر روی میزان زنده‌مانی سلولی. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود پلاسمید بیان کننده پروتئین core هیچ‌گونه اثرات کشندگی سلولی و تحریکی معناداری را پس از انجام تست trypan blue exclusion در بین گروه‌های مختلف نشان نداده است.

اثر پروتئین core ویروس هیپاتیت سی بر روی میزان بیان miR-150

برای بررسی اینکه آیا پروتئین core ویروس هیپاتیت سی می‌تواند بیان miR-150 را تحت تأثیر قرار دهد یا خیر، ما

مطالعه ما نشان داد که پروتئین core ویروس HCV می‌تواند بر روی پروفایل بیانی miR-150 تأثیر گذار بوده بطوریکه این پروتئین در بررسی ما توانست به‌طور معنادار و قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش بیان miR-150 شود. علاوه بر این ما با استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیک اهداف بیولوژیک miR-150 را بررسی نمودیم، نتایج این بررسی نشان داد که miR-150 در بالاترین سطح هیپرید شدن و تطابق می‌تواند به Cmyb متصل شود و رونوشت‌های این ژن یک هدف بیولوژیکی مهم برای miR-150 محسوب می‌گردند. C-myb یک پروتئین کوژن می‌باشد که یک فاکتور رونویسی مهمی را کد می‌کند که در تحریک تکثیر، تمایز و زنده‌مانی سلولی نقش دارد (۱۰). گزارشات نشان می‌دهد که طی عفونت مزمن در سلول‌های کبدی آلوده با HCV بیان این پروتئین بالا رفته و بیان آن در این سلول‌ها در توسعه بیماری کبد و پیشرفت بیماری به عوارض وخیم‌تر نقش دارد (۱۲-۱۰). پروتئین core به همراه دیگر پروتئین‌های ویروس HCV و miR-150 در بیماری‌های مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۵-۱۳، ۹). به عنوان مثال لی و همکاران نشان دادند که پروتئین core ویروس HCV می‌تواند به‌طور معناداری باعث کاهش بیان miR-122 شود که این می‌تواند در مکانیسم طفره رفتن ویروس از سیستم ایمنی و عفونت مزمن تأثیر گذار باشد (۱۶). علاوه بر این چن و همکاران در طی یک مطالعه بر روی miR-150 و عفونت سلول‌های آلوده با ویروس تب دانگ نشان دادند که طی عفونت کاهش بیان miR-150 اتفاق افتاده و افزایش بیان miR-150 می‌تواند در کاهش پاتوژنسیته تب هموراژیک ناشی از ویروس دانگ نقش داشته باشد (۱۴). در یک گزارش دیگر موران و همکاران اهمیت miR-150 را در پاتوژن بیماری ناشی از ویروس آنفولانزا سوبه H1N1 نشان دادند (۱۵). در مطالعه آن‌ها مشاهده شد که افزایش بیان miR-150 با پیامدهای بالینی ضعیف‌تری همراه می‌باشد. در کنار این موارد، نتایج چند مطالعه نشان داده است که در بیماری‌های مزمن کبدی از جمله فیبروز کبد بیان miR-150 دچار کاهش معناداری می‌شود

بالاترین سطح هیپرید شدن به دو توالی ناحیه UTR ۳' مربوط به رونوشت ژن C-myb متصل می‌گردد.



شکل ۳. توالی‌های هدف پیش بینی شده miR-150.

بحث و نتیجه گیری

عفونت سلول‌های کبدی توسط ویروس‌های هیپاتیت، به خصوص ویروس HCV، یک خطر عمده پیشرفت عفونت به یک عفونت مزمن و متعاقب آن فیروز کبد و سرانجام سیروز و سرطان سلول‌های کبدی محسوب می‌شود. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که پروتئین‌های ویروس HCV در عفونت مزمن ناشی از ویروس و پیشرفت بیماری نقش داشته و پروتئین‌های این ویروس به مقدار فراوان در سلول‌های کبدی آلوده شناسایی شده‌اند (۹). علاوه بر این بررسی‌ها نشان داده است که پروتئین‌های ویروس HCV می‌توانند از طریق تنظیم-ترانس رونویسی بر روی میزان بیان ژن‌های سلولی و مسیرهای تنظیم دهنده سلولی تأثیر گذار بوده و این تغییرات در پایداری عفونت ویروسی و پیامدهای بالینی وخیم آن نقش بسزایی دارند (۵،۹) microRNAs به عنوان عوامل تنظیم کننده بیان ژن نقش مهمی را در عفونت HCV و پاتوژن بیماری‌های کبدی ایفا می‌کنند (۶). مشخص شده است که عفونت HCV منجر به تغییرات در بیان microRNAs سلولی از طریق تأثیر در مسیرهای سیگنالینگ دهنده و تنظیمی می‌شوند (۵،۶) microRNAs. با هدف قرار دادن فاکتورهای سلولی حیاتی میزبانی مورد نیاز جهت تکثیر ویروس HCV، می‌توانند نقش بسزایی را در عفونت زایی و پاتوژن ناشی از این ویروس ایفا کنند.

در این مطالعه اثر پروتئین core ویروس HCV بر روی بیان miR-150 در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج

نقش قابل ملاحظه‌ای را در پایداری و پیشرفت بیماری‌های مزمن کبدی ایفا کند. روی هم رفته، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین core ویروس HCV می‌تواند میزان بیان miR-150 را تحت تأثیر قرار داده و بدین صورت، این پروتئین ساختاری ممکن است در عفونت پیچیده ناشی از ویروس HCV تأثیر گذار بوده که این می‌تواند بینش جدیدی را در جهت درک پاتوژنز بیماری و استراتژی‌های درمانی به ارمغان بیاورد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی لرستان و همچنین کلیه افراد و پرسنل شاغل و فعال در مرکز تحقیقات هیپاتیت دانشگاه علوم پزشکی لرستان که ما را در این مطالعه یاری نمودند به عمل می‌آورند.

(۱۷)، همچنین سطح بیان miR-150 می‌تواند به عنوان یک بیومارکر مهم جهت تشخیص و پیشرفت سرطان کبد محسوب گردد (۱۸). نتایج این مشاهدات نشان می‌دهد که شبیه به مطالعه ما کاهش سطح بیان miR-150 طی عفونت ویروسی می‌تواند در پیشرفت بیماری کلینیکی ناشی از ویروس و همچنین پاتوژنسیته عفونت مزمن به خصوص بیماری مزمن کبد تأثیر گذار می‌باشد، اما با این حال بررسی‌های با مقیاس وسیع‌تر و اثر پروتئین‌های بیشتری از ویروس HCV در شرایط *in vivo* برای مطالعه اثر و میانکنش بین پروتئین‌های ویروس و عوامل تنظیمی سلولی از جمله microRNAs نتایج و تفاسیر دقیق‌تر و کامل‌تری را می‌تواند در پی داشته باشد.

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه این‌طور به نظر می‌رسد که میانکنش بین پروتئین‌های ویروس HCV و microRNAs به عنوان عوامل مهم تنظیمی داخل سلولی،

References

- Hugo R, Chronic Hepatitis C Infection. *N Engl J Med* 2011; 364:2429-38.
- Averhoff FM, Glass N, Holtzman D. Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2012; 55(suppl 1): S10-S15.
- Vio N, Lai MM, *J Biosci*. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? 2003; 28(3):287-304.
- Wu C, Gilroy R, Taylor R, Olyae M, Abdulkarim B, Forster J et al. Alteration of Hepatic Nuclear Receptor-mediated Signaling Pathways in HCV Patients with and without a History of Alcohol Drinking. *Hepatology*. 2011; 54(6):1966-1974.
- Gupta P, Cairns MJ, Saksena NK. Regulation of gene expression by microRNA in HCV infection and HCV-mediated hepatocellular carcinoma. *Virology Journal*. 2014; 11(1): 1-14.
- Shrivastava S, Mukherjee A, Ray RB. Hepatitis C virus infection, microRNA and liver disease progression. *World Journal of Hepatology*. 2013; 5(9): 479-486.
- Punga AR, Andersson M, Alimohammadi M, Punga T. Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015; 356(1-2): 90-96.
- Chen W, Han C, Zhang J, Song K, Wang Y, Wu T. miR-150 Deficiency Protects against FAS-Induced Acute Liver Injury in Mice through Regulation of AKT. *PLoS One*. 2015;21:10(7):e0132734.
- Pawlotsky JM, Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12(2): 96-102.
- Kitada T, Seki S, Nakatani K, Kawada N, Kuroki T, Monna T. Hepatic expression of c-Myb in chronic human liver disease. *Hepatology*. 1997;26(6):1506-12.
- Tappero G, Farina M, Negro F, Anfossi G, Mattiello L, Giuli PD et al. Intrahepatic expression of c-fos, c-myb and c-myc oncogenes: correlation with virus-induced chronic liver disease and response to interferon. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1997;29(2):148-54
- Yang H, Huang ZZ, Wang J, Lu S. The role of c-Myb and Sp1 in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A gene expression in human hepatocellular carcinoma. *FASEB J*. 2001; 15(9):1507-16.
- Wu CF, Lin YL, Huang YT. Hepatitis C Virus Core Protein Stimulates Fibrogenesis in Hepatic Stellate Cells Involving the Obese Receptor. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114:541-550..
- Chena RF, Yanga KD, Lee IK, Liu JW, Huang CH, Lin CY et al. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic feve. *J Infect*. 2014; 69(4): 366-374.
- Moran J, Ramirez-Martinez G, Jimenez-Alvarez L, Cruz A, Perez-Patrigeon S, Hidalgo A et al. Circulating levels of miR-150 are associated with poorer outcomes of

- A/H1N1 infection. *Exp Mol Pathol*. 2015; 99(2):253-61.
16. Li S, Xing X, Yang Q, Xu H, He J, Chen Z, et al. The effects of hepatitis C virus core protein on the expression of miR-122 in vitro. *Virology Journal*. 2013; 10(1): 1-7.
17. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. microRNA-150: a promising novel biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2015; 28:10:129.
18. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. microRNA-150: a promising novel biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Pathology*. 2015; 10(1): 1-9.
19. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. microRNA-150: a promising novel biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Pathology*. 2015; 10:129.