



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.05.010  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.05.010  
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(5):590-596.

· 基础研究 ·

## 丙型肝炎病毒蛋白对肝细胞 RASSF2 mRNA 表达的影响及其机制

陈炜, 冯德云, 李波, 王颖

(中南大学湘雅医院 病理科, 湖南 长沙 410008)

### 摘要

**目的:** 探讨丙型肝炎病毒 (HCV) 蛋白 NS3、Core、NS5A 对肝细胞 RASSF2 mRNA 表达及 RASSF2A 启动子甲基化的状态的影响。

**方法:** 用 RT-PCR 检测分别转染 NS3、Core、NS5A 表达质粒的肝 QSG7701 细胞 (NS3/QSG7701、Core/QSG7701、NS5A/QSG7701) 以及正常肝细胞 L02 中 RASSF2 mRNA 的表达; 用甲基化特异性 PCR 检测 NS3/QSG7701、Core/QSG7701 及 NS5A/QSG7701 细胞中 RASSF2A 启动子甲基化的状态, 以及去甲基化药物 5-aza-dC 处理后, 各细胞 RASSF2 mRNA 表达情况与生物学行为的变化。

**结果:** 与正常肝细胞 L02 比较, NS3/QSG7701、Core/QSG7701、NS5A/QSG7701 细胞中 RASSF2 mRNA 的表达均明显降低 (均  $P < 0.05$ ); 3 种细胞的 RASSF2A 启动子均发生完全甲基化。经 5-aza-dC 处理后, RASSF2 mRNA 的表达在 NS3/QSG7701 和 Core/QSG7701 细胞中明显上调 (均  $P < 0.05$ ), 但在 NS5A/QSG7701 细胞中无明显变化 ( $P > 0.05$ ); NS3/QSG7701 和 Core/QSG7701 细胞经 5-aza-dC 处理后, 增殖率下降、凋亡率增加 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** NS3、Core、NS5A 能通过 RASSF2A 启动子甲基化, 且 NS5A 还通过其他机制降低 RASSF2 表达, 该作用可能参与了 HCV 相关肝细胞癌的发生。

### 关键词

肝肿瘤; 病毒非结构蛋白质类; 甲基化; 肿瘤抑制蛋白质类  
中图分类号: R735.7

## Influences of hepatitis C virus proteins on RASSF2 mRNA expression in hepatic cells and their mechanisms

CHEN Wei, FENG Deyun, LI Bo, WANG Ying

(Department of Pathology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the influences of hepatitis C virus (HCV) proteins NS3, Core and NS5A on RASSF2 mRNA expression and methylation status of RASSF2A promoter in hepatic cells.

**Methods:** The RASSF2 mRNA expressions in hepatic cells respectively transfected with NS3-, Core- and NS5A-expression plasmids (NS3/QSG7701, Core/QSG7701 and NS5A/QSG7701) as well as normal hepatic cell line L02 were determined by RT-PCR method. The methylation statuses of RASSF2A promoter in NS3/QSG7701,

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (14JJ3048)。

收稿日期: 2017-02-12; 修订日期: 2017-04-20。

作者简介: 陈炜, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事肝脏分子病理学方面的研究。

通信作者: 王颖, Email: 20527296@qq.com

Core/QSG7701 and NS5A/QSG7701 cells were examined by methylation-specific PCR, and the changes in their RASSF2 mRNA expressions and biological behaviors after treatment with demethylation agent 5-aza-dC were observed.

**Results:** The RASSF2 mRNA expressions were significantly decreased in all NS3/QSG7701, Core/QSG7701 and NS5A/QSG7701 cells compared with L02 cells (all  $P < 0.05$ ), and the RASSF2A promoters were fully methylated in all the three types of cells. After 5-aza-dC treatment, the RASSF2 mRNA expression was upregulated in NS3/QSG7701 and Core/QSG7701 cells (both  $P < 0.05$ ), but did not change in NS5A/QSG7701 cells ( $P > 0.05$ ); the proliferation rate was decreased and apoptosis rate was increased in NS3/QSG7701 and Core/QSG7701 cells 5-aza-dC treatment (both  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** NS3, Core and NS5A can reduce RASSF2 expression through RASSF2A promoter methylation and also through other mechanism by NS5A. This effect may probably contribute to the carcinogenesis of HCV-associated hepatocellular carcinoma.

**Key words**

Liver Neoplasms; Viral Nonstructural Proteins; Methylation; Tumor Suppressor Proteins

**CLC number:** R735.7

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染是肝细胞癌发生的重要诱因之一, 据统计, 全世界有2亿多人感染了HCV病毒, 约占世界人口的3.3%。HCV蛋白受宿主和病毒蛋白酶的作用被切割形成至少10种蛋白, 包括4种结构蛋白 (核心蛋白Core、包膜蛋白E1和E2, 还有p7离子通道) 和6种非结构蛋白 (NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)。随着对肿瘤发病机制认识的深入, 表观遗传学改变在肿瘤发生中的作用已日渐受到重视。DNA甲基化是表观遗传学的重要表现形式, 是调节基因组功能的重要手段, RASSF2通过启动子甲基化在多种肿瘤中失活<sup>[1-7]</sup>。它作为一种潜在的抑癌基因, 具有促进凋亡和细胞周期停滞及抑制细胞生长的作用<sup>[8-9]</sup>。RASSF2有3个转录本, 分别为RASSF2A、RASSF2B和RASSF2C, 仅RASSF2A转录本的启动子区有CpG岛。研究表明, RASSF2A以GTP依赖的方式与K-RAS直接结合, 促进细胞凋亡、细胞周期停滞和抑制细胞生长<sup>[8]</sup>, 在肺癌、胃癌、乳腺癌及胰腺癌中存在RASSF2A启动子甲基化<sup>[1, 10-11]</sup>。5-杂氮-2'-脱氧胞苷 (5-aza-dC) 是一种核苷酸类似物, 可抑制甲基化转移酶的活性, 使DNA去甲基化, 体外实验表明, 5-aza-dC对胰腺癌、鼻咽癌、胃癌及结肠癌等多种细胞有显著生长抑制作用<sup>[12-15]</sup>, 推测HCV蛋白可能是通过诱导RASSF2A基因启动子甲基化, 抑制其转录, 从而异常激活RAS信号通路, 参与肝细胞恶性转化。本研究观察了分别表达NS3、Core、

NS5A的QSG7701肝细胞株 (NS3/QSG7701、Core/QSG7701、NS5A/QSG7701) 中RASSF2 mRNA表达水平的改变, 并探讨RASSF2A启动子甲基化在HCV蛋白所致的肝细胞癌中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

稳定表达Core、NS3的人源肝细胞系Core/QSG7701和NS3/QSG7701由本实验室构建及保存; 稳定表达NS5A的人源肝细胞系NS5A/QSG7701由中南大学湘雅二医院传染科龚国忠教授惠赠; 其中L02细胞株购自中南大学细胞生物学研究室; RT-PCR试剂盒、DNA提取试剂盒、逆转录试剂盒均购自TaKaRa公司; EZDNA甲基化修饰试剂盒购自天漠科技有限公司; 5-aza-dC购自Sigma公司; NS3、NS5A、 $\beta$ -Actin单克隆抗体以及Core多克隆抗体均购自Abcam公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和羊抗鼠均购自中杉金桥; AnnexinV/PI双染试剂盒购自联科生物; 细胞增殖与毒性检测试剂盒购自七海复泰。RASSF2基因的PCR引物由上海生物工程有限公司合成 (正义: CTA TGG CTC TGT CAC CAA CG, 反义: GCT TCT GTT TCT CAC CAC TCG, 长度128 bp), GAPDH引物 (正义: GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC AAC, 反义: CAT GAG TCC TTC CAC GA TAC C, 长度123 bp); RASSF2A启动子甲基化引物 (正义: GTT CGT CGT

CGT TTT TTA GGC G, 反义: AAA AAC CAA CGA CCC CCG CG, 长度108 bp), RASSF2A启动子未甲基化引物(正义: AGT TTG TTG TTG TTT TTT AGG TGG, 反义: AAA AAA CCA ACA ACC CCC ACA, 长度108 bp)。

## 1.2 主要方法

**1.2.1 RT-PCR** 按照细胞中提取RNA的步骤所示取出生长良好的细胞,用PBS清洗3次,1 mL的TRIzol试剂吹打,200  $\mu$ L的三氯甲烷孵育5 min,500  $\mu$ L的异丙醇孵育10 min,75%的乙醇吹打混匀,离心后静置干燥5 min。加入10  $\mu$ L的DEPC水,吹打混匀,取2  $\mu$ L RNA样本,紫外分光光度计检测RNA样本的浓度和纯度,再根据TAKARA公司的逆转录试剂盒所示配制基因组DNA去除的反应液,共10  $\mu$ L,反应条件为42  $^{\circ}$ C 2 min,4  $^{\circ}$ C存放。配制20  $\mu$ L的逆转录反应液,反应条件为37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 s,4  $^{\circ}$ C存放,根据康维世纪PCR试剂盒进行扩增,扩增条件为94  $^{\circ}$ C预变性2 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,61  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,72  $^{\circ}$ C终延伸2 min,共35个循环,扩增结束后取出样本,配制好2%的琼脂糖凝胶,直接进行电泳。

**1.2.2 甲基化特异性PCR(MSP)** 细胞培养好后取出,胰酶消化后,用1 mL的PBS吹打,离心后加入200  $\mu$ L的PBS重悬细胞,根据TAKARA公司的全基因组DNA提取试剂盒所示,最终洗脱DNA,再取20  $\mu$ L DNA按照天漠公司的甲基化修饰试剂盒所示加入CT Conversion Reagent,放到PCR仪上,设置程序为98  $^{\circ}$ C 10min,64  $^{\circ}$ C 2.5 h,接着继续按试剂盒所示最终洗脱DNA,按照康维世纪盒所示配制50  $\mu$ L PCR扩增反应液,设置反应条件为94  $^{\circ}$ C预变性2 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,61  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,72  $^{\circ}$ C终延伸2 min,共35个循环,扩增后取反应产物,配制好2%的琼脂糖凝胶后,进行电泳。

**1.2.3 Western blot** 首先按步骤提取细胞中的总蛋白,准备4  $^{\circ}$ C离心机,用冰的PBS洗涤3次,每瓶细胞中加入100  $\mu$ L的细胞裂解混合物,冰上裂解30 min,离心后得到蛋白,用BCA法测定样本OD值,每管加入25  $\mu$ L的标准品和200  $\mu$ L已配制好的工作液,37  $^{\circ}$ C孵育30 min,568 nm处测定OD值。然后每管加入22.5  $\mu$ L的双蒸水、2.5  $\mu$ L的待测蛋白及200  $\mu$ L的分析液,37  $^{\circ}$ C孵育30 min,

测OD值计算蛋白浓度,再按比例将蛋白与上样缓冲液混合,沸水5 min,按步骤配好分离胶和积层胶后,将Maker、混合物和上样缓冲液加入到凝胶孔中,连接电泳装置,65 V电压50 min,110 V电压60 min,完毕后取出凝胶,配制好转膜缓冲液,并加入甲醇,将凝胶和滤纸直接放入到转膜缓冲液中,PDVF膜甲醇浸泡15 s,双蒸水平衡5 min,放到转膜缓冲液里。安装三明治结构,从下到上依次为滤纸 $\rightarrow$ PVDF膜 $\rightarrow$ 凝胶 $\rightarrow$ 滤纸。15 V恒压45 min。配制好封闭液,PVDF膜放到封闭液中,摇晃4 h。接着一抗孵育(摇床2 h,4  $^{\circ}$ C冰箱过夜),TBST洗涤3次,每次10 min,二抗孵育4 h,TBST洗涤3次,每次10 min。打开显像仪,设置曝光程序为每5s曝光1次,共曝100张。

**1.2.4 MTT** 待细胞生长良好后,PBS洗3次,胰酶消化吹打细胞并计数。每孔加入2 500个细胞,设置5个复孔,且每株细胞分别为对照组和实验组,培养箱中培养24、48、72 h后,避光加入20  $\mu$ L(5 mg/mL)的MTT试剂,继续培养4 h。加入150  $\mu$ L的DMSO,摇晃20 min后,酶标仪490 nm处测其OD值。

**1.2.5 流式细胞术** 取生长良好的细胞,胰酶消化后分组,再加入不同浓度药物,贴壁生长后用预冷PBS洗涤3次,并重悬。再按照试剂盒所示加入相应试剂,上机前加入10  $\mu$ L的PI,避光孵育10 min。加入400  $\mu$ L的1 $\times$ 结合缓冲液,上机并记录结果。

## 1.3 统计学处理

采用PASW Statistics 18软件进行统计分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料组间比较采用独立样本 $t$ 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NS3/QSG7701、Core/QSG7701、NS5A/QSG7701细胞中相应蛋白表达

提取分别转染空载体pRcCMV、NS3、NS5A和Core表达质粒的QSG7701细胞的总蛋白,检测NS3、Core、NS5A蛋白的表达,结果显示转染了NS3、NS5A和Core表达质粒的细胞均有相应蛋白的表达(图1)。

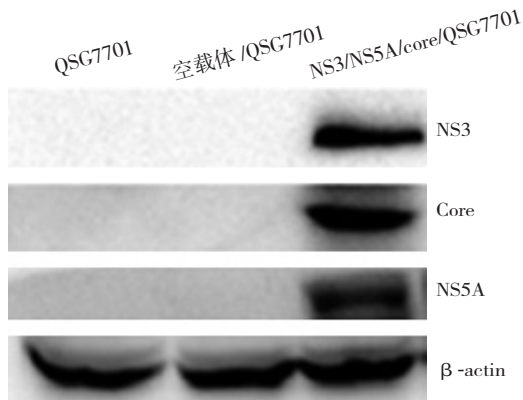


图1 NS3、Core、NS5A 蛋白检测

Figure1 Detection of expressions of NS3, Core and NS5A proteins

### 2.2 L02、Core/QSG7701、NS3/QSG7701 及 NS5A/QSG7701 细胞中 RASSF2 mRNA 表达

提取L02、Core/QSG7701、NS3/QSG7701及NS5A/QSG7701细胞的总RNA,检测每株细胞RASSF2 mRNA的相对表达量,与L02细胞(RASSF2 mRNA表达量:  $0.582 \pm 0.066$ )比较,Core/QSG7701(RASSF2 mRNA表达量:  $0.027 \pm 0.004$ )、NS3/QSG7701(RASSF2 mRNA表达量:  $0.146 \pm 0.074$ )及NS5A/QSG7701(表达水平  $0.094 \pm 0.014$ )3株细胞的RASSF2 mRNA的表达均明显降低( $P=0.000、0.002、0.000$ )(图2)。

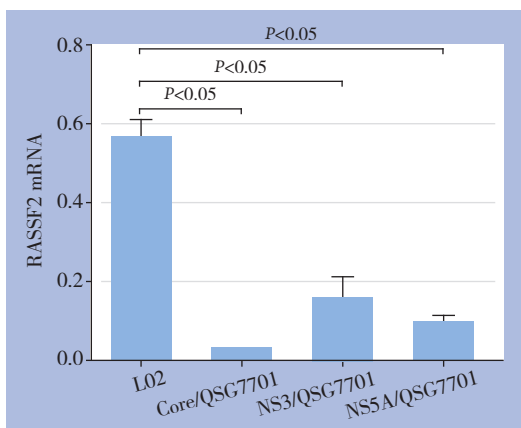
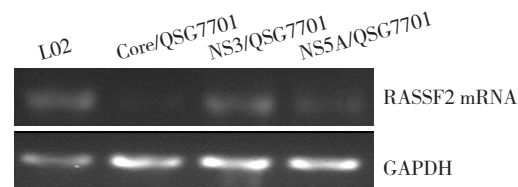


图2 RASSF2 mRNA 表达检测

Figure 2 Detection of RASSF2 mRNA expressions

### 2.3 RASSF2A 启动子甲基化检测

提取NS3/QSG7701、Core/QSG7701及NS5A/QSG7701细胞的DNA,进行甲基化的修饰,检测该3株细胞系的RASSF2A启动子的甲基化状态,显示3株细胞RASSF2A启动子均发生了完全甲基化(图3)。

QSG7701细胞的DNA,进行甲基化的修饰,检测该3株细胞系的RASSF2A启动子的甲基化状态,显示3株细胞RASSF2A启动子均发生了完全甲基化(图3)。

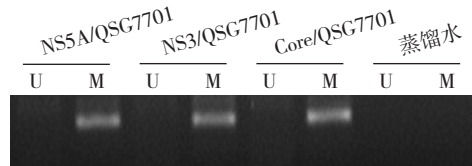


图3 MSP 结果 M: 甲基化特异性扩增; U: 非甲基化特异性扩增

Figure 3 Results of MSP M: Methylated-specific methylation; B: Unmethylated-specific methylation

### 2.4 5-aza-dC 处理对各细胞 RASSF2 mRNA 表达的影响

每株细胞设置3组,分别为未加药物的对照组、 $5 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组和 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组,培养4 d,检测各组细胞RASSF2 mRNA的表达。结果显示: NS3/QSG7701细胞株中,与对照组比较, $5 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组和 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组RASSF2 mRNA的表达明显增多( $P=0.000、0.000$ ); Core/QSG7701细胞株中,与对照组比较, $5 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组和 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组RASSF2 mRNA的表达明显增多( $P=0.023、0.000$ ); NS5A/QSG7701细胞中,与对照组比较, $5 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组和 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC实验组RASSF2 mRNA的表达无明显变化( $P=0.170、0.270$ )(图4)。

### 2.5 5-aza-dC 处理对 NS3/QSG7701 和 Core/QSG7701 细胞生物学行为的影响

将NS3/QSG7701和Core/QSG7701细胞分为未加药物的对照组和 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC处理的实验组,NS3/QSG7701细胞株对照组与实验组凋亡率分别为( $11.68 \pm 1.05$ )%、( $27.60 \pm 1.57$ )%,差异有统计学意义( $P=0.000$ ); Core/QSG7701细胞株对照组与实验组凋亡率分别为( $20.38 \pm 1.62$ )%、( $56.79 \pm 1.92$ )%,差异有统计学意义( $P=0.000$ )(图5)。同时,于 $10 \mu\text{mol/L}$  5-aza-dC处理0、24、48、72 h后检测细胞的增殖,与对照组比较,NS3/QSG7701细胞72 h后,细胞的增殖明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1); Core/QSG7701细胞24、48、72 h时间点,细胞的增殖均明显受到抑制,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$ )(表2)。

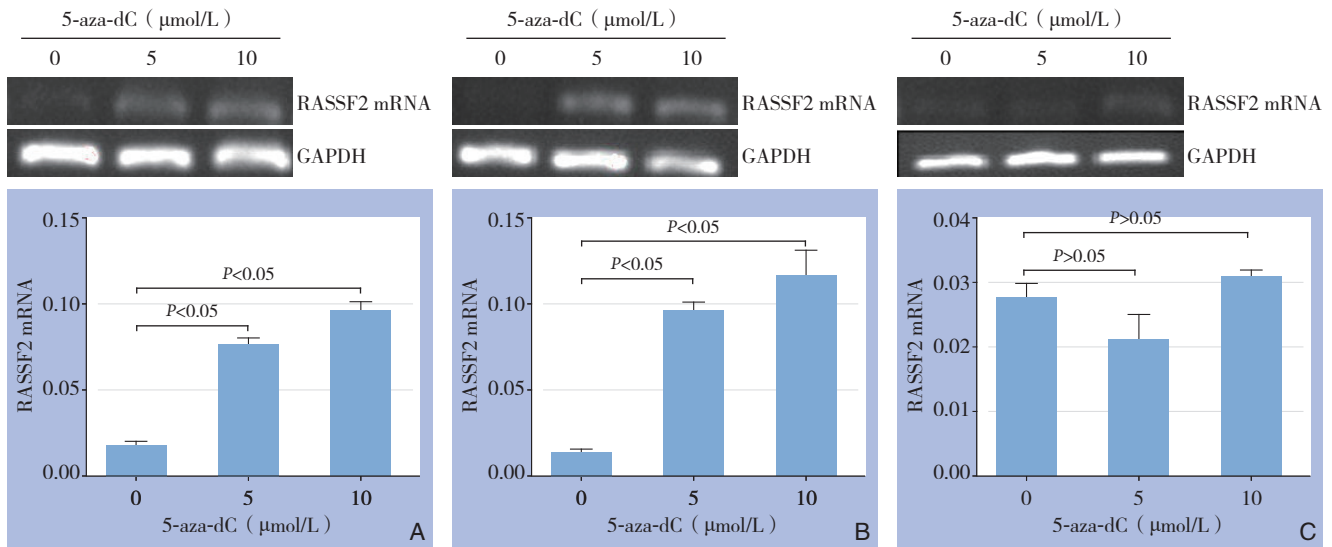


图 4 5-aza-dC 处理后各细胞 RASSF2 mRNA 的表达 A: NS3/QSG7701 细胞; B: Core/QSG7701 细胞; C: NS5A/QSG7701 细胞

Figure 4 RASSF2 mRNA expressions in each type of cells after 5-aza-dC treatment A: NS3/QSG7701 cells; B: Core/QSG7701 cells; C: NS5A/QSG7701 cells

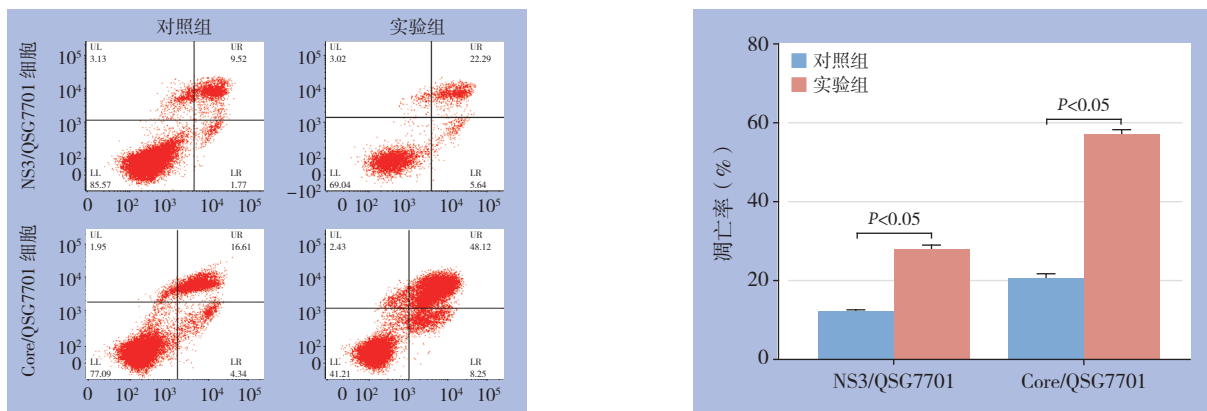


图 5 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 5 Cell apoptosis detected by flow cytometry

表 1 5-aza-dC 处理对 NS3/QSG7701 细胞增殖的影响 (OD,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of 5-aza-dC treatment on proliferation in NS3/QSG7701 cells (OD,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	实验组	P <sup>1)</sup>
0 h	0.09 ± 0.008	0.09 ± 0.008	—
24 h	0.453 ± 0.029	0.375 ± 0.045	0.065
48 h	1.260 ± 0.108	1.116 ± 0.003	0.082
72 h	1.458 ± 0.028	1.273 ± 0.017	0.010

注: 1) 与 0 h 比较

Note: 1) Comparison with 0-h value

表 2 5-aza-dC 处理对 Core/QSG7701 细胞增殖的影响 (OD,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of 5-aza-dC treatment on proliferation in Core/QSG7701 cells (OD,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	实验组	P <sup>1)</sup>
0 h	0.09 ± 0.008	0.09 ± 0.008	—
24 h	0.394 ± 0.005	0.354 ± 0.012	0.006
48 h	1.150 ± 0.017	0.999 ± 0.028	0.001
72 h	1.417 ± 0.058	1.136 ± 0.029	0.002

注: 1) 与 0 h 比较

Note: 1) Comparison with 0-h value

### 3 讨论

HCV 基因组大约有 9.6 kb, 编码约含 3 000 个氨基酸的多聚蛋白, 能被病毒或宿主细胞的酶剪

切成至少 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 这些蛋白在病毒的复制和致病过程中起着重要作用<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明, 表达 HCV 相关蛋白的质粒转染至正常肝细胞后, 能促进肝细胞无限增殖, 并导致

其恶性转化。DNA甲基化是表观遗传学中最常见的现象,约60%的人类基因启动子区含有CpG岛。CpG岛甲基化使染色体结构发生变化,高度螺旋化,凝缩成团,失去转录活性,从而导致转录抑制。目前发现启动子高甲基化的基因有Rb、P16INK4a、VHL、hMLH,这些启动子基因的高甲基化与细胞周期、凋亡、DNA的修复以及血管生成有关<sup>[18-21]</sup>。有研究<sup>[22-24]</sup>显示抑癌基因RASSF2A基因失活最重要的机制是由于其启动子发生了甲基化,在结肠癌的细胞系、结肠腺瘤以及结肠癌中常见RASSF2A启动子甲基化,而正常的结肠黏膜则否。

既往研究<sup>[25]</sup>表明表观遗传学的变化是可逆的,DNA甲基转移酶的抑制剂可以改变DNA启动子甲基化的状态,使其发生去甲基化,5-aza-dC是一种DNA甲基转移酶抑制剂,当DNA复制时,它可结合到5-甲基胞嘧啶的位置,使DNA甲基转移酶失活,达到去甲基化的作用,使甲基化的抑癌基因重新活化,抑制细胞生长或促进细胞凋亡。5-aza-dC除了能够诱导DNA去甲基化,还可以使组蛋白去甲基化,它还可还原甲基化或乙酰化所诱导的染色质重塑<sup>[26]</sup>。在基因转录沉默过程中,组蛋白乙酰化和DNA甲基化之间相互作用,启动子CpG岛的甲基化使局部的组蛋白去乙酰化,组蛋白乙酰化保护DNA不发生甲基化<sup>[27]</sup>。

本研究检测了正常肝细胞L02和NS3/QSG7701、Core/QSG7701及NS5A/QSG7701细胞系中RASSF2 mRNA的表达,结果显示,与正常的肝细胞L02相比,NS3/QSG7701、Core/QSG7701及NS5A/QSG7701细胞的RASSF2 mRNA的表达均下降,表明NS3、Core和NS5A蛋白能抑制RASSF2 mRNA的表达;MSP检测该3株细胞系中RASSF2A基因启动子甲基化的状态,发现RASSF2A基因启动子均发生了完全甲基化。为了进一步分析RASSF2 mRNA的表达的下降是否与RASSF2A启动子的高甲基化有关,用不同浓度的去甲基化药物5-aza-dC处理了NS3/QSG7701、Core/QSG7701、NS5A/QSG7701细胞,结果发现5-aza-dC处理后,NS3/QSG7701和Core/QSG7701细胞RASSF2 mRNA的表达明显升高,而NS5A/QSG7701细胞RASSF2 mRNA的表达没有明显改变。这说明HCVNS3和Core可能通过RASSF2A启动子甲基化,发挥其转录抑制作用,而NS5A/QSG7701细胞RASSF2 mRNA表达降低,可能除了启动子甲基化

外,还有其他表观遗传学修饰参与了转录沉默。

细胞增殖和细胞凋亡是反映细胞生物学行为的主要指标之一,有研究<sup>[28-31]</sup>证实同为RASSF家族的RASSF5作为RAS效应因子,连接RAS与HIPPO信号通路,在调控蛋白的稳定性和促进衰老的过程中发挥着重要作用,抑癌基因RASSF2A很可能是通过与K-Ras相互作用发挥其促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的功能<sup>[32]</sup>,本研究结果显示,10 μmol/L 5-aza-dC处理NS3/QSG7701和Core/QSG7701细胞后,能抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,表明HCVNS3和Core可能是通过促进RASSF2A启动子甲基化导致其表达下调,从而在HCV致癌过程中通过影响肝细胞的生物学行为参与肝细胞癌的发生。

#### 参考文献

- [1] Cooper WN, Dickinson RE, Dallol A, et al. Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(12):1805-1811.
- [2] Donninger H, Hesson L, Vos M, et al. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(11):2608-2620. doi: 10.1128/MCB.00208-09.
- [3] Schagdarsurengin U, Richter AM, Hornung J, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF2 in thyroid cancer and functional consequences[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:264. doi: 10.1186/1476-4598-9-264.
- [4] Guo W, Dong Z, Cui J, et al. Aberrant hypermethylation of RASSF2 in tumors and peripheral blood DNA as a biomarker for malignant progression and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(1):73-85.
- [5] Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Torrea N, et al. Differential involvement of RASSF2 hypermethylation in breast cancer subtypes and their prognosis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27):23944-23958.
- [6] Gharanei S, Brini AT, Vaiyapuri S, et al. RASSF2 methylation is a strong prognostic marker in younger age patients with ewing sarcoma[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(9):893-898. doi: 10.4161/epi.25617.
- [7] Guerrero-Setas D, Pérez-Janices N, Blanco-Fernandez L, et al. RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(8):1111-1122. doi: 10.1038/modpathol.2013.32.
- [8] Vos MD, Ellis CA, Elam C, et al. RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(30):28045-28051.
- [9] Zhang Z, Sun D, Van do N, et al. Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in

- nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(1):32–38.
- [10] Maruyama R, Akino K, Toyota M, et al. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(7):1312–1318. doi: 10.1093/carcin/bgn060.
- [11] Zhao L, Cui Q, Lu Z, et al. Aberrant methylation of RASSF2A in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its relation to clinicopathologic features[J]. *Pancreas*, 2012, 41(2):206–211. doi: 10.1097/MPA.0b013e318223d1a5.
- [12] Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6):459–465. doi: 10.1038/nrc1097.
- [13] Murata H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(8):1050–1059.
- [14] Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2003, 22(12):1866–1871.
- [15] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(Suppl):245–254.
- [16] 董金玲, 高萍, 刘顺爱, 等. HCV core/NS3/NS5A对内源性IFN- $\beta$ 表达影响及其调控机制初步研究[J]. *中国肝病杂志:电子版*, 2013, 5(1):1–5. doi:10.3969/j.issn.1674–7380.2013.01.001.
- Dong JL, Gao P, Liu SA, et al. Effects and regulation mechanism of HCV core/NS3/NS5A on expression of IFN- $\beta$  in HepG2 cells[J]. *Chinese Journal of Liver Diseases:Electronic Version*, 2013, 5(1):1–5. doi:10.3969/j.issn.1674–7380.2013.01.001.
- [17] 何琼琼, 肖旭贤, 冯德云, 等. 丙型肝炎病毒NS3基因对人肝细胞生物学特性的影响[J]. *生物技术通报*, 2007, (4):135–140. doi:10.3969/j.issn.1002–5464.2007.04.033.
- He QQ, Xiao XX, Feng DY, et al. Effect of Hepatitis c Virus NS3 Gene on Biological Characterization of Human Hepatocyte[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007, (4):135–140. doi:10.3969/j.issn.1002–5464.2007.04.033.
- [18] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(21):2042–2054.
- [19] Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(5):880–888.
- [20] Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(21):9700–9704.
- [21] Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(20):4525–4530.
- [22] Akino K, Toyota M, Suzuki H, et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(1):156–169.
- [23] Hesson LB, Wilson R, Morton D, et al. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations[J]. *Oncogene*, 2005, 24(24):3987–3994.
- [24] Park HW, Kang HC, Kim IJ, et al. Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promoter and K-ras/BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(1):7–12.
- [25] Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)[J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(5):443–451.
- [26] Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6456–6461.
- [27] Vaissière T, Sawan C, Herczeg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing[J]. *Mutat Res*, 2008, 659(1/2):40–48. doi: 10.1016/j.mrv.2008.02.004.
- [28] Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, et al. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(4):253–265.
- [29] Barnoud T, Donniger H, Clark GJ. Ras Regulates Rb via NORE1A[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(6):3114–3123. doi: 10.1074/jbc.M115.697557.
- [30] Donniger H, Calvisi DF, Barnoud T, et al. NORE1A is a Ras senescence effector that controls the apoptotic/senescent balance of p53 via HIPK2[J]. *J Cell Biol*, 2015, 208(6):777–789. doi: 10.1083/jcb.201408087.
- [31] Schmidt ML, Donniger H, Clark GJ. Ras regulates SCF( $\beta$ -TrCP) protein activity and specificity via its effector protein NORE1A[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(45):31102–31110. doi: 10.1074/jbc.M114.594283.
- [32] Clark J, Freeman J, Donniger H. Loss of RASSF2 Enhances Tumorigenicity of Lung Cancer Cells and Confers Resistance to Chemotherapy [J]. *Mol Biol Int*, 2012, 2012:705948. doi: 10.1155/2012/705948.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 陈炜, 冯德云, 李波, 等. 丙型肝炎病毒蛋白对肝细胞RASSF2 mRNA表达的影响及其机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(5):590–596. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2017.05.010

Cite this article as: Chen W, Feng DY, Li B, et al. Influences of hepatitis C virus proteins on RASSF2 mRNA expression in hepatic cells and their mechanisms[J]. *Chin J Gen Surg*, 2017, 26(5):590–596. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2017.05.010