

# HCV NS3/4A基因外来表达对Huh7细胞凋亡及DNA损伤应答的影响

任来峰<sup>1,3\*</sup> 唐子执<sup>2</sup> 吴惠文<sup>3</sup> 许宁<sup>3</sup> 刘刚<sup>2</sup> 曾鸣<sup>2</sup> 郭莲娣<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200; <sup>2</sup>四川大学华西第二医院发育与干细胞研究所, 成都 610041; <sup>3</sup>山西省汾阳医院肿瘤科, 汾阳 032200)

**摘要** NS3/4A是丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)编码的丝氨酸蛋白酶复合体, 是病毒完成自身复制周期的必要成分。该研究为调查NS3/4A对细胞凋亡及DNA损伤应答(DNA-damage response, DDR)的影响, 在Huh7细胞中表达了外来NS3/4A基因。通过DAPI染色和MTT分析显示, 外来表达NS3/4A显著诱导细胞的凋亡和增殖活力的下降。免疫荧光检测结果表明, NS3/4A可明显增加细胞内源性DNA双链断裂(double strand breaks, DSBs)损伤( $\gamma$ H2AX灶点升高); 而进一步用X-ray诱导细胞外源性DSBs损伤后, 外来表达NS3/4A的细胞显示出明显的DSBs损伤修复缺陷(减缓的 $\gamma$ H2AX灶点消退)。免疫印迹法检测结果显示, NS3/4A可抑制喜树碱(Camptothecin, CPT)诱导的ATM第1 981位丝氨酸的磷酸化(pATM1 981)。以上结果提示, NS3/4A基因外来表达可引起细胞DNA损伤, 抑制ATM介导的DSBs损伤修复信号, 诱导细胞凋亡通路的活化。

**关键词** DNA损伤; 丙型肝炎病毒; DNA双链断裂; 非结构蛋白3/4A

## Over-expression of HCV NS3/4A Influences Cell Apoptosis and Cellular Response to DNA Damage

Ren Laifeng<sup>1,3\*</sup>, Tang Zizhi<sup>2</sup>, Wu Huiwen<sup>3</sup>, Xu Ning<sup>3</sup>, Liu Gang<sup>2</sup>, Zeng Ming<sup>2</sup>, Guo Liandi<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; <sup>2</sup>Developmental & Stem Cell Institute, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; <sup>3</sup>Department of Oncology, Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200, China)

**Abstract** NS3/4A is a proteases complex encoded by hepatitis C virus (HCV), which is essential for the replication cycle of HCV. In this study, to investigate the role of NS3/4A in cellular apoptosis and response to DNA damage, the HCV NS3/4A gene was over-expressed in Huh7 cells. The cellular apoptosis and viability were determined by DAPI stains and MTT assay, and the results indicated that over-expression of NS3/4A could remarkably induce the apoptosis and decreased viability of Huh7 cells *in vitro*. The expression of  $\gamma$ H2AX was determined by immunofluorescence (IF), and the result showed that NS3/4A could induce DNA double-strand breaks (DSBs) in Huh7 cells. In addition, the results also showed that over-expression of NS3/4A resulted in a marked DSB repair defect after treating cells with X-ray (prolonged existence of the  $\gamma$ H2AX foci). Furthermore, we could also detect decreased activatory phosphorylation event (Serine 1 981) of the protein kinase Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)

收稿日期: 2014-04-03 接受日期: 2014-05-12

山西省自然科学基金(批准号: 2014021037-9)和山西医科大学汾阳学院博士启动基金(批准号: 1301)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0358-7235075, E-mail: rlaifeng@163.com; 1031572733@qq.com

Received: April 3, 2014 Accepted: May 12, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (Grant No.2014021037-9) and the Doctoral Scientific Research Foundation of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.1301)

\*Corresponding authors. Tel: +86-358-7235075, E-mail: rlaifeng@163.com; 1031572733@qq.com

网络出版时间: 2014-07-24 16:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0111.html>

after Camptothecin (CPT) treatment in NS3/4A expressed Huh7 cells by Western blot. Together, these results indicate that over-expression of NS3/4A gene can lead to increased levels of DNA damage, inhibition of DSBs repair mediated by ATM, and activation of the apoptosis pathway in Huh7 cells.

**Key words** DNA damage; HCV; DNA double-strand breaks; NS3/4A

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是严重威胁人类健康的公共卫生问题之一,全球约有1.7亿人感染HCV<sup>[1]</sup>。丙型肝炎极易慢性化,约有60%~70%的感染者发展为肝纤维化、肝硬化和肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等严重慢性肝疾病<sup>[2]</sup>。HCC是我国位居第二的癌症“杀手”,也是最为难治的恶性肿瘤之一, HCV感染约与20%的HCC相关<sup>[3]</sup>。HCV为9.6 Kb的单正链RNA病毒,编码一个多聚蛋白前体,可经宿主细胞和病毒自身蛋白酶裂解成3个结构蛋白(核衣壳蛋白C、包膜蛋白E1和E2)和7个非结构蛋白(p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B),这些蛋白可与宿主细胞多种成分交互,分别参与病毒的侵入、组装和复制,同时在HCV相关HCC的发生发展过程中扮演一定的角色<sup>[4]</sup>。

HCV NS3蛋白具有丝氨酸蛋白酶活性和解旋酶活性,借助其蛋白酶活性可将病毒自身合成的多蛋白前体切割成相应的成熟蛋白。NS4A是一个由54个氨基酸组成的小分子蛋白,与NS3形成稳定的复合体,作为NS3蛋白酶的辅因子<sup>[5]</sup>。已有研究发现,NS3/4A蛋白酶在体内与体外均可导致肝细胞的转化<sup>[6-7]</sup>,可能与其干扰宿主细胞DNA损伤应答(DNA damage response, DDR)、造成细胞基因组不稳定有关。比如,NS3/4A与毛细血管扩张-共济失调突变蛋白(Ataxia-telangiectasia mutated, ATM)相互作用,影响细胞DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)修复应答<sup>[8]</sup>; NS3和/或NS4A也可干扰细胞凋亡通路,但目前的实验结果仍不一致,甚至得出相反的结论<sup>[9]</sup>。综上所述,尽管已有NS3和/或NS4A表达与宿主细胞DNA损伤应答及凋亡的报道,但结果尚存在争议,其具体机制有待进一步探讨。因此,本研究拟通过在Huh7细胞中外来表达HCV NS3/4A蛋白,研究NS3/4A对Huh7细胞DNA损伤应答及凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞株(Huh7)和质粒Plv-green、Plv-puro、Plv-Green-NS3/4A及Plv-puro-NS3/4A均为本实

验室保存,胎牛血清及DMEM(高糖)培养基均购于Gibco公司。DNA转染试剂Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司,喜树碱(Camptothecin, CPT)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)均购于Sigma公司。核染料DAPI购于Vector公司,抗 $\gamma$ H2AX抗体、HRP标记的兔抗鼠二抗及羊抗兔二抗均购于Millipore公司,抗pATM1981抗体购自Epitomics公司, FITC标记的抗鼠二抗和抗 $\alpha$ -tubulin抗体均购于Sigma公司, Cy3标记的抗兔二抗购于DAKO公司,抗HCV NS3抗体购自博奥森公司。ECL化学发光试剂购于Millipore公司。科研X光机(DWX100)购于北京万东软件技术有限公司,凝胶分析系统(Chemidoc XRS)和680型酶标仪购于BIO-Rad公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** Huh7细胞培养在含10%胎牛血清、1%的双抗的DMEM(高糖)培养基中,在37 °C孵箱中(含5% CO<sub>2</sub>)常规培养。当细胞长至汇合度达80%~90%时,用胰酶消化进行传代培养。

**1.2.2 质粒转染** 将Huh7细胞接种在细胞培养板或皿中,置37 °C孵箱中(含5% CO<sub>2</sub>)培养,待贴壁细胞生长至约50%~60%汇合度时进行细胞转染,严格按照转染试剂盒说明书操作(注意需在转染前2~3 h更换无抗生素的培养基)。设置Plv-green或Plv-puro空载体对照组和Plv-Green-NS3/4A或Plv-puro-NS3/4A实验组,并在转染后48~72 h,进行后续有关实验。

**1.2.3 DNA损伤处理** CPT处理:将长至汇合度达80%~90%的Huh7细胞,更换新的培养基,使得培养液中含终浓度为2  $\mu$ mol/L的CPT,空白对照组用DMSO代替CPT,继续培养细胞并分别在加药1 h和3 h后收样检测。

X-ray处理:将长至汇合度达80%~90%的Huh7细胞,在科研X光机下处理预定剂量,并设不处理的空白对照组,继续培养细胞并分别在处理后1, 4, 8, 12 h收样检测。

**1.2.4 Western blot分析** 参照文献[10]的方法,简述如下:收集Huh7细胞用RIPA细胞裂解液裂解细胞

抽提细胞总蛋白, 经BCA法定量蛋白浓度, 加入4×上样缓冲液并煮沸后得到蛋白样品; 细胞总蛋白经SDS-PAGE分离后转至PVDF膜上, 经封闭液(含5%脱脂奶粉)封闭1 h, 用一抗室温孵育2 h以上, PBST漂洗, 再用二抗(HRP标记)孵育1~1.5 h, PBST漂洗; 最后将膜用ECL发光试剂显色后, 用凝胶成像仪曝光并整理结果。

**1.2.5 免疫荧光(IF)检测** 参照文献[10]的方法, 简述如下: 将Huh7细胞接种在细胞爬片上, 并转染相应质粒, 转染48 h后直接收样或经DNA损伤处理(设置空白对照组)后继续培养并在预设的时间点收样; 室温下用PBS漂洗细胞, 4%多聚甲醛(PFA)固定10 min, PBS漂洗; 再经0.25% Triton X-100通透处理5~10 min, PBS漂洗; IF封闭液封闭30 min, 湿盒中先后用特异性一抗和荧光素标记的二抗37 °C分别孵育30 min, 每次孵育后用PBS漂洗; 最后用DAPI封片, 荧光显微镜下观察标本片并拍照; 计数细胞的 $\gamma$ H2AX灶点数(100个细胞/每组), 并经3次独立实验计算其平均值。

**1.2.6 细胞凋亡分析** 按照方法1.2.5的步骤处理收集细胞, 并用DAPI染色细胞核。荧光显微镜下观察并拍照。每组细胞随机计数约500个细胞, 分别记录正常细胞(核膜完整规则, 着色为均匀蓝色)数和凋亡细胞(核边缘不规则, 核固缩, 染亮蓝色, 呈均匀

的分叶状或致密斑块等)数, 并经三次独立实验后计算细胞凋亡率。

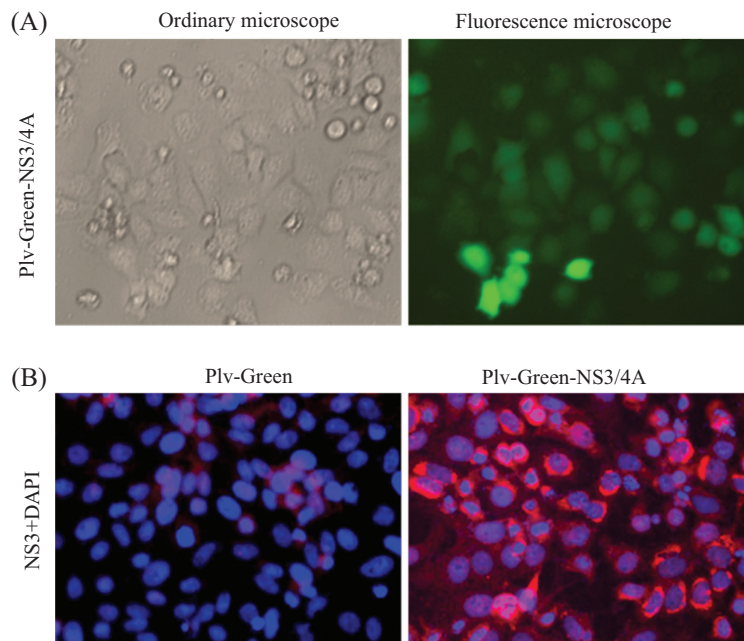
**1.2.7 细胞存活率检测** 将生长在24孔细胞培养板中并经Plv-green(对照组)和Plv-Green-NS3/4A(实验组)质粒转染24 h后的Huh7细胞, 以8 000/孔重新接种于96孔细胞培养板中, 每组设定5个复孔, 连续培养72 h后检测细胞活力。在培养结束前4 h, 在每孔细胞中加入10  $\mu$ L新鲜配制的MTT溶液(5 mg/mL)。培养结束后, 移除培养液, 将每孔细胞溶解在150  $\mu$ L DMSO溶液中, 并在酶标仪上读取细胞在490 nm的吸光度值(*D*)。计算各组细胞(5个独立孔)的平均*D*值, 以对照组细胞的存活率为100%, 则实验组细胞的存活率=(实验组*D*值/对照组*D*值)×100%。

**1.2.8 统计分析** 用SPSS 18.0统计软件进行数据处理, 数据以均数±标准差的形式表示, 均数比较应用*t*检验(双尾), 率的比较应用卡方分析, 以*P*<0.05表示差异显著, *P*<0.01为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Plv-Green-NS3/4A重组质粒在Huh7细胞中的表达

Huh7细胞瞬时转染Plv-Green和Plv-Green-NS3/4A重组质粒48 h后, 采用荧光显微镜观察直接



A: 48 h光镜图(左)和48 h荧光图(右); B: 免疫荧光检测HCV NS3/4A表达, Plv-Green转染Huh7细胞(左)或Plv-Green-NS3/4A转染Huh7细胞(右)。A: ordinary microscope (48 h, left panel) and fluorescence microscopy (48 h, right panel); B: the expression of HCV NS3/4A was detected by IF. Huh7 cells were transfected with Plv-Green (left panel) or Plv-Green-NS3/4A (right panel).

图1 Plv-Green-NS3/4A在Huh7细胞中的外来表达(100×)

Fig.1 The ectopic expression of Plv-Green-NS3/4A in Huh7 cells (100×)

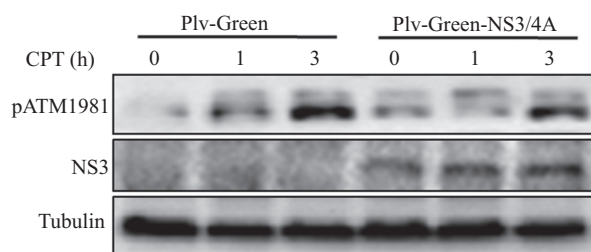


观察、IF及Western blot检测HCV NS3/4A蛋白的表达情况。荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达,可见表达效率可达90%以上(图1A)。经NS3的抗体染色后,可见Plv-Green-NS3/4A重组质粒转染的细胞NS3阳性率(表达红色荧光的细胞)达80%以上,且主要分布于细胞质中,而对照质粒Plv-Green转染的细胞则检测不到NS3荧光(图1B)。Western blot的结果与IF一致,只有Plv-Green-NS3/4A重组质粒转染的细胞可表达NS3蛋白(图2)。以上结果表明, HCV NS3/4A基因可在Huh7细胞中有效表达。

## 2.2 HCV NS3/4A基因外来表达对Huh7细胞凋亡及存活率的影响

Huh7细胞瞬时转染Plv-Green和Plv-Green-NS3/4A重组质粒48 h后,收集细胞经DAPI染色细胞核并在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。结果表明, Plv-Green-NS3/4A转染组细胞凋亡率为(18.33±3.06)%,对照质粒Plv-Green转染组细胞凋亡率则为(7.33±2.52)%,前者凋亡率明显高于后者( $P<0.05$ )(图3)。

我们进一步采用MTT法调查了HCV NS3/4A对Huh7细胞增殖活力的影响。结果发现,在96孔板中经72 h培养后,Plv-Green-NS3/4A转染组细胞D值为(0.52±0.02),对照质粒Plv-Green转染组细胞则为(0.63±0.02),两组比较有显著性差异( $P<0.05$ );与对照组相比, NS3/4A表达组细胞的存活率降低了16.56%。



质粒转染的Huh7细胞经CPT处理或不处理后在相应的时间点收样抽提细胞总蛋白,用免疫印迹检测pATM1981和HCV NS3蛋白表达水平。

Total proteins were extracted from plasmid-transfected Huh7 cells at indicated time points after treating cells with or without CPT that used to determine the expression levels of pATM1981 and HCV NS3 by Western blot.

图2 外来表达NS3/4A干扰Huh7细胞ATM的磷酸化

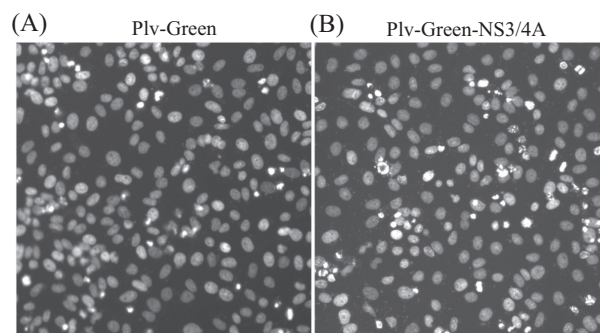
Fig.2 Ectopic expression of NS3/4A disturbed the phosphorylation of ATM in Huh7 cells

## 2.3 外来表达NS3/4A下调Huh7细胞DSBs损伤修复

用X-ray照射质粒转染的Huh7细胞,并用 $\gamma$ H2AX免疫荧光染色来评价细胞的DSBs损伤修复应答过程。结果如图4A和图4B所示,未处理的细胞仅产生极少量 $\gamma$ H2AX foci,但Plv-Puro-NS3/4A转染组细胞 $\gamma$ H2AX foci明显多于对照组( $P<0.05$ );处理1 h后,各组细胞 $\gamma$ H2AX foci数均达峰值且两组间无明显差异;而处理4 h后,对照组细胞的 $\gamma$ H2AX foci数急剧减少,而Plv-Puro-NS3/4A转染组细胞的 $\gamma$ H2AX foci减少的趋势慢于对照组,但两组比较无统计学差异( $P=0.07$ );处理8 h后,对照组细胞 $\gamma$ H2AX foci已明显少于Plv-Puro-NS3/4A转染组细胞( $P<0.05$ );处理12 h后,对照组细胞的 $\gamma$ H2AX foci已基本消退,而Plv-Puro-NS3/4A转染组细胞的 $\gamma$ H2AX foci仍较多,两组比较差异极其显著( $P<0.01$ )。

## 2.4 外来表达NS3/4A干扰Huh7细胞ATM的磷酸化活化

我们采用CPT处理细胞诱导DNA损伤,并经Western blot的方法初步分析了HCV NS3/4A对细胞pATM1981表达水平的影响。结果发现,Plv-Green-NS3/4A转染的Huh7细胞可以有效表达NS3蛋白;在未经损伤处理时,Plv-Green-NS3/4A转染组细胞pATM1981水平高于对照组;而CPT持续处理细胞3 h后,两组细胞pATM1981水平都明显升高,但Plv-Green-NS3/4A转染组细胞的pATM1981水平低于对照组细胞(图2)。

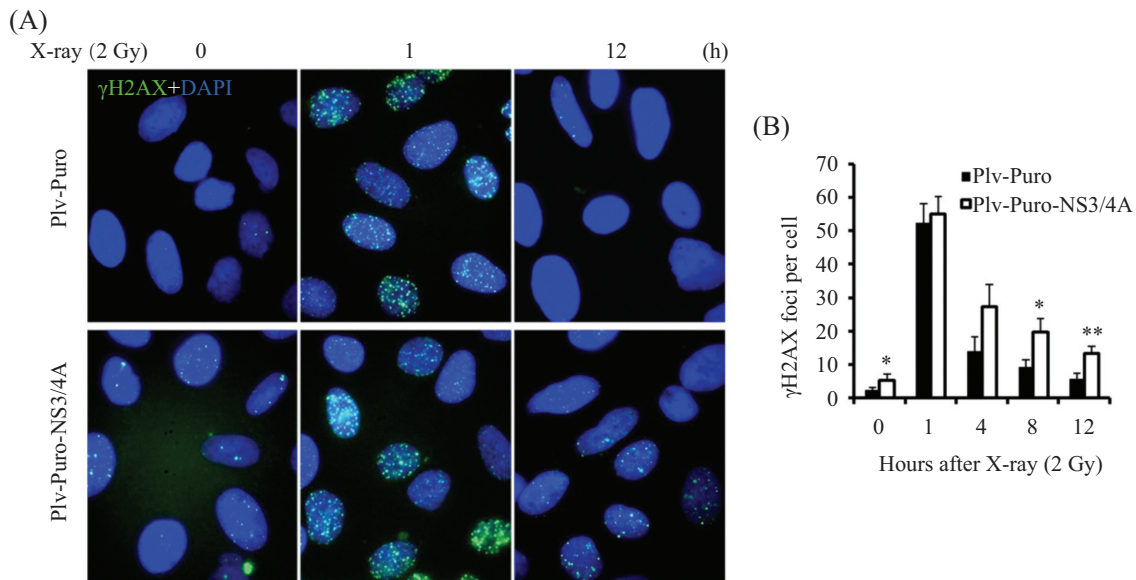


A: 对照质粒Plv-Green转染Huh7细胞; B: Plv-Green-NS3/4A转染Huh7细胞。

A: Huh7 cells were transfected with Plv-Green; B: Huh7 cells were transfected with Plv-Green-NS3/4A.

图3 外来表达NS3/4A增加Huh7细胞凋亡(DAPI染色, 100 $\times$ )

Fig.3 Ectopic expression of NS3/4A increased Huh7 cells apoptosis (DAPI staining, 100 $\times$ )



A: 质粒转染的Huh7细胞经X-ray处理或不处理后在相应的时间点取样固定, 并经免疫荧光染色( $\gamma$ H2AX抗体)后, 计数细胞 $\gamma$ H2AX foci; B:  $\gamma$ H2AX foci数分析, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与Plv-Puro组比较。

A: plasmid-transfected Huh7 cells were fixed and immunostained with the  $\gamma$ H2AX antibody at indicated time points after treating cells with or without X-ray, and  $\gamma$ H2AX foci were determined in cells; B: computational analysis of the number of  $\gamma$ H2AX foci, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs Plv-Puro group.

图4 外来表达NS3/4A干扰Huh7细胞DSBs损伤修复(1 000 $\times$ )

Fig.4 Ectopic expression of NS3/4A disturbed the DSBs repair of Huh7 cells (1 000 $\times$ )

### 3 讨论

为应对各种内源性和外源性的基因毒物质的攻击, 高等动物细胞已进化出一系列精密的调控机制(统称为DDR)来监测和修复损伤的DNA, 包括介导细胞周期阻滞、启动损伤DNA的修复应答及诱导修复无望的细胞凋亡等, 以维持细胞基因组的稳定性, 防止细胞癌变。因此, 细胞的DDR成为了机体重要的抑癌屏障<sup>[11]</sup>。HCV在其感染过程中, 通过其编码蛋白干扰宿主细胞的DDR通路, 造成细胞基因组不稳定很可能是其诱导HCC发生发展的重要机制, 但其具体细节仍不明了<sup>[4]</sup>。

NS3/4A是HCV编码的重要蛋白酶复合体, 与HCV感染引起的细胞基因组不稳定密切相关。Cheng等<sup>[12]</sup>研究发现, Huh7细胞中外来表达HCV NS3可抑制TGF- $\beta$ /Smad3介导的凋亡; Tanaka等<sup>[13]</sup>的研究表明, HCV NS3也可通过与P53相互作用抑制后者介导的凋亡。与上述报道相反, HCV NS3或NS4A过表达则可诱导Huh7、淋巴细胞及树突状细胞的凋亡<sup>[14-17]</sup>。考虑到NS4A在NS3蛋白酶活性中的作用, 我们在Huh7细胞中表达NS3/4A复合体。结果表明, HCV NS3/4A可以明显诱导Huh7细胞的凋亡和增殖活力下降。造成上述研究结果不一致的原因可能

有: 各自所采用的实验条件不同、细胞系不同, 以及HCV NS3和NS4A本身的序列差异(来自不同的临床分离株)等。

已有研究报道, HCV NS3/4A可以诱导细胞产生DSBs<sup>[8]</sup>。DSBs是细胞最严重的DNA损伤, 如果不能被有效修复将引起细胞恶性转化或死亡等严重后果<sup>[10]</sup>。组蛋白H2A的变体H2AX是DSBs修复信号通路的较上游应答因子, 在DNA损伤位点其139位丝氨酸可被DDR信号通路上游激酶ATR及ATM等磷酸化而形成 $\gamma$ H2AX<sup>[10]</sup>。因 $\gamma$ H2AX具有产生快速(在30~60 min可达顶点)、动力性消退(随着DSBs修复的完成,  $\gamma$ H2AX逐渐消退)、特异性荧光抗体染色后可在损伤位点形成显微镜下可见的特异性灶点(foci)等特点, 成为目前检测细胞DSBs修复动力学的敏感指标<sup>[10,18]</sup>。为评价HCV NS3/4A对细胞DSBs损伤修复信号的影响, 我们用X-ray诱导细胞DSBs损伤, 并以 $\gamma$ H2AX作为DSBs的评价指标。结果表明, 未照射时Plv-Green-NS3/4A转染组细胞就产生更多的 $\gamma$ H2AX foci, 提示HCV NS3/4A外来表达可引起细胞DSBs损伤; 两组细胞的 $\gamma$ H2AX foci数均在X-ray处理1 h时达峰值且无明显差别; 但从处理后1 h到12 h的时间段, Plv-Green-NS3/4A转染组细胞 $\gamma$ H2AX

foci消退趋势明显缓于对照组。该结果提示, HCV NS3/4A外来表达会干扰细胞DSBs损伤修复功能而导致DSBs长期存在, 这与文献<sup>[8]</sup>的报道一致。

ATM作为DNA损伤应答通路最关键的上游激酶之一, 在细胞DSBs后在MRN(Mre11/Rad50/NBS1)复合体协助下被快速招募到损伤位点, 其第1 981位丝氨酸发生自身磷酸化(称为pATM1 981)而活化, 并相继磷酸化一系列下游的DNA损伤应答蛋白, 启动DNA损伤修复过程<sup>[19]</sup>。Machida等<sup>[20]</sup>研究发现, 在Raji细胞和HepG2细胞中, HCV可抑制pATM1 981水平而干扰细胞DSBs修复过程。Lai等<sup>[8]</sup>发现, HCV NS3/4A可与ATM相互作用, 抑制细胞DSBs修复。我们在上述研究的基础上, 发现在Huh7细胞中外来表达HCV NS3/4A可干扰CPT(拓扑异构酶抑制剂)诱导的ATM的活化, pATM1 981水平降低, 这很有可能是NS3/4A引起细胞DSBs修复缺陷的重要原因。

综上所述, 本研究初步探讨了HCV NS3/4A对Huh7细胞凋亡及DNA损伤应答的影响。根据本研究结果, 我们推测HCV感染后可通过其NS3/4A造成宿主细胞DNA损伤, 并干扰ATM的活化影响后续的损伤修复过程, 未修复的DNA损伤诱导细胞凋亡通路活化而引起细胞凋亡; 与此同时, 在多种因素(宿主遗传或病毒蛋白等)刺激下势必会导致少量细胞凋亡通路中的关键蛋白突变, 从而灭活细胞的凋亡机制, 使得突变的细胞不能被及时清除而发生恶性转化, 可能是HCV相关HCC产生的重要原因之一, 但其具体机制尚需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(2): 123-35.
- Kwong AD, Kauffman RS, Hurter P, Mueller P. Discovery and development of telaprevir: An NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nat Biotechnol* 2011; 29(11): 993-1003.
- Fan JH, Wang JB, Jiang Y, Xiang W, Liang H, Wei WQ, *et al.* Attributable causes of liver cancer mortality and incidence in china. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(12): 7251-6.
- Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(6): 960-4.
- Banerjee A, Ray RB, Ray R. Oncogenic potential of hepatitis C virus proteins. *Viruses* 2010; 2(9): 2108-33.
- Basu A, Meyer K, Lai KK, Saito K, Di Bisceglie AM, Grosso LE, *et al.* Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes. *Virology* 2006; 349(2): 347-58.
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995; 69(6): 3893-6.
- Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* 2008; 370(2): 295-309.
- McGivern DR, Lemon SM. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer. *Oncogene* 2011; 30(17): 1969-83.
- 任来峰, 郭莲娣, 石新丽, 李莎. 下调SMU1表达对细胞增殖和DNA双链断裂损伤反应的影响. *中国细胞生物学学报* (Ren Laifeng, Guo Liandi, Shi Xinli, Li Sha. Down-regulation of SMU1 expression influence cell proliferation and cellular response to DNA double-strand breaks. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(1): 69-74.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434(7035): 864-70.
- Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004; 23(47): 7821-38.
- Tanaka M, Nagano-Fujii M, Deng L, Ishido S, Sada K, Hotta H. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(3): 792-9.
- Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, Thompson P, Major ME, Cohen JI. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology* 2004; 329(1): 53-67.
- Thoren F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: Role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 2004; 76(6): 1180-6.
- Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kienny MP, Schuster C. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol* 2005; 75(3): 402-11.
- Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K, *et al.* Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 2006; 87(Pt 7): 1935-45.
- Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, *et al.* gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9(4): 662-9.
- Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40(2): 179-204.
- Machida K, McNamara G, Cheng KT, Huang J, Wang CH, Comai L, *et al.* Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *J Immunol* 2010; 185(11): 6985-98.