

启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白331表达的调控

杨志华, 郭明洲, 李鑫, 毛高平

杨志华, 安徽医科大学研究生院 安徽省合肥市 230032
郭明洲, 李鑫, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853
毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142
杨志华, 主要从事消化系统肿瘤的临床与基础研究。
作者贡献分布: 本课题由毛高平与郭明洲设计; 郭明洲指导实验操作; 杨志华负责实验操作、资料收集、数据整理及撰写论文; 李鑫参与细胞培养、DNA及RNA的提取; 文章的修改与审校由毛高平与郭明洲完成。
通讯作者: 毛高平, 教授, 主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科。
maogaoping@medmail.com.cn
电话: 010-68410099-6232
收稿日期: 2013-01-30 修回日期: 2013-02-06
接受日期: 2013-03-05 在线出版日期: 2013-03-28

Zinc-finger protein 331 expression is regulated by promoter region hypermethylation in hepatocellular carcinoma

Zhi-Hua Yang, Ming-Zhou Guo, Xin Li, Gao-Ping Mao

Zhi-Hua Yang, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Ming-Zhou Guo, Xin Li, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Gao-Ping Mao, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, Beijing 100142, China
Correspondence to: Gao-Ping Mao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, Beijing 100142, China. maogaoping@medmail.com.cn
Received: 2013-01-30 Revised: 2013-02-06
Accepted: 2013-03-05 Published online: 2013-03-28

Abstract

AIM: To analyze the methylation status and the expression regulation of zinc-finger protein 331 (ZNF331) in hepatocellular carcinoma.

METHODS: Five human hepatic cancer cell lines and 50 specimens of human primary hepatic cancer were employed to detect ZNF331 promoter region methylation by methylation specific PCR (MSP). Semi-quantitative RT-PCR was used to examine the expression of ZNF331.

RESULTS: Partial methylation was found in HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2 and BEL-7402 cell

lines. Methylation was not detected in SNU449 cell line. Weak expression of ZNF331 was found in HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2 and BEL-7402 cell lines. ZNF331 was moderately expressed in SNU449 cell line. Increased expression of ZNF331 was found in HBXF344, HepG2, BEL-7402, and PLC/PRF/5 cell lines after 5-Aza treatment. No significant change was examined in ZNF331 expression in SNU449 cell line before and after 5-Aza treatment. ZNF331 was methylated in 80% (40/50) of primary human hepatic cancer specimens, but methylation was not detectable in normal liver tissue specimens (0/10). No correlation was found between promoter region methylation and gender, age, AFP level, hepatitis virus infection, tumor size or tumor stage.

CONCLUSION: ZNF331 expression is silenced by promoter region hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. ZNF331 is frequently methylated in human primary hepatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; DNA methylation; ZNF331 gene; Methylation-specific PCR

Yang ZH, Guo MZ, Li X, Mao GP. Zinc-finger protein 331 expression is regulated by promoter region hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 761-765 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/761.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.761>

摘要

目的: 探讨启动子区甲基化对肝细胞癌中锌指蛋白331(zinc-finger protein 331, ZNF331)表达的调控及意义。

方法: 采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)检测ZNF331在肝癌细胞系和50例原发性肝细胞癌组织中的甲基化状况, 并采用半定量RT-PCR分析5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza)处理前后肝癌细胞系中ZNF331的表达情况。

结果: ZNF331在肝癌细胞系HBXF344、PLC/

■背景资料

表观遗传学是指在DNA序列不变的基础上, 基因表达的可遗传性改变, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰、microRNA调控及染色体修饰等方式。肿瘤相关基因启动子区的异常高甲基化造成基因表达失活, 导致正常细胞的生长分化调控失常是肿瘤发生发展的关键, 这种异常改变多发生在肿瘤恶变早期。

■同行评议者

姚鹏, 副教授, 北京军区总医院全军肝病中心; 虞必光, 教授, 遵义医学院附属医院消化科

■研发前沿

随着表观遗传学的发展, DNA甲基化与肿瘤的关系成为研究的热点. 大量研究表明, 肿瘤发生发展过程中存在某些特异性的异常甲基化, 可作为肿瘤早期诊断及预后监测的分子生物学标志.

PRF/5、HepG2、BEL-7402中低表达, SNU449中表达正常. 5-Aza处理后HBXF344、HepG2、BEL-7402及PLC/PRF/5中ZNF331恢复表达. 50例原发性肝细胞癌标本中, ZNF331启动子区的甲基化率为80%(40/50), 而10例正常肝脏组织中ZNF331均无甲基化. ZNF331启动子区的甲基化与肝细胞癌患者的性别、年龄、肿瘤直径大小、血清甲胎蛋白值、肝炎病毒感染、分化水平及TNM分期均无关联($P>0.05$).

结论: ZNF331启动子区高甲基化是肝癌的频发事件, ZNF331基因表达受启动子区甲基化调控.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 肝细胞癌; DNA甲基化; ZNF331基因; 甲基化特异性PCR

杨志华, 郭明洲, 李鑫, 毛高平. 启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白331表达的调控. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 761-765 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/761.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.761>

0 引言

肝癌的发病率居恶性肿瘤的前列, 且呈逐年递增的趋势; 其预后差、病死率高, 临床危害严重. 目前手术、放化疗等治疗并未明显改善肝癌患者的预后, 因此, 临床急需进一步寻求新的治疗手段. 研究发现: 遗传调控和表观遗传调控紊乱导致基因异常表达及功能失调参与肿瘤的发生^[1-3]. 其中, 抑癌基因启动子区的甲基化起着至关重要的作用^[4-6]. 有别于经典遗传学, 表观遗传学的改变是可逆的, 这使其成为治疗疾病的潜在靶点^[7]. 同时, 研究证实^[8]: DNA异常甲基化在肿瘤形成过程中是可逆的, 这也为从表观遗传学角度治疗肿瘤提供了理论依据. 研究证实^[9-11]: 锌指蛋白家族成员-锌指蛋白331(zinc-finger protein 331, ZNF331)在胃癌和多发性骨髓瘤中具有抑癌作用. 而研究其在肝细胞癌的报道鲜见. 我们研究ZNF331在肝细胞癌发生发展中表观遗传学的变化, 以了解表观遗传学在肝细胞癌发生发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 50例肝细胞癌组织标本来源于随机选取的2011-2012年间中国人民解放军总医院收治的50例肝细胞癌患者. 其中男37例, 女13例, 中位年龄52.3(17-79)岁, 术前均未经放疗、化疗及

免疫治疗. TNM分期 I-II 期21例, III-IV期29例. 获取的新鲜标本一部分用10%甲醛溶液固定后送做病理检验, 另一部分迅速冻存于液氮, 之后迅速转存于-80℃冰箱. 10例肝正常组织来自于肝囊肿手术患者.

5株肝癌细胞系: SNU449、HBXF344、PLC/PRF/5、HepG2、BEL-7402, 均为中国人民解放军总医院消化科实验室已建立的人肝癌细胞株. 胎牛血清(FBS)及RPMI-1640培养基购自GIBCO公司; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)购自Sigma公司; TRIzol试剂盒及cDNA第一链合成试剂盒购自Invitrogen公司; DNA纯化试剂盒购自Promega公司; PCR引物均由华大基因公司合成. 细胞培养箱(MCO-20AIC型)和超低温冰箱由日本Sanyo公司生产; 超净工作台(Bcl-1360型)由北京亚泰科隆仪器公司生产; 倒置显微镜(CKX41型)由日本Olympus公司生产; 凝胶电泳仪(DYY-8C型)由北京六一仪器公司生产; 循环水式多用真空泵(SHB-III型)由郑州长城科工贸有限公司生产; 高速冷冻离心机(HC-2518R型)由科大创新中佳分公司生产.

1.2 方法 采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)和半定量RT-PCR技术检测肝癌细胞系中ZNF331启动子区甲基化与基因表达情况, 并用甲基化酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza)处理肝癌细胞系, 比较药物处理前后ZNF331 mRNA的表达, 以确定ZNF331基因的表达是否受启动子区甲基化调控, 具体步骤如下.

1.2.1 细胞培养和5-Aza处理: 5株肝癌细胞均为贴壁细胞, 均用含10%小牛血清和1%青霉素-链霉素的RMPI 1640培养基培养. 根据不同细胞的生长速度, 取对数生长期细胞按照10%-20%融合度分别接种于75 cm²培养瓶中, 每株细胞接种2瓶, 为加药组和未处理组. 待细胞贴壁后, 加药组用含5-Aza(2 μmol/L)的上述培养基培养, 每24 h更换1次培养基, 96 h后提取总RNA. 未处理组每24 h更换培养基1次, 在细胞融合度达70%左右提取总RNA. 培养环境37℃, 5%CO₂.

1.2.2 DNA和RNA的提取: 肝细胞癌组织和细胞的DNA用蛋白酶K法提取, 用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA, 提取的DNA和RNA用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量, DNA保存于-20℃, RNA保存于-80℃备用.

1.2.3 DNA亚硫酸氢盐修饰: 参照文献[9]对基因

■创新盘点

ZNF331是新近发现的一个抑癌基因. 研究表明其能够抑制胃癌的生长, 但在肝细胞癌中的未见相关报道. 本文研究ZNF331在正常肝组织、肝癌组织和肝癌细胞系的甲基化情况及ZNF331甲基化对ZNF331表达影响.

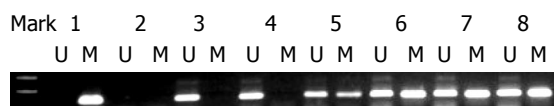


图 1 5株肝癌细胞系ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。1: 甲基化阳性对照; 2: 为阴性对照; 3: 非甲基化对照; 4-8: 5个肝癌细胞系依次是SNU449, HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2和BEL-7402; U: 非甲基化条带; M: 甲基化条带。

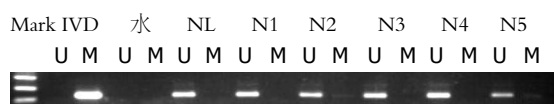


图 2 部分正常肝组织ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。IVD: 甲基化阳性对照; 水: 为阴性对照, NL: 非甲基化对照; N1-N5为5例正常肝组织; U: 非甲基化条带; M: 甲基化条带。

组DNA进行亚硫酸氢盐修饰, 用DNA纯化试剂盒纯化回收DNA, 修饰后DNA作为MSP扩增的模板(即刻使用或保存于-20℃备用)。

1.2.4 甲基化特异性PCR(MSP)扩增: 设计ZNF331的特异性甲基化引物(ZNF331-M)和特异性非甲基化引物(ZNF331-U): (1)ZNF331-M: 上游5'-TAAGGTAGGACGTTTTTAGGGTCGC-3', 下游5'-AACTCTACACGACGCAAATAAAACCG-3', 产物为147 bp; (2)ZNF331-U: 上游5'-TTTTAAGGTAGGATGTTTTTAGGGTTGT-3', 下游5'-ACAACCTCTACACAACACAAATAAAACCA-3', 产物为152 bp。对亚硫酸盐修饰后的DNA样本进行PCR扩增。以IVD(*in vitro* methylated DNA)作为甲基化阳性对照, 以ZNF331非甲基化的人外周血淋巴细胞提取的DNA作为非甲基化对照, 以去离子水作为阴性对照。

1.2.5 MSP产物分析: 取10 μL PCR产物于2.0%的琼脂糖凝胶, 130 V电泳约25 min。判定标准: 若ZNF331-M引物扩增出147 bp条带, 而ZNF331-U引物未扩增出条带, 则说明ZNF331基因启动子区发生了完全甲基化; 如ZNF331-M引物未扩增出条带, 而ZNF331-U引物扩增出152 bp条带, 即说明未发生甲基化; 如果两种引物均扩增出相应大小的目的条带, 说明存在部分甲基化。

1.2.6 RT-PCR检测ZNF331 mRNA的表达: 以提取的总RNA为模板, 按照反转录第一链cDNA合成试剂盒说明逐步进行cDNA的合成。ZNF331基因引物设计: 上游5'-TAGGTCAGCTCTAGCCTCTC-3', 下游5'-AGCGTACCTTCACATATCCAG-3', 产物为347 bp。以水作为阴性对



图 3 部分肝癌组织ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。IVD: 甲基化阳性对照; 水: 为阴性对照; NL: 非甲基化对照; T1-T5为5例肝癌组织。

照, 同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因。PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像处理系统观察、拍照并分析ZNF331基因mRNA的表达水平。

统计学处理 采用SPSS17.0软件包进行统计分析, 计数资料采用 χ^2 、校正 χ^2 或Fisher确切概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSP检测结果 5株肝癌细胞系中ZNF331启动子区甲基化率为83.3%(5/6), HBXF344、PLC/PRF/5、HepG2和BEL-7402表现为部分甲基化, 而SNU449为非甲基化(图1); 10例正常肝组织中均未检测到甲基化(图2); 50例HCC组织中ZNF331基因甲基化率为80%(图3), 其中10例呈完全甲基化、30例呈半甲基化状态。

2.2 启动子区甲基化对ZNF331基因表达的调控 5株肝癌细胞系, 5-Aza药物处理前后, SNU449细胞系中ZNF331表达无明显变化, 而余细胞系加药处理后ZNF331明显高表达(图4)。结果提示ZNF331基因表达受启动子区甲基化调控。

2.3 肝癌患者的临床指标与ZNF331基因启动子区甲基化关系 由表1可知, ZNF331基因启动子区甲基化水平与患者的性别、年龄、肿瘤直径大小、甲胎蛋白水平、乙型肝炎和/或丙型肝炎病毒感染、肿瘤分化水平及TNM分期均无相关性(P 均 >0.05)。

3 讨论

表观遗传学是指不伴有基因序列改变的、可遗传的基因表达改变^[10]。研究证实^[12,13]: DNA甲基化和组蛋白修饰等表观遗传学改变在肝癌发生发展过程中发挥着重要的作用。DNA甲基化作为表观遗传调控的重要机制之一, 主要调控靶基因的转录, 在肿瘤细胞分化和增殖中发挥重要的作用^[14]。甲基化沉默的抑癌基因已成为目前肝癌机制研究的热点。研究发现^[15-18]: LIFR、APC、sall3及miR-335等抑癌基因均因启动子区高甲基化导致其低表达, 且与肝癌的发生密切相关。而肿瘤相关基因的甲基化是肝癌发生过

■应用要点

本研究有助于明确肝细胞癌中ZNF331的甲基化状况, 为临床肝癌的早期诊断提供分子生物学标志奠定理论基础。进一步研究ZNF331在肝癌发展中的作用, 为肝细胞癌的分子靶向治疗提供理论支持。从而可能使肝癌患者摆脱目前的临床早期诊断及治疗困境。

■名词解释

锌指蛋白: 一类具有手指状结构域的转录因子, 其在胚胎发育、细胞分化、细胞转化及细胞周期的调控中发挥重要功能, 并随时间和空间的不同进行特异表达。

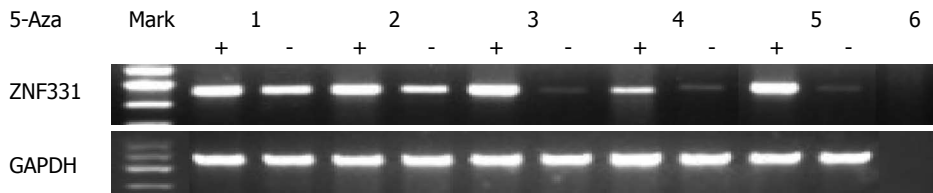


图4 甲基化抑制剂5-Aza处理前后肝癌细胞系中ZNF331表达的变化. 1-5: 5个肝癌细胞系依次是SNU449、HBXF344、HepG2、BEL-7402和PLC/PRF/5; 6(水): 阴性对照. ZNF331: 锌指蛋白331; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; +: 加5-Aza处理; -: 未加5-Aza处理.

表1 ZNF331基因启动子区甲基化与肝癌患者临床指征的关系

| 病理特征 | n | 甲基化 | χ^2 值 | P值 |
|-------------|----|-----|------------|-------|
| 性别 | | | 0.526 | 0.468 |
| 男 | 37 | 31 | | |
| 女 | 13 | 9 | | |
| 年龄(岁) | | | 0.052 | 0.820 |
| ≤50 | 16 | 12 | | |
| >50 | 34 | 28 | | |
| 肿瘤直径大小(cm) | | | 0.130 | 0.718 |
| ≤5 | 20 | 15 | | |
| >5 | 30 | 25 | | |
| 甲胎蛋白(ng/mL) | | | 1.048 | 0.306 |
| ≤200 | 36 | 27 | | |
| >200 | 14 | 13 | | |
| 病毒感染 | | | 0.526 | 0.468 |
| HBV和/或HCV | 37 | 31 | | |
| 无HBV和HCV | 13 | 9 | | |
| 分化水平 | | | 3.125 | 0.077 |
| 高 | 5 | 2 | | |
| 中、低 | 45 | 38 | | |
| TNM分期 | | | 0.867 | 0.352 |
| I-II | 21 | 15 | | |
| III-IV | 29 | 25 | | |

程中频发的早期事件, 因此可以通过甲基化标志物检测进行肝癌的早期诊断. 本研究结果发现: 肝细胞癌中ZNF331启动子区甲基化率高达80%, 这提示ZNF331启动子区高甲基化在肝癌发生发展中较为普遍, 可作为临床对肝癌早期检测的理想候选指标.

ZNF331(又称ZNF361、ZNF463及RITA), 定位于染色体19q13, 是由Kruppel相关盒(Kruppel-associated box, KRAB)结构域和12个重复串联的C₂H₂锌指结构域构成的锌指蛋白基因, 因其含KRAB结构域故被称为KRAB型锌指蛋白. KZNF(KRAB-containing zinc finger protein)是锌指类转录因子中最为庞大的一类^[19]. KRAB结构域通过募集组蛋白甲基化酶、组蛋白去乙酰化酶复合物及异染色质蛋白等使靶基因沉默. 因

此, KRAB-ZF常作为转录抑制因子发挥作用, 与核仁的维持、细胞增殖、分化、凋亡以及细胞的恶性转化等密切相关. ZNF331参与精子的形成, 在胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡及调控细胞内信号传导等多种细胞生物学行为中起着重要的作用^[20-22]. ZNF331抑制肿瘤生长主要是通过间接活化p53信号通路抑制细胞增殖, 诱导凋亡^[23,24].

目前, ZNF331在肝癌的相关研究未见报道. 本研究发现: 肝癌细胞系与肝癌组织中ZNF331基因启动子区甲基化率明显高于正常肝组织. ZNF331基因启动子区高甲基化在肝癌中普遍发生, 这表明ZNF331甲基化可能成为肝癌的早期诊断标志物. 我们应用甲基化酶抑制剂5-Aza, 降低甲基化水平, 结果显示: 肝癌细胞系ZNF331基因恢复其正常表达, ZNF331表达受甲基化调控. 这提示ZNF331基因在转录水平因启动子区高甲基化导致表达失活, 在肝癌的发生发展中可能发挥着重要的作用. 目前, 基因甲基化与肝炎病毒感染等临床病理特征是否有确切的相关性尚存争议, 本研究发现: ZNF331甲基化与患者的性别、年龄、甲胎蛋白水平、乙肝病毒感染、肿瘤TNM分期、分化水平及直径大小等无相关性($P>0.05$).

总之, 本研究显示ZNF331启动子区甲基化与肝癌的发生密切相关, 可能作为肝癌诊断的标志物, 并为进一步认识肝癌的发病机制奠定了基础. 后期实验可进一步行ZNF331在肝细胞癌中的功能研究, 以明确其在肝癌发生发展中的作用及在肝细胞癌中是否发挥抑癌作用, 从而为肝细胞癌的表现遗传分子靶向治疗奠定理论基础.

4 参考文献

- 1 Dumitrescu RG. Epigenetic targets in cancer epidemiology. *Methods Mol Biol* 2009; 471: 457-467 [PMID: 19109794 DOI: 10.1007/978-1-59745-416-2_23]
- 2 Piperi C, Vlastos F, Farmaki E, Martinet N, Papavasiliou AG. Epigenetic effects of lung cancer predisposing factors impact on clinical diagnosis and

- prognosis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1495-1501 [PMID: 18363846 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00309.x]
- 3 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692 [PMID: 17320506 DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.029]
 - 4 Chen YL, Ko CJ, Lin PY, Chuang WL, Hsu CC, Chu PY, Pai MY, Chang CC, Kuo MH, Chu YR, Tung CH, Huang TH, Leu YW, Hsiao SH. Clustered DNA methylation changes in polycomb target genes in early-stage liver cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425: 290-296 [PMID: 22842566 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.084]
 - 5 Zhao C, Bu X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1271-1282 [PMID: 22936446]
 - 6 Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P, Xiao Q, Han D, Saiyin H, Zhu J, Chen T, Roberts LR, Huang H, Yu L. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2568-2577 [PMID: 22971577 DOI: 10.1093/carcin/bgs287]
 - 7 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463 [PMID: 15164071 DOI: 10.1038/nature02625]
 - 8 Tao SF, Zhang CS, Guo XL, Xu Y, Zhang SS, Song JR, Li R, Wu MC, Wei LX. Anti-tumor effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by inhibiting telomerase activity in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2334-2343 [PMID: 22654424 DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2334]
 - 9 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826 [PMID: 8790415 DOI: 10.1073/pnas.93.18.9821]
 - 10 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009; 23: 781-783 [PMID: 19339683 DOI: 10.1101/gad.1787609]
 - 11 Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 125: 388-397 [PMID: 19384946 DOI: 10.1002/ijc.24394]
 - 12 Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, Li D, Xie H, Yin S, Yu J, Lin Q, Zheng S. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 83-91 [PMID: 17611778 DOI: 10.1007/s00432-007-0252-7]
 - 13 Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatal Res* 2007; 37: 974-983 [PMID: 17584191 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00141.x]
 - 14 Scusi EL, Loose DS, Wray CJ. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2011; 13: 369-376 [PMID: 21609368 DOI: 10.1111/j.1477-2574.2011.00303.x]
 - 15 Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Li Q, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) is detected as a novel suppressor gene of hepatocellular carcinoma using double-combination array. *Cancer Lett* 2010; 289: 170-177 [PMID: 19733004 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.08.013]
 - 16 Jain S, Chang TT, Hamilton JP, Lin SY, Lin YJ, Evans AA, Selaru FM, Lin PW, Chen SH, Block TM, Hu CT, Song W, Meltzer SJ, Su YH. Methylation of the CpG sites only on the sense strand of the APC gene is specific for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011; 6: e26799 [PMID: 22073196 DOI: 10.1371/journal.pone.0026799]
 - 17 Yang XX, Sun JZ, Li FX, Wu YS, Du HY, Zhu W, Li XH, Li M. Aberrant methylation and downregulation of sall3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2719-2726 [PMID: 22690083 DOI: 10.3748/wjg.v18.i21.2719]
 - 18 Dohi O, Yasui K, Gen Y, Takada H, Endo M, Tsuji K, Konishi C, Yamada N, Mitsuyoshi H, Yagi N, Naito Y, Tanaka S, Arii S, Yoshikawa T. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2013; 42: 411-418 [PMID: 23229728 DOI: 10.3892/ijo.2012.1724]
 - 19 Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA. The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3608-3612 [PMID: 2023909 DOI: 10.1073/pnas.88.9.3608]
 - 20 Rippe V, Belge G, Meiboom M, Kazmierczak B, Fusco A, Bullerdiek J. A KRAB zinc finger protein gene is the potential target of 19q13 translocation in benign thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 229-236 [PMID: 10502321 DOI: 10.1002/(SICI)1098-2264(199911)26:3<229::AID-GCC7>3.0.CO;2-J]
 - 21 Meiboom M, Murua Escobar H, Pentimalli F, Fusco A, Belge G, Bullerdiek J. A 3.4-kbp transcript of ZNF331 is solely expressed in follicular thyroid adenomas. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 113-117 [PMID: 14610350 DOI: 10.1159/000074165]
 - 22 Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, Go MY, Tao Q, Chang Z, Sung JJ. Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene* 2013; 32: 307-317 [PMID: 22370639 DOI: 10.1038/onc.2012.54]
 - 23 Enge M, Bao W, Hedström E, Jackson SP, Moumen A, Selivanova G. MDM2-dependent down-regulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell* 2009; 15: 171-183 [PMID: 19249676 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.019]
 - 24 Saha MN, Jiang H, Mukai A, Chang H. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 3041-3051 [PMID: 21062913 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0471]

同行评价

本文具有一定的新颖性, 也有重要的临床意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静

