

# 叶酸对脆性组氨酸三联体基因表达的影响及对宫颈癌细胞增殖凋亡的作用

高晨菲 康慧杰 白丽霞 丁玲 许娟 吴婷婷 白兰 王金桃

**【摘要】** 目的 探讨叶酸对脆性组氨酸三联体(FHIT)基因DNA甲基化、mRNA与蛋白表达以及宫颈癌细胞增殖、凋亡的影响。方法 采取体外细胞实验方法,对两种宫颈癌细胞C33A(HPV阴性)与CaSki(HPV16阳性)进行不同浓度叶酸干预,用活细胞计数和流式细胞术分别测定宫颈癌细胞的增殖和凋亡情况,采用甲基化特异性PCR(MSP)法测定FHIT基因启动子区CpG甲基化状态,利用Western blot和Real-time PCR方法分别检测FHIT基因蛋白和mRNA的表达水平。结果 不同浓度叶酸对两种宫颈癌细胞具有抑制增殖和促进凋亡的作用。随着叶酸浓度增加,抑制增殖率逐渐上升(C33A: $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki: $r=0.98, P<0.001$ ),细胞凋亡率升高(C33A: $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki: $r=0.99, P<0.001$ )。C33A与CaSki两种细胞在叶酸浓度为1  $\mu\text{g/ml}$ 和10  $\mu\text{g/ml}$ 时均呈现FHIT基因DNA甲基化阳性,100  $\mu\text{g/ml}$ 和250  $\mu\text{g/ml}$ 显示为部分阳性,500  $\mu\text{g/ml}$ 和1 000  $\mu\text{g/ml}$ 时均呈甲基化阴性。不同叶酸浓度组与对照组相比,两种细胞FHIT基因的mRNA和蛋白相对表达量的差异均有统计学意义,随叶酸浓度的升高,FHIT mRNA(C33A: $r=0.96, P<0.001$ ; CaSki: $r=0.94, P<0.001$ )及蛋白(C33A: $r=0.96, P<0.001$ ; CaSki: $r=0.97, P<0.001$ )的表达量均呈上升趋势。结论 较高浓度叶酸可降低FHIT抑癌基因的DNA甲基化水平,逆转其在转录和功能水平的异常表达,对抑制宫颈癌细胞增殖、促进凋亡具有不可忽视的作用。

**【关键词】** 宫颈癌细胞; 叶酸; 脆性组氨酸三联体基因; 表达

**Influence of folate on fragile histidine triad gene expression, cell proliferation and apoptosis in cervical cancer cell lines** Gao Chenfei, Kang Huijie, Bai Lixia, Ding Ling, Xu Juan, Wu Tingting, Bai Lan, Wang Jintao. Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Wang Jintao, Email: wangjt59@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30872166, No. 81273157) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2008011075-1).

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of folate on cell proliferation and apoptosis as well as on DNA methylation, expression of mRNA and protein of fragile histidine triad (FHIT) gene in cervical cancer cells. **Methods** Cervical cancer cell lines including CaSki (HPV16-positive) and C33A (HPV-negative) were cultured *in vitro* with different folate concentrations. Cell proliferation and apoptosis were determined by viable cell counting and flow cytometry while FHIT gene DNA methylation was used with methylation specific PCR (MSP). Both gene expression of FHIT protein and mRNA were detected by Western blot and Real-time PCR, respectively. **Results** Folate could inhibit the proliferation and promote the apoptosis in two kinds of cervical cancer cells. The number of viable cells decreased (C33A:  $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.98, P<0.001$ ) and the apoptosis rate increased (C33A:  $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.99, P<0.001$ ) along with the increase of folate concentration. FHIT gene DNA methylation showed all positive at the folate concentration levels of 1  $\mu\text{g/ml}$  and 10  $\mu\text{g/ml}$ , partially positive at 100  $\mu\text{g/ml}$  and 250  $\mu\text{g/ml}$ , but negative at 500  $\mu\text{g/ml}$  and 1 000  $\mu\text{g/ml}$  in both C33A and CaSki cells. Comparing with the control group, the mRNA or protein relative expression levels of FHIT gene in different folate concentrations were statistically significant in two kinds of cells, and showing that the FHIT gene mRNA expression (C33A:  $r=0.96, P<0.001$ ;

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.022

基金项目:国家自然科学基金(30872166,81273157);山西省自然科学基金(2008011075-1)

作者单位:030001 太原,山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

通信作者:王金桃, Email: wangjt59@163.com

CaSki:  $r=0.94$ ,  $P<0.001$ ) and protein expression (C33A:  $r=0.96$ ,  $P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.97$ ,  $P<0.001$ ) both increased along with the increase of folate concentration. **Conclusion** Our findings indicated that adequate folate seemed to be able to effectively inhibit the proliferation of cervical cancer cells and facilitate their apoptosis *in vitro*, so would reverse the aberration mRNA and protein expression of FHIT gene.

**【Key words】** Cervical cancer cells; Folate; Fragile histidine triad gene; Expression

叶酸以 5-甲基叶酸形式存在于机体,作为甲基供体参与 DNA 甲基化过程,其适宜水平被认为是维持 DNA 正常甲基化的重要因素<sup>[1]</sup>。脆性组氨酸三联体(FHIT)是位于人类 3 号染色体(3p14.2)上的抑癌基因,多项研究提示其功能失活与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[2]</sup>。在 FHIT 基因失活的众多机制中,基因启动子区 CpG 岛的高甲基化使其自身表达水平下降或缺失是一重要原因<sup>[3]</sup>。目前研究显示,叶酸缺乏和 FHIT 基因异常甲基化均与宫颈癌的发生发展关系密切<sup>[3,4]</sup>,但目前国内外均未见叶酸是否对 FHIT 基因的表达产生影响以及对宫颈癌细胞的生物学功能发挥作用的报道。为此本研究采用体外实验方法,探讨不同浓度叶酸干预对 FHIT 基因甲基化与表达的影响,以及对宫颈癌细胞增殖凋亡的作用。

## 材料与方法

1. 细胞株及其分组:选择 HPV16 阳性宫颈癌细胞 CaSki 和阴性宫颈癌细胞 C33A,分别用含 10% 小牛血清的 RP MI1640 和 MEM.EBSS 培养液培养、传代,取对数生长期的 CaSki 和 C33A 细胞培养 24 h 后,转入不同浓度叶酸培养液中培养。以浓度 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  为对照组,以浓度 10、100、250、500、1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  为 5 个叶酸干预组。

### 2. 实验方法:

(1)判断宫颈癌细胞增殖:采用活细胞计数法。取对数生长期的 C33A 和 CaSki 细胞,将细胞密度调整为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,接种于含不同浓度叶酸的培养液中培养 48 h,弃去培养液,用 PBS 洗涤后每孔用 0.25% 的胰蛋白酶液消化,加入培养液,吹打制成待测细胞悬液。取细胞悬液及 0.4% 台盼蓝染液 1:1 混匀,沿边缘缓缓滴入血球计数板,在显微镜( $4 \times 10$ )下进行细胞计数(每孔重复 3 次)。按公式计算抑制率:抑制率 = (对照组细胞总数 - 干预组细胞总数) / 对照组细胞总数。

(2)判断宫颈癌细胞凋亡:采用流式细胞术(FCM)检测。取对数生长期的 C33A 和 CaSki 细胞,分别用不同浓度叶酸处理(每个浓度 3 个平行孔),培养 48 h,用 0.05% 胰蛋白酶(不含 EDTA)1 ml 消化。收集细胞,离心,弃上清,使细胞悬浮后用 PBS

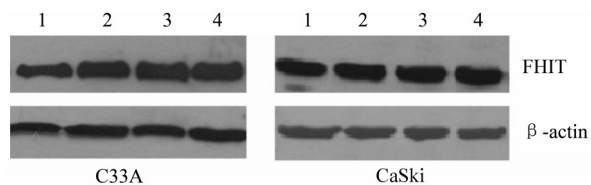
液洗涤、离心(12 000 r/min, 5 min)2 次,PE 染色(Annexin V-PE 凋亡试剂盒)15 min,加入 150  $\mu\text{l}$  binding buffer,于流式细胞仪检测,获得两种宫颈癌细胞的凋亡率。

(3)检测宫颈癌细胞 FHIT 基因 CpG 岛甲基化:采用甲基化特异 PCR(MSP)。取对数生长期 C33A 和 CaSki 细胞接种于 24 孔板中,施加不同浓度叶酸干预,培养 48 h 收集细胞。采用酚-氯仿抽提法提取细胞的总 DNA。取 20  $\mu\text{l}$  DNA 水溶液加入 5.5  $\mu\text{l}$  3 mol/L 的 NaOH 对 DNA 甲基化修饰,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育,依次加入 10 mol/L 的对苯二酚及 3 mol/L 的 NaHSO<sub>3</sub>,混匀后覆盖石蜡油,56  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育过夜。用 Wizard DNA purification System 试剂盒对 DNA 纯化,在 PTC200-PCR 仪上扩增。FHIT 基因的甲基化引物:上游 5'-TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA CGC-3',下游 5'-CGT AAA CGA CGC CGA CCC CAC TA-3';非甲基化引物:上游 5'-TTG GGG TGT GGG TTT GGG TTT TTA TG-3',下游:5'-CAT AAA CAA CAC CAA CCC CAC TA-3',产物长度均为 74 bp。反应体系均为 50  $\mu\text{l}$ ,扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,40 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。对扩增产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,在 VILBER CV-A50C 凝胶成像仪下观察、拍照,分别获得 FHIT 基因甲基化和未甲基化的目的条带。

(4)检测 FHIT 基因 mRNA 水平:用实时荧光定量 PCR 法。按照荧光定量 PCR 引物设计原则,确定引物序列, FHIT: 上游 5'-GCA GCT CTG CGG GTC TAC TTT C-3',下游 5'-TCT TCA AAC TGG TTG GCA ATA GCT C-3';  $\beta$ -actin: 上游 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。参照本研究以往建立的方法<sup>[5]</sup>,获得 FHIT 的特异性扩增曲线和熔解曲线。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  代表目的 FHIT mRNA 表达水平,其值越大,所对应的 mRNA 表达水平越高。

(5)检测 FHIT 基因蛋白表达:采用 Western blot 法。参照本研究以往建立的方法检测 FHIT 基因蛋白表达水平<sup>[4]</sup>。一抗为 1:800 兔抗人 FHIT 单克隆抗体,在相对分子质量 43 KD 和 16.8 KD 处分别获

得内参照蛋白β-actin 和 FHIT 特异性抗体结合蛋白条带。利用 Quantity One 软件分析条带的 A 值,以目的条带与内参β-actin 条带的 A 值之比作为 FHIT 蛋白的相对表达量(图 1)。



注:叶酸浓度 1~4 分别为 1、100、500、1 000 µg/ml

图 1 不同浓度叶酸 C33A 与 CaSki 宫颈癌细胞的 FHIT 蛋白表达

3. 质量控制:①细胞培养过程保证无菌操作;②规范操作,每项操作都由已熟练掌握相关技术的固定人员独立完成;③校准仪器设备,在恒定的环境条件下(温度、湿度等)使用;④进行预实验,保证结果稳定。

4. 统计学分析:使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。组间比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用方差分析,与对照组比较采用 Dunnett-*t* 法。采用 Spearman 秩相关分析进行各变量间的相关性分析。

### 结 果

1. 叶酸对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响:两种细胞的不同叶酸干预组与对照组相比,抑制率(C33A:  $F=148.09, P<0.001$ ; CaSki:  $F=168.93, P<0.001$ )及凋亡率(C33A:  $F=55.51, P<0.001$ ; CaSki:  $F=157.13, P<0.001$ )的差异均有统计学意义。各干预组与对照组比较显示,C33A 细胞各组间抑制率和凋亡率的差异均有统计学意义( $P<0.05$ );CaSki 细胞,除 10 µg/ml 组与对照组抑制率差异无统计学意义外,其余各组抑制率和凋亡率差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。相关性检验显示,随着叶酸浓度升高,抑制率逐渐上升(C33A:  $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.98, P<0.001$ ),凋亡率也逐渐升高(C33A:  $r=0.98, P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.99, P<0.001$ ),均呈正相关。相同浓度叶酸对于 C33A 增殖的抑制作用均高于 CaSki 细胞,差异均有统计学意义( $P<0.001$ ),两者凋亡率间差异无统计学意义(图 2)。

2. 叶酸对宫颈癌细胞 FHIT 基因甲基化的影响:应用 MSP 检测 FHIT 基因的甲基化状态(图 3)。结果显示,随着叶酸水平的升高,FHIT 基因甲基化程度逐渐减弱。C33A 和 CaSki 两种细胞在叶酸浓度为 1 µg/ml 和 10 µg/ml 时均呈现甲基化阳性,

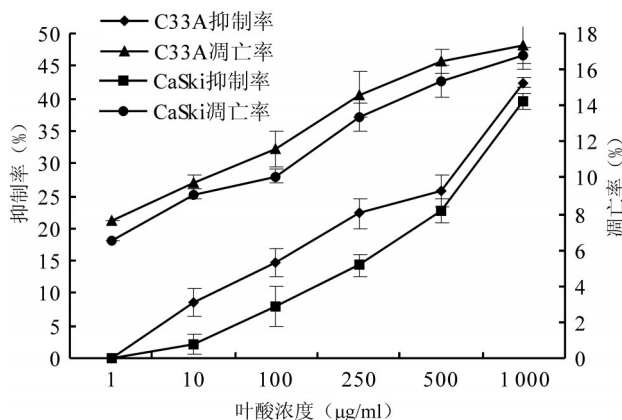
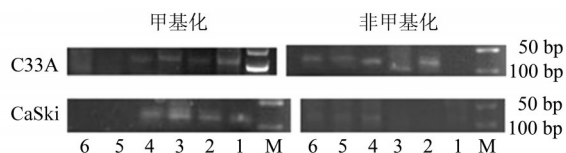


图 2 不同浓度叶酸对两种宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响



注:M:Marker; 1~6:叶酸浓度(µg/ml)分别为 1、10、100、250、500、1 000

图 3 不同浓度叶酸对两种宫颈癌细胞 FHIT 基因甲基化的影响

100 µg/ml 和 250 µg/ml 显示为部分阳性,500 µg/ml 和 1 000 µg/ml 时均呈甲基化阴性。

3. 叶酸对 FHIT 基因 mRNA 表达的影响:不同叶酸浓度下,两种细胞 FHIT 的 mRNA 相对表达量差异均有统计学意义(C33A:  $F=24.74, P<0.001$ ; CaSki:  $F=20.97, P<0.001$ ),见表 1。进一步的多重比较显示,除 10 µg/ml 组外,两种细胞的各干预组与对照组相比差异均有统计学意义。相同叶酸浓度下两种细胞 FHIT mRNA 表达的差异无统计学意义。Pearson 相关性检验显示,叶酸浓度与 FHIT 基因 mRNA 的表达呈正相关(C33A:  $r=0.96, P<0.001$ ; CaSki:  $r=0.94, P<0.001$ ),随着叶酸水平的升高,两种细胞的 FHIT 基因 mRNA 相对表达量随之增加。

4. 叶酸对 FHIT 基因蛋白表达的影响:随着叶酸浓度的增加,两种细胞的 FHIT 蛋白表达量逐渐增加,呈正相关(C33A:  $r=0.96, P<0.001$ , CaSki:  $r=0.97, P<0.001$ ),见表 2。两种细胞中,除 10 µg/ml 组外,各叶酸干预组与对照组 FHIT 基因蛋白表达量差异均有统计学意义( $P<0.001$ )。C33A 与 CaSki 细胞在同一叶酸浓度的 FHIT 蛋白表达的差异均无统计学意义。

### 讨 论

宫颈癌有 85% 的新发病例与死亡病例出现在发展中国家<sup>[6]</sup>。高危型 HPV 的持续感染是导致宫颈癌发生的主要病因,但个人卫生习惯、服用避孕药、膳食



**表 1** 不同浓度叶酸对两种宫颈癌细胞 FHIT 基因 mRNA 表达的影响

| 叶酸(μg/ml)                        | C33A 细胞                  | CaSki 细胞                         | t 值  | P 值   |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|------|-------|
| 1                                | 4.58±3.24                | 3.39±2.38                        | 0.51 | 0.637 |
| 10                               | 11.58±2.94               | 8.68±4.24                        | 0.97 | 0.386 |
| 100                              | 29.56±3.37 <sup>a</sup>  | 24.57±6.40 <sup>a</sup>          | 1.20 | 0.298 |
| 250                              | 49.17±8.86 <sup>a</sup>  | 35.09±11.46 <sup>a</sup>         | 1.68 | 0.168 |
| 500                              | 52.94±14.28 <sup>a</sup> | 48.17±17.48 <sup>a</sup>         | 0.37 | 0.733 |
| 1 000                            | 97.59±22.84 <sup>a</sup> | 73.14±8.87 <sup>a</sup>          | 1.73 | 0.159 |
| <i>F</i> =24.74, <i>P</i> <0.001 |                          | <i>F</i> =20.97, <i>P</i> <0.001 |      |       |

注:<sup>a</sup>与对照组相比, *P*<0.05

**表 2** 不同浓度叶酸对两种宫颈癌细胞 FHIT 基因蛋白表达的影响

| 叶酸(μg/ml)                        | C33A 细胞                | CaSki 细胞                          | t 值   | P 值   |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-------|-------|
| 1                                | 1.44±0.04              | 1.38±0.05                         | 1.77  | 0.151 |
| 10                               | 1.48±0.06              | 1.43±0.04                         | 1.23  | 0.287 |
| 100                              | 1.62±0.05 <sup>a</sup> | 1.60±0.03 <sup>a</sup>            | 0.73  | 0.504 |
| 250                              | 1.78±0.04 <sup>a</sup> | 1.73±0.04 <sup>a</sup>            | 1.61  | 0.183 |
| 500                              | 1.83±0.25 <sup>a</sup> | 1.85±0.05 <sup>a</sup>            | -0.89 | 0.422 |
| 1 000                            | 1.92±0.03 <sup>a</sup> | 1.91±0.03 <sup>a</sup>            | 0.57  | 0.598 |
| <i>F</i> =68.77, <i>P</i> <0.001 |                        | <i>F</i> =103.05, <i>P</i> <0.001 |       |       |

注:<sup>a</sup>同表 1

等因素与宫颈癌的发生发展过程也有密切关系<sup>[7]</sup>。近年已有研究显示叶酸缺乏可增加乳腺癌、结肠癌、胃癌等肿瘤的发病风险<sup>[8-10]</sup>。本组前期基于人群的研究也显示,血清叶酸水平低是导致宫颈癌和癌前病变发生的危险因素<sup>[4]</sup>。本次研究结果表明,叶酸干预对两种宫颈癌细胞均有抑制增殖与促进凋亡的作用,且随叶酸浓度的提高致使增殖抑制和凋亡水平均呈增加趋势。本研究发现,当叶酸浓度<500 μg/ml 时,相同叶酸水平对于 HPV 阴性的 C33A 增殖抑制作用强于 HPV16 阳性的 CaSki 细胞,差异均有统计学意义;当叶酸浓度为 500 μg/ml 时,该差异不复存在。提示 HPV 对宫颈癌细胞的增殖具有促进作用,但随叶酸水平的增加,该作用逐渐减弱。表明补充叶酸不仅可有效抑制宫颈癌细胞的生长,且在控制 HPV 致癌作用方面也可能具有重要作用。

叶酸为 DNA 甲基化提供一碳单位,参与 DNA 合成与甲基化过程。FHIT 基因的失活与 CpG 岛甲基化密切相关,而 DNA 甲基化是一种表观遗传学上的重要改变<sup>[2]</sup>。有研究表明宫颈癌组织中 FHIT 基因异常高甲基化与 FHIT 蛋白的失活有关;FHIT 蛋白在 FHIT 基因异常高甲基化的组织中表达降低,而在正常组织中表达正常<sup>[11]</sup>。研究显示, FHIT 基因在正常宫颈组织中均为阳性表达,在宫颈癌及不同等级的宫颈上皮内瘤样病变组中均有阴性表达,鳞状细胞癌组中 FHIT 的阴性率高达 67.50%<sup>[12]</sup>,提示 FHIT 基因的表达缺失在宫颈癌的发生中起重要作用。本研究采用不同浓度叶酸对宫颈癌细胞干预

后,同时检测了 FHIT 基因的 DNA 甲基化状态及 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示,随着叶酸浓度的增加, FHIT 基因 DNA 甲基化由阳性渐变为阴性,而 mRNA 和蛋白表达水平则呈逐渐增高之态势,提示 FHIT 基因 DNA 的异常高甲基化可引起 mRNA 和蛋白表达降低,进而导致其功能降低或失活,与多数研究报道一致<sup>[2,3]</sup>。本研究进一步提示叶酸可降低 FHIT 抑癌基因的 DNA 甲基化水平,逆转其在转录和功能水平的异常表达。本研究还发现,在相同叶酸水平, HPV16 阳性和 HPV 阴性宫颈癌细胞 FHIT 基因的 mRNA 与蛋白表达水平差异均无统计学意义,提示叶酸对 FHIT 基因表达的作用可能不受 HPV 感染的影响。结合本研究获得的叶酸对宫颈癌细胞具有抑制增殖和促进凋亡作用的结果,提示叶酸在宫颈癌的预防和治疗中可能具有重要作用,但其实际意义尚待在人群研究中加以验证。

参 考 文 献

- [1] Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2011, 34(1):101-109.
- [2] Hassan MI, Naiyer A, Ahmad F. Fragile histidine triad protein: structure, function, and its association with tumorigenesis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(3):333-350.
- [3] Banzai C, Nishino K, Quan J, et al. Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma [J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(1):127-132.
- [4] Wang JT, Huo XX, Ding L, et al. Effect of folic acid and DNA methyltransferase 1 on cervical cancer and its precancerous lesion [J]. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(6):617-621. (in Chinese) 王金桃, 霍晓旭, 丁玲, 等. 叶酸与 DNA 甲基转移酶 1 在宫颈癌及癌前病变中的作用 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(6):617-621.
- [5] Bai L, Wang JT, Ding L, et al. Folate inhibits methyl-CpG-binding protein 2 expression and cervical cancer cell proliferation [J]. *Cancer Res Clin*, 2012, 24(9):603-606, 609. (in Chinese) 白兰, 王金桃, 丁玲, 等. 叶酸对子宫颈癌细胞甲基-CpG-结合蛋白 2 表达及细胞增殖抑制的作用 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2012, 24(9):603-606, 609.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [7] Wang JT, Gao ES, Cheng YY, et al. Case-control study on risk factors of cervical cancer [J]. *Chin J Public Health*, 2004, 20(2):161-162. (in Chinese) 王金桃, 高尔生, 程玉英, 等. 宫颈癌危险因素病例对照研究 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(2):161-162.
- [8] Shrubsole MJ, Shu XO, Li HL, et al. Dietary B vitamin and methionine intakes and breast cancer risk among Chinese women [J]. *Am J Epidemiol*, 2011, 173(10):1171-1182.
- [9] Wang TP, Hsu SH, Feng HC, et al. Folate deprivation enhances invasiveness of human colon cancer cells mediated by activation of sonic hedgehog signaling through promoter hypomethylation and cross action with transcription nuclear factor-kappa B pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6):1158-1168.
- [10] Vollset SE, Iglund J, Jenab M, et al. The association of gastric cancer risk with plasma folate, cobalamin, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(11):2416-2424.
- [11] Ki KD, Lee SK, Tong SY, et al. Role of 5'-CpG island hypermethylation of the FHIT gene in cervical carcinoma [J]. *J Gynecol Oncol*, 2008, 19(2):117-122.
- [12] Liu HB, He CN, Li C, et al. Expression of hCTR1, FHIT and PCNA in cervical intraepithelial neoplasia and cervical invasive squamous cell carcinoma and their clinical significance [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2012, 28(9):970-974. (in Chinese) 刘洪博, 何春年, 李聪, 等. hCTR1, FHIT 与 PCNA 在子宫颈上皮内瘤变和子宫颈鳞癌中表达及意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(9):970-974.

(收稿日期:2013-11-05)  
(本文编辑:张林东)