

# 宫颈癌中 *CALCA* 基因甲基化与 HPV16-E7 致癌蛋白表达的依存关系

盛磊<sup>1</sup>, 马丽<sup>2</sup>, 希尔扎提江·苏来曼<sup>3</sup>, 阿布力孜·阿布杜拉<sup>1</sup>, 阿比达·阿不都卡德尔<sup>2</sup>

1. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学实验室, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 选择 HPV16 阳性宫颈癌细胞和 RNAi 技术, 研究 *CALCA* 基因甲基化与 HPV16-E7 致癌蛋白表达的依存关系。构建慢病毒 siRNA 重组表达载体, 建立稳定表达 HPV16-E7-siRNA 的 RNAi 细胞模型。以 SiHa 细胞和 RNAi 细胞模型的基因组 DNA 为对象, 选择 *CALCA* 基因启动子区富含 CpG 岛屿的目标片段, 使用亚硫酸氢盐测序法 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 筛查分析, 研究 RNAi 抑制 HPV16-E7 表达后, *CALCA* 基因甲基化状态的可逆性程度。选出 *CALCA* 基因启动子区富含 CpG 位点的目标片段, 其大小为 365 bp, 含有 19 个 CpG 岛屿, 发现其中 13 个 CpG 位点的胞嘧啶在 SiHa 细胞基因组 DNA 中发生了甲基化 (13/19), 而在表达 HPV16-E7-siRNA 的 RNAi 细胞模型中, 所有 CpG 位点的甲基化已发生逆转 (0/19 位点)。本研究从细胞水平证明了宫颈癌细胞内的 *CALCA* 基因启动子高甲基化对 HPV16-E7 致癌蛋白表达有依赖性, 为进一步研究 E7 蛋白的作用及致癌机制奠定了重要的物质基础。

**关键词** 降钙素相关肽基因; 宫颈癌; RNA 干扰; HPV16; *E7* 基因

**中图分类号** R737.33

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.10.011

## Association of *CALCA* Gene Methylation and HPV16-E7 Oncoprotein Expression in Cervical Cancer

SHENG Lei<sup>1</sup>, MA Li<sup>2</sup>, XIERZHATIJIANG Sulaiman<sup>3</sup>, ABUDULA Abulizi<sup>1</sup>, ABUDUKADEER Abida<sup>2</sup>

1. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** The dependence of the *CALCA* gene promoter hypermethylation on the HPV16-E7 oncoprotein expression is investigated by the RNAi technique and using the HPV16-positive SiHa cervical carcinoma cells as the target cells. A recombinant lentiviral siRNA expression vector is constructed, and an RNAi cell model stably expressing the HPV16-E7-siRNA is established. After the extraction of the genomic DNA from the SiHa cells and the RNAi cell model, the reversibility of the *CALCA* gene promoter hypermethylation induced by the RNAi inhibition of the HPV16-E7 oncogene expression is analyzed by the PCR amplification, the subsequent cloning and the sequencing of a CpG-rich target fragment in the *CALCA* gene promoter. A 365 bp CpG-rich sequence selected in the *CALCA* promoter region is found as the target fragment containing 19 CpG islands, among which the cytosine of 13 CpG sites is methylated in the genomic DNA of the SiHa cells (13/19 CpG sites), whereas all methylations are fully reversed in the RNAi cell model expressing the HPV16-E7-siRNA (0/19 CpG sites). It is shown that the *CALCA* gene promoter hypermethylation is directly dependent on the HPV16-E7 oncoprotein expression in the cervical carcinoma cells, and the foundation for the role study and the carcinogenic mechanism of the E7 protein is established.

**Keywords** *CALCA*; cervical cancer; RNAi; HPV16; *E7* gene

收稿日期: 2013-10-10; 修回日期: 2013-12-25

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技厅开放性课题 (XJDX0208-2010-01)

作者简介: 盛磊, 博士研究生, 研究方向为宫颈癌预警和发病机制, 电子信箱: shenglei950505@163.com; 阿比达·阿不都卡德尔 (通信作者), 副主任医师, 研究方向为妇科肿瘤, 电子信箱: abida0724@126.com

引用格式: 盛磊, 马丽, 希尔扎提江·苏来曼, 等. 宫颈癌中 *CALCA* 基因甲基化与 HPV16-E7 致癌蛋白表达的依存关系[J]. 科技导报, 2014, 32(10): 63-67.

降钙素基因相关肽 $\alpha$  (calcitonin-related polypeptide  $\alpha$ , CALCA)是一种由37个氨基酸组成的生物活性多肽,有广泛的生物学效应<sup>[1]</sup>。以往研究表明,在宫颈癌中CALCA是一种肿瘤特异性高甲基化候选基因<sup>[2-4]</sup>。在进一步研究中,这一观点也得到了印证。CALCA蛋白表达水平与宫颈癌病理进程相关<sup>[5]</sup>,且CALCA基因启动子甲基化与宫颈癌的发生关系密切<sup>[6]</sup>。在宫颈癌细胞内高甲基化基因的种类与肺癌、大肠癌、乳腺癌等其他肿瘤很少有统一性,提示HPV作为宫颈癌发生与发展的首要因素对基因甲基化有独特的影响<sup>[7-11]</sup>。同时有研究显示,在肿瘤细胞内HPV16编码的E7蛋白能够活化转录水平的EZH2基因表达,促进其与DNA甲基转移酶(DNMTs)的结合,从而增强DNA甲基转移酶的活性,表明病毒与基因甲基化状态有着密切联系<sup>[12,13]</sup>。但是CALCA基因启动子区高甲基化状态与HPV16-E7致癌蛋白表达的依存关系尚待进一步验证。故本研究选择HPV16阳性宫颈癌细胞株SiHa,应用RNAi技术选择性地抑制细胞内HPV16编码的E7蛋白表达,并用亚硫酸氢盐测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP)进行筛查分析,探索CALCA基因的高甲基化状态与HPV16-E7蛋白表达的依赖关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞及培养条件

实验中所使用的SiHa细胞株来自于中国科学院上海生物化学研究所细胞库。细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养,使用含10%胎牛血清(四季青),1%双抗(Sigma公司)的1640培养基(Gibco公司)。用0.25%胰蛋白酶(Sigma公司)消化液消化后,传代培养。

#### 1.1.2 载体及菌株

在慢病毒表达载体构建中,本实验主要使用BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit及TOP10 competent *E.coli* (Invitrogen公司),在RNAi细胞模型建立中主要使用BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System及One Shot Stbl3 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen公司)。

#### 1.1.3 主要试剂

在Western Blot检测鉴定过程中使用免疫共沉淀试剂Protein A、鼠来源的HPV16 E7的一抗(Santa Cruz公司)及山羊抗鼠的二抗(中杉金桥公司)。在甲基化片段克隆过程中使用亚硫酸氢盐修饰试剂:Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek公司),TA Cloning试剂盒(Invitrogen公司),质粒小提试剂盒(天根公司)及PCR试剂盒(天根公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HPV16-E7基因的RNAi细胞模型的建立

结合慢病毒siRNA载体表达的设计要求,设计了适合慢病毒表达载体的HPV16-E7基因特异性shRNA片段,其正链序列为:5'-CACCGAAAGGAGGATGAAATAGATGGCGAACCATCTATTTTCATCCTCCTTT-3';反链序列为:5'-AAAAAA

AGGAGGATGAAATAGATGGTTCGCCATTATTTTCATCCTCCTTTC-3'。使用BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit构建了pLenti6-E7 siRNA慢病毒表达载体;之后用构建好的pLenti6-E7 siRNA慢病毒表达载体以及BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System生产重组病毒(具体步骤参照说明书进行)。最终使用该重组病毒感染HPV16阳性的SiHa宫颈癌细胞,Blasticidin进行抗生素筛选(8  $\mu$ g/mL)10~12 d,从而获得表达HPV16 E7 siRNA的阳性克隆细胞<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.2 细胞基因组DNA的制备

分别取对数生长期模型组HPV16E7-siRNA和对照组SiHa细胞各1瓶(75 cm<sup>2</sup>),用浴冷的磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗后,再用0.25%的胰蛋白酶消化收集细胞,4℃ 3000 r/min离心5 min,弃上清。用常规酚/氯仿抽提和乙醇沉淀法提取基因组DNA。测定DNA浓度后,通过0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定DNA质量。

#### 1.2.3 基因组DNA的亚硫酸氢盐化学修饰

采用比较公认的亚硫酸氢盐修饰专用试剂盒Methylamp DNA Modification Kit对DNA进行修饰,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

#### 1.2.4 引物设计

根据CALCA的Genbank数据库序列,设计其特异性引物(引物均由Invitrogen公司合成并经质量检测):上游序列为5'-GGACTGAGAGGTGAAATTCACCATGA-3',下游序列为5'-CTGGGAGGCATCAGAGACACTGCCC-3',扩增产物大小为365 bp。

#### 1.2.5 CALCA基因启动子区富含CpG片段的PCR扩增及克隆测序

分别以亚硫酸氢盐修饰过的模型组HPV16-E7-siRNA和对照组SiHa的基因组DNA为模板,采用PCR方法扩增目的片段,然后将该片段克隆到PCR2.1载体上,扩增后提取质粒,使用快速核酸蛋白检测仪测定质粒DNA的浓度及纯度,并进行质粒DNA测序。

#### 1.2.6 甲基化状态的量化比较原则

用亚硫酸氢钠修饰处理基因组DNA,所有未发生甲基化的胞嘧啶(C)都被转化为尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶则不变。然后用特异性PCR引物对目的基因进行聚合酶链反应(PCR)扩增,尿嘧啶(U)又被转化为胸腺嘧啶(T),进而实现了从甲基化状态不同到碱基序列不同的变换。于是通过对甲基化特异性PCR产物的测序就可以判断该基因的甲基化状态,通过对RNA干扰前后CALCA基因甲基化特异性PCR产物的测序结果对比分析,即可得出RNA干扰前后CALCA基因甲基化状态的改变。

## 2 结果与分析

### 2.1 慢病毒介导的HPV16-E7基因RNAi细胞模型的建立

选择针对HPV16-E7基因mRNA的特异的siRNA片段<sup>[15]</sup>,构建慢病毒siRNA重组表达载体,经293FT病毒包装细胞转

染产生重组病毒,并以此感染 HPV16 阳性 SiHa 宫颈癌细胞。用抗生素筛选感染后的细胞,获得稳定表达 *HPV16-E7-siRNA* 的阳性克隆细胞株,最终通过 RT-PCR 及 Western Blot 的方法对细胞株进行转录水平及蛋白水平的鉴定,从而确定慢病毒介导的 *HPV16-E7* 基因 RNAi 细胞模型成功建立。

### 2.2 RNA 干扰前 *CALCA* 基因启动子区甲基化水平鉴定

利用专用软件(MethylPrimer Express, ABI公司)对 *CALCA* 基因启动子进行扫描,发现其中有 19 个 CpG 位点。在设计与

合成引物的基础上,以亚硫酸氢钠修饰的 SiHa 细胞基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增,PCR4.1-TA 载体克隆和测序鉴定,并以 *CALCA* 基因启动子的原序列为对照,进行甲基化状态的量化比较分析,获得了 *HPV16-E7* 基因慢病毒 RNAi 载体干扰前的 *CALCA* 基因甲基化状态信息。结果发现,在 RNA 干扰前 SiHa 细胞基因组 DNA 中 *CALCA* 基因启动子区共有 13 个 CpG 位点发生了甲基化(图 1)。

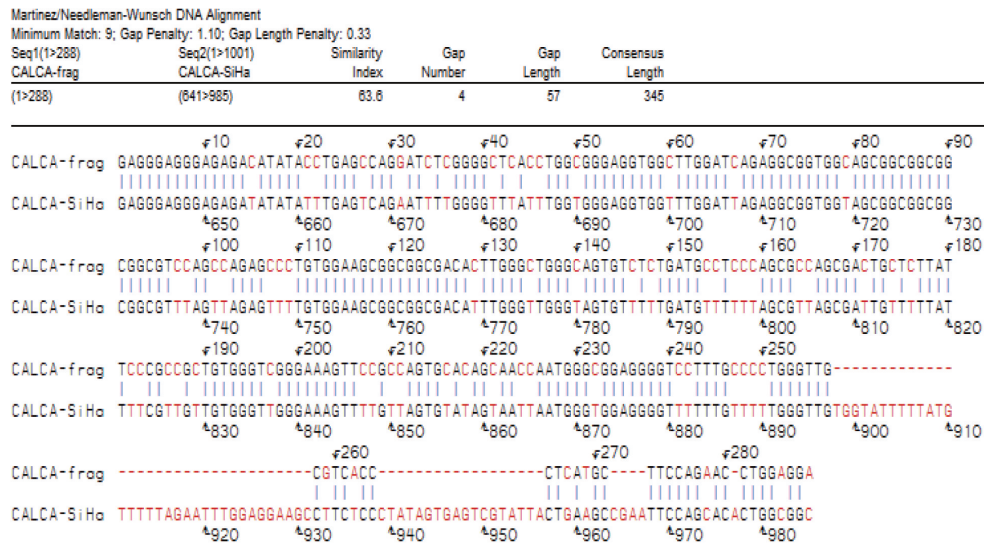


图 1 RNA 干扰前 *CALCA* 基因启动子区甲基化水平鉴定  
Fig. 1 Sequencing of *CALCA* gene promoter before RNAi

### 2.3 RNA 干扰后 *CALCA* 基因启动子区甲基化水平鉴定

以亚硫酸氢钠修饰的模型组细胞基因组 DNA 为对象,经同样方法测序鉴定,并进行甲基化状态的量化比较分析,获得了 *HPV16-E7* 基因慢病毒 RNAi 载体干扰后的 *CALCA* 基因

甲基化状态信息。结果显示,在 RNA 干扰后模型组细胞基因组 DNA 中 *CALCA* 基因启动子区 19 个 CpG 位点均未发生甲基化(图 2)。这一结果说明, *HPV16-E7* 基因特异性 RNAi 干扰后,原先 13 个 CpG 位点的甲基化状态完全复原或消失(表 1)。

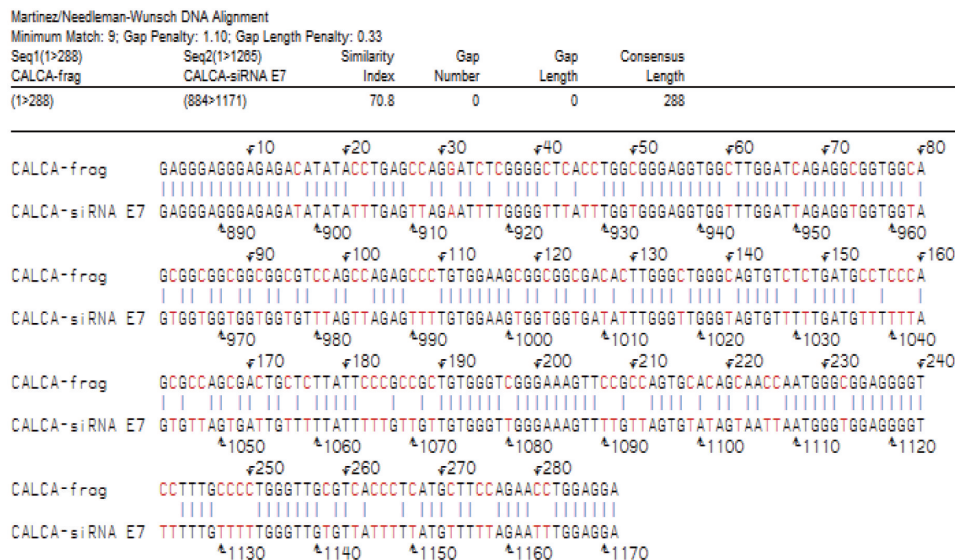


图 2 RNA 干扰后 *CALCA* 基因启动子区甲基化水平鉴定  
Fig. 2 Sequencing of *CALCA* gene promoter after RNAi

表1 SiHa细胞 HPV16-E7 基因 RNA 干扰前后  
CALCA 基因甲基化状态对比

Table 1 Comparison of CALCA gene promoter  
hypermethylation before and after the RNAi

序号	位点/bp	甲基化状态	
		干扰前	干扰后
1	36,37	-	-
2	50,51	-	-
3	73,74	+	-
4	82,83	+	-
5	85,86	+	-
6	88,89	+	-
7	91,92	+	-
8	94,95	+	-
9	118,119	+	-
10	121,122	+	-
11	124,125	+	-
12	162,163	+	-
13	168,169	+	-
14	184,185	+	-
15	187,188	-	-
16	197,198	-	-
17	208,209	-	-
18	232,233	-	-
19	258,259	+	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

### 3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,在全球女性恶性肿瘤发病率中位居第2,仅次于乳腺癌<sup>[16]</sup>。已明确人乳头瘤病毒(HPV)为宫颈癌发生的首要因素<sup>[17]</sup>,其中 HPV16 感染与占宫颈癌病理类型绝大多数的宫颈鳞癌关系最为密切。HPV 的致癌机制主要与病毒编码的 E6、E7 蛋白有关。有学者在进一步的研究中发现 E7 蛋白能够通过激活 *EZH2* 基因表达来增强 DNA 甲基转移酶的活性,表明其与基因甲基化状态有着密切联系<sup>[12,13]</sup>。

基因启动子高甲基化或过度甲基化(hypermethylation)是细胞内基因表达失活的重要原因,基因启动子高甲基化主要发生在基因启动子区域 CpG 岛及其附近区域,不改变蛋白质编码序列,但可以使多种基因表达减弱,产生一系列基因的沉默,导致基因表达调控网络紊乱,与肿瘤、精神病和各种综合症的发生有关<sup>[18,19]</sup>。近年,DNA 甲基化与肿瘤的关系已成为肿瘤研究的热点,在肿瘤的预后与治疗等方面具有长远的研究前景<sup>[20]</sup>。

*CALCA* 是甲状旁腺分泌的一种多肽,与降钙素组成一个复合体<sup>[21]</sup>。研究证明,*CALCA* 的主要生理功能涉及到神经系统、免疫系统、皮肤和心血管等多系统,参与神经营养、皮肤免疫调节、血管扩张和抗原提呈等多种生理过程。近年来,

随着肿瘤特异性基因启动子异常甲基化现象的发现,*CALCA* 基因启动子区高度甲基化被证明不仅与甲状腺癌的发生有关,而且在宫颈病变患者的组织和血清 DNA 筛查研究中,也发现该基因是一种宫颈癌特异性高甲基化候选基因。但其高甲基化状态与 HPV 编码的 E7 蛋白间的依赖关系尚未见报道。

本研究选择 HPV16 阳性宫颈癌细胞株 SiHa,应用 RNAi 技术选择性地抑制细胞内 HPV16 编码的 E7 致癌蛋白表达,并用亚硫酸氢盐测序的方法对 *CALCA* 基因启动子区的甲基化状态进行筛查分析,从而探索 *CALCA* 基因的高甲基化状态与 HPV16-E7 蛋白表达的依赖关系。

通过对比分析高甲基化候选基因 *CALCA* 在干预前后甲基化状态的变化情况发现,在干预前 *CALCA* 基因启动子区所含的 19 个 CpG 位点中有 13 个 CpG 位点发生甲基化(13/19),而当细胞内 HPV16-E7 蛋白表达下调后,*CALCA* 的高甲基化状态也随即消失(0/19)。这一结果说明,在 SiHa 细胞中,由于 HPV16-E7 基因的存在和表达,可能通过某种调控机制引起 *CALCA* 基因启动子区 CpG 位点的甲基化,而 RNAi 抑制 SiHa 细胞内源的 HPV16-E7 基因表达(mRNA 和蛋白)之后,这些甲基化状态发生逆转,可见 HPV16-E7 蛋白是 *CALCA* 发生高甲基化的主要因素。

至今研究者们已发现数十种不同的宫颈癌相关生物标记物,它们在各种检测分析中证实与宫颈癌或与 HPV 相关<sup>[22-24]</sup>,大多数研究仅限于以组织标本为研究对象,将基因表达情况与 HPV 感染率做相关性分析,从而间接得出基因表达情况与 HPV 感染有关或无关,然而对于其中的具体分子机制,很少有人做进一步研究。本研究以 HPV16 阳性细胞为对象,利用 RNA 干扰技术沉默 E7 基因,随后检测宫颈癌特异性高甲基化基因 *CALCA* 的变化情况,从而直接揭示 *CALCA* 基因甲基化与 HPV 的依赖关系,为宫颈癌细胞内基因甲基化的分子机制提供重要的理论依据。同时,本研究创立的研究模式对 HPV 和其他宫颈癌相关基因异常甲基化的研究有一定的指导意义,有助于推动宫颈癌病因、发病机制、治疗方法的深入探索。

### 4 结论

利用 HPV16 阳性 SiHa 细胞成功地建立了稳定表达 HPV16-E7-siRNA 片段的 RNAi 细胞模型,通过对对照组 *CALCA* 基因启动子区目的片段的 BSP 分析,发现 19 个 CpG 位点中有 13 个完全被甲基化,而在表达 HPV16-E7-siRNA 的 RNAi 细胞模型中,其甲基化状态完全逆转,证明 *CALCA* 基因启动子甲基化可能与 HPV16 致癌蛋白 E7 表达存在依赖关系。

### 参考文献(References)

[1] 邓水秀,秦旭平. 降钙素基因相关肽的血管生物学功能多样性[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(3): 246-249.  
Deng Shuixiu, Qin Xuping. Multiple vascular bioactivity of calcitonin gene-related peptide[J]. Journal of International Pathology and Clinical

- Medicine, 2006, 26(3): 246-249.
- [2] Hu S, Ewertz M, Tufano R P, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: A novel diagnostic tool for thyroid cancer [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2006, 91(1): 98-104.
- [3] Widschwendter A, Müller H M, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(2): 565-571.
- [4] Wisman G, Nijhuis E, Hoque M, et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia[J]. International Journal of Cancer, 2006, 119(8): 1908-1914.
- [5] 盛磊, 阿仙姑·哈斯木, 刘开江, 等. 维吾尔族妇女宫颈病变病理进程与降钙素相关肽 $\alpha$ 表达的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(4): 287-290.  
Sheng Lei, Hasimu Axiangu, Liu Kaijiang, et al. The association of cervical lesion pathogenesis in Uighur women with the protein expression of calcitonin-related polypeptide alpha[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 2011, 23(4): 287-290.
- [6] 吐尔逊帕夏·吾布力卡斯木, 阿比达·阿布都卡德尔, 盛磊, 等. 维吾尔族妇女宫颈病变与 CALCA 基因启动子甲基化的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2013, 25(2): 134-138.  
Wubulikasimu Tuerxunpaxia, Abudoukadeer Abida, Sheng Lei, et al. The association of cervical lesion pathogenesis in Uighur women and promoter methylation of CALCA gene[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis, 2013, 25(2): 134-138.
- [7] Monsonego J. HPV infections and cervical cancer prevention. Priorities and new directions[J]. Gynecologic Oncology, 2005, 96(3): 830-839.
- [8] Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: the burden of infection [J]. Obstetrical & Gynecological Survey, 2006, 61(6): 3-14.
- [9] Munoz N, Bosch F X, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2003, 348: 518-527.
- [10] Shames D S, Girard L, Gao B, et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies[J]. PLOS Medicine, 2006, 3(12): 2244-2263.
- [11] 古扎丽娜, 彭芝兰, 郭英, 等. HPV 及其亚型在四川西北地区汉族及新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中的差异表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(5): 408.  
Guzhalinuer, Peng Zhilan, Guo Ying, et al. Different expression of HPV and its subtypes in northwest sichuan han and southern xinjiang uygur women cervical cancer tissue[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(5): 408.
- [12] Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, et al. Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein[J]. Cancer Research, 2008, 68(23): 9964-9972.
- [13] 朱静, 张殊, 狄文. EZH2 组蛋白甲基转移酶在肿瘤发生发展中的作用[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(5): 415-418.  
Zhu Jing, Zhang Shu, Di Wen. Roles of EZH2 histone methyltransferase in tumorigenesis[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2011, 38(5): 415-418.
- [14] 阿比达·阿不都卡德尔, 阿仙姑·哈斯木, 赛米热·艾尼瓦, 等. 慢病毒介导的 HPV16-E7 基因 RNAi 细胞模型的建立[J]. 科技导报, 2013, 31(35): 60-63.  
Abudoukadeer Abida, Hasimu Axiangu, Ainiwaer Saimire, et al. Construction of lentivirus-mediated HPV16-E7 gene RNAi cell model[J]. Science & Technology Review, 2013, 31(35): 60-63.
- [15] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference[J]. Oncogene, 2002, 21(39): 6041-6048.
- [16] Thierry F, Benotmane M A, Demeret C, et al. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis[J]. Cancer Research, 2004, 64(3): 895-903.
- [17] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29 (7): 569-571.  
Suzuke Lalai, Peng Yuhua, Zhou Kang, et al. The analysis of pathogenetic tendency of cervical cancer in various ethnic women in Xinjiang [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2006, 29(7): 569-571.
- [18] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. Nature, 2004, 429(27): 457-463.
- [19] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future[J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5427-5440.
- [20] Yoo C B, Jones P A. Epigenetic therapy of cancer: Past, present and future[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5(1): 37-50.
- [21] 刘深基, 陈松森. 降钙素/降钙素基因相关肽基因前体 RNA 的加工 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1999, 21(4): 196-200.  
Liu Shenji, Chen Songsen. prRNA processing of calcitonin and calcitonin gene related peptide[J]. Foreign Medical Sciences, 1999, 21(4): 196-200.
- [22] 阿娜古丽·阿巴白克力, 哈尼克孜·吐尔逊, 阿布力孜·阿布杜拉, 等. 维吾尔族妇女宫颈癌及 HPV 感染与多种基因表达上调的关系[J]. 科技导报, 2012, 30(19): 50-54.  
Ababaikeli Anaguli, Tuerxun Hankiz, Abudula Abulizi, et al. Relationship of cervical cancer of uighur women and HPV infection with the up-regulation of multiple gene expression[J]. Science & Technology Review, 2012, 30(19): 50-54.
- [23] 阿仙姑·哈斯木, 李巧稚, 马俊旗, 等. 维吾尔族患者宫颈病变中内质网分子伴侣和 HLA-I 类分子表达与 HPV16 感染的关系研究[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(2): 102-105.  
Ayshangul Hasimu, Li Qiaozhi, Ma Junqi, et al. Expression of HLA-I antigen and endoplasmic reticulum molecular chaperones in uighur cervical lesions and their association with HPV16 infection[J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2011, 27(2): 102-105.
- [24] 李巧稚, 阿提开姆·阿布都克热木, 王燕, 等. 子宫颈癌中 Smad4 和 Runx3 表达与 HPV16 感染的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(10): 1112-1115.  
Li Qiaozhi, Atikaimu Abudurehemu, Wang Yan, et al. Expression of Smad4 and Runx3 in cervical lesions and their association with HPV16 infection[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2012, 28(10): 1112-1115.

(责任编辑 吴晓丽)