

- [4] Liu Z M, Ng E K W, Liang N C, *et al.* Cell death induced by *Pteris semipinnata* L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(6): 1477-1487.
- [5] Chen G G, Liang N C, Lee J F, *et al.* Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(5): 619-627.
- [6] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 307-310.
- [7] Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 275-283.
- [8] Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(4): 400-403.
- [9] Schuler M, Green D R. Transcription, apoptosis and p53: catch-22 [J]. *Trends Genet*, 2005, 21(3): 182-187.
- [10] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [11] Pang R W, Poon R T. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now [J]. *Oncology*, 2007, 72(1): 30-44.
- [12] Miura H, Miyazaki T, Ohnishi S, *et al.* Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 1997, 27(5): 854-861.
- [13] Pang R, Poon R T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2006, 242(2): 151-167.
- [14] 刘乘利, 李 冰. 血管内皮生长因子及其受体在肝癌细胞株中的表达及意义 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 770-772.
- [15] Yang L, Wu S, Wu P, *et al.* 23, 24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37) [J]. *Cancer Lett*, 2007, 256(2): 267-278.
- [16] Nicholson D W, Ali A, Lazebnik Y A, *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 37-43.

重组天花粉蛋白体外诱导宫颈癌 HeLa 细胞 p27 基因去甲基化的研究

尤程程¹, 黄利鸣^{2*}, 韩 钰¹, 王艳林², 黄益玲²

(1. 三峡大学分子生物研究所, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学医学院 病理教研室, 湖北 宜昌 443002)

摘要:目的 研究重组天花粉蛋白 (recombinant trichosanthin, rTCS) 对宫颈癌 HeLa 细胞中 p27 基因甲基化状态和基因表达的影响。方法 应用不同质量浓度的 rTCS (20、40、80 μg/mL) 处理体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞后, MSP 法检测用药前后细胞中 p27 基因的甲基化状态, Real-Time PCR 法检测用药前后细胞中 p27 和 DNA 甲基转移酶-1 (DNMT1) mRNA 水平的变化, Western-blotting 法检测用药前后细胞中 p27 蛋白表达的变化。结果 HeLa 细胞中 p27 基因为低表达, 基因启动子区 CpG 岛呈部分甲基化状态。40 μg/mL rTCS 处理导致 p27 基因启动子区 CpG 岛去甲基化; 在 20、40、80 μg/mL 的 rTCS 作用 48 h 后, p27 基因 mRNA 相对表达水平分别升高 2.22、4.00、6.03 倍, p27 蛋白水平表达也逐渐增加; 宫颈癌 HeLa 细胞中 DNMT1 mRNA 高表达, 40 μg/mL rTCS 处理 48 h 可至 DNMT1 mRNA 表达水平降低 78%。结论 rTCS 通过抑制 DNMT1, 逆转 p27 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 使宫颈癌 HeLa 细胞中 p27 基因表达活化。rTCS 能逆转宫颈癌 HeLa 细胞 p27 基因甲基化状态, 调控 p27 基因和 DNMT1 的表达。

关键词: 重组天花粉蛋白; p27 基因; 宫颈癌; DNA 甲基化

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0245-05

In vitro introduction of recombinant trichosanthin on demethylation of p27 in HeLa cells

YOU Cheng-cheng¹, HUANG Li-ming², HAN Yu¹, WANG Yan-lin¹, HUANG Yi-ling²

(1. Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Department of Pathology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract : Objective To investigate the effects of recombinant trichosanthin (rTCS) on methylation status and expression level of p27 gene in HeLa cells. **Methods** HeLa cells was treated by different concentration (20 μg/mL, 40 μg/mL, and 80 μg/mL) of rTCS for 48 h and then methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the promoter methylation status of the p27 gene, real-time PCR was used to detect levels of p27 and DNMT1 mRNA, and Western blotting assay was used to detect expression level of p27 protein before and after treatment with rTCS. **Results** Low expression level and promoter methylation status of the p27 gene were detected in HeLa cells. Treatment with 40 μg/mL rTCS

* 收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873282); 湖北省自然科学基金资助项目 (2009CDA060)

作者简介: 尤程程 (1984—), 女, 湖北十堰人, 助教, 硕士。Tel: (0717) 6397179 E-mail: yocncn@163.com

* 通讯作者 黄利鸣

totally demethylated p27 promoter. Treatment with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rTCS resulted in a 2.22-, 4.00- or 6.03-folds increase in p27 mRNA level, respectively, and also a great increase in p27 protein level. A high DNMT1 expression level was observed in HeLa cells and treatment with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rTCS resulted in a 78 % decrease at the DNMT1 mRNA expression. **Conclusion** rTCS could reverse promoter hypermethylation and re-activate the expression of p27 gene by inhibiting DNMT1 expression in HeLa cells, which indicates its potential use in cancer therapy.

Key words: trichosanthin; p27 gene; uterine cervix cancer; DNA methylation

近年研究发现,肿瘤相关基因的启动子区域 Cp G 岛高甲基化是引起宫颈癌的一个重要原因^[1]。抑癌基因 p27 是细胞周期调节蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKIs) 家族成员之一,p27 基因启动子区的高甲基化可以引起该基因表达缺失,进而导致肝癌、结直肠癌、胃癌等肿瘤的发生^[2-4]。由于 DNA 甲基化抑制基因表达的过程是可逆性的,如能获得有效去甲基化的药物,即可通过去甲基化而使因甲基化失活的抑癌基因重新表达^[5]。

天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 是从葫芦科植物栝楼的块根中提取出来的单链核糖体失活蛋白,在临床上可以引发中期妊娠流产,对子宫外妊娠、绒毛膜上皮癌有一定疗效。TCS 成熟肽由 247 个氨基酸残基组成,相对分子质量约为 24 000, PI=9.4,具有 N-糖苷酶活性,能水解真核细胞核糖体的 28 S rRNA 的 4 324 位上的腺苷酸的 N-C 糖苷链,使核糖体不可逆失活,从而抑制蛋白质的合成^[6]。本课题组前期实验证明 TCS 在体外能通过诱导细胞凋亡明显抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的生长^[7],且能够逆转宫颈癌 HeLa 细胞中 p16 和 TSLC1 基因的高甲基化状态^[8,9]。但是由于 TCS 天然资源的限制和植物蛋白分离纯化过程复杂,阻碍了 TCS 的临床应用。本课题组前期实验中利用大肠杆菌原核表达系统获得基因重组天花粉蛋白 (rTCS),发现其与天然 TCS 相似的生物活性。本研究利用纯化的 rTCS 处理 HeLa 细胞,进一步分析 rTCS 对宫颈癌 HeLa 细胞 p27 基因启动子区甲基化状态的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料:重组天花粉蛋白 (rTCS) 为本所制备^[10];人宫颈癌 HeLa 细胞株由三峡大学分子生物研究所提供;RPMI 1640 培养基和小牛血清 (BCS) 购自美国 Gibco 公司;Wizard DNA Clean-up 购自 Promega 公司;Trizol 总 RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;工具酶和 GeneRuler™ 100 bp Plus

DNA Ladders 购自 Fermentas 公司;SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit (perfect real time, 批号 DRR063M) 购自大连 Takara 公司;鼠抗人 p27 抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PVDF 膜和 ECL 发光检测试剂盒为 Amersham 公司产品;PCR 引物合成由上海生物技术工程有限公司完成。

1.2 细胞培养:人宫颈癌 HeLa 细胞株培养于 5 % CO₂、37 °C 湿化孵箱中,RPMI 1640 培养基含体积分数 10 % BCS、1 $\times 10^5$ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。实验时 HeLa 细胞处于对数生长期,活细胞数超过 95 %,于培养瓶中分别加入含不同质量浓度 rTCS (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液,作用 48 h 后收集细胞进行后续实验,以未加 rTCS 干预的细胞为对照组。

1.3 甲基化特异性 PCR (MSP) 法检测 HeLa 细胞中 p27 基因的甲基化状态:收集各组细胞,常规酚-氯仿法提取细胞 DNA,紫外分光光度法检测 DNA 浓度和纯度,按文献方法^[11]进行 DNA 修饰及纯化。MSP 反应体系为 25 μL ,包括样品 DNA 2 μL (含 DNA 0.1 μg)、10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、上下游 PCR 引物各 0.5 μL 、10 mmol/L dNTP 1 μL 、Taq 酶 0.5 μL 、双蒸水 18 μL 。反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C、30 s,53 °C、45 s,72 °C、30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。以 Cp G 甲基转移酶 (M. SssI) 处理和未处理的正常人外周血细胞 DNA 作为阳性和阴性对照,以双蒸水作为空白对照。MSP 引物设计参照文献方法^[3]:甲基化上游引物:5'-AAAGGCGAGTTAGCGT,甲基化下游引物:5'-AAAACGCCGCCGAACGA;非甲基化上游引物:5'-ATGGAGAGGTGAGTTAGT,非甲基化下游引物:5'-AAAACCCCAATTAAAAACA。预期甲基化 p27 扩增产物长度为 195 bp,非甲基化 p27 扩增产物长度为 212 bp。PCR 产物经 2 % 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像记录结果。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析 rTCS 对 p27 和

DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 基因表达的影响:收集各组细胞,用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度法检测 RNA 浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以此总 RNA 为模版,用逆转录酶和 Oligo (dT)₂₀ 引物合成 cDNA 第一链。再用 cDNA 第一链为模板进行实时荧光定量 PCR (SYBR Green 试剂盒)。PCR 体系为 25 μ L,其中 SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$) 12.5 μ L、cDNA 0.5 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、去离子水 11 μ L,反应条件:93 $^{\circ}$ C 变性 15 s、56 $^{\circ}$ C 退火 15 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s、40 个循环。实时连续测定基因扩增过程中产生的荧光,以达到指数扩增时特定荧光值的循环周数 (Ct 值) 表示目的基因 mRNA 的表达量。每个样品设 3 个复孔,Ct 取其均值,以 β -actin 为内参照。 Δ CT = CT_{目的基因} - CT _{β -actin}, $\Delta\Delta$ CT = Δ CT_{处理组} - Δ CT_{对照组}。不同样本间目的基因表达的相对差异量 = $2^{-\Delta\Delta$ CT}。PCR 引物设计参考相关文献方法^[12,13]。p27 上游引物 P1:5'-GAGGGCAA GTAC GA GTGGCAA,p27 下游引物 P2:5'-CTGCGCA TTGCTCCGCTAACC; DNMT1 上游引物 P3:5'-ACCGCTTCTACTTCCTCGA GGCCTA, DNMT1 下游引物 P4:5'-GTTGCAGTCTCTGTGAACACTGTGG; β -actin 上游引物 P5:

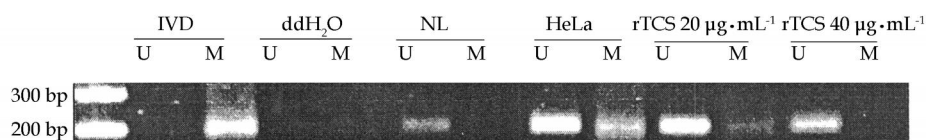
5'-TGGCACCCAGCACAATGAA, β -actin 下游引物 P6:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAA GCA。上述 3 种基因 PCR 产物的长度分别为 238、335、186 bp。

1.5 免疫印迹法分析 rTCS 对 p27 蛋白表达的影响:用蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl、0.1% SDS、0.5% NP40、0.5% 去氧胆酸钠) 提取各组细胞总蛋白,考马斯亮蓝法测定浓度。取 10 μ g 总蛋白变性 10 min 后,行 12% SDS-PAGE 分离,然后电转移至 PVDF 膜。用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h 后,PVDF 膜置于 1:1000 稀释的一抗 (鼠抗人 p27) 中,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后再置于 1:3000 稀释的二抗 (羊抗鼠 IgG) 稀释液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,化学发光显影。实验中以 β -actin 蛋白作为内参标准。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件包进行配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 rTCS 对 p27 基因甲基化状态的影响:p27 基因在 HeLa 细胞中呈部分甲基化状态,在经过不同质量浓度 rTCS 处理 48 h 后,p27 基因在 20 μ g/mL 组中甲基化条带减弱,但仍呈部分甲基化状态;40 μ g/mL 组仅出现非甲基化条带,呈现完全去甲基化状态 (图 1)。



M-甲基化反应 U-非甲基化反应 IVD-甲基化阳性对照 ddH₂O-空白对照 NL-非甲基化阳性对照
M-methylation U-un-methylation IVD-methylated positive control ddH₂O-blank control NL-un-methylated positive control

图 1 rTCS 作用后 HeLa 细胞 p27 基因甲基化状态的改变

Fig. 1 Promoter methylation state of p27 gene in HeLa cells treated by different concentration of rTCS

2.2 rTCS 对 p27 基因和 DNMT1 基因表达的影响:应用半定量 RT-PCR 技术分析 rTCS 对 p27 和 DNMT1 基因表达的影响,发现 rTCS 处理前 HeLa 细胞中 p27 基因为低表达,DNMT1 基因为高表达;经 20、40、80 μ g/mL rTCS 处理后,p27 基因的表达明显增强,DNMT1 基因的表达明显减弱 (图 2)。进一步应用实时荧光定量 PCR 技术检测,发现经 20、40、80 μ g/mL rTCS 处理后,p27 基因的表达分别比对照组升高 2.22、4.0、6.02 倍。DNMT1 基因的表达分别是对照组的 76%、22%、15% (表 1)。

2.3 rTCS 对 HeLa 细胞内 p27 蛋白表达的影响:应用免疫印迹法分析了 rTCS 处理前 HeLa 细胞中 p27 蛋白的表达量,结果发现,HeLa 细胞中 p27 的

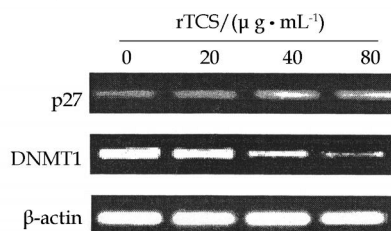


图 2 RT-PCR 分析 rTCS 对 HeLa 细胞 p27 和 DNMT1 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of rTCS on mRNA expression of p27 and DNMT1
基础表达量低,rTCS 用药后,p27 蛋白表达明显增加 (图 3)。

3 讨论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。在我

表 1 rTCS 对 HeLa 细胞 p27 和 DNMT1 基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of rTCS on gene expression of p27 and DNMT1 in HeLa cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	p27	DNMT1
对照	0	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.23
rTCS	20	2.22 $\pm$ 0.54 *	0.76 $\pm$ 0.07 *
	40	4.00 $\pm$ 0.43 **	0.22 $\pm$ 0.19 **
	80	6.03 $\pm$ 0.61 *	0.15 $\pm$ 0.34 **

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

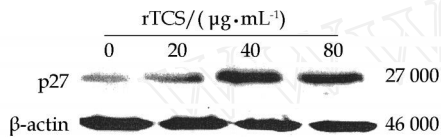


图 3 rTCS 对 HeLa 细胞内 p27 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of rTCS on p27 protein expression in HeLa cells

国,宫颈癌发病率居女性恶性肿瘤的第二位,并且有明显的年轻化趋势。研究发现,肿瘤的发生和发展与相关基因表达异常或表观遗传异常密切相关。基因表观遗传包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质改型和 RNA 干涉等^[14,15]。其中,DNA 甲基化异常被认为是基因突变和缺失之外,肿瘤抑制基因失活的第 3 种机制,而且在某些情况下是其失活的唯一机制,由此基因启动子区 CpG 岛的高甲基化引起的基因失表达现象已成为近年来肿瘤研究的热点。

p27 基因是 CDKIs 的家族成员之一,相对分子质量为 2.7×10^4 定位于人染色体 12p12-13.1,包含 2 个外显子和 1 个内含子。p27 基因的表达产物 p27 蛋白可使细胞停止在 G₁ 中期而调节细胞生长。研究表明 p27 是一个抑癌基因,它具有诱导细胞分化、促进凋亡、调节肿瘤耐药性以及防御炎性损伤等功能。在许多人类肿瘤(如乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、恶性淋巴瘤、卵巢癌和肾癌^[16-18])中 p27 表达水平降低,且其蛋白表达的阳性率与这些肿瘤的恶性程度呈显著负相关。对肝癌、结直肠癌、胃癌等肿瘤的研究^[2-4]均证实,p27 基因启动子区的高甲基化是 p27 基因在这些肿瘤中转录失活的重要机制。

宫颈癌中 p27 蛋白表达减少。Farley 等^[19]发现在宫颈轻、中和重度非典型增生中,p27 蛋白染色阳性的细胞分别占 94%、89%、44%,是逐渐下降的,提示在宫颈肿瘤发生中 p27 蛋白表达减少。在轻度和中度非典型增生中 p27 蛋白的表达较重度非典型增生显著增加 ($P < 0.001$),提示 p27 蛋白

参与宫颈癌的发生。Kim 等^[20]发现宫颈肿瘤中 39.9% 表现高 p27 蛋白表达,p27 蛋白表达与肿瘤体积 ($P < 0.01$)、浸润深度 ($P < 0.001$)、高分期 ($P < 0.001$) 和不良存活期 ($P < 0.01$) 有关。低 p27 蛋白表达的患者预后较差,提示 p27 蛋白参与宫颈鳞状细胞病变的进展。Goff 等^[21]的研究表明,在正常和浸润前病变中 p27 蛋白染色无显著差别,p27 蛋白丢失与浸润 $> 50\%$ 、大小 $> 4 \text{ cm}$ 和手术后放疗均无显著关系,与远处淋巴管侵袭有关 ($P < 0.05$)。Alfsen 等^[22]也指出,p27 和 p27 蛋白的表达与分期、年龄和组织病理参数之间无显著关联。多变量分析表明,低 p27 蛋白表达和高 p16 蛋白表达是宫颈癌预后不良的有力指标 (p27, $P < 0.01$,危害比为 3.18;p16, $P < 0.01$,危害比为 0.16)。

由于 CpG 岛甲基化导致抑癌基因转录失活是一个可以逆转的表观遗传学基因修饰过程,且该逆转 (CpG 岛去甲基化) 可直接恢复抑癌基因功能,因此,DNA 去甲基化恢复抑癌基因功能的研究也成为肿瘤基因治疗的新型手段之一^[23]。DNA 甲基化程度依赖于 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 活性,它的主要功能是将甲基转移至胞嘧啶的含氮杂环上。人体细胞含有多种 DNMT,其中 DNMT1 的主要功能是在细胞分裂过程中维持 DNA 新生链的甲基化状态。高 DNMT 活性可通过抑癌基因高甲基化使之失活,由此导致肿瘤的形成。因此,特异性地抑制 DNMT1 活性,如竞争性底物 (发夹式半甲基化寡核苷酸)、核苷类似物 (5-aza-C、5-aza-CdR)、小分子抑制物 (SAH)、反义寡核苷酸等,可使因高甲基化转录失活的抑癌基因恢复功能,从而逆转肿瘤细胞生物学活性。目前研究较多的去甲基化药物是核苷类似物,但是该类药物存在诱变性,浓度高时具有细胞毒性等不良反应,临床应用受到很大限制。因此,寻找新的安全的去甲基化药物用于肿瘤治疗具有重要的临床意义。

本研究进一步发现,在宫颈癌 HeLa 细胞中存在 p27 基因启动子区的异常甲基化。经 20 μg/mL rTCS 处理后,甲基化程度减弱,40 μg/mL rTCS 处理则导致完全去甲基化。实时定量 PCR 结果显示 p27 基因 mRNA 表达水平较 rTCS 处理前增加 2~6 倍,p27 蛋白表达也比处理前明显增高。上述结果表明高甲基化是 HeLa 肿瘤细胞中 p27 基因表达抑制的重要原因,而 rTCS 可通过基因启动子区去甲基化而活化 HeLa 细胞内 p27 基因表达。

本实验结果还表明在 HeLa 细胞中 DNMT1 高表达,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rTCS 处理 HeLa 细胞 48 h 可使 DNMT1 mRNA 表达水平降低 78%,即 rTCS 抑制 HeLa 细胞 DNMT1 的表达。

由于启动子区异常甲基化是肿瘤发生中的早期事件,对 p27 基因甲基化的检测,有可能成为早期发现宫颈癌的一种手段。rTCS 可以逆转 p27 基因甲基化状态,增强 p27 基因表达,这一作用可能是通过抑制 DNMT1 的表达来实现的,提示 rTCS 有可能是新型的 DNMT 抑制剂,因而具有潜在的临床应用价值。

致谢:三峡大学分子生物研究所全体成员对笔者的大力帮助和支持!

参考文献:

- [1] Yang H J, Liu V W, Wang Y, *et al.* Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(2): 435-440.
- [2] 雷普平, 申丽娟, 章宗籍, 等. 肝细胞癌和慢性肝病组织中 p27 kip1 基因表达及甲基化分析 [J]. 昆明医学院学报, 2007 (2): 12-16.
- [3] 崔 静, 李 庚, 千新来. p27 基因甲基化与结直肠癌发生发展及临床生物学行为的关系 [J]. 新医学, 2005, 36(3): 145-147.
- [4] Milne A N, Sitarz R, Cavalho R, *et al.* Molecular analysis of primary gastric cancer, corresponding xenografts, and 2 novel gastric carcinoma cell lines reveals novel alterations in gastric carcinogenesis [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(6): 903-913.
- [5] Strathdee G, Brown R. Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11(6): 747-754.
- [6] 姜国勇, 李思经, 翁曼丽, 等. 天花粉蛋白结构、核苷酸序列及基因表达研究进展 [J]. 山东农业科学, 1999 (2): 52-54.
- [7] 黄益零, 黄利鸣, 石新兰, 等. 天花粉蛋白对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(2): 253-254.
- [8] 黄利鸣, 邢学森, 黄益玲. p16 基因甲基化与 HeLa 细胞凋亡相关性的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(13): 721-724.
- [9] 王艳华, 黄利鸣. TSLC1 基因甲基化与宫颈癌 HeLa 细胞凋亡相关性的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(21): 2575-2578.
- [10] 尤程程, 黄利鸣, 王艳林, 等. 重组天花粉蛋白的原核表达、纯化及其对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(3): 190-193.
- [11] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9821-9826.
- [12] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1172-1179.
- [13] Zhao J G, Wu A G, Huang Z H, *et al.* Expression of p27 and its clinical significance in colorectal carcinomas [J]. *Chin German J Clin Oncol*, 2002, 1(3): 129-131.
- [14] Herman J G. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 329-333.
- [15] Jones P A, Laird P W. Cancer epigenetics comes of age [J]. *Nat Genet*, 1999, 21: 163-167.
- [16] Anastasiadis A G, Calvo-Sanchez D, Franke K H, *et al.* p27 kip1-expression in human renal cell cancers: implications for clinical outcome [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1A): 217-221.
- [17] Nourse J, Firpo E, Hanagan W M, *et al.* Interleukin-2-mediated elimination of the p27 prevented by rapamycin [J]. *Nature*, 1994, 372: 570-573.
- [18] Nakagama K, Ishida N, Shirane M, *et al.* Mice lacking p27 kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumor [J]. *Cell*, 1996, 85: 707-720.
- [19] Farley J, Uyehara C, Hashiro G, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(2): 596-602.
- [20] Kim J Y, Lim S J, Kim H J, *et al.* Clinical significance of p27 and Skp2 protein expression in uterine cervical neoplasm [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26(3): 242-247.
- [21] Goff B A, Sallin J, Garcia R, *et al.* Evaluation of p27 in pre-invasive and invasive malignancies of the cervix [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 88(1): 40-44.
- [22] Alfsen G C, Reed W, Sandstad B, *et al.* The prognostic impact of cyclin dependent kinase inhibitors p21 WAF1, p27 Kip1, and p16 INK4/MTS1 in adenocarcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical evaluation of expression patterns in population-based material from 142 patients with international federation of gynecology and obstetrics stage and adenocarcinoma [J]. *Cancer*, 2003, 98(9): 1880-1889.
- [23] Strathdee G, Brown R. Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11(6): 74.