

# 宫颈癌患者血浆和组织中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态的研究

任晨春<sup>1,2</sup>, 苗绪红<sup>2</sup>, 杨斌<sup>2</sup>, 赵磊<sup>2</sup>, 孙蕊<sup>2</sup>, 宋文芹<sup>2</sup>

(1. 天津市中心妇产科医院遗传室, 天津 300052; 2. 南开大学生命科学院, 天津 300074)

**摘要:** 为了检测宫颈癌患者血浆和组织中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态, 以找到无创性诊断宫颈癌的新指标, 选取 151 例宫颈癌患者的血浆和 30 例患者的宫颈癌组织为研究对象, 用 MSP 的方法检测 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态, 并对 MSP 产物进行克隆和测序。结果在宫颈癌患者血浆和组织中, *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化率为 30.46% 和 53.33%, 血浆和组织的总体符合率为 80%。而对照中均未检测到甲基化状态。随着患者临床分期和组织学分级的增加, *FHIT* 基因甲基化的检出率也在逐渐的增加。表明宫颈癌患者的血浆和肿瘤组织中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化的发生是高频事件, 使用 *FHIT* 基因作为标记可以对宫颈癌患者进行无创诊断和预后的评估。

**关键词:** 宫颈癌; 甲基化状态; *FHIT* 基因; 血浆; 组织

中图分类号: R71

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)09-1061-06

## Methylation Status of the 5' CpG Islands in *FHIT* Gene in the Plasma and Tissues of Cervical Cancer Patients

REN Chen-Chun<sup>1,2</sup>, MIAO Xu-Hong<sup>2</sup>, YANG Bin<sup>2</sup>, ZHAO Lei<sup>2</sup>, SUN Rui<sup>2</sup>, SONG Wen-Qin<sup>2</sup>

(1. Department of Genetics, Central Hospital of Gynecology and Obstetrics, Tianjin 300052, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300074, China)

**Abstract:** To evaluate the methylation status of the 5' CpG islands in *FHIT* gene using plasma and tissue samples from cervical cancer patients and find a novel marker for non-invasive diagnosis of cervical cancer, methylation-specific PCR (MSP) was employed to examine CpG island methylation in *FHIT* gene in 151 pretreatment plasma samples and 30 tumor tissue samples obtained from cervical cancer patients. MSP product was cloned and sequenced directly. CpG island methylation of *FHIT* was detected in 31.13% of the plasma samples, and in 53.33% of the tissue samples. The total concordant rate of methylation status between plasma and tissue samples in *FHIT* gene was 80.00%. We found a strong positive correlation between *FHIT* methylation in the plasma and the clinical stage and histological grade of the tumor. The data showed that CpG island methylation of the *FHIT* gene is prevalent in the plasma and tissue samples from cervical cancer patients. *FHIT* detection may be used as a non-invasive marker for diagnosis of cervical cancer and prognostic treatment evaluation.

**Key words:** cervical cancer; methylation status; *FHIT* gene; plasma; tissue

脆性组氨酸三联基因(fragile histidine triad gene, *FHIT*)是 1996 年由 Ohta M 等在 3p14.2 区域克隆的抑癌基因<sup>[1]</sup>。有研究表明<sup>[2,3]</sup>, *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲

基化使其在乳腺癌、肺癌和甲状腺癌等的发生中起重要的作用。史惠蓉等<sup>[4]</sup>研究了 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化与基因失活的关系, 发现宫颈癌组织中

收稿日期: 2005-11-07; 修回日期: 2006-04-27

基金项目: 天津市 131 人才基金资助[Supported by 131 Talent Fund in Tianjin City]

作者简介: 任晨春(1972-), 女, 云南省昆明市人, 副研究员, 博士在读, 专业方向: 分子细胞遗传学。Tel: 022-23043168; E-mail: miaoxh@tjmu.edu.cn

通讯作者: 宋文芹(1953-), 女, 山东省人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子细胞遗传学。Tel: 022-23508241; E-mail: rcxqy@yahoo.com.cn

*FHIT*基因 5'端CpG岛甲基化发生率为 40%，且与 *FHIT*蛋白的失活存在相关性。而国内外关于宫颈癌患者血浆中 *FHIT*基因甲基化的状态还未见报道。本研究采用甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)对宫颈癌的血浆和组织中 *FHIT*基因 5'端CpG岛甲基化状态进行研究以提出诊断宫颈癌的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选取 2004 年 1 月至 2005 年 8 月在天津市妇产科医院确诊的宫颈癌患者 151 名为研究对象, 平均年龄 44.84 岁(26~72 岁)。所有的病人于治疗前取静脉血。其中 30 名患者取宫颈癌活检组织。病理类型均为鳞癌。组织学分级(G)依 WHO 标准, 分别为 G1 级 40 例, G2 级 60 例, G3 级 51 例。临床分期依 FIGO (1995)标准, 分别为 I 期 31 例, II 期 37 例, III 期 82 例, IV 期 1 例。选取有癌组织样本的 30 例患者的癌组织旁正常组织以及相对应血中的淋巴细胞作为内对照, 另选 30 例正常宫颈组织及 30 例健康人的血浆作为对照。

### 1.2 DNA 的提取

取 2 mL 静脉血, 枸橼酸钠抗凝。室温下 3 000 g 离心 10 min, 吸取上层血浆于 1.5 mL 的 EP 管中, 10 000 g 离心 10 min, 吸取血浆, -20℃ 保存待检。血浆 DNA 的提取依照 Wizard<sup>®</sup> 纯化试剂盒 (Promega, USA) 的步骤进行。

组织 DNA 的提取依据传统蛋白酶 K 消化, Tris 饱和酚/氯仿抽提及乙醇沉淀的步骤进行。A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.6~2.0 之间。

### 1.3 DNA 亚硫酸氢盐修饰

取 1 μg 的基因组 DNA 溶于 50 μL 的双蒸水中稀释。稀释的基因组 DNA 或 50 μL 血浆 DNA 在 37℃ 的 0.3 mol/L NaOH 中变性 10 min。分别加入新鲜配制的 10 μmol/L 对苯二酚和 3 mol/L 亚硫酸氢钠(pH 5.0), 于 50℃ 孵育 16 h。采用 SBS 公司的纯化试剂盒 (SBS, Beijing) 纯化脱盐。在 0.3 mol/L NaOH 中 55℃ 孵育 15 min 后用乙醇沉淀。最后溶于 20 μL 的双蒸水中立即使用或于 -70℃ 保存待检。

### 1.4 阳性对照甲基化 DNA 的获取

取 1 μg 从正常宫颈鳞状上皮中提取的 DNA, 加入 10 U 的 *Sss* I 甲基化转移酶, 160 mmol/L 的 SAM (S-腺苷甲硫氨酸) 和缓冲液于 50 μL 的体系中, 37℃ 孵育 4 h, 再按照 DNA 亚硫酸盐修饰的方法加以修饰, 产物在 -70℃ 保存待检。

### 1.5 PCR

扩增反应体系中包含 5 μL 的模板 DNA, *FHIT* 基因的非甲基化引物为 Fu: 5'-TTGGGGTGTGGGT-TTGGGTTTTTATG-3' (正义链) 及 5'-CATAAACACC-AACCCCACTA-3' (反义链), *FHIT* 基因的甲基化引物为 Fm: 5'-TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTAC-GC-3' (正义链) 及 5'-CGTAAACGACGCCGACCCCACTA-3' (反义链)<sup>[5]</sup>, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 (Sangon, Shanghai)。PCR 反应条件为 95℃ 5 min, 然后 95℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 30 s 做 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。采用热启动, *Taq* 酶 2 U。所有 PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler (Germany) 中进行。

取 9 μL 的扩增产物经 2% 含有溴乙锭的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果, 在 Genius 凝胶成像系统 (Syngene, USA) 下观察并照相, 扩增片段为 74 bp。

### 1.6 克隆并测序

电泳后将切胶用 SBS 的 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物 (SBS, Beijing), 乙醇沉淀后连接 pUCm-T 载体并克隆到 *E. coli* DH5α 感受态细胞。上海生工生物工程技术服务有限公司测序 (Sangon, Shanghai)。测序结果与基因组 DNA 进行比对。

### 1.7 统计处理

用 SPSS11.5C (SPSS Inc., Chicago, IL) 统计软件包进行统计分析。各组间采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化状态

用 Fm 引物扩增 30 例正常宫颈鳞状上皮以及癌组织旁的正常组织均未见阳性片段, 30 例宫颈癌组织中有 16 例扩增出 74 bp 的阳性片段, 检出率为 53.33% (16/30)。正常宫颈组织与宫颈癌组织间存在显著性差异 ( $\chi^2 = 21.818, P < 0.05$ )。用 Fu 引物检测发

现, 30 例正常宫颈鳞状上皮以及癌旁正常组织均发现阳性片段, 在 30 例宫颈癌组织中, 有 14 例发现阳性片段, PCR结果见图 1 和表 1。

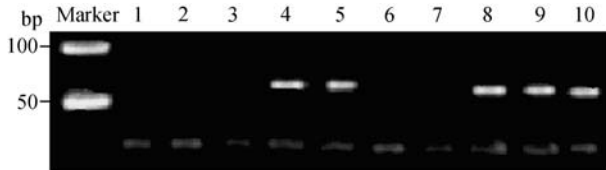


图 1 用 MSP 分析组织中 *FHIT* 基因甲基化状态

1: Fu 的阴性对照; 2: Fm 的阴性对照; 3: 病例 8 的 Fu 结果; 4: 病例 8 的 Fm 结果; 5: 病例 15 的 Fu 结果; 6: 病例 15 的 Fm 结果; 7: 病例 26 的 Fu 结果; 8: 病例 26 的 Fm 结果; 9: Fu 的阳性对照; 10: Fm 的阳性对照。

Fig. 1 MSP analysis of *FHIT* methylation status in tissue

1: neg. ctrl for unmethylation (Fu); 2: neg. ctrl for methylation (Fm); 3: Fu of pt. #8; 4: Fm of pt. #8; 5: Fu of pt. #15; 6: Fm of pt. #15; 7: Fu of pt. #26; 8: Fm of pt. #26; 9: pos. ctrl for Fu; 10: pos. ctrl for Fm.

## 2.2 血浆中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化状态

用Fm引物扩增的 30 例健康人血浆以及 30 例宫颈癌患者外周血的淋巴细胞均未发现阳性片段。151 例宫颈癌患者血浆中有 46 例扩增出了阳性片段, 检出率为 30.46% (46/151)。健康人血浆与宫颈癌患者血浆间存在显著性差异( $\chi^2 = 12.253, P < 0.05$ )。用Fu引物检测发现, 30 例健康人血浆以及患者外周血的淋巴细胞中均发现阳性片段, 而 151 例宫颈癌患者中 105 例检测到阳性片段。在这 151 例血浆样本中, 有 30 例患者活检取宫颈癌组织进行对比, 发现组织是阳性的病例中, 血浆也为阳性的检出率为 62.5% (10/16)(图 2, 表 1)。组织是阴性的病例中, 血浆中无 1 例出现阳性片段。组织与血浆的总体符合率为 80% (24/30)。

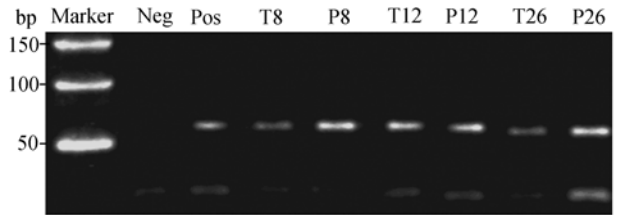


图 2 组织与血浆中 *FHIT* 基因甲基化状况的对比

T8: 病例 8 的组织结果; P8: 病例 8 的血浆结果; T12: 病例 12 的组织结果; P12: 病例 12 的血浆结果; T26: 病例 26 的组织结果; P26: 病例 26 的血浆结果。

Fig. 2 The methylation status of *FHIT* gene in tissue and plasma

T8: Tissue of pt. #8; P8: Plasma of pt. #8; T12: Tissue of pt. #12; P12: Plasma of pt. #12; T26: Tissue of pt. #26; P26: Plasma of pt. #26

## 2.3 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化状态与临床分期的关系

在 151 例血浆样本中, 按临床分期: I 期 31 例, II 期 37 例, III 期 82 例, IV 期 1 例。各期 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化的检出率分别为 I 期 6.45% (2/31), II 期 24.32% (9/37), III 期 41.46% (34/82), IV 期 100% (1/1)。各期间存在显著性差异( $\chi^2 = 16.062, P < 0.05$ )。随着临床分期的增加, 甲基化的阳性率也有增加的趋势, I 期与 II 期间存在显著性差异( $\chi^2 = 3.974, P < 0.05$ ), 而其余相邻两组之间差异无显著性( $P > 0.05$ ), 见表 2。

## 2.4 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化状态与病理分级的关系

在 151 例血浆样本中, 按组织学分级: G1 级 40 例, G2 级 60 例, G3 级 51 例。各级 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛的甲基化的检出率分别为 G1 级 5% (2/40), G2 级 28.33% (17/60), G3 级 52.94% (27/51), 3 组间

表 1 在宫颈癌组织和血浆中不同引物扩增结果

Table 1 The amplified results of different primer in tumor tissues and plasma of cervical cancer

	组织 Tissue				血浆 Plasma			
	甲基化引物 Fm Primer for methylation		非甲基化引物 Fu Primer for unmethylation		甲基化引物 Fm Primer for methylation		非甲基化引物 Fu Primer for unmethylation	
	实验组 E	对照组 C	实验组 E	对照组 C	实验组 E	对照组 C	实验组 E	对照组 C
	Experiment group	Control group	Experiment group	Control group	Experiment group	Control group	Experiment group	Control group
阳性 Positive	16	0	14	30	46	0	105	30
阴性 Negative	14	30	16	0	105	30	46	0
合计 Total	30	30	30	30	151	30	151	30
$\chi^2$	21.818		21.818		12.253		12.253	
P	<0.05		<0.05		<0.05		<0.05	

表 2 血浆中不同的临床分期和组织学分级中基因甲基化的数量

Table 2 The number of methylated gene in different clinical stages and tumor grade in plasma samples

临床分期 Clinical stage	数量 No.	阳性数 Positive	阳性率 (%) Positive rate	组织学分级 Tumor grade	数量 No.	阳性数 Positive	阳性率 (%) Positive rate
I	31	2	6.45	G1	40	2	5.00
II	37	9	24.32	G2	60	17	28.33
III	82	34	41.46	G3	51	27	52.92
合计 Total	150	45	30.00	合计 Total	151	46	30.46

存在显著性差异( $\chi^2 = 24.536, P < 0.05$ )。随着组织学分级的增加,甲基化的阳性率也有增加的趋势,且相邻两组之间也存在差异显著性(G1 与G2 组间 $\chi^2 = 8.490, P < 0.05$ ; G2 与G3 组之间, $\chi^2 = 6.977, P < 0.05$ ) (表 2)。

## 2.5 测序结果

将组织及对应的血浆中用 Fm 引物扩增后所得

的 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛 DNA 产物序列与基因组 DNA 相比对,结果发现在 Fm 阳性标本中 10 个 CG 岛中的 C 没有转变成 T,说明该 CG 岛发生了甲基化(1 为基因组序列,2 为亚硫酸氢钠修饰后的肿瘤组织序列,3 为亚硫酸氢钠修饰后的与肿瘤组织对应的血浆样本序列,均为 74 bp,且 2 与 3 测序结果完全一致,可见基因组中未发生甲基化的 C 均转变为了 T,用下划线表示):

1.CTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT CCA CGC--GCG TCA GGT  
 2.TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA CGC --GCG TTA GGT  
 3.TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA CGC --GCG TTA GGT

1.CATCACCCC GGA GCC--CAG TGG GGC CGG CGC CGC TCA CG  
 2.TAT TAT TTC GGA GTT --TAG TGG GGTCGG CGT CGT TTA CG  
 3.TAT TAT TTC GGA GTT --TAG TGG GGTCGG CGT CGT TTA CG

宫颈癌患者组织及对应的血浆中 Fm 阳性结果测序图见图 3。

## 3 讨论

*FHIT* 基因位于人类染色体 3p14.2,此区包括家

族性肾细胞癌 t(3; 8)易位断裂点和最常见的 Aphodicolin 诱导的脆性部位 FRA3B,它是组氨酸三联体(histidine triad, HIT)基因家族成员之一,由 10 个外显子组成。*FHIT* 基因的 cDNA 长约 1.1 kb,编码一个由 147 个氨基酸组成的 16.8 kDa 人二腺苷酸三

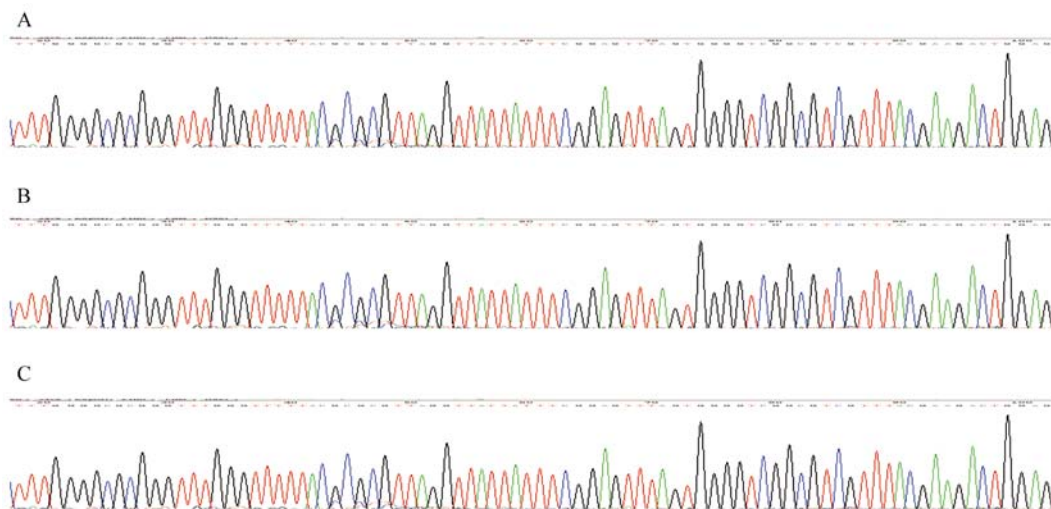


图 3 宫颈癌患者 Fm 阳性结果测序图

A: 阳性对照; B: 组织测序图; C: 血浆测序图。

Fig. 3 The sequencing result of methylation of *FHIT* in plasma of cervical cancer patient

A: Positive control; B: Tissue; C: Plasma.

磷酸水解酶(*FHIT*), 参与DNA的修复和细胞周期的调控<sup>[6]</sup>。*FHIT*在许多正常组织中均有表达, 其中肝、肾、乳房等组织中含量较为丰富, 而宫颈组织表达水平则相对偏低。到目前为止人们已在多种人类原发性肿瘤组织和细胞系中发现因*FHIT*基因缺失或点突变引起的转录异常<sup>[7-10]</sup>, *FHIT*基因的失活与恶性肿瘤的发生、发展, 特别是那些直接与外界接触的上皮性肿瘤的发展有关, 被认为是环境致癌物的靶分子<sup>[11]</sup>。

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率居女性癌症死亡率的第二位, 发生率为 16%<sup>[12]</sup>, 现在公认它的发生与HPV病毒的感染有关<sup>[13]</sup>。但是HPV阳性的患者大多数没有立即发病, 而且严重程度也因人而异, 所以宫颈癌的发生还与其他因素有关, 目前宫颈癌相关基因的研究成为热点。宫颈癌的组织类型主要有鳞癌、腺癌、腺鳞癌、小细胞癌, 其中鳞癌占大多数, 故对*FHIT*基因与宫颈癌发生关系的研究日益引起人们的重视, 且主要集中在*FHIT*基因局部杂合性缺失(LOH)、纯合性缺失所致一个或多个外显子丢失引起宫颈癌上<sup>[14,15]</sup>。同时有研究表明宫颈癌患者无*FHIT*基因的改变, 该基因的失活与其5'端CpG岛的高甲基化状态有关<sup>[4]</sup>, 这就引起了人们对*FHIT*基因表观遗传学改变的研究的兴趣。

甲基化是人类基因组DNA最重要的表观遗传学修饰方式可引起基因沉默。它的改变在肿瘤发生中起到重要的作用。与基因突变不同, DNA的甲基化是可逆的。抑癌基因5'端CpG岛发生甲基化会引起抑癌基因的失活<sup>[16]</sup>。史惠蓉等<sup>[4]</sup>发现 40%的宫颈癌的*FHIT*基因5'端CpG岛出现甲基化使*FHIT*蛋白在 67%的宫颈癌患者中不表达, 说明*FHIT*基因5'端CpG岛的甲基化在宫颈癌发生中有重要的作用。目前, 人们普遍采用甲基化特异性PCR(MSP)技术对甲基化状态进行检测, 它是利用亚硫酸氢盐修饰造成甲基化和非甲基化DNA序列的差异, 可以设计出各自特异性引物, 简化了以往的检测技术, 而且敏感性很高, 允许它对小量样本的DNA进行甲基化研究, 包括来自石蜡包埋样品或显微切割组织的DNA, 在 1 000 个非甲基化拷贝中存在一个甲基化拷贝均可检测出来, 所以它成为公认的快速、高效临床研究检测方法<sup>[17]</sup>。

从肿瘤患者血浆/血清中检测到基因5'端CpG岛的甲基化状态, 为肿瘤的无创性诊断提供了新的思路。有研究表明在结肠癌<sup>[18]</sup>、肝癌<sup>[19]</sup>等患者血浆/

血清中已检测到*p16*基因、*DAPK*基因和*MGMT*基因的高甲基化。Yang H J<sup>[20]</sup>等对 40 例宫颈癌患者的血浆进行研究, 发现*DAPK*、*p16*和*MGMT*基因甲基化的检出率分别为 40%、10%和 7.5%, 而肿瘤组织中的检出率分别为 60%、28.2%和 18.8%, 在血浆和肿瘤组织中至少有一个基因发生甲基化的比率分别为 55%和 77.3%, 为血浆中检测宫颈癌提供了良好的实验数据。*FHIT*基因的甲基化是诱发宫颈癌的一个重要的因素, 但与对宫颈癌患者血浆/血清中*FHIT*基因的甲基化状态的研究尚未见报道。我们采用MSP方法对 151 例宫颈癌患者血浆样本和 30 例宫颈癌组织样本进行*FHIT*基因5'端CpG岛甲基化状态进行的研究, 发现血浆中甲基化的发生率为 31.13%, 对应肿瘤组织中的发生率为 53.33%, 血浆和组织的总体符合率为 80%, 而在正常对照组中未发现甲基化状态。对甲基化结果成阳性的血浆与对应的肿瘤组织扩增的PCR产物进行测序, 发现血浆与肿瘤组织的甲基化状态完全一致, 进一步验证了*FHIT*基因5'端CpG岛的甲基化是宫颈癌发生的一个重要因素, 而且在患者血浆中可以探测到这种甲基化状态的存在, 所以*FHIT*基因5'端CpG岛甲基化的检测将成为宫颈癌无创性诊断的新指标。

本研究还对宫颈癌患者*FHIT*基因5'端CpG岛的甲基化率与临床分期和病理学分级的关系进行了动态研究。各期*FHIT*基因5'端CpG岛的甲基化的检出率分别为 I 期 6.45%(2/31), II 期 24.32%(9/37), III 期 41.46%(34/82), IV 期 100%(1/1), 随着临床分期的增高, 甲基化率有上升的趋势, 各期间存在显著性差异( $\chi^2 = 16.062, P < 0.05$ ), 尤其 I 期与 II 期之间存在显著性差异, 说明早期与中期之间差异显著, 对宫颈癌的诊断有重要意义。本研究由于病例采集的限制, IV 期的病例数量较少, 还需要进行大量样本的检测。按病理学分级研究发现甲基化率分别为 G1 期 5%(2/40)、G2 期 28.33%(17/60)、G3 期 52.94%(27/51), 3 组间存在显著性差异( $\chi^2 = 24.536, P < 0.05$ )。说明随着病理学分级的增高, 甲基化的阳性率显著增加, 说明肿瘤的恶性程度越高, 甲基化的出现率越高, 这为宫颈癌发生发展的预测、疗效的评估提供了良好的实验依据。

通过对宫颈癌患者血浆和肿瘤组织中 *FHIT* 基因甲基化状态的研究, 我们发现 *FHIT* 基因的甲基化对宫颈癌的发生有着重要的作用。对血浆中 *FHIT* 基

因甲基化的分子生物学分析, 将为宫颈癌的无创性诊断、预后的评估以及治疗提供新的手段。今后我们要进行多个宫颈癌相关基因甲基化指标联合应用的研究, 以提高诊断的效率。

#### 参 考 文 献 (References):

- [1] Ohta M, Inoue H, Cotticelli M G, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce C M, Huebner K. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 1996, 84(4): 587~597. [\[DOI\]](#)
- [2] Zochbauer-Muller S, Fong K M, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani A K, Milchgrub S, Gazdar A F, Minna J D. 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res*, 2001, 61(9): 3581~3585.
- [3] Zou M, Shi Y, Farid N R, al-Sedairy S T, Paterson M C. *FHIT* gene abnormalities in both benign and malignant thyroid tumors. *Eur J Cancer*, 1999, 35(3): 467~472. [\[DOI\]](#)
- [4] SHI Hui-Rong, WU Qing-Hua, SUO Zhen-He. Correlation between methylation of 5'CpG islands and inactivation of *FHIT* gene in cervical cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 2005, 24(1): 7~11.  
史惠蓉, 吴庆华, 索振河. 宫颈癌组织中 *FHIT* 基因 5'端 CpG 岛甲基化及其与基因失活的关系. *癌症*, 2005, 24(1): 7~11.
- [5] Tanaka H, Shimada Y, Harada H, Shinoda M, Hatooka S, Imamura M, Ishizaki K. Methylation of the 5'CpG island of the *FHIT* gene is closely associated with transcriptional inactivation in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, 1998, 58(15): 3429~3434.
- [6] Kannan K, Munirajan A K, Bhuvaramurthy V, Mohanprasad B K, Shankar P, Tsuchida N, Shanmugam G. *FHIT* gene mutations and single nucleotide polymorphism in Indian oral and cervical squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 2000, 36(2): 189~193. [\[DOI\]](#)
- [7] Hendricks D T, Taylor R, Reed M, Birrer M J. *FHIT* gene expression in human ovarian, endometrial and cervical cancer cell lines. *Cancer Res*, 1997, 57(11): 2112~2115.
- [8] Hayashi S, Tanimoto K, Hajiro-Nakanishi K, Tsuchiya E, Kurosumi M, Higashi Y, Imai K, Suga K, Nakachi K. Abnormal *FHIT* transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 Japanese cases. *Cancer Res*, 1997, 57(10): 1981~1985.
- [9] Druck T, Hadaczek P, Fu T B, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese M L, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli M G, Inoue H, Croce C M, Huebner K. Structure and expression of the human *FHIT* gene in normal and tumor cells. *Cancer Res*, 1997, 57(3): 504~512.
- [10] Panagopoulos I, Thelin S, Mertens F, Mitelman F, Aman P. Variable *FHIT* transcripts in non-neoplastic tissues. *Genes chromosomes cancer*, 1997, 19(4): 215~219. [\[DOI\]](#)
- [11] LIN Ya-Hua, YE Qiao-Tao. The research and development on *FHIT* gene. *Overseas Med- Radiation & Nucleus Fascicule*, 2001, 25(6): 275~278.  
林亚华, 叶巧滔. *FHIT* 基因研究进展. 国外医学放射医学核医学分册, 2001, 25(6): 275~278.
- [12] WHO Bulletin, 1986, 64: 607.
- [13] Waggoner S E. Cervical cancer. *Lancet*, 2003, 361(9376): 2217~2225. [\[DOI\]](#)
- [14] Kersemaekers A M, Hermans J, Fleuren G J, van de Vijver M J. Loss of heterozygosity for defined regions on chromosomes 3, 11 and 17 in carcinomas of the uterine cervix. *Br J Cancer*, 1998, 77(2): 192~200.
- [15] Helland A, Kraggerud S M, Kristensen G B, Holm R, Abeler V M, Huebner K, Borresen-Dale A L, Lothe R A. Primary cervical carcinomas show 2 common regions of deletion at 3P,1 with the *FHIT* gene: evaluation of allelic imbalance at *FHIT*, Rb1 and Tp53 in relation of survival. *Int J Cancer*, 2000, 88(2): 217~222. [\[DOI\]](#)
- [16] Baylin S B, Herman J G, Graff J R, Vertino P M, Issa J P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, 1998, 72: 141~196.
- [17] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, Nelkin B D, Baylin S B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821~9826. [\[DOI\]](#)
- [18] Zou H Z, Yu B M, Wang Z W, Sun J Y, Cang H, Gao F, Li D H, Zhao R, Feng G G, Yi J. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1): 188~191.
- [19] Wong I H, Lo Y M, Zhang J, Liew C T, Ng M H, Wong N, Lai P B, Lau W Y, Hjelm N M, Johnson P J. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 71~73.
- [20] Yang H J, Liu V W, Wang Y, Chan K Y, Tsang P C, Khoo U S, Cheung A N, Ngan H Y. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(2): 435~440. [\[DOI\]](#)