

宫颈癌 *p16* 基因甲基化及表达的研究

原继荣¹, 李 钰², 胡双玖¹, 李 璞²

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院妇产科, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学遗传与细胞生物教研室, 哈尔滨 150086)

摘要: 为了探讨 *p16* 基因甲基化及异常表达在宫颈癌中的意义, 分别采用甲基化特异性 PCR (MSP) 方法检测不同病理类型和临床分期的 60 例宫颈癌组织中 *p16* 基因启动子区域 5' CpG 岛甲基化状态; 采用 PCR 方法检测 *p16* 基因外显子 1 (E_1) 和外显子 2 (E_2) 纯合缺失情况; 采用免疫组化的方法分析 *p16* 蛋白的表达缺失和减弱情况。结果显示正常对照组织及癌旁 *p16* 基因无甲基化, 且无 E_1 和 E_2 缺失和 *p16* 蛋白表达异常。60 例宫颈癌标本的甲基化率为 21.67% (13/60); *p16* 基因缺失率为 15.00% (9/60); *p16* 蛋白表达下降或无表达为 51.67% (31/60)。可见 *p16* 基因蛋白的阳性表达率随着临床分期升高呈明显下降趋势。结果提示 *p16* 基因失活在宫颈癌中多见且与病理分级密切相关。*p16* 基因甲基化在宫颈癌发生中起着一定作用。

关键词: 宫颈癌; *p16* 基因表达; 甲基化

中图分类号: R737

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)01-0039-05

Methylation and Aberrant Expression of the *p16* Gene in Cervical Carcinoma

YUAN Ji-Rong¹, LI Yu², HU Shuang-Jiu¹, LI Pu²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: To detect hypermethylation and aberrant expression of the *p16* gene in cervical carcinoma (CC), methylation-specific PCR (MSP) was used to determine the methylation status of 5' CpG islands of the *p16* gene, loss or decrease of *p16* expression was analyzed by immunohistochemistry (IHC), and homozygous deletion of exon 1 (E_1) and/or exon 2 (E_2) was determined by PCR in 60 cases of CC at different pathological grades and clinical stages. The results showed absence of methylation and presence of normal expression of the *p16* gene in the control and adjacent tissues of CC. Hypermethylation, loss or decrease of expression and deletion of the *p16* gene were detected in 21.67% (13/60), 51.67% (31/60) and 15.00% (9/60) of the tumor tissues, respectively. The rate of *p16* expression markedly reduced with the increase of clinical stages. Our data suggested that inactivation of the *p16* gene was a frequent event and positively correlated with pathological grades in CC, and that methylation of the *p16* gene was an important event in carcinogenesis of CC.

Key words: cervical carcinoma; *p16* gene expression; methylation

p16 基因作为抑癌基因在多种肿瘤和细胞系中频繁发生杂合缺失、纯合缺失、突变及甲基化^[1,2]。既往认为抑癌基因失活有两条途径: 基因突变和染

色体物质丢失。现已证明 DNA 甲基化是抑癌基因失活的第三种机制^[3]。DNA 甲基化可发生在细胞恶变之前。因此, 检测基因启动子甲基化有助于早

收稿日期: 2004-02-16; 修回日期: 2004-06-15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (编号: D01-41) [Supported by the Natural Science Fund of Heilongjiang Province (No. D01-41)]

作者简介: 原继荣 (1965—), 女, 医学博士, 妇产科专业, 副主任医师, 副教授, Tel: 0451-86605577, E-mail: jryuan@hotmail.com

期发现有癌变倾向的细胞,还可作为分子指标,预测对化疗的反应和判定预后等^[4]。*p16* 基因的研究已成为当前肿瘤分子生物学和分子遗传学研究的热点之一。

本研究表明,*p16* 的失活存在于多种人类恶性肿瘤,然而探讨宫颈癌发生过程中 *p16* 基因异常表达及其 5' CpG 岛的甲基化状态的研究较少,特别是综合分析 *p16* 基因异常表达与病理类型、临床分期关系的研究更少见,对这些变化过程及相互作用的了解仍不完善。

1 材料和方法

1.1 研究对象

60 例宫颈癌及其癌旁组织标本均来自哈尔滨医科大学附属二院手术切除标本。病理分级按 1988 年 FIGO 提出的标准分为 G₁、G₂ 和 G₃ 级,且病理类型和病理分级均经该院病理科核实;临床分期按 1989 年 FIGO 公布的新分期方法分为 I、II、III 和 IV 期。其中石蜡包埋组织标本 30 例,新鲜手术切除标本 30 例(新鲜组织标本获得后迅速保存于 -70℃ 冰箱以备提取 DNA)。选择 10 例相应年龄段的正常宫颈组织做阴性对照。

1.2 组织 DNA 的提取

购用上海生工生物公司生产的 DNA 提取试剂盒,按试剂盒说明提取 DNA。提取的基因组 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳检查其完整性,经紫外分光光度计检测, A₂₆₀/A₂₈₀ (A 为吸光度,旧称光密度 OD) 均在 1.5~1.9 之间。

1.3 宫颈癌 *p16* 基因甲基化

1.3.1 DNA 亚硫酸氢盐修饰

取 2 μg 模板 DNA 蒸馏水定容至 50 μL,加入新配置 2 mol/L 的 NaOH 液 5.5 μL (使终浓度为 0.3 mol/L),置于 37℃ 孵育 20 min。加入 30 μL 10 mmol/L 氢醌 (Sigma),见溶液呈黄色。加入 520 μL 新配制的 3 mol/L 亚硫酸氢钠 (Sigma S-8890)。充分混匀后,离心,上盖矿物油。50℃ 孵育 16 h。次日,经修饰的 DNA 用 Wizard DNA Clean-Up System (Promega A7280) 纯化。纯化后的 DNA 于 4℃ 或 -20℃ 保存。在每离心管中加入 5.5 μL 的 3 mol/L NaOH,室温孵育 15 min。加入 10 mol/L 醋酸氨 33 μL 中和后,加入 3 体积的乙醇沉淀 DNA (-20℃ 过夜,摇匀 30 min),用 70% 乙醇洗涤,干燥后,用 20

μL 水悬浮。-20℃ 冻存(避免反复冻融)。

1.3.2 引物设计

参照赵迎社等^[5]据 Herman 等资料合成的引物序列,由上海生工生物公司合成引物。P16-M 和 P16-U 分别用于扩增 *p16* 基因 5' CpG 岛甲基化和非甲基化的等位基因,为了便于克隆测序,在 P16-M 和 P16-U 的正反向引物的 5' 端分别加上 *Hind* III 和 *Bam* H I 两种限制性内切酶的识别序列(表 1)。

表 1 *p16* 基因 *Msp* 分析用引物

Table 1 Primers for *Msp* analysis of *p16* gene

名称 Name	引物序列 Primers sequences(5'→3')	产物长度 Size of products
P16-MF	CTAA <u>GCTTAGAGGGTGGGGCGGATCGC</u>	243 bp
P16-MR	ATGGA <u>TCCACCTAAATCGACCTCCGACCG</u>	
P16-UF	GTAA <u>GCTTAGAGGGTGGGGTGGATTGT</u>	243bp
P16-UR	ACGG <u>ATCCACCTAAATCAACCTCCAACCA</u>	

注:M 示甲基化引物,U 示非甲基化引物,F 和 R 示正向与反向引物,字母下画线为 *Hind* III 或 *Bam* H I 的识别序列。

Note: M represents methylated -specific primers, and U unmethylated-specific primers. F and R, sense and antisense primers, respectively. Recognition sites of *Hind* III or *Bam* H I are underlined.

1.3.3 PCR 扩增特异甲基化和非甲基化片段

反应混合物 50 μL 体系: 10 × PCR Buffer, 5 μL; 25 mmol/L dNTP, 2.5 μL; 正向引物 P1 (P16-MF 或 P16-UF), 1 μL; 反向引物 P2 (P16-MR 或 P16-UR), 1 μL; 消毒的蒸馏水 28.5 μL; 修饰过的 DNA 2 μL; 加入矿物油 25~50 μL; 2.5 U *Taq* 酶加 10 μL 水,于热启动后加入各样本。

循环扩增条件: 95℃, 5 min; 95℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s, 35 个循环; 72℃, 4 min。4℃ 保存待分析。

1.3.4 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果

参见《分子克隆》。

1.4 宫颈癌中 *p16* 基因外显子 E₁ 和 E₂ 表达缺失的检测

1.4.1 引物

根据 *p16* 基因组序列并参考文献^[6],在 E₁、E₂ 两侧各设计一对引物, Exon1: P1, 5'-GAAGAAAGAG-GAGGGGCTG-3'; P2, 5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-

3',扩增产物长度 340 bp。Exon2: P1, 5'-GGCTCTACA-CAAGCTTCCTT-3'; P2, 5'-TGAGCTTTGGAAGCTCTCAG-3',扩增产物长度 427bp。

实验以 β 肌动蛋白引物作为内对照,引物序列 β -actin: P1, 5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3'; P2, 5'-AGGGGCGGACTCGTCATACT-3',扩增产物长度 312 bp。上述引物均由上海生工生物公司合成。

1.4.2 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模板,扩增基因组中的 p16 基因 E₁、E₂ 和 β -actin。PCR 反应总体积为 20 μ L,各成分含量如下: H₂O(去离子) 12 μ L; 10 \times Buffer 2.0 μ L; P 1 (10 pmol), 1 μ L; P2(10 pmol), 1 μ L; dNTP (2.5 mmol/L), 1 μ L; Taq 酶, 0.5 μ L (2.5 U); 模板 DNA, 2.5 μ L。在 PE9600 DNA 扩增仪上进行如下循环: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 50 s; 58 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 35 个(石蜡标本 45 个)循环后, 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

1.4.3 PCR 结果检测

取 7 μ L 的 PCR 产物在 1.5% (g/v) 琼脂糖凝胶(加 EB 0.5 ng/mL)上电泳分析。存图待分析。对 PCR 扩增时 p16 基因阴性的标本,重复用 p16 引物再进行 PCR 验证,PCR 反应条件同上。

1.5 宫颈癌 p16 蛋白的表达

1.5.1 实验方法

本实验 p16 蛋白测定均采用石蜡包埋切片的免疫组化方法 S-P 法。实验中 p16 基因单克隆抗体, S-P 超敏试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,其他试剂和用具取自本院病理科,操作步骤见试剂盒说明。

1.5.2 光镜下判定结果

A: 按切片中细胞浆或细胞核显色有无,深浅记分。细胞核或浆无显色, 0 分; 胞浆或核显浅黄色, 1 分; 胞浆或核显棕黄色, 2 分。B: 按显色占切片的百分比评分, 未见显色, 0 分; 显色 \leq 30%, 1 分; 显色在 30% ~ 60%, 2 分; 显色 $>$ 60%, 3 分。每例切片积分为 A \times B。按积分高低分为“-”阴性; 积分 $<$ 2 为“+”(弱阳性); 积分 2 ~ 4 分为“++”(阳性); $>$ 4 分为“+++”(高表达)。以“++”、“+++”合计例数所占百分率为明显阳性率; “+ 或 -”合计例数所占百分率为表达下降或无表达。

1.6 统计学分析

卡方检验(χ^2)

2 结果

2.1 宫颈癌中 p16 基因甲基化状态的检测

10 例正常的宫颈组织及 60 例癌旁组织样本中均未检测到 p16 基因启动子区域甲基化(图 1)。60 例宫颈癌中检测到 13 例甲基化, 占 21.67% (13/60), 且与临床病理分级和病理类型无关。其中 I ~ II 期 6 例, 占 25.00% (6/24), III ~ IV 期 7 例, 占 19.44% (7/36), 两者无明显差异($P > 0.05$) (表 2)。

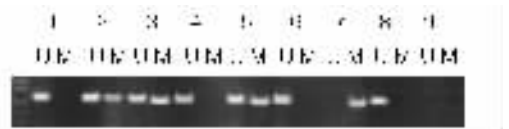


图 1 宫颈癌组织 p16 基因的 Msp 分析

U: 非甲基化扩增; M: 甲基化扩增; 1~6: 宫颈癌组织, 2, 3, 5: 显示存在甲基化; 7: 甲基化阳性对照, 为人类胎盘 DNA 在体外经 Sss I 甲基化酶处理后产生的; 8. 正常宫颈组织为甲基化阴性对照; 9. 水作对照; DNA 分子量标志 pBR32/Msp I。

Fig. 1 MSP of p16 gene in cervical carcinoma

The presence of a visible PCR product in lane U: unmethylated; M: methylated; Lanes 1~6: cervical carcinoma, 2, 3, 5 showed positive; Lane 7: Human placental DNA was treated in vitro with excess Sss I; methyltransferase was used as positive control; Lane 8: DNA from normal cervical tissue; Lane 9: water control. pBR32/Msp I as the molecular weight markers.

表 2 宫颈癌 p16 基因甲基化状态的意义

Table 2 Significance of methylation of p16 gene in cervical carcinoma

临床分期	例数	甲基化阳性例数	阳性率
Clinical stages	No.	No. of methylation	Percentage (%)
I ~ II	24	6	25.00
III ~ IV	36	7	19.44*

* 与 I ~ II 期比 $P > 0.05$ 。

* means $P > 0.05$ compared with the clinical stages I ~ II.

2.2 宫颈癌 p16 基因缺失

10 例正常宫颈及 60 例癌旁组织标本中均不存在 p16 基因外显子 E₁ 和 E₂ 的缺失。60 例宫颈癌中, E₁ 缺失率 6.67% (4/60); E₂ 缺失率 8.33% (5/60); 两者无同时缺失病例; 其中至少有一种缺失 (E₁ 或 E₂) 为 15.00% (9/60)。本研究发现 p16 基因缺失与宫颈癌不同病理类型有一定关系, 本组病例的鳞癌、腺癌及透明细胞癌的缺失率分别为 12.73%

(7/55)、33.33% (1/3) 和 50.00% (1/2)。进一步的分析还发现 *p16* 基因外显子 E_1 和 E_2 的缺失与临床病理分级相关, G_1 级无缺失 (0/8), 与 G_2 级 11.90% (5/42)、 G_3 级 40.00% (4/10) 级之间差异显著 ($P < 0.05$), 且存在甲基化 13 例标本中无 E_1 、 E_2 缺失。60 例宫颈癌组织经扩增 *p16* 基因外显子 1 和外显子 2, 以 β -actin 作内对照, 与临床病理类型及病理分级的关系见表 3、表 4 和图 2。

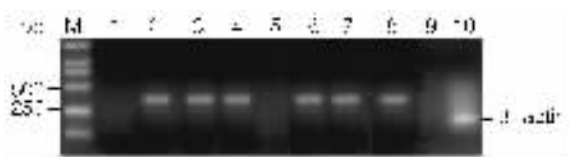


图 2 宫颈癌 *p16* 基因 E_1 的 PCR 产物电泳图

M: DL 2 000 分子量标记; 1, 5, 9 示缺失;
2~4, 6~8 示阳性; 10: 内对照。

Fig. 2 *p16* gene exon 1 of cervical carcinoma PCR analysis

M: DL 2 000 molecular marker; 1, 5, 9 showed deletion;
2~4, 6~8 showed positive; 10: β -actin.

表 3 宫颈癌 *p16* 基因缺失与临床病理类型相关性

Table 3 Relation of *p16* gene deletion and pathologic Types in cervical carcinoma

病理类型	例数	E_1 缺失	E_2 缺失
Pathologic type	No.	E_1 deletion	E_2 deletion
鳞癌 Squamous cell carcinoma	55	3	4
腺癌 Adenocarcinoma	3	1	0
透明细胞癌 Clear cell carcinoma	2	0	1

表 4 宫颈癌 *p16* 基因缺失与临床病理分级相关性

Table 4 Relation of *p16* gene deletion and pathologic grades in cervical carcinoma

病理分级	例数	E_1 缺失	E_2 缺失
Pathologic grade	No.	E_1 deletion	E_2 deletion
G_1	8	0	0*
G_2	42	2	3
G_3	10	2	2

* 分别与 G_2 和 G_3 比 $P < 0.05$ 。

* means $P < 0.05$ compared with G_2 and G_3 , respectively.

2.3 宫颈癌 *p16* 蛋白的表达

60 例宫颈癌 *p16* 蛋白表达呈明显阳性的阳性率为 48.33% (29/60) (+ + - + + +), *p16* 蛋白表达下降或无表达 (+ 或 -) 为 51.67% (31/60), 其中 I ~ II 期病例明显阳性为 79.17% (19/24), *p16* 蛋白表达下降或无表达为 20.83% (5/24); III ~ IV 期病例 27.78% (10/36) 为明显阳性, 72.22% (26/36)

表达下降或无表达。III ~ IV 宫颈癌病人 *p16* 表达下降或无表达率显著高于 I ~ II ($P < 0.05$) (表 5)。

表 5 *p16* 蛋白的表达与宫颈癌临床分期

Table 5 Expression of *p16* gene in cervical carcinoma with different clinical stages

临床分期 Clinical stages	例数 No.	<i>p16</i> 蛋白表达 Expression of <i>p16</i> protein			
		例数 No.		例数 No.	
		(+ + ~ + + +) %		(+ ~ -) %	
I ~ II	24	19	79.17	5	20.83
III ~ IV	36	10	27.78	26	72.22*

* 与 I ~ II 期相比较 $P < 0.05$ 。

* means $P > 0.05$ compared with the clinical stages I ~ II.

3 讨论

宫颈癌严重威胁着广大妇女的生命, 目前的一些分子生物学方法对其发生、发展、预后及转移的评估缺乏特异性指标。宫颈癌 *p16* 基因缺失、突变和蛋白表达的研究报道较多见^[6], 而关于其 *p16* 基因 5' 端启动子区域的 CpG 岛甲基化研究少有报道, 特别是采用甲基化特异性 PCR (MSP) 的方法研究宫颈癌国内未见报道。从基础研究和临床观察两方面综合分析其发病的报道也不多见。

本文选择了 60 例不同期别和病理类型子宫颈癌患者的肿瘤组织标本进行 *p16* 基因甲基化、*p16* 基因缺失及 *p16* 蛋白表达的研究, 结果表明 *p16* 基因失活在宫颈癌中多见, 且与病理分级密切相关。*p16* 基因甲基化在宫颈癌发生中起着一定作用。

Virmani 等^[7] 为了探讨异常甲基化在宫颈癌发生中的作用而进行了研究, 结果表明 *p16* 基因甲基化率大于 20%; 甲基化的发生独立于其他因素, 如: 乳头瘤病毒感染, 吸烟史或激素应用等。这项研究结论将可应用到妇女宫颈癌的筛查, 通过异常甲基化状态检测早期探知癌的发生和高发因素, 对宫颈癌早期诊断具有重大意义^[8,9]。

人类对 DNA 甲基化研究实验主要有两种: (1) 甲基化敏感的限制酶消化后, 采用 Southern 斑点杂交、PCR 或 RLGS (restriction landmark genomic scanning) 和 MCA (methylated CpG island amplification)。 (2) 亚硫酸氢盐修饰 DNA 后采用甲基化特异 PCR (methylation specific PCR, MSP)^[10]。

以往的 Southern 印迹法敏感度较低, 只有当甲

甲基化等位基因的比例达到百分之一以上时才能被检测出来。而 MSP 法可检测出比例为千分之一的甲基化等位片段,对 DNA 的量和纯度要求也较低,能用于少量的 DNA 或石蜡包埋组织 DNA 甲基化分析,给甲基化检测提供了许多方便^[11]。

本研究在国内率先在宫颈癌研究中应用 MSP 法,选取石蜡切片和新鲜手术两种样本研究 p16 基因 5'端启动子区域的 CpG 岛甲基化,可见 10 例正常的宫颈组织及 60 例癌旁组织样本中均未检测到 p16 基因启动子区域甲基化。60 例宫颈癌组织中存在 13 例甲基化,占 21.67% (13/60),其中 I~II 期 6 例,占 25.00% (6/24),III~IV 期 7 例,占 19.44% (7/36),两者无明显差异 ($P>0.05$),也提示了 p16 基因甲基化可能是宫颈癌的一个早期变化,与临床分期无明显关系。结果与以往采用甲基化敏感的限制酶消化后 Southern 斑点杂交等方法探测的相一致^[4]。

本文以 β -actin 为内对照,并对每份标本重复两次以上扩增,结果发现 60 例宫颈癌组织中 9 例发生 p16 基因缺失,缺失频率为 15.00% (9/60)。本研究发现 p16 基因缺失与宫颈癌不同病理类型有一定关系,本组病例的鳞癌、腺癌及透明细胞癌的缺失率分别为 12.73% (7/55)、33.33% (1/3) 和 50.00% (1/2),鳞癌的缺失率明显低于后两组。Kim 采用 PCR 方法检测了 57 例 HPV(+) 的原发宫颈癌和 3 个宫颈癌细胞株,结果发现没有 1 例发生 p16 基因的缺失和突变,这证实了作者的推测,即鳞癌的发生可能与人乳头瘤病毒的感染的关系更大。但由于本组病例数少,尤其腺癌和透明细胞癌仅 3 例,进一步的结论有待今后继续研究。本研究通过免疫组化法检测了 60 例宫颈癌组织 p16 蛋白的表达,结果表明 p16 蛋白的表达率与宫颈癌临床分期显著相关,III~IV 期病例组显著低于 I~II 期。

本研究的统计结果表明,60 例宫颈癌中 p16 基因甲基化率为 21.67% (13/60),13 例甲基化标本均不存在 p16 基因外显子的纯合缺失;p16 基因缺失率为 15.00% (9/60),9 例存在缺失标本均不存在甲基化;然而发生 p16 基因甲基化及缺失的标本均存在 p16 蛋白表达下降或无表达。60 例宫颈癌甲基化和 p16 基因缺失的总频率为 36.67%,p16 蛋白表达下降或无表达率为 51.67%,可见总频率低于 p16 蛋白表达异常率,因而可以判定还有其他因素(如突变等)影响蛋白表达。60 例宫颈癌标本有 31

例存在 p16 基因表达异常,其中甲基化和 p16 基因缺失占 70.97% (22/31),可见两者在 p16 基因失活中占重要地位,是引起 p16 基因失活的主要因素。分析 60 例宫颈癌病例,可见 p16 基因缺失主要发生在病理分级为 G₂、G₃ 个体(共 9 例:G₂ 5 例,G₃ 4 例),提示 p16 基因缺失与肿瘤恶性程度及分化有密切关系,这结果还提示 p16 基因参与了宫颈癌的发生。

由于 p16 基因作用于 CDK4 的特异性强,基因小,易于操作,因此逐渐成为人们进行基因治疗的靶基因之一。因此探讨 p16 基因在临床肿瘤中的改变情况,对进一步的基因治疗具有重要意义。

参 考 文 献 (References):

- [1] Nobori T, Miura K, Wu D T. Deletion of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1993, 368 ~ 753.
- [2] Herman J G, Merlu A, Mao L. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, 1995, 55: 4525~4530.
- [3] Bird A P. CpG-rich-island, and the function of DNA methylation. *Nature*, 1986, 321(15): 209~213.
- [4] Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest*, 2000, 105(4): 401~407.
- [5] ZHAO Ying-She, ZHANG Si-Zhong. Detection of methylation status of tumor suppressor gene p16 by methylation specific polymerase chain reaction. *Chin J Med Genet*, 1999, 16(5): 233~236.
赵迎社, 张思仲. 改进的甲基化特异性 PCR 法及在抑癌基因 p16 检测中的应用. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16(5): 233~236.
- [6] Wong Y F, Chung T K, Cheung T H. p16INK4A and p15INK4B alterations in primary gynecologic malignancy. *Gynecol Oncol*, 1997, 65: 319~324.
- [7] Virmani A K, Muller C, Rathi A. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(3): 584~589.
- [8] Dong S M, Kim H S, Rha S H. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 1982~1986.
- [9] Wang H, Ma H U. Expression and significance of p16 protein in cervical cancer. *Modern Gynecology and Obstetric Progress*, 1998, 7(1): 11~14.
- [10] Herman J G, Graff J R, Myohanen S. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821~9826.
- [11] Fan X, Inda M M, Tunnon T. Improvement of the methylation specific PCR technical conditions for the detection of p16 promoter hypermethylation in small amounts of tumor DNA. *Oncol Rep*, 2002, 9(1): 181~183.