

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.30.002

沉默 hnRNP A2/B1 抑制人宫颈癌 Hela 细胞中 cyclin D1/E 表达的研究^{*}

廖铭心,刘 瑶,蔡 瑾,方 文[△]
(贵州医科大学医学检验学院临床生化教研室,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 探讨沉默核内不均一核糖核蛋白 A2/B1(hnRNP A2/B1)基因后对人宫颈癌 Hela 细胞中细胞周期蛋白(cyclin)D1 及 cyclin E 的表达及裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 运用慢病毒转染沉默 Hela 细胞中的 hnRNP A2/B1 基因并用成功沉默后的细胞建立体外细胞及体内移植瘤模型。用 Western blot 检测细胞及移植瘤中的 cyclin D1/E 的表达情况,四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测细胞的增殖能力,免疫组织化学分析各组移植瘤组织中增殖相关蛋白增殖细胞抗原(PCNA)及 Ki-67 的表达水平并用 HE 染色分析组织的病理形态。**结果** 沉默 hnRNP A2/B1 基因后 Hela 细胞中 cyclin D1/E 表达降低,裸鼠移植瘤 PCNA 及 Ki-67 相较未沉默组表达降低,裸鼠移植瘤的生长明显受到抑制,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 沉默 hnRNP A2/B1 基因后能降低宫颈癌 Hela 细胞中 cyclin D1 及 cyclin E 的表达,抑制肿瘤细胞增殖及生长。

[关键词] 宫颈肿瘤;核糖核蛋白类,核不均一;细胞周期蛋白 D1;细胞周期蛋白 E;细胞增殖
[中图法分类号] R733.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)30-3849-05

Silencing hnRNP A2/B1 inhibits cell proliferation and cyclin D1/E in cervical cancer Hela cells^{*}
LIAO Mingxin, LIU Yao, CAI Tong, FANG Wen[△]

(Department of Clinical Biochemistry, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To reveal the effect of silencing hnRNP A2/B1 on the expression of cyclin D1 / E in cervical cancer Hela cells and the growth of nude mice xenograft tumor. **Methods** hnRNP A2/B1 knock-down in Hela cells was performed by shRNA transfection and then the expression of hnRNP A2/B1 was detected by Western blot and Quantitative real-time PCR. Cell proliferation was determined by MTT assay, Western blot was used to reveal the expression of cyclin D1/E both in vitro and vivo. The xenograft tumor tissue samples were analyzed for the expression of PCNA and Ki-67 by immunohistochemistry and the cell morphology was evaluated by hematoxylin eosin (HE). **Results** hnRNP A2/B1 knockdown significantly induced the suppression of cell proliferation, the expression of cyclin D1/E in shRNA group were significantly down-regulated compared with the control and NC group both in vitro and vivo. In addition, the growth of nude mice xenograft tumor was significantly reduced by hnRNP A2/B1 knockdown. All differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing hnRNP A2/B1 can reduce the expression of cyclin D1/E in cervical cancer Hela cells and inhibit the proliferation and growth of tumor cells.

[Key words] uterine cervical neoplasms; heterogeneous-nuclear ribonucleoproteins; cyclin D1; cyclin E; cell proliferation

宫颈癌是目前威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,尤其对于发展中国家来说其发病率更是居高不下^[1]。据中国癌症中心发布的数据显示我国宫颈癌的发病率和病死率分别为 10.4/10⁵ 和 2.59/10⁵^[2]。在寻求改善传统治疗方案的同时探索在基因水平上新的肿瘤抑制方法受到人们越来越多的关注。核内不均一核糖核蛋白 A2/B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, hnRNP A2/B1) 是 hnRNPs 家族中的一员,与 mRNA 的剪接、转运及调控细胞生

长和多种肿瘤的发生(如胃癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤等)有着密切的联系^[3-6]。本课题组前期用洛铂作用于宫颈癌细胞后也发现 hnRNP A2/B1 表达下调并有细胞周期阻滞和抑制增殖的现象^[7]。而细胞周期蛋白(cyclin)D1 与 cyclin E 联合可促进细胞通过 G₁ 期的限制点, cyclin D1、cyclin E 在调控细胞周期进程中起到重要作用^[8],同时 JOHN 等^[9]和 BUTT 等^[10]总结发现 cyclin D1 和 cyclin E 在多种肿瘤中表达都上调进而影响肿瘤的发展。本课题组前期已通

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(2015-81560481);贵州省科技厅与贵州医科大学联合基金(2015-7410)。 作者简介:廖铭心(1994—),硕士,主要从事基因及蛋白质组学研究。 [△] 通信作者, E-mail:fangwen@gmc.edu.cn。

过慢病毒介导沉默宫颈癌 Hela 细胞中的 hnRNP A2/B1 基因表达^[11-12],本研究拟进一步探讨 hnRNP A2/B1 对细胞 cyclin D1/E 表达水平的影响并通过裸鼠移植瘤模型观察沉默 hnRNP A2/B1 基因后对肿瘤生长情况的影响,阐明 hnRNP A2/B1 对宫颈癌发展的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及主要试剂 4~6 周 BALB/c 雌性裸鼠共 18 只,购自贵州医科大学实验动物中心。四甲基偶氮唑蓝(MTT)相关试剂 RIPA 裂解液、BCA 试剂盒购自碧云天生物技术公司;SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 Biosystems 公司;Trizol、逆转录试剂盒购自天根生物科技有限公司;兔抗 hnRNP A2/B1 抗体购自美国 Invitrogen 公司,兔抗 cyclin D1 和兔抗 cyclin E 抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗 β -actin、抗增殖细胞核抗原(PCNA)及兔抗 Ki-67 抗体购自博奥森生物公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RPMI-1640 培养液购自美国 Hyclone 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒购自万类生物公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒和聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 Allegra 高速台式低温离心机购自美国 Beckman 公司;Bio-rad680 全波长酶标仪、Western blot 垂直电泳槽购自美国 Bio-rad 公司;细胞培养箱购自日本三洋电机有限公司;Nikon-TE2000-U 倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒转染沉默 hnRNP A2/B1 慢病毒介导 shRNA 转染沉默宫颈癌 Hela 细胞株步骤详见参考文献^[11-12]。

1.2.2 细胞培养 人宫颈癌 Hela 细胞株购自中国科学院细胞库。将未沉默细胞株和沉默后的细胞株共分 3 组:正常 Hela 细胞组、阴性沉默对照组(Hela-NC 组)、阳性沉默实验组(Hela-shRNA 组)。各组细胞分别用含有 10% 的胎牛血清、1% 青霉素-链霉素和 1% L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液在 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,每 2~3 天换 1 次培养液。

1.2.3 real-time PCR 验证沉默效率 取上述 3 组处于对数生长期的细胞,用 Trizol 试剂盒提取总 RNA 并测定浓度,根据反转录试剂盒步骤将 RNA 反转录成 cDNA,每个样品 cDNA 模板设立 3 个平行管。采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR 反应扩增目的片段。PCR 引物如下: β -actin 正向引物:5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3',反向引物:5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG

CCA A -3'; hnRNP A2/B1 正向引物:5'-GAT GGC AGA GAA CGG TGT GAA G-3',反向引物:5'-AGG CAT AGG TAT TGG CAA CTG C-3'。PCR 的反应条件为:95 °C,10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 次循环。根据 PCR 的扩增曲线和溶解曲线分析产物的特异性,以 β -actin 为内参,最终结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 统计各组基因表达水平。

1.2.4 Western blot 于冰上用含有 1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液裂解各组细胞及移植瘤组织并在 4 °C 离心机上以 12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清蛋白液于 -80 °C 保存备用。BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳分离目的蛋白并用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭液孵育 2 h。然后 4 °C 过夜孵育兔抗 β -actin (1 : 6 000)、兔抗 cyclin D1 (1 : 500)、兔抗 cyclin E (1 : 500)、兔抗 hnRNPA2/B1 (1 : 500) 一抗,之后用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,将 PVDF 膜在山羊抗兔二抗 (1 : 90 000) 中室温孵育 1 h。ECL 发光液显影并曝光。用 Image J 软件分析各组的灰度值。

1.2.5 MTT 检测细胞增殖 用 0.25% 的胰蛋白酶将 Hela 组、Hela-NC 组及 Hela-shRNA 组的细胞消化下来并稀释至 5×10^4 /mL,以每孔 200 μ L 加入 96 孔板中并在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 12、24、48 h。然后每孔加入含 10 μ L MTT 后继续培养 4 h,之后去除上清液并每孔加入 150 μ L 的二甲基亚砜(DMSO)于酶标仪上充分震荡 10 min 后在 490 nm 处检测吸光度(A)值。

1.2.6 构建裸鼠移植瘤模型 于贵州医科大学实验动物中心购入 18 只 4 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠并用清洁级饲料饲养于无特定病原体(SPF)级动物房中。实验对应细胞分 3 组,每组 6 只裸鼠。每只裸鼠于右背靠颈部皮下接种 200 μ L 悬浮细胞液 (2×10^6 /mL 细胞悬浮于 200 μ L PBS 中)。之后每 3 天用游标卡尺测量肿瘤体积大小并根据文献中发表的公式计算体积^[13]。肿瘤生长 30 d 后用 10% 水合氯醛麻醉并断颈处死裸鼠收集肿瘤组织。

1.2.7 免疫组织化学 移植瘤组织取出后用 4% 的中性甲醛固定 24 h,之后脱水、石蜡包埋并制成 4 μ m 厚的切片粘贴于载玻片上。之后二甲苯化蜡,梯度乙醇脱蜡至水,柠檬酸盐缓冲液高压修复抗原 3 min。0.3% H₂O₂ 阻断非特异性抗原 30 min,PBST 洗 3 次后用 10% 的血清封闭液封闭 20 min。4 °C 过夜孵育兔抗 PCNA (1 : 100) 和兔抗 Ki-67 (1 : 100) 一抗,并以 PBS 代替一抗处理切片作为阴性对照。一抗孵育完毕并复温 40 min 后在 37 °C 水浴箱中孵育二抗 20 min,之后 DAB 显色,苏木素复染并逆行脱水后用中性树脂封片。棕色区域视为阳性区域,Image-Pro Plus6.0 软件分析各组组织中棕色区域的 IOD 值。

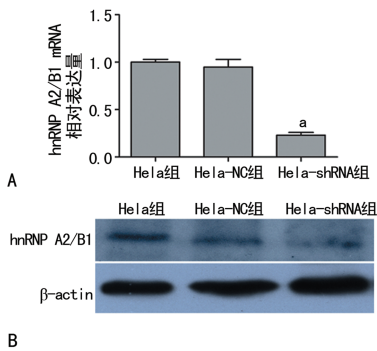
1.2.8 苏木素-伊红(HE)染色 前期组织处理与免

疫组织化学步骤类似。4 μm 厚的切片经脱蜡和再水合后用苏木素处理 5 min,1%盐酸乙醇分化 1 s,伊红染液处理 3 min,逆行脱水后用中性树脂封片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

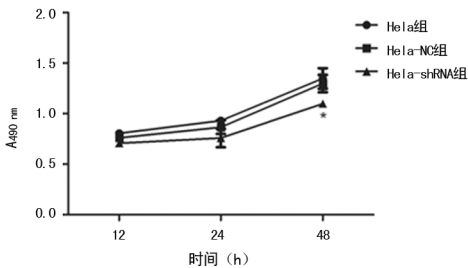
2.1 各组宫颈癌 Hela 细胞中 hnRNP A2/B1 基因表达情况比较 由慢病毒介导 shRNA 沉默 hnRNP A2/B1 基因的 Hela-shRNA 组与 Hela 组和 Hela-NC 组比较,hnRNA A2/B1 表达降低($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示 Hela-shRNA 组中的 hnRNP A2/B1 抑制效率达到 $(74.79 \pm 3.38)\%$,Western blot 结果显示 Hela-shRNA 组中 hnRNP A2/B1 蛋白的表达量相较于其他两组明显降低($P < 0.05$),见图 1。



A:hnRNP A2/B1 mRNA;B:hnRNP A2/B1 蛋白;a: $P < 0.05$,与 Hela 组及 Hela-NC 组比较

图 1 慢病毒介导 shRNA 沉默 hnRNP A2/B1 基因

2.2 沉默 hnRNP A2/B1 对宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响 对 Hela 组、Hela-NC 组及 Hela-shRNA 组分别检测各自在 12、24、48 h 时间点的增殖情况。Hela-shRNA 组在 48 h 时间点的增殖情况较 Hela 组及 Hela-NC 组明显降低 ($P < 0.05$),见图 2。



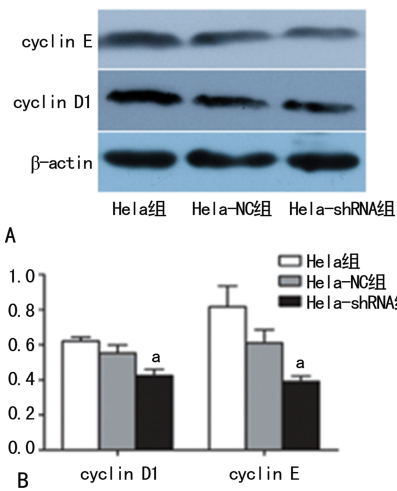
a: $P < 0.05$,与 Hela 组及 Hela-NC 组比较

图 2 沉默 hnRNP A2/B1 后各组的增殖水平比较

2.3 沉默 hnRNP A2/B1 后对体外细胞 cyclin D1 及 cyclinE 表达的影响 Western blot 结果显示 Hela-shRNA 组的 cyclin D1 及 cyclin E 蛋白水平相较于 Hela 组及 Hela-NC 组明显降低($P < 0.05$),Hela 组与 Hela-NC 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

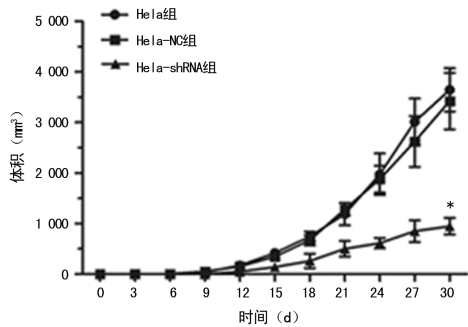
2.4 沉默 hnRNP A2/B1 后对宫颈癌 Hela 细胞移植瘤的影响 对于接种 Hela、Hela-NC 及 Hela-shRNA

的 3 组裸鼠,在实验期间各组行为都未见异常表现,饮食正常,各组存活率为 100%。Hela-shRNA 组的肿瘤生长相较于另外两组明显受到抑制,肿瘤体积明显减小 ($P < 0.05$),见图 4。免疫组织化学结果显示 Hela-shRNA 组中的增殖相关抗原 PCNA 及 Ki-67 表达较其余两组均明显降低 ($P < 0.05$),见图 5、6,HE 染色见各组切片中肿瘤细胞的病理形态呈现出细胞核深染,大小不一,核质比例失调,部分细胞形态不规则的现象,但各组之间的形态并无明显差异,见图 6。另外移植瘤组织中的 Western blot 结果同样显示 Hela-shRNA 组的 cyclin D1 及 cyclin E 较其他两组明显降低($P < 0.05$),见图 7。



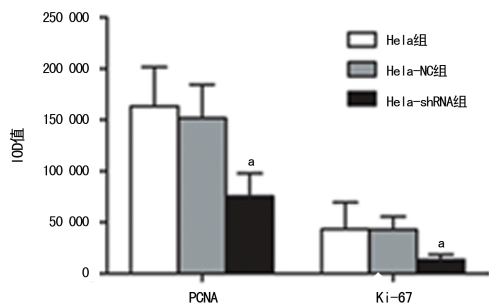
A:Western blot;B:定量分析图;a: $P < 0.05$,与 Hela 组及 Hela-NC 组比较

图 3 体外细胞中各组 cyclin D1 及 cyclin E 蛋白表达变化



a: $P < 0.05$,与 Hela 组及 Hela-NC 组比较

图 4 裸鼠移植瘤的生长情况



a: $P < 0.05$,与 Hela 组及 Hela-NC 组比较

图 5 免疫组织化学定量分析

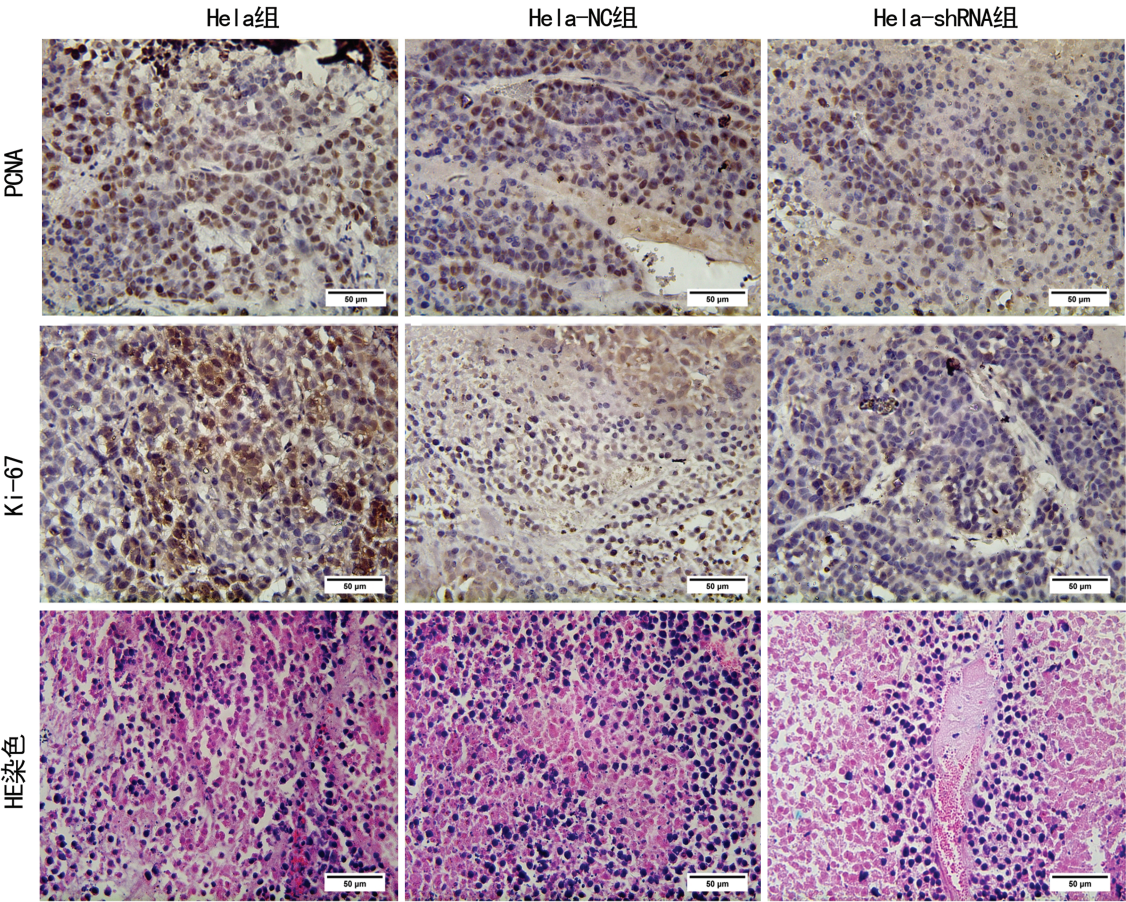
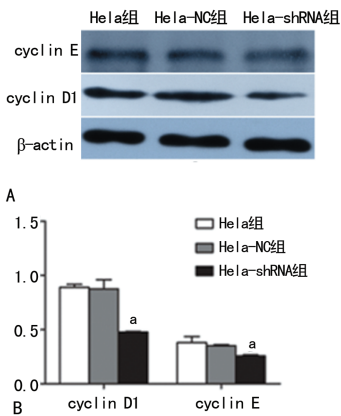


图 6 免疫组织化学及 HE 染色(×400)



A: Western blot; B: 定量分析图; a: $P < 0.05$, 与 HeLa 组和 HeLa-NC 组比较

图 7 移植瘤组织中 cyclin D1 及 cyclin E 蛋白表达变化

3 讨 论

由于宫颈癌在女性肿瘤的高发病率及恶性程度, 目前许多学者都致力于寻找与宫颈癌相关的癌基因。据文献报道, 目前宫颈癌的发生发展与诸多基因都有关联, 而 hnRNP A2/B1 基因与宫颈癌的联系鲜有报道, 因此本研究希望在前期研究的基础上进一步探索 hnRNP A2/B1 对调控宫颈癌细胞中周期相关蛋白的表达及其对细胞增殖和肿瘤生长的影响。

hnRNP A2/B1 是一组由 hnRNP A2 和 hnRNP B1 蛋白质以适当比例结合涉及细胞转录和蛋白质翻

译的 mRNA 结合蛋白^[3-4]。hnRNP A2/B1 不受调控地在肿瘤组织中的高表达是促进肿瘤形成的原因之一^[6], 甚至有研究报道将 hnRNP A2/B1 定义为一种原癌基因, 尤其是在非小细胞肺癌中, hnRNP A2/B1 已作为其肿瘤生物标记物及判断预后的指标^[14]。LI 等^[15]研究发现 hnRNP A2/B1 及其他部分 hnRNPs 家族的基因参与介导人乳头瘤病毒 16 型(HPV-16)感染宫颈上皮的过程, 同时也发现 hnRNP A2/B1 在宫颈癌中也是呈高表达状态。本研究结果显示沉默宫颈癌细胞中 hnRNP A2/B1 后其增殖及肿瘤生长等方面明显受到抑制, 这也印证了部分学者的结论, 说明 hnRNP A2/B1 确实参与了宫颈癌的发生发展过程。

从体内及体外实验结果均显示 cyclin D1 及 cyclin E 在 hnRNP A2/B1 基因沉默后均表达下调, 而这两种蛋白对于调控细胞周期进程至关重要^[8], 这说明 hnRNP A2/B1 有可能通过 cyclin D1 及 cyclin E 来调控宫颈癌中的细胞周期变化。赵向寨等^[16]发现通过沉默 hnRNPs 家族中的 hnRNP H 基因能够下调子宫内腺癌 Ishikawa 细胞中的 cyclin D1、CDK4 的表达。而据 CHOI 等^[17]报道, hnRNP A2/B1 在维持人胚胎干细胞的自我更新及多功能性上具有重要意义, 并通过沉默 hnRNP A2/B1 后也发现胚胎干细胞中的 cyclin D1 及 cyclin E 及 cyclin B1 表达下调, 细胞周

期阻滞于 G₁ 期。同时也有报道称在肺腺癌中检测到 hnRNP B1 升高而 cyclin D1 减少,协同二者的结果对肺腺癌及不典型增生的诊断具有重要意义^[18]。而上述结论与本研究结论相一致,由此可以推断 cyclin D1 及 cyclin E 在 hnRNP A2/B1 调控宫颈癌细胞周期进程中十分重要。细胞核增殖相关抗原 Ki-67 及 PCNA 均为存在于细胞增殖期的蛋白质,是增殖细胞标记物之一,常被用于许多肿瘤与非肿瘤组织通过免疫组织化学分析病理特性的标记物^[19],对于这两种蛋白质的检测有助于了解肿瘤细胞的增殖活性。本研究免疫组织化学结果显示沉默 hnRNP A2/B1 后 PCNA 和 Ki-67 的表达均显著减低,同时结合体外 MTT 细胞增殖实验,说明 hnRNP A2/B1 能够调控宫颈癌细胞的增殖活性。

综上所述,本次通过沉默 hnRNP A2/B1 基因后对宫颈癌细胞体外及体内实验的研究。结果显示, hnRNP A2/B1 在宫颈癌细胞中可能参与调控细胞增殖,并通过 cyclin D1 及 cyclin E 调控细胞周期进程,同时促进宫颈癌的生长。所以 hnRNP A2/B1 可能是治疗宫颈癌的一个基因靶点,这将为未来对治疗宫颈癌进一步研究提供一个实验依据。

参考文献

- [1] LUO C L, LIU Y, WANG P, et al. The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via JAK2 suppression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 595-605.
- [2] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S W, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(1): 48-58.
- [3] CHEN Z, CAI L, ZHU J, et al. Fyn requires HnRNPA2/B1 and Sam68 to synergistically regulate apoptosis in pancreatic cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(10): 1419-1426.
- [4] HE Y, BROWN M A, ROTHNAGEL J A, et al. Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(14): 3173-3183.
- [5] TAULER J, ZUDAIRE E, LIU H. hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7137-7147.
- [6] DENG J, CHEN S, WANG F, et al. Effects of hnRNP A2/B1 knockdown on inhibition of glioblastoma cell invasion, growth and survival [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1132-1144.
- [7] LI X, RAN L, FANG W, et al. Lobaplatin arrests cell cycle progression, induces apoptosis and alters the proteome in human cervical cancer cell Line CaSki[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(3): 291-297.

- [8] GAO N, FLYNN D C, ZHANG Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/P70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(2): 281-291.
- [9] JOHN R R, MALATHI N, RAVINDRAN C, et al. Mini review: multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior[J]. *Indian J Dent Res*, 2017, 28(2): 187-192.
- [10] BUTT A J, MCNEIL C M, MUSGROVE E A, et al. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(Suppl 1): S47-S59.
- [11] 刘瑶, 石祥, 方文. 人 hnRNP A2/B1 shRNA 慢病毒载体的构建[J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41(6): 630-634.
- [12] 刘瑶, 石祥, 方文. HnRNP A2/B1 shRNA 慢病毒载体感染 Hela 细胞的稳定株筛选 [J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41(6): 625-629.
- [13] REN CM, REN TT, GUO W, et al. Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G₁/S arrest in Ewing's sarcoma through the PI3K/Akt pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 44.
- [14] QU X H, LIU J L, ZHONG X W, et al. Insights into the roles of hnRNP A2/B1 and AXL in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1677-1685.
- [15] LI X, JOHANSSON C, GLAHDER J, et al. Suppression of HPV-16 late L1 5'-splice site SD3632 by binding of hnRNP D proteins and hnRNP A2/B1 to upstream AUAGUA RNA motifs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22): 10488-10508.
- [16] 赵向寨, 卢庆玲, 郭影, 等. 敲低 hnRNP H 基因对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖和细胞周期的影响及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(13): 3537-3539.
- [17] CHOI H S, LEE H M, JANG Y J, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2/B1 regulates the Self-Renewal and pluripotency of human embryonic stem cells via the control of the G1/S transition[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2647-2658.
- [18] TOMINAGA M, SUEOKA N, IRIE K, et al. Detection and discrimination of preneoplastic and early stages of lung adenocarcinoma using hnRNP B1 combined with the cell cycle-related markers p16, cyclin D1, and Ki-67[J]. *Lung Cancer*, 2003, 40(1): 45-53.
- [19] BOLOGNA-MOLINA R, MOSQUEDA-TAYLOR A A, MORI-ESTEVEZ A D, et al. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors[J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2013, 18(2): E174-179.