

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.05.009

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221020.1623.009.html>(2022-10-20)

RASAL2 基因高甲基化与宫颈鳞癌患者放化疗敏感性的研究*

刘金辉¹,方亚妮¹,刘孜²,李翡^{3△}

(1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712046; 2. 西安交通大学第一附属医院肿瘤放疗科, 西安 710061; 3. 陕西中医药大学妇科教研室, 陕西咸阳 712046)

[摘要] **目的** 探讨 RASAL2 基因甲基化水平与宫颈鳞癌患者放化疗敏感性的关系。**方法** 收集 2017 年 9 月至 2019 年 9 月在西安交通大学第一附属医院接受同步放化疗(CCRT)治疗 60 例宫颈鳞癌患者肿瘤组织标本和 10 例正常宫颈组织。患者依据临床应答情况进行分类,其中完全缓解(CR)患者归为敏感组,部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)患者归为耐受组。基于定量 PCR 和 Western blot 分别检测 RASAL2 基因启动子区甲基化状态和蛋白表达水平,并分析 RASAL2 基因甲基化和表达水平与患者临床数据的关联性。**结果** 与正常组织比较,宫颈癌组织 RASAL2 基因甲基化水平明显升高(0.317 ± 0.029 vs. 0.174 ± 0.078 , $P=0.020$),耐受组高于敏感组(0.400 ± 0.040 vs. 0.244 ± 0.036 , $P=0.003$)。敏感组(0.184 ± 0.014)和耐受组(0.131 ± 0.010)RASAL2 基因表达水平均低于正常组(0.307 ± 0.048),差异有统计学意义($P < 0.05$)。宫颈癌组织 RASAL2 基因表达水平与 RASAL2 甲基化程度呈负相关($r = -0.665$)。RASAL2 基因甲基化水平与患者肿瘤分化程度存在关联性,且高甲基化可作为预测患者 CCRT 不良应答的标志物。**结论** RASAL2 基因高甲基化状态与宫颈鳞癌患者的临床应答密切相关。

[关键词] 宫颈癌;RASAL2 基因;高甲基化;放化疗;应答**[中图分类号]** R737.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)05-0681-05

Hypermethylation of RASAL2 and tumor response to chemoradiotherapy in patients with cervical squamous cell carcinoma *

LIU Jinhui¹, FANG Yani¹, LIU Zi², LI Fei^{3△}

(1. Department of medical technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; 2. Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 3. Department of Gynecology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

[Abstract] **Objective** To elucidate the relationship between the methylation level of RASAL2 gene and tumor response to chemo-radiotherapy in cervical squamous cell carcinoma. **Methods** Specimens from 60 patients with squamous cervical cancer treated with concurrent chemoradiation (CCRT) and 10 normal cervical tissues from September 2017 to September 2019 at the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University were collected. Patients were classified according to the clinical response, with patients in complete remission (CR) classified as the sensitive group, patients in partial remission (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD) classified as the resistant group. The methylation status of the RASAL2 gene promoter region and protein expression levels were detected based on quantitative PCR and Western blot, respectively, and the correlation between methylation and expression levels of RASAL2 and clinicopathological parameters was assessed. **Results** High methylation of RASAL2 was observed in tumor samples compared to normal cervical samples (0.317 ± 0.029 vs. 0.174 ± 0.078 , $P=0.020$), and higher methylation level was observed preferentially in chemoradiotherapy resistant samples compared to those chemoradiotherapy sensitive ones (0.400 ± 0.040 vs. 0.244 ± 0.036 , $P=0.003$). The expression levels of RASAL2 in the sensitive group (0.184 ± 0.014) and the resistant group (0.131 ± 0.010) were lower than those in the normal group (0.307 ± 0.048),

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2022JQ-966);陕西省卫生健康委员会卫生健康科研项目(2022E028)。作者简介:刘金辉(1987-),博士,讲师,主要从事宫颈鳞癌临床分子标志物筛选和鉴定研究。△ 通信作者, E-mail:2071021@sntcm.edu.cn。

with statistically significant differences ($P < 0.05$). The expression level of RASAL2 in cervical cancer tissues was negatively correlated with the methylation status of RASAL2 ($r = -0.665$). The methylation status of RASAL2 was associated with histologic grade and hypermethylation of RASAL2 retained an independent factor in predicting adverse response to chemoradiotherapy. **Conclusion** The hypermethylation of RASAL2 in cervical carcinoma is closely associated with clinical response in patients.

[Key words] cervical carcinoma; RASAL2 gene; hypermethylation; chemoradiotherapy; response

宫颈癌是全球范围常见的女性恶性肿瘤之一,按照病理类型主要分为鳞状细胞癌和腺细胞癌两种,前者占 80% 以上^[1-2]。临床通常将 I B2~IV A 期的宫颈癌统称为局部晚期宫颈癌 (locally advanced cervical cancer, LACC)。目前,顺铂联合放疗的同步放化疗 (concurrent chemo-radiotherapy, CCRT) 是 LACC 患者的主要治疗手段^[3]。虽然 CCRT 明显改善了患者的总体生存情况,并降低了肿瘤复发率^[4],但仍有部分患者无法从治疗中受益,急需进一步阐明其分子机制^[5]。

类 RAS 基因激活物 2 (ras protein activator like 2, RASAL2) 基因编码的产物为一种 RAS-GTPase 激活蛋白,催化 RAS-GTP 水解为 RAS-GDP,进而抑制 Ras 基因活性^[6]。研究显示, RASAL2 基因在 Luminal B 型乳腺癌发挥抑癌基因作用^[7-8],但在部分三阴性乳腺癌中则是扮演着致癌基因的角色^[9]。此外, RASAL2 基因启动子区在肝细胞癌组织中普遍呈超甲基化状态,而下调该基因可明显抑制肝癌细胞生长和侵袭^[10]。这些有争议的结果表明, RASAL2 基因在恶性肿瘤的发生、发展中扮演着不同的角色^[11]。RAS 基因突变存在于多种类型恶性肿瘤中,但在宫颈癌鳞癌中发生率很低^[12]。然而也有研究证实, K-RAS 及 H-RAS 基因在宫颈癌组织中的表达水平明显高于正常宫颈组织,且参与了肿瘤的发生和转移^[13],表明 RAS 基因在宫颈癌中可能依赖其他机制激活,而非依赖于获得性突变。因此,探索 RASAL2 基因在宫颈癌中的状态,有助于进一步阐明宫颈癌发生发展的机制,并为其临床治疗提供潜在的靶点。

本文研究了 RASAL2 基因在宫颈癌组织及正常宫颈组织中的甲基化和表达水平,发现在宫颈癌组织中, RASAL2 基因呈现为异常高甲基化和表达下调状态,同时, RASAL2 基因甲基化状态与肿瘤细胞分化程度及患者对 CCRT 的应答呈相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2017 年 9 月至 2019 年 9 月西安交通大学第一附属医院接受 CCRT 治疗的 60 例宫颈癌鳞癌患者标

本。纳入标准: (1) 经组织病理学确诊为宫颈鳞癌; (2) 保存有足够的活检组织标本; (3) 随访时间 ≥ 1 年。排除标准: (1) 活检取标本前已接受化疗、放疗等治疗; (2) 同时患有 ≥ 2 种恶性肿瘤。收集同期就诊的 10 例卵巢癌患者的正常宫颈组织,经组织病理学检测确定未发生病变。本研究经西安交通大学第一附属医院伦理委员会审批通过,患者均签署知情通知书。

1.2 方法

1.2.1 分组

60 例宫颈鳞癌患者均接受 CCRT,其中放疗包括外放射治疗 (external beam radiation therapy, EBRT) 和随后进行的近距离局部高剂量腔内放射治疗 (high-dose rate intracavitary brachytherapy, HDR-ICBT)。EBRT 实施于整个盆腔,总照射剂量为 50 Gy,每周进行 5 次,每次 2 Gy,共 25~28 次。HDR-ICBT 照射剂量在 25 Gy 左右,每周进行 2 次,共 4~5 次。进行 EBRT 的患者同时接受顺铂治疗,剂量为 25 mg/m²,静脉滴注给药,每周 1 次,化疗 5 个周期。患者治疗前后均进行妇科检查, B 超或 CT 检测,治疗周期结束后根据实体瘤治疗应答评价标准 (response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)^[14] 评估临床应答情况,分为完全缓解 (complete response, CR)、部分缓解 (partial response, PR)、疾病稳定 (stable disease, SD) 和疾病进展 (progressive disease, PD),其中 CR 患者归为敏感组, PR、SD 和 PD 患者归为耐受组。

1.2.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 QIAmp DNA mini 试剂盒和重亚硫酸盐处理试剂盒 EpiTect Bisulfite Kit 购自美国 Qiagen 公司,甲基化和表达引物购自上海生工生物工程有限公司, ResoLight 染料购自瑞士 Roche 公司, HiTaq HS 聚合酶购自深圳菲鹏生物科技有限公司,组织蛋白质裂解液 (C500028) 购自上海生工生物工程有限公司,兔抗人 RASAL2 抗体 (ab121578) 购自英国 Abcam 公司。

1.2.3 DNA 提取和重亚硫酸盐处理

采用 QIAmp DNA mini 试剂盒提取和纯化 DNA,实验步骤按说明书进行,标本统一洗脱体积为 40 μ L。DNA 经 NanoDrop2000 定量后, Tris-乙二胺

四乙酸(EDTA)缓冲液统一稀释至 100 ng/ μ L。进行甲基化特异性定量检测(quantitative methylation-specific PCR, qMSP)反应前对基因组 DNA 进行重亚硫酸盐处理。重亚硫酸盐可使未发生甲基化的 C 脱氨形成 U,而对发生甲基化的 C 不起作用。因此,针对 CpG 设计的甲基化特异性引物,相应的碱基序列仍为 C。本研究采用 EpiTect Bisulfite 试剂盒对待测标本 DNA 进行重亚硫酸盐处理,各标本的 DNA 转化起始量均为 1 μ g。

1.2.4 qMSP

qMSP 通过在基础 PCR 反应体系中加入双链核酸染料实现。采用相对定量方式分析 RASAL2 基因甲基化程度,选取胶原 II α 1(collagen type II Alpha 1, COL2A1)作为内参基因,其扩增引物针对该基因非 CpG 位点序列设计。qMSP 过程采用 25 μ L 反应体系,每个反应体系中加入 0.25 μ L ResoLight 染料,0.5 U HiTaq HS 聚合酶,引物 250 nmol/L 及 20 ng 重亚硫酸氢盐处理过的 DNA。所有 qMSP 反应均在 ABI ViiATM7 实时 PCR 平台上进行。反应程序:95 $^{\circ}$ C 变性 10 min;随后运行 40 个循环扩增程序;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, T_m 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s。反应完成后,根据 ViiATM7 软件给出的 Ct 值对 RASAL2 基因进行甲基化相对定量分析。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 RASAL2 基因相对甲基化率,其中 ΔCt 指同一标本 RASAL2 基因 Ct 与内参基因 Ct 的差值。如果样品内部控制反应失败,则弃用该标本数据。

1.2.5 蛋白提取和定量

提取标本总蛋白,使用 NanoDrop2000 进行定量。蛋白标本上样量为 50 μ g,使用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行电泳;转膜后使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 RASAL2 一抗(1:500)和 GAPDH(1:2000)一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后使用二抗(1:3000)于室温孵育 4 h。基于 Syngene 化学发光成像系统拍照并依据 Image J 进行灰度分析,进行 RASAL2 蛋白定量。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism7.0 和 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床信息

60 例患者均可评价疗效,其中敏感组(CR)32 例、耐受组(PR 21 例、PD 7 例)28 例,两组年龄、肿瘤

大小、病理类型、国际妇产科学会(Federation International of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期(2009 年标准)等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

表 1 两组一般资料比较[n(%)]

项目	耐受组 (n=28)	敏感组 (n=32)	χ^2	P
年龄			0.350	0.554
≤ 55 岁	17(60.7)	17(53.1)		
> 55 岁	11(39.3)	15(46.9)		
肿瘤大小			0.006	0.941
≤ 4 cm	19(67.9)	22(68.8)		
> 4 cm	9(32.1)	10(31.2)		
组织学分级			0.179	0.673
中高分化	16(57.1)	20(62.5)		
低分化	12(42.9)	12(37.5)		
淋巴结转移			0.122	0.726
N0	11(39.3)	14(43.8)		
N1	17(60.7)	18(56.2)		
FIGO 分期			0.234	0.628
II 期	14(50.0)	14(43.8)		
III 期	14(50.0)	18(56.2)		
HPV 感染情况			0.009	0.923
阳性	27(96.4)	31(96.9)		
阴性	1(3.6)	1(3.1)		

2.2 宫颈癌组织及正常宫颈组织 RASAL2 基因甲基化状态

qMSP 结果显示,宫颈癌组织 RASAL2 基因甲基化水平较正常组织明显升高(0.317 ± 0.029 vs. 0.174 ± 0.078 , $P = 0.020$),耐受组高于敏感组(0.400 ± 0.040 vs. 0.244 ± 0.036 , $P = 0.003$),见图 1。

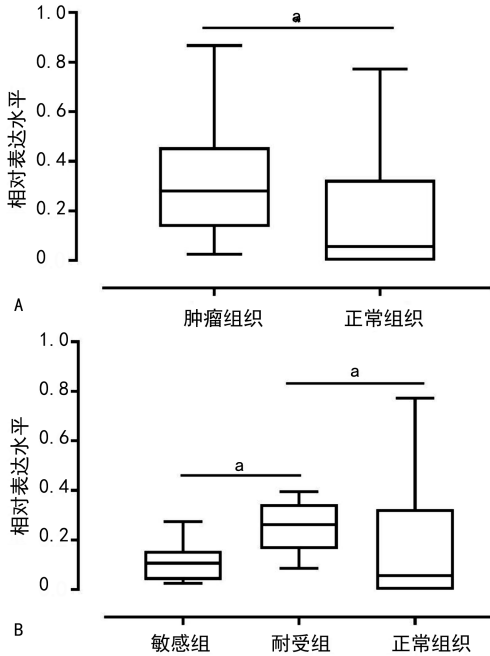
2.3 宫颈癌组织和正常宫颈组织 RASAL2 基因的表达水平

敏感组(0.184 ± 0.014)和耐受组(0.131 ± 0.010) RASAL2 基因表达水平均低于正常组(0.307 ± 0.048),且耐受组低于敏感组,差异有统计学意义($P = 0.006$)。相关性分析显示,宫颈癌组织 RASAL2 基因表达水平与 RASAL2 甲基化程度呈负相关($r = -0.665$, $P < 0.001$),见图 2。

2.4 RASAL2 基因甲基化与宫颈癌患者临床病理特征的关系

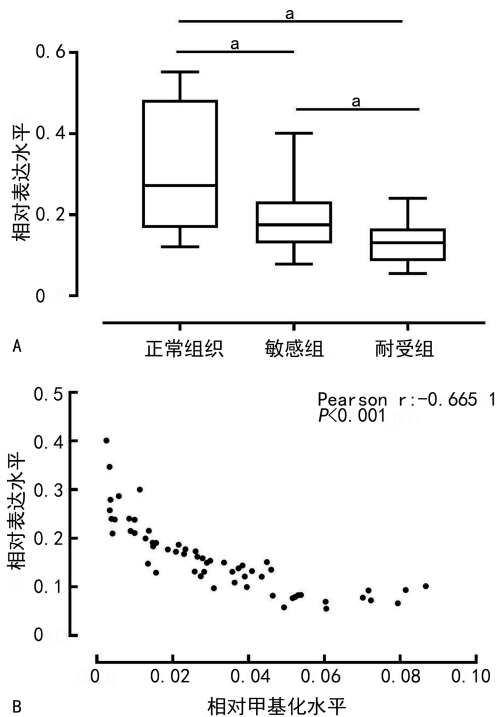
中高分化肿瘤组织 RASAL2 基因甲基化水平低于低分化肿瘤组织 RASAL2 基因甲基化水平

(0.023 ± 0.003 vs. 0.045 ± 0.005), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。



A: 宫颈癌组织和正常宫颈组织比较; B: 敏感组、耐受组和正常宫颈组织比较; ^a: $P < 0.05$ 。

图 1 宫颈癌组织及正常宫颈组织 RASAL2 基因甲基化状态

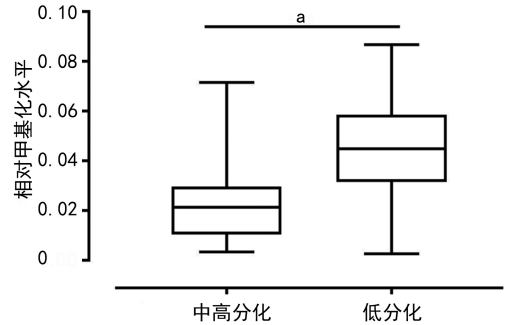


A: 敏感组、耐受组和正常宫颈组织 RASAL2 基因表达情况比较; B: 宫颈癌组织 RASAL2 基因表达水平与 RASAL2 甲基化程度相关性; ^a: $P < 0.05$ 。

图 2 宫颈癌和正常组织 RASAL2 基因表达情况

2.5 RASAL2 基因甲基化与宫颈癌患者 CCRT 敏感性的关联分析

单因素 logistic 回归分析结果显示, RASAL2 基因甲基化水平可作为预测宫颈癌患者 CCRT 敏感性的因子 ($P < 0.05$), RASAL2 基因高甲基化患者的临床应答率明显低于该基因低甲基化患者, 见表 2。



^a: $P < 0.001$ 。

图 3 RASAL2 基因高甲基化与晚期宫颈癌细胞分化程度相关

表 2 单因素 logistics 回归分析结果

项目	OR (95% CI)	P
年龄	1.022 (0.966, 1.080)	0.448
肿瘤大小	0.606 (0.167, 2.201)	0.447
组织学分级	1.276 (0.196, 8.288)	0.799
淋巴结转移	0.637 (0.227, 1.792)	0.393
FIGO 分期	1.064 (0.532, 2.126)	0.861
甲基化状态	0.690 (0.536, 0.889)	0.004

3 讨论

启动子区高甲基化是基因沉默的重要机制, 是宫颈癌中常见的分子事件^[15], 但目前甲基化分子标志物与宫颈癌患者临床应答的相关研究进展缓慢。YE 等^[16]进行的一项研究表明, TP73 蛋白水平与宫颈癌患者的放疗敏感性呈现出相关性, 表现为 TP73 基因表达水平高的患者对放疗更为敏感。该项研究进一步证实, TP73 基因启动子区甲基化水平与该蛋白表达水平呈负相关, 且去甲基化试剂处理可使宫颈癌细胞系 TP73 基因表达明显上调, 表明高甲基化是引起该基因沉默的原因。另一项研究发现, FANCF 基因启动子高甲基化在宫颈癌细胞中十分普遍, 且高甲基化使得细胞对多种可造成 DNA 损伤的药物异常敏感^[17]。而最近的一项研究表明, FANCF 基因去甲基化会引起卵巢癌细胞对顺铂的不敏感^[18]。由此可推测, FANCF 基因启动子高甲基化可增强宫颈癌细胞对顺铂的敏感性, 但仍需进一步证实。此外, 细胞凋亡信号通路 DAPK 及 FAS 基因甲基化水平被证实与宫颈癌患者接受 CCRT 的敏感性明显相关^[19]。本研究分析了 60 例宫颈鳞癌患者的 RASAL2 基因甲基化和表达情况, 以及这些变化与患者临床病理特征、

临床应答的关联性,证实 RASAL2 基因甲基化可作为预测患者 CCRT 敏感性的标志物。

RASAL2 基因启动子甲基化和表达缺失在 Luminal B 型乳腺癌普遍存在,而正常功能的 RASAL2 基因可有效抑制该类肿瘤的发生和转移^[7-8]。然而,在肝细胞癌组织中,RASAL2 基因启动子却呈现为低甲基化状态,且 RASAL2 基因缺失可有效抑制癌细胞的生长和侵袭能力^[10]。基于 qMSP 实验结果,证实肿瘤标本中 RASAL2 基因甲基化水平较正常宫颈组织明显上调,且甲基化程度在低分化肿瘤细胞中最高。此外,在肿瘤标本中检测到 RASAL2 基因表达的缺失,且与甲基化水平呈负相关。这些结果证实,RASAL2 基因转录沉默与异常启动子甲基化有关,且后者参与了宫颈癌的发生、发展。另外,在部分正常组织中也检测到了 RASAL2 基因甲基化的存在,虽然不能排除一些组织标本被邻近的肿瘤细胞污染的可能性,但既往的研究表明,导致这种情况产生的原因很可能是“正常组织”实际已产生了癌前病变^[20]。而深入解决这个问题,需要更大样本量开展研究。

值得注意的是,耐受组 RASAL2 基因甲基化水平明显高于敏感组,且 RASAL2 基因高甲基化可作为独立预测患者不良应答的因子。结合其他研究成果,有理由认为 RASAL2 基因在宫颈鳞癌细胞中发挥着抑制 RAS 基因活性的生物学功能。低甲基化时,正常表达的 RASAL2 基因可有效抑制宫颈癌细胞的 RAS 基因活性,进而一定程度上抑制了肿瘤细胞的迁移、侵袭和克隆形成能力;相应地,高甲基化诱导的 RASAL2 基因表达缺失会失去对 Ras 基因的抑制作用,给肿瘤细胞的生长和增殖提供环境,进而为化疗后残存的肿瘤细胞带来生存和种群再生的优势,临床表现为患者对 CCRT 不敏感。RASAL2 基因影响宫颈癌患者 CCRT 敏感性的具体分子机制有待进一步阐明。

综上所述,RASAL2 基因异常甲基化和低表达在宫颈癌发生、发展过程中起着重要作用。与遗传改变不同,表观遗传改变是可逆的,这使得它成为一个有吸引力的治疗目标,后续研究需要阐明 RASAL2 基因去甲基化在宫颈癌临床治疗中的可行性。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] COHEN A, JHINGRAN A, OAKNIN A, et al. Cervical cancer [J]. Lancet, 2019, 393(10167): 169-182.
- [3] KOH J, ABURUSTUM R, BEAN S, et al. Cervical cancer, version 3. 2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(1): 64-84.
- [4] KATKE A, NANDA R, THEJASWINI B, et al. Weekly vs. tri-weekly cisplatin based chemoradiation in carcinoma cervix: a prospective randomized study of toxicity and compliance [J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2021, 26(6): 948-954.
- [5] QIAO Y, LI H, PENG B. Neoadjuvant and adjuvant treatments compared to concurrent chemoradiotherapy for patients with locally advanced cervical cancer: a bayesian network meta-analysis [J]. Front Oncol, 2022, 12: 745522.
- [6] MOSADDEGHZADEH N, AHMADIAN M R. The RHO family GTPases: mechanisms of regulation and signaling [J]. Cells, 2021, 10(7): 1831.
- [7] MCLAUGHLIN K, OLSEN N, DAKE B, et al. The RasGAP gene, RASAL2, is a tumor and metastasis suppressor [J]. Cancer cell, 2013, 24(3): 365-378.
- [8] WANG X, YIN X, YANG Y. Rasal2 suppresses breast cancer cell proliferation modulated by secretory autophagy [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 462(1): 115-122.
- [9] KREIDER-LETTERMAN G, CARR N M, GARCIA-MATA R. Fixing the GAP: the role of RhoGAPs in cancer [J]. Eur J Cell Biol, 2022, 101(2): 151209.
- [10] HARRELL STEWART D R, CLARK G J. Pumping the brakes on RAS-negative regulators and death effectors of RAS [J]. J Cell Sci, 2020, 133(3): jcs238865.
- [11] ZHOU B, ZHU W, JIANG X, et al. RASAL2 plays inconsistent roles in different cancers [J]. Front Oncol, 2019, 9: 1235.
- [12] QIU L, FENG H, YU H, et al. Characterization of the genomic landscape in cervical cancer by next generation sequencing [J]. Genes (Basel), 2022, 13(2): 287.

- quadratus lumborum block; a cadaver study[J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(1):303-312.
- [11] BALOCCO A L, LÓPEZ A M, KESTELOOT C, et al. Quadratus lumborum block; an imaging study of three approaches[J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2021, 46(1):35-40.
- [12] LI H, LIANG J, SHAO P, et al. Supra-arcuate ligament blocks; anatomy, mechanisms, and techniques[J]. *J Pain Res*, 2021, 14:3837-3848.
- [13] CIOCCARI L, LUETHI N, BAILEY M, et al. The effect of dexmedetomidine on vasopressor requirements in patients with septic shock; a subgroup analysis of the Sedation Practice in Intensive Care Evaluation[SPICE III] Trial[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1):441.
- [14] PENG Y, ZHU H, CHEN H, et al. Dexmedetomidine attenuates acute paroxysmal sympathetic hyperactivity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40):69012-69019.
- [15] DEREK L, SERVIS D, UNIC A. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory markers in colorectal cancer surgery; a prospective cohort study[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(22):2691-2696.
- [16] LIU B, LI Q, XIE H, et al. Evaluation of vertebral function and long-term quality of life after percutaneous minimally invasive surgery in patients with thoracolumbar spine fractures[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022:2723542.
- [17] SAYAH W, BERKANE I, GUERMACHE I, et al. Interleukin-6, procalcitonin and neutrophil-to-lymphocyte ratio; Potential immune-inflammatory parameters to identify severe and fatal forms of COVID-19[J]. *Cytokine*, 2021, 141:155428.
- [18] WANG X Y, ZHANG F, ZHANG C, et al. The biomarkers for acute myocardial infarction and heart failure[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:2018035.

(收稿日期:2022-07-11 修回日期:2022-10-11)

(上接第 685 页)

- [13] TATLI O, DINLER DOGANAY G. Recent developments in targeting RAS downstream effectors for RAS-driven cancer therapy[J]. *Molecules*, 2021, 26(24):7561.
- [14] ZENG J, SUN P, PING Q, et al. Clinical outcome of FIGO 2018 stage I B3/II A2 cervical cancer treated by neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery due to lack of radiotherapy equipment; a retrospective comparison with concurrent chemoradiotherapy[J]. *PLoS One*, 2022, 17(3):e0266001
- [15] BHAT S, KABEKKODU P, NORONHA A, et al. Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer[J]. *Biochimie*, 2016, 121:298-311.
- [16] YE H, GUO X. TP73 is a credible biomarker for predicting clinical progression and prognosis in cervical cancer patients[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(8):BSR20190095.
- [17] PAIK E S, CHANG C S, CHAE Y L, et al. Prognostic relevance of BRCA1 expression in survival of patients with cervical cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:770103.
- [18] OLIVER J, GARCIAARANDA M, CHAVES P, et al. Emerging noninvasive methylation biomarkers of cancer prognosis and drug response prediction[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83:584-595.
- [19] GUO L, LEE Y T, ZHOU Y, et al. Targeting epigenetic regulatory machinery to overcome cancer therapy resistance[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83:487-502.
- [20] MARTINCORENA I, CAMPBELL J. Somatic mutation in cancer and normal cells[J]. *Science*, 2015, 349(6255):1483-1489.

(收稿日期:2022-05-21 修回日期:2022-10-11)