

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.08.1038

亲环素 A 在胃癌细胞中的表达及与肿瘤细胞增殖的关系

王冬¹, 李勇^{1*}, 赵群¹, 范立侨¹, 檀碧波¹, 崔平²

1. 河北医科大学第四医院普外三科, 石家庄 050011

2. 河北省人民医院医务处, 石家庄 050051

[摘要] **目的** 检测亲环素 A(CypA)在胃癌组织和细胞株中的表达情况,采用基因干扰技术抑制胃癌细胞中 CypA 的表达,探讨 CypA 对胃癌细胞增殖能力的影响和相关分子机制。**方法** 实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 CypA 在胃癌组织、癌旁组织和细胞株中的表达;合成针对 CypA 的靶向 siRNA 并转染胃癌 MKN45 细胞株,检测 CypA-siRNA 对胃癌细胞内源性 CypA 的抑制作用,同时设置非特异性 siRNA 对照组和阴性对照组。MTT 法检测各组细胞增殖情况,流式细胞术检测各组细胞周期;实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测各组细胞增殖基因 PCNA、P21、P16、Cyclin D1 的表达。**结果** 胃癌组织中 CypA 的 mRNA 和蛋白表达高于癌旁组织,胃癌细胞株 CypA 的 mRNA 和蛋白表达高于胃上皮细胞株,且在低分化细胞 MKN45 中表达最高($P<0.05$)。CypA-siRNA 可有效抑制内源性 CypA 的表达;CypA-siRNA 转染后 MKN45 细胞增殖能力下降($P<0.05$),G₀/G₁ 期细胞比例上升,G₂/M 期细胞比例下降($P<0.05$),PCNA、Cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达下调,P21 mRNA 和蛋白表达上调($P<0.05$)。**结论** 胃癌细胞中 CypA 的表达增强,CypA 基因能够通过调节部分增殖基因的表达而促进胃癌细胞增殖。

[关键词] 胃肿瘤;亲环素 A;RNA 干扰;细胞增殖

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)08-1038-05

Expression of cyclophilin A in gastric cancer and its relationship with proliferation of gastric cancer cells

WANG Dong¹, LI Yong^{1*}, ZHAO Qun¹, FAN Li-qiao¹, TAN Bi-bo¹, CUI Ping²

1. Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China

2. Division of Medical Affairs, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To examine the expression of cyclophilin A (CypA) in gastric cancer tissues and cell lines, and to explore the effect and mechanism of CypA on the proliferation of gastric cancer cells. **Methods** Real-time quantitative PCR and Western blotting analysis were used to detect the expression of CypA in gastric cancer tissues, the corresponding adjacent tissues and gastric cancer cell lines. Small interfering RNAs targeting CypA were synthesized and transfected into the gastric cancer cell line MKN45. The effect of CypA-siRNA on endogenous CypA expression was observed; meanwhile, nonspecific siRNA control group and negative control group were also designed. Cell proliferation was measured with MTT assay in each group; cell cycle was detected with flow cytometry. The expression of PCNA, P21, P16, and Cyclin D1 gene, involved in cell proliferation, were also detected by real-time quantitative PCR and Western blotting analysis. **Results** CypA expression was significantly up-regulated in gastric cancer tissues compared with para-cancer tissues; and CypA expression in gastric cancer cell lines was also significantly higher than that in the gastric epithelial cell line GES-1, with the highest expression found in the poorly-differentiated gastric cancer cell line MKN45 ($P<0.05$). The expression of CypA was significantly inhibited by the CypA-siRNA in MKN45 ($P<0.05$). MTT assay showed that the inhibition of CypA by CypA-siRNA significantly suppressed MKN45 cell proliferation ($P<0.05$). The ratio of G₀/G₁ phase cells was significantly increased in MKN45 cells after CypA-siRNA transfection, while the ratio of G₂/M phase was significantly decreased ($P<0.05$). In addition, the expression of PCNA, Cyclin D1 was significantly decreased at mRNA and protein levels when CypA was inhibited, and the expression of P21 was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** CypA is overexpressed in gastric cancer cells; CypA gene can effectively promote gastric cancer cell proliferation by regulating some proliferation related genes.

[收稿日期] 2015-11-14 **[接受日期]** 2016-01-25

[作者简介] 王冬,博士,副主任医师。E-mail: wangdongcuiping@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0311-86095348, E-mail: li_yong_hbth@126.com

[Key words] stomach neoplasms; cyclophilin A; RNA interference; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(8): 1038-1042]

胃癌是我国发病率、死亡率最高的消化道恶性肿瘤,严重危害人民健康。胃癌患者的肿瘤生长迅速,患者就诊时肿瘤多已处于进展期,综合治疗效果不佳、预后差,5年生存率不足40%^[1-2]。胃癌发展迅速的重要原因之一在于细胞具有较强的增殖能力^[3]。若能有效抑制胃癌细胞的增殖,将对阐明胃癌发生、发展机制,探索新的胃癌治疗方案有重要意义,但相关研究目前尚未取得突破性进展。亲环素A(cyclophilin A, CypA)是亲环蛋白家族成员之一,具有原癌基因特性,在乳腺癌、食管癌、胆管癌、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤中高表达^[4-7]。目前关于CypA与胃癌细胞增殖的报道不多,具体机制也不清楚。因此,本研究检测了CypA在胃癌组织和细胞株中的表达情况,并采用基因干扰技术抑制胃癌细胞中CypA的表达,观察抑制前后胃癌细胞增殖能力的改变,进一步检测抑制CypA后增殖基因的变化,为探讨胃癌细胞的增殖机制提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 RPMI 1640培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;RNA提取试剂TRIzol、核酸转染细胞的转染试剂LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司;荧光定量PCR所用反转录试剂盒及相关试剂购自美国Promega公司;所有目的基因PCR引物和小干扰RNA(siRNA)由生工生物工程(上海)有限公司合成;蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;CypA、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Cyclin D1、P21及 β -actin抗体购自美国Santa Cruz公司;MTT购自美国Sigma公司。GeneAmp 9600型PCR仪购自美国PE公司;2010型酶标仪购自奥地利Thermo公司;Epics-XL II型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 胃癌组织来源 选择2013年1月至2013年12月在河北医科大学第四医院普外三科住院行手术切除并经病理确诊的胃癌患者20例,其中男性12例,女性8例;年龄41~71岁,平均年龄(56.8±6.2)岁,患者术前均未接受过针对肿瘤的治疗。每例均取癌组织及癌旁组织(距癌组织边缘>2 cm)各1份(约1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm),标本投入液氮速冻后转入-80℃冰箱保存。该研究取得河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准并获得患者同意。

1.3 细胞株及细胞培养 高分化胃癌细胞株MKN28、低分化胃癌细胞株MKN45及正常胃上皮细胞株GSE-1购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心,细胞在河北医科大学第四医院中心实验室进行培养、传代及保存。各细胞株均于RPMI 1640培养基中常规培养(培养时加入10%胎牛血清及双抗),在5% CO₂、37℃的细胞培养箱恒温孵育。用含0.02% EDTA的0.25%胰蛋白酶溶液消化传代。

1.4 荧光定量PCR技术检测CypA、PCNA、Cyclin D1、P21 mRNA的表达 采用TRIzol一步法提取胃癌组织、癌旁组织及各细胞株的总RNA,分别取2 μ g RNA反转录成为cDNA。反转录产物取2 μ L行荧光定量PCR,按反转录试剂盒操作说明建立反应体系:2 μ L反转录产物,10 μ L SYBR Green Mix (Applied Biosystems, 美国),上、下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L,去离子水7 μ L。PCR热循环参数设定为95℃,持续5 min;然后依次行下列步骤:94℃变性30 s,60℃退火30 s,进行45个循环。CypA引物:(F)5'-CAT ACG GGT CCT GGC ATC T-3',(R)5'-TGC TGG TCT TGC CAT TCC-3';PCNA引物:(F)5'-TAA GGG CTG AAG ATA ATG CTG AT-3',(R)5'-CCT GTT CTG GGA TTC CAA GTT-3';Cyclin D1引物:(F)5'-CCG TCC ATG CGG AAG ATC-3',(R)5'-GTC ACA CTT GAT CAC TCT GG-3';P21引物:(F)5'-CGC TCT ACA TCT TCT GCC TTA G-3',(R)5'-CAG CAC TCT TAG GAA CCT CTC AT-3';P16引物:(F)5'-CAA CGC ACC GAA TAG TTA CG-3',(R)5'-ACC ACC AGC GTG TCC AGG AA-3'; β actin引物:(F)5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',(R)5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。本研究以 β actin作内参基因。荧光定量PCR检测结果经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各基因mRNA的相对表达量。

1.5 蛋白质印迹法检测CypA、PCNA、Cyclin D1、P21蛋白的表达 应用Bradford法对胃癌组织、癌旁组织及各细胞株的样本蛋白进行定量,各样本分别取60 μ g进行实验。使用12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分离蛋白样品并电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,用TBST洗涤缓冲液配制的脱脂奶粉在室温下封闭1 h。加入相应一抗4℃孵育

过夜, TBST 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗室温孵育 1 h。显色, 检测各蛋白条带灰度值并定量, 结果以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值来表示。

1.6 CypA 特异性 siRNA (CypA-siRNA) 转染 MKN45 细胞 CypA-siRNA 序列为 5'-CTG ACT GTG GAC AAC TCG AAT-3', 非特异性 siRNA 序列为 5'-CCC TTC TCT GTT TGT AAA GAG ACA T-3'。取 MKN45 细胞以 4×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h。转染前用 RPMI 1640 清洗 MKN45 细胞, 将合成的 siRNA 溶解成浓度为 40 nmol/L 的溶液, 按转染试剂操作说明稀释各溶液并分组: CypA-siRNA (CypA-siRNA 组)、非特异性 siRNA (Non 组) 及相应比例的转染试剂 Lipofectamine™ 2000 (Con 组), 其中 CypA-siRNA 组根据 CypA-siRNA 浓度不同分为 10、20、40 nmol/L CypA-siRNA 组 3 个亚组, 混合静置后分别转染 MKN45 细胞。转染 48 h 后观察转染效率。

1.7 MTT 法检测转染后细胞的生长情况 0.02% EDTA-0.25% 胰蛋白酶消化 MKN45 细胞, 将细胞密度调整为 5×10^4 /mL, 接种于 96 孔板中。待细胞生长至 60%~70% 融合时各组分别转染 CypA-siRNA、非特异性 siRNA 和转染试剂 Lipofectamine™ 2000。继续培养各组细胞, 分别在转染后 24、48、72 h 时取出培养板, 各组均加入 20 μ L 的 MTT (5 mg/mL), 培养 4 h 后去除培养液。

各孔加入 150 μ L 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 室温下振荡 15 min, 检测波长为 490 nm 时各孔的光密度 (D) 值。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测转染后细胞周期情况 转染结束后, MKN45 细胞无血清培养 16 h 进行同步化处理; 收集各组细胞, 清洗并用 70% 冷乙醇快速冲散, 制备 1×10^7 /mL 的单细胞悬液 0.1 mL。4 $^{\circ}$ C 固定 12 h 后碘化丙啶 (PI) 染色 30 min, 取密度为 1×10^6 /mL 的细胞样品 100 μ L, 应用 Epics-XL II 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司) 上机检测各组细胞周期分布。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 胃癌组织、癌旁组织和细胞株中 CypA 的表达情况 采用荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测胃癌组织、癌旁组织及各细胞株中 CypA 的 mRNA 和蛋白表达情况, 结果发现, 胃癌组织中 CypA 的 mRNA 和蛋白表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1A、1B); 而胃癌 MKN28、MKN45 细胞株 CypA 的 mRNA 和蛋白的表达水平也均高于正常胃上皮 GES-1 细胞株, 低分化 MKN45 细胞株中 CypA 的 mRNA 和蛋白的表达高于高分化 MKN28 细胞株 ($P < 0.05$, 图 1C、1D)。

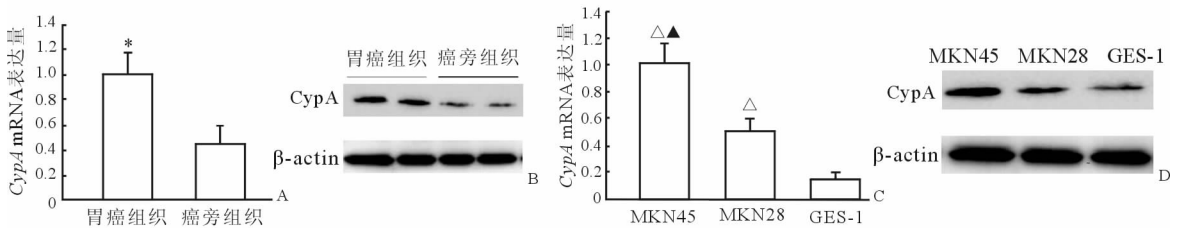


图 1 胃癌组织、癌旁组织及胃癌细胞株、胃上皮细胞株中 CypA 的 mRNA 和蛋白表达

A, C: 实时荧光定量 PCR 检测 CypA mRNA 的表达量。* $P < 0.05$ 与癌旁组织比较; $\Delta P < 0.05$ 与 GES-1 比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与 MKN28 比较。n=6, $\bar{x} \pm s$; B, D: 蛋白质印迹法检测 CypA 蛋白表达。CypA: 亲环素 A

2.2 CypA-siRNA 对 MKN45 细胞 CypA 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测转染 48 h 后各组细胞 CypA 蛋白的表达水平, 结果显示较 Con 组和 Non 组, 10、20、40 nmol/L CypA-siRNA 3 组 MKN45 细胞 CypA 蛋白的表达均明显下降, 且呈现出一定的剂量依赖性 (图 2)。本研究选取 40 nmol/L 的 CypA-siRNA 转染 MKN45 细胞进行后续实验。

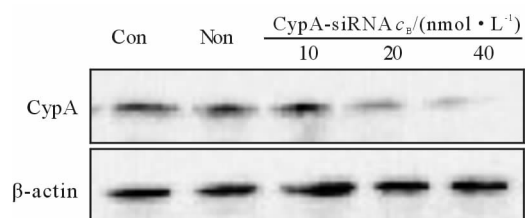


图 2 转染后各组 MKN45 细胞 CypA 蛋白的表达

CypA: 亲环素 A; Con: 转染试剂 Lipofectamine™ 2000; Non: 非特异性 siRNA

2.3 CypA-siRNA对MKN45细胞增殖能力的影响 采用MTT法检测各组细胞的增殖情况,结果发现转染后不同时间点CypA-siRNA组MKN45细胞的增殖活力较Non组及Con组均明显下降($P < 0.05$)。Non组与Con组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

2.4 CypA-siRNA转染后MKN45细胞周期的变化 转染MKN45细胞后,CypA-siRNA组细胞G₀/G₁期的细胞比例高于Con组和Non组,而G₂/M期的细胞比例低于Con组和Non组($P < 0.05$)。Non组与Con组各周期的细胞比例差异均无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.5 CypA-siRNA转染对MKN45细胞PCNA、P21、P16、Cyclin D1表达的影响 实时定量PCR和蛋白质印迹法检测结果显示,与Non组及Con组比较,CypA-siRNA组PCNA、Cyclin D1的mRNA和蛋白表达均下降,P21的mRNA和蛋白表达均上调(图4)。

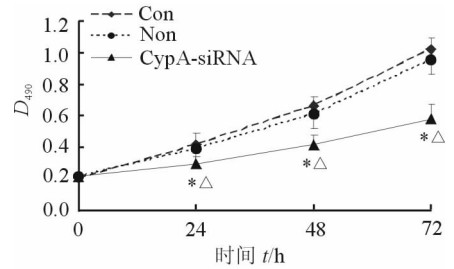


图3 转染后各组MKN45细胞的增殖活性

CypA: 亲环素A; Con: 转染试剂 Lipofectamine™ 2000; Non: 非特异性 siRNA. * $P < 0.05$ 与同一时间点 Con 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与同一时间点 Non 组比较. $n = 6, \bar{x} \pm s$

表1 各组胃癌细胞的周期分布情况

组别	%, $n = 6, \bar{x} \pm s$		
	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
Con组	36.52 ± 3.82	33.94 ± 4.23	29.54 ± 3.23
Non组	38.28 ± 4.31	32.52 ± 4.44	30.20 ± 3.66
CypA-siRNA组	57.38 ± 5.87* Δ	30.29 ± 2.82	12.33 ± 2.26* Δ

CypA: 亲环素A; Con: 转染试剂 Lipofectamine™ 2000; Non: 非特异性 siRNA. * $P < 0.05$ 与 Con 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 Non 组比较

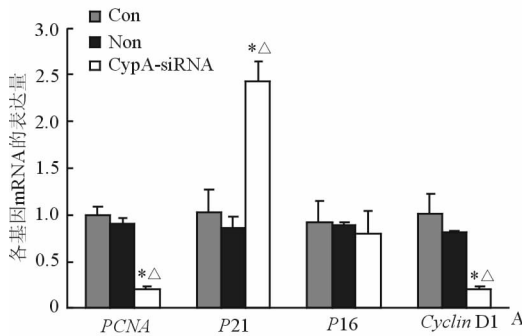
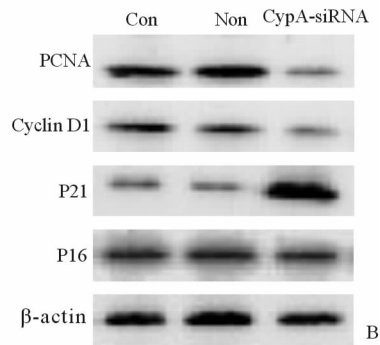


图4 各组细胞增殖相关基因的表达情况

A: 实时定量PCR检测mRNA的表达; * $P < 0.05$ 与Con组比较; $\Delta P < 0.05$ 与Non组比较. $n = 6, \bar{x} \pm s$. B: 蛋白质印迹法检测蛋白表达. CypA: 亲环素A; Con: 转染试剂 Lipofectamine™ 2000; Non: 非特异性 siRNA



3 讨论

胃癌的发生和进展是多因素共同作用的结果^[8],其中基因异常表达在胃癌发生中发挥了重要作用。胃癌细胞增殖迅速,可促使肿瘤快速生长并发生转移,因此通过抑制胃癌细胞的增殖而控制肿瘤进展是胃癌治疗的方向之一,发现胃癌细胞增殖的中心调节基因并对其功能进行分析具有重要意义。本研究分析了CypA与胃癌细胞增殖之间的关系,结果显示胃癌组织中CypA的表达高于癌旁组织,胃癌细胞株中CypA的表达也高于胃上皮细胞,且低分化的胃癌细胞株MKN45中CypA的表达高于高分化胃癌细胞株MKN28。这些结果提示CypA与胃癌有关,可能在胃

癌发生和进展中发挥了作用。

CypA是亲环素家族的成员之一,具有参与蛋白质组装、介导细胞间信号转导及调节细胞凋亡等生物学功能^[9-10]。近年来研究发现,CypA在多种恶性肿瘤中表达异常,并与肿瘤的迁移、耐药、增殖等生物学活性有关^[4-7]。本研究通过siRNA技术抑制内源性CypA在胃癌MKN45细胞株中的表达后,细胞的增殖能力明显下降,进一步证实了CypA对细胞增殖具有促进作用,为深入了解胃癌发生机制及靶向性基因治疗提供了实验依据。

siRNA技术是近年来研究基因功能常用的反向遗传学方法,该技术可有效抑制内源性目的基因的表达,通过对抑制后的效应进行分析,从而了解目

的基因的功能。本研究通过 siRNA 抑制胃癌 MKN45 细胞株 CypA 的高表达,反向证明了 CypA 对细胞增殖具有促进作用。本研究发现该技术同时抑制了 MKN45 细胞增殖标志基因 PCNA 和增殖促进基因 *Cyclin D1* 的表达,促进了增殖抑制基因 *P21* 的表达。PCNA 是标志细胞增殖状态的重要基因^[11]; *Cyclin D1* 则是通过促进细胞周期 G₁/S 期进程从而促进细胞增殖^[12]; 而 *P21* 是公认的细胞增殖负性调节基因^[13-14]。这些基因表达的变化提示 CypA 可能通过调节这些基因而干预胃癌细胞的增殖进程。此外,本研究中细胞增殖负性调节基因 *P16*^[15] 的表达变化并不明显,提示 *P16* 可能不受 CypA 调节,其对肿瘤细胞的增殖调节可能是通过其他途径实现的。

综上所述,在胃癌组织及胃癌细胞株中 CypA 的表达上调,应用 siRNA 技术抑制的 CypA 表达可有效抑制胃癌细胞的增殖能力。尽管确切的机制仍需进一步研究,但上述结果可表明 CypA 可能作为致癌基因在胃癌增殖中发挥重要作用。

[参考文献]

[1] LI Y, ZHAO Q, FAN L Q, TAN B B, ZHANG Z D, LIU Y. Analysis of lymph node dissection range-related factors for early gastric cancer operation[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60: 971-974.

[2] 檀碧波,李勇,赵群,范立侨,刘小慧,焦志凯,等. 胃癌区域转移淋巴结中锌指蛋白 139 与基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-7、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 表达的关系及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30: 951-953.

[3] ZHU Z L, YAN B Y, ZHANG Y, YANG Y H, WANG Z M, ZHANG H Z, et al. PINCH expression and its clinicopathological significance in gastric adenocarcinoma[J]. *Dis Markers*, 2012, 33: 171-178.

[4] CHEVALIER F, DEPAGNE J, HEM S, CHEVILLARD S, BENSIMON J, BERTRAND P, et al. Accumulation of cyclophilin A isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells [J]. *Proteomics*, 2012, 12: 1756-1766.

[5] FENG M X, LI J P, WANG H, SHEN Y X, TAN L J, WANG Q, et al. Clinical significance of cyclophilin A expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19: 182-186.

[6] OBCHOEI S, SAWANYAWISUTH K, WONGKHAM C, KASINRERK W, YAO Q, CHEN

C, et al. Secreted cyclophilin A mediates G₁/S phase transition of cholangiocarcinoma cells via CD147/ERK1/2 pathway[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 849-859.

[7] QIAN Z, ZHAO X, JIANG M, JIA W, ZHANG C, WANG Y, et al. Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase 9[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 442.

[8] TAN B, LI Y, ZHAO Q, FAN L, WANG D, LIU Y. Inhibition of gastric cancer cell growth and invasion through siRNA-mediated knockdown of guanine nucleotide exchange factor Vav3 [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35: 1481-1488.

[9] KOVALEV N, NAGY P D. Cyclophilin A binds to the viral RNA and replication proteins, resulting in inhibition of tombusviral replicase assembly [J]. *J Virol*, 2013, 87: 13330-13342.

[10] MCGOWAN L C, HAMELBERG D. Conformational plasticity of an enzyme during catalysis: intricate coupling between cyclophilin A dynamics and substrate turnover[J]. *Biophys J*, 2013, 104: 216-226.

[11] MADHUMATI G, KAVITA S, ANJU M, UMA S, RAJ M. Immunohistochemical expression of cell proliferating nuclear antigen (PCNA) and p53 protein in cervical cancer[J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2012, 62: 557-561.

[12] RAVIKUMAR G, ANANTHAMURTHY A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10: 671-675.

[13] OHKOSHI S, YANO M, MATSUDA Y. Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 12150-12156.

[14] LI N, ZHONG X, LIN X, GUO J, ZOU L, TANYI J L, et al. Lin-28 homologue A (LIN28A) promotes cell cycle progression via regulation of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), cyclin D1 (CCND1), and cell division cycle 25 homolog A (CDC25A) expression in cancer[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 17386-17397.

[15] RAMSHANKAR V, SOUNDARA V T, SHYAMSUNDAR V, RAMANI P, KRISHNAMURTHY A. Risk stratification of early stage oral tongue cancers based on HPV status and p16 immunoexpression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 8351-8359.