

DOI:10.13350/j.cjpb.150412

• 论著 •

宫颈癌患者感染 HPV16 E6 基因突变分析

张文娟*, 张庆玲, 亓云芳

(莱芜市妇幼保健院, 山东莱芜 271100)

【摘要】 目的 分析宫颈癌患者感染 HPV16 癌基因 E6 的突变情况,为宫颈癌的防治提供科学指导。方法 选取 2012—2014 年 2 月经病理检查确诊为宫颈癌患者的宫颈癌组织作为样本,采用常规的蛋白酶 K 裂解、苯酚-氯仿抽提法提取 HPV16 的全基因组,对 HPV16 的全基因组和癌基因 E6 进行 PCR 扩增,对 E6 基因序列突变株进行测序分析,并进一步分析其进化发生学。结果 经基因序列对比发现,30 份样本中有 23 份存在突变位点,占总样本数的 76.67%,其余 7 份样本均未发现突变位点。在所有的突变位点中,错义突变位点有 7 个:176 位点发生 G→A 的突变(1 份,占 3.33%);178 位点发生的 T→G 的突变(13 份,占 43.33%);296 位点发生 T→G 的突变(1 份,占 3.33%);350 位点发生 T→G 的突变(6 份,占 20.00%);442 位点发生 A→C 的突变(2 份,占 6.67%);443 位点发生 G→A 突变(5 份,占 16.67%);525 位点发生 G→A 的突变(1 份,占 3.33%)。而 178 位点发生的 T→A 突变(10.00%)和 241 位点 T→G 突变(6.67%)均为无义突变。选择 HPV35 型的 E6 基因序列作为外类群参考,引入 HPV16 变异体 AF472508 和 AF472509,HPV16 E6 基因的进化树分析结果显示非洲株单独构成分枝,本研究进行测序的样本中没有与三者位于同一分枝的,且样品 T11 和 T19 为 Ep 型变异体,而 T01,03,05,07,08,10,12,14 为 As 型变异体。结论 本研究成功找到了 HPV16 E6 基因的突变位点,并分析了其基因进化树,为宫颈癌的防治提供新的依据。

【关键词】 宫颈癌; HPV16; PCR; 进化树; 基因突变

【中图分类号】 R373.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2015)04-0339-04

[*Journal of Pathogen Biology.* 2015 Apr; 10(4): 339—342, 347.]

Analysis of mutations of the E6 gene of HPV16 in patients with cervical cancer

ZHANG Wen-juan, ZHANG Qing-ling, QI Yun-fang (*Maternal and Child Care Service Center of the City of Laiwu, Laiwu, Shandong 271100, China*)

【Abstract】 Objective To analyze mutations in the E6 oncogene of HPV16 infecting patients with cervical cancer in order to provide scientific guidance for prevention of cervical cancer. **Methods** The HPV16 genome and E6 gene of HPV16 were amplified with PCR, and then mutant forms of the E6 gene were sequenced and their genetic evolution was analyzed. **Results** Comparison of gene sequences in 30 samples revealed that there were mutations in 23 samples (76.67%) but no mutations in the remaining 7 samples (23.33%). The mutations included 7 missense mutations: a G→A mutation at locus 176 (3.33%), a T→G mutation at locus 178 (43.33%), a T→G mutation at locus 296 (3.33%), a T→G mutation at locus 350 (20.00%), an A→C mutation at locus 442 (6.67%), a G→A mutation at locus 443 (16.67%), and a G→A mutation at locus 525 (3.33%). There were also 2 nonsense mutations: a T→A mutation at locus 178 (10.00%) and a T→G mutation at locus 241 (6.67%). In evolutionary tree analysis, sequences of the E6 gene of HPV35 served as an external reference. Analysis of the E6 gene of HPV16 included the E6 mutants AF472508 and AF472509. EG350 represented the most common mutation from T to G at locus 350 in European variations. Analysis of the evolutionary tree of the E6 gene of HPV16 indicated that African strains constituted an independent branch, and the samples sequenced in this study were not located on the same branch as these three strains. The samples T11 and T19 were Ep variants, but T01, 03, 05, 07, 08, 10, 12, and 14 were As variants. **Conclusion** This study successfully identified point mutations in the E6 gene of HPV16 and it analyzed the evolutionary tree of this gene. These findings may provide new data for prevention of cervical cancer.

【Key words】 Cervical cancer; HPV16; PCR; evolutionary tree; genetic mutation

宫颈癌已成为全世界女性最常患的肿瘤类妇科疾病之一,其发病率仅次于乳腺癌,并且这类患者在发展中国家所占比例高达 83%^[1]。在中国,年均新发宫颈癌患者病例已达 13.16 万,约占世界总发病数的 1/7,且患者的发病率和死亡率位居第 2,更值得注意的是这类疾病的发病率呈增高趋势,且患病人群正向年轻化

发展^[2]。近年来虽然国内外学者们都进行了大量研究,但是由于多方面因素的影响宫颈癌依然妇科疾病

* 【通讯作者(简介)】 张文娟(1979—),女,山东莱芜人,本科,护士。研究方向:妇产科护理。

E-mail: zhangwenjuan197901@163.com

中高发疾病之一^[3]。因此,精确预测宫颈癌发病风险是亟待解决的重大课题。近年来的流行病学资料显示^[4],人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染是患宫颈癌的主要诱因。虽然感染 HPV 的患者中,大多数都可自行消退,但也有少数患者可能发展为宫颈癌,因此所以研究 HPV 感染对于宫颈癌的治疗也有着重要的作用^[5]。本研究对宫颈癌组织中感染的 HPV16 型 E6 基因进行分析,探讨其突变后对宫颈癌类疾病发生的影响及其进化树,旨在为治疗 HPV 感染引起宫颈癌疾病提供科学依据。

材料与方法

1 宫颈癌组织来源

选取山东省莱芜市妇幼保健院 2012—2014 年 2 月经病理检查确诊为宫颈癌患者的宫颈癌组织作为样本。通过对其感染的 HPV 病毒亚型进行分型检测后,从中选择 30 例多重耐药 HPV16 阳性的样本进行研究。

2 试剂和仪器

蛋白酶 K,德国 Qiagen 公司产品;DNA 提取试剂盒,美国 Sigma 公司产品;PCR 产物回收试剂盒,北京 TransGen 生物公司产品;Taq DNA 聚合酶及其他试剂主要购自大连宝生物公司。

PCR 扩增仪,上海医疗器械厂生产;凝胶成像系统,北京东胜创新生物科技公司生产;台式离心机,上海嘉鹏科技有限公司生产;紫外分光光度计,美国 Thermo 公司生产;低温冰箱,中国青岛 Hair 公司产品。

3 DNA 提取

采用常规的蛋白酶 K 裂解、苯酚-氯仿抽提法^[6]提取宫颈癌组织样本中 HPV16 的全基因组,使用分光光度计分别检测所提取基因组 DNA 的浓度和纯度。样本及提取物于-20℃存储备用。

4 引物设计合成

根据 GenBank 记载的 HPV16 全基因组序列,使用引物设计软件 Premier 5.0,分别设计 HPV16 全基因组序列和癌基因 E6 的 2 对 PCR 扩增引物(表 1)。引物合成由大连宝生物有限公司完成。

5 PCR 扩增

HPV16 全基因组序列和 E6 两个基因片段的 PCR 扩增体系、条件完全相同^[7]。PCR 扩增体系共 25 μl,包括:DNA 模板 100 ng,上、下游引物各 0.5 μl, DNA Taq 耐热酶 12.5 μl, Tris-HCl 1 μl, MgCl₂ 1 μl, 并用 ddH₂O 补足至 25 μl。PCR 扩增条件^[8]:95℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 4 min,共 40 个循环。PCR 扩增产物冷却保存于 4℃

冰箱中备用。

表 1 HPV16 全基因组、E6 基因、E7 基因的引物序列

Table 1 The primer sequence of HPV16 genome, E6 gene, and E7 gene

引物名称 Primer name	序列 5'→3' Sequence	产物大小(bp) Products length
HPV16	P1:GGTCGGTGGACCGGTCGATG	96
	P2:GCAATGTAGGTGTATCTCCA	
E6	P1:GAAACCGGTTAGTATAAAAGCAGAC	465
	P2:AGCTGGGTTTCTCTACGTGTTCT	

6 PCR 产物电泳检测

上述 PCR 产物均用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结束后用凝胶成像仪观察结果,摄像保存电泳结果,并记录分析。

7 HPV16 E6 序列突变株的测定与分析

使用 PCR 产物回收试剂盒,对琼脂糖凝胶中目的片段进行回收,并送至大连宝生物有限公司进行测序,用 DNAMAN 软件对 HPV 病毒进行 DNA 测序比对。

8 HPV16 E6 基因的进化树分析

用 Clustal X1.81 软件比对 HPV16 E6 基因的核苷酸序列,并用 Paup4.0 软件及邻接法完成 E6 基因的进化树分析。在此进化树分析中,选择 HPV33 型的 E6 基因序列作外类群参考。

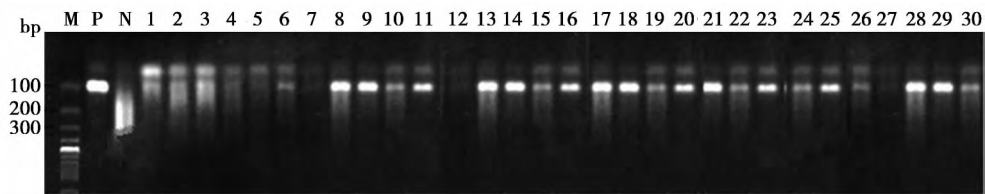
结 果

1 扩增产物电泳图

PCR 扩增反应进行 40 个循环后得到了相应扩增产物,对其产物进行凝胶电泳检测,检测结果见图 1 和图 2。图 1 为 HPV16 的 PCR 扩增产物电泳图,其中标准对照为 100 bp DNA Marker,并参照图中阴性对照和阳性对照(96 bp)。图 2 为 HPV16 E6 基因的 PCR 扩增产物电泳图,同样以 100 bp DNA Marker 作为标准对照,参照阴性对照和阳性对照(465 bp)。HPV16 全基因组序列和 E6 基因均扩增成功。

2 HPV16 E6 序列突变株的测定与分析

通过软件对 HPV16 E6 基因进行基因序列比较后发现,30 份样本中有 23 份存在突变位点,占样本总数的 76.67%,其余 7 份样本均未发现突变位点。在所有的突变位点中,错义突变位点有 7 个:176 位点发生 G→A 的突变(1 份,占 3.33%);178 位点发生的 T→G 的突变(13 份,占 43.33%);296 位点发生 T→G 的突变(1 份,占 3.33%);350 位点发生 T→G 的突变(6 份,占 20.00%);442 位点发生 A→C 的突变(2 份,占 6.67%);443 位点发生 G→A 突变(5 份,占 16.67%);525 位点发生 G→A 的突变(1 份,占 3.33%)。而 178 位点发生的 T→A 突变(10.00%)和 241 位点 T→G 突变(6.67%)均为无义突变。178 位点发生的 T→G 突变记录见图 3。

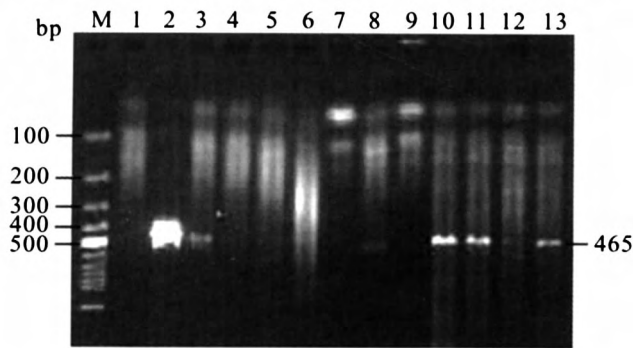


M 100 bp DNA Marker 作为标准对照 P 阳性对照(96 bp) N 阴性对照 1~30 PCR 扩增反应带

图 1 HPV16 的 PCR 扩增产物电泳图

M 100 bp DNA marker as standard control 1 Positive control(96 bp) 2 Negative control 1-30 PCR amplified reaction band

Fig. 1 The PCR amplified products electrophoretogram of HPV16

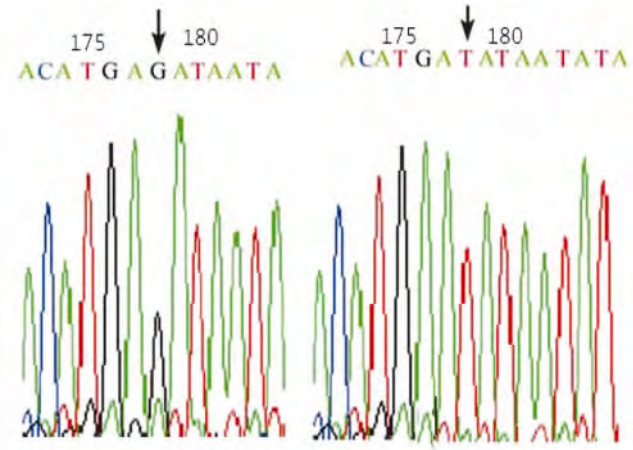


M 100 bp DNA marker 标准对照 1 阴性对照 2 阳性对照 (465 bp) 3~13 PCR 扩增反应带, 其中 3, 8, 10, 11, 12, 13 为 HPV16 E6 基因(465 bp)

图 2 E6 的 PCR 扩增产物电泳图

M 100 bp DNA marker as standard control 1 Negative control 2 Positive control(465 bp) 3-13 PCR amplified reaction band, and 3, 8, 10, 11, 12, 13 as HPV16 E6 gene(465 bp)

Fig. 2 The PCR amplified products electrophoretogram of E6



A 野生型 B 突变型
图 3 HPV16 E6 点突变对比图

A Wild type B Mutated type

Fig. 3 The compared figure of HPV16 point mutation

3 HPV16 E6 基因的进化树分析

进化树分析图见图 4。选择 HPV35 型的 E6 基因序列作为外类群参考, 引入 HPV16 变异体 AF472508 和 AF472509, 而 EG350 则代表欧洲变异体中最常见的 350 位点发生 T 到 G 突变的突变株。因此, HPV16 E6 基因的进化树分析结果表明非洲株单独构成分枝, 本研究进行测序的样本中没有与三者位于同

一分枝的, 且样品 T11 和 T19 为 Ep 型变异体, 而 T01, 03, 05, 07, 08, 10, 12, 14 为 As 型变异体。

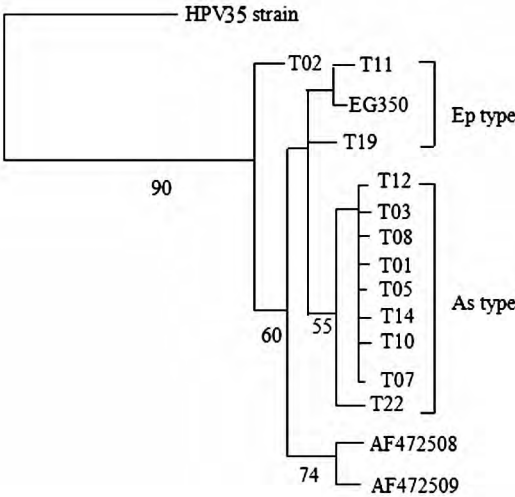


图 4 HPV16 E6 基因的进化树分析

Fig. 4 The phylogenetic tree analysis of HPV16 E6 gene

讨论

宫颈癌是医院妇科患者中最常见的生殖系统恶性肿瘤类疾病, 发病率仅次于乳腺癌, 位居全球女性恶性肿瘤疾病的第 2 位。据世界范围统计^[9], 每年约有 46 万新发现的宫颈癌病例, 其中的 80% 来自发展中国家, 中国妇女的发病率及病死率均达到了占全球患者的三分之一, 宫颈癌已经成为了威胁女性健康和生命的重要疾病。HPV 是一类在形态和基因结构上相似的小型双链 DNA 病毒, 首次在电镜下观察到此病毒是在 1949 年, 且主要感染皮肤、粘膜。此病毒的基因组呈双链环状, DNA 碱基对组成长度为 7 500~8 000 bp, 其中含有 8 个开放阅读框, 按其功能小同分为 3 个功能区域, 即早期区、晚期区和非编码区。其中, 由早期区(E 区)所编码的蛋白是与其 DNA 表达、调控及转化等重要生命过程密切相关的, 如 E1、E2、E6、E7 等, 而 E6 和 E7 蛋白是菌株发生变异所必需的物质; 晚期区(L 区)主要编码衣壳蛋白, 产生完整病毒颗粒, 而非编码区则主要调控病毒基因的表达。目前已经鉴别出的 HPV 类型已经达到了大约 100 种^[9-10], 常会引起人体生殖道、皮肤及粘膜感染。根据不同类型病毒

株的致病潜力,可以将 HPV 分为高危型和低危型,而高危型人乳头瘤病毒,主要是指 HPV16 型和 HPV18 型,与妇科患者宫颈癌的发生密切相关。已有研究表明^[11],60%的妇科宫颈癌患者组织中都可以检测到 HPV16 型,其次为 HPV18 型,很少检测到其他型别,并且 HPV16 型病毒株中存在 2 个重要的病毒致瘤基因:E6 和 E7 基因,它们以整合形式存在于人体基因组内,引起细胞基因组 DNA 损伤的积累,使细胞调节蛋白失活而导致宫颈上皮细胞发生恶性转化。

持续感染 HPV16 和 HPV18 型病毒,是宫颈癌类妇科疾病发生、发展过程中最主要的诱因。与其他 HPV 病毒亚型相比,HPV16 型更易导致宫颈上皮内瘤变甚至宫颈癌^[12-13]。德国病毒学家通过大量流行病学和分子生物学研究发现,HPV 感染是宫颈癌病发生、发展的必要条件之一,也有研究统计发现 90%以上宫颈癌患者组织中都可以检测到高危型 HPV 病毒的基因组 DNA^[14]。目前 HPV16 的检测主要依赖形态学检测和分子生物学技术检测,本研究采用 PCR 扩增电泳技术以本院 2012—2014 年 12 月期间就诊的宫颈癌患者宫颈癌组织样本为对象,对 HPV16 分离株进行扩增、凝胶电泳检测,发现 HPV16 基因组片段约为 96 bp。而 HPV16 E6 基因约为 465 bp。因此,对于 HPV16 全基因组序列和 E6 基因都成功得到了扩增,这也证明了在宫颈癌患者中大多确实都能检测到 HPV 病毒。

一般来说,在核苷酸水平上,某一类型的 HPV 与其他类型的相似性不到 90%,但是当相似性达到 98%以上时则认为是型内变异体;通常根据长末端调控区序列和 E6 基因序列,将 HPV16 型分为欧洲型、亚洲型、亚洲美洲型、非洲-1 型、非洲-2 型 5 种主要变异体,并且这些病毒变异体通常很稳定,未发生基因重组的情况,但是有研究指出 HPV16 型病毒株常出现地理区域集中分布的现象^[15]。本研究通过对 HPV16 全基因组进行测序发现,宫颈癌患者感染的 HPV16 存在很多种突变方式,部分突变位点发生在编码区,部分突变位点则发生在非编码区。因而,根据 HPV16 基因突变位点差异,可以进一步分为:欧洲 E 型变异体、亚洲型 As 型变异体、亚美型 AA 型变异体、非洲-1 型 Af1 型变异体、非洲-2 型 Af2 变异体和北美型 NA 变异体。进化分析发现,将 HPV35 E6 基因序列作为外类群参考,引入 HPV16 变异体 AF472508 和 AF472509,EG350 所代表的欧洲变异体中最常见的 350 位点发生了 T 到 G 的突变。因此,HPV16 E6 基因的进化树分析结果表明非洲株单独构成分枝。本研究测序的样本没有与三者位于同一分枝的,且样品 T11 和 T19 为 Ep 型变异体,而 T01,03,05,07,08,

10,12,14 为 As 型变异体。

流行病学的研究表明,HPV16 的不同分支致癌能力不同,这就可能会对宫颈癌的临床治疗结局产生不同影响。有研究认为,致癌能力不同可能与癌基因 E6、E7 的突变相关^[16]。本研究通过宫颈癌患者的组织样本中感染的 HPV16 病毒的 E6 基因测序比对,分析其突变情况来探讨其与宫颈癌发生、发展间存在的可能的相关性。本研究中,通过软件对 HPV16 E6 基因进行基因序列比较后发现,30 份样本中发生突变的菌株达到了 76.67%,其中错义突变位点包括:176 位点 G→A 的突变、178 位点 T→G 的突变、296 位点 T→G 的突变、350 位点 T→G 的突变、442 位点 A→C 的突变、443 位点 G→A 突变、525 位点 G→A 的突变。而 178 位点的 T→A 突变和 241 位点的 T→G 突变均为无义突变。本研究结果提示,宫颈癌患者的 E6 基因序列变异频率发生最高的位点,且常发生在 178 位点上的 T→G。且也有研究已经证实,此变异株在东亚人种中出现的概率要明显高于其他地区,所以该突变位点被认为是东亚型病毒分支的特异性变异^[17]。

此外,本研究还发现,30 例宫颈癌患者组织样本中 As 型变异体和 E 型变异体的变异株位居主导地位。由此可以认为,与其他国家 HPV16 感染的流行情况不同,As 型变异体是中国最流行的一种 HPV16 分支,然后是 E 型变异体,这对于指导 HPV 病毒感染的宫颈癌类疾病的防治具有重大意义。与 HPV 病毒致癌发生、发展紧密相关的 E6、E7 等基因,存在着多种序列变异方式,本研究中宫颈癌患者样本中,以 As 型变异体和 E 型变异体为两种最主要的 HPV16 亚型分支。因此,及时发现 HPV16 持续感染人群、尽早确诊宫颈癌病变患者,并进行有效治疗是降低宫颈癌发病率及死亡率的最有效途径,因而 HPV16 的检测也就显得至关重要。随着未来对 HPV 病毒感染及新技术的深入研究,将会为感染 HPV16 的宫颈癌患者的临床治疗提供新的手段和依据。

【参考文献】

- [1] Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7 and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1060—6.
- [2] 杨燕, 刘会玲, 虎锡, 等. 兰州地区女性感染 HPV 及其基因类型分析[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(21): 4069—71.
- [3] Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution[J]. Virology, 2005, 337(1): 76—84.
- [4] 丁晓华, 蔡红斌, 张帆, 等. 98 例宫颈癌人乳头瘤病毒 16 型 E6 基因突变及多态性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(11): 989—92.

(下转 347 页)

- malaria; a pathological study[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 44(2): 168-75.
- [11] AR B, GD T, CI N. Cerebral Malaria: The sequestration hypothesis[J]. Parasitol Today, 1994, 10(10): 412-4.
- [12] Clark IA, Rockett KA. The cytokine theory of human cerebral malaria[J]. Parasitol Today, 1994, 10(10): 410-2.
- [13] Wu X, Gowda NM, Kumar S, et al. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses[J]. J Immunol, 2010, 184(8): 4338-48.
- [14] 彭小红, 陈琳, 黄复生. NK 细胞在 TLR9 激动剂 CpG 抑制肝期约氏疟原虫发育中的作用[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(9): 675-8, 附页 1.
- [15] 孙斐, 赵春澎, 许兵红. 小鼠感染伯氏疟原虫后 TLR2、9、11 及其下游因子表达量的变化[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(10): 759-61.
- [16] Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(6): 1919-24.
- [17] Griffith JW, O'Connor C, Bernard K, et al. Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host[J]. J Infect Dis, 2007, 196(10): 1553-64.
- [18] Maglino M, Klopffleisch R, Seeburger PH, et al. The C-type lectin receptor DCIR is crucial for the development of experimental cerebral malaria[J]. J Immunol, 2013, 191(5): 2551-9.
- [19] Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, et al. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria[J]. J Exp Med, 2008, 205(5): 1133-43.
- [20] Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria[J]. Science, 1987, 237(4819): 1210-2.
- [21] Grau GE, Heremans H, Piguet PF, et al. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(14): 5572-4.
- [22] Van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, et al. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(4): 1082-95.
- [23] Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(12): 4814-9.

【收稿日期】 2015-03-10 【修回日期】 2015-04-17

(上接 342 页)

- [5] Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, et al. Persistence of high risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women[J]. J Med Virol, 2010, 82(4): 616.
- [6] Wu Y, Chen Y, Li L, et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China[J]. J Gen Virol, 2006, 87(5): 1181-8.
- [7] Briolat J, Dalstein V, Saunier M, et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN[J]. Int J Cancer, 2007, 121(10): 2198.
- [8] 郭洁, 朱中元, 王海波, 等. 通用引物 PCR 法在人乳头瘤病毒基因检测中的应用[J]. 中国热带医学, 2007, 7(5): 693-4.
- [9] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1072-9.
- [10] Munoz N, Hernandez-Suarez G, Mendez F, et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women[J]. British J Cancer, 2009(100): 1184.
- [11] 丁晓华, 张帆, 蔡红斌, 等. 中国湖北地区 HPV16 型 E6 和 E7 基因变异和进化发生学研究[J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 368-72.
- [12] 海米提·阿布都力木, 米开热木·麦麦提, 拉莱·苏祖克. 新疆妇女子宫颈病变组织中 HPV16 E6 基因突变分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(5): 513-8.
- [13] 向华国, 曾锦婷, 何婉意, 等. PCR-反向点杂交基因分型与实时荧光定量 PCR 检测人乳头瘤病毒的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(5): 367-8, 372.
- [14] 熊光武, 袁杨, 李萌, 等. 北京地区宫颈癌 HPV16 上游调控序列、E6、E7 癌基因序列初步分析[J]. 遗传, 2010, 32(4): 339-47.
- [15] 曹泽毅. 中华妇产科学(临床版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 565-75.
- [16] 张乔, 王诗卓, 魏恒, 等. 持续感染状态的 HPV-16 及 HPV-58 亚型在宫颈上皮内瘤变及宫颈癌中的分布及意义[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(23): 3564-7.
- [17] 杨英捷, 赵健, 廖秦平. 北京地区人乳头瘤病毒 16 型感染及其 E6/E7 基因变异与宫颈病变的相关性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(1): 32-4.

【收稿日期】 2015-02-02 【修回日期】 2015-04-11