

文章编号:1007-7383(2011)04-0465-06

维吾尔族子宫颈癌中 HPV16 变异体的初步研究

王刚刚,刘琳,尤伟艳,梁伟华,蒋金芳,李洪安,胡建明,常彬,赵瑾,李锋

(石河子大学医学院/新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,石河子 832003)

摘要:为检测新疆维吾尔族宫颈癌中 HPV16 变异情况,并建立 HPV16 系统生成树。选用 HPV16 感染的维吾尔族宫颈癌 40 例,德国 HPV16 标准株做阳性对照,PCR 扩增 HPV16 E6 后纯化并双向测序;应用 Lasergene、DNASTar、clustal 1.83、Mega 4.1 软件对 HPV16 E6 序列进行比对分析,并最终生成系统生成树。结果显示:在 40 例维吾尔族宫颈癌中发现 HPV16 变异位点 4 个:350nt(T→G),310nt(T→G),295nt(T→G),135nt(A→C);变异率最高位点为 350nt(71%,20/28);相应氨基酸变化为 L→V,F→L,D→E,K→T。通过系统生成树发现,本组样本全为欧洲变异体;HPV16E6 350 位点变异与分化程度及年龄分组分别作比较($P>0.05$),两者之间无统计学差异。由此可知,从系统生成树角度分析,维吾尔族宫颈癌中 HPV16 变异体为欧洲变异体;突变率最高位点为高危的 350 位点,其次为 310、295、135 位点,这些变异位点与维吾尔族宫颈癌的相关性有待进一步研究。

关键词:宫颈癌;人乳头状瘤病毒 16;变异

中图分类号:X **文献标识码:**A

HPV16 Variants in Uighur's Cervical Cancer

WANG Ganggang, LIU Lin, YOU Weiyan, LIANG Weihua, JIANG Jinfang,

LI Hongan, HU Jianming, CHANG Bin, ZHAO Jin, LI Feng

(Medical College of Shihezi University/Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832003, China)

Abstract: Objective to detected the variants of HPV16 and structured HPV 16 variants' phylogenetic tree of Uighur's cervical squamous cell carcinoma(CSCC). Methods: selecting 40 cases of Uighur's CSCC, which had HPV16 infected; Using HPV16 standard strain as positive control and amplify HPV16 E6 genes, which were sequenced, blasted and analyzed by Lasergene, DNASTar. Finally, phylogenetic tree of HPV16 was drawn by using clustal 1.83, Mega4.1 program; all the statistical dates were analyzed by SPSS17.0 software package. 4 variant sites of HPV16 were found in 40 cases of Uighur's CSCC: 350nt(T→G), 310nt(T→G), 295nt(T→G), 135nt(A→C); the most frequently variant site was 350nt, (71%, 20/28); The variation of corresponding amino acids were L→V, F→L, D→E, K→T. Following by phylogenetic tree was structured, we found all of the cases in this group were E variant; Compared HPV 350 site's variant rate with age, differentiation degree, their relations were no statistical significance($P>0.05$). By the aspect of phylogenetic tree, the variant of HPV16 was E variant in Uighur's CSCC; the most frequently variant sites were 350, the follow sites were 310, 295, 135 sites. It need further research to identify if these variant sites and variant branch were related with CSCC.

Key words: cervical squamous cell carcinoma; HPV16; variant

人乳头瘤病毒(Human Papillomaviruses, HPV)为直径 52~55 nm 的二十面体病毒,属于乳头瘤多空病毒科乳头瘤病毒属,人类是其唯一的宿主,皮肤及

粘膜组织可被感染。根据未知 HPV 型 L1 序列与已知 HPV 型 L1 序列同源性,可对未知 HPV 进行定义,如果 L1 序列同源性小于 90%,则定义为新的

收稿日期:2011-05-17

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2009BAI82B03);国际科技合作与交流专项(2010DFB34100)

作者简介:王刚刚(1982-),男,硕士生,专业方向为肿瘤病理学。

通讯作者:李锋(1963-),男,教授,博士生导师,从事肿瘤病理学研究;e-mail: lifeng7855@yahoo.com.cn。

型(Type);如果 L1 序列同源性在 90%~98%,则定义为已知 HPV 型的亚型(Subtype);如果 L1 序列同源性大于 98%,则定义为已知 HPV 型的变异体(Variant)。目前,Yamada 所描述的 HPV16 变异体可分为如下几支:欧洲变异体(Eropean variant,E)、亚洲变异体(Asia variant,As)、亚-美洲变异体(Asia-American variant,AA)、非洲 1 变异体(Africa-1 variant,Af-1)、非洲 2 变异体(Africa-2 variant,Af-2)、北美 1 变异体(North American 1,NA-1)^[1]。HPV 变异体的分布有明显的地域性差异与种族差异。

宫颈癌的主要病因有已经公认的高危型人乳头瘤状病毒(High risk-human papilloma virus,HR-HPV)感染,研究发现某些 HPV16 变异体及某些位点的变异能增加患宫颈癌的风险。本实验通过软件客观地建立维吾尔族宫颈癌中 HPV16 变异体的系统发生树,初步研究维吾尔族宫颈癌中 HPV16 变异体的分布情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例收集 收集宫颈癌样本选取新疆喀什地区陆军第 12 医院和喀什地区人民医院病理科 2001~2009 年间维吾尔族宫颈鳞癌经手术切除、福尔马林固定、石蜡包埋组织,蜡块保留时间从 3~10 年不等。HPV16 经深圳亚能膜芯片技术检测为 HPV16 阳性病例 40 例宫颈癌为研究对象。患者年龄 25~65 岁,中位 45.00 岁,平均(45.11±10.482)岁。HPV16 质粒由德国海德堡大学 HAUSEN 教授馈赠。

1.1.2 引物

引物序列等详见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 Sequences of PCR primers

基因	引物序列	扩增片段大小
β-globin	For: 5'-CAGACACCATGGT-GCACCTGAC-3'	210bp
	Rev: 5'-CCAATAGGCAGAGAGTCATG-3'	
HPV16 E6	F1: 5'-AAACTAAGGGCGTAACCGAAA-3'	214bp
	R1: 5'-GTCATATACCTCACGTGC-CAGT-3'	
HPV16 E6	F2: 5'-ACTGCGACGTGAG-GTATATGA-3'	343bp
	P2: 5'-CAGCTGGGTTTCTC-TACGTGTT-3'	

PCR 引物包括 β-globin、HPV16 E6 引物,均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 DNA 及质粒抽提试剂盒 Qiagen 石蜡组织提取试剂盒(凯杰生物技术上海有限公司)、高纯质粒小量制备试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HPV16 质粒的抽提及检测 (1)感受态细胞的培养、转染:挑取 DH5α 大肠杆菌原种,在 LB 琼脂板上划线,培养过夜,挑菌到 LB 液体培养基中,摇菌,移至离心管冰浴,离心回收细菌沉淀,加入冰预冷的 CaCl₂ 悬浮细菌沉淀,加入 4 mL 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬细菌沉淀,这时的细胞可直接用于转化实验。加甘油至终浓度为 15%~20%,混匀,分装成 200μL/份,-70℃冻存。取感受态细胞中加入连接产物,冰浴,水浴热激,立即冰浴;加液体 LB 复活;取 200 μL 铺于含 100 μg/mL Amp、X-gal 和 IPTG LB 平板;37℃恒温培养箱培养 12~16 h 后观察。(2)摇菌及封存甘油菌制备和冻存:无菌条件下取小量培养的重组质粒的菌液 1 mL 加入 1.5 mL Ep 管中,再加入 40%甘油 0.5 mL,混匀后用塑料薄膜封口,-80℃保存。(3)质粒抽提:从恒温摇床中取出培养的成云雾状浑浊的细菌,离心,弃上清,收集菌体,用溶液 P1 重悬菌体沉淀,漩涡振荡,加入溶液 P2 混合,使菌体充分裂解,直至溶液变得清亮,加入溶液 P3,立即温和翻转,室温放置 5 min,离心,取上清;将上清液加入吸附柱 AC 中,离心,弃滤液。加入去蛋白 PE,离心,弃滤液。加入漂洗液 WB,离心,弃滤液。空柱,离心,室温晾干;取出吸附柱 AC,放入离心管中,加入双蒸水,室温放置 1 min,离心洗脱 DNA,即为提取的质粒 DNA 溶液,-20℃保存,取 1 μL 在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测其纯度。

1.2.2 基因组 DNA 的制备及检测 组织切片(5 μm)10 张,装入 2.0 mL 的灭菌 Ep 管中;加入二甲苯脱蜡,离心,弃上清,加入无水乙醇,离心弃上清,晾干,加细胞裂解液轻混,加蛋白酶 K 轻混,封口,水浴过夜;95℃水浴 5 min 灭活蛋白酶 K,离心,迅速加入 Buffer AL,震荡混匀,加入无水乙醇,震荡混匀;离心后转移全部裂解液至 QIAamp 层析柱,离心,将柱子放入干净收集管,打开柱子,加入 Buffer AW1(用前轻混),离心,将柱子放入干净收集管,打开柱子,加入 Buffer AW2,离心;将柱子放入干净收集管,全速离心,使膜完全干燥;将柱子放入干净

的 Ep 管中(试剂盒未提供),打开柱子,加入 Buffer ATE,室温下盖盖孵育,全速离心,所得产物-20℃冻存储用。NanoDrop 分光光度计定量检测 DNA 浓度及纯度。

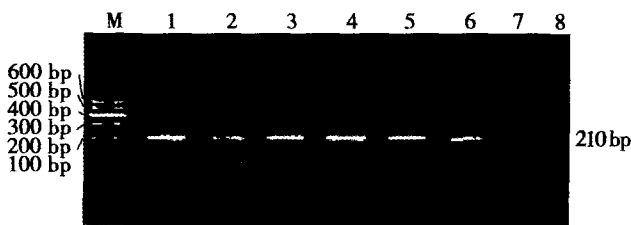
1.2.3 PCR 扩增目的片段 25 μL 的反应体系检测 β-globin、HPV16E6F1R1、HPV16E6F2P2,见表 2。

反应条件:94℃ 4 min(1×);94℃ 45 s,退火 45 s,72℃ 45 s(35×);72℃ 10 min(1×)。退火温度由左到右分别为 56℃,54℃,56℃,52℃。扩增完后在 2%琼脂糖凝胶中电泳检测 PCR 产物质量。质量合格 PCR 产物送交 Invitrogen 公司纯化后,双向测序。

表 2 PCR 反应体系
Tab.2 Systems of PCR reactions

体系	β-globin	E6F1R1	E6F2P2
dd H ₂ O	18.7 μL	16.5 μL	16.5 μL
10×PCRBUFFER(Mg ²⁺ plus)	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
dNTP(10 mmol/L)	0.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
For primer (25 μmol/L)	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Rev primer (25 μmol/L)	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Taq DNA polymerase(5 U/μL)	0.3 μL	0.5 μL	0.5 μL
Template DNA	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL

1.2.4 HPV16 变异体进化树构建 参照序列 Gen-Bank 编码如下:SihaHPV16E6(AF003019.1);CaskiHPV16E6(AF003018.1);HPV16EP(K02718.1);HPV16E131G(AF536179.1);HPV16As(AJ388066.1);HPV16AA(AF402678.1);HPV16Af1(AF536180.1);HPV16Af2(AF486324.1) HPV16NA-1(AF486325.1);Xinjiang HPV16E6(AF327851.1)。



M:marker;1-5:样本;6:阳性对照;7:阴性对照;8:空白对照

图 1 宫颈癌 β-globin 扩增电泳

Fig.1 Electrophotogram of β-globin amplification in cervical cancer

用 Chromas 软件查看测序波峰图,用 DNASTar 软件中 Seqman 程序分析、拼接、与标准序列比较发现其中变异位点,后用其中 EditSeq 程序将拼接好的核苷酸序列与标准序列翻译为氨基酸序列并加以比对分析发现氨基酸变化,应用 Clustal 1.80 将核苷酸序列比较并将文件的格式由“*.seq”转变“*.aln”,后者用 MEGA4.1 软件分析并构建 HPV16 系统发生树。

1.3 统计学分析

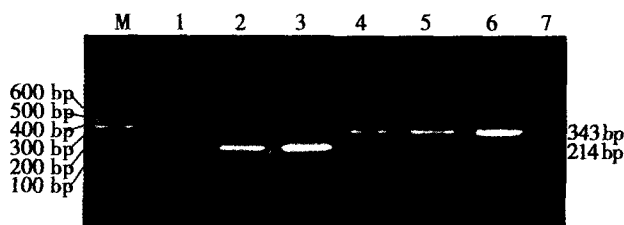
样本 HPV16 变异与临床病例资料分析,采用卡方检验分析两两之间的相关性。计数资料用率或构成比表示,计数资料组间的比较使用行×列表资料的 χ^2 检验, $P<0.05$ 视差异性有统计学意义。所有数据用 SPSS17.0 软件包处理。

2 结果

2.1 基因组 DNA 检测结果

所选新疆维吾尔族宫颈癌 40 例,经 β-globin PCR 扩增检测成功 37 例。PCR 扩增产物做 2%琼脂糖凝胶电泳,210 bp 处出现目的片段(图 1),说明样本 DNA 均可用于 HPV16 变异检测。

维吾尔族宫颈癌中 β-globin PCR 扩增检测阳性 37 例样本,全用于 HPV16 E6 扩增。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,214bp(35/37 例)、343bp(31/37 例)处出现目的片段(图 2),说明实验样本可用于后续的测序。



M:marker;1-2:E6 F1R1;4-5:E6 F2P2;3,6:阳性对照;7:阴性对照

图 2 宫颈癌 HPV16E6 扩增电泳

Fig.2 Electrophotogram of HPV16 E6 amplification in cervical cancer

2.2 HPV16 变异位点分布

扩增目的片段 E6 测序波峰图用 Chromas 及 DNASTar 软件查看并分析序列。维吾尔族宫颈癌 37 例,28 例测序成功,E6 变异率 71%(20/28),其中 T350G 变异率 71%(20/28),178 位点未见变异,发生 T310G 变异 1 例(152 号),T295G 变异 1 例(167 号),A135C 变异 1 例(167 号)。

结果见图 3 和表 3。

表 3 28 例维吾尔族子宫颈癌中 HPV16 E6 变异情况

Tab.3 Variations of HPV16 E6 in 28 cases
Uighur's cervical cancer

例数	E6 变异位点				氨基酸突变
	350	310	295	135	
8	T	T	T	A	未变异
18	G				L→V
1	G		G	C	K→T/D→E/L→V
1	G	G			F→L/L→V

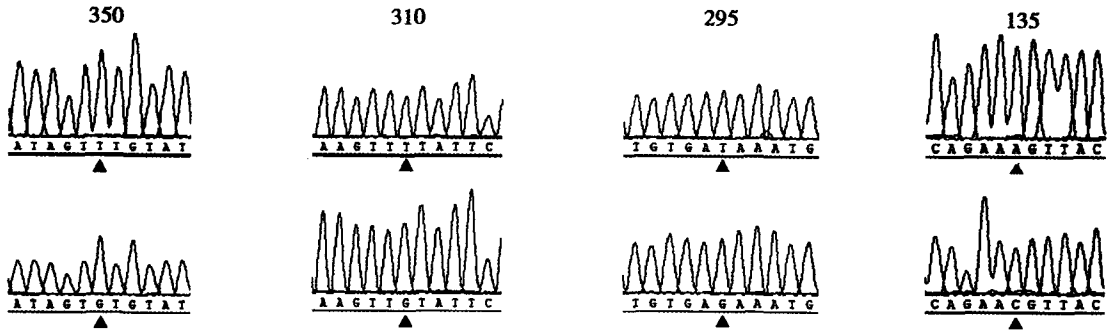


图 3 宫颈癌 HPV16E6 变异位点波峰图

Fig. 3 Wave crests of HPV16 E6 variant sites in cervical cancer

注:上层为正常波峰图,下层为变异位点的波峰图。▲分别指向相应变异位点。

2.3 系统进化树构建分析

根据 HPV16E6 序列构建进化树,从图 4、5 可看出,NA-1、AA、Af1 与 Af2 变异体分支较晚,进化较慢,一直比较稳定,而欧洲变异体及 As 变异体则早早的就分支,相对不稳定,所选维吾尔族宫颈癌样

本欧洲变异体为主。19 例样本 121、132、134、138、140、142、143、149、150、152、155、164、166、167、170、175、178、183、246 归为欧洲变异体,其中 9 例样本 125、130、145、148、151、169、179、239、244 归为欧洲标准体。

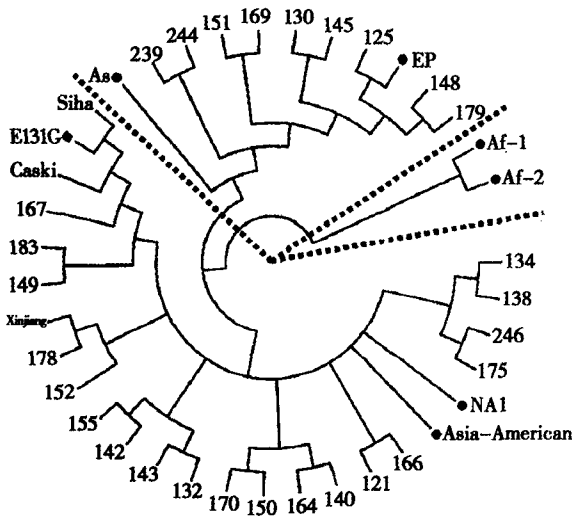


图 4 宫颈癌 HPV16 E6 无根树

Fig. 4 Unrooted tree of HPV 16 E6 in cervical cancer

注:●代表五大支变异体■代表欧洲变异体。
样本大致分支被虚线分开。

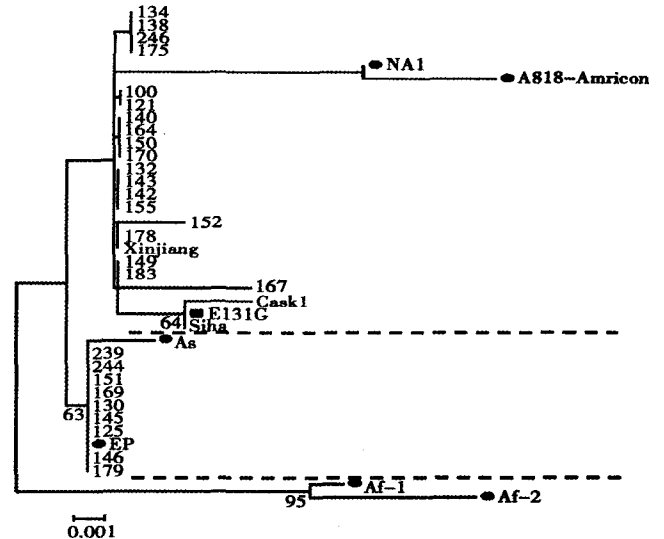


图 5 宫颈癌 HPV16 E6 有根树

Fig. 5 Rooted tree of HPV 16 E6 in cervical cancer

注:●代表五大支变异体■代表欧洲变异体。
样本大致分支被虚线分开“0.001”。

2.4 HPV16 变异与宫颈癌临床特征的相关性

宫颈癌中 HPV16 变异分型与组织分化程度相关性的比较结果见表 4。

在本实验中,维吾尔族宫颈癌有 HPV16 欧洲标准体(Ep)和 HPV16 欧洲变异体(E131G)2 种感染,感染率分别为 32. 14% (9/28)、67. 86% (19/28),以 HPV16 欧洲变异体为主。HPV16 变异体分型与组织学分化程度通过秩和检验,两者间没有

相关性($P>0.05$)。

表 4 宫颈癌中 HPV16 变异分型与组织分化程度相关性比较
Tab. 4 The correlation comparison between HPV16 variant branch and histo-differentiation degree in cervical cancer

变异类型	高分化	中分化	低分化	合计
Ep	6	2	1	9
E131G	11	5	3	19
合计	17	7	4	28

另外把 HPV16E6 350 位点变异与组织分化程度用秩和检验比较相关性,结果两者之间不存在相关性($P>0.05$),见表 5。HPV16E6 350 位点变异与年龄分组用确切概率法分析,相关性,结果两者之间不存在相关性($P>0.05$),见表 6。

表 5 宫颈癌中 HPV16 E6 350 位点变异与组织分化程度的相关性比较

Tab.5 The correlation comparison between HPV16 E6 variant of 350 site and histo-differentiation degree in cervical cancer

变异类型	高分化	中分化	低分化	合计
T	6	2	1	9
G	11	5	3	19
合计	17	7	4	28

表 6 宫颈癌中 HPV16 E6 350 位点变异与年龄分组间相关性比较

Tab.6 The correlation comparison between HPV16 E6 variant of 350 site and age groups in cervical cancer

年龄分组/岁	350G	350T	合计
≤30	1	0	1
31-40	4	2	6
41-50	7	1	8
51-60	4	1	5
≥61	1	3	4
合计	17	7	24

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一,发病率在女性癌症中仅次于乳腺癌。在我国新疆南疆地区维吾尔族宫颈癌呈现民族集聚高发现象,其汉族发病率明显低于维吾尔族^[2]。新疆南疆维吾尔族妇女宫颈癌的患病率由 527/10 万(2004 年)上升到 622/10 万(2008 年)^[3],近年其发病年龄趋于年轻化^[4]其发病率及死亡率在我国新疆少数民族中最高。目前宫颈癌的主要病因有已经公认的高危型人乳头瘤状病毒(High risk-human papilloma virus, HR-HPV)感染,另外与生活环境卫生状况差、多个性伴侣、多孕多产等环境因素和生活行为相关^[5]。其中 HPV 致癌的重要性逐渐成为研究热点。

3.1 HPV16 常见变异位点及其致癌性

HPV16 变异体中的某些特定位点的改变能增加肿瘤的易感性。大量文献报道某些位点变异后能增加疾病的易患风险。Rubén López-Revilla 等^[6]在墨西哥圣路易斯发现 1 个 AA 变异 AA-a (5.3%)及 3 个 E 变异:E-P (71.1%),E-T350G (18.4%),E-C188G (5.3%),未发现非洲变异体。

除了 E 变异外,还发现了 24 处新的核苷酸改变,其中最常见的是 A334G 变异,A334G 变异在高级别上皮内瘤变和侵袭性宫颈癌内所占比例要高于 E-P 相关的其他变异。作者认为 E-P A334G 变异相比于 E-P 原型更具有致癌性。

有研究认为 E6 的 T350G 变异与增加宫颈疾病进展的风险有关。Martha Grodzki 等^[7]报道在法国 HPV 持续感染(OR,2.4%;95%CI=1.3~4.3)和进展为高级别损伤(OR=4.2%;95%CI=2.1~8.1)的女性患者相比于其他高危 HPV 感染型更易受到 HPV16 的感染。值得关注的是,在隐匿有 HPV16 T350G 变异感染的女性中,感染呈持续进程者(OR=3.0;95%CI=1.4~6.7)和进展进程者(OR=6.2;95%CI=2.7~14.3)OR 值明显提高,Koji Matsumoto 等^[8]发现日本女性中 HLA DRB1 * 1502 与 HPV16 E 变异 D25E 感染呈正相关,而 HLA II 等位基因与 L83V 变异未发现相关性。这提示 HPV 之所以能够持续感染除了与各民族清除病毒能力差异有关外,还与民族易感 HPV 变异体类型及 HPV 病毒自身变异导致表达差异,而发生的免疫逃逸机制相关。

3.2 HPV16 变异致宫颈癌机理

E6 读码框内第 350 位碱基由 T 变为 G,密码子编码的第 83 位氨基酸由 L 变为 V,T350G(L83V)突变可以导致重要的编码蛋白改变,而这些改变的编码蛋白能增强下游信号途径的表达,如 HPV16 E6 T350G 变异在宫颈癌细胞株中可以增强 MAPK 通路信号,并且协同 Notch 信号通路和抑制 Ras 介导的转化而导致宫颈癌发生^[9]。HPV18 E6 变异可激活细胞存活和扩增中起重要作用的 Akt/PKB 及 MAPKs 信号通路^[10]。

新疆所处位置是欧亚大陆结合地,而且古代的政治婚姻以及战略人口迁徙、欧亚经商比较频繁,新疆地区民族就有 47 个,其中以维吾尔族和哈萨克族为主,这就为 HPV 形成多种变异提供了基础。对于新疆维吾尔族宫颈癌变异,前期研究者已有报道^[11-12],但是都未从病毒进化理论角度对宫颈癌中感染的 HPV16 变异体进行分析研究。本实验建立了新疆维吾尔族宫颈癌 HPV16 进化树,从进化理论角度更客观对 HPV16 变异体进行分析研究。发现维吾尔族宫颈癌以 HPV16 E 变异体为主,且主要变异位点为 350 位点,并发现 135、295、310 两个位点有变异。这与前期研究者报道相似,但是这些位点的变异与宫颈癌的相关性及 350 位点变异的致

癌机理需要进一步的研究。

3.3 问题与展望

目前,病毒致瘤学说越来越引起大家的重视,HPV16 属于高危致瘤病毒,已被公认为是诱发宫颈癌的危险因素之一,且在美国已有 HPV 四价疫苗在临床应用,四价疫苗是针对特异片段设计,而各地区 HPV 变异后是否使片段失去这种特异性,而致疫苗效力下降,值得每个关心此领域的人重视。HPV16 某些高危位点的变异对机体有很大的成瘤危险性。而本实验中这些位点是否变异在宫颈癌中表达会出现何种差异,此种差异是否与宫颈癌的发生有相关性?这还需要研究者在病毒致瘤领域做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Yamada T, Manos M M, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective [J]. *Virology*, 1997, 71(3): 2463-2472.
- [2] 姜淑清, 王涛, 土松爱, 等. 新疆策勒县宫颈癌的流行病学调查研究 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2006, 20(5): 379-381.
- [3] 陶林. TCT、DNA 定量分析和 HPV 检测对新疆维族宫颈癌的普查研究 [D]. 石河子大学, 2009.
- [4] 郝敏, 王静芳. 宫颈癌流行病学研究与调查 [J]. *国外医学妇幼保健分册*, 2005, 16(6): 405-407.
- [5] Munoz N, Franceschi S, Bosetti, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study [J]. *Lancet*, 2002, 359(9312): 1093-1101.
- [6] Lopez-Revilla R, Pineda M A, Ortiz-Valdez J, et al. Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosi City, Mexico [J]. *Infectious Agents and Cancer*, 2009, (4): 1-9.
- [7] Grodzki M, Besson G, Clavel C, et al. Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16E6-350G Variant [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2006, 15(4): 820-822.
- [8] Koji Matsumoto, Toshiharu Yasugi, Shunsuke Nakagawa, et al. Human papilloma-virus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(6): 919-922.
- [9] Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, et al. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic ras [J]. *J Virol*, 2004, 78(11): 5934-5945.
- [10] Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernandez E, Martnez-Ramrez I, et al. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway [J]. *Virology*, 2009, 383(1): 78-85.
- [11] 海米提·阿布都力木, 米开热木·麦麦提, 拉莱·苏祖克. 新疆妇女宫颈病变组织中 HPV16 E6 基因突变分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2009, 25(5): 513-518.
- [12] 朱开春, 玛依努尔·尼娅孜, 刘芳, 等. 新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 型 E6 基因变异分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(3): 209-212.