

宫颈肿瘤组织高危型 HPV 新分型检测方法的建立及应用

谢旺凯¹,王慧静¹,肖兰兰¹,计苏惠¹,王 俭¹,陈向敏²,邹阮敏³,
陈 俊⁴,薛向阳⁴

(1.温州医科大学第二临床学院,浙江 温州 325035;2.温州医科大学检验医学院、
生命科学学院,浙江 温州 325035;3.温州医科大学附属第一医院,浙江 温州
325000;4.温州医科大学微生物学与免疫学教研室、分子病毒与免疫研究所、热带
医学研究所,浙江 温州 325035)

摘要: [目的] 建立一种新型宫颈肿瘤组织高危型人乳头瘤病毒(HPV)检测及分型方法,并评价其临床应用。[方法] 基于我国人群流行的 5 种高危型 HPV (HPV 16、18、31、33、51)的 E6/E7 早期基因序列,设计特异性引物,以明确 HPV 型别的宫颈癌细胞株及宫颈肿瘤组织为模板,进行 PCR 检测,结合基因测序验证引物的特异性。进一步优化条件,建立高危型 HPV 多重 PCR 检测方法,检测 65 例宫颈肿瘤组织标本,与临床上使用的流式荧光杂交 HPV 检测方法比较,评价其敏感性和特异性。[结果] 成功建立可同时检测 5 种高危型 HPV 的多重 PCR 检测方法,对 65 例宫颈肿瘤组织进行高危型 HPV 检测,检出率为 72.3%,明显高于临床流式荧光杂交检测法的检出率(32.31%)($\chi^2=3.86, P<0.05$)。[结论] 基于 HPV E6/E7 早期基因的高危型 HPV 多重 PCR 检测方法是特异、灵敏的高危型 HPV 检测方法。

关键词: 人乳头瘤病毒;多聚酶链反应;基因分型;宫颈肿瘤

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)11-0889-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.11.B006

The Establishment and Application of A New Method for Detecting the High-risk Human Papillomavirus in Cervical Tumor Tissues

XIE Wang-kai, WANG Hui-jing, XIAO Lan-lan, et al.

(The Second Clinical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: [Purpose] To establish a new method for typing the high-risk human papillomavirus (HPV) in the cervical cancer tissues and to evaluate its clinical application. [Methods] According to the sequences of E6/E7 genes of 5 high-risk HPV types (HPV 16, 18, 31, 33 and 51) prevailing in China, the type-specific primers were designed. DNA templates from the tissues and cells of cervical cancer with known HPV genotypes were amplified with the type-specific primers by PCR. Gene sequencing verified their specificity of these type-specific primers. After optimized the conditions, a high-risk type HPV multiplex PCR assay was established. Then, the established HPV multiplex PCR assay was used to detect the HPV genotypes of 65 cases of cervical tumor tissues. The sensitivity and specificity were further evaluated when compared with the xMAP technology which was widely used in clinic. [Results] The multiplex PCR method detecting 5 types of high-risk HPVs was successfully established. In 65 cases of cancer tissues, HPV was detected in 72.3% cervical tumor tissues by multiplex PCR method which was significantly higher than that in Kit detection (32.31%) ($\chi^2=3.86, P<0.05$). [Conclusion] The established HPV multiplex PCR assay based on the design of E6/E7 genes is a specific and sensitive method for the detection and genotyping of high-risk HPVs.

Subject words: human papillomavirus; polymerase chain reaction; genotype; cervical neoplasms

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是

一类具有高度组织和种属特异性双链闭环无包膜 DNA 病毒,目前发现的 HPV 型别有约 200 种,在感染人的 40 多种 HPV 中,低危型(如 HPV6、11)主要引起尖锐湿疣及乳头瘤等皮肤黏膜良性病变,高危型(如 HPV16、HPV18 及 HPV33 等)与宫颈癌、阴茎

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ15C010002, LY14H190003)

通讯作者: 薛向阳,副教授,硕士生导师,博士;温州医科大学微生物学与免疫学教研室、分子病毒与免疫研究所、热带医学研究所,浙江省温州市茶山镇(325035);E-mail: wzxyy001@163.com

收稿日期: 2015-06-10; **修回日期:** 2015-08-04

癌等多种恶性肿瘤关系密切^[1]。建立高危型 HPV 检测及分型的方法对 HPV 相关肿瘤的筛查及疫苗的研制有重大意义^[2,3]。

HPV 基因组可分为早期区、晚期区及上游调节区(URR)或长控制区(LCR)或非编码区(NCR)。早期区编码 E6、E7、E1(E8)、E2、E4 (E3)、E5 等 5~8 个基因,晚期区编码 L1 和 L2 病毒结构蛋白^[4]。目前 HPV 的检测及分型主要针对 L1 基因展开^[5]。但众多研究发现,在大多数的宫颈癌病例,由于 HPV DNA 整合到宿主染色体,L1 衣壳蛋白基因常发生断裂丢失^[6],这严重限制了基于 L1 基因的 HPV 检测。已经明确,HPV 基因组的整合导致 HPV 编码的 2 个病毒源性癌蛋白 E6、E7 过度表达是宫颈癌发生发展重要机制^[7]。因此,E6/E7 早期基因被认为是宫颈肿瘤组织中 HPV 检测的主要靶点^[8]。本研究选取中国人群中常见的 5 种高危型别 HPV16、18、31、33、51^[9]作为研究对象。以 HPV E6/E7 基因作为检测靶点,利用多重 PCR 的高特异性与高敏感性^[10],建立一种能同时检测 5 种高危型 HPV (HPV16、18、31、33、51)的新 HPV 分型检测方法,并评价其临床应用。

1 资料与方法

1.1 材 料

1.1.1 标本采集及保存

65 例宫颈肿瘤组织标本 2010 年 12 月到 2012 年 4 月采自温州医科大学附属第一医院及附属第二医院的妇产科手术患者并经病理确诊,其中宫颈上皮内瘤样病变(CIN) 1 级 11 例,CIN 2 级 19 例,CIN 3 级 20 例,宫颈鳞癌 13 例,宫颈腺癌 2 例。患者年龄最小 25 岁,最大 69 岁,平均年龄 41 岁。所有患者在术前均未进行放、化疗等治疗。标本离体后 20min 内液氮保存。所有标本征得患者及或家属的同意并签署知情同意书。HPV16 阳性的 Siha 细胞、HPV18

阳性的 HeLa 细胞及 HPV 阴性的脐静脉内皮细胞购自美国 ATCC,由本实验室常规培养保存。

1.1.2 主要试剂

DNA 抽提试剂盒 TIANamp Genomic DNA Kit (DP304)、2×Taq PCR MasterMix(KT201)购自天根生化科技(北京)有限公司; Multiplex PCR Kit (Cat.No. 206143)购自德国 Qiagen 公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 DNA 模板的抽提

按照 TIANamp Genomic DNA Kit (DP304)DNA 提取试剂盒中的操作步骤,抽提宫颈肿瘤组织和 Siha、HeLa 细胞的 DNA。用分光光度仪(德国 EPENDORF 公司)检测 DNA 的浓度和纯度,并将 DNA 模版稀释到 100ng/μl,-20℃保存备用。

1.1.4 5 种高危型 HPV 特异扩增引物的设计

从 NCBI 基因组数据库下载 HPV 基因组,采用 ClustalW2 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 分析不同 HPV 型别 E6/E7 基因同源性,利用 Primer 6.0 及 Oligo7.0 软件设计 HPV16、18、31、33、51 5 种我国常见的 HPV 型别的特异性引物 (Table 1)。

1.2 方 法

1.2.1 引物特异性的验证

以 0.1ng 明确 HPV 分型的宫颈肿瘤标本和细胞株的 DNA 为模板,分别以 HPV16、18、31、33、51 的 E6/E7 特异性前向、反向引物进行 25μl 反应体系的 PCR 扩增。反应体系包括:12.5μl 2×Taq PCR MasterMix,0.2μmol/L 前、反向引物。反应条件为:95℃,2min 预变性,94℃,30s 变性,分别以 55℃ (HPV 51)、57℃ (HPV 16、18、31)、63℃ (HPV 33),30s 退火,72℃,2min 延伸,35 个循环,最终 72℃,5min 延伸。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分析,切胶回收目的片段,送上海生工生物工程有限公司进行基因测序,并与已公布的各型别 HPV 基因序列比较,验证引物的特异性。

Table 1 The specific primers of 5 types of HPV

HPV	Sequence		Product's molecular size (bp)
	Forward	Reverse	
HPV 16	5'-GTG GAC CGG TCG ATG TAT GTC T-3'	5'-TCC GGT TCT GCT TGT CCA GC-3'	209
HPV 18	5'-AGT GCC ATT CGT GCT GCA AC-3'	5'-ATG TTG CCT TAG GTC CAT GCA T-3'	98
HPV 31	5'-GTG GAC AGG ACG TTG CAT AGC A-3'	5'-GGT CAG TTG CCT CAG GTT GCA-3'	124
HPV 33	5'-AAT ATT TCG GGT CGT TGG GC-3'	5'-AAC GTT GGC TTG TGT CCT CTC A-3'	274
HPV 51	5'-AAT GCG CTA ATT GCT GGC AA-3'	5'-TGC TCG TAG CAT TGC AAG TCA A-3'	143

1.2.2 5 种高危型 HPV 多重 PCR 检测方法的建立

以 0.1ng 明确 HPV 分型的宫颈肿瘤标本和细胞株的 DNA 为模板,以确定的 HPV16、18、31、33、51 型特异性引物按 3:5:7:8:5 的比例混合进行多重 PCR。反应体系包括:12 μ l 引物混合物,1 μ l RNase-free water,25 μ l Taq Mix,10 μ l Q-Solution+。反应条件为:以 64 $^{\circ}$ C~58 $^{\circ}$ C 为退火温度进行降落 PCR,再以 57.5 $^{\circ}$ C 退火温度进行 27 次循环。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析结合测序,并对比各型别 HPV 的单一 PCR 产物电泳图谱,验证多重 PCR 检测方法的特异性。在此基础上,将 DNA 模板做 10 倍系列稀释,进行多重 PCR,验证建立的 5 种高危型 HPV 多重 PCR 检测方法的敏感性。

1.2.3 宫颈肿瘤组织高危型 HPV 检测

65 例宫颈肿瘤组织样本采用本研究建立的高危型 HPV 检测方法进行检测。同样的 65 例样本采用流式荧光杂交 HPV DNA 分型试剂盒(上海透景生物科技有限公司 HPV 分型试剂盒)平行进行 HPV 分型检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 对相关实验数据进行统计学处理,组间差异比较采用 χ^2 检验,检测水准以 $\alpha < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 种高危型 HPV 特异性 PCR 引物的验证

以明确 HPV 分型的宫颈肿瘤标本和细胞株的 DNA 为模板,进行特异性 PCR,结果显示(Figure 1),HPV16、18、31、33、51 的特异性引物可扩增预期的特异条带,PCR 产物测序结果与 HPV 基因序列进行同源性比较,扩增片段与对应目的基因片段序列匹配,提示设计的 5 种高危型 HPV 引物可特异性扩增目的基因。

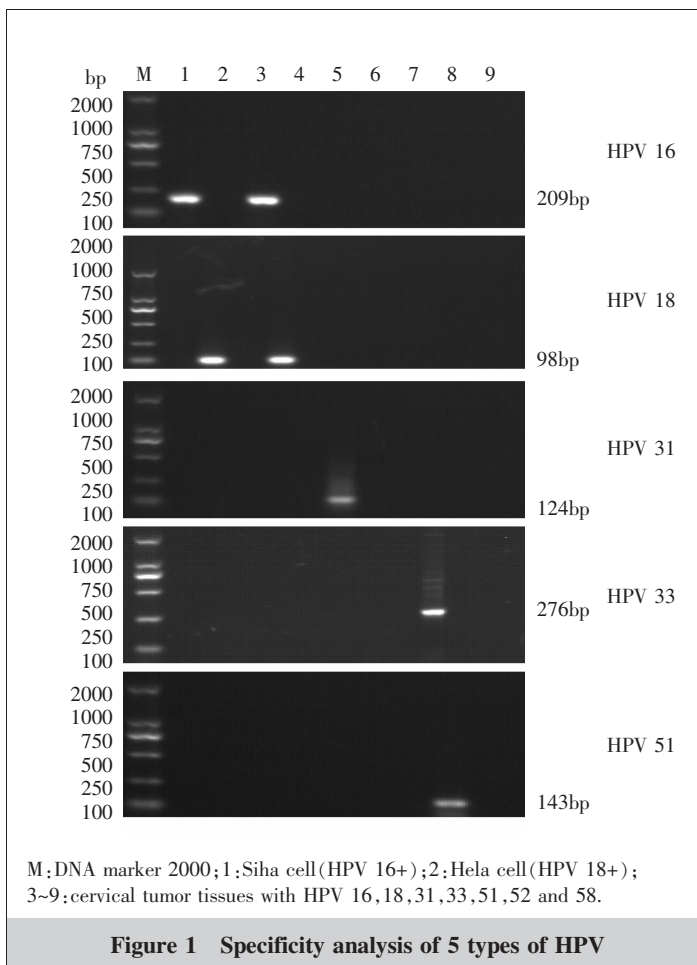
2.2 多重 PCR 方法的建立

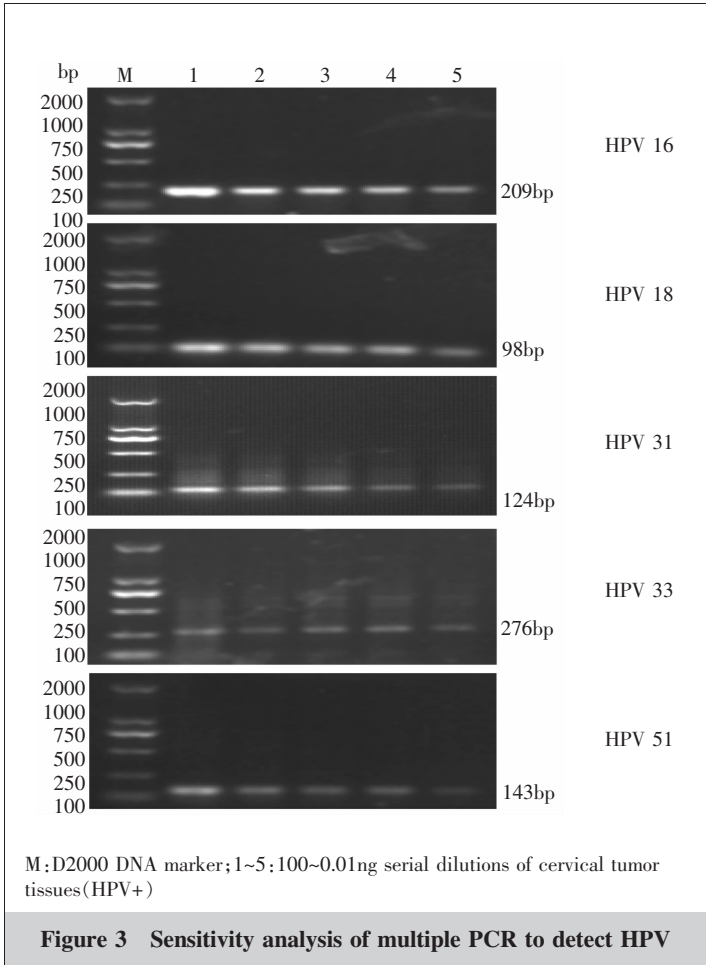
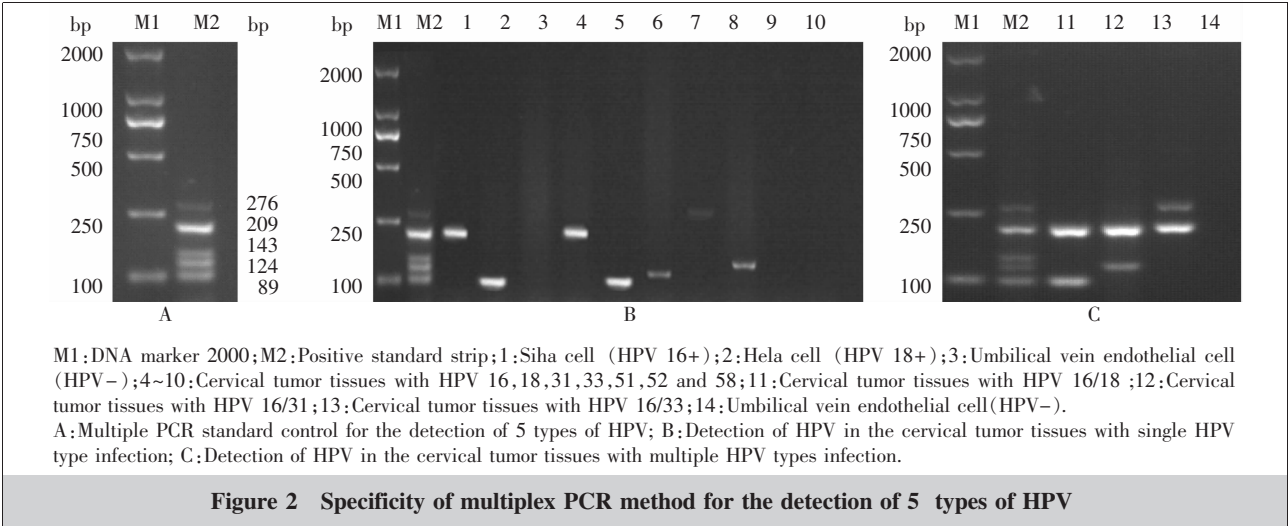
根据上述结果,将 5 种高危型 HPV 特异性 PCR 引物按比例混合,并优化条件,建立 HPV16、18、31、33、51 5 种型别多重 PCR 检测方法。图 2A(Figure 2A)是 5 种 HPV 型别多重 PCR 标准对照条带。与单一 HPV 型别 PCR 相同,多重 PCR 扩增 HPV16、18、31、33、51 阳性

的宫颈肿瘤标本和细胞株的 DNA 标本一并出现单一电泳条带,而 HPV52、58 型阳性的宫颈肿瘤组织及脐静脉内皮细胞未出现阳性条带(Figure 2B)。此外,建立的多重 PCR 还可同时检测多种 HPV 型别感染的宫颈肿瘤组织(Figure 2C)。这些结果提示,建立的多重 PCR 可特异检测 HPV16、18、31、33、51 5 种 HPV 亚型。为了进一步分析多重 PCR 方法的检测灵敏度,以 100ng、10ng、1ng、0.1ng、0.01ng 不同 HPV 型别阳性的 DNA 作为模板进行检测,结果显示,DNA 模板量低至 0.01ng 仍能扩增特异目的片段(Figure 3)。

2.3 宫颈肿瘤组织 5 种高危型 HPV 检测结果

以建立的多重 PCR 方法检测 65 例宫颈肿瘤组织标本,根据电泳条带判断 65 例宫颈肿瘤组织本 HPV 感染情况,并与临床使用的流式荧光杂交法检测结果进行比较。结果显示,65 例宫颈肿瘤组织标本多重 PCR 方法检测的检出率为 72.31%,高于临床流式荧光杂交 HPV 检测法(32.31%)的检出率





例(3.08%),多重感染 4 例(6.15%)。而临床试剂盒检测方法测出 HPV 阳性标本共计 21 例,其中 HPV16 阳性 16 例(24.61%),HPV18 阳性 0 例,HPV31 阳性 1 例(1.54%),HPV33 阳性 2 例(3.08%),HPV51 阳性 3 例(4.62%),多重感染 2 例(3.08%)。本研究建立的多重 PCR 检分型方法 HPV16 和总感染数的检出率高于流式荧光杂交检测方法($P<0.05$),而 18 型、31 型和 51 型没有表现出明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

持续高危型 HPV 感染是宫颈癌发生的重要原因。研究表明,HPV DNA 在大多数低级别 CIN 以游离状态存在,而在大多数的宫颈癌病例发现 HPV DNA 整合到宿主染色体^[11,12]。HC2 检测是目前临床 HPV 检测领域的金标准,较以往的细胞形态学检测、病理组织检测,免疫组化法检测更具灵敏度,但操作相对复杂,价格高昂,且只能确定高、低危型,无法对 HPV 具体分型^[13~15]。而临床上普遍使用的流式荧光杂交检测存在较为严重的交叉反应及漏检现象^[16]。研究已经证实,其检测的 L1 基因在宫颈癌发生发展过程存在基因缺失,这导致了临床检测方法存在假阴性。HPV 基因组的整合不但影响关键的细胞基因的表达,而且导致 HPV 编码的 2 个病毒源性癌蛋白 E6、E7 过度表达。E6 蛋白促进肿瘤抑制蛋白 p53 和含 PDZ 功能域的 DLG (disc

($\chi^2=3.86,P<0.05$)。在多重 PCR 方法检测出 HPV 阳性的 47 例标本中,HPV16 阳性 37 例 (56.92%), HPV18 阳性 3 例 (4.62%), HPV31 阳性 4 例 (6.15%), HPV33 阳性 7 例(10.77%), HPV51 阳性 2

Table 2 Cervical HPV test results of two detection methods(n=65)

HPV	Multiplex PCR		xMAP technology		χ^2	P
	N	Rate(%)	N	Rate(%)		
16	37	56.92	16	24.61	6.52	0.01
18	3	4.62	0	0	0.13	0.25
31	4	6.15	1	1.54	3.38	0.06
33	7	10.77	2	3.08	0.43	0.51
51	2	3.08	3	4.62	1.53	0.21
Multiple infections*	6	9.23	2	3.08	0.01	1.00
Total	47	72.31	21	32.31	3.86	0.04

Note:*, Multiple infections was the cervical tumor tissues with two or above types of HPV 16,18,31,33,51.

large protein) 泛素化并降解;E7 蛋白结合并灭活 pRB 及 p107、p130 等相关肿瘤抑制蛋白。此外早期基因 E6/E7 在宫颈癌变过程中持续存在^[17],因此 E6/E7 基因是理想的宫颈肿瘤组织 HPV 检测的靶基因。各 HPV 亚型的 E6/E7 基因具有特异的保守片段^[18],本研究对人类生殖器常见的 40 种 HPV 进行同源性分析发现也证实了这一说法,这为 HPV 分型提供了理论依据。而目前临床上尚未见针对 E6/E7 基因进行 HPV 检测,为此本研究拟建立一种基于 E6/E7 基因的 HPV 分型检测方法。同源性分析结果显示,中国人群中常见的 5 种 HPV(HPV16、18、31、33、51)同源性较低,据此本研究设计并验证了 5 种型别特异性引物,优化条件后建立多重 PCR 检测方法。对已知 HPV 感染型别的宫颈肿瘤组织样本进行检测,这 5 种型别的样本出现阳性条带,而其他型别的 HPV 感染或 HPV 阴性组织并不出现条带,以此验证了多重 PCR 检测方法的特异性。此外多重 PCR 是一管反应,具有快速完成 5 种型别 HPV 检测的优点,适用于常规的筛查,避免交叉感染,还可减少多次检测带来的麻烦和高成本的缺点。而且实验还验证多重 PCR 技术检测灵敏度达到 10pg 级,可采用煮沸法抽提 DNA,满足临床样本检测的要求。

研究建立的多重 PCR 方法对明确 HPV 分型的标本进行检测,阳性样本出现条带而阴性样本不出现,说明了本方法的检测特异性。对临床 65 例宫颈肿瘤组织样本检测结果显示,研究建立的多重 PCR 方法检测敏感性为 72.31%。而基于 HPV L1 基因的流式荧光杂交法检测 HPV 敏感性为 32.31%($\chi^2=3.86, P<0.05$)。根据 Entiauspe 等^[19]的研究,采用基于 L1 基因设计的引物 MY09/11 和 GP5/6 检测 251 例巴西妇女,HPV16 型阳性率最高(41.3%),其次为 HPV18 型(17.3%),HPV33(9.3%)。我国学者对 460 例

宫颈病变标本采用同样基于 L1 基因的第二代杂交捕获技术进行检测,HPV 总感染率为 45.87%^[20]。而马彩玲等^[21]针对 HPV 16 的 E6 基因对 220 例宫颈肿瘤组织进行 HPV 检测,显示癌变和 CIN 组 HPV16 型阳性率分别为 83.0%和 75.7%。以上数据提示,选择 HPV E6/E7 基因进行 HPV DNA 检测阳性

率高于 L1 基因检测方法,结果符合了 HPV L1 基因在宫颈病变过程中可能会发生缺失的观点。但目前已有的 HPV E6/E7 基因检测方法均只能检测某一种型别的 HPV,远不能满足临床高危型 HPV 检测的要求,本研究建立的方法可以同时检测 5 种高危型 HPV,更具有临床检测意义,能有效检测高危型 HPV 感染情况,明确告知患者与医生风险进展程度及指导下一步的检查与治疗^[22],在对宫颈癌的早期发现与及时治疗中具有重大的应用价值;且具有低成本的特点,可用于我国各地 HPV 的流行病学调查。这不仅仅有利于更好地开展宫颈癌的预防、治疗等工作,另一方面,也可用于研制特定 HPV 型别的宫颈癌 HPV 预防性疫苗,为我国 HPV 疫苗的研制和推广提供依据、奠定基础。

参考文献:

- [1] Zhang JY,Zou J,Li Y,et al. Research progress on the regulation mechanism of human papilloma virus gene expression[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology,2014, 23(1):70-72.[章鉴洋,邹健,李阳,等. 人类乳头瘤病毒基因表达调控机制的研究进展 [J]. 现代妇产科进展, 2014,23(1):70-72].
- [2] Katzenellenbogen RA,Vliet-Gregg P,Xu M,et al. Cytoplasmic poly (A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 E6-expressing keratinocytes [J]. J Virol,2010,84 (24), 12934-12944.
- [3] Yan HY,Cao PX. Research progress of relationship between human papillomavirus vaccine and carcinoma [J]. Journal of China Clinical Medicine (Electronic Version), 2012,4:512-524.[严虹月, 曹佩霞. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌的关系及其疫苗的研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2012,4:512-524.]
- [4] Van Doorslaer K,Tan Q,Xirasagar S,et al. The Papillo-

- mavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(24): 571-578.
- [5] Song XX, Liu YL, Yang X. Risk assessment of cervical lesion by combined detection of papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus genotyping, Thinprep-cytology test [J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2013, 40(2): 179-181. [宋晓霞, 刘玉玲, 杨晓. HPV L1 壳蛋白联合 HPV 分型、TCT 检测技术对子宫颈病变进展风险的评估 [J]. 国际妇产科学杂志, 2013, 40(2): 179-181.]
- [6] Hao M, Bian ML. Human papilloma virus L1 protein function and clinical application [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2010, 26 (5): 352-355. [郝敏, 卞美璐. 人乳头瘤病毒 L1 蛋白功能及其临床应用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(5): 352-355.]
- [7] Liu LH, Wang K, Zhang FC, et al. Advances of research on the carcinogenesis of human papillomavirus [J]. Life Science, 2008, 20(2): 295-299. [刘立鸿, 汪凯, 张富春, 等. 人乳头瘤病毒 (HPV) 致癌机制研究进展 [J]. 生命科学, 2008, 20(2): 295-299.]
- [8] Li JG, Li L. The Effect of HPV16E7 gene silencing on the proliferation of cervical cancer cell line CaSki [J]. Journal of Oncology, 2012, 18(1): 29-33. [李军果, 李力. HPV16E7 基因沉默对宫颈癌细胞系 CaSki 细胞增殖的影响 [J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(1): 29-33.]
- [9] Gong Z, Wang F. Progress of application of HPV genotyping detection in diagnosis of cervical lesion [J]. Chongqing Medicine, 2012, 41(34): 3661-3663. [龚正, 王凤. HPV 基因分型检测在宫颈病变诊治中的应用进展 [J]. 重庆医学, 2012, 41(34): 3661-3663.]
- [10] Chung HS, Hahm C, Lee M. Comparison of the clinical performances of the AdvanSure HPV screening real-time PCR, the Abbott real-time high-risk HPV test, and the Hybrid Capture high-risk HPV DNA test for cervical cancer screening [J]. Virol Methods, 2014, 205: 57-60.
- [11] Mirzaie-Kashani E, Bouzari M, Talebi A, et al. Detection of human papillomavirus in chronic cervicitis, cervical adenocarcinoma, intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma [J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(5): 9930-9935.
- [12] Martins AE, Lucena-Silva N, Garcia RG, et al. Prognostic evaluation of DNA index in HIV-HPV co-infected women cervical samples attending in reference centers for HIV-AIDS in Recife [J]. PLoS One, 2014, 9(8): 104801.
- [13] Jin YH. Clinical significance of TCT, HC2 and combined colposcopy examination for cervical disease screening [D]. Changchun: Jilin University, 2012. [金英慧. TCT、HC2 及阴道镜联合检查对宫颈疾病筛查的临床意义 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.]
- [14] Acera A, Manresa JM, Rodriguez D, et al. Analysis of three strategies to increase screening coverage for cervical cancer in the general population of women aged 60 to 70 years; the CRICERVA study [J]. BMC Womens Health, 2014, 14: 86.
- [15] Wan LM. Application research on HC2 hybridization assay for the detection of high risk HPV-DNA in screening cervical cancer [J]. Chinese Medicine Guides, 2013, 10(18): 101-105. [宛利梅. 第二代基因杂交捕获法检测高危型 HPV-DNA 在宫颈癌前病变筛查中的应用研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(18): 101-105.]
- [16] Xu R, Qu SF, Du J, et al. Using genotyping quality products to evaluate fluorescence PCR nucleic acid detection kit detecting human papillomavirus. [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011, 31(1): 79-83. [徐任, 曲守方, 杜娟, 等. 采用基因分型质控品评价荧光 PCR 法人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 79-83.]
- [17] Yang HJ, Li XL. The cause and prevention of cervical cancer [J]. Medicine and Philosophy (Clinical Decision Making Forum Edition), 2011, 7: 74, 75, 80. [杨红杰, 李忻琳. 宫颈癌病因及预防 [J]. 医学与哲学 (临床决策论坛版), 2011, 7: 74, 75, 80.]
- [18] Yu L, Zhou LS, Liu TY, et al. Research on application of HPV E6/E7 mRNA and DNA in cervical cancer screening in Mindong [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 25: 4241-4243. [余兰, 周伦顺, 刘桐宇, 等. 闽东宫颈癌普查中 HPV E6/E7 mRNA 及 DNA 的应用研究 [J]. 中国妇幼保健, 2013, 25: 4241-4243.]
- [19] Entiauspe LG, Silveira M, Nunes EM, et al. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil [J]. Braz J Microbiol, 2014, 45(2): 689-694.
- [20] Tang T, Hu XF, Zhang WQ. An analysis of human papilloma virus infection in cervical specimen [J]. Medical Journal of Qilu, 2010, 28(5): 412-414. [汤涛, 胡晓芬, 张文卿. 宫颈病变标本中人乳头瘤病毒感染情况分析 [J]. 齐鲁医学杂志, 2010, 28(5): 412-414.]
- [21] Ma CL, Li YJ, Zhang FC, et al. Detection of HPV16 E6 gene in cervical tissues by quantitative polymerase chain reaction [J]. National Medical Journal of China, 2004, 84(6): 33-37. [马彩玲, 李轶杰, 张富春, 等. 应用荧光定量聚合酶链方法检测宫颈组织中乳头瘤病毒 16E6 基因 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(6): 33-37.]
- [22] Phillips CK, Hruby GW, Durak E, et al. Tissue response to surgical energy devices [J]. Urology, 2008, 71(4): 744-748.