

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 21. 003

基于 E6/E7 基因检测高危型人乳头瘤病毒感染新方法的构建^{*}

王 俭¹, 谢旺凯², 李 婷², 吕诗卉², 倪 超¹, 薛向阳³, 陈向敏⁴, 陈 俊^{3△}

(温州医科大学:1. 第一临床医学院;2. 第二临床医学院;3. 基础医学院;

4. 检验医学院/生命科学院, 浙江温州 325035)

摘 要:目的 建立一种基于 E6/E7 基因的高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染检测的新方法,并评价其效应。方法 设计中国人群中流行的 7 种 HPV 高危型别的 E6/E7 特异性引物,建立 E6/E7 多重聚合酶链式反应(PCR)法。对 68 份宫颈肿瘤标本和 150 份宫颈脱落细胞标本分别采用不同方法进行 HPV 检测,评价新建立的方法。结果 68 份宫颈肿瘤组织中,E6/E7 多重 PCR 法检测阳性 48 份(70.59%),流式荧光杂交法检测阳性 27 份(39.71%),2 种检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$);150 份宫颈脱落细胞中,E6/E7 多重 PCR 法检测阳性 115 份(76.67%),临床流式荧光杂交法检测阳性 125 份(83.33%),2 种检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 所建立的基于 HPV E6/E7 基因的多重 PCR 方法检测高危型 HPV 感染情况具有特异性和灵敏性,且与目前临床上主流的流式荧光杂交法检测结果存在高度相近性,但价格便宜,操作简便,可推广适用于临床早期筛查。

关键词:人乳头瘤病毒; 高危型; 多重聚合酶链反应; 流式荧光杂交法

中图法分类号:R73-3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)21-3171-05

Construction of a new method for detecting high risk human papilloma virus infection based on E6/E7 gene^{*}

WANG Jian¹, XIE Wangkai², LI Ting², LYU Shihui², NI Chao¹,

XUE Xiangyang³, CHEN Xiangmin⁴, CHEN Jun^{3△}

(1. The First Clinical College; 2. the Second Clinical College; 3. Basic Medical College; 4. Laboratory Medicine College/Life Science College, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China)

Abstract: Objective To establish a new method for the detection of high-risk human papilloma virus (HPV) infection based on E6/E7 gene, and then evaluate it's effect. **Methods** The E6/E7 specific primers of 7 high-risk HPV types which were popularly in the China were designed to establish the multiplex PCR method. A total of 68 cases of cervical cancer tissues and 150 cases of cervical cytology specimens were detected by the new method and flow fluorescence hybridization. Then the new method was evaluated by analyzed the result. **Results** In 68 cases of cervical cancer tissues, the positive result of multiplex PCR was 48 cases (70.59%), and it of flow fluorescence hybridization was 27 cases (39.71%), there was obviously difference between two kinds of test ($P < 0.05$). In 150 cases of cervical exfoliated cells, the positive result of multiplex PCR was 115 cases (76.67%), and it of flow fluorescence hybridization was 125 cases (83.33%), there was no significant difference between two kinds of test ($P > 0.05$). **Conclusion** The method for detecting high risk HPV infection based on E6/E7 gene was specificity and sensitivity. The result of it was highly similar to the result of flow fluorescence hybridization which was the current clinical mainstream. It could be extended to clinical early screening because of cheap and being easy to operate.

Key words: human papilloma virus; high risk; multiplex PCR; flow fluorescence hybridization

宫颈癌是一种严重危害女性健康的恶性肿瘤,位于女性恶性肿瘤的第二位^[1]。研究已证实,几乎所有宫颈癌都是由人乳头瘤病毒(HPV)尤其是高危型 HPV 感染引发,因此高危型 HPV 检测逐渐成为宫颈癌筛查的研究热点^[2]。目前,HPV 研究主要针对

HPV 基因组进行。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^[3]。目前国内外广泛采用 HPV 通用引物定

^{*} 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY14H190003);浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2016R413066)。

作者简介:王俭,男,本科,主要从事病毒免疫研究。△ 通信作者,E-mail:chenjun_8787@163.com。

位在 HPV11 基因上进行检测^[4]。但是在高危型 HPV 感染过程中,其基因会整合到宿主细胞基因组中,这是引发宫颈细胞癌变发生的前提^[5]。而高危型 HPV DNA 的整合过程往往会发生基因断裂缺失,如 E1/E2 调控区和 L1/L2 衣壳蛋白基因的缺失,因此基于 L1 基因的检测存在一定的漏诊现象。然而,研究表明 E6 和 E7 基因在整合过程中却可以保留完整,不易发生缺失,因此,E6/E7 基因被认为是检测 HPV 最为理想的靶点^[6]。基于以上现象,本研究针对 HPV E6/E7 基因,设计我国感染率较高的 7 种高危型 HPV 特异性引物,包括 HPV16、18、31、33、51、52、58,建立一种成本低廉、效率更高的检测宫颈肿瘤、脱落细胞等组织高危型 HPV 感染的多重聚合酶链反应(PCR)检测方法,并与现在临床上主流的流式荧光杂交法进行比较,评价其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 宫颈肿瘤组织标本 68 份宫颈肿瘤组织标本采自温州医科大学附属第一医院妇产科 68 例手术患者,并经病理检查确诊,其中宫颈上皮内瘤变(CIN) 1 级 12 例,CIN 2 级 19 例,CIN 3 级 19 例,宫颈鳞癌 12 例,宫颈腺癌 2 例,正常宫颈(内膜透明细胞癌)4 例,标本离体后保存于液氮中。患者年龄 25~69 岁,平均(42.4±1.1)岁。所有标本收集均征得患者及或家

属的同意,并签署知情同意书。

1.1.2 宫颈脱落细胞标本 150 份宫颈脱落细胞标本均取自温州医科大学附属医院妇科门诊患者。患者年龄 18~78 岁,平均(43.1±11.6)岁。所有标本收集均征得患者及或家属的同意,并签署知情同意书。HPV16 阳性的 Siha 细胞和 HPV18 阳性的 Hela 细胞,购自美国 ATCC,并由实验室保存。

1.2 DNA 提取 宫颈肿瘤组织标本每份切取 50 g 病变区组织,碾碎后加入 50 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)中制成悬液备用;Siha、Hela 细胞贴壁培养至长满 50 mL 培养瓶后,也制成悬液备用。制备的悬液采用 DNA 提取试剂盒[TIANGEN TIANamp Genomic DNA Kit(DP304)]提取 DNA。将 DNA 模板统一稀释至 100 ng/μL。宫颈脱落细胞溶于细胞保存液中,取 2 mL 细胞溶液 10 000 r/min 离心 1 min 后去上清液,采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

1.3 引物

1.3.1 引物设计 在分析同源性的基础上,针对我国流行的主要高危型 HPV16、18、31、33、51、52、58 及相应 HPV 基因组的 E6/E7 基因,设计这 7 种 HPV 型别的引物。由北京六合华大基因科技有限公司合成^[7]。引物序列见表 1。将合成的引物稀释成 10 μmol/L,-20 ℃保存,待用。

表 1 各型别 HPV 特异性引物序列

引物	序列		目的片段大小 (bp)
	正向引物 5'~3'	反向引物 5'~3'	
HPV16	GCA ATG TTT CAG GAC CCA CAG	TCC TAG TGT GCC CAT TAA CAG	725
HPV18	CGC TTT GAG GAT CCA ACA CG	TAC TGC TGG GAT GCA CAC C	796
HPV31	GTG TCT ACT GCA AAG GTC AG	GCA CAC GAT TCC AAA TGA GC	637
HPV33	GAA CTA CAG TGC GTG GAA TGC	CTT TAA CGT TGG CTT GTG TCC	413
HPV51	GGA AAG ACC ACG AAC GCT G	TTG CTC GTA GCA TTG CAA GTC	530
HPV52	GTC AAA CGC CAT TAT GTC C	CCT CAT CTG AGC TGT CAC C	238
HPV58	TGT CAA AGA CCA TTG TGT CC	CTT AGC GTT GGG TTG TTT CC	175

1.3.2 引物特异性验证 为验证相应 HPV 型别引物特异性,以明确 HPV 分型的宫颈肿瘤组织标本和细胞株的 DNA 为模板,引物 FP 10 μmol/L,引物 RP 10 μmol/L,Taq Mix 12.5 μL[TIANGEN 2×Taq PCR MasterMix(KT201)]配制成 25 μL 反应体系。退火温度为 63 ℃(16、18、31、33、51、58 型),65 ℃(52 型)。热循环条件设置如下:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s;退火 30 s;72 ℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72 ℃后延伸 5 min。在 Bio-Rad S1000 PCR 仪上进行反应。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,切胶回收,基

因测序,并与已公布的各型别 HPV 基因序列比较。

1.3.3 引物敏感性验证 为分析特异性引物敏感性,以 10.00、1.00、0.10、0.01 ng 不同 HPV 型别阳性的 DNA 作为模板进行试验,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并进行敏感性分析。

1.4 E6/E7 多重 PCR 检测方法的构建 以 7 种明确 HPV 分型的宫颈肿瘤组织标本为 DNA 模板,将 HPV16、18、31、33、51、52、58 型的特异性引物按浓度 1:1:1:1:1:1:1 的比例混合加入 4 μL,RNase-free 去离子水 1 μL,Taq Mix 7.5 μL;Q-Solution+

1.5 μL [QIAGEN Multiplex PCR kit (Cat. No. 206143)]配制成 15 μL 体系。热循环条件设置如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 90 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 最后 68 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 15 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 对比各型别 HPV 的单一 PCR 产物电泳图谱以确定多重 PCR 方法的特异性。在此基础上, 以 10.00、1.00、0.10、0.01 ng 不同 HPV 型别阳性的 DNA 作为模板进行试验, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并进行敏感性分析。同时, 为避免实验存在的偶然性, 相隔一定量的时间后, 同样以新建立方法时所使用的 7 种高危型别阳性标本 DNA 作为模板, 在相同条件下以同样的参数进行实验, 验证多重 PCR 方法的稳定性。

1.5 宫颈肿瘤组织标本 HPV 感染型别检测 对 68 份宫颈肿瘤组织标本采用所构建的多重 PCR 方法进行检测。同时对相同标本采用流式荧光杂交法进行平行检测, 记录并比较分析结果。

1.6 宫颈脱落细胞标本检测 使用新建立的多重 PCR 方法对 150 份宫颈脱落细胞标本进行 HPV 感染情况检测, 同时对相同的标本采用流式荧光杂交法进行平行检测, 记录并比较分析结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理及统计分析, 计数资料以例数或率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

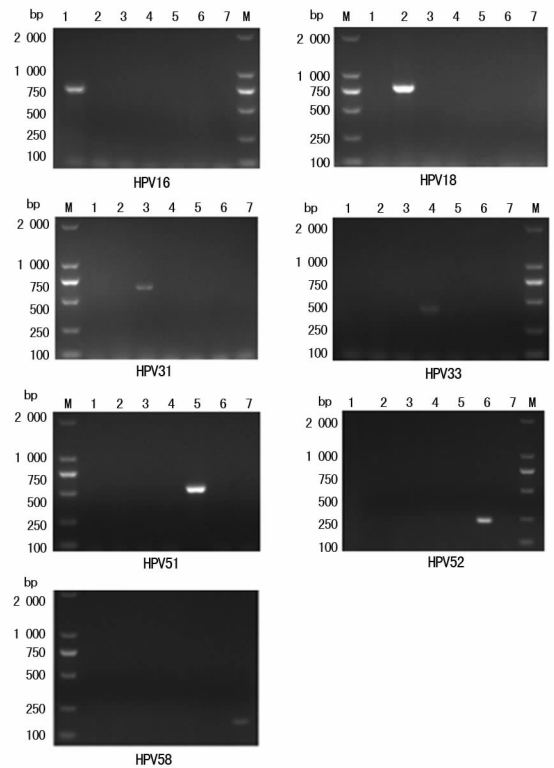
2 结 果

2.1 引物设计结果 引物特异性实验表明 7 种高危型 HPV E6/E7 引物(HPV16、18、31、33、51、52、58)均具有特异性, 见图 1。同时敏感性分析实验显示: HPV16、18、33 型 DNA 模板量低至 1 ng 仍能扩增特异目的片段, HPV31 型 DNA 模板量低至 10 ng 仍能扩增特异目的片段, HPV51 型 DNA 模板量低至 0.1 ng 仍能扩增特异目的片段, HPV52、58 型 DNA 模板量低至 0.01 ng 仍能扩增特异目的片段。

2.2 E6/E7 多重 PCR 检测方法的建立 对已经明确了 HPV 分型的宫颈肿瘤标本和细胞株所提取的 DNA 进行多重 PCR 扩增, 结果显示出现单一条带, 与使用单一型别引物进行 PCR 的结果一致, 提示所建立的多重 PCR 可特异检测这 7 种 HPV 亚型, 见图 2。且敏感性分析实验显示: HPV16、18、31、33、58 型 DNA 模板量低至 10 ng 仍能扩增特异目的片段, HPV51 和 52 型 DNA 模板量低至 0.1 ng 仍能扩增特异目的片段。

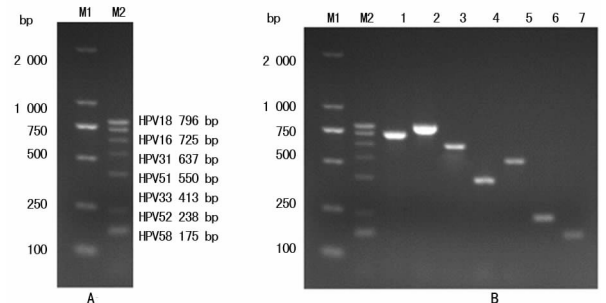
2.3 宫颈肿瘤组织 HPV 检测结果 以新建立的多重 PCR 方法检测 68 份宫颈肿瘤组织标本, 见图 3, 根据电泳条带判断 68 份宫颈肿瘤组织标本 HPV 感染情况, 检测出 HPV 阳性标本 48 份(70.59%), 其中 HPV16 阳性 36 份(52.94%), HPV18 阳性 3 份

(4.41%), HPV31 阳性 4 份(5.88%), HPV33 阳性 7 份(10.29%), HPV51 阳性 2 份(2.94%), HPV58 阳性 3 份(4.41%), 多重感染 6 份(8.82%)。高于流式荧光杂交法检测所显示 39.71% 的感染率, 2 种方法检测结果比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 11.43$, $P < 0.05$)。



注: M 为 D2000 DNA 标记物; 1 为 HPV16 阳性标本; 2 为 HPV18 阳性标本; 3 为 HPV31 阳性标本; 4 为 HPV33 阳性标本; 5 为 HPV51 阳性标本; 6 为 HPV52 阳性标本; 7 为 HPV58 阳性标本

图 1 所设计的 7 种高危型别 HPV E6/E7 引物的特异性分析

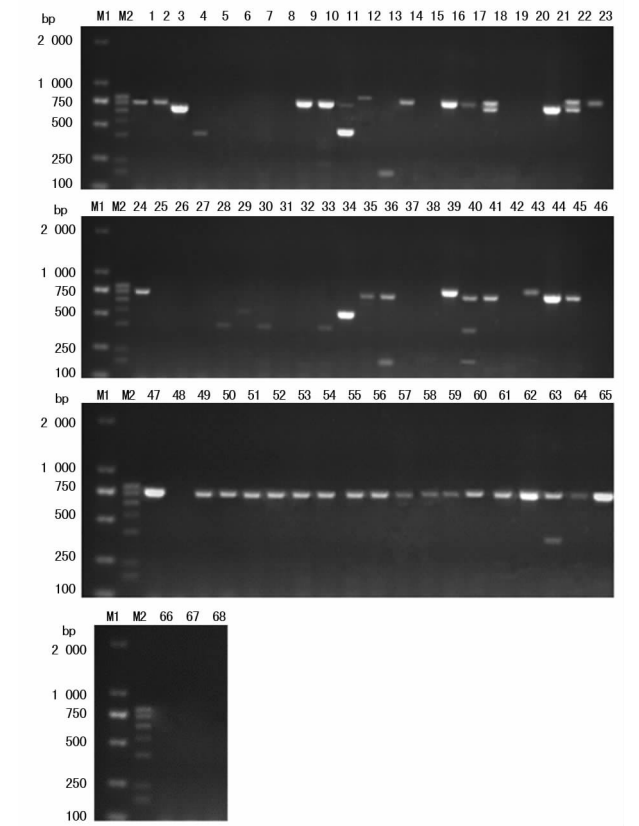


注: A 为 HPV 阳性标准条带; B 为 HPV 7 种亚型引物特异性分析; M1 为 D2000 DNA 标记物; M2 为阳性标准条带; 1 为 HPV16 阳性标本; 2 为 HPV18 阳性标本; 3 为 HPV31 阳性标本; 4 为 HPV33 阳性标本; 5 为 HPV51 阳性标本; 6 为 HPV52 阳性标本; 7 为 HPV58 阳性标本

图 2 多重 PCR 法电泳结果分析

2.4 宫颈脱落细胞标本检测结果 150 份宫颈脱落细胞标本用新建立的多重 PCR 方法及流式荧光杂交法检测的结果显示 7 种高危型别(HPV16、18、31、33、

51、52、58) 检出率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.68, P > 0.05$), 见表 2。



注: M1 为 D2000 DNA 标记物; M2 为阳性标准条带; 1~68 为宫颈肿瘤组织标本

图 3 68 份宫颈肿瘤组织多重 PCR 检测结果分析

HPV 亚型	多重 PCR 方法		流式荧光杂交法		χ^2	P
	感染数(n)	检出率(%)	感染数(n)	检出率(%)		
16	32	21.33	31	20.67	0.00	> 0.05
18	13	8.67	16	10.67	0.36	> 0.05
31	12	8.00	9	6.00	0.57	> 0.05
33	17	11.33	13	8.67	1.50	> 0.05
51	10	6.67	12	8.00	0.13	> 0.05
52	47	31.33	42	28.00	1.23	> 0.05
58	22	14.67	24	16.00	0.25	> 0.05
合计	115	76.67	125	83.33	3.68	> 0.05

3 讨 论

高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌发生的重要原因。越来越多的研究表明 HPV 基因组检测对宫颈病变预测和术后疗效判断有利, 可以避免不必要的诊断和治疗。因此, 国内外采用了很多种方法对 HPV 感染进行检测, 应用于临床宫颈癌筛查和防治。

现在临床上采用较多的是基于 L1 衣壳蛋白基因的 HPV 检测方法, 如流式荧光杂交法^[8]。但由于在

HPV 感染过程中, 病毒 DNA 通常会与宿主染色体整合, 会改变整合位点及邻近宿主基因的表达, 使部分 HPV L1 基因组发生断裂丢失, 最终导致 HPV L1 衣壳蛋白也表达缺失, 所以基于 L1 基因序列的 HPV 检测方法容易出现假阴性的结果, 这也限制了其在临床上的使用^[9]。而早期蛋白基因 E6/E7 在肿瘤的发生过程中持续存在, 且其表达的 E6/E7 早期蛋白在宫颈癌变过程中起着重要作用。恶性肿瘤病变时, HPV DNA 整合到宿主 DNA 当中, 通常导致 E2 基因中断从而使 E6/E7 基因表达增强^[10]。E6/E7 蛋白分别抑制 P53、Rb 基因的活性, 激活人细胞端粒酶的转录, 引起细胞异常分化, 导致正常细胞永生, 最终形成肿瘤^[11]。因此, 对 HPV E6/E7 基因进行检测, 能从根源上对宫颈病变进行诊断和预防, 是判断 HPV 感染的更好选择。然而, 临床上针对 E6/E7 的检测方法不多, 尤其是多重 PCR 的检测方法几乎没有。为此本研究主要构建了基于 E6/E7 的多重 PCR 方法检测 HPV 的感染情况, 在对 HPV 进行同源性分析后证实各 HPV 亚型的 E6/E7 基因具有特异的保守片段, 据此选择设计并验证了中国人群感染率较高的 7 种高危型别 HPV E6/E7 的特异性引物, 优化条件后建立了一种基于 E6/E7 基因的 HPV 多重 PCR 分型检测方法。对已明确型别的宫颈癌组织标本及宫颈细胞的检测阳性标本出现条带, 而阴性标本未出现条带证明其特异性好, 而且实验还验证了该多重 PCR 技术检测灵敏度能达到 10.00 ng, 技术稳定性良好, 满足临床标本检测方法的要求。

68 份宫颈肿瘤组织标本的 HPV 检测结果显示, 所构建的基于 E6/E7 多重 PCR 检测阳性率明显高于基于 L1 基因的流式荧光杂交法检测, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而对门诊采集的 150 份宫颈脱落细胞标本检测结果显示 7 种高危型别检出率与流式荧光杂交法检出率并无差异, 考虑到门诊患者高危型别感染较少, 样本数不够大, 有待进一步验证。

临床上使用的基于 L1 基因的流式荧光杂交法检测费用较高, 操作复杂, 需要大型仪器设备支持, 不利于在乡镇卫生院开展。而本研究所建立的基于 E6/E7 多重 PCR 法不仅能够一次检测 HPV16、18、31、33、51、52 和 58 7 种高危型别, 而且具有操作简便、成本低廉和所需仪器较少且较易获得等优势, 同时研究结果也已表明两种方法检出率高度相近。因此, 基于 E6/E7 多重 PCR 法在应用中能极大弥补流式荧光杂交法在成本和技术等方面的不足, 同时可以减少多次检测带来的交叉污染及高成本的问题, 适合在临床大面积开展患者高危型 HPV 感染的早期筛查。

参考文献

[1] JEMAL A, SIMARD E P, DORELL C, (下转第 3178 页)

- [2] KALINICHENKO V V, REN X, USTIYAN V, et al. Foxf1 transcription factor is required for formation of embryonic vasculature by regulating VEGF signaling in endothelial cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(8):709-720.
- [3] PRADHAN A, USTIYAN V, ZHANG Y F, et al. Forkhead transcription factor FoxF1 interacts with Fanconi anemia protein complexes to promote DNA damage response[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2):1912-1926.
- [4] PK L K, LEE J S, CHEN H, et al. Cytoplasmic mislocalization of overexpressed FOXF1 is associated with the malignancy and metastasis of colorectal adenocarcinomas [J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(1):262-269.
- [5] WEI H J, NICKOLOFF J A, CHEN W H, et al. FOXF1 mediates mesenchymal stem cell fusion-induced reprogramming of lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):9514-9529.
- [6] FULFORD L, MILEWSKI D, USTIYAN V A, et al. The transcription factor FOXF1 promotes prostate cancer by stimulating the mitogen-activated protein kinase ERK5 [J]. *Sci Signal*, 2016, 9(427):ra48.
- [7] PK L K, LEE J S, LIANG X, et al. Epigenetic inactivation of the potential tumor suppressor gene FOXF1 in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14):6047-6058.
- [8] YOO Y G, KONG G, LEE M O. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1 [J]. *EMBO J*, 2006, 25(6):1231-1241.
- [9] MATSUSAKA S, WU A H, CAO S, et al. Prognostic impact of FOXF1 polymorphisms in gastric cancer patients [J]. *Pharmacogenomics J*, 2017, 18(2):262-269.
- [10] NILSSON G, KANNIUS-JANSON M. Forkhead box F1 promotes breast cancer cell migration by upregulating lysyl oxidase and suppressing Smad2/3 signaling[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):142.
- [11] MAHLAPUU M, ENERBACK S, CARLSSON P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations[J]. *Development*, 2001, 128(12):2397-2406.
- [12] KALINICHENKO V V, ZHOU Y, BHATTACHARYYA D, et al. Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14):12369-12374.
- [13] KALINICHENKO V V, BHATTACHARYYA D, ZHOU Y, et al. Foxf1 $+/ -$ mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl₄ injury [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1):107-117.
- [14] MA F, LI W J, LIU C X, et al. MiR-23a promotes TGF- β 1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41):69538-69550.
- [15] STARK T W, HENSLEY P J, SPEAR A, et al. Predictive value of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) signature and PARP-1 in prostate cancer radioresistance[J]. *Prostate*, 2017, 77(16):1583-1591.

(收稿日期:2018-01-28 修回日期:2018-05-20)

(上接第 3174 页)

- et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975—2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels[J]. *J Nat Can Inst*, 2013, 105(3):175-201.
- [2] 张文晶, 刘志强. 宫颈癌筛查方法及其应用现状[J]. *医学综述*, 2017, 23(9):1732-1736.
- [3] VAN DOORSLAER K, TAN Q, XIRASAGAR S, et al. The papillomavirus episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41:D571-D578.
- [4] SHEN-GUNTHER J, YU X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(2):263-271.
- [5] PETT M, COLEMAN N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? [J]. *J Pathol*, 2007, 212(4):356-367.
- [6] 田红英, 符兆英. 人乳头瘤病毒的流行特征和致癌机制 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(24):4021-4023.
- [7] FEOLI-FONSECA J C, OLIGNY L L, BROCHU P, et al. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach[J]. *J Med Virol*, 2001, 63(4):284-292.
- [8] VAN DEN BRULE A J, MEIJER C J, BAKELS V, et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction[J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(12):2739-2743.
- [9] 范飞, 柳欣林, 李智海, 等. 人乳头瘤病毒衣壳蛋白结构生物学研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(5):20-23.
- [10] 黄莎莎, 郝登再, 张岩, 等. 高危型 HPV DNA 整合导致宫颈癌的作用机制和临床检测进展[J]. *遗传*, 2017, 39(9):775-783.
- [11] 刘志敏, 唐双阳, 万艳平. 人乳头瘤病毒感染与肿瘤的相关性研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(2):54-58.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-05-04)