

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.24.010

基于 Armored RNA 的 BCR-ABL 融合基因质控物研制

李建英,毛玉环,刘珊玲

湖南省长沙市第一医院检验科,湖南长沙 410005

摘要:目的 制备以 MS2 噬菌体装甲 RNA(Armored RNA)为材料的 BCR-ABL 融合基因质控物。方法 获取临床 p210 型 BCR-ABL 融合基因骨髓标本 cDNA,PCR 扩增 p210 型 BCR-ABL 融合基因片段和 ABL 内参基因片段。将 MS2 噬菌体成熟蛋白基因和衣壳蛋白基因克隆于 pACYCDuet-1,制成 pACYC-MS2,然后将 p210 型 BCR-ABL 融合基因和 ABL 内参基因分别插入 pACYC-MS2 载体,经原核表达、分子筛纯化、反转录-PCR 鉴定后分别制成包装有 p210 型 BCR-ABL 融合基因和 ABL 内参基因片段的病毒样颗粒(VLPs)。进行稳定性、均一性检测,同时判断质控物的适用性。结果 成功制备了包装有 p210 型 BCR-ABL 融合基因和 ABL 内参基因的 VLPs 质控物。均一性检测表明质控物目的片段拷贝数水平是均一的。稳定性检测显示质控物标本在 -20°C 可至少稳定保存 7 个月, 4°C 稳定保存 3 个月,室温稳定保存 15 d, 37°C 稳定保存 1 周。用实时荧光定量 PCR 试剂盒检测质控物水平, pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标准曲线的 R^2 分别为 0.994 0 和 0.991 7,具有很好的适用性。结论 将 Armored RNA 作为材料所制备的 BCR-ABL 融合基因质控物稳定性、均一性较好,适用于评价 BCR-ABL 融合基因检测试剂盒的性能,具有广泛的应用前景。

关键词:BCR-ABL 融合基因; 装甲 RNA; 质控物; 性能评价

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)24-3588-05

Development of quality control substance for BCR-ABL fusion gene based on Armored RNA

LI Jianying, MAO Yuhuan, LIU Shanling

Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China

Abstract: **Objective** To prepare BCR-ABL fusion gene quality control substance using MS2 phage Armored RNA as material. **Methods** obtained the cDNA of clinical bone marrow samples of p210 type BCR-ABL fusion gene, and amplified BCR-ABL fusion gene fragment and ABL reference gene fragment by PCR. The mature protein gene and capsid protein gene of MS2 phage were cloned into pACYCDuet-1 to prepare pACYC-MS2, then, the p210 type BCR-ABL fusion gene and ABL reference gene were inserted into the vector pACYC-MS2 respectively. After prokaryotic expression, molecular sieve purification and reverse transcription-PCR identification, virus-like particles (VLPs) packaged with p210 type BCR-ABL fusion gene and ABL reference gene fragments were prepared. The stability and homogeneity were detected, and the applicability of quality control materials was evaluated. **Results** The VLPs packaged p210 type BCR-ABL fusion gene and ABL reference gene were successfully prepared. The homogeneity test showed that the copy number level of the target fragment was uniform. The stability test showed that the quality control substance could be stored stably for at least 7 months at -20°C , 3 months at 4°C , 15 days at room temperature and 1 week at 37°C . Quantitative real-time PCR kit was used to detect the level of the quality control substance, and the R^2 of the standard curves of pACYC-MS2-p210 VLPs and pACYC-MS2-ABL VLPs were 0.994 0 and 0.991 7 respectively, with good applicability. **Conclusion** The BCR-ABL fusion gene quality control substance prepared by Armored RNA has good stability and homogeneity, which can be used to evaluate the performance of BCR-ABL fusion gene detection kit, and has a wide application prospect.

Key words: BCR-ABL fusion gene; Armored RNA; quality control substance; performance assessment

BCR-ABL 融合基因由 9 号染色体长臂(9q34)上的原癌基因埃布尔森小鼠白血病病毒癌基因同源物 1 (ABL1)和 22 号染色体长臂(22q11)上的断裂点集簇

区(BCR)基因易位而成,具有异常的酪氨酸激酶活性。BCR-ABL 融合基因作为慢性粒细胞白血病(CML)的分子基础,既是 CML 诊断和监测疗效的生

生物学标志物,也是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗 CML 的靶点。因此,监测 CML 患者的 BCR-ABL 融合基因水平已成为评估疗效、早期识别耐药、监测疾病进展,从而指导治疗的重要手段^[1-2]。CML 患者在接受 TKI 及造血干细胞移植(HSCT)治疗后低 BCR-ABL 融合基因水平是普遍且长期存在的,因此 BCR-ABL 融合基因已成为 TKI 治疗过程中及 HSCT 治疗后疗效评估不可或缺的指标^[3]。然而,目前用于检测 BCR-ABL 融合基因的实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术操作步骤较多,所采用的试剂、仪器及人员操作水平等均可能对检测结果造成影响。为了提高 BCR-ABL 融合基因检测水平,研制出标准化 BCR-ABL 融合基因质控物是当前的首要任务。装甲 RNA(Armored RNA)技术可形成内含 BCR-ABL 融合基因不同类型特定 RNA 的病毒样颗粒(VLPs),可使 BCR-ABL 融合基因免受环境中核糖核酸酶(RNase)和脱氧核糖核酸酶(DNase)的降解,且无生物传染性,既能大量人工合成,又有长期稳定性,是制备 BCR-ABL 融合基因质控物的合适材料^[4-5]。本研究旨在建立基于 Armored RNA 的 BCR-ABL 融合基因质控物,用于评价 BCR-ABL 融合基因检测试剂盒的性能,以促进 BCR-ABL 融合基因检测的标准化。

1 材料与方法

1.1 材料 p210 型 BCR-ABL 融合基因阳性骨髓标本。

1.2 仪器与试剂 PCR 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒、TA 克隆试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自美国 Promega 公司;p210 型 BCR-ABL 融合基因 RT-qPCR 试剂盒(以下称市场在售试剂盒)购自上海源奇生物有限公司;Top10 E. Coli 用于重组克隆的构建和扩增,购自天根生化科技有限公司;BL21(DE3) E. Coli 用于 BCR-ABL 融合基因特定 RNA 的 MS2 噬菌体 VLPs 的原核表达,购自天根生化科技有限公司。pACYCDuet-1 购自德国 Novagen 公司;pACYC-MS2 由 MS2 噬菌体成熟酶蛋白基因和衣壳蛋白基因克隆于 pACYCDuet-1 而成,由中华人民共和国国家卫生健康委员会临床检验中心免疫室提供。

1.3 方法

1.3.1 Armored RNA 质控物制备 收集 p210 型 BCR-ABL 融合基因阳性骨髓标本 cDNA,采用 PCR 扩增 p210 型 BCR-ABL 融合基因片段和 ABL 内参基因片段,纯化后的 PCR 产物分别插入 pACYC-MS2 载体,经 Top10 E. Coli 转化、筛选、鉴定、扩增,提取 pACYC-MS2-p210 和 pACYC-MS2-ABL 阳性重组载体质粒后转导 BL21(DE3) E. Coli,大量诱导表达形成 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 后分离、富集、纯化和鉴定。将纯化的 VLPs 标

本原液用基本必需培养基进行倍比稀释,然后取 $1:10^4$ 和 $1:10^5$ 稀释的 VLPs 用 RT-qPCR 先进行预定量。

1.3.2 质控物性能检测

1.3.2.1 耐 RNase 试验 随机抽取分装好的 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标本各 10 份作为 p210 Armored RNA 组和 ABL Armored RNA 组,另取 2 份 p210 型 BCR-ABL 融合基因裸露 RNA 标本作为裸露 RNA 组,在 p210 Armored RNA 组和 ABL Armored RNA 组的各 5 份标本与裸露 RNA 组的 1 份标本中分别加入 RNase ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)后于 37°C 放置 60 min;3 组剩余标本不做处理。然后同时提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测。

1.3.2.2 均一性检测 随机抽取分装好的 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标本各 10 份,提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测,每份标本检测 3 次,获得平均 Ct 值。

1.3.2.3 稳定性检测 随机抽取 5 份标本后分别置于下列环境:(1) -20°C 环境中,检测 7 个月,每个月检测 1 次;(2) 4°C 环境中,检测 3 个月,每半个月检测 1 次;(3)室温($20\sim 25^\circ\text{C}$)环境中,检测 15 d,3 d 检测 1 次;(4) 37°C 环境中,检测 7 d,1 d 检测 1 次。

1.3.3 RT-qPCR 判断质控物适用性 取两种 VLPs 水平约为 $10^6 \text{ copy}/\text{mL}$ 的标本,依次稀释至 10^5 、 10^4 和 $10^3 \text{ copy}/\text{mL}$,采用市场在售试剂盒对不同水平标本进行检测,以不同水平为横坐标、Ct 值为纵坐标绘制两种 VLPs 的标准曲线,计算 R^2 ,判断线性,以验证该质控物能否评价 BCR-ABL 融合基因检测试剂盒的性能。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;相关性分析采用 Pearson 线性相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

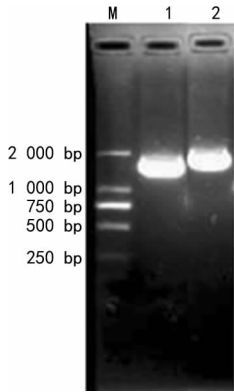
2.1 PCR 扩增目的片段结果 经 PCR 扩增后得到 p210 型 BCR-ABL 融合基因片段和 ABL 内参基因片段,长度分别为 1 399 bp 和 1 633 bp,扩增结果见图 1。

2.2 pACYC-MS2-p210 和 pACYC-MS2-ABL 载体的验证 将目的片段克隆入 pACYC-MS2 载体,形成 pACYC-MS2-p210 和 pACYC-MS2-ABL 重组载体,转化后随机挑取克隆,提取质粒,做 PCR 验证,结果见图 2。

2.3 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 的表达、纯化和鉴定

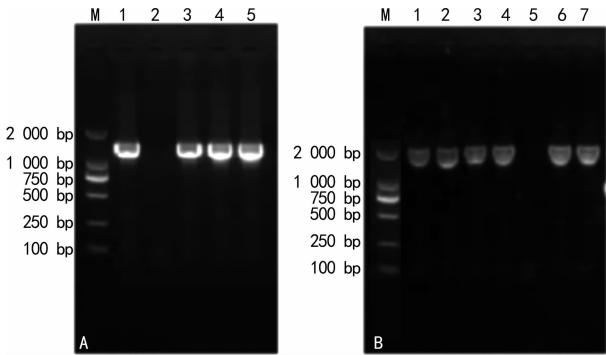
2.3.1 分子筛纯化 VLPs 分别将构建好的 2 个单质粒双表达载体转入表达宿主细胞 BL21(DE3) E.

Coli,经诱导、表达、超声碎菌离心后得到的上清液用 RNase、DNase 消化过夜,经分子筛色谱纯化。



注:M为 DL 2000 DNA marker;1 为 p210 型 BCR-ABL 融合基因扩增产物;2 为 ABL 内参基因扩增产物。

图 1 目的片段扩增电泳图



注:A 中 M 为 DL 2000 DNA marker,1、3、4、5 为 pACYC-MS2-p210 重组载体质粒的 PCR 产物,2 为阴性克隆;B 中 M 为 DL 2000 DNA marker,1~4、6、7 为 pACYC-MS2-ABL 重组载体质粒的 PCR 产物,5 为阴性克隆。

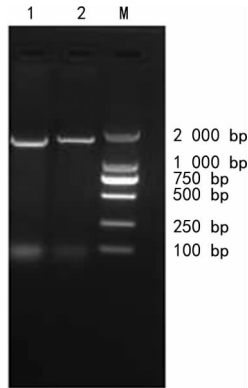
图 2 重组载体验证

2.3.2 反转录-PCR(RT-PCR)鉴定 VLPs 提取 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 里的

RNA,反转录合成 cDNA,再进行 RT-PCR 鉴定。VLPs 包装的 RNA 经 RT-PCR 扩增后产物长度依次为 1 399 bp 和 1 633 bp,见图 3。

2.4 耐 RNase 试验 耐 RNase 试验结果显示,p210 Armored RNA 组和 ABL Armored RNA 组经 RNase 处理的 Ct 值与未经 RNase 处理的 Ct 值差异无统计学意义($P>0.05$);裸露 RNA 组经 RNase 处理后均无扩增曲线、无 Ct 值,裸露 RNA 在 RNase 作用下完全降解。见表 1。

2.5 均一性与稳定性检测 均一性检测 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标本的变异系数(CV)分别为 3.45% 和 3.64%,均 $<5.00\%$,表明标本中目的片段拷贝数水平是均一的。稳定性检测显示,两种 VLPs 标本在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可至少稳定保存 7 个月, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定保存 3 个月,室温稳定保存 15 d, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定保存 1 周($CV<5.00\%$),稳定性变化趋势见图 4。



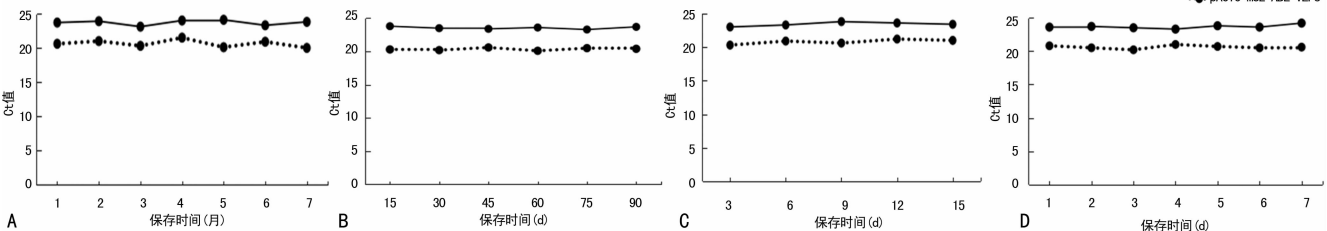
注:M为 DL 2000 DNA marker;1 为 pACYC-MS2-p210 VLPs 中 RNA 的 RT-PCR 产物;2 为 pACYC-MS2-ABL VLPs 中 RNA 的 RT-PCR 产物。

图 3 RT-PCR 鉴定 VLPs

表 1 Armored RNA 和裸露 RNA 经 RNase 处理与未经 RNase 处理的 Ct 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	经 RNase 处理	未经 RNase 处理	<i>t</i>	<i>P</i>
p210 Armored RNA 组	19.65±1.26	20.23±1.58	0.73	0.50
ABL Armored RNA 组	18.82±2.14	19.92±1.86	0.77	0.48
裸露 RNA 组	—	21.64±2.04	—	—

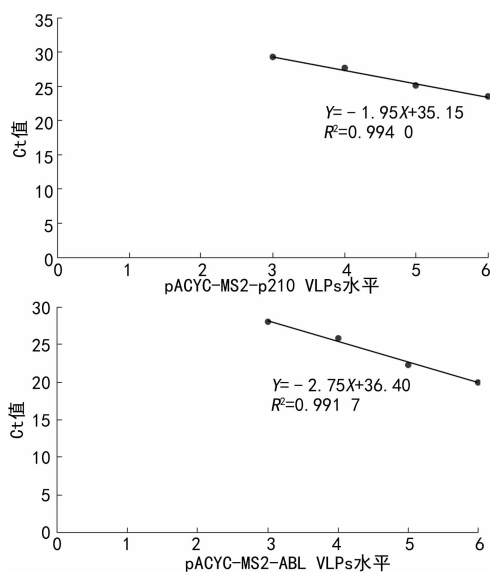
注:—表示无数据。



注:A 为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的稳定性;B 为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的稳定性;C 为室温下的稳定性;D 为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的稳定性。

图 4 质控物在不同温度下的稳定性变化趋势

2.6 RT-qPCR 判断质控物的适用性 不同水平 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 均能被市场在售试剂盒检出,其标准曲线的 R^2 分别为 0.994 0 和 0.991 7,具有很好的适用性。见图 5。



注: A 为 pACYC-MS2-p210 VLPs 标准曲线; B 为 pACYC-MS2-ABL VLPs 标准曲线; 两种 VLPs 的水平均为实际值取 lg。

图 5 两种 VLPs 的标准曲线

3 讨 论

BCR-ABL 融合基因检测对造血干细胞恶性克隆性疾病的筛查和诊断具有重要意义,为促进 BCR-ABL 融合基因检测标准化,本研究建立了基于 Armored RNA 的 BCR-ABL 融合基因质控物。此外,考虑到临床检测该融合基因采用的是 RT-qPCR,除了含有融合基因转录本以外,还含有内参基因,而且目前常见的内参基因为 ABL,为尽可能模拟真实临床标本,本研究还制备了内参基因 ABL 质控物。

Armored RNA 是由 MS2 噬菌体衣壳蛋白和成熟酶蛋白自行装配包裹外源 RNA 形成的,将 MS2 噬菌体基因组中成熟酶编码序列、成熟酶核糖体结合位点、衣壳蛋白编码序列、包装位点和复制酶部分起始位点的 cDNA 序列克隆到原核表达载体上,并在其下游处插入外源 RNA 的 cDNA 序列,经转录后即可得到带有 MS2 噬菌体操纵子序列的外源 RNA 转录产物,引起衣壳蛋白自发组装,并将外源 RNA 序列包装到包膜内,形成 VLPs。同时包装本身还是一个翻译调节的元件,当衣壳蛋白表达水平超过组装要求时,衣壳蛋白二聚体与包装位点结合,阻止核糖体结合到复制酶的起始位点,抑制了复制酶的翻译,从而完成了翻译的调节^[6]。PEABODY^[7] 于 1990 年发现 MS2 噬菌体衣壳蛋白能够优先包装含有 19 mer 茎环结构的 RNA,形成 VLPs,但外源 RNA 长度超过 500 bp 则包装效率明显降低。随后,其他研究人员以此为基础,尝试包装更长的外源 RNA 片段^[8-10]。我国学者 ZHAN 等^[11] 进一步优化条件并构建带有 3 个或 2 个

C-variant 包装位点的表达系统,成功地将长 3 034 bp 的 RNA 包入 VLPs 中。

本研究通过探讨包装位点的亲和力及位置改变对 MS2 噬菌体包膜蛋白包装外源 RNA 的影响,采用 Armored RNA 技术,经大量原核表达纯化,制备了包装有 p210 型 BCR-ABL 融合基因和 ABL 内参基因的 VLPs,用于制备 BCR-ABL 融合基因核酸检测质控物。原核表达纯化 1 次即可获得大量的 VLPs,相比裸露的 RNA 和阳性细胞系成本更低,且对实验室生物安全要求低,目前被广泛应用于核酸检测质控和标准的研究^[12]。BCR-ABL 融合基因 Armored RNA 的推广应用,将为检测工作提供统一的质控物。

均一性和稳定性是质控物应具备的基本特性。均一性检测 pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标本的 CV 分别为 3.45% 和 3.64%,均 < 5.00%,表明标本中目的片段拷贝数水平是均一的;本研究稳定性结果显示,质控物在 -20 ℃ 可至少稳定保存 7 个月,4 ℃ 稳定保存 3 个月,室温稳定保存 15 d,37 ℃ 稳定保存 1 周 (CV < 5.00%)。在均一性和稳定性允许的条件下,两种不同水平的 VLPs 均能被市场在售试剂盒检出,pACYC-MS2-p210 VLPs 和 pACYC-MS2-ABL VLPs 标准曲线的 R^2 分别为 0.994 0 和 0.991 7,说明本研究研制的质控物将有助于核酸检测工作测量程序的评价、室内质控物和室间质评标本的建立和应用,促进我国 BCR-ABL 融合基因检测的标准化和规范化。

研究发现,随 CML 病情进展,BCR-ABL 融合基因转录本水平进行性增高,该基因的定量检测有助于疗效观察和预后判断^[13]。陈蕾等^[14] 发现,BCR-ABL 融合基因转录本水平持续性增高对 CML 病情进展可能具有预测作用。随着分子靶向治疗药物的广泛使用,BCR-ABL 融合基因的突变是导致治疗效果不佳的主要原因之一,且在治疗与预后中起着重要作用。研究发现,BCR-ABL 融合基因 T315I 突变是目前治疗 CML 耐药最难以克服的基因突变^[15],国外报道 BCR-ABL 融合基因 T315I 突变在 CML 患者中的发生率约为 15%^[16],这为制备不同变异来源的 BCR-ABL 融合基因质控物提供了基础。

参考文献

- [1] 余蕙君,周义文,陈茜,等. 评价 Ph 染色体和 BCR-ABL 融合基因检测在慢性粒细胞白血病诊断、治疗及微小残余病变监测中的临床意义[J]. 吉林医学,2019,40(6): 1239-1240.
- [2] 肖恒,任彦斌,杨志明,等. 实时荧光定量 PCR 检测 BCR-ABL 融合基因的临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2017,25(5):22-23.
- [3] LAWRENCE J J, DAVID G, JULIANN C, et al. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts

- by droplet digital PCR[J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(2):174-179.
- [4] GHOLAMI M, MEHRDAD R, KAZEM B, et al. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology[J]. *Iran Biomed J*, 2018, 22(6):394-400.
 - [5] ZHANG D, LIN G, YI L, et al. External quality assessment for rubella virus RNA detection using armored RNA in China[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2):399-405.
 - [6] WEI B J, WEI Y X, ZHANG K, et al. Development of an antisense RNA delivery system using conjugates of the MS2 bacteriophage capsids and HIV-1 TAT cell penetrating peptide[J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(4):313-318.
 - [7] PEABODY D S. Translational repression by bacteriophage MS2 coat protein expressed from a plasmid; a system for genetic analysis of a protein-RNA interaction[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(10):5684-5689.
 - [8] 龚敏卿, 杨春亭, 许洪林. 病毒样颗粒技术在人用疫苗中的应用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 24(10):971-976.
 - [9] SUN Y, JIA T, SUN Y, et al. External quality assessment for avian influenza A (H7N9) virus detection using armored RNA[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(12):4055-4059.
 - [10] DONG Z, YU S, JIA T, et al. External quality assessment for the detection of measles virus by reverse transcription-PCR using armored RNA[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0134681.
 - [11] ZHAN S, LI J, XU R, et al. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8):2571-2576.
 - [12] ZHAO L H, LI R Y, LIU A H, et al. A novel duplex real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for rubella virus with armored RNA as a non-competitive internal positive control[J]. *J Virol Methods*, 2015, 219:84-89.
 - [13] MAIER J, LANGE T, CROSS M, et al. Optimized digital droplet PCR for BCR-ABL[J]. *J Mol Diagn*, 2019, 21(1):27-37.
 - [14] 陈蕾, 焦志军, 林纲, 等. 慢性粒细胞白血病患者骨髓 bcr/ablp210 和 bcr/ablp190 转录本水平变化及意义[J]. *山东医药*, 2012, 52(11):47-49.
 - [15] YUSOFF Y M, SEMAN Z A, OTHMAN N, et al. Prevalence of BCR-ABL T315I mutation in Malaysian patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(12):3317-3320.
 - [16] SANDT C, FERAUD O, MARIE-LAURE B, et al. Direct and rapid identification of T315I-mutated BCR-ABL expressing leukemic cells using infrared microspectroscopy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3):1861-1867.

(收稿日期:2020-03-10 修回日期:2020-09-18)

(上接第 3587 页)

参考文献

- [1] 肖冰冰, 刘朝晖. 阴道微生态评价在阴道炎中的应用[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2016, 17(6):483-485.
- [2] 安瑞芳, 张岱, 刘朝晖, 等. 阴道微生态评价的临床应用专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(10):721-723.
- [3] 陶址, 廖秦平. 阴道微生态的研究进展及临床意义[J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34(10):721-723.
- [4] 赵婧, 赵雪楠, 任雪慧, 等. 阴道微环境失衡与 HR-HPV 感染及宫颈病变相关性研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(16):85-86.
- [5] 陈国斌, 王颖, 刘植华. 阴道乳酸杆菌与宫颈 HPV 感染及子宫颈癌前病变的相关性研究[J]. *中国现代药物应用*, 2016, 10(12):3-4.
- [6] 林琳, 高碧燕, 杞朝梅. 阴道微生态环境的临床研究进展[J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2017, 8(6):71-75.
- [7] 张蔚苓, 赵珊琼. 高危型人乳头瘤病毒感染与阴道微生态的关系[J]. *温州医科大学学报*, 2019, 49(1):59-62.
- [8] 王美藏, 高建宏, 杨雅琴. 乳酸杆菌半定量、阴道清洁度及阴道炎症与 HPV 感染的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(22):4734-4736.
- [9] 张雪芳, 何鑫, 黄文阳, 等. 中国女性宫颈高危型 HPV 感染与阴道微生态关系的 Meta 分析[J]. *首都医科大学学报*, 2018, 39(6):841-848.
- [10] CASTRO-SOBRINHO D J, RABELO-SANTOS R S, FUGUEIREDO-ALVES F R, et al. Bacterial vaginosis and inflammatory response showed association with severity of cervical neoplasia in HPV-positive women[J]. *Diagn Cytopathol*, 2017, 45(5):474-476.
- [11] 颜杰文. 人乳头状瘤病毒与妇科常见病原微生物感染关系研究[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(5):696-697.
- [12] 邱兴堤, 吴安玥, 李栋, 等. 阴道微生物多样性与高危型 HPV 感染的相关性研究[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(6):421-425.
- [13] 麦迪娜·萨迪克, 韩莉莉. 阴道微生态变化与宫颈病变的相关性研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(6):118-119.
- [14] GAO W, WENG J, GAO Y, et al. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection; a cross-sectional study[J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13(1):271-276.
- [15] 张攀. 人乳头瘤病毒感染对宫颈炎患者阴道微生态的影响[J]. *包头医学院学报*, 2019, 35(2):65-66.
- [16] 李盛勇, 牛萃, 张帝开. 阴道微生态改变与 HPV 感染的相关性[J]. *海南医学*, 2019, 30(9):1147-1150.

(收稿日期:2020-04-02 修回日期:2020-09-29)