

· 临床研究 ·

广西宫颈癌患者HPV感染情况的分子流行病学调查*

王 鹤^① 于继云^② 李 力^①

摘要 目的:调查人乳头瘤状病毒(Human papillomavirus, HPV)各亚型在广西壮族自治区宫颈癌患者中的分布情况,为宫颈癌疫苗的研制提供理论依据。**方法:**应用凯普HPV核酸扩增分型检测试剂盒对515例广西宫颈癌患者的宫颈组织DNA进行21种HPV亚型的检测;并应用实时荧光定量PCR对HPV16、18和58型阳性样本各50、48和41例的病毒负载量进行了绝对定量检测。**结果:**1)检测的515例样本中473例HPV阳性,HPV总阳性率为91.84%。HPV16的阳性率最高,为81.40%;其次为HPV18(10.15%);第三位是HPV58(8.67%)。排在前五位的HPV亚型依次为HPV16、18、58、52及31。2)检测样本中HPV16、18和58型的病毒负载量几何均数分别为2.398 5、0.017 3、0.038 1。HPV16分别与HPV18和58型的病毒负载量比较,有显著性差异($P<0.05$);HPV18与58型的病毒负载量比较,无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**广西宫颈癌患者中有较高的HPV阳性率,其中HPV16型排在首位,HPV18和58虽然分列第二、三位,但阳性率明显低于HPV16。HPV16的病毒负载量远远高于HPV18和58,说明HPV16的高病毒负载量与其高阳性率可能存在一定关系。

关键词 人乳头瘤病毒 宫颈癌 广西壮族自治区 流行病学

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.24.021

Molecular Epidemiology Investigation on Guangxi Cervical Cancer Patients with Human Papillomavirus Infection

He WANG¹, Jiyun YU², Li LI¹

Correspondence to: Li LI; E-mail: lili_temp@hotmail.com

¹Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

²Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; China

This work was supported by the Key Project of Guangxi Department of Public Health in 2009 (No. Zhong200970), and funds of the Self-financing Project of Guangxi Department of Public Health(No.z2007177)

Abstract Objective: This study aims to investigate the distribution of human papillomavirus (HPV) subtypes in Guangxi cervical cancer patients and to provide theoretical bases for research on Guangxi HPV vaccine. **Methods:** A total of 21 subtypes of HPV from 515 cervical cancer cases in the Guangxi Zhuang Autonomous region were detected using flow-through hybridization and gene chip technology. The viral loads of HPV16, HPV18, and HPV58 from 50, 48, and 41 patients, respectively, were examined by quantitative fluorescence PCR. **Results:** 1) Among the 515 cervical cancer cases, 473 (91.84%) were HPV positive. The positive rate of HPV16 was the highest (81.40%), followed by HPV18 (10.15%) and then HPV58 (8.67%). The top five HPV subtypes in Guangxi cervical cancer patients were HPV16, HPV18, HPV58, HPV52, and HPV31. 2) The viral load geometric means of HPV16, HPV18, and HPV58 were 2.3985, 0.0173, and 0.0381, respectively. The viral load geometric mean of HPV16 was significantly higher than that of HPV18 and HPV58 ($P<0.05$). However, no significant difference in the viral load geometric mean was found between HPV18 and HPV58 ($P>0.05$). **Conclusion:** The positive rate of HPV is very high in the Guangxi region. The positive rate of HPV16 is the highest, followed by HPV18 and then HPV58. The positive rate and average viral load of HPV16 were both higher than those of HPV18 and HPV58. Thus, a relationship between the high viral load and high positive rate of HPV may exist.

Keywords Human papilloma virus; Cervical cancer; Guangxi

子宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,发病率在女性恶性肿瘤中居第二位。近10余年来以大规模人群为基础的流行病学资料显示:在99%以上的宫颈癌中存在HPV DNA,HPV感染是宫颈癌发生的首要因素且为始动因素。我国最近完成的两项中国与亚洲妇女子宫颈组织中HPV型别分布的Meta研究结果显

示^[1]:HPV58型在我国宫颈癌妇女中是继HPV16和18之后的第三重要型别。由于各型HPV之间基因的差异性导致抗原表位的不同,因此,各型HPV疫苗之间并无交叉保护作用;并且HPV基因型的分布存在地域差异,近期尚无关于广西地区宫颈癌HPV感染分子流行病学的详细报道。基于上述原因,本研究

作者单位:①广西医科大学附属肿瘤医院(南宁市530021);②军事医学科学院基础医学研究所

*本文课题受广西卫生厅重点项目(编号:重200970)、广西卫生厅自筹经费项目(编号:Z2007177)资助

通信作者:李力 lili_temp@hotmail.com

拟对广西地区 HPV 感染情况、基因型分布以及感染率高的 HPV 基因型病毒负载量进行调查,为广西 HPV 疫苗研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 525 例宫颈癌组织标本均来自广西医科大学附属肿瘤医院妇瘤科 2002 年 5 月至 2008 年 5 月收治的宫颈癌患者,所有标本均经病理确诊。宫颈癌临床分期、病理组织学分级及细胞分化程度均参照 FIGO 2009 年的宫颈癌诊治规范标准。患者年龄 24~73 岁,平均年龄(48.25±10.11)岁。所有宫颈组织标本均在放疗或化疗之前宫颈活检时收集,取自肿瘤原发病灶。标本提取后立即放入液氮中保存,备提 DNA 用。

1.1.2 引物、菌株和测序 管家基因 β -globin、GAPDH 引物、HPV16、18、58 型 E6 引物均由 Invitrogen 公司合成;宿主菌大肠杆菌 DH-5 α 由本实验室保存;质粒测序由 Invitrogen 公司完成。

1.1.3 工具酶和试剂 HPV-DNA 提取试剂盒、HPV 核酸扩增分型检测试剂盒均由广东潮州凯普生物化学有限公司提供;2 \times Easy Taq PCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 电泳用琼脂糖购自 BIOWEST AGAROSE 公司;氨苄青霉素为华北制药有限公司产品;StarPrep 快速 DNA 凝胶回收试剂盒、StarPrep 质粒小量快速提取试剂盒和 EZ-T Ligation Kit T 载体快速连接试剂盒购自 GenStar Biosolutions Co, Ltd 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、Solution I 快速连接酶为 TaKaRa 公司产品;SYBR GREEN I 荧光染料购自上海捷瑞生物技术有限公司。

1.1.4 仪器 多通道 PCR 仪(美国 Therm 公司);凯普医用核酸分子快速杂交仪(潮州凯普公司);实时 PCR 检测仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 宫颈癌组织 DNA 提取 525 例宫颈癌组织 DNA 的提取根据凯普公司提供的 HPV-DNA 提取试剂盒说明书完成。以提取到的 DNA 为模板,以管家基因 β -globin 为引物,通过 PCR 方法检测 DNA 质量。在 56 $^{\circ}$ C 的退火温度下三步法进行 35 个循环的 PCR 反应,产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,如可见 268 bp 左右的条带,即可证实 DNA 提取成功。

1.2.2 HPV 感染率及型别检测 人乳头状瘤病毒(HPV)基因微阵列分型检测试剂盒是以凯普医用核酸分子快速杂交仪为平台,利用导流杂交的原理,在已经固定好核酸探针的低密度基因芯片膜上,可一次性快速检测占中国人群 HPV 感染 95% 的 21 种 HPV 亚型的基因分型。此 21 种亚型包括 13 种高危亚型:

16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68;5 种低危亚型:6、11、42、43、44;3 种中国人群常见亚型:53、66 和 CP8304 型(中国人特有的低危亚型)。采用上述试剂盒检测 DNA 提取成功的 515 例患者 HPV 感染情况。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 HPV16、HPV18 和 HPV58 病毒负载量,实时荧光定量 PCR 标准品制备 HPV16 E6、HPV18 E6 和 HPV58E6 基因片段扩增以前期检测的单一 HPV16、18 和 58 型阳性的宫颈癌组织 DNA 为模板,采用 PCR 方法获得。PCR 产物经切胶回收后分别与 EZ-T Ligation Kit T 载体经 Solution I 快速连接酶连接后转化入 E. coli.DH5 α 感受态大肠杆菌,经氨苄青霉素培养皿筛选,挑取阳性克隆摇菌提质粒,经 PCR 初步鉴定阳性者送公司测序,最终鉴定正确者分别命名为 HPV16 E6、HPV18 E6 和 HPV58E6 EZ-T 质粒。

GAPDH-EZ-T 质粒标准品的制备过程同 HPV16 E6、HPV18 E6 和 HPV58 E6 EZ-T 质粒的制备。将 HPV16 E6、HPV18 E6、HPV58E6 和 GAPDH EZ-T 共 4 种质粒溶液分别检测 A_{260} 和 A_{280} 值,根据公式计算出质粒 DNA 的浓度和拷贝数,后将上述质粒溶液分别倍比稀释成 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 Copies/ μ L 共 7 个浓度梯度的标准品。2) 实时荧光定量 PCR 检测 HPV16、HPV18 和 HPV58 病毒负载量进行 real-time Q-PCR 检测前,先用紫外分光光度仪分别检测各待测的宫颈癌组织 DNA 的 OD 值,并换算出浓度,后用灭菌三蒸水将各待测 DNA 稀释成同一浓度,冻于 -20 $^{\circ}$ C 备用。通过 SYBR Green I 染料法对待测样品进行实时荧光定量 PCR 检测:分别将病毒质粒标准品与 GAPDH EZ-T 质粒标准品同时与待检测的已确定单一感染 HPV16、18 或 58 型的宫颈癌组织 DNA 进行同步实时荧光定量 PCR 扩增,建立双标准曲线,对各待测样品 DNA 的 HPV 病毒负载量进行绝对定量检测,同时加入阴、阳性对照品进行扩增。在避光条件下建立如下反应体系(总体积 20 μ L):10 \times PCR Buffer(with MgCl₂) 2.0 μ L、2.5 mM dNTPs 0.8 μ L、上游引物 0.4 μ L、下游引物 0.4 μ L、SYBR Green I 0.5 μ L、DNA 模板 1.0 μ L、灭菌去离子水 14.7 μ L、Taq 0.2 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,退火 1 min (HPV16: 57 $^{\circ}$ C; HPV18: 58 $^{\circ}$ C; HPV58: 54 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;并在退火时采集荧光。

1.3 统计学处理

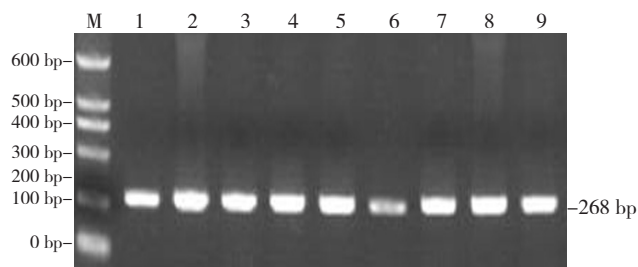
数据处理采用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,偏态分布以中位数及四分位数表示。计量资料方差齐者以 *t* 检验、单因

素方差分析(One-way ANOVA)进行统计学处理,方差不齐者以秩和检验进行统计学分析。计数资料的比较采用 χ^2 检验。 P 值均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。病毒负载量以计算几何平均数来表示,并在各组的几何平均数间进行比较。

2 结果

2.1 宫颈癌组织DNA质量鉴定结果

分别以525例宫颈癌组织中提取的DNA为模板,用产物长度为268 bp的管家基因 β -globin引物进行PCR检测,结果515例宫颈癌组织DNA均在268 bp左右可见明显条带(图1),证明515例DNA质量佳,可以进行下一步实验。



M: DNA marker(DL600); 1~9: DNA Sample1~9

图1 管家基因 β -globin PCR扩增的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA amplified by β -globin

2.2 515例宫颈癌患者中HPV各亚型的分布

用凯普HPV分型试剂盒检测提取质量好的515例宫颈癌组织DNA,结果473例HPV阳性,HPV总阳性率为91.84%。HPV16在HPV阳性的宫颈癌患者中出现的频率最多,为385例(81.40%);其次为HPV18,为48例(10.15%);第三位是HPV58,为41例(8.67%)。排在前五位的HPV亚型按其出现的频率多少排列依次为HPV16、HPV18、HPV58、HPV52及HPV31,其次为HPV53、HPV33、HPV59、HPV39、HPV66; HPV35、HPV43、HPV51最少,结果见表1。计算HPV出现的频率时若一例宫颈癌患者被多重感染,则其中感染的各型HPV各算一次。

2.3 实时荧光定量PCR检测HPV16、18、58病毒负载量条件的建立

2.3.1 HPV16、18、58 E6 EZ-T质粒和GADPH-EZ-T质粒测序 将构建好的HPV16、18、58 E6 EZ-T质粒和GADPH-EZ-T质粒分别送测序,测序结果在NCBI上进行BLSAST比对,结果与HPV16、18、58 E6基因和GADPH基因的同源性分别达到100%、100%、99%和97%,证实该质粒构建成功。

2.3.2 HPV16、18、58 E6 EZ-T质粒和GADPH-EZ-T质粒标准曲线的建立 1)GADPH-EZ-T质粒标准曲线:以倍比稀释的GADPH-EZ-T质粒标准品为模板,

通过实时荧光定量扩增得到的标准曲线相关系数是0.977,相关性佳,说明其作为检测GADPH的标准品条件良好。2) HPV16、18、58 E6-EZ-T质粒扩增标准曲线结果:分别以倍比稀释的HPV16、18、58 E6-EZ-T质粒标准品为模板,通过实时荧光定量扩增得到的三条标准曲线相关系数分别为0.991、0.976和0.992(图2),相关性佳,说明三者作为检测HPV16、18、58(+)的宫颈组织DNA的标准品条件良好。

表1 HPV各亚型在515例宫颈癌及473例HPV阳性宫颈癌患者中的频率分布

Table 1 Frequency distributions of the different subtypes of HPV in 515 cases with cervical cancer and 473 with HPV-positive cervical cancer

HPV类型	例数	总比例(%)	占HPV阳性宫颈癌的比例(%)
阴性	42	8.16	—
HPV16	385	74.76	81.4
HPV18	48	9.32	10.15
HPV58	41	7.96	8.67
HPV52	32	6.21	6.77
HPV31	20	3.88	4.23
HPV53	13	2.52	2.75
HPV33	10	1.94	2.11
HPV59	9	1.75	1.9
HPV39	6	1.17	1.27
HPV66	6	1.17	1.27
CP8304	6	1.17	1.27
HPV68	5	0.97	1.06
HPV42	4	0.78	0.85
HPV45	3	0.58	0.63
HPV11	2	0.39	0.42
HPV35	1	0.19	0.21
HPV43	1	0.19	0.21
HPV51	1	0.19	0.21

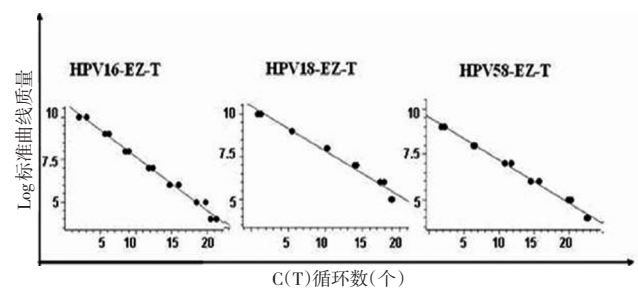


图2 GADPH-EZ-T质粒标准品的标准曲线和溶解曲线

Figure 2 Standard and melting curves of GADPH-EZ-T plasmid

2.3.3 实时荧光定量检测HPV16、18、58阳性宫颈癌组织DNA中的病毒负载量 分别对HPV16 E6、HPV18 E6、HPV58 E6 EZ-T质粒和GADPH-EZ-T质粒倍比稀释成系列浓度梯度的标准品进行检测,建立“检测结果(Ct值)-标本浓度”对应直线,通过仪器

的软件自动计算出标本浓度,最低检出拷贝数为50拷贝/细胞。对于每个阳性标本,因为有HPV16 E6、HPV18 E6、HPV58 E6 EZ-T质粒标准品定量,所以系统软件都会自动生成一个定量值;同时对于每个样本相对应的内标(GADPH)也有一个定量值,该内标的定量值可以反映出对应标本的宫颈细胞浓度。

运用实时荧光定量分别检测了HPV16、HPV18和HPV58阳性的宫颈癌组织DNA各50、48和41例,每例样品以HPV E6拷贝数和GAPDH拷贝数的比值来表示这一样本的病毒负载量,目的是消除不同样本量(GAPDH拷贝数)不同所导致的HPV E6拷贝数的差异,各型别的实时荧光定量PCR扩增曲线见图3。检测结果显示:检测样本中HPV16、HPV18和HPV58型的病毒负载量的几何均数分别为2.398 5、0.017 3和0.038 1。HPV16分别与HPV18和HPV58型的病毒负载量比较,有显著性差异($P<0.05$);HPV18与HPV58型的病毒负载量比较,无显著性差异($P>0.05$)。

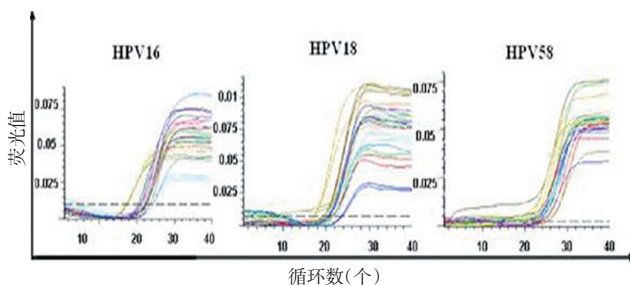


图3 HPV16、18、58 E6-EZ-T质粒标准品的标准曲线

Figure 3 Standard curves of HPV16, HPV18, and HPV58 E6-EZ-T plasmids

3 讨论

广西作为经济欠发达的西部省份,近年来宫颈癌发病率上升明显。从来自遍及广西的23个医学院校附属医院、省级及各地市医院住院病例调查的结果显示^[2]:广西宫颈癌发病率上升速度快且年轻化趋势明显。因此,研制能使广西妇女普遍受益的HPV疫苗是迫切需要的。但各型HPV之间基因的差异性导致各型HPV疫苗之间并无交叉保护作用。因此,在进行广西HPV疫苗研制之前,了解本地HPV感染的分布情况是非常必要的。

本研究中,我们采用凯普公司提供的HPV核酸扩增分型检测试剂盒,先后检测了515例宫颈癌确诊的宫颈组织DNA。结果显示,473例宫颈癌患者感染了HPV,感染率91.84%。HPV16的感染率最高,为81.40%;其次为HPV18(10.15%);第三位是HPV58(8.67%)。排在前五位的HPV亚型依次为HPV16、HPV18、HPV58、HPV52及HPV31,其次为HPV53、

HPV33、HPV59、HPV39、HPV66; HPV35、HPV43、HPV51最少。该数据通过与我国多省作者报道的数据比较发现,尽管各省报道的高危HPV型别排序不同,但16、18和58型却常常出现在前几位。南方地区,刘继红等^[3]报道广东妇女高危HPV型别感染率排在前三位的是16、58和66型;张咏梅等^[4]报道湖南湘潭地区妇女高危型HPV感染率最高的是16型,其次是52、58、6、33、68型;徐虹等^[5]报道浙江乐清地区妇女高危型HPV感染率最高的是16型,其次是18、33、58和59型;江敬红等^[6]报道武汉地区宫颈癌患者中HPV感染率最高的是16型,其次是18、52、58和33型。北方地区,徐亚萍^[7]报道山东潍坊地区宫颈病变患者中高危型HPV感染率最高的是16型,其次是68、58和52型;刘金凤^[8]报道甘肃省兰州市的宫颈癌及癌前病变的患者中HPV型别感染率排在前五位的是16、58、31、33、52型;古扎丽努尔·阿不力孜等^[9]在新疆各地区维吾尔族宫颈癌患者中HPV型别感染率排在前五位的是16、18、68、45和58型。另据全国的最新报道证实^[1]: HPV16、18、58、52和31型是我国子宫颈癌病例中最常见的5种HPV型别。综合以上报道:尽管HPV58型感染率在我国各地区的排序不尽相同,但却是我国北方和南方乃至亚洲地区子宫颈癌标本中均为第3位常见的HPV型别。

在研究中我们还发现,HPV16的感染率远远高于HPV18和HPV58。为探明原因,我们在进一步的研究中,应用实时荧光定量PCR对HPV16、HPV18和HPV58阳性样本各50、48和41例的病毒负载量进行了绝对定量检测。结果发现: HPV16、HPV18和HPV58的病毒负荷量的几何均数分别为2.398 5、0.017 3、0.038 1。HPV16型的病毒负载量明显高于18和58型($P<0.05$),而HPV18型的病毒负载量与58型比较无显著性差异($P>0.05$)。虽然目前对于高危HPV病毒负载量与宫颈癌及癌前病变的损害严重程度之间的关系还存在着争议,但高病毒负载可导致病毒复制及支持病毒持续存在^[10-11],抑制机体的免疫反应,减少病毒清除和细胞学转归的机会^[12],因此,高病毒负载更易造成持续和反复感染。从本研究结果看,HPV16型的病毒负载量比18和58型高得多,这有可能是导致HPV16型感染率特别高的一个重要因素。当HPV病毒表达旺盛时,大量的HPV癌蛋白基因的表达,严重干扰了细胞周期的正常调控,使抑癌基因失活,直接或间接刺激细胞增殖,导致细胞周期失控发生永生化,进而导致细胞癌变的概率增加。Bigras等^[13]的研究显示对于同一样本行HPV检测和细胞学检查,HPV负荷量与细胞学检查的异常程度直接相关,似乎HPV的高负荷量与宫颈病变的严重程度

有相关性。另一项超过10年的回顾研究^[14]也表明: HPV 16持续高负荷量者,即使其最初的宫颈细胞学结果是阴性,患宫颈原位癌的风险仍然比 HPV 16阴性者高至少30倍,在25岁之前感染 HPV16高负荷量的女性,有25%在15年后进展为原位癌,进一步说明 HPV16型的病毒负荷量与宫颈病变的进展程度相关。另据李隆玉等^[15]发现: CIN患者手术治疗后 HPV DNA 负荷量的明显下降以致转为阴性,这也从另一个方面证明了 HPV 病毒负荷量与宫颈病变之间的关系。在我们的研究中还发现,虽然 HPV18型和 HPV58的病毒负荷量并不高,但是二者在宫颈癌患者中的感染率及病变严重程度并不低,说明除了病毒负荷量之外,还有其他因素如宿主的遗传易感性、免疫状态、环境因素等影响宫颈病变的进展。

目前多数文献显示,20%~30%的 HPV 感染妇女同时感染了多种类型的 HPV。虽然多重 HPV 感染间的相互影响还不太明了,但持续 HPV 感染与宫颈癌发生的关系却是公认的^[16]。当 HPV16型持续感染导致机体免疫力降低后,患者容易继发其他致病能力相对较低的 HPV(如 HPV58型)感染。Liaw 等^[17]对最主要型别 HPV16与其它类型 HPV 感染(包括 HPV58)进行前瞻性研究,提示 HPV16感染可使随后其它类型 HPV 感染的危险性增加。说明要对相对低危的型别如 HPV58型等感染进行防治,必须首先提高机体的免疫力、阻断 HPV16型的持续感染,这样才能防治由 HPV16型感染继发的其他高危型别 HPV 感染。

总之,本研究利用 PCR 为基础的技术,对广西的部分宫颈癌患者进行了 HPV 感染率、型别及病毒负载量的检测,提供了一份比较完整的广西宫颈癌患者 HPV 感染情况的分子流行病学资料,为广西 HPV 疫苗研制提供了依据。

参考文献

- 1 乔友林.中国妇女人乳头瘤病毒感染和子宫颈癌的流行病学研究现状及其疫苗预防前景[J].中华流行病学杂志,2007,28(10):937-940.
- 2 黄薇,李力,余冬青,等.广西壮族自治区8009例妇科恶性肿瘤住院患者的构成特点及变化趋势[J].中华妇产科杂志,2007,42(1):22-25.
- 3 刘继红,关明飞,钱德英,等.中国和澳大利亚妇女子宫颈上皮内瘤变人乳头瘤病毒感染和相关危险因素的病例对照研究[J].中华流行病学杂志,2007,28(10):958-963.
- 4 张咏梅,周晶,龚志红.湘潭地区 HPV 感染及不同亚型分布[J].中国现代医生,2010,48(34):108-109.
- 5 徐虹,张巨香,施晓华,等.乐清地区妇女宫颈 HPV 感染及亚型分布调查研究[J].中国现代医生,2009,47(15):17-19.
- 6 江敬红,张蔚,王卓然,等.HPV 亚型在宫颈疾病中的分布特点[J].现代妇产科进展,2009,18(10):758-761.
- 7 徐亚萍,刘欣,王秀会.潍坊地区宫颈病变 HPV 感染率及型别分布

的研究[J].潍坊医学院学报,2010,32(1):14-16.

- 8 刘金凤.甘肃省以医院为基础的子宫颈癌及宫颈高度内瘤变患者 HPV 感染及型别分布[J].中国初级卫生保健,2008,22(9):32-33.
- 9 古扎丽努尔·阿不力孜,帕提曼·米吉提,李庭芳,等.HPV 各亚型在新疆各地区维吾尔族宫颈患者中的分布研究[J].新疆医科大学学报,2009,32(5):513-517.
- 10 Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study[J]. Lancet, 2000, 355(9222):2194-2198.
- 11 Ho GY, Studentsov YY, Bierman R, et al. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(1):110-116.
- 12 Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, et al. High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma[J]. Br J Cancer, 2005, 92(5):891-894.
- 13 Bigras G, de Marval F. The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13842 women[J]. Br J Cancer, 2005, 93(5):575-581.
- 14 钱德英,岑坚敏,王丁,等.高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对子宫颈癌前病变筛查的研究[J].中华妇产科杂志,2006,41(1):34-37.
- 15 李隆玉,乔志强.宫颈癌前病变患者治疗前后 HPV 病毒负荷量变化的临床分析[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(4):298-300.
- 16 Nygard JF, Sauer T, Skjeldestad FE, et al. CIN 2/3 and cervical caD-cer after an ASCUS pap smear. A 7-year, prospectivestudy of the Norwegian population-based, coordinated screening program[J]. Acta Cytol, 2003, 47(6):991-1000.
- 17 Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types[J]. J Infect Dis, 2001, 183(1):8-15.

(2012-02-11 收稿)

(2012-09-06 修回)

(本文编辑:杨红欣)