

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.09.005

文章编号: 1005-8982 (2020) 09-0028-06

人乳头瘤病毒 16 型 DNA 整合对宫颈癌变的影响 *

刘霞, 张乔, 张慧杰

(中国医科大学附属盛京医院 妇产科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 研究人乳头瘤病毒(HPV)16型DNA在宫颈鳞状细胞癌(SCC)及其癌前病变中的整合状况,探讨其在宫颈癌变中的作用。方法 采用多重聚合酶链反应技术检测428例HPV-16阳性并经组织学证实具有不同程度宫颈病变及正常宫颈上皮女性的宫颈脱落细胞中HPV-16 DNA的整合状况;采用E2/E6的比值作为整合的替代标志物。研究对象分为病例组(354例)包括经组织病理学证实的103例SCC及251例宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL),对照组(74例)包括34例宫颈低级别鳞状上皮内病变(LSIL)及40例正常宫颈上皮细胞女性。不同程度宫颈病变中HPV-16 DNA整合率的变化采用 χ^2 趋势分析;病毒整合与现患HSIL及SCC风险的优势比(OR)采用非条件Logistic回归分析。结果 HPV-16 DNA整合率随宫颈病变的加重逐渐升高,从对照组中的6.8%(5/74),升高至HSIL组的29.9%(75/251)及SCC组的68.0%(70/103),3组整合率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。经多因素分析调整吸烟状况及合并感染其他高危型HPV后,HPV-16基因组整合与现患HSIL及SCC风险的优势比为OR=2.30(95% CI: 1.62, 3.18)。结论 HPV-16 DNA整合发生在病毒感染自然史的早期,病毒整合在宫颈癌变过程中起促进作用。

关键词: 子宫肿瘤; 宫颈鳞状上皮内病变; 人乳头瘤病毒; 病毒整合

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Research of human papillomavirus type 16 DNA integration contributes to cervical carcinogenesis*

Xia Liu, Qiao Zhang, Hui-jie Zhang

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital, China Medical University,
Shenyang, Liaoning 110004, China)

Abstract: Objective To explore the integration status of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) type 16 DNA in cervical squamous cell cancer (SCC), its precursors (high-grade cervical squamous intraepithelial lesion, HSIL) and the role of virus integration in cervical carcinogenesis. **Methods** Viral integration was determined by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) in 428 HPV type 16-positive cervical scrapings obtained from women with different grades of histologically confirmed cervical lesions or normal cervical epithelia, and the ratios of E2/E6 genes were used as a surrogate for integration. The case patients included 103 women with SCC and 251 HSIL, while the controls included 34 LSIL and 40 normal cervical epithelia. The prevalence of HPV 16 DNA integration in different grades of cervical lesions was analyzed by χ^2 trend test. The association of viral integration and the risk of prevalent HSIL or SCC were assessed by unconditional logistic regression. **Results** The prevalence of HPV-16 DNA integration increased in parallel with the severity of cervical lesions, which increased from 6.8% (5/74) in controls to 29.9% (75/251) in HSIL and 68.0% (70/103) in SCC ($P < 0.05$). The differences among the three groups were statistically significant ($P < 0.05$). After adjustment for smoking status and co-infection with other high-risk HPV

收稿日期: 2019-12-15

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No: 201602841)

types, the odds ratio (OR) showed by multivariate analysis of the risk association of integration with prevalent HSIL and SCC was 2.30 (95% CI: 1.62, 3.18). **Conclusions** HPV-16 integration occurs early in the natural course of viral infection. Viral integration may contribute to the process of cervical carcinogenesis.

Keywords: uterine cervical neoplasms; cervical squamous intraepithelial neoplasia; human papilloma virus; virus integration

子宫颈癌是全球范围内第 4 位常见的恶性肿瘤^[1], 持续性高危型人乳头瘤病毒 (high-risk human papilloma virus, HR-HPV) 感染是导致子宫颈鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 及其癌前病变发生的必要但不充分病因^[1-2]。目前 SCC 发生的模式按照以下步骤进行: 急性 HR-HPV 感染, 持续性 HR-HPV 感染导致不同程度的子宫颈上皮细胞异常, 包括子宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I ~ III 级; 或 2 级分类系统的宫颈低级别和高级别鳞状上皮内病变 (low-grade/high-grade squamous intraepithelial lesions, LSIL/HSIL), 最终进展为浸润性 SCC^[3]。子宫颈癌发生的机制尚不完全清楚, 一些病毒和宿主的基因事件可能促进正常宫颈上皮向恶性肿瘤的转变^[2, 4-5]。HPV 基因组在宫颈组织中以 3 种形式存在 (环状游离型, 整合到宿主基因组中, 或者两者共存的混合型)^[4-6]。整合发生在 HPV 病毒致癌基因 *E6*、*E7* 的下游, 通常在 *E2* 或 *E1* 基因区域^[1]; HPV DNA 整合到宿主细胞基因组后, 癌基因 *E6*、*E7* 和长控制区域 (long control region, LCR) 通常被保留, 而 *E2* 基因优先被删除或破坏^[4]。因此, *E2*、*E6* 基因的比值 (*E2/E6*) 被提出可作为评估 HPV 基因组整合的替代标志物^[7-8]。HR-HPV 基因组整合后由于 *E2* 蛋白负调控功能的丧失, 通常导致 *E6*、*E7* 癌基因的表达失调, 因此病毒整合可能参与 HPV- 相关肿瘤的致癌过程。

HPV-16 是 SCC 及其癌前病变 (CIN II / III 或 HSIL) 中最常见的高危因素^[4, 9]。已有的关于 HPV-16 整合在宫颈病变中的作用尚存在争议。一些研究表明, HPV 整合与宫颈病变的严重程度相关^[1, 4, 10], 而另一些研究则相反^[11-12]。此外, 一些学者认为 HPV 整合是发生病毒感染过程的早期事件, 即发生在 LSIL 或正常宫颈上皮细胞中^[11, 13], 而另一些学者认为病毒整合是与从 HSIL 进展到 SCC 相关的晚期事件^[14]。HPV 基因组的整合率随病毒感染的型别、部位、疾病的严重程度或其他的生物-地理因素而变化^[4, 7]。该研究采用多重聚合酶链反应 (PCR) 技术^[8, 11]对来自中国东北地区 428 例 HPV-16 阳性的不同级别宫颈

病变及正常宫颈上皮女性的宫颈脱落细胞中 HPV-16 DNA 的整合状况进行全面分析, 探讨其与子宫颈病变严重程度的相关性及其在宫颈癌变中发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 8 月—2017 年 12 月于中国医科大学附属盛京医院妇科进行宫颈癌筛查 HPV-16 的妇女 428 例。研究经本院医学伦理委员会批准, 所有受试者签署知情同意书。

研究对象分为病例组 354 例, 包括经组织病理学证实 SCC 组 103 例, HSIL 组 (CIN II / III) 251 例。对照组 74 例, 包括经组织病理学证实的 34 例 LSIL 组 (CIN I) 和 40 例正常宫颈上皮组 (因良性妇科肿瘤行子宫切除术并经病理证实排除宫颈病变的女性)。在收集宫颈脱落细胞时患者年龄 18 ~ 67 岁, 平均 (38.9 ± 8.8) 岁。对患者进行如下检测: 常规妇科检查, Thin Prep[®] 细胞学检测 (TCT) 及 HPV 分型检测。宫颈脱落细胞标本采用锥形宫颈刷取样, 宫颈细胞学标本取样步骤和要求按照常规进行。用窥器轻轻暴露宫颈后, 先用棉拭子拭净宫颈表面分泌物, 将宫颈刷置于子宫颈管内达子宫颈上方 1.0 cm 左右的宫颈鳞柱交界处取样, 宫颈刷在子宫颈管内旋转 3 ~ 5 圈后取出, 将刷取的宫颈脱落细胞洗脱于 1 个包含 20 ml Preserv Cyt 溶液的小瓶中, 细胞标本放置在保存液中 2 周内检测, 4℃冰箱保存。经 Thin Prep[®] 2000 系统程序化处理宫颈脱落细胞标本, 制成直径 2 cm 的薄层细胞涂片, 采用巴氏染色^[15]。所有标本在宫颈活检或治疗前采样。采用 2001 年 TBS 系统进行细胞学检测结果分类: 上皮内病变恶性肿瘤阴性 (negative for intraepithelial lesion malignancy, NILM), 意义未明非典型鳞状细胞 (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US), 非典型鳞状细胞伴不能排除高级别鳞状上皮内病变 (atypical squamous cells with high-grade lesion that cannot be excluded, ASC-H) 或 LSIL 及 HSIL。剩余标本置入 -20℃冰箱冷冻保存, 2 个月提取 DNA 用于 HPV 分型检测。患者具有免疫缺

陷疾病史、妊娠、盆腔化疗或放疗病史,或宫颈治疗或活检病史不包括在该研究中。

1.2 材料与试剂

Thin Prep[®] 2000 细胞学检测系统 (TCT) (美国 Cytoc 公司), QIAamp DNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen Hilden 公司), SiHa 宫颈癌细胞株购自美国培养中心 (美国 ATCC 公司), HeLa 细胞株 (由该院感染科实验室惠赠), 10% 胎牛血清 (德国 Gibco Chrome 公司), 100 bp DNA 梯度 (美国 Invitrogen 公司), TaqMan 多重 PCR 试剂盒 (北京 TIANGEN 生物技术有限公司)。

1.3 仪器与设备

HPV 分型检测采用凯普 HPV Geno Array 技术 (香港 Hybri Bio 有限公司), PCR 循环仪 (德国 Eppendorf Master-cycler Gradient 公司), 台式高速离心机 (TGL-16G, 上海安亭科学仪器厂), LDZ5-2 低速离心机 (北京时代北利离心机有限公司), 紫外分光光度计 (美国 Beckman Coulter 公司); 电泳图像扫描仪 (Tanon 4100) (上海天能公司), Primer Premier 5.0 软件 (加拿大 Premier 公司), Stata 11.1 软件 (美国 Stata 公司), 电泳图像分析软件 (美国 Bio Image Ann Arbor Mich 公司)。

1.4 实验过程

1.4.1 细胞株培养及细胞 DNA 提取 SiHa 宫颈癌细胞株含有 1、2 个整合的 HPV-16 用于多重 PCR 的阳性对照。HeLa 细胞株含有 1 个整合的 HPV-18 DNA 作为阴性对照。SiHa 和 HeLa 细胞在改良的 DMEM 和 RPMI 1640 培养基中培养, 分别补充 10% 胎牛血清, 在 37℃、饱和湿度、5% 二氧化碳 CO₂ 标准条件下培养。

从宫颈脱落细胞及细胞株中提取总的细胞 DNA, 采用 DNA 试剂盒进行, 从细胞保存液中提取 3 ml 经离心后用于 DNA 制备; 采用紫外分光光度计在 OD_{260/280} 处测定 DNA 浓度。通过扩增 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*) 基因确定存在人基因组 DNA。只有 *GAPDH* 扩增阳性的标本进一步行 HPV 分型检测^[15]。

1.4.2 HPV 分型检测、阴道镜和组织学诊断 HPV 基因分型检测采用核酸分子快速导流杂交基因芯片技术, 该技术能同时检测 21 种 HPV 基因型, 包括 6 种低危型 HPV (low-risk HPV, LR-HPV) 类型 (6, 11, 42, 43, 44 型和 CP8304 相当于 81 型), 14 种 HR-HPV 类型 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,

58, 59, 66 和 68 型) 和 1 种可能 HR-HPV 型 53。基本原理是先将 HPV DNA 进行基因扩增, 然后利用其特有专利的导流杂交技术使目的分子导流穿过固定有 DNA 探针的基因芯片薄膜进行快速杂交。具体步骤包括: 样本 HPV DNA 分离、提取; PCR 扩增; 核酸分子快速导流杂交、显色; 最终的结果分析通过芯片的颜色变化直接进行肉眼判读^[15]。

HPV-16 阳性的患者, 无论其宫颈细胞学结果如何, 均转诊阴道镜。阴道镜检查后在任何可疑宫颈病变区域进行点活检。对不满意阴道镜检查, 进一步行子宫颈管内膜搔刮术 (endocervical curettage, ECC)。组织学诊断在宫颈脱落细胞取样后 3 个月内获得。宫颈组织标本是通过宫颈活检, 环状电切 (loop electrosurgical excision procedures, LEEP) 锥型切除或全子宫切除获得。对具有多个组织学诊断的患者, 以最严重的诊断为最终结果。所有组织学切片均由该院 2 位病理医师盲法审阅。如果前 2 位病理医师的诊断不一致, 由第 3 位病理医生盲法审阅病理切片。多数病理医生的判定结果作为最终的诊断。

1.4.3 多重 PCR 检测 HPV-16 基因组的体内状态 HPV-16 基因组的体内状态用多重 PCR 法进行盲法分析。如果 *E2/E6* 的比值是 0, 则 HPV DNA 认为是“纯整合”型; 如果比值 ≥ 1 是纯游离型, 如果比值为 $0 \sim <1$ 是混合型^[4, 16]。

针对 HPV-16 *E2* 和 *E6* 基因的多重 PCR 是在一个反应试管内同时扩增 *E2* 和 *E6* 基因, 扩增在 25 μ l 终反应混合物中进行: 包含 2.5 μ l 的样本 DNA, 每个引物 0.25 μ mol, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.25 μ l, 2 μ l dNTPs, 0.20 μ l TaqMan (5 u/ μ l) 和 17.05 μ l ddH₂O。循环条件是 94℃ 预变性 5 min, 随后 30 个周期为 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 最终 72℃ 继续延伸 5 min。

HPV-16 *E2* 和 *E6* 的引物用 Primer Premier 5.0 设计, 用于扩增 HPV-16 *E2* 和 *E6* 基因的引物见表 1。扩增后, 5 μ l 多重 PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 用 100 bp DNA 梯度标记, 然后在紫外线 (UV) 下显影。测量并分析 *E2* 和 *E6* 基因扩增条带的面积和灰度, 然后计算 *E2/E6* 基因的比值。每个样本检测一式 3 份。

1.5 统计学方法

数据分析采用 Stata 11.1 统计软件。计数资料采用例 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验; 不同级别宫

表 1 多重 PCR 的引物

HPV-16 扩增基因	引物序列	引物位置 /nt [†]	长度 /bp [†]
E2	正向: 5'-CGACTATCCAGCGACCAAG-3'	3 462~3 480	257
	反向: 5'-CCAATGCCATGTAGACGAC-3'	3 700~3 718	
E6	正向: 5'-ACCCAGAAAAGTTACCACAGT-3'	127~146	397
	反向: 5'-GCAACAAGACATACATCGAC-3'	504~523	

注: † 核苷酸 (nt) 和碱基对 (bp) 引物位置依据 HPV-16 基因序列 (基因库号: LC368995)。

颈病变中 HPV DNA 整合率的变化采用 χ^2 趋势分析; HPV-16 DNA 整合与现患 $\geq$ HSIL 病变风险采用多因素非条件 Logistic 回归分析; SCC 相关因素采用 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 SCC 相关因素的比较

患者平均年龄: 病例组 (37.1 $\pm$ 4.0) 岁, 对照组

(36.9 $\pm$ 3.9) 岁。两组年龄、使用激素避孕药、终生男性伴数、同时感染其他高危型比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组吸烟状况比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 病例组多于对照组。见表 2。

2.2 不同级别宫颈上皮细胞 HPV-16 DNA 的整合状况

病毒的整合率随宫颈病变的严重程度的加重而升高 ($\chi^2=78.096, P=0.000$)。HPV-16 DNA 的整合

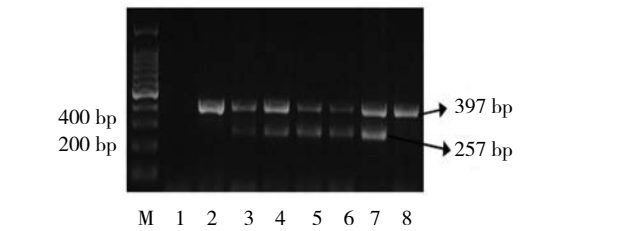
表 2 两组 SCC 相关因素的比较 例 (%)

组别	n	年龄		目前使用激素避孕药		吸烟状况		终生男性伴数		同时感染其他高危型	
		18 ~ 24 岁	>24 岁	是	否	是	否	≥ 3	<3	是	否
病例组	354	45 (12.7)	309 (87.3)	54 (15.3)	300 (84.7)	80 (22.6)	274 (77.4)	35 (9.9)	319 (90.1)	39 (11.0)	315 (89.0)
对照组	74	7 (9.5)	67 (90.5)	15 (20.3)	59 (79.7)	7 (9.5)	67 (90.5)	12 (16.2)	62 (83.8)	14 (18.9)	60 (81.1)
χ^2 值		0.607		1.139		6.525		2.508		3.522	
P 值		0.436		0.286		0.011		0.113		0.061	

率 (即混合型例数 + 纯粹整合型例数 / 总病例数) 从对照组的 6.8% (5/74) 上升到 HSIL 组中的 29.9% (75/251) 及 SCC 组中的 68.0% (70/103) [HSIL 组与 SCC 组比较 ($\chi^2=43.796, P=0.000$), 病例组与对照组比较 ($\chi^2=31.455, P=0.000$), LSIL 组与 HSIL 组比较 ($\chi^2=6.679, P=0.008$)]。在 SCC 组中, HSIL 及 LSIL 整合型 HPV-16 DNA 均以混合型为主。整合型的 HPV-16 DNA 在 SCC 女性中最常见, 并且在 32.0% (33/103) 的 SCC 患者中检测到纯粹游离型。该研究检测到的纯粹游离型及混合型 HPV-16 DNA 的 E2/E6 基因比值范围分别为 1.00 ~ 2.34 和 0.42 ~ 0.98。见图 1 和表 3。

2.3 HPV-16 DNA 整合与宫颈病变严重程度的相关性

SCC 组、HSIL 组及对照组 HPV-16 基因组整合率的变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($Z =$



M: Marker; 1: HeLa 细胞为阴性对照组; 2: SiHa 细胞为阳性对照组; 3 ~ 4: 混合型; 5 ~ 7: 纯粹游离型; 8: 纯粹整合型。

图 1 HPV-16 E2、E6 基因电泳结果

表 3 不同宫颈病变程度 HPV-16 DNA 体内状态

病变程度	n	游离型 例 (%)	混合型 例 (%)	纯粹整合型 例 (%)	整合率 / %
SCC	103	33 (32.0)	63 (61.2)	7 (6.8)	68.0
HSIL	251	176 (70.1)	69 (27.5)	6 (2.4)	29.9
LSIL	34	31 (91.2)	3 (8.8)	0 (0.0)	8.8
NILM	40	38 (95.0)	1 (2.5)	1 (2.5)	5.0

8.530, $P=0.000$)。

HPV-16 DNA 整合与现患 HSIL 或 SCC 风险的相关性采用非条件 Logistic 回归分析, 因变量 (Y) 是组织病理学结果; 将吸烟状态和同时感染其他 HR-HPV 型别纳入多变量分析模型 ($\alpha=0.10$)。Logistic 回归分析显示调整吸烟状态及合并感染其他类型 HR-HPV 因素后, HPV-16 DNA 整合与现患 HSIL 或 SCC 风险的 $OR=2.30$ (95% CI: 1.62, 3.18)。

3 讨论

该研究结果显示, HPV-16 DNA 整合率随宫颈病变的加重而升高, 这一结果与已有的一些研究报道相一致^[7, 16]。本研究在组织病理学证实的不同级别宫颈上皮细胞中进一步分析 HPV-16 DNA 的整合状况, 非条件 Logistic 回归结果显示 HPV-16 基因组整合与现患 HSIL 或 SCC 的风险相关, 进一步支持病毒整合促进 HPV- 相关肿瘤癌变的结论^[4, 6]。HPV 基因组整合很可能是通过促进 HPV 持续性感染, 以及病毒整合后 E2 负反馈调节蛋白功能的丧失, 引起 E6、E7 癌基因表达失调, 从而促进宫颈上皮癌变的发生。另外, 该研究结果显示相当一部分 (32.0%) SCC 女性仅含有纯粹游离型的 HPV-16 基因组, 这与文献报道的比例 (24.7% ~ 34.0%) 相似^[2, 17]。目前关于宫颈癌发生的潜在机制尚未完全阐明, 有研究结果进一步支持 HPV 基因组整合并非是宫颈癌发生的必要因素这一观点^[17]。一些研究显示在具有纯粹游离型 HPV DNA 的肿瘤中, 整合部位的基因或表观遗传调控可能导致 E6、E7 致癌基因表达失调^[6, 18]。表明尽管在宫颈癌中通常能检测到病毒整合, 但病毒整合在宫颈癌变过程中并非是先决条件。因此, 进一步研究与 HPV 整合相关的宫颈癌发生的具体作用机制, 如免疫逃逸相关的机制及整合部位的基因或表观遗传调控等机制将为深入阐明 HPV- 相关肿瘤的发病机制提供更为有价值的信息。

另外, 该研究显示在组织学证实的 LSIL 及正常宫颈上皮细胞中均能检测到整合型 HPV-16 基因组, 该结果进一步证明病毒整合发生在 HPV-16 感染自然史早期这一假设^[8, 13, 16]。已报道的在 LSIL 或正常宫颈上皮细胞中 HPV-16 DNA 的整合率范围波动较大, 从 8.0% (5/62)^[19] → 28.2% (3/11)^[20] → 43.8% (7/16) → 60.0% (3/5)^[1, 8]。该差异可能部分归因于不同的生物-地理因素, 如地理区域和研究人群或不同的检测

方法。

该研究的某些局限性如下。首先, 采用多重 PCR 技术同时扩增病毒 E2、E6 基因用 E2/E6 基因比值评估 HPV-16 DNA 的整合状态, 已有研究表明该方法能更为准确地确定 HPV DNA 的体内状态, 与单一 PCR 法相比能获得更为可靠的 E2/E6 比值^[7-8]。但鉴于宫颈脱落上皮细胞标本可能是异常和正常上皮细胞的混合物, 该方法不能区分哪种类型的宫颈上皮细胞含有整合型或纯粹游离型病毒 DNA, 或者两者共存于同一个宫颈细胞内。因此, 在未来的研究中采用单细胞水平分析 HPV 感染状态 (即利用激光显微切割分离出单个感染 HPV 的细胞, 然后进行 HPV DNA 分析), 可能会为病毒整合在 HPV- 相关肿瘤发生机制中的作用研究提供更为有趣的线索。其次, HPV 基因组整合事件及其随后的克隆选择 (即整合体具有转录活性) 可能是 2 个独立的过程, 该研究仅分析病毒基因组的整合率, 进一步研究整合后的转录情况将有助于更好地理解病毒整合在宫颈病变进展中的致癌机制。尽管如此, 该研究的结果进一步支持病毒整合促进 HPV- 相关肿瘤癌变过程的结论。第三, 该研究中采用 E2/E6 比值作为 HPV DNA 整合的替代标志物, 鉴于 E2 基因是 HPV DNA 整合的优先区域; 但 HPV DNA 整合还可能涉及 E1 基因的删除或断裂^[1]。因此, 进一步检测 E1 开放阅读框将为病毒整合在 HPV- 相关肿瘤发生中的作用提供更为精准的信息; 并且为进一步阐明与病毒整合相关的具体宫颈癌发病机制提供更有价值的相关信息。

综上所述, HPV-16 DNA 的整合率随宫颈病变的加重而升高, HPV-16 DNA 整合与现患 HSIL 及以上病变的风险存在相关性, 表明 HPV-16 基因组整合发生在病毒感染自然史的早期, 病毒整合在子宫颈癌变过程中发挥促进作用。

参 考 文 献:

- [1] NKILI-MEYONG A A, MOUSSAVOU-BOUNDZANGA P, LABOUBA I, et al. Genome-wide profiling of human papillomavirus DNA integration in liquid-based cytology specimens from a Gabonese female population using HPV capture technology[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1504.
- [2] BURK R, CHEN Z, SALLER C. et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer[J]. Nature, 2017, 543(7645): 378-384.
- [3] 谢幸, 孔北华, 段涛, 等. 妇产科学 [M]. 第 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 296-297.

- [4] KARBALAIE N M, KEYVANI H, SAFARNEZHAD T F, et al. Human papillomavirus type 16 integration analysis by real-time PCR assay in associated cancers[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(3): 593-598.
- [5] XIA Y C, LIU Y, DEND M H, et al. Detecting virus integration sites based on multiple related sequencing data by VirTect[J]. *BMC Med Genomics*, 2019, 12(Suppl 1): 19.
- [6] GROVES I J, COLEMAN N. Human papillomavirus genome integration in squamous carcinogenesis: what have next generation sequencing studies taught us[J]. *J Pathol*, 2018, 245(1): 9-18.
- [7] MANAWAPAT-KLOPFER A, HAEDICKE-JARBOUI J, STUBENRAUCH F, et al. HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women: a study in 644 women with single HPV16 infections[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(4): 715-722.
- [8] 陈庆云, 卞美璐, 陈志华, 等. 宫颈癌癌前病变中人乳头瘤病毒 16 整合状态的检测 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(6): 400-404.
- [9] SZOSTEK S, ZAWILINSKA B, KLIMEK M, et al. HPV16 E6 polymorphism and physical state of viral genome in relation to the risk of cervical cancer in women from the south of Poland[J]. *Acta Biochim Pol*, 2017, 64(1): 143-149.
- [10] 孙晓娟, 王健. 人乳头瘤病毒 16 的整合作用在不同宫颈病变组织中的表达及意义 [J]. *中国综合临床*, 2017, 33(1): 18-22.
- [11] RIBEIRO J, TEIXEIRA D, MARIBHO-DIAS J, et al. Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern Portugal[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2014, 125(2): 107-110.
- [12] 吴晓雪. 人乳头瘤病毒 HPV16 整合与宫颈病变程度的观察 [J]. *实用妇科内分泌杂志*, 2018, 5(27): 21-23.
- [13] LIU Y, ZHANG C T, GAO W J, et al. Genome-wide profiling of the human papillomavirus DNA integration in cervical intraepithelial neoplasia and normal cervical epithelium by HPV capture technology[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35427.
- [14] HUDELIST G, MANAVI M, PISCHINGER KI, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade[J]. *Gynecol Oncol*. 2004, 92(3): 873-880.
- [15] LIU X, ZHANG S L, RUAN Q, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in women with cervical lesions in liaoning province, China[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(1): 147-153.
- [16] 徐又先, 袁林, 濮德敏, 等. 宫颈癌中抑癌基因 FHIT 表达与 HPV16 基因状态 [J]. *现代妇产科学进展*, 2016, 25(3): 182-188.
- [17] HONG D, LIU J, HU Y, et al. Viral E6 is overexpressed via high viral load in invasive cervical cancer with episomal HPV16[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 136.
- [18] GROVES I J, KNIGHT E L, ANG Q Y, et al. HPV16 oncogene expression levels during early cervical carcinogenesis are determined by the balance of epigenetic chromatin modifications at the integrated virus genome[J]. *Oncogene*, 2016, 35(36): 4773-4786.
- [19] TONON S A, PICCONI M A, BOS P D, et al. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions[J]. *J Clin Virol*, 2001, 21(2): 129-134.
- [20] de MARCO L, GILLIO-TOS A, BONELLO L, et al. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing[J]. *J Clin Virol*, 2007, 38(1): 7-13.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 刘霞, 张乔, 张慧杰. 人乳头瘤病毒 16 型 DNA 整合对宫颈癌变的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(9): 28-33.