

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.009

潮州地区人乳头瘤病毒 52 型 E6 多态性分析

罗招云, 陈 强, 杨立业, 林 敏, 李文玉, 詹小芬, 陈默蕊

(广东省潮州市中心医院检验实验中心, 潮州 521021)

【摘 要】目的:明确潮州地区人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)52 型 E6 编码区的基因多态性。方法:提取 101 例 HPV 52 单纯感染者宫颈脱落细胞 DNA,通过特异性引物扩增 HPV 52-E6 编码区全序列,成功获得 83 份 HPV 52-E6 PCR 扩增阳性产物,进行测序及 BLAST 多态性分析。结果:成功获得 76 条 HPV 52-E6 基因全序列(447 bp)。该序列与参考株(GQ472848)的一致性为 99%。在潮州地区发现 11 种 E6 编码区多态性,9 种为同义突变,2 种有义突变,引起所编码氨基酸改变。根据基因多态性分亚洲群和欧美群 2 群。亚洲群有 7 组,第 1 组,也是最为常见组(50/76)的编码序列与广州(EU924143)和香港(DQ057293)株编码完全匹配,该组称为潮州地方株;第 2 组(12/76)多态性与广州(EU924144)等报道的 E6 全序列完全匹配;第 3 组(仅 1 例)多态性与浙江大学报道(HM004117)的 E6 全序列完全匹配;其余 4 组多态性国际上尚未报道。欧美群有 3 组,第 1 组(5/76)多态性与美国(HQ537745)报道的 E6 全序列完全匹配;第 2 组(2 例)多态性与美国(DQ057291)和德国(X74481)报道的 E6 全序列完全匹配;第 3 组(1 例)多态性国际上尚未报道。结论:潮州地区 HPV 52-E6 编码区序列存在多态性,以中国东南部和东南亚国家报道 E6 编码区序列为主,少数与欧美报道 E6 全序列完全匹配。为基因疫苗的研制提供了科学依据。

【关键词】人乳头瘤病毒;52 型;E6 基因;序列分析;多态性

【中国图书分类法分类号】R694.13

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-01

Analysis of E6 gene polymorphism of type 52 human papillomavirus from Chaozhou area of China

LUO Zhaoyun, CHEN Qiang, YANG Liye, LIN Min, LI Wenyu, ZHAN Xiaofen, CHEN Morui

(Central Laboratory of Chaozhou Central Hospital in Guangdong Province)

【Abstract】Objective: To study the polymorphism of E6 gene of HPV 52 in Chaozhou. **Methods:** The DNA was extracted from the cervical exfoliated cells of 101 cases of simple infection of HPV 52. 83 cases of E6 gene complete sequence was amplified successfully and sequenced. The BLAST 2.0 software online was used for polymorphism study. **Results:** Totally, 76 complete E6 genes were successfully amplified. The similarity was 99% compared with reference strain(GQ472848). 11 kinds of polymorphism were found, of which 9 kinds were nonsense mutation and the other 2 kinds were sense mutation, which would cause amino acid alteration. All of the 76 cases were divided into Asian cluster and American-European cluster according to the polymorphism of E6 gene. Asian cluster had seven groups. The most common polymorphism was completely matched with the sequence reported in Guangzhou (EU924143) and Hongkong (DQ057293), and this group was named the predominant sequence in Chaozhou area; the variant of the second group was completely matched with the sequence reported in Guangzhou(EU924144); the variant of the third group was completely matched with the one reported in Zhejiang University reported(HM004117); while the other 4 groups had never been reported worldwide so far. American-European cluster had three groups. The most common polymorphism was found in 5 different cases, which was completely matched with the sequence reported in America (HQ537745). The second group polymorphism were found in 2 samples, it was completely matched with sequence reported from America (DQ057291) and Germany (X74481). The third group was found in one case, which had not been reported before. **Conclusion:** There is a complicated polymorphism of HPV52 E6 genes in Chaozhou area. The common polymorphism is similar with that reported in the South-east in China or the South-east Asia. The rare sequence matches with American and European reports. This study provides molecular evidence for gene vaccine exploration in Chaozhou.

【Key words】human papillomavirus; 52 subtype; E6 gene; sequence analysis; polymorphism

作者介绍:罗招云(1973-),男,副主任检验技师,

研究方向:细胞诊断学。

通信作者:杨立业,男,主任医师,Email:yangleyee@sina.com。

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(编号:A2011760、B2008179)。

高危型人乳头瘤病毒(High risk human papillomavirus, HR-HPV)持续感染是宫颈癌及其癌前病变发生的最重要危险因素^[1]。HPV 52 是 HR-HPV 型别之一, HPV 52 在世界范围内感染率排第 7 位, 在中国 HPV 52 感染率排第 4 位, 并且南方地区比北方地区感染率要高, HPV 52 是潮州地区的优势基因型别^[2,3]。研究表明, HPV 早期基因 E6 的连续表达是高危型 HPV 恶性基因型所必需的^[4]。源于中国内地的 HPV 52 序列较少, 本研究在宫颈癌筛查高危型 HPV 研究基础上, 通过核酸分子快速导流杂交分型技术(HybriMax)筛选 HPV 52 阳性标本。检索 GenBank 基因库, 发现全世界报道 HPV 52 型 E6 超过 100 条, 保守区域不存在, 所以设计通用引物困难。迄今为止, GenBank 基因库中天津参考株(ACCESSION: GQ472848)是国内唯一报道的 1 条 HPV 52 全序列^[5]。国际上大多数不同变异株序列之间差别最大可达 2%, 难于对众多序列比对来设计通用引物, 而文献资料中均是以 1 条地理位置相近的基因序列作为引物设计参考株。通过 GenBank 基因库天津参考株序列设计特异性引物, 扩增和测序 HPV 52-E6 编码区序列, 进行多态性分析。为制备适合中国人群的 HPV 宫颈癌疫苗提供流行病学资料。据文献报道^[6]亚-美 HPV 16 变异株或非洲 HPV 16 变异株比欧洲 HPV 16 变异株具有更强的发生宫颈癌的危险性; 非欧洲 HPV 18 变异株可能在宫颈癌及癌前病变中更常见。至今, 几乎没有除 HPV 16/18 外的其它 HR-HPV 变异株关于宫颈病变程度及进展相关本质性历史资料。为了解 HPV 52-E6 变异株的致癌性, 把不同的 HPV 52-E6 变异株群作了宫颈病变严重程度比较。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源

为响应广东省政府的关爱妇女活动, 潮州市政府组织市内 3 家大医院进行新农村合作医疗妇女宫颈癌筛查, 于 2009 年 8 月至 2010 年 8 月潮州地区农村女性宫颈癌筛查的 49 458 份宫颈脱落细胞标本, 先进行高危型 HPV 筛查(仪器为杭州博日实时荧光定量 PCR), 阳性者进行 21 型 HybriMax 分型检测(潮州凯普生物技术有限公司)和液基薄层细胞学检查(Liquid-based cytologic test, LCT)。LCT 检查采用广州安必平医药公司提供的制片仪器(LBP-2801)及其配套试剂, 以 The Bethesda System(TBS)报告系统为诊断标准。选择单纯 HPV 52 型感染阳性的标本为研究对象, 进行下一步实验。

1.2 标本采集

此次宫颈癌筛查活动通过了潮州市中心医院伦理委员会的批准。标本采集前由受检者签署知情同意书。由专科医生使用潮州凯普公司专用宫颈刷完成。扩阴器暴露宫颈口后, 棉拭子擦去分泌物, 宫颈刷顺时针刷转 3~5 圈后将宫颈刷密闭保存于样品管的保存液中。

1.3 DNA 模板的制备

DNA 提取试剂盒(潮州凯普公司生物技术有限公司), 标本制备过程严格按使用说明书在安全柜中进行操作。取 500 μ l 宫颈细胞保存液, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清; 加 1 000 μ l 生理盐水混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加 50 μ l DNA 提取液混匀后于恒温金属浴 100 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 静置 5 min, DNA 产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 目的序列 PCR 扩增和测序

HPV 52-E6 PCR 以上述提取 DNA 为模板。HPV 52-E6 引物设计根据 GenBank 基因库天津参考株(TJ49-52, ACCESSION: GQ472848)序列设计特异性引物, 并经 Primer 5.0 分子生物学软件分析优化。HPV 52-E6 PCR 引物序列为: 上游引物 P1: 正义链 5'-ACGCACGGCCATGTTTGAGGAT-3'; 下游引物 P2: 反义链 5'-TAATTGCTTGTGGCTTGTCTGCTTGTC-3', 扩增产物长度为 622 bp, 上述引物均由 Invitrogen 生物技术有限公司(上海)合成。PCR 扩增仪为 ABI2700 热循环仪。E6 基因 PCR 反应条件: 50 μ l 反应体系[包含 2 μ l 模板 DNA, 灭菌去离子水 34.0 μ l, 10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μ l, dNTPs 4.0 μ l (0.2 mmol/L), DMSO 为 1 μ l, 引物 P1、P2 各 1.6 μ l (0.4 μ mol/L), Taq DNA 聚合酶 1 U (0.8 μ l)]; 反应条件为: 93 $^{\circ}$ C 5 min 后进行循环, 93 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ l PCR 反应产物在 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察结果并照相。HPV 52-E6 PCR 反应产物送广州英潍捷基(上海)贸易有限公司测序, 双向测序, 对测序结果进行分析。

1.5 序列分析

通过 BioEdit 软件工具向 GenBank 核酸数据库提交, 利用 BLAST 和 DNA STAR 等在线分析工具对所获得序列进行分析, 将所测序列与 GenBank 基因库中天津参考株(ACCESSION: GQ472848)的 E6 编码区序列进行比对。对出现的变异进行多态性分析。将获得的 76 株组成数据集, 合并全同序列, 然后分组。

1.6 建立 HPV 52-E6 进化树

通过 BioEdit、Clustal-1.8 和 Mega-5.05 软件工具, 以及利用 NCBI-BLAST 在线分析工具, 严格按照构建系统进化树的详细步骤操作。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析, 行(R) $\times$ 列(C)计数资料的 χ^2 检验, 设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV 52-E6 基因的 PCR 扩增结果

以选取的 101 例 HPV 52 单纯感染者宫颈脱落细胞 DNA 为模板, 用 HPV 52-E6 的特异 P1、P2 引物进行 PCR 扩增, 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 622 bp 位置附近显示 1 条特异 DNA 条带, 其大小与预期值一致, 成功获得 83

份 HPV 52-E6 PCR 扩增阳性产物,见图 1。

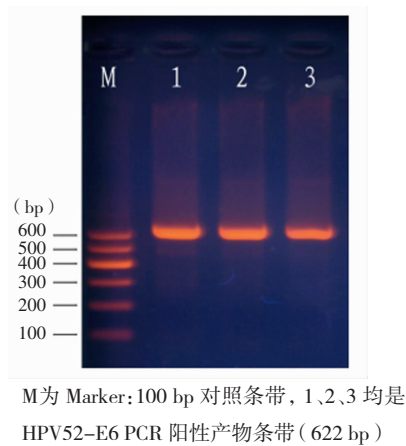


图 1 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR results

2.2 HPV 52-E6 序列测定和分析

将 83 份 E6 PCR 扩增阳性产物进行正、反双向测序,成功获得正、反各 76 条 HPV 52-E6 基因序列。以天津参考株 E6 编码区序列中起始密码和终止密码处小片段,利用 DNA STAR/Edit Seq 软件分析工具,找到相对应的起始密码和终止密码,它们之间的基因序列就是所测的 E6 编码区序列,再利用 BLAST 在线分析工具对所获得序列进行比对。将测序所得的 HPV 52-E6 基因序列与 GenBank 收录的天津参考株 E6 编码区序列进行比对,一致性均为99%。本研究实际扩增片段为 622 bp,包含 HPV 52-E6 基因全序列长度 447 bp。对 76 条 HPV 52-E6 核苷酸序列进行同源性分析,E6 基因型内核苷酸同源性为 99.1%~99.8%,符合分型规律^[7]。

2.3 HPV 52-E6 核酸序列变异结果

本研究 HPV 52-E6 基因测序结果与天津参考株 E6 编码区序列进行比对,76 条 E6 基因序列与参考株 E6 序列均存在 1 个碱基位点不同(A105G),最为常见组(CZ00105)仅存在这种 A105G 同义突变,被定为潮州地方株。

根据碱基的改变进行分类,76 条 E6 基因序列共发现 11 种碱基置换,其中 9 种同义突变,分别为 T90C、C136T、C168T、T228C、T249G、G255A、A277C、T336C、A429G;2 种有义突变为 G278A 和 C366A,可引起所编码的相应氨基酸残基改变,1 种编码的 E6 蛋白第 93 位氨基酸残基由精氨酸突变为赖氨酸(G278A),另一种编码的 E6 蛋白第 122 位氨基酸残基由天门冬氨酸突变为赖氨酸(C366A)。

根据标本的基因多态性进行分组,本研究测序结果与天津参考株比对,将 76 条 E6 全同序列合并为 1 组,合并后的 E6 序列分为 10 组[50 条 CZ00105 与广州(b00422)及香港(HK1243)完全匹配、1 条 CZ1051569(国际上未报道)、1 条 CZ105336(国际上未报道)、2 条 CZ105228(国际上未报道)、12 条 CZ105255 与广州(b00428)完全匹配、1 条 CZ105168(国际上未报道)、1 条 CZ105276 与浙江大学报道的(ZJ7-52)匹配、2 条 CZ000928 与美国(ED18604)及德国(X74481)完全匹配、5 条 CZ429928 与美国(QV03719)匹配、1 条 CZ136928(国际上未报道),与美国报道的 QV03719 有 1 个碱基不同]。把与国内和东南亚国家的 E6 基因序列亲缘关系最近的 7 组作为亚洲群,把与美国和德国等国报道的亲缘关系最近的 3 组作为欧美群,见表 1。

2.4 HPV 52-E6 10 组序列进化树之间的关系

进化树中上部分的均为国内和东南亚株,其编码序列与广州、天津、浙江和东南亚印度等国的亲缘关系最近;进化树下部分的少数株编码序列与美国和德国等西欧国家报道的亲缘关系最近,如 CZ429928 株和美国报道的QV03719 株编码序列完全匹配,CZ000928 株和国际参考株(REF)完全匹配,见图 2。

2.5 E6 基因序列 228~278 碱基变异位点比较

以潮州地方株(CZ00105)作为 A 株对照,变异点位置是相对于距离 HPV 52-E6 基因起始碱基位置而定,另 4 组 B、C、D、E 各 1 株的 E6 基因序列变异点位置分别是:B 为 CZ105255 株,变异点是 G255A;C 为 CZ000928 株,变异点是

表 1 HPV 52-E6 基因测序结果及与天津参考株比对碱基突变类型和位置

Tab.1 Sequencing results of HPV 52-E6 gene, base position of gene mutation relative to Tianjin reference strain													
分组	例数	90	105	136	168	228	249	255	277	278	336	366	429
TJ49-52		T	G	C	C	T	T	G	A	G	T	C	A
CZ00105	50	T	A	C	C	T	T	G	A	G	T	C	A
CZ1051569	1	C	A	C	C	T	T	G	A	G	T	C	A
CZ105336	1	T	A	C	C	T	T	G	A	G	C	C	A
CZ105228	2	T	A	C	C	C	T	G	A	G	T	C	A
CZ105255	12	T	A	C	C	T	T	A	A	G	T	C	A
CZ105168	1	T	A	C	T	T	T	A	A	G	T	C	A
CZ105276	1	T	A	C	C	T	T	G	C	G	T	A**	A
CZ000928	2	T	A	C	C	T	G	G	A	A*	T	C	A
CZ429928	5	T	A	C	C	T	T	G	A	A*	T	C	G
CZ136928	1	T	A	T	C	T	T	G	A	A*	T	C	G

注:第 1 行数字为距离 HPV 52-E6 基因起始碱基位置,E6 基因的第 1 个碱基起始位置为 1。*,编码氨基酸为赖氨酸,其余组为精氨酸;** ,编码氨基酸为赖氨酸,其余组为天门冬氨酸;未特殊注明者为无义突变。第 3~9 行的 7 组为亚洲株群,第 10~12 行的 3 组为欧美株群

T249G 和 G278A;D 为 CZ429928 株,变异点是 G278A;E 为 CZ105276 株,变异点是 A277C。潮州 HPV 52-E6 基因序列变异点主要集中于 228~278 碱基位点,即 B、C、D、E 株在 228~278 碱基片段包括了 5 个碱基突变点,其中一个为有义突变,其余 6 个碱基突变点散在于 228~278 碱基片段以外的基因位点(图 3)。

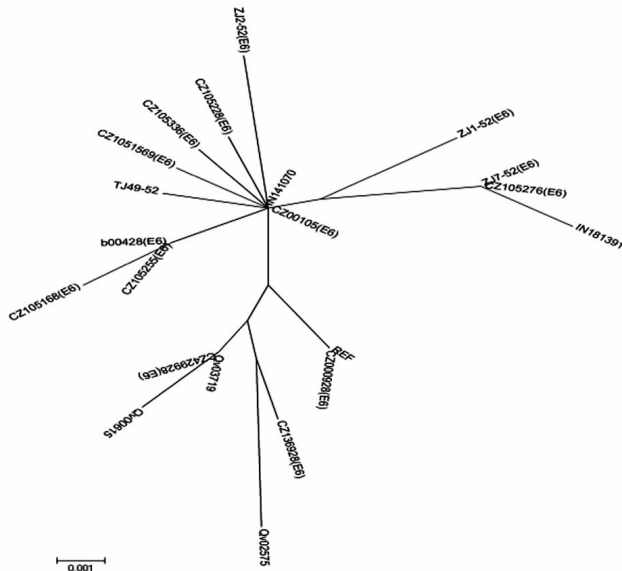


图 2 HPV 52-E6 10 组序列进化树

Fig.2 Cladogram of 10 groups sequence from HPV 52-E6



图 3 5 条 HPV 52-E6 在 228 ~ 278 碱基位点基因序列的变异点

Fig.3 Mutation point of HPV 52-E6 228 ~ 278 nucleoside from five cases

2.6 E6 基因碱基突变与宫颈病变程度关系

文献报道亚-美 HPV 16 变异株或非非洲 HPV 16 变异株比欧洲 HPV 16 变异株具有更强的发生宫颈癌的危险性,为了解 HPV 52-E6 变异株的致癌性,比较不同 HPV 52-E6 变异株群的宫颈病变严重程度差别,把含有同义突变的 6 组归为同义突变群,把含有有义突变的 4 组归为有义突变群。将同义突变群的 6 组与有义突变的 4 组的不同宫颈病变的 LCT 结果进行比较,两群的宫颈病变严重程度差别有统计学意义($\chi^2=10.068, P=0.039$);将亚洲 E6 群的 7 组和欧美 E6 群的 3 组的不同宫颈病变 LCT 结果进行比较,亚洲株和欧美株的宫颈病变严重程度差别无统计学意义($\chi^2=2.917, P=0.572$),见表 2。

表 2 4 群 E6 基因序列与 LCT 结果比较 (n=76)

Tab.2 Comparison between HPV52-E6 gene sequence and LCT results from 4 groups (n=76)

E6 序列群	条	平均年龄	NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL
同义突变群	67	45.4	31	24	0	10	2
有义突变群	9	44.8	2	4	1	1	1
亚洲 E6 群	68	45.3	31	24	1	10	2
欧美 E6 群	8	44.9	2	4	0	1	1

注:同义突变群与有义突变群比较,宫颈病变严重程度差别有统计学意义($\chi^2=10.068, P=0.039$);亚洲株群和欧美株群比较,宫颈病变严重程度差别无统计学意义($\chi^2=2.917, P=0.572$);NILM:无上皮内病变及恶性病变;ASC-US:非典型鳞状上皮细胞意义不明确;ASC-H:非典型鳞状上皮细胞不排除高级别鳞状上皮内病变;LSIL:低级别鳞状上皮内病变;HSIL:高级别鳞状上皮内病变

3 讨论

宫颈癌是影响妇女健康的重大疾病之一,HPV 感染是宫颈癌的直接病因,亦是诱发宫颈癌的首要因素^[9]。HPV 52 作为 HPV 16 簇群中的成员,是具有高度致癌性的 HPV 型别之一^[9],在亚洲等地呈现特殊的流行状况,逐渐引起人们的关注。研究表明 HPV 52 在中国和亚洲妇女中常见^[10]。中国内地是全球 HPV 52 高发区之一,某些地区甚至高于 HPV 16 和 HPV 18,在上海、四川和广东等地,高发态势尤为明显^[11]。HPV 52 型是潮州地区的优势基因型,占有阳性感染的 28.86%^[9]。

HPV 的 E6 编码 151 个氨基酸残基的病毒原癌蛋白,具有锌指结构,是高危型 HPV 的主要转化蛋白,E6 蛋白通过使抑癌基因 p53 和 Rb 失活,在宫颈癌的发生中发挥重要作用,是公认的重要致癌因子^[12,13]。因此,将 E6 原癌蛋白视作肿瘤特异性抗原,是研究开发治疗型疫苗的着眼点。目前全球已出现的宫颈癌疫苗均针对 HPV 16 和 HPV 18 型研发^[14]。过去针对 HPV 52 基因变异的研究十分有限。本研究成功获得 76 株 E6 编码区序列,并发现有 11 种碱基置换,其中 9 种为同义突变,2 种有义突变为 G278A 和 C366A,可引起所编码的相应氨基酸残基改变。了解 HPV 52-E6 基因突变特性,为制

备适合中国人群的疫苗提供流行病学资料。

潮州 HPV 52-E6 基因序列变异点主要集中于 228~278 碱基位点,含有 51 个碱基的片段包括了 5 种碱基突变点,其中 1 种为有义突变,其余 6 种碱基突变点散在分布于 228~278 碱基片段以外的基因位点。说明潮州地区 HPV 52-E6 基因多态性主要表现在 228~278 碱基片段,为本地区宫颈癌疫苗的研制提供重要的参考数据。潮州地区 E6 基因有 10 种多态性,最为常见的为潮州地方株(CZ00105),其与广州(EU924143)和香港(DQ057293)报道的 E6 全序列完全匹配;有 5 种 E6 多态性国际上尚未报道。提示 HPV 52-E6 编码基因中可能存在一系列中国地区的高频率突变位点。说明不仅在不同国家之间,即便在我国不同地区之间和不同检测对象之间,HPV 52-E6 基因多态性也存在较大的差异。总之,本研究获得的 HPV 52-E6 序列亚洲株群多与国内东南部地区(如广州、浙江、上海、天津)、香港、台湾、日本和印度等 HPV 52 东南亚株同源,欧美株群多与美国(DQ057291)和德国(X74481)等欧美国家报道的 E6 全序列匹配。从潮州地区 10 株 HPV 52-E6 序列的进化树上来看,其编码序列与广州、天津、浙江和东南亚印度等国的亲缘关系最近;潮州少数株编码序列与美国和德国等欧美国家报道的亲缘关系最近。可推测国内及东南亚株可能来源于根部的 HPV 52 变异株后形成毒株播散源,并在全球 HPV 52 的传播和迁徙过程中作为新的播散源。进一步证实了 HPV 52 在中国内地和亚洲地区呈现特殊的流行状况,特别是国内东南地区是 HPV 52 的高发地区。

高危型 HPV 16-E6 基因与宫颈癌关系密切^[13]。曾有学者对 HPV 16 研究认为 HPV 的基因变异仅局限在相对小的范围内,HPV 变异株的鉴定可以提示该病毒流行病学与进化关系^[14]。分析 E6 基因与宫颈疾病的关系,为下一步新型分子诊断方法的研发提供目标序列,为制备适合中国人群的 HPV 疫苗提供流行病学资料。本研究统计分析发现亚洲株群和欧美株群的宫颈病变严重程度差别无统计学意义($P>0.05$),同义突变群与有义突变群的宫颈病变严重程度差别有统计学意义($P<0.05$),说明潮州地区不同地域亲缘关系的 HPV 52 致癌性相当,而 E6 序列碱基同义突变和有义突变的 HPV 52 致癌性不同,有义突变引起毒力改变。

参 考 文 献

[1] 赵戴君,龚向真,胡争光,等.上海市社区子宫颈人乳头瘤病毒感染现状及危险因素研究[J].现代预防医学,2010,37(10):1867-1872.
Zhao D J, Gong X Z, Hu Z G, et al. The prevalence study on the human papillomavirus (HPV) infection and the risk factors of the community female population in Shanghai[J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(10):1867-1872.

[2] Lin M, Yang L Y, Li L J, et al. Genital human papillomavirus screening by gene chip in Chinese women of Guangdong province[J]. Aust NZJ Obstet Gynaecol, 2008, 48(2):189-194.
[3] 罗招云,杨立业,翁妙珊,等.潮州地区人乳头瘤病毒型别分布特征分析[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(3):177-180.
Luo Z Y, Yang L Y, Weng M S, et al. Analysis of subtypes distribution of human papillomavirus in Chaozhou area[J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2011, 3(3):177-180.
[4] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(11):2006-2011.
[5] Wu X L, Zhang C T, Zhu X K, et al. Detection of HPV types and neutralizing antibodies in women with genital warts in Tianjin City, China[J]. Virol Sin, 2010, 25(1):8-17.
[6] Sichero L, Ferreira S, Trottier H, et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18[J]. Int J Cancer, 2007, 120(8):1763-1768.
[7] Chan P K, Chang A R, Cheung J L, et al. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low-oncogenic risk types[J]. J Infect Dis, 2002, 185(1):28-35.
[8] Muñoz N, Castellsagué X, de González A B, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer[J]. Vaccine, 2006, 24(s3):1-10.
[9] Bouvard V, Baan R, Straif R, et al. A review of human carcinogens- Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4):321-322.
[10] Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, et al. Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer[J]. Cancer Sci, 2009, 100(7):1312-1316.
[11] Lai C H, Huang H J, Hsueh S, et al. Human papillomavirus genotype in cervical cancer: a population-based study[J]. Int J Cancer, 2007, 120(9):1999-2006.
[12] Chan P K, Liu S J, Cheung J L, et al. T-cell response to human papillomavirus type 52 L1, E6, and E7 peptides in women with transient infection, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive cancer[J]. J Med Virol, 2011, 83(6):1023-1030.
[13] Chan P K, Liu S J, Cheung J L, et al. T-cell response to human papillomavirus type 52 L1, E6, and E7 peptides in women with transient infection, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive cancer[J]. J Med Virol, 2011, 83(6):1023-1030.
[14] Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuncted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women[J]. Lancet, 2009, 374(9686):301-314.
[15] Bernard H U, Calleja-Macias I E, Dunn S T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications[J]. Int J Cancer, 2006, 118(5):1071-1076.

(责任编辑:冉明会)