

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.010

• 基础研究 •

人乳头瘤病毒16型E6/E7基因shRNA真核表达载体构建及其对人宫颈癌SiHa细胞增殖及迁移能力的影响



阿比丹•吐尔汗江¹, 杨润峰², 王 恬¹, 李 莎¹, 栗 妍¹, 项 涛¹

Construction of shRNA Eukaryotic Expression Vector Targeting Human Papillomavirus Type 16 E6/E7 Gene and Its Effects on Proliferation and Migration of SiHa Cells

Abidan•Tuerhanjiang¹, YANG Runfeng², WANG Tian¹, LI Sha¹, LI Yan¹, XIANG Tao¹

1.Department of Gynaecology and Obstetrics,Tongji Hospital,Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology,Wuhan 430030,China;2.Department of Gynecologic Oncology,Hubei Cancer Hospital

Corresponding Author: XIANG Tao, E-mail: xiangtao72@sina.com

Abstract:Objective To construct the short hairpin RNA(shRNA) eukaryotic expressing vector targeting human papillomavirus type 16 E6/E7 to establish stable transfected SiHa cell line and to observe its effects on cell proliferation and migration. **Methods** Three pairs of shRNA fragments which could specifically inhibit HPV16 E6/E7 genes were synthesized and cloned into the shRNA vector psilencer2.1-U6 hygro. The recombinant vectors were transfected into SiHa cells by Lipo2000 and E6/E7 mRNA expression was validated by real-time PCR. The stable psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7-SiHa cell line was selected with hygromycin B and validated by real-time PCR and Western blot.The CCK-8 cell proliferation assay and cell scratch wound healing assay were performed to examine cell proliferation and migration.**Results** Sequencing suggested that shRNA eukaryotic expression vector targeting HPV16 E6/E7 gene, psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7-SiHa cell line, was established successfully with a significantly inhibition of HPV16 E6/E7 expression, cell proliferation and migration.**Conclusion** Inactivation of HPV16 E6/E7 in cervical cancer cells could reduce cell proliferation and migration.

Key words:Human papillomavirus type 16 E6/E7;Construction of vector;Cell proliferation;Cell migration;Cervical cancer

摘 要: 目的 构建针对人乳头瘤病毒16型E6/E7基因的shRNA真核表达载体, 获得稳定表达干扰质粒的人宫颈癌SiHa细胞系并探讨其对SiHa细胞增殖及迁移能力的影响。**方法** 合成3条特异性干扰HPV16 E6/E7基因的shRNA片段并定向插入psilencer 2.1-U6 hygro载体, 构建重组质粒psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7并转染入人宫颈癌SiHa细胞, Real-time PCR检测转染后细胞E6/E7 mRNA的表达, 选择沉默效应最好的重组质粒并用潮霉素B稳筛, 获得稳定表达重组质粒的SiHa细胞, 并用real time-PCR和Western blot方法进行鉴定; 分别运用CCK-8细胞增殖实验和细胞划痕愈合实验检测细胞的增殖及迁移能力。**结果** 测序证实针对HPV16 E6/E7的shRNA真核表达载体psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7构建正确; 转染psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7的SiHa细胞HPV16 E6/E7表达明显受抑, 同时其增殖及迁移能力也明显受抑制。**结论** psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7真核表达载体的成功构建并获得稳定沉默表达HPV16 E6/E7的人宫颈癌SiHa细胞系, 证实沉默表达HPV16 E6/E7的SiHa细胞增殖及迁移能力会明显受到抑制, 这为进一步研究HPV 16 E6/E7基因在宫颈癌发生发展过程中的功能奠定了实验基础。

关键词:人乳头瘤病毒16型E6/E7; 载体构建; 细胞增殖; 细胞迁移; 宫颈癌

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-04-05; 修回日期: 2013-07-24
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071663)
作者单位: 1. 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院
附属同济医院妇产科; 2.湖北省肿瘤医院妇科肿瘤科
通信作者: 项涛, E-mail: xiangtao72@sina.com
作者简介: 阿比丹•吐尔汗江(1985-), 女, 硕士在
读, 主要从事宫颈癌基础研究

0 引言

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)感染是其主要病因, 其中70%为HPV16型和18型感染所引起^[1]。流行病学显示, 临床上以HPV16型感染

的宫颈鳞状细胞癌最为常见^[2]。在宫颈癌发生发展过程中，HPV的两个重要癌蛋白E6/E7起着关键作用。现有研究表明E6/E7蛋白可分别与肿瘤抑制蛋白p53和pRb结合，使p53通路和Rb通路失活，导致细胞周期调控异常，引起细胞增殖失控，抑癌基因对DNA的损伤修复功能丧失，导致癌前病变及癌症的发生及发展，与宫颈癌的发生发展密切相关^[3]。因此针对HPV16 E6/E7为靶点的基因研究及治疗成为热点。然而长期以来对HPV16 E6/E7的研究主要集中在其对宫颈癌发生的作用，而在宫颈癌侵袭、转移方面的研究一直处于空白状态。

本研究通过基因工程技术，构建靶向HPV16型E6/E7基因的shRNA真核表达载体，并将其转入人宫颈癌SiHa细胞，建立和鉴定稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7的SiHa细胞株，并运用CCK-8细胞增殖实验及细胞划痕愈合实验观察其细胞增殖和迁移能力变化，为探究宫颈癌疾病发展中HPV16 E6/E7促进侵袭转移机制的研究提供实验基础，及为以HPV16 E6/E7为靶点的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系SiHa购自美国标准生物品典藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）。表达载体psilencer 2.1-U6 hygro购自Life Technologies公司，大肠埃希菌DH5α购自北京天根生化科技有限公司。限制性内切酶Hind III和BamH I、T4 DNA连接酶及凝胶回收试剂盒均购自Fermentas公司，反转录酶试剂盒购自TaKaRa公司，小量质粒提取试剂盒购自天根公司，大量去内毒素质粒抽提试剂盒购自博大泰克公司，引物由上海英骏公司合成，脂质体Lipo2000和Trizol购自Invitrogen公司，β-actin抗体购自Abmart公司，HPV16 E6和HPV16 E7抗体购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 HPV16型基因E6/E7 shRNA表达载体的构建

根据GenBank提供的E6/E7基因序列，使用美国Ambio公司在线设计软件，通过基因序列比

对，挑选3条长度均为19个碱基的特异性寡核苷酸序列(5'-GTTATGCACAGAGCTGCAA-3'；5'-GCA TGGAGATACACCTACA-3'；5'-GTGTGACTCTA CGCTTCGG-3')，人工合成E6/E7基因的shRNA寡核苷酸，具体序列见表1。将这两段互补的寡核苷酸退火，形成具有黏性末端的互补双链。运用限制性内切酶Hind III和BamH I对表达载体psilencer 2.1-U6 hygro进行酶切纯化回收，并在T4 DNA连接酶的作用下将其与退火后的双链DNA 22℃ 4 h定向连接，连接产物转化感受态大肠埃希菌DH5α，涂布氨苄青霉素抗性平板后挑取阳性克隆，送上海英骏生物技术有限公司测序。鉴定正确的阳性克隆分别命名为psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 II、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 III。

1.2.2 SiHa细胞潮霉素B最小致死剂量的筛选

6孔板接种SiHa细胞，细胞密度80%，贴壁24 h后，加入含潮霉素B浓度分别为100、200、300、400、500、600 μg/ml的培养液。每3 d换液1次，由细胞的死亡程度决定观察时间（一般3周）。筛选SiHa的最小致死剂量（200 μg/ml）作为后续筛选克隆细胞使用。

1.2.3 脂质体介导的重组质粒转染SiHa细胞

将生长状态良好的人宫颈癌SiHa细胞接种于6孔板，待细胞60%~70%融合时，将重组质粒psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 II、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 III分别转染入SiHa细胞，设立空白载体对照，具体操作按Lipo2000脂质体转染说明书进行，转染后48 h收取细胞，鉴定筛选出效应最好的重组质粒。

1.2.4 潮霉素B筛选稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7重组质粒的SiHa细胞株

将沉默效应最好的shRNA质粒和空载质粒转染入SiHa细胞，48 h后首次换液，加入最小致死剂量的潮霉素B（200 μg/ml）。之后每2天换液1次，维持潮霉素B的浓度，直到形成单个细胞克隆。分别挑取转染shRNA重组质粒和空载质粒的SiHa细胞单克隆至96孔板中，继续加入半量最小致死剂量（200 μg/ml）的潮霉素B培养。标记好克隆的编

表1 HPV16 型E6/E7 shRNA序列

Table1 HPV16 E6/E7 shRNA sequences

shRNA	Sequence direction (5' → 3')
shRNA I	AGCTTCGTTATGCACAGAGCTGCAATTCAAGAGATTGCAGCTCTGTGCATAACTTTTTG GATCCAAAAAGTTATGCACAGAGCTGCAATCTCTTGAATTGCAGCTCTGTGCATAACGA
shRNA II	AGCTTCGCATGGAGATACACCTACATTCAAGAGATGTAGGTGTATCTCCATGCTTTTTG GATCCAAAAAGCATGGAGATACACCTACATCTCTTGAATGTAGGTGTATCTCCATGCGA
shRNA III	AGCTTCGTGTGACTCTACGCTTCGGTTCAGAGACCGAAGCGTAGAGTCACACTTTTTG GATCCAAAAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTCTCTTGAACCGAAGCGTAGAGTCACACGA

号,待克隆细胞长满96孔板后,传至24孔板,待其再长满传至6孔板和25 cm²培养瓶中,之后加入半量潮霉素B最小致死剂量(100 μg/ml)培养克隆细胞。

1.2.5 real time-PCR鉴定

Trizol法提取转染有shRNA重组质粒和空载质粒的SiHa细胞克隆总RNA,将mRNA逆转录为cDNA。在BIO-RAD荧光定量PCR仪上进行PCR反应。E6上游引物5'-CAG AGC TGC AAA CAA CTA TAC-3',下游引物5'-AGT GGC TTT TGA CAG TTA ATA C-3';E7上游引物5'-GAC AAG CAG AAC CGG ACA G-3',下游引物5'-ATT CCT AGT GTG CCC ATT AAC A-3'。以18S为内参,上游引物5'-TGACTCAACACGGGAAACCTCAC-3',下游引物5'-GGACATCTAAGGGCATCACAGACC-3'。反应条件:95℃30 s;95℃ 5 s,59℃ 15 s,39个循环;65℃ 5 s,95℃ 15 s,用2^{-ΔΔCt}法计算(E6/E7)/18S比值。在PCR过程中设立无模板阴性对照,在实验结束后进行曲线分析,以鉴定产物是否单一。本实验重复3次。

1.2.6 Western blot法鉴定

RIPA法提取转染有shRNA重组质粒和空载质粒的SiHa细胞克隆总蛋白,考马斯亮蓝测定蛋白浓度。80 μg总蛋白进行10%SDS-PAGE电泳,180 mA 1 h转至PVDF膜。PVDF膜经5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭1 h后,与小鼠抗人E6、E7单克隆抗体(1:500,Abcam)及兔抗人β-Actin抗体4℃孵育过夜。1×TBST溶液洗膜3次(20分钟/次)后,PVDF膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠及山羊抗兔二抗(1:4 000,Novogene)37℃孵育1 h,1×TBST溶液漂洗3次(15分钟/次)后ECL发光显影,采用Quantity one软件对各条带进行灰度值观察。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖

将SiHa、SiHa-psilencer 2.1-U6 hygro、SiHa-psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7细胞,胰酶消化后进行计数,调整细胞密度为1×10⁵个/ml,96孔板中每孔接种100 μl SiHa细胞悬液,即每孔1×10⁴个细胞,每组设5个平行副孔。分别于24、36、48、60、72 h取出96孔板,每孔避光加入10 μl CCK-8溶液,在细胞培养箱内继续避光孵育2 h后用酶标仪测定在450 nm处的吸光度值,记录结果,以时间为横坐标,以吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零。

1.4 细胞划痕愈合实验

将SiHa、SiHa-psilencer 2.1-U6 hygro、SiHa-

psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7细胞悬液种于6孔板,待细胞长到完全融合时,用10 μl的枪头在6孔板的底面上沿直线轻轻进行划痕,PBS冲洗2次后换含2%胎牛血清的DMEM培养液继续培养,分别于0、12、24、36、48 h在倒置显微镜下观察细胞划痕愈合情况并照相,以细胞划痕愈合百分比表示细胞的运动能力(0 h的细胞划痕愈合为0)。

1.5 统计学方法

计量资料结果以($\bar{x}\pm s$)表示。采用SPSS11.5软件对数据进行t检验和非参检验,以P<0.01为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV16型E6/E7基因shRNA真核表达载体的测序鉴定

上海Invitrogen公司测序结果显示,合成的双链DNA片段已成功连接入shRNA载体的预计位点,并且序列完全一致(图略),表明靶向E6/E7基因的psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7载体构建成功。

2.2 重组质粒的筛选

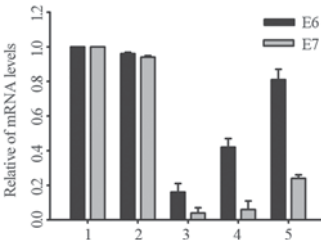
采用Real-time PCR技术检测三对psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7重组质粒对人宫颈癌细胞SiHa的沉默效应。结果显示,三对shE6/E7重组质粒转染后48 h, SiHa细胞中E6、E7基因的mRNA表达水平较转染空质粒细胞显著下降,其下降幅度分别为:shRNA I (85.97±4.90)%和(95.58±1.89)% (P<0.01); shRNA II (61.09±11.97)%和(91.25±3.40)% (P<0.01); shRNA III (24.68±10.38)%和(74.41±3.45)% (P<0.01),差异有统计学意义,见图1。数据显示,本实验设计的shRNA I能最为有效而特异地沉默E6/E7基因,抑制其mRNA水平的表达,故选择重组质粒psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I进行下一步的稳筛鉴定。

2.3 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I的SiHa细胞克隆筛选

维持最小潮霉素B致死剂量(200 μg/ml)筛选分别转染psilencer 2.1-U6 hygro、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I及空白对照SiHa细胞,每天观察细胞死亡情况,3周后可见转染后的克隆细胞,见图2。

2.4 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I的SiHa细胞克隆real-time PCR鉴定

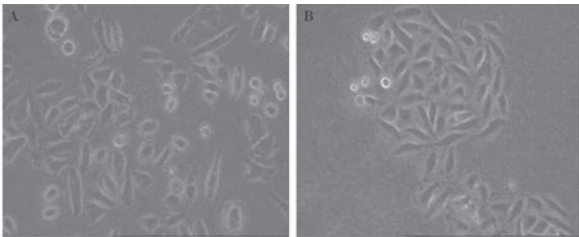
检测psilencer 2.1-U6 hygro、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I及空白对照SiHa细胞E6/E7 mRNA的表达情况。结果显示,稳筛克隆细胞E6/E7的mRNA表达水平较空载对照组下降幅度分别为:



1:SiHa-Blank; 2:SiHa-psilencer2.1-U6 hygro; 3:SiHa- psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7I; 4:SiHa- psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7II; 5:SiHa-psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7III

图1 重组质粒转染SiHa细胞后检测HPV16 E6/E7 mRNA的表达

Figure1 HPV16 E6/E7 mRNA expression after shRNA eukaryotic expression vectors transfected SiHa cells



A: SiHa-psilencer 2.1-U6 hygro (×40) ;B:SiHa-psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I (×40)

图2 稳定表达psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞形态

Figure2 Cell morphology of SiHa cells with stable psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7 I expression

(85.97±4.90)%和(95.58±1.89)%, $P<0.01$, 差异有统计学意义, 见图3A。

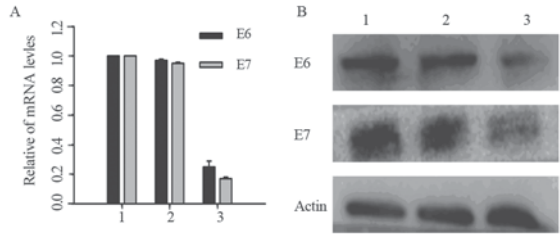
2.5 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞克隆Western 印迹检测

采用Western印迹法检测psilencer 2.1-U6 hygro、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 及空白对照SiHa细胞E6/E7 蛋白的表达情况。结果显示, 稳定筛选shE6/E7的人宫颈癌SiHa细胞E6/E7蛋白的表达与空载对照组降幅分别为 (61.09±11.97)%和 (91.25±3.40)%, ($P<0.01$), 差异有统计学意义, 见图3B。

2.6 psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7对SiHa细胞增殖能力的影响

运用CCK-8增殖检测实验检测psilencer 2.1-U6 hygro、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 及空白对照SiHa细胞的增殖能力。结果显示, 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞克隆增殖能力明显减弱。于24、36、48、60、72 h分别测量差异均有统计学意义($P<0.01$), 表明E6/E7可以促进宫颈癌SiHa细胞的增殖, 见图4A。

2.7 psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7对SiHa细胞迁



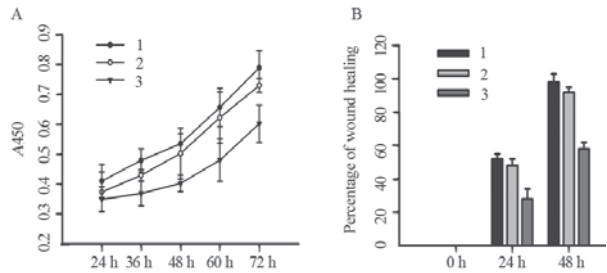
A:real-time PCR analysis; B:Western blot analysis
1:SiHa-Blank; 2: SiHa-psilencer2.1-U6 hygro; 3: SiHa- psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7I

图3 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞鉴定

Figure3 Validation of SiHa cells with stable psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7 I expression

移能力的影响

运用细胞划痕实验检测psilencer 2.1-U6 hygro、psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 及空白对照SiHa细胞的迁移能力。0、24、48 h时点细胞迁移情况对比显示, 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞迁移能力明显低于空白对照及空载质粒组, 且差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 见图4B。



A:CCK-8 cell proliferation assay;B:cell scratch wound healing assay;1: SiHa-Blank;2:SiHa-psilencer2.1-U6 hygro;3:SiHa- psilencer2.1-U6 hygro-shE6/E7I

图4 稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I 的SiHa细胞增殖及迁移能力检测

Figure4 Proliferation and migration of SiHa cells with stable psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7 I expression

3 讨论

人类乳头瘤病毒是一种小型无包膜、具有环状双链结构的DNA病毒, 具有嗜上皮性, 易侵及皮肤和黏膜。它由约8 000个碱基对组成, 其基因结构含有6个早期开放读码框架 (E1, E2, E4, E5, E6, E7)、2个晚期读码框架(L1, L2)和1个非编码调控区 (LCR)。早期读码框的基因主要参与病毒DNA的复制、转录、翻译调控和细胞转化等功能, 晚期读码框内的基因则主要编码病毒蛋白^[4]。根据HPV基因序列结构的不同, 人们确认的HPV类型大约有200种基因型^[5]。现有的流行病学和

分子生物学资料证实，高危型HPV的持续感染是导致宫颈癌发生的主要病因，以高危型HPV16、HPV18最为常见^[6]。流行病学显示，我国HPV16型感染的人群多于HPV18型感染，且子宫颈鳞状细胞癌较腺癌多见^[2]。因此，研究高危型HPV16的功能及致病机制对于宫颈癌的诊断及治疗至关重要。

研究表明，HPV16的早期基因 E6/E7是其最重要的致癌基因^[7]。E6基因编码的蛋白可与细胞内泛素水解酶E6-AP特异性结合形成E6-E6-AP复合体，并依赖蛋白水解酶系统水解P53蛋白，使其对细胞生长负调节功能丧失，引起细胞无限增生并向恶性转化^[8]。E6还可以通过诱导端粒酶的限速成分-人端粒酶反转录酶（human telomerase reverse transcriptase, hTERT）激活端粒酶促使细胞发生永生化和异常增殖^[9]。E7基因编码的蛋白可与生长抑制蛋白 pRb 结合，使其磷酸化失去活性从而释放出核转录因子E2F，最终导致感染细胞得以实现基因转录、异常增殖及恶性转化^[10]。抑癌基因P53、Rb的失活及端粒酶的激活会增加外源性HPV病毒 DNA在宫颈基底细胞的整合及突变，抵抗细胞凋亡，最终导致癌变^[11]。E6和E7蛋白不仅具有转化和致癌作用，而且还具有对病毒基因和细胞基因转录的反式激活活性，其在宫颈癌的发生过程中起到关键性作用。宫颈癌发生后很容易发生恶性增殖及转移，虽然早期筛查和手术联合放化疗的防治模式已有效改善早期宫颈癌的预后，然而对于发生宫旁浸润和远处转移的宫颈癌治疗和预后的改善仍是棘手问题^[12]。因此寻找肿瘤进展过程中的关键因子有助于我们建立肿瘤进展的预测体系，开展个体化诊治和靶向干预，从而为晚期宫颈癌患者争取治疗时机、改善预后。HPV16 E6/E7在宫颈癌侵袭转移方面的作用研究仍处于初步探究状态。近期有研究证实，在正常人包皮角质细胞中HPV16 E7可诱导其发生上皮间质转化（EMT），从而促进其侵袭转移^[13]。然而在以HPV感染为主要病因的宫颈癌中HPV16 E6/E7是否也可诱导EMT发生并促进癌症侵袭转移，这点仍需要进一步的研究。

本研究采用RNA干扰技术（RNAi），以HPV16 E6/E7为靶点，在E6/E7基因的CNS区设计多对短发夹RNA（shRNA），并以psilencer 2.1-U6

hygro为载体构建psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7重组质粒。将重组质粒转染入HPV16阳性的人宫颈癌SiHa细胞系，用Real-time PCR检测E6、E7在mRNA水平的表达改变并从中筛选沉默效应最好的重组质粒，进而用潮霉素筛选获得稳定表达psilencer 2.1-U6 hygro-shE6/E7的SiHa细胞系。另外，本研究进一步运用CCK-8细胞增殖实验及细胞划痕实验检测了HPV 16 E6/E7对SiHa细胞增殖及迁移能力的影响，为探究HPV16 E6/E7在宫颈癌发生、发展中的功能及作用机制奠定基础。

参考文献：

[1] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation[J]. Nat Rev Cancer,2010,10(8):550-60.

[2] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S,et al.Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med,2003,348(6):518-27.

[3] McCloskey R,Menges C,Friedman A,et al.Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation. [J]. J Virol,2010,84(10):5131-9.

[4] Hoenil Jo, Jae Weon Kim. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer[J]. Cancer Therapy,2005,3:419-34.

[5] McLaughlin-Drubin ME,Münger K.Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res,2009,143(2):195-208.

[6] Corusić A, Skrgatić L, Mahovlić V,et al.Cervical cancer as a public health issue--what next? [J]. Coll Antropol, 2010, 34(1):301-7.

[7] Woodman CB,Collins SI,Young LS.The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues[J]. Nat Rev Cancer,2007,7(1):11-22.

[8] Berghella V,Figueroa D,Szychowski JM,et al.17-alpha-hydroxyprogesterone caproate for the prevention of preterm birth in women with prior preterm birth and a short cervical length[J]. Am J Obstet Gynecol,2010,202(4):351.e1-6.

[9] Massimi P, Shai A, Lambert P,et al.HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background[J]. Oncogene,2008,27(12):1800-4.

[10] American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion. Use of progesterone to reduce preterm birth[J]. Obstet Gynecol,2003,102(5 Pt 1):1115-6.

[11] Kisseljov F, Sakharova O, Kondratjeva T. Cellular and molecular biological aspects of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int Rev Cell Mol Biol,2008,271:35-95.

[12] Feng SY,Zhang YN,Liu JG.Risk factors and prognosis of node-positive cervical carcinoma[J].Ai Zheng,2005,24(10):1261-6. [冯淑瑜,张彦娜,刘建刚.宫颈癌淋巴结转移的高危因素及预后分析[J].癌症,2005,24(10):1261-6.]

[13] Hellner K,Mar J,Fang F,et al.HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition[J].Virology,2009,391 (1):57-63.

[编辑：黄园玲；校对：邱颖慧]