

# 基于基因芯片技术的人乳头瘤病毒分型检测方法及应用评价\*

和晓利<sup>1,2,3</sup>, 刘洪倩<sup>2,4</sup>, 何斌<sup>4</sup>, 杨沛<sup>2</sup>, 王和<sup>2,3,4,5</sup>, 刘珊玲<sup>1,2,3,4△</sup>

1. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 细胞与基因治疗实验室(成都 610041);
2. 四川大学华西第二医院 妇产科教研室(成都 610041); 3. 胎儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室(成都 610041);
4. 四川大学华西第二医院 产前诊断中心(成都 610041);
5. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 遗传实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 评价基因芯片法人乳头瘤病毒分型检测试剂盒(HPG)的临床应用价值。方法 采集慢性宫颈炎或不规则阴道流血女性的宫颈上皮脱落细胞 151 例,应用 HPG 检测方法、第二代杂交捕获技术(HC2)检测方法以及 DNA 直接测序法进行检测,通过对 HPG 与 HC2、DNA 直接测序结果的平行对照,对 HPG 检测方法进行评价。结果 HPG 检测方法和 HC2 检测方法的总一致率为 87.42%( $kappa=0.75, P<0.05$ ),以 DNA 直接测序结果为金标准,HPG 检测方法对高危 HPV 的灵敏度和特异度分别是 100%、96.49%,HPG 方法和 DNA 直接测序方法的一致率为 98.70%( $kappa=0.97, P<0.05$ )。通过 HPG 检测结果发现,多重 HPV 感染率为 23.84%,HPV 阳性感染率较高的 HPV 亚型依次为 HPV 16(13.25%)、58(11.92%)、52(11.92%)、31(6.62%)、39(5.96%)、33(5.96%)。结论 HPG 检测法和 HC2 检测法以及 DNA 直接测序法有着良好的一致率,HPG 检测法可以实现 HPV 准确分型检测,适用于临床检测工作的需要。

**【关键词】** 人乳头状瘤病毒 人乳头瘤病毒分型 第二代杂交捕获技术 DNA 直接测序

## The Use of Human Papillomavirus Genotyping Kit Based on Gene Chip Technology for Detecting and Typing of Human Papillomavirus

HE Xiao-li<sup>1,2,3</sup>, LIU Hong-qian<sup>2,4</sup>, HE Bin<sup>4</sup>, YANG Pei<sup>2</sup>, WANG He<sup>2,3,4,5</sup>, LIU Shan-ling<sup>1,2,3,4△</sup>. 1. Laboratory of Cell and Gene Therapy, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetrics&Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Obstetrics&Gynecology and Pediatric Disease and Birth Defects of Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 4. Prenatal Diagnosis Center, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 5. Laboratory of Genetics, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: sunny630@126.com

**【Abstract】** Objective To evaluate a new human papillomavirus (HPV) genotyping technique based on gene chip technology (HPG) for HPV genotyping and its clinical efficacy. Methods HPV genotyping (HPG) test, hybrid capture II (HC2) test and DNA sequencing assay were performed in 151 patients aged 20-75 years with diagnosis of chronic cervicitis or abnormal vaginal bleeding. The cervical specimens were collected from cervical epithelium. All the cervical samples were analyzed by the HPG test, HC2 test and DNA sequencing. The clinical efficacy of the HPG test was analyzed. Results The consistent rate between HPG test and HC2 test was 87.42% ( $kappa=0.75, P<0.05$ ). When DNA sequencing assay was regarding as the final test result, the sensitivity and specificity of HPG test for high risk HPV were 100% and 96.49%, respectively. The consistent rate between HPG test and direct DNA sequencing was 98.70% ( $kappa=0.97, P<0.05$ ). The most common six HPV genotypes detected by HPG test were HPV 16 (13.25%), 58 (11.92%), 52 (11.92%), 31 (6.62%) 39 (5.96%), 33 (5.96%) in descending order of frequency. The incidence of multiple-types infection detected by HPG test was 23.84%. Conclusion HPG test is a rapid and accurate test for HPV genotyping which could detect 29 types of HPV infection at one time. It is suitable for cervical HPV infection screening in clinic.

**【Key words】** Human papillomavirus Human papillomavirus genotyping Hybrid capture II Directed DNA sequencing assay

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其死亡

率仅次于乳腺癌<sup>[1]</sup>,严重影响着女性健康。自 1990 年以来,大量的流行性病学研究发现,人乳头瘤病毒

\* 国家自然科学基金(No. 30772323)和四川省科技厅科技支撑计划(No. 2012SZ0136) 资助

△ 通讯作者, E-mail: sunny630@126.com

(HPV)是专性感染人表皮和黏膜鳞状上皮细胞的常见 DNA 病毒,是导致宫颈上皮内增生(CIN)<sup>[2]</sup>和宫颈癌的主要因素<sup>[3]</sup>,因此宫颈脱落细胞 HPV 检测已被列入宫颈癌筛查方案和指引<sup>[4]</sup>。HPV 亚型繁多,并分为与宫颈癌密切相关的高危亚型如 16、18 型,以及与生殖道尖锐湿疣等良性病变相关的低危亚型如 6、11 型等。目前,虽有较多的 HPV 检测方法,如荧光 PCR 法等,但因其灵敏度低以及不能一次检测多个 HPV 亚型等原因未在临床上得到大力推广,主要用于实验室的研究。第二代杂交捕获技术(HC2)是唯一被 FDA 批准的并用于临床的 HPV 检测方法,但其检测的型别少,且无法实现 HPV 分型检测。人乳头瘤病毒分型(HPG)检测试剂盒[港龙生物技术(深圳)有限公司]是基于基因芯片技术对 HPV 进行分型检测的产品,其基本原理是利用微量点样技术,将 29 种 HPV 型(包括 15 种高危型 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68 和 14 种低危型 HPV6、11、26、40、42、43、44、54、55、57、67、69、73、82)特异性探针点样于基因芯片基质上,制成基因芯片;经过对样本中的 DNA 进行 PCR 扩增、杂交和显色及自动扫描分析,检测样本 HPV 型别。本研究通过 HPG 检测和 HC2 检测以及 DNA 测序结果的平行对照,探索一种新的 HPV 分型检测方法,并探讨 HPG 检测的灵敏度、特异度及其临床应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象及标本采集

收集 2009 年 8 月至 2011 年 5 月在四川大学华西第二医院因慢性宫颈炎或异常阴道流血就诊的患者 151 例,年龄 20~75 岁,平均年龄(40.62±11.17)岁。按宫颈细胞学取材常规采集样本(标本采集均使用一次性宫颈刷插入宫颈管顺时针方向旋转 3 圈,取得的宫颈上皮细胞保存在细胞保存液中),4℃保存,24 h 内提取 DNA,也可-70℃长期保存,避免反复冻融。

### 1.2 主要试剂和仪器

HPG 检测试剂盒[包括 A 盒(HPV PCR 反应液, *Taq*/UNG, HPV DNA 提取液, HPV 阴性对照, HPV 阳性对照)和 B 盒(变性液, 杂交中和液, 洗液 A、B、C, 酶标原液, 显色液 A、B, HPV 分型基因芯片),港龙生物技术(深圳)有限公司], HPV 分型基因芯片检测阅读系统[港龙生物技术(深圳)有限公司], HC2 High-Risk HPV DNA Test kit

(Digene Corporation)。

### 1.3 HPG 试剂盒检测

**1.3.1 样本处理** 取出待处理标本,振荡混匀;置离心机中以 13 000 r/min 离心 5 min;弃上清,保留沉淀物行 DNA 提取。

**1.3.2 样本 DNA 提取** 向两只对照管和标本管中加入 50 μL HPV DNA 提取液,振荡混匀,沸水浴 10 min,之后 13 000 r/min 离心 10 min,保留上清液,产物立即使用或-20℃保存。

**1.3.3 PCR 扩增** 将 HPV PCR 反应液与 *Taq*/UNG 按照体积比 27.6:0.4 的比例混合,每个扩增管 28 μL 的体系分装,每个扩增管中加入 2 μL 待测 DNA 样本,混匀后进行 PCR 扩增。扩增程序如下:50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 30 s, 52℃ 45 s, 65℃ 30 s, 40 个循环, 65℃ 5 min。扩增完成后,产物可立即检测或置于-20℃保存。

**1.3.4 DNA 杂交、显色和 HPV 基因分型** 取 30 μL 变性液加至 PCR 产物管中,轻微摇动混匀,室温静置 10 min,把 HPV 分型基因芯片转移至 96 孔板内,之后向各个芯片孔中加入 100 μL 杂交中和液和 60 μL 变性的 PCR 产物,55℃温育 30 min,使 PCR 产物和探针充分杂交。吸干孔内液体,向各个芯片孔内加入 150 μL 洗液 B,轻摇漂洗 3 min,重复 2 次,取 100 μL 稀释的 1/100 的酶标原液加至各个芯片孔内,37℃温育 30 min,吸干孔内液体分别用 150 μL 洗液 A、C 清洗 3 min,再分别用 50 μL 显色液 A、B 室温显色 5 min,用 150 μL 洗液 C 清洗,室温静置 1 min,吸干各个芯片孔内液体。用 HPV 分型基因芯片检测系统阅读系统对基因芯片检测并分析。基因芯片中共含有 35 个探针点,其中 3 个阳性定位点,1 个阴性定位点,2 个内对照(HB)以及 29 种 HPV 型检测点(包括 15 种高危型和 14 种低危型)。

**1.3.5 结果判读标准** 结果有效:3 个阳性定位点(+VE)杂交后显色,1 个阴性定位点(-VE)杂交后不显色,2 个内对照点(HB)杂交后显色,否则认定为结果无效。

HPV 分型基因芯片检测阅读系统可自动检测靶点信号(INS)值,并分析和报告结果:INS<11.0, HPV 阴性;INS≥11.0, HPV 阳性。

### 1.4 HC2 检测方法

采用美国 Digene 公司杂交捕获仪的方法检测 13 种高危型 HPV(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)。主要步骤为:宫颈分泌物标

本加裂解液 65 °C 变性 45 min, 分解双链 DNA 为单链, 变性的单链 DNA 与含有高危型 HPV 基因组的 RNA 探针 65 °C 杂交 60 min, 室温下用特异性的抗体捕获 DNA/RNA 杂交体; 杂交体与偶联有碱性磷酸酶的二抗结合, 加入发光底物, 根据光的强度判断 RNA/DNA 的含量。测定结果以 RLU(相对光单位, 光信号)/cutoff(阈值)比值表示: RLU/cutoff 比值  $\geq 1.0$  pg/mL 表示阳性, 比值  $< 1.0$  pg/mL 表示阴性 (1.0 pg/mL 临界值相当于 100 000 HPV copies/mL)。

### 1.5 直接测序法测定 HPV 分型

HPG 或 HC2 检查为阳性的样本再次通过直接测序法测定 HPV 的亚型, 各个亚型的引物均根据 HPV 基因序列的 L 区设计, 测序结果与基因数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比较。

### 1.6 统计学方法

计算 HPG 检测方法的灵敏度和特异度, 用 McNemar 检验对 HPG 和 HC2、DNA 直接测序结果的一致性进行分析, 计算 *kappa* 值。  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 HPG 检测与 HC2 检测结果的一致性对比

本次实验共收集 151 例样本进行了 HPG 和 HC2 两种方法的检测。通过 HPG 和 HC2 检测结果发现, 两种检测结果一致性良好 (针对 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等 13 种高危型检测结果): 阳性符合率为 92.59% (75/81), 阴性符合率为 81.43% (57/70), 总符合率为 87.42% (132/151) (*kappa* = 0.75,  $P < 0.05$ )。其中 HPG 检测和 HC2 检测结果不符合样本共 19 例。以 DNA 直接测序结果为金标准, 其中有 13 例 HC2 检测结果阴性而 HPG 检测结果为阳性, 测序结果发现均为阳性, 且与 HPG 检测结果相符合。6 例样本 HC2 检测阳性, HPG 检测阴性者 (与 HC2 检测的 13 种高危亚型对比), 测序结果发现其中有 2 例阴性, 2 例感染了 HPV53, 1 例感染了 HPV54, 1 例感染了 HPV44 和 HPV66, 这些亚型均不被 HC2 检测。其中 18 例样本 HPG 检测结果和 DNA 测序结果完全符合; 1 例样本 HPG 检测结果为 HPV39、52、68、44, DNA 测序结果为 HPV39、52、68 (附表)。

### 2.2 HPG 检测和 DNA 直接测序结果对比

共有 150 例样本进行了 HPG 检测和 DNA 直接测序, 13 种高危型 HPV (HPV16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) 的检测结果中, 二者的

附表 HPG 检测和 HC2 检测结果不符合样本 DNA 直接测序结果  
Table The DNA direct sequencing assay in 19 discordant samples by comparing HC2 tests and HPG tests

HC2*	HPG	DNA sequencing
+	HPV53	HPV53
+	HPV53	HPV53
+	HPV54	HPV54
+	-	-
+	-	-
+	HPV44,66	HPV44,66
-	HPV16	HPV16
-	HPV18	HPV18
-	HPV39	HPV39
-	HPV52	HPV52
-	HPV52	HPV52
-	HPV58	HPV58
-	HPV58	HPV58
-	HPV68,55	HPV68,55
-	HPV6,16,51	HPV6,16,51
-	HPV35	HPV35
-	HPV39	HPV39
-	HPV39,52,68,44	HPV39,52,68
-	HPV52,53	HPV52,53

\* The results of HPV16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68

总符合率为 98.67% (148/150) (*kappa* = 0.97,  $P < 0.05$ )。以 DNA 直接测序结果为金标准判断, HPG 检测方法的灵敏度和特异度分别为 100% (90/90) 和 96.49% (58/60)。我们通过特异性引物扩增测序发现, HPG 检测和 DNA 测序结果完全不一致的有 2 例, HPG 检测为 HPV16, DNA 测序结果为阴性; 主要型别一致, 个别型别不一致的有 3 例, 均为 HPG 测序型别多于 DNA 测序型别。

### 2.3 HPV 亚型的分布

根据 HPG 检测结果来看, 研究样本中共感染了 19 种 HPV 亚型, HPV16 是最常见的感染型别。阳性感染率较高的前 6 位 HPV 亚型依次为: 16 (13.25%、20/151), 58 (11.92%、18/151), 52 (11.92%、18/151), 31 (6.62%、10/151), 39 (5.96%、9/151), 33 (5.96%、9/151), 多重 HPV 感染的阳性率为 23.84% (36/151)。

## 3 讨论

目前, 宫颈癌仍旧是严重危害全球女性健康的肿瘤, 也是病因明确、可以有效预防的肿瘤之一。20 世纪 70 年代以来, 大量的研究发现持续的 HPV 感染在宫颈癌的发生发展过程中起着极其重要的作用, 被视为宫颈癌形成的首要病因。目前, HPV 检测已经成为降低细胞学检测假阴性的重要辅助手

段<sup>[5]</sup>。

至今为止,大量研究表明 HPV 检测对早期发现宫颈鳞癌前病变,提示宫颈病变转归,给予早期干预治疗减少或者防止宫颈癌的发生有着极其重要的作用。在本次研究中,我们介绍一种新的 HPV 分型检测的方法:HPG 检测试剂盒-基因芯片法。HPG 检测试剂盒可以检测 29 种 HPV 的基因型,其中包括了常见的 13 种高危型 HPV 亚型。近年来,出现了很多 HPV 检测的方法,如实时定量聚合酶链式反应法<sup>[6]</sup>,基质辅助激光解吸飞行时间(MALDI-TOF)质谱分析法<sup>[7]</sup>等,但是这些技术由于敏感性差、重复性差或技术操作复杂、成本较高等原因,并没有很好的应用于临床。目前,HC2 是唯一被美国 FDA 认证并用于临床宫颈样本的检测方法,但是其无法实现分型检测,且检测 HPV 亚型较少。根据 HPV 对宫颈病变的作用,分为高危型 HPV 和低危型 HPV,高危型 HPV 与宫颈病变的进展密切相关<sup>[8]</sup>。因此,对 HPV 分型检测有着重要的意义。

本研究应用 HPG 检测试剂盒检测 29 种 HPV 亚型,并与 HC2 检测以及 DNA 直接测序分型检测进行了平行对照。HC2 和 HPG 的总符合率为 87.42% ( $kappa = 0.75, P < 0.05$ ), HPG 和 DNA 测序的总符合率为 98.67% ( $kappa = 0.97, P < 0.05$ )。以 DNA 检测结果为金标准,实验结果显示 HPG 对 13 种高危型 HPV 的检测有高度的灵敏度(100%)和特异度(96.49%)。HPG 和 HC2 的检测结果中,其中有 19 例样本存在不一致的情况,经过 DNA 测序结果发现,18 例样本 HPG 的检测结果和 DNA 测序结果完全一致,1 例样本 HPG 的检测结果和 DNA 测序结果基本一致。HC2 阴性,而 HPG 和 DNA 测序是阳性结果的原因主要有两个,一种可能是由于 HPV 病毒的拷贝数未达到 HC2 检测的阈值,另外一种可能是由于 HC2 存在假阴性;HC2 检测结果阳性,而 HPG 和 DNA 测序结果是阴性的原因主要有两方面,一方面是由于 HC2 可以检测到某些低危型 HPV,如 HPV53,54,44,66,另一方面是由于 HC2 检测存在假阳性。Castle 等<sup>[9]</sup>的研究发现 HC2 确实可以检测到某些低危型 HPV。HPG 检测结果和 DNA 测序结果进行平行对照,表明二者有高度的一致性,其中两例标本 HPG 检测结果是 HPV16 型, DNA 测序结果为阴性,分析原因如下:第一,可能是在进行 DNA 测序之前,HPV DNA 已经降解;第二,可能是由于 DNA

测序采用的扩增体系不够灵敏;第三,很可能是 HPG 存在假阳性的结果。另外 HPG 检测 HPV 型别多于 DNA 测序型别,可能是多重感染容易导致产生核型不完全一致的情况,因为在进行 PCR 扩增的过程中不同 HPV 型别存在竞争效应,导致不同技术对不同 HPV 型别的检测灵敏度存在差异。

本研究 HPG 的检测结果显示,在慢性宫颈炎或不规则阴道流血的患者中,HPV16 感染率居首位,其次感染率前 5 位的 HPV 依次是 HPV58,52,31,39,33。在不同的地区和不同的研究中发现,HPV 的分布存在差异。世界范围内,感染情况位居前 6 位的分别是 HPV16,18,45,31,6,58<sup>[10]</sup>;同时在亚洲、非洲、欧洲、北美洲以及南美洲,HPV 感染的分布情况也存在差异。特别值得指出的是,在中国的不同地区 HPV 分布也存在轻微的差别<sup>[11,12]</sup>。因此,从预防性 HPV 疫苗的应用来看,了解不同地区的 HPV 亚型分布至关重要。

本次研究中,我们发现,多重 HPV 感染率高于单一的 HPV 感染率。近年来,多重 HPV 感染与宫颈病变的关系逐渐受到学者的关注。目前众多学者对多重 HPV 感染的意义存在分歧。部分学者认为多重 HPV 感染是导致宫颈高级别病变的一个重要的危险因素,且在宫颈癌的发展过程中起着协同的作用<sup>[13]</sup>,同时,HPV 多重感染可以降低宫颈癌患者的存活率<sup>[14]</sup>,但是部分学者认为,相对于单一 HPV 感染,多重 HPV 感染导致宫颈癌的相对危险性并未显著提高<sup>[11,15]</sup>。因此,多重 HPV 感染与宫颈病变的相关性仍需进一步的研究。

近年来,已有大量检测 HPV 的技术平台出现且已经商业化,但均由于其操作相对较复杂,自动化困难,以及价格昂贵等原因,限制了这些检测平台在临床中的应用。HPG 检测方法价格便宜,操作方法简单,高通量自动化检测,能够极大的提高工作效率,故在我国得到广泛的临床应用。

总之,HPG 检测方法作为一种新型的基因芯片技术,可以实现 HPV 的准确分型检测以及多重感染检测,对 HPV 分型检测为宫颈疾病治疗方案的选择和 HPV 疫苗的应用有很好的指导意义。同时,与 HC2 和 DNA 测序的平行对照结果来看,HPG 检测方法与二者有很高的一致性,且灵敏度(100%)和特异度(96.49%)较高,适应于临床检测工作的需要。

## 参 考 文 献

- 1 苏韵华,许丹,张玉泉. 宫颈癌及癌前病变多种筛查方法的

- 研究进展. 实用妇产科杂志, 2009; 25(9): 529-530.
- 2 Kjr SK, van den Brule AJC, Bock JE, *et al.* Human papillomavirus—the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 1996; 65(5): 601-606.
  - 3 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999; 189(1): 12-19.
  - 4 Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, *et al.* Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*, 2004; 103(2): 304-309.
  - 5 Spitzer M. Cervical screening adjuncts: recent advances. *Am J Obstet Gynecol*, 1998; 179(2): 544-556.
  - 6 Tadokoro K, Akutsu Y, Tanaka K, *et al.* Comparative quantitative analysis of 14 types of human papillomavirus by real-time polymerase chain reaction monitoring Invader reaction (Q-Invader assay). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010; 66(1): 58-64.
  - 7 Jones J, Powell Ng, Tristram A, *et al.* Comparison of the PapilloCheck<sup>®</sup> DNA micro-array Human Papillomavirus detection assay with Hybrid Capture II and PCR-enzyme immunoassay using the GP5/6 + primer set. *J Clin Virol*, 2009; 45(2): 100-104.
  - 8 Damasus-Awatai G, Freeman-Wang T. Human papilloma virus and cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003; 15(16): 473-477.
  - 9 Castle PE, Schiffman M, Burk, RD, *et al.* Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002; 11(11): 1394-1399.
  - 10 Muoz N, Bosch FX, de Sanjose S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003; 348(6): 518-527.
  - 11 Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat Cancer Institute*, 1995; 87(11): 796-802.
  - 12 Hong D, Ye F, Chen H, *et al.* Distribution of human papillomavirus genotypes in the patients with cervical carcinoma and its precursors in Zhejiang Province, China. *Int J Gynecol Cancer*, 2008; 18(1): 104-109.
  - 13 Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, *et al.* Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis*, 2008; 35(3): 276-282.
  - 14 Bachtiry B, Obermair A, Dreier B, *et al.* Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*, 2002; 102(3): 237-243.
  - 15 Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002; 55(4): 244-265.

(2012-12-17 收稿, 2013-04-11 修回)

编辑 余琳

(上接第 631 页)

### 参 考 文 献

- 1 Gheorghide M, Zannad F, Sopko G, *et al.* Acute heart failure syndromes: current state and framework for future research. *Circulation*, 2005; 112(25): 3958-3968.
- 2 Demling RH, LaLonde C, Ikegami K. Pulmonary edema: pathophysiology, methods of measurement, and clinical importance in acute respiratory failure. *New Horiz*, 1993; 1(3): 371-380.
- 3 Mangialardi RJ, Martin GS, Bernard GR, *et al.* Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. *Ibuprofen in Sepsis Study Group. Crit Care Med*, 2000; 28(18): 3137-3145.
- 4 Wiedemann HP, Wheeler AP, Hayden D. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*, 2006; 354(24): 2564-2575.
- 5 Khan H, Belsler J, Yilmaz M, *et al.* Fresh-frozen plasma and platelet transfusions are associated with development of acute lung injury in critically ill medical patients. *Chest*, 2007; 131(5): 1308-1314.
- 6 Park M, Sangean MC, Volpe Mde S. Randomized, prospective trial of oxygen, continuous positive airway pressure, and bilevel positive airway pressure by face mask in acute cardiogenic pulmonary edema. *Crit Care Med*, 2004; 32(12): 2407-2415.
- 7 Park M, Lorenzi-Filho G. Noninvasive mechanical ventilation in the treatment of acute cardiogenic pulmonary edema. *Clinics*, 2006; 61(3): 247-252.
- 8 Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, *et al.* Treatment of ARDS. *Chest*, 2001; 120(4): 1347-1367.
- 9 Aberle DR, Wiener-Kronish JP, Webb WR, *et al.* Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema: diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology*, 1988; 168(1): 73-79.
- 10 Roberto C, Gino S, Paolo C. Chest sonography: a useful tool to differentiate acute cardiogenic pulmonary edema from acute respiratory distress syndrome. *Cardiovasc Ultrasound*, 2008; 6(1): 16-19.
- 11 Dimitri K, Ajay JK, Christopher PR. Diagnostic and prognostic utility of brain natriuretic peptide in subjects admitted to the ICU with hypoxic respiratory failure due to noncardiogenic and cardiogenic pulmonary edema. *Chest*, 2007; 131(3): 964-971.
- 12 Bentancur A, Rieck J, Koldanov R, *et al.* Acute pulmonary edema in the emergency department: clinical and echocardiographic survey in an aged population. *Am J Med Sci*, 2002; 323(5): 238-243.
- 13 王建昌, 刘平, 陈力达等. 老年人和中青年人首发急性左心衰诱因和病因的对比研究. *中国老年学杂志*, 2006; 26(12): 1607-1608.

(2013-01-07 收稿, 2013-03-06 修回)

编辑 沈进