

宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 的表达及其意义*

史跃燕¹, 鞠少卿^{2△}, 申娟娟², 张金业¹, 朱自力¹, 顾益凤¹

(1. 南通市肿瘤医院检验科, 江苏南通 226000; 2. 南通大学附属医院外科综合实验室, 江苏南通 226000)

摘要:目的 探讨宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平及其对宫颈癌的辅助诊断价值。方法 收集 55 例宫颈癌患者、32 例宫颈上皮内瘤变(CIN)患者、39 例子官肌瘤患者及 47 例健康对照者血清样本, 分别测定 hsa-miR-200a-3p 的表达水平及糖链抗原 125(CA125)和人鳞状细胞癌相关抗原(SCCAg)水平。分析血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平与临床病理特征、CA125 和 SCCAg 之间的关系。用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价 3 项指标单独及联合检测对宫颈癌的辅助诊断价值。**结果** 宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量均高于子宫肌瘤患者和健康对照者, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。CIN 患者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量均高于子宫肌瘤患者和健康对照者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。子宫肌瘤患者和健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平在年龄大小、是否绝经、肿瘤最大直径、FIGO 分期期间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 相对表达量与 CA125($r^2 = 0.012, P = 0.421$)、SCCAg($r^2 = 0.004, P = 0.647$)无相关性。ROC 曲线分析血清 hsa-miR-200a-3p 检测对宫颈癌患者的辅助诊断价值, 宫颈癌区分于子宫肌瘤时, ROC 曲线下面积(AUC)为 0.753; 宫颈癌患者区分于健康对照者时, AUC 为 0.771。**结论** 宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 相对表达量高于子宫肌瘤组和健康对照组, 有可能成为宫颈癌辅助诊断的重要生物学指标。血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平或可用于 CIN 的辅助诊断。

关键词: 宫颈癌; hsa-miR-200a-3p; 实时荧光定量 PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.12.004

中图法分类号: R737.33

文章编号: 1673-4130(2019)12-1421-05

文献标识码: A

The expression and significance of hsa-miR-200a-3p in serum of cervical cancer patients*SHI Yueyan¹, JU Shaoqing^{2△}, SHEN Xianjuan², ZHANG Jinye¹, ZHU Zili¹, GU Yifeng¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Nantong Tumor Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China; 2. Surgical Comprehensive Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China)

Abstract: Objective To explore the level of serum hsa-miR-200a-3p in cervical cancer patients and its diagnostic value in cervical cancer. **Methods** Serum samples of 55 patients with cervical cancer, 32 patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN), 39 cases of uterine fibroids and 47 healthy controls were collected. The levels of hsa-miR-200a-3p, sugar chain antigen 125 (CA125) and human squamous cell carcinoma associated antigen (SCCAg) were determined respectively. The relationship between the level of serum hsa-miR-200a-3p and clinicopathological features, CA125 and SCCAg levels was analyzed. ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of single and combined detection of hsa-miR-200a-3p, CA125 and SCCAg. **Results** The relative expression of serum hsa-miR-200a-3p in patients with cervical cancer was higher than that in patients with uterine leiomyoma and healthy controls, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). The relative expression of serum hsa-miR-200a-3p in patients with CIN was higher than that in patients with uterine leiomyoma and healthy controls, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference between relative expression of serum hsa-miR-200a-3p in patients with uterine fibroids and

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81672099); 江苏重点研发专项项目(BE2015654); 南通市“临床实验诊断研究中心”建设项目(HS2015002)。

作者简介: 史跃燕, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤标志物方面研究。△ 通信作者, E-mail: jsq814@hotmail.com。

本文引用格式: 史跃燕, 鞠少卿, 申娟娟, 等. 宫颈癌患者血清 hsa-miR-200a-3p 的表达及其意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12): 1421-1425.

healthy controls ($P > 0.05$). There was no significant difference in the expression level of hsa-miR-200a-3p between age, menopause, maximum tumor diameter and FIGO stage in cervical cancer patients ($P > 0.05$). The relative expression of hsa-miR-200a-3p was not correlated with CA125 ($r^2 = 0.012, P = 0.421$), SCCAg ($r^2 = 0.004, P = 0.647$). When cervical cancer was distinguished from uterine fibroids, area under receiver operating characteristic (ROC) Curve (AUC) was 0.753, the AUC was 0.771 when cervical cancer was distinguished from healthy control. **Conclusion** Serum hsa-miR-200a-3p expression was higher in cervical cancer patients than those in the uterine fibroids group and healthy control group, and it could be an important biological indicator for cervical cancer adjuvant diagnosis. At the same time, the expression of serum hsa-miR-200a-3p may be used for the auxiliary diagnosis of CIN.

Key words: cervical cancer; hsa-miR-200a-3p; RT-PCR

宫颈癌(CC)是严重威胁女性健康的恶性肿瘤,并且发病率有升高的趋势。据报道,中国每年新确诊的病例约为 13 万例,占全球 28.8%^[1]。研究表明人乳头状瘤病毒(HPV)感染和基因突变是宫颈癌发生的重要因素^[2]。

微小核糖核酸(miRNA)是一种小分子非编码单链 RNA,在细胞内的调节基因方式呈网状,即一个 miRNA 可调节多个靶基因,一个基因也可由多个 miRNA 调节。有文献报道称,人类基因的 1/3 由 miRNA 调控^[3]。miRNA 结合位点的 SNP 能使信使 RNA 靶基因的功能发生改变,从而使得癌症更加易发并能推进肿瘤的进展^[4]。已有研究表明,在亚洲人中,miRNA 单核苷酸的多态性与患癌风险之间的相关性更加明显^[5]。因此,miRNA 可作为肿瘤辅助诊断、疾病监测、疗效评价及肿瘤形成机制研究的潜在肿瘤标志物^[6]。同时研究表明,外周血中的 miRNA 反复冻融、酸碱处理及长期保存等均能稳定存在^[7],为 miRNA 的血清学研究提供了可能性。故许多学者认为血清 miRNA 的这些生物学特性可用于宫颈癌的早期诊断、疗效监测、机制研究及靶向治疗。

有文献报道,miR-200 家族通过对目的基因的调控影响肿瘤细胞的迁移及侵袭等生物学过程,从而参与肿瘤的发生、发展^[8]。张占薪等^[9]的研究表明宫颈癌组织 has-miRNA-200b 表达水平明显高于癌旁宫颈组织。本文通过分析 55 例 CC 患者、32 例宫颈上皮内瘤变(CIN)患者、39 例子宫颈癌患者及 47 例健康对照者的血清样本 hsa-miR-200a-3p 表达水平的变化,探讨其在宫颈癌辅助诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次实验所有血清标本均来自南通市肿瘤医院,患者为 2015 年 11 月至 2016 年 6 月收治的未经任何治疗的初诊住院患者,55 例 CC 患者:年龄 34~84 岁,平均 57 岁;32 例 CIN 患者:年龄 28~80 岁,平均 47 岁;39 例子宫颈癌患者:年龄 33~86 岁,平均 50 岁;47 例健康对照:年龄 22~61 岁,平均 43 岁。所有患者均经病理组织学或细胞学证实,入院

前未经任何放化疗及抗肿瘤治疗。健康对照纳入标准:血糖、血脂、肝肾功能均无异常、无妇科疾病及其他并发症的体检者,各组间年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理学委员会批准,所有受试者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及血清总 RNA 提取 用真空采血法采集各研究对象的空腹肘静脉血,自然凝固后离心 1 000 r/min 离心 10 min,将上层血清分装于无核糖核酸酶的 EP 管中,唯一性编号,-80 °C 冰箱保存备用。总 RNA 提取用北京百泰克生物技术有限公司(BioTeke Corporation)试剂盒提取,纯度经分光光度计测定合格后逆转成 cDNA。

1.2.2 RNA 逆转录为互补 cDNA 将 RNA 逆转录为互补 cDNA,逆转录试剂盒、hsa-miR-200a-3p 及内参 U6 茎环逆转录引物分别由美国 Thermo 公司、上海捷瑞生物科技有限公司提供。逆转录反应体系为:RNA 300 ng,5×缓冲液 4 μL,10 μM 茎环状逆转录引物 1 μL,dNTP(10 nM)2 μL,核糖核酸酶抑制剂(20 U/μL)1 μL,反转录酶(200 U/μL)1 μL,无核酸酶水补足至 20 μL。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 测定 hsa-miR-200a-3p 正向引物:5'-GCG CCT AAC ACT GTC TGG TAA-3',hsa-miR-200a-3p 反向引物:5'-CAG CCA CAA AAG AGC ACA AT-3';U6 正向引物:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',U6 反向引物:5'-TGG TGT CGT GGA GTC G-3',反应体系为:SYBR Green I mix(Rox)10 μL,cDNA 4 μL,正向引物 0.5 μL,反向引物 0.5 μL,无核酸酶水 5 μL,混匀后短暂离心。PCR 反应条件为:95 °C,10 min;95 °C,15 s;58 °C,32 s,40 个循环,hsa-miR-200a-3p 和内参 U6 均做 3 个复孔,取均值,hsa-miR-200a-3p 的相对表达水平(RQ)用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}(Ct_{\text{miRNA 均值}} - Ct_{\text{U6 均值}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{miRNA 均值}} - Ct_{\text{U6 均值}})$ 。SYBR Green I 染料和 7500 实时定量 PCR 扩增仪分别来自德国罗氏(Roche)公司和美国 ABI 公司。

1.2.4 血清糖链抗原 125(CA125)和人鳞状细胞癌相关抗原(SCCAg)测定 分别采用德国罗氏(Roche)诊断有限公司的E601化学发光仪和深圳市新产业生物医学工程有限公司的Maglumi全自动化学发光仪测定CA125和SCCAg水平。

1.3 统计学处理 统计分析运用SPSS21.0软件;数据用[M(P₂₅, P₇₅)]表示;多个独立样本比较采用Kruskal-Wallis H检验,多样本两两比较采用Mann-Whitney U检验;相关性检验用Spearman分析;用受试者工作特征曲线(ROC曲线)获得cut-off值,并评价各检测指标的诊断价值;检验水准为α=0.05, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hsa-miR-200a-3p的相对表达量 CC、CIN患者、子宫肌瘤患者和健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量分别为1.871(1.124, 5.096)、1.638(0.615, 3.875)、0.980(0.522, 1.760)和0.891(0.495, 1.600)。CC患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量高于子宫肌瘤患者和健康对照者,差异有统计学意义(P<0.001);CIN患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量高于子宫肌瘤患者和健康对照者,差异有统计学意义(P<0.05),但与CIN患者差异无统计学意义(P>0.05)。子宫肌瘤患者和健康对照者 hsa-miR-200a-3p的相对表达量差异无统计学意义(P>0.05)。见图1。

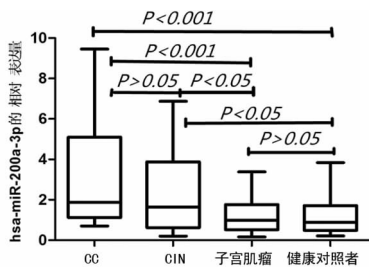


图1 血清 hsa-miR-200a-3p 在 CC 组、CIN 组、子宫肌瘤组及健康对照组中的相对表达量

2.2 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p相对表达量与临床病理特征的关系 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量在不同年龄、绝经与否、肿瘤最大直径及FIGO分期期间差异均无统计学意义(P>0.05)。结果见表1。

2.3 血清 hsa-miR-200a-3p相对表达量与糖类抗原125(CA125)、SCCAg的相关性分析 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p相对表达量与CA125、SCCAg之间无相关性(r² = 0.012, P = 0.421; r² = 0.004, P = 0.647)。见图2、3。

2.4 ROC曲线分析 CC患者和子宫肌瘤患者比较, hsa-miR-200a-3p的cut-off值为1.784, ROC曲线下面积(AUC)为0.753[95%置信区间(CI): 0.675~

0.850], 诊断效能见图4。CC患者和健康对照者比较, hsa-miR-200a-3p的cut-off值为1.502、AUC为0.771(95%CI: 0.682~0.860)。诊断效能见图5。

表1 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量与临床病理特征的关系

临床病理	n	hsa-miR-200a-3p 相对表达量[M(P ₂₅ , P ₇₅)]	P
年龄(岁)			0.798
≤60	32	1.803(1.084, 6.254)	
>60	23	1.871(1.124, 5.079)	
绝经与否			0.155
是	34	1.819(1.078, 2.876)	
否	21	3.654(1.101, 7.225)	
肿瘤大小			0.728
≤4 cm	16	2.127(1.126, 5.585)	
>4 cm	21	1.721(0.982, 5.751)	
无数据	18		
FIGO分期			1.000
I, II	44	1.878(1.083, 5.585)	
III, IV	11	1.849(1.399, 3.109)	

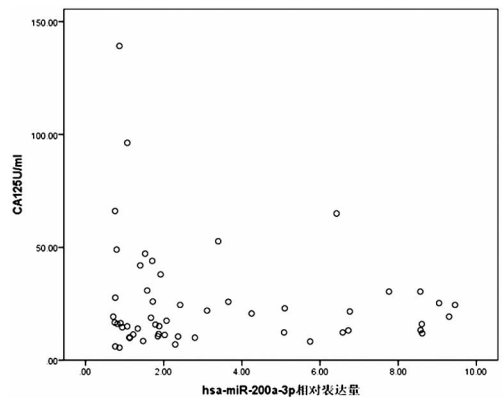


图2 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量与CA125的相关性

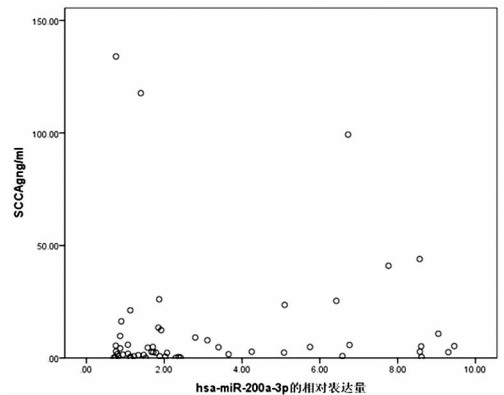


图3 CC患者血清 hsa-miR-200a-3p的相对表达量与SCCAg的相关性

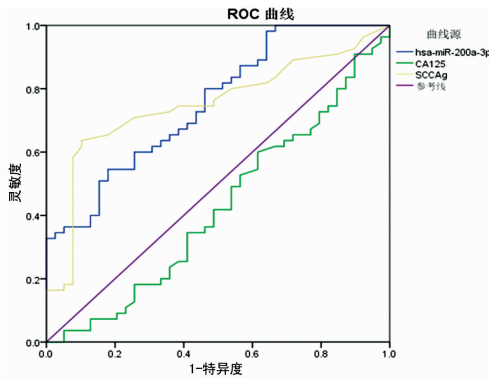


图 4 CC 患者区分于子宫肌瘤时各指标的 ROC 曲线

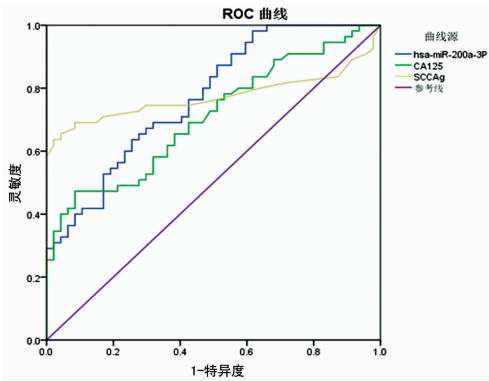


图 5 CC 患者区分于健康对照时各指标的 ROC 曲线

表 2 区分于子宫肌瘤时各指标对 CC 诊断效能的比较 (%)

分子标志物	灵敏度	特异度	准确度	阳性 预测值	阴性 预测值
CA125	90.9	12.8	58.5	59.5	50.0
SCCAg	63.6	89.7	74.5	89.7	63.6
hsa-miR-200a-3p	54.5	82.1	66.0	54.5	82.1
CA125+hsa-miR-200a-3p	94.5	10.3	60.6	60.0	57.1
SCCAg+hsa-miR-200a-3p	78.2	79.5	78.7	84.3	72.1
3 项指标联合	98.2	7.7	60.6	60.0	75.0

表 3 区分于健康对照者时各指标对 CC 诊断效能的比较 (%)

分子标志物	灵敏度	特异度	准确度	阳性 预测值	阴性 预测值
CA125	47.3	91.5	67.6	86.7	59.7
SCCAg	63.7	97.9	79.4	97.2	69.7
hsa-miR-200a-3p	63.7	74.5	68.6	74.5	63.6
CA125+hsa-miR-200a-3p	76.4	70.2	73.5	75.0	71.7
SCCAg+hsa-miR-200a-3p	80.0	72.3	76.5	77.2	75.6
3 项指标联合	85.5	68.1	77.5	75.8	80.0

2.5 hsa-miR-200a-3p、CA125 和 SCCAg 联合检测诊断 CC 的价值 ROC 曲线分析表明,在区分 CC 和子宫肌瘤时,hsa-miR-200a-3p 和 SCCAg 的灵敏度和特异度均相似,而 CA125 的特异度仅为 12.8%,联合

前两者检测的灵敏度和特异度分别为 78.2% 和 79.5%,此时联合检测 hsa-miR-200a-3p 和 SCCAg 更合适。在区分 CC 和健康对照时,hsa-miR-200a-3p 和 SCCAg 灵敏度相同,且高于 CA125,SCCAg 特异度最高。在单项检测中 SCCAg 的诊断准确率最高,SCCAg 联合 hsa-miR-200a-3p 的诊断准确率高,SCCAg 联合 CA125。见表 2、3。

3 讨论

CC 的早期发病症状隐匿,对于未定期进行宫颈筛查的女性很难及时发现,当出现明显症状而就诊时往往处于癌症中晚期,其疗效和预后均不理想。研究表明,miRNA 在 CC 组织中的升高或降低与 CC 的发生、发展密切相关^[10]。

miR-200a 属于 miR-200 家族成员,在不同的肿瘤中发挥不同的作用,与 miR-141 有着共同的序列“AACACU”。其中 miR-200a、miR-200b 及 miR-429 基因簇位于人体的 1 号染色体 p36.33 区,而 miR-200c 和 miR-141 基因簇位于人体的 12 号染色体 p13.31 区,这 2 个区域容易发生染色体缺失、易位或点突变,进一步导致肿瘤的发生。

miR-200 家族可抑制 E 盒结合锌指蛋白 1 (ZEB1)和 ZEB2 的表达从而抑制肿瘤的上皮-间质转变,最终抑制肿瘤细胞迁移和侵袭过程。miR-200a 下调 ZEB2 的表达进而抑制 CD133/1⁺ 鼻咽癌细胞和卵巢癌干细胞的迁移和侵袭^[11-12]。miR-200a 能够对 NCAM1mRNA 的 3'-UTR 进行负调控,从而导致 NCAM1 基因所编码的 NCAM-120、NCAM-140 和 NCAM-180 蛋白水平下调^[13]。张占薪等^[9]研究表明 CC 组织中 has-miRNA-200b 的表达水平高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CAO 等^[14]研究表明 miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 在上皮性卵巢癌组织中处于明显高表达状态,并与生存期呈负相关。miR-200 家族在胃癌组织中的呈低表达水平状态,与正常对照组织之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)^[15]。因此可以认为,miR-200 家族对不同的肿瘤发挥着不同的生物学功能。

本次研究通过对 55 例 CC 患者、32 例 CIN 患者、39 例子子宫肌瘤患者和 47 例健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量进行检测,并进行统计分析:CC 患者和 CIN 患者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),CC 组和子宫肌瘤患者、健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);CIN 患者和子宫肌瘤患者、健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);子宫肌瘤患者和健康对照者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

通过对血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平与临床病例特征之间关系的研究表明,其相对表达量在不同年龄、绝经与否、肿瘤最大直径及 FIGO 分期之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

本研究结果提示,CC 患者血清 hsa-miR-200a-3p 水平升高,应用实时荧光定量 PCR 测定 CC 患者血清中的 hsa-miR-200a-3p 水平对 CC 具有一定的辅助诊断价值,在单独诊断时诊断效能低于 SCCAg,高于 CA125,联合 hsa-miR-200a-3p 和 SCCAg,可提高对 CC 的诊断效能。hsa-miR-200a-3p 可能成为 CC 诊断的重要血清标志。

大多数 CC 由 CIN 转变而来,CC 重要的危险因素是高危型 HPV 的长期感染。研究表明,基质金属蛋白酶(MMP)、MMP2 在 HPV 阳性 CC 细胞中水平明显高于 HPV 阴性细胞,miR-200a 的高表达可导致 MMP2 的表达水平升高^[16],在本研究中,CIN 患者的 hsa-miR-200a-3p 水平也升高,因而可以设想 hsa-miR-200a-3p 可能参与由 HPV 感染引起宫颈病变的过程,为进一步阐明 CC 的发生机制及 CC 的预防和治疗提供新思路。

4 结 论

CC 患者血清 hsa-miR-200a-3p 的相对表达量高于子宫肌瘤患者和健康对照者,有可能成为 CC 辅助诊断的重要生物学指标,血清 hsa-miR-200a-3p 的表达水平或可用于 CIN 的辅助诊断。

参考文献

- [1] WAN L, WAN J, ZHANG Y L, et al. Clinical analysis of the trend of carcinoma of the cervix in young women[J]. J Clin Oncol, 2014, 31(10): 547-549.
- [2] DUENAS-GONZALEZ A, SERRANO-OLVERA A, CETINA L, et al. New molecular targets against cervical cancer [J]. Int J Womens Health, 2014, 6(4): 1023-1031.
- [3] KASINSKI A L S F, genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(12): 849-864.
- [4] SHI T Y, CHENG X, YU K D, et al. Functional variants in TNFAIP8 associated with cervical cancer susceptibility and clinical outcomes [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(4): 770-778.
- [5] XU Y Q, GU L, PAN Y Q, et al. Different effects of three polymorphisms in MicroRNAs on cancer risk in Asian population; evidence from published literatures [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65123.
- [6] SILVA S S, LOPES C, TEIXEIRA A L, et al. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? [J]. Forensic Sci Int Genet, 2015, 1(14): 1-10.
- [7] KOEBERLE V, PLELI T, SCHMITHALS C, et al. Differential stability of Cell-Free circulating microRNAs; implications for their utilization as biomarkers [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75184-e75194.
- [8] 刘锋, 王占祥, 黄才权, 等. miR-200a 通过靶向 NCAM1 基因影响胶质瘤细胞的迁移及侵袭 [J]. 肿瘤, 2013, 33(5): 398-403.
- [9] 张占薪, 罗大虎, 崔金全. has-miRNA-200b 在宫颈癌中的表达及意义 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(5): 386-387.
- [10] GONZÁLEZ-QUINTANAV, PALMA-BERRÉ L, CAMPOS-PARRA AD, et al. MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review) [J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 3-12.
- [11] XIA H, NG S S, JIANG S, et al. miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNBN1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 535-541.
- [12] WU Q, GUO R, LIN M, et al. MicroRNA-200a inhibits CD133/1+ ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2 [J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(1): 149-154.
- [13] YEUNG C L A, TSANG T Y, YAU P L, et al. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway [J]. Oncogene, 2011, 30(21): 2401-2410.
- [14] CAO Q, LU K L, DAI S P, et al. Clinicopathological and prognostic implications of the miR-200 family in patients with epithelial ovarian cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 2392-2401.
- [15] XU F, HE H, HUANG W, et al. Decreased expression of MiRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis [J]. Clin Transl Oncol, 2015, 25(2): 32-39.
- [16] DA SILVA C L, BROHEM C A, CORRÉA T C, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence [J]. Biochem Cell Biol, 2006, 84(5): 713-739.