

· 论 著 ·

## 人乳头瘤病毒基因分型及其与宫颈细胞学异常相关性研究

何进才, 李 瑞, 周 丹, 黄 涛, 邵牧民

(广州中医药大学深圳附属医院/深圳市中医院, 广东深圳 518033)

**摘要:**目的 了解人乳头瘤病毒(HPV)感染状况及其型别,探讨 HPV 及其不同型别感染与年龄和宫颈病变的相关性,评价聚合酶链反应(PCR)-反向点杂交法检测 HPV 的方法学性能和临床诊断性能。**方法** 采用 PCR-反向点杂交法对 2009 年 6 月至 2010 年 9 月在该院就诊或健康检查的 2 994 例女性宫颈脱落细胞标本进行 HPV DNA 及其基因分型检测,其中 131 例进行 HPV DNA 序列测定,1 511 例同步进行 HPV 基因分型和液基薄层细胞(TCT)检测。**结果** 2 994 例受检女性 HPV 感染率为 25.1%,排名前 5 位的 HPV 型别分别为 HPV52(15.6%)、16(14.1%)、58(12.0%)、56(6.6%)和 33(5.2%)。25 岁以下女性 HPV16、58 感染率最高;HPV52 感染率在 55 岁以上女性最高,25 岁以下女性次之;高危型 HPV 在非典型鳞状细胞(ASCUS)、低度鳞状上皮内病变(LSIL)及高度鳞状上皮内病变(HSIL)中感染率分别为 44.2%、91.7%和 93.3%;HPV58、16、56 和 31 与宫颈病变程度相关(回归系数分别为 0.493、1.744、-0.819 和 1.566),HPV52 则无明显相关性;分别以测序法和 TCT 结果大于或等于 LSIL 作为金标准,PCR-反向点杂交法检测 HPV 及其对宫颈病变诊断的敏感度、特异度和准确度分别为 96.4%和 92.2%、93.4%和 84.2%、94.7%和 84.5%。**结论** 女性感染 HPV 比例较高,年轻女性更易受感染,感染型别以 HPV 52、16、58、56 和 33 为主,HPV 感染与宫颈病变程度高度相关,PCR-反向点杂交法检测 HPV 在方法学性能和对宫颈病变的临床诊断性能上均能满足要求。

**关键词:**人乳头瘤病毒;基因分型;宫颈细胞学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)33-3331-04

**Studies on genotyping for human papillomavirus and its association with cervical cytology abnormality**

He Jincan, Li Rui, Zhou Dan, Huang Tao, Shao Mumin

(Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine/Shenzhen Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

**Abstract: Objective** To study the prevalence of human papillomavirus(HPV) infection and distribution of genotypes. Discuss association of infection of HPV and HPV genotypes with age and cervical lesions. Assessment the methodology performance and clinical diagnostic performance of PCR-Reverse Dot Blot(PCR-RDB). **Methods** Detect HPV DNA and its genotypes of cervical cytological specimens with PCR-RDB. The subjects were 2 994 women from outpatients and the health physical examination individuals during June 2009 to September 2010 in our hospital. In 2 994 cases, including 131 cases for DNA sequencing, 1 511 cases for detection of HPV genotypes and TCT synchronously. **Results** HPV infection rates in 2 994 females were 25.1%. The first fifth HPV genotypes infection were HPV52 (15.6%), 16(14.1%), 58(12.0%), 56(6.6%) and 33(5.2%). The highest HPV infection was the group of females aged below 25, HPV16 and HPV58 included. The women who infect HPV52 most were the group aged above 55, the group aged below 25 was next. The positive rates of HR-HPV were 44.2% in ASCUS, 91.7% in LSIL, and 93.3% in HSIL, respectively, the genotypes of HPV58, 16, 56 and 31 had correlations with the degree of cervical lesions(The regression coefficients were 0.493, 1.744, -0.819 and 1.566, respectively). HPV52 was not significant correlation with the degree of cervical lesions. With sequencing and the result of TCT  $\geq$  LSIL as gold standard, for PCR-RDB in HPV and diagnosis of cervical lesions, the sensitivity, specificity, accuracy were 96.4% and 92.2%, 93.4% and 84.2%, 94.7% and 84.5%, respectively. **Conclusion** The proportion of HPV infection in female is quite high and young women are more susceptible to infections. The major pathogenic types are HPV52, 16, 58, 56 and 33. HPV infection is highly correlated with cervical lesions level. Detecting HPV with PCR-RDB can fully satisfy the need of clinical testing on the methodology performance and clinical diagnostic performance in diagnosing cervical lesions.

**Key words:** human papillomavirus; genotyping; cervical cytology

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)在自然界广泛存在,是一类具有高度组织和宿主特异性的嗜上皮病毒,可致人类皮肤和黏膜异常增生,引起宿主组织疣状病变及乳头状瘤病变。HPV 具有多种型别,不同型别感染对宫颈上皮的致病力也不同,众多研究已经证实高危型 HPV 持续感染是宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasm, CIN)和宫颈癌的主要病因。随着 HPV 与宫颈癌病因关系的明确,HPV DNA 及其基因分型检测越来越受到重视。2006 年欧洲生殖道感染和肿瘤组织(EUROGIN)提出的宫颈癌筛查方案指出,优先推荐 HPV 基因检测作为宫颈癌筛查的首选方

法;2009 年美国阴道镜和宫颈病理学会(ASCCP)发布的《宫颈癌筛查异常妇女处理共识指南》明确指出,30 岁以上的妇女应进行 HPV 基因分型检测<sup>[1]</sup>。本研究采用聚合酶链反应(PCR)-反向点杂交法对 2 994 例女性宫颈脱落细胞标本进行 HPV DNA 及其分型检测,对其中部分病例按照盲法、平行和随机原则进行 HPV DNA 序列测定和(或)液基薄层细胞学(thin prep cytology test, TCT)检测,旨在探讨 HPV 感染状况、型别分布及其与宫颈细胞学异常和年龄的关系,并评价 PCR-反向点杂交法检测 HPV 的方法学性能及其对宫颈病变的临床诊断性能。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究对象为 2009 年 6 月至 2010 年 9 月在本院就诊或健康检查的女性,共 2 994 例,年龄 15~83 岁(其中 278 例年龄不详),分为 15~25、>25~35、>35~45、>45~55、>55~83 岁 5 个年龄组,各组例数分别为 301、1 007、877、385、146 例。

**1.2 主要仪器和试剂** 美国 MJ Research PTC-200 PCR 仪,韩国 FINEPCR 公司 Combi-H12 分子杂交仪,美国 ABI PRISM 3100 DNA 测序仪,美国 TriPath-AutoCyte PREP 制片和染片系统,亚能生物技术(深圳)有限公司 HPV 基因分型检测试剂盒。

**1.3 研究方法** 采用 PCR-反向点杂交法对 2 994 例女性子宫颈脱落细胞标本进行 HPV DNA 及其分型检测,对其中 131 例(HPV 阳性者 58 例,HPV 阴性者 73 例)进行 HPV DNA 序列测定,1 511 例同步进行 HPV 和 TCT 检测。

**1.3.1 HPV DNA 及其分型检测** 用子宫颈脱落细胞采样刷按要求采集子宫颈脱落细胞,置细胞保存液中-20℃以下保存,10 d 内检测。HPV DNA 提取(常规碱裂解法)、PCR 扩增、扩增产物分型检测和结果判读等按试剂盒说明书进行。根据方法学设计,可检出 23 种 HPV 型别,包括 5 种低危型别(HPV6、11、42、43 和 44)和 18 种高危型别(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83 和 MM4)。

**1.3.2 HPV DNA 序列测定** HPV DNA 序列测定由上海英俊公司完成。用 HPV 型别特异性引物或国际通用的 HPV 引物 MY(序列为上游引物 MY9:5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3',下游引物 MY11:5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3')扩增后再进行序列测定<sup>[2]</sup>。对于检测结果为阳性的标本采用检测到的型别相应的特异性引物扩增和序列测定进行验证。对于检测结果为阴性的标本采用国际通用的 HPV 引物 MY 扩增后进行验证,扩增无产物者判定为阴性;扩增获得产物者再用序列测定法证实,测序不能成功获得预期结果者也判定为阴性。

**1.3.3 TCT 检测** TCT 检测由本院病理科完成。细胞学诊断采用 TBS 分类法,即正常范围(within normal limits, WNL);不明意义的非典型鳞状细胞(atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS);低度鳞状上皮内病变(low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL),相当于鳞状上皮轻度非典型增生 CIN I;高度鳞状上皮内病变(high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL),分为鳞状上皮中度非典型增生 CIN II、鳞状上皮重度非典型增生 CIN III 和原位鳞状细胞癌(SCC)<sup>[3]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。配对计数资料和列联表(R×C)资料用  $\chi^2$  检验,两变量之间的相关性采用 Spearman 相关分析,成组计数资料的相关性分析用非条件二分类 logistic 回归,一致性评价用 Kappa 值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HPV DNA 及其分型检测结果扫描图谱** 单一型别感染(HPV16)的 HPV 基因分型检测结果扫描图谱见图 1,多种型别混合感染(HPV6、16 和 59)的 HPV 基因分型检测结果扫描图谱见图 2。

**2.2 HPV 感染及其型别分布** 2 994 例女性中检出 HPV 阳性 750 例,感染率为 25.1%。受感染者中高危型 HPV 阳性 667 例,占 88.9%;低危型 HPV 阳性 151 例,占 20.1%。除 HPV44 和 MM4 外,其余 21 种 HPV 型别均被检出,其中单一

型别感染检出率为 72.7%(545/750),两种及以上型别混合感染检出率为 27.3%(205/750),检出率排名前 5 位的型别依次是 HPV52、16、58、56 和 33,所占比例分别为 15.6%、14.1%、12.0%、6.6% 和 5.2%,见图 3。



PC:阳性质控。

图 1 HPV 16 感染的基因芯片扫描图谱



PC:阳性质控。

图 2 HPV6、HPV 16 和 HPV 59 混合感染的基因芯片扫描图谱

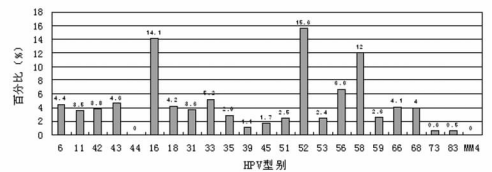


图 3 HPV 感染型别分布

**2.3 HPV 感染与年龄的关系** 750 例 HPV 感染者中有年龄记录者 692 例(58 例年龄不详),其 HPV 感染率在各年龄组(由小至大)分别为 34.2%、24.0%、24.1%、25.7%、25.3%。感染率排名前 3 位的 HPV 型别(依次为 HPV52、16 和 58)在各年龄组中所占的比例分别为 HPV52(8.3%、6.0%、5.4%、6.8% 和 8.9%)、16(9.0%、5.2%、5.0%、6.0% 和 5.5%)、58(7.0%、4.5%、4.4%、4.9% 和 4.8%)。

**2.4 HPV 感染与宫颈病变程度的关系** 在 250 例 TCT 检出子宫颈病变的女性中,HPV 感染率为 55.6%(139/250),其在 ASCUS、LSIL 和 HSIL 中感染率分别为 46.2%、91.7% 和 93.3%;而高危型 HPV 在子宫颈病变女性中感染率为 54.0%(135/250),其在 ASCUS、LSIL 和 HSIL 中的感染率分别为 44.2%、91.7% 和 93.3%。HPV 和高危型 HPV 感染率均随子宫颈病变级别递增而升高,差异有统计学意义( $\chi^2$  分别为 34.697 和 37.565,  $P < 0.05$ ),见表 1。将子宫颈鳞状上皮内病变划分为 LSIL 和 HSIL 两种程度,用非条件二分类 logistic 回归分析 LSIL 和 HSIL 患者中感染率排名前 5 位的 HPV 型别(HPV58、16、56、52 和 31)与子宫颈病变程度的关系。结果显示:HPV58、16 和 31 与子宫颈病变程度呈正相关[回归系数分别为 0.493、1.744 和 1.566,比值比(OR)分别为 1.637、5.719 和 4.788,95% CI 分别为 0.329~8.149、1.131~28.910 和 0.549~41.751],HPV56 与子宫颈病变程度呈负相关(回归系数为-0.819,OR 值为 0.441,95% CI 为 0.041~4.763),HPV52 与子宫颈病变程度无明显相关性( $P > 0.05$ )。

表 1 HPV 感染与子宫颈病变程度的关系[n(%)]

HPV 类型	ASCUS (n=199)	LSIL (n=36)	HSIL (n=15)	合计 (n=250)
HPV	92(46.2)	33(91.7)	14(93.3)	139(55.6)
高危型 HPV	88(44.2)	33(91.7)	14(93.3)	135(54.0)

**2.5 HPV 基因分型与序列测定法比较** 以序列测定法为金标准,对 PCR-反向点杂交法检测 HPV DNA 及其基因分型进行方法学性能评价,HPV 型别检测符合性比较见表 2,敏感度

为 96.97%、特异度为 89.87%、准确度为 93.10%、阳性预测值为 88.89%、阴性预测值为 97.26%、OR 为 284.0、约登指数为 0.87、阳性似然比为 9.57、阴性似然比为 0.03;HPV 病例检测符合性比较见表 3,上述各指标值分别为 96.36%、93.42%、94.66%、91.38%、97.26%、376.3、0.90、14.64 和 0.039。

表 2 PCR-反向点杂交法与序列测定法检测 HPV 型别符合性比较 (n)

PCR-反向点杂交法	序列测定法		合计
	+	-	
+	64	8	72
-	2	71	73
合计	66	79	145

$\chi^2 = 108.481, P < 0.05, Kappa = 0.862。$

表 3 PCR-反向点杂交法与序列测定法检测 HPV 病例数符合性比较 (n)

PCR-反向点杂交法	序列测定法		合计
	+	-	
+	53	5	58
-	2	71	73
合计	55	76	131

$\chi^2 = 104.2561, P < 0.05, Kappa = 0.891。$

2.6 HPV 基因分型对子宫颈病变临床诊断性能的评价 从 TCT 检测结果 ( $\geq$ LISL 为阳性,  $<$ LISL 为阴性)为金标准,PCR-反向点杂交法检测 HPV(高危型)对子宫颈病变临床诊断的敏感度为 92.2%、特异度为 84.2%、准确度为 84.5%、阳性预测值为 17.0%、阴性预测值为 99.7%、OR 为 62.8、约登指数为 0.764、阳性似然比为 5.835、阴性似然比为 0.093,见表 4。

表 4 HPV 基因分型对子宫颈病变临床诊断性能的评价 (n)

高危型 HPV	子宫颈病变		合计
	+	-	
+	47	230	277
-	4	1230	1234
合计	51	1460	1511

$\chi^2 = 192.140, P < 0.05, Kappa = 0.243。$

3 讨 论

HPV 是一类在自然界广泛存在的 DNA 病毒。人类感染 HPV 十分普遍,感染率也很高。由于各国、各地区人们的生活习俗、卫生状况、检测水平和检测方法等的差异,文献报道的 HPV 感染率和基因型别分布存在明显的地区差异,但目前普遍认为的最常见感染型别为 HPV16,在国际癌症研究协会(IARC)最新报道的包括全球 25 个国家的 3 607 例子宫颈癌患者的多中心研究中 HPV16 在所有 HPV 阳性的子宫颈癌患者的平均感染率为 57.4%<sup>[4]</sup>。本研究采用 PCR-反向点杂交技术对 2 994 例标本进行 HPV 基因分型,结果显示,HPV 总感染率为 25.1%,与国内相关文献报道结果基本一致<sup>[5]</sup>。在 23 种 HPV 型别中共检出 21 种,其中 HPV52 是感染率最高的型别,而 HPV16 和 HPV58 位居第 2、3 位,这与国内外大多数报道有所不同<sup>[6-7]</sup>,其原因可能与研究对象及其病变程度、检测方法等不同有关,确切原因尚需进一步研究。此外,本研究未能检出 HPV44 和 MM4,可能与这两种型别在人群中感染率较低和所用试剂敏感度限制等有关。

在 1 511 例盲法、平行进行 HPV 基因分型和 TCT 检查的

女性中,检出 250 例子宫颈病变患者 ( $\geq$ ASCUS),其 HPV 感染率为 55.6%,在不同病变程度(ASCUS、LSIL 和 HSIL,下同)中感染率依次为 46.2%、91.7%、93.3%;高危型 HPV 总感染率为 54.0%,在不同病变程度中感染率依次为 44.2%、91.7%、93.3%,表明 HPV 和高危型 HPV 感染率均随子宫颈病变级别递增而明显增加,与文献报道相似<sup>[8]</sup>,从而进一步论证了 HPV 感染与子宫颈病变级别高度相关。对 HPV58、16、56、52 和 31 与子宫颈病变程度的关系用 logistic 回归分析表明,HPV52 与子宫颈病变程度无明显相关性,HPV56 与子宫颈病变程度呈负相关,HPV58、16 和 31 与子宫颈病变程度呈正相关,OR 值分别为 1.637、5.719 和 4.788,提示 HPV16 是发生子宫颈高度鳞状上皮内病变风险性最高的型别,HPV31 次之,这与目前医学界认为 HPV16 是导致子宫颈鳞癌的主要原因的结论高度一致<sup>[9]</sup>,不过由于国内外人群感染 HPV 型别存在明显的地域差异等原因,本研究 OR 值排在第 2 位的是 HPV31,而不是 HPV18。此外,毕蕙等<sup>[10]</sup>研究发现 HPV16、33、52 和 59 与病变程度相关,其中 HPV16 和 HPV33 与病变程度呈正相关,HPV52 和 HPV59 与病变程度呈负相关。这种差异可能与研究对象和所用金标准不同等有关。

年龄是 HPV 感染和子宫颈癌发生的相关因素。HPV 感染可发生于各年龄组,从刚出生的婴儿到 80 岁以上老年人均有报道,并具有明显的年龄分布特点,有研究表明年轻妇女更易感染高危型 HPV,进而发展为子宫颈癌,且预后较差<sup>[11]</sup>。因研究对象所在地域不同、病变程度不同、检测方法不同等原因,文献报道的 HPV 感染与年龄的关系也不尽相同。Hrubec 等<sup>[12]</sup>调查了 439 例年龄 18~50 岁性活跃妇女 HPV 感染率,结果显示,HPV 感染率在 25 岁以下者高达 36.0%,而在 45 岁以上者只有 2.8%。Datta 等<sup>[13]</sup>对美国 6 个城市 26 所诊所的 9 657 例病例进行研究的结果显示。高危型 HPV 感染率为 23%,且随年龄增大而下降,14~19 岁为 35%,50~65 岁为 6%。也有文献报道 HPV 感染高峰在 30~34 岁年龄组,50 岁以上明显下降<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,HPV 及 HPV16、58 型感染率均在 25 岁以下年轻性活跃女性中最高,且明显高于其他 4 个年龄组,而在这 4 个年龄组中感染率无明显差别,与文献报道结果一致<sup>[15-16]</sup>;而 HPV52 感染率则呈现明显“V”字形,  $>$ 55~83 岁年龄组最高,15~25 岁年龄组次之,  $>$ 35~45 岁年龄组最低,故 HPV52 可能是绝经后妇女和年轻性活跃女性的易感型别。

PCR-反向点杂交法根据 HPV 基因特点设计特异引物,扩增出包含 23 种 HPV 基因型的目标片段,再将扩增产物与固定在膜条上的探针进行杂交,根据杂交信号的有无判断是否有这些 HPV 基因型别存在。此法具有高通量性和高特异性,可同时检测多种 HPV 型别并进行基因分型。本研究以序列测定法为金标准,对其进行方法学性能评价,结果表明,两种方法检测 HPV 结果具有良好一致性,PCR-反向点杂交法检测 HPV 的敏感度、特异度和准确度均在 90% 以上,完全能够满足临床实验室检测 HPV DNA 及其基因分型的技术要求。以 TCT 检测结果 ( $\geq$ LISL 为阳性,  $<$ LISL 为阴性)为金标准,PCR-反向点杂交法检测高危型 HPV 对子宫颈病变的阴性预测值高达 99.7%,充分说明此法非常适合用于 CIN 和子宫颈癌等子宫颈病变的筛查。

参考文献:

[1] 李瑞,周丹,何进才.人乳头瘤病毒核酸检测方法进展[J].实验与检验医学,2010,28(6):601-603.

- [2] 何进才,周小梅,黄涛,等.反向杂交法检测 23 种人乳头瘤病毒型别的研究[J].中华检验医学杂志,2007,30(1):44-47.
- [3] 刘树范.浅析巴氏五级分类法与 TBS 描述性诊断报告方式[J].中国实用妇科与产科杂志,2003,19(3):135-137.
- [4] Munoz N,Bosch FX,Castellsague X,et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective[J]. Int J Cancer, 2004,111(2):278-285.
- [5] 汤福想,刘玉玲,王会娟.妇女宫颈 HPV 感染及基因亚型分布[J].实用预防医学,2010,17(9):1717-1719.
- [6] 赵健,杨英捷,廖泰平. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒感染分型检测中的临床应用[J].中华检验医学杂志,2006,12(12):1148-1151.
- [7] An HJ,Cho NH,Lee SY,et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus(HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method[J]. Cancer,2003,97(7):1672-1680.
- [8] 朱一剑,丁显平,周仲春,等. 妇科疾病中人乳头瘤病毒感染的分子流行病学调查[J].中国妇幼保健,2007,22(19):2691-2694.
- [9] 关婷,张志文,谢燕芳,等. 人乳头瘤病毒基因型与宫颈上皮内瘤样病变的关系[J].中国妇幼保健,2006,21(7):960-963.
- [10] 毕蕙,赵健,陈锐,等. 人乳头瘤病毒感染亚型与宫颈上皮内瘤变的相关性[J].中国实用妇科与产科杂志,2010,26(5):362-364.
- [11] Lobaton AT,Herrera GR,Rojo AT,et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors[J]. Gynecol Obstet Mex,2004,72:466-474.
- [12] Hrubec KK,Mrad K,Sriha B,et al. HPV types and variants among cervical cancer tumors in three regions of tunisia[J]. J Med Virol,2011,83(4):651-657.
- [13] Datta SD,Koutsky LA,Ratelle S,et al. Human papillomavirus infection and cervical cytology in women screened for cervical cancer in the United States,2003—2005[J]. Ann Intern Med,2008,148:493-500.
- [14] 孟晓峰,刘琳. 河南洛阳地区女性人乳头瘤病毒感染与年龄相关分析[J].中国误诊学杂志,2011,11(12):2880-2881.
- [15] 徐虹,张巨香,施晓华,等. 乐清地区妇女宫颈 HPV 感染及亚型分布调查研究[J].中国现代医生,2009,47(15):17-19.
- [16] Bao YP,Ni L,Smith JS,et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia;a meta analysis[J]. Int J Gynecol Cancer,2008,18(1):71-79.

(收稿日期:2011-08-24 修回日期:2011-09-22)

(上接第 3330 页)

#### 参考文献:

- [1] Mueller CF,Laude K,McNally JS,et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005,25(2):274-278.
- [2] Levonen AL,Vahakangas E,Koponen JK,et al. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease:current status and future perspectives [J]. Circulation, 2008, 117(16):2142-2150.
- [3] Nguyen T,Nioi P,Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. J Biol Chem,2009,284(20):13291-13295.
- [4] Horiuchi S,Araki N,Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction[J]. J Biol Chem,1991,266(12):7329-7332.
- [5] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial[J]. Lancet,2002,360(9326):23-33.
- [6] Yusuf S,Dagenais G,Pogue J,et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators [J]. N Engl J Med,2000,342(3):154-160.
- [7] Scheen AJ. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular diseases. 2nd part:results of clinical trials[J]. Rev Med Liege,2000,55(2):105-109.
- [8] Jialal I,Devaraj S,Vitamin E. Supplementation and cardiovascular events in high-risk patients[J]. N Engl J Med, 2000,342(25):1917-1918.
- [9] Meydani M. Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients[J]. Nutr Rev,2000,58(9):278-281.
- [10] Dworakowski R,Alom-Ruiz SP,Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype[J]. Pharmacol Rep,2008,60(1):21-28.
- [11] Abid MR,Spokes KC,Shih SC,et al. NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2007, 282(48):35373-35385.
- [12] Ahmed FN,Naqvi FN,Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Ann N Y Acad Sci,2006,1084:481-489.
- [13] Ding H,Aljofan M,Triggle CR. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells[J]. J Cell Physiol,2007,212(3):682-689.
- [14] Su J,Lucchesi PA,Gonzalez-Villalobos RA,et al. Role of advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2008,28(8):1432-1438.
- [15] Hink U,Li H,Mollnau H,et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2001,88(2):e14-22.

(收稿日期:2011-08-24 修回日期:2011-09-22)