

·系统综述/Meta分析·

HPV16 长控制区甲基化与宫颈上皮内瘤变 2 级及以上病变关系的 Meta 分析

郭翀宇 王金桃 冉朝霞 巩璐 朱京京 李德铖 丁玲

山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室,太原 030001

通信作者:丁玲,Email: dingling79@163.com

【摘要】目的 系统评价和分析人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)长控制区(LCR)甲基化与宫颈上皮内瘤变 2 级及以上病变(CIN2+)之间的相关性。**方法** 计算机系统检索 PubMed、Embase、Cochrane Library、Web of Science、中国知网、万方数据知识服务平台、维普数据库等,检索国内外公开发表的中英文文献,按纳入排除标准筛选文献,检索年限为建库至 2022 年 2 月 27 日。采用 RevMan 5.3 和 Stata 15.1 软件进行统计学分析。**结果** 最终纳入 17 篇文献,研究对象共 1 421 例。Meta 分析结果显示,HPV16 LCR 甲基化与 CIN2+ 关系的合并效应 *OR* 值为 1.56(95%*CI*: 0.70~3.47)。亚组分析结果显示,5' 端、增强子区和启动子区甲基化与 CIN2+ 均未显示相关性;4 个 E2 结合位点(E2BS)中,E2BS1、E2BS3 和 E2BS4 甲基化增加 CIN2+ 的发生风险,*OR* 值分别为 3.92(95%*CI*: 1.92~7.99)、10.50(95%*CI*: 3.67~30.04)和 3.65(95%*CI*: 1.58~8.41),由于文献篇数限制,未对 E2BS2 进行亚组分析;在不同地区人群来源中,中国人群 CIN2+ 的发生风险与 HPV16 LCR 甲基化具有相关性,*OR* 值为 2.14(95%*CI*: 1.31~3.50);对 HPV16 LCR 进行焦磷酸测序的人群 CIN2+ 的发生风险与 HPV16 LCR 甲基化具有相关性,*OR* 值为 1.75(95%*CI*: 1.03~2.98)。**结论** CIN2+ 的发生风险与 HPV16 LCR E2BS 的甲基化存在相关性。

【关键词】 人乳头瘤病毒; DNA 甲基化; 宫颈上皮内瘤变; Meta 分析

基金项目: 国家自然科学基金(81703313, 81872705); 山西省自然科学研究面上项目(202103021224354)

The correlation between methylation in HPV16 long control region and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or more: a Meta-analysis

Guo Chongyu, Wang Jintao, Ran Zhaoxia, Gong Lu, Zhu Jingjing, Li Decheng, Ding Ling

Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Ding Ling, Email: dingling79@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between methylation in human papillomavirus 16 (HPV16) long control region (LCR) and cervical intraepithelial neoplasia grade ≥ 2 (CIN2+). **Methods** The literature retrieval was conducted by using the databases of PubMed, Embase, Cochrane Library, Web of Science, CNKI, Wanfang data and Weipu according to the inclusion and exclusion criteria, and the retrieval period was from the establishment of the databases to February 27th, 2022. Software RevMan 5.3 and Stata 15.1 were used for Meta-analysis. **Results** A total of 17 literatures were included involving 1 421 subjects. Results of Meta-analysis showed that *OR* of the correlation between methylation of HPV16 LCR and CIN2+ was 1.56 (95%*CI*: 0.70-3.47). Subgroup analysis showed that methylation of the 5' terminal, enhancer and promoter regions were not associated with CIN2+, while in four E2 binding sites (E2BS), the methylation of E2BS1, E2BS3 and E2BS4 increased the risk of CIN2+, with the *ORs* of 3.92 (95%*CI*: 1.92-7.99), 10.50 (95%*CI*:

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220307-00172

收稿日期 2022-03-07 本文编辑 万玉立

引用格式:郭翀宇,王金桃,冉朝霞,等. HPV16 长控制区甲基化与宫颈上皮内瘤变 2 级及以上病变关系的 Meta 分析[J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(11): 1821-1827. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220307-00172.

Guo CY, Wang JT, Ran ZX, et al. The correlation between methylation in HPV16 long control region and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or more: a Meta-analysis[J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(11): 1821-1827. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220307-00172.



3.67-30.04) and 3.65 (95%CI: 1.58-8.41), respectively. However, subgroup analysis on E2BS2 was not performed due to the limitation of the number of literatures. According to the different sources of population, the risk of CIN2+ in Chinese population was associated with methylation of HPV16 LCR ($OR=2.14$, 95%CI: 1.31-3.50). There was a correlation between the risk of CIN2+ and HPV16 LCR methylation in the population with pyrosequencing of HPV16 LCR, and OR was 1.75 (95%CI: 1.03-2.98). **Conclusion** The risk of CIN2+ is correlated with the methylation of E2BS in HPV16 LCR, which can be used as potential biomarkers.

【Key words】 Human papillomavirus; DNA methylation; Cervical intraepithelial neoplasia; Meta-analysis

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81703313, 81872705); Natural Science Research Project of Shanxi Province (202103021224354)

2020 年全球癌症统计数据显示,宫颈癌是世界上第四大女性癌症,发病率在中国女性癌症中排第六位,死亡率位列第七位^[1],严重威胁着女性的身心健康。高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌及癌前病变的主要致病因素^[2],其中,16 型是主要致癌型别,在宫颈癌患者中检出率超过 60%^[3]。HPV16 是一种感染上皮细胞的 DNA 病毒,包含早期编码区(E 区,包含 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 基因)、晚期编码区(L 区,包含 L1 和 L2 基因)和长控制区(LCR)^[4]。早期基因 E2、E6 和 E7 在 HPV 致癌过程中起着至关重要的作用,其中,E2 调控关键致癌基因 E6 和 E7 的转录,从而影响宫颈癌的发生发展^[5]。晚期基因编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2,参与病毒颗粒的组装,在病毒感染过程中发挥重要作用^[4]。LCR 是非编码区,对 HPV 基因复制和表达发挥调控作用,包含 5'端、增强子区和启动子区 3 个功能独立的片段,其中所含 4 个 E2 结合位点(E2BS)可与 E2 进行结合并保证 E2 正常发挥功能^[6]。DNA 甲基化作为表观遗传学的主要分子机制,对癌症的发生发展起重要作用^[7]。目前,关于 HPV16 LCR 甲基化与宫颈癌及癌前病变的相关研究较多,但由于宫颈病变病理分期、生物样本类型、人群来源、甲基化检测方法等的不同,研究结果存在差异^[8-9]。宫颈上皮内瘤变 1 级(CIN1)反转率约为 60%,大多数患者无需治疗即可自愈,而宫颈上皮内瘤变 2 级(CIN2)属于高度宫颈癌前病变,发生癌变的风险较高^[10],因此,CIN2 及以上病变(CIN2+)的发生机制值得深入和系统地探讨。本研究旨在分析 HPV16 LCR 甲基化与 CIN2+发病风险的关系,以为宫颈癌的发生机制提供进一步的科学依据。

资料与方法

1. 文献检索:检索英文数据库(PubMed、Web

of Science、Cochrane Library、Medline 及 Embase),以及中文数据库(中国知网、万方数据知识服务平台、中国生物医学文献数据库和维普数据库),检索期限均为自建库至 2022 年 2 月 27 日。英文检索词包括“HPV 16”“HPV-16”“Human papillomavirus 16”“LCR”“Long Control Region”“URR”“upstream regulatory region”“methylation”“DNA methylation”“Uterine Cervical Neoplasm”“Uterine Cervical Cancer”“Cervical Cancer”“Cervical Neoplasm”“Cancer of the Cervix”“Cervix Cancer”“Cervix Neoplasm”“Cervical Intraepithelial Neoplasia”,中文检索词包括“人乳头瘤病毒”“HPV16”“人乳头瘤病毒 16”“LCR”“长控制区”“长调控区”“上游控制区”“上游调控区”“甲基化”“DNA 甲基化”“宫颈癌”“宫颈肿瘤”“子宫颈癌”“宫颈上皮内瘤变”。此外,手动检索纳入文献的参考文献,尽可能查找全面。

2. 纳入与排除标准:纳入标准:①公开发表的 HPV16 LCR 甲基化与宫颈癌变发生发展关系的相关中英文文献;②研究对象为组织或细胞学确诊的正常及 HPV16 阳性(含单一和多重感染)人群;③研究类型为病例对照研究;④所纳入文献的病例组为 CIN2+病变的患者,对照组为宫颈上皮内瘤变 1 级及以下病变(<CIN2),包括无症状 HPV16 感染者和(或)CIN1 的患者;⑤能从原始文献中直接或间接获得发生甲基化的人数;对同一研究重复报道的文献选择数据最完整的文献。排除标准:①重复报道、资料不完整、数据不全的文献;②仅包含细胞系的研究;③可信度低的研究、个案报告、会议、综述和学位论文等。

3. 文献筛选与文献质量评价:由 2 名研究人员根据文献纳入排除标准对检索到的所有文献进行独立筛选,对于存在疑问不能确定的文献,经由 2 人讨论并向第三人咨询决定是否纳入。对于初筛纳入的文献通过纽卡斯尔-渥太华量表(NOS 量表)文献质量评价量表进行质量评估^[11],评估标准

包括研究人群的选择、组间可比性和暴露因素的测量。文献质量评分满分为 9 分, 0~3 分为低质量研究, 4~6 分为中等质量研究, ≥ 7 分为高质量研究, 本研究只纳入中高质量研究。

4. 资料提取: 提取文献资料中的相关数据, 数据提取内容包括文献的一般资料(如题目、第一作者、国家、杂志名称、发表时间)、标本类型、甲基化检测方法、病例组和对照组人数以及发生 HPV16 LCR 甲基化的人数。

5. 统计学分析: 采用 RevMan 5.3、Stata 15.1 软件对数据进行分析。对各研究进行 Q 检验估计异质性, 以 OR 值及其 95% CI 作为统计量分析 HPV16 LCR 的甲基化水平和 CIN2+ 患者之间的关系。若 $P > 0.10$ 且 $I^2 \leq 50\%$, 提示各研究结果同质性较好, 需采用固定效应模型, 否则采用随机效应模型。进行亚组分析寻找异质性来源; 进行漏斗图制作及 Egger's 检验来评估发表偏倚; 使用敏感性分析测量合并后结果的稳定程度, 观察单个研究对总体效应是否存在影响。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 文献筛选: 根据检索策略和纳入排除标准, 对中英文数据库进行全面检索, 并追溯研究中包含的参考文献, 共检索到 180 篇文献, 经过筛选后, 最终纳入 17 篇。筛选流程见图 1。

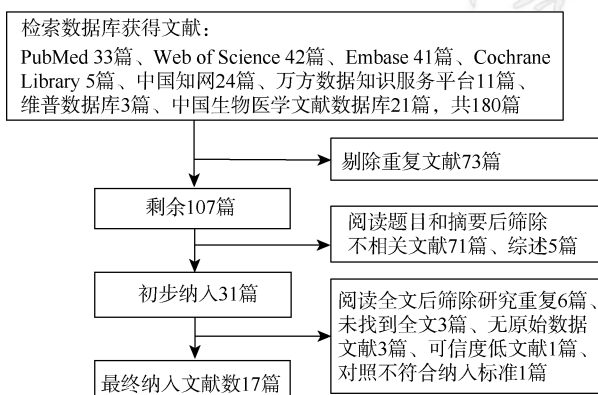


图 1 文献筛选流程

2. 文献的基本特征及质量评价: 纳入研究共 1 421 例研究对象, 发表年份为 2003–2019 年, 8 项研究人群来自中国^[6,12-18], 9 项研究人群来自其他国家^[5,7,19-25]。7 项研究采用了亚硫酸氢盐测序的方法^[5-6,13,22-25], 8 项研究采用了焦磷酸测序的方法^[7,12,14-18,20], 1 项研究采用了甲基化特异性 PCR

法^[19], 1 项研究采用了甲基化敏感限制性分析的方法^[21]。6 项研究样本类型为脱落细胞^[6-7,12,14,16,18], 11 项研究样本类型为宫颈组织^[5,13,15,17,19-25]。6 项研究探讨了 HPV16 LCR E2BS 的甲基化和宫颈癌变的关系^[5,12,14,17,19-20]。9 项研究探讨了 HPV16 LCR 5'端、增强子区和启动子区的甲基化和宫颈癌变的关系^[5-7,15-16,18,20,22,24]。对符合纳入排除标准的文献采用 NOS 量表对每篇文献的研究质量进行评估。经文献质量评价, 共纳入中等质量文献 12 篇、高质量文献 5 篇, 基本特征及文献质量评价见表 1。

3. Meta 分析结果:

(1) HPV16 LCR 甲基化与宫颈癌变的关系: 将 HPV16 LCR 甲基化作为有效结局指标, 共有 17 篇文献纳入研究, 研究对象共 1 421 例, 其中 CIN2+ 组 862 例, <CIN2 组 559 例。对所纳入文献进行异质性分析。见图 2。 $I^2 = 80\%$, 提示纳入的文献存在异质性, 采用随机效应模型进行分析, HPV16 LCR 甲基化在 CIN2+ 组和 <CIN2 组间 ($OR = 1.56$, 95% CI : 0.70~3.47, $P = 0.280$) 差异无统计学意义。

(2) 亚组分析: 为寻找异质性来源, 对 LCR 5'端、增强子区和启动子区 3 个分区进行了亚组分析。由于 5'端和启动子区 $I^2 > 50\%$, 故 3 个分区均采用随机效应模型, 结果显示, 5'端 ($OR = 2.07$, 95% CI : 0.76~5.65, $P = 0.160$)、增强子区 ($OR = 1.88$, 95% CI : 0.85~4.15, $P = 0.120$) 和启动子区 ($OR = 1.18$, 95% CI : 0.41~3.37, $P = 0.760$) 在 CIN2+ 组和 <CIN2 组间的差异均无统计学意义。见图 3。进一步对 LCR 内分布的 E2BS 进行亚组分析, 各亚组 $I^2 < 50\%$, 故采用固定效应模型, 结果显示, E2BS1 ($OR = 3.92$, 95% CI : 1.92~7.99, $P < 0.001$)、E2BS3 ($OR = 10.50$, 95% CI : 3.67~30.04, $P < 0.001$) 和 E2BS4 ($OR = 3.65$, 95% CI : 1.58~8.41, $P = 0.002$) 在 CIN2+ 组和 <CIN2 组间的差异均有统计学意义。见图 4。对人群来源进行亚组分析, 中国人群 CIN2+ 组的 HPV16 LCR 甲基化大于 <CIN2 组, 差异有统计学意义 ($P = 0.002$); 其他国家人群 CIN2+ 组和 <CIN2 组间甲基化差异无统计学意义 ($P = 0.730$)。按甲基化检测方法进行亚组分析, 采用亚硫酸氢盐测序方法的人群 CIN2+ 组和 <CIN2 组间甲基化差异无统计学意义 ($P = 0.640$); 采用焦磷酸测序方法的人群 CIN2+ 组的 HPV16 LCR 甲基化大于 <CIN2 组, 差异有统计学意义 ($P = 0.040$)。按样本类型进行亚组分析, 样本类型为脱落细胞的人群 CIN2+ 组和 <CIN2 组间甲基化差异无统计学意义 ($P = 0.160$); 样本类型为宫颈组

表 1 文献的基本特征及质量评价

第一作者及参考文献	发表年份	人群来源	样本例数(<CIN2/CIN2+)	样本类型	检测方法	文献质量评价
Badal ^[25]	2003	新加坡	38/43	脱落细胞/组织	亚硫酸氢盐测序	6
Bhattacharjee ^[5]	2006	印度	15/57	脱落细胞/组织	亚硫酸氢盐测序	7
Hong ^[15]	2008	中国	31/39	脱落细胞/组织	焦磷酸测序	6
Hublarova ^[21]	2009	新加坡	29/112	脱落细胞/组织	甲基化敏感限制性分析	6
Ding ^[13]	2009	中国	17/36	组织	亚硫酸氢盐测序	6
Xi ^[24]	2011	美国	117/94	脱落细胞/组织	亚硫酸氢盐测序	7
Snellenberg ^[19]	2012	荷兰	17/48	组织	甲基化特异性 PCR 法	6
Lorincz ^[7]	2013	英国	48/25	脱落细胞	焦磷酸测序	8
Jacquin ^[20]	2013	法国	44/42	组织	焦磷酸测序	7
胡元晶 ^[16]	2013	中国	30/30	脱落细胞	焦磷酸测序	6
Leung ^[17]	2014	中国	43/94	脱落细胞/组织	焦磷酸测序	6
Simanaviciene ^[22]	2015	立陶宛	39/118	组织	亚硫酸氢盐测序	5
Gašperov ^[23]	2015	克罗地亚	6/6	组织	亚硫酸氢盐测序	7
王微 ^[18]	2016	中国	10/10	脱落细胞	焦磷酸测序	5
Wang ^[6]	2017	中国	32/67	脱落细胞	亚硫酸氢盐测序	6
李肖甫 ^[14]	2018	中国	18/23	脱落细胞	焦磷酸测序	5
Zhang ^[12]	2019	中国	25/18	脱落细胞	焦磷酸测序	6

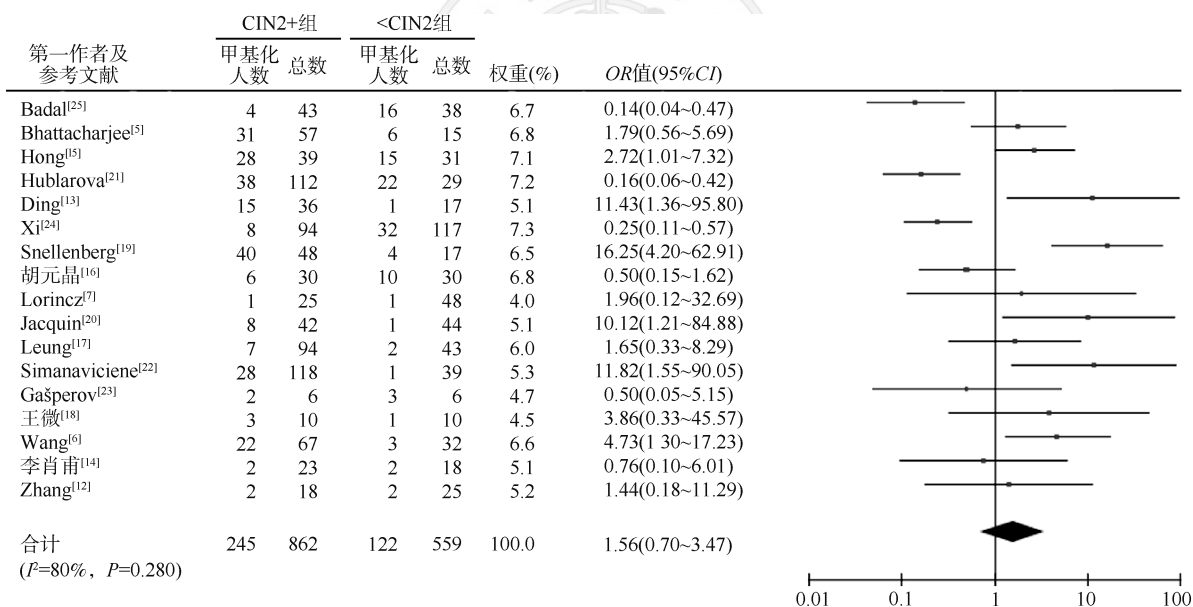


图 2 HPV16 长控制区甲基化与宫颈癌变关系的异质性分析

组织的人群 CIN2+组和<CIN2 组间甲基化差异无统计学意义($P=0.400$)。见表 2。

(3)发表偏倚评估:对所纳入研究进行发表偏倚的评估, Egger's 检验结果 $P=0.143$, 且漏斗图中代表纳入研究发表情况的散点基本对称, 表明各研究间无明显的发表偏倚。见图 5。

(4)敏感性分析:对所纳入研究进行敏感性分析, 未发现存在导致总体效应值明显波动的单个研究。见图 6。鉴于样本量对研究结果的影响, 分别去掉小样本原始研究(样本量<30 人^[18,23]或样本量<

50 人^[12,14,18,23])后再次进行敏感性分析, 仍未发现存在导致总体效应值明显波动的单个研究, 提示本次 Meta 分析稳健性较好。

讨 论

本研究纳入 17 篇文献, 探讨了 HPV16 LCR 甲基化与 CIN2+ 发生风险的相关性。LCR 的 3 个功能分区包含基因表达和 HPV 复制所需的序列基序, 其中启动子区可调节病毒癌基因的表达^[4]。Meta

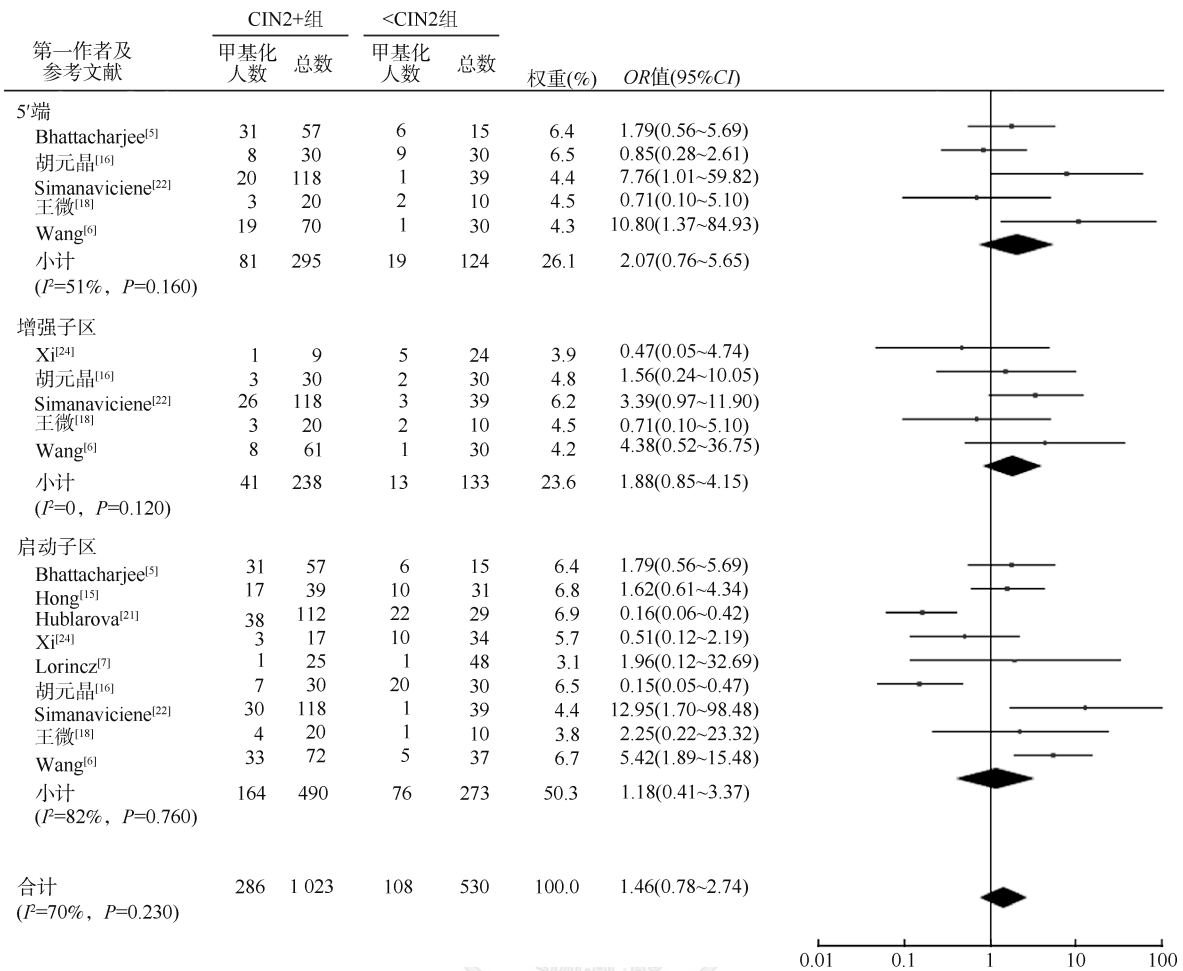


图3 HPV16长控制区甲基化与宫颈癌变相关性的异质性分析

分析结果显示,HPV16 LCR 甲基化与 CIN2+ 的发生风险未显示相关性。Bowden 等^[26]的 Meta 分析研究结果与本研究一致,本研究较之进一步纳入了中文文献和年份更近的英文文献,再次证实尚不能认为 HPV16 LCR 的甲基化程度与 CIN2+ 的发生风险有关。DNA 甲基化可能是 HPV 逃避宿主对外来细胞内因子免疫识别的一种方法,而病毒抵抗基因组的任何表观遗传变化可能是一种自然保护,所以只有少数胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)位点具有显著预测疾病的能力^[27]。进一步对位于 LCR 的 E2BS 进行了亚组分析,结果显示 E2BS 甲基化可增加 CIN2+ 的发生风险。E2BS 含有可能发生甲基化的 CpG 位点,其发生甲基化会影响 E2 与 E2BS 的结合,E2 不能正常发挥对关键病毒癌基因 E6 和 E7 的转录抑制功能,使得 E6 和 E7 转录增强,促进病毒的复制和转录^[28-29],最终导致癌变的发生^[30]。Cheung 等^[31]的研究发现,E2BS 在宫颈癌中的甲基化率高于低级别宫颈病变,与本研究结果一致。针对 E2BS2 甲基化的相关研究仅 2 篇,故未对其进行亚组分析。对人群来源进行的亚组分析结果显示,仅中国人群

CIN2+ 的发生风险与 HPV16 LCR 甲基化相关,可能是种族、生存环境和生活习惯等原因引起的^[32]。对甲基化检测方法进行的亚组分析结果显示,采用焦磷酸测序法进行检测的人群 CIN2+ 的发生风险可能与 HPV16 LCR 甲基化相关。焦磷酸测序可直接得到目的核酸片段的序列,对多个 CpG 位点的甲基化状态进行定量评估,更为准确地对具体位点进行定量检测,并且特异性高,是分子诊断的“金标准”^[9],而亚硫酸氢盐测序能直接检测分析基因组 DNA 的甲基化模式,可以检测到甲基化的程度并且明确甲基化的确切位置,但只能定性分析位点的甲基化情况,敏感性较低^[33]。

本研究采用 NOS 量表从研究人群的选择、组间可比性和暴露因素的测量 3 个方面入手进行文献质量评价,其中 5 项研究为高质量,其余 12 项为中等质量,多数研究的组间可比性评分较低,根据评分标准:①研究控制了最重要的混杂因素;②研究控制了任何其他混杂因素,判定所纳入研究是否在设计和分析阶段体现病例和对照的可比性。虽然总体评分受到组间可比性这一指标的影响,

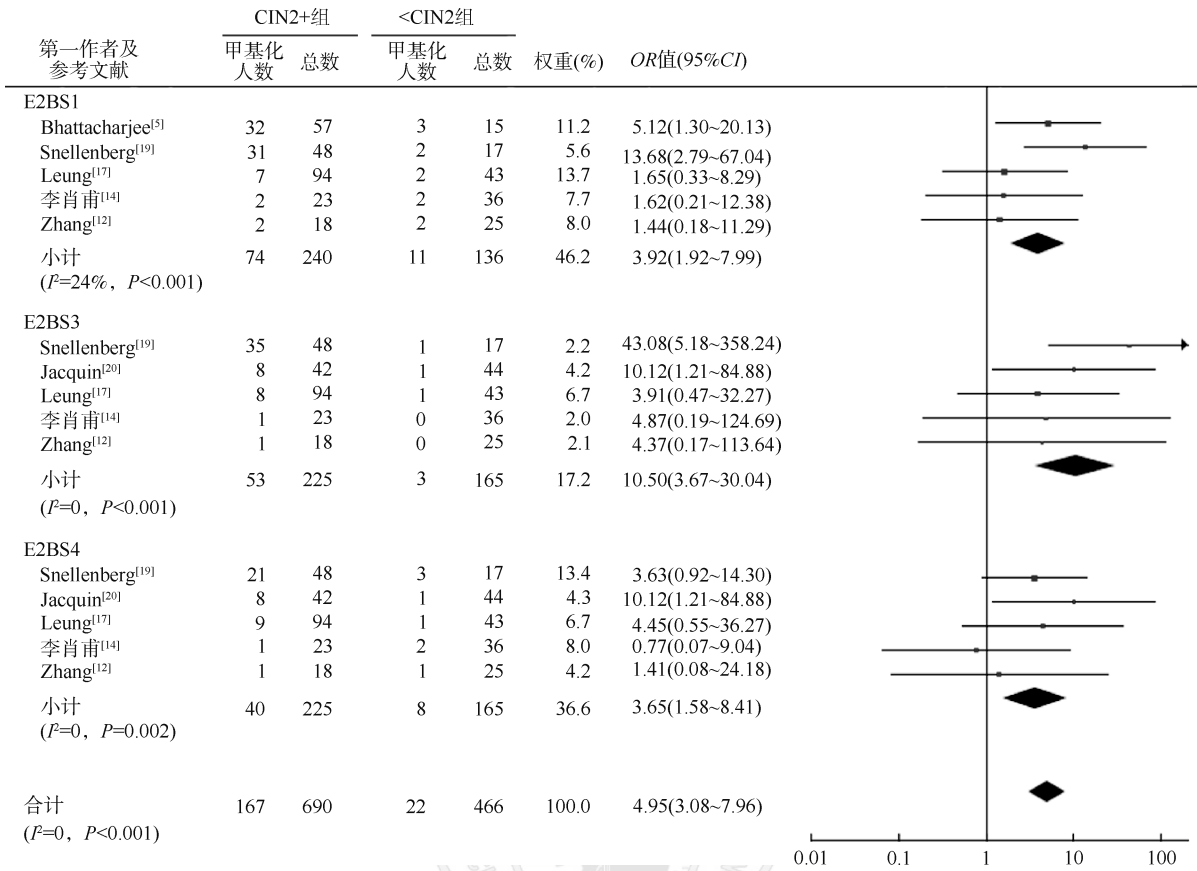


图4 HPV16长控制区E2结合位点甲基化与宫颈癌变相关性的异质性分析

表2 亚组分析结果

亚组	研究个数	样本例数	OR值(95%CI)	P值
人群来源				
中国	8	523	2.14(1.31~3.50)	0.002
其他国家	9	898	1.25(0.35~4.47)	0.730
检测方法				
亚硫酸氢盐测序	7	685	1.38(0.36~5.27)	0.640
焦磷酸测序	8	530	1.75(1.03~2.98)	0.040
样本类型				
脱落细胞	6	336	1.57(0.83~2.97)	0.160
宫颈组织	11	1085	1.59(0.54~4.69)	0.400

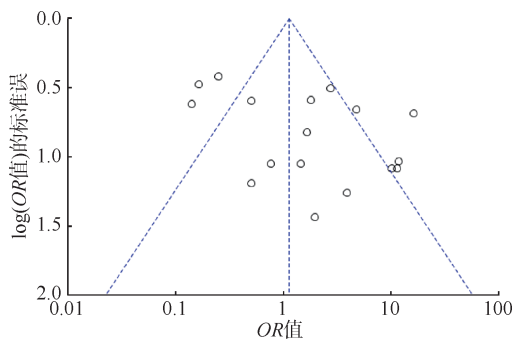


图5 17 篇文献的发表偏倚

12 项研究评分属于中等质量,但是评分接近中等质量的高线,而且其他指标分数很高,所以研究结果仍具有较高的可信度。

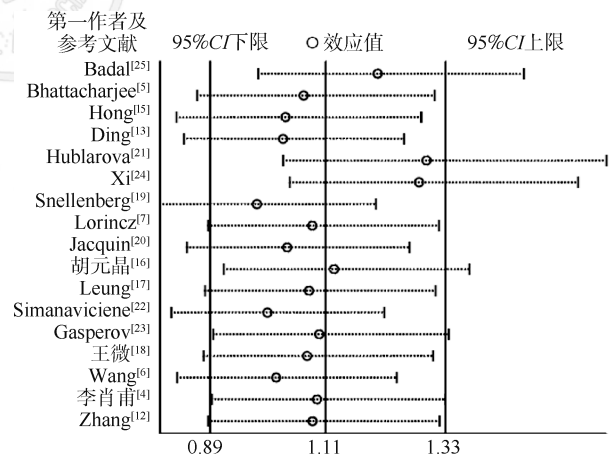


图6 纳入研究的敏感性分析

本研究存在局限性。本次纳入的研究限定为病例对照研究,可能存在一定的选择偏倚;且本研究纳入的研究均为中英文,未将其他语言的研究纳入分析,具有一定的片面性;再者,由于检索到的文献大多数呈现的是位点的甲基化率,数据多是间接计算得到,可能是本次 Meta 分析异质性较大的原因之一,本研究分析异质性来源仅限于 LCR 各分区、人群来源、检测方法和样本类型,可能还有其他因素对 HPV16 LCR 甲基化与 CIN2+ 发生风险的关系有影响,尚有待进一步的研究和拓展。

综上所述,本研究结果表明,CIN2+的发生风险与HPV16 LCR整体的甲基化未显示相关性,但可能与E2BS的甲基化有关,中国人群和经焦磷酸测序方法检测的人群CIN2+的发生风险与HPV16 LCR的甲基化具有相关性。本研究探讨了CIN2+的发生风险与HPV16 LCR甲基化的相关性,尚有待纳入更多高质量、大样本的相关研究以得到更准确的结论。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J*, 2021, 134(7):783-791. DOI:10.1097/CM9.0000000000001474.
- [2] Olusola P, Banerjee HN, Phillely JV, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities[J]. *Cells*, 2019, 8(6):622. DOI:10.3390/cells8060622.
- [3] Schiffman M, Solomon D. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(24): 2324-2331. DOI: 10.1056/NEJMcp1210379.
- [4] Amaro-Filho SM, Chaves CBP, Felix SP, et al. HPV DNA methylation at the early promoter and E1/E2 integrity: a comparison between HPV16, HPV18 and HPV45 in cervical cancer[J]. *Papillomavirus Res*, 2018, 5: 172-179. DOI:10.1016/j.pvr.2018.04.002.
- [5] Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2[J]. *Virology*, 2006, 354(2):280-285. DOI:10.1016/j.virol.2006.06.018.
- [6] Wang W, Sun ZR, Liu JH, et al. Increased methylation of human papillomavirus type 16 DNA is associated with the severity of cervical lesions in infected females from northeast China[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3809-3816. DOI:10.3892/ol.2017.5903.
- [7] Lorincz AT, Brentnall AR, Vasiljević N, et al. HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(3): 637-644. DOI:10.1002/ijc.28050.
- [8] Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression[J]. *Infect Agents Cancer*, 2016, 11(1): 59. DOI: 10.1186/s13027-016-0107-4.
- [9] Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(12): 2125-2137. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0905.
- [10] Moore LD, Le T, Fan GP. DNA methylation and its basic function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2013, 38(1): 23-38. DOI:10.1038/npp.2012.112.
- [11] Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses[J]. *Eur J Epidemiol*, 2010, 25(9): 603-605. DOI:10.1007/s10654-010-9491-z.
- [12] Zhang XA, Zhi YF, Li Y, et al. Study on the relationship between methylation status of HPV16 E2 binding sites and cervical lesions[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493:98-103. DOI:10.1016/j.cca.2019.02.027.
- [13] Ding DC, Chiang MH, Lai HC, et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 147(2):215-220. DOI:10.1016/j.ejogrb.2009.08.023.
- [14] 李肖甫,樊婷婷,智艳芳,等. HPV-16 E2结合位点甲基化水平与宫颈病变的相关性研究[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(4): 259-262, 267. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2018.04.004.
- [15] Li XF, Fan TT, Zhi YF, et al. Study on the correlation between methylation status of HPV-16 E2 binding sites and cervical lesions[J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2018, 27(4): 259-262, 267. DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2018.04.004.
- [15] Hong D, Ye F, Lu WG, et al. Methylation status of the long control region of HPV16 in clinical cervical specimens[J]. *Mol Med Rep*, 2008, 1(4):555-560. DOI: 10.3892/mmr.1.4.555.
- [16] 胡元晶,曲苒苒. HPV16 L1基因3'端和LCR基因甲基化与其致病性的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2013, 48(8):607-610. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2013.08.010.
- [16] Hu YJ, Qu PP. Relationship between the methylation of L1 3' and long control region gene of HPV16 DNA and its pathogenicity[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2013, 48(8):607-610. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2013.08.010.
- [17] Leung TW, Liu SS, Leung RCY, et al. HPV16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(6):1022-1033. DOI:10.1002/jmv.24129.
- [18] 王微,刘建华,王桂丽,等. 人乳头瘤病毒16型甲基化水平与子宫颈病变程度关系的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2016, 45(4): 293-297. DOI: 10.12007/j. issn. 0258-4646. 2016.04.002.
- [18] Wang W, Liu JH, Wang GL, et al. Correlation between severity of cervical lesions and methylation of human papilloma virus type 16 DNA[J]. *J China Med Univ*, 2016, 45(4): 293-297. DOI: 10.12007/j. issn. 0258-4646.2016.04.002.
- [19] Snellenberg S, Schütze DM, Claassen-Kramer D, et al. Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex[®] xMAP[™] system[J]. *Virology*, 2012, 422(2):357-365. DOI:10.1016/j.virol.2011.11.006.
- [20] Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, et al. Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(10): 3207-3215. DOI:10.1128/JCM.01106-13.
- [21] Hublarova P, Hrstka R, Rotterova P, et al. Prediction of human papillomavirus 16 E6 gene expression and cervical intraepithelial neoplasia progression by methylation status[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(3): 321-325. DOI:10.1111/IGC.0b013e31819 d8a5c.
- [22] Simanaviene V, Pependikyte V, Gudleviceviene Z, et al. Different DNA methylation pattern of HPV16, HPV18 and HPV51 genomes in asymptomatic HPV infection as compared to cervical neoplasia[J]. *Virology*, 2015, 484: 227-233. DOI:10.1016/j.virol.2015.06.008.
- [23] Gašperov NM, Sabol I, Planinić P, et al. Methylated host cell gene promoters and human papillomavirus type 16 and 18 predicting cervical lesions and cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129452. DOI: 10.1371/journal.pone.0129452.
- [24] Xi LF, Jiang MJ, Shen ZP, et al. Inverse association between methylation of human papillomavirus type 16 DNA and risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23897. DOI:10.1371/journal.pone.0023897.
- [25] Badal V, Chuang LSH, Tan EHH, et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression[J]. *J Virol*, 2003, 77(11): 6227-6234. DOI: 10.1128/jvi.77.11.6227-6234.2003.
- [26] Bowden SJ, Kalliala I, Veroniki AA, et al. The use of human papillomavirus DNA methylation in cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis[J]. *eBioMedicine*, 2019, 50: 246-259. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.10.053.
- [27] Dong L, Zhang L, Hu SY, et al. Risk stratification of HPV16 DNA methylation combined with E6 oncoprotein in cervical cancer screening: a 10-year prospective cohort study[J]. *Clin Epigenet*, 2020, 12(1): 62. DOI: 10.1186/s13148-020-00853-1.
- [28] Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma[J]. *Virology*, 2009, 384(2):375-379. DOI:10.1016/j.virol.2008.11.014.
- [29] Yang HJ. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(1):42-48. DOI: 10.5732/cjc.012.10033.
- [30] Reuschenbach M, Huebbers CU, Prigge ES, et al. Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers[J]. *Cancer*, 2015, 121(12): 1966-1976. DOI: 10.1002/cncr.29315.
- [31] Cheung JLK, Cheung TH, Yu MY, et al. Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 131(2): 374-379. DOI:10.1016/j.ygyno.2013.08.026.
- [32] Mix J, Saraiya M, Hollowell BD, et al. Cervical precancers and cancers attributed to HPV types by race and ethnicity: implications for vaccination, screening, and management [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, 114(6): 845-853. DOI: 10.1093/jnci/djac034.
- [33] 晏建国,付海英,沈建箴,等. 重亚硫酸氢盐测序法检测 Wnt 信号通路抑制基因在急性早幼粒细胞白血病细胞中甲基化变化[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(5):1299-1304.
- [33] Yan JG, Fu HY, Shen JZ, et al. Application of bisulfite sequencing PCR in detecting the abnormal methylation of suppressor gene of Wnt signaling pathway in acute promyelocytic leukemia[J]. *J Exp Hematol*, 2016, 24(5): 1299-1304.