

宫颈癌组织和 Siha 细胞株 HPV16 病毒整合位点的检测与分析*

陈琳, 郑莹[△]

四川大学华西第二医院 妇科(成都 610041)

【摘要】 目的 利用 DIPS-PCR 方法建立宫颈癌组织 HPV16 病毒整合位点图谱,并利用软件分析存在的优势整合位点及整合位点处启动子序列。**方法** 细胞培养 Siha 细胞株,PCR 扩增并筛选出单一 HPV16 感染的临床标本,利用 DIPS-PCR 方法检测 Siha 细胞株和单一 HPV16 感染的临床宫颈癌标本中病毒整合位点。**结果** 发现 Siha 细胞株 HPV16 整合位点 13q22;宫颈癌组织整合位点在 1、3、5、6、8、10、11、13、14、15、17、19 及 X 染色体上,整合位点在染色体的分布是随机的,但其多集中于染色体脆性部位及其附近区域。整合位点多见于 1p35.1、5p15.3、10q24、13q21~q22、Xp11.4。利用 CBS prediction servers 和 BDGP Neural Network Promoter prediction 软件分析发现整合位点存在高度疑似启动子序列。**结论** DIPS-PCR 在 DNA 水平可有效检测宫颈癌组织和 Siha 细胞株 HPV16 整合位点,整合位点多出现在染色体的脆性位点处,且该脆性部位可能存在某些使病毒癌基因过度表达的启动子序列。

【关键词】 宫颈癌 高危型人乳头瘤病毒 DIPS-PCR 整合 脆性位点 启动子

Detection and Analysis the HPV16 Integration in the Specimens of the Cervical Carcinoma and the Cell Line Siha
CHEN Lin, ZHENG Ying[△]. Department of Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

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

【Abstract】 Objective To build the viral integration sites map and verify the integration sites at or near the fragile site. **Methods** PCR method were applied to screen single HPV16 infected cervical carcinoma specimen and the viral integration sites in the specimens of cervical carcinomas and the cell line cells were detected by detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR). **Results** The integration site in cell line Siha was 13q22. The integration sites in the specimens of the cervical carcinomas were randomly located in chromosome 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 19 as well as in X, but the sites were most likely at or near the chromosome fragile site. The location of the integration sites were at 1p35.1, 5p15.3, 10q24, 13q21-q22 and Xp11.4. By using the softwares CBS prediction servers and BDGP Neural Network Promoter prediction we found that the integration sites were located at the promoter like sequences. **Conclusion** DIPS-PCR can detect the viral integration sites, and the sites are at or near the chromosome fragile sites, and the integration sites may including the promoter to amplify the virus oncogene.

【Key words】 Cervical carcinoma High-risk human papillomavirus DIPS-PCR Integration
Fragile sites Promoters

宫颈癌是女性常见的三大生殖道肿瘤之一,流行病学调查证实人乳头瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌发生存在因果关系,约 80% 妇女一生中有 1 次机会感染 HPV,大多数感染者通过自身的免疫机制可将 HPV 清除,仅小部分发展成宫颈上皮内瘤变。其中低度鳞状上皮内瘤变(CIN I)中仅 1% 进展为浸润癌,高度鳞状上皮内瘤变(CIN II 及以上)中 12% 可进展成为浸润癌^[1-2]。说明大多数 HPV 病

毒属一过性感染,只有持续性高危型 HPV(HR-HPV)感染才是宫颈癌发生的必要条件^[3-4],且 HR-HPV 病毒基因整合入宿主基因才是宫颈癌发生的关键^[5-8]。在大部分宫颈癌病例中都发现 HR-HPV 病毒基因整合入宿主基因的现象^[9-10]。目前,关于 HPV 整合位点的规律性存在较大争议^[11-13]。主流观点认为 HPV 的整合位点在染色体是随机分布的^[11,14-15],但多集中于染色体易断裂的脆性位点处^[13,16-17]。该位点处的基因及其附近区域基因多与肿瘤发生发展密切相关^[5,18],该位点处的基因包括易重复扩增片段、活性转录部位以及

* 成都市科技惠民项目(No. 0040215301552)资助

△ 通信作者, E-mail: Zhy_chd@126.com

DNA 双链易断开部位^[19-21]。本研究利用 DIPS-PCR 检测宫颈癌组织和 Siha 细胞株 HPV16 整合位点,验证病毒整合是否存在优势整合脆性部位以及整合部位基因是否包含使病毒癌基因过度扩增的顺势调节序列。

1 材料与方法

1.1 实验材料

61 例宫颈癌组织标本取自 2014 年 11 月至 2015 年 2 月四川大学华西第二医院妇科住院及阴道镜室检查的患者,所收集的标本均征得患者同意,病理检测结果证实均为宫颈癌且未接受放化疗,所取组织标本于 -70 ℃ 保存备用。Siha 细胞株由四川大学华西第二医院妇幼保健研究院公共实验室提供。DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,限制性内切酶 *Sau3AI*、*Taq-I* 和 *T4* DNA 连接酶购自 NEB,PCR 仪、电泳槽、凝胶成像系统等实验设备由四川大学华西第二医院妇幼保健研究院公共实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将液氮罐冻存的 Siha 细胞株于 37 ℃ 水浴锅迅速摇晃解冻,接种于含 10% 胎牛血清及 1% 双抗 DME 培养基中,置于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后换液继续培养。每 2~3 d 用胰酶消化传代。

1.2.2 宫颈癌组织标本及 Siha 细胞株 DNA 提取及质量鉴定 取 20~30 g 宫颈癌组织,利用 PBS 液冲洗 2~3 次,按天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取癌组织和 Siha 细胞株的基因组 DNA,利用紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。利用 PCR 扩增管家基因 β -globin 鉴定提取 DNA 质量,获得的目的片段大小约 268 bp,扩增引物如下, *GH20*: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' (上游引物); *PC04*: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' (下游引物),若可扩增出该目的片段,说明提取 DNA 质量佳,能满足进一步实验。扩增体系:2 μ L 基因组 DNA,1 μ L *GH20* (10 μ mol/L),1 μ L *PC04* (10 μ mol/L),10 μ L 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix,6 μ L 去离子水,总体积 20 μ L。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性,2 min;94 ℃ 变性,30 s,55 ℃ 退火,30 s,72 ℃ 延伸,30 s,34 个循环;72 ℃ 充分延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,电泳条件:电压 120 V,时间 30 min,利用凝胶成像仪分析电泳条带。

1.2.3 宫颈癌组织 HPV 分型 对管家基因 β -globin 可扩增出目的片段的 DNA 样品进行 HPV 分型,选通用引物 (MY09/11) 扩增 HPV 保守序列 L1 基因对样品行 HPV 分型检测,扩增片段大小约为 450 bp,引物序列如下, *MY09*: 5'-GTCCMARRGGAWACTGAT-3' (上游引物), *MY11*: 5'-CMCAGGGWCATAAAYAATG-3' (下游引物)。扩增体系:2 μ L 基因组 DNA,1 μ L *MY09* (10 μ mol/L),1 μ L *MY11* (10 μ mol/L),10 μ L 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix,6 μ L 离子水,总体积 20 μ L。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性,2 min;94 ℃ 变性,30 s,55 ℃ 退火,30 s,72 ℃ 延伸,30 s,34 个循环;72 ℃ 充分延伸 10 min。

10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,电泳条件:电压 120 V,时间 30 min,利用凝胶成像仪分析观察电泳条带。将有目的片段的 PCR 原液送苏州金唯智基因公司测序。若所有碱基位点测序均为单一峰,则为 HPV 单一感染,多个碱基位点测序出现双峰或者套峰,则为 HPV 混合感染。测序序列利用 NCBI BLAST 软件进行比对,筛选单一 HPV16 感染癌组织标本,若与 HPV16/18/58/33 基因组序列一致性 >95% 则该样品为 HPV16/18/58/33 型感染。

1.2.4 DIPS-PCR 检测癌组织和 Siha 细胞株 HPV16 整合位点

1.2.4.1 扩增引物 对 1.2.3 中检测的单一 HPV16 感染的癌组织进行 DIPS-PCR 分析。查阅文献^[22],设计 9 组 HPV16 的扩增引物及接头引物,序列如下。Forward 1: First,GGGATGTAATGGATGTTTTATGT, second, GGGATGCTATATCAGATGACGAGAACG; Forward 2: First, GGC GCCATGAGACTGAAACACC, second, GTGGAA GTGGGGGTGGTTGC; Forward 3: First, GCCA GAATGGATACAAAGACAAACA, second, GGT ACAATGGGCTACGATAATGA; Forward 4: First, TTTGCACGAGGACGAGGACA, second, ACGAGGACAAGGAAAACGATGGAGA; Forward 5: First, AGAGCCAGACACCGGAAACC, second, GAAACCCCTGCCACACC ACT; Reverse 1: First, ACACAACAAACAACACTAATTCAA CAT, second, TGAGGTGGTGGGTGTAGCTTT; Reverse 2: First, GCACCAAAGCCAGTATGAAC C, second, AATGGTGGACAATCACCTGGA; Reverse 3: First, AGCACCTATAGATTTTCCAC

TACGAG, second, AATGCCAGTACGCCTAGA
GGTT; Reverse 4: First, AAGTTGGGTAGCCG
ATGCAC, second, CAGAACGTTTGTGTCGCA
TTG。

DIPS 连接及接头引物如下。AL: GGGCCAT
CAGTCAGCAGTCGTAGCCGGATCCAGACTTA
CACGTTG; AP1: GGCCATCAGTCAGCAGTC
GTAG; AS-*TaqI*: CGCAACGTGTAAGTCTG-
NH2; AS-*Sau3AI*: GATCCAACGTGTAAGTC
TG-NH2。

上述引物均由北京华大基因科技有限公司合
成。

1.2.4.2 Adaptor 的制作 AL 引物与 AS-
Sau3AI 或 AS-*TaqI* 引物等体积混合溶解至
66 mmol/L Tris 盐酸中 (pH=7.4) 使其终浓度为
25 μ mol/L, 90 $^{\circ}$ C 2 min, 然后每分钟下降 1 $^{\circ}$ C, 冷至
4 $^{\circ}$ C, 置于冰上。

1.2.4.3 酶切基因组与 Adaptor 的连接 取基因
组 DNA 0.6 μ g, 10 U *Sau3AI*, 2 μ L 10 $\times$ *Sau3AI*
Buffer, 加双蒸水至 20 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅 1 h;
65 $^{\circ}$ C 20 min 灭活酶 *Sau3AI*。

取 0.6 μ g 基因组 DNA, 10 U *Taq-I*, 2 μ L 10 $\times$
Taq-I Buffer, 加双蒸水至 20 μ L, 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅
中 15 min; 80 $^{\circ}$ C 20 min 灭活酶 *Taq-I*。在上述酶切
基因组 DNA 中加入 2 μ L Adaptor, 1 μ L T4 DNA
连接酶, 2.6 μ L T4 DNA ligase buffer, 0.4 μ L 去离
子水至总体积 26 μ L, 置于 25 $^{\circ}$ C 水浴锅中 4 h; 65 $^{\circ}$ C
10 min 热灭活 T4 DNA 连接酶。取 2 μ L 产物进行
下一轮的线性 PCR 扩增。

1.2.4.4 线性 PCR 扩增 扩增体系: 2 μ L 基因组
DNA 连接产物, 1 μ L 10 μ mol/L HPV16 Forward
1~5 first 号引物或 1 μ L 10 μ mol/L HPV16
Reverse 1~4 first 号引物 (分别加), 10 μ L 2 $\times$
EasyTaq PCR SuperMix, 7 μ L 去离子水, 总体积
20 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性, 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变
性, 30 s, 50~55 $^{\circ}$ C (各引物的退火温度不同) 退火,
30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸
10 min。

1.2.4.5 指数 PCR 扩增 扩增体系: 2 μ L 第一轮
线性化 PCR 扩增产物, 1 μ L 10 μ mol/L HPV16
Forward 1~5 second 号引物或 1 μ L 10 μ mol/L
HPV16 Reverse 1~4 second 号引物 (分别加),
1 μ L AP1 引物, 25 μ L 2 $\times$ EasyTaq PCR
SuperMix, 21 μ L 去离子水, 总体积 50 μ L。PCR 反

应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性, 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性, 30 s, 54~
59 $^{\circ}$ C (各引物的退火温度不同) 退火, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延
伸, 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。

10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 电泳
条件: 电压 120 V, 时间 30 min, 利用凝胶成像仪分
析电泳条带。

1.2.4.6 目的片段测序 标记偏离目的片段的条
带, 将其 PCR 原液送苏州金唯智基因公司测序。正
向测序引物为 AP1, 为保证测序的准确性, 对于大
于 800 bp 的片段, 加测反向引物。利用 NCBI
BLAST 软件对测序序列进行人类和 HPV16 病毒
基因双向比对分析。利用 NCBI map viewer 软件
分析 HPV16 在染色体整合位点及整合区域的基因
分布, 判断病毒断裂位点所属区域, 以及该位点附近
脆性位点的分布。同时利用 CBS prediction servers
和 BDGP Neural Network Promoter prediction 软
件分析整合位点处的基因是否具有促使病毒癌基因
过度表达的顺式作用元件。

2 结果

2.1 宫颈癌组织 DNA 分离和质量鉴定

经 β -globin PCR 扩增, 所有癌组织标本在
268 bp 大小片段处可见清晰目的条带, 提示提取
DNA 质量能满足进一步实验需求。利用紫外分光
光度计检测 DNA 浓度在 67.135~914.960 ng/ μ L
之间, A_{260}/A_{280} 在 1.780~2.006 之间。

2.2 宫颈癌组织 HPV 病毒分型

由图 1 可以看出: 存在 HPV 感染的临床标本,
可利用 HPV 保守序列基因 L1 的扩增引物扩增该
片段, 该片段长度约 450 bp, 而不存在 HPV 感染的
临床标本则不出现该条带, 在电泳图中表现为空白
条带。

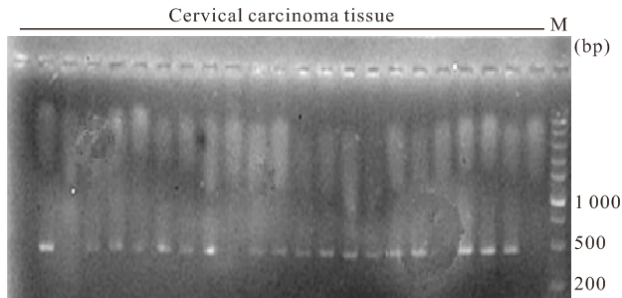


图 1 样品 HPV L1 基因的电泳图
Fig 1 The electrophoregram for HPV gene L1

M: Marker

通过 NCBI BLAST 软件进行基因比对, 发现在

61 例宫颈癌标本中,35 例为单一 HPV16 感染,5 例单一 HPV18 感染,6 例单一 HPV58 感染,2 例单一 HPV33 感染,8 例混合感染,5 例无 HPV 感染。

2.3 宫颈癌组织 DIPS-PCR 电泳结果

由图 2 可见,不同的引物扩增得到的片段长度

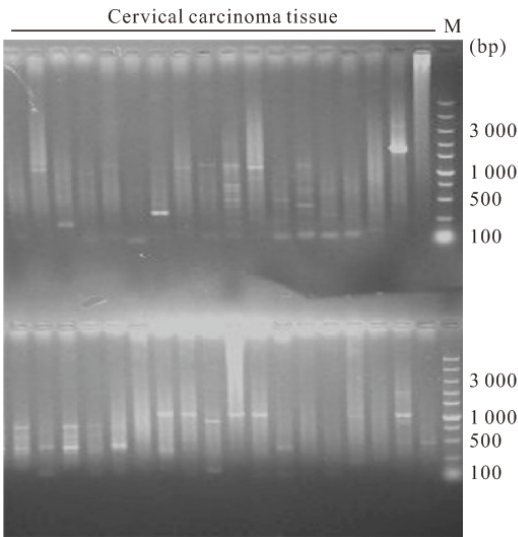


图 2 引物 16 for5 second 和 16 rev1 second 扩增条带

Fig 2 The amplification straps of 16 for5 second and 16 rev1 second

M: Marker

2.4 HPV16 病毒整合位点分析

利用 NCBI BLAST 软件对测序结果进行比对,如图 3 所示,Siha 细胞株的整合位点为 13q22。35 例宫颈癌组织中有 28 例出现病毒整合,其中 5 例标本发现 2~3 个整合位点,其余标本均为单一整合。其整合位点在 1、3、5、6、8、10、11、13、14、15、17、19 和 X 染色体上,整合位点分别为 1p35、1q24~25、3q25~q26、3q26、3、5p12~p13、5p15、3、6p22~p23、8p12、8p22~p23、8q24、1~q24、2、10q24、10q26、11q23~q25、13q21~q22、14q12~q13、14q24、15q21、3、17p12~p13、19p13、1~p13、2、Xp11、4~p21。

2.5 整合位点处启动子分析

利用分析软件 CBS prediction servers(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 和 BDGP Neural Network Promoter prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 发现在 1、5、11、10、19 号染色体的整合位点存在高度疑似启动子的序列。本研究 35 例样本中 28 例样本出现 36 次整合,其中 83.33%(30/36)落在或者靠近(< 5 Mbp)脆性位点。

有一定的集中性,这与多数临床标本中,HPV 病毒为游离状态而未与宿主基因发生整合有关。集中片段的基因多为游离的 HPV 病毒基因,而分散的基因片段中较多为 HPV 病毒基因与人类基因的整合体。

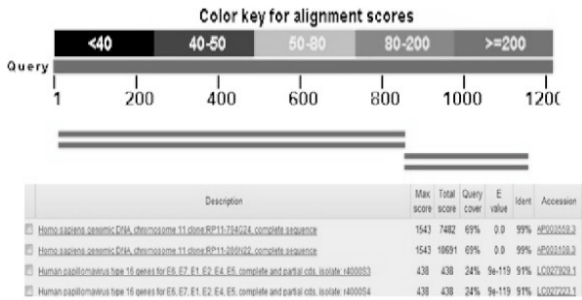
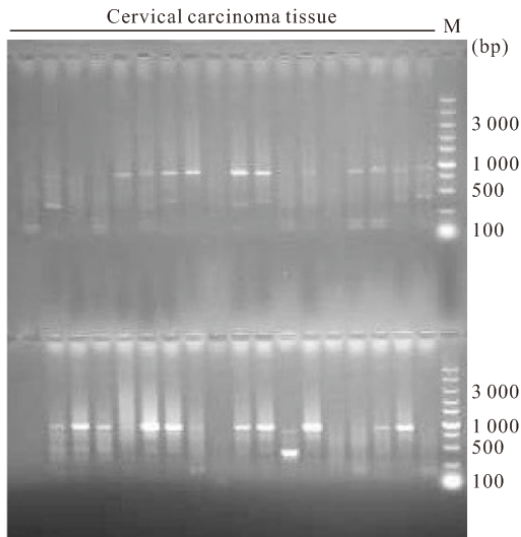


图 3 NCBI BLAST 比对结果
Fig 3 The result of NCBI BLAST

3 讨论

导致宫颈癌发生的 HPV 病毒以 HPV16 和 HPV18 最为常见, HPV16 在宫颈癌患者的检出率大约为 50%, HPV18 约占 20%,其次是 HPV31、33、45 和 58^[23]。本研究所收集标本中单一型 HPV16 检出率为 57.38%(35/61), HPV18 病毒感染检出率为 8.20%(5/61)。当前研究认为 HR-HPV 基因整合入宿主基因是宫颈癌发生的关键,基因整合可使病毒癌基因 E6/E7 过度表达,从而灭活或抑制抑癌基因,激活细胞癌基因,或触发宿主基

因扩增导致宫颈癌的发生^[12,24-25]。目前用于病毒整合检测的方法包括 Real-time PCR、amplication of papillomavirus oncogene transcripts (APOT)、DIPS-PCR。Real-time PCR 利用 HPV 病毒基因 E2/E6 比值变化判断是否存在病毒基因的整合, 既不能判断 HPV E2 断裂以外的整合, 也不能判断 HPV 病毒整合是否有效。APOT 主要是对病毒细胞整合基因转录体进行检测, 其敏感性高且较准确, 但对于没有转录的整合基因不能进行检测, 该部分基因仍存在有活性的整合转录体。DIPS-PCR 是在 DNA 一侧加入已知的一段 DNA 序列, 并用此片段扩增未知 DNA 序列, 使其能够高效特异地检测 HPV 病毒的整合位点。本实验采用 DIPS-PCR 检测出 Siha 细胞株 HPV16 病毒整合位点为 13q22 与文献报道一致^[26]。

EUGENE 等^[27]利用 APOT 方法发现 HPV16 的基因整合位点 14q23、14q23. 2、13q21. 2 和 10q23. 3 或 10q24. 2。近 5 年, 随着实验条件的提高, 发现的整合位点有 1p、3q、6q、11q、13q、20q^[28]、3q2. 8、4q13. 3、8q24. 21、13q22. 1、17q21^[29]、4q24. 21、8q24. 21、13q22. 1 和 12q21. 2, 其中以 8q24. 21、13q22. 1 是最常见的部位^[30]。本研究发现 HPV16 整合的位点 1p35、1q24~q25、3q25~q26、3q26. 3、5p12~p13、5p15. 3、6p22~p23、8p12、8p22~p23、8q24. 1~q24. 2、10q24、10q26、11q23~q25、13q21~q22、14q12~q13、14q24、15q21. 3、17p12~p13、19p13. 1~p13. 2、Xp11. 4~p21。先前的研究没有发现 X 染色体有 HPV 病毒的整合位点, 但有研究报道 HPV16 病毒感染的细胞株 Caski 存在 Xq27. 3 整合位点^[31]。本研究发现在 Xp11. 4 存在整合位点。从染色体的角度来讲, 所有染色体都可能出现病毒的整合位点, 但研究支持其整合位点多集中在染色体脆性部位或接近脆性部位, 其相距约 26 bp~500 Mbp^[5]。

脆性位点是染色体上的裂隙或间断区, 该区经过特别的化学处理或特别的组织培养条件往往容易断裂产生许多裂隙或位点。包括常见脆性位点 (common fragile sites, CFSs) 和罕见脆性位点 (rare fragile sites, RFSs) 两种。前者几乎出现在所有人身上, 后者在人群中出现的概率不足 5%, 其基因片段富含 CCG 或 AT 的微卫星重复序列^[32], 与某些基因病密切相关。CFSs 是姐妹染色体缺失、互换、易位、转导、基因扩增、质粒 DNA 及肿瘤相关病毒发生整合的位置^[33]。WENTZENSEN 等^[11]总结出

独立的整合位点 192 个, 其中在 CFSs 位点处整合事件发生率为 38%, 在染色体 1q21、2q22、2q33、3p21、3p14、3q28、4q21、5p15、6p24、8q24、9q34、12q13、13q21~q22、14q24 和 17q23 为病毒易整合部位。本研究 35 例样本中 28 例样本出现 36 次整合, 其中 83. 33% (30/36) 落在或者靠近 (<5 Mbp) 脆性位点, 高于 MARTINA 等^[34]的报道, 这可能与近年来发现的脆性位点越来越多有关。本研究发现整合位点在 1p35 出现 4 次, 5p15. 3 出现 3 次, 10q24 出现 3 次, Xp11. 4 出现 3 次, 而文献^[30]报道的常见整合位点 8q24. 21 和 13q22. 1 只出现一次, 可能与文献报道多来自西方国家, 其基因与我国存在差异有关。本研究中有 7 例样本未检测出整合位点, 这可能与整合出现在病毒的限制性内切酶酶切位点处及酶切的段端没有与接头引物连接而是断开的段端彼此再次连接有关。

我们利用分析软件 CBS prediction servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 和 BDGP Neural Network Promoter prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 发现在 1、5、11、10、19 号染色体的整合位点存在高度疑似启动子的序列, 这些序列可能具有某些调节功能, 可启动或增加病毒癌基因的表达从而导致宫颈癌的发生, 但他们的功能尚需进一步研究。且宫颈癌组织 HPV16 病毒整合位点在染色体随机分配, 但多集中在染色体脆性部位或临近脆性部位区域, 而脆性部位易导致宿主基因结构和功能的改变, 这可能是 HPV 病毒导致宫颈癌发生发展的重要机制, 此外在某些整合位点处发现高度疑似启动子序列, 这或许会导致 HPV 病毒基因 E6/E7 的过度表达, 导致宫颈癌的发生发展。

参 考 文 献

- [1] SONG SH. Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix. *Gynecol Cancer*, 2006, 16(4): 1608-1613.
- [2] VINOKUROVA S. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Research*, 2008, 68(1): 307-313.
- [3] KOSHIOL J, LINDSAY L, PIMENTA JM. persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia; a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol*, 2008, 168(2): 123-137.
- [4] NAKAGAWA JT, SCHIRMER J, BARBIERI M. Human papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer. *Rev Bras Enferm*, 2010, 63(2): 307-311.
- [5] LU X, LIN Q, LIN M, *et al.* Multiple-integrations of HPV16 genome and altered transcription of viral oncogenes

- and cellular genes are associated with the development of cervical cancer. *PLoS One*, 2014, 9(7): e97588 [2016-01-15]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097588>.
- [6] SHUKLA S, MAHATA S, SHISHODIA G. Physical state&-copy number of high risk human papillomavirus type16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian J Med Res*, 2014, 139(4): 531-543.
- [7] WILLIAMS VM. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virology*, 2011, 6(1): 45-57.
- [8] SIRINART A, ARKOM C, TIPAYA E. The three most common human papillomavirus oncogenic types and their integration state in Thai women with cervical precancerous lesions and carcinomas. *Med Virol*, 2014, 86(11): 1911-1919.
- [9] HUANG LW, CHAO SL, LEE BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *Clin Pathol*, 2008, 61(5): 627-631.
- [10] PETT M, COLEMAN N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis. *Pathol*, 2007, 212(4): 356-367.
- [11] WENTZENSEN N, VINOKUROVA S, VON KNEBEL DOEBERITZ M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3878-3884.
- [12] PETER M, ROSTY C, COUTURIER J, *et al*. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene*, 2006, 25(44): 5985-5993.
- [13] THORLAND EC, MYERS SL, PERSING DH, *et al*. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 5916-5921.
- [14] MATOVINA M, SABOL I, GRUBISIC G, *et al*. Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*, 2009, 113(1): 120-127.
- [15] DALL KL, SCARPINI CG, ROBERTS I, *et al*. Characterization of naturally occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8249-8259.
- [16] THORLAND EC, MYERS SL, GOSTOUT BS, *et al*. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 2003, 22(8): 1225-1237.
- [17] YU T, FERBER MJ, CHEUNG TH, *et al*. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005, 158(1): 27-34.
- [18] AKAGI K, LI J, BROUTIAN TR, *et al*. genome-wide analysis of HPV integration in human cancer reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res*, 2014, 24(2): 185-199.
- [19] CHENG AM, BYROM MW, SHELTON J, *et al*. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(6): 1290-1297.
- [20] MARTINEZ I, GARDINER AS, BOARD KF, *et al*. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 2008, 27(5): 2575-2582.
- [21] VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, *et al*. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2006, 103(4): 2257-2261.
- [22] LUFT F, KLAES R, NEES M, *et al*. Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int Cancer*, 2001, 92(1): 9-17.
- [23] LI N, FRANCESCHI S, HOWELL-JONES R, *et al*. Human papillomavirus type distribution in 30, 848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int Cancer*, 2011, 128(4): 927-935.
- [24] FERBER MJ, THORLAND EC, BRINK AA, *et al*. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene*, 2003, 22(46): 7233-7242.
- [25] PETER M, STRANSKY N, COUTURIER J, *et al*. Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *Pathol*, 2010, 221(3): 320-330.
- [26] DIAO MK, LIU CY, LIU HW, *et al*. Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines. *Life Sci*, 2015(127): 46-52.
- [27] EUGENE K, SVETLANA V, ELENA M, *et al*. Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequence. *BMCC Cancer*, 2002, 24(2): 2407-2430.
- [28] POULAMI D, ASHA TH, UMESH M, *et al*. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancer in Indian women. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41012 [2016-01-16]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041012>.
- [29] SCHMITZ M, DRIESCH C, JANSEN L, *et al*. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39632 [2016-01-16]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039632>.
- [30] ADEY A, BURTON JN, KITZMAN JO, *et al*. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid hela cancer cell line. *Nature*, 2013, 500(7461): 207-211.
- [31] LI H, YANG Y, ZHANG R, *et al*. Preferential sites for the integration and disruption of human papillomavirus 16 in cervical lesions. *Clin Virol*, 2013, 56(4): 342-347.
- [32] RICHARDS RI. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet*, 2001, 17(6): 339-345.
- [33] SMITH DI, HUANG H, WANG L. Common fragile sites and cancer. *Int Oncol*, 1998, 12(1): 187-196.
- [34] MARTINA S, CORINA D, LARS J, *et al*. Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39632 [2016-01-16]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039632>.

(2015-12-21 收稿, 2016-04-18 修回)

编辑 汤洁