

HPV E7 与子宫颈上皮内瘤样病变细胞 DNA 损伤应答的相关性研究*

曹寒雨¹, 王小军², 唐子执³, 楼江燕^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院基因组
稳定性实验室(成都 610041); 3. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】目的 通过原代培养 HPV 阳性的宫颈上皮内瘤变Ⅲ度(CINⅢ)的成纤维细胞与 HPV 阴性的小儿包皮成纤维细胞,探索 HPV E7 在 DNA 损伤应答过程中的作用。**方法** 选取临床病理确认为 HPV16 阳性的 CINⅢ新鲜宫颈组织和 HPV16 阴性的小儿包皮组织,组织块经胶原酶 A 消化后培养,用慢病毒 E7 或 pLV 感染 HPV16⁻成纤维细胞,用离子射线(X 光,2 Gy 或 5 Gy)分别照射 HPV16 阴性与 HPV16 阳性细胞以及经 pLV 或 E7 慢病毒感染的细胞 0~8 h,诱导细胞 DNA 双链断裂,采用间接免疫荧光法检测 DNA 双链断裂应答相关蛋白 53BP1、BRCA1、NBS1、RPA32 的应答特征。**结果** 成功从宫颈上皮内瘤变组织及小儿包皮组织原代培养出 HPV16 阳性及 HPV16 阴性的成纤维细胞。间接免疫荧光染色发现 X 光照射后,HPV16 阳性细胞中 53BP1、BRCA1、NBS1、RPA32 灶点多于 HPV16 阴性细胞($P<0.05$),E7 感染细胞中 53BP1、RPA32、NBS1 灶点少于 pLV 感染细胞($P<0.05$),均为 6 h(2 Gy)或 4 h(5 Gy)达峰。**结论** 利用原代培养 CIN 成纤维细胞成功建立了研究 DNA 损伤中 E7 作用的模型,在宫颈癌前病变发展过程中,HPV E7 能够抑制 DNA 双链断裂修复应答反应。

【关键词】 E7 原代细胞培养 DNA 损伤

HPV E7 Function in DNA Damage Response of Cervical Intraepithelial Neoplasia CAO Han-yu¹, WANG Xiao-jun², TANG Zi-zhi³, LOU Jiang-yan^{1△}. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Development and Stem Cell Institute, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: loujiangyan2@163.com

【Abstract】Objective To determine the function of human papillomavirus (HPV) E7 in DNA damage response of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) Ⅲ cells. **Methods** Samples of CIN Ⅲ and child foreskin tissues were collected, with pathologically confirmed HPV positive and negative, respectively. Collagenase A was used for digesting tissues prior to primary culture. The HPV negative cells were infected with lentivirus E7 and pLV. Proteins (53BP1, NBS1, BRCA1 and RPA32) responsive to DNA double break damages were detected by indirect immunofluorescent staining after 0-8 h treatment with X-ray (2 or 5 Gy). **Results** After treatment with 2 or 5 Gy X-ray, 53BP1, NBS1, BRCA1 and RPA32 foci in HPV⁺ cells increased compared with HPV⁻ cells ($P<0.05$). Less 53BP1, RPA32, BRCA1 and NBS1 foci positive cells (foci >5) were found in E7 infected cells than in pLV infected cells ($P<0.05$). Both of them reached the peak at 6 h (2 Gy) or 4 h (5 Gy). **Conclusion** We have successfully established a model to detect the function of HPV E7 in DNA damage response using primary culture of CIN fibroblasts. With the progression of CIN, HPV E7 can inhibit DNA double break repair.

【Key words】 E7 Primary culture DNA double break

宫颈癌是目前最常见的妇科恶性肿瘤,目前大量研究证明人乳头瘤病毒(HPV)是宫颈癌及其癌前病变宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的主要危险因素,同时也与肛门生

殖器癌和头颈部癌密切相关^[1-3]。

HPV 共有一百多种不同的基因型^[4],其中 HPV16 型为宫颈癌最常见的病因。HPV 基因组结构可分为早期(E)区(包括 E1、E2、E4、E5、E6、E7 基因)、晚期(L)区(包括 L1、L2 基因)和上游调控区(URR),其中 E6、E7 为病毒癌基因,宫颈癌的发生发展与其表型维持有着重要联系^[5-6]。在约 90%

* 四川省科技厅应用基础项目(No. 2012JY0011)资助

△ 通信作者, E-mail: loujiangyan2@163.com

的宫颈癌中高危型 HPV DNA 被整合进宿主细胞,使病毒癌基因 E6、E7 持续高表达,其中重要致癌蛋白 E7 的过表达,能够结合并降解主要抑癌蛋白 pRB 及 pRB 家族相关的 p107 与 p130,同时能够抑制细胞周期依赖激酶(CDK)抑制剂 p21Cip1 和 p17Kip1,使细胞提前由 G₁ 期向 S 期转变,促进细胞增殖^[7-9]。肿瘤的发生发展是一个 DNA 损伤的积累过程,染色体不稳定性是恶性肿瘤特别是上皮来源肿瘤的标志,基因组不稳定性对克隆细胞群体的快速筛选具有重要意义,这种细胞群体能够克服癌变进展中的各种不利因素,从而加速癌变。有研究证明 E7 在体内和体外都能够抑制细胞对离子射线的正常 DNA 损伤应答反应^[10],并且促进 DNA 断裂点周围标记细胞 DNA 损伤的 γ -H2AX 灶点的聚集^[11],但其下调 DNA 损伤应答反应的调节机制不甚清楚,并且尚无研究证明 E7 参与任何与 DNA 损伤有关的内源性酶活动^[12]。成纤维细胞作为基质细胞的一种,其表达的肝素结合性表皮生长因子(HB-EGF)已被证实发生在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用,能够刺激细胞增殖分化并诱导细胞迁移^[13-14]。本研究利用上皮内瘤变宫颈组织与儿童包皮组织原代培养成纤维细胞,探索 HPV E7 应对 DNA 损伤反应的生物学特性,有利于更好地理解 HPV 感染对宫颈上皮细胞的影响,为宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)和其向宫颈癌发展进程的限速或逆转提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料与试剂 293T 细胞由四川大学华西第二医院西部妇幼研究院基因组稳定性实验室提供,DMEM 培养基(Hyclone),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),青霉素(100 U/L)/链霉素(100 mg/L)(Invitrogen),2.5 g/L 胰蛋白酶(E+T, Sigma),胶原酶 A (Sigma), LipofectAMINE 2000 (Invitrogen), Opti-MEM (Gibco, REF31985-070), Turbo(Thermo, R0531), E7 重组质粒、pLV 重组质粒、聚凝胺(polybrene) (Sigma), 体积分数为 4% 的多聚甲醛(Sigma), TritonX-100 (Keygen), 兔抗人 p53 结合蛋白(53BP1, Bethyl, A300-272A), 兔抗人 NBS1 蛋白(Bethyl, A310-448A), 兔抗人乳腺癌易感蛋白 1(BRCA1, Bethyl, A310-477), 兔抗人复制因子 A 蛋白(RPA32, Bethyl, A304-089A), 磷酸盐

缓冲(PBS, 海门), 荧光素标记山羊抗兔二抗 CY3 (Sigma), 4, 6-联脒-2 苯基吡啶 (DAPI, Vector laboratories)。

1.1.2 标本采集 宫颈组织取自四川大学华西第二医院手术切除新鲜标本, 经术后病理报告证实为 HPV16 阳性的高级别宫颈上皮内瘤变(CIN III)组织。包皮组织取自四川大学华西医院小儿外科包皮环切手术的儿童, 经病理报告证实为 HPV16 阴性, 儿童家属对治疗及实验均签署知情同意书, 实验经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 培养原代细胞 将收集的新鲜宫颈组织或儿童包皮组织置于含有青霉素/链霉素的胎牛血清中, 立即带回实验室处理。在严格灭菌的细胞台用无菌 PBS 缓冲液清洗 10 遍, 冲洗掉组织上的血凝块, 修剪周围脂肪组织等, 移入另一直径 10 cm 的无菌培养皿中, 将其剪碎至 1 mm³ 左右, 转移至 50 mL 离心管内, 加入 0.2 mg/mL 胶原酶 A 溶液 10 mL 吹打均匀, 置于 37 °C 恒温摇床消化 2 h, 待大块组织分散成絮状且消化液混浊时, 常温离心 10 min, 4 000 r/min, 弃掉上清液, 沉淀部分用无菌 PBS 缓冲液重悬 3 次, 再用 10% FBS 重悬 3 次后, 添加 10% FBS 及 DMEM 培养基, 用 1 mL 移液枪将其转移至直径 3.5 cm 培养皿中, 细胞培养箱(体积分数为 5% 的 CO₂, 37 °C)内静置至少 7 d 待悬浮组织块贴壁后换液, 据细胞培养基颜色及细胞生长情况每隔 2~3 d 换液, 待细胞融合至 80% 左右时, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 E7、pLV 慢病毒包装 将对数生长期 293T 细胞以每皿 3×10⁶ 的细胞密度接种于直径 10 cm 细胞培养皿中, 于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养过夜。利用脂质体(LipofectAMINE 2000)将其中的质粒成分转染至包装细胞 293T 中, 构建慢病毒载体系统, 将 9 μ g 包装质粒和 3 μ g 重组慢病毒质粒加入至 1.5 mL Opti-MEM 中, 在室温下静置孵育 5 min 后, 将混合质粒和 turbo 稀释液混合在一起并充分混匀(移液枪吹打 15 次以上), 在室温下静置孵育 20 min 后, 吸取 3 mL 质粒脂质体混合物加入到细胞培养皿中, 再添加 7 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基并充分混匀, 在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 4~6 h 后, 更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 48 h 后收集细胞上清, 常温离心 10 min, 4 000 r/min, 离心后去除上清, 将其分装小管, 放置

于-80℃冰箱保存备用。

1.2.3 E7、pLV 慢病毒感染 HPV⁻ 原代成纤维细胞 HPV16 阴性的成纤维细胞以每孔 1×10^5 的细胞密度接种于 24 孔板中,置于 37℃ 孵箱中培养;次日将 1.2.2 中制备的病毒液常温下融解后感染细胞,感染时所用添加了 10% FBS 及 DMEM 的培养基中预先加入聚凝胺(1:1 000)提高转染效率,24 h 后去除含慢病毒的培养基,加入 2 mL 完全培养基;48~72 h 在荧光倒置相差显微镜下观察 E7 或 pLV 感染后各孔中 EGFP 细胞阳性率,以确定是否转染成功。

1.2.4 照射 X 射线 传代后细胞融合至 80% 左右,选取其中细胞生长状况良好的爬片,所有成纤维细胞(未经慢病毒感染的 HPV16 阳性与 HPV16 阴性的细胞,经 E7 或 pLV 慢病毒感染的 HPV16 阴性细胞)均分为对照组和实验组,对照组不照射 X 射线,实验组置于 X 射线照射仪中照射 2 Gy 或 5 Gy,1~8 h 后收样,于 4℃ 冰箱内保存。

1.2.5 间接细胞免疫荧光 利用间接细胞免疫荧光染色检测 DNA 损伤检验点分子 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 灶点(灶点代表 DNA 双链断裂及复制应激,数量和大小与 DNA 双链断裂数量一致)。照射 X 射线后于不同时间点(0 h、4 h、6 h、8 h)分别将收集好的细胞爬片用 PBS 缓冲液洗 3 遍,加入 0.3 mL/L TritonX-100 通透 10 min,PBS 洗涤(同前),用封闭血清 Blocking Buffer(20 mL/L 驴血清,30 g/L 牛血清白蛋白,0.3 mL/L TritonX-100,PBS 稀释)封闭 30 min,分别加入兔抗人一抗 53BP1(1:2 000),兔抗人一抗 NBS1(1:3 000),兔抗人一抗 BRCA1(1:100)或兔抗人一抗 RPA32(1:1 000),37℃ 恒温箱孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,加入 CY3 标记的山羊抗兔荧光标记抗体,37℃ 恒温箱孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,用 DAPI 抗淬灭溶液封片。荧光显微镜(Olympus,BX51)观察结果并拍照。高倍镜下($\times 100$ 倍)每例标本计数 4 次成纤维细胞内 53BP1 免疫荧光染色灶点,每次观察 100 个细胞,计算每 100 个细胞含有的平均灶点数。高倍镜下($\times 100$ 倍)每例标本计数 100 个细胞内阳性细胞(细胞内分别有明确免疫荧光染色的 NBS1、BRCA1、RPA32 灶点数 ≥ 5 个的细胞)所占的比例(%),计算 4 次,取平均值。

1.2.6 统计学方法 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。每两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 细胞原代培养

原代培养的成纤维细胞接种至少 7 d 后倒置显微镜下观察可有大量细胞游出,并开始贴壁延伸,7~9 d 时细胞生长繁殖旺盛,相互融合成片,9~13 d 后长满细胞瓶底,进行细胞传代。传代后倒置镜下见细胞生长良好,细胞大多呈长梭形,部分呈扁三角形(图 1)。

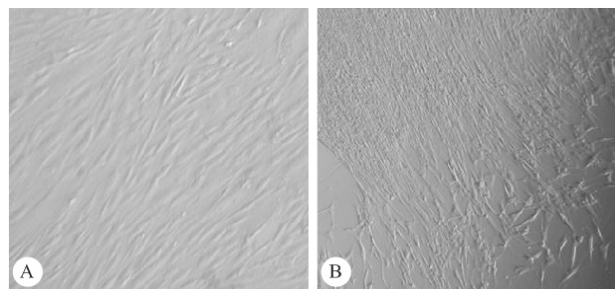


图 1 原代培养的 HPV16 阴性的小儿包皮组织(A)和 HPV16 阳性的 CIN 组织(B)

Fig 1 Primary culture of children foreskin tissue (HPV⁻) (A) and CIN tissue (HPV⁺) (B)

2.2 培养的原代成纤维细胞内源性 DNA 损伤的观察

2.2.1 HPV16 阴性与 HPV16 阳性成纤维细胞内源性 DNA 损伤的观察 如图 2、图 3 所示,0 h 未经 X 射线照射处理时,HPV 阳性和 HPV 阴性细胞均有 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 的灶点聚集,提示细胞均存在内源性 DNA 损伤。2 Gy(或 5 Gy)射线照射后 6 h(或 4 h),灶点数达高峰,HPV 阳性细胞中 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 的灶点相对 HPV 阴性细胞增多($P<0.05$)。2 Gy(或 5 Gy)射线照射后 8 h,各组灶点数均明显减少。实验结果提示 HPV16 阳性细胞对 X 射线应激过强,未进入正常修复程序,可能存在细胞 DNA 损伤修复障碍。

2.2.2 pLV 与 E7 慢病毒感染的 HPV16 阴性成纤维细胞中的 DNA 损伤观察 如图 4、图 5 所示,0 h 未经 X 射线照射处理时,E7 和 pLV 慢病毒感染细胞中均有 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 的灶点聚集。2 Gy(或 5 Gy)射线照射后 6 h(或 4 h),灶点数达高峰,E7 感染细胞中 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 灶点或阳性细胞比例少于 pLV 感染细胞($P<0.05$)。2 Gy(或 5 Gy)射线照射后 8 h,两组灶

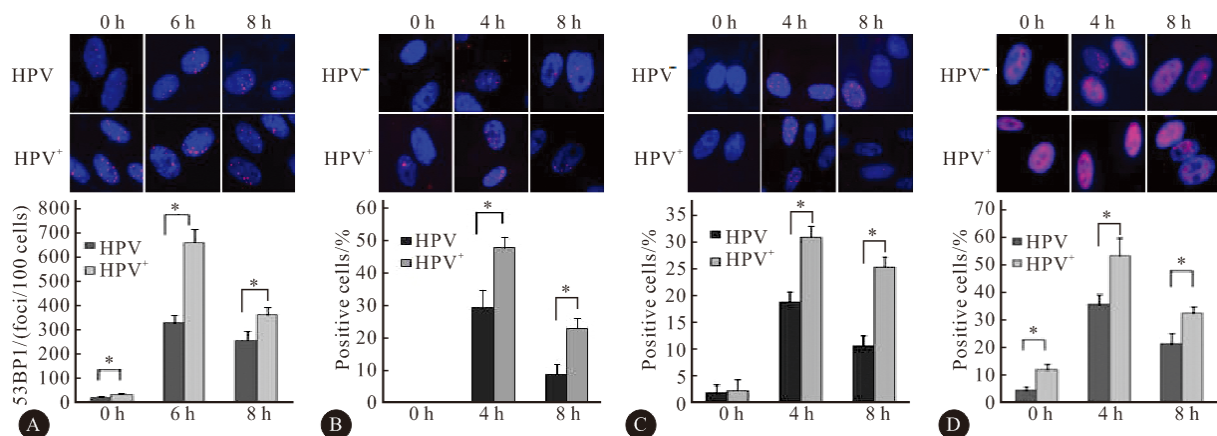


图 2 X 线照射后, HPV16 阴性与 HPV16 阳性细胞内 53BP1(A)、NBS1(B)、BRCA1(C)、RPA32(D) 灶点或阳性细胞比例的变化。间接细胞免疫荧光染色 $\times 1\ 000$

Fig 2 After X-ray irradiation, the change of 53BP1 (A), RPA32 (B), BRCA1 (C), NBS1 (D) in HPV16⁻ and HPV16⁺ cells. Immunohistochemical staining $\times 1\ 000$

A: 2 Gy; B-D: 5 Gy

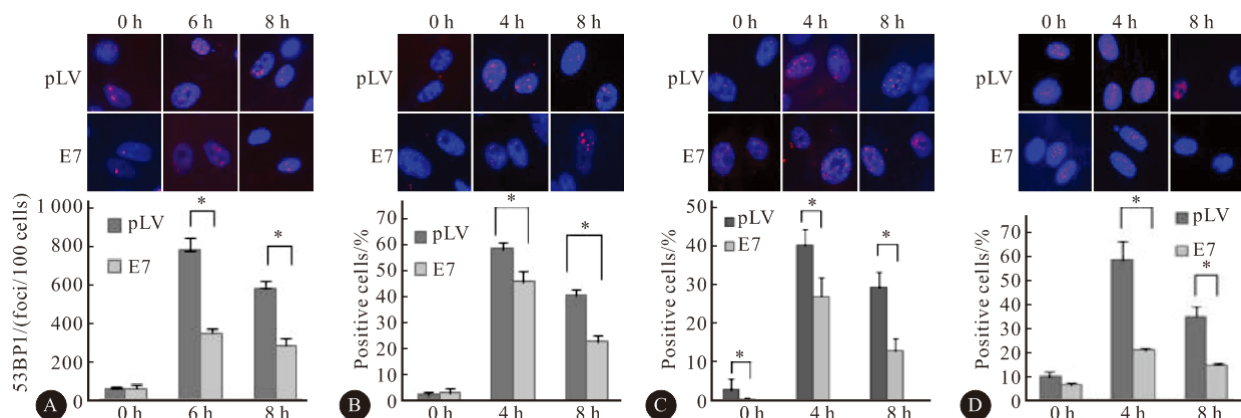


图 3 X 线照射后, pLV 或 E7 感染的细胞内 53BP1(A)、NBS1(B)、BRCA1(C)、RPA32(D) 灶点或阳性细胞比例的变化。间接细胞免疫荧光染色 $\times 1\ 000$

Fig 3 After X-ray irradiation, the change of 53BP1 (A), NBS1 (B), BRCA1 (C), RPA32 (D) in pLV or E7 lentivirus infected cells. Immunohistochemical staining $\times 1\ 000$

A: 2 Gy; B-D: 5 Gy

点数或阳性细胞比例均明显减少。实验结果显示射线照射后 E7 感染的细胞可能存在应激障碍, 细胞周期检验点分子不能受到激活进而迅速对 DNA 损伤点进行定位。

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个 DNA 损伤的积累过程, DNA 损伤包括 DNA 双链断裂, 碱基缺失、替换或插入等^[15]。这些改变能够共同作用, 在包括 HPV 相关的宫颈癌的许多上皮性肿瘤细胞中造成遗传学异常^[16]。当各种内源或外源性理化有害因

素造成 DNA 双链断裂后, 真核生物通过一系列复杂的信号转导通路激活 DNA 损伤反应启动修复程序, 同源重组修复(HR)和非同源末端连接(NHEJ)是 DNA 双链断裂的两条重要的修复通路, 其中 HR 在真核生物 DNA 修复中占主导地位^[17]。研究证实 HR 修复通路中, MRN 复合物(Mre11, Rad50, NBS1)^[18]能对 DNA 断裂末端进行切割加工, 暴露出 3'单链 DNA 的末端, 相对分子质量为 32×10^3 大小的 RPA32 包裹单链 DNA 中间体保护其稳定性从而进行进一步修复。ATM 与 ATR 通路的激活使众多下游分子发生磷酸化、泛素化等, 通过激

发、放大等启动 DNA 损伤级联反应,磷酸化 BRCA1,激活 p53 和下游检验点激酶(chk1 或 chk2),向 DNA 断裂点招募损伤修复蛋白质^[19-20]。53BP1 促使修复途径进入 NHEJ,而 BRCA1 能够竞争性抑制 53BP1 的作用使得修复机制进入 HR 途径^[21]。DNA 双链断裂修复途径在此过程中对于防止肿瘤的发生、发展起着至关重要的作用。DNA 双链断裂修复能够帮助恢复 DNA 序列的正常结构,从而维持复制、转录的准确性,保护遗传信息的相对稳定性。以上 DNA 损伤信号分子和 DNA 修复蛋白的失活或抑制都可能造成 DNA 损伤应答失调,造成 DNA 损伤的累积,增加细胞基因组不稳定性,促进肿瘤癌变进展。

各种理化因素均可造成细胞 DNA 损伤,其中离子射线造成的 DNA 双链断裂作为最严重的 DNA 损伤,能够诱导细胞凋亡。本研究中 0 h 未经处理细胞中均有 53BP1、RPA32、BRCA1、NBS1 的灶点聚集,提示细胞均有内源性 DNA 双链断裂,HPV16 阴性细胞中出现灶点表明其存在某些因素导致基因组不稳定性,如某些内源性因素包括细胞代谢过程如脱水、氧化等。经过 2 Gy(或 5 Gy)射线照射后 6 h(或 4 h),各细胞灶点数达到顶峰,表明射线造成的 DNA 双链断裂具有累积效应。HPV16 阳性细胞中 53BP1、NBS1、BRCA1 及 RPA32 灶点相对 HPV16 阴性细胞明显增多,同时部分细胞还出现泛核磷酸化,提示 HPV16 阳性细胞对射线有更高的敏感性,因此对离子射线有强烈的应激反应,大量灶点的聚集提示其可能存在 DNA 双链断裂修复障碍,RIECKMANN^[22] 和 KIMPLE 等^[23] 证实 HPV 阳性的上皮性肿瘤存在 DNA 双链断裂修复的延迟。pLV 感染细胞作为慢病毒感染细胞的阴性对照,其 53BP1、NBS1、BRCA1、RPA32 灶点明显多于 E7 感染细胞,提示 E7 感染细胞对射线的敏感性不如对照组强烈,E7 可能抑制了细胞 DNA 双链断裂修复反应 PARK 等^[24] 也有类似观点。说明可能有其他因素参与了 RPA32 在 DNA 双链断裂修复反应中的作用。经过 2 Gy(或 5 Gy)离子射线照射后 8 h,各组灶点数均明显减少,细胞已经启动修复程序,离子射线造成的 DNA 双链断裂减少。本实验结果表明 E7 抑制了细胞的 DNA 损伤应答,并且可能还有其他因素参与此过程。

大量研究证实 E7 作为 HPV 的重要致癌基因,在体内和体外均能够影响射线导致的细胞正常的 DNA 损伤反应,因此利用 CIN 的组织原代培养建

立一个基因不稳定性细胞模型研究具有重要的意义^[25],原代细胞特性相比细胞系更加贴近人体细胞。高危型 E7 癌蛋白能够结合视网膜母细胞瘤抑制蛋白(pRB)并促其降解,造成 E2F 转录因子的持续激活,造成凋亡失调,阻止细胞周期停滞,通过中心体复制错误和其他机制造成基因组不稳定性^[10]。有研究表明 HPV 高危型 E6 癌蛋白能与宿主细胞蛋白(E6AP)形成复合物,促进 p53 抑癌蛋白的降解。同时,E6 表达细胞因持续 S 期阻滞会造成复制叉的崩塌,DNA 双链断裂标记物的产生及对紫外杀伤力的敏感性增加。这些证据提示,E6 与 E7 共同参与细胞 DNA 双链断裂修复反应。近年来大量的研究和临床试验已经证实 DNA 双链断裂修复是抵抗癌症的关键因素^[26-27],E7 作为 HPV16 病毒持续高表达的癌基因,其在 DNA 损伤应答方面的作用受到广泛关注。表达 E7 癌蛋白的细胞内损伤 DNA 的持续累积和基因组不稳定性,增加了其癌变潜能和促进癌变进展。

本研究通过原代培养构建了基因不稳定性细胞模型,证实了 E7 在 DNA 损伤应答过程中的抑制作用,为进一步针对宫颈癌及癌前病变基因组不稳定性的预防或治疗手段提供了依据,但 E7 在 HPV 阳性肿瘤中的完整功能及其抑制 DNA 损伤应答反应的确切机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] MIRALLES-GURI C, BRUNI L, CUBILLA AL, *et al.* Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol*, 2009, 62(10): 870-878.
- [2] ABRAMOWITZ L, JACQUARD AC, JAROUD F, *et al.* Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDiTH V study. *Int J Cancer*, 2011, 129(2): 433-439.
- [3] GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(9): 709-720.
- [4] KADAJA M, SUMERINA A, VERST T, *et al.* Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J*, 2007, 26(8): 2180-2191.
- [5] SAUNDERS NA, FRAZER IH. Simplifying the molecular mechanisms of human papillomavirus. *Dermatol Clin*, 1998, 16(4): 823-827.
- [6] ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *I J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(9): 690-698.

- [7] ZUR HAUSEN H. Papillomavirus infections; a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1288(2): F55-F78.
- [8] DUENSING S, MUNGER K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res*, 2003(5): 383-391.
- [9] MUNGER K, HOWLEY PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 2002, 89(2): 213-228.
- [10] SLEBOS RJ, LEE MH, PLUNKETT BS, *et al.* P53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(12): 5320-5324.
- [11] DUENSING S, MUNGER K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 7075-7082.
- [12] LIU X, CLEMENTS A, ZHAO K, *et al.* Structure of the human papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 578-586.
- [13] BHOWMICK NA, NEILSON EG, MOSES HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004, 432(7015): 332-337.
- [14] KALLURI R, ZEISBERG M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401.
- [15] ZHANG Y, ROWLEY JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(9/10): 1282-1297.
- [16] HESELMAYER K, SCHROCK E, DU MANOIR S, *et al.* Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(1): 479-484.
- [17] KASS EM, HELGADOTTIR HR, CHEN CC, *et al.* Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(14): 5564-5569.
- [18] GILLESPIE KA, MEHTA KP, LAIMINS LA, *et al.* Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *J Virol*, 2012, 86(17): 9520-9526.
- [19] ROUSE J, JACKSON SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 2000, 2297(5581): 547-551.
- [20] PANIER S, BOULTON SJ. Double-strand break repair; 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 7-18.
- [21] TANG J, CHO NW, CUI G, *et al.* Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(3): 317-325.
- [22] RIECKMANN T, TRIBIUS S, GROB TJ, *et al.* HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*, 2013, 107(2): 242-246.
- [23] KIMPLE RJ, SMITH MA, BLITZER GC, *et al.* Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4791-800.
- [24] PARK JW, NICKEL KP, TORRES AD, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage. *Radiother Oncol*, 2014, 113(3): 337-344.
- [25] DUENSING S, MUNGER K. Mechanisms of genomic instability in human cancer; insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, 2004, 109(2): 157-162.
- [26] APARICIO T, BAER R, GAUTIER J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*, 2014(19): 169-175 [2015-04-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4051845/>. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.014.
- [27] DAY T, VAZIRI C. HPV E6 Oncoprotein Prevents Recovery of Stalled Replication Forks Independently of p53 Degradation. *Cell Cycle*, 2009, 8(14): 2138 [2015-02-15]. <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cc.8.14.9028?needAccess=true>.

(2016-01-14 收稿, 2016-07-03 修回)

编辑 汤洁