

致癌性 DNA 病毒的整合机制及致癌效应 *

喻正源^{1, 2)} 宋亚莉²⁾ 龚朝建²⁾ 曾朝阳^{1, 2, 3)} 卢建红²⁾

李小玲^{1, 2, 3)} 熊 炜^{1, 2, 3)**} 李桂源^{1, 2, 3)**}

(¹⁾ 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南省肿瘤医院, 长沙 410013;

(²⁾ 中南大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室及教育部癌变与侵袭原理重点实验室, 长沙 410078;

(³⁾ 中南大学湘雅三医院疾病基因组研究中心, 湖南省非可控性炎症与肿瘤重点实验室, 长沙 410013)

摘要 恶性肿瘤是一种严重危害人类生命和健康的疾病, 而致癌性 DNA 病毒是多种恶性肿瘤的主要致病因子。致癌性 DNA 病毒的整合可以使宿主细胞正常组织逐步向炎症组织转变, 并可导致癌变。病毒整合可引起宿主细胞基因组不稳定和重排, 产生新的融合基因, 并导致宿主基因表达异常, 也是病毒本身得以复制, 逃避宿主免疫识别并长期维系自我生存的机制之一。本文综述了目前对致癌性 DNA 病毒整合规律以及致癌性 DNA 病毒整合致癌效应的研究和进展, 并展望致癌性 DNA 病毒整合的研究方向以及在肿瘤发生、发展、诊断和治疗上的应用前景。

关键词 致癌性 DNA 病毒, 整合, 肿瘤, 基因组, 新一代测序技术

学科分类号 Q25, R730

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00554

致癌性 DNA 病毒一直以来在恶性肿瘤发病学方面扮演着重要角色。与动物或人类肿瘤相关的致癌性 DNA 病毒有五类: 乳 - 多 - 空病毒类, 如与人鳞状细胞癌以及宫颈癌发病相关的人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)^[1-2]等; 腺病毒类, 如与可以引发肉瘤的腺病毒(adenovirus)^[3]等; 疱疹病毒类, 如与人伯基特淋巴瘤和鼻咽癌密切相关的 EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)^[4-5]等; 乙型肝炎病毒类, 如与人类原发性肝细胞癌的发生有密切相关的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)^[6]; 痘病毒类^[7]。目前有 50 多种致癌性 DNA 病毒可以引起人类和动物肿瘤^[8-10]。已经明确是人类恶性肿瘤发生发展关键因子的 DNA 致癌病毒包括 HBV、EBV 和 HPV 等。尽管致癌性 DNA 病毒与人类恶性肿瘤的病因学关系仍未完全阐明, 但有大量研究证实, 这些致癌性 DNA 病毒可以感染进入宿主细胞后编码病毒蛋白^[11-15], 病毒蛋白可通过激活宿主细胞基因组原癌基因表达、调节细胞周期蛋白及抑制细胞凋亡等不同机制作用于细胞, 导致细胞恶性转化及肿瘤形成。同时亦有资料表明, 致癌性 DNA

病毒普遍还具有另外一种重要手段导致细胞癌变, 那就是致癌性 DNA 病毒在宿主细胞基因组上的整合。致癌性 DNA 病毒在宿主细胞基因组上的整合是致癌性 DNA 病毒长期进化过程中形成的一种重要的在宿主体内保存自我、维持在宿主细胞内长期感染并引起宿主细胞炎症或癌变的经典手段^[16-30]。致癌性 DNA 病毒在宿主细胞基因组上的整合的致癌性表现在多个方面, 致癌性 DNA 病毒(如 EBV、HBV、HPV 等)也可以整合进入宿主细胞基因组引起宿主细胞基因组不稳定, 导致染色体的倒位、易位、缺失以及重排, 从而使得宿主细胞

* 国家高新技术研究发展计划(863)(2012AA02A206), 国家“111”计划(111-2-12), 国家自然科学基金(81171930, 81171931, 81172189, 81272254, 81272298, 181372907, 91229122)和湖南省自然科学基金(14JJ1010)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 0731-84805383

熊 炜。E-mail: xiongwei@xysm.net

李桂源。E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2013-05-10, 接受日期: 2013-10-15

基因组结构出现异常^[28-33]。同时能够引起插入诱变导致宿主细胞关键抑瘤基因异常失活或瘤基因异常激活, 病毒整合也能够引起宿主细胞基因组的某些区域拷贝数变异, 间接影响宿主细胞某些关键瘤基因或抑瘤基因的表达水平^[34-39]。而病毒在宿主细胞基因组的整合过程中自身也会发生基因组的变异并改变其自身的生物学功能^[21-22, 28, 34, 40-42]。本文将以致癌性 DNA 病毒 EBV、HBV、HPV 为主, 介绍致癌性 DNA 病毒在肿瘤细胞基因组上的整合机制、整合模式、整合致癌效应以及研究致癌性 DNA 病毒整合方法学的研究进展, 并展望未来在致癌性 DNA 病毒整合机制的研究方向和热点。

1 致癌性 DNA 病毒整合的规律

1.1 致癌性 DNA 病毒的整合位点

致癌性 DNA 病毒的整合位点在目前的研究中已经有多例报道, 几乎在宿主细胞每条染色体上都能观察到它们的整合。尽管病毒在癌细胞中的整合位置表现出一定的随机性, 但还是发现了一些高频的整合位点。HPV 在整合过程中有一个整合位点在多个肿瘤组织和细胞系中被反复观察到, 即染色体的 8q24, 该区域存在著名的瘤基因 MYC^[20, 43-45]。HBV 在肝癌细胞的整合位点也有几个被多次报道, 这几个位点区域存在已经被证实与癌症发生发展紧密相关的基因 TERT^[46-47]、MLL4^[48-49]和 CCNE1^[50-51]。高建明等^[52]在 EBV 阳性的伯基特淋巴瘤细胞系 Raji 上面定位了多个 EBV 整合区域, 并指出在染色体 4q, 2q, 1q, 7q 为 EBV 整合的高频区域, 15 号以后的染色体及性染色体未发现 EBV 整合。我们通过收集中南大学湘雅医院 VCA-IgA 滴度高于 1:40 的鼻咽癌患者的鼻咽癌活检组织多例, 并采用构建鼻咽癌基因组文库的方法, 利用 EBV 的 BaMHI W 片段作为探针, 在 14, 15 号染色体上发现了 EBV 的整合。而通过 G 带 FISH 技术, 也在 EBV 阳性鼻咽癌患者的外周血中发现了 EBV 的整合。但是由于找寻到的整合位点过少, 不能进行统计分析 EBV 的整合位点的分布规律。在 HBV、HPV 和 EBV 以及其他某些能够整合的致癌性 DNA 病毒之间并没有发现共同的高频的整合位点, 这可能是几个方面的原因: 首先, 致癌性 DNA 病毒之间的序列千差万别, 病毒基因组长度大小不一, 不同病毒编码的病毒蛋白对宿主细胞造成的影响也不同, 而

病毒的整合并不是一个独立的行为, 病毒的整合往往伴随着病毒蛋白对宿主细胞持续的影响, 使得病毒的宿主细胞抵御病毒整合的能力存在差异, 而同一致癌性 DNA 病毒的不同亚型之间的整合位点以及整合频率也有区别^[31], 比如 HPV 的高致病亚型 HPV16 和 HPV18 在宿主细胞中的整合频率就高于 HPV 其他亚型。其次, 不同的致癌性 DNA 病毒整合的细胞组织类型也存在差异, 而不同的细胞组织存在不同转录活性的基因组区域, 导致宿主细胞基因组某些高转录区域暴露在病毒面前的概率增大。另外, 受传统的病毒学研究方法限制, 我们仅能找到病毒几个特定的整合位点, 某些病毒整合位点由于研究技术的限制而发生遗漏对我们在病毒整合位点的统计比较中也造成了干扰。这可能都是目前致癌性 DNA 病毒之间没有发现共同整合位点的因素。

1.2 致癌性 DNA 病毒的插入序列

目前, 对致癌性 DNA 病毒插入序列的研究发现, 致癌性 DNA 病毒可以是部分序列参与整合, 也可以是完整的致癌性 DNA 病毒全基因组序列。另外, 致癌性 DNA 病毒的插入序列与插入位点附近的人源基因组序列也存在一定的相关性。Dall 等^[16]在 HPV 整合研究中, 将 HPV 整合的病毒序列与整合位置相邻的人类 DNA 序列的关系分为 3 种。a. 微同源整合, 即病毒整合序列与相邻的人源序列存在 1~10 bp 左右的同源性。b. 非同源整合, 即病毒整合序列与相邻的人源序列不存在同源性。c. 在病毒序列和整合位置的人源序列中间还存在一段未知来源的 DNA 序列。而在 EBV 阳性的伯基特淋巴瘤细胞系 Raji 中, EBV 整合至染色体 6q15, 整合位点的 EBV 序列与相邻的人源序列存在 70% 的同源性^[23]。我们通过 G 带 FISH 技术也在 Raji 细胞系基因组这一区域发现了 EBV 的整合信号。这些研究提示, 致癌性 DNA 病毒的插入序列与整合位点相邻的人源序列的同源性可能是致癌性 DNA 病毒整合发生的一个重要条件。

致癌性 DNA 病毒的插入序列在致癌性 DNA 病毒基因组上并不是完全随机分布, 而是存在着不同的整合频率。比如致癌性 DNA 病毒 HBV 的基因组含有 4 个开放性阅读框。分别是 S 基因区、C 基因区、P 基因区和 X 基因区。国内学者对国内多例肝癌患者的多项研究证实, X 基因区的整合频率远高于其他基因区^[48]。随着对致癌性 DNA 病毒不

同基因区整合频率与致瘤性 DNA 病毒的致瘤效应研究的不断深入, 未来致瘤性 DNA 病毒不同基因区整合频率很有可能应用到临床, 成为判断与致瘤性 DNA 病毒相关疾病恶性程度的诊断以及预后的重要指标. 针对整合频率高的致瘤性 DNA 病毒某段基因区设计合适的分子靶向干预药物也将会很有应用前景.

Jayshree 等^[53]对印度肝癌患者的 HBV 整合研究发现, HBV 的 S 基因区在印度肝癌患者中 HBV 整合序列中出现频率最高. 该结果提示, 随着区域人种不同, 致瘤性 DNA 病毒插入序列也会存在差别. 这可能是由于地域的不同, 病毒的亚型会存在差异, 病毒的感染性、整合能力和整合序列存在区别. 另外, 不同地域的人种之间对某种疾病往往存在着不同的易感基因, 对抗病毒感染的能力也有区别, 但受制于以往的研究手段和研究规模, 我们目前对于不同人种对致瘤性 DNA 病毒整合是否存在不同的易感性、是否存在不同的致瘤性 DNA 病毒的敏感插入序列还了解甚少, 随着遗传流行病学研究技术的发展, 比如近几年全基因组关联研究 (genome wide association-studies, GWAS) 的大量运用, 以及对病毒整合易感遗传家系的采集, 相信在不久的将来这个重要科学问题的答案会慢慢浮出水面.

而致瘤性 DNA 病毒在整合过程中, 病毒插入序列自身也会出现变异的情况. Wang 等^[54]在多个存在 HBV 整合的肝癌样本中也发现了多个 HBV 整合序列出现 HBV 整合序列重排. Ikuta 等^[42]利用 P3HR-1 来源的 EBV 感染了 SVK 上皮细胞, 在后来的长期体外培养中, EBV 的游离体基因组已经完全丢失, 但是发现有 EBV 的序列片段整合进入了细胞基因组. 而进一步的研究发现, 整合进入的 EBV 序列与亲代的 P3HR-1 来源的 EBV 全基因组序列相比, 出现了多处重排突变等结构变异. 致瘤性 DNA 病毒的插入序列发生突变、变异和重排, 可能会使得致瘤性 DNA 病毒编码的一些基因功能发生改变. 这可能是致瘤性 DNA 病毒获取变异和进化的一种重要手段, 也可能是整合序列在宿主细胞基因组伪装和适应的结果. 致瘤性 DNA 病毒插入序列的变异, 也加深了我们对致瘤性 DNA 病毒整合这种经典的维系病毒长期潜伏感染和保存自我手段的理解.

2 致瘤性 DNA 病毒的整合对肿瘤细胞基因组转录组的影响

2.1 致瘤性 DNA 病毒整合引起肿瘤细胞的表型变化

伴随着致瘤性 DNA 病毒在宿主细胞染色体的整合, 肿瘤细胞基因组的不稳定性增加, 插入突变引起癌基因的异常高表达和抑癌基因的异常低表达, 肿瘤细胞的表型也往往会出现变化. 宫颈上皮细胞系 W12 是来自一位 HPV16 感染的低等级的鳞状宫颈上皮损伤的病人, 在早期培养时, 实验显示该细胞系中的 HPV 全部以游离体形式存在. 而在长期的体外培养过程中, HPV 的整合逐渐增多, 该细胞系的表型也由低等级的鳞状宫颈上皮损伤逐步变为高等级的鳞状宫颈上皮损伤, 并最终发展成为鳞状上皮细胞癌^[6]. 在 HBV 阳性的乙型肝炎患者中, 经常能够发现 HBV 的整合^[6]. 而在肝癌组织和肝癌癌旁组织中, 癌组织中的 HBV 整合位点明显高于癌旁组织^[48]. 我们认为, 当致瘤性 DNA 病毒整合达到一定程度, 宿主细胞基因组不稳定性持续增加, 以及病毒蛋白的持续影响, 宿主细胞组织的损伤逐步增大, 随着病毒长期的感染以及整合, 宿主的正常细胞组织也逐渐变为炎症组织, 并向非可控性炎症发展, 最终形成癌变. 这都提示致瘤性 DNA 病毒整合引起肿瘤细胞的表型变化是一个量变到质变的过程.

2.2 致瘤性 DNA 病毒整合对肿瘤细胞基因组的影响

致瘤性 DNA 病毒在宿主细胞染色体上的整合, 是致瘤性 DNA 病毒持续潜伏感染的一种重要方式, 与宿主细胞基因组不稳定性密切相关. Peter 等^[21]研究发现, 在宫颈癌中 HPV 的整合能够引起宿主细胞染色体高水平的不稳定性. Winder 等^[40]更进一步发现, 在宫颈癌中 HPV 的整合能够促使宿主细胞基因组双链 DNA 断裂, 从而使得宿主细胞基因组的不稳定性增加. 而在肿瘤细胞中致瘤性 DNA 病毒整合位点附近, 常常能够发现肿瘤细胞染色体的倒位和易位. Simon 等^[55]发现了 HBV 在肝癌组织和肝癌细胞系 Hep 40 细胞染色体上的整合, 并发现在肝癌组织中一号染色体的 1p36 位点存在异常, 而在正常肝细胞组织中却不存在这种情况. HBV 在宿主细胞基因组的整合, 也经常能够

造成宿主细胞不同长度大小的细胞基因组 DNA 片段的缺失。

致癌性 DNA 病毒整合与宿主细胞基因组异常紧密相关, 致癌性 DNA 病毒在宿主细胞长期的潜伏感染并对宿主细胞染色体进行整合, 使得宿主细胞染色体遭受断裂和损伤, 宿主细胞基因组的不稳定性持续提高, 并引起更大规模的宿主细胞基因组变异。而细胞基因组异常是肿瘤细胞的重要标志, 由此可见, 致癌性 DNA 病毒整合对宿主细胞的癌变具有重要意义。

2.3 致癌性 DNA 病毒整合对肿瘤细胞转录组的影响

致癌性 DNA 病毒对肿瘤细胞基因组的整合除了破坏宿主细胞基因组的结构, 使得宿主细胞基因组的不稳定性加强之外, 也经常会引起宿主细胞的转录异常。致癌性 DNA 病毒整合的一个经典事件是插入突变, 及由于致癌性 DNA 病毒整合导致宿主细胞某些基因的异常表达。其可能机制是: 由于病毒整合使得细胞基因组某些基因的启动子、增强子等的调控发生异常, 进而导致基因的异常表达。致癌性 DNA 病毒的插入突变, 常常引起宿主细胞某些癌基因的异常激活或高表达和某些抑癌基因的异常失活或低表达。

在 EBV 阳性的伯基特淋巴瘤细胞系 Raji 中, EBV 整合至宿主细胞染色体 6q15, EBV 的整合导致该位置附近的抑癌基因 BACH2 表达下调^[23]。而在另一株 EBV 阳性的淋巴瘤细胞系 NAB-2 中, EBV 整合至宿主细胞染色体 2p13, 该整合位点附近存在 2 个癌基因 REL 和 BCL11-A, 并且 REL 的表达显著上调^[56]。REL 基因编码经典的核转录因子 NF- κ B, 在多种淋巴瘤中都可以观察到 REL 的高表达。而在与 HPV 相关的一些生殖器肿瘤中, 经常可以观察到由于 HPV 整合而引起癌基因 MYC 的表达活化^[16]。MYC 基因可以促进细胞的增殖和永生性, 在多种肿瘤形成过程中处于重要地位。在致癌性 DNA 病毒整合过程中, 往往能够观察到一个有趣的现象, 由于整合导致病毒编码序列和宿主基因组编码序列乱排, 出现了病毒-人类融合基因^[19, 57]。但是这更可能是病毒整合过程中偶然发生的现象, 目前也没有对融合基因功能的进一步研究报道。致癌性 DNA 病毒整合引起肿瘤细胞转录异常表达, 使得细胞内多种基因表达紊乱, 打破了细胞内调控的动态平衡, 这些都是致癌性 DNA 病毒整合致癌的重要手段(图 1)。

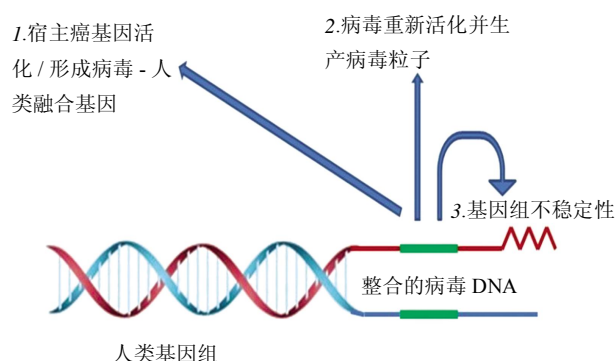


Fig. 1 Schematic representation of the hypothetical cellular consequences associated with oncogenic DNA virus

图 1 致癌性 DNA 病毒对肿瘤细胞基因组和转录组的影响示意图

致癌性 DNA 病毒在宿主细胞染色体上的整合对肿瘤细胞的影响。1: 整合引起的宿主细胞基因表达异常以及基因融合; 2: 整合进入的致癌性 DNA 病毒其基因的表达、复制以及病毒的包装和生产; 3: 整合引起的宿主细胞染色体不稳定以及重排。

3 技术的进步对致癌性 DNA 病毒整合研究的推动及进展

传统的研究致癌性 DNA 病毒整合的方法学, 比如我们通过 G 带 FISH 以及构建 EBV 阳性的鼻咽癌组织基因组文库的方法找寻 EBV 的整合位点, 仅仅只能得到在癌细胞上零散分布的几个整合位点, 不能从全基因组的角度来研究 EBV 的整合位点在宿主细胞基因组上的分布, 而受制于 EBV 基因组序列过长, 我们的 FISH 以及筛选基因组文库的 EBV 探针也仅仅只能覆盖到 EBV 基因组的很小一部分, 大量潜在的整合位点的信息由于研究方法的限制就白白漏掉了。而通过构建 EBV 阳性的鼻咽癌组织基因组文库来寻找 EBV 整合位点的方法, 也限制了我们的继续研究 EBV 整合位点对转录组影响的工作。这些技术限制使得我们不能从全基因组转录组层面全面分析病毒的整合规律以及病毒整合对宿主细胞基因组转录组的致癌效应。近年来, 在测序技术上的巨大进步为我们在致癌性 DNA 病毒整合机制研究提供了契机^[58-62]。2010 年, 在《科学》(Science)杂志出现了第一篇利用新一代测序技术对一个默克尔细胞瘤的病人癌组织进行转录组测序, 在后期的数据分析中, 意外发现了混合了

人类多瘤病毒编码序列和人源编码序列融合基因的转录本^[57]。进而对病人癌组织的基因组进行分析,发现了一个多瘤病毒在默克尔细胞瘤的整合,这掀开了新一代测序技术在病毒整合机制研究的大幕。2012年,相继出现2篇通过新一代测序技术对HBV相关的肝癌病人进行大规模的全基因组和转录组测序研究HBV整合机制的文章^[41,48], Jiang等^[41]通过对4例肝癌患者肿瘤组织和非肿瘤组织的基因组和转录组进行测序,找到了255个HBV的整合位点。在整合位点附近找到了多种形式的基因组异常。有整合对人源基因的直接破坏,病毒的启动子驱动人源转录本表达异常,病毒和人源转录本的融合,以及人源基因组DNA的拷贝数变异。研究结果提示,HBV的广泛整合可能提高了感染HBV个体的患癌几率。Sung等^[48]通过对81例HBV阳性的肝癌患者和7例HBV阴性的肝癌患者的癌组织和癌旁正常组织进行基因组和转录组的深度测序,发现肝癌组织中HBV的整合位点明显高于对应的癌旁正常组织。在整合位点附近拷贝数变异(CNVs)显著增加。大约40%的整合序列位于HBV的X基因区和C基因区。同时在超过4例患者癌组织的HBV整合位点上,通过新一代测序技术和经典的Sanger测序,验证了已经被多次报道和公认的几个著名的与肝癌相关的基因TERT、MLL4和CCNE1。RNA测序也证实,相对癌旁正常组织,癌组织中在整合位点上的这几个基因表达都存在上调。同时也证实了HBV整合位点数与患者生存期成负相关。这是目前为止对致癌性DNA病毒整合机制研究最大规模最为全面深入的报道。也给我们对其他致癌性DNA病毒整合机制的研究以及对临床治疗的指导提供了研究思路。比如针对病毒高频整合的某个基因设计对应的靶向治疗药物以及根据整合情况判断病人的预后和生存期等。相信随着第二代测序技术的普及和进步^[63-70],会有越来越多的利用测序技术研究致癌性DNA病毒整合的研究报道出现。

4 结 语

致癌性DNA病毒通过整合致癌的机制有多种,病毒的整合对宿主细胞形成了一个多方面的持续性的损伤。关于致癌性DNA病毒的基因序列整合到宿主细胞基因组的整合机制,目前有多种假说。然而绝大多数假说仅建立在对某个发现的整合位点的克隆序列进行分析的基础上,并没有严格地

设计特异性的实验来模拟致癌性病毒整合的过程,以及从宿主细胞全基因组层面观察致癌性病毒整合的位点和一些整合位点的整合频率。而致癌性DNA病毒在宿主细胞基因组上整合之后,往往伴随着人类基因组在该整合位点的基因组不稳定,从而使得该整合位点处的序列发生多样的变化,宿主细胞基因组自身也会发生突变和结构变异,这也扰乱了我们对致癌性DNA病毒整合机制的理解。如何客观有效地评估和分辨宿主细胞自身的变异和病毒整合引起的变异是急需解决的一个重要问题。感染了致癌性DNA病毒的人群,有的只是成为病毒携带者,而有的最终发展成为癌症患者,不同人群是否存在着对致癌性DNA病毒整合易感性,致癌性DNA病毒的整合是否在这其中扮演了关键角色,这都是非常值得深入研究的科学问题。近年来,microRNA^[71-73]和lncRNA^[74-76]的发现以及表观遗传学的迅猛发展拓宽了我们对人类基因组转录组调控的理解,以前,落在人类基因组非编码区的致癌性DNA病毒的整合位点往往被忽视,但是致癌性DNA病毒在人类基因组非编码区的整合是否影响了microRNA和lncRNA的表达和调控,以及致癌性DNA病毒的整合除了引起宿主细胞基因组序列发生变化之外,是否会引起宿主基因组的表观修饰变化,这些都有待我们进一步深入研究。一个好的致癌性DNA病毒整合动态模型的建立和一个好的从全基因组观察致癌性DNA病毒整合完整过程的方法和指标,都将是我们需要为之进行艰苦摸索的迫切问题。近几年,随着遗传流行病学研究方法的进步和新一代测序技术的不断发展,利用新一代测序技术对致癌性DNA病毒相关的肿瘤进行全基因组测序和转录组测序的联合应用,从而对致癌性DNA病毒在肿瘤细胞的整合以及整合引起的基因组转录组变异进行观察,也将从一个新的角度拓展我们对致癌性DNA病毒整合致癌机制的理解。对病毒整合易感家系的采集也显得尤为重要。致癌性DNA病毒在肿瘤细胞染色体上的整合以及致癌性DNA病毒在肿瘤发生中扮演的角色,还需要我们深入挖掘。

参 考 文 献

- [1] Bhat P, Mattarollo S R, Gosmann C, *et al.* Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunol Rev*, 2011, **239**(1): 85-98
- [2] Gravitt P E. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest*, 2011, **121**(12): 4593-4599

- [3] Lynch J P, 3rd, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, **32**(4): 494-511
- [4] Tsao S W, Tsang C M, Pang P S, *et al.* The biology of EBV infection in human epithelial cells. *Semin Cancer Biol*, 2012, **22**(2): 137-143
- [5] White R E, Ramer P C, Naresh K N, *et al.* EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J Clin Invest*, 2012, **122**(4): 1487-1502
- [6] Torres H A, Davila M. Reactivation of hepatitis B virus and hepatitis C virus in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, **9**(3): 156-166
- [7] Roth J R, Andersson D I. Poxvirus use a "gene accordion" to tune out host defenses. *Cell*, 2012, **150**(4): 671-672
- [8] Boshoff C. Ephrin receptor: a door to KSHV infection. *Nat Med*, 2012, **18**(6): 861-863
- [9] Yoo J Y, Pradarelli J, Haseley A, *et al.* Copper chelation enhances antitumor efficacy and systemic delivery of oncolytic HSV. *Clin Cancer Res*, 2012, **18**(18): 4931-4941
- [10] Kasman L, Onicescu G, Voelkel-Johnson C. Histone deacetylase inhibitors restore cell surface expression of the coxsackie adenovirus receptor and enhance CMV promoter activity in castration-resistant prostate cancer cells. *Prostate Cancer*, 2012, **2012**: 137163
- [11] Sabbah S, Jagne Y J, Zuo J, *et al.* T-cell immunity to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: recognition of primary effusion lymphoma by LANA-specific CD4⁺ T cells. *Blood*, 2012, **119**(9): 2083-2092
- [12] Zhang T, Zhang J, You X, *et al.* Hepatitis B virus X protein (HBx) modulates oncogene YAP *via* CREB to promote growth of hepatoma cells. *Hepatology*, 2012, **56**(6): 2051-2059
- [13] Hsu C H, Peng K L, Jhang H C, *et al.* The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. *Oncogene*, 2012, **31**(18): 2335-2349
- [14] Lavorgna A, Harhaj E W. EBV LMP1: New and shared pathways to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(7): 2188-2189
- [15] McClellan M J, Khasnis S, Wood C D, *et al.* Downregulation of integrin receptor-signaling genes by Epstein-Barr virus EBNA 3C *via* promoter-proximal and -distal binding elements. *J Virol*, 2012, **86**(9): 5165-5178
- [16] Dall K L, Scarpini C G, 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
- [17] Hafner N, Driesch C, Gajda M, *et al.* Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*, 2008, **27**(11): 1610-1617
- [18] Kalantari M, Villa L L, Calleja-Macias I E, *et al.* Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Int J Cancer*, 2008, **123**(8): 1832-1840
- [19] Kraus I, Driesch C, Vinokurova S, *et al.* The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. *Cancer Res*, 2008, **68**(7): 2514-2522
- [20] Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, *et al.* An *in vitro* multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res*, 2008, **68**(14): 5699-5705
- [21] Peter M, Stransky N, Couturier J, *et al.* Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol*, 2010, **221**(3): 320-330
- [22] Schmitz M, Driesch C, Beer-Grondke K, *et al.* Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. *Int J Cancer*, 2012, **131**(5): E593-602
- [23] Takakuwa T, Luo W J, Ham M F, *et al.* Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am J Pathol*, 2004, **164**(3): 967-974
- [24] Theelen W, Speel E J, Herfs M, *et al.* Increase in viral load, viral integration, and gain of telomerase genes during uterine cervical carcinogenesis can be simultaneously assessed by the HPV 16/18 MLPA-assay. *Am J Pathol*, 2010, **177**(4): 2022-2033
- [25] Williams V M, Filippova M, Soto U, *et al.* HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*, 2011, **6**(1): 45-57
- [26] Yhim H Y, Lee N R, Song E K, *et al.* The prognostic significance of tumor human papillomavirus status for patients with anal squamous cell carcinoma treated with combined chemoradiotherapy. *Int J Cancer*, 2011, **129**(7): 1752-1760
- [27] Zhang K, Li J T, Li S Y, *et al.* Integration of human papillomavirus 18 DNA in esophageal carcinoma 109 cells. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**(37): 4242-4246
- [28] Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, *et al.* Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog*, 2009, **5**(4): e1000397
- [29] Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2009, **286**(1): 60-68
- [30] Mason W S, Low H C, Xu C, *et al.* Detection of clonally expanded hepatocytes in chimpanzees with chronic hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2009, **83**(17): 8396-8408
- [31] Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, *et al.* Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*, 2008, **68**(1): 307-313
- [32] Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2009, **286**(1): 52-59
- [33] Feitelson M A, Reis H M, Tufan N L, *et al.* Putative roles of hepatitis B x antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. *Cancer Lett*, 2009, **286**(1): 69-79
- [34] Campitelli M, Jeannot E, Peter M, *et al.* Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e43393
- [35] Das P, Thomas A, Mahantshetty U, *et al.* HPV Genotyping and site of viral integration in cervical cancers in indian women. *PLoS One*, 2012, **7**(7): e41012

- [36] Ekeowa-Anderson A L, Purdie K J, Gibbon K, *et al.* AKT1 loss correlates with episomal HPV16 in vulval intraepithelial neoplasia. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e38608
- [37] Gray E, Pett M R, Ward D, *et al.* *In vitro* progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis. *Cancer Res*, 2010, **70**(10): 4081–4091
- [38] Ho C M, Lee B H, Chang S F, *et al.* Integration of human papillomavirus correlates with high levels of viral oncogene transcripts in cervical carcinogenesis. *Virus Res*, 2011, **161** (2): 124–130
- [39] Lace M J, Anson J R, Klussmann J P, *et al.* Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol*, 2011, **85**(4): 1645–1654
- [40] Winder D M, Pett M R, Foster N, *et al.* An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and *de novo* viral integration events. *J Pathol*, 2007, **213**(1): 27–34
- [41] Jiang Z S, Jhunhunwala S, Liu J, *et al.* The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res*, 2012, **22**(4): 593–601
- [42] Ikuta K, Ding M, Zhang F, *et al.* Epithelial cell retention of transcriptionally active, P3HR-1-derived heterogeneous Epstein-Barr virus DNA with concurrent loss of parental virus. *J Virol*, 2011, **85**(15): 7634–7643
- [43] Kim S H, Koo B S, Kang S, *et al.* HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*, 2007, **120**(7): 1418–1425
- [44] 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
- [45] Nakanishi G, Fujii K, Asagoe K, *et al.* Human papillomavirus genome integration in multifocal vulvar Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol*, 2009, **34**(8): e965–967
- [46] Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, *et al.* Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, 2003, **22**(25): 3911–3916
- [47] Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, *et al.* Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene*, 2001, **20**(43): 6233–6240
- [48] Sung W K, Zheng H, Li S, *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2012, **44**(7): 765–769
- [49] Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, *et al.* Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum Mutat*, 2008, **29**(5): 703–708
- [50] Etemadmoghadam D, George J, Cowin P A, *et al.* Amplicon-dependent CCNE1 expression is critical for clonogenic survival after cisplatin treatment and is correlated with 20q11 gain in ovarian cancer. *PLoS One*, 2010, **5**(11): e15498
- [51] Snijders A M, Nowee M E, Fridlyand J, *et al.* Genome-wide-array-based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases encompassing CCNE1 in fallopian tube carcinoma. *Oncogene*, 2003, **22** (27): 4281–4286
- [52] Gao J M, Luo X, Tang K, *et al.* Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J Virol Methods*, 2006, **136**(1–2): 193–199
- [53] Jayshree R S, Sridhar H, Devi G M. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an *in situ* hybridization study. *Cancer*, 2003, **99**(1): 63–67
- [54] Wang Y, Lau S H, Sham J S, *et al.* Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene*, 2004, **23**(1): 142–148
- [55] Simon D, Carr B I. Integration of hepatitis B virus and alteration of the 1p36 region found in cancerous tissue of primary hepatocellular carcinoma with viral replication evidenced only in noncancerous, cirrhotic tissue. *Hepatology*, 1995, **22**(5): 1393–1398
- [56] Luo W J, Takakuwa T, Ham M F, *et al.* Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest*, 2004, **84**(9): 1193–1199
- [57] Feng H, Shuda M, Chang Y, *et al.* Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 2008, **319**(5866): 1096–1100
- [58] Bras J, Guerreiro R, Hardy J. Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci*, 2012, **13**(7): 453–464
- [59] Treangen T J, Salzberg S L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet*, 2012, **13**(1): 36–46
- [60] Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(10): 685–696
- [61] Hawkins R D, Hon G C, Ren B. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(7): 476–486
- [62] Metzker M L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(1): 31–46
- [63] Tran B, Brown A M, Bedard P L, *et al.* Feasibility of real time next generation sequencing of cancer genes linked to drug response: Results from a clinical trial. *Int J Cancer*, 2013, **132**(7): 1547–1555
- [64] Carneiro M O, Russ C, Ross M G, *et al.* Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 375
- [65] Quail M A, Smith M, Coupland P, *et al.* A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 341

- [66] Zhang X, Davenport K W, Gu W, *et al.* Improving genome assemblies by sequencing PCR products with PacBio. *Biotechniques*, 2012, **53**(1): 61–62
- [67] Glenn T C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour*, 2011, **11**(5): 759–769
- [68] Zhao J, Grant S F. Advances in whole genome sequencing technology. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, **12**(2): 293–305
- [69] McCarthy A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology. *Chem Biol*, 2010, **17**(7): 675–676
- [70] Korlach J, Bjornson K P, Chaudhuri B P, *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods Enzymol*, 2010, **472**: 431–455
- [71] Iorio M V, Croce C M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*, 2012, **4**(3): 143–159
- [72] Pritchard C C, Cheng H H, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*, 2012, **13**(5): 358–369
- [73] Wang L, Wang J. MicroRNA-mediated breast cancer metastasis: from primary site to distant organs. *Oncogene*, 2012, **31** (20): 2499–2511
- [74] Pan Y F, Feng L, Zhang X Q, *et al.* Role of long non-coding RNAs in gene regulation and oncogenesis. *Chin Med J (Engl)*, 2011, **124**(15): 2378–2383
- [75] Morris K V, Vogt P K. Long antisense non-coding RNAs and their role in transcription and oncogenesis. *Cell Cycle*, 2010, **9** (13): 2544–2547
- [76] Mercer T R, Dinger M E, Mattick J S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*, 2009, **10**(3): 155–159

The Mechanism and Tumorigenesis of Oncogenic DNA Virus Integration*

YU Zheng-Yuan^{1,2}, SONG Ya-Li², GONG Zhao-Jian², ZENG Zhao-Yang^{1,2,3},
LU Jian-Hong², LI Xiao-Ling^{1,2,3}, XIONG Wei^{1,2,3}**, LI Gui-Yuan^{1,2,3}**

⁽¹⁾ Hunan Provincial Tumor Hospital and The Affiliated Tumor Hospital of Xiangya School of Medicine,
Central South University, Changsha 410013, China;

⁽²⁾ Key Laboratory of Carcinogenesis of Ministry of Health and Key Laboratory of Carcinogenesis and Cancer Invasion of Ministry of Education,
Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

⁽³⁾ Hunan Key Laboratory of Nonresolving Inflammation and Cancer, Disease Genome Research Center,
the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract Cancer is one kind of diseases which seriously jeopardized the health of human beings. Oncogenic DNA virus is a leading factor for many kinds of cancer. Virus DNA integration could cause host cell organization inflammation and tumorigenesis. Its integration could induce the host genome instability and rearrangement. It could also cause the alterations of host transcriptome such as viral promoter driven human transcription, viral-human transcription fusion and form new fusion gene, and the host gene expression change. Meanwhile, it's one of the mechanisms for virus replication, escape the host immunological recognition and maintain itself. The review focus on the research and the progress of the oncogenic DNA virus integration regulation and the carcinogenic effect of its integration. We also prospect the oncogenic DNA virus integration research direction and the application on the cancer occurrence, development, diagnose and therapy.

Key words oncogenic DNA virus, tumor, integration, genome, the next generation sequence technology

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00554

* This work was supported by grants from The National High Technology Research and Development Program of China(863)(2012AA02A206), 111 Project (111-2-12), the National Natural Science Foundation of China (81171930, 81171931, 81172189, 81272254, 81272298, 181372907, 91229122), Hunan Province Natural Sciences Foundation of China (14JJ1010).

**Corresponding author. Tel: 86-731-84805383

XIONG Wei. E-mail: xiongwei@xysm.net

LI Gui-Yuan. E-mail: ligy@xysm.net

Received: May 10, 2013 Accepted: October 15, 2013