

[文章编号] 1007-385X(2007)04-0342-05

抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞端粒酶活性的影响及其机制

饶智国^{1*}, 张积仁², 郑燕芳²(1. 广州军区武汉总医院 肿瘤科, 武汉 430070; 2. 南方医科大学 珠江医院 肿瘤中心, 广州 510282)

[摘 要] 目的: 研究抗 HPV16E6 核酶(Ribozyme)对宫颈癌 CaSKi 细胞端粒酶活性的抑制及其机制。方法: 以脂质体法将抗 HPV16E6-Ribozyme、空载体质粒分别导入 CaSKi 细胞, 命名为 CaSKi-R、CaSKi-P 细胞。点杂交检测核酶在细胞中的表达, Western blotting 法检测 3 种细胞 HPV16E6 蛋白的表达, 用 TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性, 用 RT-PCR 法检测 P53、c-myc、hTERT 和 hRT 的表达。结果: 点杂交证实核酶能在 CaSKi-R 细胞中稳定表达, Western blotting 证实 CaSKi-R 中表达 E6 蛋白较 CaSKi-P、CaSKi 明显降低。CaSKi、CaSKi-P、CaSKi-R 3 种细胞的端粒酶活性值分别为(0.89 ± 0.14)、(0.90 ± 0.11)、(0.36 ± 0.06), 转染了抗 HPV16E6 核酶的 CaSKi-R 细胞端粒酶活性的抑制率为 59.55%, 与 CaSKi、CaSKi-P 细胞比较明显下降($P < 0.01$)。与 CaSKi 和 CaSKi-P 细胞相比, CaSKi-R 细胞表达 c-myc、hTERT mRNA 明显减少, P53、hRT mRNA 表达无明显变化。结论: 抗 HPV16E6 核酶明显抑制 CaSKi-R 细胞端粒酶活性, 其机制可能与 HPV16 的 E6 蛋白及 c-myc、hTERT mRNA 减少有关。

[关键词] 核酶; 人乳头状瘤病毒; 端粒酶; 子宫颈肿瘤

[中图分类号] R730.5 [文献标志码] A

Effects of anti-HPV16E6-ribozyme on telomerase activity in cervical carcinoma cells and the related mechanisms

RAO Zhi-guo^{1*}, ZHANG Ji-ren², ZHENG Yan-fang²(1. Department of Oncology, Wuhan General Hospital of PLA Guangzhou Military Area Command, Wuhan 430070, China; 2. Center of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of HPV16E6-ribozyme on telomerase activity in cervical carcinoma cell line CaSKi and the related mechanisms. **Methods:** Anti-HPV16E6-ribozyme and blank eucaryotic plasmids were transfected into CaSKi cells *via* lipofectin, and the resultant cells were named as CaSKi-R and CaSKi-P, respectively. The expression of ribozyme in transfected cells was observed by RNA dot blotting. The expression of E6 mRNA and protein in the 3 kinds of cells were detected by Northern blotting and Western blotting, respectively. Telomerase activity was determined by TRAP-Elisa method; the expression of P53, c-myc, hTERT and hRT mRNA were examined by RT-PCR. **Results:** RNA dot blotting showed that anti-HPV16E6-ribozyme was stably expressed in transfected CaSKi-R cells. Western blotting showed that the expression of E6 mRNA and protein in CaSKi-R cells was obviously lower than that in CaSKi and CaSKi-P cells. The telomerase activities in CaSKi, CaSKi-P and CaSKi-R cells were (0.89 ± 0.14), (0.90 ± 0.11) and (0.36 ± 0.06), respectively. The inhibitory rate of telomerase activity in CaSKi-R cells was 59.55%, which was significantly lower than those in CaSKi and CaSKi-P cells ($P < 0.01$). The expression of c-myc and hTERT mRNA in CaSKi-R cells was lower than that in CaSKi and CaSKi-P cells; the expression of P53 and hRT mRNA remained unchanged. **Conclusion:** Anti-HPVE6-rivozyme can obviously inhibit the telomerase activity in CaSKi-R cells, which might be associated with decline of HPV16 E6 protein and c-myc, hTERT mRNA expression in CaSKi-R cells.

[Key words] ribozyme; human papillomavirus; telomerase; cervical neoplasms

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4): 342-346]

已证实人类宫颈肿瘤的发生、发展与致癌性人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染密切相关。其中最常见 HPV 的致癌亚型是 HPV16 型, 而 E6、E7 基因是其致癌基因^[1-3]。端粒酶(te-

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 96058)。Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 96058)

[作者简介] 饶智国(1965-), 男, 湖北省咸宁市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

* Corresponding author. E-mail: raozhiguog99@sohu.com

lomease)是一种由 RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP),其 RNA 的组分自带模板指导从头合成端粒顺序,因此端粒酶是一种 RNA 依赖的 DNA 聚合酶^[4]。端粒酶活性(telomerase activity, TA)是细胞获得永生化的必要途径,是细胞恶性转化的基础,人类 70%~95% 的恶性肿瘤端粒酶活性增高,而癌旁或正常组织端粒酶无或低表达^[5-7]。研究表明,HPV16E6 可以调节端粒酶活性,用 HPV16 或 HPV18 转染人包皮角质细胞,转化后的细胞出现永生化的端粒酶活性明显增加,因此降低端粒酶活性是肿瘤治疗的一个新靶点^[8]。为此,本实验将抗 HPV16E6 的核酶(Ribozyme)转染入宫颈癌细胞 CaSKi,阻断癌基因 E6 的表达,探讨抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌细胞 CaSKi 端粒酶活性、端粒酶催化亚单位(hTERT)的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

抗 HPV16E6 核酶由本室设计、克隆并在体外鉴定其活性。pcDNA3 为无目的基因的真核表达质粒,pc16HRz 为抗 HPV16E6 核酶的真核表达质粒,由本室构建保存,将其转化 JM105 受体菌,大量制备并纯化。CaSKi 细胞为 HPV16 阳性的人宫颈癌细胞株,本室传代培养。HPV16E6 核酶和 HPV16E6 探针由中科院上海生物化学研究所合成,HPV16E6 核酶的基因序列为 TATCATGTACTGATGAGTCCGT-GAGGACGAAAGTTGTTTG。E6 蛋白单克隆抗体(鼠抗人 IgG)和 FITC 标记的羊抗鼠二抗均购自北京中山生物技术有限公司。引物均由上海生物工程有限公司和上海博亚生物技术有限公司合成。端粒酶检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品,光密度值检测采用美国 ERMA INA 公司酶标仪($\Sigma 960$)。DNA 分子质量标准(2 kb)Marker 为中山大学生物工程中心自制,DNA Marker DL2000 和 One Step RNA PCR Kit(AMV)购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 转染 CaSKi 细胞

以脂质体法将 pc16HRz、pcDNA3 分别转染 CaSKi 细胞,以 G418(400~800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)抗性筛选,将阳性克隆细胞扩增并保存,分别命名为 CaSKi-R、CaSKi-P 细胞。

1.3 Dot blotting 检测抗 HPV16E6 核酸在 CaSKi-R 细胞中的表达

提取细胞总 RNA,取 RNA 样品 5 μl ,加 10 μl 甲酰胺,3.5 μl 39% 甲醛,1 μl 20 \times SSC,混合后置

68 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min,然后取出迅速放入冰浴。取一硝酸纤维素膜用铅笔标好位置,逐个将 RNA 样品点入相应位置,室温凉干后置 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h,与³²P 标记的抗 HPV16E6 核酸探针进行点杂交。

1.4 Northern blotting 检测 HPV16E6 RNA 的表达

提取细胞总 RNA,以³²P 标记的 E6 探针和 β -actin 探针进行 Northern blotting 杂交。杂交后对各条带进行密度灰度扫描,分析其 RNA 表达量差异。

1.5 Western blotting 检测 HPV16E6 蛋白的表达

取对数生长期的 3 种细胞,加入细胞裂解缓冲液($5 \times 10^8/\text{ml}$),冰上超声粉碎 30 min,吸上清即为细胞总蛋白。以考马斯亮蓝法测定提取液蛋白浓度,取 30 μg 蛋白进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至硝酸纤维素膜上,加入用封闭液稀释的 1:2 000 抗 HPV16E6 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入 1:300 封闭液稀释的 HRP 标记二抗 18~24 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,将膜投入显色底物液显色。

1.6 TRAP-ELISA 法检测细胞端粒酶活性

各组收集 1×10^6 细胞,按照试剂盒所提供的使用说明进行操作,用酶标仪测定 450 nm 和 655 nm 的光密度值(D),根据 $D = D_{450} - D_{655}$ 计算。

1.7 RT-PCR 检测各组细胞中 P53、c-myc、hTERT、hTR、 β -actin 的表达

1.7.1 引物设计 首先设计 P53、c-myc、hTERT、hTR、 β -actin 引物,再采用 RT-PCR 检测各组细胞中 P53、c-myc、hTERT、hTR、 β -actin 的表达。5 种基因的引物见表 1。

表 1 P53、c-myc、hTERT、hTR 和 β -actin 的引物

Tab. 1 Primer of P53, c-myc, hTERT, hTR and β -actin

Gene	Primer	bp
P53	5'-AGC ATC TTA TCC GAG TGG AAG G 3'	252
	5'-CAC AAA CAC GCA CCT CAA AGC 3'	
C-myc	5'-CGG ACG AGA CCT TCA TC-3'	520
	5'-GCT GTG AGG AGG TTT GT-3'	
hTERT	5'-CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3'	144
	5'-GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3'	
hTR	3'-GAA GGG CGT AGG CGC CGT GCT TTT GC-5'	111
	3'-GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AGG-5'	
β -actin	5'-ATC TGG CAC CAC ACC TCC TAC AAT GAC CTG CG-3'	839
	3'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-5'	

1.7.2 RT-PCR 检测各组细胞中 P53、c-myc、hTERT、hTR、 β -actin 的表达情况 50 μl PCR 体系

中,10 × One Step RNA PCR 缓冲液 5 μl,25 mmol/L MgCl₂ 10 μl,10 mmol/L dNTP 5 μl ,RNA 酶抑制剂 (40 U/μl) 1 μl ,逆转录酶 AMV Rtase XL(5 U/μl) 1 μl , Taq 酶 (5 U/μl) 1 μl ,上下游引物各(20 μmol/L) 各 1 μl,总 RNA 1 μl,去 RNA 酶水加至总量为 50 μl。50 °C 30 min,94 °C 2 min,而后 94 °C 30 s,50 ~60 °C 30 s,72 °C 90 s,总计 30 个循环。8 μl PCR 产物上样,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察扩增片段并拍照,并将电泳带灰度扫描进行定量检测。

1.8 统计学处理

统计用 SPSS10.0 软件完成。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行方差分析。

2 结果

2.1 抗 HPV16E6 核酶在 CaSKi-R 细胞中的稳定表达

抽提 CaSKi-R 细胞总 RNA,与 ³²P 标记的抗 HPV16E6 核酶探针进行点杂交,以体外转录的核酶作为阳性对照,以 CaSKi-P 细胞 RNA 作为阴性对照。结果证实,抗 HPV16E6 核酶在 CaSKi-R 细胞中能稳定表达(图 1)。

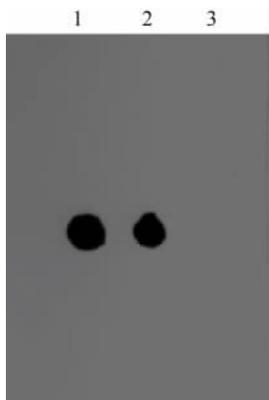


图 1 Dot blotting 检测抗 HPV16E6 核酶在 CaSKi-R 细胞中的表达

Fig.1 Expression of anti-HPV16E6 ribozyme in CaSKi-R cells detected by Dot blotting

1: Positive control(synthetic ribozyme); 2: RNA from CaSKi-R cell transfected with pc16HRz containing anti-HPV16E6-ribozyme; 3: RNA from CaSKi-P cell transfected with pcDNA3 plasmid without anti-HPV16E6-ribozyme

2.2 3 种细胞中 HPV16E6 RNA 表达水平的变化

在 CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P 等 3 种细胞中 β -actin RNA 表达量相近,密度灰度值分别为 269 448、276 513、266 694,说明总 RNA 量相当。而

CaSKi、CaSKi-R、CaSKi-P 中 E6 杂交带的灰度值分别为 333 422、137 204、350 011, CaSKi-R 中 HPV16E6 RNA 的表达较 CaSKi-P、CaSKi 明显降低 ($P < 0.01$, 图 2)。

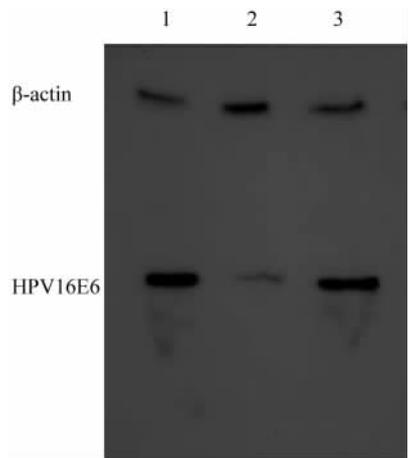


图 2 Northern blotting 检测 3 种宫颈癌细胞中 HPV16E6 RNA 的表达

Fig.2 Northern blotting analysis of HPV16E6 RNA expression in three cervical cancer cells

1: RNA from CaSKi cell containing HPV16; 2: RNA from CaSKi-R cell transfected with pc16HRz containing anti HPV16E6-ribozyme;3: RNA from CaSKi-P cell transfected with pcDNA3 plasmid without anti-HPV16E6-ribozyme

2.3 Western blotting 检测 3 种细胞中 HPV16E6 蛋白的表达

如图 3 所示,CaSKi-R 的 HPV16E6 蛋白的表达量较 CaSKi、CaSKi-P 细胞明显减少,表明转染到 CaSKi-R 细胞内的抗 HPV16E6 核酶已有效切割 HPV16E6 mRNA,从而减少了 E6 蛋白的表达。

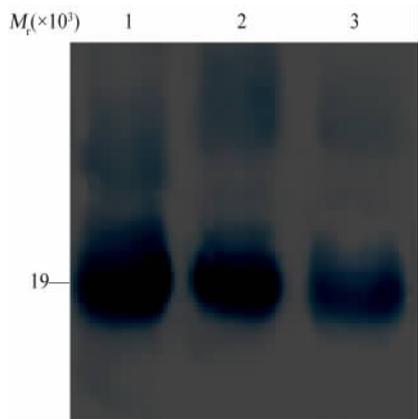


图 3 Western blotting 检测 3 种宫颈癌细胞中 HPV16E6 蛋白的表达

Fig.3 Western blotting analysis of HPV16E6 protein in three cervical cancer cells

A:CaSKi cell; B:CaSKi-P cell; C:CaSKi-R cell

2.4 TRAP-ELISA 法检测 3 种细胞端粒酶活性的变化

端粒酶产物 ELISA 定量检测结果显示, CaSKi, CaSKi-P, CaSKi-R 等 3 种细胞端粒酶活性的光密度值分别为(0.89 ± 0.14)、(0.90 ± 0.11)、(0.36 ± 0.06), 转染了抗 HPV16E6 核酶的 CaSKi-R 端粒酶活性的抑制率为 59.55%。经统计学处理, CaSKi-R 的端粒酶活性较 CaSKi, CaSKi-P 细胞明显下降($P < 0.01$), CaSKi 和 CaSKi-P 两者比较无明显差异($P > 0.05$)。

2.5 抗 HPV16E6 核酶对宫颈癌 CaSKi 细胞中 P53、c-myc、hTERT、hRT 等基因的影响

以 RT-PCR 检测 3 种细胞中 P53、c-myc、hTERT 和 hRT mRNA 的表达, 将上述 RT-PCR 的结果进行灰度扫描分析, 将 P53、c-myc、hTERT、hRT 各条带灰度值分别与各自的 β -actin 灰度值相比, 该比值可代表 P53、c-myc、hTERT、hRT mRNA 在细胞中的表达。扫描结果如图 4 所示, 与 CaSKi 和 CaSKi-P 细胞相比, CaSKi-R 细胞表达 c-myc、hTERT mRNA 明显减少($P < 0.01$), P53、hRT mRNA 表达无明显变化($P > 0.05$)。

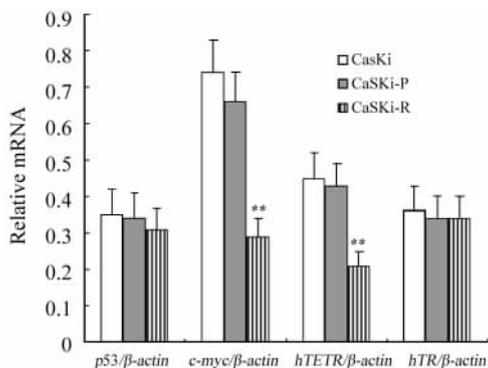


图 4 3 种细胞中 P53、c-myc、hTERT、hRT mRNA 表达的差异

Fig. 4 Different expression of P53, c-myc, hTERT, hRT mRNA in three kinds of cells

** $P < 0.01$ vs CaSKi cells or CaSKi-P cells

3 讨论

HPV 在宫颈癌发生、发展及恶性表型的维持中起着重要作用, 50% ~ 80% 的宫颈癌与 HPV16 相关, E6、E7 是其癌基因。HPV E6 基因编码的 HPV E6 蛋白主要分布于宿主细胞的细胞膜和细胞核, 约由 150 个氨基酸组成。HPV E6 蛋白的 C 端及 N 端在与 P53 的相互作用中起重要作用, C 端与 P53 特异结合, N 端是 P53 降解所必需的。

核酶是一类具有酶活性 RNA 分子, 可以序列特异地与靶 RNA 分子配对, 对底物进行切割, 降解 mRNA, 使其失去生物学功能。与反义 RNA 相比, 核酶不仅具有封闭 mRNA 的功能, 而且具有切割 mRNA 的功能。

本课题前期的研究已证实 HPV16E6 核酶在体外能有效切割 HPV16E6 基因^[9]。本研究通过脂质体法将抗 HPV16E6-Ribozyme、空载体质粒分别导入宫颈癌 CaSKi 细胞, 通过点杂交检测证实核酶在细胞中的能够稳定表达, Northern blotting 杂交证实转染核酶的 CaSKi-R 细胞 E6 基因的表达明显减少, Western blotting 法证实转染核酶的 CaSKi-R 细胞 E6 蛋白表达量明显减少, 表明转染到 CaSKi-R 细胞内的抗 HPV16E6 核酶已有效切割, HPV16E6 mRNA 表达量减少, 从而减少 E6 蛋白的合成。

本研究发现, 端粒酶产物 ELISA 定量检测结果显示, CaSKi, CaSKi-P, CaSKi-R 3 种细胞的光密度值分别为(0.89 ± 0.14)、(0.90 ± 0.11)、(0.36 ± 0.06), 转染了抗 HPV16E6 核酶的 CaSKi-R 的端粒酶活性的抑制率为 59.55%。与 CaSKi 细胞和 CaSKi-P 细胞比较, CaSKi-R 细胞的端粒酶活性明显降低($P < 0.01$)。

为了进一步探讨抗 HPV16E6 核酶导入 CaSKi 细胞导致端粒酶下降的可能原因, 本实验用 RT-PCR 方法检测了多种端粒酶的相关基因, 结果表明与 CaSKi 和 CaSKi-P 细胞相比, CaSKi-R 细胞表达 c-myc、hTERT mRNA 明显减少, P53、hRT mRNA 表达无明显变化。

HPV16 E6 蛋白通过与 P53 蛋白结合经泛素途径使其降解, 从而使 P53 不能发挥其正常的抑癌作用^[3, 10-11]。所以 HPV16 E6 蛋白降解 P53 是在蛋白水平, 而不是 mRNA 水平。本研究表明 P53 mRNA 表达在 3 种细胞中无明显差别, 而转染了抗 HPV16E6 核酶的 CaSKi-R 细胞的 P53 蛋白表达却明显减少, 也进一步证实了 HPV16 E6 蛋白降解 P53 是在蛋白水平, 而不是 mRNA 水平。

抗 HPV16E6 核酶导入 CaSKi 细胞使 CaSKi-R 细胞 E6 基因的表达明显减少, 从而导致 HPV16 E6 蛋白的表达减少, 同时伴有 CaSKi-R 细胞端粒酶活性的明显降低, 表明 E6 蛋白不仅在诱导端粒酶活性方面是必要的, 而且对端粒酶活性维持十分重要, 这一结果与 Lee^[12]等的研究结果相似。

研究发现人端粒酶包括 3 个重要部分^[13], 即人端粒酶 RNA (human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白 (human telomerase associated protein, TP1/

TLPI)和人端粒酶催化亚单位(human telomerase catalytic subunit, hTRT, 或 hTERT)。在体外将 hTERT 转录翻译后与 hTR 重组,表现出端粒酶活性;改变 hTERT 中氨基酸,端粒酶活性将减低或消失;将 hTERT 导入人体正常细胞,端粒酶活性被诱导激活。hTERT 的表达是端粒酶活性的主要限制性因素,表达水平与端粒酶活性直接相关^[14-16]。所以,在新生和永生化细胞端粒酶的活化过程中,hTERT 转录的从头激活可能是一主要的限速步骤,而这一步骤又受多种癌基因和抑癌基因产物调控。

研究发现,HPV E6 蛋白通过增加端粒酶催化亚单位基因的转录而增加角化细胞的端粒酶活性。E6 蛋白在诱导和维持宫颈癌细胞高水平 hTERT 的上起着关键性的作用,主要是通过两条通道:一个是 E6 直接活化 hTERT 启动子,另一条是通过 P53 蛋白的抑制间接地活化 hTERT 启动子。另有研究表明,在人的角化细胞和乳腺上皮细胞,HPV16 E6 通过介导内源性 c-myc 的转录后修饰而显著诱导端粒酶活性^[17]。

在 hTERT 启动子的近端有两个重要的 *E-box* 成分,无论在正常细胞和癌细胞,*C-myc* 的过度表达可以依赖 *E-box* 的方式诱导 hTERT mRNA 的表达。在人的上皮细胞和成纤维细胞,*c-myc* 表达诱导内源性 *TERT* 基因的转录导致细胞的端粒酶活化和端粒的稳定。*c-myc* 表达诱导正常和肿瘤细胞的 *TERT* 和端粒酶活化在很多实验被证实^[17-19]。

综上所述,抗 HPV16E6-Ribozyme 导入 CaSKi 细胞, CaSKi-R 细胞的 HPV16 E6 蛋白减少,经泛素途径降解的 P53 蛋白减少,细胞内的 P53 蛋白量表达增加, c-myc、hTERT mRNA 明显减少,最终导致 CaSKi-R 细胞的端粒酶活性降低。具体的影响途径有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Rajaram S, Gupta G, Agarwal S, *et al.* High-risk human papillomavirus, tumor suppressor protein p53 and mitomycin-C in invasive squamous cell carcinoma cervix [J]. Indian J Cancer . 2006, 43 (4): 156-162.

[2] Jeronimo J, Massad LS, Schiffman M, *et al.* Visual appearance of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection and type [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(1): 47-48.

[3] Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, *et al.* Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions [J]. Int J oncol, 2007, 30(4): 813-823.

[4] 卫立辛,吴孟超. 端粒酶: 肿瘤治疗研究的新希望 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(5):325-328.

[5] Shan YS, Hsieh YH, Lin PW. Telomerase activity in tumor and remnant liver as predictor of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma after resection [J]. World J Surg, 2007, 31(5): 1121-1128.

[6] Sampedro CF, Cano SG, Sampedro SF, *et al.* Telomerase and telomere dynamics in ageing and cancer: current status and future directions [J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(3): 145-154.

[7] Okumura A, Mizuno I, Nagakawa O, *et al.* Telomerase activity is correlated with lower grade and lower stage bladder carcinomas [J]. Int J Urol. 2004, 11(12):1082-1086.

[8] Steenbergen RD, Walboomers JM, Meijer CJ, *et al.* Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q [J]. Oncogene, 1996, 13 (6): 1249-1257.

[9] 郑燕芳,张积仁,屈良鹤,等. 抗 HPV16E6 核酶的原核表达与体外活性研究 [J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2000, 20(1): 79-82.

[10] Liu Y, Heilman SA, Illanes D, *et al.* p53-independent abrogation of a postmitotic checkpoint contributes to human papillomavirus E6-induced polyploidy [J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2603-2610.

[11] Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma [J]. Br J Cancer, 1999, 80(12): 2008-2018.

[12] Lee CJ, Suh EJ, Kang HT, *et al.* Induction of senescence-like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV16 DNA [J]. Exp Cell Res, 2002, 277(2): 173-182.

[13] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al.* Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer [J]. Cancer Res, 1998, 58(7): 1558-1561.

[14] Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, *et al.* Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(4): 1245-1256.

[15] James MA, Lee JH, Klingelhuiz AJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner [J]. J Virol, 2006, 80(11): 5301-5307.

[16] Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, *et al.* Reconstitution of human telomerase activity *in vitro* [J]. Curr Biol, 1998, 8(3): 177-180.

[17] Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. An update [J]. Mutat Res, 2000, 462(1): 31-47.

[18] Li H, Xu D, Li J, *et al.* Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-myc and the hTERT gene [J]. J Biol Chem, 2006, 281(35): 25588-25600.

[19] Seo EJ, Kim HJ, Lee CJ, *et al.* The role of HPV oncoproteins and cellular factors of hTERT expression in cervical carcinoma cells [J]. Gynecol Oncol, 2004, 94(1): 40-47.

[收稿日期] 2007-06-15

[修回日期] 2007-07-30

[本文编辑] 郁晓路