

端粒酶及其抑制剂的研究进展

周 远 龚兴国*

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘 要 细胞分裂中染色体因其末端的 DNA 不能完全复制而短缩,使细胞逐渐失去增殖能力,导致细胞衰老、死亡。端粒酶的活化可延长染色体的末端 DNA,维护基因组的稳定。端粒酶活性的异常表达,又会使细胞永生化或转化成癌细胞。因此,端粒酶在控制细胞寿命方面有重要作用,端粒酶活性抑制剂有望成为治疗肿瘤的新药物。

关键词 端粒酶, 活性测定, 肿瘤治疗, 端粒酶抑制剂

中图分类号 Q75 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2001)06-0604-04

端粒酶是一种能将真核生物染色体末端 DNA——端粒 DNA 加以延伸的酶。它是一种核酸蛋白质复合物。1985 年, Greider 等首先在四膜虫提取液中发现了端粒酶。它含有与端粒 DNA 互补的 RNA 模板, 可以结合在端粒 DNA 上, 通过有转录活性的蛋白部分使之延伸, 从而解决了真核细胞分裂中的末端复制问题。如果细胞内端粒酶活性异常表达, 就会使细胞获得“永生性”, 进而转化为癌细胞。因此, 它对维护基因组的遗传稳定性与细胞的增殖转化都具有重要意义。

1 端粒酶的结构

目前认为端粒酶由端粒酶 RNA 组分(Telomerase RNA, TR)、端粒酶相关蛋白和端粒酶催化亚基(Telomerase reverse transcriptase, TERT)三部分组成。

1.1 端粒酶的 RNA 部分

最早研究的四膜虫端粒酶 RNA 为 159 nt 的小 RNA, 其中 46, 47 和 48 位的核苷酸被修饰过, 而这一位置有 CAAC-CCCAA 结构, 可与四膜虫端粒的重复序列 TTGGGG 互补。编码人类的 TR 基因(hTR)位于 3q36.3, 产物 RNA 总长 451 nt, 其中模板区为(5'-CUAACCCUAAC-3')^[1]。对已研究的不同物种的端粒酶进行比较发现, 它们之间的 RNA 链同源性较低, 但它们都有各自端粒 DNA 的互补模板区, 其长度为一个全长端粒重复序列, 5'端和 3'端各有二、三个残余核苷酸。将脊椎动物的 TR 二级结构与四膜虫的比较发现, 它们的二级结构非常的相似, 有四处发卡结构形成四个小的和一个大的环形单链区, 端粒 DNA 的模板 RNA 即位于此区内^[2]。端粒的延长即通过该区与端粒 DNA 结合后进一步完成。

1.2 端粒相关蛋白

1995 年, Greider 等在四膜虫中分离出两种端粒酶蛋白质

亚单位 p80 和 p95, 并且克隆出它们的基因。1997 年在人、小鼠、大鼠中也克隆了四膜虫 p80 的同源物, 在人与小鼠中称为 TP1(Telomerase associated protein 1)在大鼠中称为 TLP1(Telomerase protein component 1)^[3,4]。TP1/TLP1 有一与 p80 同源的结构域, 位于分子的氨基末端, 这正是与 TR 特异性结合的部位。对 TP1/TLP1 的 mRNA 的表达并不限于有端粒酶活性的组织和细胞系, 各组织间的水平差异与端粒酶活性无关。因此, 端粒酶活性的表达并不是由这一部分决定的。

1.3 端粒酶的催化亚基

人类端粒酶的催化亚基为 hTERT(Human telomerase reverse transcriptase)。不同的小组在对其进行研究时, 分别命名为 hTERT, TP2, hTRT 等, 现已统一为 hTERT^[5]。hTERT 基因定位于 5p15.33, 长度约为 40 kb, 由 16 个外显子和 15 个内含子组成, 潜在的调控区域可能位于有翻译起点 ATG 上游 330 bp 直到第 2 个外显子^[6,7]。hTERT 基因 DNA 的修饰及剪切对 hTERT 的表达也有影响。启动子区有富含 CG 的 CpG 岛, 在不表达端粒酶活性的组织中该区域没有被甲基化, 而在许多肿瘤细胞中则被甲基化, 但尚未确定该甲基化作用的特殊位点。因而只能推测与 hTERT 表达调控相关^[8]。在大多数情况下, hTERT 的表达是端粒酶活性的限速步骤, 但也并非完全一致。在卵巢和子宫组织中, 可以检测到 hTERT 及 hRTmRNA 的出现, 但并不具有端粒酶的活性^[9]。

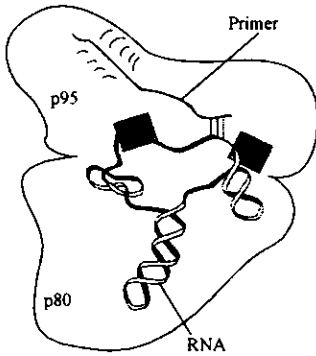
2 端粒酶的活性测定方法

建立快速、特异、灵敏、准确的检测端粒酶活性的方法, 对端粒酶的研究有重要作用。1994 年 Kim 建立了测端粒酶活性的端粒重复放大测定法 TRAP^[10](Telomeric repeat amplification protocol)。该方法用去污剂溶解法代替了原有的冻融

收稿日期: 2000-04-12, 修回日期: 2001-08-22。

基金项目: 浙江省自然科学基金(396077)及浙江大学曹光彪高科技基金资助(171026)。

* 通讯作者。 Tel: 86-571-87951537; Fax: 86-571-87951358; E-mail: gongxg@mail.hz.zj.cn

图1 四膜虫端粒酶结构模式图^[9]Fig.1 Structure model of *Tetrahymena telomerase*

法,可从较少的细胞内获得更纯的端粒酶提取物,并用PCR技术放大端粒酶反应产物的量,使检测的灵敏度大大提高 10^4 ,而且简便易行。目前应用较多的端粒酶检测方法都是以TRAP法为基础的各种改进方法,具体如下:

2.1 TRAP法

其主要步骤为:①从组织或细胞中制备端粒酶提取液。②TRAP反应:在含有一条引物、dNTP和TRAP缓冲液的反应体系中,加入端粒酶提取液,使端粒酶以其RNA组分为模板催化合成端粒DNA重复序列。③PCR反应:以TRAP反应合成的端粒重复序列为模板,加入另一条引物进行常规PCR扩增反应。扩增体系中加入有 $[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$,以标记反应产物。扩增产物经15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影分析结果。扩增产物的量与端粒酶活性成正比关系。扩增的引物序列是:5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA-3'和5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3';④以正常细胞作阴性对照,HeLa或293细胞作阳性对照。

2.2 加内对照的TRAP法

1995年,Wright^[11]等人在此基础上作改进,在TRAP法中加入150bp的大鼠肌浆蛋白基因片段作为内对照,它不会干扰端粒酶图谱的结果,扩增这段内标物的引物是5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTGTAAYGAGGCCTTC-3'和5'-CCCTTACCCTTACCCTTATAGCGCTCAATGTA-3',应用扩增产物作为内对照模板。在TRAP检测时,加入此产物,结果可见186bp内对照条带,如果内对照条带不出现,可提示PCR反应存在问题,消除假阴性结果。

2.3 端粒重复序列扩增-闪烁亲近法(TRAP-SPA)

Savoysky^[12]等近年来将TRAP法与闪烁亲近法结合建立TRAP-SPA法。SPA法将引物进行生物素标记, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 改为 $2\mu\text{CiG}[\text{Me-}^3\text{H}]\text{TTP}$ 。扩增产物为含生物素 ^3H 掺入的产物。扩增后加亲和素标记的荧光微球。激活产生光波信号,最后直接用液闪仪计数。该方法敏感性高,可定量分析端粒酶活性。

最近Takaishi等建立的TRAP-HPA法,也是较灵敏的定量方法^[13]。

3 端粒酶抑制剂与肿瘤治疗

端粒维持染色体的稳定,而恶性肿瘤细胞则常显示出染

色体的不稳定,如有环形染色体、端粒联合、双着丝粒染色体等;端粒长度与细胞寿命相关,而恶性肿瘤细胞又具有无限分裂,即永生性特点。这些均提示肿瘤发生与端粒及端粒酶的状况有相关性。根据目前已检测的癌组织标本的统计结果分析,恶性肿瘤组织端粒酶检出率高达84%~95%,而良性肿瘤及正常组织的端粒酶检出率仅4%左右。因而,在1991年Harley等就提出了端粒-端粒酶假说,认为当正常细胞的端粒达到一定长度时即开始缩短,并启动终止细胞分裂的信号,使细胞进入第一死亡期M1,此时细胞不再分裂,退出细胞周期而老化。如果细胞被病毒转染,或者某些抑癌基因,如p53、pRb等基因发生了突变,细胞便可越过M1期而继续分裂,端粒继续缩短,最终达到一个关键阈值,进入第二死亡期M2。这时大部分细胞由于端粒太短而失去功能,以致细胞死亡,而极少数细胞在此阶段激活了端粒酶,从而使端粒不再缩短,染色体稳定,获得无限增殖能力而成为永生化的细胞。

针对这一情况,抑制端粒酶活性,使肿瘤细胞失去永生性,成为肿瘤治疗的新方法。现已研究出多种端粒酶抑制剂有望成为肿瘤治疗的新药物。

3.1 反义核苷酸及肽核酸对端粒酶活性的抑制

针对端粒酶的RNA模板部分设计的特异性反义核苷酸可抑制端粒酶合成端粒序列。Feng^[11]等研究发现,反义人端粒酶RNA(Human telomerase RNA,hTR)转染人HeLa细胞,端粒DNA丢失,引起细胞死亡。Norton^[14]等设计了针对hTR模板区不同长度的反义多肽核酸(PNA)。它可与DNA或RNA形成稳定的Watson-Crick键。由于其不带电荷,中性骨架间无排斥力,使其具有较DNA寡核苷酸更高的退火温度,及抗蛋白酶和核酸酶能力。体外实验显示PNA对细胞提取物中的端粒酶和细胞内的端粒酶在低浓度下即有显著抑制作用。还有研究表明,硫代反义核苷酸(PS-ODN)也是一种有效的端粒酶抑制剂。PS-ODN不仅能有效抑制细胞提取物中的端粒酶活性,并能抑制淋巴细胞系OMA-BL1的生长,诱导细胞凋亡。

3.2 核酶对端粒酶活性的抑制

核酶是具有特殊核酸内切酶活性的小分子RNA,可序列特异性地与靶RNA分子配对,对底物进行切割,促进mRNA降解。Kanazawa(1996)等设计了针对人端粒酶mRNA成分的锤头型核酶(TeloRZ)。将其加入到肝细胞癌细胞株HepG2和Huh-7的细胞提取物中后,端粒酶活性明显受抑制。另外,Yokoyama等设计的锤头状核酶不仅能有效切割非细胞体系中的RNA底物,将其导入子宫内腺癌细胞后,可明显抑制端粒酶活性。

3.3 逆转录酶抑制剂对端粒酶活性的抑制

端粒酶是合成端粒的特殊逆转录酶。利用一些竞争性的逆转录酶抑制剂可以抑制端粒酶的活性。Yegorov^[15]等发现AZT有抑制端粒酶的功能,从而诱导鼠成纤维细胞瘤细胞发生衰老样改变。此过程是可逆的,去除抑制剂后,细胞仍能进行分裂。而长期用AZT治疗可缩短培养的Hela细胞

的端粒序列。还有研究发现,与 ddG 或 AZT 共同培养,可导致永生 B 细胞系 JY616 和 T 细胞系 Jurkat E6-1 端粒缩短,但细胞形态和分裂速率则无明显改变。近来的研究表明,7-脱氮-dGTP 与 7-脱氮-dATP^[16]也是端粒酶活性的有效抑制剂,在过量天然底物存在下,可以被端粒酶结合到端粒 DNA 序列而导致端粒缩短。

3.4 细胞分化剂对端粒酶活性的抑制

用细胞分化剂视黄酸(RA)和维生素 D₃(VitD₃)分别诱导 HL60 细胞,使其分化为 CD11b⁺成熟的粒细胞和单核细胞^[17]。研究发现用分化剂处理 72~120 h 的分化 CD11b⁺细胞,端粒酶活性明显受到抑制。相反 VitD₃处理的 CD11b⁺HL60 细胞和 RA 处理的人红白血病细胞 K562 不分化,仍保持高水平的端粒酶活性。这表明端粒酶活性的抑制与 HL60 细胞分化有关,白血病细胞同人正常细胞一样有一个通过细胞分化激活的抑制端粒酶活性的机制,从而导致端粒酶活性的抑制。Savoysky^[18]等用 RA 和 VitD₃诱导 HL60 细胞分化发现端粒酶的抑制是分化过程中的早期事件,不依赖生长抑制过程。这一模型可以用来研究端粒酶活性的调节机制,同时还表明不仅可以直接抑制端粒酶的活性,也可以通过细胞调节解除抑制端粒酶的活性,这为通过端粒酶治疗癌症又增添了一条新思路。

3.5 其它相关因子的作用

癌基因、抑癌基因对端粒酶的表达也有一定的作用。例如恶性肿瘤的发展往往与 p53 及 pRb 活性相关^[19]。p53、pRb 基因突变后,端粒酶基因的表达从抑制状态转为激活状态,它们可能是端粒酶基因上游的调节因子^[20]。c-myc 癌蛋白可明显诱导 hTERT 基因的转录活性,激活端粒酶,引起端粒长度的延伸。蛋白激酶 C(PKC)的抑制剂对端粒酶也有抑制作用。Ku 等观察到双咪唑马来酰亚胺对端粒酶有完全抑制作用,而且处理过的细胞仍保持 75% 的存活率和 20% 的蛋白合成能力。目前认为,蛋白激酶抑制剂可有效阻断端粒酶蛋白的磷酸化,从而抑制端粒酶活性。

另有研究发现,金属离子对癌细胞中端粒酶活性也有影响^[21]。特别是 Zn,它对 NRC-12 细胞及 DU145 细胞系中的端粒酶活性有诱导作用。加入 100 mmol/L Zn 后,活性最大高峰出现在 6 h 后,而加入金属离子螯合剂或放线菌酮后,活性减少。Cd 及 Cu 也有类似作用,只是影响较少。

由此可以看出,端粒酶活性受到细胞内各种因子的共同调节,其过程十分复杂。因而,端粒酶基因的表达调控机制还需进行进一步的研究,以便研制出更好的适用于肿瘤临床诊断及治疗的方法。

4 结 语

由于端粒酶在细胞内有重要作用,且与癌症及衰老等有密切关系,对端粒酶的研究将越来越受到重视。随着人们对端粒酶结构、作用机制的深入研究,不仅为认识细胞分裂周期的调控,而且对征服癌症、了解衰老过程都将起巨大的推动作用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Feng J, Funk W D, Wang S S *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, **269**(5228):1236~1241
- [2] Cheng J L, Blasco M A, Greider C W *et al.* Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, 2000, **100**(5):503~514
- [3] Nakayama J, Saito M, Nakamura H *et al.* TLP1: A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, 1997, **88**(6):875~884
- [4] Harrington L, Mcphail T, Mar V *et al.* A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 1997, **275**(5302):973~977
- [5] Meyerson M, Meyerson M, Counter C M *et al.* Hest2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997, **90**(4):785~795
- [6] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 1997, **277**(5328):955~959
- [7] Devereux T R *et al.* DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) gene. *Cancer research*, 1999, **59**(24):6087~6090
- [8] Ulaner G A, Hu J F, Vu T H *et al.* Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse-Transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J cancer*, 2000, **85**(3):330~335
- [9] Collins K *et al.* Structure and function of telomerase. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, **8**(3):374~380
- [10] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266**(5193):2011~2015
- [11] Wrigley W E, Shay J W, Piatyszek M A *et al.* Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**(18):3794~3795
- [12] Savoysky E, Akamatsu K I, Tsuchiya M *et al.* Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA). *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(6):1175~1176
- [13] Takaishi H, Kitamoto M, Takahashi S *et al.* Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. *Cancer*, 2000, **88**(2):312~317
- [14] Norton J C, Piatyszek M A, Wright W E *et al.* Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(5):615~619
- [15] Yegorov Y E, Chernov D N, Akimov S S *et al.* Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescencelike processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett*, 1996, **389**(2):115~118
- [16] Fletcher T M, Salazar M, Chen S F. Human telomerase inhibition by 7-Deaza-2-deoxy purine nucleoside triphosphates. *Biochemistry*, 1996, **35**(49):15611~15617
- [17] Xu D, Gruber A, Peterson C *et al.* Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leuke-*

- mia, 1996, 10(9): 1354 ~ 1357
- [18] Savovsky E, Yoshida K, Ohtomo T *et al.* Down-regulation of telomerase activity is an early event in differentiation of HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226(2): 329 ~ 334
- [19] Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc-an update. *Mutat-Res*, 2000, 462(1): 31 ~ 47
- [20] Vaziri H, Benchimol S. Alternative path-ways for the extension of cellular life-span inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene*, 1999, 18: 7676 ~ 7680
- [21] Nemoto K, Kondo Y Himeno S *et al.* Modulation of telomerase activity by zinc in human prostatic and renal-cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 2000, 59(4): 401 ~ 405

Progress in Telomerase and the Inhibitors

ZHOU Yuan GONG Xing-Guo *

(Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract In cells division chromosome length is shorten for the ending DNA couldn't be replicated completely, and the loss of elomere DNA will lead to senescence and death. Activation of telomerase can elongate telomere length and maintain gene stability. Up-regulation of telomerase is considered to be responsible for immortalization and carcinogenesis. It plays an important role n cell-span and cell division. The telomerase inhibitors will become efficient drugs in tumor therapy.

Key words telomerase, detecting, cancer, telomerase inhibitors

Received: April 12, 2001

This work was supported by

* Corresponding author. Tel: 86-571-87951537; Fax: 86-571-87951358; E-mail: gongxg@mail.hz.zj.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>