

端粒及端粒酶变化在肿瘤发生中的作用

北京放射医学研究所(北京,100850) 赵永良综述 吴德昌审校

摘要: 端粒位于真核染色体的末端,由串联重复排列的TTAGGG序列组成。端粒酶为一核蛋白反转录酶,以其酶内部的RNA组分为模板,合成端粒重复序列。目前研究资料表明:端粒及端粒酶参与细胞增殖、老化过程,端粒酶活化与肿瘤发生相关,预示端粒酶不仅可作为肿瘤诊断和预后的标志物,同时端粒酶活性抑制有可能成为肿瘤治疗领域中的重要手段。

关键词: 端粒 端粒酶 标志物 肿瘤

在正常人类细胞,位于染色体末端的端粒DNA随细胞分裂而逐渐缩短,这种端粒损耗现象可能是正常细胞有限存活期的标志^[1]。端粒酶是一种能维持端粒长度的核蛋白反转录酶,在生殖细胞及早期胚胎细胞,端粒酶具有转录活性,而在正常体细胞这种活性丧失或受到抑制^[2]。目前大量资料证实:多数人类肿瘤存在高水平的端粒酶活性,而良性肿瘤、体细胞(非生殖细胞)组织及有限细胞系存在低水平或缺乏端粒酶活性,提示端粒酶活化与肿瘤发生发展存在明显的相关关系^[3]。

1 端粒及端粒酶

端粒位于真核染色体的末端,参与DNA复制、染色体位移及维持染色体的稳定性,是由串联重复排列的TTAGGG序列组成,在真核染色体其序列和结构是高度保守的^[2]。在每个染色体末端,富含鸟嘌呤(G)的端粒DNA链向着染色体末端以5'-3'方向排列,并突出富含胞嘧啶(C)的互补链12~16核苷酸。在人类每条染色体末端平均有10kb的端粒DNA重复序列,由于DNA聚合酶不能完全复制染色体末端,因此端粒长度随年龄及细胞分裂数量的增加而逐渐缩短,这种端粒损耗起着细胞分裂时钟的作用,与正常体细胞衰老死亡有关^[1,4]。缺乏端粒的染色体由于末端失去保护,可发生融合、重排和易位,形成双着丝粒染色体并最终导致细胞死

亡^[5]。多数永生化肿瘤细胞及许多人体内肿瘤具有短的端粒^[6]。

端粒酶是一种核蛋白反转录酶,它以酶内部的RNA组分序列为模板,合成富含G的端粒DNA链,因此它可将端粒重复序列添加到端粒3'末端上,在维持端粒长度方面起重要作用。端粒酶在生殖细胞具有较高活性,用于维持端粒长度和细胞复制能力,但在多数分化的体细胞组织,端粒酶活性消失或受到抑制,体细胞每分裂一次,都要消耗一定长度的端粒DNA^[2]。目前已克隆了人类端粒酶RNA组分基因hTR(human telomerase RNA transcript)^[7],大约由450碱基组成,其中模板区有11个核苷酸,其序列与端粒重复序列相互补。在有端粒酶活性的生殖细胞及肿瘤组织中,可检测到hTR表达;而在无端粒酶活性的体细胞组织,也可检测到低水平的hTR表达,说明人类端粒酶蛋白与其RNA组分活性的调节是不同的。

2 人类永生化细胞系及肿瘤中端粒损耗和端粒酶活化

2.1 端粒稳定和细胞永生

在缺乏端粒酶活性的体细胞,随细胞分裂端粒持续缩短,当达到一个关键长度时,经信号转导使细胞分裂停止,细胞进入第一个危机期(M1),抑癌基因失活或癌基因活化及DNA病毒(SV40, HPV)转染可使细胞发生转化,脱离M1期而继续分裂,端粒DNA的

进一步丢失使细胞进入第二危机期 (M2)。在此期,大部分转化细胞死亡,只有极少数细胞重新获得端粒酶活性,使端粒长度稳定下来并进展成永生化细胞^[8]。以上的“端粒危机模型”得到了大量实验证据的支持:(1)使用DNA肿瘤病毒(如SV40, HPV)体外转化的人类细胞,其端粒损耗持续到M2期之后,直至极少数细胞成为永生化细胞,端粒长度稳定下来甚至恢复^[9]。Montalto观察了SV40T抗原转染人成纤维细胞后细胞永生化及恶性转化过程中端粒酶水平变化,证实端粒酶活化发生在M2期^[10];(2)大部分晚期及复发人类肿瘤组织中以端粒酶阳性的永生化细胞为主^[3];(3)大多数永生化细胞由于损耗大量端粒DNA,其长度不足4kb,只能维持20次的倍增次数,而且多数人体内肿瘤表现出类似的端粒损耗^[6]。如在肝细胞癌发生过程中,可观察到端粒的持续缩短和端粒酶的活化^[11]。因而这些肿瘤很可能依赖端粒酶来维持增殖,所以借助端粒酶活化而维持端粒长度对细胞永生化及恶性转化可能是必须的。但在一些端粒酶阴性的永生化细胞系却有非常长的端粒,说明端粒酶活化并不是维持端粒长度的唯一条件,一些细胞利用了其它机理(如重排)来维持端粒长度^[12]。

一些再生性体细胞组织如造血系统、肠滤泡细胞、皮肤基底细胞及毛囊滤泡细胞都有低水平的端粒酶表达,这种低水平的酶活性可减慢却不能完全阻止端粒缩短速度,尽管这些细胞增殖力提高但不能形成永生化的细胞^[13]。

2.2 肿瘤及永生化细胞系中端粒酶活化

1994年端粒酶敏感检测方法(TRAP, telomere repeat amplification protocol)的建立,为大量检测肿瘤标本中的端粒酶活性提供了可能。一些检测结果证实:90/101肿瘤组织(12种肿瘤类型)及98/100的永生化细胞系可检测到高水平的端粒酶活性,而22个有限细胞系、50个正常的体细胞组织及良性

增生的纤维组织无端粒酶活性,提示癌组织永生化细胞系和端粒酶活化存在重要相关关系^[13]。

端粒酶活化可作为某些恶性肿瘤诊断及其进展的重要标志物。Chadeneau等报道,在结肠多发腺瘤检测不到端粒酶活性,而在结肠癌却存在酶活性^[14]。在胃癌有83%肿瘤可检测到端粒酶活性,15%(10例)肿瘤无端粒酶活性,其中有8例为早期肿瘤^[15]。Hiyama等分析了乳腺癌中的端粒酶活性,发现在I和II期乳腺癌中,有酶活性肿瘤所占比例低于晚期肿瘤。在甲状腺肿瘤,11/20甲状腺癌有高水平端粒酶活性,而良性腺瘤及正常甲状腺组织缺乏酶活性,同时端粒酶活性与肿瘤浸润能力相关。Umbricht分析了44例甲状腺滤泡肿瘤端粒酶情况,11例滤泡癌中端粒酶全为阳性,而良性滤泡肿瘤中端粒酶阳性比例仅为8/33,因而提出端粒酶可作为区分良性及恶性甲状腺滤泡肿瘤的诊断标志物^[16]。在膀胱癌,98%肿瘤(41/42)为端粒酶阳性(正常膀胱组织为阴性),而且癌症患者尿液脱落细胞的端粒酶阳性检出率达89%(40/45),因而尿液脱落细胞端粒酶活性检测可作为膀胱癌患者诊断及随访的依据^[17]。类似的结果还发现于肝癌、胰腺癌、卵巢癌及宫颈癌中。因此,对于以上这些类型的肿瘤,了解其端粒酶活性有助于疾病诊断和治疗。

端粒酶水平和某些肿瘤的严重程度相关。Ohyashiki等人观察了急性淋巴细胞白血病患者单核细胞活性,发现酶水平在疾病缓解期下降6倍,而疾病复发后又恢复到原来的水平。在急慢性白血病患者,疾病越严重,酶水平越高,而且具有高水平酶活性的急性淋巴细胞白血病患者难以治疗^[18]。Langford的研究结果很有临床意义:通过对52例脑膜瘤分析发现,100%恶性脑膜瘤存在端粒酶活性,治疗后全部复发或继发其它肿瘤;而所有良性脑膜瘤无端粒酶活性,且能治愈^[19]。对肺癌的分析发现,80%的原发肺癌

(136例)有端粒酶活性,其中11例小细胞肺癌全部为阳性,其细胞特征表现为已经历了多次细胞分裂和染色体的变化,而这种特征对于端粒酶活化及细胞永生可能是必须的,提示小细胞肺癌可能主要由永生化的细胞组成,这也可能是小细胞肺癌在临床上难以治疗的原因。Shay等利用端粒酶活性变化来观察肺肿瘤中永生化和非永生细胞的比例,发现一些样本端粒酶活性变化很大,但不论何种肺肿瘤细胞类型,其永生细胞系都表现出了类似的端粒酶活性,因此对以上类型的肿瘤,端粒酶活性有助于预测肿瘤细胞的增殖能力及疾病的严重程度。

对于端粒酶活化时间也是目前探讨的问题。通过对癌前及恶性胃肠肿瘤和前列腺癌的分析表明:端粒酶活化通常发生在致癌过程的早期阶段^[20]。利用TRAP及hTR原位杂交方法分析肺癌发生过程中呼吸道上皮的端粒酶表达情况,32/35肿瘤细胞(5例原位癌)表现出高水平的端粒酶活性及hTR表达;在呼吸道上皮癌前变化(鳞状化生及非典型增生),71%标本存在低水平端粒酶活性,但都有hTR表达,而且在原位癌中hTR高表达预示癌细胞具有了浸润性,提示端粒酶调节失常发生于支气管肺癌多步过程的早期阶段^[21]。对胃癌发生过程的研究发现,II级胃粘膜异常增生中端粒酶阳性比例明显高于0级或I级异常增生,而在0I和II级异常增生都有hTR高表达,同时幽门螺杆菌感染程度与hTR及端粒酶活性水平相平行,提示幽门螺杆菌感染可造成胃粘膜异常增生部位hTR高表达,从而导致端粒酶的活化^[22]。Mao等人对头颈部鳞癌及癌旁组织的分析也支持以上观点:16/16的鳞癌细胞系、26/29的浸润性癌及12/12的异常增生组织都可检测到端粒酶活性,而17例正常组织无端粒酶活性,提示端粒酶活化在头颈部鳞癌为一频发事件,而且发生于致癌过程的早期阶段。

2.3 端粒酶活化不是肿瘤恶性表型所必须的

据目前用TRAP法检测的所有肿瘤中,约有15%的肿瘤为端粒酶阴性。在胶质瘤,尽管端粒酶阴性但肿瘤却是恶性的。Cupta报道在视网膜母细胞瘤,50%肿瘤端粒酶阴性,而且其端粒长度明显长于阳性肿瘤端粒,说明细胞恶性表型的出现并不完全依赖于端粒酶活化^[23]。但视网膜肿瘤有其本身的特点:即只要缺失Rb等位基因就足以引起恶性表型,而不需细胞的进一步增殖及其它突变的产生,细胞端粒较长,因而对于神经母细胞瘤,恶性表型的出现可能不需端粒酶活化及细胞的永生。在一些肿瘤,缺乏端粒酶活性提示它们完全由非永生化的细胞组成。

3 端粒酶抑制剂用于肿瘤治疗

富含鸟嘌呤的端粒酶DNA链是以端粒酶内RNA序列为模板来合成的,而且多数人类肿瘤都重新活化端粒酶来修复或稳定损耗的端粒DNA,因此许多肿瘤都可能依赖端粒酶活化来维持增殖能力,以上这些显著的特点提示了端粒酶可作为肿瘤治疗中非常有用的靶部位。端粒酶拮抗剂的筛选可从如下三个方面进行:(1)端粒酶蛋白抑制剂;(2)利用端粒酶RNA组分的反义核酸技术抑制端粒酶活性;(3)终端分化的诱导。Mata报道,与哺乳动物端粒重复序列一致的硫代磷酸寡核苷酸肽(phosphorothioate oligonucleotide, PS-ODN)可体外抑制Burkitt's淋巴瘤细胞的端粒酶活性,延长细胞倍增时间并诱发细胞凋亡;同时利用人异种移植裸鼠模型,经口给予PS-ODN可明显降低肿瘤的大小,并存在剂量依赖关系,从而证实了类似端粒酶序列的短寡核苷酸肽在体内外能抑制端粒酶的活性^[24]。Feng观察到在Hela细胞系中导入反义人端粒酶RNA组分的表达载体,可导致细胞端粒酶DNA的丢失和细胞的死亡^[7]。在HL60细胞,诱导细胞分化可导

致端粒酶活性的降低,这些体外结果说明肿瘤细胞持续增殖需要端粒酶的活性^[25]。然而目前尚缺乏足够的体内实验证据,而且在将端粒酶抑制剂应用于肿瘤治疗之前,需要澄清以下几个问题:(1)癌细胞端粒酶活化机制及端粒酶活性的调节控制因素;(2)在体内当端粒酶基因失活时,肿瘤进展是否受到抑制;当正常组织中开始有端粒酶表达时,能否促进肿瘤的形成;(3)肿瘤组织细胞类型不同,端粒酶活化的频率及程度不同,因此不同肿瘤对端粒酶抑制剂的反应可能是不一样的;(4)长期应用端粒酶抑制剂对生殖细胞及造血干细胞可造成多大程度的损害。此外,非端粒酶依赖机理的存在可能使端粒酶抑制剂的作用无效

近几年,端粒酶已成为非常活跃的研究领域,尽管很多问题还有待澄清,但大量资料提示,端粒酶不仅可作为一个新的肿瘤诊断标志物,同时还是一个潜在的肿瘤治疗靶部位。

参 考 文 献

- 1 Levy MZ et al. J Mol Biol, 1992; 225: 951-960
- 2 Blackburn EH. Nature, 1991; 350: 569-573
- 3 Kim NW et al. Science, 1994; 266: 2011-2015
- 4 Harley CB. Mutat Res, 1991; 256: 271-282
- 5 Sandell LL et al. Cell, 1993; 75: 729-739
- 6 Kipling D. Nature Genet, 1995; 9: 104-106

- 7 Feng J et al. Science, 1995; 269: 1236-1241
- 8 Sharma W et al. Anticancer Res, 1996; 16: 511-516
- 9 Counter CM et al. EMBO J, 1992; 11: 1921-1929
- 10 Montalto MC et al. Carcinogenesis, 1996; 17(12): 2631-2634
- 11 Miura N et al. Cancer Genet Cytogenet, 1997; 93(1): 56-62
- 12 Bryan TM et al. EMBO J, 1995; 14: 4240-4248
- 13 Rhyu MS. J Natl Cancer Inst, 1995; 87(12): 884-894
- 14 Chadeneau C et al. Cancer Res, 1995; 55: 2533-2536
- 15 Hiyama E et al. Cancer Res, 1995; 55: 3258-3262
- 16 Umbricht CB et al. Cancer Res, 1997; 57(11): 2144-2147
- 17 Kinoshita H et al. J Natl Cancer Inst, 1997; 89(10): 724-730
- 18 Hiyama E et al. Nat Med, 1995; 1: 249-255
- 19 Langford LA et al. Hum Pathol, 1977; 28(4): 416-420
- 20 Tahara H et al. Clin Cancer Res, 1995; 1: 1245-1251
- 21 Yashima K et al. Cancer Res, 1997; 57(12): 2373-2377
- 22 Kuniyasu H et al. Jpn J Cancer Res, 1997; 88(2): 103-107
- 23 Gupta J et al. J Natl Cancer Inst, 1996; 88: 1152-1157
- 24 Mata JE et al. Toxicol Appl Pharmacol, 1997; 144(1): 189-197
- 25 Savoysky E et al. Biochem Biophys Res Commun, 1996; 226(2): 329-334

(收稿日期: 1997-08-28)

生物剂量学技术在放射流行病学中的应用

中国医学科学院 放射医学研究所(天津, 300192) 王继先
中国协和医科大学

摘要: 低剂量电离辐射致癌危害的流行病学研究遇到了很大的困难。以研究电离辐射与生物效应定量关系为核心的放射生物剂量学及相关技术可望对流行病的剂量重建、辐射致癌危险估算、生物学模型建立和危险预测及人群中癌易感性和辐射致癌敏感性检测等提供帮助。两者的结合将把放射流行病学推向分子放射流行病学的新阶段。

关键词: 辐射致癌 放射流行病学 放射生物剂量学

放射流行病学是研究受到附加电离辐射照射特定人群的辐射健康效应与有关事件的

分布及决定因素,并用于解决放射医学与防护中有关问题的科学。当前放射流行病学的