端粒酶逆转录酶研究现状

林　勇, 陈伟忠综述, 谢渭芬, 张忠兵审校

关键词: 端粒酶逆转录酶; 肿瘤; 调控
中图分类号: R730.2　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-8578(2001)03-0246-03

目前研究认为, 大部分肿瘤细胞表达端粒酶活性, 而正常细胞大都没有端粒酶活性表达, 永生化细胞和恶性肿瘤细胞通过激活端粒酶来维持端粒长度并阻止细胞死亡, 端粒酶的激活是恶性肿瘤增殖失控的重要原因。端粒酶是一个核糖核蛋白复合体, 由 450bp 的 RNA 和至少两个蛋白亚单位组成[1]。其中对端粒酶活性表达起限速作用的蛋白组分—端粒酶逆转录酶的作用、基因结构和表达调控研究已逐步深入。本文将就端粒酶逆转录酶的研究现状作一综述。

1　端粒酶蛋白亚单位的研究

人类细胞端粒酶已有两个蛋白亚单位被克隆, 分别为人端粒酶相关蛋白 1 (human telomerase-associated protein 1, hTERI) 和人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)。大量研究结果证实: hTERT 为限速酶, 对端粒酶活性起着重要的调控作用[1]。通过对肿瘤和正常组织对比研究发现: hTERT 在肿瘤细胞中表达明显增强, 而在正常细胞中受到抑制; hTEP1 分布则较广泛, 在正常组织和肿瘤组织均有表达[2]。Jong 等[3]分别检测胃癌组织、肠化生和正常胃粘膜的端粒酶活性及其相关亚单位的表达, 结果显示 hTEP1 表达与端粒酶活性无关, hTERT mRNA 在所有癌组织均有表达, 在肠化生中阳性率为 79%。进一步研究报道, 在肝癌和肝组织中均可检测到 hTEP1, 而 hTERT 在肝细胞癌及其癌旁肝组织的阳性率分别为 100% 和 30.4%, 在正常肝组织中不表达, hTERT 的表达与端粒酶活性显著相关[4]。体外研究发现, 在细胞永生化过程中, hTERT 表达和端粒酶活性被上调, 但随着细胞分化而降低[5], Lord 等[6]对 Barrett 食管发展的不同阶段, 包括肠腺化生、不典型增生、腺癌以及正常组织分别测定 hTERT 活性, 发现随着细胞异型化程度的增高, hTERT 活性逐渐增强, 表明 hTERT 在癌变早期阶段即被上调, hTERT 的激活可能是肿瘤发生的关键步骤。

许多研究也证实, 端粒酶活性降低的关键是 hTERT 活性的下调。Koyanagi 等[7]利用全反式维甲酸诱导分化白血病细胞株 HL60, 发现 hTERT 表达与端粒酶活性均下调, 而端粒酶模板 RNA 和 hTEP1 与细胞分化和端粒酶活性关系不大。另外, 也有结果显示: 淋巴瘤细胞经 a-干扰素处理 72h 后, 其端粒酶活性仅为对照组的 20%; 在端粒酶相关基因中, hTERT 表达明显受抑, 另两种成分 (模板 RNA 和 hTEP1) 无明显改变[8]。

2　hTERT 基因调控研究

hTERT 基因表达的上调是端粒酶激活的主要途径, Counter 等[9]将由 CMV 启动子驱动的 htert-cDNA 载体转染端粒酶阴性的细胞, 发现可诱导出端粒酶活性, 且 hTERT 蛋白表达水平与端粒酶活性有关, 表明 hTERT 基因表达与端粒酶激活有密切联系, hTERT 基因结构与调控的研究亦成为端粒酶研究的重点。

htert 为一单拷贝基因, 含 4030bp, 有 16 个外显子和 15 个内含子, 其蛋白质由 1132 个氨基酸组成。Takakura 等[10]克隆出 htert 5' 端 3.5kb 的序列, 发现 hTERT 启动子没有 TATA 盒和 CAAT 盒; 但在转录起始位点上游存在转录启动元件 CCTCTCC, 可以帮助 RNA 聚合酶 II 识别和结合转录起始位点。体外瞬时转染试验表明, hTERT 的启动子及第一内含子在正常细胞和转化的前永生化细胞无表达活性, 而在永生化细胞则有显著活性。该 DNA 片段富含 GC, 并有多个转录因子的潜在结合位点, 提示该片段含有一个或多个顺式作用元件, 可结合能调控 hTERT 活性的转录因子[11]。

目前研究证实, hTERT 的调控主要是转录水平上的调控。c-myc 是由 myc 原癌基因编码的一种转录因子, 参与细胞的分化与增殖, 其调控表达异常与肿瘤发生密切相关, 肿瘤的形成多有 myc 基因的易位和过度表达。在肿瘤细胞中, c-myc 表达与 hTERT 水平相平行, c-myc 可能通过激活 hTERT 的表达而导致肿瘤发生[12]。有研究发现, htert 基因 5' 侧翼存在 29 个潜在的 c-myc 结合位点, 其中包

收稿日期: 2000-10-08; 修回日期: 2000-12-15
基金项目: 上海市青年科技启明星计划基金资助 (00QB14054)
作者单位: 200003 上海, 第二军医大学附属长征医院消化内科

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

括 18 个规范的结合位点 CACGTG(E 盒), E 盒的数目比其它 c-myc 靶基因中 E 盒的数目要多。htert 第二内含子中一段区域包含 9 个 43bp 大小的重复片段, 每个片段均含有一个 E 盒。对 hTERT 基因调控的研究发现, 外源性 myc 与 E 盒结合后, 对 hTERT 基因表达具有直接激活作用, 其激活作用与细胞增殖无关, 也不依赖于其它新合成蛋白质的辅助作用[13,14]; 类似结果显示, 激活或抑制 myc 蛋白表达可改变 hTERT 启动子活性, myc 蛋白和 hTERT 在肿瘤细胞中表达均显著增高, myc 蛋白对 hTERT 启动子的调节作用可能与其促进肿瘤形成有关[15]。

Kyo 等[16]进一步研究发现, hTERT 基因结构中邻近 ATG 位点的两个 E 盒对于其转录活性上调更有意义; E 盒突变后, c-myc 的激活作用明显下降。但不同细胞类型其下降幅度仍有差异, 这可能与 c-myc 在不同细胞中表达量有关。

c-myc 是第一个被发现的调节 hTERT 基因表达的重要转录因子。最近, 相继发现转录因子 Sp1 和 Mad 也参与调节 hTERT 的表达。Sp1 是一普遍存在的转录因子。过量表达 Sp1 可显著增强 hTERT 启动子活性; Sp1 结合位点突变后, 不仅可以降低 Sp1 对 hTERT 启动子的上调作用, 同时, 外源性 c-myc 对 hTERT 启动子的激活作用也明显减弱, 表明 Sp1 与 myc 有明显的协同作用[16]。Mad 虽然和 myc 都属于羧基端有 bHLH-Zip 结构的转录因子家族, 但 Mad 与 E 盒结合后, 可诱导细胞分化, 抑制细胞增殖。研究发现 Mad 可显著抑制 hTERT 的表达, 在非永生化细胞中, 突变 hTERT 启动子上 Mad 结合位点可明显提高 hTERT 启动子活性。目前认为 Mad 可能是非永生化细胞中 hTERT 的直接抑制因子, 与 c-myc 存在竞争抑制, 使端粒酶在正常细胞不能表达; 而在永生化和肿瘤细胞中, c-myc 过度表达, Mad 表达受到明显抑制, hTERT 的活性随之而上调[17]。

3 hTERT 的其它调控研究

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 和 1, 25-二羟维生素 D_3 (KH1060) 均为细胞诱导剂。将 KH1060 和 TPA 同时加入体外培养的白血病细胞株 ML-1, 可抑制 myc mRNA 表达, 降低 hTERT 活性, 诱导 ML-1 细胞向成熟巨噬细胞分化, 使细胞停止增殖[18]。Gunes 等[19]发现, TPA 可显著增强 Madl 的表达, 从而降低 hTERT 启动子活性。

雌激素与部分肿瘤的发生有密切关系。Kyo 等[20]报道, 雌激素受体阳性的 MCF-7 细胞中, 17-β 雌二醇可促进 c-myc 表达, 上调 hTERT 启动子和端粒酶活性, 提示雌激素诱发肿瘤的机制可能与其调节 hTERT 活性有关。Misiti 等[21]进一步研究发现, 在卵巢上皮细胞中 htert 5' 端存在与雌激素 α 受体结合的顺式作用元件, 雌激素 a 受体可明显上调 hTERT 启动子活性, 而 β 受体则无此作用。

Ulaner 等[22]发现 hTERT 转录产物存在多态性, 这些由于剪切位点不同而形成的多种 mRNA 可下调 hTERT 的活性, 而在肿瘤细胞中, 该作用机制丧失, 说明在调控机制中还存在转录产物剪切的调节。

有学者提出, 野生型 p53 蛋白可能是端粒酶活性表达的重要抑制因子, 而突变型 p53 蛋白则失去此种作用。但许多研究显示相反的结论。Sakitani 等[23]对脑星形细胞瘤的致癌机制进行了探讨, 结果显示 hTERT 活性表达对肿瘤形成起重要作用, 而 p53 突变与否对其影响不大, 至少 p53 基因 5-7 外显子的变化不起作用。有关 p53 对 hTERT 和端粒酶活性表达调控的机理尚不明确, 需进一步研究予以阐明。

4 结语

端粒酶与细胞永生化及癌变密切相关, 它的激活对肿瘤细胞的发生和发展起着重要作用。hTERT 的表达是端粒酶激活的重要途径, 其基因表达水平取决于多个转录因子联合作用的结果, 而在转录水平上也存在多种调控机制影响 hTERT 的活性。目前有关 hTERT 的基因结构与体外研究已初步阐明了 hTERT 在正常细胞和恶性肿瘤细胞的调节机制。但有关 hTERT 基因调控的详细机理与途径仍未明确。相信随着研究的不断深入, 将会发现更多有关 hTERT 的调节因子; 利用现代分子生物学技术改变 hTERT 及其转录因子的基因表达水平, 将会为肿瘤基因治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Dome JS, Look AT. Three molecular determinants of malignant conversion and their potential as therapeutic targets [J]. Curr Opin Oncol, 1999, 11: 58-67.

[2] Wu A, Ichihashi M, Ueda M, et al. Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors[J]. Cancer, 1999, 86 (10): 2038-2044.

[3] Jong HS, Park YI, Kim S, et al. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis[J]. Cancer, 1999, 86(4): 559-565.

[4] Toshikuni N, Nouso K, Higashi T, et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma [J]. Br J Cancer, 2000, 82(4): 833-837.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90: 785-795.

[6] Lord RV, Salonga D, Danenberg KD, et al. Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence [J]. J Gastrointest Surg, 2000, 4(2): 135-142.

[7] Koyanagi Y, Kobayashi D, Yajima T, et al. Telomerase activity is down regulated via decreases in hTERT mRNA but not TEP1 mRNA or hTERC during the differentiation of leukemic cells[J]. Anticancer Res, 2000, 20(2A): 773-778.

[8] Akiyama M, Iwase S, Horiguchi YJ, et al. Interferon-alpha repressed telomerase along with G1-accumulation of Daudi cells[J]. Cancer Lett, 1999, 142(1): 23-30.

[9] Counter CM, Eaton Meyerson M, Eaton EN, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase [J]. Oncogene, 1998, 16: 1217-1222.

[10] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequence essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells [J]. 1999, 59(1): 551-557.

[11] Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalyticsubunit hTERT: organization of the gene snd characterization of the promoter[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8: 137-142.

[12] Wang J, Xie LY, Allan S, et al. MYC activates telomerase [J]. Genes Dev, 1998, 12(12): 1769-1774.

[13] Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by C-MYC[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220-224.

[14] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 826-830.

[15] Oh S, Song YH, Kim UJ, et al. In vivo and in vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 63(2): 361-365.

[16] Kyo S, Takakura M, Taira T, et al. Sp1 cooperates with c-MYC to activate transcription of the human telonerase reverse transcriptase gene [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(3): 669-677.

[17] Oh S, Song YH, Yim J, et al. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene [J]. Oncogene, 2000, 19(11): 1485-1490.

[18] Saito Y, Hatta H, Mano Y, et al. Vitamin D3 analogue KH1060 combined with TPA synergistecally induces mature macrophages in human myeloblastic leukemia ML-1 cells[J]. Anticancer Res, 1999, 19(2A): 1069-1076.

[19] Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, et al. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Madl[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2116-2121.

[20] Kyo S, Takakura M, Kanaya T, et al. Estrogen activates telomerase[J]. Cancer Res, 1999, 59(23): 5917-5921.

[21] Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, et al. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11): 3764-3771.

[22] Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, et al. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium [J]. Int J Cancer, 2000, 85(3): 300-335.

[23] Sakitani H, Tsujiuchi T, Kobitsu K, et al. increased telomerase activity and absence of p53 mutation in oligoastrocytomas induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats [J]. Cancer Lett, 1998, 126(2): 157-164.

(熊　静校对)

中华预防医学会肿瘤防治学术会征文通知

恶性肿瘤是严重危害人民健康和生命的疾病，它在人类总的死亡原因中已经位居第 1 或第 2 位。为加强肿瘤防治的研究，提高现有各种治疗手段的治疗效果，促进和提高全国肿瘤防治的总体水平。由中华预防医学会主办，肿瘤防治杂志社承办的“中华预防医学会肿瘤防治学术研讨会”定于 2001 年 9 月在山东省济南市召开。参会者可获国家级学分 10 分，会议优秀学术论文将在《肿瘤防治杂志》上发表。

1. 征文内容　会议主要议题“肿瘤三级预防现状与目前问题的对策”，内容包括：(1) 肿瘤学与社会学问题，肿瘤流行病学调查；(2) 病因学研究；(3) 肿瘤普查意义及社会问题；(4) 早诊早治；(5) 晚期肿瘤患者的生活质量问题，等。

2. 征文要求　(1) 论文凡未在全国性学术会议及全国性公开刊物发表过的文章均可投寄。(2) 论著全文 5000 字以内；摘要 800 字以内，包括研究目的、方法、结果和结论四部分。尽量提供打印稿并附寄软盘。(3) 请在论文题目下方写明作者姓名、单位、通讯地址、邮编并加盖单位公章。

3. 征文截稿日期　2001 年 7 月 31 日以前(以当地邮戳为准)。会议征文一律不退稿，请自备底稿。来稿请寄：山东省济南市济兖路 440 号(250117) 肿瘤防治杂志社收，请在信封上注明“肿瘤防治学术研讨会征文。”

4. 会务联系　中华预防医学会　电话：010-640700661；64015653　传真：010-64070661。

肿瘤防治杂志社　电话：0531-7984777-82516　传真：0531-7984783　E-mail: zgzlx@public.jn.sd.cn.

中华预防医学会学术会务部

肿瘤防治杂志社

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net