维普资讯 http://www.cqvip.com

Hepotology 1997;26:336－342
11.Jaeschke H. J of Hepotology 1996;25:774－780
12.Lefebvre V. et al. Hepotology 1994;20(6):1567
13.Marsh DC. et al.Hepotology 1993;17(10:91)
14.Carini R.et al. Bio－Bio－Res－Com 1995;260(1):180
15.Richter C.Schweizer M.Corssarizza A. et al. FEBS Lett 1996;378:107－110
16.Calmus Y. Cynober L. Donesset B. Gastroenterology 1995;108:1510－1516
17.Bronk s. Am J phsysiol 1993;264(4):G744－G751
18.McCurry KR.et al.J Surg Res 1993;55:49
19.Bzeizi KI. Dawkes R. Dodd NJF. J of Hepotology 1997;26;69－74
20.Jaeschke H. et al. Am J phsysiol 1991;260(3):G355
21.Schlossberg H.Zhang YL. Dudus L.Hepotology 1996;23:1546－1555
22.Caraceni P. et al. Am J phsysiol 1994;266(5):G799
23.Langdal LA. et al. J Leukoc Biol 1993;53(5):511
24.Jaeschke H. et al. Hepotology 1993;17(5):915
25.Shibuya H. Ohkohchi N. Seya K. Hepotology 1997;25:356－360
26.Fukumoto T. et al. Transplant proc 1995;27:1901－1905
27.Clavien PA. et al. Transplantation 1992;53(5):967
28.Geng JG. et al. Nature 1990;343(22):757
29.Thornton AJ. et al.Hepotology 1991;15:1112
30.Alessandro Cc.Elisabetta C. Renata S.Hepotology 1997;25:361－367
31.Stamler JS. et al. Cell 1994;78:931
32.Anolus T. et al. Hepotology 1991;13(2):364
33.Hirano T.et al. Immunol Today 1990;11:443
34.Parola M.Leonareluzzi G.et al.Free Radic Biol Med 1996;20:351－359
35.Lisa MC. Steven LK. Alfred W. Hepotollgy 1996;23:506－514
36.Serizawa A.Nakamura S. Suzuki S. et al. Hepotology 1996;23:1656－1663

(收稿日期 1997－04－01)

203－206 肿瘤 端粒 端粒酶 36

端粒、端粒酶与人体肿瘤

病理生理学教研室 周剑芳* 综述 范维珂 汤为学 审校

R730.2

中图分类号 R730.2

端粒(telomere)是线性染色体末端的特殊异染色质结构，具有保特染色体稳定的功能[1]。1978年Blackburn和Gall测定了第一个端粒序列，基于它自身独特的结构，人们对它的复制方式提出多种假说[2]。1985年Greider与Blackburn解答了这个问题，他们在四膜虫[3]、纤毛虫[4]的细胞提取物S_{100}中发现了一种特殊的核糖核蛋白，即端粒酶(telomerase)，它可以其中的RNA为模板逆转录合成端粒DNA。后又陆续在酵母菌[5]、人类永生化细胞及胚系组织中发现。研究表明人类正常体细胞中端粒酶活性处于低水平，在胚胎组织、永生化细胞及恶性肿瘤中却可测到较高的端粒酶活性，且端粒保持一定长度[6]。这些研究的生物学意义及其在肿瘤生长中的作用，引起人们广泛注意。本文就端粒、端粒酶与人体肿瘤方面的研究动态作简要综述。

1 端粒的结构和功能

1.1 端粒的结构

Blackburn和Szostak将端粒结构分为两类：端粒相关序列(telomere associated sequences)和端粒DNA序列(telomeric DNA sequences)。毗邻染色体末端的端粒相关序列是由长核苷酸序列串联重复形成，参与了染色体间相互作用；位于

* 女，1971－08出生，95级研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

染色体末端的端粒DNA序列相当保守，一般由短核苷酸(5－8bp)串联重复250－1000次构成[2][7]。该序列富含鸟嘌呤，在每条染色体上构成3′突出末端，它的具体重复成分因种属而异。如脊椎动物为T_2AG_3[3]，纤毛虫Oxytricha和Stykonychia为T_4G_4[4]，四膜虫T_2G_4[5]，酵母菌TG_{1-3}[7]。

端粒DNA广泛分布的富G保守序列可聚合形成鸟嘌呤四联体(G－四联体)。平面排列的四个鸟嘌呤均作为Hoogsteen碱基对中氢键的供体与受体，中间配位结合一个一价金属离子，连续的G－四联体互相堆积可形成折叠结构。G－四联体结构可在两个DNA分子间形成，也可在单链DNA分子内形成。推测该结构提供了分子识别的特定结构，也对稳定染色体发挥重要作用[8][9]。

端粒与端粒结合蛋白共同发挥作用。如啤酒酵母菌中与其端粒TG_{1-3}重复序列的双链部分结合蛋白质Ra1，能影响端粒的长度，染色体的稳定[10]。在体外能与其单链尾结合的蛋白质cdc13p可在体内限制端粒复制时S期末端粒C链的降解[11]。laura chong从Hela细胞核中分离出人类端粒重复成分结合因子(hTRF human Telomeric Repeat binding Factor)，免疫荧光标记显示处于分裂间期的细胞中hTRF特异地位于端粒DNA处，M期时位于染色体末端。它由2条约60KD多肽链组成，含有一个DNA结合区，因与核瘤基因myb的结合因子同源，故称为myb型DNA结合重复区(Myb－type DNA－bindling repeat)，在NH_2－端存在一个富含谷氨酸、天门冬氨酸残基的酸基区。hTRF并不同源于Ra1，但二者的与端粒DNA结合方式存在着类似，具体机制不清，可能与结合蛋白也参与端粒酶作用于端粒过程有关[10]。

1.2 端粒的功能

端粒与结合蛋白形成的复合物保护染色体不受核酸酶的破坏，又避免因粘性末端的裸露而发生染色体融合。早在30、40年代，Muller和McClintock就认识到端粒这一功能[12][13]，以后大量实验加以证实[7][14][15]。细胞正常的DNA复制中，由于DNA聚合酶不能从头合成DNA，由RNA引物起始的随从链从5′→3′方向进行复制，当5′端引物降解后常留下一段缺隙无法再由DNA来复制。已测得人类正常体细胞染色体末端限制性片段(Terminal Restriction Fragments TRFs)长约15kb，胚系组织中TRFs长约20kb，每一次细胞分裂，正常体细胞的端粒DNA序列丢失50－200bp核苷酸[1]。这样，端粒DNA序列的长度是可反映细胞寿命的"时钟"。

2 端粒酶

1985年Greider和Blackburn首先从四膜虫细胞提取物S_{100}中发现，其构成是RNA与蛋白质复合体，酶中RNA成分对其功能非常重要，是逆转录合成端粒DNA的模板，端粒酶经RNase作用，酶即失去活性。端粒酶对热敏感，反应最适温度为23℃－30℃，65℃10分钟即可灭活。蛋白酶、反义端粒酶RNA及高盐离子强度在体外均能抑制端粒酶活性[16]。

2.1 端粒酶RNA

端粒酶RNA提供编码端粒的模板，也参与对端粒引物的识别，四膜虫端粒酶RNA长约159bp，模板区5′$CA_2C_4A_2$，编码1.5拷贝的端粒3′－$A_2C_4A_2C$，由RNA聚合酶Ⅲ转录，5′端缺乏"帽"结构，3′端有丰富的T残基[3]，模板5′端突变，所编码序列发生改变，而3′端突变，编码的端粒序列不变[17]。比较纤毛属多种原虫[4]，酵母菌[8]的端粒酶RNA发现，编码端粒DNA的模板区及其毗邻区的一级序列及二级结构是不同的，但同种间有较高的保守性。Harley克隆Hela细胞端粒酶RNA(human telomerase RNA hTR)，其模板序列TRC_3是单拷贝5′$CUA_2C_3UA_2C$，与第三对染色体长臂端互补，TRC_3表达过程对α－鹅膏碱敏感，但其5′端缺乏"帽"结构，3′端无多聚腺苷酸尾，则可能受具有SnRNA启动子特征的专一转录复合物调节[6]。人类端粒酶RNA模板区突变时，编码序列也发生改变[17]。人卵巢、睾丸组织中hTR含量高，伴有较高水平的端粒酶活性。在人体正常组织如心、肝、脑、肾、前列腺、肺、胰腺等中并不表达端粒酶活性，但也能测得少量hTR，说明在这些组织中hTR是无活性的[6]。

2.2 端粒酶蛋白

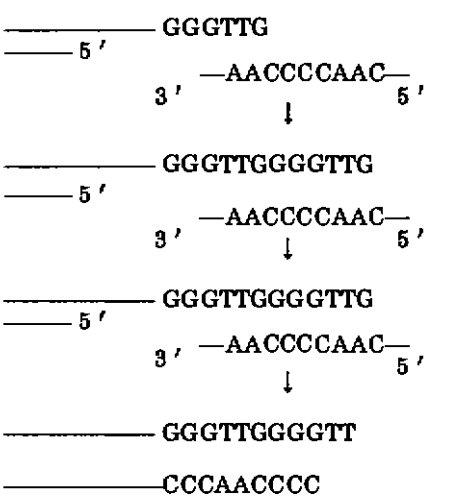
1995年，Collin克隆了四膜虫端粒酶蛋白基

维普资讯 http://www.cqvip.com

因，其表达产物为含有80kDa和95kDa亚单位的蛋白，P_{95}与端粒引物d(GT_2 G_3)$_2$ Gu_2 G_3 特异交联，P_{80}与^{32}P标记的端粒酶RNA特异结合[18]。目前对端粒酶蛋白成分功能还缺乏详细了解。在小鼠体细胞中酶活性与端粒酶RNA浓度成正比，人类则否，也许正是人类端粒酶蛋白质成分参与了酶活性的调节[6]。

2.3 端粒酶功能

端粒酶逆转录合成端粒需DNA引物起始。在体内以染色体3′端富G核苷酸突出单链为引物，体外以非特异性单链寡核苷酸DNA为引物起始聚合反应，待增加一个端粒重复序列后，伸长的DNA末端与RNA模板配对解开，转位后，重新定位于模板3′部分，开始下一轮延长过程。这一作用是连续的。以四膜虫端粒酶逆转录合成端粒为例，图示反应步骤如下：



端粒酶还具有3′→5′引物或DNA产物切割作用，及非连续性延长作用，表明酶参与了端粒合成与修复过程[16]。

3 端粒酶在人体肿瘤中的表达与调节

端粒随细胞分裂程序性缩短，当端粒足够短时，通过一个限制点或毗邻基因表达改变启动衰老[1]。永生化细胞从危机期开始表达端粒酶活性，使细胞绕过M_2 退化期，获得无限增殖能力。测得98%肿瘤细胞株表达端粒酶活性，85－90%肿瘤病例标本可测得活性[19]-[27]，综合见表一。

在诱导分化剂作用下随肿瘤细胞分化，端粒酶活性降低[28][29][30]。端粒酶活性水平与细胞周期调节蛋白有一定相关，乳癌患者中细胞周期素 (CclinE$_1$)异常增高时端粒酶活性增高，而异常的pRb，高水平细胞周期素D_1(CclinD$_1$)，并不伴有高端粒酶活性[31]。神经母细胞瘤中端粒酶活性增高与N－Myc表达增高，L－Myc表达减低相关[33]。子宫内膜癌中端粒酶活性水平与雌激素水平高低相关，且肿瘤细胞倍增率并不与端粒酶水平相关[31][32]。

表1 人体组织中端粒酶活性[19]-[27]

肿瘤部位/类型	正常组织	肿瘤邻近组织	良性病变	恶性肿瘤
肺[20]		3/68		10*/136
乳腺[19]	0/8	2/20		19/24
前列腺[21][22]	0/8		1/10	23/27
肾[23]		0/55		40/55
肝[24]				1/1
结肠[25][26]		0/24	0/21	22/23
卵巢[19]	0/8			7/7
神经系统[27][28]		0/13	0/4	94/100
血液系统[20][27]	6/4(外周血) 4/4(骨髓)			18/2(CLL)6/7(AML) 6/6(MDS)5/5(淋巴瘤)
骨骼[27]				5/5
其它[28]		8/82		24/26
合 计		4.9%	2.8%	85.1%

4 端粒酶活性检测方法及应用前景

1989年，Morin参照四膜虫端粒酶活性检测法首先用放射性检测系统测定了Hela细胞中端粒酶活性[34]。Kim建立的端粒重复扩增法TRAP(telomeric repeat amplification protocol)，两个技术性突破使敏感性提高10^4 [20]，基于这一方法，在放射性检测系统内设置了内参及定量模板，达到量化[35]。联合应用闪烁激发分析(scintillation proximity assay)又进一步简化了操作步骤[36]，同时又推出非放射性检测系统[37][38]。

端粒酶与肿瘤间的特殊关系使人们更关注它在肿瘤检测及治疗中的应用。在非浸润型膀胱癌组织中可测得端粒酶活性[39]，肺癌、乳腺癌早期也能测得[40]，对于它在临床中肿瘤治疗、检测应用人们

维普资讯 http://www.cqvip.com

抱乐观态度，正如德克萨斯大学的Shay 所说"这是癌生物学领域10来年出现的最激动人心的进展之一。它是一个广阔有待深人的领域。"目前只能在癌细胞本身中检测到端粒酶，而获得癌细胞比较困难，且影响端粒酶活性的诸多环节还不清楚，因此还存在较大的难度。

5 结语

近年来迅速发展的分子生物学技术正推进着端粒、端粒酶的研究。许多尚未解决的疑点：端粒G－四联体生物学功能、端粒酶RNA成分、蛋白质成分的结构及功能、酶活性调节等会逐一澄清。显然，上述问题的解决对深人理解细胞生长、分化、衰老、癌变及在临床上应用有重大的指导意义。

参 考 文 献

1.Jerry W.Shay. et al. proc Am Assoc Cancer Res 1995;36:673
2.Blackburn EH & Szostak JW Ann Rev Biochem 1984;53:163
3.Greider & Blackburn EH Nature 1989;337:331
4.Greider & Blackburn EH Cell 1987;51:887
5.SingerMS & Gottschilin DE Science 1994;266:404
6.Junli Feng. et al Science 1995;269:1236
7.Michelle S.Rhyu J.Natl Cancer Inst 1995;87:884
8.Williamson JR Ann Res Biophys Biomol struct 1994;23:703
9.Jean－lonis leroy.et al Nucleic Acid Res 1994;22:1600
10.Laura chong . et al Science 1995;270:1663
11.JinG－JEr lin & Virginia A.Zakian Proc Natl Acad Sci.USA 1996;93:13760
12.Muller H.J The Collecting Net－Woods Hole 1938;13:181
13.McClintock B Genetics 1941;26:234
14.Lundblad & Blackburn EH cell 1993;73:347
15.Sandell & Zakian V.A cell 1993;75:729
16.Greider & Blackburn EH cell 1985;43:405
17.Carol W .Greider Proc Am Assoc Cancer Res 1995;36:672
18.Kathleen Collins. et al cell 1995;81:677
19.K Hiyama & E Hiyama J.Natl Cancer Inst 1995;87:895
20.Nam W.Kim. et al Science 1994;266:2011
21.HJ Sommerfield. et al Proc Ann Assoc Cancer Res 1995;36:3311
22.C chadeneall. et al Proc Ann Assoc Cancer Res 1995;36:3307
23.C Mehle. et al Proc Ann Assoc Cancer Res 1995;36:3309
24.CM Counter. et al Natl Acad Sci usA 1994;91:2900
25.E Hiyama. et al Nature 1995;1:249
26.HS Schwartz. et al Cancer 1995;75:1094
27.CM Counter .et al Blood 1995;85:2315
28.Wooding E.Wright Nucleic Acid Res 1996:23:3794
29.leslie J.Bestilny.et al CancerRes 1996;56:3796
30.Juan Albanell. et al CancerRes 1996;56:1503
31.Goran landberg. et al CancerRes 1997;57:549
32.Satoru kyo .et al. CancerRes 1997;57:610
33.E Hiyama .et al Nat.Med 1995;1;249
34.G.B Morrin cell 1989;59:521
35.HW Sharma. et al Proc Natl Acad Sci USA 1996;92:12343
36.E Savoysky Nucleic Aicd Res 1996;24:1175
37.The mannual of telomerase Detection kit Cat No. S7700 Oncor Inc.
38.The instrution of telomerase PCR ELISA Cat No. 1854666 Boehringer MarinHeimCorp.
39.Kazuhiro Yoshida & Takashisugino Cancer 1997;57:362
40.News J Natl Cancer Inst 1996;88:1021

(收稿日期 1997－04－01)