Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by organizef and by posterior non-axial mesoder. Development, 1997, 124(10): 2075

21 Chalepakis G, Goulding M, Read A, *et al*. Molecular basis of splotch and Waardenburg Pax-3 mutations. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 3681

22 Shelley A P, Moriko I, Mary R L. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: Role of the Pax-3 gene and apoptosis. Diabetes, 1997, 46(7): 1189

23 Copp A J, Brook F A, Roberts H J. A cell-type-specific abnormality of cell proliferation in mutant (curly tail) mouse embryos developing spinal tube defects. Development, 1988, 104(2): 285

24 Chen W H, Morris Kay G M, Copp A J. Genesis and prevention of spinal neural tube defect in the curly tail mutant mouse: involvement of retinoic acid and its nuclear receptors. RAR-β and RAR-γ. Development, 1995, 131(3): 681

25 Zhang J, Hagopicm-Donaldson S, Serbedzija G, *et al*. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. Nature, 1996, 381(6579): 238

(收稿: 1999-04-09;修回: 1999-06-02)

(编辑 王 红)

端粒酶的结构、功能与调控*

Function, struction and regulation of telomerase

陈 兵** 综述 刘为纹 房殿春 审校 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆, 400038

正常细胞经过有限次数的分裂即进入衰老阶段,停止增殖而最终衰亡。但肿瘤细胞似乎成功地摆脱了这种衰老的束缚,表现出无限制加速增殖的永生化能力。这使人们意识到衰老与肿瘤这两大生命科学中的难题之间可能存在着某种联系和转换的必然环节。近年来端粒酶(Telomerase)的发现和"端粒假说(Telomere hypothesis)"的提出,使有关衰老和肿瘤的研究有了长足的进展。包括 Science和 Cell等在内的国际著名期刊,正以逐年增加刊登论著、述评、视点文章的形式,对端粒-端粒酶这一研究方向作出了肯定,认为有可能对衰老、肿瘤等重大生物学问题的解决产生深远的影响[1,2]。

1 末端复制问题与端粒假说

DNA双螺旋的两条链是反向平行的。因此,以这两条链为模板进行 DNA复制时,复制链延伸的方向一条为 3′→5′,另一条是 5′→3′。但生物细胞内催化 DNA复制的所有 DNA聚合酶都只能催化 5′→3′的延伸,这是一个矛盾[3,4]。冈崎片段(Okazaki fragment)的发现使之得以解决。在复制起点 DNA的两条链解开形成复制泡(Replication bubbles), DNA向两侧复制形成复制叉(Replication forks)。以复制叉移动的方向为基准,以 3′→5′模板链的复制在可沿 5′→3′方向连续进行,所形成的 DNA复制链称为前导链(Leading strand)。而以 5′→3′模板链的复制也必须按 5′→3′方向进行,但由于是与复制叉前进的方向相反,因此无法连续进行,而只能分段进行复制形成一系列 DNA片段,即所谓的冈崎片段。这些冈崎片段随后由 DNA连接酶连接成完整的另一条 DNA复制链,又称为滞后链(Lagging strand)。这种前导链的连续复制和滞后链的不连续复制称为 DNA的半不连续复制(Semi-discontinuous replication),是生物界最基本和普遍的 DNA复制方式[3]。然而,这种方式在环状 DNA的复制中表现的似乎完美,但在染色体线形 DNA的复制中却存在着一些问题:① 已知的 DNA复制都需 RNA引物的参与,其势必占据滞后链末端的一段 DNA序列而使之无法复制;② DNA连接酶的作用是连接两条紧邻的冈崎片段,必须是两条紧邻的 DNA片段才能被其催化形成磷酸二酯键,显然在滞后链的末端是不具备这个条件的。这意味着在滞后链末端的的一段 DNA序列最终未被复制,或换句话说每次所复制的子代 DNA都将较其亲本 DNA丢失一段末端 DNA序列。这也就是所谓的末端复制问题(End-replication problem),并随后为一系列实验所证实,所丢失的 DNA序列长约 50~100bp[3,4]。但问题并未到此为止,随之而来并令人长期困惑不解的问题是这种"不精确" DNA复制的动因和意义是什么,其在生物体中的作用和机制是什么?

端粒的研究开始使人们对上述问题有所了解,但真正较好的回答和理解上述问题在于端粒酶的发现及其近期的较为深入的研究。早在 30年代末,诺贝尔奖金获得者 Muller首先发现被 X线打断的果蝇染色体末端极不稳定,因而提出染色体末端结构可能是为了维持染色体的稳定,并根据希腊文组词将其命名为端粒(Telomere)[5,6]。70年代 Olovnikov又提出染色体末端的丢失可能会导致细胞退出增殖假设,但未能提供较为直接的证据[5,6]。1978年 Blackburn等发现四膜虫的端粒是重复串联的 5′-GGGGTT-3′ DNA简单序列[3,6]。1985年和 Gueider等发现一种酶,即端粒酶,可用这种简单序列给端粒 DNA"加

* 中国博士后科学基金资助,中博基[1998]6号,第三军医大学基因诊疗中心科研开发基金资助

** 陈兵,男,38岁,副主任医师,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

尾"[6-8]。此后,人端粒酶活性首先在人肿瘤(hela)细胞而非人正常体细胞中发现[4,8]。这些发现使人们意识到端粒的长度的确是可变的,端粒的"加尾"可能与肿瘤的永生化特性有关,为Olovnikov的假设提供了较为直接的证据。在此基础上,1989~1992年间 Lundblad Harley及 Allsopp等先后进行了一系列端粒短缩与细胞分裂次数及其衰老的相关性分析实验,并导致了"端粒假说"的提出[3,4]。"端粒假说"的核心内容认为:端粒随细胞分裂次数的增加而缩短,达到一定程度后启动某些信号,细胞开始衰老死亡(M_1期)。此时若一些癌基因、抑癌基因突变,则有可能使细胞越过 M_1期继续分裂,端粒继续缩短,并最终还可出现衰老死亡(M_2期)。如此时端粒酶激活,则又可使细胞越过 M_2期,并由于端粒功能的恢复而永生化。

端粒假说随后在近年的一系列实验中得到了验证和充实。列如,HPV和 EB病毒转化人上皮细胞和人胚肾细胞的实验,为假说的前半部分提供了较为直接的证据。在端粒酶 RNA模板部分结构清楚的基础上,Kim等建立了端粒酶活性检测的端粒重复片段扩增法(Telomere repeat amplification protocol, TRAP),使人体细胞组织大样本端粒酶活性的检测成为可能[15]。从目前的检测结果看,绝大多数人肿瘤和永生化细胞为阳性,而正常人体细胞(除生殖细胞、一些淋巴细胞和造血干细胞外)为阴性,与假说的后半部分吻合[4,6,8]。而更为直接的证据是来源于人端粒相关蛋白(Human telomere-associated proteins)的研究[2,4-8]。所谓端粒相关蛋白是指那些端粒结合或参与端粒调控的蛋白成分。至今为止,已发现 5种人端粒相关蛋白,即 TRF1、TRF2、TP1、hTERT和 Tankyrase[2,4-8]。TRF1和 TRF2是两种端粒 DNA结合蛋白(Telomere-specific DNA binding protein),其中 TRF1被认为可能是通过抑制端粒酶来调控端粒长度,而 TRF2可能是保护染色体末端,它们与端粒酶的具体联系途径并不清楚[2]。TP1(Telomerase protein 1, TEP1 or TLP1)是端粒酶蛋白组分中的亚单位之一,预测由 2 629个氨基酸构成,从构成上看是一种多功能蛋白[7]。分子量约 130×10^3u的 hTERT(Human telomerase reverse transcriptase, human telomerase catalytic subunit, hTRT or p127)被认为是端粒酶蛋白组分中的催化亚单位[5,9]。1998年 Bodnar等用 hTERT转染人正常细胞使之寿命明显延长。为此 Science也专门发表了述评,认为是迄今为止"端粒假说"的一个最为直接的证据[5]。Science 1998年底报道的 Tankyrase是最新发现的一种人端粒相关蛋白,结构性分析提示其可能具有二磷酸腺苷核糖多聚酶的活性,推测其可能是通过失活 TRF1的途径来调控端粒酶的活性[2]。为此,Science等杂志再次专门发表了述评,将 Tankyrase的发现归结为深入研究端粒-端粒酶结构与调控的结果[2]。

根据上述研究成果,目前可对末端复制问题和端粒假说可有如下解释和补充:① 端粒即染色体线状 DNA末端与一些端粒 DNA结合蛋白构成的结构;② 末端复制问题是控制生物寿命的正常机制,端粒 DNA的长度是细胞寿命的"计数器";③ 端粒酶可通过"加尾"的方式补充复制时丢失的端粒 DNA,延长细胞的寿命;④ 一些端粒相关蛋白参与端粒酶或端粒的调控;⑤ 肿瘤细胞很可能成功的利用了端粒酶或其调控机制而获得永生。

2　端粒酶的结构及其意义

端粒酶在结构上是一种核糖核蛋白复合物,由 RNA和蛋白质两种组份构成。自身携带有 RNA组份作为复制时的模板是端粒酶区别于一般 DNA聚合酶的主要特征[8]。端粒酶的 RNA组份包括模板区及一些附加序列。模板区的序列与端粒重复序列互补。由于不同物种的端粒重复序列不尽相同,所以模板区序列的保守性较低[6]。例如,四膜虫的模板区序列为 5′-CAACCCCAA-3′,而人的模板区序列为 5′-CUAACCCUAAC-3′。模板区又可分为两个功能域:一个用作与端粒的末端结合定位,如四膜虫的模板区序列中的 5′-CAA-3′部分;另一个用作为延伸复制的模板,如四膜虫的模板区序列中的 5′-CAACCC-3′[4,6,8]。延长的端粒 DNA与端粒酶 RNA模板解链重新互补定位,又可开始新的一组端粒重复序列的合成。如此循环即可使端粒不断延长。总的来说端粒酶 RNA组份一级结构的保守性是较低的,少者仅 150个碱基,多者可达 1 300个碱基[4,6,8]。但二级结构则相对保守性较高,存在有一些高度保守的附加结构[6]。例如I 茎、假结和一些茎环样结构。其中,I 茎可能与二级结构的形成有关,而假结和一些茎环样结构可能用作与蛋白组份结合和参与端粒酶的装配。这可能就是不同物种的端粒酶 RNA和蛋白组份可相互交换装配且仍具有活性的主要原因[6,8]。

端粒酶的蛋白组份是由一些亚单位构成[6-8]。其中了解相对较多的是端粒酶催化亚单位(Telomerase reverse transcriptase, telomerase catalytic subunit, TERT)家族,包括人的 hTERT(p127, 127×10^3u)、鼠的 mTERT(129×10^3u)、两种酵母菌的 EST2(103×10^3u)和 TRT1(116×10^3u)、两种纤毛虫的 tTERT(133×10^3u)和 p123(123×10^3u)。其中 EST2和 p123是通过生化手段直接获得,而其它几个是通过同源性分析获得其基因的的克隆[6,8]。TERT蛋白家族的共同特点是含有逆转录酶的大部分保守序列[6]。共表达人端粒酶 RNA(Human telomerase RNA, hTR)和 hTERT的网状内皮细胞裂解液可检出端粒酶活性[6]。甚至在无端粒酶活力的正常人细胞中表达 hTERT可使这些细胞出现端粒酶活性[5]。端粒酶活力的出现与 hTERT的表达有一个近乎于平行的关系[5,9]。所有这些提示 TERT可能是端粒酶的主要逆转录酶部分,是催化端粒 DNA合成端粒酶亚单位[6]。另一类端粒酶蛋白亚单位是 TEP,包括 p80、p95和 TP1(TEP1)[6-8]。p80和 p95通过与端粒酶 RNA和活性共纯化的生化手段获得,而 TP1是通过同源性分析获得的 p80人的类似物,但较 p80大的多,约 290×10^3u[4,6-8]。p80和 TP1的抗血清可封闭端粒酶的活性,提示其是端粒酶活性的构成成份[6]。p95人的类似物尚未被发现,但有证据表明 p95可与端粒单链 DNA结合,推测可能是端粒 DNA在端粒酶上的一个锚着位点[4,6-8]。功能未明的一类端粒酶蛋

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

白亚单位包括 EST1、EST3、EST4和 p43,结构性分析未见有酶的催化成份,且未发现有人的类似物,但并不能排除它们在端粒酶中具有重要功能的可能性,预计可能在端粒酶调控中发挥作用[6]。

3 端粒酶调控的研究现状

除了端粒、端粒酶的固有结构会对端粒酶的活性有调控作用外,一些理化因素如温度、dNTP和 K^+ 等也可影响端粒酶的活性[8,9]。然而,调控端粒酶活性的体内因素可能远非如此。

端粒酶的活性一般仅出现在胚胎细胞、肿瘤细胞和永生化细胞株中[9,10]。但近期的研究发现一些特殊的体细胞也拥有端粒酶活性。更有意义的是这些体细胞的端粒酶活性被调控在某一个特殊的阶段才表达,且在某种程度上受诸如生长因子这样的细胞外信号的调控。这些特殊的体细胞包括造血细胞、淋巴细胞和子宫内膜细胞。

造血系胞是最早发现的可出现端粒酶活性的体细胞[4,7]。造血系胞中较为原始的 $CD34^+$ $CD38^{-/low}$细胞无端粒酶活性,但开始增殖分化为 $CD34^+$ $CD38^+$ 细胞时则出现端粒酶活性[7,9]。

基本上处于静止状态的 $CD34^+$ $CD71^{low}$ $CD45RA^{low}$细胞是一类更为原始的造血细胞,经生长因子(IL-3、IL-6和 G-CSF等)诱导后,可转化为开始具有增殖能力的 $CD34^+$ $CD71^+$ 细胞和具有持续增殖能力的 $CD34^-$ 细胞。仅仅在出现 $CD34^+$ $CD71^+$ 表型阶段检出端粒酶活性。这种效应在加入生长因子后48h开始出现,7 d左右达到高峰,到细胞持续增殖时即逐渐消失[7,9]。子宫内膜主要在雌、孕激素的作用下发生周期性的变化。非经期的子宫内膜无端粒酶活性,随着雌激素的增高,子宫内膜进入增殖相,端粒酶活性也随之出现和增高。在增殖相的后期雌激素达到峰值,端粒酶的活性也最高。随着雌激素的下降和孕激素的升高,子宫内膜进入分泌相,端粒酶活性也随之下降[4,7]。淋巴细胞是另一类可表达端粒酶活性的体细胞。植物血凝素(Phytohemagglutinin, PHA)、CD3和 CD28单克隆抗体(单抗)可激活 T淋巴细胞并使之表达端粒酶活性[7,8]。抑制 G_1-S期转换的纳巴霉素可阻断 PHA和 CD3/CD28单抗的这种效应,而 DNA聚合酶 α抑制剂羟基脲则不能[7,8,9]。如果在 PHA诱导 12h后中断 PHA而用 IL-2诱导,可达到与 PHA诱导同样的增殖效果,但却无端粒酶活性检出[49]。抗 IgM单抗与 IL-2或 IL-4分别组合可诱导 B淋巴细胞产生相同的增殖效果,但诱导的端粒酶活性水平却差别较大[6-9]。双丁基佛钠醇(Phorbol dibutylate, PDP)在 Ca^{++} 的存在下可旁路 T或 B细胞受体介导的信号传导和引起 G0-G1期的转换。而已经证明 PDP/Ca^{++} 同时也是一种有效的淋巴细胞端粒酶激活剂[7]。

这些新近的研究成果虽然还无法揭示端粒酶活性的调控机制,但使我们看出了一些初步的调控规律[6-9]。1)端粒酶活性的调控具有细胞型特异特征。不同细胞的端粒酶调控机制似乎不仅相同。2)端粒酶的活性与细胞的自我更新和增殖能力的调控有关。具有这些能力的"干细胞"、肿瘤细胞等可有端粒酶活性,外源性增殖信号可诱导端粒酶活性。3)细胞周期特殊时相的调控机制可能是决定端粒酶活性的一个潜在因素。

4 结语

尽管有关端粒酶研究的报道逐年增加,但距临床应用尚有距离。建立在端粒酶 RNA模板基础之上的检测方法,因 RNA保存的特殊性而受到限制[4]。hTERT的表达与端粒酶的活性并非完全一致[10]。而且迄今尚未发现一种人为调控端粒酶活性的方便途径[4]。因此,寻找调控端粒酶活性的、关键的且可为临床应用的结构是端粒酶研究深入的一个途径。

关键词 端粒;端粒酶;末端复制问题
中图法分类号 Q55

参考文献

1 Lange T D, Depinho R A. Unlimited mileage from telomerase? Science, 1999, 283(5404): 947
2 Pennisi E. A possible new partner for telomerase. Science, 1998, 282(5393): 1395
3 Malkas L H. DNA replication machinery of the mammalian cell. J Cell Biochem Suppl, 1998, 30-31(1): 18
4 Mckenzie K E, Umbricht C B, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. Molecular Medicine Today, 1999, 5(2): 114
5 Lange T D. Telomeres and senescence: ending the debate. Science, 1998, 279(5349): 334
6 Nugent C I, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. Genes Dev, 1998, 12(8): 1073
7 Ishikawa F. Regulation mechanisms of mammalian telomerase, a review. Biochemistry (Moscow), 1997, 62(11): 1332
8 Greider C W. Telomerase activation: one step on the road to cancer? Trends in Genetics, 1999, 15(3): 109
9 Lorel M C, Roger R R. Telomerase maintenance mechanisms and cellular immortalization. Current Opinion in Genetics & Development, 1999, 9(1): 97
10 Tahara H, Yasui W, Tahara E, *et al*. Immunohistochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections. Oncogene, 1999, 18(8): 1561

(收稿: 1999-04-11;修回: 1999-06-22)
(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net