

端粒、端粒酶与口腔颌面部肿瘤

王安训 黄洪章

(中山医科大学口腔医学院口腔颌面外科; 广州, 510060)

摘要 近年来端粒、端粒酶与肿瘤间的关系越来越引起学者们的注意。本文复习了目前有关端粒、端粒酶的研究进展, 综述了端粒、端粒酶在肿瘤, 尤其是在口腔颌面部肿瘤中的作用; 同时对其研究前景和存在问题进行探讨。

主题词 端粒; 端粒酶; 口腔肿瘤

中图分类号 R 739.85

端粒是真核细胞染色体末端的特殊 DNA 蛋白质结构, 端粒的末端随周期性的复制逐渐缩短导致细胞衰老; 端粒酶是一种核酸蛋白, 它可将新的重复序列加到染色体末端, 以维持端粒长度。近年来研究发现多种癌具有端粒酶活性, 酶的活化使细胞逃避衰老而获得增殖能力, 最终发展成癌细胞。本文就端粒、端粒酶的结构和功能, 端粒酶在细胞癌变中, 尤其是口腔颌面部肿瘤中的作用进行阐述, 同时对其研究前景和存在问题进行探讨。

1 端粒和端粒酶

1.1 端粒

端粒是真核细胞染色体末端的特殊 DNA 蛋白质结构, 由简单重复富含 G 的 DNA 序列及端粒结合蛋白组成。端粒 DNA 序列相当保守, 但其具有种属特异性, 端粒的保守性和结构的特殊性对端粒的功能十分重要。人类染色体端粒亚单位序列为 5'TTAGGG3', 在体外形成发夹折叠的二级结构, 为染色体末端提供了一个保护性“帽子”, 防止染色体间相互融合、重组, 使染色体免受破坏, 从而保证遗传信息得以完整重复, 并可参与基因表达的调控^[1]。真核细胞端粒结合蛋白能以序列特异性的方式与折叠的端粒 DNA 链结合, 维持端粒构象, 介导端粒酶接近染色体末端, 并作为激活剂或抑制剂参与转录的调节^[2]。各种细胞端粒长度差异大, 体外细胞每分裂一次, 染色体丧失 20~500 bp, 端粒的缩短正是 DNA 聚合酶不能完全复制线性 DNA 末端所致, 当端粒缩短到临界水平(2~4 kb)时, 细胞失去分裂能力而衰老, 因此端粒长度是标志细胞分裂潜力的分子信息。端粒 DNA 长度的测定一般采用染色体末端限制片段分析法(TRFs)^[3]

1.2 端粒酶

端粒酶是由 RNA 和蛋白组成的核糖蛋白复合体, 是一种特殊的 RNA 依赖性 DNA 聚合酶, 广泛存在于永生细胞、癌细胞和生殖细胞, 同种属间端粒酶 RNA 序列相当保守, 不同种属间 RNA 序列各有其特异性。端粒酶能识别端粒 3'端的引物位点, 并依赖逆转录机制, 以自身 RNA 为模板重复复制端粒序列, 对维持染色体稳定性和完整性起着重要作用。人 HeLa 细胞端粒酶 RNA 模板序列为 5'CUAACCCAAC3', 其基因位于人 3P 远端 1/4, 属单拷贝基因, 端粒 3'末端引物与端粒酶 DNA 序列的特异性结合不完全符合碱基互补原则, 可能还存在某些空间识别位点, 在无端粒染色体, 端粒酶能直接催化合成端粒(称为染色体复制), 最近端粒 RNA 已被克隆^[4]。端粒酶蛋白起着逆转录酶的作用, 为端粒酶活性所必须, 可能还同酶的调控密切相关。1995 年 Collins^[5]分离了相对分子质量分别为 80 ku 和 95 ku 的四膜虫端粒酶蛋白, 它们分别与端粒 DNA 和端粒酶 RNA 序列特异结合, 提示端粒酶蛋白可能是一种新型聚合酶, 参与 DNA 识别、催化合成和加工作用。端粒酶的功能主要是合成染色体末端的端粒, 自身携带模板是端粒酶区别于一般纯蛋白逆转录 DNA 聚合酶的主要特征^[6]。

目前端粒酶的激活机制还未明了。研究发现其激活与病毒癌基因(HPV16-E6)^[7]、外周淋巴细胞受体激活有关^[8]、还受抑凋亡基因 bcl-2 的调节^[9]。HPV16 转染的角化细胞可激活端粒酶, 引起细胞永生, 并显示端粒延长; 经诱导后的正常外周淋巴细胞, 端粒酶的表达先于 S 期相关蛋白(ToPo 异构酶 II a)的表达, 即端粒延长在 DNA 复制前。目前端粒酶测定方法主要采用端粒重复序列扩增法(TRAP)^[10]

2 端粒酶与细胞永生化和肿瘤

端粒酶活化是细胞永生化的必须途径,而获得永生化的重要一步。研究发现人类绝大多数正常细胞无端粒酶活性,而绝大多数肿瘤细胞却表现端粒缩短并表达端粒酶活性。在人细胞衰老和永生化的端粒丢失和端粒酶表达的模型如下^[11]:随着细胞的发育,端粒酶活性受到抑制、消失,导致端粒在细胞分裂和老化中缩短;当端粒重复片段仅剩几十个碱基时,位于端粒下游的染色体上受抑制的基因解除抑制、或端粒缩短造成DNA损伤、或两者的共同作用,引起了细胞衰老的第一个死亡阶段信号(Mortality stage, M1),即抗增殖机制的激活,引起细胞分裂停止;端粒重复序列的丢失造成DNA损伤,诱导p53和pRb失活,使某些细胞绕过M1期继续分裂生长,使端粒继续缩短而进入M2期,此时由于染色体末端失去保护“帽”而不稳定,绝大多数细胞发生凋亡,只有极少数细胞在某些因素作用下激活端粒酶,延长端粒、染色体末端修复、恢复染色体稳定性,使细胞越过M2期获得永生转化,最终发展成具有无限制增殖力的肿瘤细胞。新的观点认为“临界点”上游顺式调控元件和端粒酶激活是肿瘤细胞持续生长的重要因素^[12]。

1994年Kim等^[10]采用端粒重复片段扩增法(TRAP)对12种肿瘤进行检测发现:90%(90/101例)肿瘤细胞和98%(98/100例)永生化的细胞株有端粒酶活性存在,而在非永生化的细胞、正常细胞和良性肿瘤细胞中未检测到端粒酶活性。研究还发现^[12]:常见恶性肿瘤(如前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝癌)80%~95%可检出端粒酶活性,其中乳腺癌和肺癌在极早期甚至癌前病变即能测到酶活性;胰腺癌、结肠癌早期90%~95%的患者表达酶活性,但癌前病变无酶活性表达;神经纤维瘤、急性白血病、乳腺癌、胃癌中端粒酶的过度表达提示不良预后,因此可以推测肿瘤发生发展需要端粒酶参与和维持。任何酶的抑制物可导致端粒缩短、激活衰老旁路,端粒酶成为抗癌治疗的理想靶点。端粒酶不但可能是肿瘤早期诊断、预后预测的标志物,而且可能成为肿瘤基因治疗的药物设计靶点。

Byan等的研究表明^[13]:近25%体外永生化的2%肿瘤衍生细胞株缺乏酶活性,端粒阳性的永

生化人类细胞株其衍生亚克隆间平均端粒长度差异相当大,这可能是端粒酶活性水平波动的影响,或存在有其它调节端粒长度的因素,某些永生化的纤维细胞无酶活性,也无长端粒,这提示有其它未知机制调节端粒稳定和延长。研究还发现在某些非恶性组织中可检测到端粒酶的表达,如造血干细胞^[14]、非恶性上皮细胞^[15]。

3 端粒酶与口腔肿瘤

口腔颌面部肿瘤是一种常见肿瘤,发病率高,近年来虽然诊断和治疗水平提高,但总的生存率仍较低,对高危人群的早期诊断,有助于早期治疗和提高生存率。口腔颌面部是致癌物首先攻击的部位,是一个癌化区。许多学者对口腔鳞状上皮癌变过程中各阶段端粒酶活性表达的检测发现:80%以上的口腔鳞癌端粒酶的活性阳性^[16~20],端粒酶的表达与恶性度有关,100%低分化癌均为强阳性,而高分化癌仅30%为强阳性;不同部位口腔癌的(非角化粘膜和舌)酶活性表达也有显著性差异;而酶活性的高表达与早期肿瘤的治疗反应成反比^[19]。癌前病变中38%~75%口腔白斑端粒酶活性表达^[16,17],而100%增殖性红斑酶活性表达^[17],这与增殖性红斑癌变率(40%)高于白斑(1%~2%)的临床现象相符;50%~100%不典型增生和27.8%过度增生组织酶活性表达阳性^[17~19],这提示癌前病变中端粒酶的表达与表型的演变和不典型增生的程度有关,有些过度增生组织有端粒酶的表达,这可能是镜下未发现的不典型增生细胞的酶活性或自身细胞具有的酶活性。Mutirangura的研究^[17]还发现酶的激活常在癌前病变并在癌变过程中起重要作用,但并不是所有恶性和不典型增生都表达端粒酶,这提示酶的激活并非癌所必须,这与以前的研究结果相似^[10]。由此可见端粒酶可作为口腔白斑癌变危险性评价的生物学标志。肿瘤邻近的正常粘膜是否可测得酶活性存在争议。Kannan^[16]发现邻近的正常粘膜可测得酶活性,Kang等^[21]的研究也发现具有增殖活性的正常人类口腔角化上皮(NHOK)具有端粒酶活性,而衰老的NHOK则无酶活性;然而Mao等^[18]的研究则发现,11/30例的邻近正常组织有不典型增生、过度增生和/或角化,某些部位有淋巴细胞浸润,所以以往肿瘤邻近正常组织检测到酶活性可能是癌前细胞或肿瘤细胞的

端粒酶活性。以上研究结果显示端粒酶的检测可成为口腔颌面部肿瘤早期诊断、预后预测的标志物。

关于动物模型中酶活性的检测还很少。Ohnishi^[22]检测DMBA诱导金黄地鼠颊囊癌端粒酶的活性,发现酶活性在颊囊癌形成前和形成时上升,且与恶性程度成正比,在正常粘膜中为阴性,因此酶的表达是正常向肿瘤形成转变的生物标记物。Bednarek也发现^[23]在小鼠皮肤癌变过程中癌组织的酶活性比乳头瘤高。由于TRAP法敏感度高,多种临床标本都能检测到酶活性,Califano^[19]发现80%原发口腔鳞癌酶活性阳性,而滤出的口腔含漱液32%酶活性阳性,作者认为这可能是唾液含有能使端粒酶RNA降解的RNase,或唾液存储在室温使酶蛋白容易变性以及唾液肿瘤细胞太少。唾液中酶活性阳性检出率低,以及较高的假阳性率限制了它的应用,但这一种无创伤取材方法可用于初步病例筛选。

4 研究前景

以上的研究证实端粒、端粒酶在细胞永生化和肿瘤癌变中起重要作用,口腔颌面部恶性肿瘤早期即有端粒酶活性的表达,因此酶活性的检测可成为早期辅助诊断的指标之一,同时研究还表明酶的检测在癌的检测、预后预测和疗效评价中具有重要意义。由于端粒酶存在于大部分肿瘤细胞中,大部分正常体细胞无表达,提示端粒酶是一种良好肿瘤标志物,是肿瘤治疗的理想靶点。近年来以端粒酶为靶点的抗肿瘤策略研究已成热点,目前研究方向主要有六大方面^[24]:①端粒酶RNA操作;②诱导端粒结合蛋白的基因突变;③酶的细胞周期依赖性调节;④诱导分化抑制酶的活性:如全反式维甲酸等^[25],诱导癌细胞分化,抑制酶活性,使细胞生长抑制,并出现凋亡;⑤染色体转移;利用端粒酶抑制基因导入肿瘤细胞,恢复肿瘤细胞衰老、死亡特性;⑥筛选常规抗癌药物,如原二茶酸(proto catechuic acid, PCA)和costunolide可抑制酶活性^[24];Penclomedine(一种新合成的吡啶类化合物)能引起人宫颈癌HeLa细胞有丝分裂指数下降,诱导染色体端粒融合。

虽然端粒、端粒酶与细胞永生化和癌变的关系已有大量的证据支持,但仍然存在以下问题:在癌

细胞中酶稳定端粒的机制是什么?端粒酶的激活在肿瘤的什么阶段?端粒酶调控方式如何?影响酶活性的因素?以及为什么不是所有的癌细胞都有酶活性等等,因此其关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Nimmo E R, Cranston G, Allshire R C. Telomere-associated chromosome breakage in fission yeast results in variegated expression of adjacent genes. *EMBO J*, 1994, 13(16):3801
- 2 Preston R J. Telomeres, telomerase and chromosome stability. *Radiat Res* 1997, 147(5):529
- 3 Harley C B, Futcher C W, Greider C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, 345(6274):458
- 4 Feng J, Funk W, Wang S *et al*. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, 269(5228):1236
- 5 Collins K, Kobayashi R, Greider C W. Purification of tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of enzyme. *Cell* 1995, 81(5):677
- 6 Gilson E, Laroche T, Gasser S M, *et al*. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol*, 1993, 3:128
- 7 Klingelhutz A J, Foster S A, McDougall J K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 1996, 380(6569):79
- 8 Feist H, Zeidler R, Skrebsky T, *et al*. Induction of telomerase activity in stimulated human lymphocytes precedes expression of topoisomerase II alpha. *Ann Hematol*, 1998, 76(3~4):111
- 9 Mandal M, Kumar R. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem*, 1997, 272(22):14183
- 10 Kim N W, Platyszek M A, Prowse K R *et al*. Specific association human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266(5193):2011
- 11 Wright W E, Shay J W. Times, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism. *Trends Cell Biol*, 1995, 5:293
- 12 Shay J W, Gazdar A F. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol*, 1997, 50(2):106
- 13 Bryan T M, Englezou A, Dunham M A, *et al*. Telomerase length dynamics in telomerase-positive in mortal human cell. *Experimental Cell Research*, 1998, 239(2):370
- 14 Hiyama K, Hirai Y, Kyoizum S *et al*. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 1995, 155(8):3711

(下转第103页)

- 17 强文安, 刘捷, 吕芳玲, 等. ^3H -精氨酸转化测定一氧化氮合酶特性. 中华医学杂志, 1996, 6(8): 567
- 18 胡笑克, 卢汉平, 吴乃允, 等. ^3H -TdR 掺入法选择肿瘤化疗方案的研究. 标记免疫与临床, 1996, 3(4): 196
- 19 李尹雄, 范慕贞, 张京俐, 等. 反义转染细胞 HLR-9 的 C-myc 基因表达其生物大分子的生物合成. 中华肿瘤杂志, 1999, 18(1): 16
- 20 季光. 扶正化疗方药物血清对原代培养大鼠肝细胞增殖及胶原生成率的影响. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(3): 20
- 21 高国全, 欧阳佩珍, 姚志彬. 精氨酸加压素 4~9 片断对老年大鼠脑突触体摄取 ^3H -谷氨酸, ^3H -GABA 的影响. 中华老年医学杂志, 1996, 15(6): 361
- 22 赵明, 黄祖汉, 高晓, 等. 高效简便的人低密度脂蛋白 ^{125}I 标记法. 第一军医大学学报, 1997, 17(3): 230
- 23 白坚石, 何忠效, 吴电奎, 等. 抗衰老药物对大鼠脑 DNA 甲基化酶的影响. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(6): 358
- 24 Klezien R F, Paiiza M W, Becker J, *et al.* A method using 3- α -Methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular waterspace of cells in monolayer culture. Anal Biochem, 1975, 68: 537
- 25 张宏伟, 吴肇汉, 戴腾昌. 稳定性同位素在大鼠移植小肠吸收功能研究中的应用. 中华消化杂志, 1998, 19(1): 76
- 26 邵伯芹, 刘赛, 张健, 等. 贻贝多活素对小鼠心肌营养性血流量的影响. 青岛医学院学报, 1997, 33(2): 125
- 27 凌昌全, 李敏, 卢军华, 等. 参附汤对失血性休克大鼠糖皮质激素及其受体的影响. 第二军医大学学报, 1996, 17(3): 284
- 28 杜国光, 顾文聪, 顾文霞, 等. 中药固真方对促甲状腺素受体基因表达的调节作用. 生物化学杂志, 1996, 12(3): 299
- 29 黄晖, 颜正华, 徐秋萍. 填精补血化瘀方对老年大鼠脑内单胺递质和 M 受体的影响. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(1): 28
- 30 刘洁, 翁世艾, 曹永舒, 等. 知母对甲亢模型 β 受体-cAMP 系统的调节作用. 中药药理与临床, 1996, 12(4): 16

(1999-06-22 收稿 1999-08-15 修回)

(上接第 99 页)

- 15 Taylor R S, Ramirez R D, Ogoshi M, *et al.* Detection of telomerase activity in malignant and normal skin conditions. J Invest Dermatol, 1996, 106(4): 759
- 16 Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, *et al.* Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6(6): 413
- 17 Mutirangura A, Supiyaphun P, Triekapan S, *et al.* Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, 1996, 56(15): 3530
- 18 Mao L, El-Naggar A K, Fan Y H, *et al.* Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. Cancer Res, 1996, 56(24): 5600
- 19 Califano J, Ahrendt S A, Meisinger G, *et al.* Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell cancer patients. Cancer Res, 1996, 56(24): 5720
- 20 Kagata H Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, *et al.* Telomerase activity of tumors in the head and neck. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho, 1998, 101(2): 205
- 21 Kang M K, Guo W, Park N H. Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. Cell Growth Differ, 1998, 9(1): 85
- 22 Ohnishi M, Yoshimi N, Kawamori T, *et al.* Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7, 12-dimethylbenz[*a*] anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. JPN J Cancer Res, 1997, 88(8): 111
- 23 Bednared A, Budunova I, Slaga T J, *et al.* Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression. Cancer Res, 1995, 55(20): 4566
- 24 董为人, 李进, 李福山. 以端粒酶为靶点的药物设计和基因治疗策略. 生理科学进展, 1997, 28(3): 274
- 25 Bestilny L J, Brown C B, Miure Y, *et al.* Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation immortal cell lines. Cancer Res, 1996, 56(16): 3796

(1999-06-21 收稿 1999-07-29 修回)