

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0325-04

端粒酶：肿瘤治疗研究的新希望

Telomerase: A new hope for research of cancer therapy

卫立辛, 吴孟超(第二军医大学东方肝胆外科研究所肿瘤免疫与基因治疗中心, 上海 200438)



[作者简介] 卫立辛, 河北秦皇岛人, 现任第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤免疫与基因治疗研究中心主任、研究员、博士生导师。1984年在第一军医大学获学士学位, 1989年在第四军医大学获硕士学位, 1997年在第二军医大学获博士学位; 2001年至2003年在美国NIH和新泽西医科大学开展博士后研究。主要研究方向是肿瘤生物治疗的生物新技术、肿瘤发生中细胞分子机制及细胞衰老在肿瘤学中的作用。承担国家自然科学基金4项, 承担上海浦江人才项目及上海市曙光计划项目各1项; 参加973课题和上海市基础科学研究重大课题各1项。已完成工作共发表论文103篇, 其中SCI收录论文14篇。曾获国家科技进步三等奖1项、军队科技进步二等奖2项。

端粒是染色体末端的一段富含GC的重复序列, 端粒双链中3'端突出形成3'悬端(3'-overhang)。端粒酶是由RNA和蛋白质组成的反转录DNA合成酶, 以端粒3'突出端为引物, RNA组分为模板, 蛋白组分催化合成、延长端粒重复序列。1978年Blackburn和Gall^[1]首次在四膜虫染色体末端发现了由重复序列组成的端粒。1985年Greider和Blackburn^[2]在四膜虫中发现能合成延伸端粒重复序列的端粒酶。1989年Morin^[3]首次在端粒酶阳性的人Hela细胞开始了端粒酶的研究。近年来, 端粒及端粒酶的研究已成为生物学热点, 也是人类抗肿瘤药物研究的新“靶点”。随着人们对端粒及端粒酶结构和功能认识的加深, 针对端粒酶的抗肿瘤治疗研究也不断深入, 从早期抑制肿瘤细胞端粒酶活性, 发展到新近与免疫治疗和基因治疗相结合。本文介绍针对端粒酶的肿瘤治疗研究的新进展、面临的挑战和前景。

1 端粒酶与肿瘤的关系

人端粒酶是一种核糖核蛋白复合物, 由人端粒酶逆转录酶(hTERT)、人端粒酶RNA组分(hTR)以及人端粒酶相关蛋白(hTEP1等)组成。端粒酶利用其自身hTR所携带的RNA为模板, 在hTERT的逆转录催化下, 将端粒重复序列合成到染色体末端, 延长或稳定了随着细胞分裂而进行性缩短的端粒, 在细胞永生化和恶性肿瘤的发生和发展中起到了重要的作用^[4]。许多证据表明, 除了生殖细胞、胚胎干细胞、活化的淋巴细胞、月经期的子宫内膜组织及表皮的基底细胞外, 大部分的体细胞端粒酶呈阴性^[5-6], 而在约80%~90%的人类肿瘤中端粒酶激

活^[7]。因此, 端粒酶重新激活是癌变细胞一个带有普遍性意义的生物学标志, 被认为是细胞癌变的一个重要细胞生物学异常事件, 是细胞永生化和肿瘤发生的关键步骤^[8-9]。

癌细胞中端粒酶的激活及活性的维持可能是多种因素在多个水平对不同分子靶作用的结果。正常组织广泛表达hTR和hTEP1, 而hTERT的表达被抑制, 大多数端粒酶阳性的肿瘤和永生细胞系中均表达hTERT; 此外, 在端粒酶阴性细胞中导入hTERT即可检测到端粒酶活性, 说明hTERT的表达与端粒酶活性是平行的, hTERT的激活对肿瘤细胞中端粒酶活性的激活是“必须的和足够的”^[10]。所以在端粒酶的激活过程中, hTERT基因在细胞中的表达是决定端粒酶活性关键的限速步骤^[11]。研究表明, 端粒酶除了有维持端粒长度外还作为“帽子”结构在端粒之间起到保护作用, 从而具有抗凋亡、促生长等作用^[12], 这些功能都与促进肿瘤的发生、发展有关。研究hTERT基因表达的调控机制是揭示端粒酶活性调控的一个关键, 从而可能为衰老、肿瘤发生等重大生物学问题的解决奠定基础。

2 端粒酶与肿瘤治疗的研究

端粒酶具有特殊的结构和功能, 其激活与恶性肿瘤发生关系密切。端粒酶抑制剂被认为是一类潜在的高选择性低毒的抗癌药物, 抑制剂的开发研究为恶性肿瘤的早期诊断和基因治疗开辟了新途径。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30471994); 上海市科委基础研究重大项目(No. 04DZ14006); 上海市科委浦江人才计划项目(No. 05PJ14010)

[通讯作者] 卫立辛, E-mail: weilixin@yahoo.com

以抑制端粒酶活性为靶点的肿瘤治疗方法,有望成为更有效、更安全的新方法。目前,以抑制端粒酶活性为靶点的肿瘤治疗研究方法较多,以下分别介绍。

2.1 以寡核苷酸为基础的端粒酶抑制剂的研究

目前,以脱氧寡核苷酸为基础的端粒酶抑制剂主要针对端粒酶 RNA 组分 hTR 和逆转录酶催化亚单位 hTERT,主要有反义脱氧寡核苷酸和其他一些修饰的脱氧寡核苷酸。虽然 hTERT 的表达是端粒酶活性激活的限速步骤,成功抑制其表达后可瞬时降低端粒酶活性并引起细胞凋亡,但由于其 mRNA 二级结构复杂,合适的杂交抑制位点较难确定,增加了其疗效的不可预见性。而 hTR 的易接近性使其成为抑制端粒酶活性的合适靶点。1995 年最先将针对 hTR 前 185 个核苷酸的反义 RNA 导入 HeLa 细胞,导致 HeLa 细胞端粒缩短和细胞凋亡^[13]。hTR-RiAS(Ribbon antisense)是一种针对端粒酶 RNA 的反义序列,能显著降低肿瘤细胞的端粒酶活性,诱导肿瘤细胞的凋亡,从而抑制肿瘤细胞在体内外的生长^[14]。GRN163L(geron corporation)是一种以 hTR 为靶向的硫氨基磷酸酯类寡核苷酸(13-merthio-phosphoramidate oligonucleotide)^[15],目前已经进入临床前试验的后期,已进行毒性和药理安全试验,并准备进入 I 期临床试验。在肺癌细胞中 GRN163L 能抑制端粒酶的活性,同时能抑制肺癌细胞的克隆形成及肿瘤在动物体内的转移^[16]。在肝癌细胞中 GRN163L 能以剂量依赖的方式抑制肿瘤细胞的端粒酶活性及肿瘤细胞的增殖,提高肿瘤细胞的凋亡率,同时提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[17]。其他一些修饰的寡核苷酸有短核酸肽(PNA)^[18]、甲基化的 RNA 寡聚物(2'-O-meRNA)^[19],它们主要是增加了其自身的稳定性和与靶分子的结合能力。

2.2 端粒酶定向的肿瘤基因治疗研究

抗肿瘤治疗的主要目标是使抗肿瘤药物特异性针对肿瘤细胞从而减少对正常细胞的副作用。端粒酶 hTERT 在多数肿瘤细胞中特异表达,成为区分肿瘤细胞和正常细胞的标志^[20]。由于端粒酶 hTERT 在正常细胞中不表达,那么基于 hTERT 构建的复制性腺病毒就能很方便聚集于肿瘤细胞而对正常细胞无影响,提高病毒对肿瘤杀伤的特异性^[21]。将端粒酶 hTERT 启动子替换腺病毒 E4 启动子构建的溶细胞腺病毒 VRX-011 已证实能有效地感染肿瘤细胞,显著抑制肝癌细胞 Hep3B 生长,同时在裸鼠体内的实验证明 VRX-011 能缩小肺癌细胞形成的瘤结节

而显示较低的肝毒性^[22]。端粒酶和 c-myc 癌基因在 80% 的小细胞肺癌中有表达。根据这一特性,应用端粒酶 hTERT 启动子、Myc-Max 反应元件构成的过表达 HSV-TK 的腺病毒能相对特异地针对肿瘤细胞进行基因治疗,显著抑制肿瘤细胞的生长、提高小细胞肺癌细胞的凋亡率^[23]。基于端粒酶 hTERT 启动子的靶向基因治疗的优点是可选择性地杀死端粒酶阳性的肿瘤细胞,而对端粒酶阴性的正常细胞无影响。由于不同类型肿瘤细胞 hTERT 表达不同,端粒酶定向的肿瘤基因治疗在 hTERT 高表达的肿瘤细胞中治疗效果可能更为理想。

2.3 针对端粒酶的免疫治疗研究

端粒酶 hTERT 在正常细胞中不表达而在肿瘤细胞中的广泛表达,因此被不少人认为是一种肿瘤相关抗原(tumor-associated antigens TAA)。以端粒酶 hTERT 的肽段、DNA 及 RNA 作为疫苗进行肿瘤免疫治疗备受人们关注。目前以端粒酶 hTERT 为靶点的肿瘤免疫治疗的主要策略是诱导 hTERT 特异性 T 淋巴细胞免疫反应尤其是 CTL 的反应,以期能特异地杀死 hTERT 阳性的肿瘤细胞。在肝癌细胞中,80% ~ 90% 癌细胞表达端粒酶,将源于端粒酶 hTERT, HLA-A 2402-限制性的抗原表位导入肝癌病人中,能诱导 hTERT 特异性 CTL 免疫反应,针对 hTERT 的特异性细胞毒 T 细胞能有效杀死肝癌细胞^[24]。同样,来源于端粒酶 hTERT, HLA-B 0702 限制性的多肽能够诱导人细胞毒 T 细胞(CTL)反应,且 hTERT 多肽特异性 CD8⁺ CTL 能杀伤多种 hTERT 阳性的肿瘤细胞。应用 hTERT HLA-B 0702 限制性的多肽能诱导老鼠体内 CTL 免疫反应^[25]。令人振奋的是目前的临床研究表明 hTERT 多肽的免疫治疗还未出现很严重的副反应,只是有一些流感样症状如发热和寒颤。而将端粒酶 hTERT mRNA 转染的树突状细胞(DC)回输到前列腺癌病人进行过继治疗,发现 DC 可以有效提呈 hTERT 抗原肽,诱导 hTERT 特异性 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞的免疫反应,产生广谱的抗肿瘤效应^[26]。

2.4 其他抑制剂的研究

端粒的 3' 悬端(3'-overhang)含有丰富的鸟嘌呤(G),它能形成一种叫 G-四倍体的结构。这种结构能阻止端粒酶与端粒的结合,从而抑制端粒酶对端粒的延长作用。因此利用药物来稳定这种 G-四倍体的结构就能阻止端粒酶对端粒的延长,也就间接抑制了端粒酶的作用。Telomestatin 是目前研究较多的 G-四倍体结构的稳定剂。Telomestatin 能显著抑制端粒酶的

活性,将其作用于肿瘤细胞可导致肿瘤细胞生长停止,诱导肿瘤细胞的凋亡。短期内应用 Telomestatin 处理儿童神经母细胞瘤可导致剂量依赖性的细胞毒性,诱导细胞凋亡,而长期应用无细胞毒性且能抑制端粒酶活性的 Telomestatin 处理儿童神经母细胞瘤可造成细胞端粒缩短、细胞生长停止及诱导细胞凋亡^[27]。在 BCR-ABL 阳性的白血病细胞系, Telomestatin 能可重复性抑制端粒酶的活性,诱导 caspase-3 和多聚核糖聚合酶 [poly-(ADP-ribose) polymerase] 的激活,通过 p38 MAPK 途径促进细胞凋亡。体内试验表明, Telomestatin 能抑制急性髓细胞性白血病细胞的端粒酶活性,促进端粒缩短及肿瘤细胞的凋亡且毒性轻微^[28]。另一种 G-四倍体稳定剂是 quindoline 衍生物,在白血病细胞和结肠癌细胞中已被证实能抑制细胞生长伴随着端粒缩短,诱导细胞衰老^[29]。BRACO-19 也是一种 G-四倍体的稳定剂,体内外试验显示 BRACO-19 能显著降低肿瘤细胞核内端粒酶 hTERT 的表达,诱导肿瘤细胞衰老和生长停止,且伴随有端粒的缩短。同时实验还显示经 BRACO-19 处理后,胞质中的 hTERT 和泛素结合,使 hTERT 降解加速,表明 BRACO-19 通过抑制端粒酶的催化功能和帽子效应 (capping) 产生抗肿瘤的作用^[30]。其他类型的端粒酶抑制剂也屡有报道, Huang 等^[31] 人报道 helenalin, 一种倍半萜内酯,能以剂量和时间依赖的方式抑制端粒酶的活性。

2.5 端粒酶抑制剂与放、化疗联合应用的研究

当端粒酶被抑制后,端粒长度需经一段时间缩短至一定程度时才能引起细胞凋亡,所以从药物治疗开始到产生一定的治疗作用会有一段时间的滞后。在这一段时间当中,虽然应用端粒酶抑制剂会使端粒逐渐缩短,但肿瘤细胞还会继续分裂,导致肿瘤细胞的绝对数量还是逐渐增多。而且在这段时间肿瘤细胞是否会发生突变或激活其他机制延长端粒不得而知。因此,单一的端粒酶抑制剂治疗肿瘤并不是很高效。传统肿瘤治疗方法(放疗、化疗)虽然能快速减少肿瘤的负荷,但缺点是容易复发和产生对治疗的抵抗。目前认为这种抵抗是存在肿瘤干细胞所致。此外目前传统的治疗方法不能直接影响端粒的长度。因此联合端粒酶抑制剂和传统的治疗肿瘤方法可使两者优势互补,延长肿瘤病人的生存期,至少可延缓肿瘤的复发。同时端粒酶抑制可以增加肿瘤细胞对放、化疗的敏感性^[32-35]。血管生成抑制剂通过控制肿瘤中心氧含量抑制肿瘤细胞的分裂,但不能完全抑制肿瘤细胞生长,与端粒酶抑制剂联

合使用可明显增加其作用,显著杀伤肿瘤细胞^[36]。

3 展望

与传统化疗药物的细胞毒性不同,以端粒酶为靶向的药物可望能减少对正常细胞的毒副作用。当然,这类药物会对端粒酶弱阳性的正常细胞如生殖细胞、干细胞等也可能产生影响,因这些细胞通常处于静息期,且通常正常细胞比恶性肿瘤细胞的端粒要长,同时肿瘤细胞的端粒酶活性要高于弱阳性正常细胞,因此,端粒酶抑制剂对端粒酶活性较高的、且端粒相对较短的肿瘤细胞可能发挥更大的作用,而对这些端粒酶弱阳性的正常细胞的作用可能比较弱。

针对端粒酶肿瘤治疗研究的应用前景面临三方面挑战:(1)并非所有肿瘤患者和肿瘤类型都能检测到端粒酶的活性,因此,这些细胞可能会对端粒酶靶向的治疗方法不敏感。(2)当端粒酶被抑制后,端粒的长度需要一段时间缩短至一定程度时才能引起细胞凋亡。因此,从药物治疗开始到产生一定的治疗作用会有一段时间的滞后期。(3)肿瘤细胞常常会启动其它补偿机制而逃脱治疗的压力,在以端粒酶为靶向的治疗中刺激与端粒酶功能相似的其它基因的表达,如 ALT(alternative lengthening of telomeres)机制的启动^[37],真核细胞中存在端粒酶非依赖机制延长端粒,特别是在端粒酶活性抑制时这种机制的活化。然而,随着对端粒酶结构和功能的进一步认识,无论单独使用或与其它手段联合使用,端粒酶抑制剂都有望为肿瘤治疗提供新的希望。

[关键词] 端粒酶; 肿瘤; 端粒酶抑制剂

[中图分类号] R730 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena* [J]. *J Mol Biol*, 1978, 120(1): 33-53.
- [2] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase [J]. *Science*, 1997, 276(5312): 561-567.
- [3] Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats [J]. *Cell*, 1989, 59(3): 521-529.
- [4] Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 160-168.
- [5] Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation [J]. *Microbiol Mol Biol*, 2002, 66(3): 407-425.
- [6] Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, et al. Natural and pharmacological regulation of telomerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(4): 839-865.

- [7] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787-791.
- [8] Vega LR, Mateyak MK, Zakian VA. Getting to the end: Telomerase access in yeast and humans [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 948-959.
- [9] Lustig AJ. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(11): 916-923.
- [10] Counter CM, 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(9): 1217-1222.
- [11] 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(4): 785-795.
- [12] Chang S, DePinho RA. Telomerase extracellular activities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12520-12522.
- [13] Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase [J]. *Science*, 1995, 269(5228): 1236-1241.
- [14] Bajpai AK, Park JH, Moon IJ. Rapid blockade of telomerase activity and tumor cell growth by the DPL lipofection of ribbon antisense to hTR [J]. *Oncogene*, 2005, 24(43): 6492-6501.
- [15] Herbert BS, Pongracz K, Shay JW, *et al.* Oligonucleotide N3 \rightarrow P5' phosphoramidates as efficient telomerase inhibitors [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 638-642.
- [16] Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, *et al.* *In vivo* inhibition of lung cancer by GRN163L: A novel human telomerase inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7866-7873.
- [17] Djojotubroto MW, Chin AC, Go N, *et al.* Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma [J]. *Hepatology*, 2005, 42(5): 1127-1136.
- [18] Shammas MA, Simmons CG, Corey DR, *et al.* Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(46): 6191-6200.
- [19] Pitts AE, Corey DR. Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(20): 11549-11554.
- [20] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [21] Uchino J, Takayama K, Harada A, *et al.* Infectivity enhanced, hTERT promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for SCLC treatment [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(9): 737-748.
- [22] Kuppuswamy M, Spencer JF, Doronin K, *et al.* Oncolytic adenovirus that overproduces ADP and replicates selectively in tumors due to hTERT promoter-regulated E4 gene expression [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(22): 1608-1617.
- [23] Song JS. Adenovirus-mediated suicide SCLC gene therapy using the increased activity of the hTERT promoter by the MMRE and SV40 enhancer [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(1): 56-62.
- [24] Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, *et al.* Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2006, 43(6): 1284-1294.
- [25] Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, *et al.* Immunogenic HLA-B* 0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(10): 3158-3167.
- [26] Su Z, Dannull J, Yang BK, *et al.* Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer [J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3798-3807.
- [27] Binz N, Shalaby T, Rivera P, *et al.* Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(18): 2873-2881.
- [28] Sumi M, Tauchi T, Sashida G, *et al.* A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(6): 1481-1487.
- [29] Zhou JM, Zhu XF, Lu YJ, *et al.* Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 2006, 25(4): 503-511.
- [30] Burger AM, Dai F, Schultes CM, *et al.* The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1489-1496.
- [31] Huang PR, Yeh YM, Wang TC. Potent inhibition of human telomerase by helenalin [J]. *Cancer Lett*, 2005, 227(2): 169-174.
- [32] Wong KK, Chang S, Weiler SR, *et al.* Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(1): 85-88.
- [33] Lee KH, Rudolph KL, Ju YJ, *et al.* Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(6): 3381-3386.
- [34] Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, *et al.* Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(7): 859-868.
- [35] Xi L, Chen G, Zhou J, *et al.* Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butyrate via mitochondrial pathway [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(5): 789-798.
- [36] Shay JW, Wright WE. Telomerase: A target for cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(4): 257-265.
- [37] Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, *et al.* Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 598-610.