

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.021

· 综 述 ·

T 淋巴细胞端粒及端粒酶与肿瘤免疫

Telomeres and telomerase in T cells of tumor immunity

杨莉莉,钱雅琴,综述;任秀宝 审阅(天津医科大学肿瘤医院免疫学研究室 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室 天津市“肿瘤防治”重点实验室 天津 300060)

[摘要] 端粒是真核生物染色体末端特异的核苷酸结构,主要由重复的“TTAGGG”序列组成并随着细胞分裂逐渐缩短。端粒酶能够防止端粒缩短、丢失、重排或者终端与终端的融合。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)现已被认为是端粒酶活性调控的重要组成部分。研究表明,过表达 *hTERT* 基因能够增强 T 细胞增殖能力,转入 *hTERT* 基因的 T 细胞增殖能力大大增强,这将成为肿瘤过继免疫治疗良好的细胞资源,从而为肿瘤生物治疗提供一种新的治疗方法。本文中,主要讨论 T 细胞端粒功能和端粒酶活性、端粒酶活性调控、过表达 *hTERT* 基因的 T 细胞增殖特征及转导 hTERT 基因的 T 细胞在过继免疫治疗中的应用。

[关键词] 端粒;端粒酶;T 细胞;人端粒酶逆转录酶(hTERT);免疫治疗;肿瘤免疫

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)01-095-05

端粒是线状染色体末端重复序列,主要结构包括重复序列“TTAGGG”及相关蛋白,端粒末端形成的 T 环及相关蛋白起到保护端粒的作用^[1]。端粒维持染色体的完整性,防止染色体终端与终端的融合。随着细胞的分裂端粒逐渐缩短,当缩短到一定程度时,端粒 DNA 损伤信号会诱导细胞凋亡或增殖终止,因此端粒与细胞增殖特性密切相关^[2]。人端粒酶是一种核糖核蛋白,由人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT),人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)和相关蛋白组成。一般体细胞中几乎检测不到端粒酶活性,但具有增殖潜力的细胞,如生殖细胞,造血细胞和激活的淋巴细胞中能检测到端粒酶活性^[3]。研究表明,恶性肿瘤细胞端粒酶活性增高,因而端粒酶被认为是肿瘤诊断和预后一种有价值的分子标记。端粒的功能异常与衰老、肿瘤及自身免疫性疾病密切相关^[3-4]。在肿瘤免疫中,杀伤性 T 淋巴细胞能够特异性识别肿瘤细胞,起到杀伤肿瘤细胞的作用,增强 T 淋巴细胞的活性及增殖能力,能够有效地增强其杀伤肿瘤细胞的能力。因此,本文就 T 细胞中端粒及端粒酶的结构功能以及其与肿瘤免疫的关系做一综述。

1 端粒的生物学结构

端粒结构的主要特征是特殊的 DNA 重复序列,3 链突出形成 T 环和 G 四链体^[1],在人类细胞中大约为 10-15 kb。端粒末端保护性蛋白 TRF1、TRF2、

POT1、TIN2、TPP1 和 RAP1 等具有招募端粒酶及调节端粒长度的作用^[5-6]。人类端粒酶复合物结合在端粒 3 链突出端,包含 hTERT、hTR 和相关蛋白质,其作用是防止端粒降解、损失、重排或端端融合。hTR 可作为细胞分裂过程中 DNA 末端复制的模板;hTERT 具有活性催化位点,是端粒酶调控中最重要组成部分。

随着年龄的增长,各种组织和器官中的端粒长度出现缩短,包括外周血细胞,肾皮质细胞等^[7]。当端粒长度达到临界值时,越来越多的细胞就会进入细胞衰老阶段,其特征为细胞增殖能力丧失^[8]。大部分体细胞缺乏端粒酶活性,其中成体干细胞和祖细胞的端粒酶表达较低,而肿瘤细胞表现出很高端粒酶活性,被认为是肿瘤诊断和预后的极有价值分子标记^[3]。肿瘤细胞通常通过激活端粒酶维持其端粒长度,但也可以通过替代延长端粒(ALT)同源重组机制延长端粒。ALT 是对端粒酶活性缺失或

[基金项目] 天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(No. 14JCYBJC25500);天津市高等学校科技发展基金计划资助项目(No. 20120110)。Project supported by Tianjin application infrastructure and cutting-edge technology research projects(No. 14JCYBJC25500), and the Colleges and universities in Tianjin Science and Technology Development Fund projects(No. 20120110)

[作者简介] 杨莉莉(1975-),女,河北省唐山市人,博士,副研究员,主要从事肿瘤免疫及肿瘤生物治疗研究, E-mail: yanglili1603@163.com

[通信作者] 任秀宝(Ren Xiubao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com

者活性较低细胞的一种补偿机制^[9]。研究^[10-12]表明,多种疾病如骨髓衰竭综合征、白血病及肿瘤的发生发展与端粒功能障碍有密切关系。

2 T 淋巴细胞中的端粒与端粒酶

2.1 概况

T 淋巴细胞与大多数体细胞一样,增殖寿命是有限的。体外扩增培养时需要 IL-2 或者有丝分裂原或抗原的刺激,当增殖到一定程度时,T 淋巴细胞达到最终分化状态并停止分裂^[13]。这种现象被认为是端粒随着增殖分裂而逐渐缩短,最后进入复制衰老状态。研究表明,同一个体中,幼稚 T 细胞的端粒长度比记忆 T 细胞端粒长^[14]。在体外幼稚 T 细胞与记忆 T 细胞抗体刺激后增殖,在达到复制衰老之前,幼稚 T 细胞比记忆 T 细胞具有更强的分裂能力。同样在 CD8⁺ T 细胞亚群中,CD28⁻ CD8⁺ T 细胞来源于 CD28⁺ CD8⁺ T 细胞的分化。同一个体的 CD28⁻ CD8⁺ T 细胞的端粒长度要比 CD28⁺ CD8⁺ T 细胞短。CD28⁻ CD8⁺ T 细胞在体外培养时的分裂能力也相对较低^[15]。CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在肿瘤免疫中发挥重要的免疫作用,但其端粒长度较短,提示体内诱导端粒酶逆转录酶能够防止其复制衰老。在体外实验中,调节性 T 细胞的端粒酶逆转录酶活性能够稳定诱导,但不能阻止最后的端粒缩短。对肿瘤浸润 T 细胞的研究^[16]显示,端粒长度较长的细胞能够有效的介导抗肿瘤作用,因此,肿瘤浸润 T 细胞的端粒长度及激活端粒酶逆转录酶活性的能力是其寿命及抗肿瘤能力的重要影响因素。

外周血 T 细胞端粒酶活性很低或几乎没有活性。然而,更多研究表明,外周血 CD4⁺ T 细胞端粒酶表达可被抗 CD3/CD28 抗体等诱导,一些炎性因子,如 IL-2、IL-7 和 IL-15 等均能够上调端粒酶在 T 细胞中的表达。淋巴细胞可通过端粒酶的表达提高其增殖能力,端粒酶在 T 细胞中可以有很高的表达水平^[15],并且在小鼠模型中也被证明^[17]。以上研究表明,T 淋巴细胞端粒酶可被诱导表达并维持端粒长度和细胞复制能力。临床数据表明,风湿性疾病患者白细胞或淋巴细胞端粒长度比正常对照组短;类风湿关节炎患者幼稚 CD4⁺ T 细胞因 hTERT 缺乏而导致端粒酶活性降低,而端粒逆转录酶异常表达的 T 细胞可以恢复 T 细胞的抗凋亡能力^[18]。研究^[19]显示,ZAP-70⁺/CD38⁺ 表型的慢性淋巴细胞白血病中,无论是幼稚 T 细胞还是记忆性 T 细胞,它们的端粒长度都明显比 ZAP-70⁻/CD38⁻ 表型

的短。研究^[14]表明,骨髓增生异常综合症患者中 T 细胞端粒缩短,且因诱导端粒酶活性障碍而导致其增殖缺陷,幼稚 T 细胞的再生出现障碍,同时出现衰老细胞的累积。

2.2 T 细胞中端粒酶活性的调节

端粒酶是由两个主要亚基组成:hTERT 和端粒酶 RNA 模板。hTERT 基因表达沉默时,端粒酶活性受到抑制,提示 hTERT 是决定端粒酶活性的主要催化亚基^[20]。研究表明,端粒酶活性调节中,hTERT 启动子区域是酶调控的关键部位。hTERT 基因位于人 5 号染色体的短臂上(5p15.33),距离端粒 2 Mb 的位置,调节区域有丰富的转录因子结合位点,包括激活或抑制的转录因子。Sp1 与 GC 盒结合促进转录,癌基因如 c-Myc 与 Max 蛋白组成复合物并且与 E-box 结合促进转录。然而,WT1(肾母细胞肿瘤抑制基因)与 hTERT 启动子结合下调 hTERT 的表达。另外,hTERT 启动子包含两个雌激素反应元件,因而雌激素可以与 hTERT 启动子雌激素反应元件结合并激活转录。hTERT 启动子甲基化和组蛋白甲基化对 hTERT 转录的调节也起关键的作用^[20-22]。此外,hTERT 启动子上含有五个活化 T 细胞的核因子(NFAT)结合位点,活化状态 NFAT 过表达能够促进 hTERT 的转录^[23]。而 TAL1(T 细胞急性淋巴细胞白血病 1)则对 hTERT 启动子起负调节作用^[24]。

肿瘤细胞中高表达端粒酶 RNA 组分,有助于端粒酶活性的调节^[20]。小鼠模型中,端粒酶 RNA 组分缺失会导致端粒延长障碍^[25],这表明端粒酶 RNA 对端粒活性的调节具有一定作用。关于 hTR 的研究表明,SP1 和 HIF-1 促进 hTR 的转录,SP3 则抑制其转录,MAPK 信号通路可通过与某些蛋白结合参与 hTR 转录调控。另外,在端粒酶阳性细胞系中,hTR 的表达与 H3 和 H4 的高度乙酰化和 Lys4 H3 的甲基化有关^[26]。

3 hTERT 的过表达能够增强 T 细胞的增殖能力

过表达 hTERT 的 T 细胞增殖能力增强,无论是正常细胞还是肿瘤细胞,过表达 hTERT 基因可防止细胞凋亡和复制衰老。核端粒酶是氧化应激细胞存活的关键,端粒酶敲除的细胞对化疗更加敏感^[27]。转染 hTERT 的 T 细胞能够明显增强增殖能力,延长复制寿命,但无法阻止端粒 DNA 整体亏损,说明转染 hTERT 的 T 细胞不能阻止最终的染色体异常和复制衰老。然而,转染后的细胞随着分裂端粒缩短较少,且复制终止时端粒的长度要比对照组短^[28]。

同样有研究^[29]显示, hTERT 基因转导的 CD4⁺ 辅助性和调节性 T 细胞的抗氧化应激能力增强, 且在长期培养中不会改变其抗原特异性及细胞表型, 但在培养过程中需要持续的刺激。

hTERT 转导的 CD8⁺ T 细胞增殖后期扩增次数明显减少, 且细胞周期蛋白依赖性抑制剂 P16 INK4A 和 p21Cip1 出现堆积, 导致细胞生长受限^[30]。此外, 泛素羧基末端水解酶 L1(UCHL1) 在 hTERT 转导 CD8⁺ T 细胞表达上升, 此蛋白在多种细胞过程中发挥重要作用, 包括 DNA 修复, 细胞周期调控, 抗原呈递, 信号转导, 细胞分化, 应激反应和凋亡^[31]。现已证实 hTERT 基因的过度表达能增强 T 细胞的增殖能力, 因此, “寿命延长”的 T 淋巴细胞可以作为肿瘤过继性免疫治疗的细胞来源。

4 提高 T 细胞端粒酶活性及其临床应用前景

过继免疫治疗是从患者细胞群中分离出细胞并在体外扩增, 然后回输到患者体内, 这些细胞能够直达肿瘤部位进而杀死肿瘤细胞。淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)和肿瘤浸润淋巴细胞在过继免疫治疗应用中已经取得了显著的效果。在免疫治疗方法中, 肿瘤浸润淋巴细胞过继免疫疗法是目前治疗转移性黑色素瘤最佳方法之一^[32]。在过继免疫治疗中, 为提高肿瘤反应性 T 细胞抗原特异性, T 细胞被肿瘤特异性 TCR 和 scFv 受体修饰, 能够提高抗肿瘤效果。CD8⁺ T 细胞毒性淋巴细胞在抗肿瘤中发挥重要的作用, 而 CD4⁺ T 细胞被视为提供辅助作用, 然而, CD4⁺ T 细胞能够识别由 MHC- II 类分子呈递的抗原, 可以对表达 MHC- II 类分子的肿瘤靶细胞发挥直接细胞毒性作用, 添加抗原特异性辅助细胞可以提高过继免疫治疗的临床效果^[33]。

过继免疫治疗中, 肿瘤浸润淋巴细胞需在体外培养, 长时间体外培养和扩增后, 细胞最终进入复制衰老阶段, 这是不可避免的。观察发现, 肿瘤浸润淋巴细胞在转移后迅速扩增, 之后, 由于它们不能持续诱导端粒酶活性, 端粒长度几天之内迅速下降。因此, 只有端粒较长的细胞能够维持并介导抗肿瘤活性。众所周知, 从恶性肿瘤中分离出足够数量肿瘤特异性 T 细胞相当困难, 所以为保证细胞数量, 寻找有效并能增强 T 细胞增殖能力的方法非常必要。如前所述, 过表达 hTERT 的 T 细胞克隆, 与未转染细胞相比有较高的增长率。因此, hTERT 过表达的 T 细胞不会出现恶变的遗传倾向^[28-29]。总之, 过继性免疫治疗的发展迅速, 如何有效地应用过继性免疫治疗, 特别是提高特异性抗肿瘤 T 细胞治疗效

果, hTERT 基因对于克服免疫治疗中 T 细胞的应用局限性有较大价值。肿瘤浸润淋巴细胞转入 hTERT 后将会提高其增殖能力。由此, 有理由相信它们可以提高抗肿瘤效果^[27]。

5 结 语

端粒是真核生物染色体末端重复序列, 随着细胞增殖分裂逐渐缩短, 端粒酶负责延长端粒长度, 以保证细胞正常分裂。肿瘤浸润 T 细胞是过继免疫治疗中的重要细胞, 但它也面临着难以分离和扩增的困难。研究表明, 增强 T 细胞的增殖活性与 hTERT 基因过表达有关, 因此, 如果肿瘤浸润 T 细胞转染 hTERT 基因, 可以大大提高他们的增殖能力, 并能很好地用于过继性免疫治疗中。hTERT 过表达的 T 细胞为生物治疗提供了一种新的治疗方法, 但仍存在潜在的问题。hTERT 是肿瘤通用抗原, 是抗肿瘤治疗的理想靶点, 因此推测, 转入 hTERT 基因 T 细胞有可能被淋巴细胞识别并发挥细胞毒性作用, 当然, 这将取决于 hTERT 基因的表达水平, 这种潜在问题可能会限制其在免疫治疗中的应用。因此, 该方法的开拓仍需要进一步的研究探索。

[参 考 文 献]

- [1] Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73(1): 177-208.
- [2] d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence [J]. Nature, 2003, 426(6963): 194-198.
- [3] Günes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer [J]. Cell, 2013, 152(3): 390-393.
- [4] Mason PJ, Bessler M. The genetics of dyskeratosis congenita [J]. Cancer Genet, 2011, 204(12): 635-645.
- [5] Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, et al. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 66(2): 99-117.
- [6] Nandakumar J, Cech TR. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(2): 69-82.
- [7] Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases [J]. FEBS J, 2013, 280(14): 3180-3193.
- [8] Bojesen SE. Telomeres and human health [J]. J Intern Med, 2013, 274(5): 399-413.
- [9] Conomos D, Pickett HA, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: Remodeling the telomere architecture [J]. Front Oncol, 2013, 3:27.
- [10] Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer

- [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 9-18.
- [11] Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure [J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4446-4455.
- [12] Dong W, Qian Y, Yang L. Telomerase, hTERT and splice variants in patients with myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Res*, 2014, 38(7): 830-835.
- [13] Moro-Garcia MA, Alonso-Arias R, Lopez-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response [J]. *Curr Genomics*, 2012, 13(8): 589-602.
- [14] Yang L, Mailloux A, Rollison DE, et al. Naive T-cells in myelodysplastic syndrome display intrinsic human telomerase reverse transcriptase (hTERT) deficiency [J]. *Leukemia*, 2013, 27(4): 897-906.
- [15] Weng NP, Levine BL, June CH, et al. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(6): 2471-2479.
- [16] Barsov EV. Telomerase and primary T cells: Biology and immortalization for adoptive immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 407-421.
- [17] Hathcock KS, Weng NP, Merica R, et al. Cutting edge: Antigen-dependent regulation of telomerase activity in murine T cells [J]. *J Immunol*, 1998, 160(12): 5702-5706.
- [18] Tamayo M, Mosquera A, Rego JI, et al. Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases [J]. *Mutat Res*, 2010, 683(1/2): 68-73.
- [19] Röth A, de Beer D, Nüchel H, et al. Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70 + /CD38 + chronic lymphocytic leukaemia [J]. *British Journal of Haematology*, 2008, 143(3): 383-386.
- [20] Cifuentes-Rojas C, Shippen DE. Telomerase regulation [J]. *Mutat Res*, 2012, 730(1/2): 20-27.
- [21] Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. *Gene*, 2012, 498(2): 135-146.
- [22] Gladych M, Wojtyla A, Rubis B. Human telomerase expression regulation [J]. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89(4): 359-376.
- [23] Chebel A, Rouault JP, Urbanowicz I, et al. Transcriptional activation of hTERT, the human telomerase reverse transcriptase, by nuclear factor of activated T cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(51): 35725-35734.
- [24] Terme JM, Mocquet V, Kuhlmann AS, et al. Inhibition of the hTERT promoter by the proto-oncogenic protein TAL1 [J]. *Leukemia*, 2009, 23(11): 2081-2089.
- [25] Chiang YJ, Hemann MT, Hathcock KS, et al. Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(16): 7024-7031.
- [26] Bougel S, Lhermitte B, Gallagher G, et al. Methylation of the hTERT promoter: a novel cancer biomarker for leptomeningeal metastasis detection in cerebrospinal fluids [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2216-2223.
- [27] Lamy E, Goetz V, Erlacher M, et al. hTERT: Another brick in the wall of cancer cells [J]. *Mutat Res*, 2013, 752(2): 119-128.
- [28] Röth A, Baerlocher GM, Schertzer M, et al. Telomere loss, senescence, and genetic instability in CD4 + T lymphocytes overexpressing hTERT [J]. *Blood*, 2005, 106(1): 43-50.
- [29] Luiten RM. Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4 + helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Blood*, 2003, 101(11): 4512-4519.
- [30] Menzel O, Migliaccio M, Goldstein DR, et al. Mechanisms regulating the proliferative potential of human CD8 + T lymphocytes overexpressing telomerase [J]. *J Immunol*, 2006, 177(6): 3657-3668.
- [31] Thadikkaran L, Menzel O, Tissot JD, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of human CD8 (+) T lymphocytes overexpressing telomerase [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2007, 1(3): 299-311.
- [32] Lee AF, Sieling PA, Lee DJ. Immune correlates of melanoma survival in adoptive cell therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(2): e22889.
- [33] Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(4): 269-281.
- [收稿日期] 2014 - 10 - 23 [修回日期] 2014 - 12 - 07
- [本文编辑] 阮芳铭