

端粒酶激活机制研究进展

张如刚 王兴旺 谢 弘

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 随着对端粒和端粒酶在衰老和肿瘤中重要性认识的不断深入, 端粒酶的激活途径已日益成为这一研究领域的热点. 已发现, MYC 原癌蛋白 (myelocytomatosis virus oncoprotein, MYC) 在端粒酶的激活中起关键作用. 它可以与 TERT 基因启动子区域内的 E 盒结合反式直接激活端粒酶, 还可能介导了细胞内其他分子如人乳头瘤病毒 E6 癌蛋白 (human papillomavirus E6 oncoprotein, HPV-E6) 和雌激素等对端粒酶的激活. 雌激素也可与雌激素受体形成复合物, 直接与 TERT 基因启动子区域内的退化雌激素反应元件结合反式激活端粒酶. 此外, 腺瘤样结肠息肉癌蛋白 (adenomatous polyposis coli protein, APC)、p53 及调节蛋白质磷酸化和去磷酸化过程的酶类等亦可能参与了端粒酶活性的激活.

关键词 衰老, 肿瘤, 端粒酶, MYC, HPV-E6, 雌激素

学科分类号 Q50

端粒 (telomere) 是存在于真核生物染色体末端由串联重复的 DNA 序列及其相关蛋白质所组成的结构. 端粒酶 (telomerase) 是一种由蛋白质和 RNA 构成的核糖核蛋白体, 为 RNA 依赖的 DNA 聚合酶, 能将端粒片段加至端粒的末端. 已发现, 端粒酶在细胞的永生化和肿瘤增殖的维持中起重要作用. 因而, 端粒酶的激活途径备受关注.

研究表明, 端粒酶活性缺失的端粒酶 RNA 组分基因敲除小鼠可以生存到第六代, 此时细胞已分裂了近 300 次. 而在小鼠肿瘤中, 端粒酶的激活一般发生在进行了 30~40 次分裂的细胞中. 这一研究提示, 在体内的条件下端粒酶的激活并不是在端粒缩短到极限后才发生的^[1]. 具体的激活途径可能包括 MYC 途径、HPV-E6/MYC 途径、雌激素/受体途径和 APC/MYC 途径等.

1 MYC 途径

在原代培养的无端粒酶活性的乳腺上皮细胞和成纤维细胞中发现, *myc* 基因的表达产物可直接激活端粒酶, 其活性可以达到肿瘤细胞中的水平^[2]. 已发现的人端粒酶组分包括: RNA 模板、催化亚单位 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和端粒酶相关蛋白-1 (telomerase associated protein 1, TEP-1). 分析胚胎、成年和各种肿瘤组织中的端粒酶活性及其与各组分表达之间的关系后发现, 端粒酶的活性与 TERT 的表达密切相关, 而与 RNA 模板和端粒酶相关蛋白-1 表达变化似无关联. 在正常细胞中表达 TERT 即可

诱导出端粒酶活性, 此结果亦证实了 TERT 是端粒酶活性的限制组分. MYC 激活端粒酶是否也是通过影响其 TERT 组分的呢? 研究发现 MYC 激活端粒酶的确是上调端粒酶的催化亚单位 TERT 的 mRNA 表达水平来实现的. Wu 等^[3]用凝胶阻滞法发现, 在人的 TERT 基因的启动子区存在两个典型的 MYC 结合位点和一个非典型的 MYC 结合位点, 由此启动 TERT 的表达. 而 Greenberg 等^[4]则发现在人和小鼠中的 TERT 启动子区只有两个典型的 6bp 的 MYC 结合位点即所谓 E 盒结构 (CACGTG), 而且是保守的. 在人类, 这两个位点分别位于-242 位和-34 位; 同时通过诱导报告基因的表达证实, MYC 对 TERT 基因的激活主要是通过-34 位 E 盒结合实现的. Takakura 等^[5]利用缺失研究发现, TERT 基因上游启动子区大约 181 bp 的富含 GC 序列构成了其核心调控序列; 通过凝胶阻滞分析发现其中有两个 E 盒结构 (CACGTG), 但用 MYC 或 MAX 的抗体却未发生超阻滞或竞争, 因此他们认为除了 MYC 外, 可能还存在其他的可识别该 E 盒结构的因子. Wick 等^[6]的研究亦证实了在 TERT 的启动子区 MYC 结合位点的存在. 总之, 目前已经明确在 TERT 基因启动子区有 MYC 的结合位点, 但具体数目及位置各家报道不一, 可能与研究手段等有关. 最近, Kyo 等^[7]研究发现在 TERT 基因启动子的核心区

Tel: (021) 64315030-2137, E-mail: zhangrugang@hotmail.com

收稿日期: 1999-11-06, 修回日期: 2000-02-21

域还存在 SP1 的结合位点——GC 盒, 且 SP1 和 MYC 对 TERT 基因的激活都是必需的, SP1 结合位点的突变会大大降低 MYC 对 TERT 基因的反式激活效率。

MYC 直接激活 TERT 基因的表达解释了先前的一些实验结果。首先, 它可以解释, 在 HL-60 和另外两株白血病细胞中, 反义 *myc* 为何可以抑制端粒酶的活性以及在端粒酶活性很高的肿瘤细胞中为何 *myc* 基因扩增率也很高。如, 在 16 例具有很高端粒酶活性的神经母细胞瘤患者中就有 11 例发生了 N-*myc* 扩增。其次, 它可以解释 MYC 和端粒酶为何在很多肿瘤组织中表达水平均升高以及小鼠发育过程中为何 TERT 和 MYC 的表达水平也具有一定的相关性。第三, 它可以解释为何 MYC 的表达水平和端粒酶的活性水平均与细胞的增殖密切相关。

2 HPV-E6/ MYC 途径

人乳头状病毒 (HPV) 的感染和人的子宫颈癌的发生是密切相关的。已知, HPV 的病毒癌基因 E6 在肿瘤发生中起重要的作用。E6 也是第一个被发现可以激活端粒酶的癌基因^[8]。已发现在人包皮角质化细胞和乳腺上皮细胞中单独表达 E6 即可激活端粒酶。但如此激活的端粒酶并未发现能作用于端粒使之延伸。分离单个表达 E6 的克隆发现, 只有一部分角质化细胞的端粒酶被激活了。这就提示, 可能由于大多数细胞的端粒仍在缩短, 这样少数细胞中端粒的延伸也就无法测知。也有可能端粒酶作用于端粒尚需其他因子参与。Zhu 等^[9]最近研究发现通过病毒转化的表达 TERT 的成纤维细胞具有端粒酶活性, 但端粒还在缩短。

最近的研究表明, E6 对端粒酶的激活至少部分是通过 MYC 来实现的, E6 可以在转录后水平调节 MYC 的表达^[2]。但这条途径似乎是细胞类型特异性的。在上皮细胞中 E6 的表达可以激活 MYC, 随后由 MYC 激活端粒酶。在成纤维细胞中 E6 的表达则不能激活 MYC, 这可能也是在成纤维细胞中 E6 的表达不能激活端粒酶的原因。利用转基因小鼠的研究也证明了 E6、MYC 和端粒酶三者之间的关系。在表达 E6 的小鼠中发现, 在肿瘤发生的早期阶段快速增殖的组织中就已出现 MYC 表达水平的上升, 随后, MYC 的表达水平不断升高。这和端粒酶在此种小鼠中表达水平的变化是一致的。在肿瘤发生的早期, 端粒酶的活性水平较低,

而在后期, 70% 的肿瘤组织中端粒酶的表达水平都很高。

尽管最近发现 E6 癌蛋白在细胞永生中可能还有其他的作, 但它主要是通过降解 p53 抑癌基因来起作用的。而 E6 癌蛋白对端粒酶的激活不是通过 E6 癌蛋白对 p53 降解的途径实现的。

Kiyono 等^[10]发现以逆转录病毒作为载体, 在人的角质化细胞和乳腺上皮细胞中表达 TERT 可以诱导端粒酶的活性表达, 但却不会使细胞发生永生。而只有当 TERT 和 HPV E7 同时表达后, 细胞才可以度过危机期成为永生性的细胞, 亦即在细胞的永生中, 端粒酶的 TERT 和 HPV E7 是协同作用的。这一结果提示在细胞永生过程中 E6 和 E7 的协同作用, 而 E6 的作用主要可能是通过激活端粒酶来实现的。

3 雌激素/受体途径

最近研究发现雌激素 (estrogen) 受体阳性的 MCF-7 人乳腺癌细胞用雌二醇处理后端粒酶活性升高, 同时, TERT 基因的表达水平亦升高。分析 TERT 基因的启动子区发现在 -2677 位有一个不完全回文的退化 (degenerate) 雌激素反应元件, 在 -873 位可能存在另一个与 SP1 结合位点相邻的雌激素反应元件。凝胶阻滞实验表明雌激素受体可以直接与 -2677 位雌激素反应元件结合, 从而启动 TERT 基因的表达。研究还发现当 MYC 结合位点发生突变后, 雌二醇对 TERT 基因的激活作用消失。在此过程中 *myc* 的表达水平也升高。这一结果提示雌激素不但可直接激活 TERT 基因的表达, 而且还可通过激活 *myc* 的表达间接促进 TERT 基因的表达, 从而激活端粒酶。

雌激素对端粒酶的激活解释了月经周期中子宫内膜细胞的端粒酶活性的变化。同时, 这一途径很可能是雌激素诱导产生子宫内膜癌变的分子机制^[11]。

4 APC/ MYC 途径

腺瘤样结肠息肉癌蛋白 (adenomatous polyposis coli protein, APC) 是一种细胞质蛋白, 可以结合和降解 β 链接素 (β -catenin)。在大部分直结肠肿瘤中 *apc* 基因都发生突变, 导致 β 链接素的积累, 后者与 T 细胞因子-4 (T cell factor-4, Tcf-4) 结合可以启动某些未知基因的转录。在诱导表达 APC 的直结肠癌细胞株 HT29 中发现, 抑

癌基因 *apc* 的诱导表达可以抑制 *MYC* 的表达. 因此, 他们认为 APC 通过 β -链接素/Tcf-4 直接调节 *myc* 基因的转录. Greider^[1] 认为这一结果提示了在包括直肠癌在内的肿瘤中可能存在另一端粒酶激活途径.

5 其他激活途径

Maini 等^[12] 对急性感染的单核白细胞增多症的研究发现, 大量克隆扩增的抗原特异的 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞中端粒酶活性也明显增强了. *MYC* 对端粒酶的激活可能也参与了这一过程. 由于 *MYC* 是 SRC YES 和 FYN 激酶的下流靶基因, 所以在 T 细胞激活的早期其表达水平就已上调, 再由 *MYC* 作用于 TERT 的启动子区, 从而激活端粒酶. 但 Liu 等^[13] 最近发现在各类淋巴细胞中 TERT 均有一定水平的表达, 因此他们认为转录后调控因子亦参与了对端粒酶活性的调节.

在人乳腺癌细胞中的研究发现蛋白激酶 C- α 和磷酸酶 2A 可以控制端粒酶激活和失活. 最近 Kang 等^[14] 在黑色素瘤细胞株 SK-MEL28 中发现蛋白激酶 B (又称 Akt 激酶) 可以使人 TERT 的 229 和 824 位的丝氨酸发生磷酸化, 从而激活和增强端粒酶的活性. 这些发现提示磷酸化在端粒酶激活中有调节作用.

Li 等^[15] 在人乳腺癌细胞的研究表明, p53 可以通过其羧基端区域与 TEP-1 靠近氨基端区域的相互作用抑制端粒酶活性. 这一结果提示 p53 可能参与了端粒酶活性的调节, 其在癌变过程中的表达下调使端粒酶活性更易于激活.

6 结 语

从现有资料来看, 端粒酶的激活是一个多因子参与的多水平的调节过程, 涉及转录水平调控、蛋白质之间的相互作用以及蛋白质的磷酸化等. 其中 *MYC* 构成了端粒酶激活途径的核心. 它除了能直接激活端粒酶外, 还介导了细胞内多种信号分子对端粒酶的激活, 但具体细节仍不很清楚. 另外, 在细胞内还存在其他的非 *MYC* 介导的端粒酶激活途径. 例如, 一些信号分子可能通过对 TERT 转录后水平的调节激活端粒酶, p53 可能通过与 TEP-1 的相互作用激活端粒酶. 现将端粒酶激活的可能途径总结于图 1. 无疑, 对端粒酶激活途径的研究将有助于认识端粒酶在衰老和肿瘤发生、发展中的意义, 从而针对端粒酶的激活途径, 设计抗衰老和抗

肿瘤的新策略.

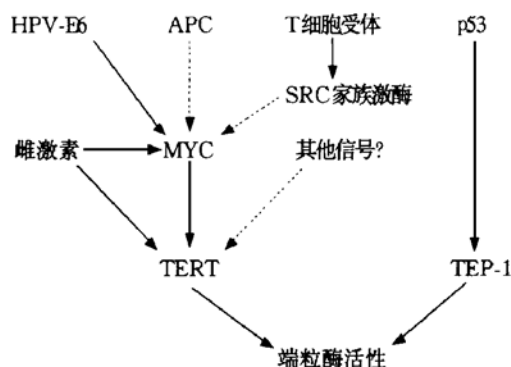


图 1 端粒酶激活途径示意图

参 考 文 献

- Greider C W. Telomerase activation: one step on the way to cancer? Trends Genet, 1999, 15 (3): 109~ 112
- Wang J, Xie L Y, Allan S, *et al.* Myc activates telomerase. Genes Dev, 1998, 12 (12): 1769~ 1774
- Wu K J, Grandori C, Amacker M. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. Nature Genet, 1999, 21 (2): 220~ 224
- Greenberg R A, Hagan R C O, Deng H Y, *et al.* Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-MYC but is not functionally equivalent in cellular transformation. Oncogene, 1999, 18 (5): 1219~ 1226
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al.* Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. Cancer Res, 1999, 59 (3): 551~ 557
- Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Gene, 1999, 232 (1): 97~ 106
- Kyo S, Takakura M, Taira T, *et al.* Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). Nucleic Acids Res, 2000, 28 (3): 669~ 677
- 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~ 82
- Zhu J Y, Wang H, Bishop J M, *et al.* Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 (7): 3723~ 3728
- Kiyono T, Foster S A, Koop J I, *et al.* Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature, 1998, 396 (6706): 84~ 88
- Kyo S, Takakura M, Kanaya T, *et al.* Estrogen activates telomerase. Cancer Res, 1999, 59 (23): 5917~ 5921
- Maini M K, Soares M V D, Zilch C F, *et al.* Virus-induced CD8⁺ T cell clonal expression is associated with telomerase up-regulation and telomere length preservation: a mechanism for rescue from replicative senescence. J Immunol, 1999, 162 (8): 4521~ 4526

- 13 Liu K, Schoonmaker M M, Levine B L, *et al.* Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (9): 5147~ 5152
- 14 Kang S S, Kwon T, Kwon D Y, *et al.* Akt Protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13085~ 13090
- 15 Li H, Cao Y, Berndt M C, *et al.* Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein P53 *in vitro*. *Oncogene*, 1999, **18** (48): 6785~ 6794

Progress on Mechanism of Telomerase Activation.

ZHANG Ru-Gang, WANG Xing-Wang, XIE Hong
(Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Following the importances of telomere and telomerase in senescence and tumor were recognized,

the pathway of telomerase activation is becoming the focus of this area. By now, MYC was found to play key role in telomerase activation. It could activate telomerase directly by binding to E-box in promoter region of TERT gene. At the same time, MYC might mediate other molecules to activate telomerase, such as HPV-E6 and estrogen. Estrogen could activate telomerase directly by forming estrogen/estrogen receptor complex binding to imperfect palindromic degenerate estrogen responding element in promoter region of TERT gene. APC, p53 and protein phosphorylation might also involve in telomerase activation.

Key words Senescence, tumor, telomerase, MYC, HPV-E6, estrogen

丙型肝炎病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 研究进展*

陈忠斌 王升启

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 由于缺乏合适的 HCV 感染细胞模型, 严重制约了 HCV 复制, 特别是 HCV 复制的关键因子依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 的研究. 对 HCV 序列比较分析并通过异源表达证明 NS5B 是 HCV 复制的 RdRp. NS5B C 端疏水性氨基酸区域以及 NS5B 与细胞膜形成复合体等影响 NS5B 溶解性. 在合适的反应条件下 NS5B 可以多种 RNA 分子为模板催化 RNA 复制, 特别是能有效复制 HCV 全长 (+) RNA. 高浓度 GTP 激活 HCV RdRp 活性. NS5B N/C 端缺失突变和保守性 A、B、C 区中的点突变影响 RdRp 活性, 但 D 区 345 位精氨酸突变为赖氨酸时 RdRp 活性明显升高. HCV RdRp 的发现及其功能研究为 HCV 药物研究提供了新型靶标.

关键词 丙型肝炎病毒, 非结构蛋白 NS5B, 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, RNA 复制

学科分类号 Q939.47

1989 年首次证实丙型肝炎病毒 (HCV) 为输血传播的非甲非乙型肝炎的主要病原, 随后对 HCV 基因组和蛋白质结构和功能进行了深入研究. 现已阐明 HCV 为黄病毒科丙型肝炎病毒属成员, 基因组由长约 9.5 nt 的 (+) RNA 构成. HCV 基因组 5' 和 3' 端均有一段非翻译区 (NTR), 其间为一编码多聚蛋白的 ORF (约 3000 氨基酸). 在宿主细胞和病毒蛋白酶作用下, HCV 多聚蛋白裂解形成至少 10 种具有不同功能的病毒蛋白: C (核心蛋白); E1 和 E2 (糖基化囊膜蛋白); p7; NS2 (金属蛋白酶); NS3 (丝氨酸蛋白酶; NTPase 和

解旋酶); NS4A (NS3 蛋白酶辅因子); NS4B; NS5A (与 HCV 干扰素抗性有关) 和 NS5B. 由于缺乏合适的 HCV 感染细胞系统, 目前对 HCV 复制的关键酶——依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 以及 HCV 基因组 RNA 的复制及其调节机制等缺乏深入研究. 氨基酸序列分析发现, NS5B 含有与其他 (+) RNA 病毒 RdRp 相同的保守性氨基酸模体

* 军事医学科学院科技创新基金资助项目 (9805107).

Tel: (010) 66932211, E-mail: chenzhongbin@USA.net

收稿日期: 1999-11-07, 修回日期: 2000-02-21