

- 15 Caqdwel R C, Joyce G F. PCR Methods Appl, 1992; 2: 28
- 16 Arnold F H. FASEB J, 1993; 7: 744
- 17 Stemmer W P C. Nature, 1994; 370: 389
- 18 Cheng S, Fockler C, Barnes W M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 5695

Advances of PCR Technique in Application.

Zhang Hongying, Zhang Jin (State Key Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023, China).

Abstract In recent years PCR technique has shown its advantages and flexibility with the

development of its methodology. This not only extended its application, but also promoted the rapid development of molecular biology. The advances of PCR used in gene and protein engineering are reported here, including ligation-independent cloning, random-primed/anchored PCR, random rapid amplification of cDNA ends, recombinant PCR and megaprimer PCR.

Key words PCR technique, gene, UDG cloning, primer

端粒与端粒酶研究进展

杨学辉 冯威健¹⁾ 温进坤

(河北医科大学生化教研室, 石家庄 050017)

摘要 细胞分裂中染色体因其末端(端粒)的 DNA 不能完全复制而短缩, 使细胞逐渐失去增殖能力而衰老。端粒酶可延长染色体末端 DNA, 端粒酶的活化使细胞无限增殖。85%左右的恶性肿瘤端粒酶表达阳性, 生殖细胞和无限繁殖的细胞系中端粒酶表达也呈阳性。文章综述了端粒的构成和功能、端粒酶在端粒合成中的作用, 介绍了端粒酶活性的测定方法、细胞恶变与端粒酶激活的关系, 并论及通过抑制端粒酶活性来治疗癌症的可能性。

关键词 端粒, 端粒酶, 恶性肿瘤

一般认为癌症是由基因多位点突变引起细胞的生长失控造成的。不同的癌症, 其突变发生于特定部位的特异性基因。然而最新的研究表明, 端粒酶(telomerase)激活在细胞癌变过程中发挥重要作用。细胞连续分裂过程中, 染色体末端(即端粒, telomere)的 DNA 不能复制, 导致染色体逐渐短缩, 失去稳定性。这一所谓“末端复制问题”可被端粒酶的 DNA 聚合活性所解决。与其他 DNA 聚合酶不同, 端粒酶是由 RNA 和蛋白质组成的核蛋白(RNP)^[1,2]。利用高灵敏度的酶活性分析法可在绝大部分恶性肿瘤和无限增殖的细胞系中检测到端粒酶活性, 而良性肿瘤细胞中测不出此酶活性。这表明端粒酶在肿瘤恶变的过程中起着重要作用, 有可能成为癌症治疗的新靶点。

本文将综述端粒与端粒酶研究的最新进展。

1 端粒及端粒序列

本世纪三四十年代 Muller^[3]首先发现染色体末端或端粒是维持染色体完整所必需的。之后, Blackburn 等^[4]报道: 四膜虫端粒是 5'-GGGGTT-3' 的连续重复序列, 并且每条染色体的端粒重复单位的重复次数不同。其他生物也存在类似的端粒重复序列^[5]。端粒重复序列位于染色体 DNA 的 3' 末端, 长约 5~8 bp, 富含 G。人的端粒重复单位是 5'-TTAGGG-3', 重复长达 15 kb^[6]。

¹⁾河北医科大学第四医院肿瘤内科。

DNA 复制沿 5'→3' 方向进行, RNA 引物起始聚合反应, DNA 聚合后, RNA 引物降解, DNA 聚合酶发挥作用填补缺口. 而与模板 DNA 3' 末端结合的引物降解后则不能填补. 这种复制方式潜在一定的危机, 多次复制后 3' 末端染色体 DNA 发生短缺, 即所谓“末端复制问题”. 通过染色体末端可延伸的非编码端粒, 可缓解这种危机. 研究表明, 端粒至少有两个功能: 稳定染色体, 防止染色体重组和末端酶解^[7].

2 端粒酶与端粒序列合成

Shampay 等^[8]发现每种细胞都有将染色体的特异性末端序列转移到外源 DNA 上的能力. Greider 等^[9]用四膜虫提取液, 检测其在单链端粒 DNA 寡核苷酸引物上合成端粒序列的活性, 证实末端转移酶 (或端粒酶) 的活性依赖含端粒序列的寡核苷酸引物, 与 DNA 模板无关. 用 RNase 处理提取液, 则不再延伸引物, 可见端粒酶复合体中含有 RNA. 分离端粒酶复合体, 得到一个 159 个核苷酸的 RNA 分子. 他们认为, RNA 有特殊的作用, 即如果 RNA 中含有 CCCCAA 的序列, 则可作为指导序列, 随之克隆了编码 RNA 的基因, 证实 43~51 bp 之间确实含有 5'-CAACCCCAA-3' 序列. 当端粒酶与含有 5'-TTGGGGTTG-3' 序列的反义脱氧寡核苷酸预保温后, 可影响端粒酶的引物延伸活性, 与 DNA 其他区段互补的 DNA 寡聚物则无此效应. 当同时加入 RNase H 和反义寡核苷酸时, 与寡核苷酸杂交的 RNA 被降解. 这些结果提示: CAACCCCAA 序列是端粒重复合成的模板. 定点突变也证实, 端粒酶的突变体在细胞内合成相应改变的重复序列^[2].

目前认为, 端粒酶是利用其 RNA 作模板合成端粒的一种 RNP 复合物. 换句话说, 端粒重复序列是由 RNA 依赖的 DNA 聚合酶 (即逆转录酶) 合成到 3' 末端的, 再利用单链 DNA 聚合酶形成双链端粒. 许多单细胞生物的端粒酶 RNA 已被鉴定, 每种都含有潜在的

模板序列, 可与相应的端粒重复序列互补结合.

端粒酶中蛋白质组分的分离较难, 最近 Greider^[10]等论述了四膜虫端粒酶两个多肽成分的纯化及其基因的克隆工作.

3 端粒与细胞分裂

70 年代初, Olovnikov^[11]提出染色体末端丢失可导致细胞退出分裂周期, 并得到许多实验证实. 1990 年 Harely 等^[12]则认为端粒的长短可反映细胞有丝分裂的次数. 最有力的证据是: 分离培养的 0 岁 (胎儿组织) 到 93 岁不同年龄的成纤维细胞, 其端粒的长度与细胞分裂有关, 细胞分裂的次数与细胞最初的端粒长度呈正比. 进一步研究发现衰老性侏儒症患者细胞端粒明显较正常人短, 早衰患者的细胞在培养中增殖能力降低. 端粒长度与衰老细胞增殖间的关系说明, 端粒可估计和限制细胞分裂次数.

4 端粒酶与恶变

端粒酶及其所依赖的 RNA 的发现是端粒生物学研究的里程碑. 1990 年 Harley 等^[12]断言端粒酶活化是细胞无限增殖所必需的. 而无限增殖则是肿瘤恶变的病因^[13,14].

Harley 等^[12]提出了端粒假说, 认为当正常人体细胞的端粒达到一定长度时即开始短缩, 并启动终止细胞分裂的信号. 正常人的双倍体细胞不能进一步分裂, 开始衰老死亡, 称为第一死亡期 (M1). 业已证实, 癌基因如 SV40T 抗原, 抑癌基因 P₅₃ 和 Rb 的突变均能使细胞逃逸 M1, 获得一定的额外增殖能力 (但并非无限增殖), 此时端粒酶仍为阴性, 端粒还在进一步短缩. 进入第二死亡期即细胞极期 (M2) 的细胞, 大部分寿命达到极限而死亡, 而生存下来的细胞具有无限增殖的能力, 且端粒酶阳性. 因为癌细胞是无限增殖的, 所以提出癌变与端粒酶激活有关.

这一假说引伸出边缘端粒诱导细胞死亡, 认为端粒酶的复活可延长细胞寿命, 肿瘤细胞

无限增殖的特征可能是端粒酶异常复活的结果。然而,端粒的长度不能精确地反应端粒酶活性,某些肿瘤组织的端粒显著短于正常组织。

Counter 等^[13]观察被 SV40 或腺病毒 DNA 转化的原代细胞在无限增殖期的端粒长度和端粒酶活性,发现极短的端粒趋于稳定,进一步测定这些细胞的端粒酶活性,发现无限增殖的细胞的端粒稳定性与端粒酶活性的启动有关。这些实验解答了肿瘤细胞端粒较短和端粒酶活化同时存在这一矛盾:端粒降解后端粒酶被激活以稳定被降解的末端。

5 端粒酶的测定方法

测定端粒酶活性的方法最初采用分析细胞提取液在引物 3' 末端上合成重复序列的能力^[2,15],通过放射性核苷酸标记,聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影观察结果。端粒酶促反应呈现 6 个核苷酸合成的脉冲性,因而形成典型的间隔 6 个核苷酸的图形。Kim 等^[16]通过

两个关键性技术步骤,增加了端粒酶分析的敏感性。首先,制备提取液时用去垢剂裂解,只用少量细胞,可获得较高的端粒酶活性。第二,利用 PCR 扩增端粒酶促反应产物,其灵敏度超过常规分析法的 10 000 倍左右。这种灵敏的分析方法称为端粒重复序列扩增法 (telomere repeat amplification protocol, TRAP) (图 1)。

6 人体组织端粒酶的表达

利用 TRAP 法对多种组织进行测定,发现 98/100 株无限增殖细胞系有端粒酶活性,12 型 101 种肿瘤组织中 90 种有端粒酶活性,22 种培养的终末细胞及 50 种正常体细胞则无端粒酶活性,良性增生性纤维瘤组织也无活性,而正常卵巢和睾丸组织及造血细胞中有端粒酶活性^[16~18],表明癌组织、无限增殖细胞系与端粒酶的活化有密切关系。自 TRAP 分析法报道后,已检测 400 多种肿瘤标本及多种人体正常组织。实验表明,大多数恶性肿瘤 (85%) 有端粒酶活性。而且端粒酶阳性者 95% 属进展期,通常较阴性者病变范围大、淋巴结转移多,术后 4 年生存率为 30%,预后明显不良。而端粒酶阴性者 80% 属早期,术后 4 年生存率超过 75%。可见端粒酶测定是诊断恶性肿瘤、判断预后的良好指标。

虽然多数肿瘤组织中端粒酶活性很高,但仍有少数恶性肿瘤不能观察到该酶活性^[16],有可能这些细胞逃逸了 M1,具有一定的增殖能力,但端粒酶尚未被激活,所以并不是无限增殖^[19],往往这些癌细胞的恶性度相对较低。也可能它们以其他方式完成端粒复制,如利用反转录系统或救援途径等^[20]。

7 端粒酶抑制剂-癌症治疗的新靶点

在癌症治疗上,端粒酶有可能是一个极好的靶点。抑制此酶或许能有效地降低某些肿瘤细胞的增殖。

Greider 等^[9]提出通过反义寡核苷酸结合 RNA 模板区域阻断端粒酶活性的方法。另一

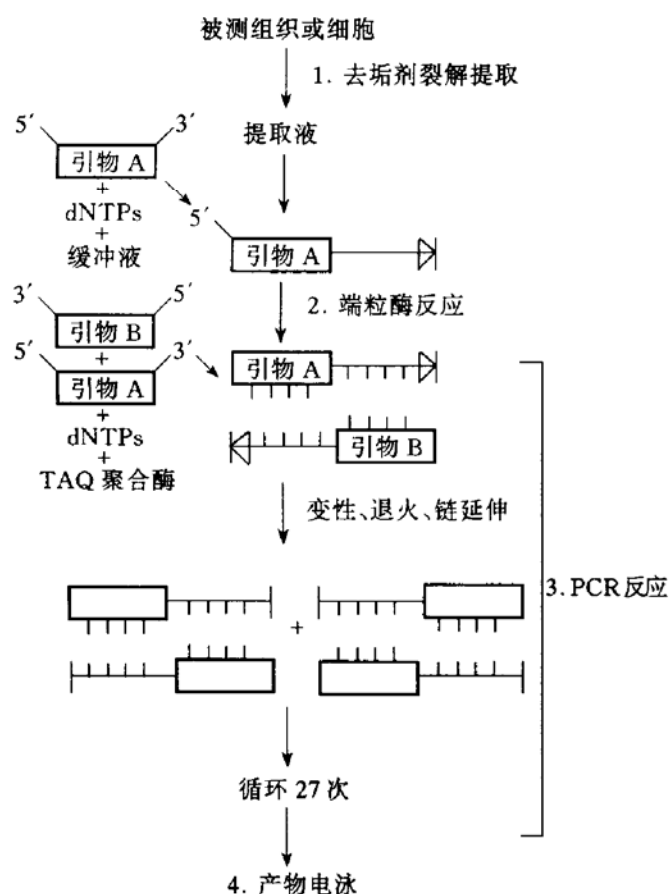


图 1 端粒重复序列扩增法的流程

战略是促使细胞产生端粒酶 RNA 突变体, 当突变的 RNA 大量表达后, 可同野生型 RNA 竞争端粒酶蛋白, 形成含突变 RNA 的酶复合物. 在四膜虫实验中这些异常酶结合到染色体末端的错误序列上, 产生的端粒不能稳定染色体, 结果引起四膜虫细胞死亡.

四膜虫端粒酶蛋白目前已被部分纯化和鉴定^[10]. 随着端粒酶蛋白的分离, 蛋白部分也可能成为抑制端粒酶活性的靶点. 特别是人端粒酶蛋白氨基酸序列相对保守, 研究进展可能更快.

细胞杂交研究表明, 将有端粒酶活性的细胞与无端粒酶活性的细胞杂交后, 杂交细胞的生命缩短. 提示体细胞可能存在端粒酶抑制剂, 这种机制及假定的抑制剂可能最终被用于抑制端粒酶活性.

端粒酶疗法可能对生殖细胞、造血细胞等有潜在的副作用, 但是, 这些细胞的端粒一般较肿瘤细胞长, 端粒酶抑制剂更容易使肿瘤细胞丢失端粒, 因而副作用较小. 另外, 也可通过事先保存造血干细胞或生殖细胞等方法来减低副作用.

综上所述, 端粒及端粒酶的生物学研究取得了一定进展, 特别是证实端粒酶在肿瘤的发生发展上具有重要作用. 然而端粒酶能否真正成为癌症诊断的特异标志及癌症治疗的靶点, 尚须进行大量深入的研究. 在端粒酶激活的水平上, 搞清端粒酶在什么阶段、怎样被激活, 不仅对征服癌症、而且对细胞分裂周期的调控以及衰老的研究将起到巨大的推动作用.

参 考 文 献

- 1 Greider C W, Blackburn E H. *Nature*, 1989; **337**: 331
- 2 Greider C W, Blackburn E H. *Cell*, 1989; **51**: 887
- 3 Muller H J. *Woods Hole*, 1938; **13**: 181
- 4 Blackburn E H, Gall J G. *J Mol Biol*, 1978; **120**: 33
- 5 Blackburn E H. *Nature*, 1991; **350**: 569
- 6 Allshire R C, Gosden J R, Cross S H *et al.* *Nature*, 1988; **332**: 656
- 7 de Lange T. *EMBO J*, 1992; **11**: 717

- 8 Shampay J, Szostak J W. *Nature*, 1984; **310**: 154
- 9 Greider C W, Blackburn E H. *Cell*, 1985; **43**: 405
- 10 Greider C W, Autexier C, Buchkovich K *et al.* *Proc Am Asso Cancer Res*, 1995; **36**: 672
- 11 Olovnikov A M. *J Theor Biol*, 1973; **41**: 181
- 12 Harley C B, Futcher A B, Greider C W. *Nature*, 1990; **345**: 458
- 13 Counter C M, Avilion A A, Lefevre C E *et al.* *EMBO J*, 1992; **11**: 1921
- 14 Shay J W, Wright W E, Werbin H. *Int J Oncol*, 1993; **3**: 559
- 15 Morin G B. *Cell*, 1989; **59**: 521
- 16 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R *et al.* *Science*, 1994; **266**: 2011
- 17 Nilsson P, Mehle C, Remes K *et al.* *Oncogene*, 1994; **9**: 3043
- 18 Chiu C P, Dragowski V, Kim N W *et al.* *Proc Am Asso Cancer Res*, 1995; **36**: abstr 3306
- 19 Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1995; **87**: 895
- 20 Levis R W, Ganesan R, Houtchens K *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 1083

Progress on Telomeres and Telomerase Yang Xuehui, Feng Weijian, Wen Jinkun (*Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China*).

Abstract Shortening of the chromosome caused by DNA incompleting replication of chromosome end (telomeres) at each cell division leads the cells to lose proliferative capacity and senescence. Telomerase elongates telomeric DNA. And the unlimited cell proliferation needs telomerase activation. About 85% of malignancy express positive for telomerase. The formations and functions of telomeres and the effects of telomerase on the telomere synthesis are reviewed. The measuring of telomerase and the relationship between cancer cell and activation of telomerase are also introduced. The possibility of the cancer treatment by the telomerase inhibition is discussed.

Key words telomeres, telomerase, cancer