

端粒酶与肿瘤

颜芹¹ 指导:齐元富²

(1 山东中医药大学 2005 级七年制硕士研究生 济南 250014; 2 山东省中医院 济南 250011)

关键词:端粒;端粒酶;肿瘤;综述

中图分类号:R 730.23

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2011.06.066

1938 年, Hermann Muller 利用 X 线照射果蝇产生突变体, 观察到染色体的末端非常稳定, 未出现断裂、缺失等破坏, 并给其命名为端粒。1984 年, Greider 作为博士生加盟了 Liz 实验室, 她们从四膜虫细胞提取物中发现了端粒酶(telomerase), 并证实了其能延伸端粒 DNA。1989 年 Morin 等人在宫颈癌的 Hela 细胞中发现了活化的人端粒酶, 1997 年证明四膜虫和酵母端粒酶的催化亚基, 从此端粒及端粒酶的研究成为现代生物学的热点^[1-2]。

1 端粒与端粒酶的结构及作用

1.1 端粒 端粒(telomere)是真核细胞线形染色体末端的特化部位, 由端粒 DNA 和端粒蛋白质构成的一种特殊结构。人类端粒 DNA 由 5' 向 3' 方向的 6 个重复序列 TTAGGG 串联组成, 这种结构具有高度保守性。Dyneke 等^[3]证实端粒在种属间存在特异性, 发现人类端粒全长 5~10 kb, 而小鼠则达 50 kb。端粒具有维持染色体结构稳定和完整的作用, 随着细胞的分裂, 端粒不断缩短, 当端粒缩短到一定程度时, 就失去了保护染色体末端的功能, 结果是编码区基因被破坏, 染色体发生融合或降解, 细胞发生衰老或死亡。

1.2 端粒酶 端粒酶是一种能延长端粒末端的核糖蛋白酶, 是目前人体内发现的唯一的由 RNA 和蛋白质构成的具有逆转录酶活性的核糖核酶。端粒酶至少由 3 个亚单位构成, 即 RNA 亚单位(HTR)、端粒酶催化亚单位(TERT)和端粒酶蛋白亚单位(TEP1)。目前研究较多的是人端粒酶催化亚单位 hTERT, 由 hTERT 基因编码的 1 132 个氨基酸残基组成, 分子量为 127 kDa^[4]。有端粒酶活性的肿瘤细胞几乎均存在 hTERT 的表达, 但在正常细胞虽有 HTR 和 TEP1 的表达, 却没有 hTERT 的表达, 这说明端粒酶活性主要由 hTERT 表达水平的高低决定^[5]。陈陵等^[6]采用脂质体法将克隆有人全长的 cDNA hTERT 的真核荧光颗粒转染端粒酶阴性的人骨肉瘤 U-2OS 细胞, 结果证实将 hTERT 转染端粒酶阴性的依赖 ALT 机制延长端粒的肿瘤细胞后, 可激活端粒酶表达, 这表明 hTERT 与端粒酶活性有着密切的关系, 是很有潜力的肿瘤标志物。

2 端粒酶与细胞衰老和肿瘤形成

2.1 细胞衰老 细胞衰老是指细胞从一个活性的生长状态转变为不可逆转的生长停滞状态。Leonard Hayflick 和 Paul Moorhead 于 1961 年发现人成纤维细胞在体外培养时增殖次数是有限的, 其分裂次数总存在一个极限值, 正常二倍体细胞在体外培养条件下增殖分裂 50~70 代就进入一种衰老状态, 虽能存活但无法继续传代培养, 这种现象被称为 Hayflick 极限^[7]。这种衰老还发生于角质化细胞、内皮细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞、肾上腺皮质细胞及软骨细胞等。细胞衰老还有细胞早熟衰老, 细胞早熟衰老可以在 DNA 损伤、氧化应激、癌基因激活等因素作用下发生。从分子生物学上讲, 衰老是一个高度管制的过程, 通过执行 G1/S 期细胞的阻滞来限制细胞的复制, 以此作为对各种因素的回应。细胞衰老主要通过两条细胞信号转导途径调控: p53-p21 通路和 p16-pRB 通路^[8]。p53 和 pRB 是两个重要抑癌基因。p21 是一种细胞周期抑制蛋白, 是 p53 的下游信号分子, 在细胞周期阻滞、细胞分化和细胞凋亡中发挥重要作用。p53 的激活可上调 p21 的表达, 抑制 CDK2/Cyclin E 复合物的活性而阻止细胞从 G1 期向 S 期转变^[9]。p16 基因是由 Kamb 等于 1994 年发现的一个直接控制细胞增殖周期的抑癌基因, 是最早发现的 Ink4 家族成员, 其编码的蛋白质即 p16 蛋白, p16 蛋白是细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK4/CDK6)的特异性抑制蛋白, 在细胞周期 G1 限制点通过 p16-CyclinD/CDK 4(CDK6)-pRB 调控途径发挥作用。它可与 CyclinD 竞争性结合 CDK4/CDK6, 抑制其酶的活性, 阻止 CyclinD 与 CDK4/CDK6 形成的复合物对 pRB 的磷酸化, 进而阻止 pRB 释放游离的转录因子 E2F, 导致细胞周期停滞于 G1/S 交界处, 对细胞增殖周期起负调节作用^[10-11]。Chin 等^[12]通过基因敲除端粒酶的 RNA 组分获得了端粒酶敲除的小鼠模型(mTR^{-/-}), 随着末端复制的进行, 端粒长度逐渐缩短, 直至端粒功能出现异常, 检测 mTR^{+/+} 和 mTR^{-/-} 后代小鼠中的 p53 的表达, 发现前者 p53 检出率为 21%, 而后者检出率为 80%。提示 mTR^{-/-} 后代小鼠细

胞中端粒功能异常能导致 p53 持续激活, 增强了 p53 的表达水平, 从而激活 p53-p21 通路, 使细胞由 G1 期到 S 期的转变受到阻滞, 诱发细胞的衰老。

2.2 细胞永生化和肿瘤形成 细胞永生指体外培养细胞自发或受外界因素影响从增殖衰老危机中逃离, 从而具有无限增殖能力的过程。细胞永生是肿瘤细胞的重要特征之一。由于“末端复制问题”的存在, 细胞不会容易的产生永生, 细胞要获得“永生”, 必须要经过两个限制点的约束, 即 M1 期和 M2 期。随着细胞的不断分裂增殖, 端粒程序进行性缩短, 当缩短至一定程度时, 细胞周期检查点发出周期停止信号, 细胞生长被阻止在死亡 1 期, 接着又在某些因子的作用下, 如病毒蛋白、癌基因、负性抑癌基因等, 细胞越过死亡 1 期继续分裂增殖, 端粒程序继续缩短, 这时由于染色体末端失去“帽子”结构而失于稳定, 有双着丝粒形成, 细胞进入死亡 2 期, 此时端粒酶被一些因子激活, 使其以自身 RNA 为模板, 合成端粒 DNA 维持端粒长度, 恢复染色体的稳定结构, 从而使极少数的细胞越过 M2 期, 使细胞无限增殖下去, 进入永生状态, 从而产生肿瘤^[13]。

3 端粒酶与肿瘤的诊断和治疗

3.1 端粒酶与肿瘤的诊断 通过检测端粒酶活性可判断肿瘤的性质。研究表明, 端粒酶在 90% 以上的恶性肿瘤尤其是晚期肿瘤中高度表达。因此, 可以将端粒酶作为肿瘤的一个标志物, 来检测组织的良、恶性。有研究使用 TRAP 方法对骨肿瘤的组织标本进行端粒酶活性检测, 结果在良性骨肿瘤中端粒酶阳性率为 4.8% (3/62), 在恶性骨肿瘤中端粒酶阳性率为 80.6% (50/62), 证实端粒酶活性与骨肿瘤良恶性密切相关, 并且可能是判断骨肿瘤患者预后的重要参数^[14]。另有研究应用免疫组织化学法检测 48 例结直肠癌、19 例结直肠腺瘤和 11 例癌旁正常组织中端粒酶的活性表达, 结果显示端粒酶在结直肠癌中的阳性率为 87.5%, 明显高于 19 例结直肠腺瘤中的阳性率 26.3% (5/19) ($P < 0.05$) 和 11 例癌旁组织中的阳性率 0.0% (0/11) ($P < 0.01$), 且与结直肠癌组织病理学分级、淋巴结转移和临床分期密切相关 ($P < 0.05$)。证实端粒酶的表达与结直肠癌的发生呈高度相关, 检测标本中端粒酶活性表达有助于结直肠癌患者的预后评估^[15]。关于端粒酶与肿瘤良恶性的研究举不胜举, 众多实验证实通过端粒酶的确可以判断肿瘤的性质。但有些正常组织, 特别是增殖性强的干细胞、生殖细胞、活化的淋巴细胞及某些良性肿瘤组织 (如乳腺纤维腺瘤、增生性结节等

组织) 也可以检测到端粒酶的激活, 约 20% 的肿瘤不表达端粒酶, 正常鼻咽黏膜中端粒酶可呈阳性, 故不宜用于鼻咽原位癌诊断^[16]。因此, 其要作为肿瘤标志物应用于临床仍有一定的局限性, 病理仍是诊断肿瘤性质的“金标准”。

3.2 端粒酶与肿瘤的治疗

3.2.1 以端粒酶 hTERT 和 TEP1 为靶点 hTERT 与肿瘤关系最为密切, 是肿瘤反义药物的新靶点。有研究证实 hTERT 基因反义核酸降低 Jurkat 细胞端粒酶活性的表达, 且呈时间依赖性, 但是 hTERT 在良恶性肿瘤分化的临床应用上并不是一个可靠性的靶点^[17]。蛋白激酶 C (PKC) 信号传递系统是细胞内相当普遍的第二信号传导系统, 端粒酶的活化必须经过 TP1 和 TP2 两种磷蛋白的磷酸化, 而 PKC 能介导这两种物质的磷酸化, 因此, 端粒酶必须依赖 PKC 的作用, 所以从理论上说 PKC 抑制剂能抑制端粒酶的活化, 进而抑制肿瘤的形成^[18]。端粒酶蛋白抗体, 端粒酶蛋白亚单位 (TEP1) 是构成端粒酶不可缺少的一部分, 因此破坏其蛋白结构使其失活, 便可抑制端粒酶活性, 但目前尚无满意的人类端粒酶蛋白抗体。

3.2.2 以 RNA 模板 (hTR) 为靶点 RNA 模板 (hTR) 是构成端粒酶的重要结构, 因此通过特异性封闭 hTR 的活性区域, 从而抑制 hTR 活性, 阻断其转录或翻译过程, 抑制端粒酶活性, 进而使端粒随细胞分裂而逐渐缩短, 使细胞衰老^[19]。近年来有许多通过抑制 hTR 活性使肿瘤内端粒丢失进而抑制肿瘤的研究, 徐锋等^[20]通过构建以 hTR 基因为靶点的 RNA 干扰装置 PhTR-siRNA, 检测 PhTR-siRNA 对膀胱尿路上皮癌 BIU-87 细胞株的生物学效应, PhTR-siRNA 干扰 hTR 基因后膀胱尿路上皮癌 BIU-87 细胞株的生长受到抑制, 明显抑制端粒酶活性, 实时定量 PCR 验证 hTR 基因明显减少。廖晶等^[21]通过构建带突变模板的人端粒酶 RNA 亚基 (MT-hTR) 重组体, 将其转染人宫颈癌 HeLa 细胞, 重组体在细胞内能成功表达目的基因, 并且在 Mutant1 转染细胞中检测到相应的突变型端粒酶活性, 构建的 4 个 MT-hTR 重组体中, 有 3 个能使 HeLa 细胞生长速度减缓。这些研究均表明, 可以通过干扰 hTR 活性, 抑制端粒酶表达, 进而诱导细胞衰老或凋亡。

4 问题与展望

近些年来, 端粒酶已经引起众多专家学者的关注, 积累了丰厚的理论基础。既然端粒酶与肿瘤有着如此密切的关系, 可将端粒酶作为肿瘤的一项标

硫酸依替米星抗感染的临床及药理研究

黄敏

(江西省南华医药有限责任公司 南昌 330009)

关键词:硫酸依替米星;临床应用;药理研究;综述

中图分类号:R 978.12

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2011.06.067

硫酸依替米星是我国自主研发的氨基糖苷类抗生素,其抗菌谱广,抗菌活性强,交叉耐药少,且不良反应轻,安全性高,而越来越为医务工作者所重视和青睐,得到广泛应用和深入研究。现将硫酸依替米星抗感染的临床应用和药理研究进展综述如下,以供同道参考。

1 临床应用

1.1 肺炎 刘君等^[1]将重症肺炎 60 例分两组,治疗组 30 例用硫酸依替米星联合头孢他啶治疗,对照组 30 例用亚胺培南西司他丁钠治疗,结果治疗组有效率为 93.33%,而对照组有效率为 83.33%,两组差异有统计学意义。陈晓波等^[2]观察硫酸依替米星联合头孢菌素治疗社区获得性肺炎 (CAP)95 例的疗效,结果表明其临床治愈率为 84.2%,细菌清除率为 93.7%,不良反应发生率为 3.16%。

志物,在临床上用于对肿瘤的监测,前景可观。但因其在一些增殖活跃的正常细胞及一些良性肿瘤中亦表达,而在约 20%肿瘤中却不表达,且其在不同恶性肿瘤中表达水平高低没有特异的区别,这就为其在临床上的应用带来困难,所以亟待进行更深入细致的研究,为人类最终战胜肿瘤发挥作用。其次, hTERT 是端粒酶必不可少的重要组成部分,可将 hTERT 作为靶点用于肿瘤的靶向治疗,但其对正常细胞有没有影响,如对增殖性强的干细胞、生殖细胞、活化的淋巴细胞,会不会导致这些细胞的提前衰老,所以要将其广泛用于临床,还需大样本、多中心、对照组的大规模实验。综上,端粒酶抑制剂将作为肿瘤治疗的重要手段,若将端粒酶抑制剂与手术、传统放化疗及中医药联合起来综合治疗,相信肿瘤的治疗定会迎来新的曙光!

参考文献

[1]廖新化.端粒酶和端粒酶的发现历程[J].生命的化学,2009,29(6):775-780
[2]Morin GB.The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonu- cleoprotein synthesizes TTAGGG repeats [J].Cell,1989(1):519-521
[3]Dynek JN,Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis [J]. Science,2004,304(5667):97-100
[4]曾益新,吕有勇,朱明华,等.肿瘤学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2008.87
[5]Kanaya T,Kyo S,Takakura M,et al.hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal cell carcinoma[J].International Journal of Cancer,1998,78:539-543

1.2 下呼吸道感染 唐春兰等^[3]采用随机对照的方法比较依替米星与奈替米星治疗下呼吸道细菌感染疗效及安全性,结果依替米星与奈替米星两组总有效率分别为 89%和 86%,细菌清除率分别为 86%和 84%,药物不良反应发生率分别为 5%和 6%,两组比较差别均无显著意义($P>0.05$)。关泉峰等^[4]将 100 例下呼吸道感染性疾病患者随机分为两组,硫酸依替米星联合头孢哌酮舒巴坦钠组(治疗组)及单用头孢哌酮舒巴坦钠组(对照组),结果治疗组有效率为 87.5%,对照组有效率为 52.5%,治疗组有效率明显高于对照组,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。

1.3 泌尿系感染 于棉荣等^[5]观察硫酸依替米星治疗女性 2 型糖尿病合并泌尿系感染的疗效,对 60 例中段尿培养阳性患者,应用硫酸依替米星(200

[6]陈陵,余松涛,梁光萍,等.端粒酶 hTERT 促进肿瘤细胞侵袭与转移及其机制研究[J].实用临床医药杂志,2010,14(5):13-20
[7]王宏兰,赵春华.细胞衰老与肿瘤抑制[J].国外医学·老年医学分册,2006,27(3):97
[8]Campisi J.Senescent cells,tumor suppression,and organismal aging: good citizens,bad neighbors[J].Cell,2005, 120(4):513-522
[9]Chen X,Zhang W,Gao Y,et al.Senescence-like changes induced by expression of p21 (waf1/cip1)in NIH3T3 cell line [J].Cell Research, 2002,12(3-4):229-233
[10]Qin Y,Li B,Tan YS,et al.Polymorphism of p16 INK4a gene and rare mutation of p15 INK4b gene exon in primary hepatocarcinoma [J]. World Journal of Gastroenterology,2000,6:411
[11]Dimri GP.What has senescence got to do with cancer [J]?Cancer Cell,2005,7(6):505-512
[12]Chin L,Artandi SE,Shen Q,et al.p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinoge nesis[J].Cell,1999,97(4):527-538
[13]李改霞.端粒酶与细胞永生[J].畜牧兽医杂志,2009,28(3):44-46
[14]李玲,马俊芬,连鸿凯,等.端粒酶检测对良、恶性骨肿瘤诊断的影响及意义[J].肿瘤基础与临床,2009,22(4): 292-294
[15]张明亮,田怀呆,陈勇,等.结直肠癌肿瘤中端粒酶活性表达及意义[J].肿瘤防治研究,2010,37(6):687-689
[16]Hwang CF,Su CY,Kou SC,et al.Diagnostic usefulness of telomerase activity in nasopharyngeal carcinoma[J]. Japanese Journal of Cancer Research,2000,91(7):706-716
[17]Baykal A,Thompson JA.In situ human telomerase reverse transcriptase expression pattern in normal and neoplastic ovarian tissues[J].Oncology Reports,2004,11(2):297-302
[18]张景泽,杨智勇,丁鹏.端粒酶抑制剂用于肿瘤治疗的研究进展[J].中国老年学杂志,2009,29(7):903-905
[19]朱晓应,符伟军,洪宝发.端粒酶与肿瘤靶向治疗[J].国外医学·遗传学杂志,2005,28(6):366-368
[20]徐锋,苏筠,程文,等.RNA 干扰 hTR 基因对膀胱尿路上皮癌 BIU-87 细胞株端粒酶活性的影响 [J]. 医学研究生报,2009,22(6):587-591
[21]廖晶,周俊宜,杨锐,等.端粒酶 RNA 亚基模板突变抑制 HeLa 肿瘤细胞的生长[J].中国生物化学与分子生物学报,2009,25(2):177-181
(收稿日期:2011-04-12)