

# 端粒酶催化亚单位在肿瘤特异基因治疗作用中的研究

文 忠<sup>1</sup> 综述, 肖健云<sup>2</sup>, 郭梦和<sup>1</sup> 审校

关键词: 端粒酶亚单位; 肿瘤特异表达系统; 恶性肿瘤

中图分类号: R730.231 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)02-0122-02

## 0 引言

在已知的 6 个<sup>[1]</sup> 端粒酶亚单位 (hTR、TEP<sub>1</sub>、hTERT、hsp90、p23、dyskerin) 中, 以端粒酶催化亚单位 (human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT) 在调控端粒酶 (Telomerase) 活性中最具特异性, 二者相关性大于 80%。近年研究表明, hTERT 仅仅在端粒酶阳性的肿瘤细胞中高表达, 在端粒酶阴性的细胞中不表达。hTERT 的这种作用特点与其结构上的新认识有关。针对以上特点, 研究人员设计了以 hTERT 启动子为核心, 调控其他候选基因 (如自杀基因、凋亡基因等) 作为肿瘤特异表达杀伤系统, 能够特异性杀灭肿瘤细胞, 而对正常细胞无作用, 这一特异杀伤系统, 为肿瘤基因治疗及其临床应用带来了曙光。本文就 hTERT 结构及功能研究最新进展作一综述。

## 1 hTERT 结构特征的新认识

hTERT 是较早发现的端粒酶亚单位之一, 能特异性的调控端粒酶活性, 成为影响端粒酶活性的限速酶。最新研究发现<sup>[2]</sup>, 在 hTERT 转录本中存在 6 个断裂部位, 包括 4 个插入部位和 2 个缺失部位, 2 个缺失部位分别被命名为  $\Delta$  位点。其中 1 个或 2 个缺失部位与进化、癌细胞生长有关。 $\Delta$  位点有 36bp 大小, 位于逆转录酶 (RT) A 结构域区。因此,  $\Delta$  位点缺失突变可成为抑制端粒酶的最突出的负性抑制物。 $\Delta$  位点与 4 个插入位点可引起成熟前转录终止。Colgin<sup>[3]</sup> 等的研究也证实, hTERT 断裂突变可抑制外源端粒酶活性, 导致端粒缩短、融合, 诱导 HT<sub>1080</sub> 细胞株出现衰老改变, 成纤维细胞出现凋亡。

## 2 hTERT-hTR 复合体形成及其影响因素

一般认为, hTR 作为模板, 像其他核糖体蛋白一样, 主要在细胞核内核糖体装配完成, hTERT 必须与 hTR 形成复合体才能构成完整的有功能的酶。

那么 hTERT 究竟是在细胞浆内还是细胞核内与 hTR 结合成复合体的呢? 近年来的研究比较一致地认为<sup>[4,5]</sup>, 在细胞核内存在 hTERT 定位结构域, 或称为可鉴别出一个 hTERT 蛋白的核靶信号。hTERT 蛋白可浓集于核内或从核中排出, 干扰这一信号区的点突变, 将进一步阻断 hTERT-hTR 复合体的形成, 因而引起端粒酶活性下降。由 hTERT 蛋白引起的这种点突变亦可导致转染细胞端粒的缩短。进一步研究显示, 以上作用取决于 hTERT 蛋白 N-末端氨基酸序列, 该末端氨基酸序列特异性决定 hTERT 蛋白核内定位作用。此外, Bachand 等<sup>[6]</sup> 的研究也发现, hTR 结构亦可影响 hTERT-hTR 复合体的形成。hTR 中的 CR<sub>4</sub>-CR<sub>5</sub> 结构域成为潜在的复合体结合的位点, 在缺乏以上结构域的 hTR, 对 hTR-hTERT 蛋白复合体的抑制作用较弱。hTR 中其它结构域如假节 P<sub>3</sub> 螺旋, CR-7 结构域, H/ACA 盒等都能有效地抑制 hTR-hTERT 蛋白复合体的形成。

## 3 hTERT 启动子结构与功能

hTERT 基因 5' 侧一个 5.8Kb 基因片段中, 含有 hTERT 启动子序列, 其位于转录起始区上游 283bp 区为核心启动子, 具有最大启动子活性。在一系列分化体系中, 从结合元素中, 已鉴别出 2 个抑制元素, E-盒 (CACGTG) 和一个新成份 MT-盒, 能将部位相关的致突变作用介导入这种新的转录因子结合元素中去。这种突变能以细胞特异性方式, 影响 hTERT 启动子的转录活性。因此, 人们推测, 结合到 E-盒和新元素的转录因素可作为癌细胞中 hTERT 表达和端粒酶活性的主要决定因素<sup>[7]</sup>。对 hTERT 的研究表明, hTERT mRNA 及蛋白只分布于端粒酶阳性的肿瘤细胞中, 而在端粒酶阴性的细胞中一般不存在。鉴于这种特异性关系, 为以 hTERT 启动子为核心的构建肿瘤特异杀伤系统奠定了基础, 亦为肿瘤基因治疗的临床应用带来了曙光。Majumdar 等<sup>[8]</sup> 利用构建的 hTERT 启动子控制下的疱疹病毒 TK 基因肿瘤特异表达载体 (hTERT/TK), 能特异性杀伤裸鼠肝癌移植瘤。同时, 能增强抗癌前体药物 GCV (无环

收稿日期: 2004-01-15; 修回日期: 2004-04-08

作者单位: 1. 510282 广州, 南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉科; 2. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉科

鸟苷)对该瘤的敏感性。通过裸鼠肝组织病理学及血清酶学检查发现,肝脏未发现有毒性反应。而用作对照的巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)调控下的TK基因表达载体,不但能杀伤移植瘤,同时亦能造成明显的正常肝组织病理改变,血清酶学检查发现肝功能受到损害。Braunstein 等<sup>[9]</sup>在卵巢细胞癌的研究中亦发现,hTERT/TK 仅仅在端粒酶阳性的卵巢癌细胞中表达,而在端粒酶阴性的正常卵巢上皮细胞中不表达,说明该肿瘤特异表达系统,具有较高的特异杀伤肿瘤细胞的能力。此外,hTERT 还能与其他杀肿瘤因子如细胞凋亡基因构建成肿瘤特异表达载体。近期一组研究报道<sup>[10-18]</sup>显示:分别构建 hTERT/-FDD、-Caspase6、-Caspase8、-GFP-TRAIL、-E1A-Spm2 及-Bax 肿瘤特异表达载体,转入肿瘤细胞后能特异性增强抗癌前体药物 GCV 对肿瘤细胞的敏感性,并诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常对照细胞无影响。活体动物试验中,亦显示出相同的治疗效果。这对定向诱导肿瘤细胞凋亡开拓了新领域。hTERT 不但能够诱导 TK 基因靶向性杀伤肿瘤,还能诱导另一自杀基因,即 CD 基因(Cytosine Deaminase)特异性杀伤大肠癌细胞,并增强其前体药物 5-Fu 对大肠癌的敏感性<sup>[19]</sup>。从以上研究可以看出,hTERT 启动子能够调控多种因素特异性杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无毒性作用,具有较为广泛的应用领域及调节切入点。

总之,对 hTERT 启动子结构与功能的研究,为我们开辟了一个全新的研究领域,以 hTERT 启动子为核心的肿瘤特异表达系统,能够特异性的定向杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无损伤,这对耳鼻喉科常见的鼻咽癌、喉癌等恶性肿瘤的基因治疗及临床应用的研究将起到积极的引导作用。

#### 参考文献:

- [1] Chang J T, Chen Y L, Yang H T, et al. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(14): 3442-3450.
- [2] Yi X, White DM, Aisner DL, et al. An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity[J]. *Neoplasia*, 2000, 2(5): 433-440.
- [3] Colgin M, Wilkinson C, Englezou A, et al. The hTERT alpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity[J]. *Neoplasia*, 2000, 2(5): 426-432.
- [4] Yang Y, Chen Y, Zhang C, et al. Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 277(2): 201-209.
- [5] Etheridge KT, Banik SS, Armbruster BN, et al. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24764-24770.
- [6] Bachand F, Triki I, Autexier C. Human telomerase RNA-protein interaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(16): 3385-3393.
- [7] Braunstein I, Cohen-Barak O, Shachaf C, et al. Human telomerase reverse transcriptase promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cell[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14): 5529-5536.
- [8] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, et al. The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(7): 568-578.
- [9] Braunstein I, Cohen-Barak O, Shachaf C, et al. Human telomerase reverse transcriptase promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14): 5529-5536.
- [10] Gu J, Kagawa S, Takakura M, et al. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5359-5364.
- [11] Koga S, Hirohata S, Kondo Y, et al. FADD gene therapy using the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter to restrict induction of apoptosis to tumors in vitro and in vivo[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(3B): 1937-1943.
- [12] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5796-802.
- [13] Gu J, Andreeff M, Roth JA, et al. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(1): 30-37.
- [14] Koga S, Hirohata S, Kondo Y, et al. A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(10): 1397-1406.
- [15] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(9): 1015-1025.
- [16] Komata T, Koga S, Hirohata S, et al. A novel treatment of human malignant gliomas in vitro and in vivo: FADD gene transfer under the control of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(5): 1015-1020.
- [17] Lin T, Huang X, Gu J, et al. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP-TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cell[J]. *Oncogene*, 2002, 21(52): 8020-8028.
- [18] Kirch HC, Ruschen S, Brockmann D, et al. Tumor-specific activation of hTERT-derived promoters by tumor suppressive E1A-mutants involves recruitment of p300/CBP/HAT and suppression of HDAC-1 and defines a combined tumor targeting and suppression system[J]. *Oncogene*, 2002, 21(52): 7991-8000.
- [19] Liu J, Zou WG, Lang MF. Cancer-specific killing by the CD suicide gene using the human telomerase reverse transcriptase promoter[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(3): 661-666.

[编辑: 刘红武; 校对: 安 凤]