

研究简报 ·

# 以端粒酶为靶标抗癌药物筛选模型建立及端粒酶抑制剂筛选

郑晓飞\*, 王升启, 孙志贤  
(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

## Determination of Telomerase from HeLa Cells as a Target for Screening Antitumor Agents

ZHENG Xiao-fei\*, WANG Sheng-qi, SUN Zhi-xian

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** Telomerase, a ribonucleoprotein enzyme, has been found in immortalized but not in most somatic adult human tissues, and thus emerged as a novel target for cancer chemotherapy. Recently it has been found that telomerase is a fruitful target for oncologic drug development. A new method for screening antitumor agents by using telomerase as a target has been established according to the phenomena that the enzyme activity can be affected by some types of antitumor agents or chemicals. The telomerase was extracted from HeLa cells. The telomeric repeat amplification protocol (TRAP) was used to measure enzyme activity. Telomerase activity can be inhibited by 4 kinds of chemical compounds.

**Key words** telomerase, screening method, antitumor agents

中图分类号 Q55.R979

新药研究与开发离不开筛选模型,而筛选模型的关键是寻找、确定和制备药物筛选靶——药靶。近来研究表明,端粒酶与恶性肿瘤的发生和发展有着密切的关系,端粒酶在恶性肿瘤细胞中表达率占80%~90%,而在正常体细胞中不表达<sup>[1~4]</sup>。这表明端粒酶在维持肿瘤细胞的增殖中起着重要作用。抑制端粒酶的活性有可能抑制肿瘤的生长,因而端粒酶被认为是恶性肿瘤诊断和治疗的新靶标。以端粒酶为抗癌药物作用的靶标,建立抗癌药物筛选模型,在分子水平上筛选针对端粒酶的抑制剂,进而获得特异性高、针对性强、毒副作用小的新型广谱的抗癌药物,成为探索癌症治疗新途径。本实验采用端粒重复扩增法(TRAP),以HeLa细胞为材料,提取并建立了端粒酶活性测定方法,并以该酶为靶标,建立了筛选抗癌药物的新方法,并从91种小分子化合物中筛选到了4种具有开发潜力的抑制剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

HeLa细胞株为本室保存;TRAP法测定端粒酶活性用引物由本室合成,正向引物(TS)为:5'-AA TC C G T C G A G C A G A G T T-3',逆向引物(CX)为:5-

CCCTACCCTTACCCTTACCCTAA<sub>3</sub>;端粒酶活性检测试剂盒由本室制备;CHAPS(3-cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propanesulfonate)为Sigma公司产品;Taq酶和dNTP为Promega公司产品;DMEM培养基为Gibco公司产品;其它试剂均为进口和国产分析纯试剂;小分子化合物由郑州大学药物所提供,均为化学合成或从中药提取的单体有机化合物。高三尖杉酯碱和三尖杉酯碱由杭州民生制药厂生产,环磷酰胺由上海第十二制药厂生产,3-氨基苯甲酰胺(3AB)为Sigma产品,羟基喜树碱由黄石市第三制药厂生产,平阳霉素由天津市河北制药总厂生产,顺铂由冶金部贵金属研究所生产,丝裂霉素C为日本协和发酵工业株式会社生产,羟基脲为Fluka产品。

收稿日期:2001-04-20,接受日期:2001-06-15

国家自然科学基金部分资助项目(No. 30070859)

\*联系人:郑晓飞,男,1964年11月生,博士,副研究员

Tel:010-66931237, E-mail:zhengxf@nic.bmi.ac.cn

Received: April 20, 2001; Accepted: June 15, 2001

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30070859)

\*Corresponding author Tel:010-66931237

E-mail:zhengxf@nic.bmi.ac.cn

## 1.2 方法

**1.2.1 制备端粒酶提取液** 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液进行 HeLa 细胞培养, 收获细胞, 用 PBS 洗两次, 离心收集细胞. 参照 Kim 等<sup>[1]</sup> 的方法制备端粒酶提取液. 每  $10^6$  细胞加 100  $\mu$ l 细胞裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF, 5 mmol/L 巯基乙醇, 0.5% CHAPS, 10% 甘油), 冰浴裂解细胞 30 min. 于 4  $\times$  16 000 g 离心 25 min. 收集上清液, 用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 小量分装, -70  $^{\circ}$ C 冻存.

**1.2.2 药物对端粒酶活性的影响** 对 Kim 等的方法加以改进, 由本室制备端粒酶活性检测试剂盒. 91 种不同的化合物和 9 种常用抗癌药物分别用无菌水或二甲基亚砷溶解. 在反应体系中加入 0.5  $\mu$ l (0.6  $\mu$ g 蛋白) 端粒酶提取液, 25  $\mu$ l 端粒酶活性测定反应液, 0.25  $\mu$ l 化合物或抗癌药物, Taq 酶 2 U, 室温放置 15 min, 再加入 0.3  $\mu$ l TS 引物, 30  $^{\circ}$ C 反应 20 min. 再加 CX 引物 0.3  $\mu$ l, 石蜡油 20  $\mu$ l. 按如下条件进行 PCR 扩增: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 在 PTC-51B 型 DNA 合成仪上扩增 30 个循环. PCR 产物在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 银染色. 染色方法如下: 1. 将聚丙烯酰胺凝胶用 5 倍凝胶体积的固定液 (固定液为含 10% 乙醇和 0.5% 乙酸的水溶液) 浸没, 充分振荡 5 min; 2. 向固定液中加入 20% 的硝酸银贮存液使固定液中硝酸银的终浓度为 0.2%, 振荡染色 5~10 min; 3. 倾去染色液, 将凝胶用水洗涤 2~3 次, 每次 30 s, 倾干水分; 4. 将凝胶转移到 5 倍凝胶体积的显色液 (显色液为含 3% 氢氧化钠和 0.1% 甲醛的水溶液) 中, 振荡, 直至条带出现, 一般约需 3~10 min 左右; 5. 将显色液倾去, 用水洗涤 1~2 次, 将凝胶转移到固定液中, 固定 5 min 即可. 用 Bio-Rad 图像分析仪进行观察并照相.

**1.2.3 药物对 Taq 酶活性的影响** 用本室制备荧光蛋白基因扩增试剂盒检测药物对端粒酶活性的影响. 取 25  $\mu$ l 扩增反应液, 加入 0.5  $\mu$ l 含荧光蛋白基因片段的 pEGFP 质粒, 0.25  $\mu$ l 化合物或抗癌药物, 2 U Taq 酶, 石蜡油 20  $\mu$ l, 室温放置 15 min. 按如下条件进行 PCR 扩增: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 在 PTC-51B 型 DNA 合成仪上扩增 30 个循环. PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, EB 染色, 用 Bio-Rad 图像分析仪进行观察并照相.

**1.2.4 药物对 HeLa 细胞生长的抑制** HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液进行细胞培养, 在 96 孔细胞培养板中, 每孔加  $3 \times 10^3$  细胞 (0.2 ml)

培养过夜, 再分别加入 H9、H13、H30 号和 B1 号化合物, 浓度为 6 mg/L、3 mg/L、1 mg/L 和 0.5 mg/L, 每个浓度 3 孔, 并设置阴性对照. 24 h 换液, 同时加入化合物, 培养 72 h, 用 MTT 染色, 492 nm 测定光吸收.

## 2 结果

采用本实验方法筛选了 91 种分离纯化的天然和化学合成的小分子化合物, 以及 9 种常用抗癌药物. 小分子化合物由三大类构成, 一类是酚类糖苷, 一类是糖类衍生物, 另一类是冬凌草甲素衍生物. 实验中阴性对照为热灭活 HeLa 细胞提取液, 端粒酶已经失活, 故在凝胶电泳图谱中不显示条带; 阳性对照为未经处理的 HeLa 细胞提取液, 端粒酶活性保持良好, 故在凝胶电泳图谱中显示条带. 实验中银染结果越接近阴性对照, 表明端粒酶活性越低, 化合物对端粒酶的抑制效果越好; 实验中银染结果越接近阳性对照, 表明化合物对端粒酶的抑制作用越弱或没有作用. 91 种小分子化合物对端粒酶活性抑制筛选中发现 H9、H13、H14、H30 和 B1 对端粒酶活性有抑制

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Fig. 1 Effect of chemicals on telomerase activities

1. Positive control; 2. Negative control; 3. B1; 4. D1; 5. E; 6. H30; 7. H14; 8. H13; 9. H11; 10. H7; 11. H9; 12. H5; 13. H3 (Concentration of all chemicals is 200 mg/L)

作用 (Fig. 1). 在 9 种常用抗癌药物中, 发现羟基喜树碱对端粒酶活性有抑制作用 (Fig. 2). 为了证明药物的作用是针对端粒酶还是 Taq 酶, 进行了药物对 Taq 酶作用实验, 结果表明 B1 和羟基喜树碱对 Taq 酶有不同程度的抑制作用. H9、H13、H14 和 H30 对 Taq 酶无明显作用 (Fig. 3). 因此, 可以初步认定化合物 H9、H13、H14 和 H30 在体外对端粒酶活性有抑制

作用.

为了检测 B1、H9、H13 和 H30 在细胞水平对细胞生长的影响,将不同浓度的 B1、H9、H13 和 H30 加到 HeLa 细胞培养液中,作用 72 h,结果表明均对 HeLa 细胞生长有抑制作用(Fig. 4),并且有一定的剂量依赖关系.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

**Fig. 2** Effect of antitumor drugs and chemicals on telomerase activities

1: Cyclophosphamide (10 mg/L); 2: Hydroxyurea (10 mg/L); 3: Mitomycin C (4 mg/L); 4: 3AB (200  $\mu$ mol/L); 5: Pingyangmycin (10 mg/L); 6: HHT (10 mg/L); 7: HT (10 mg/L); 8: Hydroxycamptothecin (10 mg/L); 9: Cis-platinum complex (10 mg/L); 10: H86 (200 mg/L); 11: H90 (200 mg/L); 12: Negative control; 13: Positive control

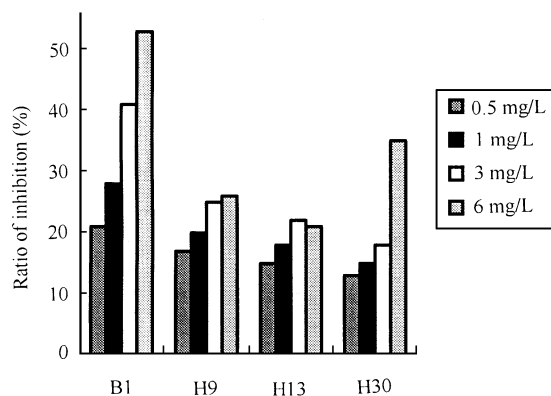
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**Fig. 3** Effect of antitumor drugs and chemicals on *Taq* activities

1. Negative control; 2. Positive Control; 3. Hydroxycamptothecin; 4. H5; 5. H7; 6. H9; 7. H13; 8. H14; 9. H30; 10. B1

### 3 讨论

由于端粒酶在细胞内有重要作用及与癌症有着密切的关系,人们对端粒酶的研究将愈来愈受到重视.抑制端粒酶活性的研究虽然才刚刚起步,但由于端粒酶自身的特殊性,在反义核酸、核酶及小分子抑制剂方面都取得了可喜的进展. Norton 等<sup>[5]</sup>针对端粒酶 RNA 模板区设计合成了不同长度的反义硫代



**Fig. 4** Inhibition of proliferation of HeLa cells by different concentration of B1, H9, H13 and H30

寡核苷酸(PS)和肽核酸(PNA),PS和PNA对细胞提取物中的端粒酶和细胞内的端粒酶均有不同程度的抑制效果. Kanazawa 等<sup>[6]</sup>设计了一种锤头型核酶(TeloRZ)抑制端粒酶的活性. Yegorov<sup>[7]</sup>和Blackburn<sup>[8]</sup>实验表明,逆转录酶抑制剂 ddG、AZT 和 Carbovir 可以抑制端粒酶的活性. Xu 等<sup>[9]</sup>用细胞分化诱导剂全反式视黄酸(ATRA)和 1,25-二羟维生素 D3 (VD3)分别诱导 HL60 细胞分化,通过细胞分化途径间接抑制端粒酶.本实验针对端粒酶分子作用机制试图寻找针对端粒酶的小分子药物,通过抑制端粒酶活性特异性抑制恶性肿瘤细胞的生长.为此,我们建立了端粒酶抑制剂筛选模型,利用 Kim 等建立的 TRAP 端粒酶活性测定方法,首先在体外筛选能够抑制 TRAP 反应的可能的端粒酶抑制剂,然后直接利用 PCR 扩增反应对抑制 TRAP 反应的化合物是否是抑制 *Taq* 酶活性进行确证,避免造成假阳性;在此基础上进行细胞水平的抑制癌细胞生长研究,在 9 种已知癌症治疗药物和 91 种化合物中初步筛选到了 H9、H13、H14 和 H30.其在体外可以抑制端粒酶的活性,检测的 H9、H13 和 H30 对培养的 HeLa 细胞生长具有抑制作用,表明该类化合物具有抗癌的潜力.但对于该类化合物的特异性还需要进一步深入研究.本实验采用改进的银染方法进行端粒酶活性测定,避免了使用同位素带来的诸多不便.在银染显色液中用氢氧化钠代替一般 DNA 银染中使用的碳酸氢钠,使染色时间大大缩短,染色过程不超过 30 min,而且操作也较一般 DNA 银染色方法简便,重复性好.非常适合大规模的药物筛选.

目前以端粒酶为靶标开发新型抗癌药物受到广泛的关注.本实验采用的筛选方法直接针对端粒酶分子,可以在分子水平上针对特定的分子机制进行

抗癌药物的筛选,避免了针对细胞进行药物筛选的盲目性,因此该方法具有直接、快速、简便的优点,非常适合于大规模的药物筛选.因此在新药开发中,作为一种新的手段有重要意义.随着对端粒酶结构、作用机制、表达调控和端粒酶与癌症关系的深入研究,通过抑制端粒酶的活性抑制癌细胞的生长会有很大的潜力,有望成为今后治疗癌症的一种有效广谱的手段.

### 参考文献 (References)

- Kim N W, Piatyzek M A, Prowse K R, Harley C B, West M D, Ho P L, Coviello G M, Wright W E, Weinrich S L, Shay J W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266** (5193): 2011 ~ 2015
- Shay J W, Wright W E. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol*, 1996, **8** (1): 66 ~ 71
- 郑晓飞, 王升启, 邢瑞云, 朱宝珍, 孙志贤. 癌细胞株及胃癌组织端粒酶催化亚基因表达研究. 军事医学科学院院刊 (Zheng Xiao-fei, Wang Sheng-qi, Xing Rui-yun, Zhu Bao-zhen, Sun Zhi-xian. Human telomerase reverse transcriptase RNA and telomerase activity in malignant cell lines and gastric tumor tissues. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1999, **23** (3): 190 ~ 192
- 郑晓飞, 王升启, 孙志贤. 癌症治疗的目标——抑制端粒酶的策略. 生物化学与生物物理进展 (Zheng Xiao-fei, Wang Sheng-qi, Sun Zhi-xian. A target for cancer therapy: Strategies for telomerase inhibition. *Prog Biochem Biophys*), 1998, **25** (3): 242 ~ 245
- Norton J C, Piatyzek M A, Wright W E, Shay J W, Corey D R. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotech*, 1996, **14** (5): 615619
- Kanazawa Y, Ohkawa K, Ueda K, Mita E, Takehara T, Sasaki Y, Kasahara A, Hayashi N. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **225** (2): 570 ~ 576
- Yegorov Y, Chernov D N, Akimov S S, Bolsheva N L, Krayevsky A A, Zelenin A V. Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett*, 1996, **389** (2): 115 ~ 118
- Strahl C, Blackburn E H. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (1): 53 ~ 65
- Xu D, Gruber A, Peterson C, PISA P. Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia*, 1996, **10** (8): 1354 ~ 1357

## “全国发育与生殖生物学研讨会”征文通知

发育生物学和生殖生物学是当今生命科学领域的两个热点学科,与农业生产和人口控制等国计民生问题关系十分密切,因此受到国家和科研人员的高度重视.为了检阅和交流研究成果,介绍学科进展,推出新人,拟于2002年7月底在北京召开全国发育与生殖生物学研讨会,届时邀请国外专家学者讲学.

主办单位:中国科学院遗传与发育生物学研究所

协办单位:中国科学院动物所生殖生物学国家重点实验室

承办单位:中国科学院遗传与发育所《发育与生殖生物学学报》编辑部

大会主席:国家自然科学基金委员会副主任、中国科学院遗传与发育生物学研究所研究员 朱作言院士  
中国科学院遗传与发育生物学研究所所长 李家洋院士

副主席:中国科学院遗传与发育生物学研究所副所长、《发育与生殖生物学学报》编委 薛勇彪研究员

征文内容:植物、动物、人体的基因表达、调控、克隆,生殖生物学及相关问题的研究论文或综述.英文稿请附详细中文摘要,或中文稿附详细的英文摘要.请寄书面来稿一式两份,注明“征文”.

欢迎国内外发育生物学、生殖生物学及相关领域的专家学者报名参加会议,交流成果.会议征文评审后在《发育与生殖生物学学报》上全文发表.

投稿与报名地址:北京中关村南一条3号 中国科学院遗传与发育所《发育与生殖生物学学报》编辑部  
邮编:100080

联系人:王为先 陈惠萍

电话:010-62545869, 传真:010-62551951

E-mail: wangwx @263. net