

# 应用 mTR<sup>-/-</sup> 鼠模型系统研究肿瘤发生机制的进展

李 鹏<sup>1</sup>, 吴东林<sup>2</sup>, 马鹤雯<sup>2</sup>, 杨焕民<sup>1</sup>, 张玉静<sup>2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 密山 158308; 2. 中国人民解放军军需大学基础部生化教研室, 吉林 长春 130062)

**摘要:**端粒酶是真核细胞体内的一种核糖核酸蛋白质复合体, 是一种特殊的 DNA 聚合酶, 具有延伸 DNA 末端的功能, 能够维持端粒长度和功能, TERT 具有反转录酶活性。在大多数体细胞和原代细胞中, 端粒酶活性很低, 通常检测不到, 但在肿瘤细胞中, 端粒酶则被广泛激活, 因此认为端粒酶与肿瘤的发生具有密切的关系, 本文介绍了应用端粒酶阴性鼠研究端粒酶与 G 链悬垂和 P53 在肿瘤的发生过程中的相互关系。

**关键词:** mTR<sup>-/-</sup> 鼠; 肿瘤; P53; G 链悬垂

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)02-0219-04

## The Advance of Tumor Development Mechanism Applying mTR<sup>-/-</sup> Mouse Model

LI Peng<sup>1</sup>, WU Dong-lin<sup>2</sup>, MA He-wen<sup>2</sup>, YANG Huan-min<sup>1</sup>, ZHANG Yu-jing<sup>2</sup>

(1. August First Agriculture University the Animal Basic Research Department, Mishan, Heilongjiang 1158308, China;

2. The Quartermaster University of PLA the Basic Research Department, Changchun, Jilin 130062, China)

**Abstract:** Telomerase is Ribonucleoprotein complex in eukaryocyte, which is composed of telomerase reverse transcriptase(TERT) and telomerase RNA. Telomerase is a special DNA polymerase which can extend the terminal of DNA and maintain the length of telomere. TERT have reverse transcriptase activity. Telomerase activity do not examine in most somatic cell and primary cell, but most tumor cell have strong telomerase activity. It was think that the telomerase has strong relation with tumor occurrence. In this article, the author instruct the correlation of G-overhang strand and P53 in tumor occurrence.

**Key words:** mTR<sup>-/-</sup> mouse; tumor; G-overhang strand

肿瘤是威胁人类生命安全的一类重要的疾病, 在相当长的一段时间里, 人们对于肿瘤的发病机制进行了研究, 从而为肿瘤的彻底治愈寻找出新的有效的途径。近年来, 随着端粒(telomere)及端粒酶(telomerase)的发现<sup>[1,2]</sup>, 人们对于肿瘤的发生又有了新的认识, 认为肿瘤的发生与端粒及端粒酶有重要的联系。然而, 随着人们对肿瘤发生机制的更深入的研究, 对于肿瘤与端粒酶的关系问题又有了新的认识。本文就这一问题进行综述。

### 1 建立 mTR<sup>-/-</sup> 鼠模型系统

端粒是位于染色体末端的一段具有高度重复、富含 GC 的一段 DNA 序列, 伴随 DNA 的不断复制, 端粒序列将逐渐

丢失, 端粒起到保护染色体末端不被降解, 以及防止末端连接的作用, 如果没有端粒的帽子结构, 染色体末端则会发生融合, 从而在有丝分裂过程中形成具有双着丝粒染色体, 这势必激活 DNA 的损伤检查机制, 以降低染色体的损伤<sup>[3]</sup>。

端粒酶是能够维持端粒长度和功能的一种特殊的反转录酶, 它是一个端粒结合蛋白复合体, 由基本的催化部分端粒酶反转录酶(telomerase reverse transcriptase TERT)和 RNA 组成<sup>[4]</sup>, 其中 RNA 亚基为端粒的合成提供模板<sup>[5]</sup>。在大多数体细胞和原代细胞中, 端粒酶活性很低, 通常检测不到其活性, 但在肿瘤细胞中, 端粒酶活性则广泛存在。由此认为端粒酶是维持细胞分裂及克服端粒序列不断损失所必需。当前流行的观点是: 癌细胞如果端粒酶无活性, 当初

收稿日期: 2001-03-06; 修回日期: 2001-11-16;

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. NSF39800106)

作者简介: 李 鹏(1971-), 男, 硕士研究生, 讲师, 专业方向: 分子遗传学。Tel: 0467-5071238。

期癌细胞端粒被削减到不可忍受的长度时,将或者是经历末期生长停滞(衰老),或者是死亡。因此,端粒的缩短被认为是抑制肿瘤的机制。癌细胞中这种端粒酶被激活的普遍的现象,被定义为肿瘤细胞的 Achilles'heel。然而最近的一些研究表明,虽然端粒酶的缺失确实能够抑制肿瘤的生长,但是在同样的系统中,某些特殊条件下却具有其他的结果:表明抗端粒酶的药物能够产生截然相反的效果——即促进癌症的转化。因此有研究者试图通过建立端粒酶活性缺乏系统来研究肿瘤的发生机制。

端粒酶缺乏小鼠( $mTR^{-/-}$ )的祖系开始于小鼠必需的端粒酶 RNA 亚基(mouse telomerase RNA,  $mTR$  RNA)的剔除(knock out)。由 Carol Greider 于 1995 年在实验室条件下首先获得。

值得注意的是:小鼠与人在关于端粒与端粒酶的调节上有两个重要的不同之处。首先,小鼠的体细胞端粒酶活性比人体细胞端粒酶活性受到较低程度的抑制,因此,在成年小鼠的一些组织当中,能够测到端粒酶活性。其次,小鼠的端粒长度比人的端粒长 20kb,(人的端粒长度仅为 5~15kb)。由于每次细胞分裂,端粒仅缩短 100bp 左右,缺乏端粒酶的小鼠细胞需要经过多次分裂以消耗端粒序列,最终使其长度可与人细胞的端粒相当。研究表明  $mTR$  阴性( $mTR^{-/-}$ )鼠胚胎干细胞表现其生长缺陷之前需要经过 300 次分裂,在其完全停滞之前需要经过 450 次分裂。此外,小鼠细胞更容易诱导其他的端粒稳定机制,如在人的某些永生细胞观察到的 ALT 途径<sup>[6]</sup>。由于小鼠与人端粒间存在这些重要的不同点,因此,不可能用正常的小鼠端粒的损失来作为研究肿瘤抑制机制模型。为了解决这个问题, $mTR^{-/-}$ 小鼠必须喂养六代,直到其端粒的长度达到人的端粒长度。

## 2 $mTR^{-/-}$ 鼠的肿瘤易感性

由于端粒酶与肿瘤的密切关系,人们预测端粒酶缺乏将导致小鼠对肿瘤的感染性降低,或根本不产生肿瘤,而得到的资料却表明与预期的相反。这些  $mTR$  突变鼠比野生型鼠更容易自发产生肿瘤,这种肿瘤易感性的升高,被认为是由于端粒序列的损失而表现出不同形式的染色体损伤及整体遗传的不稳定性。实验证明在这些 G6 代  $mTR^{-/-}$ 小鼠的细胞中,检测到高概率的染色体损伤<sup>[7]</sup>。在一些器官系统(如造血细胞)中,端粒的损失与增殖能力降低及细胞凋亡相联系。端粒功能的丧失在 G4 代以后的后代  $mTR^{-/-}$ 鼠中表现出对不同类型的细胞、器官系统的生理和形态学的不利影响<sup>[8]</sup>。人们认为这是由于端粒的过度缩短,暴露出染色体的末端,从而发生染色体融合—连接—断裂,即发生了染色体 DNA 的损伤。

有研究表明这种染色体的不稳定性是由于 G 链悬垂(G-strand overhangers)功能的丧失所致<sup>[9]</sup>。用端粒酶结合蛋白 TRF2 无功能突变体证明:缺乏 G 链悬垂,会导致染色体

融合和非整倍体染色体细胞迅速积累并诱导 DNA 损伤应答。大多数真核细胞端粒的远端是一个段突出的富含 G 的链,其在双链 DNA 之外伸展而形成 3' 端悬垂。这个悬垂在真核细胞中是保守的,但端粒长度及其结构则随着种的不同而不同。这些悬垂被认为与端粒的功能如与末端特异蛋白结合<sup>[10]</sup>,防止末端—末端结合及促进减数分裂和减数分裂的染色体分离有关<sup>[11]</sup>。G 链悬链执行这些功能的机制很可能是依赖于特异结合蛋白和 DNA 结构。在体内和体外培养中有很多蛋白质能与 G 链悬垂结合。如在尖毛虫属和游仆虫属中的  $\alpha$  和  $\beta$  端粒结合蛋白(TBPs),在人与鼠中的 Cdc13p 都可与 G 链悬链结合。在体外培养时,G 链悬垂单链具有一些非规则性结构,包括四聚体和三聚体螺旋,能够调节端粒结构<sup>[12]</sup>。

悬链很可能是由单链 G 链的延长或 C 链的降解所形成。由于端粒酶能够延长 3' 悬垂,完成线形染色体末端的复制,从而阻止端粒的进行性缩短,因此,端粒酶曾被认为与 G 悬垂的产生有关。有证据表明端粒酶确实是在细胞周期某一点上,端粒酶暂时性地对悬垂的产生起作用。即在端粒酶的作用下发生 G 链延伸和互补 C 链聚合发生滞后作用。然而最近的实验表明:端粒酶并非 G 悬链产生所必需<sup>[13]</sup>。有研究者应用  $mTR^{-/-}$ 鼠,详细分析了该鼠的肝脏和成纤维细胞的 G 链悬垂,比较了  $mTR^{-/-}$ 鼠细胞与野生型细胞悬垂信号的数量,表明端粒酶在 G 链悬垂产生中并不起主要作用<sup>[14]</sup>。

现在认为,无端粒酶功能的 G 链悬垂的存在是由于外切核酸酶或内切核酸酶修饰活性对于 C 链悬垂发生选择性降解。在酵母中去掉 G 链结合蛋白 Cdc13p,染色体 C 链末端迅速发生 5'~3' 降解<sup>[20]</sup>。最近的证据表明 *Rad50p*、*Mre11p* 和 *Xrs2p* 基因在维持端粒的长度上发挥作用,且很可能在 C 链形成过程中发挥作用<sup>[15]</sup>。在酵母体内,当这些基因发生突变时,能显著降低单链 DNA 5'~3' 降解速度<sup>[16]</sup>。而在哺乳动物细胞调节 C 链核酸酶活性的物质是 TRF1、TRF2 以及各种 hnRNP 和端粒酶催化亚基 hTERT。

## 3 P53 在 $mTR^{-/-}$ 鼠的作用

*P53* 是一种肿瘤抑制基因,保护细胞免受基因的毒性变化或环境压力的影响,在 DNA 中由于离子反应而引起双链打开,通过 N 端磷酸化,引起产物 *P53* 的迅速稳定,从而导致细胞生长停滞,或是在人和鼠的衰老细胞中导致凋亡<sup>[17]</sup>。

*P53* 被激活是衰老和 DNA 损伤的信号。有研究者检测了端粒缺乏和 *P53* 在后代  $mTR^{-/-}$ 鼠细胞和器官中的相互作用,发现 *P53* 能够调节端粒过度缩短所造成的不利影响。而当 *P53* 缺乏加之端粒过度缩短起作用时,能够提高细胞转化为癌细胞的概率。研究表明 *P53* 途径在应答无功能端粒时起重要作用,在细胞转化为癌细胞的危机期中也有重要的作用。Chin 等于 1999 年通过过度缩短端粒的稳定和 *P53*

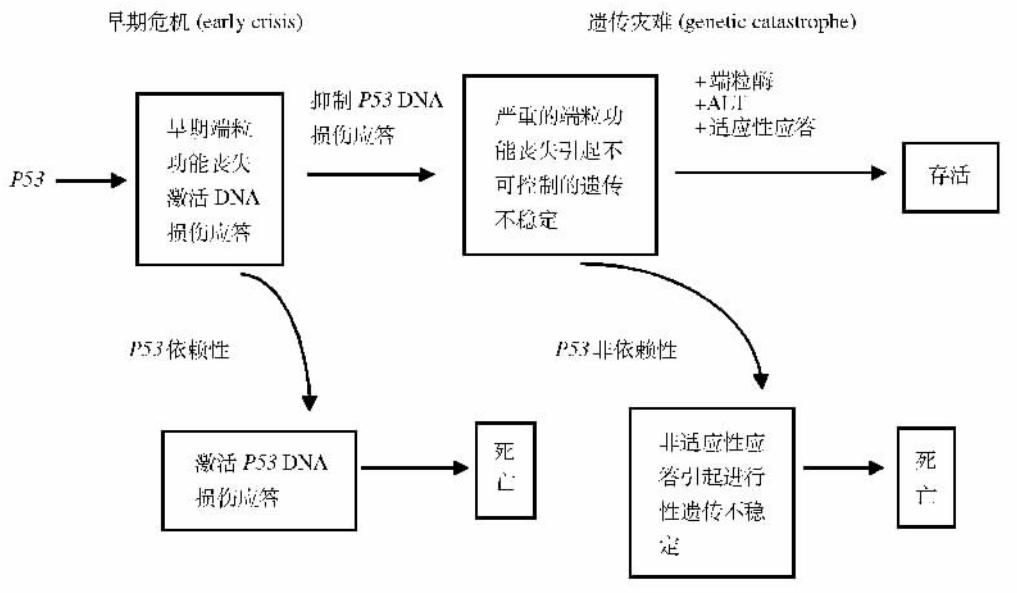
蛋白的激活,进一步探索 P53 点如何调节无功能端粒酶的作用。发现 P53 功能的缺失确实能够挽救一些在后代 mTR 阴性鼠细胞和器官的缺陷<sup>[18]</sup>,如鼠 G6 代雄性精母细胞的凋亡和雌性不育,P53 使其能够继续繁衍。在 mTR<sup>-/-</sup> 后代 MEF 中端粒酶功能的缺失,其作用与细胞内 P53 的作用相一致,因此认为,在这些细胞内 P53 途径被激活。正如在诱导 P53 检查点情况下(如培养细胞的  $\gamma$  辐射),G6mTR<sup>-/-</sup> P53<sup>+/+</sup> MEFs 表现 S 阶段的减少和更多的细胞在细胞周期中处于 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 期。当 P53 功能的消除时能够促进细胞周期进行。因此,在雄性生殖细胞体内培养和 MEFs 体外培养,P53 功能的缺陷改变了端粒无功能细胞的命运,即从死亡到生存或从细胞周期停滞到进行。P53 如何进行精确的反应还并不清楚,但是在后代中染色体高频率表现缺陷,说明 DNA 损伤信号的激活很可能是过程的一部分。另外,可能是极短的端粒缺乏足够的 TRF2,这 TRF2 端粒帽子蛋白需要通过染色体末端来抑制 P53 的激活<sup>[19]</sup>。

然而,P53 的缺失不能够完全解决端粒酶功能缺乏所带来的负作用。在 G8mTR<sup>-/-</sup> P53<sup>-/-</sup> 雄性小鼠中,人们发现生殖细胞发生显著缺陷,从而导致不育。因此,当染色体序列损失更长时,P53 非依赖性机制必然存在,并能导致细胞生长停滞或死亡。

突变引起肿瘤的发生并能够影响整个染色体的稳定性。由于 mTR 突变鼠端粒的损失和 P53 功能缺乏的细胞对染色体损伤的反应降低,从而引起很高程度的染色体的混乱,进而导致肿瘤的发生。端粒酶功能缺乏细胞合并有 P53 的缺乏,导致染色体稳定性丧失及遗传稳定性的丧失,并导致细胞进入衰亡。细胞对于这种基因组危机的应答是各不相同的,也是复杂的。最近的研究结果表明,从端粒中去除端

粒结合蛋白 TRF2,能直接激活 P53 依赖的调控途径,当缺乏 TRF2 或是具有短端粒或是发生融合—连接—断裂循环,这些都能够调节 P53 的诱导过程。在正常细胞中,P53 对于端粒功能丧失表现出重要的作用,一个显著作用是在遗传危机的早期发挥其应答作用。在具有正常的 DNA 损伤检查点的 mTR<sup>-/-</sup> 鼠中,针对端粒功能丧失能够产生特异应答,引起细胞生长停滞,或是引起凋亡。但这种作用随着细胞的类型,P53 状态及小鼠生理背景的不同而不同。在雄性生殖细胞、淋巴细胞中端粒的损失可强烈激发凋亡的应答,而 MEF 则经历双阶段细胞周期停滞。在 MEF 中,这个停滞与 P53 蛋白的稳定和活化同时发生。有证据表明,这个显著的双阶段细胞周期停滞也与 P53 调节的检查点应答有关。另外,P53 也可作为细胞生长 G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 期的抑制因子。由此可知,激活的 P53 在端粒功能丧失的细胞中起重要的作用。

细胞通过抑制 P53 的活化,以通过细胞生命期复制的次数(即细胞的衰老的主要检查点),P53 的抑制能使细胞在衰老以后继续分裂,并发生端粒的进行性缩短。进入危机期后,仅有少数细胞可幸存下来。通过在体(*in vivo*)及细胞培养表明:在细胞培养阶段,危机期可分为两个时期,即早期和晚期,晚期又称之为“遗传灾难(genetic catastrophe)”,细胞的死亡在早期危机(early crisis)中是 P53 依赖性的,P53 的缺乏或抑制则能够绕过这个检查点,最终导致进入 P53 非依赖性凋亡,这可能也是不可控制的染色体融合—连接—断裂循环和进行性染色体不稳定的结果。在 G6mTR<sup>-/-</sup> P53<sup>+/+</sup> 鼠中缺乏有效的精母细胞为早期危机提供了证据,而 G7 和 G8mTR<sup>-/-</sup> P53<sup>-/-</sup> 卵子的组织学的改变,为后期危机提供了证明,因此,G7 和 G8 mTR<sup>-/-</sup> P53<sup>-/-</sup> 细胞发生不可控制的遗传不稳定性,导致细胞分裂能力的丧失。



在这些已建立的模型中,端粒酶功能的缺失表现出对细胞生命周期和生存能力的负面影响。然而,在这些鼠的肿瘤细胞中,检查点功能很可能在早期发生突变消除,而导致耐受染色体损伤状态,并促进肿瘤的发展。如果这些结论类推到人的话,可以想像,应用端粒酶抑制剂治疗人肿瘤将从而具有很高的依赖性,在那些检查点完整的肿瘤中,应用端粒酶抑制剂后,发生细胞的衰老和凋亡(这是好的方面),而在这些途径已经丧失的肿瘤细胞中,抗端粒酶的治疗可能促进肿瘤的发生(这是坏的方面)。

为了了解危机、端粒酶及潜在致癌性的内部相互联系,探索并分析了 MEF 的多期特征。病灶(focus)的形成被认为是肿瘤形成的早期的表现。外源端粒酶在 P53 无活性的细胞中能够减少病灶的形成。这表明,端粒功能的丧失伴随有 P53 缺陷,将使细胞易发生转化。这个发现与以往的观点即后期危机代表第二次端粒为基础的的生长停滞论相矛盾<sup>[31]</sup>。在肿瘤细胞内,细胞的衰老检查点已经被毁减。由此认为后期危机不是在检查点上,而是在缺乏 2 个强有力的染色体稳定因子即功能性端粒及 P53 的基础上,无限增长的结果。一旦端粒功能和 P53 被损伤,细胞的命运就不可预测了。而且依赖于其他的随机的遗传突变,不能重新恢复或不能容忍染色体不稳定的细胞(如 G7、G8 代的精母细胞)将死亡。在其他细胞中,非整倍单倍体的增加或是融合—连接—断裂则容易发生遗传变异而促进生存,如致肿瘤因子的活化,肿瘤抑制因子的缺乏,端粒维持机制被重新激活,或是产生对端粒功能丧失的适应<sup>[29]</sup>。

虽然端粒和 P53 功能性缺失容易使肿瘤细胞发生转化,端粒酶活性重组仍能够显著提高转化灶产生永生化细胞的能力,因此,端粒酶的活化能够提高细胞通过遗传灾难而存活的能力。

总之,应用 mTR<sup>-/-</sup> 鼠模型系统,人们对于肿瘤的发生机制有了更进一步的认识,尤其是肿瘤的发生与端粒酶、P53 的功能,G 链悬垂之间的相互关系作了深入的探索,从而为肿瘤的治愈提供理论依据。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] Blackburn E H, Gall J G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena[J]. J Mol Bio, 1978, 120: 33~53.
- [2] Moyzis R K, Buckingham J M, Cram L S, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988, 85: 6622~6626.
- [3] Greider C W. Telomere length regulation[J]. Annu Rev Biochem. 1996, 65: 337~365.
- [4] Greider C W. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future[J]. Curr Biol. 1998, 8: 178~181.
- [5] Greider C W. and Blackburn. EHA telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis[J]. Nature. 1989, 337: 331~337.
- [6] Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity[J]. EMBO J. 1992, 11: 1921~1929.
- [7] Lee H W, Blasco M A, Gottlieb G J, et al. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs[J]. Nature. 1998, 392: 569~574.
- [8] Rudolph K, Chang S, Lee H, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice[J]. Cell. 1999, 96: 701~712.
- [9] Micheal T Hemann, Carol W. G-strand overhangs on telomere in telomerase-deficient mouse cell[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 3964~3969.
- [10] Gottsching D E, Zakian V A. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of Oxytricha micronuclear DNA[J]. Cell. 1986, 47: 195~205.
- [11] Van Steensel B, Smogorz Wska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions[J]. Cell. 1998, 92: 401~413.
- [12] Kirk K E, Blackburn E. An unusual sequence arrangement in the telomeres of the germ-line micronucleus in Tetrahymena thermophila[J]. Genes Dev. 1995, 9: 59~71.
- [13] Doinnie L, Wellinger R J. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93: 13902~13907.
- [14] Blasco M A, Lee H W, Hande M P, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA[J]. Cell. 1997, 91: 25~34.
- [15] James E, Haber. The Many Interfaces of Mre11[J]. Cell. 1998, 95: 583~586.
- [16] Haber J E. In vivo biochemistry: physical monitoring of recombination induced by site-specific endonucleases[J]. Bioessays. 1995, 17: 609~620.
- [17] Levine A J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. Cell. 1997, 88: 323~331.
- [18] Lynda Chin, Steven E, Artandi, et al. P53 Deficiency Rescues the Adverse Effects of Telomere Loss and Cooperates with Telomere Dysfunction to Accelerate Carcinogenesis[J]. Cell. 1999, 97: 527~538.
- [19] Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, et al. P53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2[J]. Science. 1999, 283: 1321~1325.
- [20] Nugent C I, Hughes T R, Lue N F, et al. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance[J]. Science. 1996, 274: 249~252.