

端粒与细胞衰老及肿瘤发生的关系

张军 吕碧涛 王梁 综述 李怀义¹ 审校

第二军医大学海医系¹ 第二军医大学基础部生物学教研室 上海 200433

正常人体细胞经过一定次数的分裂增殖后就停止分裂开始死亡,这种现象叫做细胞衰老。人们试图用放射、氧化等诸多理化因素来解释细胞衰老的原因,但大都难以说明细胞分裂次数的有限性。有的学者⁽¹⁾认为这是由于正常细胞复制过程中3'端DNA不能完全复制,每经过一次复制,均丢失一段3'端DNA,结果导致染色体末端丢失,最终导致细胞分裂停止。之后,人们发现染色体末端结构——端粒随着细胞增殖而逐渐变短,因此,端粒与细胞衰老的关系受到了越来越多的重视。本文就近年来端粒与细胞衰老及肿瘤发生关系的研究进展作一综述。

1. 端粒序列

端粒是染色体末端的DNA——蛋白复合物,由一段特殊结构的DNA序列和端粒蛋白组成。端粒DNA序列由富含G/C的重复序列构成,例如,人体细胞端粒含有5—15kbp的TTAGGG重复序列,其它真核生物的端粒序列组成与人类相似。端粒末端约有12—16个富含G的核苷酸序列并不存在互补序列,换言之,这一段DNA是单链的。端粒序列是细胞进化过程中一段高度保守的序列。去除了端粒的染色体易发生融合、重排,形成环状、双着丝粒染色体。因此,端粒起着稳定、保护染色体的作用⁽²⁾。

正常人体细胞有严格的生长、分化调控系统,细胞经过一定次数的分裂之后,就逐渐走向衰老死亡。随着体细胞的衰老,其端粒逐

渐变短,在此基础上,Harley等⁽³⁾根据其研究结果提出了细胞衰老的端粒假说,即:端粒随着细胞的分裂增殖而逐渐变短,当其减至一定长度时就引发细胞停止分裂,细胞开始衰老死亡。单细胞生物和生殖细胞具有无限增殖的能力,研究发现其端粒并不是随着细胞分裂增殖而逐渐变短,而是稳定在一定的长度。酵母菌EST1基因突变后,随着细胞分裂,端粒逐渐变短,最终细胞衰老死亡。这就提示稳定的端粒长度是细胞能不断分裂增殖的一个条件。

体外培养的肾胚细胞研究发现,端粒限制酶切片段(terminal restriction fragments, TRF)随着细胞增殖而逐渐变短,每增殖一次约丢失65bp,和人成纤维细胞端粒序列的丢失速度相似⁽¹⁾。动物和人实验证明,年龄长者供体细胞端粒长度比年轻供体者短⁽⁴⁾。体外研究还发现,端粒长度与细胞分裂增殖能力密切相关,端粒长者细胞所能进行的分裂次数越多,因此端粒长度是分析细胞分裂次数的标志之一。Allsopp等⁽⁵⁾提出,体内细胞存在一个端粒序列的阈长度,当细胞端粒长度达到这一阈值时,就意味着细胞衰老开始。他们分析了用HinfI和RsaI限制酶所得的成纤维细胞端粒限制酶切片段长度,发现衰老细胞有着相似长度的限制酶切片段,即该细胞衰老的端粒长度阈值。端粒长度相当于细胞分裂次数的一个控制点,当达到这个控制点后,就触发了细胞衰老的机制。正常细胞的衰老控制点并不是细胞增殖的极限,如用

SV₄₀或 Ad5 转化的的人成纤维细胞和肾胚细胞其分裂增殖次数增多细胞寿命延长,然而其端粒仍随细胞分裂而缩短,直至细胞死亡。而且,衰老前细胞内双着丝粒染色体明显增多,在转化的细胞中,部分细胞可逃脱衰老死亡,变成不死细胞(imortal cell),其端粒序列不再缩短,而是稳定在一定长度^(1,4,5)。直肠癌细胞和卵巢癌细胞等人体肿瘤细胞亦具有稳定的端粒长度,不过端粒长度要比其起源组织细胞为短。由此表明,端粒是维持染色体稳定和细胞生存的重要结构,体细胞转变成肿瘤细胞的一个重要条件就是逃脱端粒相关的细胞衰老机制,与大多数体细胞不同,生殖细胞的端粒长度明显大于体细胞,而且不管供体年龄,其长度保持稳定,这也是生殖细胞具有不断增殖能力的一个原因。

端粒随细胞分裂逐渐缩短,如何导致细胞衰老,其机制还未明确。端粒变短后,失去了对染色体的保护作用,染色体易发生重排,在衰老细胞中亦发现双着丝粒染色体明显增多,可能是某些基因的改变最终引起了细胞衰老,另一种可能的机制是:端粒变短,使得与端粒相关的调控细胞分裂的基因失去作用或者使得肿瘤抑制基因 P53 活化,阻止了细胞分裂⁽⁶⁾。当然,端粒 DNA 序列的丢失对机体来说还可能是一种如同外界理化因素所致的 DNA 损伤作用,这种损伤作用达到一定阈值时,就引起了细胞衰老⁽⁵⁾。

端粒长度随着细胞分裂逐渐变短,最公认的原因是由于 DNA 不完全复制造成的,每次复制之后,其 3' 端就丢失一段 DNA 序列。VonIglinski 等⁽⁷⁾报道,轻度高氧条件下人成纤维细胞每次增殖约丢失 500bp,明显高于正常氧浓度条件下的对照组(90bp),细胞的分裂能力也明显下降。高氧条件下,细胞内氧自由基明显增多,可能是引起端粒加快丢失的主要原因。这也提示,正常体细胞随着寿命增长,体内氧自由基蓄积,亦可加速端粒的丢失,加快细胞衰老。Chang 等⁽⁸⁾检测了人不同血管内皮细胞端粒限制酶切片段长度,

发现血流压力大的血管内皮细胞端粒长度明显短于压力小者,说明慢性压力是导致细胞损伤,不断增殖,从而加速细胞衰老的一个原因。21 三体综合症患者淋巴细胞端粒丢失速度明显高于对照组,提示体内亦存在调控端粒序列长度的机制⁽⁹⁾。例如:端粒在新生鼠的不同组织中其长度是相似的,而在成熟鼠中则差异明显,说明小鼠端粒长度可能受到一种组织特异的发展方式调节⁽⁴⁾。

需要指出的是,端粒与细胞复制衰老有密切关系,而与在静止期细胞的衰老关系还不明确。细胞复制衰老和细胞死亡并不相同,许多细胞在停止分裂后,并不立即进入死亡,而可存活相当长一段时间。

2. 端粒酶

端粒序列由端粒酶合成。端粒酶是一种核糖核蛋白逆转录酶,由蛋白和一段 RNA 组成,其 RNA 序列和端粒序列互补,因而在合成端粒过程中起到模板作用⁽²⁾。单细胞生物体内端粒酶是有活性的,因此单核细胞之所以能进行完全的 DNA 复制,维持端粒长度稳定是与端粒酶不断合成端粒重复序列分不开的。改变端粒酶 RNA 模板或蛋白结构,可以使端粒变短,细胞衰老。生殖细胞其端粒酶亦是有活性的,因此,生殖细胞和单核细胞有相似的维持端粒稳定的机制。然而,人体内大部分组织细胞并没有检测到端粒酶的活性,由于缺少端粒酶修复已经丢失的端粒序列,端粒不断变短,导致细胞衰老。用 SV40 或 Ad5 转化的细胞虽然可延长一定的寿命,但细胞内没有端粒酶活化,端粒仍随细胞分裂增殖而不断变短⁽¹⁾。

与正常体细胞不同,肿瘤细胞有稳定的端粒长度,Morin 等⁽¹⁰⁾在 Hela 细胞中首先检测到了端粒酶的活性,这就提示肿瘤细胞端粒稳定与端粒酶的活化密切相关。然而肿瘤细胞端粒序列亦明显短于其起源组织细胞,衰老细胞在变成肿瘤细胞后端粒序列还有所增长,而且细胞内含有一定数量(下转封二)

(上接 192 页)的双着丝粒染色体,这就提示端粒酶的活化和端粒的稳定、增长出现在肿瘤发生的晚期,为此 Counter 等⁽¹⁾检测了用 SV40 或 Ad5 转化前后人肾胚细胞端粒长度,端粒酶活性和双着丝粒染色体数目。结果发现在转化成不死细胞后,细胞内出现端粒酶活性,端粒长度不再缩短,反而有所增长,双着丝粒染色体数目不再增加,说明端粒酶活化是细胞转化成不死细胞的一个重要条件。之后人们检测了 HPV 转化的上皮不死细胞和 EBV 转化的人 B 淋巴不死细胞及卵巢癌细胞端粒酶的活性,均得到了阳性结果⁽¹¹⁾。应用最近发展起来的 PCR 端粒酶检测技术(TRAP),Kim 等⁽¹²⁾在 100 株转化的不死细胞和 101 株肿瘤细胞中证明,98%转化不死细胞和 90%肿瘤细胞有端粒酶活性。因此,体细胞转化成肿瘤细胞的一个可能机制是:随着细胞增殖,端粒不断丢失,失去了对染色体的保护作用,染色体发生重排、基因突变,激活端粒酶的表达,从而维持细胞端粒稳定的长度,使细胞具有无限增殖的能力。这也表明选择性端粒酶抑制剂可能是一种很有前途的抗肿瘤药物。

然而,Bryan 等⁽¹³⁾报道 35 株转化不死细胞用 TRAP 法检测端粒酶活性,结果有 15 株是端粒酶阴性的,Kim 等⁽¹²⁾亦报道 6 株 SV40 转化的不死细胞是端粒酶阴性的。这些细胞具有稳定的端粒长度,这就说明端粒酶活化并不是细胞变成肿瘤细胞的一个必须条件,而只是一种维持端粒长度稳定的机制,细胞还可以通过其它机制来保持端粒的稳定。

肿瘤细胞或病毒转化的不死细胞具有稳定的端粒长度,一个重要的途径是通过活化端粒酶来完成的。所有这些端粒酶阳性的细胞都有相似长度的较短端粒序列,表明这类细胞可能是通过活化端粒酶来稳定端粒的。Bryan 等报道的 15 株端粒酶阴性的不死细胞,其端粒序列明显长于其它细胞株(50kb),具有长端粒序列的细胞可能通过另

外一种未知的机制来维持端粒稳定。例如:果蝇细胞可以把特异的反转座子(retrotransposon)转移到正常或断裂染色体末端来维持端粒长度。人体细胞是否存在这一机制还有待于研究。体外培养的人体细胞是很难自发转变成不死细胞的。Rogan 等⁽¹⁴⁾报道一株 Li-Fraumeni 综合症患者的成纤维细胞自发转变成了不死细胞。尽管其成纤维细胞 P53 蛋白发生了变异,大多数培养细胞株还是衰老死亡。对自发变成不死细胞的细胞株检测均未发现 P16INK4 蛋白和端粒酶活性,而其端粒在转化成不死细胞后却延长了,说明 P53 和 P16INK4 的表达丢失在端粒稳定和细胞恶变中有一个重要作用。与其它体细胞不同,正常人外周血、骨髓淋巴细胞有较低的端粒酶活性。慢性淋巴细胞性白血病患者淋巴细胞端粒酶活性在早期低于对照组,而在晚期则升高。尽管细胞内端粒酶活性不同,早期端粒随着细胞的复制逐渐变短,换言之,慢性淋巴细胞性白血病患者早期细胞缺少一种稳定端粒序列的途径,而端粒酶活性在晚期才升高,可能是端粒序列缩短到一定长度时通过一种未知的机制来活化端粒酶⁽¹⁵⁾。与人体内淋巴细胞相似,大多数鼠组织细胞具有端粒酶活性,但其端粒亦随着细胞分裂而逐渐变短,这种差别可能是鼠类缺乏一种人体细胞具有的调控端粒酶活性的途径。这也可能是鼠类细胞比人体细胞更易变成不死细胞的一个原因⁽⁴⁾。

3. 端粒蛋白

从许多动物细胞中已纯化出端粒蛋白。端粒蛋白与端粒末端单链 DNA 结合,防止化学修饰和核酸酶的作用,起到保护端粒的作用。端粒长度与端粒蛋白相关,例如:rap1 端粒蛋白可调节端粒的长度。随着细胞衰老,端粒蛋白活性增加。由于端粒蛋白也有特异的 RNA 结合性,因此,端粒蛋白可能实际是不均一核糖核蛋白(heterogenous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)的一(下转封三)

(上接封二)种。hnRNP 与不均一核 RNA (heterogenous nuclear RNA, hnRNA) 结合形成复合体,并参与转录后 mRNA 前体的剪接。Southernwestern 印迹分析和免疫沉降分离表明成纤维细胞端粒蛋白可能是 hn-RNPA/B。用紫外交联法检测几种主要 RNA 结合蛋白对 RNA 的结合性,发现衰老细胞中其结合活性明显降低而且,Western 印迹发现包括端粒蛋白在内的 RNA 结合蛋白量是下降的,这与 RNA 蛋白结合性下降是一致的。但是端粒蛋白量虽下降,其与端粒 DNA 序列结合性却增加。这可能与蛋白修饰如磷酸化或去磷酸化相关。由于端粒蛋白起到保护端粒作用,随着细胞衰老,端粒长度下降,可能会启动促进端粒稳定的途径,端粒蛋白活性增加可能是其中之一⁽¹⁶⁾。

更深入地研究端粒与衰老及肿瘤发生的机制是非常有意义的,这对于延缓机体衰老过程,弄清正常细胞生长发育调控的机理和寻找有效的抗肿瘤药物都有巨大的价值。

参考文献

1. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, 1992; 11(5): 1921-9.
2. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991; 350(6319): 569-73.
3. Harley CB, Futcher AB, Greider CW, et al. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*, 1990; 345(6274): 458-60.
4. Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(11): 4818-22.
5. Allsopp RC, Harley CB. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*, 1995; 219(1): 130-6.
6. Marx J. Chromosome ends catch fire. *Science*, 1994; 265(5179): 1656-8.
7. Von Iglinski T, Saretzki G, Docke W, et al. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts; a model for senescence? *Exp cell Res*, 1995; 220(1): 186-93.
8. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(24): 11190-4.
9. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet*, 1993; 52(4): 661-7.
10. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 1989; 59(3): 521-29.
11. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(8): 2900-4.
12. Kim NW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266(5193): 2011-15.
13. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, et al. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 1995; 14(17): 4240-8.
14. Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, et al. Alterations in p53 and p6INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1995; 15(9): 4745-53.
15. Counter CM, Gupta J, Harley CB, et al. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*, 1995; 85(9): 2315-20.
16. Hubbard K, Dhanaraj SN, Sethi KA, et al. Alteration of DNA and RNA binding activity of human telomere binding proteins occurs during cellular senescence. *Exp Cell Res*, 1995; 218(1): 241-7.