

端粒酶抑制剂与肿瘤治疗研究进展

姚成才综述, 林从尧审校

关键词: 端粒酶; 抑制剂; 肿瘤; 治疗

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)01-0062-03

0 引言

肿瘤的发生是多阶段、多步骤的复杂过程。原癌基因的激活、抑癌基因的失活是肿瘤发生的重要分子基础。肿瘤细胞获得无限增殖特性而成为永生细胞, 这其中端粒酶起了重要作用。端粒酶是一种特殊的 DNA 聚合酶, 具有逆转录酶活性, 由人类端粒酶 RNA (humantelomeraseRNA, hTER)、端粒酶相关蛋白 1 (humantelomerase-associated protein 1; hTEP1) 和端粒酶逆转录酶 (humantelomerasereverse transcriptase, hTERT) 三组分构成, 能以自身的 RNA 为模板, 反转录成端粒的重复单元 TTAGGG 加到人染色体末端, 阻止端粒随细胞分裂而缩短, 使细胞绕过衰老途径成为永生细胞, 导致人类肿瘤的发生。迄今发现近 90% 的肿瘤细胞都有端粒酶活性, 而正常细胞或组织几乎没有端粒酶活性。端粒酶已成为当今肿瘤新的标志物和肿瘤治疗的新靶点, 抑制端粒酶活性已成为肿瘤治疗的一种新策略。本文就最近几年来端粒酶抑制剂与肿瘤治疗关系作一综述。

1 反义核苷酸、反义肽核苷酸、硫代反义核苷酸对端粒酶活性的抑制

1.1 反义核苷酸

反义核苷酸是能抑制基因表达的 RNA, 它能与靶细胞的 DNA 互补形成双链而抑制靶基因的表达。张运涛等^[1] 用脂质体介导法将端粒酶反义 RNA 真核表达载体 (pBBS212-hTER) 导入人肾癌 GRC-1 细胞系中, 采用 MTT 法检测细胞生长动力, 电镜下观察细胞增殖情况及端粒酶反义 RNA 对细胞凋亡的影响。结果发现细胞的增殖动力明显受到抑制, 倍增时间延长, 电镜观察到部分 GRC-1/pBBS212-hTER 细胞出现染色体边聚或形成凋亡小体, 表明反义 hTER 封闭合成端粒的模板而抑制端粒酶活性。Kondo^[2] 等研究了恶性胶质瘤细胞系 U87-MG 和 U251-MG, 也发现反义核苷酸降低了两者的端粒酶活性。

1.2 反义肽核苷酸

反义肽核苷酸 (peptidenucleic acids, PNAs) 是一种多肽骨架的核酸模拟物, 具有与天然 DNA 相似结构特征。PNAs 通过 Watson-Crick 原则与 DNA/RNA 结合, 且不易被核酶和蛋白酶降解, 有望成为良好的抗癌药物。Norton 等^[3] 设计了针对人乳腺上皮细胞系 HME50-5 的端粒酶 RNA 模板区附近不同大小的 13 个 PNAs 片断, 采用固相合成技术, 利用 PNAs 合成单体, 从 3 端向 5 端合成甘氨酸为骨架的 PNA 分子, 发现其对端粒酶的抑制活性随 PNA 链的延长而增强, 且抑制效果比同序列的 Ps-OND 强 10~50 倍。Hamilton 等^[4] 把 PNAs 导入真核细胞, 发现端粒酶活性受到抑制且端粒的长度不能维持。

1.3 硫代反义核苷酸

硫代反义核苷酸 (phosphorothioate oligonucleotide, Ps-OND) 是具有与哺乳动物端粒序列相同的 5'-d(TTAGGG)-3' 序列。它可以抑制端粒酶的活性, 用于肿瘤的治疗。Mata 等^[5] 设计合成了与哺乳动物端粒重复序列相同的硫代反义核苷酸 5'-d(TGTGAG)-3', 与 Burkitts 淋巴瘤细胞系 OMA-BL1 共孵育, 发现 Ps-OND 能抑制细胞裂解液中端粒酶的活性, 使细胞倍增时间延长, 并诱导细胞死亡。进一步利用裸鼠移植瘤模型评价 Ps-ODN 的体内抗癌效果, 发现 Ps-ODN 抗癌活性呈剂量依赖性, 50 μ g/d 的 5'-d(TTAGGG)-3' 能明显抑制成瘤裸鼠瘤体的大小。

2 核苷类似物对端粒酶活性的抑制

利用已知的逆转录酶抑制剂, 如 AZT (3-Azido-2,3-dideoxythymidine)、AZT-TP (AZT-5-triphosphate)、5-AZA-CR (5-azacytidine)、ddl (dideoxyinosine)、ddT[1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] 等来抑制端粒酶活性, 使其不能保护染色体末端而使细胞凋亡来达到治疗肿瘤的目的。Melana 等^[6] 发现 AZT 能有效的抑制 4 种乳腺癌细胞系增殖及其端粒酶活性。Murakami 等^[7] 研究表明 ddl 和 AZT-TP 能使妇科肿瘤 HEC-1 细胞系端粒酶活

收稿日期: 2002-04-18; 修回日期: 2002-06-17
作者单位: 430071 武汉大学中南医院肿瘤科

性下降,端粒长度缩短。Kitagawa 等^[8]用 5-AZA-CR 作用于前列腺癌细胞系 DU-145 和 TSU-PR1,发现两个细胞系的生长都受到抑制,可是 TSU-PR1 中端粒酶活性明显降低,而在 DU-145 中却未发现,West-bolt 分析发现 5-AZA-CR 在 TSU-PR1 中通过激活 p16 表达和抑制 c-myc 表达,从而抑制 hTERTmRNA 转录而降低端粒酶的活性,但在 DU-145 中却无 p16 的表达而导致 c-myc 的抑制;RT-PCR 分析揭示 5-AZA-CR 抑制 hTERT 启动子的转录活性和启动子核心内的 E-box。Choi 等^[9]发现 Retinoicacid (RA)和它的类似物 trans-RA、9-cis-RA 和 13-cis-RA 能抑制人乳腺癌 MCF-7 和永生化的乳腺上皮细胞系 MCF-10A 中端粒酶活性。

3 细胞分化诱导剂对端粒酶活性的抑制

正常人类细胞经过分化,端粒酶活性受到抑制。是否永生化的肿瘤细胞也可以通过诱导分化抑制端粒酶活性来达到治疗的目的呢?马东礼等^[10]用 RT-PCR 方法在 HeLa 细胞中检测到端粒酶 hTERT 的转录,在榄香烯 (elemeneemulsion, 一种诱导宫颈癌细胞凋亡的药物) 诱导细胞凋亡的过程中, hTERT 明显受到抑制,且 hTERT 的转录表达随榄香烯作用于 HeLa 细胞的时间、剂量的增加而增强 (150ug/ml 榄香烯作用于 heLa 细胞 48h 后, hTERT 的扩增明显减少, 72h 后扩增产物完全消失,即 hTERT 活性完全被抑制)。hTERT 是端粒酶活性的重要决定因素。从而证明细胞分化诱导剂通过抑制 hTERT 转录而降低端粒酶活性。目前已用到的诱导分化剂主要有:全反式维甲酸、1,25-二羟维生素 D₃、二甲亚砷、丁酸等。

4 核酶对端粒酶活性的抑制

核酶 (ribozyme) 是一类具有酶活性的反义 RNA,除特意封闭靶基因 RNA 外,同时具有切割靶 RNA 的作用,使其降解而失去生物学功能。由于端粒酶的催化亚单位 hTERT 决定端粒酶的活性,而 hTERTmRNA 是拳头型核酶极好的作用靶点。Yokoyama 等^[11]通过研究发现 hTERTmRNA5' 末端下游 13 个核苷酸是核酶抑制端粒酶活性的极好靶点 (13-ribozyme),同时在 polyA 尾上游 59 个核苷酸也可抑制端粒酶的活性。从而证明 13-ribozyme 能够调节端粒酶的活性,可能对癌症的治疗有潜在价值。Kanazawa 等^[12]设计针对人类端粒酶 RNA 组分拳头结构的核酶 teloRZ,发现它能特异性的切割其底物,即人工合成的部分端粒酶 RNA 片段,且能抑制人肝癌细胞系 HepG2 和 Huh-7 细胞提

取物的端粒酶活性。由于核酶精确度高,对人体无毒副作用,有望成为高效、低毒,广谱的抗癌新药。

5 其他药物对端粒酶活性的抑制

某些儿茶酸 EGCG (epigallocatechin gallate) 具有强而直接抑制人成单核细胞白血病 U937 细胞和人直肠癌 UT29 细胞的端粒酶活性^[13]。细胞外多糖 GA3 (Gymnodiniums pA3) 在 10.0 mg/ml 就对人类白血病细胞系 K562 显示细胞毒性,使其端粒酶活性降低^[14]。-IFN (alphainterferon) 能快速 (通常在 4 小时内) 和显著的下调人恶性造血干细胞系、急性原发性白血病细胞中端粒酶活性^[15]。Akiyama 等^[16]发现 HerbimycinA 能降低人类慢性粒细胞白血病细胞 K562 端粒酶的活性,且这种降低作用与细胞周期有关,主要在 S 期、G₂/M 期和 Cyclin-D₁ 期。另外还有顺铂、蛋白激酶 C 抑制剂、多种细胞周期阻滞剂、新喹诺酮类药物氧氟沙星和茈萘沙星等。

6 发展前景和存在的问题

6.1 发展前景

端粒酶抑制剂用于肿瘤治疗具有广阔的应用前景,除上述这些抑制剂外,进一步研究可大致归纳为以下几个方面:(1) 阻断端粒酶复合物的组装和转运过程,包括阻断 SnRNA 在细胞核内的转录, RNA 的修饰、加工、转运至细胞质并与蛋白质组装,再返回细胞核的各步骤。(2) 阻断端粒 DNA 与端粒酶活性位点的结合。(3) 通过对端粒酶活性细胞内调节机制的调控阻断端粒酶活性,如 p53、p21、c-myc、sp1 基因等。(4) 阻断端粒酶蛋白催化亚基的功能。(5) 制备突变端粒酶 RNA 与内源性 RNA 竞争端粒酶蛋白。(6) 端粒酶蛋白组分抑制剂。(7) 端粒酶细胞周期依赖性调节。

6.2 存在的问题

尽管端粒酶抑制剂用于肿瘤治疗具有重大的潜在价值,但也存在一些问题:(1) 正常人类生殖细胞、表皮细胞、肠黏膜基底干细胞等具有再生能力的细胞中,均可检测到不同水平端粒酶活性的表达,端粒酶活性抑制剂能否对这些细胞产生毒性作用还需考虑。(2) 部分肿瘤细胞具有较长端粒 (>10kb),随着有丝分裂进行,端粒缩短是个缓慢过程,在此情况下,端粒酶抑制剂是否有效?(3) 人类细胞中可能还存在不依赖端粒酶的端粒替代途径,端粒酶抑制剂能否导致所有肿瘤细胞死亡还有待证实?(4) 人类肿瘤细胞中亦有端粒酶阴性的细胞,可能导致对端粒酶活性的耐药。(5) 正常细胞的端粒较多数肿瘤

细胞长,且原始干细胞较少进行有丝分裂,其端粒缩短速度低于肿瘤细胞,故端粒酶抑制剂的疗程在正常细胞端粒耗尽前会停止。这样,当抑制端粒酶活性的治疗结束后,正常细胞端粒酶活性是否得到修复还有待研究。

尽管端粒酶抑制剂用于肿瘤治疗还存在不少问题,但随着肿瘤分子病因研究的加深,分子生物学技术的发展,药学理论研究的深入和制药工艺的提。相信不久的将来,端粒酶抑制剂会给广大肿瘤患者带来福音。

参考文献:

- [1] 张运涛,姜茹,刘利,等.端粒酶反义 RNA 对人肾癌细胞系 GRC-1 的生长影响[J].实用癌症杂志,2001,16 (3):233-235.
- [2] Kondo Y, Kondo S, Tanaka Y, et al. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 1998, 16 (17): 2243-2248.
- [3] Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE, et al. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids[J]. *Nature Biotech*, 1996, 14 (9): 615-621.
- [4] Hamilton SE, Simmons CG, Kathiriya S, et al. Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase[J]. *Chemistry & Biology*, 1999, 6 (6): 343-351.
- [5] Mata JE, Joshi SS, Palen B, et al. A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells in vitro and in vivo[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 144 (1): 189-197.
- [6] Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine[J]. *Clinical Cancer Research*, 1998, 4 (3): 693-696.
- [7] Murakami J, Nagai N, Shigemasa K, et al. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer lines[J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35 (6): 1027-1034.
- [8] Kitagawa Y, Koyano S, Takakura M, et al. Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT[J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 6 (7): 2868-2875.
- [9] Choi SH, Kang HK, Im EO, et al. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by retinoic acids[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17 (5): 971-976.
- [10] 马东礼,童善庆,肖家祁,等.檫香烯对 Hala 细胞端粒酶催化亚单位基因表达的作用[J].中国癌症杂志,2000,11 (1):9-13.
- [11] Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, et al. The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozymes to suppress telomerase activity[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2000, 273 (1): 316-321.
- [12] Kanazawa Y, Ohkawa K, Ueda K, et al. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 1996, 225 (2): 570-576.
- [13] Naasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 1998, 249 (2): 391-396.
- [14] Sohma K, Sumida T, Hamakawa H, et al. Inhibitory effect of a farnesyl transferase inhibitor on telomerase activity in K562 cells[J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1998, 99 (3): 259-265.
- [15] Xu D, Erickson S, Szepes M, et al. Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and non-malignant hematopoietic cells[J]. *Blood*, 2000, 96 (13): 4313-4318.
- [16] Akiyama M, Yamada O, Akita S, et al. Ectopic expression of myc fails to overcome downregulation of telomerase activity induced by herminycin A, but ectopic hTERT expression overcomes it[J]. *Leukemia*, 2000, 14 (7): 1260-1265.

(周永红校对)