

Development on detecting human telomerase activity with radionuclide tracing technology

LIU Meng, WANG Rong-fu*

(Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

[Abstract] Human telomerase, especially human telomerase reverse transcriptase (hTERT), plays an important role in human aging and tumorigenesis. hTERT represents the major determinant of telomerase activity. Since its potential clinical significance, the measurement of hTERT expression conduces to not only tumor diagnosis, but also the research of telomerase. The development of detecting human telomerase activity with radionuclide tracing technology was reviewed in this article.

[Key words] Human telomerase reverse transcriptase; Telomerase; Radionuclide tracing technology

放射性核素示踪技术检测端粒酶活性的研究进展

刘 萌 综述, 王荣福* 审校

(北京大学第一医院核医学科, 北京 100034)

[摘要] 人端粒酶(telomerase)与人类的衰老与肿瘤发生密切联系;其主要组成成分之一——人端粒酶催化亚单位(hTERT)是端粒酶的限速亚单位,具有重要的临床应用价值与研究意义。检测端粒酶活性,尤其是hTERT活性,不仅有助于临床诊断肿瘤,而且对于进一步开展端粒酶研究具有重要作用。本文综述放射性核素示踪技术检测端粒酶活性的研究进展。

[关键词] 人端粒酶催化亚单位;端粒酶;放射性核素示踪技术

[中图分类号] R817.4 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2009)01-0018-03

人端粒酶(telomerase)主要包括三种成分,即人端粒酶RNA成分(human telomerase RNA template, hTR)、人端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)及端粒酶相关蛋白hTERT1(TP1/TLP1),其中hTERT是端粒酶活性的决定因素,其上调可能是人肿瘤发生、发展的关键事件。检测端粒酶活性,尤其是hTERT活性不仅有助于临床诊断肿瘤,而且对于进一步开展端粒酶研究具有重要作用。本文对hTERT的作用以及已有的一些检测技术、特别是放射性核素示踪技术检测端粒酶活性的研究进展进行综述。

1 hTERT 的功能

大量研究表明,hTERT只在端粒酶阳性的肿瘤细胞、癌前病变细胞和永生化细胞中表达,其mRNA水平与端粒酶活

性正相关。正常组织或肿瘤旁组织中的hTERT表达被抑制^[1],而端粒酶其他两个组成成分(hTR和hTP1)在端粒酶阴性的正常组织和肿瘤组织中均有组成性表达。因此,hTERT基因是迄今所知的人体肿瘤特异性最强的生物标志之一,在肿瘤特异诊断和治疗方面具有潜在应用价值^[1-2]。研究^[3-7]发现,hTERT是一个广谱的肿瘤靶点,大约在85%~90%的恶性肿瘤细胞以及永生化细胞中可以检测到高活性表达的hTERT。在某些肿瘤类型,恶变前hTERT已被激活;随着肿瘤的进展,hTERT活性逐渐上升,因而hTERT活性监测可作为早期诊断或预警的一个指标。此外,hTERT活性也可能是肿瘤患者预后评估的良好指标,至少在部分肿瘤(如胃癌)中,hTERT活性高者预后不良^[8]。近来的研究^[9-10]显示,hTERT表达与端粒酶激活会增强肿瘤细胞的耐药性,而hTERT表达降低与有效的放、化疗有关。

2 hTERT 检测方法

传统的端粒酶检测方法是利用端粒酶具有逆转录酶的功能:在端粒酶自身携带的RNA模板指引下,用掺入放射性核素³²P标记的dGTPs合成端粒DNA片段,并将其结合至引物的3端,而后通过8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分离产物,经放射自显影法显示结果。对于端粒酶阳性者而言,该方法能显示出一系列相差6

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划基金-973计划基金(2006CB705705),国家自然科学基金(30470498,30670583),北京大学985二期基金(985-2-056),放射性药物教育部重点实验室开放基金(0706)。

[作者简介] 刘萌(1978-),女,福建莆田人,博士,助理研究员。研究方向:分子功能影像学及分子核医学。E-mail: Louisa_liu@bjmu.edu.cn

[通讯作者] 王荣福,北京大学第一医院核医学科,100034。

E-mail: rongfu_wang2003@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2008-10-25 [修回日期] 2008-12-26

个碱基序列的 DNA 梯状条带。研究者应用该方法首次检测到了人类肿瘤中的端粒酶。但是,由于该方法是基于低渗膨胀、物理裂解的原理提取端粒酶,无放大作用,所需样本量大而检测灵敏度低,因而很不实用,目前多已淘汰。1994 年, Kim 等首创一种高灵敏度的端粒酶检测方法,其基本思路是将端粒重复序列直接检测法与聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 结合起来,称之为端粒重复序列扩增法 (telomeras repeat amplification protocol, TRAP)。TRAP 法是将具有极高灵敏度的 PCR 应用于传统的端粒重复序列直接检测法,加之洗涤剂裂解法代替原来的低渗处理方法,使检测灵敏度提高了 104 倍。这无疑是端粒酶研究历程中的一个里程碑。事实上也正是在 TRAP 法发表后,有关端粒酶的研究才得以蓬勃开展。该方法也是目前最常应用的检测端粒酶活性的方法之一。

TRAP 法虽然极大促进了对端粒酶的研究,但尚有许多不足之处,如检测结果是而非线性的,不能对端粒酶活性做精确的定量研究,可能出现假阴性结果,耗时长,未能达到微量水平等等。针对 TRAP 法的诸多不足之处,出现了多种改良方法,包括 TRAP 结合液体闪烁计数法、TRAP-银染法、TRAP-ELISA 法、半定量 TRAP 法、原位 TRAP 法、原位杂交法等^[11]。

研究者们正在寻找除 TRAP 法之外的方法来检测端粒酶的表达,主要思路是对酶蛋白进行直接检测,其中最具有发展前景的方法是应用免疫组织化学法直接检测石蜡包埋的薄切片上的 hTERT。目前该方法尚处于发展阶段,尽管已经出现一些比较成功的多克隆抗体,但其特异性很有限:即便是新鲜的组织样品,也很难对 hTERT 进行准确的细胞定位。因此,有必要研制一些高度特异的单克隆抗体,这也是免疫组织化学法检测端粒酶活性的重要研究方向之一。用单克隆抗体分析石蜡包埋切片上的 hTERT 是进行临床研究的理想工具,不仅可以提高诊断特异性,进行准确的细胞定位,还能对确诊患者的肿瘤标本进行回顾性分析。

3 放射性核素示踪技术检测 hTERT 活性

上述端粒酶检测手段,无论是 TRAP 法、TRAP 改良法,还是免疫组织化学法,都必须先获得疾病或者疑似疾病的组织标本,然后在体外检测端粒酶活性,均属于有创性操作;而且还可能因为取样的准确性欠佳造成假阴性。既然 hTERT 是迄今为止最具特异性的肿瘤标志物之一,且具备多种临床应用潜质,那么是否可以应用某种手段实现在体检测 hTERT 活性表达,从而达到无创性诊断具有 hTERT 表达活性的疾病的目的?

由于放射性核素具有高特异性、高灵敏度的体内示踪作用,因此有学者提出利用放射性核素标记 hTERT 抗体片段、基因片断或报告基因,制备 hTERT 分子探针,将其引入体内,实现无创、特异、早期在体诊断肿瘤的目的,并且实现实时、动态监控端粒酶基因治疗的目的。已有部分研究取得了令人鼓舞的成果,证明该思路具有较强的科学性与可行性。

Groot-Wassink 等^[12]评价了正电子发射断层扫描仪 (positron emission tomography, PET) 在检测端粒酶启动子片段体内

表达模式的可行性。在该研究构建了重组腺病毒,携带有来自 hTR 基因与 hTERT 基因的两种启动子片段;通过静脉注射或者瘤内注射的方式将该重组腺病毒引入荷瘤裸鼠体内,启动钠/碘转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 报告基因的表达;最后通过 PET 显像以及体内生物分布方法观察转基因表达的模式。该研究结果显示 hTR 与 hTERT 启动子片段均表现出肿瘤选择性表达的性质,并且能通过 PET 显像进行可视化与定量分析,因此认为 hTR 与 hTERT 基因启动子均能安全应用于监控基因治疗的过程中;PET 显像 (采用 NIS 作为报告基因) 能实现在体评价这两种启动子病灶选择性的目的。倘若能将该方法直接应用于人体显像,那么采用 NIS PET 报告基因的基因表达显像技术有望在临床上用于活体检测端粒酶启动子的活性,监控端粒酶基因治疗的进程。

为实现无创性检测化疗所导致的 hTERT 基因表达变化的目的, Padmanabhan 等^[13]采用放射性核素示踪技术以及光学技术检测 5-氟脲嘧啶治疗前后 hTERT 基因在肿瘤细胞中的表达变化。该研究构建了一个融合报告基因结构,包括人源化雷尼利亚荧光素酶 (humanized Renilla luciferase, hrl, 用于生物发光显像)、单体红色荧光蛋白 1 (monomeric red fluorescence protein 1, mrfp1, 用于荧光显像) 以及短胸苷激酶 (truncated thymidine kinase, tk, 用于放射性核素标记显像);该融合报告基因处于 hTERT 启动子片段的监控之下。将融合报告基因结构转入 hTERT 表达阳性或阴性的肿瘤细胞中,以 5-氟脲嘧啶进行治疗,然后通过各种显像方式观察治疗前后 hTERT 启动子活性的变化情况,结果显示将融合结构转入 hTERT 表达阳性的肿瘤细胞中后,三种报告系统均能产生高活性表达,并且能观察到 hTERT 启动子的活性。hTERT 表达阴性的肿瘤细胞则未显示出明显的报告基因表达。

反义显像 (antisense imaging) 是用放射性核素标记人工合成的一段反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON), 经体内核酸杂交显示目的基因或基因过度表达的组织。该技术具有特异性强、亲和力高、安全性好等优势,受到研究者广泛关注,取得极大研究进展^[14-18]。王荣福课题组^[19]以 hTERT mRNA 为生物靶点,利用放射性核素钼 [^{99m}Tc] 制备新型反义分子探针 (^{99m}Tc-hTERT ASON)^[20] 在荷 MCF-7 乳腺癌动物模型上进行体内生物分布与显像研究。体内生物分布结果显示,^{99m}Tc-hTERT ASON 的肿瘤摄取率与肿瘤/非肿瘤比值 (tumor-to-nontumor, T/NT) 均高于对照组 ($P < 0.05$);在尾静脉注射后 6 h, ^{99m}Tc-hTERT ASON 的肿瘤/血液 (tumor-to-blood, T/B) 与肿瘤/肌肉 (tumor-to-muscle, T/M) 比值分别达到 2.02 与 8.85。单光子发射型计算机断层 (single photon emission computed tomography, SPECT) 显像结果显示:在尾静脉注射^{99m}Tc-hTERT ASON 后 4~8 h, 荷瘤裸鼠肿瘤部位出现明显放射性浓聚;而对照组的肿瘤部位在任何时相均未见有明显放射性浓聚^[21]。该研究表明针对 hTERT mRNA 为靶点的反义分子探针 (^{99m}Tc-hTERT ASON) 能特异性聚集在肿瘤组织中;换言之,^{99m}Tc-hTERT ASON 可在活体动物水平上特异性检测 hTERT 的表达。

总之,检测端粒酶活性方法应朝向具有直接性、无创性、

高特异性和强敏感性特点的方向发展,对肿瘤的早期诊断、鉴别诊断、预后评价以及治疗指导等方面发挥重要作用。由于在细胞恶变过程中存在复杂性、多阶段性以及多因素参与性,因此要明确端粒酶在肿瘤发生、发展过程中的确切作用机制尚有许多工作要做,而检测方法的改进无疑会推动该方面研究的不断深入。

[参考文献]

- [1] Baykal A, Rosen D, Zhou C, et al. Telomerase in breast cancer: a critical evaluation. *Adv Anat Pathol*, 2004, 11(5): 262-268.
 - [2] Dhaene K, van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch*, 2000, 437(1): 1-16.
 - [3] Gudjonsson T, Villadsen R, Ronnov-Jessen L, et al. Immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2523-2534.
 - [4] Kowolik CM, Liang S, Yu Y, et al. Cre-mediated reversible immortalization of human renal proximal tubular epithelial cells. *Oncogene*, 2004, 23(35): 5950-5957.
 - [5] Sun Y, Firestein GS, Wenger L, et al. Telomerase-transduced osteoarthritis fibroblast-like synoviocyte cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(4): 1287-1292.
 - [6] Kampinga HH, Van Waarde-Verhagen MA, Van Assen-Bolt AJ, et al. Reconstitution of active telomerase in primary human foreskin fibroblasts: effects on proliferative characteristics and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 2004, 80(5): 377-388.
 - [7] Wu CH, Lin SR, Hsieh JS, et al. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance. *Dis Markers*, 2006, 22(3): 103-109.
 - [8] Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett*, 2003, 194(2): 221-233.
 - [9] Lee KH, Rudolph KL, Ju YJ, et al. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3381-3386.
 - [10] Asaad NY, Abd El-Wahed MM, Mohammed AG. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid carcinoma: diagnostic and prognostic role. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2006, 18(1): 8-16.
 - [11] Hiyama E, Hiyama K. Telomerase detection in the diagnosis and prognosis of cancer. *Cytotechnology*, 2004, 45(1-2): 61-74.
 - [12] Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, et al. Noninvasive imaging of the transcriptional activities of human telomerase promoter fragments in mice. *Cancer Res*, 2004, 64(14): 4906-4911.
 - [13] Padmanabhan P, Otero J, Ray P, et al. Visualization of telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter activity using a trimodality fusion reporter construct. *J Nucl Med*, 2006, 47(2): 270-277.
 - [14] Britz-Cunningham SH, Adelstein SJ. Molecular targeting with radionuclides: state of the science. *J Nucl Med*, 2003, 44(12): 1945-1961.
 - [15] Lendvai G, Veliky I, Bergström M, et al. Biodistribution of ⁶⁸Ga-labelled phosphodiester, phosphorothioate, and 2'-O-methyl phosphodiester oligonucleotides in normal rats. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26(1): 26-38.
 - [16] Sun X, Fang H, Li X, et al. MicroPET imaging of MCF-7 tumors in mice via unr mRNA-targeted peptide nucleic acids. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16(2): 294-305.
 - [17] Nakamura K, Kubo A, Hnatowich DJ. Antisense targeting of p-glycoprotein expression in tissue culture. *J Nucl Med*, 2005, 46(3): 509-513.
 - [18] Haberkorn U, Mier W, Eisenhut M. Scintigraphic imaging of gene expression and gene transfer. *Curr Med Chem*, 2005, 12(7): 779-794.
 - [19] Wang RF, Liu M, Zhang CL, et al. Preliminary study on ^{99m}Tc-labeled antisense oligonucleotide targeted hTERT mRNA: preparation, characterization and biodistribution in normal mice. *Eur J Nucl Med & Molecular Imaging*, 2007, 34(Suppl 10): S149.
 - [20] Liu M, Wang RF, Zhang CL, et al. Noninvasive imaging of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA with ^{99m}Tc-Radiolabeled antisense probes in malignant tumors. *J Nucl Med*, 2007, 48(12): 2028-2036.
 - [21] Liu M, Wang RF, Zhang CL, et al. Study on different effect of liposome-mediated method on antisense molecular probe targeting in vitro and in vivo. *J Oncology*, 2008, 14(8): 636-639.
- 刘萌, 王荣福, 张春丽, 等. 脂质体介导对反义分子探针肿瘤靶向作用影响的实验研究. *肿瘤学杂志*, 2008, 14(8): 636-639.