

文章编号: 1672 - 058X(2009)06 - 0589 - 04

*h*TERT 基因表达调控机制及其在抗肿瘤研究中的应用

殷 菲, 肖 何

(重庆工商大学 药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067)

摘 要:人端粒酶逆转录酶 (Human telomerase reverse transcriptase, *h*TERT) 的表达异常通常被认为是正常人体细胞癌变的先决条件。就调节 *h*TERT 表达的相关转录因子及其作用机制进行了综述, 指出以 *h*TERT 表达异常在肿瘤形成和发展过程中有十分重要的作用, 但鉴于肿瘤形成的复杂性, 关注与肿瘤生理和病理相关的内源性因子及其细胞因子在功能上的联系是进一步研究的方向。

关键词:人端粒酶逆转录酶; *c-Myc*; 转录; 端粒酶

中图分类号: Q279

文献标志码: A

端粒酶是一种由 RNA、蛋白质构成的核酸蛋白组成的 DNA 聚合酶, 它在体内以自身的端粒酶 RNA (telomerase RNA) 为模板, 在人端粒酶逆转录酶 (Human telomerase reverse transcriptase, *h*TERT) 的催化下向端粒末端添加六聚体 TTAGGG, 从而使端粒保持一定的长度^[1]。端粒酶的激活与肿瘤形成密切相关。*h*TERT 也被认为是决定该酶活性的关键性因子。在大多数肿瘤中都可观察到 *h*TERT 表达水平上调与端粒酶活性成正相关, 而且这也被认为是肿瘤发育所必须的^[2]。由于 *h*TERT 只在端粒酶阳性的肿瘤细胞和永生化细胞中表达, 而且肿瘤细胞主要通过激活 *h*TERT 而激活端粒酶, 因此, 对 *h*TERT 激活和抑制机制的研究有助于阐释肿瘤发生机制, 进而为抗肿瘤治疗提供理论基础。

1 *h*TERT 转录激活因子及其作用机制

1.1 *c-Myc* 在 *h*TERT 转录中的作用

c-Myc 基因是 *h*TERT 的重要激活因子, 在 *h*TERT 基因表达过程中起决定作用。Wang 等利用正常乳上皮细胞 (Human mammary epithelial cells, HMECs) 和成纤维细胞 (MR90) 检测了各种细胞和病毒癌基因 (E6, mdm-2, E7, cdc25C, cdc25A) 对 *h*TERT 的激活能力, 发现只有 *c-Myc* 可在这两种细胞中表达并提高端粒酶活性, 而且 *c-Myc* 将 HMECs 细胞中的 *h*TERT 表达水平提高了近 50 倍, 由此可见, *c-Myc* 可能通过调控 *h*TERT 的表达来调节端粒酶活性^[3]。Wu 用亚胺环己酮 (Cycloheximide, CHX) 阻断蛋白质表达的方法, 证明了 *c-Myc* 可直接激活 *h*TERT 的表达。他们进一步并通过电泳迁移实验证实, *c-Myc* 可与 Max 形成异源二聚体而直接结合到 *h*TERT 转录起始位点中的两个典型 5'-CACGTG-3'E-box 结合元件附近^[4]。Greenberg 采用了同 Wu 相似的实验方法证实, 在 MR90 细胞中, *c-Myc* 直接激活了 *h*TERT 的转录, 并用碱性磷酸酶报告质粒分析得出, *h*TERT 的 ATG 密码子上游 -34 bp 的 E-box 结合元件直接介导了这种激活效应^[5]。

1.2 其他的 *h*TERT 转录激活因子及其机制

Satoru Kyo 等用大小为 181 bp 且含 *h*TERT 的核心启动子报告质粒分析表明, 当启动子中 5 个 Sp1 结合

收稿日期: 2009 - 09 - 10; 修回日期: 2009 - 09 - 10。

作者简介: 殷菲 (1976 -), 河北石家庄人, 博士, 副教授, 从事分子药理学研究。

元件突变后,在 NHF 和 SiHa 细胞中过量表达 Sp1 情况下,其相对荧光强度也分别下降 4 或 2 倍。而在含有这种报告质粒的正常人体角质细胞中,即使过量表达 *cMyc* 和 *Max*,其荧光强度增加也不明显^[6]。他们还注意到,在用 SV40 LT 转导的人体成纤维细胞中,*cMyc* 和 Sp1 可诱导细胞进入无限增殖,并伴随着端粒酶活性的显著增加。

近来,Endoh 等人在结肠癌细胞中研究发现,*Survivin* 基因可通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PKB)信号通路使 *cMyc* 和 Sp1 磷酸化而增强它们对 *hTERT* 启动子的结合活性,从而上调 *hTERT* 的表达^[7]。这与 Wang 等提出的 *cMyc* 表达量的上调是激活 *hTERT* 的关键略有不同。而且他们还指出,*Survivin* 还具有上调 Fas 配基的表达而使癌细胞避免 T 淋巴细胞诱导的衰老的双重功能。最近,Furuya 等研究发现,*survivin* 与 *aurora-B* 激酶之间的相互作用在 *survivin* 调节 *hTERT* 表达过程中具有十分重要的作用^[8]。这些研究结果不仅有助于探索与维持作为癌细胞特征之一的无限增殖相关的基因变化,而且还能为从组织侵略性特征(不被人体免疫系统排除)的相关变化来探讨正常细胞的癌变机理奠定基础。

1.3 *hTERT* 的转录抑制因子及其机制

自从发现 *hTERT* 在肿瘤形成中的作用以来,人们一直在探索能够抑制 *hTERT* 表达的相关因子及其作用机制^[9,10]。Cagatay Günes 等观察到,当人体造血细胞 U937 分化时,*cMyc* 维持恒定,而 *Mad1* 的表达水平迅速增加,进而与 *Max* 结合形成异源二聚体后竞争性结合到位于 *hTERT* 的 ATG 上游 -29 ~ -34 和 -243 ~ -238 bp 的两个 E-box 元件进而抑制 *hTERT* 的转录^[11]。这种抑制主要取决于近端的 E-box 元件(-29 ~ -34 bp),这与 Greenberg 等人的研究结果一致。Sataru Kyo 也做了类似证明,他们还研究证实,69% 的直肠癌、肺癌、胃癌、结肠癌细胞中的 *Mad1* 表达水平显著下降,并推测 *Mad1* 对 *hTERT* 启动子的抑制可能限制了细胞的增殖潜能,并对抑制肿瘤形态的出现有贡献。

有研究认为,在应答细胞缺氧、DNA 损毁等而触发细胞停滞或凋亡过程中有重要作用的 P53 蛋白也能抑制 *hTERT* 的转录^[12]。Xu 等用热敏感型 P53 表达载体转染 Burkitt 淋巴细胞(BL41)和 SL2 细胞,结果发现,P53 可与 Sp1 结合而阻遏 Sp1 对 *hTERT* 近端启动子区的结合,从而下调启动子的活性^[13]。这与 Sataru Kyo 等人的研究结果一致。他们还强调,野生型 P53 介导的 *hTERT* 水平下调不依赖于通过 P21 诱导的 G1 期阻滞,并指出 P53 的缺失突变并非必然激活端粒酶活性。另外,还有人报道认为,P53 介导的 *cMyc* 转录抑制是细胞 G1 期停滞所必须的^[14]。

研究还发现,与细胞分裂相关的基因 E2F 家族成员之一的 E2F-1 也可通过结合到位于 *hTERT* 的转录起始位点上游 -98 bp 和 -174 bp 的两个非典型结合元件而抑制其转录^[15]。这种抑制依赖于 E2F-1 的整个 DNA 结合结构域。他们在首先假设端粒酶活性的抑制可选择性地对抗人体癌细胞无限增殖形态的出现,并通过实验证实,E2F-1 因子的缺失是肿瘤形成的潜在机制。

2 *cMyc* 的抑制因子及其机制

Roger A Greenberg 通过实验证实,*cMyc* 和 *hTERT* 在肿瘤细胞转化过程中有不同的作用^[5]。近年来,Jesús Gil^[12]通过在人体前列腺上皮细胞(Human Prostate Epithelial Cell, HPrEC)中过量表达 *cMyc* 进而诱导细胞无限增殖模型,研究发现,表达 *cMyc* 的 HPrEC 有更强的增殖能力,亦能激活 *hTERT* 表达,并能对抗 p16 NK4a 诱导的衰老,而且细胞并没有丢失响应基因毒素诱导细胞凋亡的能力^[16]。事实上,Xu 和 David L. Crowe 都曾经指出,P53 或 E2F-1 的改变对下游其它靶基因(特别是与细胞周期相关的)的影响对肿瘤的形成有重要作用。Ana Cerezo 用转化生长因子(Transforming growth factor 1, TGF-1)处理能正常响应增殖与分化且端粒酶阳性的 HaCaT 皮肤角质细胞,结果发现,尽管细胞增殖与端粒酶活性普遍地密切联系,但也无必然的因果联系^[17,18]。越来越多的研究结果显示,*hTERT* 的激活可能是癌化的一个必要条件,而非充分必要条件。

Li 在 T47D 乳腺癌细胞系和 MCF-10A 正常乳腺上皮细胞中研究发现,肿瘤抑制因子 BRCA1 和 *cMyc* 及

Nmi (N-Myc反应蛋白)能够形成三聚物。BRCA1和 Nmi一起能抑制由 *c-Myc*激活的含 *hTERT*的核心启动子的报告质粒荧光酶活性(下降略75%)。而BRCA1的两种突变形式和单独的BRCA1或Nmi都无法抑制*hTERT*启动子的活性^[19]。同样,他们根据家族性乳腺癌中也有BRCA1基因突变这一现象推断出乳腺癌发育的可能分子机制。

3 以 *c-Myc*和 *hTERT*为靶点的抗肿瘤药物研究

因为 *hTERT*的激活在维持与促进肿瘤细胞生长中的重要作用,许多研究者都对以前表明有抗癌作用的物质开展了对 *hTERT*表达的机制研究。Takahiro Eitsuka在人结肠腺癌细胞(DLD-1)中研究证实,多聚不饱和脂肪酸(如DHA, EPA)能以时间和剂量依赖方式抑制 *c-Myc*和 *hTERT*的表达,从而下调端粒酶活性,这种效应随分子中双键数目的增多而增加,其中DHA表现了最强的抑制^[20]。Hideki Ouchi研究了3-羟基异黄酮对前列腺癌细胞生长抑制作用的机制^[21]。他们同时测定在不同时间和不同剂量的3-羟基异黄酮作用下,前列腺癌细胞中的 *c-Myc*、*hTERT*、P21和端粒酶活性的变化情况,结果发现, *c-Myc*表达量的下调和由P21上调诱导的细胞周期停滞都会引起 *hTERT*表达水平下降。Jiang等研究发现,1,25-二羟基维生素D₃可通过降低 *hTERT* mRNA的稳定性而促进卵巢癌细胞(OCa)的凋亡,并通过实时荧光定量PCR分析得出 *hTERT* mRNA水平的降低发生在1,25(OH)₂VD₃诱导细胞凋亡之前,从而证明前者是后者的原因而不是其结果^[22]。他们还推测认为, *hTERT*的负调控可能在抑制癌细胞的生长中起关键作用。他们也通过实验进一步证实,经1,25(OH)₂VD₃处理过的稳定表达 *hTERT*的OCa细胞仍然增强表达了端粒酶活性,延长了端粒长度并选择性的对抗1,25(OH)₂VD₃诱导的凋亡。

4 结 论

尽管目前大量的研究结果都证实 *hTERT*表达异常在肿瘤形成和发展过程中有十分重要的作用,但是,正常细胞的癌变是一个有众多基因改变和因子共同同步参与的过程,而无限增殖也只是癌细胞的特征之一,要揭示实现癌细胞全部特征的基因改变不仅仅只涉及 *hTERT*的调控。这正如 Teruo Endoh所指出的一样,那些多功能的因子包括 *c-Myc*和 *survivin*在内的癌基因,它们与其激活的 *hTERT*一起对肿瘤的形成和发展发挥重要作用,或许这也是研究肿瘤形成机制的重要靶点。总的来说,鉴于肿瘤形成和发展的复杂性,人们应该更加关注那些与肿瘤生理和病理相关的内源性因子,并进一步深入研究目前已经发现的细胞因子在功能上的联系。

参考文献:

- [1] COUNTER C M, MEYERSON M, EATON E N, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of *hTERT* (*hEST2*), the catalytic subunit of telomerase[J]. *Oncogene*, 1998, 16 (9): 17 - 22
- [2] FABRICIUS E M, KRUSE-BOITSCHENKO U, KHOURY R, et al. Immunohistochemical determination of the appropriate anti-*hTERT* antibodies for in situ detection of telomerase activity in frozen sections of head and neck squamous cell carcinomas and tumor margin tissues[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34 (5): 57 - 79
- [3] WANG J, XIE L Y, ALLAN S, et al. Myc activates telomerase[J]. *Genes Dev*, 1998, 12 (12): 69 - 74
- [4] WU K J, GRANDORIC, AMACKER M, et al. Direct activation of *TERT* transcription by *c-Myc*[J]. *Nat Genet*, 1999, 21 (2): 220 - 224
- [5] GREENBERG R A, OHAGAN R C, DENG H, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of *c-Myc* but is not functionally equivalent in cellular transformation[J]. *Oncogene*, 1999, 18 (5): 1219 - 1216
- [6] KYO S, TAKAKURA M, TAIRA T, et al. Sp1 cooperates with *c-Myc* to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (3): 669 - 677
- [7] ENDOH T, TSUJIN, ASANUMA K, et al. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1-and *c-Myc*-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305 (2): 300 - 311

- [8] FURUYA M, TSUJIN, KOBAYASHI D, et al Interaction between survivin and auroraB kinase plays an important role in survivin-mediated up-regulation of human telomerase reverse transcriptase expression[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34 (4): 1061 - 1068
- [9] FANG Y W. hTERT, c-Myc, Ki-67在肝癌组织中的表达及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25 (4): 338 - 340
- [10] CHEN L, TANG X D, YU S T, et al Induction of anti-tumour immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice[J]. *J Pathol*, 2009, 217 (5): 685 - 692
- [11] GUNES C, LICHTSTENER S, VASSEROT AP, et al Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (8): 2116 - 2121
- [12] STRAZISAR M, ROTT T, GLAVAC D. K-RAS and P53 mutations in association with COX-2 and hTERT expression and clinicopathological status of NSCLC patients[J]. *Dis Markers*, 2008, 25 (2): 97 - 106
- [13] XU D, WANG Q, GRUBER A, et al Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells[J]. *Oncogene*, 2000, 19 (45): 5123 - 5133
- [14] HO JS, MA W, MAO DY, et al p53-Dependent transcriptional repression of c-Myc is required for G1 cell cycle arrest[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (17): 7423 - 7431
- [15] CROWE DL, NGUYEN DC, TSANG KJ, et al E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29 (13): 2789 - 2794
- [16] GL J, KERA I P, LLEONART M, et al Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc[J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (6): 2179 - 2185
- [17] CEREDO A, KALTHOFF H, SCHUERMAN M, et al Dual regulation of telomerase activity through c-Myc-dependent inhibition and alternative splicing of hTERT[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115 (6): 1305 - 1312
- [18] CEREDO A, STARK H J, MOSHER S, et al Constitutive overexpression of human telomerase reverse transcriptase but not c-Myc blocks terminal differentiation in human HaCaT skin keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121 (1): 110 - 119
- [19] LI H, LEE TH, AVRAHAM H. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (23): 65 - 73
- [20] EITSUKA T, NAKAGAWA K, MIYAZAWA T. Dual mechanisms for telomerase inhibition in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells by polyunsaturated fatty acids[J]. *Biofactors*, 2004, 21 (1 - 4): 19 - 21
- [21] OUCHI H, SHIGURO H, IKEDA N, et al Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity[J]. *Int J Urol*, 2005, 12 (1): 73 - 80
- [22] JIANG F, BAO J, LI P, et al Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 through the down-regulation of telomerase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (6): 213 - 215

Regulating mechanism of hTERT gene expression and its application in antitumor research

YIN Fei, XIAO He

(Research Centre of Medicinal Chemistry & Chemical Biology,
Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: Over-expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) holds a critical role in the development of tumor from normal cells. So, those genes and cytokine, which can enhance the expression of hTERT, might be involved in the progress of tumor development. At present, we want to summarize the researching development of these factors and their mechanism, and generally introduce their application in tumor therapy targeting on hTERT. Focusing on its functional connection with endogenous factor and its cell factor in tumor physiology and pathology is the direction for further research.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; c-Myc; transcription; telomerase

责任编辑:田 静