

端粒酶活性检测的几种方法

张敏*, 奚耕思, 周艳妮

(陕西师范大学生命科学院, 西安710062)

摘要: 端粒酶活性检测方法的不断发展改进为癌症的诊断治疗以及人们对衰老的进一步研究提供了新途径和新思路。近年来端粒酶活性的检测方法有:(1)基本方法。(2)TRAP法。(3)改良的TRAP法。(4)间接检测法等。

关键词: 端粒酶; 癌症; 活性检测

中图分类号: Q55;R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-68-04

端粒酶和细胞衰老、永生化和癌变均密切相关,而端粒酶的活化是以上各变化过程的一个重要事件。端粒酶结构和功能的特殊性使得其活性的测定在整个端粒、端粒酶与衰老和癌症的关系研究中显得尤为重要,人们试图从这里找到一条诊治癌症和延缓衰老的新途径。

1 端粒和端粒酶

1.1 端粒

端粒是真核生物染色体末端特殊的DNA-蛋白质结构,含多个重复序列,人和大多数脊椎动物的端粒重复序列为5'-TTAGGG-3'。同时端粒结构的形成和功能维持需要端粒结合蛋白的直接或间接参与。正常细胞在分裂过程中,因其端粒DNA不能完全复制而导致部分重复序列的丢失,而当端粒缩短到临界长度(人类约为5~7kb)时,细胞停止分裂并开始衰老死亡。

1.2 端粒酶

有少数正常细胞(如永生细胞系)及绝大多数恶性肿瘤细胞可逃逸这一临界点,因为其含有活化的端粒酶系统,说明活化的端粒酶可能对癌细胞的生长和存活是必需的^[1]。端粒酶是一种核糖核蛋白复合物,是由RNA和蛋白质亚基组成的一种特殊的逆转录酶,其可利用自身的RNA模板合成末端DNA,并添加到染色体末端以克服末端序列的丢失,从而使细胞获得无限增殖能力^[2]。

端粒酶蛋白催化亚基(TERT或TRT)具有反转录酶的主要特征,其表达在出生后即被抑制,但大量研究显示在原发性肿瘤、癌细胞系和永生细胞系中可检测到TERT的表达,其与端粒酶活性的表达

水平一致,与端粒酶的活化过程密切相关^[3~7]。

2 端粒酶活性的检测方法

2.1 基本方法——端粒重复序列延伸法

这是1985年Greider等最早提出的端粒酶活性检测方法^[8]。通过细胞提取液与寡核苷酸引物的保温,具活性的端粒酶利用所提供的原料以自身的RNA为模板在引物的3'端添加DNA序列,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影显示结果。此方法灵敏度较低,所需样本量大,因此并不实用。

2.2 TRAP法

1994年Kim等建立端粒重复序列扩增法(Telomeric repeat amplification protocol, TRAP)。其基本原理和步骤为:①利用CHAPS去污剂从组织或细胞中制备端粒酶提取液。②TRAP反应(或PCR扩增):利用端粒酶的逆转录酶活性在非端粒引物TS(5'-AACCGTCGAGCAGAGTT-3')3'末端合成端粒重复序列,然后将反应产物进行PCR扩增,同时引入下游引物CX[5'-(CCCTTA)₃CCCTAA-3'],反应体系中含有 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 以标记产物。③反应产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影检测。阳性结果在凝胶电泳上显示相隔6bp的梯状条带,多用条带深浅表示端粒酶活性大小。通过这种方法, Kim检测到大多数人类恶性肿瘤细胞(约85%)中存在端粒酶活性,而同一个体的大多数正常组织中没有,这表明端粒酶可以作为恶性肿瘤的标志物之一应用于癌症诊断^[9]。TRAP法由于应用

收稿日期:2003-07-21; 修回日期:2003-11-10

基金项目:陕西师范大学青年基金。

*通讯作者, E-mail: zmqhmm@sina.com

PCR 技术对端粒酶合成的端粒 DNA 进行扩增,大大提高了检测的灵敏度和速度,目前应用较广^[10~13],同时随着该方法的使用,端粒酶及其调控机制的研究有了飞速发展。但 TRAP 方法尚有不足之处:属于定性检测,对活性程度的判定较困难;应用放射性同位素标记有一定的危险性等。

2.3 改良 TRAP 法

2.3.1 TRAP-银染法 由于同位素标记的不安全性,有学者在反应体系中以非同位素标记的 dNTP 替代 α -³²P 标记的 dCTP,把 TRAP 反应产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳之后进行银染显示梯状条带,建立 TRAP-银染法。该方法在保留了上述 TRAP 法灵敏度高、特异性强等优点的基础上,缩短了检测所需时间,避免了同位素的放射污染,同时重复性较好,已在临床上癌症诊断方面得到广泛应用^[14-16]。

2.3.2 TRAP-溴化乙锭(EB)法 Saleh 等使用 EB 染色简化并改进了传统的 TRAP 法。也是以非放射性元素进行标记,反应产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳之后经 EB 染色后在紫外灯下照相,同样显示梯状条带。结果表明,对于粗抽提物而言,EB 染色具有足够的可信度和灵敏度,同时又经济省时,便于在临床上推广使用^[17]。

2.3.3 TRAP-杂交保护(HPA)法 Hirose 等建立了 TRAP-杂交保护(hybridization protection assay, HPA)法^[18],以克服 TRAP 方法中进行凝胶电泳需要时间较长的问题。其基本原理是利用吡啶酯标记的化学发光球体探针,一个球体分子仅与一个端粒酶反应产物分子杂交,所以化学发光强度直接与产物分子的数量相对应,这一点对端粒酶活性定量分析是必须的。对此法的进一步改良将针对提高定量的准确性,包括解决组织抑制剂问题和改进检测中的判断标准等。该方法目前为一种快速、灵敏、半量化并可进行大量肿瘤样品临床诊断的检测方法^[19,20]。

2.3.4 TRAP-闪烁接近(SPA)法 由于电泳操作过程较繁琐,Savoysky 等将 TRAP 法与闪烁邻近分析(scintillation proximity assay, SPA)结合建立 TRAP-SPA 法^[21]。其基本原理是将 CX 引物 5' 端用生物素标记,在存在 ³H-dTTP 的条件下进行 PCR 扩增,然后反应产物与链霉抗生素蛋白包被的荧光液态球相混合,激发含有 ³H 的核酸液闪并产生信号,再由液闪计数器计数^[22]。张黎明等用此方法检测乳腺癌和肝癌等组织样品的端粒酶活性,显示与 TRAP-银染法所测

结果一致^[23]。

2.3.5 TRAP-酶联免疫吸附测定(ELISA)法 1996 年德国 Boehringer Mannheim 公司研制出了 TRAP-ELISA 试剂盒,之后这种方法被广泛应用于端粒酶活性分析^[24,25]。其原理是利用 TRAP 法处理细胞或组织,并对端粒酶反应产物进行 PCR 扩增,引物 TS 用生物素标记,扩增产物与地高辛标记的探针杂交,并与包被有亲和素的微孔板结合,再用酶标记的抗地高辛抗体检测并显色,酶标仪测定结果。Wu 等比较了分别基于电泳和 ELISA 的 TRAP 法用于半定量检测端粒酶活性的精确程度,发现 ELISA 法比前者更不易受到其他因素的影响,并认为将电泳和 ELISA 法结合起来检测端粒酶活性具有更好的优越性^[26]。

2.4 间接检测法

上述方法都是直接检测端粒酶活性,鉴于现普遍认为端粒酶催化亚基 TERT 的表达与端粒酶活性水平成正相关,因此可通过检测 TERT 的 mRNA 或蛋白表达来间接检测端粒酶活性。

2.4.1 原位杂交(in situ hybridization,ISH)法 人们通过标记探针与 TERT mRNA 作原位杂交来检测后者的原位表达,间接检测端粒酶活性。Saretzki 等应用荧光原位杂交等方法在 20 例肺癌细胞系中也发现 hTERT mRNA 表达与端粒酶活性之间有强相关性^[6]。范松青等利用此法检测人恶性黑素瘤中的 hTERT mRNA,发现恶性黑素瘤不但有 hTERT mRNA 高表达,而且其表达在转移性恶性黑素瘤中较原发性恶性黑素瘤有增加趋势,提示 hTERT mRNA 可间接反映恶性黑素瘤中的端粒酶活性^[27]。但 Kamradt 等应用此方法检测人前列腺癌中 hTERT mRNA 的表达,同时应用 TRAP-ELISA 法检测其端粒酶活性,发现二者表达水平并不一致^[25]。

2.4.2 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法 其原理是首先提取组织或细胞中的总 RNA,然后在 TERT 基因引物参与和逆转录酶的催化下进行逆转录反应,合成的 cDNA 作为模板再进行 PCR 反应,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并对结果进行凝胶图像分析。Wisman 等在人卵巢癌中利用此方法检测了 hTERT 的 mRNA 表达,并用 TRAP 法检测端粒酶活性,结果同样证实二者均存在于恶性肿瘤中并且表达模式相同^[10]。近几年许多研究应用此方法半定量检测 TERT mRNA 的表达与否和相对表达量的多少,从而间接表示端粒酶活性^[7,11,16,28]。

2.4.3 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)方法 其原理是制备抗 TERT 部分多肽的抗体,利用抗原与抗体结合的特异性来原位检测组织或细胞中 TERT 的表达,同时借助组织化学方法显示抗原抗体的反应部位,间接推测端粒酶活性。大多数科学家认为免疫组织化学的检测方法与 TRAP 法基本符合^[24,29-31]。但 Tahara 等应用此方法发现,人结肠癌组织中 hTERT 的蛋白表达并不总是伴随着端粒酶活性的升高^[32]。

3 结语

TRAP 法及其各种改良方法可直接检测端粒酶活性,比较灵敏、迅速且重复性好,目前在肿瘤诊断方面应用最广。原位杂交、逆转录-聚合酶链反应和免疫组化方法均属间接检测法,虽然目前普遍认为 TERT 的 mRNA 或蛋白表达和端粒酶活性之间具有相关性,但这些间接检测法的准确性仍有待进一步研究。同时以上方法都不能完全定量地检测细胞中端粒酶活性,目前学者已纷纷致力于这方面的研究,这无疑将会成为端粒酶活性检测方法及其相关研究的一次巨大飞跃。

人类恶性肿瘤细胞中普遍存在着较高的端粒酶活性,其已被广泛认为是恶性肿瘤诊断和治疗的相关靶点^[33]。因此,进一步深入研究端粒酶激活与调控机制,有助于阐明肿瘤发生、发展的机制,也为利用端粒酶进行临床早期诊断和治疗提供理论依据,而端粒酶活性检测方法的不断改进和发展必将有力地推动这些领域的研究。

参 考 文 献

- [1] HIYAMA E, HIYAMA K. Clinical utility of telomerase in cancer[J]. *Oncogene*, 2001, **21**: 643 - 649.
- [2] COLLINS K, MITCHELL J R. Telomerase in the human organism[J]. *Oncogene*, 2002, **21**: 564 - 579.
- [3] TAKAKURA M, KYO S, KANAYA T, *et al.* Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer[J]. *Cancer Res*, 1998, **58**(7): 1158 - 1161.
- [4] KANAYA T, KYO S, TAKAKURA M, *et al.* hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 1998, **78**(5): 539 - 543.
- [5] TAKAHASHI S, KITAMOTO M, TAKAISHI H, *et al.* Expression of telomerase component genes in hepatocellular carcinomas[J]. *Eur J Cancer*, 2000, **36**(4): 496 - 502.
- [6] SARETZKI G, PETERSEN S, PETERSEN I, *et al.* hTERT gene dosage correlates with telomerase activity in human lung cancer cell lines[J]. *Cancer Letters*, 2002, **176**: 81 - 91.
- [7] CHEN W W, XIONG X X, ZHOU H Y, *et al.* Expression of telomerase activity, telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in lung cancer[J]. *Chin Med J*, 2002, **115**(2): 290 - 292.
- [8] GREIDER C W, BLACKBURN E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts[J]. *Cell*, 1985, **43**: 405 - 413.
- [9] KIM N W, PIATYSZEK M A, PROWSE K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, **266**: 2011 - 2015.
- [10] WISMAN G B, HOLLEMA H, HELDER M N, *et al.* Telomerase in relation to expression of p53, c-Myc and estrogen receptor in ovarian tumours[J]. *Int J Oncol*, 2003, **23**(5): 1451 - 1459.
- [11] SHENG W Y, CHIEN Y L, WANG Tzu-Chien V. The dual role of protein kinase C in the regulation of telomerase activity in human lymphocytes[J]. *FEBS Letters*, 2003, **540**: 91 - 95.
- [12] ACHI M V, RAVINDRANATH N, DYM M. Telomere Length in Male Germ Cells Is Inversely Correlated with Telomerase Activity[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, **63**: 591 - 598.
- [13] XU J, YANG X. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, 2001, **64**(3): 770 - 774.
- [14] WEN J M, SUN L B, ZHANG M, *et al.* A non-isotopic method for the detection of telomerase activity in tumour tissues: TRAP-silver staining assay[J]. *Mol Pathol*, 1998, **51**(2): 110 - 112.
- [15] 虞伟, 谈华, 武建国等. 端粒重复序列扩增-银染色法用于端粒酶活性测定的研究[J]. *医学研究生学报*, 2000, **13**(2): 96 - 98.
- [16] 刘敏, 纪新强, 罗兵等. 上皮性卵巢肿瘤端粒酶活性及其各亚单位基因表达的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2003, **30**(7): 461 - 465.
- [17] SALEH S A, SUN J L, XIE K C, *et al.* Detection of telomerase activity by Ethidium Bromide[J]. *Journal of Fudan University(Natural Science)*, 1999, **38**(5): 568 - 571.
- [18] HIROSE M, ABE-HASHIMOTO J, OGURA K, *et al.* A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, **123**: 337 - 344.
- [19] TAKAISHI H, KITAMOTO M, TAKAHASHI S, *et al.* Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay [J]. *Cancer*, 2000, **88**(2): 312 - 317.
- [20] WEGE H, CHUI M S, LE H T, *et al.* SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(2): e3.
- [21] SAYOYSKY E, AKAMATSU K, TSUCHIYA M, *et al.* Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(6): 1175 - 1176.
- [22] KAZMER S, PAN K M, VASSILEV L V. Quantification of telomerase activity by direct scintillation counting[J]. *J*

- Biochem Biophys Methods*, 1999, **40**: 113 – 117.
- [23] 张黎明, 印木泉, 贺 茜等. 端粒酶活性检测方法研究[J]. 第二军医大学学报, 2002, **23**(1): 102 – 103.
- [24] 赵瑞皎, 李锦军, 苏 兵等. 卵巢良性和恶性上皮性肿瘤中端粒酶蛋白表达及活性的研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2002, **11**(2): 161 – 166.
- [25] KAMRADT J, DROSSE C, KALKBRENNER S, *et al.* Telomerase activity and telomerase subunit gene expression levels are not related in prostate cancer: a real-time quantification and in situ hybridization study[J]. *Lab Invest*, 2003, **83**(5): 623 – 633.
- [26] WU Y Y, HRUSZKEWYCZ A M, DELGADO R M, *et al.* Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2000, **293**: 199 – 212.
- [27] 范松青, 魏启幼. 原位杂交法检测恶性黑色素瘤中人类端粒酶RNA及人类端粒酶催化亚基单位mRNA的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2001, **34**(4): 292.
- [28] SAGAWA Y, NISHI H, ISAKA K, *et al.* The correlation of TERT expression with c-myc expression in cervical cancer [J]. *Cancer Letters*, 2001, **168**: 45 – 50.
- [29] POREMBA C, HEINE B, DIALLO R, *et al.* Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR[J]. *J Pathol*, 2002, **198**(2): 181 – 189.
- [30] POREMBA C, SCHEEL C, HERO B, *et al.* Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh-frozen and paraffin-embedded tissues[J]. *J Clin Oncol*, 2000, **18**(13): 2582 – 2592.
- [31] 吴名耀, 吴贤英, 庄楚香. hTERT和C-myc的表达在食管上皮增生和癌变过程中的意义[J]. 癌变·畸变·突变, 2003, **15**(1): 17 – 20.
- [32] TAHARA H, YASUI W, TAHARA E, *et al.* Immunohistochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and non-tumor tissue sections[J]. *Oncogene*, 1999, **18**(8): 1561 – 1567.
- [33] BLASCO M A. Telomeres and cancer: a tale with many endings[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2003, **13**: 70 – 76.

Detection Methods for Telomerase Activity

ZHANG Min*, XI Geng Si, ZHOU Yan Ni

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: At present, there are many methods to detect telomerase activity, as follows: i, The basic method. ii, Telomeric repeat amplication protocol(TRAP). iii, Advanced TRAP. iv, Indirect detection method. Continuous development of the detection method for telomerase activity will provide a new channel for cancer diagnosis and treatment.

Key words: telomerase; cancer; activity detection

This work was supported by the Young Research Foundation of ShanXi Normal University.

*Corresponding author, E-mail: zmqhmm@126.com