

端粒位置效应与人类衰老

巩 艳 房殿春*

(第三军医大学西南医院消化科, 重庆 400038)

摘要 端粒随细胞分裂进行性缩短不但防止了人类肿瘤的发展, 而且与人类的衰老密切相关。另外, 端粒中存在一种特殊的现象: 端粒位置效应, 它首先在酵母中发现, 表现为靠近端粒序列附近的基因表达因端粒的位置效应而沉默。在人类细胞中也存在端粒位置效应, 并且有多种因子参与此效应, 它可能对细胞生长停止、肿瘤以及衰老发生时等许多随端粒缩短密切相关基因的程序性表达产生重要作用。

关键词 端粒; 端粒位置效应; 衰老

1 人类端粒 DNA 序列

端粒是真核细胞染色体末端的特殊结构。作为一种重要的遗传元件, 它参与维持线性染色体的完整性、阻止不同染色体之间发生作用。与某些真核生物的染色体末端一样, 人类端粒序列包括两个结构功能区, 其一个为端粒重复双螺旋 DNA, 含有大量串联的高重复 TTAGGG 短序列; 另一个则为端粒末端序列, 是富含 T、G 碱基的 DNA 链(又被称为 G 链)延伸到双螺旋 DNA 片段以外形成的端粒 3' 端的悬突。除了双链 DNA 和悬突区域以外, 直接与端粒重复序列相连的序列构成了第 3 个结构区域, 称为亚端粒^[1], 它的结构是可变的, 染色体在这一区域含有重复序列并具有多态性, 在体细胞内出现很大程度上的甲基化现象。另外, 在染色体内部也存在端粒重复序列^[2], 它们是染色体断裂和重组的研究热点。

2 端粒位置效应在衰老酵母细胞中的发现

1961 年, Hayflick 等^[3]首次提出细胞衰老的概念。体外培养的人类细胞进行有限分裂, 当细胞群中的大部分细胞经历了一定次数的分裂以后, 就不再对各种正常的生长刺激做出反应, 而是停止分裂, 细胞并没有死亡, 依然保持代谢活性, 只是在基因表达方式上可能有一定的改变。现代生物学普遍认为细胞衰老是生物体内的正常现象, 也是抵御细胞恶性转化的屏障。在这个过程中, 端粒 DNA 随细胞衰老进行性丢失, 成为计数细胞分裂能力的有丝分裂时钟。

在人类细胞分裂过程中, 端粒长度进行性缩短, 细胞生理发生程序性改变, 最终进入衰老的第一阶段(M_1 期), 引起细胞以下表现: 基因表达的

改变; DNA 的甲基化; 细胞生长的适应性降低; 对生长刺激的低反应性, 当有病毒癌蛋白和反义寡核苷酸作用时, 生物体内 P53 和 Rb 信号途径被抑制, 端粒失能, 导致基因不稳定, 细胞跨过 M_1 期进入衰老的第二阶段, 即 M_2 期或危机期^[4]。

存在这样一种现象: 靠近端粒序列附近的基因表达因端粒的存在而沉默, 这就是端粒位置效应(telomere position effect, TPE)。在芽殖酿酒酵母中的具体表现为: 当标记基因插入染色体末端(距离端粒重复序列小于 4 kb)时, 标记基因的表达被抑制, 酵母细胞 S 期复制延迟。端粒沉默效应的发生受到培养环境、基因表达改变和端粒长度的影响。另外, 特异端粒蛋白的胞外水平也是端粒沉默效应发生的限定因素。Wright 等^[5]提出预衰老细胞或衰老细胞的进行性变化是由端粒染色质重排所伴发的亚端粒基因失去沉默引起的。正常细胞随着每次细胞分裂, 端粒会丢失 50~100 个核苷酸, 当它进行性缩短到一个关键长度时, 端粒的沉默蛋白释放, 亚端粒基因表达, 影响染色体内部位点基因的表达。既然特异端粒蛋白从端粒释放到其他位点时, 提高了该位点沉默性, 那么人类端粒缩短后, 能够以顺式或反式方式进行性影响许多基因的表达情况^[6,7], 但是一直缺少人类 TPE 的较好证据。有的研究报告端粒附近序列在人类细胞复制延迟, 并在端粒附近检测到较弱的沉默效应; 然而, 另外一些研究结果表明人类端粒并未对它附近基因有沉默效应。

3 人类细胞中的 TPE

收稿日期: 2003-09-01 接受日期: 2004-03-18

国家自然科学基金资助项目(No.30270609)

*通讯作者。Tel/Fax: 023-68754124, E-mail: fangdianchun@hotmail.com

Baur 等^[8]证实了人类端粒位置效应的存在,即:人类端粒附近基因发生转录沉默,与酵母的 TPE 类似。构建荧光素酶报告序列置于端粒重复序列附近的质粒,然后将它与不含端粒重复序列的荧光素酶报告质粒在同样条件下瞬时转染人类 HeLa 细胞,筛选到的阳性克隆中前者荧光素酶的表达水平仅是后者的 1/10,并且这种效应并非是混合克隆或报告基因突变的结果。当人端粒酶逆转录酶活性单元在转染后筛选到的端粒阳性克隆过表达,端粒长度从 5 kb 延长到 14 kb 后,荧光素酶表达水平降低到原来的 1/2 到 1/10 不等,推测 TPE 与端粒的长度有关。Koering 等^[9]进一步研究了人类细胞端粒位置效应和端粒组分对报告基因 EGFP 表达的影响时发现,瞬时转染实验中,端粒 DNA 非但没有抑制 EGFP,反而稍稍升高了它的表达水平;在稳定转染的细胞系中,端粒 DNA 可抑制 EGFP 的表达,并且也没有发现端粒长度的变化和 EGFP 表达水平之间存在联系。为进一步探讨细胞内正常存在的端粒基因的表达是否受到端粒长度的影响,联合使用定量 RT-PCR 和定量荧光原位杂交对比分析 34 个端粒基因在年轻和衰老人类纤维母细胞的表达及与它们相对应的 24 条染色体末端的端粒长度变化情况,结果显示仅端粒长度不足以决定细胞内正常存在的端粒基因的表达特征。现在认为,在端粒缩短中,基因表达的改变呈现不连续模式,它们的许多变化是衰老细胞特异的,与细胞分裂相关,细胞内正常存在的端粒基因的表达受到端粒局部异染色质改变的影响^[10]。

已知组氨酸去乙酰化酶在维持异染色质结构和调节基因表达中发挥重要作用。高效特异的 I 类、II 类组氨酸去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)处理转染有端粒片段的阳性克隆,去除异染色质结构维持的稳定因素,荧光素酶表达水平比未经处理的克隆升高 20 倍,说明人类 TPE 的发生过程可能与端粒附近异染色质结构有关。而 Koering 等^[9]在实验中发现,一次性 TSA 处理细胞,端粒附近基因发生去沉默,细胞的异染色质结构以不同形式被打断;当延长 TSA 处理细胞的时间或多次持续处

理细胞时,异染色质结构却不再发生改变。FISH 结果显示异染色质蛋白 I(heterochromatin protein 1, HP1)在 3 种哺乳动物中的异构体 HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ 中的 HP1 α 和 HP1 β 的存在位置发生变化。正常情况下,HP1 α 和 HP1 β 以 TSA 敏感的方式结合异染色质,位于着丝粒异染色质区,现在在染色体末端端粒处检测到这两种蛋白质。一种解释是:在细胞异染色质的任一区域存在端粒位置效应,端粒本身又能够以 TSA 敏感的方式募集一种或几种沉默效应的抑制因子,对抗端粒位置效应,HP1 可能是其中的因子之一。

另外,出于实验设计的原因,如报告基因距离端粒过远,或是启动子对 TPE 有抵抗作用,或是与细胞自身的生物学特性有关,在许多端粒功能研究中并未发现它的 TPE。有一些细胞通过端粒替代延长机制(alternative lengthening of telomeres, ALT)维持端粒的长度,形成异常端粒,是否与正常端粒邻近的基因发生作用仍不清楚。在大多数永生细胞系和 5% 肿瘤细胞中都有 ALT^[11],这些细胞的 TPE 值得进一步研究。

比较酵母和人类端粒相关蛋白,认为其中许多蛋白质可能参与人类 TPE 的发生。芽殖酿酒酵母的 TPE 受不同的端粒相关蛋白直接调节,包括:Rap1p、Ku 的异二聚体(Hdf1p/2p)、Rif2p 和 Sir2/3/4p 复合物,另外受到许多其他蛋白质的间接影响。这其中最关键的调节因子是 Sir2 蛋白(NAD⁺ 依赖的 III 型组氨酸去乙酰化酶)^[13],在人类有 7 种同源物,功能尚不清楚。那么这些蛋白质,尤其是与 Sir2p 最相近的人类同源物 SIRT1 是否为人类 TPE 所必需,将成为探讨的焦点(表 1)。TPE 对尼克酰胺(类似 Sir2p 样去乙酰化酶的竞争性抑制剂)的反应为研究提供了初始线索。即使 Sir2p 样蛋白确实拮抗组氨酸去乙酰化酶抑制剂,如 TSA,它们也可能是与此有关的去乙酰化酶家族成员之一。例如,正常情况下,HDAC2 蛋白(I 型组氨酸去乙酰化酶)常以两种形式存在,但有时仅表现出一种形式。可能是 HDAC2 辅助介导正常细胞的 TPE;细胞衰老时,

表 1 参与端粒位置效应的蛋白质^[12]

酿酒酵母端粒蛋白	裂殖酵母类似物	人类类似物	在酿酒酵母 TEP 中的作用
Yku70/yku80p	Pku70/Spbc543.03c	KU70/KU80	必需
Rap1p	Rap1p	RAP1	必需
Sir2p	Spbc16d10.07c, Spcc132.02	SIRT1-7	必需
Sir3p, Sir4p	Unknown	Unknown	必需
HistonesH3,H4	HistonesH3,H4	HistonesH3,H4	必需
Rif1p, Rif2p	未知	未知	抑制
Mre11p/Rad50p/Xrs2p	Rad32p/Rad50p	MRE11/RAD50/NBS1	非必需
Cdc13p, Stn1p	Pot1p	POT1b	非必需
Tel2p	Spac458.03(?)	未知	抑制
Tbf1p(?)	Taz1p	TRF1, TRF2(端粒结合蛋白)	

由于端粒蛋白的协同作用，HDAC2只有一种形式被诱导，试图维持端粒的正常结构。

4 TPE与细胞衰老

细胞衰老M₁期是一系列DNA损伤的结果。细胞端粒缩短，TPE的改变与M₁期的关系仍不清楚。实验发现：与其他染色体末端端粒序列相比，位于含有细胞衰老相关基因和它的调控基因的染色体末端的端粒序列更倾向于随细胞分裂进行性缩短，并且是最短的端粒序列，而不是具有平均长度的端粒序列导致细胞衰老^[14]。这样的话，端粒片段随细胞有丝分裂逐渐缩短，TPE丢失，可以对许多基因表达的程序性变化做出反应，那么端粒的进行性缩短就参与了细胞衰老过程。通过鉴定因端粒缩减、表达受到影响的基因，观察培养细胞或组织衰老过程中这些基因的变化，可以间接确定TPE与细胞衰老的关系。另外，细胞永生化的重要特征之一是细胞存在组氨酸去乙酰化和DNA甲基化的协同作用，介导抑癌基因转录沉默。以上实验已证实组氨酸去乙酰化参与人类TPE，那么，TPE的改变影响了细胞的永生化的。

5 TPE与人类衰老

越来越多的事实支持这样一个假说：器官衰老至少部分是异染色质分配进行性改变的结果。酿酒酵母的衰老与Sir蛋白复合物从端粒到核糖体DNA位点的重分配及伴随的TPE丢失有关^[15]，SIR2基因的额外复制能够延迟酵母的衰老。哺乳动物DNA微阵列发现，衰老与多种基因的表达改变有关。在β-球蛋白/LacZ转基因鼠衰老过程中，β-球蛋白/LacZ

基因进行性沉默，不再发生球蛋白转换，端粒的衰减是否类似于此种沉默效应值得研究。对于酵母和人类而言，端粒越长，亚端粒基因越容易沉默。假设TPE在衰老相关基因表达中发挥重要作用的话，那么端粒附近的基因在老年个体细胞中是高水平表达的。另外，端粒附近基因可能不是唯一的受年龄依赖TPE的改变所影响的。在酵母中，较长的端粒内部序列抑制年龄依赖性的对端粒起作用的沉默蛋白的转录动物中^[16]，端粒序列插入染色体内部可导致基因不稳^[17]。如果哺乳动物的确存在端粒TPE的话，当端粒随人类衰老而逐渐缩短，内部端粒DNA片段与染色体末端端粒有效竞争端粒沉默蛋白，内部端粒DNA序列附近的基因在衰老细胞表达水平下降。随着研究的深入和对人类端粒位置效应的进一步认识，人类必将揭示衰老的秘密。

参考文献 (References)

- [1] de Lange T *et al.* *Mol Cell Biol*, 1990, **10**: 518
- [2] Park VM *et al.* *Am J Hum Genet*, 1992, **50**: 914
- [3] Hayflick L *et al.* *Exp Cell Res*, 1961, **25**: 585
- [4] Shay JW *et al.* *Radiat Res*, 2001, **155**: 188
- [5] Wright WE *et al.* *Trends Genet*, 1992, **8**: 193
- [6] Tham WH *et al.* *Oncogene*, 2002, **21**: 512
- [7] Mason JM *et al.* *Genetics*, 2003, **163**: 917
- [8] Baur JA *et al.* *Science*, 2001, **292**: 2075
- [9] Koering CE *et al.* *EMBO Rep*, 2002, **3**: 1055
- [10] Ning Y *et al.* *Hum Mol Genet*, 2003, **12**: 1329
- [11] Bryan TM *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 1271
- [11] Tissenbaum HA *et al.* *Nature*, 2001, **410**: 227
- [12] Wood JG *et al.* *Trends Pharmacol Sci*, 2002, **23**: 1
- [13] Hemann MT *et al.* *Cell*, 2001, **107**: 67
- [14] Steinert S *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273**: 1095
- [15] Sinclair D *et al.* *Annu Rev Microbiol*, 1998, **52**: 533
- [16] Mason JM *et al.* *Genetica*, 2003, **117**: 319
- [17] Kilburn AE *et al.* *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 126

Telomere Position Effect and Human Senescence

Yan Gong, Dian-Chun Fang*

(Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract As cells divide, telomeres get shorter and shorter. Telomeric sequences' shortening limits cancer progression and contributes to aging in humans. In addition, telomeres have special phenomena: the expression of genes near telomeres are silenced by telomere position effect (TPE) originally found in yeast. Recently, it has been demonstrated in human cells and found that many factors are involved. TPE may play an important role in programmed gene expression by telomere shortening with implications for cellular senescence and cancer.

Key words telomere; telomere position effect; senescence

Received: September 1, 2003 Accepted: March 18, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270609)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-23-68754124, E-mail: fangdianchun@hotmail.com