

- 3725—3736.
- [4] Bazen F. J. 1990, *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**:6934—6938.
- [5] Vigon I. et al. , 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**:5640—5644.
- [6] Souyri M. et al. , 1990, *Cell*, **63**: 1137 — 1147.
- [7] Benit L. et al. , 1993, *Oncogene*, **8**: 787 — 790.
- [8] Benit L. et al. , 1994, *J. Virol.* , **68**(8): 5270 — 5274.
- [9] Courtois G. et al. , 1995, *J. Virol.* , **69**(5): 2794—2800.
- [10] Mignotte V. et al. , 1994, *Genomics*, **20**: 5—12.
- [11] Methia N. et al. , 1993, *Blood*, **82**(5): 1395 — 1401.
- [12] Debeli N. et al. , *Blod*, **85**(2): 391—401.
- [13] Columbyova L. et al. , 1995, *Cancer Res.* , **55**: 3509—3512.
- [14] Vigon I. et al. , 1993, *Blood*, **82**(3): 877 — 883.
- [15] Matsumura I. et al. , 1995, *Blood*, **86**(2): 703—709.
- [16] Sauvage F. J. et al. , 1994, *Nature*, **369**: 533 — 538.
- [17] Lok S. et al. , 1994, *Nature*, **369**: 565—568.
- [18] Bartley T. D. et al. , 1994, *Cell*, **77**: 1117 — 1124.
- [19] Foster D. C. et al. , 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 13023—13027.
- [20] Gurney A. L. et al. , 1994, *Science*, **265**: 1445 — 1447.
- [21] Drachman J. G. et al. , 1995, *J. Biol. Chem.* , **270**(10): 4979—4982.
- [22] Sattler M. et al. , 1995, *Exp. Hematol.* , **23**: 1040—1048.
- [23] Sasaki K. et al. , 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **216**(1): 338—347.
- [24] Morella K. K. et al. , 1995, *Blood*, **86**(2): 557—571.
- [25] Gurney A. L. et al. , 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5292—5296.

端粒、端粒酶与癌症关系研究的进展

杨红玉

(云南教育学院环境资源分院生物系 昆明 650031)

Muller 早于 1938 年便发现了端粒 (Telomere)^[1]。1978 年 Blackburn 发现四膜虫染色体端粒为含有 (CCCAA, TTGGGG)_n 重复的一段 DNA, 但是其功能尚不清楚^[2]。1986 年端粒酶 (Telomerase) 的发现, 在解决真核生物 DNA 复制难题的同时, 也逐渐揭示了端粒的功能^[3]。端粒除保证 DNA 完整复制外, 在维持染色体结构稳定 (保护染色体不分解和染色体重排及末端不相互融合等)、染色体在细胞中的定位 (使之不随机分布)^[4] 和引起细胞衰老等方面起着重要作用。端粒酶是一种 RNA—蛋白复合物。在对四膜虫端粒酶 RNA 的组分研究中, 发现其中含有一段顺序与端粒的 DNA 互补。这便是端粒酶的活性位点。它起着合成端粒的模板作用^[5]。1995 年 Brayant 小组克隆了人的端粒酶的 RNA 组分, 发现人的端粒酶

RNA 模板区包括 11 个核苷酸 (5'GUAACC—CUAAC), 与人的端粒酶顺序 (TTAGGG)_n 互补^[6]。

有关研究充分表明, 端粒、端粒酶与细胞寿命直接相关。现进一步发现端粒酶的激活与表达程度与肿瘤的发生和转移具有十分密切的关系, 从而使该研究成为分子生物学、基础医学等多个学科共同关注的热点。

端粒长度、端粒酶与细胞增殖能力的关系

端粒酶在人的体细胞中是不表达的, 因此端粒随着细胞的每次分裂而缩短, 结果导致细胞的衰老。Harley 用人的端粒重复片断 (TTAGGG)₃ 作探针分别对胎儿、新生儿以及青年和老年的细胞株的端粒长度进行了比较,

发现随着年龄的增长,人的成纤维细胞的端粒长度不断下降^[7]。但是在转化的细胞中,端粒长度不变^[8]。在对体外培养的人成纤维细胞端粒长度所作的测定中,也发现随着成纤维细胞的不断分裂,端粒长度下降^[9]。相反,精子中的端粒长度与受试者的年龄无关。这是因为精子中有端粒酶的表达,使端粒保持固定长度的缘故。所以端粒的长度被认为是人体细胞寿命的生物标记^[10]。1996年Wright所做的用正常无端粒酶的细胞与有端粒酶表达的永生细胞进行杂交试验,结果后代便显示出有限的寿命,而且证明了杂种细胞显示有限寿命是由于端粒酶的活性被抑制。用寡核苷酸处理细胞后会导致细胞端粒加长。将这种细胞与正常细胞杂交,该杂种细胞的寿命比用未加长端粒的正常细胞杂交的寿命要长。这些观察给上述的端粒长度决定人细胞的分裂能力的学说提供了第一个直接证据^[11]。

端粒维持染色体的稳定,而癌细胞则常显示染色体的不稳定,如常呈现环形染色体、端粒联合、双着丝粒染色体等;端粒长度与细胞寿命相关,而癌细胞又具有无限制分裂,即永生性特点。这些均提示癌细胞的发生与端粒及端粒酶状况存在着相关性。1992年Harley观察到当人体培养细胞被致肿瘤病毒转化后,生长失控,但其中只有显示端粒酶活性的细胞才演变成永生细胞^[12]。

此后科学家们在测定各种癌细胞和正常细胞中端粒长度和端粒酶活性方面做了大量工作。尤其是Kim在1994年提出的端粒重复片断扩增法(TRAP),使端粒酶活性测定的灵敏度增加了10万倍^[13]。Bednarek小组用TRAP法研究了鼠皮肤乳头瘤发生发展过程中端粒酶活性的变化。他们观察到在头10周的起始阶段,所分析的11例中只有1例显示高水平的端粒酶活性,显示更高水平的端粒酶活性的标本数目在20周有增加,到30周时数目激增,所有标本都显示出了高水平的端粒酶活性。早期乳头瘤的染色体为二倍体,而晚期的乳头瘤染色

体则为非整倍体并且发育异常。据此研究者认为端粒酶活性水平的逐渐增加与染色体的不稳定和恶性肿瘤表型恶化的水平增加密切相关^[14]。日本科学家曾测定了66个原发性胃癌样品的端粒酶活性。其中85%的有酶活性,15%的没有活性。没有酶活性者中有8个是早期肿瘤病人,而大多数具有端粒酶活性的肿瘤(包括转移性的),不仅较大而且大都是晚期。检测到端粒酶活性的肿瘤患者的存活期明显地短于那些没有检测到活性者。66个标本中有14个(22%)可测到端粒长度的改变,并且均有端粒酶活性。另外其中有22例为非整倍染色体肿瘤,它们也都可以测到端粒酶活性。因此他们认为端粒酶激活可能是肿瘤形成过程中的一个关键步骤^[15]。

Tahara等人还观察了人肝组织中端粒酶的活性,对慢性肝炎和肝癌的端粒酶活性进行了比较。他们检测的33例肝癌患者中有28例具有端粒酶活性。肝肿瘤小于3cm的18例中有15例测到端粒酶活性。8例乙型肝炎病毒阳性的肝癌都有端粒酶活性。而正常的肝组织中则没有端粒酶活性。但是38例肝炎患者中的19例和另外8例肝硬化的肝组织中,也测到了很弱的端粒酶活性。Tahara认为端粒酶的表达可能在肝癌的形成中起重要作用^[16]。Kitada也发现慢性肝炎或肝硬化患者的端粒长度明显的短于正常肝细胞的端粒长度,并且有随着慢性肝炎的发展而端粒继续变短的趋势^[17]。

Hiyama用PCR法测定了136个原发肺癌组织(其中11个为小细胞肺癌,125个为非小细胞肺癌)和68个相邻的非癌组织的端粒酶活性。结果是11个原发性小细胞肺癌的切除样本都有高水平的端粒酶活性表达。而其他125个非小细胞肺癌组织的端粒酶活性则分布于从无到高水平的各个层次。从转移性癌组织中则可观察到高水平的端粒酶活性及端粒长度改变。68个邻近癌组织的正常组织中有3个可以测到端粒酶活性,占4.4%。Hiyama认为仅呈现低水平或无端粒酶活性的非小细胞肺癌,可能

会含有原发性的非永生癌细胞,而端粒酶活性呈现高水平的小细胞肺癌,则可能主要由永生细胞组成。端粒酶活性可能在临床上诊断和治疗肺癌中具有意义^[18]。Langford 也发现人的神经胶质瘤患者中,有 75%的可测到端粒酶活性,而 25%的测不到端粒酶活性。他认为脑肿瘤的形成可分成鲜明的亚组,走着不同的发生途径^[19]。Bacchetti 报道了人直肠癌癌恶变与端粒酶活性的相关性,建立了直肠癌癌形成期间端粒酶活性随时间变化的模型^[20]。

其他研究者们在乳腺癌、Wilms 肿瘤、卵巢癌、白血病、结肠癌、肾癌中也都测到了端粒酶活性和端粒变短的现象^[13,21-24]。

关于端粒酶活性与癌发生的分子机制

上述研究证明在许多癌细胞中具有端粒酶活性,但是其端粒又比正常组织的短。如果说端粒酶的主要功能是催化合成端粒,维持端粒长度,那么上述现象显然是相悖的。这是个令人迷惑的问题。是端粒变短不依赖于端粒酶?还是癌细胞中有端粒分解呢?或者,相对于端粒的丧失代表了细胞分裂次数的生物钟这一假设来说,癌细胞是一个例外?为此 Hastie 及同事测定了正常组织、腺瘤组织和癌组织的端粒。发现从正常的组织发展到腺瘤组织,呈现端粒丧失现象,但从腺瘤到癌组织之间,端粒则没有进一步丧失^[25]。Kim 也报道正常的结肠组织、结肠息肉(或结肠腺瘤)中没有端粒酶活性,而所测的所有结肠癌中端粒酶活性均为阳性^[26]。Harley 提出癌是由于多基因碰撞(hits)的结果^[27]。在碰撞中出现细胞分裂和选择,碰撞的性质和数量决定细胞的分裂。癌的产生可能需要细胞多次分裂(80 多次以上),碰撞导致了在没有端粒酶活性的细胞中发生肿瘤(例如腺瘤)。这些突变导致生长失控或者遗传不稳定。由于这些细胞分裂的加快,使这些细胞的端粒比同类细胞的端粒迅速变短。每次细胞分裂的端粒丧失没有变,只是分裂速率变化随细胞分

裂次数越多,端粒丢失的也就越多,直至其临界点。细胞必须重新激活端粒酶以便防止端粒的进一步变短,并有某种方法使染色体稳定。结果便是无限制的永生细胞在端粒较短处逐渐稳定下来。根据这一假设,可以肯定肿瘤组织应该具有比正常组织更短的端粒,但是如果端粒酶被激活,那么肿瘤细胞分裂时应该可以观察到端粒并没有继续变短。

据笔者了解,1995 年末至 1996 年关于端粒酶的研究主要集中在两方面,一是研究端粒酶钝化或激活的机制,二是着手研究端粒酶抑制剂,以开辟癌症治疗新途径。Bryant 用人体端粒反义 RNA 在 HeLa 细胞中转录本表达获得成功,从而使 HeLa 细胞的端粒酶 RNA 被封闭,端粒复制受抑制。这样,端粒随着细胞的分裂而减短,最终导致 HeLa 细胞凋亡^[6]。Xu 提出反式维生素 A(ATRA)和 1,25-二羟维生素 D3 可诱导 HeLa 细胞 HL60 的分化^[28]。Kanazawa 认为双髻鲨核酶(hammerhead ribozyme)可作为人肝细胞癌端粒酶的抑制剂^[29]。Yegorov 发现反转录酶抑制剂迭氮胸苷和 carbovir 可以阻止鼠端粒酶功能^[30]。

还有学者观察了端粒酶活性的调节与 HeLa 细胞分化之间的关系。他们均观察到,人早期幼粒白血病细胞 HL60 分化成单核白细胞和粒性白细胞时,端粒酶活性被大大地抑制^[28,31-32]。端粒酶活性降低是分化过程中的早期事件,而不是结果。另外,Zhu 在观察肿瘤细胞的不同周期与端粒酶活性的关系时发现,端粒酶活性在 HL60 的静止期(用白蛋白剥夺法诱导产生)并未受到影响。在 S 期活性最高。而在停滞于 G2/M 期的细胞中则测不到端粒酶活性。各种各样的细胞周期抑制剂都能导致端粒酶活性的抑制。这些结果将细胞周期的连续进行与端粒酶活性直接联系起来^[33]。Kruk 测定了胚胎 NT2 前体细胞分化成 hNT 神经元前后的端粒长度和端粒酶活性。结果是前体细胞中有端粒酶活性而神经细胞中没有端粒酶活性,而且前体细胞中的端粒长度也比神经细胞

中的长。Kruk 据此认为端粒酶活性丧失和端粒长度变短在神经细胞的分化中起着重要作用^[34]。端粒酶活性的丧失被认为是细胞内具有端粒酶抑制机制。Xu 认为永生性白血病细胞的分化是由于这类细胞象正常人体细胞一样具有端粒酶抑制机制,分化激活了这个机制。因此,寻找端粒酶的生理调节规律并深入研究其抑制机制是很有必要的^[28]。Savoysky 观察到端粒酶的抑制既不是它的 RNA 组分表达的降低,也不是分化过程中端粒酶抑制剂的出现,端粒酶活性的抑制与 P21 和 Rb 的 mRNA 的表达增加有平行关系^[32]。Avilion 测定了肿瘤细胞中端粒酶活化期间近期克隆的端粒酶 RNA 组分(hTR)水平。结果发现在原代细胞和生命期细胞中检测不到近期端粒酶活性,但在危机期和危机后期却检测到了近期端粒酶活性,而端粒酶 RNA 组分即使在没有检测出端粒酶活性的细胞中也以高水平存在。Avilion 还检测分析了 21 例肿瘤标本和 5 例正常组织,结果发现端粒酶 RNA 组分存在于包括正常组织在内的所有标本中。Avilion 认为在肿瘤发生的多阶段中,端粒酶 RNA 和端粒酶活性之间缺乏相关性。因此说端粒酶 RNA 组分不是端粒酶活性的良好标志。也许端粒酶是在几种不同水平上受调节的^[35]。

端粒、端粒酶与肿瘤关系的研究在最近短短几年有长足的进展。美国已将端粒酶抑制列为癌症治疗的新目标^[36]。尽管有很多问题尚有待于进一步研究,但端粒、端粒酶,尤其是端粒酶抑制的研究,无疑将对癌症诊断和治疗方法的革命产生极为重要的影响。

参 考 文 献

- [1] Muller, H. J., 1938, *Collect. Net.*, **13**: 181—198.
- [2] Blackburn, E. H., 1978, *J. Mol. Biol.*, **120**: 33.
- [3] Blackburn, E. H., In *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*, 1986, pp. 155—178, Academic Press Inc.
- [4] 汪国顺等, 1992, *实验生物学报*, **25**: 185—187.
- [5] Greider, C. W. and Blackburn, 1989, *E. H., Nature*, **337**: 331—337.
- [6] Bryant Villeponteau, Junli F. et al., 1995, *Science*, **296**: 1236—1270.
- [7] Harley, C. B. et al., 1990, *Nature*, **345**: 458—461.
- [8] de Lange, T. et al., 1990, *Mol. Cell Biol.*, **10**: 518—522.
- [9] Olovnikov, A. M., 1973, *J. Theo. Biol.*, **41**: 181—190.
- [10] Richard, C. A., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**: 10114—10116.
- [11] Wright W. B. et al., 1996, *BMBO J.*, **15**: 1734—1741.
- [12] Harley, C. B. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**: 31588—31591.
- [13] Kim, N. W. et al., 1994, *Science*, **266**: 2011—2015.
- [14] Bednarek, A. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 4566—4569.
- [15] Hiyama, F. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 3258—3262.
- [16] Tahara, H. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 2734—2736.
- [17] Kitada, T. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**: 33—38.
- [18] Hiyama, K. et al., 1995, *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**: 895—902.
- [19] Langford, L. A. et al., 1995, *Lancet*, **346**: 1267—1268.
- [20] Bacchetti, S. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 2533—2536.
- [21] Greider, C. W. et al., 1989, *Nature*, **337**: 331—337.
- [22] Counter, C. M. et al., 1992, *EMBO J.*, **11**: 1921—1929.
- [23] Counter, C. M. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 2900—2907.
- [24] Ohmura, H. et al., 1995, *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**: 899—904.
- [25] Hastie, N. D. et al., 1990, *Nature*, **346**: 866—868.
- [26] Kim, N. W. et al., 1995, *Science*, **269**: 1533—1538.
- [27] Harley, C. B. et al., 1994, *Cold Spring Harbor Symp Biol.*, **59**: 1—8.
- [28] Xu, D. et al., 1996, *Leukemia*, **10**: 1354—1357.
- [29] Kanazawa, Y. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**: 570—576.
- [30] Yegorov, Y. E. et al., 1996, *FEBS Lett.*, **397**: 187.

- 389: 115—118.
- [31] Bestiny, L. J. et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**: 3796—3802.
- [32] Savovsky, E. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 329—334.
- [33] Zhu, X. et al., 1996, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 6091—6095.
- [34] Kruk, P. A. et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**: 487—492.
- [35] Avilion, A. A., 1996, *Cancer Res.*, **56**: 645—650.
- [36] Inoue, S., 1996, *Gan To Kagaku Ryoho*, **23**: 191—201.

核酸转染技术和阳离子脂质体

王 颢 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室 200031)

目前已有多种能将分子传递进入真核细胞的技术和试剂。它们导入的分子通过同细胞组份的相互作用,可以分别导致基因表达、蛋白质合成、细胞分裂或分裂被抑制、细胞结构和形态的改变、细胞不受控制地繁殖或恶性转化(癌变)。但是迄今为止,没有任何一种方法或试剂自认为是最佳的,因此必须按照实验需要针对不同目标选择合适的转染方法。已有许多种技术都可用来传递 DNA、RNA、寡核苷酸、蛋白质或小分子,但通常介导核酸进入真核细胞有如下两种不同的方法:

转染(Transfection) 使目的基因通过生物化学或生物物理学的方法介导进入真核细胞的过程。一般需要使用一些试剂同含有需要表达的基因的质粒 DNA 混合后,导入靶细胞中表达。

感染(Infection) 靶细胞被一个基因组中包含有克隆化序列的病毒所感染而产生介导的过程。通常感染比转染需要更多的步骤和时间,由于依赖病毒的作用,所以这方面还牵涉到安全性的问题。

当前,在基因治疗领域有效性和安全性日益受到重视,研究高效的、非致免疫的且制备容易的非病毒载体成了当务之急,本文就此着重阐述介导核酸进入真核细胞的转染技术和试剂。

转染技术的发展史

转染技术已有三十几年的历史,DEAE-葡聚糖法是在 60 年代末报道的,而磷酸钙共沉淀法则是在 1973 年提出的。今天,这两种转基因方法仍作为通用的、普及的转染 DNA 的技术继续得到应用。

一些物理学方法如显微注射法(1980 年)、电穿孔法(1982 年)、基因枪技术(1990 年)、喷气注射法(1995 年)和脉冲电场(1996 年)等,均能成功地介导核酸进入真核细胞。这些方法有较高的转染效率,但并不是对所有的细胞都有效,而且对细胞有较高的毒性,操作上需要有专门的精密仪器。

到了 80 年代中期,虽然能成功地进行转染的细胞株已显著增加,但高表达的重复性仍很差,还有一些难转染的细胞株。产率较低且重复性并不理想的磷酸钙法仍被广泛地应用。

1987 年,美国生命技术公司推出一种商品化的阳离子脂质体转染试剂——Lipofectin Reagent^[1]。它被证明能显著改进转染效率,在用于多种真核细胞时有瞬时转染和用量少的特点。1990 年,简单运用 LipofectACE Reagent 使一个 T₇/牛痘病毒系统在胞浆中大量表达^[2]。1992 年,制成的 SA 阳离子脂质体被证明