

◇ 综 述 ◇

人端粒酶逆转录酶基因的表观遗传学调控

吴小琴^{1,2}综述 李俊^{1,2}审校

摘要 人端粒酶逆转录酶(hTERT)是控制端粒酶活性的限制性成分。hTERT的表达受多种因素的调控,其中表观遗传学可通过DNA甲基化、组蛋白修饰及非编码RNA调控hTERT基因的表达。有关hTERT基因表达的表观遗传学研究近几年取得了较大进展。hTERT基因启动子区甲基化的状态、位点、作用及其临床意义、非编码RNA对hTERT基因的表达调控等已成为研究的热点。本文就表观遗传学对hTERT基因表达的调控作一综述。

关键词 端粒酶;人端粒酶逆转录酶;表观遗传学;DNA甲基化;组蛋白修饰;非编码RNA

中图分类号 R 349.64

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0554-04

端粒是真核细胞染色体末端的特殊结构,可维持染色体的完整性和结构稳定性等^[1]。在正常细胞分裂过程中由于末端复制问题,端粒逐渐缩短,最终导致细胞衰老、死亡,而大多数肿瘤细胞则能通过端粒酶添加端粒重复序列TTAGGG至DNA末端,阻止端粒随着细胞分裂而缩短,从而使细胞具有无限增殖的能力^[2]。因此,端粒酶的活化是恶性肿瘤的普遍现象,在恶性肿瘤中其活性检出率为85%~95%^[3]。人的端粒酶主要由端粒酶RNA(human telomerase RNA, hTR)、端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和端粒相关蛋白(human telomerase-associated protein 1, hTP1)构成。端粒酶依靠自身RNA模板,在hTERT催化下与hTP1作用合成端粒DNA。其中,hTERT的表达程度与端粒酶的活性密切相关,hTERT在单个体细胞内的转录水平为1~5拷贝,而在肿瘤细胞中基因拷贝数增加^[4]。因此对hTERT表达的调控成为端粒酶研究的热点。关于hTERT的调控有很多因素,

比如各种小分子抑制剂、转录因子、hTERT磷酸化及显性负性突变体等。

表观遗传学是指在不改变DNA序列的前提下使基因表达发生可遗传性的变化,最终导致带有相同DNA序列的各种细胞及组织具有不同的基因表达模式和生物学功能。表观遗传学调控主要有DNA甲基化、组蛋白修饰及非编码RNA等,它们在人类各种疾病,尤其是肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用。有研究^[5]表明,表观遗传调控hTERT的活性。本文就关于hTERT基因表观遗传学调控的研究进展作一综述。

1 DNA甲基化

1.1 hTERT基因结构特点 人类hTERT基因位于第5号染色体短臂5p15.33区,由16个外显子和15个内含子组成,总长约35 kbp。hTERT基因启动子序列位于5'端一个5.8 kbp的基因片段中,转录起始点的上游181 bp区为核心启动子,其序列上存在多个hTERT转录因子(Sp1、c-myc、Est、Mad-1等)的结合位点。hTERT基因的转录受控于其启动子的调控。在hTERT基因启动子区有一个富含GC区,构成一个CpG岛,分别定位于-208~-150 bp、-310~-20 bp、-330 bp至第2个外显子之间、转录起始点上游181 bp或283 bp区域,长度59~290 bp不等,该岛被认为是DNA甲基化的一个靶点。

1.2 hTERT基因启动子甲基化状态及作用 Nomoto et al^[6]应用PCR和单链构象多态性技术,对13株胃肠肿瘤细胞系、24例肠癌标本及8例正常志愿者外周血细胞经亚硫酸氢盐处理后分析,发现11种细胞系hTERT启动子序列呈高甲基化的状态;在肿瘤标本中6例hTERT启动子完全甲基化,17例呈部分甲基化,而正常组织多为非甲基化状态。Cong et al^[7]发现肿瘤细胞中hTERT启动子核心区(-500 bp)呈现高度甲基化状态。以上研究表明hTERT启动子处于高甲基化状态,然而hTERT启动子的这种甲基化状态与其基因表达二者之间的关系尚不明

2013-10-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:21272008、81072686、81273526)

作者单位:安徽医科大学¹药学院、²肝病研究所,合肥 230032

作者简介:吴小琴,女,硕士研究生;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lj@ahmu.edu.cn

确。多数研究表明 DNA 甲基化可以沉默基因表达, Liu et al^[8-9] 和 Lopatina et al^[10] 证实 hTERT 启动子甲基化可沉默 hTERT 基因表达。另外也有研究^[11-12] 表明二者之间并无显著关系。然而越来越多研究表明在肿瘤细胞中 hTERT 调控区的甲基化状态促进 hTERT 基因的表达。Guilleret et al^[13] 研究发现 hTERT 启动子甲基化与 hTERT 表达呈正相关, 并且端粒酶阳性细胞系用去甲基化试剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR) 处理后 hTERT 表达下降, 端粒酶活性降低及端粒缩短。这种情况下 CpG 甲基化可能是通过干扰转录抑制因子的结合, 从而正调控 hTERT 启动子。造成以上这些不同的研究结果可能的原因是临床标本中有正常组织的存在或由不同的研究方法导致。De Wilde et al^[14] 对人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV) 诱导的致癌作用分析发现宫颈癌细胞株中 hTERT 启动子甲基化程度与肿瘤表型的进展一致, 但临床样本差异无统计学意义。

目前多数学者认为 hTERT 启动子的高甲基化通过与抑制性转录因子作用, 进而影响 hTERT 基因的表达。Renaud et al^[15] 通过染色质免疫沉淀实验发现当 hTERT 基因的第一外显子非甲基化时, 与 hTERT 转录抑制因子 CTCF 结合并抑制 hTERT 的转录起始; 而第一外显子的调控序列发生甲基化时, CTCF 不能与此结合位点结合, 即解除 CTCF 对 hTERT 表达的抑制作用。从而推测 hTERT 启动子 CpG 岛甲基化的主要目的可能是为了阻断 CTCF 的结合, 从而促进 hTERT 的转录。Choi et al^[16] 应用曲古柳菌素(Trichostatin A, TSA) 下调 DNA 甲基转移酶(DNMT1) 诱导 hTERT 启动子 CpG 岛特定定位点去甲基化, 发现在这个去甲基化区域有 CTCF 的一个结合位点, 位于 CpG 岛的 31st 和 33rd 之间。当 TSA 诱导 CpG 岛特定定位点的去甲基化时, 促进了 CTCF 与 hTERT 启动子上位点结合, 从而抑制 hTERT 的转录。然而, 研究表明 hTERT 启动子完全甲基化明显抑制 hTERT 转录, 而启动子局部的低甲基化对 hTERT 的表达起关键作用。Zinn et al^[17] 研究发现在肿瘤细胞中尽管 hTERT 启动子上游很多区域高度甲基化, 但转录起始位点附件区域(-150 ~ 150 bp) 的 DNA 低甲基化甚至非甲基化。如上所述, hTERT 启动子甲基化作用与一般惯例不同。然而, 对于启动子的高甲基化状态及部分区域低甲基化与 hTERT 表达的具体关系仍待深入研究。

2 组蛋白修饰

2.1 组蛋白乙酰化 组蛋白的乙酰化和去乙酰化是一个可逆的动态过程, 主要发生在组蛋白分子 N 端赖氨酸残基上, 由组蛋白乙酰转移酶(histone acetylase, HAT) 和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC) 调控。Choi et al^[18] 和 Meeran et al^[19-20] 研究发现 hTERT 启动子区域的组蛋白在 HAT 的作用下发生乙酰化, 可导致 DNA 空间结构处于松弛状态, 从而有利于转录因子与之结合, 使转录效率大大提高, 即组蛋白乙酰化可激活 hTERT 基因的转录。相反, 在 HDAC 作用下组蛋白去乙酰化, 引起染色质 DNA 高度凝缩, 转录因子难于与之相应的顺式反应元件结合, 使 hTERT 转录受到抑制。Mao et al^[21] 研究表明 NAD 依赖性的组蛋白去乙酰化酶 Sirt1 与 c-myc 转录因子的 C 端相互作用, 导致 c-myc 体外和体内去乙酰化。而且这种脱乙酰化作用促进 c-myc 与其活化分子 MAX 结合, 从而促进了 hTERT 启动子上 c-myc 的转录激活。Choi et al^[16] 又发现 HDAC 抑制剂(HDACi) 增强了 HAT 共激活复合体将乙酰基转移到组蛋白赖氨酸 Lys 残基的能力, 导致核染色质结构开放, 从而激活或抑制 hTERT 等基因, 最终促进了不同转录因子如 CTCF、c-myc 及 MAD1 等与启动子结合。另也有研究^[22] 表明在正常细胞中 TSA 以 Sp1 依赖的方式诱导表达 hTERT 和端粒酶活性。

2.2 组蛋白甲基化 有文献报道另一重要形式组蛋白甲基化也调控 hTERT 表达。Atkinson et al^[23] 发现肿瘤细胞中 H3-K4 三甲基化激活 hTERT 基因转录。Liu et al^[24] 对肿瘤细胞研究发现组蛋白甲基转移酶(SMYD3) 在 hTERT 启动子调控中起着至关重要的作用。SMYD3 使 H3-K4 发生三甲基化, 募集 HAT 导致染色体构象开放, 从而有利于 c-myc 与 Sp1 结合; 同时沉默 SMYD3 可减弱 H3-K4 甲基化和 H3 乙酰化, 最终抑制 hTERT 转录及端粒酶活性。Ge et al^[25] 也发现 DNA 甲基化和组蛋白 H3-K9 修饰影响 c-myc 与 hTERT 启动子上 E-box1 位点结合, 同时沉默 c-myc 明显抑制 hTERT 表达。综上所述, 研究表明 hTERT 的表达可能是由表观遗传学(DNA 甲基化和组蛋白修饰) 及转录因子共同相互调控的结果。

3 非编码 RNA

3.1 microRNAs microRNAs 也叫 miRNAs 或

miRs 是一类由内源基因编码的长度为 20~25 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,在细胞分化、生物发育及疾病发生发展过程中发挥重要作用。随着非编码 RNA 尤其是 microRNAs 成为基因表达调控的研究热点,其在 hTERT 表达调控中的作用也逐渐被认识。

Mitomo et al^[26]首次报道了与端粒酶活性相关的 miRNAs。研究者选取并分析正常甲状腺及甲状腺癌细胞中差异表达的 miRNAs,最终较乳突状甲状腺癌相比,低分化型甲状腺癌细胞中 miR-138 表达显著下降。同时 miRs 在线数据库预测 miR-138 的潜在靶点是 hTERT。因此将 miR-138 前体分子转入甲状腺癌细胞中,应用 Western blot 和荧光素酶报告基因系统检测 hTERT 表达明显下调。从而推测 miR-138 与 hTERT mRNA 的 3'UTR 靶点结合抑制翻译过程,进而下调 hTERT 表达和抑制端粒酶活性。miRNAs 的活性具有细胞特异性,除 miR-138 以外,其他 miRNAs 在其他组织细胞中也参与调控 hTERT 活性。Miura et al^[27]研究表明人染色体 10p 可能含有调控 hTERT 表达的基因,从而应用细菌人工染色体克隆研究发现与正常肝细胞相比,肝癌细胞中 RGM249(编码 miRNAs 的前体基因,位于 10p15.3 区)高表达,基本与 hTERT 表达一致;同时发现 RGM249 可显著降低 hTERT mRNA 水平。另外, Wang et al^[28]研究表明 miR-21 在胶质母细胞瘤的细胞增殖调控中起着十分重要的作用,并以 STAT3 依赖的方式调控 hTERT 表达影响细胞增殖。

3.2 长链非编码 RNA 近年来研究^[29]表明另一种非编码 RNA, TERRA(或 TelRNA)参与端粒酶的调控。哺乳动物的 TERRA 分子是一段含有 UUAGGG 重复序列,大小为 100~9 000 bp 的长链非编码 RNA。研究认为 TERRA 可能以两种方式抑制端粒酶活性,一种是与它的互补性序列作用阻滞 RNA 部分(hTR),另一种是影响端粒区的异染色质^[30]。而 Redon et al^[31]同时也发现 TERRA 也可以 hTR 非依赖形式与 hTERT 相互作用改变其结构从而抑制端粒酶活性。目前研究结果仅提示,非编码 RNA 可能对 hTERT 起到调控,但还未能阐明它们是通过何种机制来发挥调控作用,这有待进一步探索。

4 前景与存在的问题

通过对肿瘤组织及细胞的研究,揭示了表观遗传学对 hTERT 基因表达的调控作用。这为进一步研究肿瘤的发生机制及诊断治疗方法提供新途径。

如 Widschwendter et al^[32]研究发现宫颈癌患者 hTERT 启动子甲基化的预后远差于未发生甲基化患者。但是调控 hTERT 表达是多重因素多种机制,未来还应进一步探讨 hTERT 启动子的高甲基化状态与其表达之间的具体关系, microRNA 与 DNA 甲基化和组蛋白修饰如何相互作用调控 hTERT 表达等。

参考文献

- [1] Flores I, Blasco M A. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging[J]. FEBS Lett, 2010, 584(17): 3826-30.
- [2] Beatty G L, Vonderheide R H. Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(7): 881-7.
- [3] Shay J, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-91.
- [4] Bryce L A, Morrison N, Hoare S F, et al. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization[J]. Neoplasia, 2000, 2(3): 197-201.
- [5] Daniel M, Peek G W, Tollefsbol T O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)[J]. Gene, 2012, 498(2): 135-46.
- [6] Nomoto K, Maekawa M, Sugano K, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP[J]. Jpn J Clin Oncol, 2002, 32(1): 3-8.
- [7] Cong Y S, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(1): 137-42.
- [8] Liu L, Lai S, Andrews L G, et al. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease[J]. Gene, 2004, 340(1): 1-10.
- [9] Liu L, Saldanha S N, Pate M S, et al. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2004, 41(1): 26-37.
- [10] Lopatina N G, Poole J C, Saldanha S N, et al. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306(3): 650-9.
- [11] Dessain S K, Yu H, Reddel R R, et al. Methylation of the human telomerase gene CpG island[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 537-41.

(下转第 560 页)

- an independent predictor of a favorable outcome in early stage breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 106(1): 39–47.
- [23] Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 122(6): 253–70.
- [24] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 214–26.
- [25] Huang X, Wullschlegel S, Shpiro N, et al. Important role of the LKB1–AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice [J]. *Biochem J*, 2008, 412(2): 211–21.
- [26] Kalender A, Selvaraj A, Kim S Y, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(5): 390–401.
- [27] Buzzai M, Jones R G, Amaravadi R K, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6745–52.
- [28] Cebioglu M, Schild H H, Golubnitschaja O. Diabetes mellitus as a risk factor for cancer: stress or viral etiology? [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2008, 8(2): 76–87.
- [29] Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis [J]. *Nature*, 2009, 457(7225): 36–7.
- [30] Huang N L, Chiang S H, Hsueh C H, et al. Metformin inhibits TNF- α -induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 134(2): 169–75.
- (上接第 556 页)
- [12] Devereux T R, Horikawa I, Anna C H, et al. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(24): 6087–90.
- [13] Guilleret I, Yan P, Grange F, et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity [J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(4): 335–41.
- [14] De Wilde J, Kooter J M, Overmeer R M, et al. hTERT promoter activity and CpG methylation in HPV-induced carcinogenesis [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 271.
- [15] Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, et al. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(4): 1245–56.
- [16] Choi J H, Min N Y, Park J, et al. TSA-induced DNMT1 down-regulation represses hTERT expression via recruiting CTCF into demethylated core promoter region of hTERT in HCT116 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 449–54.
- [17] Zinn R L, Pruitt K, Eguchi S, et al. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 194–201.
- [18] Choi K C, Jung M G, Lee Y H, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 583–92.
- [19] Meeran S M, Ahmed A, Tollefsbol T O. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy [J]. *Clin Epigenetics*, 2010, 1(3–4): 101–16.
- [20] Meeran S M, Patel S N, Tollefsbol T O. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11457.
- [21] Mao B, Zhao G, Lv X, et al. Sirt1 deacetylates c-Myc and promotes c-Myc/Max association [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(11): 1573–81.
- [22] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, et al. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(8): 1528–38.
- [23] Atkinson S P, Hoare S F, Glasspool R M, et al. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7585–90.
- [24] Liu C, Fang X, Ge Z, et al. The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2626–31.
- [25] Ge Z, Li W, Wang N, et al. Chromatin remodeling: recruitment of histone demethylase RBP2 by Mad1 for transcriptional repression of a Myc target gene, telomerase reverse transcriptase [J]. *FASEB J*, 2010, 24(2): 579–86.
- [26] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-438 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(2): 280–6.
- [27] Miura N, Sato R, Tsukamoto T, et al. A noncoding RNA gene on chromosome 10p15.3 may function upstream of hTERT [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10(1): 5.
- [28] Wang Y Y, Sun G, Luo H, et al. MiR-21 modulates hTERT through a STAT3-dependent manner on glioblastoma cell growth [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(9): 722–8.
- [29] Reig-Viader R, Briño-Enríquez M A, Khouriauli L, et al. Telomeric repeat-containing RNA and telomerase in human fetal oocytes [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(2): 414–22.
- [30] Ng L J, Cropley J E, Pickett H A, et al. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(4): 1152–9.
- [31] Redon S, Reichenbach P, Lingner J. The non-coding RNA TERCRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(17): 5797–806.
- [32] Widschwendter A, Müller H M, Hubalek M M, et al. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(2): 407–16.