

端粒酶在细胞永生化中的应用

陈小云, 张 敏, 王 磊, 张启龙, 王 栋, 蒋桃珍

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-11-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0053-05 [中图分类号] Q25

[摘 要] 细胞永生化是目前细胞生物研究的热点和难点之一。位于真核生物细胞染色体末端的端粒可以稳定染色体, 而由 RNA 和蛋白质组成的端粒酶以自身 RNA 为模板合成端粒。因此, 将外源性端粒酶逆转录酶 (TERT) 基因转染至目的细胞, 则可能诱导细胞发生永生化。本文从端粒、端粒酶、端粒酶在细胞永生化中的应用、端粒酶在传代细胞系中的应用、存在问题与展望等五个方面进行了综述, 以为相关研究人员提供参考。

[关键词] 端粒酶; 外源性端粒酶逆转录酶; 细胞; 永生化

Progress on Telomerase and Cellular Immortalization

CHEN Xiao-yun, ZHANG Min, WANG Lei, ZHANG Qi-long, WANG Dong, JIANG Tao-zhen

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Establishment of immortalized cell line was one of the hot and difficult subjects in cell biology. Telomeres at chromosome ends in eukaryotes stable the chromosome. Telomerase, an RNA-protein complex, adds multiple telomeric repeats to its 3-prime end by using RNA component as template. Thus ectopic expression of the telomerase reverse transcriptase (TERT) and subsequent activation of telomerase can allow normal eukaryotes to overcome senescence and crisis, and become immortal. An overview of the advance in the telomere, applications of telomerase in the cell immortalization, applications of telomerase in the cell line as well as question and prospect was given, in order to give reference to the researcher.

Key words: telomerase; TERT; cell; immortalization

细胞永生化 (cell immortalization) 指体外培养的细胞经过自发的或受外界因素的影响从增殖衰老危机中逃离, 从而具有无限增殖能力的过程。自然界中自发永生化的几率非常小, 啮齿类动物为 $10^{-5} \sim 10^{-6}$, 而人类细胞则小于 10^{-12} ^[1]。细胞永生化与端粒 (telomere) 和端粒酶 (telomerase) 有密切联系。端粒除保持染色体完整性外, 还作为细

胞生存期限的关键性调控因子存在, 端粒功能障碍会导致细胞增殖衰竭或凋亡。

端粒酶的催化亚单位端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 在端粒酶的激活中起着关键作用。目前, 应用端粒酶来延长细胞的生命期是近年来的研究热点之一。相对于病毒、原癌基因等永生化基因, TERT 具有许多优越性。端

基金项目: 国家自然科学基金项目 (项目批准号 31101817); “863” 项目课题“疫苗与诊断试剂创制及工艺创新”子课题: “重大动物疫病疫苗悬浮培养关键技术研究” (2011AA10A213)

作者简介: 陈小云, 博士, 副研究员, 从事细胞的保藏和研究工作。E-mail: chenxiaoyun@ivdc.gov.cn

粒酶转染建立的永生化细胞保持了正常细胞的生理特性,具有正常的生长速率,正常的核型,呈现生长锚着依赖性和接触生长抑制性,因而是一种非常理想的细胞来源^[1]。

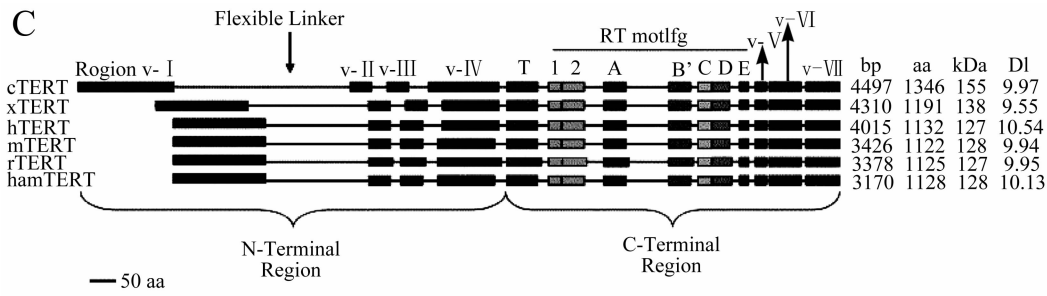
1 端粒和端粒酶

端粒是位于真核细胞线性染色体末端的特殊结构,由简单的 DNA 串连重复序列和一系列相关的蛋白质组成,即 DNA 蛋白复合物。端粒 DNA 由若干个不含功能基因的简单重复的非编码序列构成。端粒的两条 DNA 链长度也不一样,以人为例,其中具有一条单链富含 GT,比它的互补链富 CA 单链多出 50 ~ 400 个核苷酸。

端粒酶是一种合成和延伸端粒的核糖核蛋白。正常细胞内检测不到端粒酶活性,因此正常细胞分裂次数是有限的,不能无限增殖。但是恶性肿瘤细

胞的增殖并不使端粒区缩短,因此具有无限增殖的能力,这是因为细胞中端粒酶被激活^[2],它的作用在于补充细胞分裂中丢失的端粒,维系细胞稳定。

端粒酶由三部分组成:端粒酶 RNA (telomerase RNA, TR 或 TRC) 模板、端粒酶相关蛋白 (TPI) 和 TERT。TERT 的表达水平高低决定端粒酶活性,被认为是调节端粒酶活性的重要限速步骤之一。TERT 在进化上相对保守,几乎所有物种均含有 6 个逆转录酶元件和 1 个端粒酶特异性元件。对人、鸡、猴、大鼠、仓鼠、蟾蜍等 6 个不同物种 TERT 的基因序列比较可以发现,其功能元件是相对保守的(图 1)。在原代培养的细胞中稳定表达人端粒酶催化亚基(hTERT)基因能稳定端粒的长度,使细胞易于永生化,因此 hTERT 的激活是细胞永生化的重要步骤。



注:cTERT:鸡端粒酶逆转录酶;xTERT:蟾蜍端粒酶逆转录酶;hTERT:人端粒酶逆转录酶;
mTERT:猴端粒酶逆转录酶;rTERT:大鼠端粒酶逆转录酶;hamTERT:仓鼠端粒酶逆转录酶;

图 1 不同物种的 TERT 基因比较

2 端粒酶在细胞永生化中的应用

2.1 端粒酶的优越性 到目前为止,采用传统方法已经构建了许多种永生化细胞系,但是各种细胞永生化的方法都有着显著的局限性。它们往往出现有别于正常细胞的特征,如细胞形态改变、核型改变、具有致癌性;另外,有些细胞的生长失去接触性抑制,成为转化细胞。而 TERT 介导的永生化细胞是正常细胞,而非转化细胞。研究表明,它们具有正常生长率、核型,呈现接触抑制和锚着依赖性,不具有致癌性和软琼脂克隆形成能力等^[4]。其次,TERT 介导的永生化细胞已通过了 M1 期和 M2 期,同生殖干细胞一样,是真正意义上的永生化。

hTERT - 永生化细胞兼具原代细胞的原始特性,以及传代细胞系的连续培养能力。在获得两种类型细胞优点的同时,避免了它们的缺陷。表 1

中,对常见的四种细胞类型的特性进行了简要比较。

表 1 四种细胞类型的特征比较

	原代细胞	hTERT - 永生化细胞	癌,病毒 - 永生化细胞	传代细胞系
模拟体内组织表型	++++	+++	++	+
遗传稳定性	二倍体	二倍体/假二倍体	假二倍体/非整倍体	非整倍体
增殖能力	+	+++	+++	+++
供应能力	+	+++	+++	+++
实验可重复性	低	良好	良好	良好
费用	高	中	低	低
使用方便性	+	++	++	+++

2.2 端粒酶在人类细胞永生化中的应用 1998 年, Bodnar 等^[5]首先将外源性 hTERT 导入人视网膜色

素上皮细胞和包皮成纤维细胞获得成功。后续研究发现, 此类细胞可持续增殖, 至少达未转染细胞 PDs 的 2 ~ 3 倍。Wieser 等的研究结果表明, 外源表达 hTERT 即足以使肾近端小管上皮细胞永生化, 永生化的各项表型与原代细胞一致, 经过连续 90 次群体倍增后, 转化细胞依然保持良好的遗传稳定性^[6]。美国 Clontech 与 Geron 公司合作推出第一种商品化的永生化正常细胞系 hTERT - RPE1, 其较正常细胞增殖快, 平均每周末达 5 - 6 PDs, 其传代多于 150 代, 其中有 3 个克隆多于 300 代^[7]。

全球最大的生物材料资源中心美国典型培养物保藏中心(ATCC)也致力于人类细胞的 hTERT 永生化细胞系的构建。目前已构建了 10 余种 hTERT 永生化细胞系, 并实现了商品化。同时, ATCC 还发布了 hTERT 永生化细胞系的质量控制标准, 包括 TRAP 试验检测 hTERT 活性、核型分析、免疫化学和细胞特定标志的流式细胞术等, 以保证细胞质量始终处于良好的可控状态。

国内研究者也在 hTERT 永生化人类细胞系方面进行了一些研究。如吕丽萍^[8]将编码 hTERT 的基因转入成人肝细胞, 筛选出了经 hTERT 修饰后的成人肝细胞, 细胞株可连续传代培养。与原代成人肝细胞相比, 转化细胞对 HBV 的易感性未见明显改变。

2.3 端粒酶在哺乳动物细胞永生化中的应用 来源于靶宿主组织的原代动物细胞, 是病毒增殖的最理想工具。尽管极少的原代细胞可自发永生化, 但是其基因型不稳定, 甚至与原代细胞表型存在较大差异。例如 有研究者采用 SV40 病毒, 使猪肺泡巨噬细胞(PAM)永生化, 但永生化的细胞不支持猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的复制^[9]。进一步的研究发现, 这些细胞均不能表达 PRRSV 进入细胞的受体 pCD163^[10]。这一研究也进一步证实了病毒转化细胞, 可能会导致原代细胞表型的改变。

因此, 研究者们转而采用表达 hTERT 转化的方法, 使原代细胞永生化。如针对采用病毒永生化的 PAM 出现的问题, Sagonga 等^[11]将 hTERT cDNA 转染 PAM 细胞, 稳定转染细胞能组成型表达 hTERT 蛋白, 使细胞永生化。该 PAM 永生化的细胞未影响细胞表面 CD163 受体的表达水平。因此, 这一新型

细胞系有利于 PRRSV 病毒的分离和增殖, 并可作为病毒致病性和免疫功能研究的有效工具。

除了 PAM 外, 其它猪的原代细胞, 也有成功采用 hTERT 获得永生化的报道。例如 Sabine 等采用 hTERT 基因转染技术, 获得了永生化的猪输卵管上皮细胞系 TERT - OPEC, 该细胞具有端粒酶活性, 并与上皮细胞标志物角蛋白具有免疫反应^[12]。

潘小平等^[13]将含 hTERT 真核表达的载体转染到原代猪肝细胞, 经 G418 筛选, 获得耐药性的猪肝细胞克隆并传代 3 代。原代细胞和转化细胞培养上清中分泌白蛋白和尿素氮在前 3 天无统计学差异($P > 0.05$)。此后, 有研究者^[14]将编码 pCI - neo - hTERT 真核表达质粒导入原代培养的猪小肠上皮细胞, 得到抗 G418 阳性细胞群, 并传至 80 代。

Pamela 等^[15]发现对于驴、普通斑马和细纹斑马等 3 种马属动物, 仅表达外源 hTERT 尚不足以使其原代成纤维细胞永生化。但是, 若同时表达 hTERT 和 hTERC, 则可检测到端粒酶活性以及端粒的延长, 并能使 3 种动物的原代成纤维细胞永生化。

现有的研究结果表明, 将 hTERT 转入牛的体细胞和胚胎细胞, 能延长其端粒长度, 并增强端粒酶活性。对于牛源原代细胞, 有报道称仅转化 hTERT, 就能使牛毛细管内皮(BCE)细胞通过衰老期, 获得永生化。令人费解的是, 尽管转化细胞可检测出很高的端粒酶活性, 但这些稳定转染的细胞, 端粒的长度却随着细胞传代而逐渐缩短^[16]。后来, Wiebke 等将 hTERC 和 hTERT 表达质粒, 分别注射至牛囊胚细胞, 发现外源表达 hTERC 能增加牛囊胚细胞的端粒酶活性和端粒长度; 而且共表达 hTERT 和 hTERC 组, 与单独表达 hTERC 组相比, 端粒的长度没有增加^[17]。以上结果表明, TERC 是牛囊胚细胞端粒酶活性的限速因素之一。

对于山羊的原代细胞, 国内也有一些成功的报道。例如杨艳将 hTERT 基因导入山羊卵巢间质原代细胞, 建立了永生化的山羊卵巢间质细胞系。转染细胞系无致瘤性转化, 同时保持了正常细胞的生物学特性^[18]。随后, 赵晓娥等^[19]用将 hTERT 基因转染到山羊胎儿成纤维细胞中, 结果外源性 hTERT 基因可以延长胎儿成纤维细胞在体外培养的寿命,

降低细胞凋亡率。

此外,在永生化鼠类细胞方面,目前已有大量成功的报道。最近,对于鼠的骨髓间充质干细胞^[20]和造骨细胞^[21]等原代细胞的永生化又取得了成功。

2.4 端粒酶在禽类动物细胞永生化中的应用

hTERT 在永生化禽类原代细胞方面,很少有成功的报道。最早的报道是 Georgios 等(2005)将 hTERT 转染鸡胚成纤维细胞(CEF),在转染的 CEF 中检测到 hTERT 表达,却没有检测到端粒酶活性或稳定的端粒长度,并且转染的 CEF 与正常 CEF 经历同样世代后开始衰老凋亡^[22]。

随后,有研究者对这一问题进行了更深入的研究,他们构建了多种 *chTR* 的表达载体,转染 CEF 细胞。结果可以检测到 *chTR* 的表达,并伴随着内源 *chTERT* 的表达。但是在这些转染的 CEF 细胞中端粒酶活性未持续存在^[23]。这一结果提示,CEF 细胞中可能缺少某些端粒保护蛋白的支持。

国内也有一些相关的研究报道。如孙莹等检测了鸡胚成纤维细胞(CEF)和马立克氏淋巴瘤细胞系(MDCC-MSB1)的端粒酶活性,发现 *chTERT* 是端粒酶活性的主要限速步骤之一,也可能是导致马立克氏病淋巴瘤的重要因素^[24]。还有研究人员构建了 hTERT 基因真核表达载体并转染 CEF,转染后可观察到绿色荧光^[25]。但是,这一研究在近三年来均未见后续报道,因此,不能确定是否会如上文中 Georgios 等报道的那样,在转染的 CEF 中检测到 hTERT 表达,却没有检测到端粒酶活性或稳定的端粒长度。

虽然目前还未见采用 hTERT 成功永生化 CEF 的报道,但是,在鸡的骨髓干细胞却有成功的先例。徐玉林将 hTERT 转染骨髓干细胞获得稳定传代的细胞,检测到端粒酶的活性。永生化细胞具有较强的生命活力,并仍然保留正常的生物学特性^[26]。

3 端粒酶在传代细胞系中的应用

Crea 等于 2006 年首次报道了 hTERT 对永生化细胞体外培养特性的影响,过量表达 hTERT 的永生化中国仓鼠卵巢细胞系 CHO K1 在批次培养中的细胞凋亡明显减少、活细胞密度显著提高、培养时间明显延长^[27]。这一研究结果为组成型过量

表达 hTERT 能有效地改善永生化细胞的生长特性、提高细胞培养效率提供了肯定的依据。

刘红等研究发现,hTERT 组成型过量表达可降低 Vero 细胞的贴附生长依赖性和对血清的依赖程度,是有应用潜力的改良哺乳动物细胞体外培养性状的技术途径^[28]。

hTERT - 永生化技术,还可用于细胞系基因功能研究。例如,有研究者将野生型和间隙连接蛋白基因 43 (Cx43) 缺失型鼠的造骨细胞系,采用 hTERT - 永生化后进行研究,明确了 Cx43 在早期分化和矿化阶段的作用^[29]。

4 问题与展望

从目前的研究结果来看,细胞永生化过程中端粒的维持并非全部依赖于端粒酶的激活,约有 30% 的永生化人细胞系并不表达端粒酶。在一段时期内,研究者们一直试图解释这部分细胞在不表达端粒酶活性的情况下,如何保持甚至是延长端粒的长度,并提出了多种假说。2012 年 science 杂志上发表了一篇文章,对此进行了解释,指出 10 - 15% 的人类癌细胞并不表达端粒酶的活性,而是利用端粒替代延长(ALT)机制,该机制不同于通常采用的通过端粒酶延长端粒的机制^[30]。

尽管鸡的端粒酶活性重建取得了一定进展,但是目前尚未见到利用 *chTR* 和 *chTERT* 建立鸡的永生化细胞的报道,有些问题仍有待进一步探索和研究。相信随着研究的不断深入,鸟类的端粒生物学将被完整地阐明,将为人类最终阐明衰老和癌症等疾病的发生机制奠定基础。

另外,并非所有类型的细胞都能通过这种方法建立永生化细胞系,甚至对于同一种细胞,不同的研究得到不同的结果。细胞永生化虽是目前细胞生物学的热点之一,但有许多问题尚未解决,如细胞的衰老机制、一些细胞循环的分子机理以及对不同的细胞采用何种永生方法等方面还有待研究。这些问题的阐明,有利于了解细胞增殖与衰老的分子机制,为治疗肿瘤、控制肿瘤细胞增殖以及器官移植奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Katakura Y, Alam S, Shirahata S. Immortalization by gene trans-

- fection[J]. *Methods Cell Biol*,1998,57:69.
- [2] Li S. Cell – cycle – dependent telomere elongation by telomerase in budding yeast[J]. *Biosci Rep*,2011,31(3):169–177.
 - [3] Huard S,Moriarty T,Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity[J]. *Nucl. Acids Res*,2003,31(14):4059–4070.
 - [4] Morales C P,Holt S E,Ouellette M,*et al.* Absence of cancer – associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase[J]. *Nat Genet*,1999,21(1):115.
 - [5] Bodnar A G,Ouellette M,Frolkis M,*et al.* Extension of life – span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. *Science*,1998,279(5349):349.
 - [6] Wieser M,Stadler G,Jennings P,*et al.* hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2008,295:F1365–F1375.
 - [7] Choy – Pik Chiu. Telomerase – immortalized hTERT – RPE1 cell line[J]. *CLONTECHniques*,1999,14:2.
 - [8] 吕丽萍. hTERT 修饰的成人肝细胞及其对肝炎病毒易感性的研究[D]. 军事医学科学院野战输血研究所博士学位论文,2009.
 - [9] Weingartl, H M,Sabara M,Pasick J. van Moorlehem E,*et al.* 2002. Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility[J]. *J. Virol*,2002,104:203–216.
 - [10] Lee Y J,Park C K,Nam E,*et al.* Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J. Virol*,2010,163:410–415.
 - [11] Sagonga M,Parkb C,Kimb S,*et al.* Human telomerase reverse transcriptase – immortalized porcine monomyeloid cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Journal of Virological*,2012,179:26–32.
 - [12] Sabine H K,Paola P,Johannes K,*et al.* Dioxin Exerts Anti – estrogenic Actions in a Novel Dioxin – Responsive Telomerase – Immortalized Epithelial Cell Line of the Porcine Oviduct (TERT – OPEC) [J]. *Toxicological sciences*,2006,90(2):519–528.
 - [13] 潘小平,李兰娟,曹红翠,等. 人端粒酶逆转录酶诱导的猪肝细胞初步鉴定[J]. *浙江医学*,2006,28(2):103–105.
 - [14] 全 钢. 转染 hTERT 猪小肠上皮细胞株的建立和猪传染性胃肠炎病毒对其活性的影响[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文,2010.
 - [15] Pamela Vidale,Elisa Magnani,Solomon G,*et al.* The catalytic and the RNA subunits of human telomerase are required to immortalize equid primary fibroblasts[J]. *Chromosoma*,2012,121:475–488.
 - [16] Niina V,Jonas F,Magnus H,*et al.* Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb[J]. *The FASEB Journal*,2003,2: online express article.
 - [17] Wiebke G,Wilfried B,Doris H,*et al.* Ectopic Expression of Human telomerase RNA component results in increased telomerase activity and elongated telomeres in bovine blastocysts[J]. *Biol Reprod*,2012,10:87–95.
 - [18] 杨 艳. hTERT 基因转染建立永生化的山羊卵巢间质细胞的研究[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文. 2010.
 - [19] 赵晓娥,马保华,谢 莹. 转 hTERT 基因的山羊胎儿成纤维细胞的生物学特性及其表达分析[J]. *中国兽医学报*. 2012,32(4):586–590.
 - [20] 黄 炜,吕安林,刘博武,等. Plenti6. 3/V5 – TERT 慢病毒载体的构建并成功建立永生化大鼠骨髓间充质干细胞系的研究[J]. *中华临床医师杂志,电子版*,2012,6(10):2608–2613.
 - [21] Mia M,Marcia U M,David C,*et al.* Characterization of hTERT – immortalized osteoblast cell lines generated from wild – type and connexin43 – null mouse calvaria[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2010,299:C994–C1006.
 - [22] Michailidis G,Saretzki G,Hall J. Endogenous and ectopic expression of telomere regulating genes in chicken embryonic fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005,335(1):240–246.
 - [23] Marina S,Ginette D,Denis S,*et al.* Involvement of the Oncoprotein c – Myc in Viral Telomerase RNA Gene Regulation during Marek’s Disease Virus – Induced Lymphomagenesis[J]. *J. Virol*. 2007,5,81:4848–4857.
 - [24] 孙 莹,邹亚学,潘风光. 鸡胚成纤维细胞和马立克氏淋巴瘤细胞端粒酶基因的表达水平[J]. *中国兽医学报*. 2007,27(5):700–706.
 - [25] 梁榕旺,赵国琦,田智泉. 荧光真核表达载体 pEGFP – N1 – hTERT 的构建及鉴定[J]. *上海畜牧兽医通讯*. 2009,6:2–4.
 - [26] 徐玉林. 骨髓干细胞生物学特性及其永生细胞系研究[D]. 浙江大学博士学位论文,2009.
 - [27] Crea F,Sarti D,Falciani F,*et al.* Over – expression of hTERT in CHO K1 results in decreased apoptosis and reduced serum dependency[J]. *Biotechnol*,2006,121(2):109–123.
 - [28] 刘 红,王海涛,李世崇. 组成型过量表达 hTERT 对 Vero 细胞体外培养生物学特性的影响[J]. *现代生物医学进展*. 2011,11(11):2001–2005.
 - [29] Mia M T,Marcia U M,David C,*et al.* Characterization of hTERT – immortalized osteoblast cell lines generated from wild – type and connexin43 – null mouse calvaria[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2010,299:C994–C1006.
 - [30] Jerry W,Shay. Cancer and Telomeres – – An ALternative to Telomerase[J]. *Science*,2012,336:1388.