

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.033

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190428.1039.024.html>(2019-04-29)

## 端粒及其类似物在肿瘤靶向治疗中的研究进展\*

李 翠 综述, 罗 瑛<sup>△</sup> 审校

(昆明理工大学医学院衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650000)

**[摘要]** 端粒与细胞凋亡、衰老及肿瘤的发生、发展有着密切联系,端粒长度及其结构的完整性在肿瘤细胞的无限增殖中具有重要作用。人端粒末端具有富含鸟嘌呤的串联结构(TTAGGG),其单链悬出末端回旋形成 loop 环维持端粒功能稳定,该序列在一定情况下能自发形成 G-四链体(G4)。G4 的形成会从结构上抑制端粒酶或者 ALT 延长端粒的作用从而具有抗肿瘤特性。与端粒同源的寡核苷酸(T-Oligo)入核后会引发肿瘤细胞的 DNA 损伤反应,通过激活 ATM(毛细血管共济失调基因)通路,上调 p53、p73、p95/Nbs1 等下游因子,使肿瘤细胞发生衰老或凋亡。本文综述端粒及其类似物在肿瘤靶向治疗中的研究进展,为肿瘤临床治疗奠定基础。

**[关键词]** 端粒;肿瘤;寡核苷酸类;G-四链体

**[中图法分类号]** R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)15-2646-04

### Research progress of telomere and its analogues in tumor targeted therapy\*

LI Cui, LUO Ying<sup>△</sup>

(Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650000, China)

**[Abstract]** Telomere is closely related to apoptosis, cellular senescence, tumorigenesis and development. Telomere length and its structural integrity play an important role in the infinite proliferation of tumor cells. The telomere end has a guanine-rich tandem structure (TTAGGG), and its single-stranded hanging end turns to form a loop to maintain telomere function, and the sequence spontaneously forms a G-quadruplex (G4) under certain conditions. The formation of G4 will inhibit telomerase structurally or the effect of ALT on extending telomeres, so as to have anti-tumor properties. Oligonucleotides (T-Oligo), homologous to telomeres, can cause DNA damage in tumor cells after entering the nucleus, and make tumors cells undergoing aging or apoptosis via activating the ataxia telangiectasia mutated (ATM) pathway to up-regulate downstream factors such as p53, p73 and p95/Nbs1. This review summarized the research progress of telomeres and their analogues in tumor targeted therapy, and lays a foundation for clinical treatment of tumors.

**[Key words]** telomere; neoplasms; oligonucleotides; G-quadruplex

2009 年学界发现端粒和端粒酶在染色体末端保护的作用机制,打开了肿瘤靶向治疗的新方向,揭示了端粒和端粒酶的重要性。人端粒是位于真核生物线性染色体末端,由非编码 DNA 重复序列 TTAGGG 和 TRF1、TRF2、POT1、TIN2、PAP1、TPP1 (POT1 和 TIN2 结合蛋白)6 种端粒结合蛋白组成的一种回环结构,具有保护染色体完整和维持基因组稳定的作用<sup>[1]</sup>。在经典的复制性衰老学说中,端粒随着细胞分裂而缩短,直至 Hayflick 界限,细胞最终进入复制性衰老或死亡。大多数的肿瘤细胞通过重激活端粒酶补偿机制维持端粒长度。端粒酶具有反转录活性,是真核细胞中的一种核酸聚合酶。人端粒酶结构包括

端粒酶 RNA 组分(TERC),端粒反转录酶 TERT,以及 TP21、热休克蛋白(hsp90)、p23 等相关蛋白<sup>[2]</sup>。端粒酶在正常体细胞中活性的不可检测性,使其成为具有研究前景的靶标。十多年来,学者围绕端粒和端粒酶进行了多方面的探索和研究,其中以端粒作为靶标成效明显的有 G-四链体(G4)稳定剂,以端粒酶作为靶标成效明显的有端粒酶免疫治疗和端粒酶结构相关的核苷酸抑制剂。然而,近几年研究发现,端粒酶阳性细胞和端粒酶阴性细胞在治疗过程中出现了转化的现象<sup>[3]</sup>,这就使以端粒酶为直接或间接靶标的肿瘤靶向治疗易脱靶及肿瘤细胞对药物不敏感,从而增加肿瘤治疗的难度。本文综合目前的研究结果,对效

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(KKGD201460063)。 作者简介:李翠(1989-),在读硕士研究生,主要从事 p53 调控的 ALT 肿瘤方面的研究。 △ 通信作者, E-mail:luoyingabc@yahoo.com。

果明显的端粒和端粒酶的靶向治疗进行概括,对 T-Oligo 与 G4 在肿瘤靶向治疗中的作用与可能的机制进行综述。

## 1 端粒、端粒酶与肿瘤靶向治疗研究现状

近 20 年,靶向端粒和端粒酶的癌症治疗策略研究成为生物学和医学的研究热点。端粒的结构比较特殊,在其 3' 末端有悬出的单链序列,使得端粒在一定情况下容易形成 G4 结构<sup>[4]</sup>,这种结构不仅会阻碍端粒酶结合到单链末端甚至会使端粒末端出现脱环从而影响端粒的延长。因此,G4 结构稳定剂的研究具有一定的抑制作用。例如,用稳定剂 CX-5461 处理后,神经胶质瘤细胞中的 DNA 双链断裂增加,细胞增殖受到抑制并诱导其发生凋亡<sup>[5]</sup>。顺铂衍生物四铂选择性稳定 U2OS ALT 肿瘤细胞中的 G4 结构,抑制端粒回环结构形成,减少姐妹染色体交换,从而诱发 DNA 损伤,诱导凋亡,但是对正常细胞影响甚微<sup>[6]</sup>。端粒酶结构成分比较复杂,但是对端粒酶活性起关键作用的结构主要是 TERT 亚基<sup>[7]</sup>,TERT 至少有 5 种剪接体,通过改变 TERT 的剪接体也能抑制端粒酶的活性。

端粒酶靶向治疗的研究主要有以下 3 个方面:(1)针对 TERC 亚基的反义寡核苷酸;(2)针对 TERT 亚基的免疫治疗;(3)针对端粒酶活性位点结构的非核苷酸抑制剂。目前,针对端粒酶靶点治疗策略中比较有成效的是 GRN163L、GV1001、BIBR15312、VX1001<sup>[8-10]</sup>,但也有局限性:GRN163L 是靶向 TERC 的一种反义寡核苷酸,在临床 II 期试验中发现对实体瘤治疗效果有限<sup>[11-12]</sup>;BIBR1532 是靶向端粒酶活性位点的小分子抑制剂,对短端粒肿瘤效果良好,但是对端粒较长的肿瘤治疗效果有限;GV1001 与 VX1001 都是利用 TERT 多肽结构引发 CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup> 免疫应答达到治疗肿瘤的目的,但是目前单一肽段效果有限,多种肽段组合还需要更多的研究<sup>[13]</sup>。近几年研究表明,很多肿瘤在端粒酶介导的靶向治疗过程中容易由端粒酶阳性转换成端粒延长替代机制(ALT)维持端粒,这就容易导致脱靶,直接影响药物疗效,但是也有一部分端粒酶阳性肿瘤细胞在治疗过程中未出现这种情况,如 GRN163L 能很好地抑制端粒较短的 NSCLC 细胞的增殖<sup>[14]</sup>,也能诱导鳞状食管癌细胞的凋亡并且增加其放疗的敏感性<sup>[15]</sup>。还有研究发现,在端粒酶阳性的肿瘤细胞中 ALT 特性的发展受到抑制,而其抑制的关键不太可能是端粒酶,但是具体的作用机制还不明确<sup>[3]</sup>。这也提示靶向端粒及其结构的研究可能会比直接靶向端粒酶相关成分更长久有效。

## 2 T-Oligo 与肿瘤的靶向治疗

T-Oligo 是与端粒 3' 悬出末端同源的寡核苷酸,由十多个核苷酸构成,通常为 11 个,早在 21 世纪初就被应用于衰老机制的研究中。学者们发现细胞最

终衰老的根本原因是端粒缩短到一定长度时,端粒单链末端无法侵入双链端粒 DNA 中形成 loop 结构,使得染色质脱环,引发 DNA 损伤(DDR),从而走向衰老或凋亡。这与 TRF2 的缺失所引发的 DDR 基本一致,说明 TRF2 在端粒异常所致衰老或凋亡中具有重要作用。在引入 T-Oligo 后,随着 T-Oligo 在细胞核中的积累,T-Oligo 诱发同样的 DDR、周期阻滞和凋亡。这可能是由于激活了 ATM 通路及其下游因子 p53、pRb、E2F1、P95/Nbs1、Chk2 等<sup>[16-17]</sup>。

T-Oligo 诱发细胞衰老和凋亡的特性被广泛应用于肿瘤的靶向治疗中。研究发现,当外来的寡核苷酸进入肿瘤细胞核内时主要发挥两方面的作用:(1)与端粒招募的结合蛋白 POT1、TRF2、TRF1 等形成复合物<sup>[18]</sup>,使端粒不能形成有效的核酸蛋白复合物,影响端粒结构的完整,引发细胞内的 DDR 等应激反应;(2)因其结构类似于暴露的端粒悬出末端,随着 T-Oligo 在细胞核内的积累,细胞内的 DDR 或凋亡监控蛋白结合并识别 T-Oligo 直接引发细胞内周期阻滞、凋亡等应激反应。如图 1 所示,T-Oligo 作用机制图:T-Oligo 进入细胞核后通过 WRN 蛋白或 Mre11/Hrad50/Nbs1 复合物诱发肿瘤细胞 DDR 机制。通过 ATM 表达上调及其磷酸化,激活 p53、p95/Nbs1、p73 通路:ATM 磷酸化直接促进 Chk2 和 p53 的磷酸化,并上调其下游因子 p27、p21、p16、Bax 诱导细胞的衰老或凋亡;ATM 的磷酸化直接促使 p95/Nbs1 上调,诱发 S 期阻滞,最终走向衰老或凋亡;ATM 磷酸化后促进 Rb 的磷酸化,并上调下游因子 E2F1、p73 引发 S 期阻滞,最终诱发细胞的衰老或凋亡。

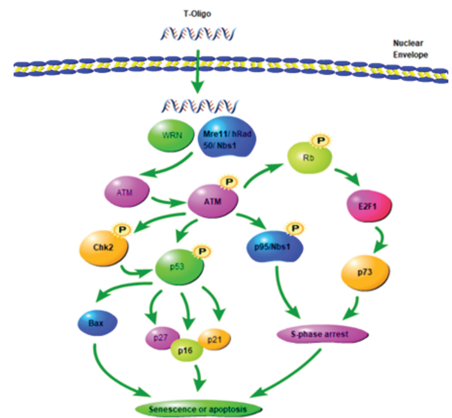


图 1 T-Oligo 作用机制图

在前列腺癌、淋巴瘤、乳腺癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤等肿瘤治疗的研究中,T-Oligo 展示了良好的抑癌抗癌效应<sup>[19]</sup>。前列腺癌细胞 DU-145 在用 T-Oligo 处理 1 d 后就可以明显检测到细胞增殖的抑制,在处理 4~5 d 后检测到细胞的凋亡增强<sup>[20]</sup>。T-Oligo 还能通过 p53/p73 通路诱导非小细胞肺癌细胞的衰老或死亡,而不影响正常的支气管上皮细胞<sup>[21]</sup>。另一项对黑色素瘤细胞 MU、PM-WK、MM-

MC 的研究发现,经 T-Oligo(11 碱基)处理,细胞通过 WRN 蛋白和 ATM 激酶上调 p53、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3),下调血管内皮生长因子 (VEGF)及其受体,并激活 E2F1 通路,诱导细胞的周期阻滞和凋亡<sup>[22]</sup>。在小鼠的黑色素瘤异种移植模型中发现,T-Oligo 处理后,肿瘤转移情况减少 90%~95%,肿瘤体积减小 84%~88%<sup>[23]</sup>。近期研究还发现,T-Oligo 处理黑色素瘤细胞 48 h 后,细胞存活率减少 75%<sup>[18]</sup>。T-Oligo 还能激活黑色素瘤细胞中的 ATM 通路,上调 ATM 和 ATM 的磷酸化,以及下游 p53、p73、Bax 等相关因子。T-Oligo 在肿瘤的靶向治疗中不仅单独使用有效,还能与其他的抗癌药物联合使用,增强抗癌疗效。例如,T-Oligo 单独处理乳腺癌细胞时,能促进癌细胞的衰老和凋亡,而在用 T-Oligo 预处理后发现,放射治疗的敏感性增加,对正常组织几乎没有影响<sup>[21]</sup>。T-Oligo 在抗癌过程中并没发现依赖于端粒酶,以上充分说明,T-Oligo 的运用可能成为非常有效的抗癌方法,未来 T-Oligo 与其他抗癌药物的联合使用将具有较好的临床应用前景。

### 3 G4 与肿瘤的靶向治疗

G4 是一种在端粒区自发形成的二级结构。这种结构不仅能阻止端粒酶靠近端粒,还能阻止端粒区域复制叉的活动<sup>[24]</sup>,从而克服端粒酶介导的细胞永生。此外,G4 还能抑制通过 ALT 机制延长端粒的策略。研究发现,DNA 解旋酶能分解 G4,而端粒酶不能分解 G4 结构,这一特性使 G4 配体及稳定剂的发展得到广泛的研究和运用。G4 配体能与端粒 3' 悬出端单链区紧密结合,促进 G4 的形成及其稳定。研究发现,G4 配体在黑色素瘤细胞中与 c-MYC 和 BCL-2 启动子序列相结合,下调 c-MYC 和 BCL-2 的表达,并抑制其增殖,诱导凋亡<sup>[25]</sup>。另一项研究显示,G4 配体可以用较低浓度抑制神经胶质瘤细胞的增殖,并诱发 DDR<sup>[26]</sup>。目前,最有前景的 G4 稳定配体包括 Telomestatin、BRACO-19 和 RHPS 4。Telomestatin 和 RHPS 在肿瘤细胞中的作用机制尚不明确,但有研究发现 RHPS4 特异性结合 G4 后诱导 U251 MG 神经胶质瘤细胞 G<sub>2</sub>/M 期的阻滞,增加了放射治疗的敏感性<sup>[27]</sup>。BRACO-19 使肿瘤细胞出现后期桥和端粒融合,这可能是由于 BRACO-19 引发端粒 T-loop 结构的脱环或端粒结合蛋白的释放引发 DNA 损伤<sup>[28]</sup>,而端粒功能失调最终会引起 p53 和 p21 介导的细胞周期阻滞、衰老或凋亡。还有研究发现,钾离子浓度在 BRACO-19 发挥作用的过程中,也具有重大作用<sup>[29]</sup>。目前 BRACO-19 的研究已经进入临床研究阶段,但是 BRACO-19 对肿瘤细胞的治疗作用依赖于端粒的长度<sup>[30]</sup>,端粒过长时,BRACO-19 的作用效果明显受阻。G4 的研究对肿瘤靶向治疗具有重大的意义,但是如何筛选出合适的治疗群体,或者与其他治疗方式联合

运用还需要进一步的研究。

### 4 小 结

端粒和端粒酶在肿瘤发生、发展过程中具有重要作用。绝大多数肿瘤细胞的端粒长度都比正常的体细胞短,而超过 85% 的肿瘤细胞中端粒酶被重新激活,这都使端粒和端粒酶成为肿瘤靶向治疗的关键而被广泛研究。但在端粒酶阳性的肿瘤细胞治疗过程中发现肿瘤细胞特性由 ALT 阴性变为 ALT 阳性,这就容易导致治疗效果降低甚至失败;但是也有部分的端粒酶阳性肿瘤细胞在治疗过程中没有出现这种情况。因此,对肿瘤细胞的转变性进行筛选将有利于靶向药物的准确使用,或者在端粒酶阳性肿瘤治疗的后期联合引入 ALT 特性的靶向药物,这都需要更进一步的研究来解决。此外,T-Oligo 与 G4 在肿瘤靶向治疗中具有良好的作用,但也都存在一定的缺陷,如 T-Oligo 因容易被核酸酶降解,在体内的传递受到阻碍。新发现的一种阳离子多肽形成的纳米复合物具有良好的生物利用度,或许能帮助 T-Oligo 在体内的传递,但这还需要更多的研究证实。G4 的使用从结构方面能很好地诱导端粒酶阳性和 ALT 特性的肿瘤细胞的衰老或凋亡,但是 G4 配体或稳定剂与 G4 结构的特异性结合与结合度都存在一些问题,还需要设计和发现更合适的小分子来稳定 G4 结构,从而为推动肿瘤靶向治疗的长期稳定发展奠定基础。

### 参考文献

- [1] MAESTRONI L, MATMATI S, COULON S. Solving the telomere replication problem[J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(2):e55.
- [2] ARNDT G M, MACKENZIE K L. New prospects for targeting telomerase beyond the telomere[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8):508-524.
- [3] de VITIS M, BERARDINELLI F, SGURA A. Telomere length maintenance in cancer: at the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT) [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):e606.
- [4] 刘文静, 孙彤, 张萍, 等. 原子力显微镜单分子力谱技术在 G 四链体研究中的应用[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(9):1107-1114.
- [5] LI G, SHEN J, CAO J, et al. Alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase in gliomas and its modulation mediated by CX-5461 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):78.
- [6] ZHENG X H, NIE X, FANG Y, et al. A cisplatin derivative Tetra-Pt(bpy) as an oncotherapeutic agent for targeting ALT cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(10):dix061.
- [7] JIANG J S, WANG Y Q, SUSAC L, et al. Structure of telomerase with telomeric DNA [J]. *Cell*, 2018, 173(5):1179-1190.

- [8] MAN R J, CHEN L W, ZHU H L. Telomerase inhibitors; a patent review (2010-2015)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(6): 679-688.
- [9] JAFRI M A, ANSARI S A, ALQAHTANI M H. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 69.
- [10] THOMA C. Signal of GV1001 efficacy[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(8): 466-467.
- [11] REYES-URIBE P, ADRIANZEN-RUESTA M P, DENG Z, et al. Exploiting TERT dependency as a therapeutic strategy for NRAS-mutant melanoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4058-4072.
- [12] SALLOUM R, HUMMEL T R, KUMAR S S, et al. A molecular biology and phase II study of imetelstat (GRN163L) in children with recurrent or refractory central nervous system malignancies: a pediatric brain tumor consortium study[J]. *J Neurooncol*, 2016, 129(3): 443-451.
- [13] RUDEN M, PURI N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase[J]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(5): 444-456.
- [14] FRINK R E, PEYTON M, SCHILLER J H, et al. Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31639-31651.
- [15] WU X P, ZHANG J, YANG S J, et al. Telomerase antagonist imetelstat increases radiation sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13600-13610.
- [16] RANKIN A M, FALLER D V, SPANJAARD R A. Telomerase inhibitors and 'T-oligo' as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity[J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19(4): 329-338.
- [17] SYED A, TAINER J A. The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair[J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 263-294.
- [18] CHHABRA G, WOJDYLA L, SANJALI A, et al. Mechanism of action of G-quadruplex forming oligonucleotide homologous to the telomere overhang in melanoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 903-910.
- [19] SCHRANK Z, KHAN N, OSUDE C, et al. Oligonucleotides targeting telomeres and telomerase in cancer[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): e2267.
- [20] GNANASEKAR M, THIRUGNANAM S, ZHENG G X, et al. T-Oligo induces apoptosis in advanced prostate cancer cells[J]. *Oligonucleotides*, 2009, 19(3): 287-291.
- [21] PURI N, PITMAN R T, MULNIX R E, et al. Non-small cell lung cancer is susceptible to induction of DNA damage responses and inhibition of angiogenesis by telomere overhang oligonucleotides[J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(1): 14-23.
- [22] PITMAN R T, WOJDYLA L, PURI N. Mechanism of DNA damage responses induced by exposure to an oligonucleotide homologous to the telomere overhang in melanoma[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(5): 761-77.
- [23] UPPADA S B, ERICKSON T, WOJDYLA L A, et al. Novel delivery system for T-oligo using a nanocomplex formed with an alpha helical peptide for melanoma therapy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 43-53.
- [24] IVANCICH M, SCHRANK Z, WOJDYLA L, et al. Treating cancer by targeting telomeres and telomerase[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6(1): e15.
- [25] MICHELI E, ALTIERI A, CIANNI L, et al. Perylene and coronene derivatives binding to G-rich promoter oncogene sequences efficiently reduce their expression in cancer cells[J]. *Biochimie*, 2016, 125: 223-231.
- [26] NAKAMURA T, OKABE S, YOSHIDA H, et al. Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3605.
- [27] BERARDINELLI F, SGURA A, FACOETTI A A, et al. The G-quadruplex-stabilizing ligand RHPS4 enhances sensitivity of U251MG glioblastoma cells to clinical Carbon ion beams[J]. *FEBS J*, 2018, 285(7): 1226-1236.
- [28] ZHOU G T, LIU X R, LI Y Q, et al. Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 14925-14939.
- [29] WANG Z, LIU J P. Effects of the central Potassium ions on the G-quadruplex and stabilizer binding [J]. *J Mol Graph Model*, 2017, 72: 168-177.
- [30] SI M K, PRAMANIK S K, GANGULY B. Tuning the ring strain effect in acridine derivatives on binding affinity with G-quadruplex-DNA; a computational and experimental study[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 1177-1185.

(收稿日期: 2019-03-10 修回日期: 2019-04-24)