

文章编号: 1004-0374(2010)10-1005-04

端粒酶线粒体转位

文 蕾, 凌贤龙*

(第三军医大学新桥医院消化科, 重庆 400038)

摘 要: 端粒酶是一种逆转录酶, 主要存在于细胞核, 其主要功能是维持端粒长度, 有助于细胞永生化。现已发现, 氧化应激可以改变端粒酶活性, 促使端粒酶从细胞核转位到线粒体, 因而不能继续维持端粒长度, 使细胞端粒缩短。端粒酶线粒体转位的非依赖端粒功能包括改善线粒体功能、减少细胞氧化应激、拮抗细胞凋亡。

关键词: 端粒酶; 线粒体转位; 端粒酶的非依赖端粒功能

中图分类号: R363;Q55

文献标识码: A

Translocation of telomerase to mitochondria

WEN Lei, LING Xian-long*

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

Abstract: Telomerase is a reverse transcriptase which main exist in nucleus, with the main function of maintaining telomeres, so it contributes to cellular immortality. It has been demonstrated that telomerase activity would be altered upon oxidative stress and excepted from nucleolus to mitochondria as well as telomere shortening. The telomere-independent functions of translocation of telomerase to mitochondria have been related to improved mitochondrial function, decreased oxidative stress and resistaned cell apoptosis.

Key words: Telomerase; translocation to mitochondria; telomere-independent functions of telomerase.

端粒酶(telomerase)是一种具有逆转录酶活性的特殊DNA聚合酶, 主要存在于细胞核, 其主要功能是合成端粒DNA, 使端粒出现多个重复序列而不断延长, 因此它有助于细胞的永生化。已证明端粒酶可在细胞内不同亚细胞器之间动态穿梭。在氧化应激条件下, 端粒酶从核内转位, 在线粒体内被发现。线粒体保护作用可能是端粒酶在细胞生存和老化方面的一个重要功能。

1 端粒酶与细胞永生化

端粒是指位于真核细胞线性染色体末端的一种特殊结构, 起着保护染色体末端, 维持染色体的稳定性和完整性, 并调节细胞的生长、决定细胞的生命等功能。而其功能主要依靠端粒长度和端粒结构的保持。随着细胞分裂次数的增加, 端粒DNA逐渐缩短, 当端粒缩短到临界长度时, 即不能维持染色体的稳定, 细胞就会出现衰老以致死亡。因此, 端

粒缩短被看作是正常细胞分裂和老化的分子信号。

DNA末端复制问题和氧化应激介导的端粒DNA损伤通常会造成端粒缩短。端粒酶可以合成端粒DNA, 弥补细胞分裂时DNA端粒的缩短, 维持端粒的长度, 保持染色体的动态平衡。端粒酶在生物体的老龄化和长寿中也发挥了作用, 在抗癌小鼠模型已证实了端粒酶稳定端粒的功能^[1]。

端粒酶是一种核糖核蛋白酶, 主要由3个亚单位构成, 即端粒酶RNA(telomerase RNA, TR)、端粒酶相关蛋白质(telomerase-associated protein, TP1/TP2)和端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)^[2]。研究表明, hTERT表达水平随着端粒酶活性增加而相应成比例增加, 并在正常和癌组织中

收稿日期: 2010-04-22; 修回日期: 2010-06-11

*通讯作者: E-mail: Lingxlong@yahoo.com.cn

存在差异性表达, 因此认为 hTERT 是人类端粒酶活性的主要调控亚单位。hTERT 是 RNA 依赖的 DNA 聚合酶, 它区别于其他逆转录 DNA 聚合酶的主要特征是自身携带模板。端粒酶的主要功能是合成端粒 DNA, 使端粒末端出现多个重复序列而不断延长。

端粒酶的活性在人类不同细胞和组织是不同的。人类细胞在胚胎发育早期端粒酶呈活化状态, 随后被抑制并一直处于失活状态。正常人体组织端粒酶表达呈阴性或阳性率很低, 而在生殖细胞、胚胎干细胞和癌细胞中端粒酶高表达。端粒酶激活和端粒长度维持与细胞永生化密切相关。主要是由于端粒酶能延长端粒, 保持端粒长度和结构的稳定。但是, 研究发现, 端粒酶还存在非依赖于端粒的功能^[3]。

2 端粒酶非依赖端粒功能

越来越多的证据表明, 除了维持端粒长度的明确作用外, 端粒酶有更多的生理功能。端粒酶非依赖于端粒的功能包括促进 DNA 修复、抗细胞凋亡或改变染色质结构和基因表达^[4-6]。在不同类型的细胞, 如神经细胞和癌细胞, 随着端粒酶活性增强, 抵抗由应激导致的细胞凋亡和(或)衰老的能力也明显加强。同时, 在 TERT 异位过度表达模型系统中, 端粒酶不能保护在增加氧化应激时的端粒^[4-8]。这些资料表明, 端粒酶促进细胞的生存和抗应激非依赖于端粒长度^[9]。

第一次分析端粒酶的非依赖于端粒功能是神经生理学家 Mark Mattson。端粒酶在胚胎脑组织中高表达, 并在神经细胞的分化和生存过程中起重要作用^[10]。随着 TERT 水平下降培养的胚胎脑细胞可出现细胞凋亡增加, 表明这些胚胎神经元的生存需要 TERT。与此相反, 在 PC12 嗜铬细胞瘤细胞, TERT 过度表达可以增强肿瘤细胞对于各种损伤因素, 包括营养戒断因素、星形孢菌素和 DNA 损伤等所引起的凋亡的抵抗能力^[10-12]。研究显示, TERT 可以在线粒体改变和天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶激活之前, 通过阻止细胞凋亡的级联反应来发挥其凋亡抑制作用。TERT 过度表达可以对抗撤出营养因素后由于线粒体膜电位下降和活性氧增加导致的损伤。因此, 有人认为, 端粒酶可作为发育中的大脑神经元生长促进因子, 而在各种年龄相关的神经退行性疾病中, 成年脑组织中 TERT 下调可能会增加神经元的脆弱性。

Zhang 等^[13]通过对野生型 TERT 和它的两种变异

体(14-3-3 蛋白结合结构域突变体和 RT 结构域突变体)的研究, 证实了 TERT 的抗凋亡作用。Massard 等^[14]也证明, 在各种肿瘤细胞中, 降低 hTERT 水平可促进由顺铂、依托泊苷和活性氧诱导的非 p53 依赖的细胞凋亡。Kang 等^[15]通过对鼠前脑神经元的研究发现, TERT 可以减少胞浆中 Ca^{2+} 的累积, 增强线粒体对其的摄取能力, 从而选择性阻断 NMDA (*N*-甲基-D-天冬氨酸)受体介导的神经毒性, 进而发挥其对缺血缺氧性脑损伤的保护性作用。

3 端粒酶核外转位

研究发现, 端粒酶可在细胞内不同亚细胞器之间动态穿梭。hTERT 蛋白有核和核仁定位信号, 以及核输出信号。2000 年, Seimiya 等^[16]发现了端粒酶核外转位: 信号蛋白 14-3-3 是绑定在 TERT 上的一个组成部分, 它能使 TERT 定位于细胞核, 当 14-3-3 蛋白表达阴性时, TERT 从细胞核移出, 在细胞质出现。Haendeler 等^[6]研究显示, HEK 293 细胞 3 个细胞亚组分的端粒酶活性, 约 60% 在细胞核、20% 在线粒体、20% 在细胞质。

在增加氧化应激时^[4, 17-19], 端粒酶从核内转位, 在细胞质(主要是线粒体)被发现。在 Ahmed 等^[4]的实验中, 用 H_2O_2 处理人成纤维细胞 MRC5 后发现, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 细胞核外的端粒酶活性从总活性的 25%~30% 逐渐增加到 80%~90%, 通过激光共定位发现, 降低细胞应激水平可扭转端粒酶核外转位。因此, 端粒酶在亚细胞器间穿梭是细胞内自然发生的和动态调节的。这个穿梭过程取决于各种因素, 如细胞所处周期阶段、DNA 损伤和氧化应激。

氧化应激, 如过氧化氢可能通过蛋白激酶 Src(其酪氨酸 707 磷酸化)促进 TERT 核外转位, 其他因素, 如 CRM1 和胞浆内 14-3-3 蛋白可能涉及其中^[16, 17]。hTERT 在不同的细胞器的定位似乎是动态调节和依赖于各种信号, 如抗原、生长因子或氧化应激。由于端粒酶只有在细胞核能发挥其保护端粒的功能, 因此, hTERT 的核外定位提示端粒酶具有其他非依赖端粒功能。

4 线粒体与氧化应激

线粒体是除细胞核外拥有 DNA 的细胞器之一, 也是细胞呼吸和通过 ATP 产生能量的重要的细胞器, 是细胞内活性氧(ROS)的主要来源, 同时也是活性氧诱导的氧化损伤的主要目标。线粒体功能障碍和氧化应激与细胞衰老和老化过程有重要联

系。Harman^[20, 21]提出了老龄化的“自由基或氧化应激理论”认为老龄化是代谢过程中产生的活性氧(ROS)造成的分子损伤积累的结果,并最终决定生物体的寿命。这一理论通过Miquel等^[22]的努力得到了进一步发展和完善。他们指出,线粒体内氧化应激诱导的体细胞突变积累是导致老龄化和与年龄有关的退化性疾病主要因素。

有大量证据表明,氧化应激可诱发或加快细胞衰老的发展过程。长期以来线粒体DNA(mtDNA)损害一直作为细胞内氧化应激一个敏感的指标,许多相关的研究表明,随着年龄增长,活性氧生成增加,线粒体功能降低和线粒体DNA氧化损伤增加^[23]。氧化应激和细胞衰老日益被认为是老龄化、衰退和失去活性的重要的内在机制。实验表明,线粒体功能和活性氧簇在决定寿命中发挥重要作用^[24]。因此,对线粒体的保护作用在细胞抗应激、抗凋亡中有着潜在的意义,与细胞的永生化密切相关。

5 端粒酶线粒体转位

近几年研究发现氧化应激和药物治疗可导致端粒酶从细胞核转位到线粒体并保护线粒体功能^[4, 6-19]。并且,氧化应激导致的端粒酶线粒体转位的发生有时间和剂量依赖性^[4]。过氧化氢治疗后不到3 h,即可发生端粒酶线粒体转位。Ahmed等^[4]发现,氧化应激(慢性氧:40%氧条件下)导致80%~90%的端粒酶进入线粒体,而细胞核内其余端粒酶无法维持端粒的长度,因此端粒缩短,其实,早在1995年,von Zglinicki等^[25]就曾证明成纤维母细胞在同样条件下,端粒缩短明显加速。将hTERT高表达的细胞从高氧状态转到常氧状态,可以扭转端粒酶核外转位,端粒重新延长和扩展。

Ahmed等^[4]发现了端粒酶的线粒体保护作用,从而推翻了Santo等^[18, 19]描述的端粒酶线粒体转位对线粒体的不利影响,破坏DNA的完整性、导致细胞凋亡。而且,在各种细胞系统中,线粒体端粒酶的保护功能很好地对应早先发现的端粒酶的抗凋亡功能。Saretzki^[26]指出,端粒酶保护线粒体是一个全新的功能,在应激时,端粒酶能够改善线粒体功能,减少氧化应激。

Ahmed等^[4]发现,在人成纤维细胞,线粒体hTERT基因的过度表达可以保护线粒体DNA免受急性(过氧化氢处理)或慢性(氧化应激)损伤,降低线粒体内过氧化物的产量和维持其较低的细胞ROS水平,同时可以增强线粒体偶联,抑制线粒体功能障

碍所致的逆行反应,保护并增强线粒体作用,抵制凋亡。这与Haendeler等^[6]研究发现的在UV和溴化物介导的损伤下TERT可以使mtDNA受到保护,并提高线粒体作用的结论一致。

Kovalenko等^[27]发现与TERT核输出信号有关的突变不能维持端粒的长度、线粒体功能和细胞生长:突变干扰TERT的核输出信号,尽管此时的TERT仍保留催化活性,却不再促进细胞的永生化。在表达TERT突变基因的细胞中,可以产生高水平的线粒体活性氧簇,线粒体功能受损,并损伤端粒DNA及端粒外DNA。del Bufalo^[28]通过对Bcl2抑制剂所诱导的凋亡模型进行研究,认为TERT在线粒体的过表达在保护线粒体膜电位和其作用中起着重要作用,并且是独立于其可以维持端粒长度这一催化活性之外的作用。

端粒酶被运送到线粒体基质后通过TOM与TIM结合到线粒体DNA编码的complex I,并增加complex I呼吸效率^[6]。TERT基因敲除小鼠的心肌线粒体的呼吸效率比较野生型小鼠低。同时,hTERT线粒体转位与抗凋亡之间有正相关关系。hTERT敲除后,线粒体活性氧生成增加。然而,目前还不清楚hTERT是通过何种机制保护线粒体DNA。可能的机制包括通过改进耦合或更有效地降低线粒体活性氧生成、直接结合和保护线粒体DNA、提高DNA修复或加速损伤线粒体的降解。

Saretzki^[26]提出:hTERT保护线粒体的一个可能的机制是加快降解已经损伤的线粒体,避免DNA受损。而Tondera等^[29]则描述了一种所谓的“应激诱导的线粒体超融途径(stress-induced mitochondrial hyperfusion SIMH)”:当细胞处于一定水平(较低,正好可诱导凋亡的水平)应激状态时,线粒体相互融合形成一闭合的网状结构,阻止线粒体断裂。van der Bliek^[30]发现这种融合形成的网状结构,可以促进线粒体的一些关键成分发生互换,以加强线粒体结构,对抗进一步的损伤。

在人类端粒酶呈阳性细胞中,如淋巴细胞、内皮细胞和干细胞,端粒酶逐步核外转位和穿梭到线粒体可能是一个重要生理机制。这可能意味着,在正常生长条件下,端粒酶保护端粒;在增加氧化应激的条件下,端粒酶保护线粒体。与高表达hTERT基因的成纤维细胞相似,在增加应激下,细胞端粒酶由细胞核向线粒体的亚细胞穿梭也发生在癌细胞。有数据显示^[4, 6],线粒体功能可能与端粒功能共存:在正常生理状态下,在多种细胞类型

中, 20%~30%的端粒酶出现在细胞核外, 部分在线粒体。

虽然氧化应激时端粒酶从细胞核转位线粒体确切的生物学意义并不完全清楚, 我们推测, 在增加应激的情况下, 对于细胞生存来说, 保护线粒体比保护端粒更直接和重要。一旦高应激状态消失, 这个过程便宣告结束。由于活性氧和线粒体损伤是衰老进程中的重要组成部分, 线粒体端粒酶增加了衰老进程的复杂程度, 这还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, 2008, 135 (4): 609-22
- [2] Blackburn EH. Telomeres and telomerase: the path from maize, tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*, 2006, 12: 1133-8
- [3] Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2002, 99: 12606-11
- [4] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci*, 2008, 17: 1046-53
- [5] Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet*. 2008 1: e10
- [6] Haendeler J, Dröse S, Büchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (6): 929-35
- [7] de Magalhães JP, Chainiaux F, Remacle J, et al. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, 2002, 523 (1-3): 157-62
- [8] Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, 2002, 277 (41): 38540-39
- [9] Rubio MA, Davalos AR, Campisi J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. *Exp Cell Res*, 2004, 298 (1): 17-27
- [10] Mattson MP, Fu W, Killen M, et al. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J Mol Neurosci*, 2000, 14: 3-15
- [11] Lu C. Telomerase protects developing neurons against DNA damage induced cell death. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 131: 161-71
- [12] Zhu H, Fu W, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid β -peptide-induced apoptosis. *J Neurochem*, 2000, 75: 117-24
- [13] Zhang P, Chan SL, Fu W, et al. TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability. *FASEB J*, 2003, 17: 767-9
- [14] Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, et al. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, 2006, 25: 4505-14
- [15] Kang HJ, Choi YS, Kim KW, et al. Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *J Neurosci*, 2004, 24: 1280-7
- [16] Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, et al. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J*, 2000, 19 (11): 2652-61
- [17] Haendeler J, Hoffmann J, Brandes R P, et al. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (13): 4598-610
- [18] Santos JH, Meyer JN, Skovvaga M, et al. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell*, 2004, 3: 399-411
- [19] Santos JH, Meyer JN, van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 (11): 1757-68
- [20] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956, 11: 298-300
- [21] Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 1972, 20 (4): 145-7
- [22] Miquel J, Economos AC, Fleming J, et al. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 1980, 15 (6): 575-91
- [23] Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol*, 2001, 36 (7): 957-68
- [24] Sedensky MM, Morgan PG. Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mitochondrial aging mutants. *Exp Gerontol*, 2006, 41 (3): 237-45
- [25] von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, et al. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, 1995, 220: 186-93
- [26] Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol*, 2009, 44: 485-92
- [27] Kovalenko OA, Caron MJ, Ulema P, et al. A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*, 2010, 9 (2): 203-19
- [28] del Bufalo D. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1429-38
- [29] Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, et al. SLP-2 is required for stress induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*, 2009, 28 (11): 1589-1600
- [30] van der Bliek AM. Fussy mitochondria fuse in response to stress. *EMBO J*, 2009, 28 (11): 1533-4