

端粒保护蛋白 TRF2 在肿瘤发生和治疗中作用机制的研究进展*

孙茹^① 综述 郭晓兰^{①②} 审校

摘要 端粒重复序列结合因子2(telomeric-repeat binding factor 2, TRF2)是一种重要的端粒保护蛋白,与端粒保护蛋白1(protection of telomeres 1, POT1)、端粒重复序列结合因子1(telomeric-repeat binding factor 1, TRF1)、相互作用核蛋白2(TRF1-interacting nuclear protein 2, TIN2)、阻滞活化蛋白1(repressor activator protein 1, Rap1)以及TPP1,5个核心蛋白通过一系列相互作用共同形成端粒保护蛋白复合体(shelterin)以维持端粒结构和功能的稳定性和完整性。越来越多的研究显示TRF2在多种肿瘤中异常表达并与肿瘤的发生,肿瘤细胞的耐药以及肿瘤血管的生成密切相关。因此,本文就TRF2的结构与生理功能,以及其在肿瘤发生、发展与治疗中的作用研究进展进行综述,以期对肿瘤的预防和治疗提供新的思路。

关键词 端粒 端粒保护蛋白复合体 端粒重复序列结合因子2 肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2017.16.325

Research progress in the mechanism of telomeric shelterin component TRF2 in tumorigenesis and tumor treatment

Ru SUN¹, Xiaolan GUO^{1,2}

Correspondence to: Xiaolan GUO; E-mail: alan5200@hotmail.com

¹Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; ²Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

The work was supported by the 2014 Applied Foundational Research of Sichuan province (No. 2014JY0115) and the Natural Science Key Project of Sichuan Education Department (No. serial number: 16ZA0224)

Abstract Telomeric-repeat binding factor 2 (TRF2) as an important telomere binding protein, protects telomere ends and maintains the structural and functional stability and integrity of telomeres by interacting with five other essential core proteins (POT1, TRF1, TIN2, RAP1, and TPP1) to form a complex called shelterin. An increasing number of studies have discovered the abnormal expression of TRF2 in many tumors and that TRF2 is closely related to tumor occurrence, drug resistance, and tumor angiogenesis. Here, we review the latest research findings on the structure and function of TRF2, as well as the role of TRF2 in the occurrence, development, and treatment of tumors. We hope to provide novel perspectives for the prevention and treatment of tumors.

Keywords: telomere, telomeric shelterin, telomeric-repeat binding factor 2, tumor

端粒结合蛋白又名端粒保护蛋白复合体(shelterin),主要由端粒重复序列结合因子1(telomeric-repeat binding factor 1, TRF1)、端粒重复序列结合因子2(telomeric-repeat binding factor 2, TRF2)、端粒保护蛋白1(protection of telomeres 1, POT1)、相互作用核蛋白2(TRF1-interacting nuclear protein 2, TIN2)、阻滞活化蛋白1(repressor activator protein 1, Rap1)以及TPP1构成^[1-2]。端粒保护蛋白复合体中的TRF2不仅是一种端粒保护蛋白,还能够独立于端粒之外抑制DNA损伤反应(DNA damage response, DDR),同时通过转录激活血小板源生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR β)促进内皮细胞

血管生成。近年来,随着分子遗传学研究的不断深入,逐步对TRF2有了充分的认识,本文就TRF2的结构、功能及其在肿瘤中的研究加以综述。

1 TRF2的结构与生理功能

1.1 TRF2的结构

TRF2基因定位于染色体16q22.1,基因全长30 kb。TRF2在人体中广泛表达,其主要包括碱性区(basic)、二聚化区(dimerization)、定向序列(NLS)和DNA结合区(Myb)4个结构域。其中,碱性结构域(basic)主要参与DNA损伤应答;二聚化结构域又称为TRF同源(TRF homology, TRFH)结构域,主要参与同源二聚体的形成;Myb结构域主要负责识别并结合到端粒DNA

作者单位:①川北医学院医学检验系(四川省南充市637000);②川北医学院转化医学中心

*本文课题受四川省科技厅2014应用基础研究项目(编号:2014JY0115)和四川省教育厅自然科学重点项目(编号:16ZA0224)资助

通信作者:郭晓兰 alan5200@hotmail.com

重复序列 TTAGGG 并与之结合^[3-4]。

1.2 TRF2 与端粒的结构和功能

端粒作为染色体末端的核酸蛋白质复合体,其正常功能的维持取决于端粒长度和端粒保护蛋白的共同作用。TRF2 是调节端粒完整性的关键因素,其主要通过 2 种途径来保护端粒:即抑制经典的非同源末端重组(classical non-homologous end-joining, C-NHEJ)DNA 修复机制和 ATM 依赖的 DNA 损伤信号转导途径。TRF2 缺失会导致端粒的去保护状态,激活 ATM 及下游信号通路。同时,TRF2 的缺失也会引起由 Ku70/80 和 DNA 连接酶 4 依赖的 c-NHEJ 调节端粒末端融合^[5]。当 TRF2 活性受抑时,端粒出现功能异常,导致 DNA 损伤灶产生,称之为端粒功能异常诱发的损伤灶(telomere dysfunction-induced focus, TIF)^[6],同时引起 DNA 损伤响应的相关因子聚集,如 53BP1、ATM、Mre11、RAD17 和 γ -H2AX 等。

TRF2 为端粒长度的负调控因子,Saint-leger 等^[7]研究发现 TRF2 可能通过其 N 端碱性区(basic)与解离酶相关蛋白 SLX4 以及参与解离活动的两种不同类型的内切酶 GeN1、MUS81 的相互作用来调控端粒长度。近期研究表明,TRF2 还可以通过其 N 端碱性区(basic)募集 Rap1 到端粒,以抑制同源末端重组修复(homology directed repair, HDR),从而调节端粒长度^[8]。

1.3 TRF2 与 DNA 损伤反应和基因组稳定性

真核生物的 DNA 损伤检控系统是维持细胞基因组稳定的一个重要机制,能够检测细胞出现的 DNA 损伤反应(DNA damage response, DDR)^[9],当 DNA 复制损伤或抑制 shelterin 复合体而导致端粒功能异常时,细胞 ATM 激酶信号活化,可激活端粒 DNA 损伤诱导的 ATM 信号转导通路,导致端粒发生 DDR,即为 ATM 依赖的 DDR。TRF2 则通过特异地抑制依赖 ATM 的信号通路,包括其下游因子 chk2 和 P53^[10-12],从保护染色体末端免于损伤,维持基因组的稳定性。另一方面,DNA 双链断裂(DSBs)的修复对维持基因组稳定也至关重要,修复途径主要包括非同源末端连接(NHEJ)和同源末端重组(HR)。TRF2 则主要是通过抑制经典的非同源末端连接(C-NHEJ)发挥作用。TRF2 与端粒 DNA 结合抑制 C-NHEJ,也可以通过与 ATM 的相互作用抑制 C-NHEJ 的激活^[5,13]。由 C-NHEJ 引起的染色体的改变,与人类肿瘤形成过程中的基因组不稳定性有关。因此,利用 TRF2 针对性抑制 C-NHEJ 可能会成为一种新的肿瘤治疗方法。

2 TRF2 在肿瘤中的作用研究

2.1 TRF2 与肿瘤发生

端粒功能异常在肿瘤发生中起着复杂的作用,

紊乱的端粒既可以通过诱导复制性衰老抑制肿瘤的增殖扩散,又可导致基因组的不稳定性、致癌基因重组而促进肿瘤的发生发展^[14]。TRF2 作为整个端粒结合蛋白复合体中的关键部分,其不仅直接参与 T 环、D 环的形成,维持染色体结构的完整性;同时通过抑制经典的非同源末端连接(C-NHEJ)DNA 修复机制和 ATM 依赖的 DDR,从而使染色体避免不正确的修复,维持基因组的稳定性。因此,TRF2 的表达或功能异常,都可能与肿瘤的发生发展密切相关。

TRF2 的高水平表达,已经在多种人类肿瘤中被观察到,包括肝癌、胃癌、结直肠癌、皮肤癌等,且随着肿瘤的进展其表达不断增强^[15]。提示 TRF2 可能是肿瘤发生发展过程中的一个危险因素。而有研究发现在低级星形胶质细胞瘤(low grade astrocytomas, LGA)中,TRF2 的表达明显升高,在间变型星形胶质细胞瘤(anaplastic astrocytomas, AA)与多形性星形胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)中 TRF2 的表达却呈进行性降低^[16]。与之类似,TRF2 在肿瘤早期上调,随肿瘤恶性程度增加反而下调的现象也出现在非小细胞肺癌^[17]和乳腺癌^[18]中。虽然在上述肿瘤的恶性进展中 TRF2 下调的原因尚不完全清楚。但是,在肿瘤发生早期 TRF2 的表达都一致升高,提示 TRF2 可能在肿瘤的发生早期中扮演着重要的角色。越来越多的研究表明 TRF2 的异常表达不仅与肿瘤发生相关,同时与细胞衰老也存在着紧密的联系,Zhang 等^[19]在恒河猴卵巢颗粒细胞中通过免疫荧光对 TRF2 和 DNA 双链断裂的标志分子 γ -H2AX 进行共定位检测,同时检测 DNA 损伤修复的标志蛋白 BRCA1 的表达,发现随着卵巢逐渐老化,DNA 双链断裂增强而修复减弱,证实 DNA 损伤和修复缺失与卵巢老化有关。而 Muñoz 等^[20]在小鼠皮肤组织中过表达 TRF2 后发现其端粒缩短,DNA 损伤反应增强,从而导致小鼠出现过早衰老表现和皮肤癌变的风险明显提高。因此,肿瘤和衰老的发生机制既相互对立又相互交织,而 DNA 损伤修复反应则是联系二者的纽带。

研究表明高水平 TRF2 的致癌机制可能包括:1)通过负调控机制引起了迅速、显著的端粒缩短,导致基因组不稳定而致癌基因重组;2)抑制了 ATM 依赖的 DNA 损伤反应,从而允许染色体畸变的积累以及异常细胞的继续生长;3)减少了有丝分裂阻滞后的细胞死亡,并推迟细胞进入危机状态,有利于细胞进入永生性;4)XPF/ERCC1 复合体通过核苷酸切除修复途径(nucleotide excision repair, NER)参与紫外线诱导的 DNA 损伤修复和 DNA 交联修复。而上调 TRF2 可以隔离端粒周围的 XPF/ERCC1,导致端粒的异常降解以及基因组其他 DNA

损伤部位的错误修复^[21-22]。

2.2 TRF2 与肿瘤治疗

2.2.1 TRF2 与肿瘤血管生成 众所周知血管生成对癌症恶化至关重要。抑制肿瘤血管生成是被广泛接受的一个癌症治疗选择,目前有很多癌症患者受益于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的抑制剂。研究发现 TRF2 在包括前列腺、胰腺、乳腺、肺以及肾脏等部位相关肿瘤的血管中,都呈高表达态势;并且 TRF2 能刺激内皮细胞的迁移、增殖和管样结构的形成,从而增加肿瘤血管生成^[23]。新的研究表明 TRF2 通过转录激活血小板源生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR β) 促进内皮细胞血管生成,该作用独立于 TRF2 的端粒保护作用^[24]。因此,与经典的抗新生血管疗法相比,以 TRF2 作为治疗靶标,可能成为癌症治疗的一大发展与进步。

2.2.2 TRF2 与肿瘤耐药 虽然放化疗在恶性肿瘤的治疗中具有重要作用,但肿瘤耐药依然是临床治疗的主要障碍之一,越来越多的研究发现 TRF2 可能与肿瘤耐药有关。Yang 等^[25]发现在具有放射抗性的 A549R 和 U2OSR 细胞中,TRF2 明显增高,降低 TRF2 表达可显著提高肿瘤细胞的放疗敏感性。Orun 等^[26]针对永生化间充质干细胞的研究中也发现相同结果,提示 TRF2 可能作为肿瘤的潜在放射治疗靶点。宁寒冰等^[27]研究发现 TRF2 在耐长春新碱的胃癌细胞系 SGC7901/VCR 和耐阿霉素的胃癌细胞系 SGC7901/ADR 中的表达明显高于其亲本细胞,提示 TRF2 可能与胃癌耐药相关,而抑制 TRF2 的表达能明显增强耐药细胞对顺铂、阿霉素、依托泊苷的敏感性,同时发现 ATM、 γ -H2AX 和 P53 在耐药细胞中的表达明显低于 SGC7901,且利用 shRNA 抑制 TRF2 表达后,ATM、 γ -H2AX 和 P53 表达明显上调,提示 TRF2 可能通过抑制 ATM 及其下游靶分子的表达参与肿瘤耐药的发生^[28]。Yordan 等^[29]研究也发现抑制 TRF2 的表达能明显增强口腔鳞癌细胞对靶向 EGFR 的化疗药物,如西妥昔单抗和厄洛替尼的敏感性,这可能成为癌症治疗的重要发展与进步。

2.2.3 靶向 TRF2 与肿瘤治疗 当用 siRNA 在结直肠癌和肾脏上皮肾细胞癌细胞系中沉默 TRF2 的表达后,肿瘤细胞的增殖和克隆形成都受到明显抑制,显著地诱导了细胞周期阻滞以及细胞凋亡^[30-31]。Bai 等^[32]通过颅内肿瘤异种移植实验,将慢病毒 shTRF2 和空载体感染的胶质母细胞瘤干细胞分别立体定位注射到无胸腺 BALB/c 裸鼠的大脑皮层中,发现实验组小鼠的寿命较对照组明显延长。表明降低 TRF2 的表达显著提高了胶质母细胞瘤模型裸鼠的生存

率。上述研究结果均表明 TRF2 可能成为新的抗肿瘤治疗靶标。同时,新的研究认为,与既往以抑制端粒酶来治疗肿瘤的策略相比,靶向 TRF2 的肿瘤治疗可能更为有效。主要原因为:首先,端粒酶抑制剂对依赖端粒延长替代机制(alternative lengthening of telomere, ALT)的肿瘤细胞无效;其次,在 TRF2 表达增高的肿瘤中,端粒酶抑制剂的治疗效果也并不明显^[33];而降低 TRF2 的表达会引起端粒的 3'悬突缩短,从而导致肿瘤细胞染色体融合,肿瘤细胞过早衰老或死亡。降低 TRF2 的表达可以激活磷酸化的 ATM 进而激活抑癌基因 p53, p53 不仅作为端粒损伤信号下游的效应分子,也是主要的衰老启动因子之一,其通过表达 Siah1 促进 TRF2 降解,抑制 ATM 的激活,故 TRF2-ATM-P53-Siah1 形成了一个正反馈环路,能够同时促进端粒脱帽进而诱导 p53 介导的细胞衰老信号转导通路,增大肿瘤细胞抑制效应^[34]。因此,靶向 TRF2 的肿瘤治疗具有极为广阔的应用前景。

3 结语

TRF2 主要通过对端粒末端的保护、长度的调节以及抑制 DNA 损伤反应,起到保护端粒结构和功能完整性以及基因组稳定性的作用。随着科学研究的深入,关于 TRF2 更多的新功能将被不断地发现,在肿瘤中的作用机制也将逐渐完善,必将有助于今后更深入地认识肿瘤发生发展,以及探寻肿瘤治疗的新方法、新策略。

参考文献

- [1] Saint-Leger A, Koelblen M, Civitelli L, et al. The basic N-terminal domain of TRF2 limits recombination endonuclease action at human telomeres[J]. Cell Cycle, 2014, 13(15):2469-2474.
- [2] Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres[J]. Nucleus, 2011, 2(2):119-135.
- [3] Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, et al. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2[J]. Nat Genet, 1997, 17(2):231-235.
- [4] Fairall L, Chapman L, Moss H, et al. Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2[J]. Mol Cell, 2001, 8(2):351-361.
- [5] Feuerhahn S, Chen L, Luke B, et al. No DDR at chromosome ends: TRF2 takes centre stage[J]. Trends in Biochem Sci, 2015, 40(5):275-285.
- [6] Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres[J]. Current Biology, 2003, 13(17):1549-1556.
- [7] Saint-Leger A, Koelblen M, Civitelli L, et al. The basic N-terminal domain of TRF2 limits recombination endonuclease action at human telomeres[J]. Cell Cycle, 2014, 13(15):2469-2474.
- [8] Rai R, Chen Y, Lei M, et al. TRF2-RAP1 is required to protect telomeres from engaging in homologous recombination-mediated deletions and fusions[J]. Nature Commun, 2016, (7):10881.
- [9] Verdun RE, Karlseder J. Replication and protection of telomeres[J]. Nature, 2007, 447(7147):924-931.
- [10] Fujita K, Horikawa I, Mondal AM, et al. Positive feedback between

- p53 and TRF2 during telomere-damage signalling and cellular senescence[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(12):1205-1212.
- [11] Horikawa I, Fujita K, Harris CC. P53 governs telomere regulation feedback too, via TRF2[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(1):26-32.
- [12] Okamoto K, Bartocci C, Ouzounov I, et al. A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection[J]. *Nature*, 2013, 494(7438):502-505.
- [13] Doksan Y, Wu JY, de Lange T, et al. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-Dependent T-loop formation[J]. *Cell*, 2013, 155(2):345-356.
- [14] Mar FA, Debnath J, Stohr BA. Autophagy-independent senescence and genome instability driven by targeted telomere dysfunction[J]. *Autophagy*, 2015, 11(3):527-537.
- [15] Hu H, Zhang Y, Zou M, et al. Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(9):1407-1414.
- [16] La Torre D, Conti A, Aguenou MH, et al. Telomere length modulation in human astroglial brain tumors[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5):e64296.
- [17] Lin X, Gu J, Lu C, et al. Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19):5720-5725.
- [18] Diehl MC, Idowu MO, Kimmelschue KN, et al. Elevated TRF2 in advanced breast cancers with short telomeres[J]. *Bre Cancer Res Tre*, 2011, 127(3):623-630.
- [19] Zhang D, Zhang X, Zeng M, et al. Increased DNA damage and repair deficiency in granulosa cells are associated with ovarian aging in rhesus monkey[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(7):1069-1078.
- [20] Muñoz P, Blanco R, Blasco MA, et al. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(7):718-721.
- [21] Patel TN, Vasan R, Gupta D, et al. Shelterin proteins and cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(8):3085-3090.
- [22] Hayashi MT, Cesare AJ, Rivera T, et al. Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection[J]. *Nature*, 2015, 522(7557):492-496.
- [23] El Maï M, Wagner K, Michiels J, et al. The telomeric protein TRF2 regulates angiogenesis by binding and activating the PDGFR β promoter[J]. *Cell Reports*, 2014, 9(3):1047-1060.
- [24] Mai ME, Wagner KD, Michiels JF, et al. TRF2 acts as a transcriptional regulator in tumor angiogenesis[J]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2(3):e988508.
- [25] Yang X, Li Z, Yang L, et al. Knockdown of telomeric repeat binding factor 2 enhances tumor radiosensitivity regardless of telomerase status[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(9):1545-1552.
- [26] Orun O, Tiber PM, Serakinci N. Partial knockdown of TRF2 increase radiosensitivity of human mesenchymal stem cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, (90):53-58
- [27] Ning HB, Li JC, Liu ZG, et al. DNA damage increases telomerase activity and mRNA expression of telomeric repeat binding factor 2 in gastric cancer cells[J]. *World Chin J Digest*, 2006, 14(10):942-946. [宁寒冰,李继昌,刘志国,等.DNA损伤诱导胃癌细胞端粒酶活性和TRF2表达增高[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(10):942-946.]
- [28] Ning HB, Wang YH, Zhang LF, et al. Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by telomeric repeat binding factor 2 small interfering RNA[J]. *Chin J Diges*, 2011, 31(7):481-483. [宁寒冰,王艳红,张连峰,等.端粒重复序列结合因子2小干扰核糖核酸逆转胃癌细胞多药耐药性的研究[J]. *中华消化杂志*, 2011, 31(7):481-483.]
- [29] Yordan B, Vincent P, Hélène R, et al. Telomeric repeat-binding factor 2: a marker for survival and anti-EGFR efficacy in oral carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):44236-44251.
- [30] Dong W, Shen R, Wang Q, et al. Sp1 upregulates expression of TRF2 and TRF2 inhibition reduces tumorigenesis in human colorectal carcinoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(22):2166-2174.
- [31] Pal D, Sharma U, Singh SK, et al. Over-expression of telomere binding factors (TRF1 & TRF2) in renal cell carcinoma and their inhibition by using siRNA induce apoptosis, reduce cell proliferation and migration invitro[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(3):e115651.
- [32] Bai Y, Lathia JD, Zhang P, et al. Molecular targeting of TRF2 suppresses the growth and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. *Glia*, 2014, 62(10):1687-1698.
- [33] Bidzinska J, Baginski M, Skladanowski A. Novel anticancer strategy aimed at targeting shelterin complexes by the induction of structural changes in telomeric DNA: hitting two birds with one stone[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(2):201-216.
- [34] Horikawa I, Fujita K, Harris CC. P53 governs telomere regulation feedback too, via TRF2[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(1):26-32
- (2017-03-20 收稿)
- (2017-05-16 修回)
- (编辑:孙喜佳 校对:张侃)

作者简介

孙茹 专业方向为端粒保护蛋白在肿瘤发生发展中的机制研究。

E-mail: 415028193@qq.com

