

目錄

中文摘要	2
英文摘要	4
緒言	
一、 染色體終端與染色體終端	6
二、 染色體終端 與細胞的老化之間關係	9
三、 染色體終端 與細胞腫瘤之間關係	11
四、 台灣肺癌	15
研究動機	17
實驗材料	19
實驗方法	22
實驗結果	35
實驗討論	42
圖表與圖表說明	53
參考文獻	69

摘要

染色體終端序列 (telomere) 位於染色體兩端，由簡單重複核 酸序列 (TTAGGG) 所組成，可提供染色體完整性及穩定性，避免與其他染色體發生融合或重組現象而引起染色體結構改變。染色體終端 (telomerase) 是一種核糖核蛋白複合酵素，主要是由蛋白質及 RNA 成分所組成，染色體終端 會以本身 RNA 分子當作模版來複製終端序列，使染色體終端延長並穩定染色體結構。在人體很多器官的癌化組織多會表現出染色體終端 活性，與人類腫瘤有著密切相互關係，但在正常體細胞卻很少有此酵素的活性，顯示此酵素活性的表現可能和細胞癌化有關。終端 的活化在細胞的不死及癌化扮演著關鍵角色。在本研究中，分別使用 TRAP 反應及 RT-PCR 方法測人類非小細胞肺癌 (NSCLC) 的終端 活性及反轉錄酵素次單元 h.TERT mRNA。研究結果顯示終端 在肺癌細胞株 (H1299) 有活性表現，而在正常肺細胞 (MRC-5) 則無此酵素活性，另外在 28 例台灣非小細胞組織有 24 例被證明含有終端 活性 (佔 85%)，反轉錄催化次單元是終端 活性表現的速率決定步驟，利用 RT-PCR 來偵測肺癌 hTERT mRNA 表現，結果在三株肺癌細胞株 (H1299、A427 及 CL-3) 均有表現，在正常肺細胞 MRC-5 則沒有 hTERT mRNA 存在。另外在 56 例台灣非小細胞組織有 45 例被證明含有 hTERT mRNA (佔

80%)。雖然終端 活性與腫瘤相關性陸續被研究證實，但如何被活化及調節，此機制尚未清楚的被瞭解。因此本研究利用基因選殖方式，選殖出 RNA 模版啟動子 (tel-p) 及反轉錄催化次單元 (tert-p)。利用共同轉染方式將 Bcl-2 B[a]P 或者野生型 p53 和含有螢光酵素活性的載體，送入肺癌細胞株 (H1299)，結果顯示出，Bcl-2 與 B[a]P 會活化 tel-p 轉錄活性而 p53 則有抑制現象，但是在 tert-p 則沒有活化或抑制其轉錄的情形。藉由測定終端 活性，來診斷及追蹤肺癌，並且瞭解其作用機制，研發新的治癌方法，可能在未來治療肺癌上扮演著不可或缺的重要角色。

ABSTRACT

Telomere are the distal ends of human linear chromosome composed of tandem of sequence TTAGGG. The role in maintaining chromosome stability and prevention of chromosome degradation, end-to-end fusion, rearrangement. Telomerase is an RNA-dependent ribonucleoprotein enzyme capable of adding short repetitive telomeric sequence to the ends of the chromosome. This protein is thought to be essential for the acquisition of cellular immortality, because of its ability to overcome the reduction of chromosomal ends that occurs normally in somatic cells during cell divisions. Recently, telomerase activity has been detection in the tissues of human cancer but not in the majority of normal that may play a role in tumorigenesis. Therefore the activation of telomerase activity may be a rate-limiting or critical step in cellular immortality and oncogenesis. In the present study, we focus on elucidating the change and the possible relationship of telomerase activity and the telomerase catalytic subunit (TCS) status in non small cell lung cancer patients and RT-PCR assay. Telomerase activity was demonstrated in 22 of 28 lung cancer tissue (85%), and lung cancer cell line (H1299), but was not found in normal lung cell line (MRC-5). We evaluate the rate-limiting

determinant of telomerase activity is telomerase catalytic subunit of the lung tumor cell lines and tissue using RT-PCR. Three lung cancer cell lines (H1299, A472 and CL-3) and 45 out of 56 lung cancer tissue (85%) expressed TCS, but TCS was not found in normal lung cell line (MRC-5). However, although the enzymatic activity of telomerase has been well studied, but the factor and mechanisms involved in telomerase regulation in lung cancer are not well understood. Therefore we have cloned the promoter of human telomerase RNA (tel-p) and telomerase catalytic subunit (tert-p) gene. During apoptosis or anti-apoptosis and determine whether these pathways differ in the modulation of tel-p and tert-p expression in cancer progression .We study their transactivation properties of Bcl-2, B[a]P or wild type p53 by co-transfection them with a luciferase reported plasmid carrying the tel-p and tert-p gene into the NSCLC (H1299) cell line. The results of this study showed that tel-p was activated by Bcl-2 or B[a]P and repressed by wild type p53 but was not found in tert-p. These findings suggest that measuring telomerase activity would be useful diagnosis and in the future may have implication for inhibition telomerase activity as an anti-tumor therapy in non-small cell lung cancer.

緒言

一、染色體終端與染色體終端

染色體終端序列 (telomere), 含有簡單重複 (tandom repeat) DNA 序列, 主要位於染色體的兩端, 扮演著穩定 DNA 結構及避免染色體遭受到破壞或不正常重組現象, 與維持染色體的完整及穩定性有關 (Blackburn et al., 1991)。早在 1930 年 Hermann J. Muller 及 Barbara McClintock 分別在果蠅及玉米染色體兩端發現有一像蓋子似的特殊組成, 可提供染色體完整性。Muller 將之命名為 “telomere”, 乃是來自希臘字 “telo” 代表終端 “mere” 表示部分 (Greider et al., 1996), 而 McClintock 則注意到如果沒有 telomere, 染色體就會發生末端與末端融合現象, 產生不穩定現象 (McClintock 1941)。染色體終端序列早期發現於單細胞纖毛蟲 Tetrahymena, 它是由一連串很短又一再重複的核 酸序列 (TTAGGG) 所組成 (Blackburen et al., 1978)。後來陸續找出其它生物終端序列的組成, 發現許多真核生物, 其染色體兩端都是由簡單而且重複的序列, 此重複的序列通常含有很多鳥糞嘍呤“G”。例如哺乳類及人類其染色體終端序列都是由 5'-TTAGGG-3' 所構成, 其全長為 15Kb (Greder et al., 1996)。一般真核生物的染色體 DNA 呈現直線狀, 當 DNA 在進行半保留方式複製 (semiconservative replication) 時, 引子合成酵素 (primase) 會先

製造引子 (primer) 黏附在親代帶染色體 DNA 上，然後 DNA 聚合酵素 就會複製出子代股 (daughter strand) 複製完畢之後，另外一個 DNA 聚合酵素 會將引子移走，連接酵素 (ligase) 將縫隙 (gap) 補滿 但卻無法將子代股的 5' 端填滿因而產生染色體終端複製問題 (end replication problem) 而留下缺口。所以細胞在每次分裂時其染色體終端大約會減少 50-60bp，如此一來經過 100 次細胞分裂之後終端序列 便會逐漸消失，細胞便會衰老 (senescence) 或死亡 (Wynford et al., 1997)。這現象可由纖維母細胞 (fibroblast) 的體外 (In vitro) 實驗 結果證實，即染色體終端長度與細胞分裂次數有很大關連性 (Harley et al., 1990)。然而生殖細胞情形有別於體細胞，例如卵母細胞或精母 細胞，其染色體終端長度並不會隨著細胞分裂以及年齡的增加而有顯 著的減短。研究發現這情形主要是因 germ line 組織的終端酵素 (telomerase) 呈現活化的狀態，使得能維持終端序列的一定長度，而不 受染色體複製問題影響變短 (Counter et al., 1992)。然而終端酵素的活 化是否與防止染色體終端序列的縮短有關，並且在維持染色體完整性 或細胞老化及腫瘤的形成上扮演何種角色？

染色體終端 (telomerase) 是一種核糖核蛋白酵素，屬於特殊的 DNA 聚合，過去的研究發現，終端 與很多癌症的激發或形成有 密切關係，其原來的機制是用來產生和支持真核細胞的染色體終端

DNA (Biessmann et al.,1992)。

染色體終端 主要由三個次單元 (subunit) 所構成。 一、 telomerase RNA : 簡稱 h.TR , 位於第 3 對染色體 3q21-q28 , 主要當作複製模版 , 含有重複的 11 個核苷酸 5' -CUAACCCUAAC-3' 序列 , 此序列會與染色體終端 (TTAGGG)互補。 先前研究 germ line 組織與腫瘤細胞會比正常細胞及組織更容易表現出 telomerase RNA 次單元。 在人類細胞株終端 的複製模版發生突變通常會影響到本身活性的表現。 1995 年 Feng 利用基因選殖方式 (cloning)將選殖出來 telomerase RNA 與(anti-sence)反股 telomerase RNA 序列共同轉染至人類子宮頸癌 (HeLa)細胞株 , 結果發現會導致染色體終端序列縮短 , 以及產生細胞死亡情形 (Feng et al., 1995)。 二、 telomerase associated protein : 簡稱 h.TP , 位於第 14 對染色體 14q11.2 , 早期是在單細胞纖毛蟲發現 , 其分子量分別為 80 及 95 kDa (P80 & P95)。 P80 主要功能是與 telomerase RNA 鍵結與終端 有相互關連性 , 另一個 P95 主要是鍵結在終端序列上 , 可能與穩定終端 結構有關(Harrington et al., 1997)。 但 h.TP 其調控終端 機制並不清楚 , 在 1996 年 Autexier 認為 telomerase associate protein 並不是影響染色體終端 活性的重要次單元 (Auterier et al., 1996)。 三、 telomerase catalytic subuint : 簡稱 h.TERT , 位於第 5 對染色體 5p15.33 , 最早從原生動物所分離純

化,其分子量為 123kDa (P123),以及在釀酒酵母菌中發現,簡稱 EST2 反轉錄酵素。此外 Lingner 進行把釀酒酵母菌中的 EST2 移除的實驗中發現會導致終端序列縮短或細胞衰老。並且指出此次單元可能與延長終端序列有關,是催化終端 活性的速率決定步驟 (Linger et al., 1997)。終端 是 RNA 與蛋白質的複合酵素,其 RNA 模版會與染色體終端序列呈互補 (complementary) 關係,因此以 RNA 為模版時,在反轉錄酵素次單元催化作用之下,終端酵素可製造一段相同於終端的 DNA 連接在染色體 3' 端,使染色體不會因複製問題而縮短,使細胞具有無限分化能力 (Harley 1990, Counter 1992)。染色體終端 會在缺失的終端序列增補 DNA,發生一連串的 DNA 複製與細胞分裂機制中 (Watson, 1972 ; Olovnikov, 1973),其活性表現可能與惡性腫瘤形成及轉移性質有著密切關係 (Lange. 1994)。一般正常體細胞是無法偵測到終端 活性,但例外情形見於胚細胞、造血原細胞、淋巴球及表皮角質化細胞四種 (Broccoli et al.,1995; Harley et al., 1996)。

二、染色體終端 與細胞的老化之間關係

染色體終端長度會隨著時間的變化在人類細胞的老化上扮演著重要角色。幾乎所有具有細胞核的生物均會合成終端 ,其組成隨著生物之不同而異 (Greider et al., 1985; Zahler et al., 1988)。然而正常人

類體細胞會隨著細胞分裂的進行，其染色體終端上的 DNA 片段會逐漸縮短，顯示終端並非隨時皆處於活化態。此外亦發現某些人體組織及細胞中的染色體終端長度會隨老化的進行而減少 (Hastie et al., 1990; Harley et al., 1990)。在 1960 年代，許多研究人員認為人類的細胞是可以永無止盡一直分裂下去，但 Hayflick 卻證明了這觀念是錯誤的 (Hayflick & Moorhead, 1961)。目前已知從人類新生胚胎細胞衍生出來的細胞培養約可以分裂 80-90 次，然而若從老人的細胞培養，大約只能分裂 20-30 次 (Greider & Blackburn, 1996)。所以細胞並不是可以無限制分裂，當細胞不再進行分裂就會如 Hayflick 所形容變成衰老的 (senescent) 細胞，接著走向死亡。在 1970 年代 Olovnikov 認為細胞逐漸停止分裂是因為染色體逐漸縮短，可能認為終端是細胞複製次數及繁殖潛能 (proliferation potential) 的指標，即終端長度之變化可能是細胞的分裂定時器 (mitotic clock)，控制細胞何時應進入危機期及不死期 (Autexier & Greider, 1998)。1991 年 Harley 提出“染色體終端假說 (telomere hypothesis) 內容指出：配子形成時期出現之染色體終端酵素活性，可維持親子代 (generation) 間生殖細胞之染色體終端序列長度的恆定；當分化形成體細胞後，則會喪失了終端的活性。所以，體細胞分裂時，染色體終端複製問題或其他原因造成終端 DNA 受損，會使染色體終端序列愈來愈短，當超過一條以上的染色

體終端序列短到一定值時—類似細胞週期的關卡 (cell cycle checkpoint), 會傳達出使細胞停止分裂的訊息, 在這個時期—即衰老期 (又稱 M1, 即 motality stage I), 可以看到許多染色體不正常的情形, 如雙中節 (dicentric)等, 可能是喪失染色體終端保護功能所造成。有些細胞的基因變異; 如抑癌基因 p53、pRB 被抑制, 或是病毒致癌基因 (oncogene) 的激活, 均會使細胞逃過細胞週期的關鍵點, 帶著變異的基因繼續存活下去。但是細胞若繼續分裂, 則染色體終端序列繼續變短, 終至有一個以上的染色體完全喪失染色體終端序列或染色體終端長度達到最短極限值—此時即危機期 (又稱 M2, 即 motality stage II), 幾乎所有的細胞都會死亡。能逃過危機期進入不死期的少數倖存細胞, 可能是因為染色體終端 被激活, 得以補修染色體終端長度變化, 穩定染色體末端, 故可以無限增殖。

三、染色體終端 與細胞腫瘤之間關係

癌症起因是由於細胞的多重基因發生突變以及細胞不正常增殖的表現, 導致其 DNA 複製及細胞週期脫離正常軌道。亦即是腫瘤細胞具有不斷分裂的能力而不受生長限制的特性。有些學者認為, 染色體終端 的缺乏與人類體細胞的增生能力的減少有關, 並且指出正常細胞之分裂能力有一定限制係由於染色體終端序列逐漸縮短的緣故

(Harley et al., 1990)。一個正常細胞其染色體終端序列長度會隨著細胞分裂次數增多而減短，以致無法一直增殖下去，但是腫瘤細胞較易渡過衰老死亡的危機期，可能是此時例如致癌基因 (myc) 激活終端 活性表現，以修補或提供維持終端序列的長度。因此在癌症的形成過程當中，可能需要終端 的活性來幫助細胞不斷分裂。染色體終端變短可視為是一種抑制腫瘤的機制。抑制終端 活性表現可使細胞在分裂過程中漸漸失去染色體終端 DNA 片段，而延緩腫瘤的生長，甚至在造成細胞損傷之前死亡。癌細胞若能製造終端酵素的話，則便能維持染色體終端長度，細胞便可能會無限期的分裂與增生下去 (Greider & Blackburn 1996)。在正常的情況下，染色體終端 的表現並非為所有器官及細胞的特徵，僅限於具有修補能力而能持續增生的體組織或細胞。在一般老鼠細胞的終端序列長度要比人類細胞的終端序列來得長，在老鼠的許多體細胞也常可偵測到終端 的活性，且終端序列並沒有縮短現象(Kipling & Cooke 1990)。然而在基因轉殖鼠 (transgenic mice) 的動物實驗中，發現終端 是在癌化過程末期才出現的，而且並非百分之百的惡性腫瘤皆有終端酵素活性 (Blasco et al., 1996)，在基因移除老鼠 (knock out mice) 的實驗中，卻意外發現移除了終端酵素 RNA 組成分 (mTR^{-/-}) 的老鼠，細胞內雖然沒有終端 活性，但卻可存活達六代，而且仍然有培養成為不死細胞株的能力，也可以被病

毒致癌基因轉型，並可在裸鼠 (nude mice) 身上產生腫瘤 (Blasco et al.,1997)。但在第五，第六代基因移除鼠 (mTR^{-/-})，其體內細胞汰換率 (turn over rate)高的器官組織 (highly proliferative organ) 如骨髓，肝臟以及生殖器官 (如睪丸) 的細胞增殖能力都有下降的情形，因此終端酵素活性及維持終端序列長度的能力在這些細胞汰換率高的器官中，長期是相當重要 (Lee et al.,1998)。據推測，在正常老鼠細胞中，終端酵素的活性可以反映出其容易不死的特性 (Prowse & Greider 1995)。染色體終端 首先在人類癌症細胞中發現是在 1994 年，由 Counter 在卵巢癌中細胞發現。而在同年 Kim 也發現終端 活性與人類癌症有關連性，他們在 101 例來自 12 種不同癌組織的檢體中，發現有 90 例可測出終端酵素活性，然而 50 例正常組織的對照組都沒有終端酵素活性存在。此外，在 100 例不死亡的細胞株中，也有 98 株具有終端酵素活性表現 (Kim et al.,1994)。之後陸續在這幾年的研究發現許多人類的腫瘤組織都可以偵測到終端 活性，例如：胃癌 (Hiyama et al ,1995)、子宮頸癌、卵巢癌 (Kyo et al , 1996)、腦癌 (Counter et al , 1994)、前列腺癌 (Sommerfeld et al , 1996)、膀胱癌 (Lin et al , 1996)、急性骨髓性白血病 (Zhang et al ,1996)、乳癌 (Bednarek et al ,1997)、胰臟癌 (Hiyama et al , 1997)、肝癌 (Tahara et al ,1995)、尿道癌 (Ito et al ,1998)、結腸癌 (Hiyama et al ,1996)。此

外腦膜瘤 (meningiomas)雖然只有 50%偵測到終端酵素活性，但其中高達 95%在組織病理上確定為惡性腫瘤，顯示染色體終端酵素活性在這類癌症當中，為很好的預後指標 (Langford et al ,1997)。至於肺癌組織染色體終端活性的研究上，較早由 Kim 等人報告在 18 例肺癌組織發現 18 例皆有此酵素活性，而正常 3 例組織無此活性 (Kim et al, 1994)。此外在 1995 年 Hiyama 分析 136 例肺癌病人組織終端酵素活性，結果發現在 125 例非小細胞肺癌 (NSCLC 即 non-small-cell lung cancer)中有 98 例具有活性反應，其中腺癌佔了 45 例，鱗狀上皮細胞癌佔 46 例。此外 11 例小細胞肺癌 (SCLC 即 small-cell lung cancer)均有活性表現。作者認為偵測染色體終端可當作診斷肺癌的生物指標 (Hiyama et al 1995)。此外也有用支氣管沖出液來分析肺癌終端酵素活性 (Yahata et al ,1998)。之後在 1996 與 1999 年陸續有學者使用 TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) 染色體終端重覆增幅步驟分析法檢測肺癌，其結果是約有 70~80%的肺癌具有染色體終端酵素活性表現，而在腫瘤附近的正常組織比較少被偵測到 (Hirashima et al ,1998 , Marchetti et al ,1999)。

四、台灣肺癌

在美國不論是男性或者是女性，肺癌是引起死亡的主要癌症

(Rush et al.,1997)。根據衛生署完成的民國 88 年台灣地區十大死因統計，癌症依然高居首位，其中肺癌發生率佔男性腫瘤第二位，女性腫瘤的第四位，並且發現在 88 年成為癌症死因之首，根據世界衛生組織統計，肺癌是近廿年來，人類癌症死亡率增加最快的癌症，增加率為 319%。其中非小細胞癌則佔台灣肺癌將近九成的比例。肺癌的臨床表現上，肺癌的症狀有咳嗽、咳血、胸痛、哮鳴、喘鳴及氣促。若是腫瘤壓迫到上腔靜脈，會使上半身的靜脈血液返回心臟受阻，造成病人頸部及臉部腫脹，上肢浮腫、血管怒張，嚴重者有呼吸困難、腦壓升高、意識不清等「上腔靜脈症候群」。肺癌的診斷，詢問病人關於個人及家庭成員的過去病史，包括抽菸狀況及工作史，並做一些身體檢查、胸部 X 光及其他檢查，如痰液的細胞學檢查、胸部 X 光及電腦斷層掃描檢查、支氣管鏡檢查、經皮穿胸細針抽吸及切片檢查、胸腔穿刺術、開胸剖探術。同時，肺癌容易轉移到骨頭、肝臟、腦部、兩側腎上腺及骨髓，安排全身骨骼掃描檢查來偵測是否有骨頭轉移；利用放射性核子掃描或電腦斷層掃描檢查有無腦部轉移；胸部電腦斷層掃描可了解胸腔附近的組織及淋巴侵犯程度。肺癌的治療與預後肺癌常用的治療方法有外科手術、放射線治療、化學治療或合併使用這幾種治療方法。小細胞肺癌 小細胞肺癌生長得很快，很容易迅速擴散至其他器官，初期對化學藥物或放射線治療的反應極為敏

感。由於診斷時常有遠處隱藏或明顯地轉移，因此治療上還是視為全身性疾病，採用全身性化學藥物治療為主，所以不主張採取手術治療。小細胞肺癌多發生在男性，占台灣肺癌的 12%。非小細胞肺癌相對於小細胞肺癌，非小細胞肺癌的生長較緩，轉移發生也較慢，對化學治療及放射線治療的反應較差，唯一能夠根治的機會就是手術徹底切除。這種肺癌占台灣肺癌 88%，依腫瘤細胞型態，可分為腺癌、鱗狀細胞癌及大細胞癌。其中，腺癌占非小細胞肺癌 50%，為肺癌中最常見的型態，多發生在女性，抽菸者與不抽菸者機會相等，也是女性及不抽菸者得到肺癌最常見的類型。有關非小細胞肺癌病人的預後，目前國內醫學中心的追蹤報告指出，第一期非小細胞癌病人的手術結果最好，五年存活率 50%至 75%；第二期 30%至 50%；第三期僅有 5%至 25%；晚期非小細胞癌，少有存活到五年之久（行政院衛生署.,1998）。

研究動機

染色體終端 活性普遍存在於癌化組織中，但在正常的體細胞，除了會分裂的細胞組織及活化的淋巴細胞外，卻很少有此酵素的活性存在，顯示此酵素活性的表現可能與細胞癌化有關。本研究欲以 TRAP assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) 終端序列重覆增幅步驟來探討能否應用終端 活性作為肺癌預後指標，評估藉由測定肺癌細胞及組織的終端 活性，達到早期診斷肺癌的可行性。一般而言反轉錄酵素次單元 (h.TERT)，是決定催化酵素活性表現的主要次單元，因此本實驗以 RT-PCR 方式偵測肺癌組織的反轉錄酵素次單元 h.TERT mRNA 的表現情形。由於啟動子 (promoter)轉錄活化會關係到 h.TERT mRNA 量的表現。而且啟動子的轉錄結合區域會受外來因子所調控，例如在先前有研究指出終端 可能會藉由 p53 來調控終端的活性，此外 Bcl-2 也可利用 anti-apoptosis 路徑來調節此活性表現。由此可知 Bcl-2 與 p53 在終端 活性表現上均扮演著關鍵角色，因此本論文想知道 Bcl-2 與 p53 是否會藉由啟動子轉錄結合區來調控終端 活性表現。本研究將 RNA 模版啟動子 (telomerase RNA promoter) 與反轉錄 啟動子 (telomerase reverse transcriptase promoter) 接在含有螢光酵素 (luciferase) 的載體上，利用共同轉染方式 (Co-transfection) 將 Bcl-2 或 p53 送入肺癌細胞 (H1299) 來分

析染色體終端 的調控情形。肺癌的分子異常的順序調控目前還尚未清楚了解，肺癌的生物特性也正在著手積極研究中。確認 RNA 模版啟動子及反轉錄 啟動子在肺癌細胞中的轉錄調控區域，可更加瞭解染色體終端 活化的分子機制，便能早期了解終端 在肺癌的作用機轉，以利於發展新的抑癌藥物，將來可應用在肺癌診斷上，期望病患能夠得到較理想的治療效果。

實驗材料

酵素

- (1) Taq DNA polymerase (Hi-Tag 購自於快興)、T4-Ligase、RNaseA、Klenow enzyme、購自於 Takara (SHUZO CO., LTD., Kyoto,Japan)。
- (2) RNase inhibitor、M-MLV RT RNase、*SmaI*、*EcoRI* 購自於 Promega (Madison,WI,UAS)。
- (3) Restriction enzyme : *XhoI*、*NheI*、*HindIII*、*BamHI*、*KpnI* 購自於 Takara (SHUZO CO., LTD., Kyoto,Japan)。

藥品

- (1) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Basal Medium Eagle (BMN)、F-12 Medium、fetal bovine serum (FBS)、penicillin/streptomycin 購自 GIBCO BRL (Gaithersburg,MD,USA)。
- (2) Ammonium persulfate (APS)、acrylamide、chloroform、isopropanol、Sodium Bicarbonate (NaHCO_3)、2-mercaptoethanol、tetramethylethylenediamine (TEMED)、Benzamidine、CHAPS lysis buffer、kanamycin、SDS、Sodium acetate、benzo[a]pyrene (B[a]P) 購自於 Sigma (St.Louis MO,USA)。
- (3) Reporter lysis buffer、Sodium carbonate、Luciferase assay substrate

購自於 Promega (Madison, WI, USA)。

(4) 細胞培養皿由丹麥 Nunc 公司購得。

(5) LB agar、LB broth 購自於 Pronadisa。

(6) Sodium Hydroxide (NaOH)、Glycerol 購自於 Wako(Osaka, Japan)。

(7) Sodium chloride 購自於 Merck (Darmstadt, Germany)。

(8) Bio-Rad protein assay reagent 由美國 Bio-Rad 公司購得。

(9) DOTAP Liposome Transfection Reagen , ampicillin 購自於 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)。

(10) dNTPs , Lymphocyte isolation sterile solution (Ficoll paque) 購自於 Pharmacia (Uppsala, Sweden)。

細胞

(1) MRC-5 與 WI-38 購自食品工業發展研究所。

(2) H1299 由中研院李德章博士所贈與。

質體

(1) BMN cloning vector 購自 stragtagen。

(2) PGL-3 basic vector 購自 promega。

(3) β -Galactosidase control vector 由中山醫學院牙研所楊肇基老師所提供。

常用儀器

- (1) 37 恆溫細胞培養箱：Forma Scientific
- (2) 倒立式顯微鏡：OLYMPUS-CK40
- (3) 高速離心機：Kubota 2010
- (4) 微量冷凍離心機：Biofuge
- (5) 真空乾燥機：Savant speed vaccum sc110
- (6) 光譜分析儀：HITACHI U-1500
- (7) 鏈聚合 連鎖反應器：Perkin Elmer 2400 PCR system
- (8) 冷光儀：TD-20/20 luminometer
- (9) 37 恆溫迴旋式震盪培養箱：Firstek Scientific S300R
- (10) 電源供應器：Major Science MP-250
- (11) 迷你垂直電泳槽：Hoefer
- (12) 電泳轉漬槽：BIO-RAD
- (13) pH meter：JENCO microcomputer model 6200
- (14) 高壓殺菌斧：TOMIN TM322
- (15) 無菌操作台：HIGH TEN SCIENTIFIC CORPORATION ,

Laminar flow

實驗方法

一、細胞之蛋白萃取

細胞生長於 10 公分培養皿，生長之七、八分滿時，以 PBS 緩衝液 (8 g/L NaCl , 0.2 g/L KCl , 1.4 g/L Na₂HPO₄ , 0.2 g/L KH₂PO₄) 洗三次，刮下細胞，加入 200 微升 1X CHAPS Lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5 , 1 mM MgCl₂ , 1 mM EGTA , 0.1 mM Benzamidine , 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5 % CHAPS , 10 % Glycerol) 與 RNase inhibitor 混合均勻，至於冰上作用 30 分鐘，然後 4 °C 離心 12000 rpm , 20 分鐘，取上清液 160 微升至新管，再以蛋白定量分析。

二、組織之蛋白萃取

將肺癌組織 40 至 100 毫克，加入 200 微升 1X CHAPS Lysis buffer 利用玻璃研磨器研磨組織，置於冰上作用 30 分鐘，4 °C 離心 12000 rpm , 20 分鐘取上清液 160 微升至新管，再以蛋白定量分析。

三、蛋白定量分析

首先以 Bio-Rad reagent : ddH₂O 以(1 : 4)之比例稀釋混合，成為 Bio-Rad working reagent，並取代測物 5 微升與標準品 (BSA) 2.5 微

升、5 微升、10 微升、15 微升、20 微升與已經稀釋的 1ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後，以分光光度器（Chitachi.U1500）分析於波長 595 nm 測可見光吸光值，由濃度對吸光值得依標準曲線圖。未知濃度的蛋白質溶液與 Bio-Rad working reagent 反應所得的吸光值由標準曲線圖就可得知其濃度。

四、染色體終端 重覆增幅步驟 (Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP assay) (Falchetti et al., 1998)

取蛋白萃取液 2 微升 (50 ng/ μ l), 加入 5 微升 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, PH 9.0 , 25 mM MgCl₂ , 500 mM K₂O , 0.1 % gelatin), 2 微升的 10 mM dNTPs 和各 2 微升的 10 pmol TS (Telomerase Substrate) primer 及 Cxa reverse primer , 加入 1 微升的 Hi-Tag DNA polymerase (5 單位/微升), 最後加入二次蒸餾水至 50 微升作用 30 , 30 分鐘。反應條件：94 , 1 分鐘 , 54 , 1 分鐘 , 72 , 1 分鐘 , 上述條件進行 35 cycle , 72 反應作用 10 分鐘, 取 30 微升 PCR 產物, 進行 110 伏特 2 小時 , 12% acrylamide gel 垂直電泳分析 , 最後用 ethidium bromide (EtBr) 染色觀察。

五、染色體終端 活性分析 (Total Product Generated, TPG)

將已用 ethidium bromide (EtBr) 染色過後的 acrylamide gel, 利用數位化影像分析系統 (AlphaImagerTM200, Alpha Innotech Corporation) 在 UV 燈下依據染色強度作定量分析, 其計算公式如下。

(樣本未經過 RNase A 處理-樣本經過 RNase A 處理)/ 未經過 RNase A 處理的 internal control

[TSR8(positive control)-CHAPS lysis buffer(negative control)]/TSR8 internal control

六、反轉錄 鏈聚合 連鎖反應(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

(A) 肺組織 RNA 之抽取

取 50 至 100 毫克肺癌組織, 使用液態氮將之硬化, 至於研鉢中磨粉末。迅速置入新離心管中, 加入 0.5 毫升的萃取液 (0.4 M guanidinium thiocyanate, 5 mM β -MSH, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 10 % N-lauroyl sarcosine) 和 0.5 ml 的酚: 氯仿(v/v=1:1), 震盪混合, 置於冰上 10 分鐘後, 以 12000 rpm 離心 10 分鐘, 取出上清液, 加入 1/10 體積的 4.4 M 醋酸氨, PH 5.2。然後加入等體積的異丙醇, 混合均勻後, 在 4 °C 下離心 12000 rpm, 15 分鐘。得到沈澱物, 風乾後, 加入 0.05 毫升的溶解液(5 mM EDTA,

0.5 % sarcosine 及 5 % MSH) 溶解 RNA , 在 4 °C 下離心 13000 rpm 去除不溶物。上清液於 260 nm 波長與 280 nm 波長測其吸光度 , 其比值應大於 1.8 以上。將 RNA 分裝 , 儲存於零下 70 °C 冰箱。

(B) c-DNA 合成 (採用 Promega CLONTECH advantage RT-for-PCR Kit 方法)

第一股 cDNA 合成 :

取 Poly (A)⁺ RNA 5 微克 , 加入 1 pmole 的 oligo (dT)₁₅ (1 微克/微升) , 均勻混合後。在 70 °C 水溶液中加熱 5 分鐘後置於室溫 10 分鐘 , 依次加入 10 微升 5X MMLV buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 , 375 mM K₂O , 50 mM DTT , 2.5 微升 10 mM dNTPs , 15 mM MgCl₂) 和 1 微升 RNase inhibitor (40 單位/微升) , 最後加二次蒸餾水至 49 微升。將上述反應溶液靜置室溫 5 分鐘後加入 1 微升 AMV 反轉錄 (200 單位/微升) , 42 °C 反應作用 1 小時。

(C) 鏈聚合 連鎖反應

取 0.5 微克的 cDNA , 加入 5 微升 10 X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0 , 25 mM MgCl₂ , 500 mM K₂O , 0.1 % gelatin) , 2 微升的 10 mM dNTPs , 和各 2 微升的 10 pmole 引子分別為 HT-CS₁ 及

HT-CS₂ 其 PCR 產物為 328 bp 大小。 β -actin 的 5' 端及 3' 端引子 (primer)當內對照組 (internal control)最後加二次蒸餾水至 50 微升，上層加 50 微升的輕礦物油，加熱 94 °C，5 分鐘，最後加入 0.5 微升的 Hi-Taq DNA polymerase (5 單位/微升)。反應條件：94 °C，1 分鐘，54 °C，1 分鐘，72 °C，2.0 分鐘，上述條件進行 35 cycles，72 °C 反應 10 分鐘，作用完畢後取 20 微升進行 1.5 % agarose gel 電泳分析。

七、統計分析

將 TRAP assay 及 RT-PCR 結果，用 SPSS 的 Student' t-test 的統計方法加以分析，並檢測其差異性。Student' t-test 主要是在分析兩組間的差異性，P 值小於 0.05 代表具有統計上的意義。

八、Telomerase RNA promoter (tel-p) (Zhao et al.,1998) 與 Telomerase Catalytic Subunit promoter (tert-p) (Horikawa et al.,1999) 的基因選殖。

(A) 鏈聚合 連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

各取 2 微升的 MRC-5 genomic DNA (40 ng/ μ l)，分別加入 5 微升 10 X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 25 mM MgCl₂, 500 mM K₂O, 0.1 % gelatin)，2 微升的 10 mM dNTPs，和各 2 微升的 10 pmole

引子分別為(tel-p *Xho I* , tel-p *Nhe I*)及(tert-p *Hind III* , tert-p *Kpn I*)
最後加二次蒸餾水至 50 微升，加熱 94 °C，5 分鐘，最後加入 1 微升的 Hi-Taq DNA polymerase (5 單位/微升)。反應條件：94 °C，1 分鐘，54 °C，1 分鐘，72 °C，2 分鐘，上述條件進行 35 cycles，72 °C 反應 10 分鐘，作用完畢後取 20 微升進行 1 % agarose gel 電泳分析，其 PCR 產物 tel-p 為 876 bp，tert-p 為 430 bp。

(B) PCR 產物接合反應

將 Telomerase RNA promoter 與 Telomerase Catalytic Subunit promoter 的 PCR 產物先由 agarose gel 回收，經 Klenow enzyme 反應使這片段成 blunt end 再和 BMN vector (經 *Sma I* digestion)作接合反應。取 DNA:Vector 約 3:1 的量，加入 2 微升 10X Ligation 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 10 mM mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 50 % Glycerol)，和 2 微升 T4 DNA ligase (5 單位/微升)加二次蒸餾水至 20 微升，16 °C 反應 overnight 後即可進行轉形作用 (transformation)。

(C) 轉形作用 (Transformation)

1. 勝任菌體 (Competent bacterial cells)之製備：

選取單一菌落的大腸桿菌 XL-10 (strgtage), 於 3 毫升的 LB 培養液中, 於 37 培養 12 小時。取 0.5 毫升菌液至 100 毫升的培養液中, 於 37 振盪培養 3 小時後 $OD_{600}=0.5$ 時, 在 4 離心 5,000 rpm (Beckman JA-14 rotor) 5 分鐘, 取得菌體沈澱, 以 10 毫升的 Transformation buffer (10 mM MOPS, 100 mM $CaCl_2$, 30 mM dextrose, 15 % Glycerol, pH 6.5) 懸浮菌體。4 離心 5000 rpm 5 分鐘, 得到菌體沈澱, 再以 20 毫升的 Transformation buffer 懸浮菌體, 分裝 100 μ l/per eppendroff 置於冰浴中 1 小時後, 儲存於零下 70 冰箱。

2. 轉形作用之步驟：

取勝任菌體 100 微升, 分別加入 10 微升 telomerase RNA promoter 及 Telomerase Catalytic Subunit promoter 與 BMN vector 的接合 DNA (ligation mixture), 混合後, 置於冰浴上 30 分鐘後, 再置於 42 水浴中 1 分鐘, 使進行熱休克效應(Heat shock)。加入 200 微升的 LB 培養液於 37 培養 1 小時後。取 100 微升, 以及 20 微升 100 mM IPTG (Isopropyl- β -thiogalacto pyranoside) 和 10 微升的 10% X-gal (溶於 N-N-Dimethylformamide) 塗抹至 LB+Ap agar plate (每毫升含 100 微克的 Ampicillin), 置於 37 培養箱培養, 第二天挑選白色菌落 (白色菌

落表示載體已嵌入 DNA，藍色菌落則否)於 3 毫升 LB+Ap 培養液的試管中，37 振盪培養 12 小時。

(D) 質體 DNA 的微量抽取

將接合質體 (tel-p-BMN/ tert-p-BMN)的大腸桿菌培養 12 小時，取 1.5 毫升菌落置於 eppendorf 管中，以冷凍離心 13000 rpm 1 分鐘，移去上清液，沈澱的菌液利用 PlasPrep 試劑組，抽取質體 DNA。首先將菌體懸浮，取 100 微升的 C1 buffer 加入菌體沈澱，之後再加入 100 微升的 C2 buffer，均勻混合 5 分鐘，直到菌液澄清，然後再加入 150 微升的 C3 buffer (C3 使用前要先需冰浴)，上下均勻混合次數，至於冰上，冰浴 5 分鐘，以 4 離心 12000 rpm 10 分鐘，取上清液至新的離心管，加入 150 微升 C4 buffer 混合均勻，再加入 10 微升的 PlasPrep (resin)充分混合，靜置於室溫 10 分鐘之後，離心 12000 rpm, 30 秒，接著移除上清液，加入一毫升的 Wash buffer (C5 buffer:95%酒精:水 = 1:6:5 稀釋而成)，懸浮沈澱物清洗後，離心 12000 rpm, 30 秒，接著移除上清洗，以上的清除步驟重複一次後，倒乾上清洗，用真空乾燥機，用 20-50 微升的 T/E buffer 溶解沈澱物，然後將其至於 50-60 的熱水，水浴 5 分鐘，再離心 12000 rpm 1 分鐘，取上清液，即是質體 DNA。最後溶入於 20 微升的二次蒸餾水備用。

(E) 限制 水解方法

取 7 微升的質體 DNA (tel-p-BMN/ tert-p-BMN), 加入 1 微升 10X MULTI-CORE™ buffer (250 mM Tris acetate, PH7.8 , 1 M potassium acetate , 100 mM magnesium acetate , 10 mM DTT), 和各 1 微升的 *EcoRI* 及 *BamHI* 限制 , 作用 37 , 1 至 2 小時 , 用 1 % agarose gel 電泳分析 , 確認是否為正確質體 , 之後再進行 Luciferase Reporter Gene 的接合作用。

(F) Luciferase Reporter Gene 之接合作用

Telomerase RNA promoter PCR 產物經由 *NheI* , *XhoI* 及 Telomerase Catalytic Subunit promoter PCR 產物經由 *Hind* , *KpnI* 限制 作用後由 agarose gel 回收 DNA, 再和含有 Luciferase reporter gene pGL-3 vector 進行接合反應。取 DNA:Vector 約 3:1 的量 , 加入 2 微升 10X Ligation buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂ , 10 mM mercaptoethanol , 0.1 mM EDTA , 50 % Glycerol) , 和 2 微升 T4 DNA ligase (5 單位/微升)加二次蒸餾水至 20 微升 , 16 反應 overnight。

(G) DNA 共同轉染 (DNA Co-transfection)

本實驗所使用的細胞株為 H1299 的肺癌細胞株，培養在 37 °C，5 % CO₂ 培養箱。所用培養液為含 10 % 胎牛血清之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO)，並添加 100 U/ml 的 penicillin 及 100 μg/ml 的 streptomycin。轉染方法乃採取 cationic liposome DOTAP{N[1(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate 的方式來進行(BRL)。轉染時將質體 (pGL-3-telp, pGL-3-tert-p, -gal 分別加入 p53,bcl-2 或 B[a]P)及 DOTAP (1.5~2 μg/μl plasmid)加入 1.5 ml Opti-DMEM (GIBCO)培養液混勻，於室溫靜置 20 分鐘。將轉染混合物加在 5×10⁵ 細胞培養 6 小時後，再換新培養基 48 小時，移去細胞培養液並以 PBS 清洗二次，使用 luciferase 試劑組 (Promega)。使用冷光分析儀 (Tunel 20/20) 分析轉錄活性。

九、細胞培養

MRC-5、WI-38 正常肺細胞株培養於含有 10 % FBS, 5.5 % sodium bicarbonate, 1 % L-glutamine 和 100 單位/毫升 penicillin/streptomycin 之 BME 細胞培養液培養。H1299、A427 細胞株則培養於含有 10 % FBS, 5.5 % sodium bicarbonate, 1 % L-glutamine 和 100 單位/毫升 penicillin/streptomycin 之 DMEM 細胞培養液中。CL-3 細胞培養於含有 10 % FBS, 5.5 % sodium

bicarbonate 1 % L-glutamine 和 100 單位/毫升 penicillin/streptomycin 之 F12 細胞培養液中，將細胞株置於含 5 % CO₂ 的 37 恆溫培養箱內培養，每二天更換一次新鮮的培養液，每種細胞株均約隔三~四天分盤培養，細胞株培養密度為 2×10^6 個細胞/10 公分培養皿。

十、細胞分盤

首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 10 毫升 1 倍的 phosphate buffer saline (PBS, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L K₂HPO₄, 8 g/L NaCl, 2.16 g/L Na₂HPO₄) 緩衝溶液清洗，然後將 1 倍的 PBS 緩衝溶液吸出，在加入 1 毫升 1 倍的 trypsin (為一種內切，能幫助細胞脫離培養皿)，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出 (盡量吸乾，因為對細胞有害)，置於 37 培養箱 5 分鐘，使細胞能脫離培養皿，5 分鐘之後用顯微鏡觀察細胞是否以脫離培養皿 (細胞若尚未完全脫離，可用手輕輕拍打培養皿邊緣，以幫助細胞脫落)，細胞脫落後，以 10 毫升 trypsin 抑制劑 (用含有血清的細胞培養液即可) 沖洗細胞，並將細胞吸出，置於 15 毫升離心管中 (若需進行細胞計數，則可以取 100 微升置於 1.5 毫升 eppendorf 管中備用)，於 4 離心 900 rpm 5 分鐘後，將上清液去除 (盡量吸乾)，在加入是當細胞培養液，待混合均勻後即可種入培養皿中。

十一、冷凍細胞

經確定細胞數後，加入適當的冷凍細胞培養液（1 毫升 DMSO+9 毫升含血清培養液），將細胞稀釋成 $2-4 \times 10^6$ 個細胞/毫升，以每個冷凍管 1 毫升將細胞移至冷凍管中，在將冷凍管移至保麗龍盒中，先於零下 20 冷凍 1 小時，再移至零下 80 ，4 小時，之後隨即將細胞移至液態氮桶中，以確保細胞之完整。

十二、解凍細胞

解凍細胞步驟如下：首先，取 9 毫升新鮮的細胞培養液，置於 15 毫升離心管中備用。將細胞自液態氮桶取出（動作要快），於 37 快速回溫，將冷凍管中之細胞液取出，與 9 毫升新鮮細胞培養液充分混合，於 4 離心 900 rpm 5 分鐘後，將上清液去除（盡量吸乾），在加入 5 毫升新鮮的細胞培養液，待混和均勻後，在將細胞移至 10 公分細胞培養皿。

十三、細胞 DNA 抽取

將細胞以 1×10^6 的細胞數，種於 10 公分的培養盤中培養 24 小時之後，用 PBS 清洗三次，之後加入 1 毫升的 GenoMarker，然後用刮杓

刮下細胞，用 pipetman 吸至 1.5 毫升的離心管中，作用 3 至 5 分鐘，再加入 500 毫升的 chloroform 上下均勻混合後，於 4℃ 下用 12000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液至新的離心管，加入 2 微升 RNase (10mg/ml) 處理 30 分鐘，加入等體積的 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 震盪混合後靜置 5 分鐘，於 4℃ 離心 12000 rpm 5 分鐘，取上清液至新的離心管，再加入和上清液十分之一體積的 3 M 醋酸鈉和兩倍半體積的 95% 酒精均勻混合後，於 4℃ 離心 12000 rpm 10 分鐘，去除上清液，用真空乾燥機 (Savant Speed Vac Sc110)，乾燥後，加入 100 微升的無菌水溶解，完成後將 DNA 利用光譜分析儀於 260 nm 及 280 nm 波長下測其吸光值，進而測量其濃度，並保存於零下 20℃ 的冰箱中。

公式： $\mu\text{g/ml DNA} = \text{吸光值 (OD 260 nm)} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{稀釋倍數}$ 。

結果

一、終端序列增幅法 (TRAP) 測量之染色體終端 活性

利用高敏感度的非放射性終端 重複增幅步驟 (TRAP assay), 研究肺癌細胞及組織的終端 活性。首先從中萃取蛋白, 取 0.1 微克進行鏈聚合 的增幅反應, 之後再用 EtBr 染色觀察。本實驗分析肺癌細胞株 (H1299) 及正常細胞株 (MRC-5) 與 28 例非小細胞肺癌 (NSCLC) 病患組織之染色體終端 分析, 其結果顯示在 H1299 細胞株具有高度的活性表現, 而在 MRC-5 正常細胞株則無法偵測到此活性 (圖一)。此外在 28 例非小細胞肺癌病患組織中有 21/28 (75%) 例呈現陽性反應 (圖二)。把細胞及肺癌組織呈陽性的標本, 經 RNase A 先處理過後再作 TRAP 分析, 則 DNA ladder 皆消失, 表示其酵素的陽性反應確實是來自 RNA 成份的複合物 (telomerase), 而沒有偵測到有終端 活性的有 7 例 7/28 (25%)。

二、肺癌臨床病理資料與染色體終端 活性表現之統計分析

在 28 例非小細胞肺癌使用 TRAP 反應分析終端 活性, 有 21 例具有活性, 並且以 SPSS 統計的 Crosstabs 分析病人的臨床資料 (n=28) 其臨床病理特徵包括, 性別, 腫瘤位置, 腫瘤大小, 臨床分期 (TNM), 淋巴轉移及吸煙習慣與染色體終端 活性表現之間關係, 結果未發現

有統計學上的相關性 (表一)，而在年齡方面與終端 活性表現似乎有顯著意義 ($p=0.027$)。年齡大於 55 歲的肺癌病患，具有終端 活性表現比例較高。

三、染色體終端反轉錄酵素 h.TERT mRNA 之分析

- (A) 將萃取好的細胞的 RNA 約 10-20 微克，每次大約取 5 微克合成 cDNA 使用 HT-CS₁ 及 HT-CS₂ 二段引子(附表一)，進行反轉錄鏈聚合 的增幅反應，進行 1.5% 電泳分析，得到 328 bp 核酸序列大小。結果發現在肺癌細胞株 (H1299, CL-3, A427)均有染色體終端反轉錄酵素 h.TERT mRNA 表現，而在正常肺細胞株 (WI-38, MRC-5)則沒有 h.TERT mRNA 表現 (圖三)。
- (B) 分析肺癌組織及腫瘤鄰近正常組織 (non-tumor)終端反轉錄酵素 h.TERT mRNA。其結果在 56 例肺癌組織中發現有 45/56 (80%) 例具有反轉錄酵素 h.TERT mRNA 表現，而在 33 例腫瘤鄰近正常組織只有 4/33 (12%) 例有表現 (圖四)。

四 肺癌臨床病理資料與終端反轉錄酵素 h.TERT mRNA 表現之統計分析

使用反轉錄 聚合 連鎖反應 (RT-PCR)方法分析 56 例非小細

胞肺癌 (NSCLC)的反轉錄酵素 h.TERT mRNA 的表現情形。結果顯示在 56 例中 45 有活性表現。此外，從表二中顯示反轉錄酵素 h.TERT mRNA 轉錄活性表現與肺癌的臨床病理特徵包括，年齡，性別，腫瘤位置，腫瘤大小，臨床分期 (TNM)，淋巴轉移，吸煙習慣以及 p53 免疫組織染色法 (IHC)來作統計分析 (表二)，並且分析肺癌病人的存活率情形 (圖五)。此分析可用來判斷反轉錄酵素 h.TERT mRNA 轉錄活性是否可當作非小細胞肺癌預後的參考因子，其結果發現均無與終端反轉錄酵素 h.TERT mRNA 表現有相關意義。

五、染色體終端 與反轉錄酵素 h.TERT mRNA 在肺癌表現的相關性

同時使用 TRAP assay 及 RT-PCR 分析 22 例病人組織終端 及反轉錄酵素 h.TERT mRNA，結果發現其中有 17/22 (77%) 例兩者均有表現 (表三)。並且使用 SPSS 統計分析發現終端 活性表現與反轉錄酵素 h.TERT mRNA 沒有相關意義 (p=0.556)。

六、Telomerase RNA promoter (tel-p)與 pGL-3 質體之構築

以 MRC-5 genomic DNA 當模版，用 tel-p *XhoI* 與 tel-p *NheI* 兩段引子 (附表一)進行鏈聚合 反應的增幅，其 PCR 產物為 867bp (圖

六 A) PCR 產物經由 *EcoRI* 及 *BamHI* 限制 水解作用後接至 BMN 載體 (圖六 B), 以 1.5% 電泳分析, 確認 DNA 大小之後, 再用 *XhoI* 及 *NheI* 限制 作用後接至 pGL-3 載體, 構築在含有螢光酵素活性 (Luciferase) 的表達基因上 (圖六 C)。

七、Tel-p 之序列分析

將 tel-p 及 pGL-3 所構築的質體, 轉形至大腸桿菌 (XL-10), 進行大量增殖, 抽取質體 DNA, 進行序列分析, 其結果如 (圖七)。其核酸序列與 1998 年 Zhao 等人所發表序列大致相同, 其相似度高達 95%。

八、Tel-p 之細胞轉染及 Luciferase 活性分析

為了要探討染色體終端 基因受調控機制, 故將 (tel-p/pGL-3) 構築完成的質體, 轉染至肺癌細胞 (H1299), 由轉染細胞中所表現螢光的相對活性 (relative luciferase activity) 來分析啟動子的轉錄表現。以質體 DNA, 包括 -gal (當作 internal standard) 和已經構築好的 (tel-p/pGL-3), 及 p53 或 Bcl-2 質體 DNA, 利用 cationic liposome -DOTAP, 進行細胞共同轉染實驗 (Co-transferction), 培養 48 小時, 利用冷光分析儀進行 Luciferase 活性分析, 每組實驗均進行三

重覆並求其螢光酵素的相對活性 (relative luciferase activity)。結果得知加入 p53 的樣品中其 luciferase 活性表現大約是對照組的 1/4，而 Bcl-2 則有增加 2 倍的現象 (圖八)。因此由本研究結果顯示出 p53 會抑制 tel-p 的轉錄活性，而 Bcl-2 則有活化的情形。

九、Telomerase catalytic subunit promoter (tert-p)與 pGL-3 質體之構築

以 MRC-5 及 H1299 genomic DNA 當模版，用 tert-p *Hind* 與 tert-p *KpnI* 兩段引子 (附表一)進行鏈聚合反應的增幅，其 PCR 產物為 430 bp (圖九 A)。其 PCR 產物經由 *EcoR I* 及 *BamHI* 限制水解作用後接至 BMN 載體 (圖九 B)，以 1.5% 電泳分析，確認 DNA 大小之後，再用 *Hind* 及 *KpnI* 限制接至 pGL-3 載體，也與上述同樣的構築在含有螢光酵素活性的表達基因上 (圖九 C)。

十、Tert-p 之序列分析

將 tert-p 及 pGL-3 所構築的質體，轉形至大腸桿菌 (XL-10)，進行大量增殖，抽取質體 DNA，進行序列分析，其結果如 (圖十)，其核酸序列與 1999 年 Horikawa 等人所發表序列大不相同，因為懷疑此序列是否有錯誤，所以另外取 H1299 細胞的 genomic DNA 當模版重

新增幅,但所得到序列還是與MRC-5細胞 genomic DNA所增幅相同

十一、Tert-p 之細胞轉染及 Luciferase 活性分析

將質體 DNA, 包括 -gal (當作 internal standard)與已經構築好的 (tert-p/PGL-3), 及 p53 或 Bcl-2 質體 DNA, 利用與上述相同方法進行 Luciferase 活性分析, 每組實驗均進行三重覆並求其螢光酵素表現的相對活性 (relative luciferase activity)。本研究結果指出不論加入 p53 及 Bcl-2 其 luciferase 表現均與對照組差不多 (圖十一)。因此認為 p53 與 Bcl-2 對 tert-p 的轉錄活性並無影響。

十二、環境污染物 B[a]P 與染色體終端 之關係

B[a]P (benzo[a]pyrene)是一種多環芳香烴類的環境污染物, 會經由代謝酵素 cytochrome P450 形成環氧化物, 而在 DNA 上形成 DNA 鍵結物, 引起肺細胞基因突變, 甚至可能導致肺癌發生。因此本實驗室分析環境污染物 B[a]P 是否會對 tel-p 及 tert-p 兩個啟動子轉錄活性產生影響, 進而調控染色體終端 的活性。同樣也是利用共同轉染方式, 測量螢光酵素活性表現, 結果得知 B[a]P 會促進 tel-p 啟動子的 luciferase 活性, 但不會對 tert-p 啟動子轉錄活性產生影響 (圖十二)。

討論

從人類子宮頸癌細胞株 (HeLa) 發現具有終端 活性，並且認為終端 的活化可能是細胞避免老化，進入不死狀態及造成細胞腫瘤化的重要因素 (Morin et al.,1989)。然而終端 活性在人類細胞癌化中所扮演的角色，直到 1994 年 Kim 等人使用偵測染色體終端 的方法——終端重複序列的增幅方法 (TRAP assay)，而展開一連串臨床腫瘤的研究。TRAP 反應是一種簡易、高敏感的偵測終端 活性表現的方法。本研究是利用非放射性 EtBr 染色的 TRAP assay 來分析肺癌組織終端 活性。首先我們先將細胞萃取物進行蛋白濃度測定分析，並且參考 TRAPez Telomerase detection Kit 所建議之蛋白濃度進行 TRAP 反應。本研究發現細胞萃取物蛋白濃度過高反而會抑制終端 活性表現，或許是萃取物內含有 Taq 聚合酵素干擾質的存在而影響到 TRAP 反應的結果 (Utakoji et al., 1996)。之前研究學者所使用的引子可能會造成自我接合產生二聚體 (dimer) 以及偽陽性情形，因而造成實驗失去準確性，所以 TRAP assay 方法也不斷再進行修正 (Krupp et al.,1997 ; Holt et al.,1996)。本研究進行 TRAP 反應是採用修飾過 CXa 引子，此引子是由 1998 年 Falchetti 等人所修改的，主要是將原本 CX 引子改成 CXa 引子以減低與 TS 引子互補性形成二聚體的，以增加 TRAP 反應的敏感性及準確性。經過引子條件修正後，本研究最終以

50 ng/μl 進行 TRAP 反應，結果發現在肺癌細胞株 H1299 有終端活性表現，而在正常肺細胞株 (MRC-5) 則無此酵素活性。另外分析 28 位台灣非小細胞肺癌病患組織 (NSCLC)，結果有 24/28 (80%) 呈現終端陽性反應。在國外學者關於非小細胞肺癌染色體終端活性的研究指出，在 125 例 NSCLC 中有 98/125 (78%) 偵測到有終端活性，其中腺癌佔 45 例，鱗狀上皮癌佔 46 例 (Hiyama et al.,1995)。而在其他學者也陸續在各種癌化組織檢體的研究上，也證實終端活性與細胞不死化及惡性腫瘤之間有著密切的關連性 (Steven et al.,1997; Yashima et al.,1997)。由此我們可得知終端活性在人類非小細胞肺癌扮演著重要角色，並且可以推論偵測終端活性可作為診斷肺癌的重要指標。而本研究發現有 4/28 (14%) 例的非小細胞肺癌組織不含有終端活性，推測可能是這些腫瘤細胞已呈現衰老現象，因而只含有微量終端活性，或者是在非小細胞肺癌的形成中造成終端不活化原因，可能是其終端序列長度會隨著細胞分裂次數增加而逐漸縮短。此外從 mTR^{-/-} 基因移除的老鼠實驗中也證實：老鼠細胞之腫瘤形成與細胞轉形成不死細胞株並不需終端 (Blasco et al., 1997)。其實終端只是有核生物中，最常用來穩定終端序列，並使細胞有增生機會 (Nakamura et al., 1998)，而細胞癌化形成可能與基因變異有關，不一定要激活終端活性，只要累積足夠變異基因就有機

會超越老死危機。然而在沒有端粒活性的癌化組織中，可能有其他方法來支持細胞無限增殖以獲得生存優勢。這些不需要端粒活性而使細胞不死的機轉中，有可能是 ALT (telomere lengthening mechanisms) 染色體重組的 telomerase-independent 機制，存在於沒有端粒活性的癌細胞中，而成為細胞增生的基礎 (Bryan et al., 1995; Nakamura et al., 1998)。另外，綜合臨床病理資料分析可發現，端粒活性與腫瘤病人年齡（大於 55 歲）有統計上意義 ($P < 0.05$)。一般來說，腫瘤好發率平均在 60 歲，因而人口如果有較高比例到達腫瘤好發年齡時，其腫瘤發生率也會因此提升 (Axtell et al., 1976)。本研究分析端粒活性的肺癌病人大多為 N_0 病人，其臨床病理意義大都為非轉移的病人，但是其端粒表現 75% 機率。這意味著端粒的活化已在細胞癌化的早期或者是具有潛在轉移特性時即便發生。Saito 等人表示具有轉移潛力之腫瘤細胞有較高之端粒活性 (Saito et al., 1997)。這也說明端粒，可能在細胞產生轉移之前便有活化的跡象。在病理分析方面，發現腫瘤分期 (T-N stage) 及抽煙狀況均與端粒活性無統計上相關性。這也可在其他的腫瘤發現相同情形，例如乳癌等 (Hiyama et al., 1996)。

染色體端粒是 RNA 與蛋白所構成的複合酵素，主要由三種次單元所構成，其中反轉錄催化次單元 (h.TERT)，是決定酵素活性

表現的速率限制步驟的重要次單元 (Meyerson et al.,1997 ; Nakamura et al.,1997)。有學者指出人類反轉錄催化次單元普遍存在於惡性腫瘤，而在正常細胞則否，其表現與終端 活性有著密切關係。而相對於其他兩種次單元 (hTR 及 hTP) 不論在正常組織及腫瘤組織均會存在 (Ito et al.,1998 ; Kanay et al.,1998)。hTERT 不僅是決定終端 活性速率的重要次單元，也與細胞腫瘤化有著密切關係，因此分析其表現機制可有助於瞭解終端 活化及細胞腫瘤化之過程。將 hTERT 送入不含有終端 人類細胞株，可使細胞延長至少 20 次族群倍增的壽命，並且活化終端 活性，維持正常細胞生理與基因型態 (Nakayama et al.,1998 ; Counter et al.,1998)。在 1998 年 Bodnar 等人發現 hTERT 具有調節終端 的作用，並且可以維持終端序列長度，以及延長人類纖維母細胞，血管內皮細胞與視網膜上皮細胞的生長 (Bodnar et al.,1998)。hTERT 可在 Rb 及 p53 去活化路徑中，調控角化細胞及上皮細胞的終端 活性。由以上研究顯示 hTERT 在有終端 活性的腫瘤中扮演著相互調節角色。本研究使用 RT-PCR 方式分析台灣非小細胞肺癌 (NSCLC) hTERT mRNA。其結果顯示在肺癌細胞株 (H1299 、 CL3、 A-427) 有 hTERT mRNA 表現，而在正常肺細胞株 (MRC-5、 WI-38) 則呈陰性反應，另外在 56 例 NSCLC 組織中有 45 (80%) 例偵測到有 hTERT mRNA 表現，而國外方面，在乳癌研究

上有 101/134 (75.4%) 例有表現 (Bieche et al.,1999)。表現率與本研究相似。最近有報導指出在肝癌及子宮頸癌等惡性腫瘤大部分有 hTERT mRNA 的表現，但在其腫瘤鄰近正常組織偵測不到 (Nakayama et al.,1998 ; Takakura et al.,1998)。然而在本研究中發現也只有 4/33 (12%)腫瘤鄰近正常組織(non-tumor)有 hTERT mRNA 表現，依據 1998 Ito 等人推測可能是腫瘤鄰近正常組織內含些許癌細胞殘留而導致有活性表現 (Ito et al.,1998)。HTERT 反轉錄酵素次單元可使正常體細胞的終端 活化，避開衰老危機期，進而延長細胞生命週期 (Bondnan et al.,1998 ; Vaziri & Benchimol.,1998)。此反轉錄酵素次單元普遍存在於不死及腫瘤細胞，而在正常細胞無法偵測到，這些都一再可證明 hTERT 反轉錄酵素次單元，確實與細胞的不死及腫瘤的形成中扮演著重要角色。此外分析 hTERT mRNA 是否與終端 活性表現有關，但依本研究結果顯示出並無相關性。在 1998 年 Ito 等人在尿道癌研究中發現終端 活性與 hTERT mRNA 也沒有相關性，並且指出可能有下列幾種因素。一、終端 三種次單元(h.TERT , h.TR , h.TP) 其表現量一致，而導致三種次單元都可能成為終端 活性表現的重要角色。二、終端 三種次單元經由轉錄後修飾來調節終端 活性。三、細胞及組織萃取液中含有抑制終端 的抑制劑，因而減低終端 活性 (Ito et al., 1998)。本研究為了要確立肺癌病人的早期診斷指

標，不僅研究細胞和組織之 hTERT mRNA 表現，而且還分析肺癌病人之血液淋巴球，但其結果卻發現不論在正常人及肺癌病人都無法偵測出 hTERT mRNA 表現，因此欲以終端 活性為早期診斷或追蹤肺癌便有所限制。所以要以病人血液中淋巴球來偵測 h.TERT mRNA 表現作為早期偵測指標似乎不太可行。

由前人研究及綜合本實驗的資料中發現，終端 在細胞腫瘤化扮演著關鍵角色，至於其受調控機轉尚未清楚。接下來本實驗主要是藉由基因選殖來探討終端 受那些調節因子所調控，以及可能的調控機轉。本研究是利用 p53、Bcl-2 及環境致癌物 B[a]P，來探討是否會調控 telomerase RNA 啟動子及 telomerase reverse transcriptase 啟動子的轉錄活性。由先前得知 p53 是一種抑癌基因，當其抑癌基因受到損傷時，會使細胞停留在 G1 期，因而造成細胞衰老走向程序性的凋亡（apoptosis）。而 p53 與終端 都是與維持基因完整性有關，並且發現在細胞癌化過程中，p53 可因終端序列縮短而活化。終端 可能是 p53 的下游基因，藉由 p53 的轉錄活性來調控終端 活性。在 1999 年 Ueda 等人，經由 UV 照射下的人類皮膚中發現 p53 會調節終端 活性表現（Ueda et al.,1997）。此外將 p53 突變基因送入人類正常乳房上皮細胞，結果發現其終端 有被活化情形，並且造成細胞不死化現象（Gollahon et al.,1996）。p53 活化可能會去抑制終端複合酵素表現，

而使細胞走向衰老，而 p53 突變，可能無法抑制終端 表現，造成細胞不死及癌化現象 (Liu 1999)。而 Bcl-2 (B 細胞淋巴瘤-2)，主要是位於粒腺體外膜，可提供腫瘤細胞生長且抑制細胞程序性凋亡 (anti-apoptosis)的發生 (Korsmeyer et al.,1995 ; Garson et al.,1993)。

Bcl-2 在腫瘤細胞可利用 anti-apoptosis 路徑來調控終端 活性。在 1997 年 Mandal 等人將 Bcl-2 送入子宮頸癌細胞株 (HeLa) 中，結果發現會誘導終端 活化 (Mandal et al.,1998)。綜合以上結果得知，Bcl-2 及 p53 對終端 活性表現扮演著密不可分角色。本研究根據轉染實驗測螢光 (Luciferase) 活性，結果發現 p53 及 Bcl-2 會對 telomerase RNA 啟動子轉錄活性產生抑制及活化情形。根據 1998 年 Zhao 等人所定序的人類之 telomerase RNA 啟動子指出，此序列含有許多轉錄結合因子，例如：SP1 及 AP2 等在誘導活化 telomerase RNA 轉錄啟動子中扮演著重要角色 (Zhao et al.,1997)。其中 AP1 可介由致癌基因 (oncogene)及蛋白激酶 C (PKC)來誘導 T 細胞 telomerase RNA 轉錄啟動子活性，另外 SP1 轉錄結合區域可受到 p53 調控影響 (Bodnar et al.,1996)。因此 p53 及 Bcl-2 可能是間接透過這些轉錄因子來抑制或活化 telomerase RNA 啟動子的轉錄活性，抑制或活化 telomerase RNA 複製模版進而調控終端 活性表現。由先前得知 hTERT 反轉錄酵素次單元是終端 活性的速率決定步驟與細胞不死

及癌化有著密切關係，因此本研究室之後選殖出 hTERT 啟動子，同樣的也是送入 p53 及 Bcl-2 來看其轉錄活性，但其結果顯示 p53 及 Bcl-2 不會活化 hTERT 啟動子轉錄活性。可能是此 DNA 序列沒有 AP1、SP1 等轉錄結合因子（見圖十），而使 p53 及 Bcl-2 無法調控其轉錄活性。但由前人研究指出致癌基因 myc 會活化 htert-p 轉錄活性（Wick et al.,1999），因此本實驗之後必需使用 myc 當作對照組，來進一步探討 p53 及 Bcl-2 無法調控 htert-p 轉錄活性的原因。

TRAP 反應是一種敏感度極高的分析方法，到目前為止還是能有效偵測肺癌終端 活性表現。由之前學者及本研究綜合指出終端 活性大部分存在於惡性腫瘤及不死細胞，而較少在正常組織中被偵測到。但值得注意是在分化成長的正常血液淋巴球偵測到有終端 活性表現，並且指出 hTERT 轉錄活性與調控終端 活性有關，但是在血液淋巴球則較少被研究，因此反轉錄催化次單元的調控特性並不太清楚，所以研究人類血液淋巴球之 hTERT mRNA 表現，但結果發現不論在正常人及非小細胞肺癌病人都偵測不出具有 hTERT mRNA 表現（Data not shown）。在未來可以利用西方點墨法，來偵測血液淋巴球反轉錄酵素蛋白表現，以確立早期診斷肺癌的生物指標。

由先前得知終端 活性在腫瘤形成過程中扮演重要角色，其中 telomerase RNA 是重要複製終端序列的模版，可能與細胞增殖速率有

關，雖然有報導指出 hTR 不論在正常及腫瘤組織都可被偵測到。但是在高度分化的血液淋巴球則發現 hTR 具有調節終端 活性 (Weng et al.,1997)。Telomerase RNA 次單元在腫瘤分化上可能扮演著重要角色，極有潛力發展成另一種與細胞成熟度或分化程度有關之腫瘤生長或增殖指標，因此可利用 Ki-67 (細胞增殖指標)，及原位雜合法來觀察了解肺癌細胞癌化過程，更確認終端 在肺癌所扮演角色。此外在細胞轉染實驗方面，同時也要配合 TRAP 反應分析方法，才可有效偵測出外來因子例如 p53 或 Bcl-2 其轉錄活性是否真的會影響腫瘤細胞終端 活性表現。本研究所選殖出來的催化次單元啟動子 (h.tert-p) 由於基因序列與原先參考 Horikawa 所定序出來的不一樣，並且送入外來基因 p53 與 Bcl-2 及 B[a]P 均沒有發現有任何調控其轉錄活性現象。因此本研究考慮是否 h.tert-p 會有甲基化情形產生，而造成轉錄活性失去功能，h.tert-p 含有許多重複 CpG 小島，而 CpG 是真核生物 DNA 甲基化轉錄調控的重要環節。調控及維持染色體終端序列是一種多重機制，然而催化次單元啟動子的 CpG 小島甲基化程度可調節終端 活性以及關係到本身轉錄活性表現的重要依據 (Horikawa et al.,1999)。由正常及腫瘤細胞所定序出來催化次單元啟動子 DNA 上 CpG 小島甲基化程度上的不同，將會影響到轉錄活性表現。在 1995 年 Merlo 等人，在人類腫瘤細胞中發現，當 p16 啟動子產生甲基化會

使 p16 基因失去其原來功能 (Merlo et al.,1995 ; Gonzalez et al.,1995)。

另外在結腸直腸癌細胞中，其 hMLM1 啟動子的特殊區域產生甲基化現象，會失去轉錄活性 (Deng et al.,1999)。由以上研究指出啟動子甲基化確實會造成失去其原本的轉錄功能，因此未來將主要分析肺癌細胞株 (H1299) 及肺正常細胞株 (MRC-5)，使用兩種限制 (MspI、HapII) 來觀察兩種細胞株甲基化程度，以便瞭解催化次單元啟動子整個轉錄作用機轉。

終端 活性在大部分腫瘤細胞都可被偵測到，然而不會在正常細胞中發現。終端 活化在許多惡性腫瘤之間扮演著重要角色，可能與促進腫瘤的生長發育有著密切關係，所以抑制其活性就成為一種典型治療腫瘤疾病的重要方法。從缺乏終端 老鼠中發現會導致終端序列縮短，並同時伴隨著基因不穩定現象，包括非整倍體 (aneuploidy) 及染色體異常現象 (Blasco et al.,1997)。在之前 Feng 等人將反向股 (anti-sense) 的 RNA 送入子宮頸癌細胞株 (HeLa)，結果造成細胞在第 20 次族群倍增之後逐漸衰老 (Feng et al.,1995)。但後來學者發現此實驗可能無法進行體內實驗。在 1996 年 Norton 等人利用 peptide nucleic acids (PNAs) 或者其它寡核甘酸 (2'-O-MeRNA) 等，直接抑制 telomerase RNA 模版作用，造成終端 失去活性 (Norton et al.,1996) 或者利用其它路徑來抑制終端 活性，例如目前已經證實從鼻咽癌細

胞中的蛋白激酶 α -c (PKC) 確實會抑制終端 活性，在未來也可利用調控啟動子的轉錄活性來發展另外一種抑制終端 活性的基因治療方法，經由動物及臨床試驗，開發新的抗終端 抑癌藥物，將可應用在國人的肺癌上。

