同步后分析的端粒酶分周期检测新技术

吴霞¹, 郭玥¹, 戴俊², 夏帆¹, 娄筱叮^{1*}

1. 中国地质大学材料与化学学院, 生物地质与环境地质国家重点实验室, 纳米矿物材料及应用教育部工程研究中心, 武汉 430078;

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科, 武汉 430030

* 联系人, E-mail: louxiaoding@cug.edu.cn

A new technique for telomerase detection based on post-synchronous analysis

Xia Wu¹, Yue Guo¹, Jun Dai², Fan Xia¹ & Xiaoding Lou^{1*}

¹ State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, Engineering Research Center of Nano-Geomaterials of Ministry of Education, Faculty of Materials Science and Chemistry, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China;

² Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

* Corresponding author, E-mail: louxiaoding@cug.edu.cn

doi: [10.1360/TB-2021-0366](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0366)

世界卫生组织于2021年2月发布的《2020年世界癌症报告》显示,在未来的20年中,全世界的癌症病例数可能会增加60%。全球每年有1/6的人死于癌症,癌症负担在增加^[1]。根据世界卫生组织的权威性结论,癌症如果能在早期被发现,患者的治愈率可达80%。然而,许多癌症很难在早期查出,一般等到中、晚期的时候,往往错过了最佳治疗时机。因此,对肿瘤细胞的准确判断及对癌症早期的准确筛查意义重大。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体,由核糖核酸模板、逆转录酶催化组分(TERT蛋白)和其他相关蛋白组成^[2]。在正常人体组织中,端粒酶的活性被抑制,但在约85%的癌细胞中,端粒酶被重新激活,使肿瘤细胞能够在细胞分裂中维持端粒长度,实现永生^[3,4]。因此,端粒酶可以作为一种重要的肿瘤标志物^[5]。准确检测细胞中的端粒酶活性在肿瘤疾病的诊断和预后判断中显得尤为重要。

尽管目前报道的端粒酶活性检测方法有很多,比如化学反应发光法、电化学方法、荧光分析方法、比色法等,但这些方法对细胞的前处理均是基于细胞整体非同步化水平上进行的^[6-9]。一个随机增殖细胞群体中存在着不同周期时相(G1期, S期, G2期和M期)的细胞,这些细胞的生化代谢方式各具特点,活性物质的表达会随细胞周期呈规律性的波动。这意味着,这些基于混合周期时相细胞的活性靶标物质检测方法将难以排除因周期波动带来的误差。为了探究不同细胞周期细胞的端粒酶活性水平差异,我们利用通过人为诱导的细胞同步化方法,使细胞处于同一细胞周期时相。基于前期

本课题组^[10-13]对端粒酶及mRNA等肿瘤标志物检测的工作基础,以共价键的方式将核酸单元和聚集单元结合,建立了基于聚集诱导发光单元(AIEgens)的上下游联动检测系统,建立了同步后分析的技术解析细胞周期中各个时相TERT mRNA和端粒酶活性的动态过程^[14],证实了细胞内端粒酶活性随周期变化带来的干扰。因此,在对细胞活性物质进行检测时,必须将细胞周期的影响考虑进去,相关研究成果发表在*National Science Review*^[14]。

在肿瘤的诊断过程中,端粒酶活性随细胞周期呈规律性波动,基于混合周期时相细胞进行端粒酶检测时,难以排除因细胞周期波动带来的误差,有可能影响对肿瘤细胞的识别和判断。为了克服细胞周期异质性对端粒酶活性检测结果的影响,我们通过人为诱导HeLa增殖细胞群体同步化后得到不同细胞周期的细胞,再利用PyTPA-DNA及Silole-R两种聚集诱导发光探针四个周期细胞中的TERT mRNA含量和端粒酶活性进行荧光定量分析。结果发现,通过细胞同步化后,PyTPA-DNA在G0/G1期的荧光较弱,随着G1/S、S期的推移,荧光强度逐渐增大,于S期达到最大。然而,在同样的条件下,PyTPA-DNA在G2/M期中的荧光强度则是四个周期中最小的。通过利用Silole-R检测四个周期下细胞的端粒酶活性,也得出了相同的趋势。除此之外,我们通过传统的端粒重复扩增方法(TRAP)也证实了端粒酶活性随周期变化的结果。在这里,两种聚集诱导发光分子组成的上下游联动检测信号变化规律一致,即说明细胞周期对逆转录蛋白TERT的mRNA表达

图1 (网络版彩色)对不同周期细胞中TERT mRNA表达水平及端粒酶活性的聚集诱导发光检测系统^[14]

Figure 1 (Color online) AIEgen-based fluorescence detecting system for analysis of TERT mRNA and telomerase activity in different phases of cell cycle^[14]

及端粒酶活性均造成影响。此外, 我们还将不同细胞周期肿瘤细胞的TERT mRNA表达量和端粒酶活性与正常细胞进行了对比。结果显示, 处于G0/G1、G1/S、S周期的HeLa细胞中的TERT mRNA水平和端粒酶活性均高于正常细胞; 而处于G2/M期的HeLa细胞中的TERT mRNA水平和端粒酶活性水平与正常细胞基本相同。这些结果都说明了在使用TERT mRNA和端粒酶活性作为肿瘤病变的早期诊断依据时应考虑细胞周期的影响。

综上, 细胞周期对逆转录蛋白TERT mRNA及端粒酶活性均造成影响, 两组信号变化规律一致, 从G0/G1、G1/S期逐

渐升高到S期, G2/M期则降到最低点。传统端粒酶检测方法都是在细胞整体水平上进行的, 忽略了周期中的异质性, 可能影响结果的准确性。这些结果提示我们, 对肿瘤标志物进行分周期检测是必要的。我们通过开发周期同步后分析技术的上下游联动检测系统实现了对TERT mRNA以及端粒酶活性的体外及体内高精度、高灵敏度检测, 为精准细胞分析提供了一个新的切入点, 例如, 若不区分细胞周期或处于G2/M期, 则难以区分癌症细胞和正常细胞, 极有可能导致漏检。这为进一步推进癌症的早期精准诊断和治疗提供了新的思路。

推荐阅读文献

- 1 Zou X L, Jia M M, Wang X, et al. Interpretation of the World Cancer Report 2020 (in Chinese). Chin J Thorac Cardiovasc Sur, 2021, 28: 11–18 [邹小

- 农, 贾漫漫, 王鑫, 等. 《2020全球癌症报告》要点解读. 中国胸心血管外科临床杂志, 2021, 28: 11–18]
- 2 Kolquist K A, Ellisen L W, Counter C M, et al. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet*, 1998, 19: 182–186
- 3 Harley C B, Kim N W, Prowse K R, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1994, 59: 307–315
- 4 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011–2015
- 5 Weinrich S L, Pruzan R, Ma L, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, 1997, 17: 498–502
- 6 Zhu J, Wang Y, Li B, et al. Ultra-sensitive and chemiluminescent detection of telomerase activity via handheld luminometer. *Sens Actuat B Chem*, 2019, 301: 127109
- 7 Dong P, Zhu L, Huang J, et al. Electrocatalysis of cerium metal-organic frameworks for ratiometric electrochemical detection of telomerase activity. *Biosens Bioelectron*, 2019, 138: 111313
- 8 Zhuang Y, Huang F, Xu Q, et al. Facile, fast-responsive, and photostable imaging of telomerase activity in living cells with a fluorescence turn-on manner. *Anal Chem*, 2016, 88: 3289–3294
- 9 Wang Y, Yang L, Wang Y, et al. Target-controlled in situ formation of G-quadruplex DNAzyme for a sensitive visual assay of telomerase activity. *Analyst*, 2019, 144: 5959–5964
- 10 Dai J, Wu X, Ding S Y, et al. Aggregation-induced emission photosensitizers: From molecular design to photodynamic therapy. *J Med Chem*, 2020, 63: 1996–2012
- 11 Lou X, Zhuang Y, Zuo X, et al. Real-time, quantitative lighting-up detection of telomerase in urines of bladder cancer patients by AIEgens. *Anal Chem*, 2015, 87: 6822–6827
- 12 Zhuang Y, Huang F, Xu Q, et al. Facile, fast-responsive, and photostable imaging of telomerase activity in living cells with a fluorescence turn-on manner. *Anal Chem*, 2016, 88: 3289–3294
- 13 Zhuang Y, Shang C, Lou X, et al. Construction of AIEgens-based bioprobe with two fluorescent signals for enhanced monitor of extracellular and intracellular telomerase activity. *Anal Chem*, 2017, 89: 2073–2079
- 14 Wu X, Wu J, Dai J, et al. Role of cell cycle progression on analyzing telomerase in cancer cells based on aggregation-induced emission luminogens. *Natl Sci Rev*, 2021, doi: 10.1093/nsr/nwaa306