

甾体激素作用的分子过程*

姚 连 生

(中国科学院上海生物化学研究所)

甾体激素是激素中有着甾核这一基本化学结构的一大类物质(表1)。根据甾体激素的来源或它们的生理功能,可以分为性腺激素、肾上腺皮质激素或雄激素、雌激素、糖皮质激素、盐皮质激素等等。在实践中人们认识到这类激素在生物体内起着调节物质代谢、控制个体生长发育的作用。它们由内分泌腺体或细胞产生,通过血液循环输送到效应器官,即靶器官发挥作用。它们在血液中浓度很低,如雄激素、糖皮质激素和孕激素一般在10—100毫微克分子之间,雌激素及盐皮质激素的浓度更低,在1毫微克分子以下,因此研究起来比较困难^[1]。直至60年代初,合成了高比度氚标记雌二醇以后,对于雌激素作用机制的研究进入了一个崭新的阶段。

1962年 Jensen 和 Jacobson 将生理剂量的³H-雌二醇给予未成熟的大鼠以后,测定放射性在体内的分布,发现对雌二醇敏感的子宫和阴道等组织放射性的掺入特征是保留时间较

长,而其他组织如肝、肾、血液等的放射性出现一过性增高后迅速降低(图1)。经分析雌二醇的化学结构在子宫和阴道中没有发生变化。为了解释³H-雌二醇在靶组织中的这种保留作用, Jensen 等提出了靶细胞内可能有某种物质可以与进入细胞的激素分子结合不使外逸,而一般细胞是没有这种功能的^[2]。在这一时期内,细胞的分部研究和细胞放射自显影的研究指出,未成熟大鼠给予³H-雌二醇后放射性是积聚在子宫组织的细胞核内,由此人们猜测雌激素与细胞核还有某种反应^[3]。1966年 Toft 和 Gorski 首先用蔗糖密度梯度超离心技术证实了子宫细胞溶质中存在一种与雌二醇具有高度亲和力的蛋白分子,它们的沉降系数是9.5 S,分子量约20万,这就是雌激素受体蛋白。

雌激素受体蛋白的发现是研究甾体激素作

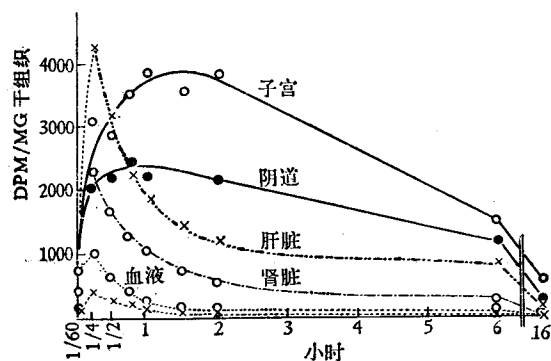


图1 未成熟大鼠皮下注射[617³H]-雌二醇后在组织中的放射性浓度

○—○—○ 子宫 ●—●—● 阴道
 ×—×—× 肝脏 ○—○—○ 肾脏
 ○—○—○ 血液 ×—×—× 肌肉

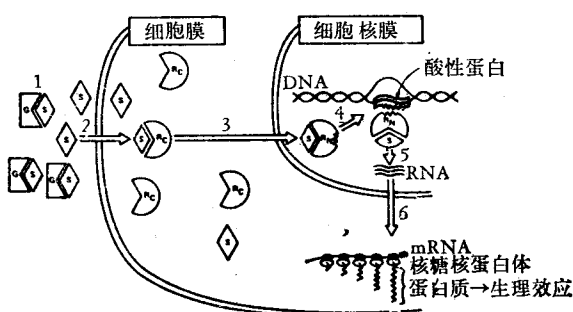
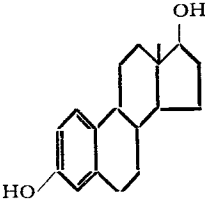
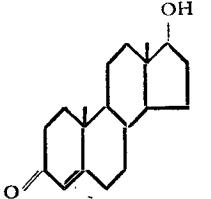
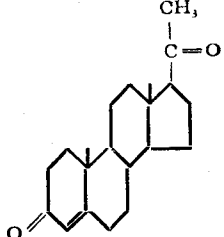
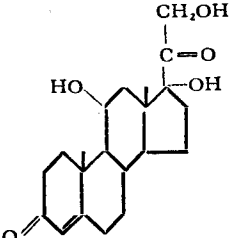
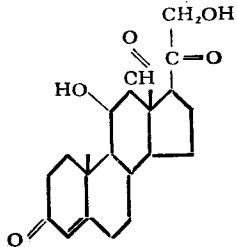


图2 甾体激素作用机制的模式

1. 甾体激素(S)结合在血液中的结合蛋白(G)上;
 2. 激素通过细胞膜扩散,与细胞浆受体结合成受体-甾体复合物(R·S); 3. 胞浆受体-甾体复合物发生变构作用,并转移到细胞核内(R_nS); 4. R_nS结合在核的受纳器上,接着得到基因转录作用活化; 5. 专一的DNA顺序进行转录,合成新的mRNA分子; 6. mRNA的翻译过程,有新的蛋白合成,从而调整生理反应。

* 本文系1977年9月在第二次全国乳房癌协作组会上所做的专题报告。

表 1 各 类 甾 体 激 素 的 代 表

名 称	来 源	靶 组 织	功 能	化 学 结 构*
雌激素 (雌二醇)	卵巢	子宫、阴道 乳腺 下丘脑	促进雌性特征的发育和保持	
雄激素 (睾酮)	睾丸	精囊 前列腺 睾丸	促进雄性特征的发育和保持	
孕激素 (黄体酮)	卵巢 胎盘	子宫 输卵管	维持妊娠	
糖皮质激素 (氢化可的松)	肾上腺皮质	所有的细胞	调节能量利用	
盐皮质激素 (醛固酮)	肾上腺皮质	肾	调节电介质平衡	

* 用粗线画出的为甾核结构

用分子机制的一个重大突破。十多年来经过许多实验室的努力,结合现代分子生物学的成就,对于甾体激素作用的分子过程已经有了一个比较明确的轮廓。雌二醇进入靶细胞后,首先与细胞浆中的受体蛋白结合,结合的复合物可能

具有新的分子构型,它能够进到细胞核内,与核内物质反应,主要是结合到染色质上,影响 DNA 的转录,从而有新的 mRNA 合成,接着细胞内就会有新的蛋白质合成^[4,5]。雌二醇对子宫细胞作用的这一模式(图 2),目前已为大

多数人所接受,而这一模式的每一个生化过程都有一定的实验事实支持。现在已知,对于其他甾体激素的作用,这一模型基本上也是适用的。

一、子宫细胞浆的雌激素受体

雌二醇进入体内可以和许多蛋白质结合。在大多数情况下,这种结合是非专一性的;只有在靶细胞中才有高亲和力的结合。这种高亲和力和低亲和力的组分在数量上非常悬殊,因此在测定时高亲和力的结合作用常常被低亲和力结合作用所掩盖。直至 1966 年 Toft 和 Gorski 用蔗糖密度梯度超离心方法鉴定这种高亲和力结合物质才获得成功。严格鉴定表明,这一组分对蛋白酶和其他蛋白变性条件是敏感的,并不受核酸酶的影响,显然是一种蛋白质^[6]。当时认为这种蛋白只存在于对雌二醇敏感的组织内,也就是说在经典的靶细胞内才有受体蛋白。可是近年来的工作证明,甾体激素特别是雌激素的受体蛋白的分布较原来设想的要广泛得多,但数量上要比经典的靶细胞内少得多^[7](见表 2)。

表 2 靶和非靶组织中雌激素受体含量

组 织	受 体 含 量 (pmole/100mg)
子 宫	5.92
阴 道	2.15
垂 体	1.43
肾 脏	0.20
膈 肌	0.06
脾 脏	0.02

甾体激素受体蛋白的三个特点是专一性强、亲和力高、结合量低。每一种受体蛋白只对它们特异的激素分子有高度的亲和力,就是说雌激素受体只能与雌二醇或与雌二醇结构相近的分子才发生紧密的结合,它们的亲和力常数一般在 $10^9-10^{12} M^{-1}$ 。反过来说,凡与雌激素受体能竞争性结合的化合物,都具有一定的雌激素活性,并且常常是雌激素的拮抗物。图 3 说

明雌激素受体对其他二个甾体激素孕酮及睾酮是没有结合力的。此外受体蛋白在组织内的含量是有限的,因此少量激素就可达到饱和结合。从图 3 已可看出尽管雌二醇浓度成倍增加,但 9.5 S 的组分几乎是相等的。受体蛋白的这三个特点为设计测定各种甾体激素的受体提供了有利条件。

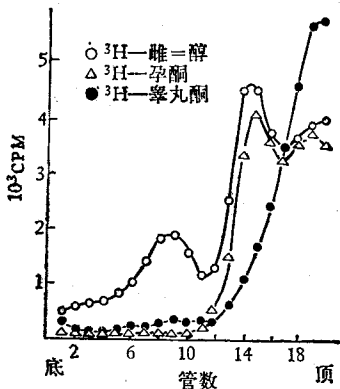


图 3 子宫细胞溶质雌二醇受体对不同甾体激素结合的专一性

后来其他一些研究者 (Erdos, 1968; Rochefort 和 Baulieu 1968; Korenman 和 Rao 1968) 报告,早期测定的 9.5 S 受体蛋白是与一个 8 S 的成份相一致的,并且发现样品中的盐浓度 (NaCl 或 KCl) 大于 0.2 M 时,这 8 S 复合物会可逆地转变成较轻的组分,它们的移动速度稍慢于牛血清白蛋白,约 4 S 左右。1969 年 De Somber 和 Jensen 等把钙离子加到子宫细胞浆中,有 EDTA 存在下制备了一个稳定的 4 S 结合单位,去盐后它不能可逆地回复到 8 S 或者更大的聚合物。1971 和 1972 年 Puca 等报告 8.6 S 形式的受体在高 KCl 浓度(大于 0.2 M)下转变为 5.3 S,分子量约 118000。他们还提出证据说明经钙离子稳定的 4.5 S 受体(分子量 61000)是由 Ca^{++} 活化的“受体转化因子”将 5.3 S 复合物转化成的。这种因子看来是一蛋白水解酶,它促使 5.3 S 复合物裂解为二个片段的分子。

细胞浆雌二醇受体分子的大小与制备时的条件有关系,因为后来许多作者报告的 S 值都有不同。Chamness 和 McGuire 曾总结过各实验室所报告的雌激素受体蛋白的不同 S 值,其

范围在 4—10 之间^[8]。

雌激素受体蛋白分子除了在不同盐浓度下有聚合和解聚作用外,对温度的变化亦是很敏感的。把子宫细胞溶质在 37℃ 保温 2 小时,结合雌二醇的能力丧失 85%,在 65℃ 15 分钟,就可全部丧失活性。可是在子宫细胞溶质中加入少量雌二醇后,受体的热稳定性就大大增加,由此一般认为受体分子本身原对热是不稳定的,但与激素生成的复合物是比较稳定的。

二、雌激素受体复合物与靶细胞核的反应

现在已有许多整体的和离体的实验证明,子宫细胞浆内的雌二醇受体复合物很快向细胞核内转移,由于这种转移作用,在给了大剂量雌二醇后,大鼠子宫细胞浆内可出现短暂的雌二醇受体的消失现象,经过 4 个小时恢复到原来的水平。细胞浆受体的补充是细胞继续接受激素刺激的必要条件;补充的究竟是原来的受体重复使用还是新合成的受体,还不清楚。雌激素受体复合物转移到核内与染色质结合,可以用 0.3M KCl 溶液抽提出来。它们的沉降系数是 5 S。自由的雌二醇不进入细胞核,将雌二醇直接与未曾接触过雌二醇的纯化的子宫细胞核保温,在核上测不到 5 S 的受体蛋白,而将雌二醇与子宫匀浆保温,或与离体的细胞核在有细胞溶质存在下保温,可以容易地生成 5S 的复合物。实验指出这种雌激素受体复合物转移到细胞核上是一种依赖温度的过程;在 0—2℃,这种转移过程极其缓慢,几乎没有发生,一旦温度上升到 25℃,雌二醇受体复合物很快进到细胞核内。这种温度依赖关系,以及雌激素受体复合物进入细胞核前后沉降系数的改变,一般认为是由于雌激素受体复合物的构型发生了变化。关于这种变构作用是发生在细胞浆内还是进入细胞核以后尽管还有争论,但雌二醇进到细胞核内必须先与细胞浆受体结合,没有受体的雌二醇与细胞核是没有作用的,则是肯定的。Jensen 和 Gorski 称这种现象为雌激素作用的“二步机制”,即激素分子进入靶细胞首先与受

体结合成复合物,然后在温度影响下通过变构作用进到细胞核内。

三、细胞核上激素受体复合物的结合点

激素受体复合物进到细胞核内是激素作用的关键一步。大量研究证明给了雌激素后的早期生化反应是大鼠子宫中 RNA 生物合成增加,这种作用受到环己亚胺(一种蛋白质合成的抑制剂)的抑制。RNA 和蛋白质合成抑制剂并不影响雌二醇与受体的结合和向细胞核的转移过程,但能抑制由激素受体复合物所激起的细胞核内的生化反应,也就是说激素受体复合物影响着细胞核内 DNA 的转录反应,由此可见雌激素是在基因水平上调节着生物大分子的合成。

为了说明甾体激素调节基因表达的一系列生化过程,这里介绍 O'Malley 小组的工作。他们用亲和层析的方法从雌二醇诱导过的小鸡输卵管中提纯了孕酮的受体蛋白。经过分析鉴定,孕酮受体是由二个蛋白亚基所组成的二聚体,每一个亚基由一条氨基酸链组成,分子量约 10 万;根据分子的轴比来看,分子的形状是中间粗两端细,像雪茄烟一样;二个亚基并排连接,每一个亚基有一个激素结合点。进入细胞核的孕酮受体复合物是与细胞核的染色质结合。进一步分析这一细胞核结合点性质指出,它是结合在染色质中核蛋白的非组蛋白上,O'Malley 等把这结合点定义为 AP₃。这一非组蛋白组分对激素受体复合物是专一的,只有小鸡输卵管组织的细胞核染色质来源的非组蛋白 AP₃ 组分才具有结合孕酮受体复合物的能力^[9](表 3)。

表 3 ³H-孕酮与小鸡输卵管细胞溶质保温后再与选择性除去酸性蛋白部分的染色质的结合作用

染 色 质	³ H-孕酮(μg)/DNA(g) (代表染色质)
对照(包含全部酸性蛋白 AP)	1.20
除去 AP ₂	1.02
除去 AP ₂ 和 AP ₃	0.34
除去 AP ₂ AP ₃ 和 AP ₄	0.30

现代分子生物学对细胞核染色质结构分析告诉我们,染色质主要是由 DNA 和核蛋白二部分构成(还有少量 RNA);核蛋白可分组蛋白和非组蛋白二大类;组蛋白是碱性的,种类不多,不同组织来源的组蛋白种类和组成基本上没有什么变化;非组蛋白又叫酸性蛋白,种类很多,在每一种细胞核内可多到 500 种以上,且不同的组织或不同的生物体这种酸性蛋白的种类有着很大的不同,目前有许多迹象表明它与基因的调控密切相关。看来甾体激素复合物可能是通过与这一类蛋白结合调节 DNA 的转录。

四、Jacob-Monod 理论和激素受体复合物调节 DNA 的转录

六十年代初, Jacob 和 Monod 在研究大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的诱导合成时,提出了一个蛋白合成基因调节的操纵子学说。这一理论对当前甾体激素作用机制的探讨有一定的影响。图 4 是 Jacob-Monod 理论的图解。他们指出一个蛋白质(酶)的结构是由 DNA 分子上一个叫结构基因决定的,由结构基因转录产生的 mRNA 具有一个蛋白质结构的密码,可翻译成蛋白分子。结构基因的转录作用受到另外一个叫调节基因的控制。调节基因本身也产生一个 mRNA 分子。由这个 mRNA 合成的蛋白质叫阻遏蛋白,它结合在与结构基因相连的一个叫操纵基因上,这样就阻止了结构基因的转录作用,一旦除去阻遏蛋白,结构基因就被活化,开始转录。这种由一个操纵基因和一个或几个结构基因组

成的单位就叫操纵子。Jacob 和 Monod 在大肠杆菌培养基中加入少量乳糖,可诱导细菌产生 β -半乳糖苷酶。他们认为这是乳糖分子与操纵基因上的阻遏蛋白结合后,使阻遏蛋白与操纵基因脱离, β -半乳糖苷酶的结构基因得到活化,启动 RNA 聚合酶合成了 β -半乳糖苷酶的 mRNA。他们把由乳糖分子所引起的这种反应叫诱导作用,乳糖分子本身称作诱导物。早在 1964 年, P. Karlson 把甾体激素的作用与细菌基因表达诱导物的作用作了比较,认为甾体激素可以引起靶组织中 RNA 合成的增加是因为甾体激素与阻遏蛋白结合使结构基因活化的结果。可是 Jacob-Monod 的理论是建立在原核生物模型的基础上的,原核细胞在结构上比有激素反应的哺乳动物细胞要简单得多,前者没有细胞核, DNA 均匀地分布在细胞浆里;后者是真核细胞,它们有明显的细胞核,在核膜内包藏着 DNA 和各种在原核细胞中不曾找到过的蛋白质,它们结合在一起组成染色质。同一种生物体的每一个细胞核内都有着相同的 DNA 结构,即生物体的全套遗传信息,但是不同的细胞可以产生出完全不同的蛋白质,由此可见真核细胞的基因调节是一个颇为复杂的问题。现在已有很多实验事实说明真核生物 DNA 具有的重复顺序,插入顺序,单拷贝基因,低的转录百分率等,这些在原核细胞的转录作用中是没有的。甾体激素也不是简单地像乳糖分子那样从操纵基因上除去阻遏蛋白而引起基因表达,而是激素分子与受体蛋白的复合物结合到染色质上而引起基因的表达,这种结合的性质是研究工作者十分感兴趣的问题。

O'Malley 等将提纯的孕酮受体二聚体在温度和盐浓度的影响下解离成亚基。这二个亚基的功能是不同的, A 亚基只能与 DNA 结合,对完整的染色质无亲和力;而 B 亚基可结合到完整的染色质上,且与非组蛋白结合,对 DNA 无亲和力。据此他们设想孕酮受体复合物的二聚体在调节基因表达作用中 B 亚基具有在染色质上定位的功能,而 A 亚基则具有启动 DNA 转录的作用^[10] (图 5)。他们用纯化的孕酮受体复

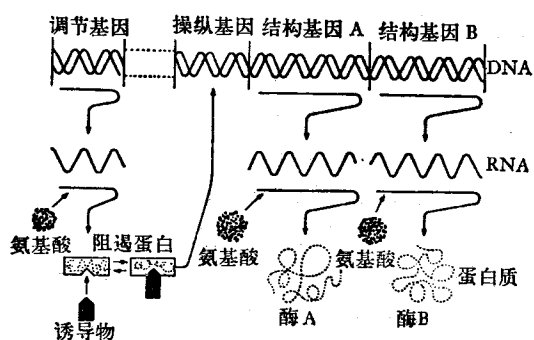


图 4 Jacob-Monod 提出的细菌中蛋白合成基因调节的操纵子学说

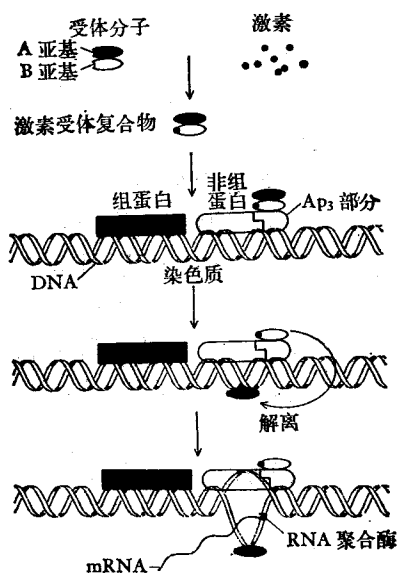


图5 O'Malley 提出的孕酮受体分子的二个亚基与染色质的相互作用使基因活化的模式图 (说明见正文)

合物和小鸡输卵管的染色质保温，在离体条件下证实了合成 RNA 的起始点数目与结合在染色质上孕酮受体复合物的数目之间具有一定的相关性。为了确定这些合成的 RNA 是否属于激素反应所特定的蛋白质密码，他们用 RNA-DNA 分子杂交技术，测定了孕酮受体复合物激发的输卵管染色质模板所合成的 RNA 是卵白蛋白的 mRNA，而卵白蛋白正是在雌激素或孕激素的诱导下才产生的。

孕激素受体复合物调节卵白蛋白的合成为我们了解甾体激素的作用提供了一个简便的实验模型。可是我们知道在小鸡输卵管中与孕酮作用有关的蛋白还有伴清蛋白，卵粘蛋白和溶菌酶等，它们的基因是怎样同时受孕酮受体复合物的调节，是一个颇为复杂的问题。为了寻找甾体激素作用更为原始的反应，Gorski 和 Banlien 二个不同的实验室分别独立地用同位素双标记技术测到了大鼠子宫在雌二醇的作用下早期所产生的诱导蛋白^[12](图 6)。他们用 ^{14}C 和 ^3H -亮氨酸分别掺入到雌二醇处理过的和对照的大鼠子宫合成的蛋白中，然后分别制备这二种动物的子宫细胞浆，并把它们合并起来用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白质的分离，接着

测定凝胶上 ^3H 和 ^{14}C 的产物，加以比较，可以看到一个不同于 ^3H 的 ^{14}C 峰，它就是雌二醇的诱导蛋白。环己亚胺和放线菌素 D(RNA 合成的抑制剂)都可抑制这一诱导蛋白的合成。这种与激素相关的诱导蛋白迄今只在大鼠子宫合成的蛋白中找到。关于这一蛋白的功能，有人认为可促进 DNA 的合成，调节离体培养细胞的增殖作用^[12,13]。

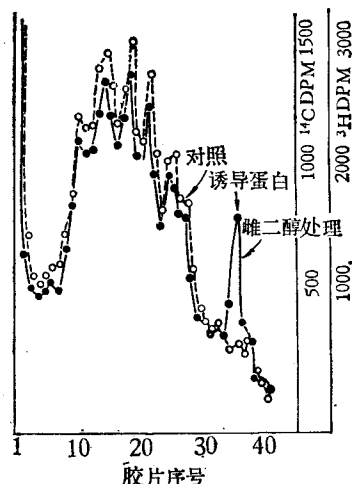


图6 离体条件下子宫与 ^{14}C 亮氨酸和雌二醇 — — — 或 ^3H -亮氨酸 保温后分离的可溶性蛋白的电泳分布

五、临床意义

甾体激素的作用一定要通过专一性的受体蛋白才能实现，而细胞内受体含量的多少又决定这一细胞对激素反应的大小，同时激素受体复合物与细胞核的相互作用是细胞对激素产生效应的关键步骤。这些结果不仅对了解甾体激素的作用在理论上有意义，而且对于临床实践也有一定的指导作用。例如有一种男性假两性畸形的病人，他们血液中的雄激素水平与正常人没有差别，但由于靶组织中缺乏雄激素受体蛋白，因此雄性第二性征就不能发育。有一些癌肿组织的生长与激素有密切的关系，在雌激素依赖的乳腺癌组织中就有雌激素的受体蛋白，其他如前列腺癌，淋巴肉瘤有的也分别与雄激素和肾上腺皮质激素有关，在这种肿瘤组织中就分别含有相应的受体蛋白。因此若人工合

成一些化合物,具有与天然性激素竞争受体的作用,就有可能用于治疗目的。事实上各类甾体激素相应的拮抗物都已合成;利用拮抗物来研究甾体激素的作用,也是近几年来一个很活跃的方面。纳法西丁(Nafoxidine)它之所以有抗雌激素作用是由于阻断了细胞浆受体的补充,纳法西丁开始与子宫细胞浆受体结合成复合物,也可转移到细胞核里。它在细胞核里保留的时间比雌二醇长,在细胞核上结合规律也不完全同于雌激素。虽然它能引起基因的转录,一次给药也可促进子宫生长,可是它抑制细胞浆受体的循环使用或新合成,就不能继续对激素起反应,所以一般都是一次给药时具弱雌活性,而多次给药则拮抗性十分明显。随着甾体激素作用机制的深入了解,人工设计合成的抗激素试剂还有可能作为安全有效的避孕药物。

六、结 束 语:

甾体激素作用机制的研究十多年来虽然取得了很大的进展,但对它的了解还是属于粗线条的。从激素分子在内分泌腺体中产生,直至在靶细胞内如何调节基因的表达,各个环节上都有着许多尚待澄清的问题,特别是作为甾体激素作用的关键大分子——受体蛋白,由于它们在组织内的含量有限,提纯起来比较困难,又由于方法学上的局限,对它的了解也还是很不夠的。例如,受体一定要在与激素结合的情况下才可测定,在靶细胞内自然状态的受体分子究竟是怎样的,就无法知道。还有激素受体复

合物变构作用的本质是什么?它们在细胞内的功能是什么?在DNA的转录过程中激素和受体究竟是如何参与反应的?可以说甾体激素的作用愈深入到细胞内部的分子过程,我们能得到的信息愈少,原因是真核细胞的基因表达本身,就是当今分子生物学正在攻坚的一大课题。尽管如此,甾体激素与基因表达的关系目前正是一个活跃的研究领域。对甾体激素的受体分子作为真核细胞转录作用的调节元件正在积极的研究。

本文得到张友瑞先生的指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Shutsung Liao.: *Int. Rev. Cytol.*, 41, 87, 1975.
- [2] Jensen, E. V. et al.: *Recent. Progr. Hormone Res.*, 18, 387, 1962.
- [3] Stumpf, W. E.: *Endocrinology*, 83, 777, 1968.
- [4] Jensen E. V. et al.: *Sci.*, 182, 126, 1973.
- [5] Hsueh, A. J. W.: *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 21, 53, 1978.
- [6] Toft, D. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 1740, 1967.
- [7] Clark, J. H. et al.: *Receptor and Hormone Action*, 383 ed by O'Malley.
- [8] Chamness, G. C. et al.: *Biochemistry*, 11, 2466, 1972.
- [9] O'Malley, B. W. et al.: *J. B. C.*, 247, 1368, 1972.
- [10] O'Malley, B. W. et al.: *Scientific American* 234 (2), 32, 1976.
- [11] Schulster, D. et al.: *Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones*, p257.
- [12] Yamomuto, K. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 721, 1976.
- [13] Liu Yi-Hsun (刘以训): *Scientia Sinica*, 22, 222, 1979.

[本文于1979年11月20日收到]

生 物 活 性 肽——P 物 质

温 博 贵

(江西医学院生化教研室)

1931年 Von Euler 和 Galdum 在测定乙酰胆碱的组织分布时,发现马脑和肠壁的酸性乙醇提取液中存有另一种生物活性物质。因当时

将该物质制备成粉末状态(powder),故称之为P物质^[1](下称SP)。然而,经过近半个世纪的研究,证明SP具有重要的神经生物学功能。目