

(School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract In the progress of the genome projects, the most important purpose of molecular biology of the gene is to investigate the structure and function of not only single important gene but also the whole genome, that is the gene transcription and expression patterns of the whole cell. In order to resolve such complex problem, revolutionary research methods

must be developed. Serial analysis of gene expression (SAGE), cDNA microarray, DNA microchip are the novel methods for fast and quantitative analysis of gene characteristics which are recently advanced in this background.

Key words gene expression patterns, serial analysis of gene expression (SAGE), cDNA microarray, DNA microchip

雄激素受体的作用机制

解 芳 刘 峻 张永莲

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 主要概述了雄激素受体的作用机制, 特别对影响雄激素受体特异性的因素进行探讨. 雄激素受体 (AR) 属于甾体激素受体超家族, 能通过配体依赖方式与特异的 DNA 序列结合, 调控基因转录.

关键词 雄激素受体, 应答元件, 转录调控, 专一性

学科分类号 Q71

雄激素可以扩散进入靶组织和非靶组织, 但它只在雄激素受体存在的靶组织细胞中行使其生物学功能. 象其他所有甾体激素受体一样, 雄激素受体也是一种转录因子, 它一旦被雄激素激活便能识别靶因子上专一的 DNA 序列并与之结合, 从而调控该基因的转录, 并表达新的蛋白质, 最终使得细胞的功能发生改变. 雄激素受体对其靶基因的调控具有高度的专一性, 这种专一性无法简单地用受体与特异 DNA 序列结合来解释, 本文将从受体表达的细胞特异性, 受体相对应的配体特异性分布, 辅助性顺式元件的参与, 辅激活因子 (coactivator) 的发现以及染色质结构等方面加以阐述.

1 雄激素受体 (AR) 的结构和功能

雄激素受体基因由 8 个外显子组成, 其编码的雄激素受体是一种核蛋白, 由 918 个氨基酸组成^[1]. AR 的基因及蛋白质的结构特征如图 1 所示. 外显子 1 最大, 编码受体的 N 端, N 端的残基最不保守. 结构分析表明, N 端结构域与 AR 的转录激活有关^[2]. 这个区域包含两种多聚体——多聚谷氨酸和多聚脯氨酸, 多聚氨基酸结构被认为在转录激活方面起重要作用^[3]. 外显子 2 和 3 编码

AR 的 DNA 结合结构域 (DBD), 该结构域高度保守, 由 68 个氨基酸组成, 能折叠成两个锌指结构. 外显子 4 至 8 编码受体的铰链区和配体结合结构域 (LBD), 该区域起着形成二聚体和结合配体的作用.

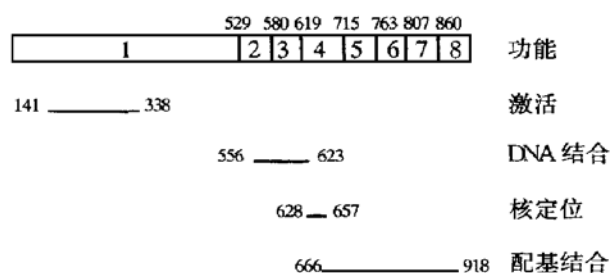


图 1 雄激素受体结构功能示意图

2 AR 的作用机制

2.1 AR 的活化与进核

AR 在胞浆中能与热休克蛋白 (Hsp) 结合, 当雄激素与 AR 结合后, AR 被激活, 热休克蛋白解离, AR 进入核中与 DNA 作用. 在过去 10 年中, 发现了许多核定位信号 (NLS) 与蛋白质的核定位有关^[4]. 该信号的一个共同特征是富含赖氨酸

酸和精氨酸. 通过转染实验研究一系列 AR 缺失突变体的亚细胞定位, 发现位于 AR 铰链区的 NLS 对 AR 进核起关键作用^[5].

2.2 AR 与特异的 DNA 序列结合

AR 在核内与特异的 DNA 结合是调控基因表达的关键一步. 通过转染实验, 将含有报告基因的嵌合质粒转入宿主细胞后, 鉴定到较短的 DNA 元件, 其对于报告基因在激素诱导下的表达是不可缺少的. 此类 DNA 调控序列被称为激素应答元件 (HRE). 雄激素应答元件 (ARE) 是 HRE 中的一员. 现在, 已在许多雄激素应答的基因上找到了 ARE^[6]. 但这些 ARE 事实上与糖皮质激素受体 (GR) 识别的应答元件 (GRE) 几乎完全相同, 其序列为 GGA/TACA nnn TGTTCT, 是一个不完全的回文结构. AR 能以二聚体的方式与之结合. AR 特异应答元件的搜寻研究尚在进行之中.

在许多基因中激素应答元件常常成簇出现, 形成激素应答单元 (HRU), 行使增强子功能. 当这些应答元件单独存在时活性极低, 而聚集在一起时活性明显提高. 这表明在一个基因中几个 ARE 可能以协同方式对转录激活起作用^[7].

2.3 AR 的激活功能

AR 与 ARE 结合后, 诱发或抑制基本转录机器的装配, 进而调控 RNA 的合成. 在几种甾体激素受体上 (包括 AR), 主要的激活功能 (AF-1) 被定位在受体的 N 端^[8], 第二个激活功能 (AF-2) 在 LBD 发现^[9]. AF-1 和 AF-2 的活力随着启动子和细胞类型的变化而改变, 两个区域的协同作用可能产生最大的转录应答 (图 2).

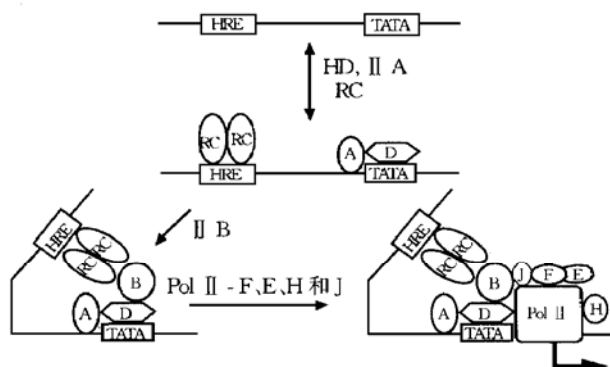


图 2 核受体转录调控的示意图

关于 AR 如何与基本转录机器相互作用现在还知之甚少, 但最近有报道^[10] AR 的 AF-1 结构域能与基本转录机器中的转录因子 TF II F 相互作用,

促进转录. 其他核受体 (例如维生素 D 受体) 与应答元件结合后, 则能与转录因子 TF II B 相互作用^[11, 12]. 此外 TF II D 的亚基也是核受体的接触位点. 例如雌激素受体 (ER) 的 AF-2 区域能与 TAF II 30 相互作用^[13]. 目前已经提出的反式因子与基本转录机器相互作用的模型有以下几种^[14, 15]: a. 通过桥蛋白起作用; b. 相互直接作用; c. 通过影响染色体结构起作用.

3 决定 AR 特异性的因素

AR 和 GR 都能与 GRE 类的元件结合, 但它们分别调控不同的基因, 表现出完全不同的功能, 这一问题已经并继续得到分子生物学家的关注. 目前发现许多因素会影响受体功能的特异性. 例如受体表达的细胞特异性以及受体相对应配体的特异性分布. 然而当 GR 和 AR 在同一细胞中皆表达且被配体活化时, 受体的特异生理功能的机制就不能用上述两个理由来解释了. 可能的主要原因还有以下四种.

3.1 受体自身的差异

GR 亚家族受体 N 端结构域同源性较低, 且含转录激活功能 (AF-1), 可能会有助于受体特异性发挥作用. 在其他转录因子中有这样的例子. 例如八聚体结合因子 Oct-1 和 Oct-2 结合同样的 DNA 序列, 但是 Oct-2 C 端的激活结构域 (非 Oct-1 C 端的激活结构域) 能激活含八聚体序列的 β -珠蛋白基因的转录^[16].

3.2 辅助性顺式元件与 ARE 形成复合应答单元

前面已述在受雄激素调控的基因上发现了一些 ARE, 但它们与 GRE 几乎完全相同, 并且在转染实验中, 这些序列不能优先应答雄激素的诱导. 这与这些基因在体内主要受雄激素调控相矛盾. 但是在用包含 ARE 和其他顺式元件的较长天然 DNA 片段作转染分析时, 发现其能优先应答雄激素^[17]. 因此, 辅助性顺式元件与 ARE 形成的雄激素应答单元可能在受体特异行使功能时起作用.

3.3 辅助性反式作用因子的参与

在 SLP 基因中发现了一个增强子, 只对雄激素应答, 糖皮质激素对其没有激活效应. 转染实验发现 GR 和 AR 都能结合在这一增强子上, 但是 GR 没有反式激活作用, 这说明不是蛋白结合序列本身, 而是结合于 HRE 附近的辅助因子起作用^[18].

Yeh 等^[19]报道, 利用酵母双向杂交系统分离得到了一个 AR 专一的辅助激活因子能明显提高

AR 转录活力, 该因子的发现表明, AR 对其靶基因的专一调控需要辅助因子参与。

3.4 染色质的结构

激素受体与 HRE 的作用机制主要是从体外实验推断出的。体内受体与 HRE 直接结合的有力证据尚不多见。染色质结构在体内基因转录中起着重要的调节作用。转录因子与顺式元件之间的相互作用受染色质结构的影响。核受体的一个重要功能是改变染色质结构, 促使辅助因子与启动子结合, 诱导基因转录。有证据表明, 激素受体在改变染色质结构的能力上有差异。如: 糖皮质激素和孕激素对 MMTV 启动子作用不同, 原因是糖皮质激素受体比孕激素受体 (PR) 易于活化模板的染色质结构^[20]。由此可见, 染色质结构对受体特异性激活基因转录有一定作用。

目前在细胞水平, 发现细胞与细胞间的接触影响受体的转录激活, 是否其对受体特异行使功能有作用尚待进一步研究。

GR 亚家族受体 DNA 结合的非专一性, 功能的高度专一性, 涉及的原因可能不止上述几种, 也有可能通过多步作用模式起作用, 即受体发挥作用的每一步骤的专一性是有限的, 多步控制产生的累积效应可能会有很高的专一性。这些步骤包括激素与受体结合, DNA 与受体结合, 转录激活等, 其中酶促反应导致配体活化或失活也是重要一环。

4 展 望

目前由雄激素所引出的调控机制主要集中在起始转录这一步, 对转录后调控的了解还非常有限, 将来的研究必将导向这个方面。诸如, 雄激素能调节 mRNA 的稳定性和它的翻译吗? AR 是否对 RNA 聚合酶 II 的延伸速度及 RNA 的拼接有调控作用? 此外, AR 蛋白本身的作用无疑也会引起广泛的关注。例如怎样的信号途径和配体能调节 AR 活力? 这些途径和配体是否对突变体 AR 也起作用? AR 是否也具有类似 ER 的非基因组机制? 最后随着 AR 专一的辅助激活因子被克隆, 辅因子的搜寻仍将是研究热点。

参 考 文 献

- Chang C, Kokontis J, Liao S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptor. *Science*, 1988, **240** (4850): 324~ 326
- Simental J A, Sar M, Lane M V, *et al.* Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, 1991, **266** (1): 510~ 518
- Gerber H P, Seipel K, Georgiev O, *et al.* Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science*, 1994, **263** (5148): 808~ 811
- Silver P A. How proteins enter the nucleus. *Cell*, 1991, **64** (3): 489~ 497
- Zhou Z X, Sar M, Simental J A, *et al.* A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. *J Biol Chem*, 1994, **269** (18): 13115~ 13123
- Chang C, Saltzman A, Yeh S, *et al.* Androgen receptor: an overview. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 1995, **5** (2): 97~ 125
- Kasper S, Rennie P S, Bruchovsky N, *et al.* Cooperative binding of androgen receptors to two DNA sequences is required for androgen induction of the probasin gene. *J Biol Chem*, 1994, **269** (50): 31763~ 31769
- Palvimo J J, Kallio P J, Jkonen T, *et al.* Dominant negative regulation of trans-activation by the rat androgen receptor: roles of the N-terminal domain and heterodimer formation. *Mol Endocrinol*, 1993, **7** (11): 1399~ 1407
- Kallio P J, Poukka H, Moilanen A, *et al.* Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol Endocrinol*, 1995, **9** (8): 1017~ 1028
- McEwan I J, Gustafsson J. Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (16): 8485~ 8490
- Ing N H, Beekman J M, Tsai S Y, *et al.* Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem*, 1992, **267** (25): 17617~ 17623
- MacDonald P N, Sherman D R, Dowd D R, *et al.* The vitamin D receptor interacts with general transcription factor IIB. *J Biol Chem*, 1995, **270** (9): 4748~ 4752
- Jacq X, Brou C, Lutz Y, *et al.* Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*, 1994, **79** (1): 107~ 117
- Adams C C, Workman J L. Nucleosome displacement in transcription. *Cell*, 1993, **72** (3): 305~ 308
- Gill G, Tjian R. Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein. *Curr Opin Genet Dev*, 1992, **2** (2): 236~ 242
- Tanaka M, Herr W. Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2 interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell*, 1990, **60** (3): 375~ 386
- Rennie P S, Bruchovsky N, Leco K J, *et al.* Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol*, 1993, **7** (1): 23~ 36
- Adler A J, Danielsen M, Robins D M. Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (24): 11660~ 11663
- Yeh S, Chang C. Cloning and Characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (11): 5517~ 5521
- Archer T K, Zaniewski E, Moyer M L, *et al.* The differential capacity of glucocorticoids and progestins to alter chromatin structure and induce gene expression in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 1994, **8** (9): 1154~ 1162

Action Mechanisms of Androgen Receptor. XIE Fang, LIU Jun, ZHANG Yong-Lian (Shanghai

Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract The androgen receptor (AR) belongs to the steroid hormone receptor superfamily that is a ligand-dependent transcription factor. It can regulate gene transcription through binding to specific DNA

element. The action mechanism of androgen receptors is summarized with a special emphasis on the specificity of the function of androgen receptors.

Key words androgen receptor, response element, transcriptional regulation, specificity

反义核酸抗肝炎病毒研究进展*

林汝仙 王升启

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 病毒性肝炎的治疗一直是困扰人类的一个难题。目前可利用的药物仍屈指可数。反义核酸技术的发展为病毒性肝炎的治疗带来了新的希望。利用反义 DNA, 反义 RNA 和核酶技术来抑制乙型肝炎病毒, 丙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒, 在体外已进行了大量的研究, 体内也进行了一些研究, 为临床应用反义核酸治疗病毒性肝炎奠定了基础。

关键词 反义核酸, 抑制, 肝炎病毒

学科分类号 Q75, R512.6

病毒性肝炎是人类与其长期抗争的恶魔, 迄今已发现有 7 种类型。由于病毒性肝炎的传染性强, 尤其是乙型及丙型病毒性肝炎可形成慢性感染, 造成肝细胞的持续损伤, 加重肝脏病变, 常导致病情反复发作, 长期迁延不愈, 部分病人可发展成肝硬化和肝癌, 危害极大。近年来, 对病毒性肝炎的研究有较大的进展, 但能有效治疗病毒性肝炎的临床药物仍屈指可数, 尤其是对慢性乙型及丙型病毒性感染, 临床可用的药物仍是各型干扰素, 对有选择性的病人来说, 其治愈率也只有 30% ~ 40%^[1]。因此寻找一种有效的抗肝炎病毒药物已成为迫在眉睫的问题。

由于病毒的遗传物质不同于宿主细胞, 从基因治疗的角度去发现新的抗病毒药物已成为近年来的研究热点。反义核酸技术是一种新的基因治疗技术, 包括反义寡核苷酸 (ASON), 反义 RNA (asRNA) 及核酶三大部分。反义寡核苷酸是一段反义的 DNA 序列, 能与特异性的靶序列互补, 抑制靶基因的表达。由于它特异性强, 毒副作用小而成为人们研究抗病毒药物的热点。近几年来已有几种抗病毒反义寡核苷酸药物进入临床试验阶段。反义 RNA 是指一段与 mRNA 互补的 RNA 分子, 是通过将正常 cDNA 反向插入到启动子下游后转录产

生的。核酶是一种小的 RNA 分子, 能以序列特异的方式在特定的位点断裂 RNA 分子, 从而阻断特异蛋白的表达。核酶的抗病毒作用也引起了研究者的广泛兴趣和关注。本文主要对近几年来应用反义寡核苷酸, 反义 RNA 和核酶技术抗肝炎病毒的研究进展作一简要综述。

1 反义核酸抗乙型肝炎病毒

病毒性乙型肝炎 (HBV) 以其感染面广, 慢性化和难以治愈而成为临床治疗的难点。目前, 全世界约有 3 亿人感染 HBV, 我国乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的携带率占全国人口的 9.8%, 占全世界感染者的 1/3 强。干扰素是目前临床上唯一可用于治疗 HBV 感染的药物, 但治疗效果不好, 随着反义寡核苷酸技术的产生和发展及对 HBV 基因结构, 功能和复制等主要环节的认识和了解, 应用 ASON 来抑制 HBV 基因的复制和表达在体外已进行了大量的研究, 体内也进行了一些研究。体外研究主要采用转染了 HBV DNA 并能长期稳定分泌病毒的肝癌细胞系进行的 (HepG2,

* 国家“863”国家自然科学基金 (102-08-04-01) 及总后“9.5”重点课题 (962007) 资助。

收稿日期: 1997-12-15, 修回日期: 1998-04-20