

降钙素和降钙素基因相关肽的选择性表达

杨绍华 陈俊杰

(华西医科大学重组 DNA 研究室, 成都 610041)

摘要 降钙素和降钙素基因相关肽 (CT/CGRP) 由同一基因编码, 该基因结构及其 5' 端侧翼序列决定了它能够在甲状腺 C 细胞以及中枢和外周神经细胞生成不同的表达产物. 这种选择表达调控决定多细胞生物的发育、性别分化和进化. 如果表达失控将导致甲状腺髓样癌 (MTC) 和骨质疏松症等疾病. 文章对该基因的结构和选择性表达调控进行了综述.

关键词 降钙素, 降钙素基因相关肽, 选择性表达, 甲状腺髓样癌

Copp 等于 1962 年发现狗副甲状腺分泌一种降钙作用快速而短暂的激素并命名为降钙素 (CT), 随后用酸抽提法分离得到前体 CT 为 130 肽, 活性 CT 为 32 肽, $M_r=3500$, 第 1、7 位的半胱氨酸形成分子内 —S—S— 键, 外观呈套索状^[1,2]. 1981 年, Rosenfeld 等^[3]利用甲状腺髓样癌 (MTC) 能分泌大量 CT 的特征, 对 CT 基因的表达调控进行了研究, 发现移植的 MTC 细胞内同时存在着两种约 1.0 kb 和 1.1 kb 的成熟 CT mRNA. 序列分析表明, 二者 5' 端起始密码 ATG 至下游 228 bp 核苷酸序列完全相同, 仅 3' 端序列有所不同, 说明两者系由同一基因编码并具有共同的原始转录体, 随后才开始出现选择性剪接加工, 实现其产物的分化. 组织定位显示, 1.0 kb 的 CT-mRNA 主要存在于甲状腺 C 细胞, 而 1.1 kb 的 mRNA 则主要存在于大脑皮层、丘脑下部、脑垂体和脊髓前角运动神经元. 后者原始翻译产物为 128 肽, N 端的 76 个氨基酸与前体 CT 相同, 遂称为降钙素基因相关肽 (CGRP). 活性 CGRP 为 37 肽, $M_r=4100$, 外观与 CT 相同, 具有扩张血管和降低血压的作用^[4]. 研究阐明 CT/CGRP 基因以及 5' 侧翼调控序列以及它在神经内分泌细胞的选择性表达调控机制, 不仅有助于理解多细胞生物的发育和分化, 也便于解释某些临床疾病的发病机理. 最近的研究

表明, 骨质疏松症 (osteoporosis) 年轻患者血浆 CT 含量低和 MTC 组织中异常增多均与该基因的表达调控有关^[5], 因而对它的研究颇为引人注目, 本文拟就其研究进展作如下综述.

1 CT/CGRP 基因及 5' 旁侧序列

人 CT/CGRP 的基因定位于 11 号染色体短臂 1 区 2 带 (11P¹²), 跨度 7.8 kb, 5' 端调节序列为 1.8 kb, 编码区 5.8 kb. 编码区含有 6 个外显子和 5 个内含子. 在转录过程中, 外显子 1、2 和 3 为 CT 和 CGRP 的 mRNA 所共用, 外显子 4 仅含有 CT 的编码, 外显子 5 仅含有 CGRP 的编码. 外显子 1 和 6 仅转录而不翻译成多肽链, 分别称为 5' 和 3' 端非翻译外显子. CT/CGRP 基因起始密码子 ATG 位于外显子 2 序列中, 其 5' 端为外显子非翻译区. CT 和 CGRP 的终止密码 TAA 和 TGA 分别位于外显子 4 和 5 序列中, 故外显子 4 和 5 的 3' 端也含非翻译区 (图 1)^[6].

CT/CGRP 基因 5' 侧翼调节序列含有: 基本转录增强子 (enhancer of basal transcription, EBT) 和协同转录增强子 (enhancer of synergetic transcription, EST), 分别位于 -1460 bp 至 -820 bp 和 -260 bp 至 -104 bp; TATA 盒 (5'-AATAA-3'), 位于 -29 bp 至

-25 bp, 为 RNA 聚合酶转录起始信号; 两个 cAMP 识别位点, 分别为 5'-TGACGTCA-3' (-260 bp 至 -253 bp) 和 5'-GTGACGCA-3' (-111 bp 至 -104 bp), 同一序列为 5'-TGACG-3'; 螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 位点, 5'-CCNNCC-3', 有 5 个区段, 分别位于 -1573 bp 至 -1568 bp, -1430 bp 至

-1425 bp, -1241 bp 至 -1236 bp, -1023 bp 至 -1017 bp 和 -82 bp 至 -77 bp; 八聚体结合位点, 5'-AGTGCAAAT-3' (-167 bp 至 -160 bp 和 -1017 bp 至 -1009 bp), 与八聚体具有特异亲和性; 反式作用因子 (trans-acting factor, TAF) 结合位点, 5'-TGACCTCA-3' (-175 bp 至 -168 bp) (图 2)^[7]

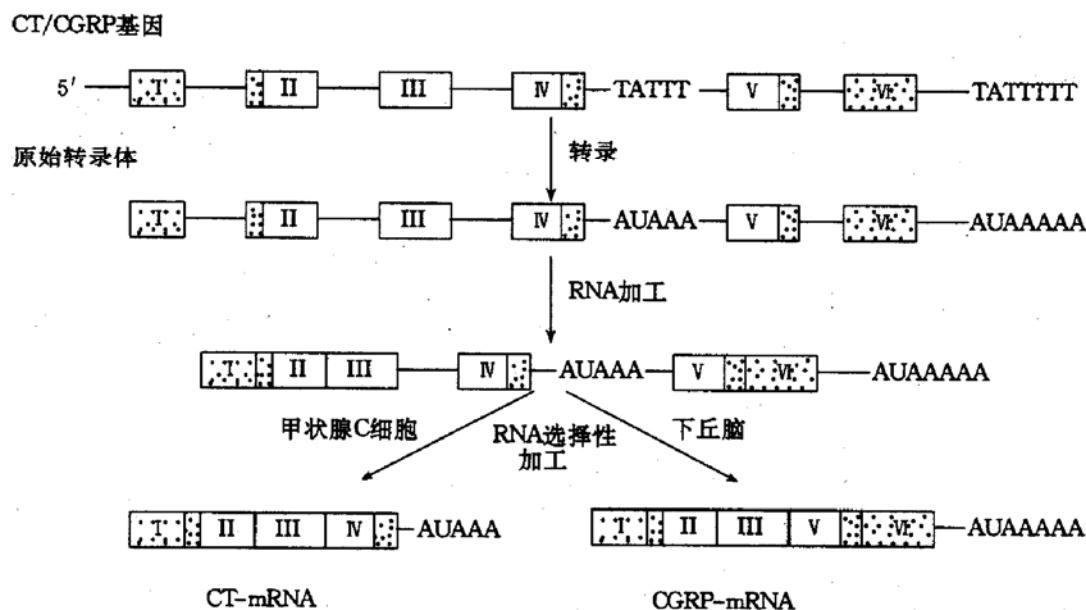


图1 CT/CGRP 基因结构、转录和加工

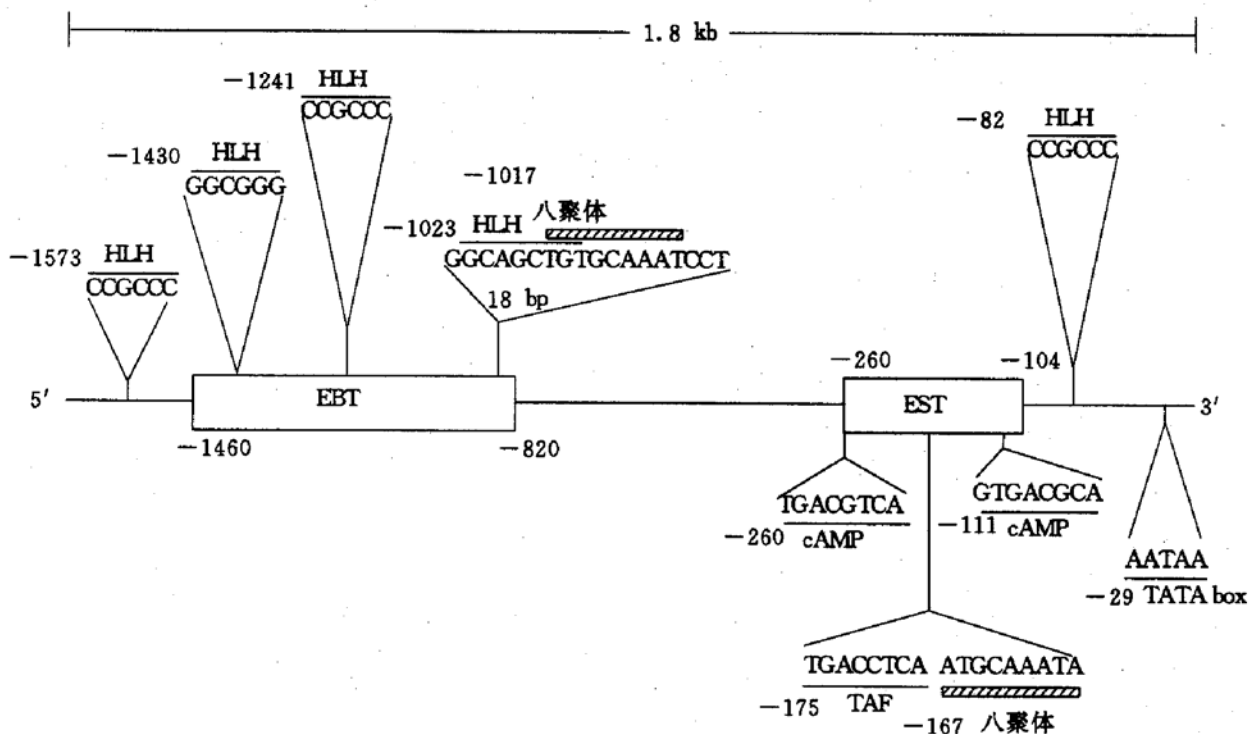


图2 CT/CGRP 基因 5' 侧翼调节序列结构特征

研究表明,HLH 和八聚体等转录因子与上述各转录元件特异结合是激活增强子活性和 CT/CGRP 基因细胞特异性表达所必需的,无论 HLH 或八聚体结合位点的突变均可导致增强子活性丧失.最近发现 HLH (HB1 和 HB2) 和八聚体 (OB1 和 OB2) 转录因子均系蛋白质家族,其中 OB2 与 HLH (可能为 HB1) 形成复合物,相互协同作用可使增强子活性明显增强,表明它们是 CT/CGRP 基因转录的重要因子.

2 CT/CGRP 基因选择性表达

CT/CGRP 虽在不同的组织表达,但它们具有共同的原始转录体,长 5.7 kb,经过进一步剪除三个内含子 (1、2 和 5),形成一个长 3.3 kb 的中间体;随后由于剪接位点的选择而表现出组织特异性.在甲状腺 C 细胞中,以外显子 3 与外显子 4 及其 3' 端 Poly A (5'-AUAAA-3') 尾拼接占优势,故 98% 的 CT/CGRP 基因转录产物为 1.0 kb 的成熟 CT-mRNA;在神经元中则以外显子 3 与外显子 5 和外显子 6 及其 3' 端 Poly A (5'-AUAAAAA-3') 尾拼接为主,故 99% 为 1.1 kb 的成熟 CGRP-mRNA (图 1).若将以产生 CGRP-mRNA 占优势的神经元内该基因内含子 3 (恰在外显子 4 上游) 约 21 个核苷酸去除,可使 CT-mRNA 生成量明显增加,表明这段缺失序列可能含有 CT 特异剪接的负调节因子的结合位点^[8].

CT 和 CGRP 基因除在甲状腺和神经组织表达外,还在肺、胸腺、前列腺和消化道等组织散在的类 C 细胞和某些癌细胞 (MTC 细胞和纵膈肿瘤细胞) 中表达. Tschopp 等^[9]在测定 CT 和 CGRP 的含量时发现,每克甲状腺组织含有约 (146 ± 26) ng 的 CT,而每克 MTC 组织的 CT 含量竟高达 (680 ± 372) μ g,为甲状腺正常组织含量的 1000~2000 倍,表明 CT 在 MTC 细胞内表达处于失控状态, Symes 等^[10]发现这与一个位于 -1500 bp 的 TAF 位点有关. Peleg 等^[5]在 CT/CGRP 基因 5' 侧翼 EST 内检出 3 个与 MTC 有关的基序即 E1、E2 和

E3; 比较 CT 阳性和阴性的 CT 基因的表达,发现 CT 阴性癌细胞的 3 个基序都具有增强子活性,以 E2 最强并起主导作用, E1、E3 活性较弱,可能是辅助基序,在 CT 阴性细胞中唯独 E2 没有增强子活性.这说明在两种癌细胞内 E2 的激活因素互不相同,目前认为最大可能是由于转录因子翻译后修饰导致空间构象改变,从而影响其与 E2 基序的结合反应.现从 B 淋巴细胞和胰癌细胞中分离 HLH 蛋白质家族,因其空间构象不同,在不同细胞表现的转录活性也各异.将 E2 由 CAGCTG 诱变为 CTTCCG,则使其增强子活性大大减弱甚至完全丧失,这说明 E2 自身的碱基改变也影响与蛋白因子的结合反应.

3 CT/CGRP 选择性表达的调节

在真核生物体内,大量基因的表达调控都是通过选择性 RNA 剪接机理实现的,在高等生物体内决定个体发育、性别分化和组织特异性的基因表达即是如此^[11]. RNA 剪接在细胞核内进行,需要前体 mRNA 与小分子 RNA (即 SnRNA) 和蛋白质构成 SnRNPs 或称为剪接体 (spliceosome). 业已证实一些 RNA 结合蛋白质作为反式作用因子 (TAF), 参与选择性 RNA 剪接过程. 如剪接因子 SF2 普遍存在于哺乳动物细胞核内,它是原始转录体剪接第一步所必需的,无论在体内或体外实验,调节 SF2 浓度即可改变一些基因 5' 端剪接位点的使用; 3 种决定果蝇性别特异性的剪接因子 (即 *sxl*、*tra* 和 *tra2*) 均影响了 3' 端剪接位点的使用^[12]. 哺乳动物体内决定组织特异性的剪接因子尚待证实. 如 Cote 等^[13]从 HeLa 细胞核抽提出一种分子量 60 000 的蛋白质,它能够与 CT/CGRP 前体 mRNA 的外显子结合. 最近, Resser 等^[14]从大量大鼠脑组织分离得到分子量为 43 000 和 41 000 的两种蛋白质,它们能够与 CT/CGRP 前体 mRNA 剪接受体结合,抑制 CT-mRNA 的生成,表明它们可能是参与选择性剪接活动的 TAF.

前体 mRNA 剪接为两步反应,第一步在

5' 端的剪接供位上裂解, 并在分支点序列 (branch point sequence, BPS) 形成内含子套圈 (intron lariat); 第二步在 3' 端剪接受位上裂解, 并使两端外显子相互连接. 上述 5' 端供位和 3' 端受位均含有保守的核苷酸序列, 在酵母该序列为 UACUAAC, 在高等真核生物则为 PyNPYUPuAPy^[15,16]. 近年发现几种与选择性 RNA 剪接加工有关的顺式作用元件. 例如, CT/CGRP 前体 mRNA 内含子 3 和外显子 4 的 3' 端裂解位点的序列分别为 UACUGUC 和 CACUCAC. Adema 等^[17]体外剪接实验证实, 上述内含子的 3' 端分支受位是调节 CT/CGRP 前体 mRNA 选择性剪接的顺式作用元件, 若 U 突变为 A, 则使 CT-mRNA 生成增多.

实验证实 CT/CGRP 基因转录也受激素、第二信使和其他大分子的调控. 尽管血浆 Ca^{2+} 浓度变化会引起 CT 分泌量的改变, 但细胞内 CT-mRNA 的生成量则保持相对恒定. 现已知, 类固醇激素和 cAMP 等促进 CT/CGRP-mRNA 的生成; 1, 25-二羟基维生素 D_3 ($1, 25-[OH]_2D_3$) 和视黄酸 (retinoic acid, RA) 等则抑制其生成. 视黄酸抑制该基因表达是由细胞核内的 RA 受体 (RA receptor, RAR) 介导的, 其抑制效应是作用于 EBT 的 18 bp 基序. 突变分析表明, 无论 HLH 或八聚体结合位点突变都将抑制该基因表达, 二者协同调节该基因转录缺一不可^[18,19]. 电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assays, EMSA) 显示, RA-RAR 复合物不直接与基因结合, 而是先形成 HLH-Octamer-RA-RAR 复合物, 使 HLH-八聚体构象改变而且不再与 18 bp 基序结合, 最终导致转录活性明显下降.

综上所述, CT/CGRP 基因组织特异表达的分子生物学研究虽已取得了进展, 但有关参与 mRNA 选择性剪接的 TAF, 5' 侧翼序列的调节机理与 MTC 与该基因表达的关系仍待深入研究. 这些问题均涉及蛋白质与核酸相互作用的空间构象问题, 这无疑是 CT/CGRP 基因表达调控研究的热点和方向.

参 考 文 献

- 1 Byfield P G, Turner K, Galante L *et al.* *Biochem J*, 1969; **111** (3): 13
- 2 Amara S G, David D N, Rosenfeld M G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77** (8): 4444
- 3 Rosenfeld M G, Amara S C, Roos B A *et al.* *Nature*, 1981; **290**: 63
- 4 Nelkin B D, Rosenfeld K L, Bustros A D *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; **123**: 684
- 5 Peleg S. *Nucleic Acids Res*, 1993; **21**: 5360
- 6 Bovenberg R A, Adema G J, Jani H S *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1988; **16** (16): 7867
- 7 Amara S G. *Mol Cell Endocrinol*, 1985; **2** (3): 191
- 8 Amara S G, Evans R M. *Mol Cell Biol*, 1984; **4** (10): 2151
- 9 Tschoop F A, Tohler P H, Fischer J A. *Mol Cell Endocrinol*, 1984; **36**: 53
- 10 Symes A J, Craig R K, Brickell P M. *FEBS Lett*, 1992; **306**: 229
- 11 Li S, Klein E S, Russo A F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86** (24): 9778
- 12 Delsert C D, Rosenfeld M G. *J Biol Chem*, 1992; **267** (21): 14573
- 13 Cote G J, Stalow D T, Peleg S *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1992; (9): 2361
- 14 Resser J R, Liittschwager K, Leff S E. *J Biol Chem*, 1993; **268** (11): 8366
- 15 Yeakley J M, Hedjran F, Morfim J P *et al.* *Mol Cell Biol*, 1993; **13** (10): 5999
- 16 Cote G J, Gould J A, Huang S C *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 1987; **53** (3): 211
- 17 Adema G J, Hulst K L, Bass P D. *Nucleic Acids Res*, 1990; **18** (18): 5365
- 18 Lanigan T M, Tverberg L A, Russo A F. *Mol Cell Biol*, 1993; **13** (10): 6079
- 19 Tverberg L A, Russo A F. *J Biol Chem*, 1993; **268**: 15965

Alternative Expression of Calcitonin and Calcitonin Gene Related Peptide. Yang Shaohua, Chen Junjie (*Recombinant DNA Laboratory, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract Calcitonin and calcitonin gene related peptide (CT/CGRP) are coded by a commensal gene, of which the structure and 5' flanking sequence make the differential expressive products from thyroid C cell or nerve cell. The regulation of alternative expression determines the growth, sexual

differentiation and evolution in multicellular animals. The medullary thyroid carcinoma (MTC) or osteoporosis would arise supposing that the abnormal expressive regulation

occurs.

Key words calcitonin, calcitonin gene related peptide, alternative expression, medullary thyroid carcinoma

二酰基甘油调控细胞功能的机制

孙俊辉 朱培阁

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 二酰基甘油 (DG) 是一些磷脂水解产生的一种有重要功能的第二信使, 它主要通过激活细胞内的蛋白激酶 C (PKC) 进而磷酸化一系列底物蛋白, 产生相应的细胞效应. 在细胞整体水平, DG 还是一种重要的脂类物质的代谢中介产物, 通过若干代谢途径参与脂类和激素代谢循环. 目前, 有关 DG 调控细胞生理功能的研究, 主要集中在细胞信号转导方面.

关键词 二酰基甘油, 肌醇磷脂, 第二信使, 细胞信号转导, 蛋白激酶 C

二酰基甘油 (diacylglycerol, DG), 作为一种中性脂类物质, 广泛地存在于动物体的各种组织细胞中. 在生物膜的磷脂双分子层结构中, DG 是形成多种磷脂的重要前体. 在复杂的脂类物质代谢中, DG 又是重要的中介产物. 此外, DG 作为多种激素的前体或中介物还在生物体激素水平调控中起重要作用. 特别重要的是, 随着人们对细胞信号转导机制研究的逐步深入, 发现 DG 还是重要的第二信使物质, 它可以将外界的刺激信号, 通过激活细胞内的一种重要的蛋白激酶 C (PKC), 并磷酸化各种底物蛋白, 产生相应的生物学效应^[1,2]. 本文将重点阐述 DG 与细胞信号转导的关系.

1 细胞内 DG 的来源及代谢途径

二酰基甘油, 按其化学命名即为甘油骨架上的两个羟基以酯键与两个脂肪酸相连. 由于只有脂肪酸链在甘油骨架第 1、2 位上的二酰基甘油, 即 Sn-1, 2-DG 才对 PKC 有明显的激活作用, 而其异构体 Sn-1, 3-DG 及 Sn-2, 3-DG 对 PKC 的活性几乎都没有影响, 所以研究热点集中在 Sn-1, 2-DG (以下简称 DG).

如图 1 所示, 细胞内 DG 的形成主要通过以下四条途径: a. 由磷脂酶 C (PLC) 直接水解或通过磷脂酶 D/磷酸酶 (PLD/PAP) 途径间接水解某些磷脂; b. 磷脂酸 (PA) 通过相应的磷酸酶的水解; c. 三酰基甘油在脂酶作用下的水解; d. 单酰基甘油在酰基转移酶作用下的酯化. 其中前两种形成 DG 的途径与细胞信号转导机制有关, 而后两种主要与体内的脂类代谢平衡相联系.

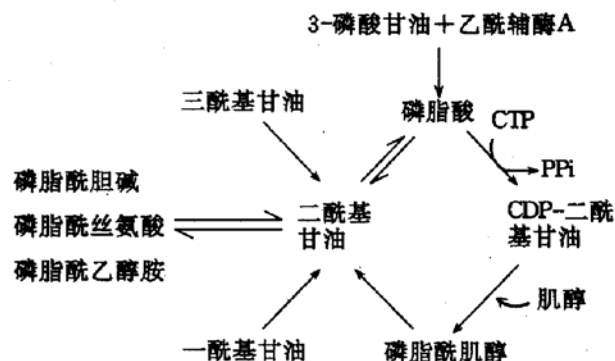


图 1 与形成二酰基甘油有关的脂类代谢途径

CTP: 三磷酸胞嘧啶, CDP: 二磷酸胞嘧啶, PPi: 无机焦磷酸.