

6 Kostrikis L G, Tyagi S, Mhlanga M M, *et al.* Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles. *Science*, 1998, **279** (20): 1228~ 1229

7 Samson M, Libert F, Doranz B J, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, **382** (6593): 722~ 725

8 Rappaport J, Cho Y Y, Hendel H, *et al.* 32 bp CCR-5 gene deletion and resistance progression in HIV-1 infected heterozygotes. *Lancet*, 1997, **349** (9056): 922~ 923

9 Giesendorf B A, Vet J A, Tyagi S, *et al.* Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin Chem*, 1998, **44** (3): 482~ 486

10 Telenti A, Imboden P, Marchesi F, *et al.* Detection of rifampicin resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 1993, **341** (8846): 647~ 650

11 Matsuo T. *In situ* visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1379** (2): 178~ 184

Research Advances in Molecular Beacons for Nucleic Acids Probing. CHEN Zhong-Bin,

WANG Sheng-Qi, SUN Zhi-Xian (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Molecular beacons are hairpin-shaped oligonucleotide with a fluorescent moiety and a non-fluorescent quenching moiety attaching to each ends and can be used to report the presence of specific nucleic acids in homogeneous solution or in living cells. The design principles and advantage of molecular beacon and the application for gene mutation detection were briefly introduced.

Key words molecular beacon, fluorescence resonance energy transfer, homogeneous real-time assay, gene mutation discrimination

人雄激素芳香化酶基因 (CYP19) 结构及其表达调控研究进展*

何海琼 王金发

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 人雄激素芳香化酶与乳腺癌的发生和发展密切相关. 综述了编码该酶的 CYP19 基因的结构、独特的组织特异性表达和调控 CYP19 基因表达的各种因素及其有关的调控机制.

关键词 人雄激素芳香化酶, 组织特异性表达, CYP19, 乳腺癌

学科分类号 Q75

人雄激素芳香化酶是体内催化雌激素生物合成的限速酶. 正常生理条件下, 人雄激素芳香化酶基因 (CYP19 基因) 在下丘脑和大脑其他部位的表达对与性别有关的行为印迹及下丘脑-垂体轴分泌促性腺激素都是必需的; 另外, 该基因在植入前囊胚细胞中的表达为体外培养的胚胎植入子宫提供了信号^[1]. 在乳腺癌等癌变组织中均可检测到 CYP19 基因的过量表达或表达模式的改变^[2~4]. CYP19 基因的表达模式很不一般, 弄清该基因的表达调控

机制不仅是针对 CYP19 基因进行癌症治疗的基础, 也有助于从分子水平了解其他基因表达的调控机理.

1 CYP19 基因的结构和组织特异性表达

人 CYP19 基因的 cDNA 全序列已经清楚, 其基因以单拷贝位于人染色体组的 15q21.1 区

* 国家自然科学基金资助项目 (39370402).

收稿日期: 1997-07-03, 修回日期: 1997-11-17

带，全长至少 70 kb，由 10 个外显子组成^[5]。CYP19 基因的内含子 I 中有多个启动子，现在已经报道的外显子 I 和相应启动子如图 1 所示。

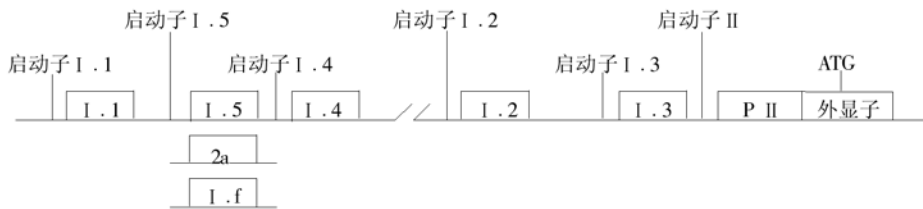


图 1 人雄激素芳香化酶基因外显子 I 和相应启动子

组织特异性表达是 CYP19 基因表达模式的最大特点。Means^[6]首先证实胎盘中 CYP19 基因主要采用启动子 P I .1 进行转录，其次是 P I .2。而卵巢中 P II 是主要的启动子，睾丸和前列腺中也主要是 P II 特异的转录物，因此 P II 常被称为生殖腺特异的启动子^[7]。

Veena 等^[8]研究了各种 CYP19 基因转录物在妇女不同脂肪组织中的分布。结果表明，不考虑个体的年龄和脂肪组织所处部位，启动子 P I .4 特异的转录物占有很大优势，启动子 P I .3 和 P II 特异的转录物水平则偏低。乳腺癌病人体内与肿瘤部位相邻的脂肪组织中 CYP19 基因的转录水平比远离肿瘤部位的脂肪组织高，而后者又高于正常妇女相应部位。在正常妇女的乳腺脂肪组织，主要是 P I .4 特异的转录物，P II 和 P I .3 特异的转录物以

低拷贝存在，乳腺癌病人体内恰好相反^[2]。这种变化可能造成雌激素局部过量导致癌变或加速癌细胞的增殖^[3]。

下丘脑和扁桃体中，CYP19 基因的转录物是外显子 I .4 特异的，它的启动子区包括一 TATA 盒、CAAT 盒、Ad4 序列及雄激素反应元件^[9]。

CYP19 基因在肝脏中的表达体现了这个基因表达的发育阶段特异性：在胎儿的肝脏中，CYP19 基因转录物主要是外显子 I .4 特异的，外显子 I .3 特异的占少数，而在成人肝脏中则相反^[10]。启动子 P I .f 也是胎儿肝脏特异的，对 P2a 则只检测到它可以在胎盘中转录 CYP19 基因^[6]。表 1 总结了 CYP19 基因的组织特异性表达。

表 1 CYP19 基因启动子的组织特异性

组织	P I .1	P I .2	P I .3	P I .4	P I .5	P I .f	P II
大 脑	-	-	-	+	-	-	-
胎儿肝脏	+	-	+	+++	-	+	+
成体肝脏	-	-	+	-	-	-	-
卵 巢	-	-	+++	-	-	-	+++
表皮成纤维	-	-	+	+++	-	-	+
胎 盘	+++	+++	+	+	+	-	+
正常脂肪	+	-	+	+++	-	-	-
癌变脂肪	-	-	+++	+	-	-	+
前列腺	-	-	-	-	-	-	+
睾 丸	-	-	-	-	-	-	+

注：+ 表示有转录活性；- 表示没有转录活性。

2 CYP19 基因表达的调控

2.1 核外调控因子和反式作用因子

BtcAMP 和 cAMP 可以在无血清培养基中使胞质中 CYP19 基因的活性提高 26~60 倍. 糖皮质激素在含血清的培养基中可增强 CYP19 基因的表达, 而且这种调控具有组织特异性: 在脂肪基质细胞和胎儿肝细胞中有效, 在卵巢中作用很小或根本没有作用^[11].

在子宫内膜异位和肿瘤发生时, CYP19 基因被异常激活, 现在认为子宫内膜异位植入物生长是前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 使 CYP19 基因在基质细胞中的活性上升, 引起雌激素水平升高所致. 实验表明 PGE2 通过提高胞内 cAMP 的浓度, 增强由 cAMP 调节的启动子 P II 的转录活性. 对子宫内膜细胞中的 cDNA 进行分析, 发现转录物是启动子 P II 特异的, 只有少数具有脂肪组织特异的 5' 末端, 说明 PGE2 特异地参予启动子 P II 的调控^[12].

TNF- α 与地塞米松协同作用, 可以诱导 CYP19 基因在无血清培养基中的脂肪基质细胞表达. 序列分析发现启动子 I .4 上游有一个类 AP-1 结合位点. 现在推测 TNF- α 可能通过作用于神经鞘氨醇的合成激活 *c-fos* 和 *c-jun* 基因表达, 其产物与外显子 I .4 上游 AP-1 元件结合, 然后与由配体激活的糖皮质激素受体共同作用诱导 CYP19 基因表达^[13].

Katsumi 报道了一个与位于 CYP19 基因 -2141~-2115 的顺式作用元件结合的转录激活因子. 其氨基酸序列与转录因子 IL-6 (NF-IL6) DNA 结合结构域的氨基酸序列相同. 免疫学分析证实了 NF-IL6 是绒毛膜癌细胞 BeWo 中与该调控序列结合的主要核蛋白^[14].

2.2 顺式作用元件

氯霉素乙酰转移酶活性分析确证, CYP19 基因帽子区-242~-166 的 DNA 序列对该基因在胎盘的转录具有增强作用, 最近还证实了这个增强子元件的细胞类型特异性^[15]. 胎盘

特异的启动子 I .1 上游-301 前的一段序列足以调控 CYP19 基因在胎盘的特异表达. 凝胶阻滞分析表明这个启动子区含有 3 个相互独立的区域, 可以形成特异的结合复合体, 与人绒毛膜癌 JEG-3 细胞核蛋白结合, 命名为 TSE (trophoblast specific element). TSE 结合蛋白存在于人胎盘和绒毛膜癌细胞的核中. TSE 核心序列发生突变直接影响 CYP19 基因在胎盘的活性, 所以它对 CYP19 基因在胎盘的差异性表达起重要作用^[16].

在 CYP19 基因的帽子区还存在两个顺式作用元件, hATRE-1 (human aromatase cytochrome P450 gene transcriptional regulatory element-1) 和 hATRE-2, 前者位于 CYP19 基因-2238~-2214 处, 后者位于-2141~-2098. hATRE-1 抑制 BoWe 细胞中 CYP 基因的表达量, hATRE-2 则增强了该基因的活性. 凝胶阻滞分析表明, 与 hATRE-1 作用的核蛋白只存在于 BoWe 细胞中, 与 hATRE-2 作用的核蛋白也存在于 HeLa 和 TYK-nu 细胞, 但是没有增强转录的作用, 这很可能是组织特异性调控的一种方式^[17].

Wang 等^[18]在 CYP19 基因内含子 I 3' 端发现了一个具有沉默子特性的负调控元件, 它可远距离 (几 kb) 抑制 SV40 启动子的活性, 双向作用于多个启动子. 这个沉默子抑制了位于 CYP19 基因内含子 I 3' 端的启动子在多种细胞中的活性, 暂时还没有发现它具有组织特异性.

3 CYP19 基因表达调控中的信号传导

基因的表达调控最终归结于调控信号的传导. 对于 CYP19 基因, 这方面的研究在脂肪组织中进行得最深入, 脂肪特异的 P I .4 含有一个糖皮质激素效应元件 (GRE), 一个 AP-1 结合位点和一个 λ 干扰素激活位点 (GAS). 受到含 IL-11 等细胞因子刺激后, 胞内 Jak1 的酪氨酸残基迅速被磷酸化, 被激活的 Jak1 使 STAT1 磷酸化, 与 P I .4 上游的 GAS 元件结合, 启动基因表达^[19]. 另一条信

号传导途径与 TNF- α 有关. TNF- α 作用于神经鞘氨醇的合成, 在神经鞘氨醇和 TNF- α 作用下, *c-fos* 基因被激活, 其产物与启动子 P1.4 上游的 AP-1 结合位点结合, 激活转录. 同时, 根据 p38 激酶抑制剂可有效阻遏此条件下 CYP19 基因的表达, 推测另一个激酶 p38/HOG1/MARK 参与了调控. 它可能通过磷酸化 *c-jun* 基因产物 N 端的丝氨酸残基激活 *c-jun* 蛋白, 大量产生的 *c-jun* 蛋白作用于启动子 P1.4 上游的 AP-1 结合位点激活 CYP19 基因的转录^[12].

最近还发现了 CYP19 基因表达的旁分泌机制: 乳腺癌细胞分泌某种生长因子在癌变区附近引发促结缔组织生长反应, 使 CYP19 基因表达量局部升高, 刺激乳腺癌细胞分泌多种生长因子和细胞因子, 一方面刺激乳腺癌细胞增殖, 另一方面正反馈于脂肪基质细胞激活 CYP19 基因^[20].

4 展 望

许多研究都表明, 人雄激素芳香化酶的水平升高与乳腺癌的发生和发展密切相关. 已经有报道利用人雄激素芳香化酶的抑制剂进行乳腺癌治疗的研究, 而弄清 CYP19 基因表达调控中的信号传导途径, 在转录水平对 CYP19 基因进行调控的临床应用前景更大^[4], 这将是今后研究工作的主要方向.

参 考 文 献

- Gary D M, Mala S M, Corbin C J, *et al.* Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen. *J Biol Chem*, 1989, **264** (32): 19385~ 19391
- Veena R A, Serdar E B, Marilyn L, *et al.* Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, **81** (11): 3843~ 3849
- Harada N. Molecular and epidemiological analyses of abnormal expression of aromatase in breast cancer. *Pharmacogenetics*, 1995, **5** (1): S59~ 64
- Bulum S E, Simpson E R. Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Res Treat*, 1994, **30** (1): 19~ 29
- Chen S, Marc J B, Robert S, *et al.* Human aromatase: cDNA cloning, southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA*, 1988, **7** (1): 27~ 38
- Means G D, Michael W K, Mala S M, *et al.* Tissue specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol*, 1991, **5** (12): 2005~ 2013
- Katsumi T, Satoshi N, Yutaka S. Identification and characterization of transcriptional regulatory elements of the human aromatase cytochrome p450 gene. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 1996, **56** (1): 151~ 159
- Veena R A, Christy I A, Even R S, *et al.* Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, **82** (1): 70~ 74
- Shiichi H, Nobuhiro H, Yasuyuki T. Novel exon of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Bioph Res Comm*, 1994, **198** (3): 1153 ~ 1160
- Nobuhiro H, Toshiaki U, Yasuyuki T, *et al.* Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (27): 11312~ 11316
- Lanoux M J, Cleland W H. Factors affecting the conversion of androstenedione to estrogens by human fetal hepatocytes in monolayer culture. *Endocrinology*, 1985, **117** (2): 361~ 367
- Luis S N, Kazuto T, Khaled M Z, *et al.* Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, **82** (2): 600 ~ 606
- Ying Z, John E N, Renee V, *et al.* Tumor necrosis factor- α stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activation protein 1 binding site upstream of promoter 1.4. *Mol Endocrinol*, 1996, **10** (11): 1350~ 1357
- Katsumi T, Shizuo A, Tadimitsu K, *et al.* Identification of a transcriptional regulatory factor for human aromatase cytochrome P450 gene expression as nuclear factor interleukin 6 (NF-IL6), a member of the CCAAT/enhancer-binding protein family. *Eur J Biochem*, 1995, **231** (1): 292~ 299
- Katsumi T, Li Xia Y, Yutaka S. Transcriptional regulation of the human aromatase cytochrome P450 gene expression in human placental cells. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 1995, **53** (1): 181~ 190
- Kazuyo Y, Nobuhiro H, Shiichi H, *et al.* Regulation of placenta-specific expression of the aromatase cytochrome P450 gene. *J Biol Chem*, 1995, **270** (42): 25064~ 25069
- Katsumi T, Yutaka S. Identification and characterization of cis-action regulatory elements for the expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene. *J Biol Chem*, 1994, **269** (11): 8099~ 8107
- Wang J, Chen S. Identification of a promoter and a silencer at the 3'-end of the first intron of the human aromatase gene. *Mol Endocrinol*, 1992, **6** (9): 1479~ 1488

- 19 Ying Z, John E N, Serdar E B, *et al.* Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem*, 1995, **270** (27): 16449~ 16457
- 20 Nichols J E, Bulun S E, Simpson E R. Effects of conditioned medium from different cultured cell types on aromatase expression in adipose stromal cells. *J Soc Gynecol Invest*, 1995, **2** (1): 45~ 50

Studies of the Structure and the Tissue-specific Expression of Aromatase Gene CYP19. HE Hai-Qiong, WANG Jin-Fa (*School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275,*

China).

Abstract Aromatase plays an important role in the initiation and development of breast cancer. A full description is given on the structure, the unique tissue-specific expression pattern, the factors and mechanisms involved in the expression regulation of the gene of aromatase, CYP19.

Key words aromatase, tissue-specific expression, CYP19, breast cancer

真核生物的 MAPK 级联信号传递途径*

周志琦 刘 强¹⁾

(清华大学生命科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 MAPK 级联途径在真核生物细胞的信号传递过程中起着重要的作用. MAPK 级联途径由 MAPK、MAPKK 和 MAPKKK 三类酶蛋白组成. 这三类蛋白质的结构非常保守, 通过磷酸化作用传递各种信号. 在酵母和动、植物细胞中已经发现了一系列的 MAPK 级联途径成员, 使真核生物的信号传递途径逐渐得到阐明.

关键词 信号传递, MAPK 级联途径, 蛋白质磷酸化

学科分类号 Q73

生物的信号传递是指细胞感知胞外刺激后, 通过细胞内信号分子的逐级传递作用, 最终诱导产生一系列的细胞质、细胞核内事件和各种生理生化反应的过程. MAPK 级联途径 (MAPK cascade) 存在于所有真核生物中, 在信号传递的过程中占据着相当重要的地位. MAPK 级联途径的三级成员为促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), 促分裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK) 和促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK). 它们都是具有 11 个保守的亚结构区域的蛋白激酶 (图 1a), 在信号传递的过程中, 通过氨基酸残基的磷酸化作用被逐级激

活 (图 1b)^[1]. MAPK 又被称为 ERK (extracellular-regulated kinase), 它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其分子质量大多为 40~45 ku. 它的激活需要上一级的双特异性的蛋白激酶 (dual specificity protein kinase) —— MAPKK 对它的双重磷酸化作用. 磷酸化作用的位点是 Thr 和 Tyr 残基, 它们位于第 VII 和第 VIII 亚结构区域之间的高度保守的 TxY 序列上 (图 1b). MAPKK 又称为 MEK (MAPK/ERK kinase), 上游的蛋白激酶 MAPKKK 可使它的高度保守的双重磷酸化位点 SxxxS/T 发生磷酸化, 从而导致它的活化 (图 1b). 胞

* 国家自然科学基金资助项目 (39770167).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-10-19, 修回日期: 1998-04-13