

甾体激素受体的结构

杨 义 力

(中国人民解放军第二军医大学, 上海)

提 要

现已克隆出糖皮质激素受体、雌激素受体、孕激素受体和 1, 25-二羟基维生素 D₃ 受体的 cDNA, 并对受体的结构和功能进行了卓有成效的研究, 为进一步阐明甾体激素受体的作用机制打下了基础。本文对这一进展进行了综述。

甾体激素是指激素中含有甾核的一类物质, 主要包括雄激素、雌激素、孕激素、糖皮质激素、盐皮质激素和 1, 25-二羟基维生素 D₃。六十年代以来的一系列工作证明, 它们主要是通过相应受体发挥作用的。近年来, 由于生物化学技术的不断发展和基因工程技术, 单克隆抗体技术、亲和标记技术等受体研究中的应用, 使我们对受体的认识不断深入, 现已克隆出雌激素、孕激素、糖皮质激素和 1, 25-二羟基维生素 D₃ 受体的 cDNA, 并运用 DNA 重组和核酸的定点突变 (site-directed mutagenesis) 等技术在分子水平上阐明其结构和功能, 本文将着重讨论前三种受体结构研究的一些进展。

一、受体的基本结构

多年来, 人们一直用“二步机制”来描述甾体激素的作用机制, 虽然 King^[1] 及 Welshons^[2] 等工作证明雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 位于细胞核而不是细胞质内, 但在没有相应激素存在时, 组织和细胞匀浆后绝大多数特异结合位点在胞液中, 其沉降系数为 8—10S, 其中直接和甾体激素结合的蛋白质沉降系数为 4S, 一般把这种 4S 的蛋白质称作甾体激素受体。

由于制备的胞液中受体含量极低, 并且有

多种蛋白酶, 因而早期关于甾体激素受体分子量测定的结果很混乱。近年来, 得益于亲和层析技术和对蛋白酶作用的抑制, 各实验室的结果渐趋一致。一般认为, 糖皮质激素受体 (GR) 的表观分子量为 94K (Kilodalton) 左右^[3], ER 的表观分子量为 65—70K^[4,5], 而 PR 的情况则比较复杂。在鸡输卵管和人乳腺癌细胞系的工作表明^[6,7], 存在着 A (79—85K) 和 B (108—115K) 两种分子, 均能和孕激素及 DNA 结合。现在主要有三方面的工作提示 A 并非 B 的降解产物, 但二者有很大的同源性, (1) 所试过的各种方法均不能将 B 转变成 A; (2) A 和 B 经蛋白酶水解后, 许多肽都是相同的, 但也有某些肽不同; (3) 大多数抗 B 的抗体也能识别 A, 只有极个别的不能识别 A。而 Loosfelt 等在兔的工作表明^[8], 只有一种 PR 分子, 表观分子量为 115K, 其部分降解后可产生类似 A 的分子。最终的结论有待于受体的进一步纯化和各种分子一级结构的测定。

Wrange 等进一步分析了纯化的 GR 的结构^[3]。用胰蛋白酶或 α 糜蛋白酶部分水解 GR 后, 得到一个 39K 的片段, 它仍能 and 糖皮质激素及 DNA 结合, 但不能和抗 GR 抗体结合。将此 39K 片段再用胰蛋白酶消化, 得到 27K 和 25K 的片段仍能 and 激素结合。他们还发现, 抗体

和 GR 的结合不影响 GR 和激素及 DNA 的结合。在对糖皮质激素抗性 (glucocorticoid-resistant) 细胞的研究中,发现一种抗性细胞虽含有受体,但该受体对 DNA 的亲合力较正常细胞的 GR 大的多。Gehring 等用光亲和标记等方法证明^[9],这种 GR 的分子量为 40K,与 Wrangé 等水解 GR 得到的 39K 片段很相似。这些结果提示,GR 至少包括三个区域,即激素结合区,DNA 结合区和抗体结合区,后者能调节受体与 DNA 的结合。

用糜蛋白酶、胰蛋白酶和金黄色葡萄球菌 V₈ 蛋白酶部分水解 PR 发现,A 和 B 均可变成 43K 的片段,它既能和孕激素结合,也能和 DNA 结合,该片段进一步水解得到一个 23K 的片段,仅能和激素结合,而另一个 15K 的片段能和 DNA 结合^[6,7]。对 ER 的分析也表明,存在着 DNA 结合区和甾体结合区,但 PR 和 ER 中均没有发现独特的抗体结合区^[9]。

二、受体 cDNA 的研究

1984 年,Miesfeld 等首先报告克隆出大鼠肝 GR 的 cDNA^[10]。从 1985 年底至今,多个实验室报告克隆出人、小鼠和大鼠 GR cDNA^[11-13],人和鸡 ER cDNA^[14,15],鸡和兔 PR cDNA^[8,16]、鸡 1,25-二羟基维生素 D₃ 受体 cDNA^[17]。这些实验室主要采用两种方法得到受体的 cDNA,(1)用表达载体(如 λ gt 11)构建 cDNA 库,再用抗受体抗体从中筛选受体 cDNA 克隆;(2)若已知受体的部分氨基酸序列,可据此合成寡聚核苷酸探针,从 cDNA 库中筛选受体 cDNA。通常,为了得到完整的受体 cDNA,需把抗体筛选和探针筛选方法结合使用。

Hollenberg 等克隆出了人 GR cDNA^[11],其中有编码 777 个氨基酸的开读框架。Miesfeld 等^[13]及 Danielsen 等^[12]也分别克隆出编码 795 及 783 个氨基酸的大鼠和小鼠 GR cDNA。比较人、大鼠和小鼠的 GR 可以发现,1) 它们同源性非常高,达 85% 以上。还有另一些氨基酸残基是保守取代;2) 氨基酸的取代

大多发生在分子的 N-侧,如人和小鼠的 GR 比较,C-侧只有 4 个非保守取代;3) 人、大鼠和小鼠 GR 的肽链长度各不相同,但这主要是由于大鼠和小鼠 GR 的 70—90 位间分别有连续 19 个和 6 个谷氨酰胺残基;4) 三种 GR 的 C-侧近中部均有一个富含半胱氨酸 (Cys) 和碱性氨基酸残基的区域,约含有 80 个残基。这些结果说明,不同种族 GR 的甾体结合区和 DNA 结合区几乎是全保守的,它们都和 GC 结合并通过相同的机制调节基因的表达。

Green 等报告了人 ER 的 cDNA 序列^[14],之后,Krust 等把克隆的鸡 ER cDNA 与 Green 等的结果比较^[15],发现在适当排列后,80% 的氨基酸残基是相同的。进一步把整个序列从 N 端至 C 端依次分为 A、B、C、D、E 和 F 六个区域(见图 1),其中 A(87% 的残基相同),C(100%) 和 E(94%) 为高度保守区。C 区富含 Cys 和碱性氨基酸残基,E 区含较多的疏水残基。由于发现 ER 的 C 侧完整性为其结合雌激素所必需,故推测 C 区和 E 区可能分别为与 DNA 及雌激素的结合有关的区域。

比较克隆的 ER、PR 和 GR 的序列发现,虽然它们长度各异,但均有一个高度同源的富含 Cys 和碱性氨基酸残基的区域,约有 80 个残基,其中的 Cys 几乎是全保守的,形成二个重复的 [Cys—x₂₋₃—Cys—x₁₃₋₁₅—Cys—x₂—Cys] 结构。各种受体此区的 C 侧长度均相似,含较多的疏水氨基酸残基,有一定的同源性。在富 Cys 和碱性残基区的 N 侧,各种受体的长度各异,也没有同源性。这些结果与用纯化受体部分水解所得到的结果相一致。ER、PR 及 GR 的 cDNA 序列和癌基因 V-erbA 的序列也有同源性,尤其是富 Cys 和碱性氨基酸残基区域的同源性更高。最近的研究表明^[18],C-erbA 基因编码的是甲状腺激素受体,这就是说,甲状腺激素受体与甾体激素受体有一定同源性。

Miller 等在研究爪蟾 5SRNA 基因转录因子 TF_{IIIA} 的序列时发现,其中有一个富含 Cys 和组氨酸 (His) 的区域,形成九个 [Tyr—Phe—x—Cys—x₄—Cys—x₃—Phe—x₅—Leu—x₂—

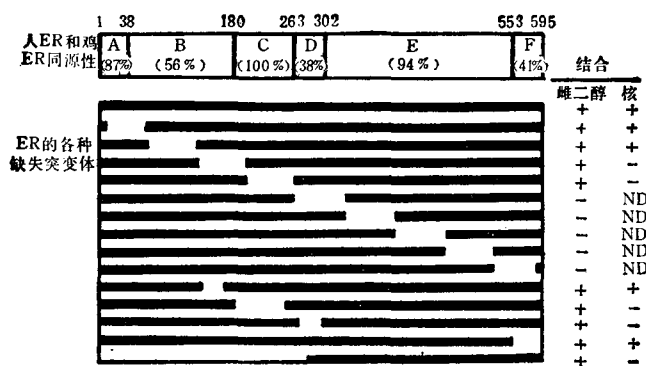


图1 人雌激素受体的缺失突变及其和雌二醇、细胞核结合的能力
ND 表示未测(参见正文)

His-x₃-His-x₂-6】这样的重复结构,并推测其与该因子和DNA的结合有关,类似的结构也在果蝇和酵母的一些蛋白质中发现。在一些逆转录病毒的核结合蛋白质,也存在Cys-x₂-Cys-x₄-His-x₄-Cys这样的结构^[19]。现在发现ER、GR和PR也具有相似的结构,并且这些蛋白质均在基因调节中起重要作用,提示上述富Cys区可能是一种有重要意义的结构。

为研究ER的一级结构和功能的关系,Kuma等利用定点突变的方法制备了一系列人ER cDNA的缺失突变体(图1)^[20],然后用体内和体外两种方法检测突变cDNA表达产物的功能,证明ER的激素结合区位于301—522位氨基酸残基之间。Kumar等还发现,用完整的ER cDNA转染Hela细胞后,在无雌二醇时,至少80%的受体可在制备的胞液中发现,但当HeLa细胞和雌二醇孵育后,90%以上的受体与核紧密结合。据此,他们把多种有缺失的ER cDNA引入HeLa细胞中,以雌二醇能否改变受体的分布来判定表达的ER片段是否有DNA结合功能,结果发现180—302位的氨基酸残基为ER与DNA的结合所必需。但这项工作尚有不严谨之处,因为受体实现核结合不仅需要能与DNA结合,还需能穿过核膜等。有证据提示^[21],人ER的263—269、298—304区域可能与受体通过核膜有关。

Godowski等在已知大鼠GR cDNA序列的情况下利用多种限制性内切酶得到GR-

cDNA的不同片段^[22],然后把完整的GR cDNA或其不同的缺失片段分别克隆于pSp64载体中,用SP6 RNA聚合酶在体外转录,得到的mRNA再在兔网织红系统中翻译,发现在大鼠GR的795个氨基酸残基中,407—566的片段即有DNA结合能力,但地塞米松的结合则需407—795区域。这和GR部分水解及比较ER、GR和PR而推测的结论一致,说明GR的DNA结合区可单独存在。而维持受体结合区则至少需一部分DNA结合区的参与。他们还把GR的各种cDNA插入表达载体pSV7d,同时构建一个含有与糖皮质激素反应成分(GRE)相连的氯霉素酰基转移酶基因(CAT)的质粒,二者共转染到CV-1细胞。当pSV7d含有完整GR cDNA时,培养液中加入地塞米松后,CAT活性可增加100倍以上。cDNA缺失GR C-端27,101,123,180,287,331个氨基酸时,地塞米松均不能增加CAT活性。但有趣的是,缺失C-端190,200,239和270个残基的GR显示出持续的转录激活作用,即使在没有激素存在时,CAT活性也显著增加。这提示,GR的DNA结合区先是被“遮盖”的,和激素结合或激素结合区的缺失则使其暴露出来,这也给所谓“转化”(transformation)赋予了实际的意义。

Northrop等发现^[23],S₉细胞有二种GR,一种能和激素结合,但与DNA的亲合力低。另一种不能和糖皮质激素结合,但可为多株抗GR单克隆抗体识别。从这种细胞也克隆

出了两种 GR cDNA, 一种由于碱基 A 变 G, 使 546 位的谷氨酸残基为甘氨酸取代, 表达产物不能与激素结合。另一种由于在 484 位组氨酸取代了精氨酸, 表达产物虽能和激素结合, 但和 DNA 的亲合力很低。这说明在 GR 的 DNA 结合区或甾体结合区一个氨基酸残基的改变即可导致受体功能的丧失。他们的研究还证明, GR 另一些残基的改变则不影响受体的功能。

Green 等构建了由爪蟾卵黄蛋白 (vitellogenin, Vit) A₂ 基因的雌激素反应成分, 胸腺嘧啶激酶 (tk) 基因的启动子和 CAT 基因组成 vit-tk-CAT 杂合分子^[23], 并证明 ER 的 C 区不仅为核结合所需, 而且也是激活基因转录所必需的。比较 ER 和 TF_{IIIA} 发现, ER 的 DNA 结合单位由二对 Cys 组成, 而 TF_{IIIA} 的则由一对 Cys 和一对 His 组成。他们用定点突变的方法以 His 取代 ER 中的 Cys²⁰² 和 Cys²⁰⁵, 这样的 ER 大小不变, 仍能和雌激素结合, 但不能促进 CAT 基因的表达, 说明 Cys²⁰² 和 Cys²⁰⁵ 在 ER 与 DNA 的相互作用中起着重要作用。

以往的工作表明, 甾体激素受体能识别特异的 DNA 序列, 上述工作则说明, 受体和靶基因的特异相互作用与 ER 的 C 区及 GR、PR 的富 Cys 和碱性残基区有关, 那么, 把人 ER 的 C 区用人 GR 的相应区域取代, 就应该能促进糖皮质激素靶基因的转录。事实正是这样。Green 等构建了这种 ER-GR cDNA, 它在 HeLa 细胞中可表达, 但不论有无雌二醇, 均不能促进 vit-tk-CAT 基因的表达。而在雌二醇存在时, 可促进 GR 的靶基因 MMTV-CAT 的表达, 且雌二醇的半效量和诱导 ER 靶基因表达时一样。这项工作再次证明, 受体的 DNA 结合区有固定的结构, 一旦暴露出来, 就能和特异的靶基因作用。

三、其 它

如前所述, 在低温、低盐情况下制备的胞液中, 标记的激素是和沉降系数为 8S 的复合物结合, 加入钼酸钠后, 则可使这种复合物稳定。关于这种复合物究竟是人工现象, 还是受体在细

胞内的天然状态 (native receptor), 虽已有许多讨论, 但都还缺乏直接的证据。许多实验室对钼酸钠稳定的 8S 复合物进行的研究表明^[24-26] (1) 其中只含有一个配基结合单位, 即前面所述及的受体。还有一种表观分子量为 90K 的蛋白质, 这在各种甾体激素受体的 8S 复合物中可能是共同的。而且, 当把 ER cDNA 在正常时没有 ER 的细胞中表达时, 匀浆后也可得到 8S 复合物, 现已发现, 这种 90K 蛋白属于热休克蛋白 (heat shock protein), 可能与 Rous 肉瘤病毒的转化蛋白也是相同的。(2) 受体要能与 DNA 结合并调节基因表达, 8S 复合物的解离是必需的。

Munck 等早就发现^[27], 细胞的糖皮质激素结合能力与它的 ATP 水平密切相关, 而用碱性磷酸酶处理胞液则可使其糖皮质激素结合能力大大降低, 因而提示, 磷酸化与甾体激素发挥作用有关。这已为近来的体内、体外实验所证实。许多作者发现, 提纯的甾体激素受体可为来自同一组织的激酶磷酸化。把组织或细胞与 [³²P] 焦磷酸孵育后从中提取受体, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行放射自显影可以证明, 受体确为磷酸化蛋白。关于受体磷酸化与其功能的关系也有许多研究, 如 Raymoure^[28] 和 Auricchio 等^[29] 用胞液进行的工作表明, 鸡输卵管和大鼠子宫的 ER 有激素结合型和非结合型两种形式, 非结合型磷酸化后即可转变为结合型, 结合型用磷酸酶处理后又可转变成非结合型。但这些过程是受多种因素调节的, 在细胞内有什么意义尚待进一步探讨。

此外, 许多实验室还发现一些其它蛋白质可能为甾体激素受体系统的组分^[30], 如 Gustafsson 实验室发现一种 72K 的蛋白质不能和甾体激素及 DNA 结合, 但总是和 94K GR 一起被纯化, 该蛋白可使 GR 识别 DNA 的特异性增加。O'Malley 实验室发现一种 108K 的蛋白质, 能为抗 PR-B 的单克隆抗体识别, 但不能和孕激素结合。已克隆出其 cDNA, 和 PR-B 的序列没有同源性。King 实验室报告了一种 29K 的蛋白质和 ER 有关。但这方面的工作大多为

单个实验室进行的,且它们的作用不明。

有些实验室在用放射配体法进行的研究中还发现,细胞中可能存在着同种甾体激素的不同受体,它们在与配基的亲合力及数量方面均不相同,但对这些不同受体的分子特性尚缺乏研究,因而很难断定它们的性质。

四、结 语

近年来,由于新技术、新方法的应用,使我们初步了解了 GR、ER、PR 和维生素 D₃受体的一级结构,并对结构和功能的关系进行了探讨,因而,今后关于甾体激素受体的研究将主要集中于(1)甾体激素受体调节基因表达进而产生生物效应的机制;(2)受体在细胞内的动态过程,即它们的定位、调节、“激活”,循环等过程;(3)努力阐明雄激素和盐皮质激素受体的结构。尤其是甾体激素受体已成为一类了解的最多的转录调节蛋白,因而已经并将继续作为我们认识真核基因表达、调控的一个良好模型。

本文承徐仁宝教授审阅、指正,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] King, W. J. and Greene, G. L.: *Nature*, 1984, **307**, 705.
- [2] Welshons, W. V. et al.: *Endocrinology*, 1985, **117**, 2140.
- [3] Gustafsson, J. A. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 1986, **24**, 63.
- [4] Lubahn, D. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 2515.

(上接第 342 页)

蛋白基因表达的控制机理及其分子基础,也是当前需要研究的问题。

我国在种子蛋白方面的研究开展的较晚,还处于起始阶段,我们应在这方面大力开展研究,利用我国丰富的植物资源,为改善人民的营养条件,促进科研和生产的发展而努力工作。

参 考 文 献

- [1] Spena, A. et al.: *Embo. J.*, 1982, **1**, 1589.
- [2] Argos, P.: *J. Biol.*, 1982, **257**, 9984.
- [3] Moreira, M. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, **210**, 633.
- [4] Suzuki, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **258**, 2634.

- [5] Greene, G. L. and Press, M. F.: *J. Steroid Biochem.*, 1986, **24**, 1.
- [6] Renoir, J.-M. and Mester, J.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1984, **37**, 1.
- [7] Horwitz, K. B. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 1986, **24**, 109.
- [8] Loosfelt, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 9045.
- [9] Gehring, U. and Hotz, A.: *Biochemistry*, 1983, **22**, 4013.
- [10] Miesfeld, R. et al.: *Nature*, 1984, **312**, 779.
- [11] Hollenberg, S. M. et al.: *Nature*, 1985, **318**, 635.
- [12] Danielsen, M. et al.: *EMBO J.*, 1986, **5**, 2513.
- [13] Miesfeld, R. et al.: *Cell*, 1986, **46**, 389.
- [14] Green, S. et al.: *Nature*, 1986, **320**, 134.
- [15] Krust, A. et al.: *EMBO J.*, 1986, **5**, 891.
- [16] Jeltsch, J. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 5414.
- [17] McDonnell, D. F. et al.: *Science*, 1987, **235**, 1214.
- [18] Sap, J. et al.: *Nature*, 1986, **324**, 635.
- [19] Berg, J. M.: *Nature*, 1986, **319**, 264.
- [20] Kumar, V. et al.: *EMBO J.*, 1986, **5**, 2231.
- [21] Wolff, B. et al.: *Trends in Pharmacological Science*, 1987, **8**, 119.
- [22] Godowski, P. J. et al.: *Nature*, 1987, **325**, 365.
- [23] Green, S. and Chambon, P.: *Nature*, 1987, **325**, 75.
- [24] Joab, I. et al.: *Nature*, 1984, **308**, 850.
- [25] Catelli, M. G. et al.: *EMBO J.*, 1985, **4**, 3131.
- [26] Mendel, D. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 3758.
- [27] Dougherty, J. J. et al.: *Trends in Pharmacological Science*, 1985, **6**, 83.
- [28] Raymoure, W. J. et al.: *Nature*, 1985, **314**, 745.
- [29] Auricchio, F. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 1986, **24**, 39.
- [30] King, R. J. B.: *J. Steroid Biochem.*, 1986, **25**, 451.

[本文于 1987 年 8 月 14 日收到]

- [5] Hukman, W. J. et al.: *Plant Physiol.*, 1982, **69**, 1414.
- [6] Higgins, T. J. et al.: *Plant Physiol.*, 1981, **67**, 205.
- [7] Bollini, R. et al.: *J. Cell Biol.*, 1983, **96**, 999.
- [8] Slightom, J. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 1897.
- [9] Larkins, B. A. et al.: *Plant Physiol.*, 1978, **62**, 256.
- [10] Parker, M. L.: *Plant Cell Environ.*, 1982, **5**, 37.
- [11] Harris, N.: *Planta*, 1979, **146**, 63—69.
- [12] Davies, H. M. et al.: *Plant Physiol.*, 1981, **68**, 284.
- [13] Chrispeels, M. J.: *Planta*, 1981, **58**, 140—151.
- [14] Gatehouse, J. A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1981, **118**, 627.
- [15] Dierks, C.: *FEBS Lett.*, 1982, **144**, 167.
- [16] Chandler, P. M. et al.: *Plant Physiol.*, 1983, **71**, 47.

[本文于 1987 年 8 月 3 日收到]