

综述与专论

甾体激素的调节基因表达作用

杨 义 力

(第二军医大学, 上海 200433)

提 要

由于对甾体激素受体的结构、结构与功能关系及 HRE 进行了许多研究, 人们对甾体激素受体和 HRE 及多种转录因子相互作用调节基因表达的过程在分子水平上有了更深入的了解, 因而对甾体激素调节基因表达的机制有了进一步的认识, 本文综述了这方面的研究进展。

关键词 甾体激素, 受体, 基因表达

一、引 言

自从 60 年代 Clever 和 Karlson 发现昆虫蜕皮素可诱导染色体上形成膨突 (puff) 以来, 甾体激素调节基因表达的作用逐渐成为人们十分感兴趣的问题。近年来, 主要由于 (1) 受体纯化和基因克隆的成功, 以及对其结构和功能关系的深入了解; (2) 许多受体调节基因的克隆和激素反应成分 (hormone responsive element, HRE) 的识别, 使得这一领域的研究有了飞速发展, 为阐明甾体激素生理和药理作用的分子机制打下了基础, 也为进一步了解真核细胞基因表达调控的机制提供了良好的模型, 本文综述了这方面研究的新进展。

二、甾体激素受体结构的研究进展

70 年代末至 80 年代初, 一些实验室成功地纯化了糖皮质激素受体 (GR)、雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 等, 并借助于单克隆抗体技术、亲和层析等生化方法以及对突变受体的研究证明, 这些受体有 3 个功能区, 一个是

激素结合区 (C 端), 另一个是 DNA 结合区。受体 N 端区域的功能尚不十分明确, 但它与受体和抗体的结合、受体的转录激活作用等有关, 因而有人把它称为调节区。近年来, 已克隆出 6 种主要甾体激素受体的 cDNA, 由这些 cDNA 推出了相应受体的氨基酸序列。比较各种甾体激素受体的一级结构可以发现, 它们都有一个高度同源的富 Cys 区, 约 70 个氨基酸残基 (图 1)。多种研究表明, 这一区域内的 Cys 可和 Zn 络合, 有可能形成如图 2 所示的“锌指结构” (zinc finger)。甾体激素受体的 C 端也有一定的同源性。

借助于定点突变、基因重组和转移技术, 许多实验室对甾体激素受体的结构和功能关系进行了深入研究。这些研究发现, 受体的富 Cys 区就是 DNA 结合区, 其中的“锌指结构”直接参与和 DNA 的结合。受体分子 C 端的功能比较复杂, 它不仅直接和甾体激素结合, 而且与受体蛋白的核定位、和 DNA 结合时形成二聚体、和 90kD 蛋白的结合等有关。关于甾体激素受体结构及其转录激活作用的关系有较多的

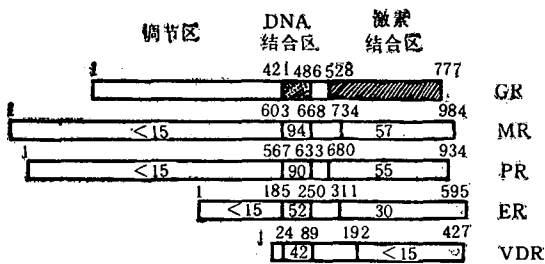


图1 5种主要甾体激素受体一级结构比较的示意图
GR: 糖皮质激素受体; MR: 盐皮质激素受体; PR: 孕激素受体; ER: 雌激素受体; VDR: 1, 25(OH)₂ 维生素 D₃ 受体。方框外的数字为氨基酸序号, 方框内的数字表示各区与 GR 相应区的同源性

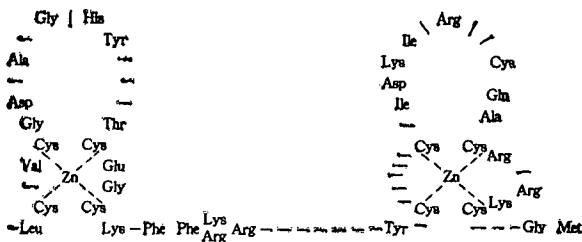


图2 甾体激素受体中2个可能的“锌指结构”示意图

研究。Yamamoto 等实验室的研究发现^[1], 缺失 C 端激素结合区的 GR 有不依赖激素的转录激活作用, 在 DNA 结合区的某些突变只影响受体的转录激活作用, 而不影响它与 DNA 结合, 说明 GR 的激素结合区对 DNA 结合区有“遮盖”作用, 且 DNA 结合区还有转录激活作用。Chambon 实验室进一步的研究还发现^[2], 人 ER 的激素结合区完全缺失后, 转录激活作用仅有完整受体的 5%。对鸡 PR 的研究也得到类似的结果。他们还把酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合区(无转录激活作用)与人 GR 或 ER 的激素结合区重组, 形成的嵌合分子与相应的配基结合后能识别基因的 GAL4 反应成分(GAL4-response element), 但只是在与激素结合后方能促进基因的转录。缺失 N 端的 GR 虽能和激素及 DNA 特异结合, 也没有转录激活作用。这些研究表明, 甾体激素受体的转录激活作用与分子的多个区域有关(图 3)。

Green 等还把人 ER 的 DNA 结合区用人 GR 的相应区域取代, 形成的嵌合分子可和雌

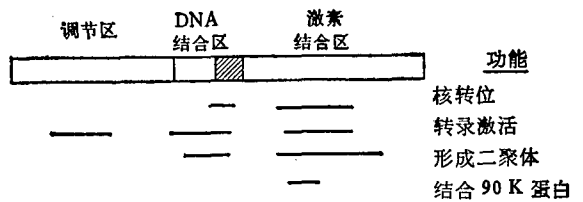


图3 甾体激素受体结构与功能关系示意图

二醇结合, 并促进 GR 的靶基因 MMTV-CAT 的表达, 说明受体的靶基因特异性是由 DNA 结合区决定的。他们更仔细的分析表明^[3], 把嵌合分子 N 端的一个“锌指结构”区再用 ER 的相应区域取代后, 又只能识别 ER 的靶基因, 而取代 C 端“锌指结构”区后的分子仍只能识别 GR 的靶基因, 提示靶基因的特异性是由 DNA 结合区 N 端的“锌指结构”决定的。

三、激素反应成分及其和受体的相互作用

采用缺失突变和重组基因转移技术, 一些作者在对小鼠乳腺癌病毒(MMTV) DNA 的研究中首先发现, GR 可通过和 MMTV-DNA 转录起始点上游一定区域的 DNA 序列相互作用而调节它的表达。进一步采用硝酸纤维素滤膜结合测定及核酸酶印迹法证明, 上述区域内有多个 GR 结合区, 每个结合区的 DNA 片段和其它基因重组后转入适当的细胞内, 可使原先不受糖皮质激素(GC)调节的基因在 GC 作用下增加转录, 因而这些片段被称作 GC 反应成分(glucocorticoid response element, GRE)。并且, GRE 具有增强子的特性。许多作者在对人金属硫蛋白基因 II_A、鸡溶菌酶基因、人生长激素基因、酪氨酸转氨酶(TAT)基因、色氨酸氧化酶(TO)基因等的研究中均发现存在 GRE, GR 通过和 GRE 相互作用调节基因的表达。GRE 大多位于基因转录起始点上游 400bp 以内, 但大鼠子宫珠蛋白等基因的 GRE 距转录起始点 1—2kb, 生长激素基因是 GRE 则位于第一个外显子内。多数基因的 5' 侧存在着多个 GRE, 它们有的排列在一起(如 MMTV 的 GRE), 有的则相距很远, 如 TO 基

因的 2 个 GRE 相距约 800bp。TAT 基因的 2 个 GRE 有协同作用, TO 基因的 GRE 则有相加性。上述这些变化的意义和作用尚不清楚。比较各种不同基因的 GRE 可以发现, 它们大多含有共享序列 5'TGTTCT3', 通常形成一个由 15bp 组成的反向重复结构, 典型的可表示为 5'GGTACANNNTGTTCT3'。Strähle 等进一步的研究表明^[4], 这种 15bp 的序列即可使基因受 GC 诱导。

许多真核细胞基因的表达可受多种甾体激素的调节, 如 GC、孕激素、雄激素和盐皮质激素都可增加 MMTV-DNA 的表达, 兔子宫珠蛋白可受雌激素、孕激素和 GC 的调节, 孕激素和 GC 均可诱导小鸡溶菌酶基因的表达。对这些基因的 HRE 的研究表明, 孕激素反应成分、盐皮质激素反应成分及雄激素反应成分通常是和 GRE 部分或完全重叠的, 这与相应受体的 DNA 结合区有很高的同源性是一致的。Strähle 及 Ham 等的研究还表明^[4,5], 前述含 "TGTTCT" 的 15bp DNA 片段也可介导孕激素和雄激素对 MMTV-DNA 表达的调节。

由于缺少合适的宿主细胞和靶基因, 对雌激素反应成分 (ERE) 和 1,25 (OH)₂ 维生素 D₃ 反应成分的研究比较少。Walker 等比较了多种受雌激素诱导基因的 5' 侧序列^[6], 发现存在一个 13bp 的同源序列, 可表示为 5'GGTCA-NNNTGACC3', 和 GRE 的 15bp 同源序列有着相似的结构。缺失突变的研究表明, 这一段序列为 ERE 发挥作用所必需。Klock 等的研究发现^[7], 由 TGACCT 形成的 15bp 反向重复序列 5'AGGTCACAGTGACCT3' 即可使和其重组的 tk-CAT 基因表达受雌二醇诱导, 而把 TGACCT 变成 TGTCCT 或 TGTTCT 后所形成的 15bp 反向重复序列则全无 ERE 的作用, 却可使与其重组的基因受 GC 诱导, 说明 ERE 和 GRE 有极其相似的结构, 但又是不同的。

Beato 实验室对 GR、PR 与 GRE、PRE 的结合进行了较多的研究^[8]。他们首先证明, 纯化的 PR、GR 能和相应的 HRE 特异结合, 然后

利用直接和受体结合的鸟苷酸 (G) 不能为二甲基亚砷 (DMS) 甲基化的原理进行了甲基保护实验, 结果提示保守序列 5'TGTTCT3' 及 HRE 中的一些 G 是受体和 DNA 的接触点, PR 和 GR 虽能和同一段 DNA 结合, 但它们接触的 G 只有部分相同。采用分辨力更高的羟自由基印迹法 (hydroxyl radical footprinting) Beato 等发现, 在 MMTV-LTR 的一个 GRE 中, 存在 4 组受体接触位点, 相距约 10bp, 正好相当于 B-DNA 双螺旋的一周, 提示受体是和 DNA 的一侧接触。当中的 2 组接触位点包含甲基保护实验中所识别的 G, 保守序列 5'TGTTCT3' 也在此范围内。根据上述结果, 他们提出了 GR 和 GRE 作用的模型, 受体二聚体的 4 个 "锌指" 和 DNA 接触, 其中 2 个 N 侧的 "锌指" 和当中的 2 个接触点特异结合, 而受体 C 侧 "锌指" 的作用则是非特异性的。这一模型还有待更多的研究支持。

四、甾体激素的调节基因表达作用

甾体激素作用的 "两步机制" 得到了众多研究的支持, 除了前面提到的 DNA 转移实验和其它体外实验外, Becker 等还利用甲基化保护实验的原理进行了基因组印迹测定 (genomic footprinting)^[9], 证明完整细胞用 GC 处理后, 有受体和 TAT 基因的 GRE 结合。但近年来许多实验室的研究提示, 至少 PR 和 ER 主要是位于细胞核而不是细胞质内。Beato 等的研究发现^[10], 未和激素结合的 PR 和 GR 在体外也能和 DNA 特异结合, 其亲和力不比激素-受体复合物低。近年来的一些研究还发现, 制备的胞液中甾体激素受体是以和 90kD 热休克蛋白形成多聚体形式存在的, 与激素结合后方能解离, 进而和 DNA 结合。因而现在一般认为, 无论甾体激素受体是位于细胞核还是细胞质内, 和 90kD 蛋白的解聚是与 DNA 结合的前提, 而激素和受体的结合则促进这种解聚。同时, 激素的结合对受体的转录激活作用也有重要影响, 因为某些甾体激素的拮抗剂和受体形成的复合物虽能和 DNA 结合, 但并不能促进转录。

甾体激素受体和 DNA 结合后如何促进基因转录的过程尚不清楚,但已有一些研究表明,这需要受体和其它转录因子协同作用。Buetti 及 Miksicck 等人的研究发现^[11,12],MMTV-LTR 中转录因子 NF I 结合序列的突变可使 GC 的诱导表达作用丧失。Cordingley 等用核酸外切酶进行的印迹实验表明^[13],在 GC 诱导 MMTV-DNA 转录时有 NF I 及另一转录因子和启动子区域结合。有好几个实验室对 CACCC 序列及其结合因子进行了研究。在 Becker 等的基因组印迹测定中,DMS 的反应性除了在 GRE 处有改变外,相邻的 CACCC 处也有改变。Danesch 等报告^[14],把 TO 基因中近侧 GRE 附近的一个 CACCC 序列缺失后,GC 即不能诱导 TO 基因的表达。而把 CACCC 序列置于 GRE 的附近,则可使重组基因的表达为 GC 诱导^[15]。Strähle 等进行了更仔细的分析^[16],他们把有 GRE 或 ERE 作用的 15bp 序列插入到 TK 基因 TATA 盒的上游,然后去掉启动子的其它序列,发现 TK 基因的表达仍受 GC 或雌二醇诱导。但当 GRE 插入到 TAT 基因上游 351bp 处时,GC 却不能诱导 TAT 基因表达,只有 2 个 GRE 一起,或是 GRE 加 CCAAT 序列,才能使 GC 发挥诱导作用,CCAAT 序列的突变又可使 GC 的作用消失,说明在 GR 和 CCATT 结合蛋白间存在着协同作用。有趣的是,CCATT 序列的作用可为 CACCC 序列或转录因子 Sp I、NF I 的结合序列所替代,其作用强度与所用细胞有关,这说明 GR 可和多种蛋白质因子协同作用调节基因的表达。

真核细胞的 DNA 是以染色质形式存在的,因而,染色质的结构和甾体激素调节基因表达的作用可能有密切关系。在对 MMTV-DNA 的研究中许多作者发现,用 GC 处理细胞后,在 MMTV-LTR 的附近出现 DNA 酶 I 超敏点。Jantzen 等也报告^[17],在 GC 诱导细胞 TAT 时,TAT 基因的 GRE 附近也出现 DNA 酶 I 超敏点,提示 GC 可使靶基因附近染色质中 DNA 的结构或结合蛋白发生改变。Richard-Foy 等人发现^[18],含 MMTV-DNA 的牛乳头

状瘤病毒 (BPV) 载体以附加体的形式存在于细胞内,用 MDE-Fe(II) (甲基二丙基 EDTA 亚铁)进行随机裂解提示,BPV 中的 MMTV-DNA 也是以核小体形式存在的,用激素处理细胞后,原先不敏感的部位也可受 MDE-Fe(II) 的作用。他们用核酸外切酶 III 进行的研究还发现,只是在用激素处理后,MMTV-DNA 中和 NF I 及 TATA 盒结合因子结合的序列才受保护。这些研究提示,在 GC 的作用下,和靶基因结合的蛋白质发生了改变,使转录因子与受体能和 DNA 相互作用。

值得指出的是,除了诱导基因表达外,甾体激素的许多作用是通过抑制特定基因的表达产生的。GC 可通过抑制一些细胞因子 (cytokin) 基因的表达来发挥免疫调节作用,也可抑制 I 型和 IV 型胶原、前阿黑促皮素 (POMC)、催乳素、人糖蛋白激素 α 亚基等众多基因的表达。一些实验室采用基因转移的方法对其进行了研究,证明 GC 的这些作用也是由 GR 介导的,这些基因的 GR 结合片段至少是和 GRE 类似的。进一步采用缺失分析发现,为 GR 抑制作用所必需的基因 5' 侧序列也含有其它转录因子的结合位点,如 Akerblom 等报告^[19],人糖蛋白激素 α 亚基基因转录起始点上游 -100 至 -152bp 为 GC 抑制转录所必需,这一段序列也为 cAMP 促进基因表达及该基因的组织特异性表达所必需,可和相应的转录因子结合。如果细胞对 cAMP 无反应性,则 GC 诱导而不是抑制 α 亚基基因的表达。GC 对 POMC 基因表达调控的情况和这非常类似^[20]。这些研究有力地提示,GC 抑制基因表达可通过和其它转录因子相互作用而产生。Adler 等对雌激素和 GC 调节催乳素基因表达的研究也提示^[21],ER 和 GR 是通过和转录因子的相互作用而抑制基因表达的。他们用突变受体进行的研究还提示,GR 和 ER 的抑制作用无需受体的 DNA 结合区,如这一结果能为进一步的研究证实,则是一个很有启发的发现。

五、结 语

由于对甾体激素受体的结构、结构与功能关系及 HRE 的研究有了很大进展,人们对甾体激素受体和 HRE 及多种转录因子的相互作用有了更深入的了解,因而对甾体激素调节基因表达的机制有了更进一步的认识。但上述结果大多是采用基因转移、重组等方法得到的,对细胞内天然状态时,受体、转录因子和 DNA 的相互作用缺乏足够的了解,对染色质 DNA 的结构及结构蛋白与受体的关系所知甚少。在细胞内,受体的转录激活作用与激素和受体结合的关系也还有待阐明。由于同一段 DNA 可与不同的甾体激素受体相互作用,且细胞内可存在多种甾体激素的受体,激素作用的特异性如何产生也是一个令人感兴趣的问题。许多实验室的研究还表明,甾体激素受体的磷酸化与和激素及 HRE 的结合、转录激活作用、受体蛋白的再循环等有关,但其分子机制尚不清楚。虽然这些问题目前还很难回答,但生物工程技术的飞速发展使我们已经看到了解决问题的方法。

参 考 文 献

- 1 Miesfeld R, Godowski P J, Maler B A *et al. Science*, 1987; 236: 423

(上接第 358 页)

型阶段,还需要进一步对其有效性和实用性做大量的研究工作。然而,它们在人类疾病防治方面的实际应用日趋明显。anti-Id 由实验室转入临床已是指日可待的事了。

参 考 文 献

- 1 Jerne NK *et al. Ann Immunol*, 1974; 125C: 373
- 2 Caraux J *et al. Cell Immunol*, 1983; 78: 23
- 3 Jerne N K *et al. Immunol Rev*, 1984; 79: 5
- 4 Tung E *et al. Immunology*, 1983; 50: 57
- 5 Burdette S *et al. N Engl J Med*, 1987; 317(4): 221
- 6 Dunn P L *et al. Immunol*, 1987; 139: 2110

- 2 Webster N J G, Green S, Jin J R *et al. Cell*, 1988; 54: 199
- 3 Green S, Kumar V, Theniaz I *et al. EMBO J*, 1988; 7: 3037
- 4 Strahle U, Klock G, Schutz G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7871
- 5 Ham J, Thomson A, Neddham M *et al. Nucl Acids Res*, 1988; 16: 5263
- 6 Seiler-Tuyns A, Walker P, Martinez E *et al. Nucl Acids Res*, 1986; 14: 8755
- 7 Klock G, Strahle U, Schutz G. *Nature*, 1987; 329: 734
- 8 Chalepakis G, Postma J P M, Beato M. *Nucl Acids Res*, 1988; 16: 10237
- 9 Becker P B, Gloss B, Schmid W *et al. Nature*, 1986; 324: 686
- 10 Beato M. *Cell*, 1989; 56: 335
- 11 Buetti E, Kuhnle B. *J Mol Biol*, 1986; 190: 379
- 12 Miksick R, Borgmeyer U, Nowock J. *EMBO J*; 1987; 6: 1355
- 13 Cordingley M G, Riegel A T, Hager G L. *Cell*, 1987; 48: 261
- 14 Danesch U, Gloss B, Schmid W *et al. EMBO J*, 1987; 6: 625
- 15 Schule R, Muller M, Otsuba-Murakami H *et al. Nature*, 1988; 332: 87
- 16 Strahle U, Schmid W, Schutz G. *EMBO J*, 1988; 7: 3389
- 17 Jantzen H M, Strahle U, Gloss B *et al. Cell*, 1987; 49: 29
- 18 Richard-Foy H, Hager G L. *EMBO J*, 1987; 6: 2321
- 19 Akerblom I W, Slater E P, Beato M *et al. Science*, 1988; 241: 350
- 20 Roberts J. *DNA*, 1986; 5: 68
- 21 Adler S, Waterman M L, He X *et al. Cell*, 1988; 52: 685

[本文于 1989 年 8 月 19 日收到]

- 7 Herlyn D *et al. Science*, 1986; 232: 100
- 8 张红樱. 生物科学动态, 1989;(2):6
- 9 Tran C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 3892
- 10 Marlimes C A *et al. Lancet*, 1988; 27: 454
- 11 Lider O *et al. Science*, 1988; 239: 181
- 12 Daigleish A. *Scientist*, 1988; 119(1620): 33.
- 13 Nisouoff A *et al. Clin Immunol Immunopathol*, 1981; 21: 307
- 14 Sach D L *et al. T Exp Med*, 1982; 155: 1088
- 15 Kennedy R C *et al. Science*, 1986; 232: 220
- 16 贾文祥等. 中华免疫学杂志, 1987; 3(2):77
- 17 Mourad W. *Immunology*, 1988; 63: 397
- 18 Blaser K *et al. Immunology*, 1983; 48: 423

[本文于 1989 年 6 月 27 日收到]