

人红细胞生成素受体的研究进展

王少雄 董 晨 华子春

(南京大学生物化学系, 南京 210093)

摘要 人红细胞生成素受体 (hEPOR) 是位于相对成熟阶段人体红系祖细胞表面的跨膜蛋白, 它能专一性结合人红细胞生成素 (hEPO), 将促进细胞生长、增殖和分化的信号传导到膜内, 该过程涉及了 hEPOR 自身及部分相关蛋白的磷酸化. hEPOR 具有一些与其功能相关的保守结构, 它的氨基酸序列与鼠 EPOR (mEPOR) 高度同源. EPOR 因为膜外 R129C 突变或结合特定蛋白质而具有组成型活性. EPOR 还与红白血病等多种血液病密切相关.

关键词 红细胞生成素受体, 红系细胞, 细胞因子受体超家族, 跨膜信号传导, 红白血病

人红细胞生成素 (hEPO) 是一种促进人体红系祖细胞生长、增殖和分化的主要生长因子, 其作用由位于细胞表面的特异性人红细胞生成素受体 (hEPOR) 介导完成. 在人红系祖细胞分化过程中, 爆式红系集落形成单位细胞 (BFU-E) 不能表达 hEPOR, 对 EPO 不敏感. 经白细胞介素 3 (IL-3) 或粒-巨噬系细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 刺激 2—3d (天), BFU-E 细胞开始表达 EPOR 并对 EPO 具有微弱敏感性, 再经 4—5d, 这些细胞表面出现大量的 EPOR, 成为对 EPO 非常敏感的红系集落形成单位 (CFU-E), CFU-E 细胞在 7d 内形成有核红细胞群. 当细胞生长超出有核红细胞阶段时就不再依赖 EPO, 同时细胞表面的 EPOR 数目也相应减少. 由此说明 hEPOR 主要存在于相对成熟的红系祖细胞中, 与 EPO 结合共同完成其生理功能. 研究者发现存在两种亲和性不同的 EPOR, 只有高亲和性的受体对 EPO 的生物效应产生应答, 而低亲和性的受体则几乎不被生理浓度的 EPO 所结合^[1].

1 EPOR 的结构

hEPOR cDNA 编码一种分子量为 55 240, 含 508 个氨基酸残基的蛋白质, 其氨基酸序列与鼠 EPOR (mEPOR) cDNA 编码序列有 82%

相同^[2].

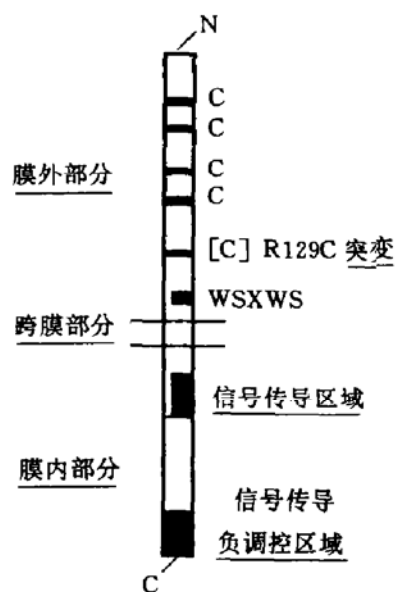


图 1 EPOR 结构示意图

如图 1 所示, hEPOR 膜外有 226 个氨基酸, N 端连接由 24 个氨基酸组成的信号肽. Gln⁵²-Ser⁵⁴为 N 糖基化位点. 第 130 位的 Arg 残基可以突变为 Cys 残基, 从而使 EPOR 具有不依赖 EPO 诱导的细胞增殖和细胞分化的能力. EPOR 膜外部分有两个保守结构, 一是位于跨膜区域附近的 5 氨基酸结构: W-S-X-W-S, 其中 X 代表任何氨基酸 (在 hEPOR 中为 W²⁰⁹-

S²¹⁰-A²¹¹-W²¹²-S²¹³, 二是 4 个保守的 Cys 残基 (C²⁸、C³⁸、C⁶⁷、C⁸³), 由具有以上膜外保守结构的蛋白质受体组成了一个受体家族, 称为胞质激素受体超家族, 其成员包括: EPO、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、GM-CSF、白血病抑制因子 (LIF)、催乳素 (prolactin)、生长因子 (GH) 等的受体. 保守的 WSXWS 结构是使受体维持特定构型并与配基结合的必需组成部分, 该结构还参与了受体与蛋白之间的相互作用, 其突变将导致 EPO 诱导的信号传导功能显著降低^[3]. 通过对 IL-2 受体 β 链上相应结构的分析证明 W 残基以及它们之间的间距尤为关键^[4,5].

hEPOR 的跨膜部分由 22 个氨基酸组成 (L²²⁷—L²⁴⁹), 大部分为疏水氨基酸, 当 RPOR 被 SFFV 病毒 (friend spleen focus-forming virus) 表达的一种糖蛋白 (gp55) 激活时, 该区域起着非常重要的作用^[6].

hEPOR 膜内的 236 个氨基酸可分为两个功能相对保守的区域. 通过 EPOR 膜内部分缺失试验发现近膜部分一个 91 氨基酸组成的区域能完成信号的传导功能, 它和 IL-2 受体 β 链上的相关区域高度同源. 在该区域中, Gln²⁷⁹—Leu³¹⁰和 Pro³³⁰—His³³⁹之间的残基至关重要, 这两个部位含有在胞质激素受体超家族成员之间普遍存在的保守残基. 突变实验发现替换 W²⁸³将导致 EPOR 所有功能的丧失, 而 L³⁰⁷或 E³⁰⁸突变也将对 EPOR 的功能造成极大破坏. 以上分析说明 EPOR 膜内区域的这些部位对信号传导必不可少. 在膜内远端发现有一信号传导的负调控位点. 在 C 端区域还可能有磷酸化位点或酪氨酸激酶结合位点. 研究表明, EPOR 的膜内部分对配体的识别和内吞作用并不重要^[7,8].

有证据表明细胞表面的 EPOR 存在寡聚结构. 在 EPOR cDNA 转染的 COS 细胞中, 用放射性标记的 EPO 结合到细胞表面后发现 EPO 可以与分子量 65 000—105 000 的多肽交联. 其中 65 000 的多肽用抗血清免疫沉淀分析与 EPOR 一致. 几乎肯定是 EPOR cDNA

克隆的产物, 人们推测 65 000 的 EPOR 与 100 000—105 000 的多肽以多聚物形式存在^[9]. 而 mEPOR 膜外 Arg¹²⁹ 突变为 Cys 将导致 EPOR 形成以二硫键相联的二聚体, 它能使低亲和性受体在没有 EPO 存在时产生细胞内的生长信号^[10]. 通过对超家族另一成员生长激素受体 (GH-R) 的晶体结构分析, 人们推测 EPO 也将导致其受体在细胞表面形成同二聚体^[11].

2 hEPOR 的代谢研究

在 Ba/F3 细胞中表达的新生 EPOR 由于未获得内糖苷酶-H 的抗性, 几乎半数很快降解 ($t_{1/2}$ = 40—60min) (该过程发生在内质网). 剩余的 EPOR 由于在高尔基体中获得抗内糖苷酶-H 的寡糖成分成为分子量 66 000 的分子. 而 66 000 的 EPOR 也只有 40—60min 的半衰期, 它们中的大部分在溶酶体中被降解, 只有不到 5% 能最终出现在细胞表面. 在 EPO 诱导的鼠红白血病细胞中, 人们还发现了分子量为 70 000—72 000 形式的 EPOR, 它们含有更高的糖基化成分^[12].

当 EPO 与受体结合后, 结合了配基的 EPOR 经内吞作用进入细胞, 受体上结合的 EPO 在溶酶体中被降解. 而受体的代谢途径则不太清楚^[13].

3 EPO 诱导的跨膜信号传导

胞质激素受体超家族成员的膜内结构缺少与已知蛋白激酶的同源性, 而且在家族成员之间同源性也不明显. 由于细胞表面 EPOR 量很少并且缺乏一种专一性依赖 EPO 增殖和分化的细胞系, 因此到目前为止对 EPO 诱导的信号传导机制仍知之甚少.

在 EPO 诱导的信号传导过程中人们发现细胞内 cAMP 水平提高, 同时伴随有一个快速的内向 Ca²⁺ 流. EPOR 的信号传导可能还包括磷脂酶 A2 和磷脂酶 C 的活化^[14], 并涉及蛋白质的磷酸化作用. 有报道说, 一种分子量为 97 000 的磷酸化辅助蛋白参与了该过程^[15]. 另外, 人们发现稳定表达 EPOR 的 IL-3 依赖性造

血细胞(如淋巴系 Ba/F3 细胞等)能在 EPO 存在时生长,然而表达了 EPOR 的 NIH-3T3 纤维细胞却并不因 EPO 的诱导而增殖,这说明造血细胞中 EPOR 的信号传导机制具有独特性。

蛋白质磷酸化是许多生长因子受体(如 PDGF、EGF、CSF-1 和胰岛素等的受体)信号传导的早期重要步骤。通过序列比较及变体实验表明胞质激素受体超家族中部分成员,如 EPO、IL-2、IL-3、IL-4 的受体,其胞内区域 Ser 和 Pro 残基占很高比例,说明这些成员也许有相似的信号传导机制。有证据表明, Ser/Thr 的磷酸化和 EPOR 的活动有关。对有酪氨酸激酶结构域的受体如 CSF-1 和 EGF 受体,它们的 C 端区域有与自身磷酸化有关的酪氨酸残基,从而实现受体信号传导的负调控,而酪氨酸激酶抑制剂能阻碍依赖 EPO 的红白血病细胞的生长并能诱导红系细胞分化,说明酪氨酸磷酸化作用在 EPOR 信号传导及红细胞生长过程中也扮演了极为重要的角色^[16]。然而, EPOR 膜内结构域中并没有明显的激酶作用特征。研究人员发现一种胞质蛋白可能与 EPOR 偶联并对信号传导进行负调控。该蛋白由 c-raf 原癌基因编码,称为 Raf-1 蛋白,它是一种普遍存在于细胞内的 Ser/Thr 磷酸激酶。EPO 能诱导 EPOR 阳性细胞中 Raf-1 蛋白上 Ser/Thr 残基的快速磷酸化,用 GM-CSF、IL-2 或 IL-3 刺激也能产生该效应。这与其它分裂素(如 T-细胞活化因子, EGF、CSF-1 和胰岛素等)诱导的 Raf-1 蛋白磷酸化主要发生在 Ser 残基上不同。Raf-1 蛋白的反义寡核苷酸能专一性降低细胞内 Raf-1 的浓度,同时抑制 IL-3 或 EPO 刺激的 DNA 合成。

综上所述,在信号传导过程中, EPOR 经历了一个自身磷酸化过程。经 EPO 刺激的 EPOR 阳性细胞中,大部分受体保持 64 000—66 000 的未磷酸化形式,而一小部分受体经磷酸化成为与细胞增殖功能密切相关的 72 000 形式,其浓度在 EPO 刺激后几分钟内降低到基线水平。除了分子量为 72 000 的受体,在体外对部分纯化的细胞表面 EPO-EPOR 复合物磷酸化后发

现一个相关的分子量为 130 000 的蛋白(pp130),它可能是与 EPO-EPOR 复合物共纯化出来的蛋白激酶或有关激酶的底物,两者均含磷酸化-酪氨酸^[17]。

4 EPOR 的激活: 突变及与一种病毒蛋白的相互作用

现在知道至少有三种不同的机制能激活 EPOR,促使 EPOR 阳性细胞增殖: a. 与天然配体 EPO 结合; b. EPOR 膜外区域 R129C 突变; c. 结合缺陷形式 SFFV 病毒 env 基因产物——gp55。后两种机制为 EPOR 所特有,与各种红白血病密切相关。

研究人员用遗传选择的方法鉴别出两种能提高 EPOR 活性的突变。第一种(tEPOR)包括前述的 C 端删除。tEPOR 基因删除了 EPOR cDNA 中的一段跨越 3' 编码和非编码的区域,导致野生型 EPOR 末端 34 个氨基酸(Gly⁴⁷⁵—Ser⁵⁰⁸)被 2 个氨基酸 Ala 和 Leu 所代替。该突变使受体与 EPO 结合能力增强,表达 tEPOR 的细胞能在 1 pmol/L 的 EPO 中生长(相当于生理浓度的 1/10),没有 EPO 时则不能生长^[19]。第二种类型叫做组成型突变体(cEPOR),该突变体赋予细胞在缺乏 EPO 和其它生长因子时自主生长的能力。现已鉴别出两种不同的 cEPOR。其一是在野生型 EPOR cDNA 上含有一个单一的 C→T 突变,导致膜外第 129 个氨基酸(对 mEPOR 而言,在 hEPOR 中应为第 130 个残基)由 Arg 变成了 Cys(即 mEPOR 的 R129C 突变体)。另一种则同时含有 tEPOR 的 C 端切除和 R129C 突变。R129C 突变体由于在 129 位密码子处编码了一个额外的 Cys,因此该变体在细胞表面和内质网中均以二硫键连接成二聚体存在,尽管还没有直接证据说明 EPO 诱导了细胞表面受体的二聚化,但人们认为以二硫键相连的 R129C EPOR 变体的二聚结构与野生型 EPO-EPOR 复合物中受体的结构类似。

研究表明,缺陷形式的 SFFV 病毒是导致各种红白血病的主要原因。目前已知的两种

SFFV 病毒 (SFFV-A 和 SFFV-P) 都能导致红白血病. 由 P 型 SFFV 病毒 env 基因编码的 gp55 蛋白以其跨膜区域通过其它膜成分间接结合在 EPOR 上并激活 EPOR 的促细胞增殖功能, 导致宿主细胞无论 EPO 存在与否都能生长^[18]. 相对来说, 对由 A 型 SFFV 病毒导致红白血病的机理则了解尚少. 从动物中分离出来的感染了 SFFV-A 的致红白血病细胞株, 其生长仍依赖于 EPO. 目前尚不能确认 EPOR 和 SFFV-A 病毒 env 基因产物之间形态和功能上的联系, 但有证据表明同 SFFV-P 一样, SFFV-A 病毒跨膜区域对 EPOR 的激活也非常重要. 结合了 gp55 的野生型 EPOR 的生理功能同 R129C 突变体 EPOR 类似, 除了赋予细胞不依赖生长因子的增殖外, 突变还导致了受体在内质网中的积累, 并改变了野生型 EPOR 胞内快速降解的特征.

在 SFFV 病毒感染早期, 红系祖细胞生长过程中产生多克隆的有核红细胞增多症, 并在 4—6 周内分化出不依赖生长因子的致红白血病细胞, 祖细胞分化停留在原始红细胞阶段. 由 gp55 激活的 EPOR 被认为与早期有核红细胞增生症有关, 它能促进随后的基因突变的积累, 导致红白血病克隆生长. 与此相类似, 组成型活性的 R129C EPOR 能在 SFFV 病毒诱导的红白血病中取代 gp55 作为致癌因子促进不受控制的有核红细胞增生, 导致进一步的基因改变最终产生明显的红白血病. 同 gp55 激活的 EPOR 一样, R129C EPOR 在疾病后期所扮演的角色也不清楚. R129C EPOR 在非红系细胞内的表达并不能使细胞最终产生癌变, 而为癌细胞发展所必需的继发突变只能在各种造血祖细胞中达到, 因此该类疾病被限制在红系细胞内.

EPO 的另一个主要功能是阻止红系祖细胞在发育后期的程序死亡 (apoptosis), 人们发现在早期红系祖细胞中存在大量缺失膜内大部分区域的截断形式 EPOR, 而全长的 EPOR 则在晚期祖细胞中占优势. 尽管截断形式的 EPOR 能传导促进有丝分裂的信号, 它与全长

EPOR 相比在阻止被转染细胞程序死亡方面能力显然较差. 以上发现说明不同阶段表达的 EPOR 具有不同的功能^[20].

迄今 hEPOR 的研究还处于起步阶段, 有关 EPOR 结构与功能的关系, EPOR 信号传导过程的进一步精细研究正在进行之中, 并可望具有临床实际应用价值.

参 考 文 献

- 1 Youssoufian H, Longmore G, Neumann D *et al.* Blood, 1993; **81**: 2223
- 2 Winkelmann J C, Penny L A, Deaven L L *et al.* Blood, 1990; **76**: 24
- 3 Quelle D E, Quelle F W, Wojchowski D M *et al.* Mol Cel Biol, 1992; **12**: 4553
- 4 Chiba T, Amanuma H, Todokoro K. Biochem Biophys Res Commun, 1992; **184**: 485
- 5 Yoshimura A, Zimmers T, Neumann D *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 11619
- 6 Zon L I, Moreau J F, Koo J W *et al.* Mol Cel Biol, 1992; **12**: 2949
- 7 Miura O, Cleveland J L, Ihle J N *et al.* Mol Cel Biol, 1993; **13**: 1788
- 8 Chiba T, Kishi A, Sugiyama M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1992; **186**: 1236
- 9 Sawyer S T. J Biol Chem, 1989; **264**: 13343
- 10 Watowich S, Yoshimura A, Longmore G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 2140
- 11 De Vos A M, Ultsch M, Kossiakoff A A *et al.* Science, 1992; **55**: 306
- 12 Sawyer S T, Hankins W D. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 6849
- 13 Sawyer S T, Krantz S B, Goldwasser E *et al.* Biol Chem, 1987; **262**: 5554
- 14 Meredith M G, Clejan S, Tou J S *et al.* Am J Physiol, 1992; **262**: C1197
- 15 Linnekin D, Evans G A, D'Andrea A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 6237
- 16 Ullrich A, Schlessinger J. Cell, 1990; **61**: 203
- 17 Yoshimura A, Lodish H F. Mol Cel Biol, 1992; **12**: 706
- 18 Kishi A, Chiba T, Sugiyama M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1993; **192**: 1131
- 19 Yoshimura A, Longmore G, Lodish H F *et al.* Nature, 1990; **348**: 647
- 20 Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H *et al.* Science, 1992; **257**: 1138

Advance in the Research of Human Erythropoietin Receptor. Wang Shaoxiong, Dong Chen, Hua Zichun (*Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract Human erythropoietin receptor (hEPOR) is a transmembrane protein which located in the surface of the relatively mature erythroid progenitor cells. It can promote the viability, proliferation and differentiation of the cells by specifically binding to erythropoietin (EPO), in which process the hEPOR itself and some other proteins will be phospho-

rylated. There are some conserved domains in hEPOR which is adapted to its function. The amino acid sequence of the human EPOR is 82% identical to that of the mouse protein. The EPOR can be constitutively activated by a single R129C mutation or binding to a special protein. It is also closely related to many blood diseases such as erythroleukemia.

Key words human erythropoietin receptor (hEPOR), erythroid cell, cytokine receptor superfamily, transmembrane single transduction, erythroleukemia

甾体激素受体超家族的基因调控机制

毛俊浩 吕志良

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 甾体激素受体超家族是一类基因反式作用因子, 对 RNA 聚合酶 II 转录的某些蛋白质基因和 RNA 聚合酶 I 转录的核糖体 RNA 基因均有正或负的转录调节作用. 超家族对 RNA pol II 转录的基因调控的机理包括受体激活, 相关蛋白解离, 磷酸化, 同源/异源二聚化, 核转位, 与正/负激素应答元件及相应转录蛋白作用, 最终激活或抑制特异靶基因的转录. 甾体激素对 RNA pol I 转录的基因的调节作用以及超家族中的经典受体和孤儿受体非配合的激活机制是目前研究的热点.

关键词 甾体激素受体超家族, 结构与功能域, 正/负基因调控, 孤儿受体

甾体激素作用于细胞内的特异性受体 (绝大部分为核受体), 调控特定基因的表达, 对细胞发育, 分化和生理功能起着重要的调节作用. 多数受体已被鉴定, 克隆和测序. 近年来发现一些非甾体如甲状腺激素和视黄酸的受体的氨基酸序列与经典的甾体激素受体有着显著的同源性, 并且具有相似的高级结构, 因此认为它们是由共同的祖先基因演化而来, 构成了甾体激素受体超家族 (steroid hormone receptor superfamily, SHRS). 该超家族成员包括糖皮质激素受体 (GR)、孕激素受体 (PR)、盐皮质激素受体 (MR)、雄激素受体 (AR)、雌激素受

体 (ER)、维生素 D3 受体 (VDR)、甲状腺素受体 (TR α 、 β)、反式视黄酸受体 (RAR α 、 β 、 γ)、视黄酸 X 受体 (RXR α 、 β 、 γ)、蜕皮激素受体 (ECR)^[1]. 它们在作用机制上也具有相似性, 都是激素诱导的反式转录因子. 近年来利用该超家族中高度保守的 DNA 结合域为探针, 对不同种, 不同组织细胞的 cDNA 文库进行筛选, 发现许多与该超家族成员相关的蛋白质, 但没有找到与之结合的配体, 故称为孤儿受体 (orphan receptor). 目前已发现的孤儿受体有 EAR-1、EAR-2、COUP、ERR-1、ERR-