

糖皮质激素受体与 DNA 的相互作用

杨 义 力

(中国人民解放军第二军医大学,上海)

糖皮质激素 (Gc), 对机体的发育、分化和代谢起着重要作用, 在临床上, Gc 也是应用最广泛的药物之一, 因而它的作用机制引起了人们的很大兴趣。六十年代以来的工作表明, 存在着 Gc 受体, Gc 和胞浆中受体结合, Gc-受体复合物激活后进入细胞核内, 调节基因的表达。但对 Gc-受体复合物调节基因表达过程, 了解的还很少。近年来, 由于基因重组技术的应用, 受体纯化的成功以及对小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV)、金属硫蛋白基因的研究, 使人们能够从分子水平上研究受体与 DNA 的相互作用, 取得了令人鼓舞的成果, 为进一步研究和认识 Gc 的作用机制及真核基因的调节奠定了基础。

一、研究 Gc 受体与 DNA 相互作用的主要方法

1. Gc 受体的纯化

确定存在 Gc 受体后, 人们就一直试图提纯它, 主要有两类方法, 一是亲和层析, 即把配

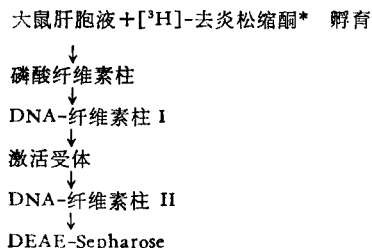


图 1 纯化 Gc 受体方法示意图

孵育后 Gc 受体与 $[^3\text{H}]\text{-TA}$ 结合, 此时受体表面带负电荷, 因而在磷酸纤维素柱和 DNA-纤维素柱 I 的“穿过峰”中, 表面带正电的蛋白质则吸附于上两柱中。激活后, 受体表面带正电, 能吸附于 DNA-纤维素柱 II 上, 与表面带负电荷的蛋白质分离。这样, 即可达到纯化的目的

* $[^3\text{H}]\text{-Triamcinolone Acetonide}$, $^3\text{H-TA}$

基或特异抗体偶联到支持物(如纤维素)上进行层析。目前看来, 这种方法纯化的效果不很好; 二是利用 Gc 受体激活前后表面电荷的变化来分离它。用此法 Wrangc 等^[1]已能将激活的 Gc 受体纯化到大于 98% 的纯度。主要步骤如图 1 所示。

2. 硝酸纤维素滤膜结合测定^[3]

这是测定与受体结合的 DNA 片段的方法。在一定条件下, 受体蛋白能吸附在硝酸纤维素 (NC) 滤膜上, 而双链 DNA 则不能被吸附。在标记的双链 DNA 溶液中加入激活的 Gc 受体, 孵育后将样本用 NC 滤膜过滤, 如有能和受体结合的 DNA, 则这种 DNA 将因与受体结合而存在滤膜上, 可用含去垢剂的液体将其从滤膜上洗下来进行研究。

3. 核酸酶“足迹” (Footprint) 法^[2]

这是用来确定 DNA 片段上与受体结合位点的方法。首先把所要研究的 DNA 一端用 ^{32}P 标记, 然后加入适当浓度的 DNA 酶 I, 使得每一个 DNA 只被切断一次, 因为切点是随机的, 将此样本进行电泳, 可见存在着各种不同长度的 DNA。若把同样的 DNA 和激活的 Gc 受体孵育后再用 DNA 酶 I 处理, 则由于受体结合于 DNA 上, 结合处的 DNA 不能受酶的作用, 有些长度的 DNA 就不能得到, 在电泳图谱上就会出现“空挡”, 由“空挡”的位置就可推定受体的结合位点。

其它常用的方法还有 DNA-纤维素结合法^[6]、甲基化保护及干扰^[4]、电镜观察等。应特别提出的是, 受体和 DNA 结合的条件稍有不同, 结果就会有很大变化。基因重组、转移等方法这里也不赘述。

二、Gc 受体与 MMTV DNA 的相互作用

小鼠乳腺癌病毒 (MMTV) 是一种逆转录病毒, 能够引起小鼠的乳腺肿瘤。和其它逆转录病毒一样, 在其生活周期中, RNA 需反转录成 DNA。MMTV DNA 长约 9kb。

大约十年前人们发现, 在培养的小鼠乳腺瘤组织或细胞系中, 加入 Gc 可使病毒的产量大大增加。如用 MMTV 感染培养的肝癌细胞, 则受感染的肝癌细胞中病毒颗粒也因 Gc 的存在而增加。随后一系列工作表明, Gc 的这种作用是由宿主细胞的 Gc 受体介导, 通过增加转录起始效率, 合成更多的病毒 RNA 而完成^[5]。

尽管 MMTV DNA 整合入宿主基因组的位置是随机的, 但总是受 Gc 的调控, 因而提示决定 Gc 反应性的是 MMTV DNA 序列本身。由于已知逆转录病毒的 LTR (long terminal repeat) 中含有启动子, 故猜想 MMTV LTR 中可能含有决定 Gc 反应性的序列。目前, 至少有两类实验支持这种想法。1) 在混合的 DNA 中, Gc-受体复合物特异地和 LTR 的一定区域结合。Payvar 等^[4]用硝酸纤维素滤膜结合法表明, 只有含 MMTV DNA 的 DNA 片段才能和受体结合, 这种结合为非标记的 MMTV DNA 片段所竞争。Govindan 等^[7]研究表明, 只有含

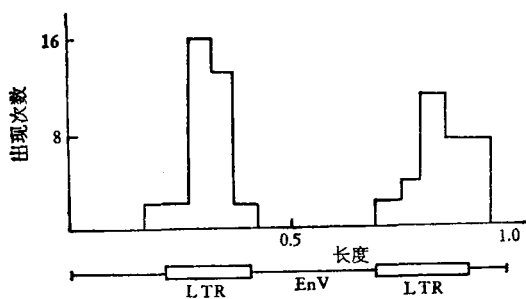


图 2 电镜观察激素-受体复合物的结合位置

横轴为 DNA 的相对长度, 纵轴为复合物在某一长度出现的次数。下面为该组作者所用的 MMTV DNA 的结构, 说明结合频率最高处, 对应于 LTR

LTR 的 DNA 才能和受体结合。他们还进一

步用电镜观察来说明受体是和 LTR 结合, 结果见图 2。2) 把 MMTV LTR 与其它基因融合后转入细胞内, 该种基因的表达也受 Gc 调控。Lee 等^[8]把 MMTV LTR 与小鼠二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因融合后转入受体细胞中, 证明 DHFR 的产生受 Gc 调节。Huang 等^[9]用 Harvey 肉瘤病毒的 P₂₁ 基因及许多作者用胸腺嘧啶激酶 (TK) 基因进行的类似工作, 均说明 MMTV LTR 可使这些基因的表达受 Gc 调控。

但是, MMTV LTR 长约 1.4kb。哪一段与上述作用有关呢? Majors 等^[10]把 LTR 与单纯疱疹病毒的 TK 基因编码区融合, 然后不断从 LTR 的 5' 端切掉核苷酸, 得到一系列具有不同长度 LTR 的融合基因, 把它们分别转入细胞中, 以确定哪些序列与 Gc 的调节有关。结果发现切掉 LTR 中转录起始点上游第 190 个碱基 (-190) 以上的序列, 不影响基因对 Gc 的反应性, 再往下游切, 则 Gc 的增强转录作用几乎完全消失。但在 -107 位附近插入 4 个碱基对或造成 20 个碱基对缺失, 并不影响 Gc 的调节作用。即使把 -59 到 +100 (以转录起始点为 0, 往上游为负, 往下游为正) 的序列用来自 Rous 肉瘤病毒的相应序列代替, 也不改变 Gc 对 TK 基因的调节作用。Hynes 等^[11]做了类似的工作, 表明 Gc 的调节仅需 -202 下游的 LTR 序列。该组作者还进一步把细胞内转录的资料与体外结合的结果进行比较, 测出 LTR 内至少有两个受体结合位点, 一个位于 -202 至 -137, 另一个位于 -137 至 -50, 并证明它们的存在与激素诱导转录相关。Chandler 等^[12]的工作表明, 提供 Gc 反应性的 DNA 序列与启动子是不同的, 称之为 GRE (Glucocorticoid Response Element), 并证明 GRE 对应于他们实验室所鉴定的 Gc 受体结合区域。他们还把 GRE 和 TK 基因及其启动子融合, 使原先不受 Gc 影响的 TK 基因表达在转录水平上受 Gc 的调节, 而且 GRE 与 TK 基因间的距离不是十分重要, GRE 以任一指向均能起作用。

自从 Gruss 及 Benoist 等在 SV₄₀ 中发现了增强子以来, 引起了人们的极大兴趣, 许多作

者在多种病毒甚至真核细胞中发现了增强子样序列,并对其特性进行了研究.一般认为,增强子是一类短的,顺式作用的 DNA 序列,具有如下特点^[21]: 1) 仅以顺式方式作用于启动子;2) 在启动子 5' 侧或 3' 侧均能起增强作用;3) 相对于启动子的任一指向(3' 至 5' 或 5' 至 3') 均能起作用;4) 发挥作用与距受控基因的远近相对无关;5) 对异源性启动子也能发挥作用.上述 Chandler 等人的工作及 Yamamoto 实验室的工作^[22]均强烈提示, Gc-受体复合物是和 MMTV DNA 中的增强子相互作用,进而调节基因的表达.

与此同时,尚有一些体外研究的结果提示,特异的受体结合位点也存在于可转录的

MMTV DNA 序列中^[4,13]. 为进一步澄清这一问题, Payvar 等^[14]综合运用核酸酶“足迹”法、电镜观察和 NC 滤膜结合法,研究受体与 MMTV DNA 的结合. 他们把 MMTV DNA 的大部分进行了克隆,证明存在 5 个结合区域(图 3),在结合区域 1 中有 5 个结合位点,在 2 和 3 中各有 2 个结合位点. 他们的电镜观察结果也与此一致,而且,各个位点与受体的亲和力相差少于一个数量级. 各个结合位点的长度在 14 至 44bp 之间. 分析表明,存在一个 8 核苷酸的共享序列 $AGA\uparrow CA(G)\uparrow$, 该序列在上述 9 个结合位点中共出现了 13 次,但该序列重要性如何尚不清楚.

上述结构基因内的结合区域的作用尚待进

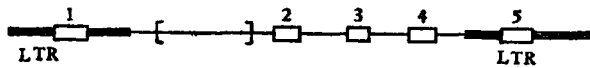


图 3 MMTV DNA 及其受体结合区域

方括号内为尚待进一步研究的区域.

一步研究,目前已有些结果提示它是有某些生物功能的. Payvar 等证明,含上游或内部结合区域的质粒稳定整合入宿主的基因组后,表达受激素的调节. 在 Yamamoto 实验室进行的工作表明,结合区域 2 也具有增强子的性质.

三、Gc 受体与人金属硫蛋白基因的相互作用

金属硫蛋白(MT)分子量为 6000—10,000,能和许多重金属结合. 它在体内可能与金属离子的代谢有关. 在许多真核细胞中均存在 MT 基因,重金属离子(如 Cd^{2+}) 或 Gc 可诱导该基因的表达,且均是通过增加转录而完成的,这为研究 Gc 受体的作用机制及真核基因的表达提供了一个良好的模型^[15].

人的 MT 电泳时主要有两个带,分别称为 MT-I 和 MT-II. 进一步用 cDNA 杂交等说明,MT₁ 是由一个大的基因家族编码的,至少有 11 个成员^[16]. 在 Baxter 实验室,克隆出了 hMT-II_A 基因,将其转入大鼠成纤维细胞,虽然整合的位点和拷贝数各不相同,但表达均受

Cd^{2+} 和 Gc 诱导,因而提示,提供 Cd^{2+} 和 Gc 调节的成分在克隆的 DNA 片段内部. 为进一步了解 Gc 对 hMT-II_A 的作用,进行了三种嵌合分子转移实验^[17];第一,用 hMT-II_A 基因的 5' 侧替代 TK 基因的相应片段,虽然原先 TK 基因表达不受 Cd^{2+} 和 Gc 控制,融合再转入细胞后,TK 基因的表达变得受这两种成分的诱导. 第二,把 hMT-II_A 基因的 5' 侧与完整的 TK 基因相联结,虽然 hMT-II_A 的序列距 TK 启动子约有 600bp,但转入细胞后, Cd^{2+} 和 Gc 仍能调节 TK 基因的转录. 第三,把 hMT-II_A 基因从转录起始点以上 40 个核苷酸起的序列与 TK 基因从 TATA Box 起以下的序列相连接,转入到大鼠细胞,TK 基因的表达也受 Cd^{2+} 和 Gc 的调节. 这些结果说明,hMT-II_A 基因的 5' 侧序列中,含有决定 Gc 反应性的片段,它不是经典的启动子,而是具有增强子的某些特性.

为进一步确定提供 Gc 调节的 DNA 成分以及它们是否为受体结合位点, Karin 等^[18]构建了一批 5' 侧逐渐缺失的 hMTK 基因,把它

们转入培养细胞后表明,5'侧至少需包括至-268处,才能保持Gc的可诱导性,至少要至-91处,才能保持TK基因的基础表达。他们又用NC滤膜结合测定及核酸酶足迹法表明,-258至-237bp是DNA与受体的结合区域。这样,Gc受体和DNA的结合与对激素的反应性相一致。

此外,Baxter实验室还对Gc受体与大鼠生长激素基因(rGH)及人生长激素基因(hGH)的相互作用进行了研究^[17]。他们把克隆的rGH分别转入小鼠和大鼠的纤维母细胞,发现在小鼠细胞,rGH的转录产物较正常小,Gc能使其细胞内水平增加4—5倍,但这种作用不是在转录水平上的。在大鼠细胞,rGH虽能够完整表达,但不受Gc调控。Robin等^[19]用rGH和TK基因共转导小鼠纤维母细胞,转录产物大小正常,地塞米松可使其水平增加3—5倍,且把rGH的5'侧与TK基因融合,嵌合基因的转录也受Gc调节。而在大鼠纤维母细胞,虽然TK基因也能表达,但不受Gc调节。这些结果说明,情况远不像在MMTV和hMT-II_A那样简单,可能对各种不同的基因存在着不同的调节方式,也可能存在一些组织特异性因子等等,有待进一步的工作来说明。

四、结 束 语

如上所述,Gc-受体复合物能和某些DNA片段特异结合,这种结合与Gc表现生物活性相平行,与复合物结合的DNA片段符合增强子的标准,因而强烈提示,Gc-受体复合物通过和增强子的相互作用,调节基因的表达。最近,Zaret等^[20]又用染色质水平的实验提供了新的证据。在小鼠L细胞基因组中引入MMTV DNA的衍生物,用地塞米松处理可增加该基因的转录,与此相平行地在染色质上出现DNA酶I的超敏区,此区又对应于MMTV LTR中的Gc受体结合片段(增强子)。

但是,目前的结果还远不能说明受体与增强子作用后如何调节基因的表达,也不能解释Gc作用的组织特异性等许多问题,因而受体和基因研究者正进行国际间合作来进一步探讨这一问题,可望在近年内获得更加令人鼓舞的结果。

本文承徐仁宝副教授指正,特此致谢

参 考 文 献

- [1] Wrangé, O. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9284, 1979.
- [2] Galas, D. J. and Schmitz, A.: *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3157, 1978.
- [3] Payvar, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 6628, 1981.
- [4] Scheidereit, C. and Beato, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 3029, 1984.
- [5] Ringold, G. M.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **560**, 487, 1979.
- [6] Pfahl, M.: *Cell*, **31**, 475, 1981.
- [7] Govindan, M. V. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 5157, 1982.
- [8] Lee, F. et al.: *Nature*, **294**, 228, 1981.
- [9] Huang, A. L. et al.: *Cell*, **27**, 245, 1981.
- [10] Majors, J. and Varmus, H. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 5866, 1983.
- [11] Hynes, N. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 3637, 1983.
- [12] Chandler, V. L. et al.: *Cell*, **33**, 489, 1983.
- [13] Pfahl, M. et al.: *Science*, **222**, 134, 1983.
- [14] Payvar, F. et al.: *Cell*, **35**, 381, 1983.
- [15] Hager, L. J. and Palmiter, R. D.: *Nature*, **291**, 340, 1981.
- [16] Karin, M. and Richards, R. I.: *Nature*, **299**, 797, 1982.
- [17] Lan, N. C. et al.: *J. Steroid Biochem.*, **20**, 77, 1984.
- [18] Karin, M. et al.: *Nature*, **308**, 513, 1984.
- [19] Robin, D. M. et al.: *Cell*, **29**, 623, 1982.
- [20] Zaret, K. S. and Yamamoto, K. R.: *Cell*, **38**, 29, 1984.
- [21] *Enhancers and Eukaryotic Gene Expression* (Eds. Y. Gluzman, and T. Shenk.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
- [22] Yamamoto, K. R., In *Steroid Hormone Receptors: Structure and Function* (Eriksson, H., and Gustafsson, J.-A., eds) Elsevier Science Publisher B. V. 1983.

[本文于1985年6月10日收到]