

综述与专论

细胞内视黄酸信号传递系统

李载权 刘秉文

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

摘要 视黄酸对基因表达的调控与肿瘤细胞的分化、胚胎的发育以及疾病的发生关系密切。视黄酸的基因调控作用是通过视黄酸信号传递系统实现的。视黄酸信号传递系统包括视黄酸、细胞液视黄醇(酸)结合蛋白、视黄酸细胞核受体及视黄酸反应元件等。视黄酸信号传递系统自成一体系, 在这一系列调控的级联反应中存在着多级反馈调控环节, 而且该系统还与视黄酸配体以外的信号系统相联系。

关键词 视黄酸, 细胞核视黄酸受体, 视黄酸反应元件

视黄酸 (retinoic acid, RA) 是人体重要营养素维生素 A 即视黄醇 (retinol, ROH) 在体内的一类氧化代谢产物。从膳食中直接或间接获得的视黄醇及其在体内形成的视黄醛 (retinal, RAL)、视黄酸以及人工合成的类似物统称为类视黄醇 (retinoid)。类视黄醇在维持视网膜功能、骨骼生长发育、生殖功能、抑制某些肿瘤细胞增殖以及促进脊椎动物胚胎发育方面发挥重要作用^[1]。其中视黄酸用于肿瘤的临床治疗始于 70 年代, Sporn 等^[2]回顾了视黄酸对多种恶性肿瘤细胞增殖的抑制和某些癌细胞向正常细胞转化的诱导实验。1987 年, Petkovich^[3]和 Giguere^[4]分别在不同的实验室同时发现了细胞核视黄酸受体 (retinoic acid receptors, RARs), 1990 年 Mangelsdorf^[5]又发现了另外一种不同于 RARs 的细胞核视黄酸受体, 名为 RXRs (retinoic acid X receptors)。现在视黄酸受体作为细胞核内调控基因表达的一类调节因子参与视黄酸信号的传递过程已初步明确^[6]。

1 视黄酸的代谢和胞液内信号传递

视黄醇是非极性分子, 主要储存于肝脏细胞。它们自肝脏释放后与血浆视黄醇结合蛋白

(retinol binding protein, RBP) 结合, 然后转运至机体需要的组织细胞, 再经其细胞膜特异性视黄醇结合蛋白受体 (RBP-R) 进入细胞内, 但有关转运机制尚不清楚。细胞内视黄醇与细胞液视黄醇结合蛋白 I (cellular retinol binding protein I, CRBP-I) 结合后, 在特异性 NADPH-视黄醇脱氢酶的作用下氧化成视黄醛, 后者又在细胞液醛脱氢酶的作用下氧化为视黄酸^[7]。视黄酸有全反式 (all *trans* retinoic acid, atRA)、9 顺式 (9 *cis* retinoic acid, 9cRA) 及 3, 4-双脱氢 (3, 4-didehydroretinoic acid, dd RA) 视黄酸等异构体。9cRA 产生的机制目前还不清楚, 可能涉及异构酶的作用。这些视黄酸分子能与细胞液视黄酸结合蛋白 I (cellular retinoic acid binding protein-I, CRABP-I) 发生结合, 并在微粒体 P450 氧化酶的作用下被羟化为水溶性无活性产物。实验证明过度表达 CRABP-I 的 F9 肿瘤细胞株中视黄酸半衰期减小, 生物活性降低, 即视黄酸与 CRABP-I 的结合可防止视黄酸对细胞核受体的活化。但 Shubeita^[8]认为 CRABP 是细胞液与细胞核之间的穿梭体, 能将视黄酸以细胞液转运到细胞核上的视黄酸受

体上, 然后再回到细胞液. 总之究竟视黄酸是如何进入细胞核也还不十分清楚.

细胞内 CRBP 分为 I 和 II 型两种. I 型分布广泛, 视黄醇与 I 型 CRBP 结合后能防止胞液脱氢酶的非特异性氧化, 保证视黄醇能特异地被氧化为视黄酸. 而 II 型主要分布于小肠, 其作用是 CRBP-II 所结合的视黄醇能在卵磷脂:视黄醇乙酰转移酶的作用下, 形成可贮存的视黄醇酯. 细胞内 CRABP 能结合视黄酸, 也分为 I 型和 II 型. 现尚不知道 II 型 CRABP 是否与 I 型 CRABP 作用相同. 但已证明 I 及 II 型 CRABP 对 9cRA 均无结合作用. 因此人们推测 9cRA 可能是经另一条途径进行代谢的. CRBP 和 CRABP 直接控制着视黄酸的种类和含量, 成为视黄酸信号传递系统中的一个重要成分^[6].

2 视黄酸受体

视黄酸受体是细胞核内接受视黄酸分子并将其信号传递给靶基因的一类重要中介成分, 它位于细胞核. 该受体蛋白质的一级结构已经确定, 分为 5 个结构域^[9], 即 A/B、C、D、E 及 F 区. 视黄酸受体与类固醇激素、甲状腺素、维生素 D₃ 受体以及一些孤儿受体如受体

coup-tf 等其他核受体 (ONR) 属同一超基因家族, 但视黄酸受体在基因调节的信号传递过程中比其他核受体要复杂得多.

视黄酸受体一般分为全反式视黄酸受体 (retinoic acid receptors, RARs) 和 9 顺式视黄酸受体 (retinoic acid X receptors, RXRs) 两类. 这两类受体中每一类受体又包括许多亚类, 不少亚类还有许多异构体 (isoforms). 视黄酸受体的基因已经定位, 如人类 RAR α 、RAR β 和 RAR γ 的基因分别定位于 17q²¹, 3p²⁴ 及 12q¹³ 染色体上; 视黄酸受体基因共含 10 个外显子, 每一外显子功能不一样. 外显子 I 和部分外显子 II 表达受体蛋白 5'-非翻译区, 外显子 II、III 表达受体的 A/B 区, 外显子 IV、V 表达受体的 C 区, 外显子 VI 表达受体的 D 区, 外显子 VII 及部分 X 表达受体的 E 区, 外显子 X 的剩余部分表达受体的 F 区. RAR 和 RXR 基因之所以表达了不同的异构体^[10]主要是由于启动不同的启动子, 或剪拼不同的外显子, 或在内部 CUG 密码上开始翻译. 结果是 RAR、RXR 的 A/B 区和 F 区各自长短不同而且同源性也差, 但在 C 及 E 区仍保持了高度的同源性, 因此各 RAR、RXR 的 mRNA 大小及其受体氨基酸的长短也不一样 (表 1).

表 1 小鼠视黄酸受体氨基酸数、染色体定位、mRNA 的大小及体内分布

分 类	氨基酸数	染色体定位	mRNA/kb	分 布
RAR α 1	462	11	2.3	大脑、皮肤、肌肉、心脏、肾
RAR α 2	459	11	2.3	肺、肝、小肠
RAR β 1, β 3	455, 482	14	?	大脑、皮肤、肺
RAR β 2, β 4	448, 399	14	?	肾、肝、肺、心、皮肤、肌肉
RAR γ 1, γ 2	454, 447	15	?	皮肤、肺
RAR α	467	2	5.6	肝、肾、肺、脾、肌肉、皮肤
RAR β	410	17	2.7 (3.0)	广泛
RAR γ 1	413	1	2.0	肝、肾、肾上腺
RAR γ 2	340	1	2.5	大脑、肺

视黄酸受体各结构域有不同的功能. 如 A/B 区为 N 端区, 大多数受体的不同亚型系

由此区外显子剪拼不同所致. A/B 区与转录活性的特异性有关; 参与顺式作用元件的反式

调节; 此区也是容易与个别染色体基因表达产物形成杂交嵌合体的区域. C 区为 DNA 结合域, 该区富含半胱氨酸并形成两个锌指结构, 这两个锌指结构分别组成具有识别功能的 P 及 D 盒, 能特异地结合 DNA. D 区为绞链区, 该区与受体在核内的稳定及其核内位移有关. E 区为视黄酸配体的结合域, 该区还与受体二聚化作用有关. F 区为 C 端区, 存在着特异性抗原决定簇, 与抗视黄酸受体抗体的特异性有关.

关于小鼠中各种 RAR 和 RXR 的氨基酸数目, 基因的染色体定位, mRNA 的大小及体内分布见表 1.

3 视黄酸受体二聚化与反应元件

3.1 视黄酸受体二聚化

现在已经清楚, 除药理剂量的视黄酸外, atRA、9cRA、ddRA 都能与 RAR 结合, 而 9cRA 则主要与 RXR 结合. 核受体必须二聚化后才能与细胞核 DNA 结合并调控基因的表达. 视黄酸受体 RXR 既可与 RAR、RXR 形成异源或同源二聚体, 也能与其他核受体 (ONR) 形成异二聚体. 可以与 RXR 形成异二聚体的其他核受体有 T₃R、VD₃R、孤儿受体 coup-tf, ARP 和 PPAR 等. 因此视黄酸核受体的二聚化作用不但保证视黄酸信号传递系

统本身的信息传递, 同时也沟通了与其他信号系统的联系. 受体二聚体分为以下三类形式: RAR/RXR、RXR/RXR、RXR/ONR. 实际上各类型的受体相互间可以组合成多种形式的二聚体, 从而使基因表达的调控更加复杂, 更加精细. 通常细胞内以 RXR/RXR 二聚体为主. 显然视黄酸的种类、浓度、甾体激素及其他因子的不同, 可控制二聚体的形式^[11].

3.2 视黄酸反应元件

视黄酸二聚体所结合的靶基因区域为视黄酸反应元件 (retinoic acid response element, RARE). RARE 与激素反应元件 (HRE) 一样, 位于靶基因的启动子区内. 目前关于视黄酸受体二聚体与 RARE 结合的细节认识上还没统一. RARE 根据其核心半位序列的重复方向以及间隔的碱基数可以分为同向重复 (directed repeat, DR)、反向重复 (everted repeat, ER)、回文序列 (palindrome, pal) 以及复合结构 (complex structure) 四种形式. 在同向重复碱基序列的 RARE 中间隔一个碱基时为 DR-1, 间隔两个碱基时为 DR-2, 反向重复中间隔八个碱基时为 ER-8, 余类推.

目前已发现大约 50 种蛋白质基因上游启动子区内含有 RARE, 这些基因中 RARE 的碱基结构, 视黄酸受体二聚体及其视黄酸配体的关系见表 2.

表 2 视黄酸反应元件

分类	亚类	基因	碱基序列	作用的二聚体	配体
同向重复	DR-1	hApo A1	GCAGGGCAGGGGTCAAG	RXR/RAR, RXR/RXR RXR/ONR	9cRA, atRA
	DR-2	rCRBP- I	GTAGGTCAAAAAGTCAGA	RXR/RAR	atRA, 9cRA
	DR-5	hRAR β 2	AGGGTTCACCGAAAGTTCACT	RXR/RAR	atRA, 9cRA
	DR-3			RXR/VD ₃	VD ₃
	DR-4			RXR/T ₃ R	T ₃
反向重复	ER-8	my F-crystallin	AGTGACCCCTTTTAACCGGTCAGT	RXR/RAR	atRA, 9cRA
回文结构		bGH	GGGGGACATGACCCCA	RXR/RAR	9cRA
复合结构		r-GH	AAAGGTAAGATCAGGGACGTGACCGCA	RXR/RAR	atRA, 9cRA

4 视黄酸转录调节的信号传递过程

4.1 视黄酸调控信号的传递过程

当核受体结合视黄酸分子后,二分子核受体即聚合成二聚体,然后二聚体与靶基因上游顺式作用元件即视黄酸反应元件(retinoic acid response elements, RAREs)相结合.受体二聚体与相应 RARE 的结合有着严格的空间对应性,例如某些二聚体中两个受体的 DNA 结合区分别与靶基因 RARE 中反向重复的核心半位结构(core half site consensus)结合,其中一个受体的第一锌指结构借其 P 盒识别 RARE 的半位结构,而另一个受体的第二锌指结构借其 D 盒识别两个半位结构之间的碱基距离.尽管 RAR 和 RXR 上的 P 盒识别的半位结构都为 PuGGTCA 或其类似的碱基序列^[12],但异源二聚体中 RAR 与 RXR 各自分工不一样,RAR 主要识别 DR-2 和 DR-5 的 RARE 3'-上游区半位结构,而 RXR 则识别 5'-下游半位结构,从而形成识别的多样性.

4.2 视黄酸受体对靶基因的转录调节

受体 C 区与 DNA 结合时,并不产生转录活性,只是将具有反式调节作用的 A/B 区和 E 区信息传递给靶基因,使染色体构象发生改变,核小体结构发生变化,从而有利于其他转录因子或 RNA 聚合酶转录起始复合物的工作,调节基因的活性.

形式不同的二聚体一般识别不同的视黄酸反应元件.虽然有时不同二聚体对同一反应元件都能识别,但对基因表达的影响并不相同.如 RXR/RAR 抑制 CRBP-Ⅱ 基因 DR-1 的活性,而 RXR/RXR 促进 CRBP-Ⅱ 基因 DR-1 的活性,因此控制不同的视黄酸种类就可以间接调节视黄醇结合蛋白Ⅱ基因的表达方向^[13].

受体二聚体调控基因表达时,其调节能力还要受到靶基因上游 RARE 构象和序列的影响.如 DR-5 反应元件比 DR-2 和 ER-8 的调控能力强,也比多碱基间隔的重复性元件强;具有 GGTTCA 或 AGGTCA 半位结构的反应元件比其他类型的反应元件强;同向重复反应元

件主要对 RARs 反应,而反向重复和回文序列反应元件既对 T₃R 又对 RARs 反应;DR-1 反应元件同时也是许多孤儿受体如 coup-tf, PPAP, ARP-1, HNF₄ 等的共同反应元件.

更有趣的是,在细胞 CRBP、CRABP 以及视黄酸受体的基因上也存在 RARE,因此视黄酸信号传递系统的级联反应中存在多级反馈调控环节,而这些环节控制着视黄酸信号传递的强度和方向.

实验证明,视黄酸受体还能抑制 AP-1 的活性.Leder 认为这主要是 RAR 与组成转录因子 AP-1 的 c-Jun 蛋白形成了无效的异二聚体,使 AP-1 活性降低.有些靶基因启动子区含有 AP-1 位点,或同时有 RARE 元件,因此视黄酸受体信号系统与转录因子 AP-1 作用的佛波酯基因调控系统也发生着联系^[14].

5 视黄酸信号传递系统与视黄酸功能

综上所述,视黄酸信号传递系统包括视黄酸、细胞液视黄醇(酸)结合蛋白、视黄酸核受体、受体二聚体,视黄酸反应元件等成分.视黄酸调控信号系统最终激活或抑制相应功能性靶基因的表达,但同时该系统自身也受到多层次的反馈调节,并与外界信号系统如 AP-1 及其他类固醇激素受体等组成复杂的信息网络.

现已证明,RARE 不但存在于很多功能基因中,而且还参与这些基因的转录表达,如编码细胞外基质层状蛋白(laminin)β 亚单位,编码表皮生长因子受体(EGF-R)、编码蛋白激酶 C(PKC),编码人骨钙蛋白(osteocalcin)、编码跨膜酪氨酸蛋白激酶受体(即癌基因 c-kit),甚至编码视黄醇(酸)结合蛋白.视黄酸核受体本身的基因中也都含有 RARE,以及视黄酸在细胞水平上参与酶及生长因子受体的合成,也与蛋白激酶活性调节及肿瘤细胞分化和转移有关^[15].正常胚胎的形态发生和脑神经的发育都与视黄酸调控发育控制基因有关,而大剂量外源性视黄酸的致畸胎作用被认为是视黄酸在时间和空间上不适当地激活了胚胎期形态发生相关的发育控制基因.近年来在

急性粒细胞白血病中两类视黄酸受体嵌合体 (PML/RAR α 和 PLZF) 的发现以及视黄酸在一些肿瘤治疗上的成功极大地丰富了视黄酸信号传递系统的理论, 同时也极大地促进了类视黄醇类新药的设计和筛选^[16].

参 考 文 献

- 1 何志谦编. 人类营养学, 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 125~143
- 2 Sporn M B, Roberts A B. Cancer Res, 1983; 43: 3034
- 3 Petkovich M, Brand N J, Krust A *et al.* Nature, 1987; 330: 444
- 4 Giguere V, Ong S, Segui P *et al.* Nature, 1987; 330: 642
- 5 Mangelsdorf D J, Ong E S, Dyck J A *et al.* Nature, 1990; 345: 224
- 6 Giguere V. Endocrine Review, 1994; 15: 61
- 7 Posch K C, Burns R D, Napoli J L. J Biol Chem, 1992; 267: 19676
- 8 Shubeita H E. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 5645
- 9 Beato M. Cell, 1989; 56: 335
- 10 Leid M, Kastner P, Chambon P. Trends Biol Sci, 1992; 17: 427
- 11 Rosen E D, O'Donnell A L, Koenig R J. J Biol Chem, 1992; 267: 22010
- 12 Tsai S Y, Carlstedt-Duke J, Weigel N L *et al.* Cell, 1988; 55: 361
- 13 Durand B, Saunders M, Leroy P *et al.* Cell, 1992; 71: 73
- 14 Schule R, Evans R M. Trends Genet, 1991; 7: 377

15 Balkan W, Colbert M, Bock C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 3347

16 Pratt M A C, Kralova J, McBurney M W. Mol Cell Biol, 1990; 10: 6445

The Cellular Retinoid Signaling System. Li Zai-quan, Liu Bingwen (*Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract Retinoid signaling system is composed of retinoic acids, retinol binding proteins (RBPs), cellular retinol binding proteins (CRBPs), cellular retinoic acid binding proteins (CRABPs), retinoic acid nuclear receptors and retinoic acid responsible elements. This system has been proved to regulate expression of many functioning genes, such as genes of CRABP-I, c-Fos, growth factor receptor, protein kinase C, etc. Therefore, the retinoid's role in morphogenesis during embryonic development and regulating the growth and differentiation of a wide variety of cell types throughout life of organism are involved in this signaling system.

Key words retinoic acid, retinoic acid nuclear receptor, retinoic acid responsible element

壳多糖酶研究的概况及最新进展

彭仁旺¹⁾ 管考梅 黄秀梨

(北京师范大学生物系, 北京 100875)

摘要 壳多糖酶专一性水解壳多糖中的 β -1,4 糖苷键, 在自然界的碳循环中具有极其重要的意义. 壳多糖酶分布广泛, 功能多样, 在真菌生长发育、植物抗真菌感染等生理过程中壳多糖酶均发挥重要作用. 文章概述了壳多糖酶研究的现状及最新进展. 介绍了壳多糖酶的分布、理化性质、催化性质、在细胞中的定位及其调控; 简介了近年来真菌和植物壳多糖酶研究的动态及最新进展.

关键词 壳多糖酶, 细胞壁代谢, 植物基因工程

¹⁾ 现为中国科学院微生物研究所博士生. 收稿日期: 1995-03-24, 修回日期: 1995-05-15