

核孤儿受体 TR3/ nur77 与一种新细胞凋亡机制*

孟 斌 温博贵**

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

摘要 核孤儿受体 TR3/ nur77 是一种立刻早期基因 (immediate-early gene) 的产物, 与固醇类激素受体结构相似, 是核受体超家族的重要成员之一, 可被多种生长因子或凋亡诱导剂诱导表达, 具有复杂的生物学功能, 涉及细胞增殖、分化发育和凋亡过程。最近对其诱导凋亡机制的研究取得了重大进展, 发现当细胞受到凋亡诱导剂刺激后, TR3 基因表达升高, 其产物从细胞核移位至线粒体膜, 引起细胞色素 c 释放, 从而导致细胞凋亡。即 TR3 的转录激活功能和诱导凋亡功能是由其不同的亚细胞定位结合所决定的, 其诱导凋亡过程与其对基因的反式激活功能无关。核转录因子 p53 也具有类似情况。这种核转录因子由细胞核移位至细胞浆并发挥生物学功能的调控方式是一种新模式, 可能具有重要的生物学意义。

关键词 TR3/ nur77, 核孤儿受体, 立刻早期基因, 线粒体, 凋亡, 移位

学科分类号 Q71

细胞核受体是一个受体超家族 (nuclear receptor superfamily), 包括类固醇激素受体、甲状腺激素受体、维生素 D₃ 受体、维甲酸受体以及近几年发现的数目众多的孤儿受体 (orphan receptor)。所谓孤儿受体是指一类目前还未发现其相应配体的核受体。这些受体的共同特征是都具有在序列上高度保守的、由 2 个锌指结构组成的 DNA 结合区及一个配体结合区, 能和特定 DNA 上的应答元件结合, 调控特定基因的表达, 从而在细胞的生长、分化和凋亡等生物学过程中发挥重要的调节作用^[1~3]。现在发现的孤儿受体已达百种以上, 它们能相互作用或与其他转录因子作用以调控多种基因的表达。其中核孤儿受体 TR3/ nur77 是一种立刻早期基因 (immediate-early gene) 的产物, 可以被血清及各种生长因子如表皮生长因子 (EGF)、神经生长因子 (NGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板生长因子 (PDGF) 或者佛波酯等诱导表达, 具有复杂的生物学功能, 参与细胞的增殖、分化发育和凋亡过程。近几年对 TR3/ nur77 与细胞凋亡的关系研究比较深入, 发现其参与多种细胞的凋亡过程, 如未成熟胸腺细胞以及肿瘤细胞的凋亡等, 对其调控机制的研究也取得了重大进展。

1 TR3/ nur77 的生物学特性

1985 年 Lau 等^[4]用血清及生长因子处理静止期小鼠纤维母细胞, 使其发生 G0/G1 期转换, 发

现在处理后几分钟内即有一批基因转录表达, 认为这些立刻早期基因与生长因子及某些促癌因子引起的细胞增殖有关^[5]。随后他们在由这些立刻早期基因构成的 cDNA 文库中克隆鉴定出 3CH77 基因, 并定名为 nur77^[3]。nur77 编码的蛋白质含有 601 个氨基酸残基, 通过 DNA 和氨基酸序列比较, 发现 nur77 蛋白与类固醇激素、甲状腺激素、维生素 D₃ 和维甲酸受体超家族具有共同的结构特征, 即有一个 DNA 结合区和一个配体结合区。由于没有发现其相应配体, 故认为 nur77 蛋白在生长因子引起的基因响应调节过程中可能是作为一个特异的 DNA 结合蛋白而发挥作用。

1989 年 Chang 等^[6]用针对类固醇激素受体超家族成员共有 DNA 结合序列的寡核苷酸为探针, 在人前列腺细胞的 cDNA 文库中分离到一个新的基因并命名为 TR3。该 cDNA 编码的蛋白质含有 598 个氨基酸残基, 序列分析表明 TR3 蛋白含有与类固醇激素受体超家族成员同源的 DNA 结合区和配体结合区, 其配体结合区氨基酸序列与雌激素受体有 20% 的同源性, 与其他已知类固醇受体有不到 15% 的同源性; 而其 DNA 结合区则有 55% 的氨基酸序列与已知类固醇受体同源。与小鼠的 nur77 相

* 广东省教育厅自然科学研究项目 (9922) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0754-8900473, E-mail: bgwen@stu.edu.cn

收稿日期: 2001-01-05, 接受日期: 2001-02-23

比, 人的 TR3 有 86% 的核苷酸序列和 91% 的氨基酸序列与其同源。

其他一些作者也先后报道了在人及其他动物细胞中发现的 TR3/nur77 的一些同源物, 如 NGFI-B (nerve growth factor-induced clone B) 是在大鼠中发现的 nur77 的同源物^[7], NOR-1 (neuron-derived orphan receptor) 是从人的胎儿脑组织中发现的 TR3/nur77 的同源物^[8], 另外还有 N10、Nurr1 (Nur-related factor 1)、NOT、RNR^[9, 10] 等等, 这些基因在进化上是保守的, 它们组成了 TR3/nur77 受体亚家族, 作为核转录因子, 在细胞的增殖、分化发育和凋亡等生物学过程中发挥着重要的调节作用。

2 TR3/nur77 与凋亡的关系

TR3/nur77 基因开始是作为细胞对生长因子刺激的立刻早期基因而被发现的, 然而后续的研究揭示 TR3/nur77 也参与了许多细胞的凋亡过程。例如在鼠的胸腺细胞发育过程中, 很多实验证实 nur77 (NGFI-B) 蛋白参与了未成熟 T 细胞的阴性选择 (negative selection), 即对自身反应性 T 细胞 (self-reactive T cells) 的克隆删除过程, 以及外周 T 细胞和 T 细胞杂交瘤细胞的凋亡过程^[11~14], 这些凋亡都是由 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR)

介导的。在人的肿瘤细胞系, 如肺癌、前列腺癌和乳腺癌等中, 发现用各种凋亡诱导剂处理后引起的细胞凋亡过程中也有 TR3 的表达和参与^[15~17]。如果用 TR3 的显性负突变 (dominant-negative mutant) 过表达或反义 RNA 技术使 TR3 的活性受到抑制后, 则上述细胞的凋亡也被抑制^[11, 12, 15, 16]。说明 TR3/nur77 在细胞凋亡过程中可能起着关键作用。

3 TR3/nur77 的凋亡调控机制

凋亡是多细胞生物保证个体正常生长发育和细胞新陈代谢、维持机体稳定及体内平衡的重要生物学功能之一, 其功能异常与许多疾病的发生有关, 对此研究尤其在肿瘤发生学和治疗学上具有重要意义。人们对凋亡的多个方面展开了深入细致的研究, 然而近来越来越多的研究发现许多凋亡过程都与线粒体有关, 如图 1 所示^[18], 被不同信号途径激活的各种凋亡终末因子从细胞浆或细胞核移位至线粒体膜, 引起线粒体膜通透性增加并释放一些凋亡前体分子如 caspases 酶前体、细胞色素 c、Smac/Diablo 和一种能激活核酸酶的凋亡诱导因子等, 从而导致细胞凋亡发生, 提示线粒体可能是细胞凋亡的中心环节, 有人甚至称线粒体为“细胞的潘朵拉魔盒”^[18]。

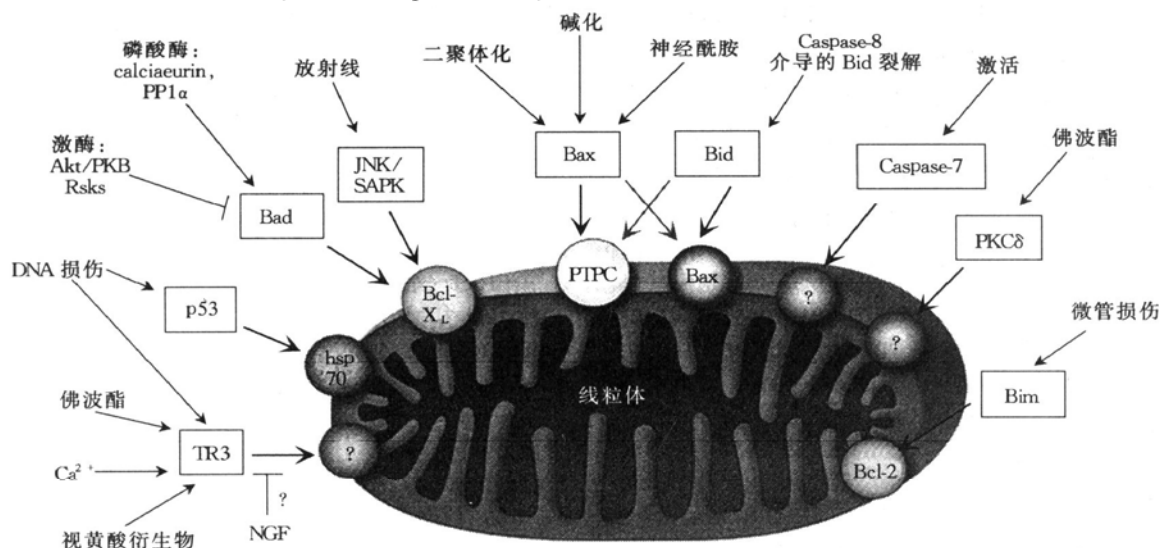


Fig 1 Mitochondrion: the death signal integrators^[18]

图 1 线粒体——凋亡信号的整合者^[18]

各种凋亡途径的终末效应子 (方框内) 被不同途径激活后, 从细胞浆或细胞核移位至线粒体膜, 并与膜上已知或未知受体相互作用, 使线粒体膜通透性升高, 导致 caspases 或核酸酶激活因子从线粒体内外膜间隙中释放出来。

PTPC: permeability transition pore complex..

在孤儿受体 TR3/nur77 参与的凋亡过程中, TR3/nur77 基因可以被多种因子激活. 例如在胸腺未成熟 T 淋巴细胞的阴性选择过程中, TR3/nur77 的表达受 TCR/CD3 的调控^[11~14]; 在肿瘤细胞系中, 许多凋亡诱导剂如 TPA、AHPN (CD437)、钙离子载体 (calcium ionophore) 及 etoposide VP-16 等均可使 TR3/nur77 基因激活^[19]. 作为核转录因子, TR3/nur77 通常是在胞浆翻译合成, 然后进入细胞核, 通过与 DNA 链上的特定序列相互作用, 来调控相关基因的转录. 因此人们自然认为 TR3/nur77 可能也是通过调控凋亡相关基因的表达而诱导细胞凋亡. 然而最近 Zhang 及其同事 (Li 等^[19]) 在对人前列腺癌 (LNCaP) 等细胞系的研究中却发现, TR3 介导的细胞凋亡与其调控基因表达的反式激活功能并不相关: 他们把一个含有 TR3 结合序列 (NurRE) 的报告基因 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 质粒转染进 LNCaP 细胞, 然后用 EGF 进行刺激, 结果发现 TR3 和 CAT 均表达, 但细胞不发生凋亡; 而当用凋亡诱导剂刺激时, TR3 表达, 报告基因 CAT 不表达, 但细胞发生凋亡. 说明 TR3 介导细胞凋亡并不是通过调控相关基因表达这条途径.

这是一个令人感到意外的结果. 经进一步研究发现^[19], 原来在受到凋亡诱导剂刺激后, 核孤儿受体 TR3 发生了移位, 即从细胞核移位至细胞浆并与线粒体膜发生结合, 导致细胞色素 c 释放, 从而启动凋亡过程. 相反, 如果使 TR3 蛋白的 N 端或 C 端发生部分缺失, 使其不能发生移位或与线粒体膜结合, 或者用阻断剂 (leptomycin B) 阻断 TR3 从细胞核移出, 均可使诱导的凋亡现象消失. 而用 EGF 诱导产生的 TR3 则位于细胞核内, 能引起下游基因的转录及细胞增殖, 但不发生细胞凋亡. 说明 TR3 受体的不同功能状态, 即诱导细胞凋亡和调控基因转录, 是由其不同的亚细胞定位决定的: 即在核内 TR3 发挥核转录因子的作用, 对其下游基因进行调控, 与细胞的增殖有关; 而当其移位至细胞浆并与线粒体膜结合后, 则引起细胞凋亡. 另外, 使 TR3 受体 DNA 结合区缺失也并不影响其细胞凋亡功能, 更进一步说明 TR3 的反式激活功能与细胞凋亡无关. 这种由核转录因子从细胞核移位至细胞浆并与线粒体膜相互作用发挥生物学功能的调控方式立即受到了重视^[18], 它可能代表了一种新的调节方式而具有重要的理论意义.

无独有偶, 最近有一篇关于 p53 的报道^[20] 也

发现了类似的情况. 作为熟知的核转录因子, 人们一直认为 p53 是通过调控与凋亡有关的基因而诱导细胞凋亡的, 尽管对其细节并不了解. 然而 Marchenko 等^[20] 在实验中发现 p53 也发生了从细胞核到线粒体的移位, 并与线粒体膜蛋白 hsp70 (一种热休克蛋白) 相互作用, 引起细胞色素 c 释放, 导致细胞凋亡. 虽然没有排除通过调控下游基因表达诱导细胞凋亡这条途径, 但象 TR3 一样, 单独的 p53 蛋白 (野生型) 对线粒体的特异靶向作用也足以引起细胞凋亡. 这个发现更增加了核转录因子移位到线粒体并发挥生物学功能这一新的调节方式的重要性.

4 结束语

核孤儿受体 TR3/nur77 具有双重功能. 当细胞接受生长因子的刺激时, TR3/nur77 早期表达并作为核转录因子调控下游基因的转录, 参与细胞的增殖反应. 而当细胞受到凋亡因子的刺激时, TR3 表达并从细胞核移位至线粒体膜, 引起细胞色素 c 释放及细胞凋亡. 即 TR3/nur77 不同的亚细胞定位使其发挥不同的生物学功能, 其诱导凋亡的功能与其反式激活功能无关^[19]. 核转录因子由细胞核移位至线粒体这一新的调控机制不仅使细胞凋亡机理更加复杂, 同时也提出了更多需要解决的问题. 例如假说中 TR3/nur77 的配体究竟为何物? 它是如何区别不同信号并作出不同反应的? TR3 是如何定位到线粒体以及与线粒体膜上的哪些蛋白质发生作用? TR3/nur77 家族的其他成员是否也有同样的作用? 已发现抑癌蛋白 p53 具有同样的功能^[20], 而另外有些核转录因子如 c-Myc 和 c-Jun 等也同时具有介导细胞增殖和凋亡的双重功能, 那么它们是否也以同样的方式诱导细胞凋亡? 这种作用机制是一个普遍现象还是一种特例? 有何生物学意义? 等等. 对这些问题进行深入研究不仅具有重要的理论意义, 还可能具有潜在的新药发掘价值, 如用于肿瘤的治疗^[19] 等. 相信这将成为又一个新的研究热点.

参 考 文 献

- 1 Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995, **83** (6): 835 ~ 839
- 2 Mangelsdorf D J, Evans R M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 1995, **83** (6): 841~ 850
- 3 Hazel T G, Nathans D, Lau L F. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid

- hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (22): 8444~ 8448
- 4 Lau L F, Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J*, 1985, **4** (12): 3145~ 3151
 - 5 Lau L F, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (5): 1182~ 1186
 - 6 Chang C, Kokontis J, Liao S S, *et al.* Isolation and characterization of human TR3 receptor: a member of steroid receptor superfamily. *J Steroid Biochem*, 1989, **34** (1~ 6): 391 ~ 395
 - 7 Matson M A, Milbrandt J. The NGF1-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol Cell Biol*, 1989, **9** (10): 4213~ 4219
 - 8 Ohkura N, Ito M, Tsukada T, *et al.* Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGF1-B family. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1308** (3): 205~ 214
 - 9 Ryseck R P, Macdonald-Bravo H, Mattei M G, *et al.* Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J*, 1989, **8** (11): 3327~ 3335
 - 10 Mages H W, Rilke O, Bravo R, *et al.* NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol*, 1994, **8** (11): 1583~ 1591
 - 11 Liu Z G, Smith S W, McLaughlin K A, *et al.* Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate early gene nur77. *Nature*, 1994, **367** (6460): 281~ 284
 - 12 Woronicz J D, Calnan B, Ngo V, *et al.* Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature*, 1994, **367** (6460): 277~ 281
 - 13 Youn H D, Sun L, Prywes R, *et al.* Apoptosis of T cells mediated by Ca^{2+} -induced release of the transcription factor MEF2. *Science*, 1999, **286** (5440): 790~ 793
 - 14 Van den Brink M R, Kapeller R, Pratt J C, *et al.* The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (16): 11178~ 11185
 - 15 Li Y, Lin B, Agadir A, *et al.* Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (8): 4719~ 4731
 - 16 Uemura H, Chang C. Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology*, 1998, **139** (5): 2329~ 2334
 - 17 Ohkubo T, Ohkura N, Maruyama K, *et al.* Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, **162** (1~ 2): 151~ 156
 - 18 Brenner C, Kroemer G. Mitochondria: the death signal integrators. *Science*, 2000, **289** (5482): 1150~ 1151
 - 19 Li H, Kolluri S K, Gu J, *et al.* Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, 2000, **289** (5482): 1159~ 1164
 - 20 Marchenko N D, Zaika A, Moll U M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 2000, **275** (21): 16202 ~ 16212

Orphan Receptor TR3/ nur77 and a New Apoptosis Mechanism^{*}

MENG-Bin, WEN Bo-Gui^{**}

(The Department of Biochemistry, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China)

Abstract Orphan receptor TR3/nur77, a member of nuclear receptor superfamily, is a product of immediate-early gene which is expressed rapidly after induced by several proliferation factors such as EGF, FGF, NGF, PDGF or phorbol ester, and different apoptosis inducers. It is similar in structure with the members of steroid/retinoid receptor superfamily that all have a DNA-binding region of two zinc-finger and a ligand-binding region. As a transcription factor its complex functions are involved in proliferation, differentiation and apoptosis of cells. Recently there is an important development about the TR3 receptor in the mechanism of inducing apoptosis. After treated by different apoptosis inducers TR3 expressed increasingly, and it is found surprisingly that TR3 translocates from the nucleus to mitochondria to induce cytochrome c release and apoptosis. That is, mitochondria targeting of TR3 but not its DNA binding and transactivation is essential for its proapoptotic effect. This is a new model may be a very significant pathway in the regulation of cell signal transduction especially in the apoptosis.

Key words TR3/nur77, orphan receptor, immediate-early gene, mitochondria, apoptosis, translocation

^{*} This work was supported by a grant from the Natural Sciences Research Program of Educational Department of Guangdong Province (9922).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-754-8900473, E-mail: bgwen@stu.edu.cn

Received: January 5, 2001 Accepted: February 23, 2001