

甾体激素的作用机制及其受体的结构和功能

徐幼海

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

甾体激素对靶器官细胞内核酸和蛋白质合成的调节作用,早在50年代已经发现^[1]。60年代初,高比度³H-雌激素的应用,进一步推动了甾体激素研究的活跃进行^[2,3]。激素控制基因活性的概念,则是在发现蜕皮素诱导昆虫巨染色体疏松(puff)之后形成^[4]。70年代后期,激素受体的纯化和特征研究、激素调节基因克隆的进展以及激素应答顺序(hormone responsive elements, HRE)的发现,又大大加速了激素受体生物学领域研究的深入发展。

一、甾体激素作用的机理——两个模式

1. 雌激素作用模式 甾体激素作用的机理,最早由Gorski等在1968年提出。如图1所示,雌激素(E)进入靶细胞,与胞质中专一性受体(R)形成复合物(S-R),活化后移位核内,诱导基因表达^[5]。以后发现其他甾体激素也有相似机制,如雄激素^[6](A)、孕激素(P)^[7]和皮质激素(G)^[8]。

甾体激素进入细胞后,能与许多蛋白质结合。其中绝大多数为非专一性的,仅与受体呈专一性结合。每个细胞内约有 1.6×10^4 个受体

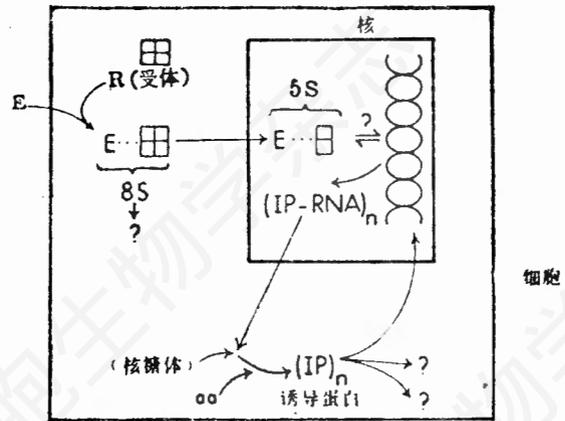


图1 雌激素进入子宫细胞的作用机制

或 10^{-8} mol/L。受体的特征是:(1)与激素呈高亲和性结合, $k_d 2 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9}$ mol/L;(2)这种结合可被结构类似的化合物竞争。用同位素标记的激素作为检测指标,发现在高渗介质(0.4 mol/L KCl)中呈4S的受体,可在低渗介质(0.1 mol/L KCl)中凝聚为8S的二体^[9]。利用这一性质,调节盐浓度可以在制备时去除大量低亲和性血清结合蛋白(4S)。雌激素受体的分子量估计是76 kDa^[10]。

受体与激素结合后,表现出一些新的理化

(上接147页)

- [18] Ouchi Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 157:301.
 [19] Rennick R. E. et al., *Atherosclerosis*, 1988, 71:35.
 [20] Schwartz S. M. et al., *Human. Pathol.*, 1987, 18:240.
 [21] Stemme S. et al., *Transplant. Proc.*, 1989, 21:3697.
 [22] Bonin P. D. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1989, 181:475.
 [23] Miossec P. et al., *J. Immunol.* 1986,

136:2486.

- [24] Taylor R. G. et al., *Am. J. Pathol.* 1986, 125:152.
 [25] Quinn M. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987, 84:2995.
 [26] Walker L. N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, 83:7311.
 [27] Valenty A. J. et al., *J. Cell. Physiol.*, 1988, 136:479.
 [28] Morisaki N. et al., *Atherosclerosis.* 1989, 78:61.

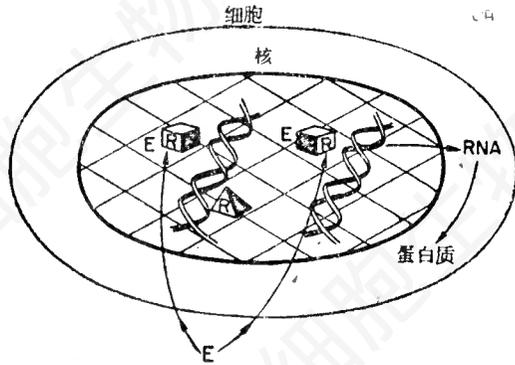


图2 雌激素受体的“新”模式

性质，对热和光耐受并有构型变化^[11]。其沉降系数为5S，相当于130kDa。但在尿素溶液中，5S受体分子又转变为4S(80kDa)受体和一个50kDa的亚单位。该亚单位称X蛋白，也同样存在于非靶组织^[12]。上述资料表明，受体分子在细胞内以多种形式存在，其沉降系数的变化实质上是受体的组成或构型变化的结果。这种变化的分子机制并不清楚，但显然是甾体激素作用所必需的。

2. 雌激素作用模式的进展 1986年Gorski等综合了近10多年来受体研究的进展，提出了一个新的模式。要点是未结合的受体是一种核蛋白，与激素结合后被活化并诱导基因转录，如图2^[13]。

核受体的想法起自DNA聚合酶I的亚细胞分布。该酶通常存在于细胞匀浆后的胞质部分，但在细胞松弛素处理后的去核细胞，却见于核质部分。1984年Welshon用细胞松弛素处理垂体瘤GH-3株细胞，离心分部后测定，未结合受体极大部分见于核质部分^[14]。同年，King和Greene用单抗免疫技术得到同样结果^[15]。

受体存在于核内的一个可能原因是与DNA的静电吸引，为此细胞匀浆时易被稀盐溶液从核质中提取到胞质部分^[16]。另一原因可能是核蛋白之间的盐键，成为维持核内蛋白组份的一种内聚力量。近年应用溶液两相分配法(ATTP)的研究发现，受体蛋白通常以其疏水区以弱键与染色质呈低亲和性结合^[17]。甾体

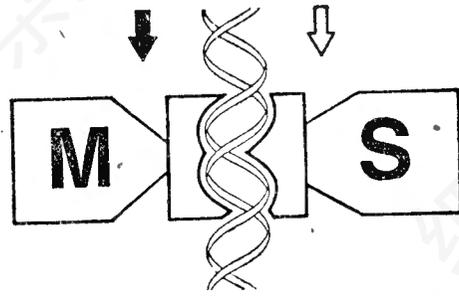


图3 皮质激素受体(PR)的结构功能区模式

激素则改变了受体的构型，拆断这种与染色质的非专一和疏水性作用，使之成为亲水性蛋白并诱导受体与核组份的专一性结合。

二、受体的结构——Domain结构

甾体激素受体的氨基酸顺序大都从其cDNA的核苷酸顺序推衍而来。如GR有780个残基，T₃R是480个残基，PR为1000个残基。根据各段残基的功能，目前一般认为受体有3个主要的结构功能区——Domain ON端是调节区M，C端是激素结合区S，中间是DNA结合区，富集碱性氨基酸和胱氨酸(见图3)^[18]。

1. DNA结合区 是甾体激素受体最令人感兴趣的区域，由66—68个残基组成。其中20个是保守性残基，包括9个CyS(C₁—C₉)和一些碱性、疏水性残基。这一显著的特征也介释了各受体有明显同源性的原因。DNA区有两个指状结构，C I和C II，称锌指不尽相同^[19]。其中锌指C I是由两对CyS组成，C₂—C₃间的指环是13个残基。锌指C II大多数报告是由4个CyS组成，其指环是12个残基。C I与C II之间有一个15—17个残基的连接区(见图4)^[20]。

DNA区在甾体激素作用机制中的重要性可由缺失(deletion)研究证明。用编码人ER和GR的cDNA系列缺失片段，或位点定向突变的cDNA片段，转染细胞后发现，DNA区有缺陷的受体无活化转录和结合DNA的功能。第三个研究方法是嵌合受体模型，即用一种受

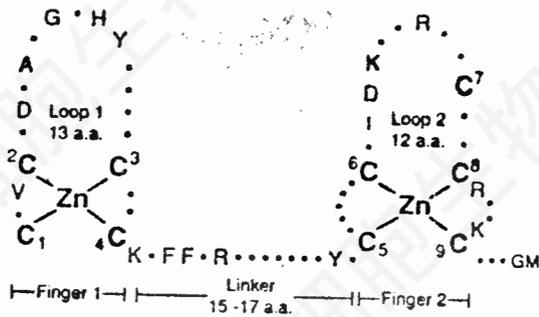


图4 甾体激素受体DNA结合区的锌指结构

体的“指”替代另一种受体上相应的“指”。该实验发现，指C I决定结合DNA的专一性，而指C II提供非专一性接触，并稳定指C I与DNA的结合^[21]。指C II有较多中、高度保守性的碱性氨基酸，可与DNA磷酸骨架键合。另一方面，C II区对受体的二体形成也十分重要。

2. M区 调节受体与DNA的相互作用。缺失该区域的受体分子则以异常高的亲和性与DNA结合，细胞转染实验发现，M区的部分或全部缺失将产生一个缩短的受体分子，不能调节对激素反应的强度。M区的调节是通过对象一性和非专一性DNA顺序的识别而进行的，减少非专一性DNA结合，使受体分子选择正确的HRE^[18]。

3. S区 约25 kDa大小，有大量的疏水性残基。以人和大鼠的GR和PR为例，该区域中Glu⁵⁴⁶、Cys⁵⁴⁴和Tyr⁵⁷⁰等参与分子的折叠，形成疏水袋。值得注意的是，甾体激素与缺失M和/或DNA区的突变受体仍有正确的结合，因此S区的折叠是独立于DNA区的^[22]。

缺失实验还发现，S区的完整性对结合激素是重要的。如大鼠GR的c端去除29个残基后，其对激素的结合减少到正常的1%。此外，S区还参与受体二体的形成，其与激素结合的部分是非保守性氨基酸。

三、受体的功能

1. 受体与HRE顺序的相互作用 依据目

前的观念，专一性基因调节顺序的顺式作用和各类蛋白质之间有复杂的相互作用。这类蛋白质通过这种作用和/或其他蛋白质的相互作用而调节转录——反式作用。目前对于甾体激素受体日益增加的兴趣是由于受体为一组基因调节蛋白质，其生物学活性十分专一，由激素激活，并与DNA中增强子样结构——HRE有重要的功能作用。

顺式作用因子(cis-acting factor)通常在靶基因组上游，经专一性调节蛋白质活化或抑制转录。顺式因子有多种类型，增强子(enhancer)为其中之一，其对转录的激活作用，与自身核苷酸顺序的方向以及与转录起点的距离无关。其相应的反应因子，可以是组织专一性的和/或发育调节的，也可以是输入的细胞外信号。甾体激素靶细胞内的受体，由于激素的作用而增加对HRE的亲和性，调节了基因的转录，因而成为研究增强子调节转录的极好模式。

HRE有3类，ERE的保守顺序是GGTC-AnnnTGACC，GRE是GAACAnnnTGTTTC，而TRE则是GGTCATGAACC^[23]。这种15个bp的回文结构有一个3个bp的中隔和两个6bp的臂。两侧的3个bp是倒转互补的——回文，如TGT/ACA^[24]。这提示每侧可识别一个二元对称的受体。DNA结合实验发现，在激素存在时两个受体分子形成二体，并与HRE接触后形成完全稳定的二体，激素并不诱导受体的DNA区结构改变。Chambon等依据上述实验提示了受体与DNA顺序结合的模式，如图(5)所示^[25]。图中A/B是受体中靶基因专一性的区域，可能与结合到靶基因调控区的其他因子协同作用。c是DNA区，E是激素结合区。HSP是热休克蛋白，通常阻止受体与DNA结合或形成二体。受体经与激素结合而活化，HSP随之介离，从而诱导基因的活化。

靶基因HRE与受体的功能关系，目前常用受体突变株专一性变换的方法来研究。(1)位点定向突变，替换单个氨基酸来探查其相应

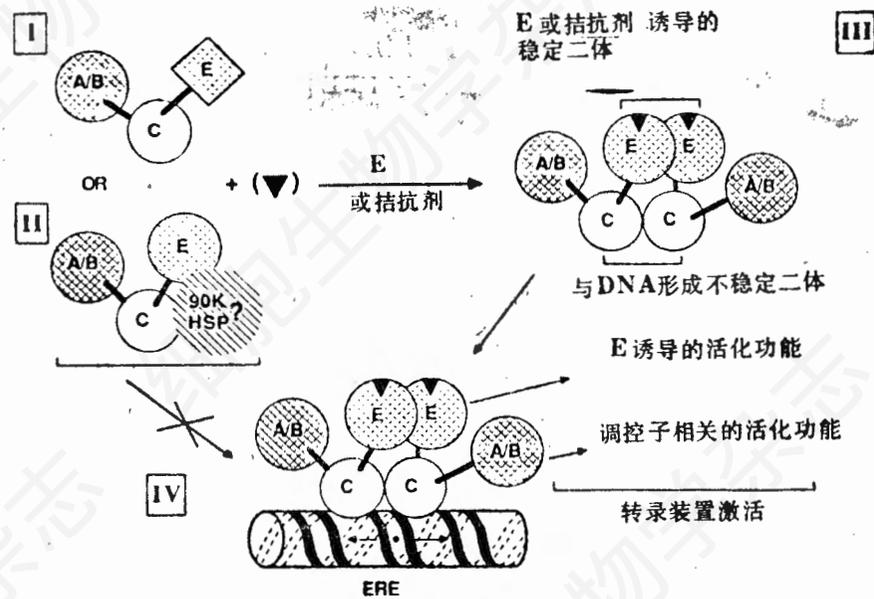


图5 受体与DNA顺序结合的模式

的功能关系。如DNA区的C₁-C₂为功能所必需，而C₃则并非必需。(2)杂合受体，即受体A的DNA区与受体B的S区组成的受体。(3)指替换(finger swap)，替换指CI或CII以研究其与目标基因专一性的关系。至1989年，这种专一性替换实验已延伸到氨基酸顺序的更改，主要是在Denielsen^[26]、Marder^[27]和Evans^[28]等3家实验室。他们发现GR指CI中Gly-Ser为功能所必需，更改为Glu-Gly后，则转而活化ERE。若更改为Glu-Ser，则对GRE和ERE均有活化作用。

受体结构与功能关系尚体现在指CII上，其C₃后面的10个残基能形成很强的两性电荷螺旋，有利于识别DNA双螺旋结构，与TFAII蛋白的螺旋结构有相同意义。指CII的疏水侧与受体DNA区的其他结构相斥而被包裹起来，指亲水表面接触溶液并与DNA结合，从而稳定形成的二体结构。

因此，受体的专一性变换突变株提供了有关蛋白质-DNA相互作用的模式，为蛋白质残基顺序变动引起的位点专一性的改变，提供了可能的解释。

甾体激素除了诱导靶基因的表达以外，尚

有负调节作用。目前有3个系统研究皮质激素的负调节作用：鸦片黑色素皮质肽原(proopiomelanocortin)基因、催乳素(prolactin)基因和糖蛋白激素的 α 亚单位基因^[29]。研究发现，负调节时的GR识别顺序——negative GRE(nGRE)与正调节时的GRE有明显的不同。而如果改变nGRE其中两个位点，则可转变为positive GRE(pGRE)。然而，DNA顺序并非决定正、负调节的唯一决定因素。除了受体以外，尚需要其他非专一性蛋白对nGRE的协同调节。最近Yamamoto实验室在小鼠的增殖素(proliferin)基因发现一个25bp的上游区片段，接连调控子，参与正或负调节机制。调节作用需要激素反应的选择子，c-Jun和c-Fos。在c-Jun存在时G诱导该基因表达，c-Jun消失时诱导作用停止；在c-Jun和c-fos共同存在，尤其c-fos水平转高时，则G抑制基因的表达^[29]。

2. 甾体激素受体与染色质组份的关系

甾体激素受体与染色质组份的关系早在70年代初就开始有报告。由于染色质组份的复杂性，尤其是随着对染色质非组蛋白研究进展的缓慢，所以研究激素调节基因表达的重心，逐渐

转移到受体与 HRE 的作用机制。值得一提的是,该领域的研究对于从 in ViVo 水平上理解甾体激素调控基因表达的机制,提供重要的资料。尤其是对染色质蛋白的分部及其与受体-激素复合体的相互作用与基因表达的关系,仍然是一个重要的研究方面。

mainwaring 最先报告 $^3\text{H-A}$ 与染色质内位点有亲和性结合,约占核内总量的 70%^[30] 1985 年 Bruchovsky 实验室用甲醛将核内结合的 S-R 复合物与染色质或 DNA 交联,测得染色质上的 S-R 占 75%,而与 DNA 直接结合的仅占 18%^[31]。上述结果提示,染色质组份参与甾体激素对靶组织的作用机制。以后又有证据表明, S-R 复合物与染色质组份的这种作用具有组织专一性和激素专一性^[32]。对于染色质组份的进一步分部,发现染色质中非组蛋白主要参与 S-R 结合^[33]。由于非组蛋白种类繁多,目前尚未能分离出单一的蛋白质来。在这些研究的基础上,提示了甾体激素接受蛋白(acceptor)的设想,以后逐渐演变为一个综合性概念,包括核内的染色质蛋白和 DNA 组份。随着受体与 HRE 作用机制研究的深入,逐渐较少被采用。近年来 Spelsberg 对鸡输卵管 PR 和兔子宫 ER 的研究发现, S-R 复合物的专一性位点是由蛋白质与 DNA 结合而组成的^[34]。蛋白质的介聚可以引起 S-R 专一性结合的丢失,并且染色质蛋白的抗体阻止受体在核内的结合。这些专一性染色质接受了受体携带信息的大部分,显然对于甾体激素的调控机制将发挥不可忽视的作用^[35]。

甾体激素调节基因表达的作用与染色质构型的变化有关。Weintraub 实验发现,激素处理后靶基因的调节区邻近出现 DNase I 超敏感区域,提示 S-R 复合物通过改变染色质的构型而影响基因的转录^[36]。另外,靶细胞核染色质经 MNase 处理后分部的核小体,具有 S-R 的结合位点和靶基因的 DNA 顺序^[37]。这一结果支持上述结果,并且进而提示 S-R 复合物、染色质蛋白和靶基因三元因素在基因表达中的

综合作用。而这种活性染色质的核小体 DNA 顺序不仅具有 DNase I 超敏感性,并且还包含了 HRE 区域,核小体构型变动的信息有可能被编码在 HRE 区域内(-200 至 -60)^[38]。研究靶基因 DNA 顺序与转录因子(NF-1)的关系发现, DNA 对 NF-1 的亲和性比对 S-R 复合物更大。然而 DNA 顺序与 NF-1 的结合需要激素的处理,这表明有某种因子阻止了两者的结合,这种因子可能就是核小体的构型。S-R 与 HRE 结合后的活化作用所以能完成是因为解除并重排了核小体的构型。这类调节作用在酵母中已有叙述^[20]。

综上所述,甾体激素通过其专一性受体的中解,调节靶基因的表达,是一个多元体系的综合作用,包括 S-R 复合物与靶基因中顺式作用因子(如 HRE)、染色质组份和多种转录因子的协调作用。而目前的研究进展,也已逐渐从受体-HRE 及受体-染色质蛋白质的单一作用,过渡到多种因子的复合效应;也从各种因子的试管内反应,逐渐过渡到观察转染细胞的基因表达。

摘 要

本文介绍了甾体激素作用机制的研究进展,以及受体参与作用的模式。甾体激素受体的核内定位,是一个重要的突破。对于受体 Domain 结构的研究及其与靶基因 HRE 相互作用,则是近年来更深入的发展。另一方面,细胞内专一性染色质组份接受了受体携带的大部分激素信息,也成为研究甾体激素调控机制的一个不可忽视的方面。

参 考 文 献

- [1] Szego, C. M. and Roberts, S., 1953, *Recent Progr. Hormone Res.*, 8: 419-470.
- [2] Glasscock, R. F. and Hoekstra, W. G., 1959, *Biochem. J.*, 72: 673-682.
- [3] Jensen, E. V. and Jacobson, H. I. 1962, *Recent Progr. Hormone Res.*, 18: 387-414.
- [4] Karlson, P., 1963, *Perspec. Biol. Med.*,

- 6: 203—213.
- [5] Gorski, J. Toft, D. et al., 1968, *Recent Progr. Hormone Res.*, 24: 45—80.
- [6] Unhjem, C. Tveter, K. J. and Arkvaag, A., 1969, *Acta Endocrinol.*, 62: 153—164.
- [7] Weist, M. G. and Rao, B. R., 1971, *Adv. Biosci.*, 7: 251—266.
- [8] Wira, C. and Munck, A., 1970, *J. Biol. Chem.*, 245: 3436—3438.
- [9] Jensen, E. F. Suzuki, T. Numata, N., 1969, *Steroids*, 13: 417—427.
- [10] Notides, A. C. and Nielsen, S., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249: 1866—1873.
- [11] Milgrom, E. Atger, M. and Baulieu, E. E., 1973, *Biochem. Biophys. Acta*, 320: 267—283.
- [12] Yamamoto, K. R., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249: 7068—7975.
- [13] Gorski, J. Weishons, W. V. et al., 1986, *Recent Progr. Hormone Res.*, 42: 297—329.
- [14] Welshons, W. V. Lieberman, M. E. and Gorski, J., 1984, *Nature* (London), 307: 745—747.
- [15] King, W. J. and Greene, G. L., 1984, *Nature* (London), 307: 745—746.
- [16] Skafai, D. F. and Notides, A. C., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 12208—12213.
- [17] Hensen, J. C. and Gorski, J., 1985, *Biochem.*, 24: 6078—6085.
- [18] Gehring, U., 1987, *TIBS*, 12: 399—402.
- [19] Danielsen, M. Hinck, L. and Ringold, M., 1989, *Cell*, 57: 1131—1138.
- [20] Beato, M., 1989, *Cell*, 56: 335—344.
- [21] Green, S. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 3037—3044.
- [22] Kumar, V. Green, S. Staub, A. et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 2231—2236.
- [23] Glass, O. K. Holloway, J. M. Devary, O. V. et al., 1988, *Cell*, 54: 313—323.
- [24] Ahe, B. V. H. Irinch, S. Scheidereit, C. et al., 1985, *Nature*. (London), 313: 706—709.
- [25] Green, S. and Chambon, P., 1988, *TIG*, 4: 309—314.
- [26] Green, S. and Chambon, P., 1987, *Nature* (London), 325: 75—78.
- [27] Green, S. Kumar, V. Thenlaz, I. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 3037—30442.
- [28] Umesono, K. and Evans, R. M. 1989, *Cell*, 57: 1139—1146.
- [29] Diamond, M. I. Miner, J. N. Yoshinaga, S. K. et al., 1990, *Science*, 249: 1255—1272.
- [30] Mainwaring, W. I. P., 1969, *J. Endocrinol.*, 44: 323—333.
- [31] Foekens, J. A. Reinnie, P. S. Cheng, H. et al., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 1003—1009.
- [32] Mainwaring, W. I. P. and Peterkkan, B. M., 1971, *Biochem. J.*, 125: 285—295.
- [33] Wang, T. Y. Luo, R. S. and Xu, Y. H. 1984, *Biochem.*, 23: 5326—5329.
- [34] Spelsberg, T. C. Ruh, T. Ruh, M. et al., 1988, *J. Steroid Biochem.* 31: 579—592.
- [35] 徐幼海, 1987, *细胞生物学杂志*, 9: 6—10.
- [36] Burch, J. B. E. and Weintraub, H., 1983, *Cell*, 33: 65—76.
- [37] Xu, Y. H. Luo, R. S. and Wang, T. Y., 1987, *J. Steroid Biochem.*, 26: 647—652.
- [38] Richard-Foy, H. and Hager, G. L., 1987, *EMBO J.*, 6: 2321—2328.

新 书 介 绍

陈瑞铭教授主编的《动物组织培养技术及其应用》一书已由科学出版社出版。

本书介绍作者多年积累的工作经验和成果并介绍国内外实验室动物组织培养技术的精华。全书共31章,除系统描述了动物组织培养的基本设备、所使用的各种培养液和细胞株的建立等技术外,还对单克隆抗体、基因转染、器官培养及组织培养技术在生物学、医学上的应用作了详细介绍,是一本实用的实验室工具书。

本书可供从事细胞生物学、动物学、遗传学、病毒学、免疫学、肿瘤学和基础医学研究的科研人员,实验室技术人员和大专院校师生参考。