

甾体激素作用于靶细胞的分子机制

卢 廷 龄

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

有关甾体激素作用于靶细胞分子机制的研究,近十几年来,由于方法技术的提高和建立,有了很大的发展。Jensen等(1962)用高比度的 ^3H -雌二醇,对其在子宫、阴道等靶器官中的积聚、滞留进行了比较,证实激素能专一性地与其靶细胞结合,这在研究激素对细胞的作用方面作出了主要贡献。嗣后,有了关于雌激素受体的发现。Jensen等(1967)见到,大鼠、小牛子宫细胞质内有一种与雌激素亲和性很强的蛋白,这种蛋白称为雌激素受体。迄今,有关甾体激素受体的研究说明,它是靶细胞细胞质的组成部分。受体对细胞外界某一特定激素(化学信号)有专一性的识别和结合能力。由于激素与受体的相互作用而引起细胞内部一系列反应,最终导致靶细胞产生生理效应。激素受体的发现,对激素调节细胞的生化过程、生长分化以及功能表达等诸方面的研究有很大的推动。关于这些方面的工作,近年国外书刊有大量综合性报道。本文仅就甾体激素作用于靶细胞的一般规律作一简要的阐述。

甾体激素包括雄性激素、雌性激素(雌激素和孕激素)以及肾上腺皮质所分泌的激素(皮质甾类)。近年来,关于甾体激素对细胞功能的调控,尤其有关基因功能的表达及蛋白质合成方面进展很大,其作用机制也比较清楚。很多工作是利用大鼠子宫、鸡输卵管为材料研究雌激素与孕酮的作用机制, O'Malley及Means(1974), O'Malley及Schrader(1976), Schrader及O'Malley(1978)曾作过相当全面的报道。

一、甾体激素受体的性质

甾体激素受体是存在于细胞质内,它能与进入细胞的相应的激素专一性结合,形成激

素-受体复合物,复合物能转移到细胞核内,以致引起核内的变化。然而,近年来也有报道,大鼠子宫内膜细胞与肝细胞表面也有雌激素受体(Richard及Clara,1977),看来这是一相当复杂的问题,有待更多的工作来证明。

1. 雌激素受体 甾体激素受体的概念来自于Jensen及Jacobson 1962年的工作。他们用生理剂量的 ^3H -雌二醇处理未成熟大鼠,子宫内滞留 ^3H -雌二醇的量远超过血流中的量。子宫组织匀浆经105,000g离心后的上清液或称细胞溶质(Cytosol),含有一种可溶性的、与 ^3H -雌二醇结合的蛋白质,即雌激素受体。雌激素受体对热不稳定,透析不掉,可被硫酸铵沉淀。如子宫匀浆与蛋白水解酶温育,即失去与雌激素结合的能力,但核糖核酸酶及脱氧核糖核酸酶无此作用。这一结果提示,受体是蛋白质性质。激素-受体复合物的沉降行为与介质的离子浓度有关,在蔗糖溶液中作梯度离心,其沉降系数为8S,如介质中加进0.3或0.4 M KCl以提高离子浓度则为4S,当介质的离子浓度在生理范围,6S占主要成份。Notides(1977)认为,4S部分为单体,当受到雌二醇与温度的影响,可变为二聚体,即8S部分。Toft与Gorski(1967)报道,大鼠子宫的200,000分子量的蛋白质分子与 ^3H -雌二醇有强亲和性,而且与雌二醇结构类似的甾体及一些非甾体的类似物也有亲和性。近几年来,相当数量的工作证明,4S部分的分子量为60,000—80,000。

2. 孕酮受体 鸡输卵管是孕酮的专一性靶组织。鸡如先用雌激素处理,再注射 ^3H -孕酮,标记的孕酮出现在输卵管细胞质和细胞核内。激素-受体复合物在含有0.3M KCl的蔗

糖溶液中梯度离心, 其沉降系数是 3.8S, 也有报道为 4S; 当离子浓度降低, 则为 6S 和 8S。孕酮受体分子呈长椭圆形, 长度约为宽度的 14—18 倍。受体由 A、B 两个亚基组成。Schrader 和 O'Malley (1978) 认为, 4S 部分为受体解离后的亚基所构成; 而 6S 与 8S 部分则皆为 A、B 亚基的聚合体或称二聚体。受体的每一亚基代表一条肽链, 亚基的分子量各为 110,000 与 117,000 (Schrader 及 O'Malley, 1972; Kuhn 等, 1975), 而且每一亚基可与一分子孕酮结合。在豚鼠、兔子、大鼠、小鼠及人的子宫和阴道组织中也找到了孕酮受体。应当指出, 孕酮受体有依赖于雌激素存在的特性, 譬如, 预先用雌激素作为引物处理动物, 孕酮受体量可增加 10 倍; 再如, Leavitt 等 (1974) 发现, 田鼠在乏情期其孕酮受体量开始增高, 动情前期时达到最高点, 而且血清中雌激素浓度的变化与孕酮受体量的变化也相互吻合。切除卵巢的动物, 孕酮受体量逐渐降低, 如给予外源雌激素, 孕酮受体量又逐渐恢复。这些事实都说明, 孕酮受体量的变化是受雌激素的调控的。

二、激素—受体复合物向细胞核移位

Jensen 等 (1968)、Gorski 等 (1968) 发现, 甾体激素不仅在细胞质内滞留, 而且也积聚在细胞核内。根据前人的工作, 可概括如下:

1. 甾体激素与受体形成的复合物, 通过温育, 有进入细胞核的活力。Jensen (1968) 认为, 在 37℃ 约 80—90% 雌激素—受体复合物可与核结合。举例来说, 将大鼠子宫的细胞溶质、 ^3H -17 β 雌二醇和分离的细胞核共同温育, 自细胞核可提取到更多的雌激素—受体复合物, 其沉降系数为 5S。如将细胞核单独与 ^3H -17 β 雌二醇温育, 不加进细胞溶质, 自细胞核内提取不到 5S 复合物。

2. 用标记的雌二醇处理靶组织后, 核内 5S 部分逐渐增高, 细胞质内 8S 部分相应降低。

根据这些实验结果, Jensen (1968) 提出了“两步”论假说, 即激素进入细胞质首先与受体结合, 并引起受体构形发生改变, 以致能

进入细胞核。

O'Malley (1974) 用孕酮刺激鸡, 见到孕酮—受体复合物只与输卵管的细胞核结合, 一些非靶的器官如, 肺、脾、心脏、肠子的细胞核就无此现象。根据用雌激素和孕酮所得到的类似结果, 于是产生了核受体假说。按照这一假说, 靶细胞核有与受体专一性结合的部位, 称接受部位。实验证明, 核的接受部位是染色质。

三、激素—受体复合物与染色质的 DNA 及非组蛋白的相互作用

染色质的哪种成份与激素—受体复合物有结合的功能呢? Yamamoto 及 Alberts (1975) 认为接受部位是位于 DNA 上。有些实验也有类似结果, 例如, 与雌二醇结合的子宫细胞核, 被 DNA 酶处理后, 雌二醇被解离下来, 这说明激素—受体复合物与染色质结合是与 DNA 有密切关系; 体外系统实验也有同样结果。但 DNA 与雌激素受体的结合无专一性, 因为大鼠子宫雌激素受体能与小牛胸腺 DNA 结合, 与鲑鱼精子 DNA、大肠杆菌 DNA 等都有结合的活力。然而, ^3H -雌二醇与子宫的染色质经温育后有明显的结合活力, 如果在温育之前先将子宫染色质的组蛋白解离, 其结合活性并不受影响。因而, O'Malley 等 (1972, 1974) 认为, 接受部位与非组蛋白有关, 因此利用重组染色质进行实验。他们将鸡输卵管细胞染色质的组蛋白解离掉, 将其他组织或其他物种组织的组蛋白与去掉组蛋白的染色质重组, 制备杂交染色质。杂交染色质与孕酮—受体复合物结合活力与输卵管的完整染色质类似。另外, 大鼠输卵管去组蛋白染色质与小牛胸腺组蛋白杂交后, 仍不失去与激素—受体结合的能力。鉴于这些实验结果, 一般认为组蛋白本身对染色质与激素—受体的结合不起什么作用。

为了弄清染色质的哪种组分与激素—受体结合的问题, 研究者们用氘标记的孕酮与鸡输卵管受体形成的复合物对以非组蛋白重组的染色质进行了不少实验。鸡红血球的染色质与 ^3H -孕酮—受体复合物无结合活力, 但如把输

卵管的非组蛋白插入红血球的 DNA, 这一杂交染色质与 ^3H -孕酮-受体复合物就显示结合活力, 同激素-受体复合物与输卵管完整的染色质结合的情况类似; 反之, 红血球的非组蛋白与输卵管的 DNA 重组后, 即失去结合活力, 其情况与红血球完整染色质所显示者相同。这些实验说明, 靶组织染色质与激素-受体复合物的专一性结合是通过非组蛋白实现的。

鸡输卵管孕酮受体, 不论是完整的二聚体形式或单独的 A、B 亚基都可通过多种离子交换树脂或亲和层析技术达到分离和提纯。实验证明, A 亚基对 DNA 有强结合活力, 而 B 亚基则对非组蛋白的 AP_5 成份显示强亲和性。另外, B 亚基与 AP_5 有相同的组织专一性。由于对孕酮受体的性质已有相当的了解, Schrader 及 O'Malley 认为, 在机体内染色质的非组蛋白和 DNA 与受体的结合方式, 对受体行使其功能来说, 是很重要的。他们设想, B 亚基的功能是在邻近激素调控的基因区域起专一性的定位作用。因此, B 亚基可作为一指定器(specifier)专一性地将 A 亚基或称效应器(effector)导向一定部位, 从而 A 亚基与邻近的 DNA 顺序结合。

四、激素对基因转录的作用

激素-受体与染色质结合后所引起的一系列变化是甾体激素作用于细胞的根本问题。前人的工作已证实, 雌激素处理未成熟的鸡, 其染色质与 RNA 聚合酶的结合活力增高。一般来说, RNA 聚合酶与 DNA 顺序结合的数量可以反映染色质模板活力, 但这是一相当复杂的反应, 进行体内实验, 对激素诱导的基因转录机制很难较彻底地阐明, 因而必须发展体外转录的定量系统。于是人们采取了用于微生物上的方法, 测定 RNA 链在染色质上的起始位点。

RNA 合成的起始可分两个基本的步骤。首先, RNA 聚合酶随机地、非专一性地与 DNA 结合。在足够时间之后, 并在适当的温度, RNA 聚合酶在起始位点与 DNA 形成稳定的结合, 随后 DNA 双链局部解螺旋, 这样, 可以使 RNA 链迅速合成; 第二个步骤是真正

的起始转录, 即 RNA 聚合酶促使两个三磷酸核苷之间形成第一个磷酸二酯键。每个基因只有一个起始位点。因此, 通过起始位点数目的测定就可了解被激活的基因数目。当然, 在高等有机体内是否存在起始位点, 迄今尚未证明, 但一些基因表达的现象是支持有关起始位点的假说的。因而, O'Malley 及 Schrader (1976), Schrader 及 O'Malley (1978) 藉助对起始位点数目的测定作为激素处理后基因表达数目的指标。他们利用的体外系统是使每一起始位点产生一分子 mRNA, 然后停止转录, 以此来计算输卵管染色质的起始位点。这一系统是基于抗菌素利福平能使 RNA 聚合酶分子失活的特性, 因此, 它是 RNA 合成的抑制物。但 RNA 聚合酶如已占据起始位点, 利福平便无抑制作用。与 DNA 结合了的 RNA 聚合酶能迅速地合成 mRNA, 即使有利福平存在的情况下也能进行。因此, 输卵管的染色质模板与 RNA 聚合酶经一定时间温育形成稳定的结合后, 同时加入利福平和三磷酸核苷, 可进行测定。未与 DNA 结合的或与 DNA 随机结合的 RNA 聚合酶分子则被利福平抑制。因此, 每一个在稳定起始位点的 RNA 聚合酶分子只能合成一条 RNA 链。通过对 RNA 链数目的测定, 对 RNA 聚合酶与一已知模板结合的位点数目便可间接地了解, 这一方法称为利福平攻击鉴定(Rifampicin-Challenge Assay)。

他们利用上述系统已进行了很多工作, 这里只列举一、两个实验。先用雌激素处理未成熟的鸡, 令其输卵管出现分化和合成卵白蛋白的功能, 当停止注射 12 天后, 再注射孕酮, 则后者有模拟雌激素功能的作用。如果不先经雌激素处理, 单独注射孕酮, 输卵管的变化很不明显。因此, 作者从接受两种激素处理的鸡输卵管提取染色质作为模板, 进行利福平攻击鉴定以测定起始位点的数目。注射孕酮之前为 8600 起始位点/pg·DNA。注射孕酮后, 位点数目迅速上升。注射后仅半小时, 位点数目为 15,900, 几乎增高一倍; 一小时后, 位点数目达到最高水

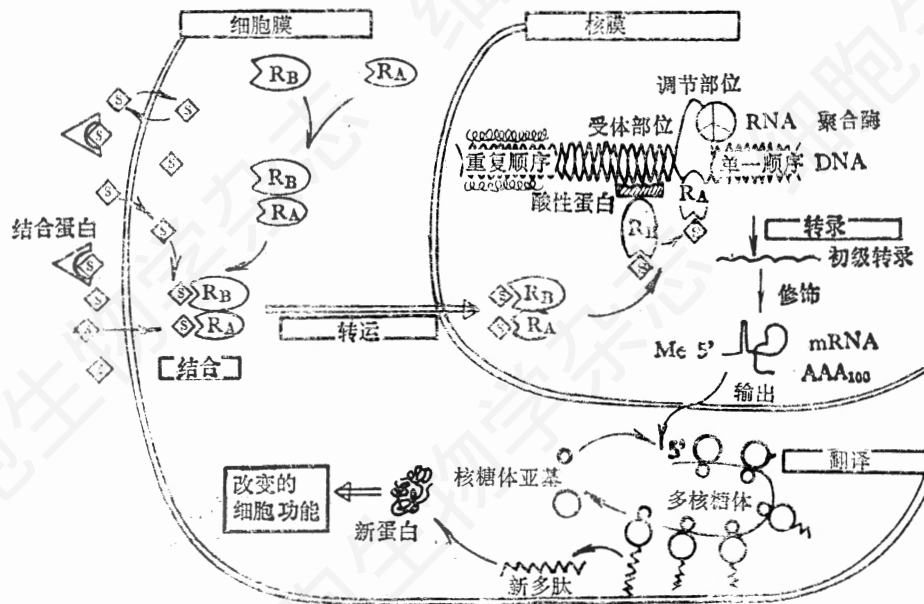
平, 为 23,000。这一实验说明, 由于孕酮的诱导, 鸡输卵管染色质转录的增高主要是由于起始位点的调变所致。第二个实验是, 将纯化的孕酮—受体复合物与仅注射过雌素的鸡输卵管染色质温育, 使受体预先与染色质结合, 再加入饱和量的 RNA 聚合酶, 最后加入利福平与核苷酸。结果显示, 起始位点的增加取决于受体的剂量的增大。作者通过一系列的实验得出两点结论: 1. 孕酮—受体复合物是激活输卵管基因转录的重要因素, 没有与激素结合的受体不产生效应。2. 起始位点的数目与同染色质相结合的激素—受体复合物的数目基本相等, 亦即每一接受位点需要一个激素—受体复合物。

为了进一步确定被激活而开始转录的基因正是编码最终产物的基因, 作者从雌素处理的鸡输卵管提取纯化卵白蛋白 mRNA 作为模板, 利用核酸分子杂交技术, 制备与 mRNA 链互补的单链 DNA (^3H -cDNA), 再以 ^3H -cDNA 作为分子探针检测转录过程中所合成的 mRNA。

实验结果说明, 孕酮能诱导卵白蛋白 mRNA 的产生, 而且孕酮处理后, 卵白蛋白 mRNA 分子数目急剧增高; 另外, 诱导卵白蛋白 mRNA 产生所需的时间过程与产生全部起始位点所需的时间过程极为相似。作者认为, 这一系统可用作研究孕酮调控基因表达的模式系统。

Schrader 及 O'Malley (1978) 把甾体激素对基因表达所产生的作用以模式图加以概括。

1. 细胞质内的变化 甾体激素以孕酮为例, 可能通过简单的扩散作用进入细胞并与细胞质中的受体二聚体结合。在生理条件下, 细胞内的受体可能是 6S 部分; 另外可能还有一低分子量的偶联因子与受体两个亚基的相互作用有关。受体的每一亚基与一分子孕酮结合, 激素与受体结合可能引起一些尚不了解的构形变化。至少, 激素使受体出现三种变化: a. 与 B 亚基结合的激素能引起染色质接受部位的表达, b. 受体与染色质结合, c. 使原来结合稳定的 A、B 亚基趋向于不稳定, 二者易于分开。



2. 核内的变化 受体通过核膜的机制目前仍不清楚, 可能系 ATP 供给能量或通过酶的作用进入细胞核。受体与具有专一性的接受部位相互作用。接受部位是由 DNA 与专一性

的非组蛋白共同构成。受体的结合部位邻近于被激活的基因, A、B 亚基在邻近基因的调节部位解离, 释放出 A 亚基, 从而与 DNA 相互作用。A 亚基可能起正调节作用, 它与 DNA

的特定顺序结合,使DNA原先的稳定状态解除,以致与RNA聚合酶结合,开始转录。转录开始后,受体可能与激素解离,并出现无能状态。mRNA经过加帽(Cap),被转运到多聚核糖核蛋白体进行翻译。

雌激素对靶细胞核功能的影响,简单地归纳如下:经雌激素处理的鸡输卵管细胞核合成RNA的速度和总量都有所增高,对染色质的模板活力有活化作用,此外,也进一步证实了雌激素能增加起始位点的数目。另外一些作者以未成熟大鼠子宫为材料,也见到雌激素能增高RNA聚合酶I与RNA聚合酶II的活力,并且用DNA—RNA杂交技术也证实了雌激素能迅速地诱导产生不同种类的RNA分子。

近几年来,对雄性激素和肾上腺皮质激素作用于靶细胞的机制也有一些工作。已经证实靶细胞的细胞质中有相应的激素受体,激素与受体结合后也进入细胞核。然而,有关对基因功能表达的调控方面,雄性激素的研究成果还不很肯定,Jänne等(1976)报道,雄性激素能调控小鼠肾细胞的基因转录,但在其他的靶细胞系统,如离体培养的人纤维母细胞,未见雄性激素处理后对RNA合成有什么影响。关于皮质激素,多以大鼠肝细胞和肝癌细胞的色氨酸加氧酶和酪氨酸转氨酶mRNA的合成作为指标进行研究,实验结果说明,皮质激素也类似雌性激素,对基因转录有激发作用。

结 束 语

从分子水平研究甾体激素的作用近十几年来虽有很大进展,但尚有许多问题有待进一步探讨和阐明。例如,在生理条件下激素受体的真正构形是如何的?激素与受体结合产生的相互作用是什么?又如,激素—受体复合物向核内移位的机制是什么?激素—受体复合物对RNA合成起始位点虽有直接作用,但调节机制本身仍不清楚等等,这些都是今后需要进行研究的问题。目前,由于掌握了激素受体分离提纯、微量分析等方面的方法技术,相信,有

关激素作用分子机制的研究将会逐渐深入,而且关于激素作用机制的了解,对于细胞分化的研究也一定会起推动作用。

参 考 文 献

- [1] Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D., Notides, A. 1968, *Recent Progr. Horm. Res.*, 24, 45-80.
- [2] Jänne, O., Bullock, L. P., Bardin, C. W., and Jacob, S. T. 1976, *Biochim. Biophys. Acta.*, 418, 330-343.
- [3] Jensen, E. V., and Jacobson, H. I. 1962, *Recent Progr. Horm. Res.*, 18, 387-414.
- [4] Jensen, E. V., Hurst, D. J., DeSombre, E. R., and Jungblut, P. W. 1967, *Science*, 158, 385-387.
- [5] Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Slumpf, W. E., Jungblut, P. W. and DeSombre, E. R. 1968, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 59, 632-638.
- [6] Kuhn, R. W., Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. 1975, *J. Biol. Chem.*, 250, 4220-4228.
- [7] Leavitt, W. W., Toft, D., Strott, C. A., and O'Malley, B. W. 1974, *Endocrin.*, 94, 1041-1053.
- [8] Notides, A. R. 1978, *Receptors and Hormone Action*, Vol. II Chapt. 2., Edited by O'Malley, B. W., Birnbaumer, L.
- [9] O'Malley, B. W., Spelsberg, T. C., Schrader, W. T., Crytil, F., and Steggle, A. W. 1972, *Nature*, 235, 141-144.
- [10] O'Malley, B. W., and Means, A. R. 1974, *Science*, 183, 610-620.
- [11] O'Malley, B. W., and Schrader, W. T. 1976, *Scientific American*, 234, 32-43.
- [12] Richard, J. P. and Clara, M. S. 1977, *Nature*, 265, 69-72.
- [13] Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. 1972, *J. Biol. Chem.*, 247, 51-59.
- [14] Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. 1978, *Receptors and Hormone Action*, vol. II, Chapt. 8, Edited by O'Malley, B. W. Birnbaumer, L.
- [15] Toft, D., and Gorski, J. 1967, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 57, 1740-1743.
- [16] Yamamoto, K. R., and Alberts, B. 1975, *Cell*, 4, 301-310.