雄激素与大鼠前列腺细胞基因的表达

徐幼海

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近十多年来,对于性激素诱导的特异蛋白质的体内合成作了大量研究,以了解甾类激素作用的机制。一般认为甾类激素对蛋白质合成的调节是由于它对专一性 mRNA 浓度的早期刺激。当前,对于雄激素在前列腺前叶细胞中作用的研究也取得了相当的进展,尤其是关于睾酮在体内的活化代谢^[1]、雄激素-受体复合物的形成^[2]以及该复合物与前列腺细胞核的结合^[3]等方面。然而,尚需要详细的分子生物学研究证实雄激素诱导的专一性 RNA 分子的存在。

大鼠前列腺是雄激素的主要靶器官之一,但曾经因无法测定雄激素诱导的标志蛋白质,而妨碍应用它作为研究雄激素作用的模型。为此, Bishop 等建议分析 Poly (A) RNA 与其 cDNA 的杂交动力学,来代替直接寻找标志蛋白质,以得到有关哺乳类细胞中不同 RNA 顺序数的信息^[4],从而为激素对于前列腺细胞基因表达的作用提供直接证据。本文拟就当前关于前列腺细胞在雄激素刺激下的表达,作一个综述。

一、大鼠前列腺主要蛋白质产物及其与激素的关系

大鼠前列腺在睾酮刺激下产生几种主要蛋白质。比较正常和无激素下 mRNA 的翻译,经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,可检测出与激素有关而产生出的蛋白质有近十种,分子量在 9,000—37,000 道尔顿^[5]。目前对 9,000、10,000、12,000 及 20,000 多肽已有较多研究^[6-8],最近又证实 9,300 和 13,500 多肽的产生也与雄激素密切相关^[9]。

早在 1974 年,就已发现雄激素增加去睾丸大鼠前列腺细胞聚核糖体 mRNA 含量,大小为 6-15 S。这提示 mRNA 合成的激素刺激是范围广泛的,导致一个不均一 mRNA 群体的产生。应用 cDNA 杂交动力学研究该种诱导转录的 RNA 顺序复杂性,测得大鼠前列腺前叶细胞中约有 8,000 种左右的 RNA 顺序存在。其总量的 35% 是高浓度类,约 1—2 种 RNA 顺序; 29% 由 24 种 RNA 顺序组成;其余为稀少顺序类。但在激素撤除 3 天后,高浓度类 RNA 减少 10 倍;撤除至 7 天时,则减少 100 倍^[10]。资料表明,前列腺内一些基因的转录明显地依赖激素状态,而睾酮的主要效应似在调节 RNA 顺序的相对浓度。

激素刺激后 RNA 顺序组成和浓度改变的原因是染色质转录的模板活性改变。雄激素处理大鼠后 2—4 小时,前列腺染色质转录活性和常染色质含量即有增加^[11]。因此,可以认为雄激素的早期作用表现在染色质上 RNA 起始位点增加,原始转录产物增多。同时,用分离前列腺细胞核的实验发现,经睾酮处理后 2 小时,由 RNA 聚合酶 II 催化的 RNA 合成明显增加,主要是 20—40 S 的 HnRNA,提示 RNA 聚合酶活性增强。

近年来,借助于 cDNA 分子克隆技术已对前列腺的几种主要专一 RNA 顺序、翻译产物的性质及其与雄激素的关系,作了一些研究。介绍如下:

1. PBP 在大鼠前列腺液中有一种主要的分泌蛋白质,与雄激素有较高结合力,称为前列腺的甾类激素结合蛋白质(PBP)^[10],约占前列腺前叶合成蛋白质总量的 41%。PBP 是一

种四聚体,由三个不同的亚单位组成: C_1 (Mr 10,000)、 C_2 (Mr 11,000)和 C_3 (Mr 9,000),并以二硫键联接成 C_3-C_1 和 C_3-C_2 两亚部。Parker等用PAT 153 HB/101系统^[12],得到并鉴定了编码10,000和9,000多肽的两个cDNA克隆。该两多肽分别是 C_1 和 C_3 亚单位,其mRNA对雄激素的撤除和再补充作出反应,显然处于雄激素的控制下。Mpanias等用PBR₃₂₂/×1776系统建成cDNA库^[7],分离出编码10,000、12,000和9,000多肽的三个cDNA克隆。此外,三种多肽mRNA翻译产物与其抗血清的免疫反应也证实,与cDNA克隆相应的三种多肽,分别为前列腺细胞内PBP的三个亚单位之一,其中分子量为12,000的多肽相当于PBP的 C_2 亚单位。上述实验找出了细胞中PBP各亚单位相应的cDNA克隆,为研究雄激素对大鼠前列腺细胞中PBP-mRNA表达的调节作用,提供了更直接的手段。

PBP-mRNA在蔗糖梯度离心中呈现单个沉降峰,大小为9S,相当于600NT。正常大鼠PBP-mRNA顺序代表前列腺总Poly(A)⁺RNA的10%左右,撤除激素3天后降至约0.17%,几乎是两个数量级的差别,显示了对激素的明显依赖性。此外,核内 C_3 PBP-RNA顺序的消失,要比 C_2 和 C_1 PBP-RNA顺序为快,正好与胞质中三种PBP-RNA顺序的消失类型相反^[7]。这说明,雄激素对PBP基因的调节作用是一个复杂的过程,可能涉及到一些另外的控制步骤。

PBP主要是作为前列腺的分泌蛋白,不过也许还有另外作用。Liao等报告,PBP可逆地抑制激素受体复合物在核内的停留,因而促进受体自核释出^[13]。抑制活性主要来自 C_1 ,而PBP与甾类激素结合的活性则与 C_2 有关。PBP的该抑制活性可能是维持正常激素反应的调节机制。

最近,PBP三个亚单位的基因已从大鼠DNA库中分离出来,三者有相似的外显子/内含子排列,并有显著的DNA顺序同源性,提

示它们可能来自基因复制。该三个基因的DNA序列及其酶谱也已清楚,从而为深入研究基因表达与激素的关系,开阔了一个新的阶段。

2. 20 K 蛋白质 稍后,Parker和Wang分别从各自的cDNA克隆系统中,分离并鉴定了编码另一主要蛋白质,即称为20 K蛋白质(Mr. 20,000)的cDNA顺序。此多肽分子加上10%的-CHO基团,就成为22 K的糖蛋白。资料表明,22 K可能是一个二聚体的亚单位。20 K蛋白质占胞质总量的9%,其产生由睾酮在mRNA水平调节。20 K cDNA与前列腺总Poly(A)RNA的杂交表明,20 K-mRNA于激素撤除后迅速下降约30—100倍;再给予激素,1小时内即增加3倍。

3. 其它蛋白质 1983年又有报告从大鼠前列腺细胞cDNA库中,鉴定了两个编码中等浓度mRNA的cDNA克隆,其相应多肽的分子量是9,300和13,500。实验证明这两种mRNA是激素依赖性的,撤除激素后约降至正常的40%。对这方面研究的一个趋势是,逐一弄清楚与激素有关的几种基因及其表达产物。

二、激素对转录后产物的影响

真核细胞内新生HnRNA的Poly(A)化过程构成转录后事件,由核内Poly(A)聚合酶催化。甾类激素与该酶活性的关系,已有一些初步的探讨。Jacob等曾观察到,Poly(A)聚合酶活性的增加,很明显地是与甾类激素刺激的转录同时出现^[15]。Crava报告在兔子子宫,Poly(A)聚合酶于雌激素诱导的最初2小时被激活。相似的结果也可在雄激素处理的大鼠前列腺观察到,核内游离和结合型Poly(A)聚合酶活性约增加2倍。结合型酶涉及HnRNA最初的Poly(A)化,而游离型酶则与Poly(A)片断的随后延长有关。至于激素增加Poly(A)聚合酶活性的机理,目前尚无直接的证据。

一些证据提示,甾类激素对新生HnRNA转运到核外可能有调节作用。睾酮处理去睾丸大鼠后两小时,大约至少有69,000种信息在核

内转录, 而仅 5,000 多种信息出现于聚核糖体。与对照组相比, HnRNA 复杂性增加 49%, 而聚核糖体 RNA 则增加 32%, 两者之比率要比对照组高 12%。资料表明, 雄激素尚可能在转录后水平影响 mRNA, 但目前尚无直接及专一性证据。

三、雄激素-受体复合物 与染色质的相互作用

经典的模式认为, 雄激素和其它甾类激素一样, 经胞质受体而作用于靶器官。与雄激素结合的受体移位至核, 结合到染色质上, 导致雄激素专一性基因的表达。在这里, 受体起着激素与核内转录部位之间中介分子的作用。受体移位至核内前, 发生一种依赖温度的活化过程(“转化”), 表现为沉降系数从 8 S 降至 4.5 S。Liao 等设想, 受体经耗能过程活化而结合甾类激素配位体^[17]。在前列腺, 睾酮由 5 α -还原酶转化成活化型 5 α -双氢睾酮(DHT), 后者为核选择性滞留。可能的原因是, 睾酮-受体复合物的解离速率比 DHT-受体复合物的高。

雄激素-受体复合物在细胞核的结合位点主要在染色质, 约占 70%, 其余在核基质部分。滞留在核内的雄激素在 16 小时内维持较高水平, 这可能是激素诱发生物学反应所必需的。例如, 雄激素对小鼠肾脏鸟氨酸去羧酶的专一性刺激, 取决于受体复合物在核内滞留时间的长短, 而非移入核内的受体复合物含量。

染色质上受体复合物的结合位点, 显然是与转录活跃区域有关, 可由 M 核酸酶轻度水解后分部出来。资料表明, 该分部出来的转录活跃组分与染色质的其余部分相比, 具有 80% 以上的 RNA 聚合酶 II 活性和 5 倍高的内源性 RNA, 表现了明显的激素相关性。

此外, 已经观察到前列腺染色质结构变化与激素有关: 放线菌素 D 与染色质的结合增多; 圆二色性光谱在 220 nm 波长处幅度明显改变; 常染色质含量增加; 非组蛋白蛋白质(NHP)结

合的 DNA 融解增加且结合的聚赖氨酸也增加。此两种作用具有靶作用专一性。这种结构变化的意义在于与专一性基因顺序的转录有关。以 PBP-cDNA 为探针, 发现正常前列腺核中 M 核酸酶敏感的 DNA 含有的 PBP 顺序大约富集了 6 倍; 而在去睾丸大鼠前列腺核, 则无此种变化^[18]。资料表明, 正常与去激素的前列腺染色质, 具有不同的结构, 提示活化的构型允许选择性基因顺序被转录。

近年来, 对于激素受体在细胞核结合的性质已有一些质疑。Horowitz 与 Moore 基于对蛙卵母细胞内惰性大分子运动的研究, 提出了胞质排除机制模式(cytoplasmic exclusion model)。认为对大分子可利用的胞质中的水相, 受到胞质胶样性状的限制。因此, 胞质内含物的行为犹如分子筛一般, 排出一定大小的大分子。Gorski 和 Gannon 的进一步设想是^[19], 受体与甾类激素配位体(如雌激素)相互作用之前, 结合在胞质中而不能通过核孔, 而配位体的存在使受体释出, 可通过核孔并与核内的分布达到动态平衡。然而, 困难是不易用实验手段佐证。1984 年 King 和 Greene 用五种抗雌激素亲和蛋白(estrophilin)的单克隆抗体, 测定各种雌激素敏感组织中的受体水平, 冰冻切片上显示特异性染色仅限于细胞核, 而不论有无雌激素的存在^[20]。同年, Welshons 等用细胞松弛素 B 诱导去核, 重新研究了未被结合的雌激素受体亚细胞分布^[21]。在大鼠垂体瘤细胞(GH₃), 作者发现胞质结合雌激素很少, 而大多未结合的雌激素受体与核组分结合。作者的设想是, 胞质受体是一种制备提取过程中产生的假象物质, 完整细胞中并无作为激素反应的受体核移位, 而仅仅是受体对核组分亲和力的增加。

四、靶组织染色质组分的研究

甾类激素发挥其作用的一个关键步骤是在靶细胞核内被选择性滞留而促发相应基因的转录。多数作者倾向于认为, 核内滞留的激素

是在染色质专一性结合位点(acceptor)上。在这方面已陆续有一些报道:Tymoczko和Liao首先在大鼠前列腺细胞核的低盐提取物中,发现一种酸性蛋白质组分具有 acceptor 特性^[22];其后 Hiremath等从大鼠前列腺染色质的0.35 mol/L NaCl可溶性部分纯化并证实了这种 acceptor 组分(Mr 14,000)^[23];1976年 Mainwaring等从大鼠前列腺细胞核的2 mol/L NaCl提取物中,分离到Mr 70,000的一种碱性 acceptor 蛋白质^[24];此外,Wang发现2 mol/L NaCl不溶性染色质蛋白质中,也存在着具有明显 acceptor 功能的蛋白质组分^[23]。

为研究染色质上有 acceptor 活性物质的分布,通常用低盐(0.3—0.4 mol/L NaCl)和高盐(1—3 mol/L NaCl)溶液将染色质分部成三个组分:低盐可溶性部分(14%)、高盐可溶性部分(85.5%)及不溶性染色质沉淀(0.5%)。

易于经0.3—0.4 mol/L NaCl从染色质上释放的NHP(非组蛋白类蛋白质)为疏松结合的NHP,包含几种重要的蛋白质:刺激转录启动的调节因子、核RNA聚合酶、蛋白激酶及高移动性蛋白质组分(HMG)^[25]。该部分的 acceptor 位点占总数的14%。染色质重组实验表明,0.35 mol/L NaCl可溶性NHP与雄激素诱导的染色质结构变化有关,其RNA聚合酶II反应中的模板活性,与聚赖氨酸滴定曲线一致。这说明前列腺染色质的活化结构是由雄激素专一性的NHP所决定,且含有活跃转录的DNA顺序。

另一种染色质组分是高盐不溶性蛋白质,各实验室有不同的制备,包括(1)核内核糖核蛋白(nuclear RNP),33 S大小,由5 S RNA和非均一酸性及磷酸化的蛋白质组成^[26]; (2)核基质(nuclear matrix),形态上由外周层、沉淀的核仁和核糖核蛋白的纤维颗粒网架组成^[27]; (3)染色质NP组分(Chromatin NP fraction),是染色质在连续的高盐分部中,经2.5 mol/L NaCl/urea(pH 8)释放的NHP组分,系去除90%以上NHP和组蛋白后剩下的

NHP^[28]; (4)沉淀染色质(residual chromatin),2 mol/L NaCl提取的不溶性染色质部分,主要含NHP,紧密结合在约5—8%的DNA上^[29]。上述四种染色质组分的共同特点是具有高亲和力的雄激素结合位点,且均为紧密结合的染色体或核NHP。M核酸酶对于这部分 acceptor 上结合的^[3H]DHT水平无影响,而DNase I却导致^[3H]DHT从 acceptor 缓慢而持续的丢失,表明高盐不溶性蛋白质 acceptor 可能与核小体的核心有关。染色质重组实验显示,不溶性蛋白质为染色质专一性地与雄激素——受体结合及转录所需要。此外,尚发现在有蛋白质紧密结合的DNA中,浓集了活跃转录及细胞专一性的基因顺序^[29],提示耐高盐的NHP较易与活性基因顺序相互作用,功能如转录的调节因子,该染色质组分与受体复合物的相互作用是DNA依赖性的,但DNA参与此过程的方式及原因并不清楚。可能的解释是,蛋白质组分与DNA的结合提供了与受体复合物相互作用需要的构象;或者是两者均为与受体复合物作用的结合位点所需要^[28]。

可以设想,雄激素对前列腺细胞基因表达的调节作用与其它甾类激素一样,经受体分子中介、识别并与核染色质的专一性组分相互作用,改变染色质构型,成为一种活化状态,从而与RNA聚合酶及其调节因子相匹配,最终引起激素专一性的基因转录。然而,确切的机制仍不清楚,雄激素调节前列腺细胞基因表达过程中的各个环节,尤其是核内事件的分子机制,仍为当今各家研究的集中点。

摘 要

本文讨论了雄激素与大鼠前列腺细胞基因表达的关系。利用cDNA克隆和杂交等技术,已发现前列腺中有近十种依赖雄激素的蛋白质,本文较详细讨论了雄激素对甾体激素结合蛋白(PBP)及20 K蛋白质基因表达的影响。激素受体复合物在核内主要结合在染色质上,这种结合导致染色质结构活化和专一性的基因表

达。雄激素还可通过引起 Poly(A) 聚合酶活性增加等变化影响转录后加工。最后讨论了靶组织染色质结构特点及染色质上受体复合物结合位点的分布。

参 考 文 献

- [1] Mainwaring, W. I. P. 1977, In *The Mechanism of Action of Androgen*. pp 43—47, Spinger-Verlag, New York.
- [2] Anderson, K. M. & Liao, S. 1968, *Nature* (Lond.), 219: 277—279.
- [3] Fang, S. & Liao, S. 1971, *J. Biol. Chem.*, 246: 16—24.
- [4] Bishop, J. O. et al., 1974, *Nature*(Lond.), 250: 199—204.
- [5] Hiremath, S. T. et al., 1981, *Exp. Cell Res.* 134: 193—200.
- [6] Peeters, B. et al., 1982, *Eru. J. Biochem.* 123: 55—62.
- [7] Mpanias, O. D. et al., 1983, *Mol. cell Biochem.* 56: 145—154.
- [8] Chamberlin, L. L. et al., 1983, *Biochem.* 22: 3072—3077.
- [9] Xu, Y. H. et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 624—629.
- [10] Parker, M. G. & Mainwaring, W. I. P., 1978, *J. Steroid Biochem.* 9: 455—460.
- [11] Loor, R. M. et al., 1977, *Biochem. Biophys. Acta.* 477: 312—321.
- [12] Parker, M. G. et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 6996—7001.
- [13] Chen, C. et al. 1979, *J. Steroid Biochem.* 11: 401—405.
- [14] Parker, M. G. et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 12—15.
- [15] Jacob, S. T. et al., 1976, *Biochem. J.* 153: 733—735.
- [16] Hiremath, S. T. & Wang, T. Y. 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1200—1205.
- [17] Liao, S. et al., 1981, Cellular dynamics of androgen receptor and protein induction in the Ventral prostate. in *The Prostate Cell Structure and Function Part A*, pp 381—389.
- [18] Hiremath, S. T. & Wang, T. Y. 1982, *Cell Bio. Interl. Rep.* 6: 279—285.
- [19] Gorski, J. & Cannon, F., 1976, *Annual Review of Physiology* 38: 425—450.
- [20] King, W. J. & Greene, G. L., 1984, *Nature*(Lond.) 307: 745—747.
- [21] Welshon, W. V. et al. 1984, *Nature* (Lond.) 307: 747—749.
- [22] Tymoczko, J. L. & Liao, S. 1971, *Biochem. Biophys. Acta.* 252: 607—611.
- [23] Hiremath, S. T. et al. 1981, *Biochem. Biophys. Acta.* 653: 130—138.
- [24] Mainwaring, W. I. P. et al., 1976, *Biochem. J.* 156: 129—141.
- [25] Gazit, B. et al., 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 1787—1790.
- [26] Liao, S. et al., 1973, *Nature N. B.* 241: 211—213.
- [27] Barrack, E. R. & Coffey, D. B. 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 7265—7275.
- [28] Klyzsejko-Stefanowicz, L. et al. 1976, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 1954—1958.
- [29] Nyberg, L. M. & Wang, T. Y. 1976, *J. Steroid Biochem.* 7: 276—273.

扫描电镜的细胞表面分子标记术*

洪 龙 生

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

细胞表面分子的一个重要特点是与特异的配体结合,并能将信息传至细胞内使之产生生物效应。要了解细胞表面分子的上述特点常需测定它们的分布和数量。早先,人们^[1]曾用荧光标记的配体在光镜下观察细胞表面分子,以

后为弥补光镜分辨率的不足而用免疫酶标^[2],或铁蛋白标记^[3],使它能在透射电镜(TEM)下观察,但 TEM 的每一个超薄切片中所得的表

* 承蒙顾国彦教授的直接指导和周郑老师的不断鼓励、帮助,特此致谢。