

高即可激活卵子。由此可见,受精诱导的  $Ca^{2+}$  波动对充分激活卵子,保证激活后胚胎早期发育有重要意义。有众多类型的细胞在生理过程中出现胞质  $Ca^{2+}$  波动的现象表明:胞质游离  $Ca^{2+}$  波动可能是细胞内信号传导和功能调节的一种普遍方式。

### 参 考 文 献

- [1] Jaffe, L. F. 1983, *Dev. Biol.*, **99**: 265-276.
- [2] Kline, D., Kline, J. T. 1992, *Dev. Biol.*, **149**: 80-89.
- [3] 邓满齐、辛俭、黄秀英、孙方臻, 1997, 科学通报, **42**(3): 317-320.
- [4] Miyazaki, S. 1993, *Japanese J. Physiol.*, **43**: 409-434.
- [5] Berridge, M. J. 1988, *FASEB J*, **2**: 3074-3082.
- [6] Miyazaki, S. 1988, *J. Cell Biol.*, **106**: 345-353.
- [7] Moore, G. D. et al., 1993, *Dev. Biol.*, **159**: 669-678.
- [8] Kline, D. et al., 1988, *Science*, **241**: 464-467.
- [9] Williams, C. J. et al., 1992, *Dev. Biol.*, **151**: 288-296.
- [10] Fujiwara, T. et al., 1993, *Dev. Biol.*, **156**: 69-79.
- [11] Kline, J. T., Kline, D. 1994, *Biol. Reprod.*, **50**: 193-203.
- [12] Miyazaki, S. et al., 1992, *Science*, **257**: 251-255.
- [13] Xu, Z. et al., 1994, *Development*, **120**: 1851-1859.
- [14] Crossley, I. et al., 1991, *Cell Regulation*, **2**: 121-133.
- [15] Rakow, T. L., Shen, S. S. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 9285-9286.
- [16] Deng, M. Q. et al., 1997, *Biol. Reprod.*, (in press).
- [17] Deng, M. Q. et al., 1996, *Acta Pharmacologica Sinica*, **17**(4): 357-360.
- [18] Dale, B. et al., 1985, *Experientia*, **41**: 1068-1070.
- [19] Swann, K. 1990, *Development*, **110**: 1295-1302.
- [20] Stice, S. T., Robl, J. M. 1990, *Molecular Reproduction and Development*, **25**: 272-280.
- [21] Swann, K., Whitaker, M. J. 1990, *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. **42**: 141-153.
- [22] Whitaker, M., Swann, K. 1993, *Development*, **117**: 1-12.
- [23] Parrington, J. et al., 1996, *Nature*, **379**: 364-368.
- [24] Foltz, K. R., Lennarz, W. J. 1992, *J. Cell Biology*, **116**: 647-658.
- [25] Blobel, C. P., et al., *Nature*, **356**: 248-252.
- [26] Kuretake, S. et al., 1996, *Biol. Reprod.*, **55**: 789-795.
- [27] Sttler, C., et al. 1997, *Development*, **124**: 2267-2274.
- [28] Igusa, Y., Miyazaki, S. 1983, *J. Physiol.*, **340**: 611-632.
- [29] Miyazaki, S. 1990, *J. Reprod. Fert.*, Suppl. **42**: 163-175.
- [30] Randrlamampita, C., Tsien, R. Y. 1993, *Nature*, **364**: 809-814.
- [31] Steinhardt, R. A., et al., 1974, *Nature*, **252**: 272-280.
- [32] Whitaker, M., Patel, R. 1990, *Development*, **108**: 525-542.
- [33] Whikater, M., Swann, K. 1993, In: *Advances in Developmental Biochemistry*, JAI Press, pp201-221.
- [34] Kaufman, M. H. 1983, In: *Early Mammalian Development, Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press.
- [35] Ozil, J. P. 1990, *Development*, **109**: 117-127.
- [36] Vitullo, A. D., Ozil, J. P. 1992, *Dev. Biol.*, **151**: 128-136.
- [37] Collas, P. et al., 1995, *Molecular Reproduction and Development*, **40**(2): 235-258.

## 视黄素受体结构及其一些生物学特性

吴 乔 苏文金

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

近年来,视黄素(retinoid)对癌细胞生长的抑制作用,以及临床上治疗癌症的效果引起人们的极大关注。视黄素的作用主要由其受体:视

黄酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和视黄素 X 受体(retinoid X receptor, RXR)介导<sup>[1]</sup>, 这些受体作为配体激活的转录因子,通过结合

到靶基因的特定应答序列上,来调节基因的转录和表达。因此,深入了解视黄素受体的性质和作用,有助于阐明视黄素的抗癌机理。本文结合我们近来的工作结果<sup>[2-4]</sup>,就视黄素受体结构及其一些生物学特性作一个综述。

## 一、视黄素受体结构

视黄素受体是一类细胞核受体,属于转录因子中最大家族——类固醇和甲状腺激素受体超家族成员<sup>[1,5]</sup>。视黄素受体由 5 个亚区组成(图 1),其中,高度保守的 DNA 结合区域(C 区:DNA binding domain)中有两个富含半胱氨酸的锌指(图 2),在第一个锌指结构上,受体识别特异性 DNA 序列就是直接经过 P-box 上

的三个氨基酸进行的,另外,DR-box 能够与第二锌指结构上的 D-box 相互作用,允许非对称性复合体形成异源二聚体。第二个锌指直接用于不同的 DNA 结合,允许受体形成对称性或不对称性的二聚体,其上 D-box 中的六个氨基酸对于 DNA 的相互作用十分重要。在低度保守的配体结合区域(E 区:ligand binding domain)中,含有大量的疏水氨基酸,是一个复杂的多功能区,它与配体连接、二聚体形成、转录激活和抑制等功能有关。此外,还有两个激活功能区:AF-1 和 AF-2(图 1),AF-1 位于 N 端,不需要配体的激活,自身具有微弱的激活特性,AF-2 位于 LBD 区,需要配体的激活,这两个功能区都与反向激活功能有关,同时 AF-2 也是异源二聚体形成所必需的。

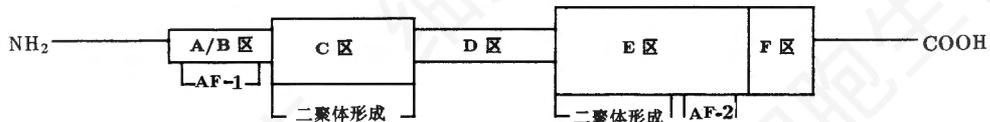


图 1 视黄素受体的结构

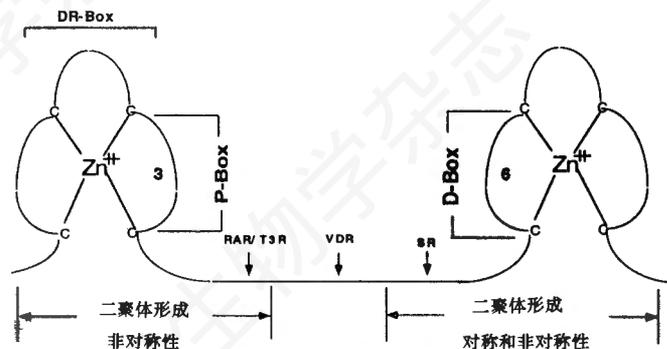


图 2 锌指结构

RAR 和 RXR 由三种不同基因  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  编码,形成了 RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$  和 RXR $\gamma$  等不同亚型的受体,通过分析 5' 端上游区域的氨基酸顺序和一些功能性的转录起始点,又发现了各种不同受体的亚类(isoform),其中有三种 RAR $\alpha$ ,四种 RAR $\beta$  和七种 RAR $\gamma$

亚类<sup>[6]</sup>,这些亚类通过组织特异性而被调节。大多数亚型的受体及其亚类具有不同的功能,例如,RAR $\gamma$  亚型是一种很强的 CRABP II (cellular retinoic acid binding protein II) 的激活因子,RAR $\beta_2$  亚类能够抑制正常细胞转化为致癌性细胞,具有 p53 基因的某些功能。可见,不同

的受体亚型,不同的亚类和受体上不同的亚区行使各自不同的功能,由此构成受体结构的复杂性和受体功能的多样性。

## 二、视黄素受体介导的应答途径

早期认为,与甲状腺激素受体一样,RAR能够形成同源二聚体(RAR/RAR),并结合到视黄素应答元件上,调节基因的转录与表达,后来发现,RAR需要辅助性蛋白的协助才能发挥作用。1992年终于发现,RXR就是这种辅助性蛋白<sup>[7]</sup>。RXR通过与RAR形成异源二聚体(RAR/RXR),增加RAR与视黄素应答元件的亲和力,由此加强RAR的转录活性和对配体的敏感性。不仅如此,RXR在其配体(如9-cis

retinoic acid)的存在下,还可以通过形成同源二聚体(RXR/RXR)来识别视黄素应答元件,由此介导不同的视黄素应答途径,因此,RXR既作为异源二聚体又作为同源二聚体发挥作用。此外,作为辅助性蛋白,RXR还能与维生素D受体(VDR)、过氧化物增长因子激活受体(PPAR)、甲状腺激素受体(TR),癌基因蛋白(如v-erbA)以及其他许多未知特性的“孤儿受体”(orphan receptor,详述见第三部分),如COUP-TF和Nur77等形成异源二聚体,由此介导视黄素和其他激素信号之间的相互作用。可见,RXR在介导不同激素的多向性效应和激素信号的趋同性效应中起着关键的作用(图2)。

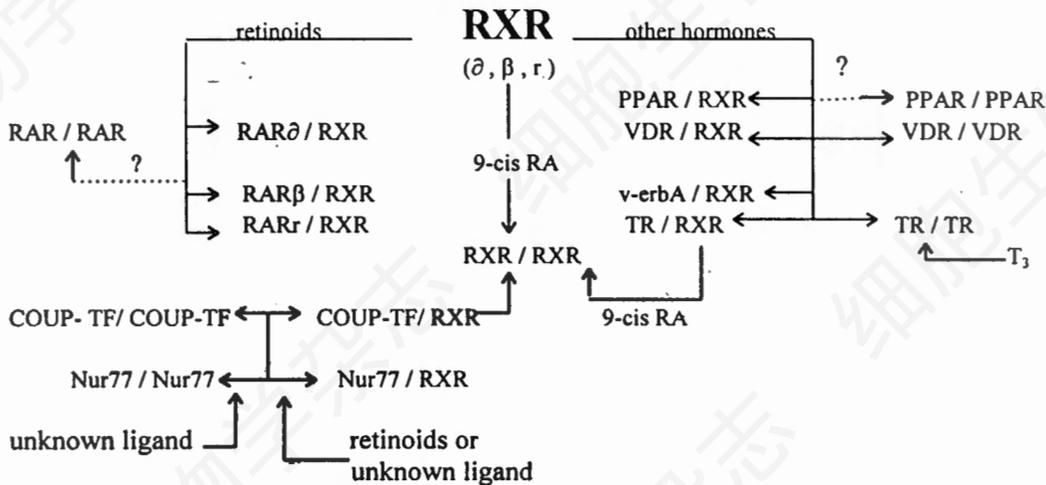


图3 RXR与其他受体之间的相互作用 (引自文献[1],作者补充部分内容)

全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和顺式视黄酸(如9-cisRA)是不同的受体选择性视黄酸(receptor-selective retinoic acid),ATRA能够结合到RAR/RXR异源二聚体上,选择性地激活RAR;9-cisRA能够结合到RXR/RXR同源二聚体或RAR/RXR异源二聚体上,选择性地激活RXR。激活的RAR或RXR与视黄素应答元件相互作用,调控靶基因的表达,某些靶基因就是RAR亚型,如

RARβ。在许多不同类型的细胞中,经视黄酸的诱导,RARβ转录水平显著提高,从而在扩增视黄酸信号应答上起着关键作用。例如,激素依赖性(hormone-dependent)乳腺癌细胞不表达RARβ,经ATRA诱导后RARβ表达,由此介导ATRA对癌细胞的生长抑制。但ATRA不能诱导激素非依赖性(hormone-independent)乳腺癌细胞表达RARβ,所以不能抑制癌细胞的生长<sup>[3,4]</sup>。进一步研究表明,癌细胞中RARα

的相对水平与介导细胞生长抑制和诱导 RAR $\beta$  表达有关,在激素依赖性乳腺癌细胞中,高水平的 RAR $\alpha$  表达有利于 RAR/RXR 形成异源二聚体,视黄素由此通过 RAR 信号传导途径作用癌细胞,而在激素非依赖性乳腺癌细胞中,低水平的 RAR $\alpha$  不能与 RXR 形成异源二聚体,因此 RXR 与 nur77 形成异源二聚体,视黄素由此通过 RXR 信号传导途径作用癌细胞<sup>[3,4]</sup>。可见,不同的受体具有不同的功能,视黄素作用的过程是不同基因对不同受体应答的复杂过程。

### 三、视黄素受体与孤生受体的相互作用

COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) 是一种孤生受体 (orphan receptor), 其特异性配体至今未知,也属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员,在胚胎发育过程中,对器官形成、神经发生和细胞分化等起着重要作用。研究表明,COUP-TF 是一种抑制因子<sup>[9]</sup>,它能够结合到各种激素应答元件上,这些应答元件也可被 RAR 和 RXR 识别,但是 COUP-TF 能够抑制这些受体的转录活性,这是因为:1) COUP-TF 可以形成同源二聚体,并以较高的亲和力结合到激素应答元件上,从而竞争性地抑制 RAR 或 RXR 与应答元件的结合;2) COUP-TF 能够与 RXR 形成异源二聚体,由此限制了 RXR 与 RAR 形成二聚体的可能性。在肺癌细胞中,COUP-TF 与另一种孤生受体 Nur77 之间存在着动态平衡,这种平衡不仅决定了肺癌细胞对视黄素的敏感性,而且视黄素主要是通过 COUP-TF/Nur77 的作用途径发挥其抗癌作用的<sup>[2]</sup>。Nur77 也属于核受体超家族成员,能够被不同生长刺激因子快速诱导。在 RAR $\beta$  基因启动子中发现 Nur77 的结合识别元件,提示 Nur77 可能参与 RAR $\beta$  基因表达的调节,由此介导视黄素与生长信号之间的关系。所以,尽管孤生受体没有配体,但它能够通过视黄素受体的相互作用,建立一个动态平衡,以调节视黄素的应答途径。

### 四、视黄素受体与 AP-1 的相互作用

癌基因蛋白 c-Fos 和 c-Jun,经胞外刺激物的诱导,在细胞核中形成一种复合物,即:激活因子蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)<sup>[9]</sup>,这个蛋白能够特异地结合到具有 AP-1 结合位点的 DNA 序列上或肿瘤启动子 TPA 的应答元件 (TRE) 上。视黄素受体可以通过抑制 AP-1 转录活性来抑制肿瘤启动子 TPA 的影响,但是,这种抑制不是受体与 TRE 的相互作用,而是 RAR 或 RXR 与 AP-1 之间的相互作用来抑制 AP-1 结合到 TRE 上。近期研究表明,这种受体介导的抑制 AP-1 转录活性的分子机制可能是由于与一些共同激活因子,如 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CBP) 的竞争而产生的<sup>[10]</sup>,这种通过 CBP 由 RAR/AP-1 相互作用介导的膜和核受体之间的信号传导途径,对于抑制恶性肿瘤是十分重要的。另外,视黄素抑制 c-Fos 和 c-Jun 的活性也需要 RAR $\alpha$  介导。在 HeLa 细胞中,c-Fos 和 c-Jun 形成二聚体,c-Fos 和 c-Jun 基因的转录活性很高,而 RAR $\alpha$  表达水平很低。当 RAR $\alpha$  基因稳定转染细胞后,视黄素可以显著地抑制 c-Jun 和 c-Fos 基因的转录活性。因此,视黄素最终也可以通过 RAR $\alpha$  来拮抗 c-Fos/c-Jun 介导的 AP-1 活性。

### 五、视黄素受体与细胞凋亡

细胞凋亡是一种限制细胞生长的重要途径,视黄素可以诱导白血病细胞、乳腺癌细胞、肺癌细胞等细胞株的细胞凋亡,由此抑制癌细胞的生长,其中视黄素受体也参与介导细胞凋亡。在激素依赖性乳腺癌细胞中,ATRA 能够诱导细胞凋亡,但在激素非依赖性乳腺癌细胞中,ATRA 不能诱导细胞凋亡,将 RAR $\alpha$  或 RAR $\beta$  基因稳定转染到激素非依赖性乳腺癌细胞后,视黄酸则能够有效地诱导癌细胞的细胞

凋亡<sup>[3,11]</sup>。在 HL-60 细胞中,内源性 RARs 的激活可以诱导细胞分化,而内源性 RXRs 的激活则可以诱导细胞凋亡,ATRA 诱导 HL-60 细胞的分化过程中,RAR $\beta$  转录水平显著上升,BCL-2 转录水平显著下降<sup>[12]</sup>。所以,视黄素受体介导的细胞凋亡的诱导可能代表视黄素抑制癌细胞生长的另一个重要机制。

## 六、视黄素受体与细胞生长分化

视黄素是一种有效的诱导分化剂,能够影响许多类型细胞的生长和分化,包括胚胎干细胞、不同类型的癌细胞等。视黄素对许多晚期的、恶性程度高的乳腺癌细胞作用不明显,其原因是 RAR $\beta$  不表达或者 RAR $\alpha$  表达水平很低,将这两种基因分别转染癌细胞并稳定表达时,视黄素则能够有效地抑制癌细胞的生长和诱导癌细胞分化<sup>[3,4,11]</sup>。文献指出,RAR $\beta$  受体表达与抑制癌细胞生长密切相关,RAR $\alpha$  受体表达与癌细胞分化有关<sup>[12]</sup>。通过基因剔除方法,将胚胎畸胎瘤干细胞(embryonic teratocarcinoma stem cell)F9 中的 RAR $\alpha$  和 RAR $\gamma$  基因分别剔除后发现,剔除 RAR $\alpha$  基因的 F9 细胞经视黄素诱导后,分化特异性标记基因 Hoxb-1 和 CRABP-II 的 mRNA 表达水平显著低于野生型 F9 细胞,但是,剔除 RAR $\gamma$  基因的 F9 细胞经视黄素诱导后,Hoxb-1 和 CRABP-II 基因的 mRNA 表达水平显著高于野生型 F9 细胞,表明在 F9 细胞中 RAR $\gamma$  可能与分化有关,但是,RAR $\beta$  的过度表达并不能诱导剔除 RAR $\gamma$  基因的 F9 细胞的分化。在胚胎癌细胞(embryonal carcinoma cell)P19 中,通过激活 RAR $\alpha$  或 RAR $\gamma$ ,可以诱导 Hoxb-1 基因表达和细胞分化,特别是当 RAR $\alpha$ /RXR 或 RAR $\gamma$ /RXR 异源二聚体激活后,则对 P19 细胞的诱导分化产生加成作用,但是,激活 RAR $\beta$ /RXR 也不能诱导 P19 细胞的分化。可见,不同的 RAR 受体可能介导不同的视黄素靶基因的特异性应答,视黄素受体通过不同的机制介导基因的转录,通过不同的信号传导途径抑制细胞的生长,而且

这种作用呈现特异性受体的依赖性。

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 基因是 CDK-cyclin 广谱抑制剂,可抑制哺乳动物细胞的过度繁殖,在细胞周期中具有重要的作用。最新研究表明,编码 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 的基因是视黄素应答靶基因<sup>[14]</sup>,在 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 启动子中可能含有许多对分化信号敏感的应答元件,视黄素应答元件可能分别位于 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 启动子内,因此,视黄素可以通过其受体 RAR 或 RXR 与应答元件的相互作用而调节 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 的表达,从而诱导癌细胞的分化。

## 七、展望

视黄素是一种很有希望的治疗药物,但有一定的毒性和副作用,这是由于不同的视黄素受体没有被选择性激活而引起的<sup>[15]</sup>。目前已合成一系列受体选择性视黄素——RAR-或RXR-受体选择性视黄素。RAR-受体选择性视黄素能够选择性地激活 RAR 受体,RXR-受体选择性视黄素则选择性地激活 RXR,这些不同的受体选择性视黄素提供了一个严格的生理应答范围,选择性地激活不同的视黄素应答途径。例如,RAR-受体选择性视黄素能够有效地抑制激素依赖性乳腺癌细胞生长,而 RXR-受体选择性视黄素则能够有效地抑制激素非依赖性乳腺癌细胞生长<sup>[2,3]</sup>。所以,深入探讨受体介导视黄素的作用途径,分析视黄素受体与其他受体或蛋白之间的相互关系,对于研究视黄素的抗癌机制,开发更多低毒高效的视黄素及其衍生物将有重要意义。

注:文中图 1、图 2 由 Agadir Anissa 博士(美国加州 The Burnham Institute)提供,在此致谢。

## 参考文献

- [1] Zhang X-K, et al., 1993, *Trends Endocrinol Metab.* 4:156.
- [2] Wu Qiao, et al., 1997, *The EMBO J.* 16: 1656.
- [3] Wu Qiao, et al., 1997, *Molecular and Cellular Biology*, 17:6598.
- [4] 吴乔等, 1997, 厦门大学学报(自然科学版),

- 36:787.  
 [5] Evans R. M. 1988, *Science*, **240**:889.  
 [6] Dolle P, et al., 1990, *Development* (Cambridge, UK) **110**:1133.  
 [7] Zhang X-K, et al., 1992, *Nature*, **355**:441.  
 [8] Kliewer S. A. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1448.  
 [9] Yang-Yen H. F. et al., 1991, *New Biol.* **3**:1206.

- [10] Kamei Y. et al., 1996, *Cell*, **85**:403.  
 [11] Liu Y. et al., 1996, *Molecular Cellular Biology*, **16**:1138.  
 [12] Delia D. et al., 1992, *Blood*, **79**:1291.  
 [13] Lotan R. et al., 1995, *N. Engl. J. Med.* **332**:1405.  
 [14] Liu Min, et al., 1996, *J. Biological Chemistry*, **271**:317.  
 [15] Orfanos C. E. et al., 1987, *Drugs*, **24**:459.

## 细胞激光微操作系统\*

李银妹 楼立人 操传顺 崔国强 王浩威 鲁润龙 朱俊

(中国科学技术大学物理系、生物系 合肥 230026)

很多生物样品是透明的或半透明的,激光可以不破坏物体的表层而作用于其内部,为活体研究提供了一种非接触式、远距离、且无菌操作的可能。利用能量密度为每平方微米千微焦的激光微束形成具有 PN 量级力的梯度力场可以对单个细胞的组织结构施加影响。这为细胞、亚细胞的活体研究开辟了一个具有重大实际应用价值的全新领域。

利用光的热学效应为主的光场能够对细胞或细胞器进行加工;用光的力学效应能够对细胞或细胞器进行捕获和搬运。我们称前者为光刀,后者为光镊。

光镊是继光刀之后在生命科学中得到重要应用的一项实验技术,是一种用以操作和研究活体细胞的得力工具。通常光镊指的是单光束梯度力光阱<sup>[1]</sup>。它是一束高度会聚的激光束,作用在透明微粒上,若微粒的折射率大于周围的介质,此微粒将受到光场的作用力而被束缚在光束焦点附近。这种光镊可以直接用来捕获选定的细胞,并保持其正常的生命活动,进而可实现对此单个活体细胞的显微操作<sup>[2]</sup>。光镊的问世为时不久,已受到科学界的广泛注意,被誉为打开了单个活体细胞研究的大门。

我们研制的“细胞激光微操作系统”就是将光镊和光刀这两种各具特色的工具结合于一

体,使它们的功能互相补充,互相配合,相得益彰,完成单一技术无法实现的功能。本系统利用光镊与光刀非机械接触式的作用,对细胞施行显微操作和显微加工,利用它们空间和时间上的高度定位控制对生物体造成的损伤和干扰,从而达到改变其生物性状的目的<sup>[3]</sup>。

### 一、系统总体结构及各组成部分功能

系统的总体结构如图 1 的框图所示。

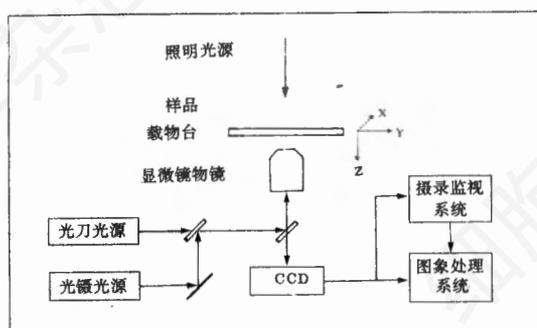


图 1 结构框图

\* 国家科委、安徽省科委、国家基金委、中国科学院资助。

本系统中 Nd:YAG 激光器的研制得到了中国科学技术大学物理系吴鸿兴、郭大浩、夏小平和齐开国等老师的指导,在此深表感谢。