

孤生受体的相互作用对视黄酸应答元件的影响

吴 乔

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

张晓坤

(The Burnham Institute, 加州, 92037 美国)

摘要 孤生受体 COUP-TF 和 nur77 的功能及其作用机理仍未阐明. 以 DNA 瞬时转染和测定氯霉素乙酰转移酶(CAT)活性, 以及凝胶阻滞测定, 分析 COUP-TF 和 nur77 的相互作用对视黄酸应答元件(RAREs)的影响. 实验表明, COUP-TF 通过降低 RAREs 的基础活性, 来增强 RARE 对视黄酸(RA)的敏感性, 而 nur77 则拮抗 COUP-TF 的作用. nur77 能够加强不同 RAREs 的转录活性, 并且与 RA 的诱导无关. 结果证实, nur77 通过与 COUP-TF 的直接作用而对 RAREs 产生影响, 从而抑制 COUP-TF 与 RAREs 结合和 COUP-TF 的转录活性.

关键词 孤生受体, COUP-TF, nur77, 视黄酸应答元件, 视黄酸

Interaction of Orphan Receptors and Their Effect on Retinoic Acid Receptor Elements

WU Qiao

(The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

ZHANG Xiaokun

(The Burnham Institute, CA 92037 USA)

Abstract The function of two orphan receptors, COUP-TF and nur 77, and their mechanism of action remain largely unknown. The interaction between COUP-TF and nur77, and their effect on retinoic acid response elements (RAREs) were investigated. In transient transfection assay and CAT assay, COUP-TF increased retinoic acid(RA) sensitivity to RAREs by reducing basal activity of various RAREs. nur77 counteracted the effect of co-transfected COUP-TF in CV-1 cells. nur77 enhanced the transcriptional activity of various RAREs in a RA-independent manner. Gel retardation assay showed that nur77 and COUP-TF antagonized each other's DNA binding. These observations demonstrate that nur77 exerts its effect on RAREs through direct interaction with COUP-TF, which results in inhibition of COUP-TF RARE binding and transcriptional activity.

Key words Orphan receptor, COUP-TF, nur77, Retinoic acid element, Retinoic acid

近年来, 视黄酸(retinoic acid, RA)已应用于临床治疗许多类型的癌症. RA 的作用主要由其受体 RARs(retinoic acid receptors)和 RXRs(retinoid X receptors)介导, 这些受体作为配体激活的转录因子, 通过结合到各种类型的视黄酸应答元件(retinoic acid response elements, RAREs)上, 调控基因的转录与表达^[1,2]. 研究表明, 尽管 RARs 或 RXRs 的表达对介导 RA 的作用是必需的, 但它们的表达并不能完全驱动靶基因对 RA 的应答^[3], 提示还有其它受体参与 RA 应答的调节.

COUP-TF(chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)与 RARs 和 RXRs

样, 属于类固醇/甲状腺核受体超家族成员, 由两种不同的基因 COUP-TF 和 COUP-TF 编码^[4]. 由于 COUP-TF 的特异性配体至今未知, 因此将它归为孤生受体(orphan receptor). COUP-TF 能够抑制 RARs 诱导的转录活性, 是因为 COUP-TF 形成同源二聚体结合到 RAREs 上, 从而竞争性地抑制 RARs 结合到 RARE 上, 表明 COUP-TF 可能参与调节 RA 的应答过程^[5]. 另一个孤生受体——nur77

联系人: 吴乔, 女, 1959 年 5 月生, 博士, 副研究员

Tel: (0592) 2185361, E-mail: XGWU@XMU.EDU.CN

收稿日期: 1997-12-01, 修回日期: 1998-05-18

(也称 NGF- β 或 TR β) 也属于核受体超家族成员, 已确定在 RAR β 启动子中含有 nur77 的结合位点^[6], nur77 能够与 RXR 形成异源二聚体而结合到 β RARE 上^[7], 提示 nur77 也可能参与对 RAR β 基因表达的调节。所以, 尽管这些孤生受体的特异性配体仍未确定, 但它们能够通过 RARs 或 RXRs 的相互作用调节 RA 的应答。

目前为止, 孤生受体之间的相互作用仍未阐明, 它们与 RAREs 的相关性则是阐明其功能关系, 及其对 RA 应答调控的关键。因此, 本文着重分析 COUP-TF、nur77 和 RAREs 之间的相互关系, 结果表明, COUP-TF 与 nur77 存在着拮抗作用, 这种作用是通过抑制对方结合到 RAREs 上产生的。这一结论可能为研究孤生受体对视黄酸应答元件的调控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

用于 DNA 瞬时转染的 CV-1 细胞(猴肾细胞)培养在 DMEM 培养液中。CV-1 细胞来自美国 ATCC。

1.2 各种受体表达质粒和报告基因表达质粒

用于 DNA 瞬时转染的 nur77 和 COUP-TF 表达质粒为它们的 cDNA 片段克隆到 pRc/CMV 表达载体 (Invitrogene, San Diego, CA) 中。各种类型的报告基因表达质粒是将各种视黄酸应答元件, 包括 β RARE、 $\Delta\beta$ RARE、RAR β 启动子、TRE-pal、ApoA β -RARE、CRBP β -RARE 和 MHC-TRE 等克隆到含有胸腺嘧啶脱氧核苷激酶的氯霉素乙酰转移酶启动子(tk-CAT)上, 表达载体为 pBluescript-CAT vector。这些表达质粒的构建具体参见文献^[2, 8-10], β 半乳糖苷酶表达质粒购于 Pharmacia。 $\Delta\beta$ RARE 为 β RARE 突变体, 序列为 TG-TAGGGTTCACACTGAGTTCACTCA(划线的为突变的核苷酸)。

1.3 DNA 瞬时转染和氯霉素乙酰转移酶(CAT)活性测定

以 5×10^4 细胞/孔的接种量将细胞接种于 24 孔培养板中, 24 h 后采用磷酸钙和 DNA 共沉淀的转染方法^[11:a], 将所需的 DNA, 包括 COUP-TF 和 nur77 表达质粒、各种报告基因表达质粒、 β 半乳糖苷酶表达质粒等瞬时转染到 CV-1 细胞中, 37 $^{\circ}$ C、3% CO $_2$ 温育过夜。细胞转染后, 换新鲜培养液, 用 10^{-7} mol/L 视黄酸(Sigma)处理 24 h, 细胞用 PBS 洗涤, 加入

200 μ l Tris(250 mmol/L, pH7.8), 于干冰上反复冻融 3 次, 得细胞提取液, 再按文献[11:b]方法测定氯霉素乙酰转移酶活性和 β 半乳糖苷酶活性。

1.4 体外受体蛋白的合成和凝胶阻抑测定

参照文献[2]方法。主要步骤为: 通过酶解 DNA, 转录, 翻译等步骤进行体外受体蛋白合成(试剂盒为 Stratagene(San Diego), 按说明书操作), 合成的受体蛋白包括 nur77、COUP-TF β 、COUP-TF α 、RAR 和 RXR。以 α - 32 P-dATP 和 α - 32 P-dCTP 标记各种寡核苷酸, 包括 β RARE、 $\Delta\beta$ RARE、TRE-pal、ApoA β -RARE、CRBP β -RARE 等(各种寡核苷酸序列参见文献[2, 8, 9]), 以制备探针。将合成的受体蛋白与探针室温杂交 20 min, PAGE 胶上电泳, 干胶, -80 $^{\circ}$ C 曝光, 显影。如果需要加入抗体, 则先将抗体与受体蛋白室温温育 30 min, 再与探针杂交。

2 结果与讨论

2.1 COUP-TF 与 nur77 的拮抗作用

为了研究两种孤生受体的相互关系, 分析 COUP-TF 对 RAREs 转录活性的影响, 以及 nur77 对 COUP-TF 活性的抑制作用, 首先进行 CAT 活性测定。通过 CAT 相对活性的高低, 判断 RA 调控 CAT 表达的作用, 以及 nur77 和 COUP-TF 对 RA 调控 CAT 表达作用的影响。当以 β RARE-tk-CAT 作为报告基因时, 随着 COUP-TF 浓度的增加, RA 诱导的 CAT 相对活性基本不变(Fig. 1: 实心杆), 但基础活性受到显著抑制(Fig. 1: 空心杆), 结果导致依赖 RA 的倍数诱导(即: RA 诱导后的 CAT 相对活性/RA 诱导前的 CAT 相对活性, fold induction)增加(Fig. 1: 斜线杆)。随着 nur77 的加入和浓度的提高, 基础活性又显著提高(Fig. 1: 空心杆), 但 RA 诱导的 CAT 相对活性仍基本不变(Fig. 1: 实心杆), 结果导致依赖 RA 的倍数诱导下降(Fig. 1: 斜线杆), 由此提示 COUP-TF 对 CAT 基础活性的抑制作用被 nur77 所拮抗。当以另一个 RARE——TREpal-tk-CAT 作为报告基因时, 也观察到 COUP-TF 与 nur77 的拮抗作用(Fig. 1)。结果表明, COUP-TF 能够加强 RAREs 对 RA 的敏感性, nur77 则降低 RAREs 对 RA 的敏感性, 而这种作用正是由于 COUP-TF 和 nur77 的相互拮抗产生的。

2.2 nur77 对视黄酸应答元件转录活性的影响

COUP-TF 与 nur77 相互拮抗的结果提示一种新的调节 RA 应答的可能机制, 由于 β RARE 上含

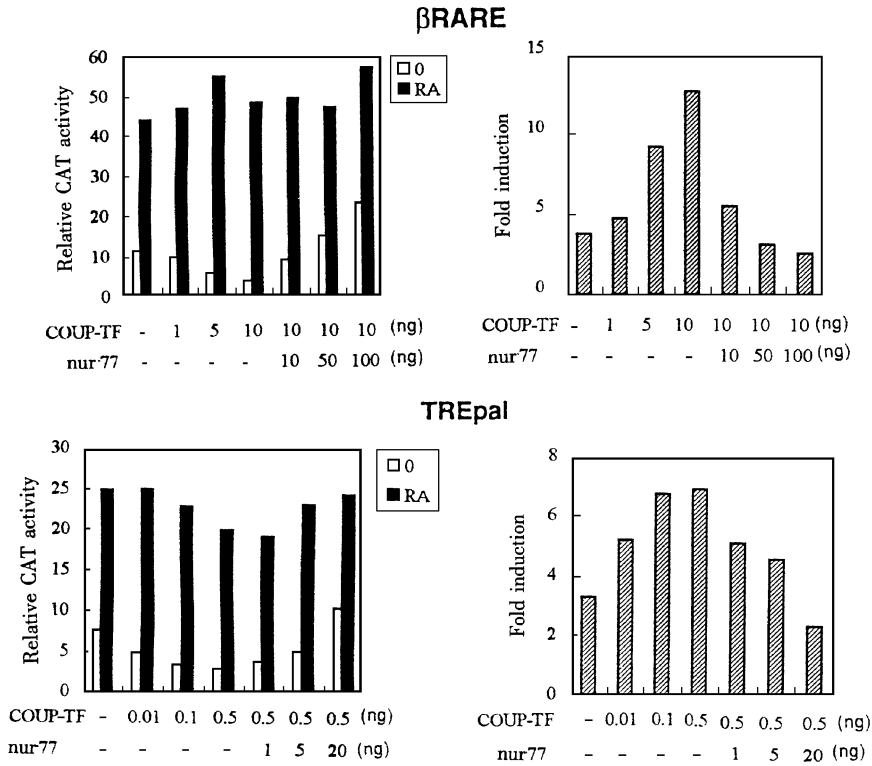


Fig. 1 Effect of COUP-TF and nur77 on βRARE and TRE-pal

有 nur77 的结合位点^[6], 那么 nur77 是否可能通过结合到视黄酸应答元件上而对 RA 产生调控呢? 为此, 我们分析 nur77 对 RAREs 转录活性的影响. 首先, 选用三种含有 βRARE 的报告基因 (RARβtk-CAT, βRARE-tk-CAT 和 ΔβRARE-tk-CAT), 并以空白载体的报告基因 pBLCAT₂ 作为对照, 测定

CAT 活性. 随着 nur77 浓度的增加, RA 诱导的 CAT 相对活性显著提高 (Fig. 2: 实心杆), 但更为重要的是基础活性也显著提高 (Fig. 2: 空心杆), 对照组中未见基础活性或 RA 诱导的 CAT 相对活性发生变化 (Fig. 2), 由此提示, 转录活性的加强可能不是 RA 诱导的结果, 而是基础活性增强的结果. 为了

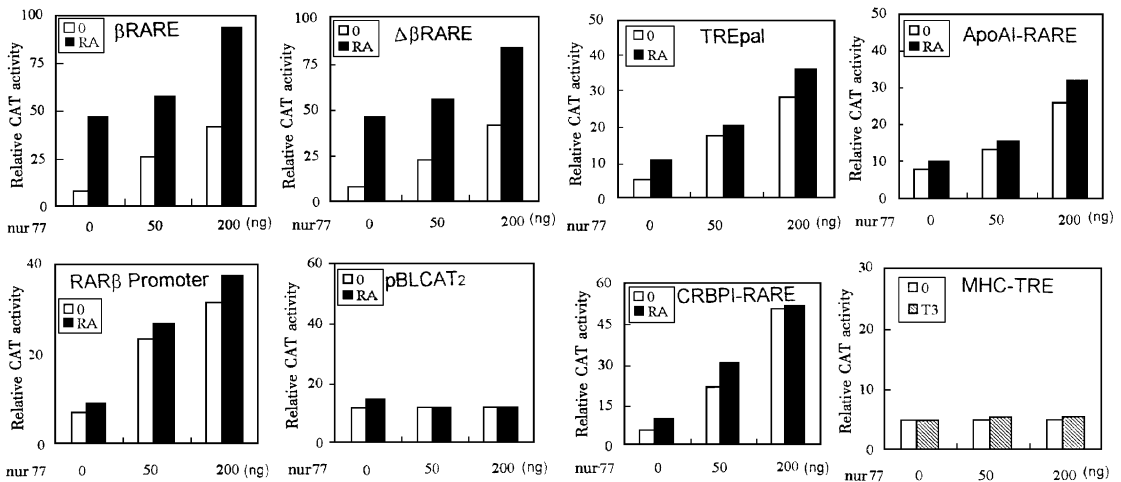


Fig. 2 Nur77 promoted various RAREs activity

证实这种可能性, 以及确定这种作用并不仅仅对 β RARE 特异, 其它 RARE 报告基因, 如 TRE_{pal}-tk-CAT, ApoA -RARE-tk-CAT 和 CRBP -RARE-tk-CAT 等和 nur77 一起, 分别转染到 CV-1 细胞, 结果再次证明, 随着 nur77 浓度的增加, 不仅 RA 诱导的 CAT 相对活性显著提高, 而且基础活性也显著提高(Fig. 2). 作为对照, 我们还选用另一类报告基因 MHC-TRE-tk-CAT (甲状腺激素特异性应答元件), 并以其特异性配体 T₃ (甲状腺激素) 诱导, 结果随着 nur77 浓度的增加, T₃ 诱导的 CAT 相对活性以及基础活性均不改变(Fig. 2). 以上结果证实, nur77 能够加强 RAREs 转录活性, 但这种作用与 RA 的诱导无关.

2.3 nur77 和 COUP-TF 相互拮抗的机制

为了进一步了解 nur77 加强 RAREs 转录活性是否由于其结合到 RAREs 上引起的, 我们进行凝胶阻滞测定. 当以 β RARE 探针时, nur77 不能结合到 β RARE 上, RXR 也不能结合到 β RARE 上, 但 nur77 和 RXR 形成的异源二聚体可以结合到 β RARE 上, 因为 nur77/RXR 异源二聚体能够被抗 nur77 抗体(anur77) 作用后向上移动, 或被抗 RXR 抗体(aRXR)所抑制(Fig. 3). 结果不仅佐证 nur77 能够与 RXR 形成异源二聚体^[7], 而且表明 nur77 加强 RARE 活性不是通过自身结合到 β RARE 上产生的. 当以 $\Delta\beta$ RARE (β RARE 的突变体) 为探针时, nur77/RXR 异源二聚体则不能结合到 $\Delta\beta$ RARE 上(Fig. 3), 表明在 β RARE 中, nur77 结合位点的完整性, 对于有效形成 nur77/RXR 二聚体十分重要.

当以其它 RAREs, 如 TRE_{pal}, CRBP -RARE 和 ApoA -RARE 等作为探针, 不仅 nur77 不能结合到这些 RAREs 上, 甚至 nur77/RXR 异源

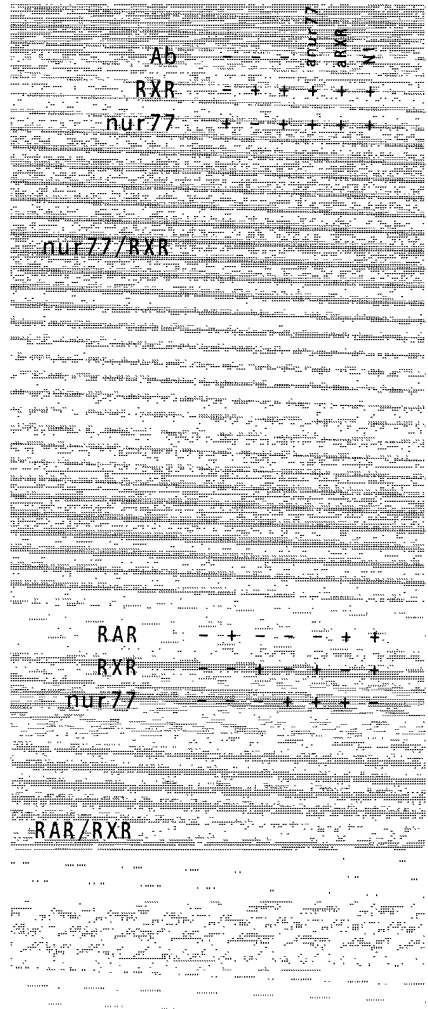


Fig. 3 Analysis of nur77 binding to β RARE and $\Delta\beta$ RARE

二聚体也不能结合到这些 RAREs 上(Fig. 4). 作为对照, RAR 和 RXR 可以形成异源二聚体而结合到

RAR	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
RXR	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
nur77	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
RAR/RXR															

Fig. 4 Analysis of nur77 binding to various RAREs

各种 RAREs 上^[2] (Fig. 4). 以上结果表明, 尽管 nur77/RXR 异源二聚体能够结合到 β RARE, 但它不是 nur77 加强 RAREs 活性的关键, 由此进一步提示, nur77 可能通过蛋白-蛋白的相互作用调控 RAREs, 而这个蛋白可能是 COUP-TF.

为此, 我们通过凝胶阻滞测定证实这种可能性. 首先分析 nur77 对 COUP-TF 结合到 β RARE 的影响. COUP-TF 能够形成同源二聚体结合到 β RARE 上^[5], 但 nur77 能够抑制 COUP-TF 结合到 β RARE 上, 而且抑制作用随 nur77 浓度的增加而加强 (Fig. 5), 作为对照, 加入 RAR, COUP-TF 不会被抑制 (Fig. 5). 反之, 我们也分析 COUP-TF 对 nur77/RXR 的影响, 当 nur77/RXR 结合到 β RARE 上, COUP-TF 能够抑制 nur77/RXR 结合到

β RARE 上, 而且随着 COUP-TF 浓度的增加, 抑制作用更显著 (Fig. 5). 在其它 RAREs, 如 CRBP - RARE, TRE-pal, 和 ApoA -RARE 上, 也发现 nur77 抑制 COUP-TF 结合到 RAREs 上 (Fig. 6). 结果表明, nur77 与 COUP-TF 的相互拮抗是通过抑制对方结合到 RAREs 上产生的, 而且是蛋白-蛋白的直接作用, nur77 功能的发挥不需要 nur77 直接结合到 RAREs, 这与 COUP-TF 需要结合到 RAREs 才对其它受体产生竞争性抑制^[5]有所不同.

COUP-TF 与 nur77 相互作用及其对 RAREs 的调控还提示我们, 在癌细胞中, RA 可能通过调节 nur77/COUP-TF 发挥抗癌作用, 而且 nur77 和 COUP-TF 的动态平衡在调节癌细胞对 RA 敏感性的过程中可能起着重要作用, 有关研究正在进行.

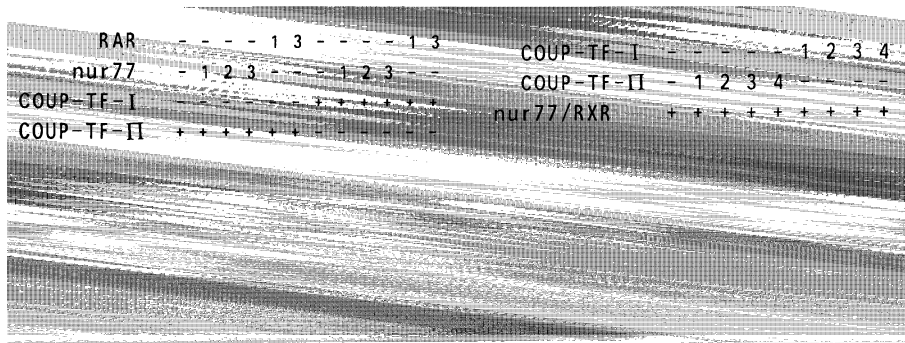


Fig. 5 Mutual inhibition of nur77 and COUP-TF protein

nur77	- 2 4 - 2 4	- 2 4 - 2 4	- 2 4 - 2 4
COUP-TF-I	- - - + + +	- - - + + +	- - - + + +
COUP-TF-II	+ + + - - -	+ + + - - -	+ + + - - -

Fig. 6 Inhibition of COUP-TF binding to various RAREs by nur77

References

- 1 Brand N, Petkovich M, Krust A, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, 1988, **332**: 850 ~ 853
- 2 Zhang X-K, Hoffmann B, Tran P, Grunpner G, Pfahl M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature*, 1992, **355**: 441 ~ 446
- 3 Kim Y-H, Dohi D, Gill R H, Zou C-P, Oridate N, Walsh G L, Nesbitt J C, Xu X-C, Hong W-K, Lotan R, Kurie J M. Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. *Cancer Res*. 1995, **55**: 5603 ~ 5610
- 4 Wang L-H, Tsai S Y, Cook G R, Beattie W G, Tsai M J, O'Malley B W. COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*, 1989, **340**: 163 ~ 166
- 5 Kliewer S A, Kazuhiki U, Heyman R A, Mangelsdorf D J, Dych J A, Evans R M. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, **89**: 1448 ~ 1452
- 6 Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurrl. *Gene Dev*, 1995, **9**: 769 ~ 782
- 7 Forman B M, Umesono K, Chen J, Evans R M. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 1995, **81**: 541 ~ 550
- 8 Tran P, Zhang X-K, Salbert G, Hermann T, Lehmann J M, Pfahl M. COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathway. *Mol Cell Biol*, 1992, **12**: 4666 ~ 4676
- 9 Lee M-O, Lui Y, Zhang X-K. A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormone sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**: 4194 ~ 4207
- 10 Luckow B, and Schutz G. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. 1987, **15**: 5490 ~ 5498
- 11 J. 萨姆布鲁克, 等著. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1993, a: 786-792, b: 805-808. (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993)

“第 7 届全国生物膜学术讨论会”征文通知

由中国生物化学与分子生物学会、中国生物物理学会和中国细胞生物学会主办, 中科院昆明动物所和中国细胞生物学会云南省分会协办的“第 7 届全国生物膜学术讨论会”定于 1999 年 11 月 8 日 ~ 11 月 11 日在云南省昆明市召开。热烈欢迎从事生物膜研究的各学科科技工作者以及港、台学者参加会议进行交流。

一、征文范围:

1. 生物膜、膜蛋白的结构; 2. 细胞膜与膜骨架; 3. 膜脂-膜蛋白的相互作用; 4. 信号跨膜传导; 5. 偶联膜(线粒体、叶绿体膜等)的结构与功能; 6. F₁-V-型 ATP 酶; 7. 离子通道; 8. 多肽或蛋白质的插入及跨膜转运; 9. 受体; 10. 膜与疾病和老化。

二、征文格式要求:

文稿约 1000 字(A4 纸一个印刷版面) 请用激光或喷墨打印机打印, 一式二份。打印格式: 题目——宋体 3 号字, 作者姓名——黑体 5 号字, 单位和邮编——楷体 5 号字, 正文——宋体 5 号字。每行 40 字, 不列文献。文稿经评审符合要求将直接胶印, 请严格按格式要求打印。

三、征稿截止日期: 1999 年 7 月 31 日。

四、征文请寄: 北京市朝阳区大屯路 15 号, 邮编: 100101

中国生物化学与分子生物学会秘书处

联系人: 杜连芳 电话: (010) 64889892