

种方式发挥其免疫抑制作用,在维持外周免疫耐受和预防自身免疫性疾病中发挥着重要作用。RA 患者外周血中 Treg 细胞数量减少和(或)功能降低,提示 Treg 细胞的异常与 RA 的发生发展密切相关,但仍需关于该方面的临床调查及相关动物实验的考证,未来有必要加强在此方面以及与临床相关实验室指标密切结合的研究,从而更准确地解释 Treg 细胞在 RA 发病中的免疫机制,得出解决方法,最大程度地减轻 RA 患者的病痛。同时针对 RA 患者体内 Treg 细胞数量减少采取各种体外诱导促使该细胞增殖的方法已成为治疗 RA 的一个新靶点,相信未来治疗 RA 的前景将更加广泛。

参考文献

- 1 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF- β producing cells [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006, 5(3):179-190
- 2 Anderson AE, Isaacs JD. Tregs and rheumatoid arthritis [J]. *Acta Reumatol Port*, 2008, 33(1):17-33
- 3 Chen X, Fang L, Song S, *et al.* Thymic regulation of autoimmune disease by accelerated differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells through IL-7 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2009, 183(10):6135-6144
- 4 Lin SC, Chen KH, Lin CH, *et al.* The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3 expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients [J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(12):987-996
- 5 Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4 [J]. *Science*, 2011, 332(6029):600-603
- 6 Yan Z, Garg SK, Banerjee R. Regulatory T cells interfere with glutathione metabolism in dendritic cells and T cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(53):41525-41532
- 7 Liang B, Workman C, Lee J, *et al.* Regulatory T cells inhibit dendrit-

- ic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II [J]. *J Immunol*, 2008, 180(9):5916-5926
- 8 Bopp T, Becket C, Klein M, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of T cell-mediated suppression [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(6):1303-1310
- 9 Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to Treg cell-mediated suppression of dendritic cell activation [J]. *Cell Immunol*, 2010, 265(2):91-96
- 10 Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21):2033-2045
- 11 Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, *et al.* Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation [J]. *Immunity*, 2011, 34(4):566-578
- 12 Huber S, Gagliani N, Esplugues E, *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner [J]. *Immunity*, 2011, 34(4):554-565
- 13 Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population [J]. *Nature*, 2010, 465(7302):1093-1101
- 14 Dai J, Liu B, Li Z. Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(5):528-533
- 15 Pandiyan P, Conti HR, Zheng L, *et al.* CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model [J]. *Immunity*, 2011, 34(3):422-434
- 16 Samson M, Audia S, Janikashvili N, *et al.* Inhibition of IL-6 function corrects Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(8):2499-2503

(收稿日期:2012-08-30)

(修回日期:2012-10-15)

雌激素受体作用的分子机制及靶向治疗研究进展

黄 卉 许增禄 黄秉仁

雌激素通过雌激素受体- α (estrogen receptor α , ER α) 和雌激素受体- β (estrogen receptor β , ER β) 起作用。此后又发现了一种新的 G 蛋白偶联的雌激素

受体(G protein-coupled receptor 30/G protein-coupled estrogen receptor-1, GPR30/GPER-1)。因此,雌激素的信号转导依赖于这 3 种受体作用的平衡,通过基因组途径或非基因组途径调控细胞的增殖与分化,影响人类的生理、生殖和行为。

一、ER 的结构

1. 雌激素经典受体 ER α 和 ER β ^[1]: ER α 基因

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院人体解剖与组织胚胎学教研室(黄卉、许增禄),生物化学与分子生物学研究室(黄卉、黄秉仁),医学分子生物学国家重点实验室(黄秉仁)

ESR1 位于人 6 号染色体,由 8 个外显子编码 595 个氨基酸组成的野生型雌激素受体 α 蛋白。ER β 基因 ESR2 位于人 14 号染色体,由 8 个外显子编码 530 个氨基酸组成的野生型雌激素受体 β 蛋白。这两种受体有组织分布的特异性、作用的拮抗性。雌激素受体 α 、 β 均可分为 A ~ F 6 个结构域和 3 个功能区,功能区包括氨基端的非配基依赖的转录激活区 AF1 [activation function (AF) domains]、DNA 结合区 (DNA-binding domain, DBD)、配基结合区 (ligand-binding domain, LBD) 及其所含的配基依赖的转录激活区 AF2。配基结合区也负责结合共调控子(共激活子和共抑制子)和分子伴侣蛋白,负责受体的双体化和核定位。ER α 和 ER β 的 DNA 结合区 (C 区) 有 96% 的同源性,在配基结合区 (E、F 区) 分享一个中等程度的同源性 (59%),D 区含有几个功能区,包括铰链区、部分配基依赖的激活区 AF2a 及核定位信号,该区与 A、B 区在两种受体中同源性差。

2. GPR30 (GPER-1)^[2]: 几年前新发现了一个功能性的雌激素跨膜受体,即 G 蛋白偶联雌激素受体 30 (GPR30、GPER-1),它介导了基因组作用及快速的非基因组信号转导。GPR30 的编码基因位于人第 7 号染色体,由 3 个外显子构成,但仅由第 3 个外显子编码含有 7 个跨膜片段顺序的全长 375 个氨基酸的蛋白,分子质量约 41kDa。可结合 17- β 雌二醇,但其不与皮质醇、孕酮和睾酮结合。

二、ER 调控作用的分子机制

1. ER α 和 ER β 经典的基因转录激活作用(基因组信号途径): ER α 和 ER β 作用的经典机制包括配基结合到受体的配基结合区,结合了配基的双体化受体通过其含有锌指的 DNA 结合区识别并结合到靶基因的顺序特异的应答元件即雌激素应答元件 (ERE) DNA 上,基于配基-受体复合物形态而募集共激活子或共抑制子,形成多蛋白复合物,而这些复合物激活或者抑制基因的转录。随后发现 ER α 不是简单地募集各个单个的蛋白,而是募集相互连接着的有着不连续活性的蛋白网络,进而在维持受体的结构与功能、稳定受体-DNA 的结合、影响受体应答基因的表达、修复错误折叠的蛋白及损伤的 DNA、确定细胞命运及氧化应激等方面起着决定性的作用^[3]。但受体丝氨酸或酪氨酸的磷酸化、甲基化、乙酰化、苏素化 (sumoylation) 及棕榈酰化 (palmitoylation) 等促进了该复合物转录活性的变化或降解,而 ER 的泛素化或导致受体的进一步激活,或诱导它的降解^[4-7]。雌激素

应答元件 (ERE) 结合蛋白 (ERE-BP) 的研究证实该蛋白的表达导致组织特异性的雌激素抗性^[8]。

2. ER α 和 ER β 结合到其他转录激活因子上调控基因转录: ER α 和 ER β 能够通过结合或者激活别的直接结合 DNA 的转录因子来调控基因转录,例如激活蛋白 AP1、特征蛋白 SP1、核因子 κ B (NF- κ B)、p53 以及信号转导和转录激活子-5 (STAT5) 等^[9]。此时 ER 可以结合到完整的或不完整的 ERE 模体上,或者通过一个伙伴转录因子间接与染色质相互作用。文献报道,ER 与 TGF 信号转导途径有所交联,ER 与转录因子 Smad2、3 结合以及后者的磷酸化而募集到泛素连接酶 Smurf1,致使 Smad 进入蛋白酶体降解途径,从而抑制了 TGF- β 诱导的细胞迁移^[10]。

3. 不存在配基情况下 ER 介导的转录: ER 能够不存在配基雌激素时引发转录应答^[11]。活力亢进的生长因子受体,例如 EGFR、IGFIR 能够结合细胞外信号分子 (EGF/IGF-I) 后激活蛋白激酶瀑布,他们能在无雌激素配基下磷酸化和激活 ER。

4. ER α 和 ER β 的差异性转录应答: 虽然 ER α 和 ER β 作用机制相似,但却能导致差异性的转录应答^[12]。芯片分析揭示两种雌激素受体调控着共同和不同的基因表达,还能差异性地调控同一基因的表达,原因是它们以不同的亲和力结合同样的配基,而后引发不同的应答以及受体信号瀑布的回应。ER α 和 ER β 负责募集共调控蛋白的 AF1 区保守性差,在氨基酸顺序上只有 20% 的同源性,提示功能上的差异源于 ER 结构的不同。而配基,如 17- β 雌二醇能诱导受体构象的改变,使之乐于结合共激活子到 ER α , 结合共激活子或抑制子到 ER β 。雌激素拮抗剂 tamoxifen (三苯氧胺) 在结合到 ER α 而不是 ER β 时才募集共抑制子。此外,两种雌激素受体通过形成异源二聚体而影响受体-DNA 的结合,或者通过变换受体的量而调控彼此的活性。ER β 在 ER α 阳性细胞内的表达是通过抑制募集 ER α 到 ERE 上,或者抑制 ER α 介导的其他转录因子结合到 ERE 上,从而抑制 ER α 的转录活性。ER α 和 ER β 可差异性调控有促细胞分裂作用的核转录因子 MYC。在各类肿瘤中高表达的 CCND1 (编码 cyclin D1) 转录时,这两种受体通过调控区域,包括 CREB 和 AP1 模体区发挥相反的作用。最终的基因表达模式及其后来的生物应答的改变往往取决于与一个基因所在染色质的调控位点上的转录因子的结合的比例,以及 ER α 和 ER β 的细胞定位、各种共调解蛋白和信号转导成分的表达水

平以及细胞外刺激的性质。

5. 快速的非基因组应答信号通路: 尽管 ER α 和 ER β 已被认为是与雌激素基因组作用有关的主要核受体, 但他们也有一小部分呈现在细胞膜上, 从而介导雌激素快速激活细胞内信号途径(非基因组途径), 如 ER α -46。GPR30 作为雌激素的 G 蛋白偶联受体已被证实能够激活腺苷酸环化酶和表皮生长因子受体, 启动 ERK 和 PI $_3$ K 信号途径, 导致基因组和非基因组效应, 即 GPER-1 导致了 EGFR 的反式激活作用, 但也激活了细胞内快速信号转导^[13]。

6. 雌激素受体表达水平的改变影响着基因转录: ER 表达水平与其基因表达调控作用密切相关^[14]。细胞内的 ER 源于 ER 合成和 ER 降解的动力学平衡。ER 的转录受几个因子的调控, 如 ER α 受 GATA3、FOXO3A、FOXO1 和 ER α 自身调控(即自我调控), 但也存在交叉调控, 即受其他核受体的影响^[15]。ER 的合成由于其基因启动子的甲基化而被抑制。启动子的高度甲基化与大多数肿瘤和肿瘤细胞株中 ER α 和 ER β 蛋白的缺失明显相关。据报道, DNA 去甲基化试剂, 例如 5-AZAC (5-aza-2D-deoxycytidine) 可在肿瘤细胞中重建 ER β 的表达。一系列 ER 亚型特异的小干扰 RNA 能够影响 ER 的表达, 而特异的 miRNA 与 ER 水平的负相关在多种肿瘤中均被发现。在转录翻译后 ER 亚型与热休克蛋白形成复合物时是稳定的。配基的结合使受体与分子伴侣分离, 促进了蛋白酶体介导的降解。这个过程需要 ER 磷酸化状态的改变以及受体与几个别的蛋白的相互作用, 如泛素连接酶和泛素结合蛋白。总之, 受体水平的调节、分子伴侣的下调以及泛素连接酶表达增加均与蛋白酶体介导的 ER 降解相关。两个最近的研究提示含有泛素结合模体的蛋白, 含 CUE 区的蛋白 2 (CUEC2) 和狐猴酪氨酸激酶 3 (LMTK3) 可调控 ER α 的稳定性和影响乳腺癌的内分泌性抵抗^[16]。

7. 雌激素受体配基等影响着激素信号转导通路: 内源性配基、共调控子的调制失控, 都可成为肿瘤候选病因及治疗靶点。雌激素受体配基中除了 E $_2$ 可以激活每种亚型的受体外, 特异配基的合成与使用已获得广泛重视。这些合成物可称为选择性雌激素受体调节子(selective estrogen receptor mediators, SERMs), 它们可以结合这些受体, 但在转录激活活性上具有受体特异性, 如 tamoxifen 是 ER α 选择性激动剂或拮抗剂, 而 raloxifene 是 ER β 选择性激动剂或拮抗剂。为了研究 3 种雌激素受体作用的分子机制, 很多人工合

成的选择性激动剂或拮抗剂已研发成功。4,4',4''-[4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl]tris-phenol (PPT) 是 ER α 的激动剂, 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) 激活 ER β , 而化合物 G-1 是 GPR30 高度特异的激动剂。图 1 显示了各种雌激素受体配基, 包括内源性配基、外源性配基、激动剂及拮抗剂、选择性雌激素受体调节子(SERM)、选择性雌激素受体下调子(SERD)及 GREP 的激动剂及拮抗剂与其相应受体的对应情况及其功能的概况。

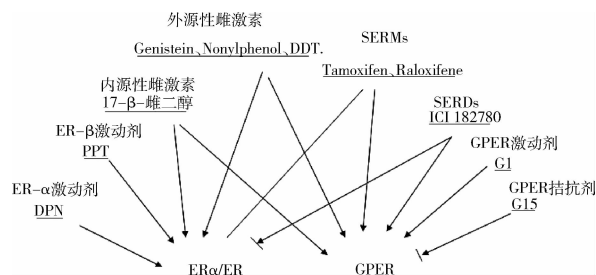


图 1 ER 配基及有关功能

GPER 和来自 ER α 、ER β 的细胞膜结合受体的激动剂和拮抗剂参与了快速细胞内信号转导。箭头示意激活, 被阻止的箭头表示抑制, 而直线表示组织特异性的激活或者抑制。选择性雌激素调节子(SERM)选择性雌激素下调子(SERD)

三、靶向 ER 的肿瘤治疗

到目前为止, 持续地暴露于雌激素下被认为是一个已确立的诱发乳腺癌的病因。流行病学等研究提示前列腺癌、卵巢癌、肺癌和子宫内膜癌的病因均与雌激素有关。因此, 抗雌激素治疗是治疗激素相关肿瘤的有效途径。然而, 接受组合激素(雌激素加孕酮)替代疗法的绝经期妇女可以减少结肠癌的发生率。在前列腺癌患者饮食中添加雌激素对其病情有缓解作用, 这显现出雌激素在肿瘤组织中作用的复杂性。

70% 的乳腺癌细胞生长依赖于雌激素和有功能的 ER α , 因此通常对 ER α 阳性乳腺癌给予抗雌激素化疗, 如使用作用于 AF2 区的三苯氧胺(tamoxifen)。自 1978 年被美国 FDA 批准为新药以来, 三苯氧胺(tamoxifen)的辅助化疗在过去几十年降低了乳腺癌等疾病的复发率并使得乳腺癌的病死率明显下降。2006 年新药雷洛昔芬(raloxifene)被证实有三苯氧胺一样的预防乳腺癌复发的作用。治疗还可选用选择性雌激素受体降解子或下调子(SERD, SERDs)样的氟维司群(fulvestrant), 其作用于 AF1 和 AF2, 完全阻断 ER 作用, 同时氟维司群部分阻断 EGF 的促增殖

作用。用于治疗乳腺癌的选择性雌激素受体调节剂 (SERM) toremifene (托瑞米芬) 也已被证实可用于防止高恶性级别前列腺癌。

另外, 靶向雌激素合成的芳香酶抑制物均已被成功的用于治疗 and 预防乳腺癌, 且对晚期疾病芳香酶抑制剂比三苯氧胺作用更佳, 所以抗雌激素治疗外的第 2 种治疗方法就是阻断 Estrogen 在周围组织和肿瘤内的生成, 如使用 anastrozole, letrozole, or exemestane 等芳香酶抑制剂 (aromatase inhibitor, AI), 可降低复发率 37% ~ 55%。

进一步的临床研究显示肿瘤中 ER 特异亚型表达的变化取决于肿瘤的类型和疾病的阶段, 因此第 3 种抗雌激素治疗是选择性靶向治疗不同雌激素受体亚型的肿瘤^[17]。在三阴 (雌激素受体 α 、孕激素受体及表皮生长因子受体均为阴性) 乳腺癌中, 无法应用激素疗法, 也不能使用 EGF 受体的单克隆抗体, 但此类肿瘤细胞常常表达膜雌激素受体 GPR30, 因此设法抑制其表达成为有效的靶向疗法, 而同时阻遏 GRP30 和经典的 ER 也就成为治疗雌激素相关肿瘤的较好策略。编码 ER - β 蛋白的 ESR2 基因启动子的甲基化涉及肿瘤中受体表达水平的改变, 因此可使用的第 4 种抗雌激素治疗方法是使用去甲基化药物, 促进 ER - β 的表达。5 - AZAC (5 - aza - 2D - deoxycytidine) 可在肿瘤细胞中重建 ER β 的表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖^[18]。

从雌激素受体作用的分子机制和激素相关肿瘤治疗的进展可以看出雌激素相关肿瘤治疗策略是选择性靶向 ER, 即重建 ER 正常水平和正常活性。这包括与 ER 密切相关内源性配基合成抑制剂 (芳香酶抑制剂) 及人工合成的激活性或抑制性配基的使用, 3 种 ER、共激活子和共抑制子的转录表达、修饰和降解等有关制剂如去甲基化制剂和小干扰 RNA 使用等。

鉴于科学发展的规律, 我们相信雌激素受体转录激活作用的分子机制必将在未来获得更深入的研究, 而雌激素相关肿瘤也必将获得更有效的治疗。

参考文献

- 1 Sugiyama N, Barros RP, Warner M, *et al.* ER β : recent understanding of estrogen signaling[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2010, 21 (9): 545 - 552
- 2 Prossnitz ER, Barton M. The G - protein - coupled estrogen receptor GPER in health and disease [J]. Nature Reviews Endocrinology, 2011, 7(12): 715 - 726
- 3 Schultz - Norton JR, Ziegler YS, Nardulli AM. ER α - associated protein networks[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2011,

- 22(4): 124 - 129
- 4 Murphy LC, Seekallu SV, Watson PH. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18 (1): R1 - 14
- 5 Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, *et al.* Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors [J]. Endocr Rev, 2011, 32(5): 597 - 622
- 6 Prenzel T, Begus - Nahrman Y, Kramer F, *et al.* Estrogen - dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome - dependent monoubiquitination of histone H2B [J]. Cancer Res, 2011, 71(17): 5739 - 5753
- 7 Zhang QG, Han D, Wang RM, *et al.* C terminus of Hsc70 - interacting protein (CHIP) - mediated degradation of hippocampal estrogen receptor - α and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(35): 617 - 624
- 8 Lisse TS, Hewison M, Adams JS. Hormone response element binding proteins; Novel regulators of vitamin D and estrogen signaling [J]. Steroids, 2011, 76 (4): 331 - 339
- 9 Menendez D, Inga A, Resnick MA. Estrogen receptor acting in cis enhances WT and mutant p53 transactivation at canonical and noncanonical p53 target sequences [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107 (4): 1500 - 1505
- 10 Band AM, Laiho M. Crosstalk of TGF - β and estrogen receptor signaling in breast cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011, 16(2): 109 - 115
- 11 Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 12 (8): 1054 - 1060
- 12 Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, *et al.* Tumor repressive functions of estrogen receptor β in SW480 colon cancer cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6100 - 6106
- 13 Ohshiro K, Schwartz AM, Levine PH, *et al.* Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non - genomic signaling [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): 1 - 8
- 14 Al - Nakhle H, Burns PA, Cummings M, *et al.* Estrogen receptor β 1 expression is regulated by miR - 92 in breast cancer [J]. Cancer Res, 2010, 70(11): 4778 - 4784
- 15 Bagamasbad P, Denver RJ. Mechanisms and significance of nuclear receptor auto - and cross - regulation [J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 170 (1): 3 - 17
- 16 Giamas G, Filipovici A, Jacob J, *et al.* Kinome screening for regulators of the estrogen receptor identifies LMTK3 as a new therapeutic target in breast cancer [J]. Nature Med, 2011, 17(6): 715 - 719
- 17 Girgert R, Emons G, Gründker C. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple - negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 199 - 205
- 18 Krecmerová M, Otmar M. 5 - Azacytosine compounds in medicinal chemistry: current stage and future perspectives [J]. Future Med Chem, 2012, 4(8): 991 - 1005 (收稿日期: 2012 - 09 - 25)

(修回日期: 2012 - 10 - 08)