

糖皮质激素受体突变与糖皮质激素抵抗

王雪萍 综述, 姜 悦 审校

(中山大学附属第一医院检验医学部 510080)

关键词:糖皮质激素抵抗; 糖皮质激素受体; 基因突变; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.024**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)08-0940-03

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是由肾上腺皮质束状带分泌的一类甾体激素,分泌受下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴的调节,参与多种生理病理功能的调节,是机体最重要的内分泌激素之一,临床上 GC 被广泛应用于类风湿关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病(IBD)等自身免疫性疾病,以及免疫性肾炎、慢性阻塞性肺病(COPD)等慢性炎症性疾病和小儿白血病等肿瘤的治疗,发挥其抗炎和免疫抑制作用。但是,在临床应用中发现相当一部分人对 GC 不敏感,甚至产生抵抗,严重影响疾病的治疗,因此,研究其抵抗机制,并且根据机制制定出诊断 GC 抵抗的方法显得十分重要。长期以来,人们进行了很多研究,但是目前 GC 抵抗的机制尚未明确。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)作为糖皮质激素发挥作用的介导是 GC 抵抗研究的重要方面,GR 突变是 GC 抵抗最重要的分子机制之一。

1 hGR 的结构及其功能机制

糖皮质激素受体属于核受体超家族,与盐皮质激素受体、黄体酮受体、雄激素受体具有高度相似性,其相对分子质量为 94×10^3 ,位于细胞质内,未与配体结合时,是以多蛋白复合体的形式存在的,其伴侣蛋白主要有热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)90、Hsp70、免疫亲和蛋白和 p23 等。当 GR 与配体结合后,其构象发生改变,从蛋白复合体中解离,在核定位序列(nuclear location signals, NL)的介导下转入核内,以二聚体的形式与糖皮质激素相关基因的反应原件(glucocorticoid response elements, GRE)结合,并与共激活因子结合,特别是 p160 家族中的 GRIP1(glucocorticoid receptor interacting protein 1),启动或抑制相应基因的转录,从而发挥 GC 的作用^[1]。

人类糖皮质激素基因(nuclear receptor superfamily3, group C, member 1, NR3C1)位于染色体的 5q31~32 区,由 9 个外显子和 8 个内含子构成,外显子 1 和外显子 2 的起始部分为 5'非编码区,外显子 2 的其余部分构成了 N 末端区(N-terminal domain, NTD),起始密码子位于 NTD,外显子 3 和外显子 4 构成了 DNA 结合区(DNA-binding domain, DBD),外显子 5 到外显子 9 包含了铰链区(hinge range, HR)和配体结合区(ligand-binding domain, LBD)。hGR 有 hGR α 和 hGR β 两个亚型,是由于外显子 9 的不同剪切构成的。糖皮质激素的主要生理作用均由 hGR α 介导的,它由 777 个氨基酸构成,NTD 由第 1~420 位的氨基酸构成,DBD 和 HR 由第 421~526 位的氨基酸构成,LBD 由第 527~777 位的氨基酸构成,能够与 GC 结合,是其产生作用的基础,同时它还有两个内源性的转录活性单位(activation function, AF) AF-1 和 AF-2,是通过与共激活因子结合来发挥转录调节作用,AF-1 位于氨基端,作用时不依赖糖皮质激素,AF-2 位于羧基端,属于糖皮质激素依赖型^[2]。hGR β 包含 742 个氨基酸,不能与 GC 结合,但能够与 DNA 结合,能对 hGR α 的作用产生负面影响,最近研究显示,hGR β 还

可在 hGR α 存在的情况下影响基因的表达^[3]。

hGR α 的 LBD 由 12 个 α -螺旋和 4 个小 β -肽链形成一个 3 层的螺旋区域,其中螺旋 1 和 3、7 和 10 分别形成 3 层结构的末端,螺旋 4、5、8、9 形成中层的顶部^[3-4]。在螺旋 12 尾部有一条延长的肽链,形成一个紧密的 β -折叠和一条 β -肽链,该肽链位于螺旋 8 和 9 之间,并且参与螺旋 12 稳定。此外,LBD 的配体结合口袋由螺旋 3、5、11、12 构成,与配体结合后螺旋 11 和 12 的构象发生变化,形成能够与相应的共激活因子结合的 AF-2 界面^[5]。

2 GC 抵抗的分子机制

2.1 突变影响 NR3C1 功能的机制 GR 是 GC 的作用基础,故 GR 基因的突变是 GC 抵抗的重要机制之一。到目前为止,GC 抵抗的机制仍然在不断研究中,由于 GC 作用过程复杂,且抵抗可以发生在这个过程中的一个或多个环节。GR 基因的突变主要位于 DBD 和 LBD,特别是 LBD,各种报道显示,GR 基因(NR3C1)的突变和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)都会影响 hGR α 作用的分子机制,改变了组织对 GC 的敏感性,从而使机体产生 GC 抵抗^[6]。相关研究表明,GR 基因突变对 GC 作用的影响主要通过以下几个机制进行:(1)突变 GR 与配体结合的亲和力;(2)突变 GR 是否影响正常 GR 对配体的亲和力;(3)突变 GR 细胞内定位及其与配体结合后核转位时间的快慢;(4)突变 GR 与 GRE 的结合能力;(5)突变 GR 转录活性的变化;(6)突变 GR 与共激活因子 GRIP1 的异常相互作用。

2.2 检测 NR3C1 突变对功能影响的方法 地塞米松结合实验(whole-cell dexamethasone binding assays)是用于检测突变 GR 与配体结合亲和力和的一种方法。除了 hGR α 477H 和 C421Y 外,其他突变均可导致 hGR α 相对亲和力降低,尤其是 hGR α I559N 和 hGR α V571A 明显下降^[7-10]。由于螺旋 5、11、12 均参与构成 GR 的配体结合口袋,hGR α I559N 和 hGR α V571A 位于螺旋 5,而 hGR α V729I、hGR α F737L、hGR α I747M、hGR α L773P 等靠近螺旋 11 和螺旋 12^[11-12]。此外,hGR α R714Q 突变前的精氨酸对配体结合口袋的形成也有重要作用^[13]。突变改变了配体结合口袋的形成,又因为 2439insA 等为框移突变,使得相应的蛋白质序列改变,从而使 GR 与配体的结合能力降低^[14-15]。

反式激活作用分析(transactivation assays)是用于检测突变 GR 对于正常 GR 的有无影响的方法。hGR α I559N、hGR α F737L、hGR α D641V、hGR α I747M 和 hGR α L773P 都对正常 GR 的作用有负面影响。其中 hGR α F737L 呈时间依赖性,即在暴露于配体后的较短时间(3~6 h)即具有这种特性,且 hGR α F773L 和 hGR α I747M 的负性作用会随着其与正常 GR 比率的增加而加强^[13-14]。

荧光受体的定位分析[detection and localization of green fluorescent protein (GFP)-fused hGRs]是用于检测 GR 在细胞

内的定位及其与配体结合后核内转位的速度的方法。在不含地塞米松的情况下,突变 GR 和正常 GR 都位于细胞质内。在相同的地塞米松浓度下与配体结合后,两者都向细胞核内转位,但突变 GR 的核转位时间明显慢于正常 GR(12 min)。GR 的核内转移是在两个核定位序列 NL1 和 NL2 的参与下进行的,NL1 位于 DBD 和 LBD 的交界区,NL2 位于 LBD 区,突变 GR 的 NL1 功能受损,不仅影响 GR 与配体的结合能力,而且影响配体诱导的受体构象变化;若同时突变 NL2,影响了 LBD 的正常结构,使得突变 GR 向核内转位的时间延长。此外,突变 GR 和正常 GR 与热休克蛋白(Hsp)的不同结合也会使 NL1 和 NL2 的作用部分降低^[16]。

染色体免疫共沉淀反应(chromatin immunoprecipitation assays)是用于检测突变 GR 与糖皮质激素反应原件(glucocorticoid response element,GRE)结合能力的方法。在已知的突变位点中,hGR α C421Y、hGR α R477H 和 hGR α R366X 等框移突变导致终止密码子,不能与 GRE 结合,使 DBD 与 DNA 的结合功能受损^[17]。此外,突变 GR 会降低正常 GR 与 GRE 的结合能力。唯有 hGR α C638S 突变可导致 GR 与 GRE 的结合能力增强。

蛋白质印迹分析(western blot analyses)是用于检测突变 hGR α 和正常 hGR α 的蛋白质表达差异的方法。1615delA、2350delT、2439insA 等引起的框移突变,会使得突变后的氨基酸序列发生改变,R469X、G679S 等突变会使得终止密码子提前,均可使蛋白质的表达发生异常改变^[18-20]。

荧光素酶和 β -半乳糖苷酶分析(luciferase and β -galactosidase assays)是用于检测突变 GR 转录活性的方法。大部分突变 GR 均表现为转录活性的降低,其中 hGR α R366X、hGR α C421Y 和 hGR α R477H 无转录活性,这与突变后受体不能与 GRE 正常结合有关^[16]。另外 hGR α M565R、C638S 和 A573Q 的转录活性增加^[21]。

GST pull-down 实验(glutathione-S transferase pull-down assays)是用于分析突变 GR 与共激活因子 GRIP1 相互作用的方法。突变 GR 中 hGR α R477H 能通过 AF-1 和 AF-2 与 GRIP1 正常结合,hGR α I559N 不能与 GRIP1 结合,其余均是与 GRIP1 以异常方式结合。正常情况下,GR 与 GRIP1 通过 AF-1 和 AF-2 结合形成复合体并发生相互作用,使得结合 DNA 的构象发生改变,启动或者抑制相应靶 DNA 的转录,螺旋 12 在 AF-2 界面形成方面有重要作用。所以靠近螺旋 12 的突变位点 559、729、737、747、773 等均会影响 AF-2,螺旋 12 的稳定还受位于螺旋 8 和 9 之间的一条 β 链的影响,因此位于其间的突变位点 679 也会影响 AF-2,另外 714 位点的精氨酸也对 AF-2 的形成有重要影响,该点突变会降低其与 GRIP1 的 LXXLL 模体的结合^[16]。此外,框移突变后氨基酸序列改变也会影响螺旋 12 的形成和稳定性。

2.3 NR3C1 多态性对功能的影响 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)是由于单个核苷酸变异而引起的 DNA 序列改变,其也被认为是 GC 抵抗的重要分子机制之一。研究报道表明,NR3C1 含有大量的 SNP,目前发现与 GC 敏感性相关的基因主要有:TthIII I(rs10052957)、ER22/23EK(rs6189 和 rs6190)、N363S(rs6195)、BclII(rs41423247)、GR-9 β (rs6198)等。

TthIII I 是限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)的一种,是 hGR mRNA 的 3 807 bp 处 C $\rightarrow$ T 形成的,与 hGR α 的敏感性降低有关^[22]。然而由于它与 ER22/23EK 有一定的联系,故有报道称 TthIII I 不能

单独发挥效应^[23-24]。且 Zobel^[24] 发现在单相抑郁症患者 TthIII I 多态性常增加。ER22/23EK 是在两个相连的密码子 22 和 23 处:GAG AGG $\rightarrow$ GAA AAG,从而使得 22 位的谷氨酸被精氨酸取代,23 位的谷氨酸被亮氨酸取代,ER22/23EK 在 GR-A 上有较高的表达^[25-26]。Yudt 和 Cidlowski^[27] 报道称,GR 翻译后至少有 GR-A 和 GR-B 两种受体,GR-B 的转录活性大于 GR-A,高表达 ER22/23EK 的 GR-A 可能对 GR-B 的活性产生抑制,所以 ER22/23EK 多态性所导致的低活性 GR 增加可能是 GC 抵抗的机制之一。N363S 是位于外显子 2 的第 363 位密码子处 AAT $\rightarrow$ AGT,使得相应的氨基酸由天冬酰胺突变为色氨酸,它与提高 GC 的敏感性有关,有报道称相比正常的 GR,N363S 能够调节一些新的基因,其产生的影响可能提高 GC 的敏感性,但具体机制至今尚不十分清楚^[28]。BclII 也是 RFLP 的一种,位于第 2 内含子中,其在外显子 2 下游 646 个 bp 处 C $\rightarrow$ G 形成^[29]。通过影响 GR 来提高 GC 的敏感性,由于其多态性在内含子,既不与编码氨基酸的密码子有关,也不与基因的调节和断裂点有关,故其机制尚不清楚,可能是因位于基因编码的起始区,或者与某个具有功能的重要多态性相连等^[30]。GR-9 β 是 GR β 第 9 外显子的 UTR 的模体 ATTTA $\rightarrow$ GTTTA,该模体与 mRNA 的稳定性有关,发生多态性变化后可能导致 GC 抵抗。Derijk^[31] 报道 9 β 多态性会使得 GR β 的表达和稳定性增加,抑制 GR α 的功能。Akker^[32] 研究发现 9 β 多态性会使得其对炎症因子的反式抑制作用减弱,引起炎症系统的活化。

此外,还有一些多态性与 GC 的敏感性有关,其中 D401H 在不同的组织中可以表现出或增加 GC 的敏感性或者出现 GC 抵抗^[33]。-22C/A 可能增加 GC 的敏感性,而 NR3C1-1、2314insA、S651F 等都可能与 GC 抵抗有关,它们都是通过影响 GR 的功能导致 GC 敏感性的改变^[34-36]。

3 小 结

目前,糖皮质激素的抵抗机制受到越来越多的关注,但是由于 GC 作用过程的复杂性,其机制至今尚未完全阐明。人们希望通过对其机制的研究找到一种方法能够在用药前对 GC 抵抗进行诊断,以提高激素用药的有效性,减轻用药带来的抵抗和不良反应。随着分子克隆技术的发展,对 GR 研究的日渐深入,在 GC 抵抗的分子机制方面也有了很大的进步,不断有新的突变被发现,如最近新发现的突变位点 hGR α T556I,已证实其在 GC 抵抗中的作用^[37]。相信通过分子生物学技术检测 GR 突变来诊断 GC 抵抗是可行的,需要在未来的工作中对突变信息进一步完善,提高分子检测的灵敏度和准确度。

参考文献

- [1] Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006, 102(5): 11-21.
- [2] Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 83(5): 37-48.
- [3] Kino T. Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(4): 671-675.
- [4] Charmandari E. Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(5): 1563-1572.
- [5] Bledsoe RK. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and

- coactivator recognition[J]. *Cell*, 2002, 110(1): 93-105.
- [6] Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Identification of natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutations or polymorphisms and their functional consequences at the hormone-receptor interaction level[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 590(41): 33-60.
- [7] Charmandari E. Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGRalpha R477H and hGRalpha G679S associated with generalized glucocorticoid resistance[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(4): 1535-1543.
- [8] Powers JH. Cloning and expression of mutant glucocorticoid receptors from glucocorticoid-sensitive and resistant human leukemic cells[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(17): 4059-4065.
- [9] Bray PJ, Cotton TG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene(NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(6): 557-568.
- [10] Charmandari E. Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission and clinical phenotype[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4): 1939-1949.
- [11] Charmandari E. A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(10): 3986-3990.
- [12] Charmandari E. A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance; the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(6): 3696-3705.
- [13] Nader N. A novel point mutation in helix 10 of the human glucocorticoid receptor causes generalized glucocorticoid resistance by disrupting the structure of the ligand-binding domain[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5): 2281-2285.
- [14] Trebble P. Familial GC resistance: a novel, naturally occurring mutation which has dominant negative effects on ligand dependent and independent GR action, 2010, 95(12): 15-18.
- [15] Jiang T. The phase-shift mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis[J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 313(2): 113-117.
- [16] Kino T. Pathologic human GR mutant has a transdominant negative effect on the wild-type GR by inhibiting its translocation into the nucleus; importance of the ligand-binding domain for intracellular GR trafficking[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(11): 5600-5608.
- [17] Swlith MK. Nelson's syndrome associated with a somatic frame shift mutation in the glucocorticoid receptor gene[J]. *JMA*, 1996, 81(1): 124-129.
- [18] Schmidt S. Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor[J]. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2600-2602.
- [19] Hala M. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines[J]. *Int J Cancer*, 1996, 68(5): 663-668.
- [20] Bouligand J. Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): 13563-13566.
- [21] Warriar NC, Yu MV, Govindan L. Hormone binding domain of human glucocorticoid receptor. Enhancement of transactivation function by substitution mutants M565R and A573Q[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(46): 29010-29015.
- [22] Rosmond R. A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men[J]. *Metabolism*, 2000, 49(9): 1197-1199.
- [23] Rossum EF. Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004, 61(5): 573-581.
- [24] Zobel A. Unipolar depression and hippocampal volume: impact of DNA sequence variants of the glucocorticoid receptor gene[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147(6): 836-843.
- [25] Koper JW. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance[J]. *Hum Genet*, 1997, 99(5): 663-668.
- [26] Russcher H. Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(7): 1687-1696.
- [27] Yudit MR, Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor[J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(7): 1093-1103.
- [28] Jewell CM, Cidlowski JA. Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(8): 3268-3277.
- [29] Rossum EF. Identification of the BelI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene; association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 59(5): 585-592.
- [30] Manenschijn L. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms[J]. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1179(16): 179-198.
- [31] Derijk RH. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2001, 28(11): 2383-2388.
- [32] Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(7): 2800-2803.
- [33] Charmandari E. A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(12): 4963-4968.
- [34] Ikeda Y. A polymorphism in the promoter region of the glucocorticoid receptor gene is associated with its transcriptional activity[J]. *Endocr J*, 2001, 48(6): 723-726.
- [35] Kumsta R. Characterization of a glucocorticoid receptor gene (GR, NR3C1) promoter polymorphism reveals functionality and extends a haplotype with putative clinical relevance[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2009, 150(4): 476-482.
- [36] Koyano S. Functional analysis of three genetic polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1): 110-116.
- [37] Zhu HJ. Generalized glucocorticoid resistance accompanied with an adrenocortical adenoma and caused by a novel point mutation of human glucocorticoid receptor gene[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(4): 551-555.