

软体动物维甲酸 X 受体研究进展

李 维 王淑红* 王艺磊 王国栋 邹志华

集美大学水产学院 厦门 361021

摘要: 维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 作为配体依赖的转录因子, 是核受体超家族重要的一员。脊椎动物 RXR 与配体及其辅调节因子相互作用, 调控基因的协调表达, 在胚胎发育、细胞分化、新陈代谢等许多生理过程中起着重要作用。软体动物 RXR 的研究因其与腹足类性畸变的关系越来越受到关注。本文综述了目前获得的软体动物 RXR 基因的结构, 比较了软体动物 RXR 基因各功能结构域与人类和其他动物 RXR 的相似性。以 RXR 编码区的氨基酸序列为基础, 构建了系统进化树, 发现软体动物 RXR 与脊索动物而不是其他无脊椎动物的 RXR 聚成一支。软体动物和甲壳动物不同 RXR 亚型的氨基酸序列比较发现, 两类动物可能存在不同的剪切酶或剪切位点。此外论文还针对软体动物 RXR 的配体、二聚体伙伴以及生理功能等方面的研究进行了综述。

关键词: 维甲酸 X 受体; 软体动物; 性畸变

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)04-655-10

Retinoid X Receptor in Mollusc

LI Wei WANG Shu-Hong* WANG Yi-Lei WANG Guo-Dong ZOU Zhi-Hua

Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: Retinoid X receptor (RXR) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors that have been characterized in a wide variety of species. In vertebrates, RXR functions as either homo- or hetero-dimers to regulate expression of target genes. RXR is important in a variety of physiological events including embryo development, cell-proliferation, metabolism and regeneration. The investigation of molluscan RXR is of particular interest due to its involvement in neogastropods imposex. In this review, we compared the amino acid sequence of molluscan RXRs with human RXR α and other vertebrate RXRs and performed phylogenetic analyses. Parsimony analyses of 22 invertebrate and vertebrate RXRs indicated that the molluscan RXRs were analogous to chordate RXRs. The alignment of amino acid of different isoforms of molluscs and crustaceans indicated that different cutting enzymes or splice sites should exist in T-box. In addition, we discussed the ligand, dimer partner, and physiological function of molluscan RXRs.

Key words: Retinoid X receptor; Mollusc; Imposex

维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 是核受体 (nuclear receptor, NR) 超家族中重要的一员, 可与多种其他核受体如维甲酸受体 (retinoid acid receptor, RAR)、甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR) 和维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 等形成二聚体作为转录因子, 参与动物个体发育、代谢、细胞分化、细胞增殖以及细胞凋亡等众多生理学过程。核受

体作为配体依赖的转录因子, 特异配体与核受

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 20877034), 福建省科技重点项目 (No. 2011N0022), 集美大学创新团队基金项目 (No. 2010A001);

* 通讯作者, E-mail: shwang@jmu.edu.cn;

第一作者介绍 李维, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水生生物学; E-mail: joeney007@foxmail.com。

收稿日期: 2013-03-06, 修回日期: 2013-05-17

体的配体结合域(ligand binding domain, LBD)结合后,激活二聚体转录因子,调控下游基因的表达。这种依赖于脂溶性配体的核受体活性,使其信号转导通路的激活与抑制容易操作,也可根据 LBD 的结构特点,人工设计核受体的激动剂以及拮抗剂。已有大量研究表明,这些核受体介导的信号转导通路涉及 II 型糖尿病(Evans et al. 2004)、癌症(Michalik et al. 2004, Knudsen et al. 2010)和心血管病(Shulman et al. 2005)等多种疾病。因此,RXR 成为多种药物设计的靶,吸引了众多研究者的目光(Aagaard et al. 2011)。此外,配体依赖的核受体的激活方式,也使得一些结构类似于配体的环境污染物得以通过这些核受体干扰生物的正常生理学过程(Jiang et al. 2012)。因此,RXR 在医学和环境科学领域都占据十分重要的地位,在过去的十几年间,很多学者对脊椎动物尤其是人类 RXR 的基本基因结构和分型(α 、 β 和 γ)(Mangelsdorf et al. 1992)、蛋白质空间构型(Bastien et al. 2004, Lefebvre et al. 2010)、转录后修饰(RXR 蛋白磷酸化)(Lefebvre et al. 2010)、与靶基因调控区域 REs 的结合(Wei 2004)、与配体(ligand)的结合(Aagaard et al. 2011, Dawson et al. 2012)、与其他转录因子或蛋白分子的相互作用以及辅调因子(coregulator)等(Wei 2003, McKenna 2012)多个方面进行了出色的研究与综述。

研究表明,几乎所有的动物门类,包括海绵、扁形动物、线虫动物、腔肠动物、节肢动物、软体动物、棘皮动物和脊索动物都存在 RXR。然而,哺乳动物之外有关 RXR 的研究多集中在昆虫和甲壳类(Durica et al. 2002, Hopkins et al. 2008),主要是由于节肢动物生长发育的重要激素——蜕皮激素是通过与 RXR 形成异源二聚体而发挥其生理功能的。软体动物作为仅次于节肢动物的动物界的第二大类群,RXR 的研究一直未受到关注。直到 21 世纪初,一些研究发现 RXR 参与了 TBT 诱导腹足类性畸变的过程,人们才开始关注软体动物的 RXR。一些软体动物主要是腹足类的 RXR 相继被克隆,包

括疣荔枝螺(*Thais clavigera*)(Nishikawa et al. 2004)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)(Bouton et al. 2005)、狗岩螺(*Nucella lapillus*)(Castro et al. 2007)、泥螺(*Ilyanassa obsoleta*)(Sternberg et al. 2008)和静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)(Carter et al. 2010)。研究者不仅分析了 RXR 基因的结构,也探讨了 RXR 的配体以及在性畸变和性腺发育中的功能。本文将对软体动物 RXR 的相关研究进展进行综述,希望通过软体动物与其他门类 RXR 的比较,进一步了解这一古老而重要的转录因子的生物演化过程,并为软体动物 RXR 生物学功能的研究提供基础资料。

1 RXR 基因结构分析

RXR 是核受体超家族的一员,与其他核受体类似,RXR 蛋白也具有典型的六个结构域。从 N 端开始,依次为 A/B 区,包含一个本身有活性的配体非依赖性的转录激活域(AF1)。然后是最保守的 C 区,也称 DNA 结合区(DNA binding domain, DBD),该结构域介导核受体与位于靶基因启动子区域的特异顺向重复序列也称反应元件(response elements, RE)结合。之后是 D 区或铰链区,在 DNA 结合区(C 区)和配体结合区(E 区)之间起连接作用。与 D 区相邻的 E 区或配体结合区(ligand binding domain, LBD)序列高度保守,以充分保证选择型配体的识别。该区含一个配体依赖性的转录激活域(AF2),它能传递配体结合信号,控制配体依赖的转录和激活,同时也是二聚体化的形成部位。最后是 F 区,在 E 区的 C 端外,F 区的序列高度可变,其结构和功能尚不十分清楚(Mangelsdorf et al. 1992, 张艳等 2007)。

以杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)RXR 的氨基酸序列为基准,对目前所有已知软体动物 RXR 与人类 RXR α 和果蝇(*Drosophila melanogaster*)超气门蛋白(ultraspiracle, USP)主要功能结构域相似性的比较发现(图 1):软体动物 RXR 物种间的相似性相当高,尤其是两个主要功能区 DBD 和 LBD,相似度都在 90% 以上。从图 1 还

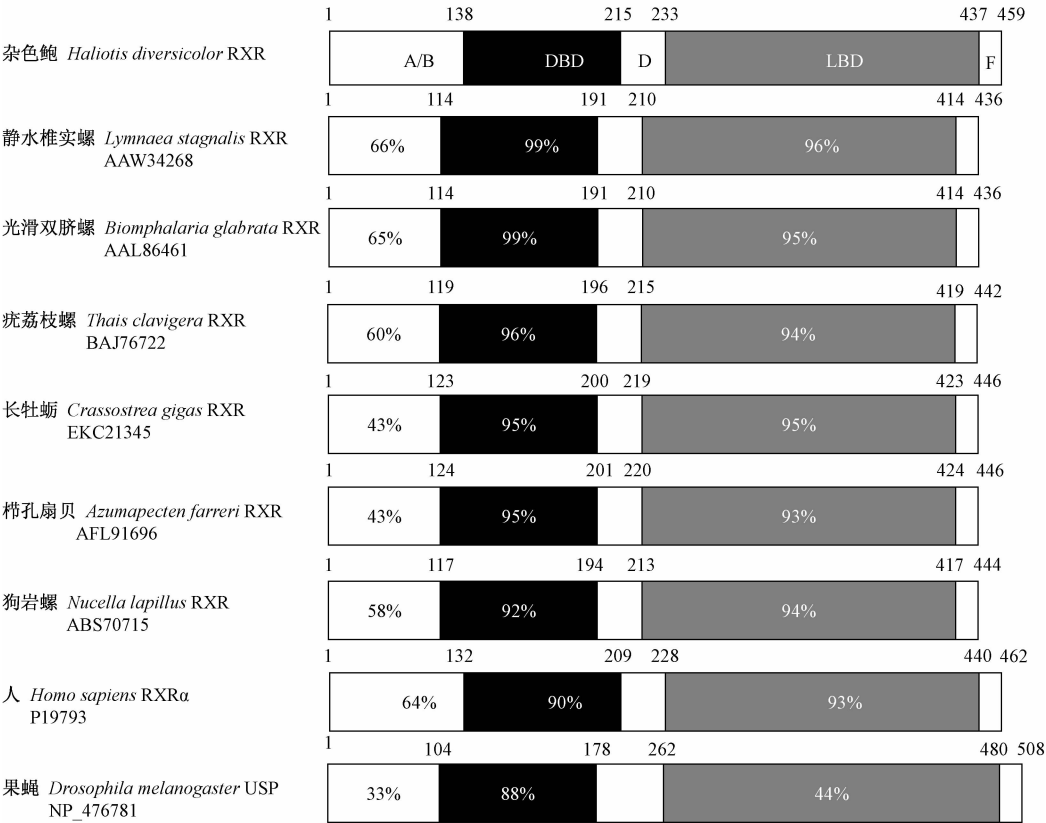


图 1 杂色鲍 RXR 氨基酸序列与其他同源核受体的比较

Fig.1 Comparison of amino acid sequences of *Haliotis diversicolor* RXRs with other homogeneous nuclear receptors

图中方框上方数字表示不同物种 RXR 结构域的位置,黑色部分为 DBD,灰色部分为 LBD,白色部分为 A/B 区、D 区和 F 区;RXR 表示维甲酸 X 受体,USP 表示超气门蛋白;方框中数字表示对应物种 RXR 相应结构域与杂色鲍的相似度;图中左侧为不同物种名称及 RXR 氨基酸序列的 GenBank 登录号,其中杂色鲍 RXR 序列为作者克隆,未提交数据库。

The numbers above boxes indicate amino acid positions of different RXR domains. DBD is indicated in black while LBD is in gray, and A/B, D and F domains are in white. RXR is retinoid X receptor, USP is ultraspiracle; numbers inside the boxes show similarity of small abalone RXR with other nuclear receptors. The species name and GenBank accession number for each RXR sequence is on the left of box(the RXR sequence of *Haliotis diversicolor* is cloned by author which is un-submitted).

可以看出杂色鲍 RXR 与人类 RXRα 也具有较高的相似性,DBD 和 LBD 的相似度分别为 90% 和 93%;而杂色鲍 RXR 与果蝇 USP 在 DBD 的相似度为 88%,LBD 的相似度仅为 44%,这说明软体动物 RXR 在结构上更接近于脊椎动物的 RXR。此外,将软体动物 RXR 的 DBD 与人类 RXRα 进行多序列比对发现:软体动物 RXR 的 DBD 包含的几个与 DNA 结合相关的重要结构域(P-box,D-box,T-box)几乎和人类 RXRα 在该区域的序列完全一致。

这些结构域决定 RXR 与下游基因 DNA 的特异结合(Bouton et al. 2005),这表明软体动物 RXR 对下游基因的调控机制可能与人类 RXRα 类似,即软体动物 RXR 可能和人类 RXRα 相同,通过与靶基因调控区同样的 RE 序列结合而调控下游基因的表达。

2 软体动物不同 RXR 亚型的结构分析

Castro 等(2007)研究狗岩螺 RXR 时发现,有几个克隆在 NIRXR 的 DNA 结合域 T-

box 区域的丙氨酸 (alanine, A) 和缬氨酸 (valine, V) 之间插入了 5 个氨基酸 (CLSTA), 说明 NIRXR 存在另外一个亚型。Urushitani 等 (2011) 随后也克隆到疣荔枝螺 RXR 的两种亚型。与 NIRXR 的情况类似, TcRXR 的另一种亚型也是在 T-box 区域 A 和 V 之间插入了 5 个氨基酸 (CLSSA)。我们在杂色鲍中也克隆到了 HdRXR 的 2 种亚型, 与狗岩螺和疣荔枝螺类似, 两种亚型的差异也出现在 T-box 区域的 A 和 V 之间, 不同的是杂色鲍插入了 4 个氨基酸 (LLAA) (图 2)。此外, 在 NCBI 数据库还发现另外一种双壳类软体动物栉孔扇贝 (*Azumapecten farreri*) RXR 存在 4 种亚型: 其中一种亚型与 HdRXR 类似, 在 T-box 区域有 4 个氨基酸序列插入 (CLAA); 另外两种亚型也是在同一位置插入不同长度的氨基酸序

列, 分别为 20 和 24 个氨基酸 (图 2)。由此推测, 软体动物 RXR 的 mRNA 在转录过程中可能在 T-box 区域有不同的选择性剪切。T-box 是 RXR 重要的 DNA 结合功能区, 除插入的氨基酸序列外, 具有共同的氨基酸序列 KREAVQEER, 在 RXR 形成同源二聚体或异源二聚体过程中是至关重要, 还在 RXR 与下游基因的结合中起重要作用。在该区域的不同剪切表明, 不同亚型可能参与调控不同的下游基因。

有趣的是, 甲壳类中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) 和褐虾 (*Crangon crangon*) 的 RXR 亚型中也存在类似的插入片段, 不同的是甲壳类的插入位置是 T-box 的谷氨酰胺 (glutamine, Q) 和谷氨酸 (glusate, E) 之间 (图 2)。不同亚型氨基酸插入

AfRXR a:	AFL91696	166	DRNCVIDKQRNRCQYCRYMKCLAMGMKREA-----	VQEER	201
AfRXR b:	AFL91697	166	DRNCVIDKQRNRCQYCRYMKCLAMGMKREA-----	CLAAVQEER	205
AfRXR c:	AFL91698	166	DRNCVIDKQRNRCQYCRYMKCLAMGMKREAINSSPSSGSSSISG-----	LDPDEAVQEER	221
AfRXR d:	AFL91699	166	DRNCVIDKQRNRCQYCRYMKCLAMGMKREAINSSPSSGSSSISDLPDEACLAAVQEER		225
TcRXR a:	BAJ76722	161	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREA-----	VQEER	196
TcRXR b:	BAJ76723	161	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREA-----	CLSSAVQEER	201
NlRXR a:	ABS70715	159	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREA-----	VQEER	194
NlRXR b:	ABS70716	159	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREA-----	CLSTAVQEER	199
HdRXR a:	(未提交)	180	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLSMGMKREA-----	VQEER	215
HdRXR b:	(未提交)	180	DKNCMIDKQRNRCQYCRYMKCLSMGMKREA-----	LLAAVQEER	219
FcRXR a:	ACN78601	154	ERGCTIDKQRNRCQYCRYQKCLSMGMKREAVL-----	VGAAEEER	194
FcRXR b:	ACN78602	154	ERGCTIDKQRNRCQYCRYQKCLSMGMKREAVQ-----	EER	189
GlRXR a:	AAZ20368	111	ERSCTIDKQRNRCQYCRYQKCLTMGMKREAVQ-----	VGAVEGER	151
GlRXR b:	AAZ20369	111	ERSCTIDKQRNRCQYCRYQKCLTMGMKREAVQ-----	EER	146
CcRXR a:	ACO44668	116	DRACTIDKQRNRCQYCRYQKCLGMGMKREAVQ-----	VGGIEEER	156
CcRXR b:	ACO44669	116	DRACTIDKQRNRCQYCRYQKCLGMGMKREAVQ-----	EER	151

图 2 软体动物和甲壳动物 RXR 不同亚型氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of different RXR isoforms from molluscs and crustaceans

图中序列两端的数字表示氨基酸序列的位置, “-”表示氨基酸序列在该位置缺失; 图中左侧为不同物种的 RXR 及其氨基酸序列的 GenBank 登录号, “a、b、c、d”表示 RXR 不同的亚型; Af. 栉孔扇贝, Tc. 疣荔枝螺, Nl. 狗岩螺, Hd. 杂色鲍 (序列为作者克隆, 未提交数据库), Fc. 中国对虾, Gl. 地蟹, Cc. 褐虾。

The numbers at two ends of sequence indicate the positions of amino acids; “-” indicates amino acid deletion at the position. RXRs from different species and their accession numbers in GenBank are in the left, “a, b, c, d” indicate different RXR isoforms; Af. *Azumapecten farreri*; Tc. *Thais clavigera*; Nl. *Nucella lapillus*; Hd. *Haliotis diversicolor* (un-submitted); Fc. *Fenneropenaeus chinensis*; Gl. *Gecarcinus lateralis*; Cc. *Crangon crangon*

位置的不同可能与软体动物和甲壳动物 mRNA 加工过程中剪切酶的作用位点不同有关。尽管 Sternberg 等 (2008) 在泥螺只克隆了插入 5 个氨基酸的 RXR 型,光滑双脐螺 (Bouton et al. 2005) 和静水椎实螺 (Carter et al. 2010) RXR 也尚无有关 RXR 亚型的报道,但我们有理由相信 RXR 在 T-box 区域的选择性剪切在软体动物和甲壳类中可能是普遍的剪切方式,其他软体动物也可能存在 RXR mRNA 的转录后加工。

3 软体动物 RXR 的系统进化分析

将软体动物 RXR 和其他不同门类动物的 14 个 RXR 氨基酸序列进行 ClustalW 分析,再使用 Phylip3.69 软件以最大简约法构建系统进化树 (图 3),海绵 (*Suberites domuncula*) 定义为群外种。在图 3 中,软体动物双壳类长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和栉孔扇贝各自成一支,腹足类聚成一支,其中杂色鲍属前鳃亚纲原始腹足目,与肺螺亚纲基眼目静水椎实螺和后鳃亚纲异鳃总目光滑双脐螺聚在一支,同为新腹足目的疣荔枝螺和狗岩螺聚为一支。按动物不同门类分析,扁形动物曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、腔肠动物水母 (*Tripedalia cystophora*) 和线虫动物马来丝虫 (*Brugia malayi*) 各自一支;其他物种分为两大支:节肢动物自成一,软体动物和棘皮动物、半索动物以及脊索动物聚成一支。这与图 1 各重要功能结构域相似性比较的结果一致,即软体动物 RXR 与脊索动物 RXR 在结构和功能上更为接近,而与其他无脊椎动物的 RXR 则相差甚远。类似的进化关系在软体动物和甲壳动物酚氧化酶进化树中也同样出现 (吴曙等 2009),这些分子生物学的演化证据,对传统的动物分类及进化关系的界定提出了严峻的挑战。Adoutte 等 (2000) 在 PNAS 发表文章指出,DNA 序列分析对系统进化树有了新的阐释。那些因结构简单而被认为进化地位较低进而被划分在多细胞动物进化树底层的类群在分子进化树中升至较高的位置,如本文涉及的软体动物。这种结果导致过渡物种的消失,促使我们不得不重新考虑复杂的两侧对称

动物的起源。

4 软体动物 RXR 配体的研究

绝大多数核受体都是配体依赖的转录因子,其转录活性的激活需要配体与受体的结合。配体通常都是一些小的亲脂性分子,比如类固醇、甲状腺激素、视黄酸和脂肪酸。它们特异地与 LBD 的保守功能区结合后引起 LBD 构象的变化,进而释放辅抑制因子或者结合辅激活因子。软体动物 RXR 的 LBD 跟人类 RXR α 的一样,由 11 个 α 螺旋和 2 个 β 转角组成,序列都很保守 (Bouton et al. 2005)。AF-2 区位于螺旋 H12,软体动物 RXR 和人 RXR α 编码 AF-2 区的氨基酸序列完全相同。该区域氨基酸序列的保守说明软体动物 RXR 可能具有脊索动物 RXR 类似的配体。

9-顺式维甲酸 (9-cis-retinoid acid, 9cRA) 被普遍认为是人 RXR 的天然配体 (Mangelsdorf et al. 1992),而软体动物 RXR 的天然配体尚无定论。Horiguchi 等 (2007) 发现注射 9cRA 可以明显诱导疣荔枝螺的性畸变现象且 RXR 的水平显著升高。此外,Castro 等 (2007) 和 Stange 等 (2012) 向狗岩螺体内注射 9cRA 也发现相同的情况。使用酵母双杂交技术,将光滑双脐螺 RXR 的 LBD 和 *Gal4* 报告基因的 DBD 结合,经 9cRA 或 DHA 处理后能显著诱导报告基因 *Apo-A1-tk-luc* 在 COS-1 细胞系中的表达 (Bouton et al. 2005)。将 NIRXR 的 LBD 与 GST 的 DBD 结合后共转染到大肠杆菌表达,也发现 9cRA 能显著诱导报告基因的表达 (Castro et al. 2007)。最近研究发现 pcDNA3.1-TcRXR 在 9cRA 存在的情况下,也能诱导报告基因 *pRL-Tk* 在 COS-1 细胞系中的表达 (Urushitani et al. 2011)。这些研究表明 9cRA 或 DHA 可以与上述 RXR 结合,激活 RXR 的转录活性。9cRA 与人类 RXR α 的氨基酸结合位点包括 I268、C269、A271、A272、Q275、W305、N306、L309、F313、R316、L326、A327、V342、I345、V349、R371、C432、H435 (Egea et al. 2000)。de Groot 等 (2005) 发现光滑双脐螺 RXR 的 LBD

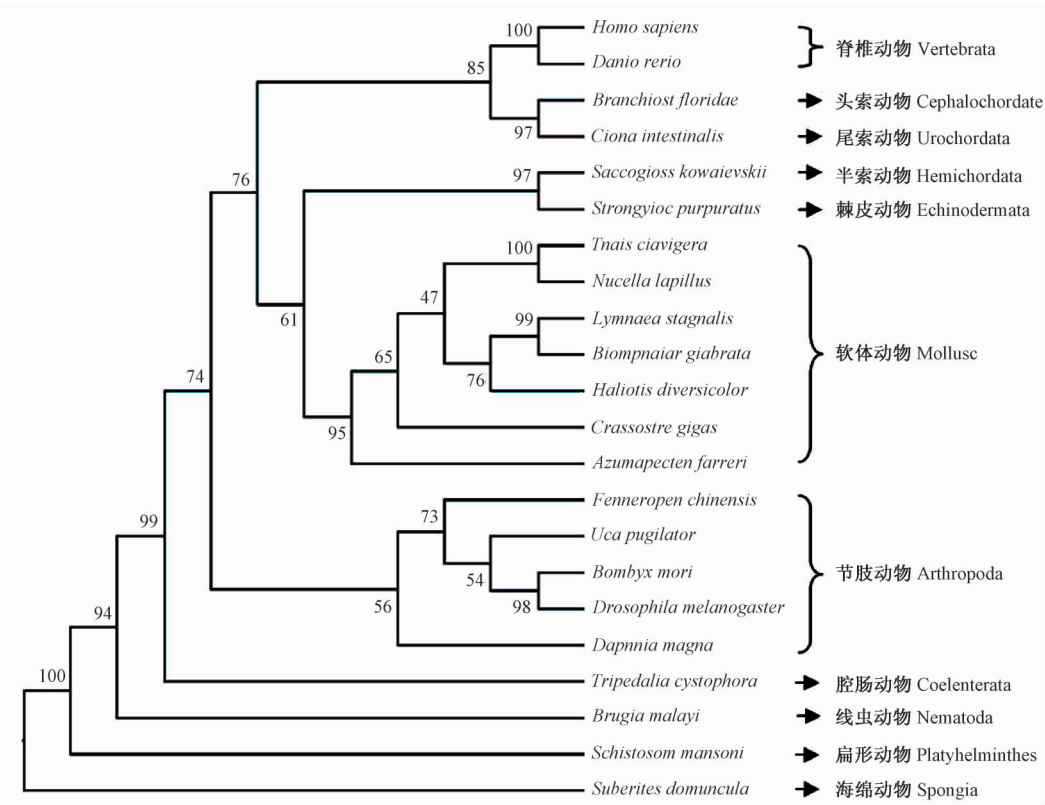


图 3 RXRs 的系统进化树

Fig. 3 Consensus phylogenetic tree of RXRs

用最大简约法(1 000 次重复)对 22 种 RXRs 构建系统进化树,海绵为外群。图中各枝上的数字表示置信度;物种所属门类用箭头或大括号标出。

Consensus phylogenetic tree of 22 RXRs constructed using 1 000 bootstrapped data sets and the parsimony method with the RXR of the sponge *Suberites domuncula* as the outgroup. Number at nodes represent parsimony bootstrap values (%). Classification of the species is marked by arrow and brace.

22 种 RXRs 及其序列号(22 RXRs GenBank accession numbers): *Homo sapiens*. 人, P19793; *Danio rerio*. 斑马鱼, AAC59720; *Branchiost floridae*. 文昌鱼, AAM46151; *Ciona intestinalis*. 海鞘, NP_001071809; *Saccogloss kowalevskii*. 囊舌虫, XP_002731697; *Strongyloc purpuratus*. 海胆, XP_784246; *Thais clavigera*. 疣荔枝螺, BAJ76722; *Nucella lapillus*. 狗岩螺, ABS70715; *Lymnaea stagnalis*. 静水椎实螺, AAW34268; *Biomphalar glabrata*. 光滑双脐螺, AAL86461; *Haliotis diversicolor*. 杂色鲍, 未提交; *Crassostre gigas*. 长牡蛎, EKC21345; *Azumapecten farreri*. 栉孔扇贝, AFL91696; *Fenneropen chinensis*. 中国对虾, ACN78601; *Uca pugilator*. 大西洋招潮蟹, AAC32789; *Bombyx mori*. 家蚕, AAC13750; *Drosophila melanogaster*. 果蝇, NP_476781; *Daphnia magna*. 大型蚤, ABF74729; *Tripedalia cystophora*. 水母, AAC80008; *Brugia malayi*. 马来丝虫, ABQ28715; *Schistosom mansoni*. 曼氏血吸虫, AAD16119; *Suberites domuncula*. 海绵, CAD57002。

与 9cRA 的结合位点跟人类 RXR α 的一样。ClustalW 比对目前 NCBI 数据库中软体动物 RXR 与人类 RXR α 的氨基酸序列后发现,在这些结合位点编码的氨基酸完全一致。Dmetrichuk 等(2008)用高效液相色谱和质谱法在静水椎实螺中枢神经系统中首次检测到全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和

9cRA 的存在。因此,9cRA 很可能也是软体动物的天然配体,软体动物 RXR 其他天然配体的研究尚有待进一步深入。

TBT 是目前研究最多的软体动物 RXR 的环境配体,Nishikawa (2006)用放射性标记法分析了有机锡和 9cRA 与 hRXR α 和腹足类 RXR 结合的 50% 抑制浓度(50% inhibitory

concentration, IC₅₀), 结果显示 hRXR α 和腹足类 RXR 都能结合有机锡和 9cRA。Urushitani 等(2011)用报告基因检测了 9cRA 和有机锡对疣荔枝螺 RXR-1 的转录活性, 9cRA 和 TBT 对 TcRXR-1 的最低激活浓度均为 10^{-8} mol/L。一般来说, RA 含有一个酸性的头部基团和一个长的脂肪链或芳香链可以把 hRXR α LBD 螺旋 5(H5)上的 Arg316 残基和另一侧的 H11 桥连。尽管 TBT 只与 H11 上的一个残基 Cys432 结合,但这种结合足以使 RXR α 稳定在激活状态的构象。比较 hRXR α -TBT 和 hRXR α -9cRA 的空间结构,发现对于大部分区域,与 TBT 结合的残基也属于 9cRA 的结合区(binding pocket)。另外,两种配体诱导同样的残基定位和侧链定向(Egea et al. 2000, Le Maire et al. 2009)。前文(图 1)比对 hRXR α 和软体动物 LBD 的高相似性(>93%)及关键配体结合域残基的完全保守,说明软体动物 RXR 和 hRXR α 有着相似的 LBD 空间结构和共同的环境和天然配体。

5 软体动物 RXR 的二聚体伙伴

在脊椎动物中, RXR 与其他核受体形成异源二聚体而发挥生物学作用。能够与 RXR 形成异源二聚体的有维生素 D 受体(VDR)、甲状腺激素受体(THR)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、肝 X 受体(liver-X receptor, LXR)、胆汁酸受体(bile acid receptor, BAR)等(Wolf 2008)。在节肢动物中, RXR 与蜕皮激素受体(ecdysteroid receptor, EcR)形成异二聚体(Hopkins et al. 2008)。脊椎动物的维甲酸信号通路主要是通过维甲酸受体(RAR)和 RXR 介导, RXR 可形成同源二聚体或与 RAR 形成异源二聚体而调控下游基因的表达(刘桂中等 2000)。有关软体动物二聚体伙伴的研究,目前只在青螺(*Lottia gigantea*)有关于 RAR 基因序列的报道(Albalat et al. 2009)。因此,软体动物 RXR 是以同源二聚体还是以异源二聚体的形式转导维甲酸信号尚不清楚,其信号转导

通路的研究还需要进行广泛而深入的探讨。

6 软体动物 RXR 的生物学功能

RXR 作为核受体家族的重要一员,在哺乳动物中参与胚胎发育、细胞增殖与分化和新陈代谢等许多重要的生理过程,而有关软体动物 RXR 生理功能的研究目前则主要集中在参与有机锡暴露导致的腹足类性畸变和性腺发育方面,也有少量文献涉及到在脂肪代谢、幼体发育以及神经系统发育方面的作用。

Nishikawa 等(2004)发现 RXR 在疣荔枝螺性畸变个体的阴茎和输精管中的表达量显著高于正常个体。随后, Horiguchi 等(2007)实时荧光定量分析发现 TcRXR 的 mRNA 在疣荔枝螺各组织都有表达,在雄性个体和性畸变个体的阴茎和输精管的表达显著高于其他组织。Western blot 分析发现 TcRXR 蛋白在雄性个体的阴茎含量最高,而在雌性个体的阴茎形成区域(penis-forming areas)和雌雄个体的头神经节(head ganglia)的含量较少。免疫组化染色(immunohistochemical staining)分析 RXR 在雄性和性畸变个体的阴茎、输精管中的定位, TcRXR 主要分布在雄性个体阴茎和输精管的上皮细胞及其周围的平滑肌细胞的细胞核,间质组织、表皮和黏液细胞没有分布。这说明 RXR 是由输精管细胞及其周围平滑肌细胞产生的, RXR 参与了正常雄性个体和性畸变雌性个体性器官的分化。但由于缺乏软体动物体内 RXR 天然配体、二聚体伙伴以及下游靶基因的信息, RXR 调控软体动物性腺分化的机制还需要大量的研究证实。

与有机锡通过激活 RXR 主要引起腹足类性畸变不同,有机锡可作为人类 RXR α 、RXR β 、RXR γ 和 PPAR γ 的激动剂,激活 RXR-PPAR γ 而干扰哺乳动物的脂质稳态(lipid homeostasis)和脂肪形成(adipogenesis)(Grun et al. 2006)。即对于哺乳动物而言,有机锡最明显的毒理学效应是环境肥胖因子而不是性畸变。然而,有机锡对脂肪代谢的影响在腹足类也有报道。有机锡暴露明显影响大羊角螺(*Marisa*

cornuarietis) 体内脂肪酸含量和成分 (Janer et al. 2007, Lyssimachou et al. 2009)。Le Maire 等 (2009) 发现 TBT 的锡原子与 Cys432 残基以共价键的方式结合人 RXR α , 从而来激活 RXR-PPAR γ 二聚体的转录活性。由于软体动物 RXR 在该位点与人 RXR α 高度保守并且已有实验证明 TBT 和 TPT 能结合软体动物 RXR (Nishikawa et al. 2004, Castro et al. 2007), TBT 诱导软体动物的脂肪酸变化也很可能是由 RXR-PPAR γ 介导的。因此, TBT 既能诱导腹足类的性畸变也能诱导体内脂肪酸生成和积累, 这可能与生物暴露于 TBT 的时间和当时体内不同组织 RXR 的活跃程度有关。而 TBT 对哺乳动物和腹足类毒性作用的不同, 则可能与 RXR 的异源二聚体伙伴有关: RXR 和不同的核受体形成的异源二聚体, 下游靶基因不同, 调控的生理学过程也各不相同。

在静水椎实螺胚胎中, LsRXR 最早出现在担轮幼虫阶段 (trochophore stage), 在后续每个阶段都有发现且在幼体阶段 (hatchling stage) LsRXR 表达量最高。Western blot 分析发现 RXR 在胚胎的细胞核、细胞质和细胞膜都有分布。用 RXR 激动剂 PA024 和 9cRA 处理胚胎, 发现相当数量经 9cRA 和 PA024 处理的胚胎的眼和壳存在缺陷, 甚至一些胚胎在担轮幼虫期停止发育。用 RXR 的拮抗剂 HX531 处理胚胎后发现所有处理胚胎的壳都存在缺陷, 但是眼睛没有异常。这些结果表明 RXR 与软体动物眼睛发育和壳的钙化有关 (Carter et al. 2010)。此外, 对培养的神细胞进行免疫组化分析发现 LsRXR 蛋白主要分布在神经轴突, 外周神经节和生长锥 (growth cone)。生长锥是神经元发育或再生时呈扇形膨大的末端突起, 对轴突生长的导向性有重要作用 (于晓霞等 2004), 表明软体动物 RXR 还与神经系统的发育有关。

7 结语与展望

综上所述, 软体动物 RXR 基因结构与脊索动物的非常接近, 尤其是 DBD 和 LBD, 在一些

关键功能区如 D-box、P-box、T-box、AF-2 的序列高度保守。另外, 人类 RXR 的天然配体 9cRA 与软体动物 RXR 有很高的亲和力, 可以与多种软体动物的 RXR 结合。这些结果以及为数不多的软体动物 RXR 功能研究表明软体动物的 RXR, 不仅结构与脊索动物类似, 在功能上也很有可能类似于脊索动物, 参与软体动物的胚胎发育、细胞分化与增殖以及新陈代谢过程。然而, 软体动物 RXR 信号转导通路的研究尚处于起步阶段, 在很多方面亟待深入研究。例如大多数软体动物 RXR 的天然配体尚无定论, RXR 是以同源二聚体还是与其他核受体形成异源二聚体发挥作用尚未明确。此外, 软体动物 RXR 调控的下游基因有哪些? 软体动物体内存在哪些辅调因子, 如何调节 RXR 的转录激活作用? 同时, 腹足类 RXR 与性畸变的密切关系, 也预示着软体动物 RXR 极有可能参与其性别决定和性腺分化, 进一步深入研究极有可能揭示软体动物性别决定分子机制这一历史难题。

参 考 文 献

- Aagaard M M, Siersbæk R, Mandrup S. 2011. Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8): 824–835.
- Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, et al. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9): 4453–4456.
- Albalat R, Cañestro C. 2009. Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1/3): 188–196.
- Bastien J, Rochette-Egly C. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, 328: 1–16.
- Bouton D, Escriva H, de Mendonca R, et al. 2005. A conserved retinoid X receptor (RXR) from the mollusk *Biomphalaria glabrata* transactivates transcription in the presence of retinoids. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(2): 567–582.
- Carter C J, Farrar N, Carlone R L, et al. 2010. Developmental expression of a molluscan RXR and evidence for its novel, nongenomic role in growth cone guidance. *Developmental Biology*, 343(1/2): 124–137.

- Castro L F C, Lima D, Machado A, et al. 2007. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod (*Nucella lapillus*). *Aquatic Toxicology*, 85(1): 57 – 66.
- Dawson M I, Xia Z B. 2012. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(1): 21 – 56.
- de Groot A, de Rosny E, Juillan-Binard C, et al. 2005. Crystal structure of a novel tetrameric complex of agonist-bound ligand-binding domain of *Biomphalaria glabrata* retinoid X receptor. *Journal of Molecular Biology*, 354(4): 841 – 853.
- Dmetrichuk J M, Carlone R L, Jones T R, et al. 2008. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-*cis* retinoic acid on isolated neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(48): 13014 – 13024.
- Durica D S, Wu X, Anilkumar G, et al. 2002. Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 189(1): 59 – 76.
- Egea P F, Mitschler A, Rochel N, et al. 2000. Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-*cis* retinoic acid. *The EMBO Journal*, 19(11): 2592 – 2601.
- Evans R M, Barish G D, Wang Y X. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine*, 10(4): 355 – 361.
- Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, et al. 2006. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular Endocrinology*, 20(9): 2141 – 2155.
- Hopkins P M, Durica D, Washington T. 2008. RXR isoforms and endogenous retinoids in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4): 602 – 614.
- Horiguchi T, Nishikawa T, Ohta Y, et al. 2007. Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais clavigera*. *Aquatic Toxicology*, 84(3): 379 – 388.
- Janer G, Navarro J C, Porte C. 2007. Exposure to TBT increases accumulation of lipids and alters fatty acid homeostasis in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3): 368 – 374.
- Jiang W W, Yan Y, Li N, et al. 2012. Retinoid X receptor activities of source waters in China and their removal efficiencies during drinking water treatment processes. *Chinese Science Bulletin*, 57(6): 595 – 600.
- Knudsen K E, Penning T M. 2010. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(5): 315 – 324.
- Le Maire A, Grimaldi M, Roecklin D, et al. 2009. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Reports*, 10(4): 367 – 373.
- Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. 2010. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(11): 676 – 683.
- Lyssimachou A, Navarro J C, Bachmann J, et al. 2009. Triphenyltin alters lipid homeostasis in females of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. *Environmental Pollution*, 157(5): 1714 – 1720.
- Mangelsdorf D J, Borgmeyer U, Heyman R A, et al. 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes & Development*, 6(3): 329 – 344.
- Mckenna N J. 2012. EMBO Retinoids 2011: mechanisms, biology and pathology of signaling by retinoic acid and retinoic acid receptors. *Nuclear Receptor Signaling [J/OL]*. [2013-4-8]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309077/>.
- Michalik L, Desvergne B, Wahli W. 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews Cancer*, 4(1): 61 – 70.
- Nishikawa J. 2006. Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology*, 149(1): 117 – 124.
- Nishikawa J, Mamiya S, Kanayama T, et al. 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environmental Science & Technology*, 38(23): 6271 – 6276.
- Shulman A I, Mangelsdorf D J. 2005. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *New England Journal of Medicine*, 353(6): 604 – 615.
- Stange D, Sieratowicz A, Oehlmann J. 2012. Imposex development in *Nucella lapillus*-Evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways *in vivo*. *Aquatic Toxicology*, 106 – 107: 20 – 24.
- Sternberg R M, Hotchkiss A K, Leblanc G A. 2008. Synchronized expression of retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc. *Environmental Science & Technology*, 42(4): 1345 – 1351.
- Urushitani H, Katsu Y, Ohta Y, et al. 2011. Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquatic Toxicology*, 103(1/2): 101 – 111.
- Wei L N. 2003. Retinoid receptors and their coregulators. *Annual*

- Review of Pharmacology and Toxicology, 43(1): 47–72.
- Wei L N. 2004. Retinoids and receptor interacting protein 140 (RIP140) in gene regulation. *Current Medicinal Chemistry*, 11(12): 1527–1532.
- Wolf G. 2008. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid X receptor? *Nutrition Reviews*, 64(12): 532–538.
- 刘桂中, 赵剑华, 王秀琴. 2000. 维甲酸信号通路的生物学进展. *生理科学进展*, 31(4): 337–340.
- 吴曙, 王淑红, 王艺磊, 等. 2009. 软体动物和甲壳动物酚氧化酶的研究进展. *动物学杂志*, 44(5): 137–146.
- 于晓霞, 曹济民. 2004. 生长锥导向分子 Slit/Robo 对神经生长的调控作用. *国外医学: 生理病理科学与临床分册*, 24(3): 208–211.
- 张艳, 秦琴, 周度金, 等. 2007. 核受体超家族及其辅调节子的研究进展. *局解手术学杂志*, 16(1): 58–59.