论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0514-03

ERR1突变体I240R对其转录活化功能的影响

李 强,陈 敏,陈 彬,李渝萍,陈 健,钟小林,周度金 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分析ERR1突变体I240R对ERR1转录活化功能的影响。**方法** 用重叠延伸PCR构建ERR1的缺失突变体ERR1/I240R到真核表达质粒pSG5上,通过荧光素酶报告基因表达系统检测ERR1/I240R对ERR1转录活化功能的影响。**结果** 测序证实成功构建了ERR1的突变体pSG5/ERR1/I240R。报告基因表达系统检测显示ERR1/I240R激活的荧光素酶报告基因活性明显高于野生型的ERR1。**结论** ERR1突变体ERR1/I240R转录活化功能明显高于野生型的ERR1,为进一步研究ERR1的结构与功能打下了基础。

关键词: 雌激素受体相关受体1;突变体;转录活化

中图法分类号: Q502; R392.2; R394-33 **文献标识码:** A

Effects of ERR1 mutant I240R on its transcriptional activation

LI Qiang, CHEN Min, CHEN Bin, LI Yu-ping, CHEN Jian, ZHONG Xiao-lin, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the effects of mutant I240R on the activation of gene transcription of estrogen receptor-related receptor α 1 (ERR1). **Methods** Mutant of ERR1 was obtained by overlap extension PCR, and then inserted into MCS of plasmid pSG5. After identification of the positive clone by digestion of restriction endonuclease and sequencing, the activation of luciferase was detected by Luciferase Assay System. **Results** pSG5/ERR1 I240R, mutant of ERR1, was successfully constructed. It was found that the luciferase activity of reporter gene generated by ERR1 mutant I240R was obviously higher as compared with that of the ERR1 wild type. **Conclusion** The function of transcription activated by ERR1 mutant I240R was higher than that of the ERR1 wild type, which may be the base for further studies of the constitution and function of ERR1.

Key words: estrogen receptor-related receptor α 1; mutant; transcriptional activation

雌激素受体相关受体(estrogen receptor-related receptor α 1, ERR1)是最早发现的孤儿核受体,作为核受体超家族的一员,在基因表达调控中发挥重要作用。与经典的核受体不同,ERR1的天然配体至今未发现,我们前期研究发现环境毒物毒杀芬可能是其人工合成的配体[1]。研究显示,ERR1广泛表达于小鼠生长发育的各种组织中,但在成年小鼠仅在心、肌肉、肾、胰腺和肠中表达。ERR1的功能并不十分清楚,目前认为它能与多种基因上游的激素反应元件(estrogen response element, ERE)结合,可能调节甲状腺素受体α、骨桥结合素和芳香族化酶等基因的表达[2~4]。最近有报道表明[5,6],ERR1和雌激素受体(estrogen receptor, ERα)竞争结合乳铁蛋白基因上游的ERE和核受体辅活化子;在乳腺癌细胞MCF-7中,ERR1能抑制ERα的转录活化功能;ERR1高表达于乳腺癌组织中,过表达ERR1能抑制MCF-7细胞的生长。ERR1主要通过于基因上游的ERE结合,调节基因的表达。鉴于ERR1能抑制ERα的转录活化功能,找到比野生型转录活性更高的ERR1突变体,有助于发现更好的ERα拮抗分子。为此我们设计构建了ERR1的突变体,通过荧光素酶报告基因表达系统检测突变体对ERR1转录活化功能的影响,加深人们对ERR1结构与功能的认识,同时为进一步研究ERα拮抗分子打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 虫荧光素酶报告系统购自Pro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300126, 30370317);第三军医大学博士创新性课题资助(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300126, 30370317) and the Research Foundation for Innovative Projects of Doctoral Candidates of Third Military Medical University (2004)

作者简介:李 强(1971-),男,重庆市大足县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事核受体基因表达调控方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68775190

通讯作者:周度金,电话:(023)68752261-8051, E-mail: dujinzhou@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2005-02-24

mega 公司。大肠杆菌 DH5α 菌株、pACT2/ERR1、pSG5 真核表达质粒、pGL$_3$(SF$_1$)$_3$Luc 报告质粒(含 ERR1 激素结合结构域 SF$_1$ 三拷贝重复序列)、HeLa 细胞均由本室保存。

1.1.2　引物及主要试剂　　PCR 引物(上海生工生物工程公司)，*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶(New England 公司)，T4 DNA 连接酶(Promega 公司)。PCR 纯化试剂盒、DNA 凝胶抽提试剂盒(Qiagen 公司)，细胞培养液、FBS(Gibco 公司)其它试剂为国产分析纯。引物序列如下：

F1：5′-GCCGAATTC ATG TCCAGCCAGGTGGTGGGC-3′

R3：5′-GGGGTACTAGTAACCCGGGCGGATCC TCA GTCCAT-CATGGCCTCGAGCAT-3′

R4：5′-GGGGTACTAGTAACCCGGGC-3′

F2：5′-ATTGTGGTCACC***CGC***AGCTGGGCCAAG-3′

其中，底部划线代表酶切位点，划框部分为起始或终止密码，斜体加粗为突变点。

1.2　方法

1.2.1　ERR1 点突变体的构建　　采用重叠延伸 PCR 进行，简述如下：以 pACT2/ERRα1 为模板，用 F2 和 R3 引物进行第 1 轮 PCR 扩增，扩增出含 I240R 突变产物；产物经纯化后，取约 50ng 作引物，以 pACT2/ERRα1 为模板进行 PCR 重叠延伸；然后用 F1 与 R4 作引物进行第 2 轮 PCR 扩增，扩增出带突变全长 ERR1；目的片断经回收、酶切(位点同上)后连接到真核表达载体 pSG5 上，然后转化大肠杆菌 DH5α，对阳性克隆进行酶切鉴定；最后送公司进行测序鉴定(测序工作由上海申友公司完成)，考虑到 ERR1 全长 1 269 bp，测序时先在突变点上游 100 bp 处设计引物测突变点，突变正确的克隆进行全长测序。

1.2.2　HeLa 细胞的培养　　取液氮冻存的 HeLa 细胞复苏，接种于含 10% FBS 的 Eagle′s MEM 常规培养基中，另加 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素，5% CO_2、37 ℃恒温恒湿培养。每 1～2 天更换培养基。

1.2.3　HeLa 细胞的转染　　按 Gibco 公司 Lipofectin 试剂盒使用手册进行转染。已在培养瓶中长满的 HeLa 细胞用胰酶消化收集后计数，按 4×10^5 细胞/孔接种至 6 孔培养板，每孔加 2 ml 含 10%FBS 的 D-MEM 培养基培养至 70%～80%满密度(18～24 h)，按每 μg 质粒 DNA 加 2 μl 的 Lipofectin 进行转染实验。

1.2.4　虫荧光素酶分析　　细胞培养 48 h 后用 1×PBS 清洗细胞 2 次，每孔加入检测系统中的细胞裂解缓冲液温和振荡 15 min，涡旋振荡 1 min，12 000×*g* 离心去细胞碎片，上清用于检测。用 Bio-Rad 蛋白检测试剂测定上清的蛋白浓度，在 100 μl 荧光素酶底物中加入等蛋白浓度的细胞裂解液，立即于 TD20/20 荧光照度计上检测，延迟 2～4 s，整合 10 s 读数。每组样品单独转染 3 孔，并进行平行测定，具体方法参照 Promega 公司手册进行。

1.3　统计学处理

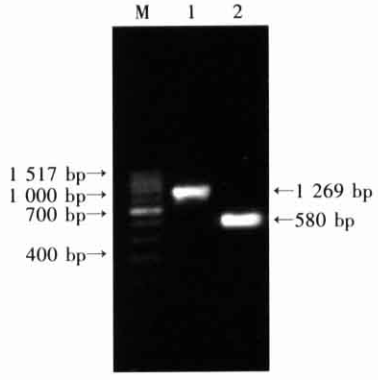
所得结果采用 SPSS 软件进行方差分析，Microsoft Excel 作图。

2　结果

2.1　ERR1 突变体的构建

2.1.1　ERR1 点突变 PCR 结果　　取 ERR1 突变体构建过程中两次 PCR 产物各 5 μl 在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳，结果显示在突变体构建中，PCR 产物在相应分子量处均有 1 条带，与预期构建 ERR1 突变体的片断大小一致(图 1)。

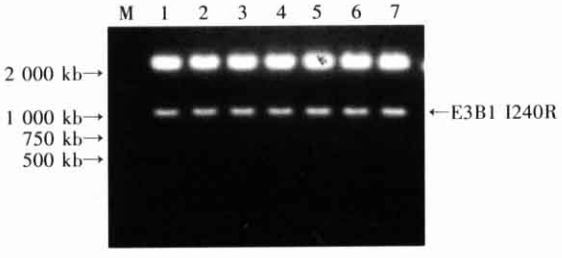
2.1.2　重组 pSG5/ERR1 I240R 的酶切鉴定结果　　从氨苄抗性 LB 平板上挑取多个阳性克隆，小量抽提质粒后，用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切。如图 2 所示，双酶切可分别切出相应大小的突变体片段，可初步确定它们均为阳性重组质粒，阳性重组质粒经测序进行进一步验证，证实上述所得的质粒正确克隆了 ERR1 突变体编码区 cDNA，插入方向及阅读框均正确(结果未显示)。



M：100 bp DNA ladder；1：Product of second PCR for ERR1 I240R construction；2：Product of first PCR for ERR1 I240R construction

图 1　ERR1 突变体构建的 PCR 产物电泳结果

Fig 1　Electrophoretic analysis of the mutation of ERR1 construction amplified by PCR



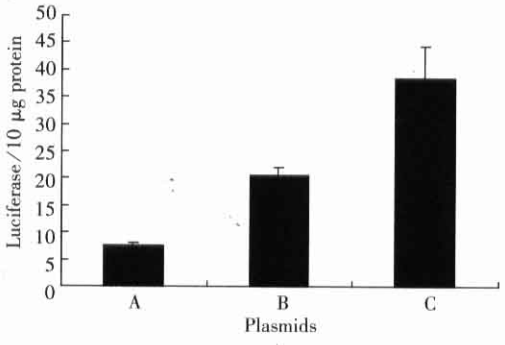
M：DL2000 DNA ladder；1－7：pSG5/ERR1 I240R

图 2　*Eco*R Ⅰ与 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定 ERR1 突变体

Fig 2　Identification of mutation of ERR1 digested with *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ

2.2　ERR1/I240R 对 ERR1 转录活性的影响

本课题采用 pGL3 荧光素酶报告系统，将 ERR1 三拷贝的顺式作用元件(SF$_1$)$_3$ 构建到报告质粒的报告基因上游调控区，当反式作用因子如 ERR1 与顺式作用元件(SF$_1$)$_3$ 结合后，就可以调控报告基因的表达，通过报告基因的活性鉴定，间接反应反式作用因子调控基因表达的强弱[7,8]。突变体 ERR1/I240R 与野生型 ERR1 分别与荧光素酶报告质粒 pGL3(SF$_1$)$_3$Luc 共转染到 HeLa 细胞中，结果显示 ERR1/M258R 激活的荧光素酶报告基因活性明显高于野生型的 ERR1($P<0.01$，图 3)，表明 ERR1 突变体 ERR1/I240R 转录活化功能明显高于野生型的 ERR1。



A: pGL3(SF1)$_3$Luc; B: pGL3(SF1)$_3$Luc + ERRα1; C: pGL3(SF1)$_3$Luc + ERR1/I240R

图 3 ERR1/I240R 对转录活化功能的影响

Fig 3 Effects of ERR1/I240R on the transactivational function

3 讨论

核受体超家族由几百个成员组成,作为转录因子参与基因的表达调控,在胚胎发育、细胞分化、和内环境稳定过程中起重要作用。ERR1 是核受体超家族中的孤儿受体(orphan receptor)成员,可能参与了甲状腺素受体 α、骨桥结合素和芳香族化酶等基因表达的调节[2~4]。此外,包括我们在内的多家实验室的研究发现 ERRα1 可能还是一种与乳腺癌有密切关系的核受体:ERR1 和 ERα 竞争结合乳铁蛋白基因上游的 ERE 和核受体辅活化子;在乳腺癌细胞 MCF-7 中,ERR1 能抑制 ERα 的转录活化功能;ERR1 高表达于乳腺癌组织中,过表达 ERR1 能抑制 MCF-7 细胞的生长[5,6]。目前 ERR1 的结构和功能的关系并不十分清楚,又鉴于 ERR1 能抑制 ERα 的转录活化功能,因此,研究 ERR1 突变体的转录活化功能,有助于深入了解 ERR1 的结构与功能关系;同时找到比野生型转录活性更高的 ERR1 突变体,有助于发现更好的 ERα 拮抗分子,为 ERR1 的进一步研究打下基础。

核受体超家族成员具有共同的结构特征,一般包含 A、B、C、D、E、(F)6 个保守程度不同的结构域:A/B 区位于核受体间不十分保守的氨基末端,该区在长度、序列和结构上高度多变;C 区为核受体中高度保守的 DNA 结合结构域(DNA -binding domain, DBD),在结构上含有两个专司 DNA 结合的锌指模体(zinc finger motif);D 区为连接 C 区和 E 区的非保守区域,又称铰链区(hinge region);E 区含保守的配体结合结构域(ligand-binding domain, LBD,又称为激素结合结构域,hormone binding domain, HBD),这一结构域相对较大且功能复杂,通常被认为介导了受体的二聚化、与热休克蛋白的结合、核定位、转录活化、分子内沉寂、分子间阻遏等多种作用;F 区通常被认为是 LBD 的 C 端伸展区,目前其特定的功能尚不十分明确。核受体的结构中介导转录活性的两个反式激活功能区分别位于其结构的两端,其中组成性配体非依赖的激活功能结构域 AF1 (activation function-1)位于 A/B 区,配体依赖的 AF2(activation function-2)结构域存在于配体结合结构域 LBD 中[9]。还有研究提示[10,11] ERR3 的 LBD 含 12 个 α 螺旋,其中第 12 螺旋为 AF2 结构域,3、4 和 12 螺旋可能参与了 ERR3 与配体的结合,与核受体的转录活化功能密切相关。由于 ERR1 与 ERR3 高度同源,LBD 的结构相似,因此,我们在 ERR1 相应的 4 螺旋区选取了 1 个非极性氨基酸进行突变,即 ERR1 I240R,旨在研究该氨基酸突变后对 ERR1 转录活化功能的影响。结果证实 ERR1 240 位的异亮氨酸突变成碱性氨基酸精氨酸后,其转录活化功能明显增强,表明 ERR1 240 位的异亮氨酸对 ERR1 结构与功能起重要作用,这些结果为深入研究 ERR1 的结构与功能以及发现更好的 ERα 拮抗分子奠定了基础,相关的研究正在我室展开。

参考文献:

[1] 杨 春,陈 敏,陈 彬,等. 毒杀芬对孤儿受体雌激素相关受体 1 (ERRα-1)的拮抗作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 183 - 185.

[2] Yang N Y, Shigeta H, Shi H, *et al*. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5795 - 5804.

[3] Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERRα-1 orphan receptor[J]. Cancer Res, 1998, 58(24): 5695 - 5700.

[4] Zhang Z, Teng C T. Estrogen receptor-related receptor α1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20837 - 20846.

[5] Zhang Z, Teng C T. Estrogen receptor α and estrogen receptor-related receptor α1 compete for binding and coactivator[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 172: 223 - 233.

[6] 陈 健,陈 敏,陈 彬,等. hERR1 对乳腺癌细胞生长活性及 ER 转录激活功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(17): 1527 - 1530.

[7] Lee S K, Anzick S L, Choi J E, *et al*. A nuclear factor, ASC-2, as a cancer-amplified transcriptional coactivator essential for ligand-dependent transactivation by nuclear receptors *in vivo*[J]. J Biol Chem, 1999, 274 (48): 34283 - 34293.

[8] Zhou D, Quach K M, Yang C, *et al*. PNRC: a proline-rich nuclear receptor coregulatory protein that modulates transcriptional activation of multiple nuclear receptors including orphan receptors SF_1 (steroidogenic factor 1) and ERRalpha1 (estrogen related receptor alpha-1)[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(7): 986 - 998.

[9] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression[J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1269 - 1304.

[10] Hong H, Yang L, Stallcup M R. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22618 - 22626.

[11] Greschik H, Wurtz J M, Sanglier S, *et al*. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 303 - 313.

(编辑 薛国文)