DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.019
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2132 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2132-04

ERR1与核受体辅活化子相互作用位点研究

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与核受体辅活化子相互作用的位点。方法 用常规PCR方法和重叠延伸PCR构建ERR1的各种突变体到表达质粒pGBT9上,通过酵母双杂交实验分析其与已知核受体辅活化子PNRC的相互作用。结果 成功构建了ERR1的缺失突变体pGBT9/ERR1 1-412、pGBT9/ERR1 1-144、pGBT9/ERR1 190-412、pGBT9/ERR1 145-423、pGBT9/ERR1 190-423、pGBT9/ERR1 190-423 F232A、pGBT9/ERR1 190-423 K244A。酵母双杂交实验显示ERR1的氨基酸145-423和190-423可分别与PNRC相互作用;ERR1 190-423 K244A与PNRC的相互作用明显低于ERR1 190-423;其它突变体与PNRC的相互作用未检测到。结论 ERR1与核受体辅活化子相互作用的位点位于ERR1的配体结合结构域(LBD, aa190-423),ERR1与核受体辅活化子相互作用依赖于其LBD的AF2结构域,AF2结构域外的其它氨基酸F232、K244也对ERR1与核受体辅活化子相互作用起关键作用。

关键词:雌激素受体相关受体1;核受体辅活化子;相互作用
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Study on binding site of estrogen-related receptor 1 interacting with coactivator

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 identify the binding site of estrogen-related receptor 1 (ERR1) interacting with nuclear receptor coactivaor. Methods Deletants and mutants of ERR1, obtained by normal PCR and overlap extension PCR, were inserted into MCS of yeast expression plasmid pGBT9. After identification of the positive clone by digestion of restriction endonuclease and sequencing, the interaction between each of the recombinant mutations and PNRC was detected by yeast-two hybrid. Results pGBT9/ERR1 1-412, pGBT9/ERR1 1-144, pGBT9/ERR1 190-412, pGBT9/ERR1 145-423, pGBT9/ERR1 190-423, pGBT9/ERR1 190-423 F232A, pGBT9/ERR1 190-423 K244A, the mutants or deletants of ERR1, were successfully constructed. GalDBD-ERR1/aa145-423 or aa190-423 fusion protein could interact with the known coactivator PNRC. Yeast-two hybrid assay revealed that the interacting effect of ERR1 190-423 K244A with PNRC was significantly lower than that of ERR1 190-423 with PNRC, but no interaction between the other mutations and PNRC could be found. Conclusion By a combination of mutagenesis and yeast two-hybrid assay, the coactivator-interacting domain on ERR1 has been mapped to a region encompassing amino acids 190-423 which is the ligand-binding domain (LBD) of ERR1. ERR1 can interact with coactivator in an AF2-dependent manner and the other amino acids F232 or K244 not involved in AF2 domain are the key amino acids for ERR1 interacting with coactivator.

Key words: estrogen-related receptor 1; coactivator; interaction; PNRC

雌激素受体相关受体(estrogen-related receptor 1, ERR1)是最早发现的孤儿核受体,作为核受体超家族的一员,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的功能并不清楚,目前认为它能与多种基因上游的激素反应元件(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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300126;30370317)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300126; 30370317)
作者简介:李 强(1971-),男,重庆市大足县人,博士研究生,主治医师,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,E-mail:liqiangpei@163.com
通信作者:周度金,E-mail:dujinzhou@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-07-01;修回日期:2004-10-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有报道表明, 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]。ERR1 主要通过与核受体辅活化子结合发挥转录活化功能, 已知核受体与核受体辅活化子结合主要依赖核受体的 AF2 结构域[7], 但 ERR1 与核受体辅活化子相互结合的精细区域目前尚不清楚, 特别是除 AF2 结构域以外的氨基酸是否影响它与核受体辅活化子的相互结合。为此我们设计构建了 ERR1 的各种缺失突变体, 通过酵母双杂合实验检测它们与已知核受体辅活化子 PNRC 的相互结合作用, 探寻 ERR1 与核受体辅活化子相互结合的位点, 加深人们对 ERR1 结构与功能的认识。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒与菌株　　酵母双杂交系统中载体质粒 pGBT9 和 Y187 菌株购自 Clontech 公司。(Y187: 酵母报告宿主株, 含 *Lac* Z 报告基因, 用于检测两已知蛋白间的相互作用。转化标志: TRP1, LEU2) 大肠杆菌 DH5α 菌株、pACT2/ERR1、pACT2/PNRC、pBT9/ERR1、pACT2/PNRC270-317、酵母双杂交阴性对照质粒 pLAM5′-1 质粒均为本室保存。

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), 酵母转化试剂盒(Bio 101), 酵母培养基(CLONTECH), ONPG(SIGMA), 其它试剂为国产分析纯。引物序列如下:

F1: 5′-GCCGAATTC ATG TCC AGC CAG GTG GTG GGC-3′

R3: 5′-GGGGTACTAGTAACCCGGGCGGATCC TCA GTC CATCAT GGC CTC GAG CAT-3′

R4: 5′-GGGGTACTAGTAACCCGGGC-3′

R2: 5′-GCGGATCC TCA CATGCCCACCCGCAG-3′

R5: 5′-GCGGATCC TCA CTTGTGCATGGGCAC-3′

F5: 5′-GCGGAATTC ATG ACAGCAGCCCCAGTG AAT-3′

F6: 5′-GCCGAATTC ATG CTCAAGGAGGGA-3′

F2: 5′-ATCAGCTGGGCC ***GCG***AGCATCCCAGGC-3′

F3: 5′-GGCCCCCGGAAG ***GCT***GCAGCCCCAGTG-3′

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 缺失体的构建　　采用标准 PCR 的方法构建缺失突变体, 以真核表达质粒 pACT2/ERRα1 为模板, 分别用 F1 和 R2, F6 和 R3, F1 和 R5, F5 和 R3, F5 和 R5, 5 对引物扩增 ERR1 相应的 1-144, 145-423, 1-412, 190-423, 190-412 之间的片断, PCR 产物经回收、酶切(上游酶切位点为 *Eco*RⅠ, 下游为 *Bam*HⅠ)后, 将它们通过 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 位点连接到 pGBT9 载体上, 然后转化大肠杆菌 DH5α, 对阳性克隆进行酶切鉴定, 最后进行测序鉴定(测序工作由上海生工公司、基康公司和申友公司完成)。

1.2.2　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, 分别用 F2 和 R3, F3 和 R3 两对引物进行第 1 轮 PCR 扩增, 扩增出含 K244A 和 F232A 的 ERR1 突变产物; 产物经纯化后, 取约 50 ng 作引物, 以 pACT2/ERRα1 为模板进行 PCR 重叠延伸; 然后用 F5 与 R4 作引物进行第 2 轮 PCR 扩增, 扩增出 ERR1/K244A 190-423 和 ERR1/F232A 190-423 片断; 目的片断经回收、酶切(位点同上)后连接到 pGBT9 载体上, 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(测序工作由上海生工公司、基康公司和申友公司完成)。

1.2.3　ERR1 及突变体与 pACT2/PNRC270-317 的相互作用　　酵母双杂合实验按 Clontech 试剂盒说明书进行, β-半乳糖苷酶活性单位(miller unit, 即 1 个β-半乳糖苷酶活性单位定义为每分钟分解 1 μmol ONPG 生成硝基苯酚的酶活性): β-半乳糖苷酶活性单位(U)= 1 000× A_{420}/(t× v× A_{600}) [t: 反应时间 (min); v: 0.1 ml× 浓缩系数; A_{600}: A_{600}/ml 菌液]。

1.2.4　酵母双杂结果处理　　酵母双杂实验对 5 个独立的克隆进行β-半乳糖苷酶活性检测, 每个克隆重复 3 次。采用 SPSS 软件对各组结果做均值计算及方差分析。

2　结果

2.1　ERR1 缺失突变体的构建

2.1.1　ERR1 缺失体和点突变 PCR 结果　　取 ERR1 突变体 PCR 产物 5 μl 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 结果显示, 在各种突变体相应分子量处均有 1 条带, 与 ERR1 突变体大小一致, 见图 1。



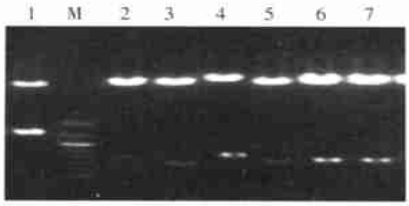
M: 100 bp DNA ladder; 1: ERR1 1-144; 2: ERR1 190-412; 3: ERR1 1-412; 4: ERR1 190-423; 5: ERR1 145-423; 6: First PCR for ERR1 F232A; 7: First PCR for ERR1 K244A; 8: Second PCR for ERR1 F232A; 9: Second PCR for ERR1 K244A

图 1　突变体的 PCR 产物电泳结果

Fig 1　Electrophoretic analysis of the mutations of ERR1 amplified by PCR

2.1.2　重组 pGBT9/ERR1 缺失突变体的酶切鉴定结果　　从氨苄抗性 LB 平板上挑取阳性克隆, 小量抽提质粒后, 用 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 双酶切。如图 2 所示, 双酶切可分别切出相应大小的各种突变体片段, 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 各种突变体编码区 cDNA, 插入方向及阅读框均正确(结果未显示)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



M: 100 bp DNA ladder; 1: pGBT9/ERR1 1-412; 2: pGBT9/ERR1 1-144; 3: pGBT9/ERR1 190-412; 4: pGBT9/ERR1 145-423; 5: pGBT9/ERR1 190-423; 6: pGBT9/ERR1 190-423 F232A; 7: pGBT9/ERR1 190-423 K244A

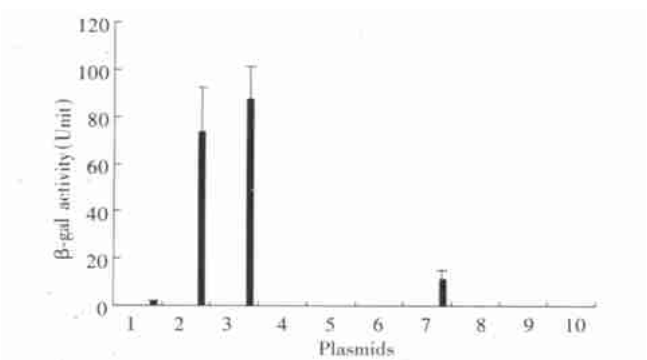
图2 *Eco*RⅠ与 *Bam*HⅠ双酶切鉴定各种突变体

Fig 2 Identification of mutations of ERR1 by digestion with *Eco*RⅠ and *Bam*HⅠ

2.2 ERR1 缺失突变体与核受体辅活化子的相互作用

我们前期研究证实 ERR1 与辅活化子 PNRC 的氨基酸片断 270-317 的相互作用最强[8]，为了便于结合强弱的分析，实验中采用 pACT2/PNRC 270-317 质粒表达与 ERR1 的各种突变体进行酵母双杂分析其相互作用。

酵母双杂交实验显示 ERR1 的氨基酸 145-423 和 190-423 可分别与 PNRC 相互作用，而氨基酸 1-144 与 PNRC 没有相互作用，氨基酸 190-423 活性比氨基酸 145-423 更强($P<0.05$)，表明 ERR1 氨基酸 1-144 不参与 ERR1 与 PNRC 的结合，同时 ERR1 氨基酸 145-189 可能干扰 ERR1 与 PNRC 的结合，已致 ERR1 氨基酸 145-423 与 PNRC 的结合能力比 ERR1 氨基酸 190-423 弱。ERR1 的氨基酸 190-423 正好是 ERR1 的配体结合结构域(LBD)，提示 ERR1 与 PNRC 的相互结合位于 ERR1 的 LBD。缺失了 AF2 结构域的突变体 ERR1 氨基酸 190-412 不能与 PNRC 结合，表明 ERR1 与核受体辅活化子相互作用是依赖 AF2 结构域的。244 位的赖氨酸突变成丙氨酸的 ERR1 190-423 K244A 和 PNRC 的相互作用与 ERR1 190-423 相比结合能力下降了 4 倍($P<0.01$)；ERR1 232 位的苯丙氨酸突变成丙氨酸的 ERR1 190-423 F232A 未发现与 PNRC 的相互作用，证明 ERR1 的 F232 和 K244 对 ERR1 与核受体辅活化子相互作用起关键作用(图 3)。



1: ERR1 WT + PNRC 270-317; 2: ERR1 145-423 + PNRC 270-317; 3: ERR1 190-423 + PNRC 270-317; 4: ERR1 1-144 + PNRC 270-317; 5: ERR1 190-412 + PNRC 270-317; 6: ERR1 190-423 F232A + PNRC 270-317; 7: ERR1 190-423 K244A + PNRC 270-317; 8: PLAM5' + PNRC 270-317; 9: pGBPT9 + PNRC 270-317; 10: ERR1 WT + pACT2

图3 **ERR1** 突变体与核受体辅活化子的酵母双杂结果

Fig 3 Interaction between mutations of ERR1 and coactivaor from yeast two hybrid screening

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。目前 ERR1 的结构和功能的关系并不十分清楚，已知 ERR1 主要通过与核受体辅活化子结合发挥转录活化功能，因此，研究 ERR1 与核受体辅活化子相互作用的位点，有助于深入了解 ERR1 的结构与功能关系，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 AF_1 (activation function-1)位于 A/B 区，配体依赖的 AF_2 (activation function-2)结构域存在于配体结合结构域 LBD 中[9]。EER1 作为核受体家族的一员，同样具有上述结构特征。根据上述特征，我们设计了 ERR1 1-412 (缺失 AF_2)、ERR1 1-144 (A/B 区)、ERR1 190-412 (LBD 区缺失 AF_2)、ERR1 145-423 (C + LBD 区并缺失 AF_2)、ERR1 190-423 (LBD 区)。研究提示 ERR3 的 LBD 含 12 个 α 螺旋，其中第 12 螺旋为 AF_2 结构域，3、4 和 12 螺旋可能参与了 ERR3 与配体的结合[10,11]，核受体与配体结

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合后暴露与辅活化子的结合界面。由于 ERR1 与 ERR3 高度同源，LBD 的结构相似，因此，我们又在 ERR1 相应的 3、4 螺旋区选取了两个极性氨基酸进行突变，即 ERR1 190-423 F232A、ERR1 190-423 K244A，旨在研究除 AF_2 结构域外的氨基酸对 ERR1 与辅活化子结合的影响。结果证实 ERR1 与核受体辅活化子相互作用的位点位于 ERR1 LBD，ERR1 与核受体辅活化子相互作用依赖 ERR1 的 AF_2 结构域，除 ERR1 的 AF_2 结构域外，LBD 的其它氨基酸 F232、K244 也对 ERR1 与核受体辅活化子相互作用起关键作用。这些结果为深入研究 ERR1 的结构与功能奠定了基础。

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(ERRα1)的拮抗作用[J]. 第三军医大学学报，2001，21(10)：183－185.

[2] Yang N Y, Shigeta H, Shi H P, *et al*. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediateresponse 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 P, 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, 75(27): 20837－20846.

[5] Zhang Z P, Teng C T. Estrogen receptorαand estrogen receptor-related receptorα1compete for binding and coactivator[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 172(1-2): 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. PNRC: a proline-rich nuclear receptor coregulatory protein that modulates transcriptional activation of multiple nuclear receptors including orphan receptors SF1 (steroidogenic factor 1) and ERRalphal (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): 1269－304.

[10] Hong H, Yang L, Stallcup M R. Hormone-independent transcriptional activation ang 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 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2004)23-2135-01

个案与短篇

两种静脉穿刺方法的对比分析

Comparative analysis of two methods for venous puncture

陈 莉[1]，罗小玲[2] （重庆市第九人民医院：[1] 肝胆外科，[2] 呼吸科，重庆 400700）

静脉穿刺有两种方法：一种是针头斜面向上，针头与皮肤成一小角度(45°)由静脉上方迅速刺入皮下进入静脉，见回血后顺静脉再进少许，简称“新法”；另一种是针尖斜面向上，针头与皮肤成(20°)角[1]，从静脉上方刺入皮下，再沿静脉方向潜行一小段距离进入静脉，见回血后顺静脉再进少许，简称“传统法”。其区别：“新法”针头从皮下直接进入静脉，没有在皮下组织潜行；而“传统法”针头刺入皮下后，在皮下组织潜行 0.2～1.0 cm 才进入静脉。为减少患者静脉穿刺疼痛，降低拔针后局部肿胀，提高穿刺成功率，我们对临床上的两种穿刺方法进行了比较，效果满意，现报告如下。

作者简介：陈 莉(1965－)，女，重庆市北碚区人，主管护师，主要从事肝胆外科护理管理方面的研究。电话：(023)68282225

收稿日期：2004-06-25；修回日期：2004-08-18

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取我院呼吸科神态清楚，神经系统反射正常，一般情况良好的患者 240 例。随机分为“新法”和“传统法”两组各 120 例，两组年龄，性别差异无显著性($P>0.05$)。

1.2 方法

采用单盲法，两组均由专人(指静脉穿刺技术过硬的 3 名护士)进行严格无菌操作。新法组 120 例，其中男 52 例，女 68 例，平均年龄 57.2 岁；传统法组 120 例，其中男 63 例，女 57 例，平均年龄 57.7 岁。根据疼痛反应(患者皱眉，肢体抽动及口中发出嘘声或痛苦表情，呻吟声)将疼痛程度分为剧痛，较痛，微

（下转 2138 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net