DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.014
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)17-1527-03

论著

hERR1对乳腺癌细胞生长活性及ER转录激活功能的影响

陈 健,陈 敏,陈 彬,周长保,李渝萍,彭家和,李蓉芬,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 构建hERR1高表达的乳腺癌细胞株,研究hERR1对乳腺癌细胞株生长活性的影响及其机制。方法 PCR构建hERR1真核表达载体,转染乳腺癌细胞株,G418筛选稳定表达细胞株;MTT法研究hERR1高表达株的生长速率;瞬时转染结合CAT活性分析,研究hERR1对ER转录功能的影响。结果 筛选了hERR1高表达乳腺癌细胞株;局部高表达的hERR1在体外抑制乳腺癌细胞株的生长;hERR1以剂量依赖方式抑制ER转录激活功能。结论 局部高表达hERR1可能通过与ER竞争结合ERE,抑制ER的转录活化功能,从而抑制ER阳性乳腺癌细胞株的生长。

关键词:hERR1;乳腺癌;基因表达调控
中图法分类号:R392.12;R737.9 文献标识码:A

The *in vitro* effects of hERR1 on the growth activity of breast cancer cell strain and ER transactivation function

CHEN Jian, CHEN Min, CHEN Bin, ZHOU Chang-bao, LI Yu-ping, PENG Jia-he, LI Rong-fen, ZHONG Xiao-lin, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a cell line which can stably overexpress hERR1 and to observe the effects of hERR1 overexpression on breast cancer cells. Methods An eukaryotic expression plasmid for hERR1, used for the infection of MCF-7 breast cancer cell line, was constructed by PCR. Cell line that expresses hERR1 stably was screened with G418. The growth rate of hERR1 transfected breast cancer cells was determined by MTT. Co-transfection and CAT analysis were employed to examine the effects of hERR1 overexpression on ER transactivation function. Results The constructed cell strain could stably overexpress hERR1. MCF-7 cells transfected with hERR1 grew slower than those without being transfected. hERR1 reduced ER transactivation activity in the transient transfection assay in a dose-dependent manner. Conclusion Overexpression of hERR1 may inhibit the growth rate of ER positive MCF-7 cells by means of competing with ER for binding ERE and hence inhibit the transactivition function of ER *in vitro*.

Key words: human estrogen receptor-related receptor 1 (hERR1); breast cancer; regulation of gene expression

雌激素及雌激素受体(Estroger receptor, ER)对机体正常生理功能以及乳腺癌的发展具有重要作用,约60%~75%的乳腺癌表达ER并且其生长依赖于雌激素。人雌激素受体相关受体1(Human estrogen receptor-related receptor 1, hERR1)是最早克隆到的孤儿受体之一,与ER关系密切,可能在乳腺癌的发展中也很重要[1]。hERR1在体内表达广泛,功能多样,其在乳腺癌中的高表达,提示它与乳腺癌的发生、发展有关[2]。

为深入探讨hERR1在乳腺癌发生、发展中的作用及其分子机制,我们构建了hERR1的真核表达载体,采用稳定转染的方法建立了一株能稳定表达hERR1蛋白的MCF-7细胞株。在此基础上,采用MTT法比较了稳定表达株和空载体转染细胞株之间生长速率的差异,进一步用瞬时转染的方法研究了hERR1与ER之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

MCF-7, pSG5-hERR1、pHβ-neo、pUMS-pl.3-CAT、pACT2-ERR1(由美国Bechman癌症研究所周度金教授和Dr. Chen Shiuan惠赠)。OPTI-MEM Ⅰ无血清培养基(GIBCO公司),Lipofectin(Life Tech.公司),*Taq* DNA聚合酶、限制性内切酶及酶缓冲液(New England公司),引物及探针(由上海生物工程技术服务有限公司合成),^{14}C标记氯霉素及n-丁酰辅酶A(Amersham Pharmacia Bio-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070359);国家自然科学基金两个基地建设资助项目(9910761946)
作者简介:陈 健(1971-),男,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事核受体与基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261
通信作者:周度金,电话:(023)68752261
收稿日期:2002-07-08;修回日期:2002-09-12

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

tech公司),纯化的 *E. coli* 表达hERR1蛋白(由 Dr. Chun Yang 惠赠),兔抗 hERR1 多克隆抗体(由美国国立环境卫生院 Dr. Teng 惠赠),其它均为进口及国产分析纯试剂。

真核表达质粒 pHβ-neo-hERR1 的构建、筛选及鉴定参考文献[3]进行。

1.2 稳定表达 hERR1 的细胞株的构建

1.2.1 pHβ-neo-ERR1 转染细胞 采用脂质体法,每孔加重组质粒 0.2 μg/μl Lipofectin,对照组则加等量的空载体 pHβ-neo。

1.2.2 稳定表达株的筛选 转染 72 h 以后,细胞转入 Eagle's MEM 选择培养基(含 600 μg/ml G418),连续筛选 4 周以上。将获得的阳性克隆(命名为 ERR1-3 # 和 ERR1-5 #)大量培养。

1.2.3 Western blotting 鉴定阳性克隆 将转染空载体转染和 pHβ-neo/ERR1 转染的 MCF-7 总蛋白进行 SDS-PAGE,以 5 μg 用 *E. coli* 表达并纯化的 hERR1 作为阳性对照。电转移法将蛋白带转印至硝酸纤维膜。转印膜进行 Western Blotting,参考 Pierce 公司 Western 印迹试剂盒使用说明书进行。

1.2.4 RT-PCR 检测转染细胞 hERR1 的 mRNA 水平 采用 RT-PCR 法。上游引物为 5′-CAGGTGACCAGCGCCATGTCC-3′(21 bp),下游引物为 5′-CAGTGGGTCCACCTCCG GCCGCCG-3′(24 bp)。以质粒 pSG5-hERR1 为阳性对照,反应条件:94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环。

1.3 MTT 法检测转染细胞生长速率

参考文献[4]进行。按 1 000、2 000、3 000、4 000 和 5 000 个细胞/孔等 5 个不同浓度梯度接种未转染(记为对照组)和转染(记为实验组)的 MCF-7 细胞于 96 孔培养板,每孔终体积 200 μl。培养 3 d 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl。继续孵育 4 h,吸去各孔培养基,加入 DMSO 200 μl 显色,490 nm 下,在酶标仪上比色测定各孔光吸收。

1.4 瞬时转染

1.4.1 瞬时共转染 采用脂质体法,所用细胞为 MCF-7。实验分两组:第 1 组,每一转染用 0.25 μg 报告质粒 p(ERE)3-tk-CAT+0.1 μg 质粒 pSG5-ER;第 2 组,每一转染用 0.25 μg 报告质粒 p(ERE)3-tk-CAT+0.1 μg 质粒 pSG5-ER+含量依次递增的 pSG5-hERR1。转染完成后,收集细胞于 1.5 ml Ep 管,离心沉淀细胞,加入 100 μl 0.25 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)重悬细胞,反复冻融裂解细胞,离心收集上清。

1.4.2 β-半乳糖苷酶活性分析 取 20 μl 细胞裂解物置一 1.5 ml Ep 管,加入:100× Mg 溶液 3 μl,1× ONPG 溶液 66 μl,0.1 mol/L 磷酸钠(pH 7.5)201 μl[3]。37 ℃温浴至出现黄色,加入 0.5 ml 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应读取 A_{420}。

1.4.3 CAT 活性分析 每份样品各取适量,使之有相同的 β-半乳糖苷酶活性,加入 ^{14}C 标记氯霉素(2 μl)和 5 mg/ml n-丁酰辅酶 A(5 μl),加 0.25 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)至终体积 150 μl,37 ℃温浴过夜,产物用 300 μl 二甲苯抽提,取 150 μl 二甲苯相与 3 ml 闪烁液混合后用闪烁计数器计数,CAT 活性以 cpm/μg 蛋白表示,计为 $\bar{x} \pm s$。

2 结果

2.1 hERR1 真核表达载体的构建

以含全长 hERR1 cDNA 的质粒 pACT2-ERR1 为模板,采用 PCR 方法合成出编码全长 hERR1 的 cDNA,并将之定向克隆到真核稳定表达载体 pHβ-neo 中,构建出 hERR1 的真核表达载体 pHβ-neo-hERR1。经酶切及测序鉴定,表达质粒构建正确,见图 1。



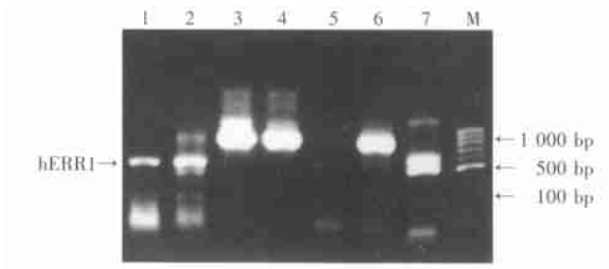
2, 3, 4, 6: correct recombinants

图 1 重组体经 ***Sal*** Ⅰ + ***Hind*** Ⅲ双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig1 Recombinants are digested by *Sal* Ⅰ and *Hind* Ⅲ, separated on 1% agarose gel electrophoresis

2.2 hERR1 稳定表达细胞株的构建

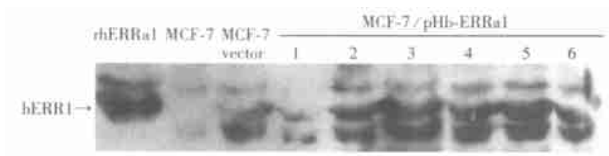
通过脂质体转染法,将表达质粒 pHβ-neo-hERR1 转染给 ER 阳性的乳腺癌细胞株 MCF-7,经高浓度 G418 筛选 6 个月,得到几个阳性克隆。选择其中两个克隆并分别记为 NO. 3 # 和 NO. 5 #。RT-PCR 结果如图 2 显示,转染细胞(3 # 和 5 #)hERR1 mRNA 水平明显(第 1、2 泳道)高于普通 MCF-7 细胞(第 5 泳道)。图 3Western 印迹结果显示,3 # 和 5 # 细胞 hERR1 蛋白表达水平明显高于对照组(第 1 ~ 6 泳道)。



1, 2: constructed cell strain. NO. 3 # & 5 #; 3, 4: are β-actin specific RT-PCR of 3 # & 5 #; 5, 6: are normal MCF-7 cell and the β-actin specific RT-PCR product; 7: hERR1 expression plasmid(positive control). hERR1 specific RT-PCR analysis of constructed cell strain

图 2 转染细胞 **hERR1** 特异的 **RT-PCR** 结果

Fig 2 hERR1 specific RT-PCR analysis of the constructed cell strain



1 ~ 6: cells transfected with hERR1 expression plasmid, which expresses hERR1 proteins with high levels

图 3 **Western** 印迹转染细胞的 **hERR1** 蛋白水平

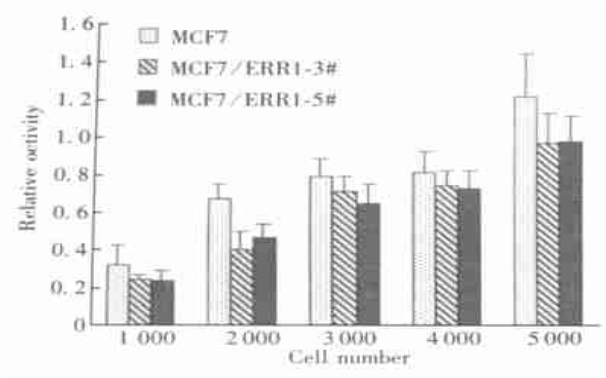
Fig 3 Western blotting of the constructed cell strain with high expression level of hERR1

2.3 MTT 检测转染细胞生长情况

应用 MTT 法检测了 hERR1 高表达株 MCF-7/ERR1-3 # 和 5

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

#及空载体转染的 MCF-7 细胞在生长速率上的差异。实验以 1 000～5 000 5 个梯度的细胞数, 在相同培养条件下分别检测了 MCF-7/ERR1-3#、5#和空载体转染的 MCF-7 细胞, 每一梯度平行做 4 组, 结果取平均值。MTT 结果 A 见图 4, hERR1 转染细胞 NO. 5#和 NO. 3#均较未转染细胞生长速率慢, 且 NO. 5#较 NO. 3#速率慢。实验结果表明, 局部高表达的 hERR1 对体外培养的 ER 阳性乳腺癌细胞的生长有一定抑制作用。



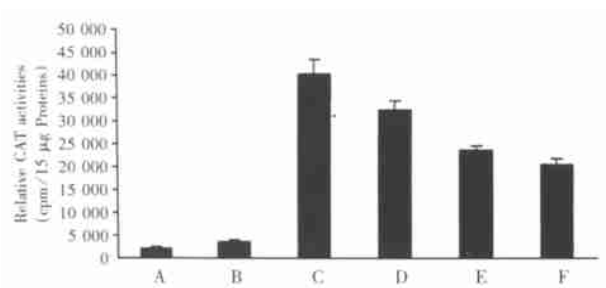
The cell strains transfected with hERR1 expression plasmid grow slower than the normal MCF-7 cell

图 4　**MTT 法分析 hERR1 转染的 MCF-7 细胞与非转染细胞的生长速率差异**

Fig 4　MTT assay of relative growth rates of MCF-7/hERR1 cell and normal MCF-7

2.4　瞬时转染检测 hERR1 对 ER 功能的影响

为进一步了解 hERR1 抑制细胞增殖的机制, 我们用 hERR1 表达质粒和 ER 表达质粒与含 ER 结合位点(ERE)的 CAT 报告质粒一起共转染 MCF-7 细胞, 对照组则只用 ER 表达质粒和 CAT 报告质粒一起共转染。如图 5 所示, 报告质粒的基础转录活性比较低(第 1 列), 加入 ER 表达质粒后, CAT 活性有明显增加(第 3 列), 但用 hERR1 表达质粒与 ER 表达质粒共转染时, CAT 活性有明显下降, 且表现出对 hERR1 的剂量依赖性(第 4～6 列)。



A: P1; B: P1+0.5 μg P3; C: P1+0.1 μg P2; D: P1+0.1 μg P2+0.1 μg P3; E: P1+0.1 μg P2+0.5 μg P3; F: P1+0.1 μg P2+1 μg P3; P1: plasmid p(ERE)3-tk-CAT); P2: plasmid pSG5-ER; P3: plasmid pSG5-hERR1. This figure shows that hERR1 can inhibit ER transactivation activity in a dose-dependent manner

图 5　**hERR1 的过表达对 ER 转录功能的影响**

Fig 5　Effects of overexpressed hERR1 on ER transcriptional function

3　讨论

雌激素受体相关受体 1(hERR1)是最早发现的孤儿受体之一, 其 cDNA 是通过用人 ERα 的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)为探针筛选 cDNA 文库而得到的[1]。hERR1 在体内表达广泛, 功能多样, 其在乳腺癌中的高表达, 提示它与乳腺癌的发生、发展有关。

为深入研究 hERR1 的生物学作用, 尤其是 hERR1 与乳腺癌之间的关系, 我们构建了一个 hERR1 的真核表达载体, 并用此载体转染 ER 阳性乳腺癌细胞株, 通过长期 G418 筛选, 获得一 hERR1 稳定表达细胞株。Western 印迹和 RT-PCR 检测表明, 所获细胞株能持续高表达 hERR1 蛋白, 为进一步进行有关 hERR1 的研究奠定了良好的基础。

我们采用该细胞株检测了它与普通 MCF-7 细胞之间生长速率上的差异, 结果显示, 虽然 hERR1 稳定表达株 3#和 5#的生长速率有一定差异, 但二者的生长速率均慢于普通 MCF-7 细胞, 表明局部高水平的 hERR1 在体外对 ER 阳性的乳腺癌细胞株的生长有一定抑制作用。3#和 5#转染细胞的生长差异则可能是由于转染效率以及 hERR1 表达质粒在受体细胞中的表达效率不同所致。

为深入了解这种抑制作用的分子机制, 我们进一步设计了瞬时共转染结合 CAT 活性分析实验。实验结果表明, 高表达的 hERR1 对 ER 活性有较明显的抑制作用, 表明 hERR1 是通过竞争性结合 ER 的靶位点 ERE, 抑制 ER 功能的正常发挥。从结果还可以看出, hERR1 对 ER 活性的抑制作用表现出剂量依赖性。

hERR1、ERα 和 ERβ 有很高的核苷酸和氨基酸序列同源性, 尤其是它们的 DBD。hERR1 不仅能以单体形式结合于扩展的半位点序列 5′-TCAAGGTCA-3′(Estrogen receptor-related receptor response element, ERRE)[5,6], 也可以同二聚体形式结合于雌激素效应元件(Estrogen response element, ERE), 表明 ERR 的靶基因与 ER 或 SF-1 的靶基因有很大的重叠性[7]。由于 ERE/ERRE 存在于许多基因的启动子区, 因此受 hERR1 作用的靶基因范围相当广泛。hERR1 即可充当转录活化因子[8～11], 也可表现转录抑制功能[10], 其功能的发挥不仅与 ER 密切相关[5,9], 还与基础转录[7]、辅活化/辅抑制因子[12]有关。

综上所述, 结合共转染和培养细胞实验, 我们认为 hERR1 在体外对乳腺癌的生长有一定抑制作用, 这种作用主要是通过 hERR1 与 ER 竞争结合 ER 的靶位点 ERE, 抑制 ER 对众多生长因子的转录活化功能实现的。

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

参考文献：

[1] Giguere V, Yang N, Segui S, *et al*. Identification of a new class of steroid hormone receptors[J]. Nature(Lond.), 1988, 331(6151): 91—94.

[2] 陈 健, 陈 敏, 陈 彬, 等. hERR1在乳腺癌中的表达及其对芳香族化酶表达的调控[J]. 第三军基大学学报, 2002, 24(10): 1233—1235.

[3] J萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 34—68.

[4] 司徒镇强, 吴正军. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996. 138—187.

[5] Johnston S D, Liu X, Zuo F, *et al*. Estrogen-related receptorα1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements[J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(3): 342—352.

[6] Vanacker J M, Bonnelye E, Chopin-Delannoy S, *et al*. Transcriptional activation of the nuclear receptor ERRα(estrogen receptor-related receptor-α)[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(5): 764—773.

[7] Giguere V. Orphan nuclear receptor: from gene to function[J]. Endocrine Rev, 1999, 20(5): 689—725.

[8] Vanacker J M, Bonnelye E, Delmarre C, *et al*. Activation of the thyroid receptor α gene promotor by the orphan nuclear receptor ERRα[J]. Oncogene, 1998, 17(19): 2429—2435.

[9] Zuo N, Shigeta H, Shi H P, *et al*. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promotor[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5795—5804.

[10] Zho F, Mertz R J. Simian virus 40 late gene expression is regulated by members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(19): 8586—8590.

[11] Vanacker J M, Delmarre C, Guo X, Laudet V. Activation of the osteopontin promotor by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related α[J]. Cell Growth & Differentiation, 1998, 9(12): 1007—1014.

[12] Xie W, Hong H, Yang N N, *et al*. Constitutive activation of transcription and binding of coactivator by estrogen-related receptor 1 and 2[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(12): 2151—2162.

（编辑 薛国文）

（上接1526页）

12.5%；仅1个指标异常的有1例，占4%；一个指标以上异常的有20例，占83.5%，其中患轻度AN的有8例（仅迷走神经功能受损的6例，仅交感神经功能受损的2例），患重度AN的有12例。

表1 **Graves**病患者与对照组功率谱指标数值间的关系

组别	例数	年龄	PVV	PHV	RVH	TFP
对照组	30	42±8.5	541±219	272±197	2.8±1.8	985±528
Graves病组	24	40±7.9	262±289#	113±155*	6.5±8.2*	454±477#

*：$P<0.01$；#：$P<0.05$ 均与对照组比较

3 讨论

本研究表1表明功率谱法能分别就交感和迷走成分进行定量测定。与对照组相比较，Graves病患者功率谱指标数值均具有显著性差异，提示病情尚未完全控制的Graves病患者可能存在心ANSF的全面减损，即交感和迷走神经功能可能存在不同程度的降低，但RVH明显增高则进一步提示Graves病患者存在的心ANSF减损可能以迷走神经功能受损为重，交感神经功能受损相对较轻或无，而在临床上表现出心交感神经功能相对亢进的症状和体征如心悸、心动过速、心率相对固定等。

一个以上的功率谱指标异常提示心ANSF障碍。本研究提示：Graves病所致AN的发生率约为83.5%。主要表现为交感和迷走神经功能同时受损，交感神经功能相对亢进，单一神经病变以迷走神经病变为主，这些损伤性改变推测与Graves病患者血液中过多的甲状腺激素对自主神经的直接损害有关，而不能简单以甲状腺激素对神经和心血管的兴奋性刺激来解释。通过药物和其它方式完全控制Graves病病情后，这些改变能否恢复将是我们进一步研究的课题。

同一研究方法在糖尿病患者[3]也有类似的发现，两种疾病虽然均与自身免疫性疾病有关，但引起AN的发病机制是不同的，推测两种疾病所致AN可能有类似的表现和结局，这可能与心交感和迷走神经的解剖位置有关，也可能与健康人心交感和迷走神经自然衰减速度不一有关[2]。

本研究表明：HRS的功率谱分析能对Graves病患者的心AN程度进行定量评价，可为临床医师预防、诊断和治疗AN提供参考。

关键词：Graves病；功率谱特征；AN
中图法分类号：R581.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Freeman R, Soul J P, Roberes M S, *et al*. Spectral analysis of heart rate in diabetic autonomic neuropathy. A comparision with standard tests of autonomic function[J]. Arch Neurol, 1991, 48(2): 185—189.

[2] Xu X H, Xie Z X, Chen L C, *et al*. A computerized system for analysing chaotic characteristics of heart period signal[J]. Chin J Biomed Eng, 1995, 4(3): 128.

[3] 李 荣, 严钟德, 刘东方. 糖尿病患者心率信号功率谱特征分析[J]. 重庆医科大学学报, 1999, 24(4): 365—367.

（编辑 张大春）

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