DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.048
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1233-03

论著

hERR1在乳腺癌中的表达及其对芳香族化酶表达的调控

陈 健,陈 敏,陈 彬,周长保,李渝萍,张 艳,曹廷兵,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 了解hERR1在乳腺癌及癌旁组织中的表达情况,以及它对芳香族化酶基因表达的调节作用。方法 收集乳腺癌患者的临床标本,应用RT-PCR法,研究癌组织及相应的癌旁组织中hERR1的表达情况;采用瞬时转染和CAT活性分析的方法,研究hERR1对芳香族化酶基因表达的调节。结果 hERR1在癌组织中的表达明显高于相应的癌旁组织(16/26例);hERR1以剂量依赖方式促进芳香族化酶启动子Ⅰ.3活性。结论 hERR1在体内可能起到促进乳腺癌生长的作用。

关键词:hERR1;乳腺癌;基因表达调控
中图法分类号:Q344.14 文献标识码:A

Expression and regulation on aromatase gene of hERR1 in breast cancer

CHEN Jian, CHEN Min, CHEN Bin, ZHOU Chang-bao, LI Yu-ping, ZHANG Yan, CAO Ting-bing, ZHOU Du-jin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression of hERR1 in breast cancer tissues and para-carcinoma tissues, and its effects on aromatase gene expression. Methods RT-PCR was applied to analyze the expression of hERR1 in breast cancer tissue and para-carcinoma tissue. Effects of hERR1 on aromatase gene expression were studied with transient transfection and CAT activity assay. Results hERR1 expressed in both normal and malignant breast tissues, with higher levels in carcinoma tissues than in corresponding peri-carcinoma tissues in the most of samples examined. The transient transfection assays showed that hERR1 increased CAT transcription under the control of promoter I.3 of the human aromatase gene in a dose-dependent manner. Conclusion hERR1 might increase the growth rate of breast cancer *in vitro*.

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

乳腺癌是妇女恶性肿瘤中发病率最高的一种,雌激素和雌激素受体(ER)在乳腺癌的发生、发展中具有重要作用。人雌激素受体相关受体1(Human estrogen receptor-related receptor 1,hERR1)是最早发现的孤儿受体之一,属于核受体超家族,与ER有很高的序列同源性,但却不与包括雌激素和雄激素在内的任何经典的类固醇激素结合[1]。hERR1广泛表达于体内各种组织,在骨骼发育与形成[2]、脂肪代谢[3]中均有重要作用。有关hERR1的作用机制目前所知甚少。最近的资料显示,hERR1的靶位点为5′-TCAAGGTCA-3′(hERR1效应元件,ERRE),这一序列出现于许多基因的启动子区,包括一些雌激素效应元件(ERE)中[4]。hERR1通过其靶位点充当转录活化因子[5],也可表现转录抑制功能[6]。hERR1可与ER竞争结合ERE或与ER直接以蛋白-蛋白的方式相互作用,以此调节ER对其靶基因的活化效应[4,5]。在乳腺癌的发展过程中hERR1有可能通过这两种方式影响到乳腺癌的发生与发展。

为此,我们检测了乳腺癌及其相应癌旁组织中hERR1的表达水平,通过比较两者的差异,以期找出hERR1的表达与乳腺癌之间是否有某种联系。芳香族化酶是负责雌激素生物合成的一个关键酶,催化雄激素转变为雌激素。最近以芳香族化酶启动子中的S1成分为探针,应用酵母单杂合技术筛选人乳腺cDNA表达文库,得到hERR1[7],暗示hERR1与芳香族化酶的表达调控有关。我们进一步应用瞬时转染和CAT实验检验了过表达的hERR1对人芳香族化酶基因启动子转录功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳腺癌标本 由重庆市肿瘤医院乳腺科提供,术后迅速液氮冷冻保存。

1.1.2 细胞株及质粒 MCF-7细胞,pSG5-hERR1,pSV-β-Gal,pUMS-p1.3aro-CAT(由美国Bechman癌症研究所Dr. Chen Shiuan惠赠)。

1.1.3 试剂及仪器 Tripure及Titan™单管RT-PCR试剂盒(宝灵曼公司),Eagle's MEM常规培养基(Hyclone公司),OPTI-MEM Ⅰ无血清培养基(GIBCO公司),脂质体Lipofectin(Life Tech. 公司),限制性内切酶及酶缓冲液(New England公司),Bio-Rad凝胶成像系统。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070359);"两个基地"建设专项基金资助项目(9910761946)
作者简介:陈 健(1972-),男,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事基因表达调控方面的研究。电话:(023)68752261
收稿日期:2001-09-28;修回日期:2002-01-20

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

1.2 乳腺癌组织内 hERR1 的表达情况

1.2.1 标本总 RNA 提取 采用 Tripure 一步法，按说明书进行。

1.2.2 RT-PCR 采用 Titan 单管 RT-PCR 法。参照 hERR1 及 ER 全长 cDNA，设计并合成引物：引物 1：5′-CAGGTGACCAGCGC-CATGTCC-3′，引物 2：5′-CAGTGGGTCCACCTCCGGCGCCG-3′，以质粒 pSG5-hERR1 为阳性对照，β-actin 为内参。反应条件：94 ℃ 1 min，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共 30 个循环。

1.2.3 Southern 印迹 RT-PCR 反应完成后，1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离反应产物，将产物转印到尼龙膜（Zeta 膜，Bio-Rad 公司）上，操作方法见用户手册。

1.2.4 探针标记 所用探针为 5′-GGTCCAGCTC-CCACTCGCTGCCTCC-3′。操作按《分子克隆实验指南》进行。

1.2.5 杂交 按 Bio-Rad 公司用户手册进行。杂交之后放射自显影 24～36 h。

1.3 hERR1 对芳香族化酶基因表达的调控作用

1.3.1 乳腺癌细胞 MCF-7 的培养 MCF-7 细胞培养于 Eagle's MEM 常规培养基中，培养基含 10% FBS，100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素。

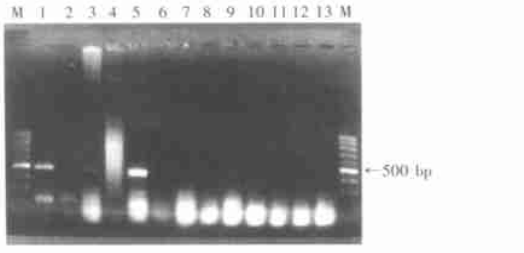
1.3.2 瞬时转染 方法按 Lipofectin 试剂盒使用手册进行。将 MCF-7 接种 6 孔培养皿，培养至 70%～80% 满密度（18～24 h），用被检质粒＋pSV-β-Gal（w/w＝3∶1）总计 5 μg DNA 和 8 μl Lipofectin 共转染细胞（20～24 h），pSV-β-Gal 用以标化转染效率。对每一转染分别用 0.25 μg 报告质粒 pUMS-p1.3aro-CAT 和含量依次递增的 hERR1 表达质粒 pSG5-hERR1。转染完成后，移去含 Lipofectin 和 DNA 的培养基，代之以常规培养基继续培养 24 h。用细胞刷收集细胞于 1.5 ml Ep 管，12 000× g 离心沉淀细胞，加入 100 μl 0.25 mol/L Tris-HCl（pH8.0）重悬细胞，液氮冻融裂解细胞。12 000× g 4 ℃离心 5 min，收集上清。

1.3.3 β-半乳糖苷酶及 CAT 活性分析 操作按《分子克隆实验指南》进行。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和癌旁组织中 hERR1 表达水平的差异

收集乳腺癌标本，以 Tripure 法提取标本总 RNA，经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，选取其中 RNA 完整的 26 对，以 hERR1 特异引物进行 RT-PCR 扩增，经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，可见 500 bp 处 hERR1 特异的条带，癌组织明显较癌旁组织高，见图 1，阳性率为 61.52%。进一步以 Southern Blotting 鉴定，证实 500 bp 处确为 hERR1 特异的条带，见图 2。



M：100 bp DNA ladder marker；1，3，5，7，9，11：Carcinoma tissues；2，4，6，8，10，12：Para-carcinoma tissues

图 1 乳腺癌及癌旁组织 hERR1 特异的 RT-PCR

Fig 1 Specific RT-PCR for in breast cancer and para-carcinoma tissues

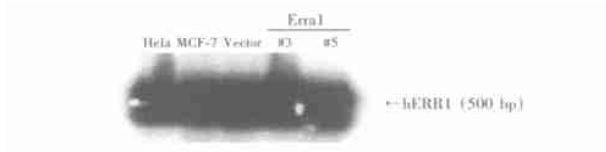
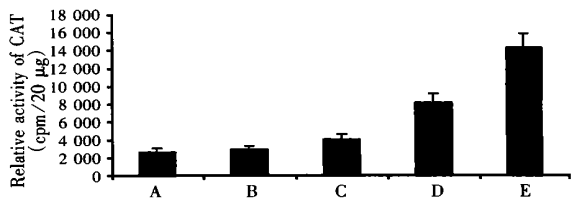


图 2 Southern Blotting 鉴定 hERR1 特异的 RT-PCR 产物

Fig 2 Southern blot of RT-PCR products for hERR1

2.2 hERR1 对芳香族化酶启动子Ⅰ.3 的影响

芳香族化酶催化雄激素转变为雌激素，该反应是雌激素生物合成的关键步骤，并在激素依赖性乳腺癌的病理发生和子宫内膜癌中有重要作用。最近，Yang，C. 等以芳香族化酶的一个沉默子 S1 为探针，采用酵母单杂合技术筛选人乳腺 cDNA 文库，分离到 hERR1 cDNA[8]，同时发现 hERR1 能特异结合于序列 5′-AAGGTCAGAAAT-3′，该片段位于芳香族化酶基因的启动子Ⅰ.3 区域，进一步提示 hERR1 可能与乳腺癌有关。为检测 hERR1 与该序列结合后对芳香族化酶启动子活性的影响，我们以不同量的 hERR1 表达质粒和含芳香族化酶基因组片段（包含有启动子Ⅰ.3 和 S1）的 CAT 报告质粒共转染 MCF-7 乳腺癌细胞，见图 3，hERR1 诱导启动子Ⅰ.3 引导的 CAT 活性以剂量依赖方式增高。



1：Reporter plasmid pUMS-p1.3 aro-CAT（0.25 μg each）；2：plasmid pSG5-hERR1；A：plasmid1；B：plasmid1＋0.10 μg plasmid2；C：plasmid1＋0.25 μg plasmid2；D：plasmid1＋0.50 μg plasmid2；E：plasmid1＋1.00 μg plasmid2

图 3 hERR1 对芳香族化酶基因启动子Ⅰ.3 转录功能的影响

Fig 3 Fig 3 Effect of hERR1 on transcriptional functions of aromatase promotorⅠ.3

3 讨论

3.1 雌激素、ER、hERR1 与乳腺癌

乳腺癌是妇女恶性肿瘤中发病率最高的一种，其发病涉及多方面的原因，其中雌激素及其受体（ER）起到非常重要的作用。雌激素通过与位于靶组织细胞内的相应受体 ER 的结合，引起 ER 构象改变而二聚化，二聚化的激素-受体复合物结合于特定靶基因上的顺式作用元件（雌激素效应元件 ERE），从而调节一些重要基因的表达，进而引起明显的生物学效应。

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（DBD）为探针筛选 cDNA 文库而得到的[1]。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，因此 hERR1 很可能结合与 ER 靶位点相同或相似的 DNA 序列。事实上，hERR1 不仅能以单体形式结合于扩展的

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

半位点序列 5′-TCAAGGTCA-3′(ERRE)[4]，也可以同二聚体形式结合于雌激素效应元件(ERE)[8]。许多核受体也能与半位点 5′-AGGTCA-3′结合，与之相似的扩展的半位点 5′-TCAAGGTCA-3′也是 SF-1 结合位点(即 SFRE)，因此，ERR 的靶基因与 SF-1 或 ER 的靶基因有很大的重叠性，如糖酵解(己糖激酶、烯醇化酶)、脂肪酸代谢(MCAD)中的一些酶。

基于以上几点，我们推测 hERR1 在乳腺癌的发生与维持中有重要作用，并研究了乳腺癌组织与正常组织中 hERR1 表达量的差异，结果显示，在本实验所研究的 26 例乳腺癌病例中，16 例标本的癌组织 hERR1 表达量明显高于癌旁组织，证实 hERR1 的确与乳腺癌有关。这方面仍需更多来自临床标本的实验结果。

3.2 芳香族化酶与雌激素及乳腺癌的关系

雌激素在体内由睾酮转化而来，反应由芳香族化酶催化。芳香族化酶属于细胞色素 P450 家族，也是雌激素生物合成的关键酶。研究表明，芳香族化酶/雌激素的局部合成对乳腺癌的发展也很重要[9]。芳香族化酶基因的表达调控非常复杂，因该基因含有多个启动子，在不同组织中有不同的表达特点[9]。芳香族化酶启动子 1.3 区含有一 S1 成分(位于芳香族化酶启动子Ⅰ.3 和Ⅱ之间的一个沉寂子)，为 hERR1 结合位点，暗示 hERR1 很可能也参与了对芳香族化酶基因表达的调节。为此，我们用含芳香族化酶启动子Ⅰ.3 和三个串联的 S1CAT 报告质粒 pUMS-pⅠ.3-CAT，与被检质粒 pSG5-hERR1 一起共转染 MCF-7 细胞，结果显示 hERR1 对启动子Ⅰ.3 有一种剂量依赖性的激活方式。我们的实验结果表明，hERR1 对芳香族化酶启动子Ⅰ.3 有活化作用，因而可能与雌激素的局部代谢有关，暗示了 hERR1 与乳腺癌之间有一种相关性，这种关联的纽带之一是芳香族化酶。

参考文献：

[1] Giguere V, Yang N, Segui S, *et al*. Identification of a new class of steroid hormone receptors[J]. Nature, 1988, 331(6 151): 91—94.
[2] Bonnelye E, Vanacker J M, Dittmar T, *et al*. The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development[J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(7): 905—916.
[3] Sladek R, Bader J A, Giguere V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptorα is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(9): 5 400—5 409.
[4] Johnston S D, Liu X, Zuo F, *et al*. Estrogen-related receptor α1 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.
[5] Yang N, Shigeta H, Shi H P, *et al*. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5 795—5 804.
[6] 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): 8 586—8 590.
[7] 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): 5 695—5 700.
[8] 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.
[9] Zhou C, Zhou D, Esteban J, *et al*. Aromatase gene expression and its exon usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). J Steroid Biochem Mol Biol, 1996, 59(2): 163—171.

(编辑 薛国文)

文章编号：1000-5404(2002)10-1235-01

个案与短篇

特发性血小板减少性紫癜患者 PAIgG 的检测及意义

Level and significance of platelet-associated IgG in the plasma of persons with ITP

刘 红，彭贤贵，陈幸华，王庆余，孔佩艳，张 曦 (第三军医大学附属新桥医院血液科，重庆，400037)

原发性血小板减少性紫癜(ITP)在临床上是较为常见的出血性疾病，90％患者发病与免疫异常有关。行血小板相关抗体(PA IgG)检测，对临床诊断和治疗均有一定的帮助。现将我院检测 122 例 ITP 患者的 PA IgG 结果进行分析，报告如下。

1 材料和方法

1.1 检测对象

122 例患者均为我院住院或门诊病人，经临床及实验室确诊，符合诊断标准[1]。其中男性 45 例，女性 77 例，年龄 10～73 岁，平均年龄 38.6 岁。急性型(AITP)36 例，慢性型(CITP)86 例。正常对照 25 例，均为健康体检者，男性 14 例，女性 11 例，年龄 17～56 岁，平均年龄 31.5 岁。

1.2 测定方法

抽取静脉血 5 ml，用 EADT 抗凝。用 ELISA 方法测定血小板相关抗体(PA IgG)含量。由上海太阳生物技术公司提供的试剂合，严格按操作规程进行。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行 t 检验。

2 结果

正常对照组测得值为 44.63±11.43 ng/10^7 PA，与标准值一

(下转 1138 页)

作者简介：刘 红(1960—)，女，河南省新乡市人，副主任医师，主要从事白血病发病机制方面的研究，发表论文 16 篇。电话(023)68755609

收稿日期：2002-03-01；修回日期：2002-07-20

(C)1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net