DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.017
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1421-04

论著

核受体及核受体辅活化子对芳香族化酶基因转录调控的研究

周度金[1,2],杨 春[1],周长保[1],陈 彬[1],陈 敏[1],陈 健[1],李渝萍[1],张放鸣[1],陈 煊[2] ([1]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;[2]Beckman Research Institute of the City of Hope, Duart, California 91010, USA)

提 要:目的 研究核受体及核受体辅活化子对芳香族化酶基因转录的调控。方法 酵母单、双杂合筛选、蛋白质-蛋白质相互作用分析、DNA突变、报告基因转染功能分析、迁移率改变及足迹分析等技术。结果 ①鉴定了主导芳香族化酶基因在乳腺癌细胞中表达的启动子Ⅰ.3和启动子Ⅱ的确切位置以及对这两个启动子起调节作用的沉默子(Silencer) S1和cAMP效应要素(CREaro)等顺式作用元件。②分离鉴定了能与类固醇衍生因子1(Sterodogenic Factor1, SF1)相互作用并参与芳香族化酶基因转录调控的转录因子,其中近50%的克隆编码两种新的富含脯氨酸的核受体辅调节蛋白质,命名为PNRC(Proline-rich Nuclear Receptor Coactivators)。功能分析显示PNRC通过与SF1或ERR1相互作用,进一步增强SF1或ERR1对芳香族化酶基因启动子1.3的转录激活作用。③缺失突变及定点突变分析证明含SH3结合模体的23个氨基酸残基区域是PNRC分子与核受体的相互作用位点。结论 我们鉴定了主导芳香族化酶基因在乳腺癌细胞中表达的启动子及调控序列,克隆了与DNA调控序列结合的蛋白质和通过蛋白质相互作用参与芳香族化酶基因转录调控的转录因子——一种新型的核受体辅活化子PNRC。

关键词:核受体;芳香族化酶;辅活化子;PNRC;基因表达调控
中图法分类号:R71;Q571 文献标识码:A

Transcriptional regulation of aromatase gene by nuclear receptors and a new family of nuclear receptor coactivators, PNRCs (Proline-rich nuclear receptor coactivators)

ZHOU Du-jin, YANG Chun, ZHOU Chang-bao, CHEN Bin, CHEN Ming, CHEN Jian, LI Yu-ping, ZHANG Fang-ming, CHEN Shiuan (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the transcriptional regulation of the aromatase gene by nuclear receptors and nuclear receptor coactivators. Methods Yeast one-hybrid and yeast two-hybrid screenings, protein-protein interaction assays, mammalian cell transfections and CAT assays, DNA deletion, mobility shift assay and DNaseI footprinting, et al. Results ① we have identified promoters I.3 and II, two major promoters driving aromatase expression in breast cancer cells, and two regulatory elements including a silencer S1 and a cAMP-responsive element, CREaro. ②we have searched for co-regulatory proteins interacting with these proteins using bovine SF1 as the bait in a yeast two-hybrid screening of a human mammary gland cDNA expression library. About 50% of the positive clones obtained from this screening encode two novel nuclear receptor coactivators, named PNRCs (Proline-rich Nuclear Receptor Coactivators). PNRCs interacted with the orphan receptors SF1 and ERRα1 in a ligand-independent manner. These proteins function as a coactivator to enhance the transcriptional activation towards promoter I.3 of the human aromatase gene mediated by SF1 and ERRα-1.③ Results from a mutagenesis study demonstrated that a 23-amino acid sequence region containing a SH3-binding motif is crucial for PNRCs to interact with the nuclear receptors. Conclusion we have identified promoters driving aromatase expression in breast cancer cells and their two regulatory elements, and have cloned proteins binding to these regulatory elements and a new family of nuclear receptor coactivators, PNRCs, which act as transcriptional factors taking part in transcriptional regulation of aromatase gene by protein-protein interaction.

Key words: nuclear receptor; aromatase; coactivators; PNRC; gene expression regulation

芳香族化酶(Aromatase)是雌激素生物合成中最后一步限速酶,其表达具有明显的组织特异性。保持体内芳香族化酶的活性及雌激素的正常水平是维持性征,生殖生育能力及许多代谢过程所必需的。雌激素通过与雌激素受体(ER)形成复合物继而与靶基因上的雌激素效应要素(ERE)结合,介导一系列基因的表而促进癌细胞增殖生长。已知2/3的乳腺癌的生长依赖于雌激素。大量来自酶活性测定、免疫组化分析以RT-PCR分析的资料显示,芳香族化酶在乳腺癌组织的表达高于正常乳腺组织[1]。一系列细胞培养和动物模型研究进一步证明了癌细胞局部表达的芳香族化酶足以促进癌细胞本身的生长。因此,深入认识肿瘤细胞中芳香族化酶基因表达调控的机制,将为探索控制乳腺癌局部雌激素形成,限制癌细胞生长的新途径提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MATCHMARKER双杂合系统(Clontech);[^{14}C]-氯霉素(放射活性为55 mCi/mmol, 1 Ci=3.7×10^{10} Bq)(Amersham);各种激素(Sigma);酵母转化试剂盒(Bio 101);Eagle's MEM培养液及经木炭葡聚糖(Charcoal-1 dextran)处理的胎牛血清(Hyclone);Lipofectin(Life);CAT表达载体pUMSVOCAT和牛SF1 cDNA分别由Kurichi博士(密西根大学)和Parker博士(Duke大学)提供。

1.2 质粒构建

所有重组DNA和质粒构建的实验都按照标准的操作程序进行,并且质粒构建中插入DNA片段的序列和方向都经过标准的DNA测序法确定。所需目的片段通过PCR产生,恰当酶

作者简介:周度金(1947—),女,江西省临川市人,博士,教授,主要从事分子内分泌学及肿瘤分子生物学方面的研究,发表论文40篇。电话:(023)68752261
收稿日期:2001-01-19;修回日期:2001-05-29

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

切后连接到相应的表达质粒中。构建的表达质粒有：DBD-GAL4-SF1 融合蛋白表达质粒 pGBT9-SF1；含全长 PNRC 编码序列的 PUC13-B4-2；PNRC 的各种突变体（PNRC270-327，PNRC270-318，PNRC278-300，PNRC270-327 和 PNRC319-327）与 GAL4 AD 融合蛋白酵母表达质粒（pACT2）等。

1.3 酵母单、双杂合筛选

MATCHMAKET 酵母单、双杂合系统，根据 Clontech 提供的方法进行。双杂合筛选以 pGBT9-SF1 为诱饵筛选 MATCHMAKER 乳腺 cDNA 表达文库。pGBT9-SF1 与 Gal4AD 文库质粒共转化酵母细胞，转化子铺在缺乏组氨酸、亮氨酸和酪氨酸的平板上进行 His 报告基因表达筛选，阳性转化子再用菌落影印分析进行β-半乳糖苷酶活性筛选，从而得到真阳性杂合质粒中的核苷酸插入序列，该序列在 GenBank 中与已知序列进行同源性分析和鉴定。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用分析

酵母双杂合分析用于检查体内蛋白质-蛋白质相互作用。依据 Clontech 手册说明，在酵母双杂合分析中用酵母交配法研究蛋白质-蛋白质相互作用。所得的阳性菌落按手册说明进行液体β-半乳糖苷酶活性测定。

1.5 紫外交联分析

紫外交联分析用于鉴定与芳香族化酶基因启动子 1.3 起调节作用的沉然子 S1 特异结合的蛋白质。在含或不含竞争性 DNA 的情况下，10 mg 的 MCF-7 细胞核蛋白与 1×10^5 cpm ^{32}P-标记，BrdU-替代的 S1 和 2.5 μg 的 poly(dI-dC) 在 20 μl 结合缓冲液中室温孵育 30 min。混合物在距紫外交联仪光源 5 cm 远处用 254 nm 波长，120 000 μW/cm^{2}强度照射 6.5 min 后，在 10～20% SDS-PAGE 中进行电泳和放射自显影。

1.6 哺乳系细胞转染和 CAT 分析

HeLa 细胞培养在血清经 5% 木炭葡聚糖（Charcoal-1 dextran）处理的 Eagle's MEM 培养液中。细胞用脂质体 Lipofecin 依据厂商提供的说明转染。收集的细胞悬浮于 0.25 mol/L Tris-HCl pH 8.0 并反复冻融，采用液闪计数法测定含等量蛋白的每种细胞抽提物的 CAT 活性。

2 结果及讨论

2.1 主导芳香族化酶基因在乳腺癌细胞中表达的启动子及其顺式作用元件的鉴定

人类芳香族化酶基因含有 10 个外显子（Exon），第一外显子（Exon1）为非编码区。从不同组织部位分离的芳香族化酶 mRNA 的第一外显子序列不同。由于翻译的起始密码位于第二外显子（Exon2），故各组织部位所表达的芳香族化酶蛋白结构相同。迄今至少发现 7 种不同的第一外显子[2]，提示芳香族化酶基因的表达是由多个组织特异性的启动子所控制。它在胎盘中的表达由启动子 1.1 驱动；在卵巢中的表达由启动子Ⅱ控制；在脂肪组织包括正常乳腺组织中的脂肪基质细胞中的表达主要由启动子 1.4 主导。我们以及其他实验室的研究发现[3,4]，在乳腺癌组织中，主导芳香族化酶基因表达的启动子由正常情况下的 1.4 变成启动子 1.3 和启动子Ⅱ。为进一步弄清癌变过程中芳香族化酶基因启动子使用发生转换的机理，我们用 DNA 缺失突变、报告基因转录功能分析、迁移率改变及足迹分析等技术，鉴定出启动子 1.3[5] 以及对启动子 1.3 起调节作用的沉默子 S1（5′-CCAAGGTCAGAATGCTGCAATTCAAGCCA-3′）[6] 和起正性调节作用的 cAMP 效应要素（CREaro，TGAACGTA）[7]。

为进一步了解沉默子和 cAMP 效应要素如何相互影响，我们用含启动子 1.3 调控区不同顺式作用元件的 CAT 报告质粒转染肿瘤成纤维细胞；将转染后的细胞在含有 20 μmol/L 的 Forskolin 或不含 Forskolin 的培养液中继续培养 24 h 后，检测细胞抽提物中的 CAT 活性。如图 1 所示，用既含沉默子又含 cAMP 效应要素的质粒（pUMS-68/+129CAT 和 pUMS-104/+129CAT）所转染的并经 Forskolin 处理的细胞，其 CAT 活性明显地高于只用含沉默子质粒（pUMS-34/+129CAT）转染的细胞中的 CAT 活性，提示在 cAMP 存在下，起正性调节作用的 cAMP 效应要素可以克服沉默子 S1 对启动子 1.3 转录功能的负性调节作用。鉴于这一发现以及其他研究资料，我们对癌变过程中芳香族化酶基因启动子转换的可能机制提出这样的假设：在正常乳腺脂肪基质细胞中，芳香族化酶的表达主要由启动子 1.4 驱动，而启动子 1.3 和启动子Ⅱ的转录被沉默子 S1 所抑制。在乳腺癌组织中，由于目前尚不清楚的因素，细胞中 cAMP 浓度被升高，解除了沉默子对启动子 1.3 和启动子Ⅱ的转录抑制，从而增强了依赖于 cAMP 的启动子 1.3 和启动子Ⅱ的转录活性。

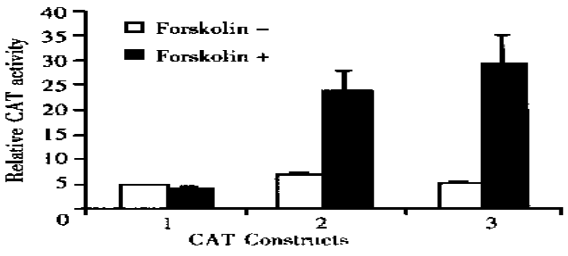


图 1 不同质粒转染的肿瘤成纤维细胞的 CAT 活性比较

Fig 1 Comparison of CAT activities in tumor fibroblasts transfected with different CAT plasmids

1: The plasmid containing only silencer; 2, 3: The plasmids containing both of the cAMP-responsive element and the silencer

2.2 孤儿受体（Orphan nuclear receptor）对芳香族化酶启动子 1.3 的转录活性的调节。

真核基因转录水平的调控是通过转录因子（反式作用因子）与靶基因上特定的 DNA 序列（顺式作用元件）结合或通过蛋白质—蛋白质相互作用而实现的。迁移率改变和足迹分析显示，乳腺癌细胞 MCF-7 核抽提物中存在能与沉默子 S1 结合的蛋白质，紫外交联分析进一步发现至少有 4 种分子量分别为 $1\,500\times 10^3$，45×10^3，30×10^3和 25×10^3的蛋白质与 S1 特异结合，见图 2。

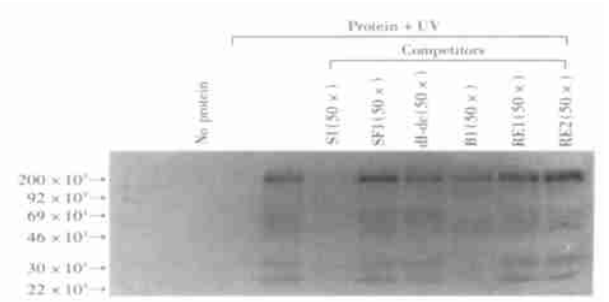


图 2 紫外交联分析鉴定的沉默子结合蛋白

Fig 2 Characterization of the silencer binding proteins by UV cross-linking analysis

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

为弄清这些蛋白质的性质, 以沉默子 S1 序列为探针, 采用酵母单杂合技术(以 DNA-蛋白质相互作用为原理), 筛选人乳腺组织 cDNA 表达文库以克隆编码这些 S1 结合蛋白的基因。结果发现, 大多数阳性克隆是编码数种孤儿受体的基因, 包括 ERR1(Estrogen receptor-related receptor 1), Ear-3 和 RAR[8]。迁移率改变和足迹分析发现, 这些孤儿受体与 S1 上的同一序列即 5′-AAGGTCAGAAAT-3′ 结合[8], 其中 5′-AGGTCA-3′ 又称为 SF1 结合位点, 孤儿受体 SF1 能与此序列结合从而上调芳香族化酶基因在卵巢中的转录。瞬时转染实验的结果进一步发现, 以上孤儿受体虽然能与芳香族化酶基因上的同一 DNA 序列结合, 但有的激活芳香族化酶基因启动子的转录活性, 如 ERR1, SF1, 见图 3; 有的却抑制启动子的活性, 如 Ear-2, COUP-TF1, RAR, 见图 4。故 S1 对启动子的抑制作用可能是多种孤儿受体与这一序列竞争结合以及各种孤儿受体差异表达所产生的综合效果。

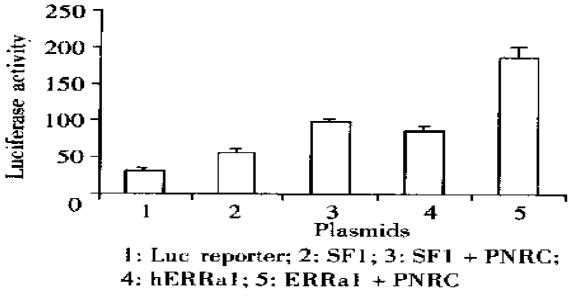


图 3　孤儿受体 ERR1, SF1 对 HeLa 细胞中人芳香族化酶基因启动子 1.3 的转录激活作用

Fig 3　The transactivation activities of SF1 and ERR$_{\alpha 1}$ on promoter 1.3 of the human aromatase gene in HeLa cells. HeLa cells were transfected with reporter (pGL(SF1)3-P1.3aro-Luciferase) or along with nuclear receptors or receptors plus PNRC 48 h after transfection, cells were harvested for luciferase assays

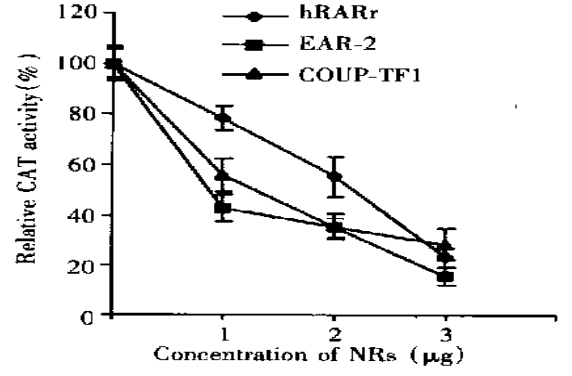


图 4　孤儿受体 EAR-2, COUP-TF1 和 RARγ 对 HeLa 细胞中人芳香族化酶基因启动子 1.3 的负调控作用

Fig 4　Negative regulatory effects of orphan nuclear receptors EAR-2, COUP-TF1, and RARγ on promoter 1.3 of the human aromatase gene in HeLa cells. HeLa cells were transfected with reproter plasmid (pUMS-68γ+129CAT) along with indicated amount of expression plasmids for indicated nuclear receptors (pSG5-hRARγ, pSG5-EAR-2, and pSG5-COUP-TF1). 48 h after transfection, cells were harvested for CAT assays

2.3　核受体辅活化子 PNRC 的克隆及其对芳香族化酶基因的转录调控

2.3.1　PNRC 的克隆　　核受体是一类能与靶基因上特定的激素效应序列结合从而介导多种基因转录的转录因子。最近研究表明, 核受体与靶基因上的激素效应元件结合后, 它对靶基因转录的调节除需要与转录起始复合物上的转录因子相互作用外, 还需要与一类新近发现的桥梁分子即核受体辅活化子和核受体辅阻遏子(Nuclear receptor corepressors)相互作用[9]。为进一步理解上述核受体对芳香族化酶基因的转录调控机制, 我们以 SF1 为诱饵蛋白, 采用酵母双杂合技术筛选人乳腺组织 cDNA 表达文库, 拟寻找乳腺癌组织中与 SF1 相互作用并参与调节芳香族化酶基因转录的转录因子。实验结果除克隆到几种已知的核受体辅活化子如 SRC-1 和 RIP140 外, 其余大多数的阳性克隆编码两种富含脯氨酸的蛋白质, 命名为 PNRC[10]。

2.3.2　PNRC 与核受体的相互作用　　PNRC 虽然是由于它与 SF1 的相互作用而被克隆, 酵母双杂合分析进一步显示, 它却能与所有被检测的核受体的激素结合域如 ER/HBD, PR/HBD, TR/HBD, RA/HBD, RXR/HBD 以及 SF1 和 ERR1 相互作用。PNRC与 SF1 和 ERR1 的相互作用是配体非依赖性的, 而与其他核受体间的相互作用则完全依赖于相应配体的存在。此外, 与其他核受体辅活化子如 SRC-1、GRIP1 一样, PNRC 与核受体间的相互作用需要受体分子上的功能性 AF-2 结构域。PNRC 不与带有 AF-2 区突变且丧失转录激活功能的雌激素受体发生相互作用[10]。

2.3.3　PNRC 作为辅活化子的功能分析　　PNRC 调节多种核受体包括 ER, SF1, ERR1, PR 和 TR 的转录激活功能。然而, 如图 5 所示, 它对各种核受体在 HeLa 细胞中的辅激活程度不同, 上述核受体在 HeLa 细胞中内源性表达水平的差异可能是部分原因。如图 5 所示, PNRC 通过与 SF1 和 ERR1 的相互作用进一步增强了 SF1 和 ERR1 对芳香族化酶基因启动子 1.3 的转录活性。

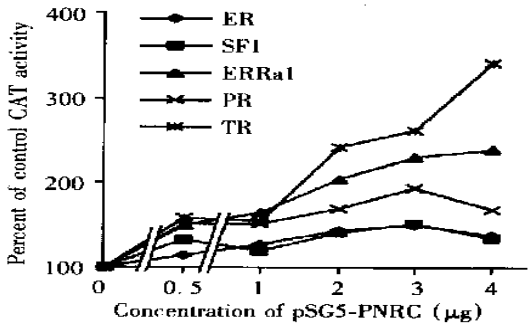


图 5　PNRC 在 HeLa 细胞中对各种核受体辅激活程度的比较

Fig 5　Comparison of coactivation activity of PNRC on transactivation mediated by different NRs in HeLa cells. HeLa cells were co-transfected with the various nuclear receptors-expressing plasmids ane their cognate hormone response element containing reporters (receptor/HRE) along with indicated amount of pSG5-PNRC or empty expression vector. The cells were then treated with their ligands for 24 h and the reporter CAT activity was determined

2.3.4　PNRC 与核受体相互作用位点的鉴定　　已知大多数核受体辅活化子依赖于其分子上被称为 NRbox(Nuclear receptor

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

box)的保守模体 LXXLL 与核受体相互作用[11]。PNRC 的 C 末端有 NRbox 样的序列 HLKTLL。从 PNRC 270-327 片段中去掉包括 NRbox 样序列在内的最后 10 个氨基酸残基，并不影响 PNRC 与核受体的相互作用，说明 PNRC 分子上 NRbox 样序列不是它与核受体相互作用的部位。进一步的缺失突变分析发现 PNRC278-300 区域为 PNRC 与核受体相互作用必须的[10]。这个由 23 个氨基酸残基组成的短肽富含脯氨酸，其中有一个 SH3 结合模体 S-D-P-P-S-P-S。将其中的脯氨酸残基转变成丙氨酸，即 P287A 和 P290A，几乎完全破坏了 PNRC 与多种核受体包括 SF1，PR/HBD，TR/HBD，RAR/HBD 和 RXR/HBD 的相互作用见图 6。与其他的核受体辅活化子不同，PNRC 与核受体的相互作用不是通过 NRbox 而是通过 SH3 结合模体，因此，PNRC 代表一种新型的核受体辅活化因子。

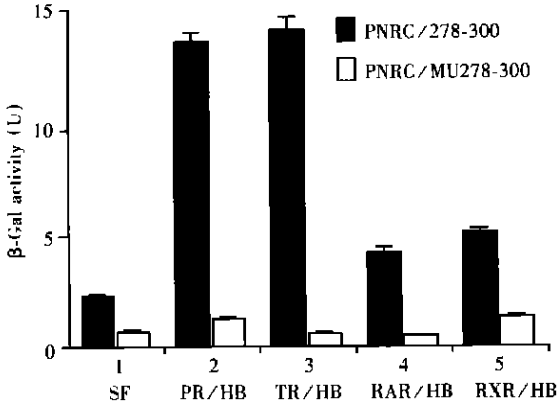


图 6 PNRC SH3 结合模体的突变分析

Fig 6 Mutational analysis of the SH3-binding motif in PNRC. Yeast strain Y187 was co-transformed with $pACT_2$-$PNRC_{278-300}$ (wild type) or $pACT_2$-$PNRC_{278-300}$ (mutant P287A or P290A) along with each type of the Gal4DBD fusion protein expression plasmids for SF1, PR/HBD, TR/HBD, RAR/HBD, and RXR/HBD. The Y187 transformants carrying both plasmids were selected for β-galactosidase activity assays

参考文献：

[1] Harada N. Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 61(3—6): 175—184.

[2] Sun X Z, Zhou D, Chen S. Autocrine and paracrine actions of breast tumor aromatase. A three-dimensional cell culture study involving aromatase transfected MCF-7 and T-47D cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 63(1—3): 29—36.

[3] Zhou C, Zhou D, Esteban J, *et al*. Aromatase gene expression and its exon 1 usage in human breast tumors. Detection of aromatase messager RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996, 59(2): 163—171.

[4] Bulun S E, Noble L S, Takayama K, *et al*. Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997, 61(3—6): 133—139.

[5] Zhou D, Clarke P, Wang J, *et al*. Identification of a promoter that controls aromatase expression in human breast cancer and adipose stromal cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(25): 15 194—15 202.

[6] Zhou D, Chen S. Characterization of a silencer element in the human aromatase gene[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 353(2): 213—220.

[7] Zhou D, Chen S. Identification and characterizaiton of a cAMP-responsive element in the region upstream from promoter 1.3 of the human aromatase gene[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 371(2): 179—190.

[8] Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERRa-1 orphan receptor[J]. Cancer Res, 1998, 58(24): 5 695—5 700.

[9] Horwitz F B, Jackson T A, Bain D L, *et al*. Nuclear receptor coactivators and corepressors[J]. Mol Endocrinol, 1996, 10(10): 1 167—1 177.

[10] 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 SF1(steroidogenic factor 1) and ERRα1(estrogen related receptor α-1)[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(7): 986—998.

[11] Heery D M, Kalkhoven E, Hoare S, *et al*. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors[J]. Nature, 1997, 387(6 634): 733—736.

（编辑 陈聪连）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标准	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(Database)、计算机程序(Computer program)及电子公告(Electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

（本刊编辑部）

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