DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.023
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1183-03

论著

毒杀芬对孤儿受体雌激素相关受体1(ERRα-1)的拮抗作用

杨 春[1],陈 彬[1],陈 敏[1],陈 健[1],李渝萍[1],周长保[1],周度金[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, U.S.A)

提 要:目的 研究毒杀芬(Toxaphene)对孤儿受体雌激素相关受体1(Estrogen-related receptor, ERRα-1)活性的影响。方法 细胞瞬时和稳定转染及氯霉素酰基转移酶和芳香族化酶活性测定。结果 毒杀芬抑制了由ERRα-1所介导的氯霉素酰基转移酶的转录表达和辅活化子(Coactivator)GRIP1诱导的ERRα-1的活性。在构建的稳定高表达ERRα-1的HepG2肝癌细胞株中,ERRα-1增加了芳香族化酶的转录表达,ERRα-1高表达细胞株与10μmol/L浓度的毒杀芬温育24 h后,芳香族化酶活性降低到非ERRα-1转染的HepG2细胞中芳香族化酶活性的水平。结论 毒杀芬是ERRα-1的拮抗剂,它拮抗了ERRα-1调节芳香族化酶转录的作用,从而使该酶的表达量降低。

关键词:雌激素相关受体1;毒杀芬;孤儿受体;芳香族化酶
中图法分类号:R392.1;R977.12;R979.8 文献标识码:A

The antagonists of ERRα-1 orphan receptor: toxaphene

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

Abstract: **Objective** To explore the effect of toxaphene on the activity of orphan nuclear receptor, estrogen related receptor α-1 (ERRα-1). **Methods** Transient and stable transfection experiments in cells and assays of chloramphenicol acetyltransferase activity and aromatase activity were used. **Results** Toxaphene had an antagonist activity against ERRα-1 mediated transcription of the reporter chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and to be capable of suppressing the GRIP1 coactivator-induced ERRα-1 activity as revealed by transient transfection experiments using the SK-BR-3 breast cancer cell line. In addition, A stable ERRα-1 expressing HepG2 hepatoma cell line was generated, and the aromatase activity in the transfected cell line was found to be twice that in the untransfected cell line. 24 h incubation of an ERRα-1-transfected HepG2 cell line with 10μmol/L toxaphene reduced its aromatase activity to the level in the untransfected cell line. **Conclusion** Toxaphene is the antagonist of ERRα-1. It antagonize the regulation of aromatase activity and decrease the expression of aromatase.

Key words: ERRα-1; toxaphene; orphan receptor; aromatase

雌激素相关受体1(ERR-1)的cDNA是在利用人雌激素受体α (Estrogen receptor α, ERα)的DNA结合域为探针去筛选cDNA文库时首次被分离出来的[1]。ERRα-1在脑、心脏、骨骼肌和褐色脂肪等组织中有较高表达,在骨骼发育、骨骼肌形成和脂肪代谢中起作用。我们的最新研究结果发现ERRα-1在人乳腺组织中表达,并调节该组织中芳香族化酶的转录,从而调节雌激素的合成[2]。同时ERRα-1可通过直接的DNA竞争结合和与ERα间形成蛋白质-蛋白质相互作用的方式参与雌激素对某些基因启动子的活化作用[3]。ERRα-1是孤儿核受体家族中的一员,其配体尚未被发现,我们的实验发现一种杀虫剂——毒杀芬是ERRα-1的拮抗剂。

1 材料和方法

1.1 材料

毒杀芬和CAT表达载体pUMSVOCAT分别由Shelby博士(美国环境卫生科学研究院)和Kurachi博士(密西根大学)提供。[^{3}H]—雄甾烷二酮(NEN-Dupont),[^{14}C]-氯霉素(Amersham),SK-BR-3乳腺瘤细胞(ATCC),木炭葡聚糖处理血清(Hyclone),Lipofectin(Life)。

1.2 表达质粒

为构建人ERRα-1哺乳细胞表达质粒pSG5-hERRα-1,用PCR方法扩增两端带*EcoR*Ⅰ酶切位点的hERRα-1编码区,将其插入到pSG5载体的*EcoR*Ⅰ酶切位点上。辅活化子GRIP1的表达质粒pSG5-GRIP1由洛杉矶南加州大学Stallcup博士赠送。

1.3 细胞瞬时转染实验和CAT检测

根据Lipofectin制造商的操作程序对哺乳动物细胞进行瞬时转染实验。每盘细胞中加入10μg的被测质粒和3μg的pSV-β-Gal质粒(用来平衡转染的效率)。转染后16 h,细胞重新放置在含5%木炭葡聚糖处理的小牛血清培养液中,并同时加入被测试药物。48 h后,收集细胞沉淀悬浮于0.25 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶液中,反复冻融后,分装细胞破裂物并用于β-半乳糖苷酶活性检测,然后检测含有等量β-半乳糖苷酶活性的细胞破碎物中的氯霉素酰基转移酶(Chloramphenicol acyltransferase activity, CAT)活性。

1.4 稳定转染建立ERRα-1高表达HepG2细胞株

1.4.1 人ERRα-1表达质粒pHβ-hERRα-1的构建 用PCR方法扩增两端带*EcoR*Ⅰ酶切位点的hERRα-1编码区,将其连接到表达载体pHβ中,DNA测序确认表达质粒的正确性。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(300702359)
作者简介:杨 春(1966—),女,四川省荣昌县人,博士,副教授,主要从事芳香族化酶基因表达调控方面的研究,发表论文10篇,现在加拿大蒙特利尔Sainte-Justine医学研究中心遗传系从事博士后工作。电话:(023)68752261
收稿日期:2001-01-02;修回日期:2001-05-25

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

1.4.2 HepG2稳定转染实验 10 μg 的 pHβ-hERRα-1 表达质粒与 20 μl 的 Lipofectin 共转染 HepG2 细胞，16 h 后，细胞转至 Eegle' s MEM 培养液中培养 48 h，然后进行G418 筛选，在 2 周内逐渐将G418 浓度增加到 1 000 μg/ml；再挑选单个的克隆到 25 cm^2的培养瓶中培养。

1.5 芳香族化酶活性的测定

培养的组织细胞清洗后加入 100 nmol/L 的 1β-[^{3}H] N-androst-4-ane-3.17-dione 和 500 nmol/L 孕激素，培养 2 h 后，吸 1 ml 培养液与等量氯仿混合，上层水相用葡聚糖处理过的木炭-1 抽提后，进行液体闪烁计数，并用 Bradford 方法检测细胞的蛋白质浓度。

2 结果

2.1 毒杀芬对ERRα-1 的拮抗活性

ERRα-1 表达质粒 pSG5-hERRα-1 和另一个 CAT 表达质粒（包含一段芳香族化酶基因的启动子 I.3 和 ERRα-1 的调节元件 S1[4]）转染到 SK-BR-3 乳腺癌细胞中，细胞在含 10 μmol/L 毒杀芬的培养液中培养 48 h，CAT 的活性检测发现毒杀芬抑制了 ERRα-1 诱导的 CAT 基因表达，这种拮抗作用随浓度增加而加强。在空白对照组中，无 ERRα-1 载体的 pSG5 转染细胞中的毒杀芬并没有改变 CAT 的活性，见图 1。

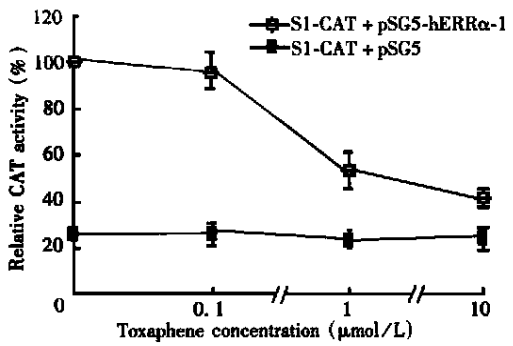


图1 毒杀芬在 SK-BR-3 乳腺癌细胞中对 ERRα-1 功能的影响

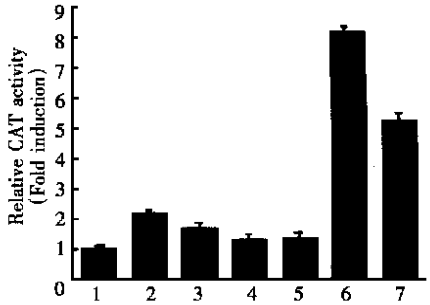
Fig 1 Modulation of the ERRα-1 activity by toxaphene in SK-BR-3 cells

2.2 毒杀芬对ERRα-1 与辅活化子GRIP1 相互作用的抑制

在没有配体加入的情形下，SK-BR-3 细胞中 ERRα-1 的活性可被辅活化子GRIP1 提高 3 倍，见图 2。而毒杀芬则能够抑制 GRIP1 对 ERRα-1 活性的增强效应。一般认为细胞核的核受体辅活化子，如 GRIP1 结合到核受体的配体结合域[5]，并依赖于激动剂的存在，拮抗剂则会阻扰这种结合作用。我们的结果进一步支持毒杀芬是 ERRα-1 的拮抗剂，其拮抗作用是通过干扰 ERRα-1 与核受体辅活化子如 GRIP1 之间的相互作用实现的。

2.3 毒杀芬通过ERRα-1 的介导抑制芳香族化酶的表达

芳香族化酶活性在 pSG5-hERRα-1 转染后的 SK-BR-3 细胞中增加了128%。该细胞与 10 μmol/L 的毒杀芬培养 24 h 后，芳香族化酶活性则降低到 86%，该结果说明毒杀芬可通过ERRα-1 来降低芳香族化酶基因的表达，见图 3。为了进一步证实该发现，我们构建了高表达 ERRα-1 的 HepG2 细胞株，在 ERRα-1 转染后的HepG2 细胞中芳香族化酶的活性是非转染 HepG2 细胞株中的 191%，但若将该转染HepG2 细胞株与 10 μmol/L 浓度的毒杀芬培养 24 h 后，芳香族化酶的活性则大大降低，低至非转染HepG2 细胞株中芳香族化酶的活性水平，见图 4。由于毒杀芬不是芳香族化酶的抑制剂，所以芳香族化酶活性的降低是因为该酶的基因表达水平降低所致。



a: pSG5-hERRα-1 1 μg; b: pSG5-GRIP1 1 μg; c: Toxaphene 10 μmol/L; 1: None a; b; c; 2: a; 3: a+c; 4: b; 5: b+c; 6: a+b; 7: a+b+c

图2 毒杀芬在 SK-BR-3 细胞中对 ERRα-1 与核受体辅活化子 GRIP1 相互作用的抑制

Fig 2 Inhibition of the interaction of ERRα-1 with GRIP1 by toxaphene in SK-BR-3 cells

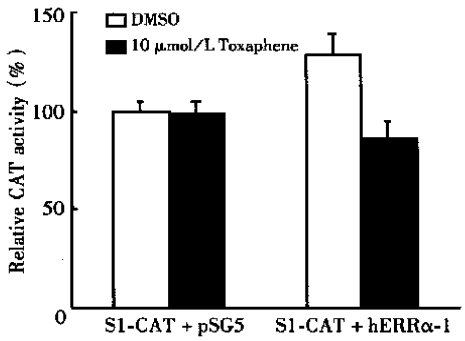


图3 毒杀芬对瞬时转染 ERRα-1 的 SK-BR-3 细胞中芳香族化酶活性的影响

Fig 3 Effect of toxaphene on aromatasse activities in ERRα-1 transient transfected SK-BR-3 cells

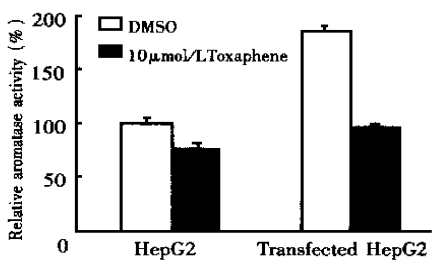


图4 毒杀芬对非转染和转染 ERRα-1 的 HepG2 细胞株中芳香族化酶活性的影响

Fig 4 Effect of toxaphene on aromatase activities in regular HepG2 and ERRα-1 transfected HepG2 cell

3 讨论

分子生物学技术被成功地运用于寻找某些孤儿核受体的配体[6]，ERRα-1 在没有配体存在下也具有生物活性，可能与转录辅活化子的相互作用有关。我们发

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

现在 ERRα-1 和辅活化子 GRIP1 的共转染细胞中, CAT 的活性显著增高, 并且毒杀芬可能干扰了 ERRα-1 和辅活化子的相互作用。尽管我们发现在没有配体加入的情况下, 辅活化子 GRIP1 显著地增加了 ERRα-1 的转录活性, 但也不能完全排除细胞中本身就存在尚未被发现的具有高亲和力的配体。

根据 Vanader 等[7] 的发现, ROS D/218 细胞在被处理的血清中培养时, ERRα-1 失去了在该细胞中的转录激活活性, 实验结果认为 ERRα-1 的配体可能存在于血清中。

我们实验室已经证明芳香族化酶基因上的 S1 元件是一个负调节元件, 当 ERRα-1 与 S1 相互作用时, 出现正向调节效应[4]。S1 元件的负调节效应主要是由于另外一些孤儿受体与之结合或是 ERRα-1 与细胞内的辅阻遏子相互作用所致。如我们结果所示, ERRα-1 的正向调节作用也可被拮抗剂所抑制。

许多工业、化工和环境中存在的化合物, 具有类似或拮抗以及非直接地改变一些激素(主要是类固醇类激素)的活性, 这些化合物被称为内分泌紊乱剂, 通常它们被认为与雌激素或雄激素的受体结合, 并诱发许多雌激素或雄激素的活性。我们认为这些化合物可能以一种非直接的方式抑制芳香族化酶活性, 从而降低细胞中雌激素水平而增高雄激素水平; 也可能改变芳香族化酶的表达水平, 从而改变组织细胞中雄激素与雄激素的比例。杀虫剂毒杀芬与这类化合物相似, 它通过抑制 ERRα-1 的正向转录调节活性, 抑制芳香族化酶的表达, 从而调节雌激素的生物合成。

综上所述, 我们应用分子生物学技术发现了毒杀芬是孤儿核受体 ERRα-1 的拮抗剂, 芳香族化酶的表达可被毒杀芬通过 ERRα-1 的介导而被抑制, 由于ERRα-1 可与雌激素受体 ER 相互作用, 调节芳香族化酶的表达, 从而影响雌激素的生物合成, 暴露于如毒杀芬一类的杀虫剂环境中可能会影响正常的内分泌功能, 并且有可能在乳腺癌的发病机制中起作用。

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] Yang C, Zhou D, Chen S. Modulation of aromatase statement in the breast tissue by ERRα1 orphan receptor[J]. Cancer Res, 1998, 58(24): 5 695—5 700.

[3] Johnston S, Liu X, Zuo F, *et al*. Estrogen-related receptor-α-1 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.

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

[5] Hong H, Kohli K, Trivedi A, *et al*. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domain of steroid receptors[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1996, 93(10): 4 948—4 952.

[6] Parks D J, Blanchard S G, Bledsoe R K, *et al*. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. Science, 1999, 284(5 523): 1 365—1 368.

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

(编辑　冯崇英)

(上接 1182 页)

2.2　缓解所需疗程

22 例患者均在 1～2 疗程内达 CR, 第 1 疗程达 CR 占 71.3%, 第 2 疗程达 CR 占 28.7%, 平均 1.24 个疗程。

2.3　缓解期与生存期

CR22 例中 3 例失访, 余 19 例缓解期 5～32 月, 中位缓解期为 16.8 月, 生存期 6～36 月。6 例复发, 其中 1 例死于感染, 1 例带病生存。

2.4　毒副反应及并发症

65.6%(21/32)病人出现消化道反应, 主要为恶心、呕吐、纳差、腹痛等。在使用 HDMTX 过程中, 口腔溃疡发生率为 81.3%(26/32)。骨髓抑制 62.5%(20/32), 其中骨髓增生减低 35%(7/20), 明显减低 55%(11/20), 极度减低 10%(2/20)。骨髓抑制发生于化疗后 5～18 d, 在 8～30 d 内恢复。WBC＜1.0×10^9/L 占 43.8%(14 例), 最低 WBC 0.2×10^9/L。PLT＜20×10^9/L 占 43.8%(14 例), 最低 PLT 3×10^9/L。肝功能轻度受损 9.3%(3/32), 肾功能轻度受损 3.1%(1/32), 心肌酶谱增高 6.3%(2/32), 脱发 34.3%(11/32)。

3　讨论

成人急淋的治疗尚未达满意的疗效, 肿瘤细胞产生的耐药可能是其主要原因之一。采用大剂量 MTX 治疗, 药物可通过被动扩散的方式直接进入细胞内且可抑制游离 MTX 从胞内向胞外流动, 从而保持胞内足够的药物浓度, 达到逆转耐药的目的; HDMTX 可透过血脑、血眼、血睾屏障, 杀伤隐蔽的白血病细胞, 从而有效防治中枢神经系统白血病[2]。我们采用 HDMTX 与 THP 等组成大剂量甲氨蝶呤(HDMTX)＋CTOP 联合化疗方案治疗急淋的结果表明: ①本方案治疗成人急淋初治病例有较高缓解率(68.2%), 毒副反应较小, 是诱导缓解的较理想方案; ②对复发、难治性病例的完全缓解率为 50%, 较高; ③可获得较长的缓解期和生存期; ④治疗中枢神经系统白血病有较好疗效; ⑤81.3%的病例在使用 HDMTX 后出现程度不同口腔溃疡, 以轻度溃疡居多, 使用表皮细胞生长因子、口腔溃疡油后短期内缓解, 不影响治疗。

关键词: 甲氨蝶呤; 白血病, 急性淋巴细胞性; 化疗
中图法分类号: R733.710.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张之南 主编. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 184—194.

[2] 叶　辉, 顾龙君. 大剂量甲氨蝶呤治疗急性淋巴细胞白血病的研究进展[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(2): 110—111.

(编辑　潘式文)

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