

· 论 著 ·

ER β 相互作用蛋白 HPIP 的分离及其在 ER β 信号途径中的作用周 蕾¹, 安广宇¹, 宋雨光¹, 姜 妮¹, 赵艳杰¹, 叶棋浓²

(1. 北京世纪坛医院肿瘤内科 100038; 2. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要:目的 以雌激素受体 β (ER β)AF2 结构域为诱饵, 采用酵母双杂交方法, 从人类乳腺 cDNA 文库筛选的蛋白 HPIP, 进一步验证其与 ER β 相互作用的功能。方法 分别用细胞免疫荧光分析和酵母双杂交的方法筛选蛋白的细胞内定位及结合结构域的鉴定, 转染 293T 胚胎肾细胞, 利用荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性测定, 检测 HPIP 对 ER 转录活性的影响。结果 HPIP 的编码基因主要分布于细胞质中, HPIP 与 ER β AF2 结构域相互作用, 而不与 ER β AF1 和 DBD 相互作用, HPIP 能降低 ER 的转录活性, 而且这种抑制作用在激素存在时更显著, 但是雌激素受体抑制剂存在时, HPIP 反而增强 ER β 的转录活性。结论 HPIP 可能通过影响 ER β 信号途径在乳腺癌发生、发展中起重要作用。

关键词:受体, 雌激素; 造血相关的 PBX 相互作用蛋白质; 乳腺肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0016-03

Isolation of an ER β interaction protein HPIP and its role in ER β signalingZhou Lei¹, An Guangyu¹, Song Yuguang¹, Jiang Ni¹, Zhao Yanjie¹, Ye Qinong²

(1. Department of Tumor, Shijitan Hospital, Beijing 100038, China; 2. Bioengineering Institute, Military Medical Academy of Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To generate the HPIP and to test the function of its interaction with ER β on the bait of structure field of ER β AF2 and filtering proteins combined with ER β in the cDNA library of human mammary glands using the method of yeast two-hybrid method. Methods The methods of fluorescence analysis of cellular immunity and yeast two-hybrid were used respectively in filtering intracellular positioning and identifying the binding domain of proteins. The transfections of HEK293T cell, the determination of activity with luciferase and β -galactosidase enzyme, and the examinations on the influence of HPIP to ER β transcription activity were conducted. Results The coding genes of HPIP were mainly located in cytoplasm. HPIP interacts with the structure field of ER β AF2 instead of ER β AF1 and DBD. HPIP was with the function of reducing the transcription activity of ER. This inhibition was more significant with the existence of hormone. However, HPIP increased the transcription activity of ER β when the inhibitors of estrogen receptors exist. Conclusion HPIP may be essential in breast cancer growth and progression through ER β signaling.

Key words: receptors, estrogen; hematopoietic PBX-interacting protein; breast neoplasms

雌激素在乳腺癌的发生、发展中起重要作用, 它通过与雌激素受体(estrogen receptor, ER)的结合, 调节受雌激素调控的下游基因的表达。ER 有 2 种亚型, ER α 和 ER β ^[1-3]。目前, 研究表明, ER α 及其共调节因子在乳腺癌的发病机制中有重要作用^[4-5]。ER β 是近年研究新发现的与雌激素结合的受体, 与 ER α 在结构上高度同源, 但在组织分布及表达水平上存在明显差异, 在生理及病理过程中可能具有不同生物学活性^[6-9]。因而, ER β 及其共调节因子的深入研究, 对于揭示乳腺癌的发生机制以及对内分泌治疗失败的原因的解释等方面有重要意义。造血相关的 PBX 相互作用蛋白质(hematopoietic PBX-interacting protein, HPIP)是国外学者以 PBX1 作为诱饵, 利用酵母双杂交技术从胎儿肝脏 cDNA 文库中筛选得到的^[10-11]。参与维持胚胎期造血干细胞的定向分化和成熟血细胞正常的有丝分裂, 具有调节造血干细胞正常的生长分化过程, 抑制白血病的发生的作用, 但报道还不是很多。

本实验利用酵母双杂交方法, 以 ER β 的 AF2 为诱饵蛋白, 从乳腺文库中筛选到了与之相互作用的蛋白 HPIP, 将其在 ER 信号通路中的作用进行进一步的验证。

1 材料与方 法

1.1 基因的钓取和 HPIP 真核细胞表达载体的构建 酵母双杂交的方法得到了与 ER β AF2 结构域结合的蛋白 HPIP, 以人类乳腺 cDNA 文库为模板钓取全长 cDNA 序列, 并构建到带有 FLAG 标签的真核表达载体 pCDNA3 上, 获得重组表达质粒 pCDNA3-FLAG-HPIP。引物序列如下, 引物 1: 5'-ATG

GCC TCC TGC CCA GAC TCT GAT-3'。引物 2: 5'-GTG TCA GCC CCG GTG GTG GTG GTG-3'。

1.2 蛋白质印迹分析 293T 细胞转染 24 h 后, 收集细胞, 加入 SDS Samper Buffer, 沸水里煮 10 min 使之变性。将上述变性的细胞总蛋白离心后取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 利用转移槽将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。一抗用 5% 脱脂奶粉, 二抗用 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶耦联 IgG。TBST 洗膜后用化学发光法显色、压片。

1.3 哺乳动物细胞的转染 用无双抗的 DMEM 培养基(含 10% FBS)将 MCF7 细胞接种在 6 孔板中。接种细胞密度以转染时细胞密度达 80%~90% 为准, 接种后 24 h, 将总量为 1.0 μ g DNA 与 160 μ L DMEM 培养基混合, 再将 4 μ L Lipo-fectamine 2000(Invitrogen)与 160 μ L DMEM 培养基混合, 然后将上述 2 种溶液混合, 室温放置 20 min, 加入到细胞中。

1.4 细胞免疫荧光分析 MCF7 细胞转染 24 h 后, 弃去培养基, 用 3% 新鲜配制多聚甲醛固定。经 0.5% Triton X-100 处理和 1% 羊血清封闭后加 FLAG 多克隆抗体(1:100), 室温孵育 2 h, 用含 1% 羊血清的 PBS 洗 3 次, 每次 10 min。然后加入荧光素标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 最后用 DAPI 进行核染色, 并于荧光显微镜下观察。

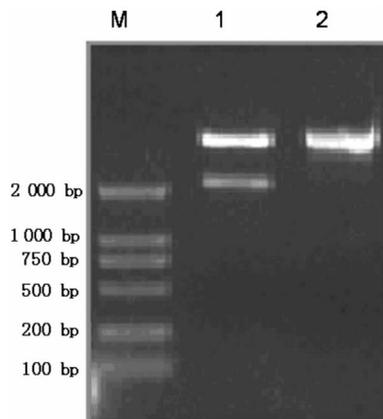
1.5 结合结构域的鉴定 将构建的质粒 pCDNA3-HPIP 分别与包含 ER 不同结构域的质粒 pGBKT7-ER β -AF1(1~145 aa)、pGBKT7-ER β -DBD、pGBKT7-ER β -AF2(255~504 aa)共

转化酵母 AH109 细胞,验证其特异性。

1.6 荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性测定 利用荧光素酶法测定 ER 的转录活性。荧光素酶活性测定基本按 Promega 说明进行。

2 结 果

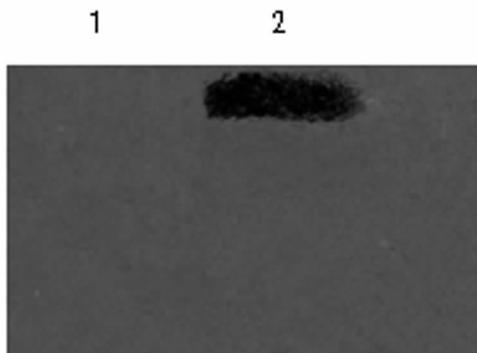
2.1 筛选到的基因 cDNA 序列的钓取及克隆 从人乳腺文库 cDNA 中钓取了阳性克隆的全长 cDNA 序列,并克隆到表达载体 pCDNA3 上,经 BamHI 和 KbaI 酶切鉴定,得到约 2 196 bp(HPIP)的外源 DNA 插入片段(图 1),而空载体 pCDNA3 分别经同样酶切后无插入片段,说明克隆成功。经测序鉴定,所得序列完全正确。



M:DNA Marker; 1: pCDNA3/HPIP (BamHI+KbaI); 2: pCDNA3 (BamHI+KbaI)。

图 1 HPIP 表达载体的酶切鉴定

2.2 候选基因的表达鉴定 将 pCDNA3-FLAG-HPIP 质粒转染 293T 细胞中,24 h 收集细胞进行 SDS-PAGE,然后用 FLAG 抗体进行蛋白质印迹法检测。结果表明,转染 pCDNA3-FLAG-HPIP 质粒的 293T 细胞分别特异地表达了相对分子质量约 87 kD 的预期蛋白,说明此表达载体均可用于候选基因的进一步功能研究(图 2)。



1: pCDNA3-FLAG; 2: pCDNA3-FLAG-HPIP。

图 2 HPIP 在 293T 细胞中表达产物的蛋白质印迹分析

2.3 筛选蛋白对 ER 转录活性的影响 293T 胚胎肾细胞中,检测 HPIP 对 ER 转录活性的影响。0.5 μ g HPIP, 0.025 μ g ER β , 0.2 μ g ERE-luciferase, 0.1 μ g β -gal 表达质粒共转染到细胞中,通过检测荧光素酶的活性而反映 ER 的转录活性。加雌激素(E2)时,HPIP 能明显降低 ER β 转录活性;加雌激素拮抗剂时, ER β 转录不仅没有降低,反而增加(图 3)。

2.4 筛选蛋白的细胞内定位 按材料和方法所述,用 FLAG 抗体对转染 pCDNA3-FLAG-HPIP 的 MCF-7 细胞进行免疫细

胞化学分析。结果表明,在转染 pCDNA3-FLAG-HPIP 重组质粒的 MCF-7 细胞中可观察到荧光,且主要为细胞质染色。说明候选基因主要分布于细胞质中(彩插 I 图 4)。

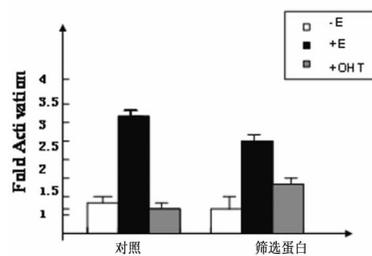


图 3 293T 细胞中 HPIP 降低 ER β 转录活性

2.5 与筛选蛋白相互作用的 ER 结构域的确定 为确定与候选基因结合的 ER β 结构域,将 ER β 各个结构域的表达质粒与筛选获得的 HPIP 表达质粒(pACT2-HPIP)分别共转化酵母 AH109 细胞,转化子涂于含有 X- α -gal 的四缺培养基上。能在四缺平板上生长并在 X- α -gal 存在条件下变为蓝色的为阳性反应。结果表明 HPIP 与 ER β AF2 结构域相互作用,而不与 ER β AF1 和 DBD 相互作用。表明 HPIP 与 ER β AF2 结构域结合有特异性(表 1)。

表 1 ER β 各个结构域与 HPIP 相互作用分析

质粒	四缺培养基生长情况	X- α -gal 活性
pGBKT7-ER β -AF1+pACT2-HPIP	-	白色
pGBKT7-ER β -DBD+pACT2-HPIP	-	白色
pGBKT7-ER β -AF2+pACT2-HPIP	+	蓝色

3 讨 论

HPIP 是 2000 年 Abramovich 等^[12]以 PBX1 作为诱饵,利用酵母双杂交技术从胎儿肝脏 cDNA 文库中筛选得到的。PBX 是一组由 Pbx 基因编码的含有 TALE 高度保守结构的同源蛋白,包括 PBX1、PBX2、PBX3 和新发现的 PBX4 共 4 种同源结构,一起参与维持胚胎期造血干细胞的定向分化和成熟血细胞正常的有丝分裂。PBX 的同源结构域与 DNA 的模序(motif)结合,同时提供了与转录因子 HOX 结合的位点,PBX 与 HOX 以二聚体的形式参与基因的表达,二者的相互作用可以提高与 DNA 结合的亲和力及特异性^[13]。染色体在 t(1; 19) 断裂易位,使 PBX 的同源结构域基因与转录子增强结合蛋白 E2A 的转录激活结构域基因融合,融合的 E2A-PBX1 是一种原癌基因,可诱发急性白血病。Wang 等^[14]发现 PBX1 与它的原癌基因衍生物 E2A-Pbx1 共同结合于 DNA 的模序 ATCAATCAA 序列。

HPIP 除了和 PBX1 结合外,也可以和 PBX2 和 PBX3 相互作用。和 PBX1 一样在原始的造血细胞 CD34(+)亚群中表达。HPIP 由全长的 cDNA 编码 731 个氨基酸,没有发现与目前已知的蛋白有同源性。因而,这个蛋白被命名为造血相关的 PBX 相互作用蛋白质(HPIP)。HPIP 主要位于细胞质中,只有少量位于细胞核。HPIP 强烈抑制原癌基因 E2A-PBX 与 DNA 的模序(ATCAATCAA)结合。因而,HPIP 具有调节造血干细胞正常的生长分化过程,抑制白血病发生的作用。

本实验以 ER β 为诱饵蛋白,通过酵母双杂交技术筛选到了这个蛋白,首先将筛选到的蛋白的基因全长 cDNA 序列从人乳腺 cDNA 文库中钓出,构建到带有 FLAG 标签的表达载

体 pCDNA3 上,经酶切鉴定及测序鉴定,证实 pCDNA3-FLAG-HPIP 质粒构建成功。然后再把构建好的质粒转染到 293T 细胞,FLAG 抗体进行蛋白质印迹检测,证实这个质粒可以在哺乳动物细胞中表达,可进行进一步的功能研究。功能研究以含有雌激素应答元件(estrogen response element,ERE)调控的荧光素酶为报告基因(ERE-luc),HPIP 和 ER 的表达质粒共转染至 293T 细胞,通过检测荧光素酶活性,反映 HPIP 对 ER 转录活性的影响。结果表明,HPIP 能降低 ER 的转录活性,而且这种抑制作用在激素存在时更显著,但是雌激素受体抑制剂存在时,HPIP 反而增强 ER 的转录活性;HPIP 通过与 ER 相互作用而改变 ER 的转录活性,是 ER 信号途径中的新型调节因子,而雌激素受体抑制剂对转录活性不仅不降低,反而增加。

细胞免疫荧光化学分析 HPIP 的表达质粒转染至 MCF-7 细胞,荧光显微镜下观察,该蛋白定位于细胞质内,与目前资料报道的一致;HPIP 和不同 ER 结构域的表达质粒共转染至酵母细胞,结构域定位实验发现特异的与 ER β 的 AF2 结合,与 ER β 的 AF1/DBD 不结合,表明 HPIP 与 ER β 结构域结合具有特异性。由于 PBX 和 ER 分别位于两个不同的信号途径,PBX 调节胚胎期原始造血干细胞分化,ER 维持乳腺上皮细胞正常生长发育,二者之间可能的联络(cross-talk)具体通过什么机制有待于深入的探索。此外,据报道 PBX 在胚胎形成期与多种器官的形成有关,而 ER 在心血管系统和中枢神经系统中也存在表达,提示 PBX 与 ER 的相互作用在以上生命过程中也可能发挥重要作用。总之,尽管在一定程度上表明了 HPIP 可以影响 ER 的转录活性,在乳腺癌的发展过程中可能发挥重要的作用,但是还有许多问题尚未得到解决,需要更多或更深入的分子生物学研究来阐明。

参考文献:

- [1] Chen XN, Zhu H, Meng QY, et al. Estrogen receptor- α and - β regulate the human corticotropin-releasing hormone gene through similar pathways[J]. *Brain Res*, 2008, 5(1): 1-10.
- [2] Marik R, Allu M, Anchoori R, et al. Potent genistein derivatives as inhibitors of estrogen receptor α -positive breast cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 15(1): 10-13.
- [3] Saji S, Jensen EV, Nilsson S, et al. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(3): 337-342.
- [4] Hahm ER, Lee J, Huang Y, et al. Withaferin A suppresses estrogen receptor- α expression in human breast cancer cells[J]. *Mol Carcinog*, 2011, 22(10): 1000-1002.
- [5] Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(3): 270-282.
- [6] Flynn JM, Dimitrijevič SD, Younes M, et al. Role of wild-type estrogen receptor- β in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells[J]. *Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(3): 637-647.
- [7] Palmieri C, Saji S, Sakaguchi H. The expression of oestrogen receptor (ER)- β and its variants, but not ER α , in adult human mammary fibroblasts[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 33(1): 35-50.
- [8] Wu X, Subramaniam M, Grygo SB, et al. Estrogen receptor- β sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(1): 27-29.
- [9] Mc Cormack O, Chung WY, Fitzpatrick P, et al. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer; progesterone receptor B hypermethylation in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Tr*, 2008, 111(1): 45-53.
- [10] Abramovich C, Shen WF, Pineault N, et al. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA[J]. *Biol Chem*, 2002, 21(44): 6766-6771.
- [11] Abramovich C, Chavez EA, Lansdorp PM, et al. Functional characterization of multiple domains involved in the subcellular localization of the hematopoietic Pbx interacting protein (HPIP)[J]. *Oncogene*, 2002, 21(44): 6766-6771.
- [12] Abramovich C, Shen WF, Pineault N, et al. Functional cloning and characterization of a novel nonhomeodomain protein that inhibits the binding of PBX1-HOX complexes to DNA[J]. *Biol Chem*, 2000, 275(3): 361-364.
- [13] DiMartino JF, Selleri L, Traver D, et al. The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver[J]. *Blood*, 2001, 98(4): 618-626.
- [14] Wang X, Yang Z, Zhang H, et al. The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 17(6): 1220-1228.
- [15] Siva R, Green RH, Brightling CE, et al. Modulation of eosinophilic inflammation in COPD[J]. *Eur Respir J*, 2005, 26(4): 441-445.
- [16] Postma DS, Boezen HM. Rationale for the dutch hypothesis. Allergy and airway hyperresponsiveness as genetic factors and their interaction with environment in the development of asthma and COPD[J]. *Chest*, 2004, 126(1): 96-98.

(收稿日期:2011-06-18 修回日期:2011-08-15)

(上接第 15 页)

- [13] Sozańska E, Barczyk A, Marta BM, et al. The usefulness of induced sputum examination in the diagnostic evaluation of selected chronic inflammatory diseases of the respiratory tract[J]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2009, 77(2): 349-351.
- [14] Gorska K, Krenke R, Korczynski P, et al. Eosinophilic airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59(2): 261-263.

(收稿日期:2011-06-20 修回日期:2011-08-15)