

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 200326077

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

雌激素受体 ER α 亚细胞定位
及其与细胞生长的相关性

**Subcellular Localization of Estrogen Receptor ER α
and Its relationship with Cell Proliferate**

杨 超 毅

指导教师姓名: 吴 乔 教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2006 年 6 月 25 日

论文答辩时间: 2006 年 8 月 31 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 陈奕欣

评 阅 人: _____

2006 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 () , 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

目 录

| | |
|------------------------------|-----------|
| 中文摘要 | 1 |
| 英文摘要 | 2 |
| 前言 | |
| 1 雌激素受体 ER | 4 |
| 1.1 ER的结构 | 4 |
| 1.2 ER与配体 | 5 |
| 1.3 选择性ER调节因子与肿瘤治疗 | 6 |
| 1.4 ER信号调控的机制 | 8 |
| 1.4.1 ER 与磷酸化 | 8 |
| 1.4.2 ER 与生长因子信号 | 8 |
| 1.4.3 ER 与蛋白激酶 | 9 |
| 1.5 ER分子结构的作用机制 | 10 |
| 1.6 ER的转运 | 13 |
| 1.6.1 细胞膜上ER的转运 | 13 |
| 1.6.2 ER的入核 | 14 |
| 2 视黄素X受体 RXR | 15 |
| 2.1 RXR的分子结构 | 15 |
| 2.2 RXR的功能研究 | 16 |
| 3 本文研究的目的是科学意义 | 18 |
| 材料与 方法 | |
| 1 材料 | 19 |
| 2 实验方法 | 21 |
| 2.1 细胞培养 | 21 |
| 2.2 药物处理 | 21 |
| 2.3 瞬时转染 | 22 |
| 2.4 质粒构建 | 22 |
| 2.5 蛋白提取与Western Blots | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.6 免疫荧光染色和观察 | 24 |
| 2.7 BrdU检测 | 25 |
| 结果与分析 | |
| 1. ER α 及其缺失突变体表达载体的构建 | 26 |
| 2. ER α 及其缺失突变体在细胞中的定位 | 29 |
| 3. 配体对ER α 及其缺失突变体的影响 | 31 |
| 4. RXR α 对ER及其突变体在细胞中定位的影响 | 33 |
| 5. E2对ER α 及其缺失突变体和RXR α 共定位的影响 | 35 |
| 6. ER α 及其缺失突变体对细胞增殖的影响 | 37 |
| 讨论 | 41 |
| 参考文献 | 46 |

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---------------------------------------|---|
| Abstract in Chinese | 1 |
| Abstract | 2 |
| Introduction | |
| 1 Estrogen receptor (ER) | 4 |
| 1.1 The structure of ER..... | 4 |
| 1.2 The ligand of ER..... | 5 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3 Selective modulators for estrogen receptor and tumor therapy | 6 |
| 1.4 The signal pathway of ER | 8 |
| 1.4.1 ER and phosphorylation | 8 |
| 1.4.2 ER and growth factors | 8 |
| 1.4.3 ER and protein kinases..... | 9 |
| 1.5 The mechanisms of ER molecule | 10 |
| 1.6 Translocation of ER | 13 |
| 1.6.1 Membrane transport of ER | 13 |
| 1.6.2 Nuclear import of ER | 14 |
| 2 Retinoid X receptor (RXR) | 15 |
| 2.1 The structure of RXR..... | 15 |
| 2.2 The study of RXR function..... | 16 |
| 3 Purpose of This Thesis..... | 18 |

Materials and Methods

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1 Materials | 19 |
| 2 Methods..... | 21 |
| 2.1 Cell culture..... | 21 |
| 2.2 Drug treatment..... | 21 |
| 2.3 Tansient transfection assay..... | 22 |
| 2.4 Plasmid construction | 22 |
| 2.5 Western blot analysis | 23 |
| 2.6 Fluorescence microscopy..... | 24 |
| 2.7 BruU assay | 25 |

Results

| | |
|---|----|
| 1 The construction of ER α and its mutants..... | 26 |
| 2 The localization of ER α and its mutants | 29 |
| 3 The effect of ligand on ER α and its mutants | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4 The co-localization of RXR α with ER α and its mutants | 33 |
| 5 Theeffect of E2 on RXR α , ER α and its mutants | 35 |
| 6 The influence of ER α and its mutants in cell proliferation | 37 |
| Discussion and Conclusion | 41 |
| Reference | 46 |

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 是核受体超家族 (nucleus receptor, NR) 成员之一。作为一种激素受体, ER 能够被其配体雌激素中的主要成分雌二醇 (steroid hormone 17 β -estradiol, E₂) 激活。ER 广泛地分布在雌性或雄性生殖系统、乳腺、中枢神经系统的部分区域里。同时, ER 还参与细胞增殖、分化、凋亡等各种重要的生理调控过程。

ER 可以分成 ER α 和 ER β 两个亚型, 它们都由 4 个不同的功能域组成, 每个功能域都发挥不同的作用。这 4 个功能域分别是: 转录激活区 (A/B)、配体结合区(LBD)、铰链区(Hinge)和 DNA 结合区(DBD)。本文中, 我们通过构建 ER α 的不同缺失突变体 (ER Δ LBD、ER Δ DBD 和 ER Δ Hinge) 来研究不同功能域在细胞增殖、亚细胞定位和 E₂ 刺激对 ER α 亚细胞定位的影响。结果表明, ER α 呈核多浆少的分布、ER Δ LBD 为核定位、ER Δ DBD 为核多浆少分布、ER Δ Hinge 主要分布在浆, 核中有很少量。进一步分析表明, E₂ 诱导的 ER α 入核是入核序列 (NLS) 依赖性。此外, 我们还发现, ER α 能够增强293T细胞增殖, 且这种促增殖效应依赖于 ER α 在细胞核与胞浆的正常转运。

视黄素 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员,其配体视黄素 (retinoids) 是天然的或人工合成的维生素 A 衍生物。视黄素通过 RXRs 的介导在细胞生长、分化和凋亡过程中发挥重要的作用。

RXR α 能够与 ER α 结合形成异源二聚体, 但 RXR α 在协助 ER α 转运过程中的作用未见报导。我们的研究表明, RXR α 能够协助突变体 ER Δ DBD 和 ER Δ Hinge 出核, 并且当 E₂ 处理细胞后, 出核的 ER Δ DBD 又重新回到核中, 而出核的 ER Δ Hinge 不受影响。结果提示, ER α 不同功能域在与 RXR α 、E₂ 作用时发挥不同的功能。

总之, 通过研究, 我们确定了 ER α 不同功能域在其亚细胞定位、促细胞增殖中的作用, 并且发现 RXR α 能够协助 ER Δ DBD 和 ER Δ Hinge 出核。这为我们进一步研究 ER α 和 E₂ 的作用机理以及更有效地防治乳腺癌提供了一些研究思路。

关键词: 雌激素受体 (ER); 雌二醇 (E₂); 视黄素 X 受体 (RXR)

Abstract

Estrogen receptor (ER), known as a hormone receptor, is one of the members of nucleus receptor (NR). ER has been shown to be activated in response to its ligand: steroid hormone 17 β -estradiol (E₂). As a mediator of estrogen action, the ER is involved in many important physiological processes, such as in spermary, ovary and neurocyte. At the same time, ER also participates in cell proliferation, differentiation and apoptosis.

There are two kinds of ER, ER α and ER β , which have four different functional regions. They are transcriptional activity domain, ligand binding domain, hinge domain and DNA binding domain. In this study, we constructed three different ER α mutants (ER Δ LBD、ER Δ DBD and ER Δ Hinge) to study the influence of ER α in cell proliferation and ER α subcellular localization in response to E₂. The results showed that in the 293T cell ER α localized more in the nucleus than in the cytoplasm. The ER Δ LBD localized in the cytoplasm, the ER Δ DBD was the same as ER α , and the ER Δ Hinge almost localized in the cytoplasm. We also found that the nuclear import of ER α , induced by E₂, was nuclear location signal-dependent (NLS-dependent). Moreover, we showed that ER α could increase proliferation of 293T cells and such increase depended on the ER α capability of shuttling between the nucleus and the cytoplasm.

Retinoic X receptors (RXRs) belongs to the steroid hormone receptor superfamily. RXRs have three different subspecies, RXR α 、RXR β and RXR γ , which ligands are natural or synthetic vitamin A derivatives. RXRs play an important role in regulating a

broad range of biological processes, including cell proliferation, differentiation and apoptosis.

RXR α may form heterodimer with ER α . However, its function in assistance of ER α translocation is still largely unknown. In our study, we indicated that RXR α had an ability to assist ER Δ DBD and ER Δ Hinge translocation from the nucleus to the cytoplasm, and after treatment of E₂, the ER Δ DBD returned to the nucleus while the ER Δ Hinge still localized in the cytoplasm. These results demonstrate that the different domains of ER α may exert different functions when it interacts with RXR α in response to E₂ treatment.

To sum up, we demonstrate effects of different functional region of ER α in its subcellular localization and cellular proliferation. Our data reveal that RXR α can assist the ER Δ DBD and ER Δ Hinge export from the nucleus. These findings will be helpful for further research on the functional mechanisms of ER α and E₂ and prevention of breast cancer.

Key words: Estrogen receptor (ER); 17 β -estradiol (E₂); Retinoid X receptor (RXR)

前 言

1 雌激素受体 ER

雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 属于核受体 (Nucleus receptor, NR) 家族成员^[1], 是一种雌激素依赖性转录因子, 在乳腺癌的发生、发展和治疗中起重要作用。雌激素受体在哺乳类动物中广泛表达, 其组织学的分布在不同的物种间如人、大鼠、小鼠既有相似也有区别。雌激素受体可以分为 ER α 、ER β 两种亚型。一般来说, ER α 主要在雌性或雄性生殖系统、乳腺、心血管、中枢神经系统的部分区域(尤其下丘脑) 等部位表达, 在子宫表达水平最高; ER β 则在卵巢、雄性生殖器官和中枢神经系统的不同区域(如皮质, 部分下丘脑) 中常有较高的表达, 在卵巢表达水平最高^[2]。

1.1 ER 的结构

ER 有两种亚型, 分别是 1986 年发现并被克隆的定位于 6 号染色体长臂上的 ER α ^[3], 和 1996 年鉴别的新雌激素受体 ER β ^[4]。ER α 基因编码长约 295kb 含 595 个氨基酸的蛋白质。与其他核受体结构一样, ER 可分为: 转录激活区、配体结合区(Ligand binding domain, LBD)、铰链区(Hinge)和 DNA 结合区(DNA binding domain, DBD)^[5] (图 1)。ER 有两个转录活性区域 AF-1 (transcription activation function - 1) 和 AF-2 (transcription activation function - 2)。前者的活性不依赖配体, 定位在 N 端的 A/B 区, 后者对配体有依赖性, 存在于配体结合域。ER 两种亚型有高度的同源性, 它们 DBD 区和 LBD 区的序列同源性分别为 97% 和 59%, 转录激活区和铰链区的同源性较低, 分别为 16% 和 30%。此外, ER β 与雌激素

的结合能力比 ER α 弱。ER 主要表达于乳腺、子宫、阴道、骨和其他一些靶器官 [6-7]。

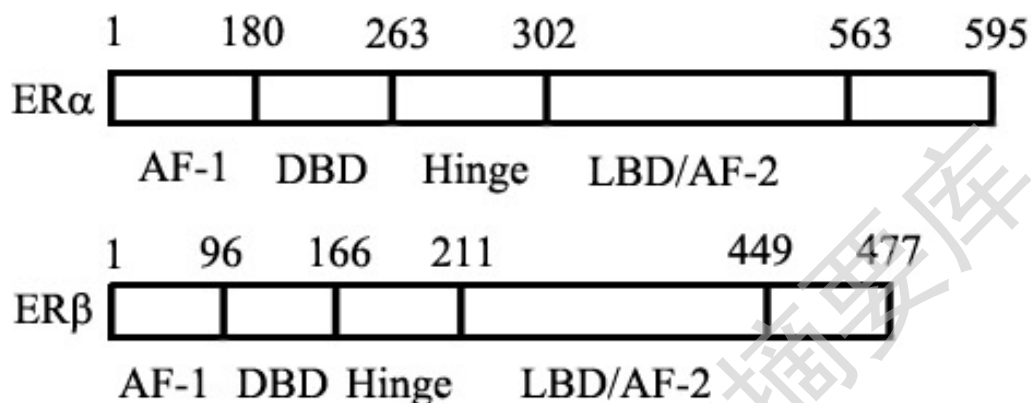


图 1 ER α 和 ER β 结构示意图

1.2 ER 与配体

雌激素（17 β -estradiol, E₂）是雌激素受体的主要配体。雌激素是广泛调节众多靶组织，如生殖道、乳腺、骨骼及心血管生长、发育、功能的类固醇激素，它的这些作用主要通过其受体 ER 来实现^[8-9]。

作为核受体，ER α 存在着依赖配体的经典途径：ER α 未与配体结合时，多以蛋白抑制复合物的非活化形式存在。如 90KD 的热休克蛋白与 ER α 激活区结合，可能导致其激活区（A/B）将 DNA 结合区（DBD）“掩盖”起来，阻止 ER α 与 DNA 的结合或形成二聚体。当 E₂ 结合 ER α 后，ER α 转录激活区 AF-1 的构象发生变化，暴露出 DNA 结合区（DBD），从而激活 ER α 结合到 DNA 上的雌激素应答元件（estrogen receptor element, ERE）上，发挥 ER α 受体的相关功能^[9]。最近的研究报道，ER α 除了上述经典的配体激活途径之外，还存在其它不同的 DNA 激活途径。例如：被磷酸化的 ER α 在没有配体存在的情况下能够正确地与雌激

素应答元件（ERE）结合，此途径被认为是非配体依赖性（Ligand-independent）途径^[10]。另外，E₂-ER α 复合体还能同一些转录因子相结合，如 Fos/Jun，从而靶定到相应的应答元件上（如 AP-1），对 DNA 进行调控。这样的途径被认为是非 ER 应答元件依赖性（ERE-independent）途径（图 2）。

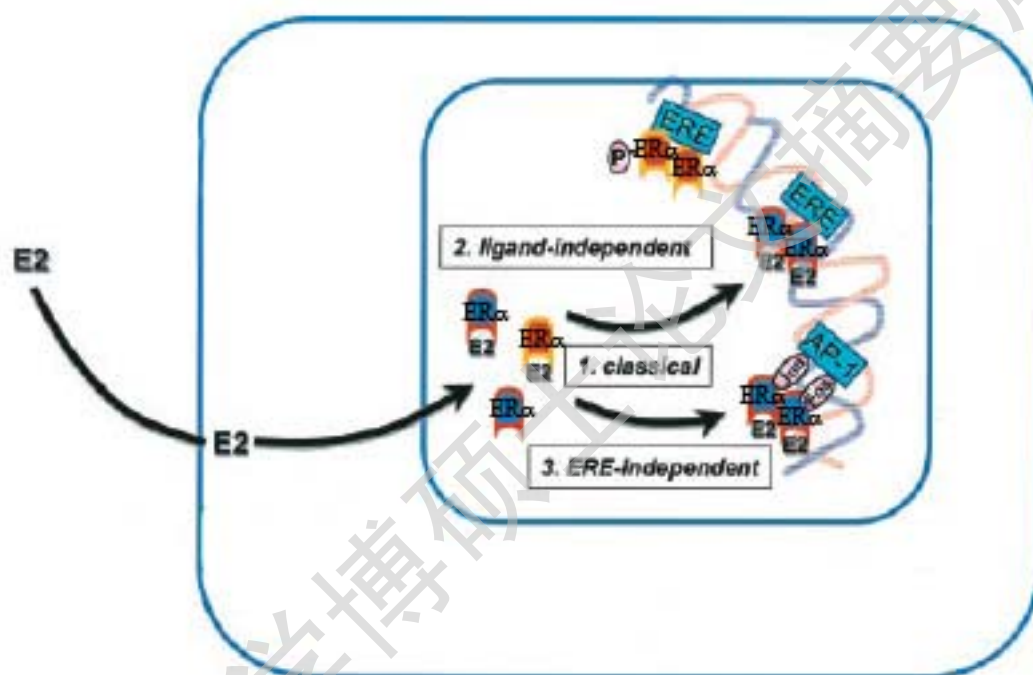


图 2 ER 在细胞内的不同作用途径^[10]

1.3 选择性 ER 调节因子与肿瘤治疗

乳腺癌细胞在肿瘤中的增殖和扩散明显受雌激素的影响。无论体内或体外的研究都表明，乳腺癌细胞中雌激素水平明显且稳定地提高，这些雌激素是由生长因子、蛋白酶以及膜下受体产生的^[11]。

约 40% 的人乳腺癌都与“雌激素-雌激素受体”有关，因此可以通过不同的手

段和方法阻断 ER 的功能^[12]，如具有组织特异的选择性雌激素受体调节因子（selective estrogen receptor modulator, SERMs）可以抑制 ER 的功能^[13]。

不同的选择性雌激素受体调节因子（SERMs）能与 ER 结合，并持续性地发挥不同的作用。如 Tamoxifen，它是临床用于治疗和预防乳腺癌的第一种 SERM。Tamoxifen 在乳腺癌细胞中表现为抗雌激素，但是在维持骨质密度、降低血液循环中的胆固醇含量等方面则有类似雌激素的作用，它还会提高 50 岁以上妇女的子宫内膜癌的几率^[12]。尽管 Tamoxifen 已经应用在乳腺癌的防治，并且临床治疗表明有 2/3 患者的病情得以控制和改善。但是，由于抗药性和 Tamoxifen 自身活性较弱等缺点限制了该药物在临床的进一步应用^[14-15]。

近年来，随着分子生物学技术的发展，对 ER 的研究日益深入，特别是在 ER β 亚型发现及克隆后，对雌激素作用的信号转导途径有了进一步的认识，开发了更多更好的具有组织特异的选择性雌激素受体调节因子，为治疗乳腺癌等疾病开辟了一条更宽广的途径^[8]。如 ICI182780 对 ER 没有任何激动素的作用，被认为是一种纯正的抗雌激素剂。其机理是 ICI182780 直接与 ER 二聚体结合，增加 ER 蛋白的空间翻转，翻转后的 ER 由于三维构象的改变，与 E₂ 的结合能力降低，从而达到抗雌激素的作用^[16]。但是动物实验表明，即使这些新药比原先的抗雌激素剂更纯，依然会产生抗药性，只是速度稍微慢一些而已^[17]。

最新的研究则是开发一类重组的 ER 突变体，用于抑制肿瘤细胞中“E₂-ER”依赖性的内源 ER^[18]。另外，Raloxifene 也是一种与 SERM 类似的化学药物，它在预防骨质疏松的同时，还可以降低胆固醇含量，并且减少乳腺癌和子宫内膜癌的发生几率^[19]。

1.4 ER 信号调控的机制

尽管 ER 介导的生物学功能还没有完全被揭示, 但最近的研究表明, ER 的功能不仅局限于与配体的结合, 可能还与一系列信号分子以及相关因子有关^[20]。这些信号调控机制包括 ER 磷酸化、ER 与生长因子、蛋白激酶、共调节因子、孕激素受体以及癌基因/抑癌基因蛋白等通路的相互作用。这些作用不仅参与调节靶细胞的生长、分化和维持正常生理功能, 而且与人雌激素相关肿瘤的发病以及该类肿瘤对雌激素拮抗剂等药物的耐药性有关^[21-22]。

1.4.1 ER 与磷酸化

ER 的 Ser 磷酸化位点位于氨基末端 A/B 区, 包括 Ser104、Ser106、Ser118 和 Ser167^[23]。该区域与 ER 转录激活功能相关。Tyr 磷酸化位点位于 E 区, 主要为 Tyr 537^[24]。ER 磷酸化影响受体功能的许多方面, 包括 ER 的转录激活功能、ER 与 DNA 和配体的结合能力, 以及 ER 的再循环利用等。人 ER Tyr537 的磷酸化可以调节 ER 的二聚体化和 DNA 结合能力^[25]; Ser118 磷酸化可以调节 ER 的转录激活功能^[23]。用点突变检测 ER 磷酸化后的活性, 发现 Ser118 突变为丙氨酸(Ala) 后, 其活性降低 25% , 与 Ser104、Ser106 同时突变时, 其活性则降低 50%^[26]。但是, ER 的 DNA 结合和转录活性受磷酸化调节的机制尚需进一步研究。

1.4.2 ER 与生长因子信号

乳腺癌的发生可能受 E₂ 或者生长因子如表皮生长因子 (Epidermis Growth Factor, EGF) 的刺激。但是, 当肿瘤细胞受到这些因子刺激时, 大量表达的却

是二者的受体，即 ER 和 EGFR (Epidermis Growth Factor Receptor)，其他相关的家族成员也会同时大量地表达^[27]。尽管细胞内有关生长刺激旁路的机制还未完全了解，但是一种潜在的 EGF 和 E₂ 信号调控机制已经被认可，即：STAT5 可能是乳腺癌细胞中雌激素和生长因子信号途径中的关键分子，通过它可以对多种肿瘤细胞进行针对性的靶向治疗^[28]。研究表明，STAT5 能够抑制 E₂ 对 ER 的作用。对 ER 突变体的研究发现 ER-LBD 在这一过程中起主导作用，而 ER-DBD 则起到辅助作用^[29-30]。

EGFR 能够刺激子宫中的 DNA 合成和基因转录，这主要取决于雌激素依赖的 ER 作用。调控细胞膜上酪氨酸激酶生长因子受体传递的信号将导致一些变化，包括：1 增强细胞核内 ER 的磷酸化及其活性；2 促使共调控蛋白的磷酸化^[31]。最新研究表明，一部分的 ER α 发挥一种类似胞浆蛋白的作用，结合并定位细胞膜上。这些 ER 是利用细胞膜上的 EGFR，通过多种激酶级联反应，进行快速和多样的信号转导^[32-33]。这些信号转导将影响雌激素在乳腺癌细胞中的转录途径和非转录途径的活性。

1.4.3 ER 与蛋白激酶

晶体结构研究发现，人 ER-LBD 的 AF-2 功能域中的疏水性氨基酸朝向配体结合腔的内面，酸性的亲水性氨基酸向外，直接证明了 AF-2 区的疏水性氨基酸是功能性共调节因子的作用靶点^[34]。众多研究已经证明，雌激素能够诱导快速及瞬时的 Src/Erk 级联磷酸化活化。这种级联反应引发的各种细胞功能将促进细胞的增殖和分化^[35]。虽然其中的机制还有待进一步研究，但部分研究已经表明，雌激素受体在这个过程中与 Src 家族成员相互作用，从而诱导 Src 酶活性并

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库