

# 新的ER下游靶基因*BAP18*的鉴定及其在ER阳性乳腺癌中的作用

王安琦<sup>1</sup> 李佳璇<sup>1</sup> 张博涵<sup>2</sup> 林琳<sup>3</sup> 孙戈<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>中国医科大学, 第一临床学院, 沈阳 110122; <sup>2</sup>中国医科大学, 第三临床学院, 沈阳 110122; <sup>3</sup>中国医科大学, 生命科学学院, 教育部医学细胞生物学重点实验室, 沈阳 110122)

**摘要** 雌激素受体(ER)/雌二醇(E2)调控其下游靶基因的转录及蛋白表达, 在乳腺癌的发生发展过程中发挥至关重要的作用, 寻找新的ER下游靶基因可以为乳腺癌的临床治疗提供新的治疗靶点。该研究通过Western blot和qPCR方法确定了一个新的ER下游靶基因*BAP18*, 其表达量可以被E2和ER上调, 同时使用拮抗E2和ER的药物如他莫昔芬或氟维司群可以使*BAP18*表达量下降。通过生物信息学分析确定了*BAP18*转录起始位点前潜在的ER结合位点, 构建了检测*BAP18*转录活性的质粒后, 用荧光素酶双报告基因实验和染色质免疫共沉淀实验确定了*BAP18*启动子上ER的结合位点和上调转录的区域。凝胶迁移实验确定ER可以直接结合*BAP18*的启动子DNA。最后利用CRISPR-Cas9定向敲除*BAP18*, 发现*BAP18*的敲除可以导致ER阳性乳腺癌细胞的生长和增殖减慢且凋亡增加。该研究鉴定了*BAP18*是ER下游靶基因, 其在乳腺癌中有促癌作用。*BAP18*的发现有望为ER阳性乳腺癌的临床治疗提供理论基础和新的治疗靶点。

**关键词** *BAP18*; 雌激素受体; 转录调控; 组蛋白阅读子; 乳腺癌

## Identification of *BAP18* as a Novel ER Target Gene and Its Function in ER Positive Breast Cancer

WANG Anqi<sup>1</sup>, LI Jiaxuan<sup>1</sup>, ZHANG Bohan<sup>2</sup>, LIN Lin<sup>3</sup>, SUN Ge<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>The First Department of Clinical Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China; <sup>2</sup>The Third Department of Clinical Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China; <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

**Abstract** ER (estrogen receptor) and E2 (estradiol) play crucial roles in the occurrence and development of breast cancer, which regulate the transcription and protein expression of their downstream target genes. Identification of new ER downstream target genes provides new therapeutic targets for the clinical treatment of breast cancer. This study identified a novel ER downstream target gene *BAP18* in ER-positive breast cancer cells by Western blot and qPCR assays. The *BAP18* expression could be up-regulated by E2 and ER, while its expression decreased following antiestrogens such as tamoxifen or fluvastatin. Potential ER binding sites were identified upon the promoter region of *BAP18*. After the construction of luciferase plasmids to detect *BAP18* transcriptional activity, luciferase assays and ChIP assays confirmed the ER binding site and the activation region. The EMSA assay confirmed that ER could directly bind to the promoter region of *BAP18*. Finally, targeting by CRISPR-Cas9, it was found that

收稿日期: 2021-02-19 接受日期: 2021-05-17

国家自然科学基金(批准号: 31871286、81872015)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15140074067, E-mail: sung@cmu.edu.cn

Received: February 19, 2021 Accepted: May 17, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31871286, 81872015)

\*Corresponding author. Tel: +86-15140074067, E-mail: sung@cmu.edu.cn

*BAP18* knockdown could slow the growth and proliferation and increase the apoptosis of ER positive breast cancer cells. This study identified *BAP18* as a newly discovered downstream target gene of ER, which plays a vital role in breast cancer. The discovery of *BAP18* is expected to provide a theoretical basis and a new therapeutic target for the clinical treatment of ER positive breast cancer.

**Keywords** BAP18; ER; transcription regulation; histone reader; breast cancer

乳腺癌(breast cancer)是女性常见的恶性肿瘤之一,据2020年世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)最新数据显示,全球范围内乳腺癌新增人数大约为226万,其发病率首次超过肺癌成为全球第一大癌症。临床研究数据表明,大约75%的乳腺癌病人表现出雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性或被ER介导的基因转录活性所影响<sup>[1-2]</sup>。临床上针对这一部分病人的治疗存在多种内分泌药物方案,例如使用他莫昔芬(Tamoxifen)进行雌激素拮抗或氟维司群(Fulvestrant)进行ER降解<sup>[3-4]</sup>。然而尽管存在标准化的内分泌治疗方案,仍有近20%的早期疾病患者对抗雌激素治疗产生了耐药性,并且超过半数的经内分泌治疗的患者发生无法治愈的转移性疾病复发<sup>[5-6]</sup>。针对抗雌激素治疗耐药研究已经成为了乳腺癌研究的热点,雌激素受体辅调节因子异常表达与雌激素受体通路异常激活尤为关键<sup>[7-9]</sup>。对于ER转录调控的深层分子机制的研究可以为ER阳性乳腺癌患者提供新的治疗思路和治疗靶点。

雌激素受体属于类固醇受体超家族成员之一,野生型的ER由595个氨基酸组成,包含5个主要的功能域:雌激素非依赖的转录激活域区、雌激素依赖的转录激活域区、DNA结合功能域、配体结合功能域与多变铰链区<sup>[10-11]</sup>。研究显示,ER在雌二醇(E2)的作用下可以发生蛋白结构的变化,这种改变有利于ER蛋白形成同源或异源二聚体进入细胞核激活其下游靶基因的转录。ER可以直接结合到雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)的DNA上,激活靶基因的转录,这种激活方式是目前ER信号通路激活转录的最主要也是最普遍的激活方式<sup>[12-13]</sup>。ER下游靶基因如*MYC*、*MTA3*、*CARM1*等的相关研究在近些年越来越受到关注<sup>[14-17]</sup>,多种ER的调控方式也被发现在ER阳性乳腺癌的发生发展、肿瘤侵袭转移、肿瘤免疫微环境和内分泌化疗治疗耐药等方面存在着巨大差异并发挥重要作用,提示我们研究ER介导的基因转录在乳腺癌临床治疗方面存在着广阔前景<sup>[18]</sup>。

BP18(BPTF associated protein of 18 kDa)是人

C17orf49(chromosome 17 open reading frame 49)编码的功能尚不明确的蛋白质,蛋白大小为18 kDa。BAP18在其蛋白质N-端含有一个SANT[Swi3, Ada2, N-CoR, (TF) IIIB]结构域。最初发现,BAP18可以与AR相互作用并上调AR介导的基因转录,与MLL1/MOF蛋白复合物共同参与前列腺癌的癌症进程<sup>[19]</sup>。随后发现BAP18可以上调ER介导的基因转录并促进乳腺癌的进程和内分泌耐药<sup>[20]</sup>,同时BAP18在口腔鳞状细胞癌中可以促进CCND1/2的表达进而促进癌症的进程<sup>[21]</sup>,由此可见,BAP18在多个癌症中都可能起促癌作用。有趣的是,在本实验室的研究成果中发现BAP18在雌激素作用下有表达量的变化,但是关于BAP18本身被转录调控的具体机制是未知的,尤其是在乳腺癌中特定的时空条件下BAP18是否能被ER/E2调控仍有待深入研究。解析BAP18的分子功能可以为未来乳腺癌的治疗提供新的实验依据并成为临床治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞MCF7、T47D细胞由中国医科大学生命科学学院染色质生物研究室保存,两者均为ER阳性的乳腺癌细胞系。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、RPMI-1640培养基和EMSA相关试剂购自 Thermo Scientific公司;胎牛血清FBS购自以色列 Biological Industries公司;Trizol购自 Invitrogen公司;RT-PCR、qPCR相关试剂购自 TaKaRa公司;R250染色、细胞凋亡相关试剂购自北京索莱宝科技有限公司;BAP18、ER等相关抗体购自 CST公司;荧光素酶双基因报告检测相关试剂购自 Promega公司;Western blot相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;Tamoxifen和Fulvestrant(HY-13757A和HY-13636)购自 MCE公司;E2雌二醇(E8875)购自 Sigma公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 本实验所采用的人源乳腺癌细胞系MCF7使用含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉

素双抗的高糖DMEM培养基, T47D细胞使用10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素双抗的RPMI-1640培养基。置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>浓度的二氧化碳培养箱中培养。

1.2.2 质粒 实验采用的*BAP18*启动子双报告质粒是pGL3-basic质粒, 使用*Xho* I和*Hind* III酶切位点插入*BAP18*转录起始位点-2 000—0的DNA片段。质粒构建所需引物对在表1中展示。Crisper-Cas9定向剪除*BAP18*启动子质粒利用px458载体Cas9质粒进行制备。gRNA序列为F: 5'-CAC CGG TCG GAG AGA TCT TCT CGG-3'; R: 5'-AAA CCC GAG AAG ATC TCT CCG ACC-3'。

1.2.3 染色质免疫共沉淀(ChIP) MCF7细胞在无血清DMEM条件下分别用雌二醇和等量乙醇培养4 h, 细胞在室温使用终浓度1%甲醛交联10 min后使用SDS溶解液重悬并超声裂解。采用标准化的ChIP实验方法进行操作<sup>[22]</sup>。抗体总量达到每种样品5 μg。对于PCR, 从50 μL的DNA提取液中提取2 μL, 扩增35~40个循环。具体的正向引物和反向引物序列在表1中展示。

1.2.4 荧光素酶双基因报告实验(luciferase assay) 用ER(20 ng)、肾素荧光素酶质粒(pRL)(2 ng)和不同长度的*BAP18*启动子双报告基因治疗共转染MCF7细胞。转染后4 h, 细胞换液培养于无血清DMEM培养基中, 并添加乙醇或10<sup>-8</sup> mol/L E2。24 h后, 收集

细胞, 并使用之前文章所述的荧光素酶双基因报告实验检测系统(Promega)检测荧光素酶活性<sup>[23]</sup>。

1.2.5 RNA提取和实时定量PCR(Real-time qPCR) 总RNA用Trizol进行分离。采用PrimeScript™ RT-PCR试剂盒对总RNA(2 μg)进行逆转录。实时聚合酶链反应使用SYBR预混Ex Taq试剂盒(TaKaRa)在Mx3000P仪器(AgilentStrataGene)上进行。使用的正向和反向引物在表1中展示。所有的基因表达水平以*GAPDH*为内参, 结果代表至少3次的独立实验结果。

1.2.6 凝胶迁移实验(EMSA) EMSA实验采用标准化的程序和步骤。本研究使用的实验组DNA探针序列为: 5'-CGA GGC CTA GGG TCA GGA TTA CGT CTG GG-3'。使用的对照组DNA探针序列为: 5'-CGA GGC CTA GCC CTA GGC CTA TGT CTG GG-3'。其3'端被附加生物素标记。

1.2.7 细胞生长曲线和细胞凋亡 细胞进行生长曲线实验和细胞凋亡实验之前预先进行质粒转染。细胞在每天对应时间进行细胞计数, 每组细胞有3个平行实验, 最后使用Student *t*-test检验进行统计。细胞凋亡实验使用Solarbio公司Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒标准化实验步骤(CA1020)进行。

1.2.8 统计学分析 各实验结果均独立重复3次。本实验数据在组间比较时均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 使用GraphPad Prism 8软件进行unpaired Student's two-

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| 名称<br>Name         | 正向引物(5'→3')<br>Forward primer (5'→3') | 反向引物(5'→3')<br>Reverse primer (5'→3') |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| qPCR               |                                       |                                       |
| BAP18              | TGG CAT CTG GTG TCT TGT CA            | TTG GCA TCG GAG TCG TTC A             |
| ESR1               | GAC TGC ACT TGC TCC CGT               | CCA CTT CGT AGC ATT TGC GG            |
| GAPDH              | CAG CGA CAC CCA CTC CTC               | TGA GGT CCA CCA CCC TGT               |
| Plasmids construct |                                       |                                       |
| Promoter-1         | GGA TCG GAG AGG GCC TGA               | CCG CGC AGG AAG TCC C                 |
| Promoter-2         | GAA GAA GTG CCG GTT CTC CC            | CCG CGC AGG AAG TCC C                 |
| Promoter-3         | TTG AGG ACG TTC CCT TCA CG            | CCG CGC AGG AAG TCC C                 |
| Promoter-4         | GGC CCC TAG GTT AGA GGA CT            | CCG CGC AGG AAG TCC C                 |
| Promoter-5         | GAG GAG AGC GGC TTT CTT GA            | CCG CGC AGG AAG TCC C                 |
| ChIP               |                                       |                                       |
| EBS1               | TGG GAG GCG AGG AAA CTC T             | TTT CAG TCT GTC TCC TTC TCC G         |
| EBS2               | ATG TGT AGC TGG GCC TTG TT            | CGA GGC AAG GGT GGG AAT AG            |
| EBS3               | TTG AGG ACG TTC CCT TCA CG            | GGG CCT CCC AGA CGT AAT TC            |
| EBS4               | TGT GCT TCT CAG TCC ACC TC            | TAT GTG CCC GAC ACC TGT TT            |



tailed *t*-tests 统计分析用于确定组间的统计相关性。 $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 在乳腺癌细胞中E2能够促进BAP18 mRNA及蛋白表达

通过Western blot实验发现, BAP18在两种乳腺癌细胞系中均随E2浓度增加而表达增多(图1A)。在MCF7细胞和T47D细胞中使用100 nmol/L E2处理发现, BAP18的蛋白表达随处理时间增长而发生增加; 同时, 使用50 nmol/L Tamoxifen处理发现, BAP18的蛋白表达随处理时间增长而发生减少(图1B和图1C)。同样地, 在MCF7细胞和T47D细胞中, BAP18的mRNA水平可以随E2处理时间的增长而增加, 随Tamoxifen处理时间的增长而减少(图1D和图1E)。在MCF7细胞中分别用无水乙醇(EtOH)、E2和Tamoxifen处理MCF7细胞0至24 h, 荧光素酶双基因报告实验显示, E2可以显著上调ER的转录活性, 而Tamoxifen可以显著下调ER的转录活性(图1F)。通过不同浓度Fulvestrant处理MCF7细胞和T47D细胞, 发现随Fulvestrant处理ER蛋白表达减少, 同样地BAP18的mRNA和蛋白水平发生减少(图1G、图1H和图1I)。以上实验结果说明, BAP18可以被ER/E2调控, 可能是E2诱导的ER下游靶基因。

### 2.2 ER/E2 诱导BAP18的基因转录

通过NCBI网站进行检索, 发现在BAP18转录起始位点前2 000之内含有4个潜在的ER结合位点, 随后构建了不同长度的BAP18启动子荧光素酶双基因报告质粒(图2A和图2B)。利用荧光素酶双基因报告实验发现, BAP18全长启动子的转录活性可以随ER的外转表达量和E2浓度的增加而增加(图2C和图2D)。而各个截短的启动子质粒荧光素酶双基因报告实验显示, 缺失EBS III核心启动子之后BAP18的转录活性明显下降(图3C)。以上实验结果说明, BAP18 EBS III位点有可能是ER的调控位点。

### 2.3 ER在E2处理后招募并直接结合在BAP18核心启动子上

在MCF7细胞中, 利用ChIP实验发现ER主要结合在EBS III区域, 且该区域的组蛋白H4ac和H3K4me3修饰水平在E2刺激下增加(图3A和图3B)。EMSA实验发现, ER可以直接结合到BAP18 EBS III的DNA探针上(图3C)。以上结果表明, ER可以直接

结合在EBS III区域并上调该区域的转录活性。

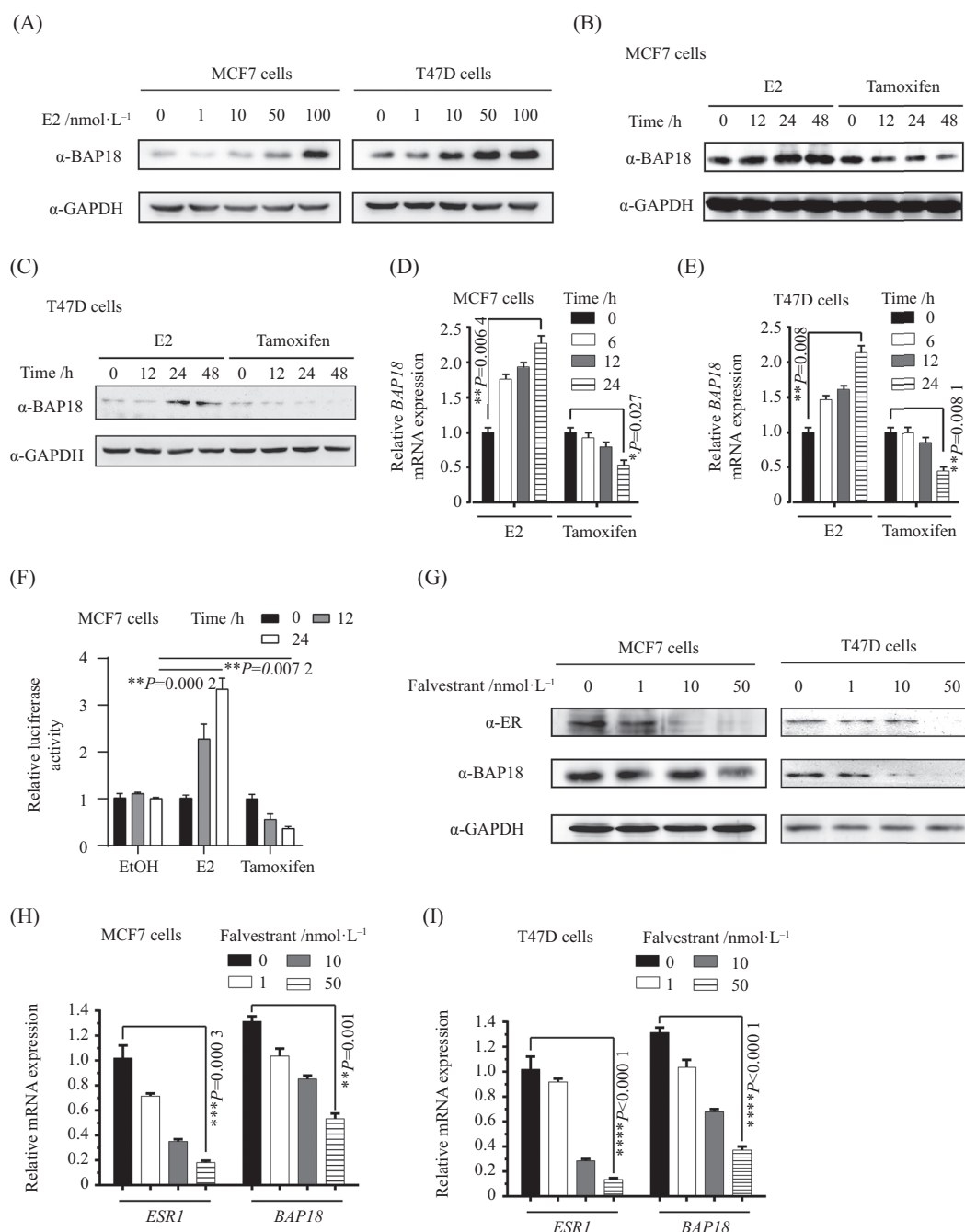
### 2.4 BAP18敲除抑制乳腺癌细胞的生长并促进细胞凋亡

构建CRISPR-Cas9 BAP18<sup>-/-</sup>质粒并转染MCF7细胞和T47D细胞, 利用Western blot实验发现BAP18在Cas9质粒转染作用下表达明显降低(图4A)。通过细胞生长曲线实验发现, BAP18敲除可以显著抑制乳腺癌细胞MCF7的生长(图4B)。R250染色发现, BAP18的敲除可以显著降低MCF7和T47D细胞的活细胞数量(图4C)。通过流式细胞凋亡检测发现, BAP18敲除可以显著促进MCF7细胞和T47D细胞的凋亡(图4D)。

## 3 讨论

分子的异质性和复杂性使乳腺癌成为世界范围内最具侵袭性和高死亡率的肿瘤之一。内分泌疗法的发展以阻断雌激素依赖的乳腺癌细胞生长为中心, 其关键就是抑制ER下游靶基因的转录激活。但乳腺癌病人中仍有大部分经过内分泌治疗后产生耐药性和不可挽回的恶化和远端转移。因此, 探究乳腺癌中ER新的靶基因的功能和其转录调控的机制对临床乳腺癌治疗有极大的指导意义。

组蛋白赖氨酸的甲基化通常和转录调控相关, 例如组蛋白H3赖氨酸4位点的三甲基化代表的是活跃状态下的染色质。组蛋白H3K4me3被认为是基因启动子的标志, 并常伴有组蛋白H3或H4的乙酰化的交互对话<sup>[24-25]</sup>。基因的转录激活需要调控该基因的转录因子的招募。雌激素受体当与雌激素结合后会入核并识别特定的雌激素反应元件而激活基因的转录。荧光素酶双基因报告实验系统作为人造的转录活性调控识别系统, 可以直接反映一定区域内的转录活性。本实验由于发现了BAP18可以受到雌激素和雌激素受体的双重调控, 所以设计了BAP18启动子的双基因报告系统。虽然我们发现了BAP18启动子区有4个ER的结合位点, 但只有缺失了核心启动子III时BAP18的转录活性大幅度下降。ChIP实验结果显示, ER在BAP18的核心启动子III上主要招募并伴随着一系列的显示活跃状态的组蛋白修饰。同样地, 进行了体外的蛋白-DNA直接结合实验发现ER可以与EBS III的DNA链直接结合, 这说明, ER可以直接结合在EBS III上, 招募一些组蛋白乙酰化和甲基化酶对该区域进行组蛋白修饰从而激活BAP18

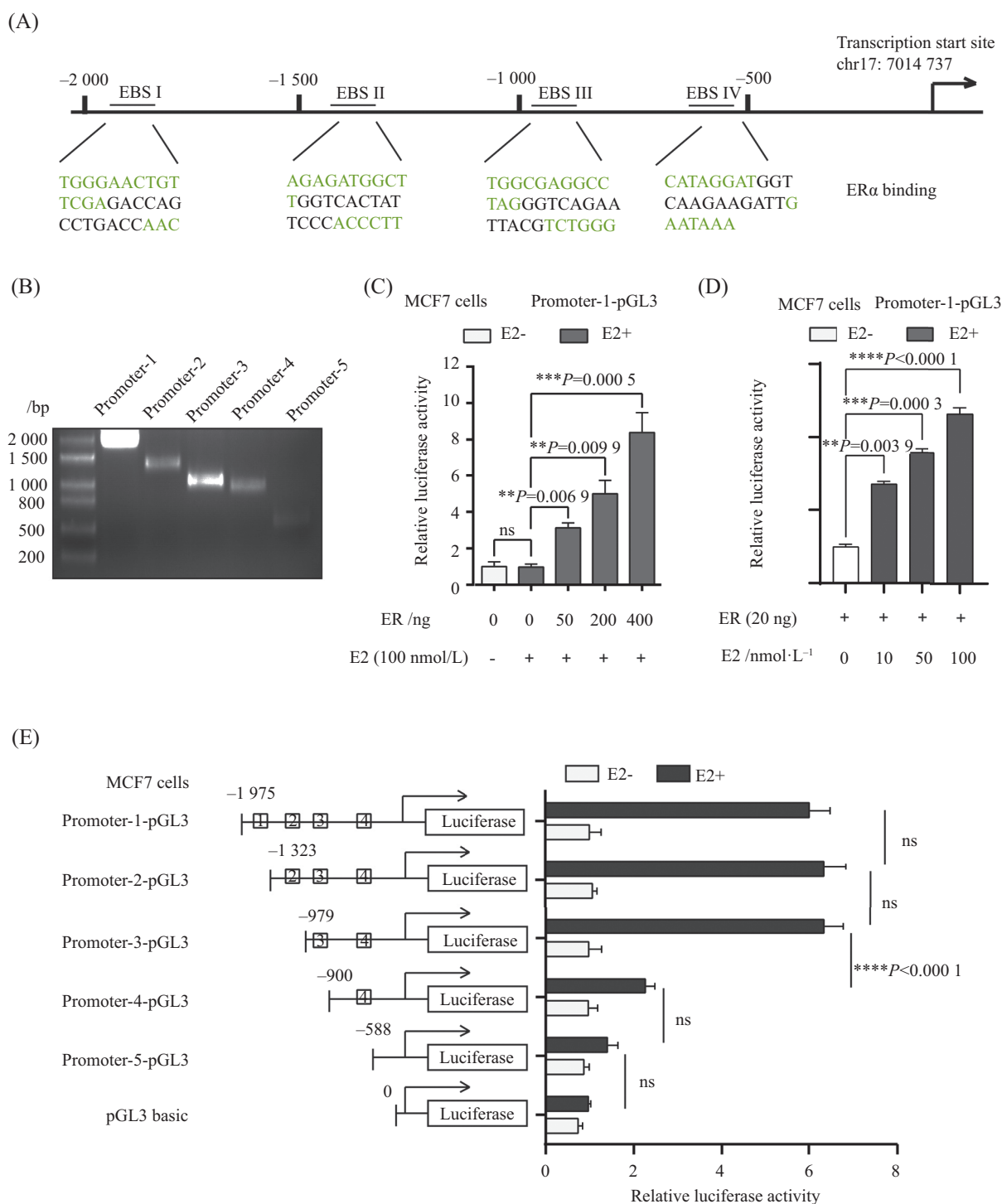


A: MCF7、T47D细胞进行不同浓度E2处理48 h, Western blot实验检测两种细胞系中BAP18表达水平; B、C: MCF7细胞和T47D细胞中进行E2(100 nmol/L)和Tamoxifen(50 nmol/L)处理, 分别在0、12、24和48 h对BAP18的蛋白水平进行检测; D、E: MCF7细胞和T47D细胞中进行E2(100 nmol/L)和Tamoxifen(50 nmol/L)处理, 分别在0、12、24和48 h对*BAP18*的mRNA水平进行检测; F: 分别使用无水乙醇(EtOH)、E2(100 nmol/L)和Tamoxifen(50 nmol/L)处理MCF7细胞, 使用荧光素酶双基因报告系统检测ER的转录活性; G: MCF7细胞和T47D细胞进行不同浓度的Fulvestrant处理, 对ER和BAP18的蛋白水平进行检测; H、I: MCF7细胞和T47D细胞进行不同浓度的Fulvestrant处理, 对*ESR1*和*BAP18*的mRNA水平进行检测。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: MCF7 and T47D cells were treated with different concentrations of E2 for 48 h, and Western blot assay was used to detect the expression level of BAP18 in the two cell lines; B,C: MCF7 cells and T47D cells were treated with E2 (100 nmol/L) and Tamoxifen (50 nmol/L), and the protein levels of BAP18 were detected at 0, 12, 24 and 48 h, respectively; D,E: MCF7 cells and T47D cells were respectively treated with E2 (100 nmol/L) and Tamoxifen (50 nmol/L), and the mRNA levels of *BAP18* were detected at 0, 12, 24 and 48 h; F: MCF7 cells were respectively treated with anhydrous ethanol (EtOH), E2 (100 nmol/L) and Tamoxifen (50 nmol/L), and the transcriptional activity of ER was detected by luciferase assays; G: MCF7 cells and T47D cells were treated with Fulvestrant at different concentrations to detect the protein levels of ER and BAP18; H,I: MCF7 cells and T47D cells were treated with different concentrations of Fulvestrant, and mRNA levels of *ESR1* and *BAP18* were detected. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图1 在乳腺癌细胞中E2能够促进BAP18 mRNA及蛋白表达

Fig.1 E2 increases BAP18 mRNA and protein expression in breast cancer cells

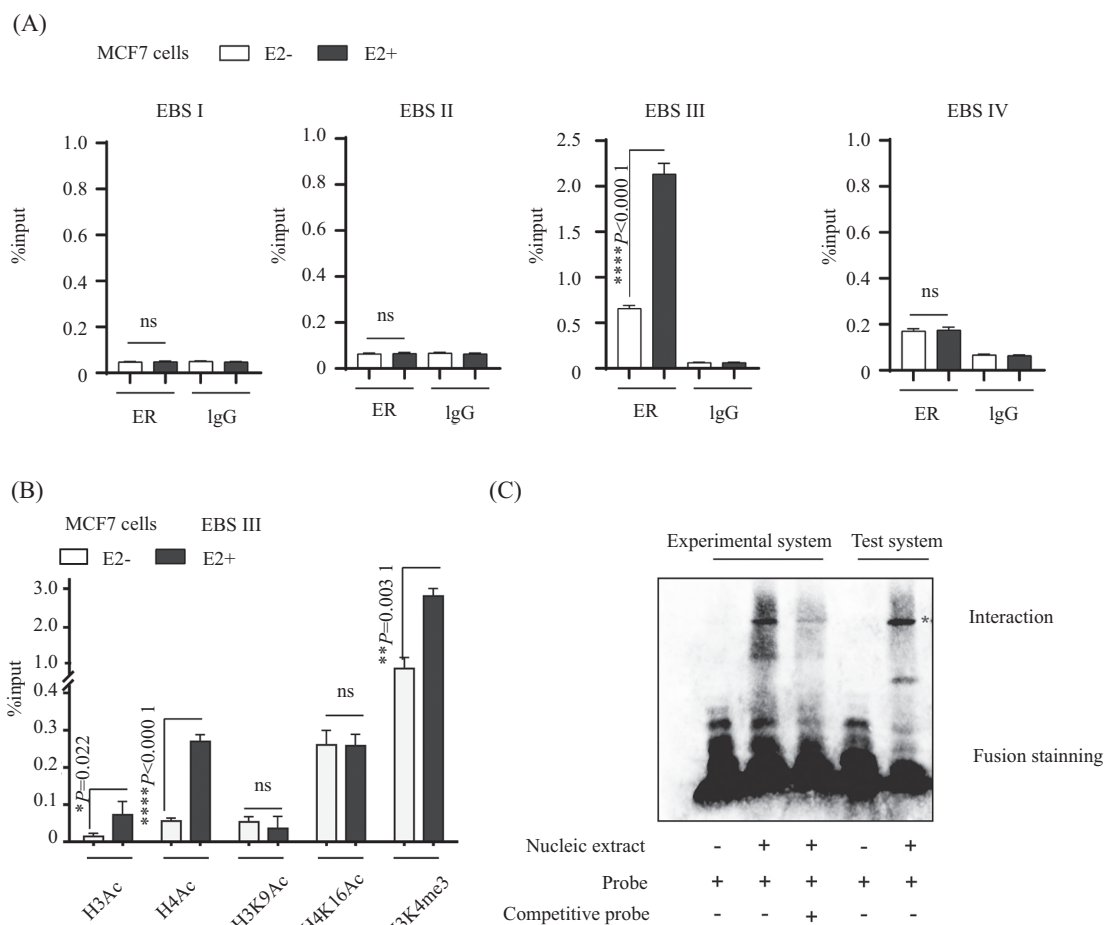


A: NCBI网站检索*BAP18*转录起始位点前2 000的碱基序列, 使用Jaspar分析其中含有的潜在的ER结合位点。绿色标注为结合位点周围无意义碱基; 黑色碱基为结合位点碱基序列; B: 使用RT-PCR实验合成不同长度的*BAP18*启动子序列; C、D: 不同ER外转量或不同E2浓度处理, 检测*BAP18*全长启动子的转录活性; E: 使用荧光素酶双击报告系统检测不同长度*BAP18*启动子的活性。ns代表无统计学差异, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: NCBI website is used to search for the 2 000 base sequence before the transcription start site of *BAP18*, and Jaspar website is used to analyze the potential ER binding sites upon *BAP18* promoter region. Meaningless bases sequence around the binding site are marked in green, and the black are the sequence of the binding site; B: different lengths *BAP18* promoter sequences are synthesized and detected by RT-PCR experiments; C,D: the transcriptional activity of *BAP18* promoter is detected with differential ER expression or E2 concentrations; E: activity of different lengths of *BAP18* promoters. ns stands for no statistical significance, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

图2 ER/E2诱导*BAP18*的基因转录

Fig.2 ER/E2 induces the transcription of *BAP18* gene



A: ER在4个预测的结合位点上的招募情况; B: EBS III位点附近的组蛋白修饰水平; C: ER蛋白与*BAP18*启动子DNA探针的直接结合。星号代表结合探针在凝胶上的位置。ns代表无统计学差异, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: recruitment of ER at the four predicted binding sites; B: Histone modification level near EBS III site; C: direct binding of ER protein to *BAP18* promoter DNA probe. The asterisk represents the position of the binding probe on the gel. ns stands for no statistical significance, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

图3 ER在E2作用下招募并直接结合在*BAP18*核心启动子区

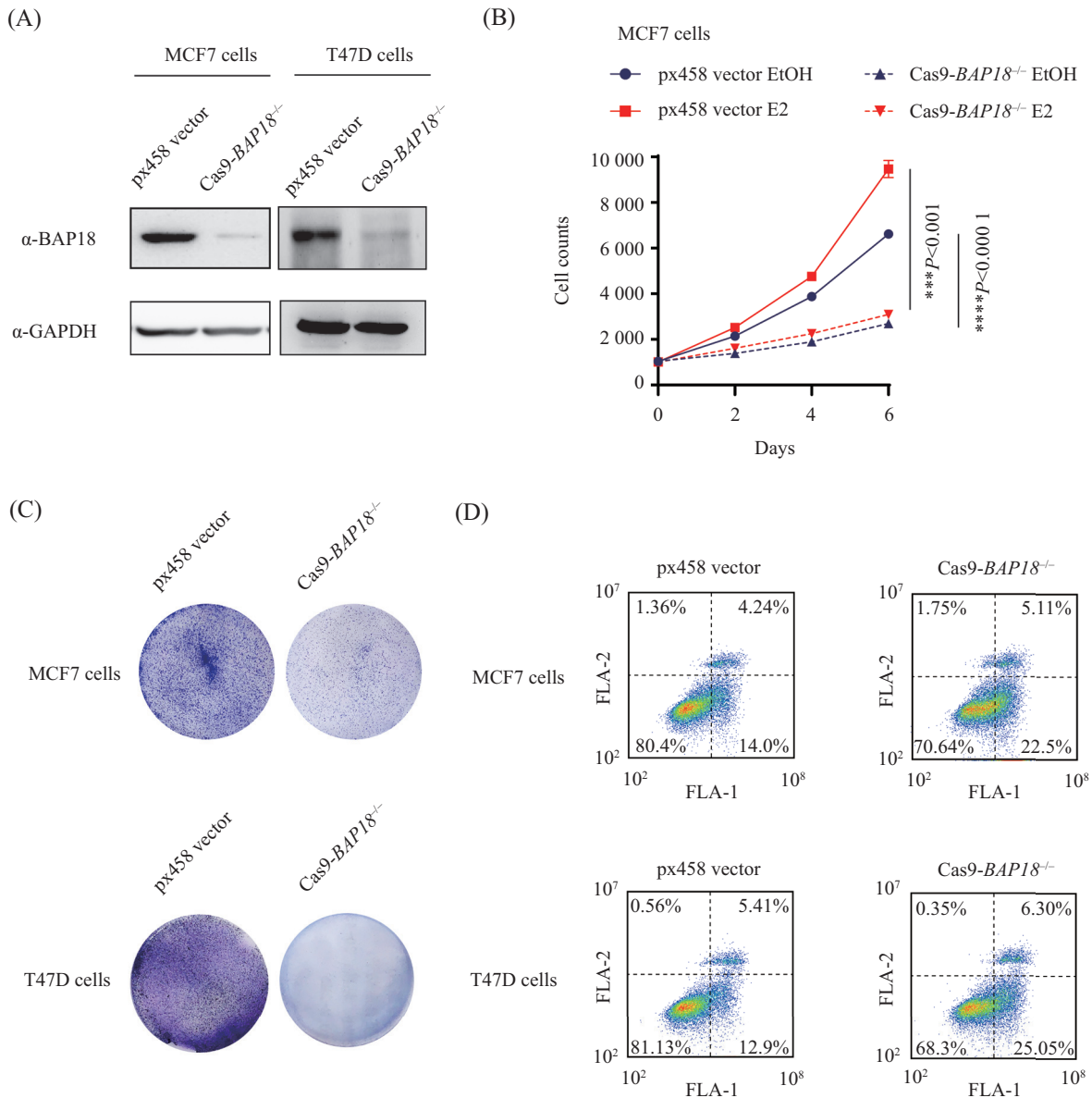
Fig.3 ER is recruited and directly binds to the core promoter region of *BAP18* gene with the treatment of E2

的转录。

最新研究提供的证据表明, ER下游靶基因参与多种与肿瘤发生和肿瘤进展有关的信号通路, 包括DNA损伤修复、细胞周期调控、上皮-间质转化和DNA甲基化等<sup>[26-28]</sup>。例如, 参与雌激素途径的重要基因死盒多肽5(dead-box helicase 5, DDX5), 这是一种依赖ATP的RNA解旋酶, 参与基因激活转录、RNA合成、DNA损伤修复和RNA剪接等几个重要生物学过程。这种多面性的活性取决于DDX5作为几种致癌转录因子(如 $\beta$ -catenin、p53和STAT3)的辅调节因子的能力<sup>[29]</sup>。过去研究表明, DDX5作为ER辅调节因子, 可以激活促进雌激素依赖基因如*TFF1*, 并促进ER与CBP-p300、类固醇受体共激活因子(steroid receptor coactivator, SRC)家族和RNA聚合酶

II(RNA Pol-II)的相互作用, 在转录机制组装中发挥重要作用。但最新的文章表明, DDX5在乳腺癌细胞中同样受到ER/E2信号轴的调控, 作为新的ER下游靶基因形成正反馈通路, 在特定的雌激素环境下急速促进乳腺癌的发展。同样地, 这种正反馈作用也可以降低乳腺癌细胞对内分泌药物的敏感性进而影响乳腺癌的治疗过程<sup>[30]</sup>。在本研究中, *BAP18*作为新的ER下游靶基因, 被发现可以受到雌激素和ER的调控, 同样地, 在高浓度的Tamoxifen和Fulvestrant作用下*BAP18*的表达量虽有降低, 但仍有一定量的表达。结合之前发现的*BAP18*可能作为ER的辅调节因子促进ER介导的基因转录<sup>[20]</sup>, 因此*BAP18*与ER之间可以形成促进转录的正向循环, 共同促进乳腺癌的进程, 这提示我们*BAP18*在乳腺癌中可能成为潜





A: 利用CRISPR-Cas9系统进行*BAP18*启动子定向敲除质粒的构建并转染MCF7细胞和T47D细胞, Western blot实验检测敲除效率; B: 细胞生长曲线检测*BAP18*敲除对细胞生长的影响; C: R250染色实验检测*BAP18*敲除对两种乳腺癌细胞生长的影响; D: 细胞流式凋亡检测*BAP18*敲除对细胞凋亡的影响。\*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001。

A: the *BAP18* promoter knockout plasmid is constructed using CRISPR-Cas9 system and plasmids are transfected into MCF7 cells. Western blot assay is used to detect the knockout efficiency; B: cell growth curve is used to detect the effect of *BAP18* knockout on cell growth; C: R250 stain assay detects the effect of *BAP18* knockout on cell counts; D: apoptosis analysis is used to detect the effect of *BAP18* knockout on cell apoptosis in MCF7 and T47D cells. \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

图4 *BAP18*敲除抑制乳腺癌细胞的生长并促进细胞凋亡

Fig.4 *BAP18* depletion leads to inhibition of breast cancer cell growth and increasing of cell apoptosis

在治疗靶点。

综上所述, 本研究先通过在细胞水平的实验发现*BAP18*受E2和ER的调控, 进而设计并构建了*BAP18*启动子的双报告系统检测出了ER主要招募和调控的启动子区域。最后, 利用Cas9质粒对*BAP18*进行敲除检测了乳腺癌细胞的生长。本研究首次发

现*BAP18*是一个全新的ER下游靶基因, 并且在雌激素的作用下表达增加。*BAP18*的高表达促进乳腺癌细胞的生长, 有望为临床治疗提供指导意见。

## 参考文献 (References)

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global



- cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [3] RUHSTALLER T, GIOBBIE-HURDER A, COLLEONI M, et al. Adjuvant letrozole and tamoxifen alone or sequentially for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: long-term follow-up of the BIG 1-98 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(2): 105-14.
- [4] RAZAVI P, CHANG M T, XU G, et al. The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(3): 427-38, e6.
- [5] HARVEY J M, CLARK G M, OSBORNE C K, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(5): 1474-81.
- [6] BERTUCCI F, NG C K Y, PATSOURIS A, et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 560-4.
- [7] MUSGROVE E A, SUTHERLAND R L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(9): 631-43.
- [8] TOY W, SHEN Y, WON H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1439-45.
- [9] ROBINSON D R, WU Y M, VATS P, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1446-51.
- [10] HERVOUET E, CARTRON P F, JOUVENOT M, et al. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(3): 237-45.
- [11] GAO L, ALUMKAL J. Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer [J]. *Epigenetics*, 2010, 5(2): 100-4.
- [12] HUA S, KITTLER R, WHITE K P. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer [J]. *Cell*, 2009, 137(7): 1259-71.
- [13] RHEINBAY E, PARASURAMAN P, GRIMSBY J, et al. Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 55-60.
- [14] LI W, HU Y, OH S, et al. Condensin I and II complexes license full estrogen receptor alpha-dependent enhancer activation [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 188-202.
- [15] MILLOUR J, CONSTANTINIDOU D, STAVROPOULOU A V, et al. FOXM1 is a transcriptional target of ERalpha and has a critical role in breast cancer endocrine sensitivity and resistance [J]. *Oncogene*, 2010, 29(20): 2983-95.
- [16] MILLER T W, BALKO J M, GHAZOU I Z, et al. A gene expression signature from human breast cancer cells with acquired hormone independence identifies MYC as a mediator of antiestrogen resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 2024-34.
- [17] FUJITA N, JAYE D L, KAJITA M, et al. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer [J]. *Cell*, 2003, 113(2): 207-19.
- [18] NARBE U, SJOSTROM M, FORSARE C, et al. The estrogen receptor coactivator AIB1 is a new putative prognostic biomarker in ER-positive/HER2-negative invasive lobular carcinoma of the breast [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 175(2): 305-16.
- [19] SUN S, ZHONG X, WANG C, et al. BAP18 coactivates androgen receptor action and promotes prostate cancer progression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(17): 8112-28.
- [20] SUN G, WANG C, WANG S, et al. An H3K4me3 reader, BAP18 as an adaptor of COMPASS-like core subunits co-activates ERalpha action and associates with the sensitivity of antiestrogen in breast cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(19): 10768-84.
- [21] WANG X, WANG C, YAN G, et al. BAP18 is involved in upregulation of CCND1/2 transcription to promote cell growth in oral squamous cell carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2020, 53: 102685.
- [22] ZHAO Y, TAKEYAMA K, SAWATSUBASHI S, et al. Corepressive action of CBP on androgen receptor transactivation in pericentric heterochromatin in a *Drosophila* experimental model system [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(4): 1017-34.
- [23] ZHAO Y, GOTO K, SAITOH M, et al. Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment. Identification of the p102 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle-binding protein as a coactivator for the receptor [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(33): 30031-9.
- [24] TOSKA E, OSMANBEYOGLU H U, CASTEL P, et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D [J]. *Science*, 2017, 355(6331): 1324-30.
- [25] GALA K, LI Q, SINHA A, et al. KMT2C mediates the estrogen dependence of breast cancer through regulation of ERalpha enhancer function [J]. *Oncogene*, 2018, 37(34): 4692-710.
- [26] JIN K, PARK S, TEO W W, et al. HOXB7 is an ERalpha cofactor in the activation of HER2 and multiple ER target genes leading to endocrine resistance [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(9): 944-59.
- [27] BALUAPURI A, WOLF E, EILERS M. Target gene-independent functions of MYC oncoproteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(5): 255-67.
- [28] DROOG M, NEVEDOMSKAYA E, DACKUS G M, et al. Estrogen receptor alpha yields treatment-specific enhancers between morphologically similar endometrial tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(8): E1316-25.
- [29] NASSA G, GIURATO G, SALVATI A, et al. The RNA-mediated estrogen receptor alpha interactome of hormone-dependent human breast cancer cell nuclei [J]. *Sci Data*, 2019, 6(1): 173.
- [30] HASHEMI V, MASJEDI A, HAZHIR-KARZAR B, et al. The role of DEAD-box RNA helicase p68 (DDX5) in the development and treatment of breast cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5478-87.