

high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1571-1574.

[16] Chuh AA, Chiu SS, Peiris JS. Human herpesvirus 6 and 7 DNA in peripheral blood leucocytes and plasma in patients with pityriasis rosea by polymerase chain reaction: a prospective case control study[J]. Acta Derm Venereol, 2001, 81(4): 289-290.

[17] 尚世强, 董关萍, 余钟声, 等. 应用 PCR-RFLP 技术检测中枢神经系统感染患儿 6 种疱疹类病毒 DNA 的实验研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19(10): 611-613.

[18] Teo IA, Griffin BE, Jones MD. Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6[J]. J Virol, 1991, 65(9): 4670-4680.

[19] Hudnall SD, Chen T, Tyring SK. Species identification of all eight human herpesviruses with a single nested PCR assay[J]. J Virol

Methods, 2004, 116(1): 19-26.

[20] 郑之北, 俞锡林, 吴亦栋, 等. 多重 PCR——基因芯片技术检测多种人疱疹病毒[R]. 浙江: 浙江省医学病毒学、医学微生物与免疫学学术年会, 2007.

[21] Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(7): 928-932.

[22] 王慧, 惠艳, 刘涛, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测人类 8 型疱疹病毒载量方法的建立及其诊断应用[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(7): 413-417.

(收稿日期: 2012-08-20)

• 综 述 •

PEA3 亚家族在乳腺癌中的研究进展

薛成军¹, 陈治水¹, 袁 蓉¹综述, 陈 辉²审校

(1. 中国人民解放军第九十一中心医院检验科, 河南焦作 454003;
2. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

关键词: 乳腺肿瘤; 多瘤病毒增强子激活剂 3; 基因表达调控; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 05. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0576-03

多瘤病毒增强子激活剂 3(Polyomavirus enhancer activator, PEA3)亚家族是 ETS(E26 transformation-specific)家族成员之一。ETS 最早是由美国 Frederick 国家癌症研究所分子肿瘤学实验室在鸟骨髓成红细胞增多症病毒 E26 的基因序列中发现的。随后, 拥有高度保守同源序列 28 个 EST 基因被发现。根据结构域中氨基酸序列的相似程度和亚群的特异性, ETS 基因家族编码的 28 种蛋白被分为 12 个亚家族。ETS 蛋白家族分子结构可分为 A、B、C 共 3 个区。A 区位于氨基末端, 在各个成员间缺乏同源性; B 区在各家族成员间仅有少量同源性; C 区位于羧基末端, 拥有一个高度保守的含 85 个氨基酸的 ETS 结合位点(ETS Binding Site, EBS), 可识别并结合富含嘌呤的 DNA 核心序列 5'-GGAA/T-3'^[1]。近十年来, 许多研究表明 PEA3 亚家族的转录因子的过表达可导致细胞的恶性转化, 增强肿瘤细胞的侵袭性和转移性; 已有动物实验证实 PEA3 亚家族与乳腺癌存在着联系。现就 PEA3 亚家族在乳腺癌中的研究进展作一综述。

1 PEA3 亚家族成员及其生理作用

PEA3 亚家族包括 3 个 ETS 转录因子。第一个被发现的是多瘤病毒增强子激活剂 3(PEA3), 也被称为腺病毒 E1A 增强子结合蛋白(E1AF), 可以被细胞中的病毒利用来完成它们自身的复制。现在, PEA3/E1AF 比较通用和合理的名字是 ETS 变异体 4(ETS variant 4, ETV4)。后来, 另外两个与 ETV4 结构十分相似的 PEA3 亚家族成员, ETV1(ETS variant 5, ETV5)和 ETV5(ETS variant 5, ETV5)也相继被发现和鉴定。

ETS 转录因子家族在多种生理过程中发挥重要作用, 包括细胞的增殖分化、迁移凋亡、血管发生和器官形成等^[2]。通过对 PEA3 转录因子 mRNA 水平的分析, ETV1, ETV4 和 ETV5 在人类胚胎期和成年期的多种器官中都有不同程度的

表达^[3]。虽然 ETV1, ETV4 和 ETV5 经常存在重叠表达的情况, 但是它们在一些特定组织中的 mRNA 水平存在很大差异。由此可见, PEA3 亚家族成员可能存在不同的调节机制并执行不同的生理功能。有研究发现, PEA3 亚家族能促进上皮细胞出芽并进一步形成脉管样结构, 并通过一个复杂的通路和周围的组织间质产生相互作用^[4]。Chotteau-Lelievre 等^[5]研究了 ETV1, 4, 5 从小鼠胚胎 9.5 d 到出生时的表达规律, 认为它们在胚胎发育中, 尤其是在需经历上皮-基质相互诱导转化的一些器官的发育中扮演了重要角色。

2 PEA3 亚家族在乳腺癌中的过表达及其与 HER2/neu 关系

第一次发现 PEA3 亚家族与乳腺癌有关是通过转基因鼠乳腺癌的研究, 发现 ETV4 的过表达可产生致癌作用。有研究显示, ETV1 的下调可使植入裸鼠腹腔内的人类乳腺癌细胞增殖水平降低^[6]。在 Firlej 等^[7]的研究中, 对 ETV4 和 ETV5 表达的抑制可以减慢肿瘤的增殖和转移; 反之, 如果上调它们的表达, 也可能对乳腺组织产生致癌作用。这些研究表明 PEA3 亚家族在乳腺癌的形成和转移中可能起到关键的作用。

HER2/neu 属于表皮生长因子受体家族, 并在人类 20%~30% 的乳腺癌中存在过表达^[8]。已有研究证实 HER2/neu 与乳腺癌的发生、转移和药物抵抗相关联, 并且阻滞 HER2/neu 表达的药物曲妥珠单抗可以明显改善乳腺癌患者的预后。在 HER2/neu 转基因鼠的研究中, PEA3 亚家族的三个转录因子在 mRNA 水平上都有上调, 提示它们可能是 HER2/neu 蛋白的下游效应因子^[11]。有研究显示, 在乳腺癌的分级及预后分析中, ETV4 过表达与 HER2/neu 的过表达存在正向关联^[12]。但 Xia 等^[9-10]报道, ETV4 的表达与 HER2/neu 在乳腺癌中没有关联或成反向关联^[13]。这也许因为 ETV4 与 HER2/neu 的表达都有多个基因参与调控, 在乳腺癌发展的不同阶段, 参与

调控的基因可能有差异,从而导致了实验结果的不一致。近年来,分子水平的研究提示 HER2/neu 和 PEA3 转录因子之间可能存在一个恶性循环。HER2/neu 可以激活 PEA3 转录因子的活性,而 PEA3 转录因子反过来可以通过结合 HER2/neu 基因的启动子而激活它转录^[14]。因此,尽管 PEA3 亚家族在乳腺癌中的过表达已经得到确认,但是与 HER2/neu 的关系及其预后的参考价值仍需要进一步验证。

目前,HER2/neu 激活 PEA3 亚家族的一个可以信赖的通路是:HER2/neu-RAS-RAF-MEK-MAPK-PEA3^[15],所有的 PEA3 转录因子都由分裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)激活。另一个 HER2/neu 激活 PEA3 因子活性的可能通路涉及甾体激素受体活化剂(steroid receptor coactivator, SRC)。已知的 3 种 SRC 蛋白都参与激活 ETV1 的活性,其中 SRC-3 在乳腺癌中存在较高的含量,并可以分别与 ETV1 和 ETV4 结合^[16]。有文献报道,在乳腺癌的研究中,ETV4 的表达与 SRC-1 和 SRC-3 的表达存在正相关^[17]。这两种通路虽然在研究中存在不一致,但是并不能武断认为它们是矛盾的,也许是存在双向通路的情况,这也从侧面说明 PEA3 亚家族在乳腺癌中表达机制的复杂性。

3 PEA3 亚家族在乳腺癌中与其他基因的相互调节作用

在乳腺癌细胞的研究中,PEA3 亚家族也被证实与其他基因的调节相关。基膜降解是肿瘤细胞发生和侵袭转移的关键步骤,研究证实基质金属蛋白酶(Matrix metallo-proteinases, MMPs)是降解细胞外基质最重要的酶类^[18]。在有些 MMPs 基因的启动子区域,可以观察到 ETS 的结合序列,不同的 ETS 转录因子可以与特定的启动子结合,调节 MMPs 基因的表达^[19]。在乳腺癌的研究证实,PEA3 亚家族可以激活包括间质胶原酶(MMP-1),基质溶解因子(MMP-7)和明胶酶 B(MMP-9)的 MMPs。在 MDA-MB-435s 乳腺癌细胞株的研究中发现,MMPs 基因表达的上调可以增强肿瘤细胞的转移和侵袭^[20],而 ETV4 的过表达也使肿瘤细胞出现侵袭性的表型。同样,在 TAC-2.1 乳腺上皮细胞的研究中发现,ETV4 和 ETV5 的过表达不仅使上皮细胞在凝胶载体中生成更多的脉管样结构,而且具有侵袭胶原基质的现象。以上两个研究表明,PEA3 亚家族可能通过激活 MMPs 的表达来增强乳腺癌的侵袭性。然而,Gu S 等人通过对人类 MDA-MB-231 和 MCF-7 的乳腺癌细胞的研究中发现,ETV4 可以通过提高 CXC 趋化因子受体的 mRNA 水平和启动子的活性,进而促进乳腺癌的转移^[21];Verreman 等^[22]对 MCF-7 细胞株的研究则发现异质性核糖核蛋白-1 转录激活因子也参与到 PEA3 亚家族介导的乳腺癌的转移。端粒酶催化亚基的过表达是肿瘤细胞无限增殖所必须的过程。Vageli 等^[23]通过对 43 例乳腺癌标本中的端粒酶逆转录酶、ETV-1 和 HER2/neu 的 mRNA 水平的分析发现 HER2/neu 和 ETV-1 共同上调端粒酶逆转录酶的基因表达,并且 ETV-1 在这一过程中可能起主要作用。

尽管大量文献研究 PEA3 亚家族在乳腺癌形成中的作用,但是仍没有确定 PEA3 转录因子的上调是乳腺癌形成的原因还是结果。在 HER2/neu 诱导的鼠乳腺癌形成的研究中发现,不仅 PEA3 亚家族存在表达上调,其他 ETS 基因都有上调;但是在与正常组织的对比中,PEA3 亚家族在 mRNA 水平上表现出更明显的差异,说明 PEA3 亚家族可能在乳腺癌形成中起关键作用。Baker 等^[24]在 MMTV/Wnt1 转基因鼠的乳腺癌的研究中,通过对 ETV4 的特异性抑制可以实现 HER2/neu 和 Wnt1 介导的乳腺癌发生减缓。但是,在针对 ETV1 研究中发现,在转基因鼠的乳腺中仅存在尿激酶纤维蛋白溶解酶原激

活剂和 MMP-3 转录增强的现象,但并未发现其他异常的病理改变。当然这也不能排除 ETV1 对乳腺组织的致癌作用,仍需要更深一步的研究。有文献报道,P300 和聚腺苷脱氨酶核糖聚合酶 1(PARP1)作为 ETV1 保持活性所必须的因子可以与 ETV1 相结合^[25],因此有学者认为相应的 P300 和 PARP1 抑制剂可能对 ETV1 阳性的乳腺癌的研究和治疗有帮助。

4 展 望

近些年来,针对 HER2/neu 过表达的乳腺癌患者的新型治疗药物曲妥单抗开始应用于临床,然而该药仅对 30% 左右的患者有效。如何将关于 PEA3 亚家族的研究结果应用于乳腺癌的临床治疗仍是一个难题。目前,直接通过干扰 RNA 技术对 ETV1,4,5 进行靶向干扰应该有广阔的前景,对 PEA3 因子的上游激活物基因,如 RAS,RAF,MEK 等的表达进行干扰,或对其下游基因产物(如 MMPs,VEGF 等)的抑制来间接抑制 PEA3 亚家族的表达也是一个临床研究方向。虽然目前对 PEA3 亚家族在乳腺癌中的作用机制仍不是十分清楚,但是随着基因组学和蛋白质组学的快速发展,对 PEA3 亚家族在乳腺癌的发生,转移和预后中的作用必将有一个更清晰的认识。

参考文献

- [1] Hollenhorst PC, Mcintosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80(6):437-471.
- [2] Chaar ZY, Hastings L, Sriram R, et al. Impaired c-src activation and motility defects in PEA3-null fibroblasts[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(12):2237-2242.
- [3] Hollenhorst PC, Jones DA, Graves BJ. Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(18):5693-5702.
- [4] Lu BC, Cebrian C, Chi X, et al. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12):1295-1302.
- [5] Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, et al. PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro[J]. *Dev Biol*, 2003, 259(2):241-257.
- [6] Shin S, Bosc DG, Ingle JN, et al. Rel is a novel ETV1/ER81 target gene upregulated in breast tumors[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(3):866-874.
- [7] Firlej V, Ladam F, Brysbaert G, et al. Reduced tumorigenesis in mouse mammary Cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 20):3393-3402.
- [8] 黄俊, 邓明凤, 郭华雄, 等. FISH 和 IHC 检测乳腺癌患者 HER2/neu 基因影响因素的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(3):268-270.
- [9] Yang JW, Kim MR, Kim HG, et al. Differential regulation of ErbB2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast Cancer cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(3):350-356.
- [10] Euhus D, Bu D, Xie XJ, et al. Tamoxifen downregulates ets oncogene family members ETV4 and ETV5 in benign breast tissue: implications for durable risk reduction[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(11):1852-1862.
- [11] Shepherd TG, Kockeritz L, Szrajber MR, et al. The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis[J]. *Curr Biol*, 2001, 11(22):1739-1748.

- [12] Myers E, Hill AD, Kelly G, et al. A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression [J]. Br J Cancer, 2006, 95(10): 1404-1409.
- [13] Xia WY, Lien HC, Wang SC, et al. Expression of PEA3 and lack of correlation between PEA3 and HER-2/neu expression in breast Cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 98(3): 295-301.
- [14] Ishida S, Higashino F, Aoyagi M, et al. Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 325-330.
- [15] Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in Cancer progression [J]. Cell Res, 2003, 284(1): 99-110.
- [16] Qin L, Liao L, Redmond A, et al. The AIB1 oncogene promotes breast Cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(19): 5937-5950.
- [17] Xu J, Wu RC, O'malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(9): 615-630.
- [18] 黄竹英, 李松, 汪平帮, 等. VEGF 与 MMP-9 在原发性肝癌中的表达及意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1353-1354, 1356.
- [19] 朱民, 寿楠海. E1AF、MMP-2 及 MMP-7 在大肠癌组织中的表达及意义 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2004, 42(4): 434-436.
- [20] 张涛, 陈晓品, 汤为学, 等. MMP-2, MMP-9 在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达变化 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 600-603.
- [21] Gu S, Chen L, Hong Q, et al. PEA3 activates CXCR4 transcription in MDA-MB-231 and MCF7 breast Cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(10): 771-778.
- [22] Verreman K, Baert JL, Verger A, et al. The coactivator activator CoAA regulates PEA3 group member transcriptional activity [J]. Biochem J, 2011, 439(3): 469-477.
- [23] Vageli D, Ioannou MG, Koukoulis GK. Transcriptional activation of hTERT in breast carcinomas by the Her2-ER81-related pathway [J]. Oncol Res, 2009, 17(9): 413-423.
- [24] Baker R, Kent CV, Silbermann RA, et al. Pea3 transcription factors and wnt1-induced mouse mammary neoplasia [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8854.
- [25] Brenner JC, Ateeq B, Li Y, et al. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate Cancer [J]. Cancer Cell, 2011, 19(5): 664-678.

(收稿日期: 2012-10-09)

• 综 述 •

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪应用于 鲍曼不动杆菌检测的研究进展

梁 亮 综述, 农生洲[△] 审校

(广西壮族自治区人民医院检验科, 广西南宁 530021)

关键词: 鲍氏不动杆菌; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.028**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)05-0578-03

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是一种新型的软电离物质谱,其原理是用激光照射待测物与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量传递给生物分子使其电离,让离子在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同可以推断出片段的大小,适用于混合物及生物大分子的测定。MALDI-TOF MS具有灵敏度高、准确度高及分辨率高的特点,为生命科学等研究领域中的一种强有力的分析测试手段。近年来, MALDI-TOF MS已逐渐应用于临床微生物学细菌鉴定^[1]及真菌药敏的研究^[2],尤其在非发酵革兰阴性杆菌的鉴定方面有着重要的作用^[3]。鲍曼不动杆菌是一种常见的革兰阴性非发酵杆菌,是当前国内外医院感染和社区获得性感染的主要条件致病菌^[4-5]。本文就近年来 MALDI-TOF MS 在检测鲍曼不动杆菌中的研究进展进行综述。

1 对产碳青霉烯类菌株的检测

目前碳青霉烯类抗生素已广泛应用于治疗鲍曼不动杆菌感染。有研究表明,全球范围内碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌感染的发病率逐年增多^[6],此类爆发流行的菌株多以产 OXA 型 β -内酰胺酶为主^[7-8]。如何快速、准确的鉴定出细菌是否具有产碳青霉烯酶的活性,对指导临床合理用药、控制鲍曼不动杆菌感染播散有重要的意义。Hrabák 等^[9]用 MAL-

DI-TOF MS 检测碳青霉烯类药物美洛培南及其降解产物的情况,对已知产碳青霉烯酶和不产碳青霉烯酶的肠杆菌科和假单胞菌属细菌分别作了验证,结果显示此方法用于鉴别菌株是否产碳青霉烯酶的检测灵敏度为 96.67%,特异度可达 97.87%,说明 MALDI-TOF MS 检测具有快速、灵敏、特异性高的特点; Hrabák 等^[10]对 108 株产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌、35 株不产碳青霉烯酶而对碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌,以及 2 株产 NDM-1 型的鲍曼不动杆菌用 MALDI-TOF MS 对碳青霉烯类药物美罗培南的水解情况进行了分析测定,结果显示 MALDI-TOF MS 适用于产碳青霉烯酶类的菌株的检测。Burckhardt 等^[11]用同样的方法对多种产碳青霉烯酶的细菌进行检测时,发现在 1~2.5 h 内就可以检测到大量的碳青霉烯酶活性。Kempf 等^[12]用 MALDI-TOF MS 对 106 株鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类的情况进行分析,经过严格的质控测试,推论 MALDI-TOF MS 适用于大量的产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌临床分离株的检测。上述研究均提示 MALDI-TOF MS 在检测菌株产碳青霉烯酶尤其是 β -内酰胺酶方面,具有快捷高效、准确度和特异度高的特点。

2 基因分型研究

PCR(palindromic-polymerase chain-reaction, PCR)相关检测技术是菌株基因分型研究中公认的检测金标准,早已在临床常规应用。然而由于 PCR 操作复杂,试剂成本高,仪器需要专