

## • 论 著 •

# Fra-1 在乳腺癌细胞中高表达原因及其启动子高转录活性的分子机制研究

周秋媛,李 虹<sup>△</sup>,王红莉,李 伟,徐艳华

(湖北省恩施州中心医院病理科,湖北恩施 445000)

**摘要:**目的 探讨 Fra-1 在乳腺癌细胞中高表达原因,以及 Fra-1 启动子高转录活性的分子机制。方法 选取 2 株人乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7、1 株人脐静脉内皮细胞株 ECV304 进行研究。采用实时荧光定量逆转录—聚合酶链反应法和蛋白印迹法分别检测 Fra-1 mRNA 和蛋白的表达情况;构建 Fra-1 双荧光报告载体,检测 Fra-1 启动子转录活性;构建 Fra-1 启动子短截报告载体及相关位点的突变型报告载体,检测短截报告载体及突变型载体转录活性;通过凝胶迁移阻滞试验观察生物素标记的特异性探针与活化因子蛋白-1(AP1)结合情况。结果 乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7 中, Fra-1 的 mRNA 和蛋白的相对表达量及其启动子全长报告载体转录活性均高于人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在构建的一系列 Fra-1 启动子短截报告载体中, 只有 pGL3B-256 活性明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );AP1 突变型报告载体 pGL3B-M2、特异性蛋白 1 及 AP1 双突变报告载体 pGL3B-M3 活性明显低于野生型报告载体 pGL3B-M1, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );凝胶迁移阻滞试验观察到生物素标记的特异性探针与 AP1 结合发生了明显的阻滞效应。结论 在体外培养的乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7 中, 反式作用因子 AP1 通过激活 Fra-1 基因启动子上调其表达。

**关键词:**启动子; 乳腺癌; 反式作用因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3113-04

## Causes of Fra-1 high expression in breast cancer cells and molecular mechanism of Fra-1 high transcription activity

ZHOU Qiuyuan, LI Hong<sup>△</sup>, WANG Hongli, LI Wei, XU Yanhua

(Department of Pathology, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

**Abstract: Objective** To explore the causes of Fra-1 high expression in breast cancer cells and molecular mechanism of Fra-1 high transcription activity. **Methods** Two human breast cancer cell lines MDA231 and MCF-7 and 1 human umbilical vein endothelial cell ECV304 were selected as the research objects. Real time fluorescent quantitative reverse transcription—polymerase chain reaction and Western blotting were used to detect the Fra-1 mRNA and protein expression; the Fra-1 dual fluorescence reporter vector was constructed, and the Fra-1 promotor transcription activity was detected; the Fra-1 promotor short-cut reporter vector and mutation reporter vector at related loci were constructed, and the transcription activity of short-cut reporter vector and mutation reporter vector was detected; the binding situation of specific probe marked by biotin with activator protein-1(AP1) was observed by using the gel migration block test. **Results** The relative expression of mRNA and protein and promotor whole length reporter vector transcription activity of Fra-1 in human breast cancer cell lines MDA231 and MCF-7 cells were higher than that in human umbilical vein endothelial cell ECV304, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ); in constructed series Fra-1 promotor short-cut reporter vectors, only the activity of pGL3B-256 was obviously decreased, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ); the activity of AP1 mutation reporter vector pGL3B-M2 and SP1 and AP1 dual mutation reporter vector pGL3B-M3 was significantly lower than that of wild type reporter vector pGL3B-M1, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ); the gel migration block test found that the binding of specific probe marked by biotin with AP1 had obvious blocking effect. **Conclusion** In vitro cultured breast cancer cell lines MDA231 and MCF-7, the trans-acting factor AP1 up-regulates its expression by activating Fra-1 gene promoter.

**Key words:** promotor; breast cancer; trans-acting factor

Fra-1 是 1993 年 Matsui 等学者发现的一种原癌基因, 该基因参与胚胎发育过程中的骨形成<sup>[1]</sup>。Fra-1 属于活化因子蛋白(AP)-1 家族中 Fos 亚家族成员之一, 其调节肿瘤细胞的生长、转移和侵袭主要是通过与目标基因启动子上的抗原处理相关转运体反应元件相结合而实现的<sup>[2-3]</sup>。目前, 国内外关于 Fra-1 与乳腺癌的研究还处于起步阶段, 其分子机制的研究也较少。本研究探讨 Fra-1 在乳腺癌细胞中高表达原因及其启动子高转录活性的分子机制, 为针对 Fra-1 靶向治疗乳腺癌提供一定的试验基础。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2 株人乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7、1 株人脐静脉内皮细胞株 ECV304 进行研究。

**1.2 仪器与试剂** Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 实时荧光定量逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Thermo 公司, PrimeSTAR HS 酶、LA Taq 酶均购自日本 TaKaRa 公司, DNA ladder 购自台湾 GeneDirex 公司, Good-View 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司, Fra-1 抗体购自美国 Santacruz 公司, 人全血基因组提取试剂盒购自美国

PeproTech 公司, BCA 蛋白测定试剂盒、细胞核蛋白抽提试剂盒均购自碧云天生物技术研究所, 电泳迁移率试验试剂盒购自美国 Pierce Biotechnology 公司, 胎牛血清、杜氏培养基均购自美国 Invitrogen 公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂。人乳腺癌细胞株 MDA231、MCF-7 及人脐静脉内皮细胞株 ECV304 均购自于美国模式培养物集存库。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养方法** 在 37 °C、5% 二氧化碳条件下用含有 10% 胎牛血清的杜氏培养基培养。细胞密度为每孔  $2 \times 10^5$  个细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化并传代。

**1.3.2 Fra-1 mRNA 检测方法** 将 3 株细胞在体外条件下进行培养, 当细胞生长至对数生长期时裂解细胞, 并提取细胞的 mRNA, 通过逆转录的方法将 3 株细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA, 设计 RT-PCR 引物检测 3 株细胞中 Fra-1 mRNA 的相对表达量, 细胞周期 PCR 芯片数据分析采用<sup>ΔΔ</sup>Ct 方法。

**1.3.3 Fra-1 蛋白水平检测方法** 将 3 株细胞在体外条件下进行培养, 当细胞生长至对数生长期时裂解细胞, 并提取细胞的总蛋白。采用蛋白质印迹法检测 3 株细胞中 Fra-1 蛋白的表达情况, 同时检测  $\beta$ -Actin 内参蛋白, 操作按 BCA 蛋白测定试剂盒使用说明进行。

**1.3.4 Fra-1 启动子转录活性检测方法** 构建 Fra-1 全长启动子双荧光报告载体 pGL3B-2163。将处于对数生长期的乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7 转种于 24 孔细胞培养板, 每孔接种的细胞数量为 100 000 个, 细胞完全贴壁后更换不含血清的培养基, 转染 Fra-1 启动子报告载体, 每孔转染量为 1  $\mu$ g, 同时每孔转染 0.1  $\mu$ g 的内参报告基因 pRL-TK, 培养 5 h 后更换含 10% 胎牛血清的完全培养基继续培养 48 h, 细胞裂解后收集荧光蛋白, 检测荧光蛋白活性。

**1.3.5 荧光蛋白活性检测方法** 在 Fra-1 全长启动子报告载体 pGL3B-2163 的基础上, 采用巢式 PCR 法构建一系列的 Fra-1 启动子的短截报告载体, 并根据其长度分别命名为 pGL3B-1475、pGL3B-880、pGL3B-676、pGL3B-386 和 pGL3B-256。将处于对数生长期的乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7 转种于 24 孔细胞培养板, 每孔接种的细胞数量为 100 000 个, 细胞完全贴壁后更换不含血清的培养基, 转染 Fra-1 启动子报告载体 (pGL3B-2163、pGL3B-1475、pGL3B-880、pGL3B-676、pGL3B-386 和 pGL3B-256), 转染及检测方法同 1.3.4。

**1.3.6 启动子转录结合位点预测方法** 启动子可能存在潜在的转录因子结合位点, 预测分析使用免费的在线分析软件 TF-SEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)、TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) 和 TFbind (<http://tfbind.hgc.jp/>)。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 Fra-1 mRNA 在不同细胞株中的表达情况** MDA231、MCF-7 细胞株 Fra-1 mRNA 相对表达量分别为  $6.07 \pm 0.24$ 、 $6.12 \pm 0.48$ , 明显高于 ECV304 细胞株的  $1.00 \pm 0.00$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 Fra-1 蛋白在不同细胞株中的表达情况** MDA231、MCF-7 细胞株 Fra-1 蛋白相对表达量分别为  $4.25 \pm 0.62$ 、 $4.29 \pm 0.71$ , 明显高于 ECV304 细胞株的  $1.00 \pm 0.00$ , 差异

有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

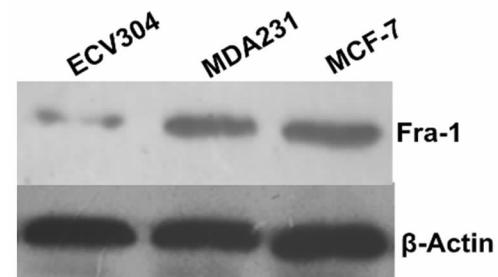


图 1 Fra-1 蛋白在不同细胞株中的表达强度

**2.3 Fra-1 启动子在不同细胞株中的活性比较** MDA231、MCF-7 细胞株 Fra-1 启动子活性分别为  $5.17 \pm 0.57$ 、 $5.12 \pm 0.44$ , 明显高于 ECV304 细胞株的  $1.00 \pm 0.00$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 乳腺癌细胞中调控 Fra-1 启动子转录活性区域分析** Fra-1 短截报告载体 pGL3B-1475、pGL3B-880、pGL3B-386 与全长报告载体 pGL3B-2163 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而短截报告载体 pGL3B-256 活性明显低于与全长报告载体及其他短截报告载体, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。MDA231、MCF-7 细胞株 Fra-1 启动子在起始转录位点上游  $-164 \sim -52$  nt 区域有着重要的调控转录区域。见图 2。



图 2 乳腺癌细胞中调控 Fra-1 启动子转录活性区域分析

**2.5 乳腺癌细胞中 Fra-1 启动子核心区域生物信息学分析** 上述调控转录区域有两个与 Fra-1 转录密切相关的转录因子结合位点特异性蛋白 1 (SP1) 和 AP1, 其中 SP1 预测位点为 GGG GGT GGA GCC T, AP1 预测位点为 TTC ATA AAA A。另外两个转录因子 EGR1 及 AP2 与 Fra-1 启动子的转录活性调节关系不大。见图 3。



图 3 乳腺癌细胞 Fra-1 基因启动子核心区域生物信息学分析

**2.6 影响乳腺癌细胞 Fra-1 启动子转录的位点** SP1 突变型报告载体 pGL3B-M1 与转染 Fra-1 启动子报告载体 pGL3B-368 相对活性均为  $1.00 \pm 0.00$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而 AP1 突变型报告载体 pGL3B-M2、SP1 及 AP1 双突变报告载体 pGL3B-M3 相对活性分别为  $0.26 \pm 0.09$ 、 $0.21 \pm$

0.06, 明显低于野生型报告载体 pGL3B-M1, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.7 凝胶迁移阻滞试验结果** 见图 4。图中 Freeprobe 表示没有与核蛋白结合的生物素标记的自由探针, 图中上端 4 泳道表示核蛋白 AP1 与其特异性探针相结合的条带, 该条带与自由探针比较, 发生了明显的阻滞现象。第 1 泳道为没有添加核蛋白的阴性对照组, 该组 AP1 特异性探针因不能与任何核蛋白结合而没有发生阻滞现象; 第 2 泳道为添加 100 倍生物素(已提取核蛋白)的 AP1 特异性探针, 其阻滞效应明显减弱, 自由探针优先反应 20 min; 第 3 泳道为添加 100 倍生物素(已提取核蛋白)的 AP1 特异性探针, 由于优先反应 20 min 且不能够与 AP1 结合, 其阻滞效应并没有受到影响; 第 4 泳道为加入核蛋白并添加生物素标记 AP1 探针, 其阻滞效应明显, 而且与第 3 泳道的阻滞条带无明显差别。

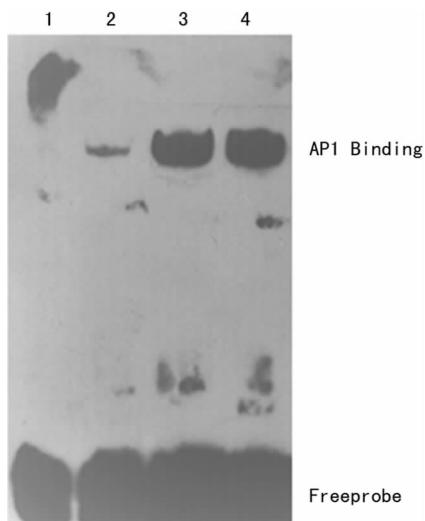


图 4 凝胶迁移阻滞试验

### 3 讨 论

乳腺癌是最常见的女性恶性肿瘤之一, 发病率仅次于子宫癌。乳腺癌的发病人数占全身各类恶性肿瘤发病人数的 7%~10%, 现已成为威胁女性健康的重要原因之一, 越来越受到广大学者和科研人员的关注<sup>[1]</sup>。乳腺癌的发病常与基因遗传相关, 广泛的流行病学研究发现, 40~60 岁及更年期前后妇女发病率较高。欧美的流行病学研究发现, BRCA-1、BRCA-2、P53、PTEN 等基因的表达或缺失与乳腺癌的发病有着密切的关系, 与这些基因相关的乳腺癌占全部乳腺癌的 5%~10%<sup>[2-3]</sup>。

Fra-1 是新近发现的与癌症密切相关的基因, 在多种癌组织细胞中呈现高表达, 可以促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移能力<sup>[4]</sup>。本研究通过 RT-PCR 技术和免疫印迹技术检测乳腺癌细胞株 MDA231、MCF-7 中 Fra-1 的 mRNA 表达和蛋白表达, 与正常的人脐静脉内皮细胞株相比, 它们的相对表达量明显增高。这表明在体外培养的乳腺癌细胞株中, Fra-1 的 mRNA 和蛋白呈现高表达。在细胞内, mRNA 和蛋白的表达受到各种因素的调节, 其中基因在转录水平上的调控是最重要的, 而基因的转录活性调节主要涉及基因的启动子区域。本研究构建 Fra-1 基因启动子全长的报告载体 pGL3B-2163, 将该报告基因连同内参 pRL-TK 共转染乳腺癌细胞株 MDA231、MCF-7 和正常的人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 发现乳腺癌细胞株 MDA231 和 MCF-7 中 Fra-1 启动子的转录活性明显高于

人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 这与 Fra-1 中 mRNA 和蛋白表达检测结果是一致的。

基因启动子是基因的组成部分之一, 在遗传学中是指 1 段能使基因进行转录的 DNA 序列, 其可以被 RNA 聚合酶辨认, 并开始转录<sup>[5-6]</sup>。在 RNA 合成中, 启动子区域和调控区域就像“开关”, 决定基因的活动, 继而控制细胞开始生产哪一种蛋白质<sup>[7-8]</sup>。然而基因启动子区域存在着成千上万的转录因子及反式作用因子调控的区域, 对于这些区域的研究才是弄清基因转录调节机制的钥匙。本研究采用生物信息学相关方法并参考国内外相关文献, 在 Fra-1 启动子全长报告基因的基础上克隆了一系列的短截报告基因, 通过分析其荧光活性发现在 -164~-52 nt 启动子区域中存在特异性调节 Fra-1 启动子转录的活性区域, 这为寻找潜在的转录因子或者反式作用因子结合位点提供了线索。同时, 本研究发现该区域有着两个与 Fra-1 基因转录密切相关的转录因子结合位点 SP1 和 AP1, 另外两个转录因子 EGR1 和 AP2 与 Fra-1 启动子的转录活性调节关系不大。本研究采用巢式 PCR 方法构建这两个位点的报告基因, 通过转染乳腺癌细胞并检测荧光活性发现 AP1 位点可能与乳腺癌细胞株 Fra-1 启动子活性调节相关, 这提示 AP1 位点可能是调控 Fra-1 在乳腺癌细胞中高转录活性的重要转录因子结合位点。

凝胶迁移阻滞试验是用来研究 DNA 与特异性蛋白的相互作用的一种方法, 通常是用放射性标记或者生物素标记的 DNA 片段与分离纯化蛋白成分(可以是胞浆蛋白, 也可以是胞核蛋白)或提取物中的蛋白混合物相结合, 然后在非变性凝胶中分析该产物的表达情况。与游离 DNA 相比, 蛋白-DNA 复合物由于相对分子质量大而导致迁移率降低, 因此与游离 DNA 片段相对比时可观察到“阻滞”现象<sup>[9]</sup>。该方法可用于检测 DNA 结合蛋白、RNA 结合蛋白, 可通过加入特异性的抗体来检测特定的蛋白质, 并可进行未知蛋白的鉴定<sup>[10]</sup>。本研究使用乳腺癌细胞株的细胞核蛋白和放射性自显影技术观察到了明显的阻滞现象, 间接证实基于反式作用因子 AP1 序列设计的生物素标记探针可以与核蛋白中高表达的 AP1 蛋白相互结合。这说明反式作用因子 AP1 参与了乳腺癌细胞中 Fra-1 基因启动子转录的进行, 其具体作用机制可能是促进了 RNA II 类聚合酶与启动子的结合而促进转录的进行, 或者是提高了通用转录因子 DNA 聚合作用从而促进了转录的发生。

综上所述, 乳腺癌细胞株 MDA231、MCF-7 中, Fra-1 的 mRNA 和蛋白呈高表达, 调节 Fra-1 启动子活性的主要区域位于启动子起始转录位点上游 -164~-52 nt 区域, 该区域可能存在的潜在转录因子或者反式作用因子位点为 AP1, 该位点的碱基序列为 TTC ATA AAA A。

### 参考文献

- [1] 林霄. 原癌基因 Fra-1 在乳腺癌中的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(2): 213-214.
- [2] Hovhannisyan H, Zhang Y, Hassan MQ, et al. Genomic occupancy of HLH, AP1 and Runx2 motifs within a nuclelease sensitive site of the Runx2 gene[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(2): 313-321.
- [3] 郝一, 高明, 董雯, 等. JNK/AP-1 信号通路在 As2O3 诱导乳腺癌细胞凋亡中的作用[J]. 军事医学, 2011, 35(2): 118-121.

(下转第 3119 页)

雌激素通过 ER 介导基因或非基因机制调控心血管系统功能<sup>[1,9-10]</sup>。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  位于细胞核内, 通过调节特异性靶基因的转录而发挥基因型调节效应, 由独立基因 ESR1 和 ESR2 编码, 广泛分布于巨噬细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞等<sup>[11]</sup>。有研究表明, ESR1 和 ESR2 基因的单核苷酸多态性(SNPs)影响了雌激素相关的作用, 如 ESR1 的 Pvu II (rs2234693) 和 Xba I (rs9340799), ESR2 的 Rsa I (rs1256049) 和 Alu I (rs4986938) 等。Pvu II 基因多态性能影响转录因子的结合, 改变蛋白质表达<sup>[12]</sup>。有研究表明, ER $\alpha$  和 ER $\beta$  基因的遗传变异与脂质代谢、CHD 等疾病有关<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示: 两组 ER $\alpha$  基因 Pvu II、Xba I 和 ER $\beta$  基因 Rsa I、Alu I 基因型频率分布具有群体代表性, 其酶切多态性在男、女性间没有明显性差异; CHD 组中 pp、xx、RR、AA 基因型最多, PP、XX、rr、aa 基因型最少, 对照组中 Pp、xx、RR、AA 基因型最多, PP、XX、rr、aa 基因型最少, CHD 组 p/x 基因分布频率明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 其原因可能与冠心病危险因素相关。

综上所述, 雌激素基因多态性可能是一个有效的治疗 CHD 的靶点, p/x 基因分布频率可能与冠心病危险因素相关。尽管公共卫生的健康教育宣传在不断加强, 但 CHD 的发病率仍不断攀升。因此, 需要尽更大的力量去避免诱发冠心病的相关危险因素, 降低冠心病的发生率。

## 参考文献

- [1] Wu Q, Zhao Z, Sun H, et al. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(9): 1034-1043.
- [2] 吴芹, 常唐喜. 雌激素受体  $\alpha$ 、 $\beta$  基因多态性与冠心病[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(1): 76-77.
- [3] Weng H, Zhang C, Hu YY, et al. Association between estrogen receptor- $\alpha$  gene Xba I and Pvu II polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015(1): 1-9.
- [4] Yang L, Zhang H, Jiang YF, et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms and primary biliary cirrhosis in a Chinese population: a case-control study [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(22): 3008-3014.
- [5] Grundy SM, Becker D, Clark LT, et al. Third report of the National cholesterol education program (NCEP) expert

(上接第 3115 页)

- [4] Soriano V, McMahon B. Strategic use of lamivudine in the management of chronic hepatitis B [J]. *Antiviral Res*, 2013, 100(2): 435-438.
- [5] 宋玉华, 王静, 宋三泰, 等. 原癌基因 Fra-1 在人乳腺肿瘤组织中表达的初步研究 [J]. 上海医药, 2011, 32(1): 44-47.
- [6] Williams EM, Copp JN, Ackerley DF. Site-saturation mutagenesis by overlap extension PCR [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1179(6): 83-101.
- [7] Zhang B, Zhang R, Ji J, et al. Cloning of human adiponectin gene by PCR-driven overlap extension and expression in *Pichia pastoris* [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2008, 24(8): 1480-1484.

panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report [J]. *Circulation*, 2002, 106(25): 3143-3421.

- [6] Dellatorre S, Mitro N, Fontana R, et al. An essential role for liver ER $\alpha$  in coupling hepatic metabolism to the reproductive cycle [J]. *Cell Rep*, 2016, 15(2): 360-371.
- [7] Wei J, Shi YP, Zhang XY, et al. Estrogen upregulates hepatic apolipoprotein M expression via the estrogen receptor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811 (12): 1146-1151.
- [8] Zhao T, Zhang D, Liu Y, et al. Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women [J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(1): 50-54.
- [9] Gomes-Rochette NF, Souza LS, Tommasi BO, et al. Association of Pvu II and Xba I polymorphisms on estrogen receptor alpha (ESR1) gene to changes into serum lipid profile of post-menopausal women: effects of aging, body mass index and breast cancer incidence [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0169266.
- [10] Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system [J]. *Am J Cardiol*, 2002, 89(12A): 12-17.
- [11] Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74(5): 337-343.
- [12] Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein [J]. *Circulation*, 2002, 105(16): 1879-1882.
- [13] Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, et al. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts [J]. *Circ Res*, 2006, 98(5): 590-592.
- [14] Domingues-Montanari S, Subirana I, Tomás M, et al. Association between ESR2 genetic variants and risk of myocardial infarction [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(7): 1183-1189.

(收稿日期: 2017-03-24 修回日期: 2017-07-13)

- [8] Ovchinnikov DA, Wan Y, Coman WB, et al. DNA methylation at the novel CpG sites in the promoter of Med15/PCQAP gene as a biomarker for head and neck cancers [J]. *Biomark Insights*, 2014, 9(9): 53-60.
- [9] Zhang M, Xiao XQ, Jiang YF, et al. DNA demethylation in PD-1 gene promoter induced by 5-azacytidine activates PD-1 expression on Molt-4 cells [J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(2): 450-454.
- [10] Memelink J. Electrophoretic mobility shift assay for the analysis of interactions of jasmonic acid-responsive transcription factors with DNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1011(4): 209-225.

(收稿日期: 2017-03-12 修回日期: 2017-07-01)