

基于哺乳动物单杂交技术 ER α 调节剂高通量筛选模型的建立及应用

张倩¹, 水小溪¹, 范玉玲², 郝伟丽¹, 郑智慧^{1,2}, 路新华², 赵宝华¹, 张华², 贺建功²

1 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

2 华北制药集团新药开发有限责任公司, 石家庄 050013

摘要: 雌激素受体 α (Estrogen receptor α , ER α) 是一种类固醇核受体, 在机体的多种生理功能中起关键作用。为了筛选新的 ER α 调节剂, 本研究建立一个基于哺乳动物单杂交的报告基因技术的高通量 ER α 调节剂筛选模型。利用 RT-PCR 技术从脂肪组织总 RNA 中扩增 ER α 配体结合区 (Ligand binding domain, ER α LBD) 基因序列, 并插入含 GAL4 DNA 结合域的 pBIND-GAL4 表达质粒构建 pBIND-GAL4-ER α (LBD) 的嵌合表达质粒。该质粒与本室已构建好的含 GAL4 响应元件和荧光素酶的报告质粒 pGL3-GAL4 共转染, 通过测定荧光素酶的活性评价 ER 调节剂的转录调节的活性。经过多种条件优化, 激动剂阳性药对照雌二醇可以剂量依赖地诱导荧光素酶的表达, 最大上调倍数可达 28.1 倍, EC₅₀ 为 0.17 μ mol/L。拮抗剂阳性对照它莫昔芬可以有效地拮抗雌二醇的活性, 最大下调倍数为 6.3 倍, EC₅₀ 为 0.1 μ mol/L。该筛选模型可微量化于 384 孔板, 且 Z' 因子均大于 0.5。利用该模型从 2000 多个微生物和植物来源的天然产物以及合成化合物中筛选得到 4 个 ER α 激动剂。该模型灵敏、稳定, 可以快速进行多种来源的 ER α 调节剂的筛选和活性评价。

关键词: ER α , 激动剂, 拮抗剂, 共转染, 高通量筛选

Development and application of a mammalian one hybrid-based high-throughput screening model for ER α modulator

Qian Zhang¹, Xiaoxi Shui¹, Yuling Fan², Weili Hao¹, Zhihui Zheng^{1,2}, Xinhua Lu², Baohua Zhao¹, Hua Zhang², and Jianguo He²

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 Drug Research & Development Center of North China Pharmaceutical Group Corporation, National Microbial Medicine Engineering & Research Center, Shijiazhuang 050013, China

Abstract: Estrogen Receptor (ER α) is a member of superfamily of ligand-activated transcription factors which play critical roles in many biological processes. To screen novel modulators of ER α for drug development and biological function research, we developed a mammalian one-hybrid-based high-throughput screening model for ER α modulator. We cloned the ER α LBD gene from the total mRNA of fat tissue by RT-PCR and fused it with the GAL4 DNA binding domain of pBIND-GAL4 plasmid to construct a chimera

Received: March 11, 2009; **Accepted:** May 14, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30873017), State Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2009CB526513).

Corresponding author: Baohua Zhao. Tel: +86-311-86268437; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com; z_zhihui2003@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No. 30873017), 国家基础研究发展规划项目(973 项目)(No. 2009CB526513)资助。

expression plasmid pBIND-GAL4-Era(LBD). The L02 cells was cotransfected with pBIND-GAL4-ER α (LBD) and a GAL4-responsive luciferase reporter plasmid pGL3-GAL4, and following treatment with test compounds for 24 h, the activities of luciferase were detected to evaluate the transactivities of ER α modulators. After manner optimizations of transfection conditions, Estradiol, an agonist control, induced the expression of luciferase in a dose-dependent with EC₅₀ of 0.17 μ mol/L, the maximum folds of induction was about 28.1. Tamoxifen, an antagonist control, efficiently suppressed the estradiol-mediated luciferase induction with EC₅₀ of 0.10 μ mol/L. Using this screening model, we discovered four ER α agonists from 2000 natural and synthetic compounds.

Keywords: ER α , agonist, antagonist, cotransfection, high-throughput screening

哺乳动物细胞单杂交技术(Mammalian one-hybrid)也称为 GAL4 嵌合受体基因检测方法(GAL4 chimera receptor assay), 该技术是近些年发展起来并主要应用于核受体(Nuclear receptor, NR)功能及其配体生理活性筛选和评价的一种新技术^[1,2]。该技术机理是利用了酵母细胞转录因子 GAL4 和哺乳细胞核受体的分子结构中都具有 2 个相似的主要结构域: 配体结合结构域(LBD)和 DNA 结合结构域(DBD), 将核受体的配体结合结构域(LBD)与酵母细胞转录因子 GAL4 的 DNA 结合结构域(DBD)融合成嵌合蛋白表达质粒, 再与含有 GAL4 特异响应元件的报告质粒共转染动物细胞, 通过测定报告基因的表达水平从而评价核受体配体的激动或拮抗活性。

雌激素受体 α (Estrogen receptor, ER α)是类固醇激素受体超家族成员之一^[3-5], 参与了对内分泌、心血管、肿瘤发生、生殖、骨代谢等多种生理功能的调节^[6-9], 并已经成为重要的药物研发靶点。由于 ER α 激动剂可以提高雌激素水平、降低骨代谢^[10]等, 可被用于绝经综合症、骨质疏松症^[11,12]等疾病的治疗; ER α 的拮抗剂由于可以调节雌激素水平、维持细胞正常的生理周期^[10]等, 可被用于乳腺癌^[13-15]、白血病等疾病的治疗。而且最近的研究表明 ER α 的配体还有希望成为冠心病、肥胖症^[16]、心脑血管疾病^[17]、神经系统疾病的治疗药物^[18]。

对 ER 深入的机理研究和相关疾病的药物研发依赖于新的配体调节剂的发现。为了发现和研究新的 ER α 调节剂, 本研究利用分子生物学建立了一个哺乳动物单杂交技术的报告基因 ER α 调节剂高通量筛选模型。本研究主要就该方法的建立、优化以及利用该方法进行筛选的结果进行报道。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种与细胞株

pGEM-T easy Vector、pBIND 购于 Promega 公

司, pGL3-GAL4 为本实验室构建; *E. coli* DH5 α 由本实验室保存; 3T3L1 细胞、HCT-15 细胞和 HeLa 细胞购自美国 ATCC; 人胚肝细胞株 L02 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 工具酶与主要试剂

Ex-Taq, DL2000 marker, λ -DNA Hind III marker, DNA Ligation Kit (TaKaRa); 限制性内切酶 BamH I、Kpn I, Luciferase Assay System (Promega); 胎牛血清, PRMI 1640 培养液(Hyclone); LipofectamineTM 2000 Reagent, SuperscriptTM Reverse Transcriptase (Invitrogen); 脂肪组织总 RNA (Clontech), Estradiol (E2, Sigma, 化学结构式见图 1A), Tamoxifen(扬子江药业集团有限公司, 化学结构式见图 1B)。

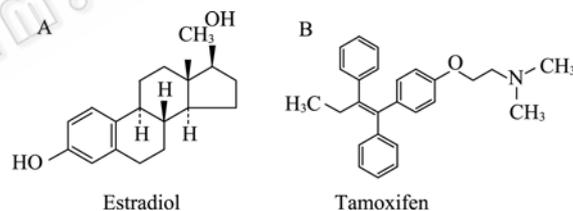


图 1 雌二醇与它莫西芬的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of estradiol and tamoxifen. (A) Estradiol. (B) Tamoxifen.

1.3 ER α LBD 片段的扩增

用 SuperscriptTM Reverse Transcriptase 试剂盒对脂肪组织总 RNA 进行反转录, 再以 cDNA 为模板进行 PCR, ER α LBD 基因的上游引物和下游引物分别为: 5'-AATGGATCCTATCTGCTGGAGACATGC-3', 5'-AATGGTACCTCAGACCGTGGGAAAC-3'。ER α LBD 片段 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 反应终止于 4 $^{\circ}$ C。

1.4 pBIND-ER α LBD 质粒的构建、转化和制备

将 ER α LBD PCR 产物与 pGEM-T easy Vector 连接、转化并鉴定, 后送上海生工测序。将序列正确的 pGEM-T easy Vector-ER α LBD 质粒进行 BamH I 和

Kpn I 双酶切, 酶切片段在保持读码框相同的情况下与 pBIND 上的 GAL4 DNA 结合域融合连接为 pBIND-GAL4-ER α (LBD) 嵌合表达载体。表达载体用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 进行双酶切鉴定。该质粒用 QIAGEN-tip 100 进行大量制备, 并通过检测 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值对质粒进行定性和定量。

1.5 细胞培养

细胞用含 10%胎牛血清, 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 PRMI 1640 培养基, 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.6 瞬时转染和报告基因检测

将待转染的细胞株以 3×10^5 个/mL 细胞数接种于 96 孔板, 24 h 后将培养液换成含 10%胎牛血清的无双抗的 PRMI 1640 培养基, 用 LipofectamineTM 2000 Reagent 将重组质粒 pBIND-ER α (LBD) 与含 5 个 GAL4 相应元件以及荧光素酶报告基因的 pGL3-GAL4 质粒^[19]共转染入细胞。6 h 后加入不同浓度的阳性药诱导刺激, DMSO 作为空白对照。给药 24 h 后加入细胞裂解液(EDTA, TritonX-100, Tris 等)裂解细胞 5 min 后, 加入反应液(EDTA、TritonX-100、Tris、ATP、ConA、Luciferase 等)迅速用 1420 Multilabel Counter 检测荧光素酶的表达活性。荧光素酶的表达诱导倍增数为加药组荧光素酶的活性与空白对照(DMSO)的比值。在常规的筛选中大于 2 倍的诱导倍增活性确定为阳性化合物。

1.7 Z'因子的计算

Z'因子是评价高通量筛选方法稳定性的一个重要参数^[20]。Z'因子值的范围在 0~1 之间。对细胞水平的筛选模型, 当 Z'因子大于 0.4 被认为该方法较稳定, 适用于高通量药物筛选。Z'因子计算公式如下: $Z' \text{ 因子} = 1 - (3 \times \text{加药孔 Luc 值的 SD} - 3 \times \text{空白对照孔 Luc 值的 SD}) / (\text{加药孔 Luc 平均值} - \text{空白对照孔 Luc 平均值})$ 。

2 结果

2.1 ER α LBD 的克隆

用 SuperscriptTM Reverse Transcriptase 试剂盒对脂肪组织的总 RNA(Clontech)进行反转录, 再以 cDNA 为模板进行 ER α LBD 基因的扩增, 电泳结果经 Kodak Digital Science 1D 定量软件分析得扩增片段大小约 950 bp(图 2), 与预期片段大小相符。

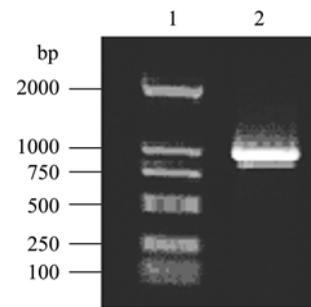


图 2 ER α LBD 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR product of ER α LBD fragment. 1: DL2000 marker; 2: PCR product of ER α LBD.

2.2 表达载体 pBind-ER α LBD 的构建

将 ER α LBD 基因的 PCR 产物电泳、割胶回收后与 pGEM-T easy Vector 连接, 并进行 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定得到 3 kb 和 950 bp 的片段(见图 3)。将酶切验证所得的阳性克隆送上海生工测序, 测序结果与 NCBI 报道的基因序列(Accession No. NM-001122742)一致。将经 *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切的 ER α LBD 片段与 pBind 载体连接, 构建表达载体 pBind-ER α LBD。双酶切验证结果见图 3。

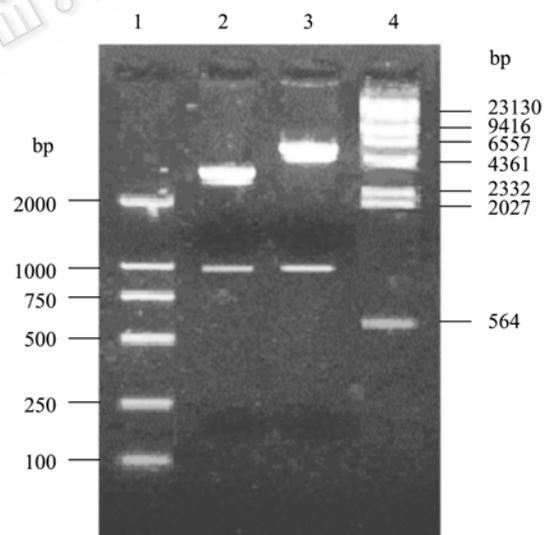


图 3 重组质粒的酶切分析

Fig. 3 Restriction enzymatic analysis for recombinant vector pGEM-T easy-ER α and pBind-ER α (LBD). 1: DL2000 marker; 2: pGEM-T easy-ER α (LBD)/*Kpn* I, *Bam*H I; 3: pBind-ER α (LBD)/*Kpn* I, *Bam*H I; 4: λ -DNA/*Hind* III marker.

2.3 模型优化

由于细胞共转染过程中有多种因素, 如脂质体的量、脂质体与 DNA 的比例、报告质粒与表达质粒的比例和宿主细胞等均影响转染的效率。本实验室在

其他的模型建立过程中已经针对 96 孔板中共转染的脂质体量, 质粒 DNA 总量等方面进行了优化^[21], 为了达到最高的信噪比和稳定性, 本研究在此基础上进行报告质粒 pGL3-GAL4 和表达质粒 pBind-ER α LBD 之间的比例及宿主细胞选择的优化。优化过程采用 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂雌二醇作为阳性药, 空白对照中加等量的 DMSO 作为阴性对照。

2.3.1 报告质粒与表达质粒比例优化

本研究首先固定了 96 孔板每孔脂质体 0.5 μL 、脂质体与 DNA 的比例为 5:3, 后将报告质粒与表达质粒的比例分别设定为 0.027 $\mu\text{g}/0.27 \mu\text{g}$ 、0.05 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{g}$ 、0.15 $\mu\text{g}/0.15 \mu\text{g}$ 、0.25 $\mu\text{g}/0.05 \mu\text{g}$ 、0.27 $\mu\text{g}/0.027 \mu\text{g}$ 和 0.28 $\mu\text{g}/0.02 \mu\text{g}$, 转染宿主为 3T3L1 细胞, 加药 24 h 后测定荧光素酶的活性。从结果(图 4)可以看出在该条件下, 报告质粒与表达质粒在 0.27 $\mu\text{g}/0.027 \mu\text{g}$ 时阳性药对荧光素酶的诱导活性倍增数最高, 约 18.3 \pm 2.1 倍, 所以本模型在转染时报告质粒与表达质粒分别确定为 0.27 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 和 0.027 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 。

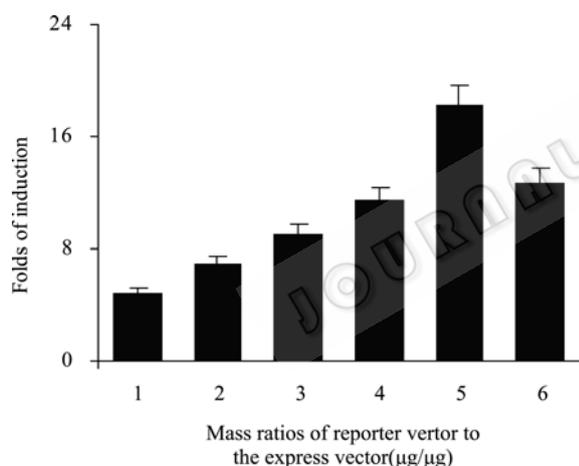


图 4 不同质粒比对转染效率的影响

Fig. 4 Effects of different mass ratios of the reporter vector to the expression vector on transfection efficiency. 1: 0.027/0.27; 2: 0.05/0.25; 3: 0.15/0.15; 4: 0.25/0.05; 5: 0.27/0.027; 6: 0.28/0.02.

2.3.2 转染宿主优选

由于不同的细胞株对转染效率影响很大, 为了达到最佳的转染效果, 本模型在以上 96 孔板优化条件的基础上分别利用 HCT-15、3T3L1、L02 以及 HeLa 4 个细胞株进行宿主的优选, 结果见图 5。4 个细胞株在该转染条件下有一定的差异。其中人体胚胎肝细胞 L02 细胞系中诱导表达倍增数最高(23 \pm 2.6

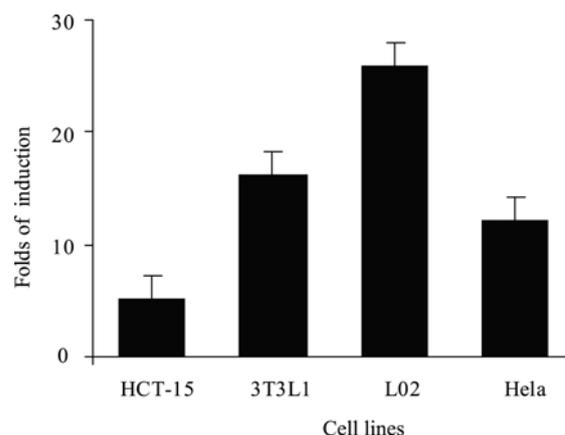


图 5 四种宿主细胞的转染效率比较

Fig. 5 Effects of different cell lines on transfection efficiency.

倍), 3T3L1 细胞系(15.1 \pm 2.4 倍)与 HeLa 细胞系(12.2 \pm 2.2 倍)次之, HCT-15 细胞系(5.0 \pm 2.8 倍)最低。因此选用 L02 细胞系作为转染宿主。此外以正常的肝胚细胞 L02 作为宿主还可以在活性筛选的同时完成对化合物细胞毒性的初步评价。

2.4 模型评价

本研究利用激动剂阳性药对照雌二醇和拮抗剂阳性药对照它莫昔芬进行模型的灵敏度与稳定性的验证。利用 96 孔板经过优化的转染条件: 0.5 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的脂质体、0.27 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 报告质粒与 0.027 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 表达质粒共转染 L02 细胞。雌二醇浓度分别选取 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 、0.06 $\mu\text{mol/L}$ 、0.18 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 。处理细胞 24 h 后进行活性测定, 结果见图 6A, 荧光素酶的活性与雌二醇的浓度呈剂量依赖关系, 最高诱导倍增数为(28.1 \pm 2.5)倍, EC_{50} 为 0.17 $\mu\text{mol/L}$ 。通过多次活性测定的结果证明该筛选模型的 Z' 因子大于 0.62。在进行拮抗剂筛选验证时将 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂阳性雌二醇与不同浓度的拮抗剂阳性对照及 DMSO 同时加入细胞培养液中, 它莫昔芬浓度分别为 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.03 $\mu\text{mol/L}$ 、0.10 $\mu\text{mol/L}$ 、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$, 24 h 后进行活性测定, 结果见图 6B。拮抗剂阳性药它莫昔芬能剂量依赖地拮抗雌二醇的激动活性, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度时拮抗效果最好, 下调倍数为(6.3 \pm 1.5)倍, EC_{50} 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, Z' 因子为 0.54。

2.5 模型的微量研究

为了进一步验证模型的稳定性和提高筛选效率并降低筛选成本, 本研究在 96 孔板的基础上还进行了模型的 384 孔板和 1/2 面积 96 孔板激动剂模型筛

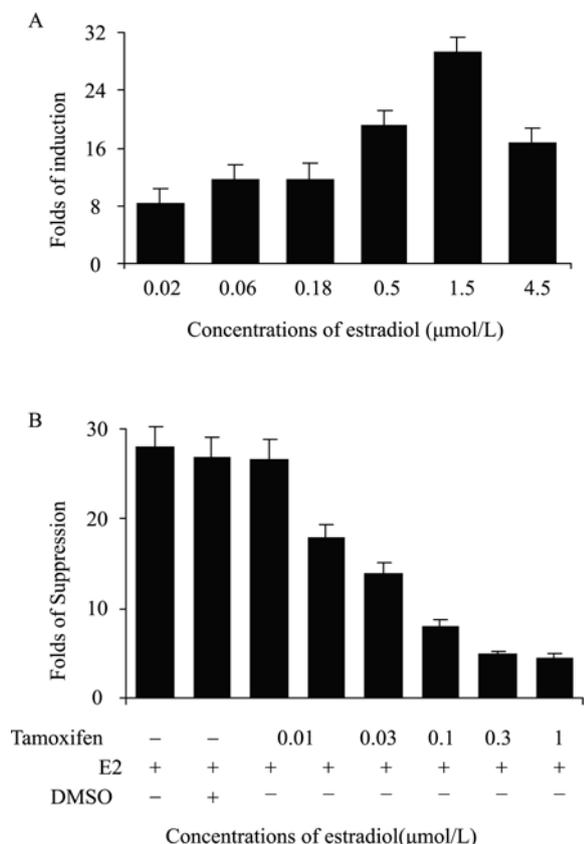


图 6 激动剂雌二醇与拮抗剂它莫西芬对 ERα 的转录调节活性
 Fig. 6 Effects of estradiol (agonist) and tamoxifen (antagonist) drugs on transactivities of ERα. (A) Estradiol. (B) Tamoxifen.

选微量试验。利用以上优化好的条件(0.5 μL/孔的脂质体、0.27 μg/孔报告质粒、0.027 μg/孔表达质粒、共转入 L02 细胞、1.5 μmol/L 激动剂阳性雌二醇刺激), 按照脂质体、报告质粒、表达质粒与细胞培养板孔径面积等比减少的方式, 对该模型进行微量试验(图 7)。1.5 μmol/L 激动剂雌二醇阳性药在 384 孔板对荧光素酶的活性可以达到(12.3±2.4)倍的诱导活性, 在 1/2 面积 96 孔板可以达到(16.2±2.1)倍的诱导活性, Z' 因子值分别为 0.52 和 0.46。

2.6 模型筛选

本研究利用 96 孔板, 以 1.5 μmol/L 的雌二醇(E2) 作为阳性对照, 对华北制药集团所拥有的 2000 多个来源于微生物、植物以及化学合成的单体化合物进行了筛选, 从中筛选得到 4 个 ERα 激动剂, 分别为 Genistein、3',4',5',7'-tetrahydroxy-8-methoxy isoflavone、Cyclophenol 和 Questin, 其结构见图 8。可见 4 个化合物在不同浓度下(0.1~45 μmol/L)对 ER 激动活性见图 9, 它们的最大活性诱导倍增数分别为 10.1、

6.2、3.7、4.1 倍, EC₅₀ 值分别为 0.7、0.7、1.2、0.8 μmol/L。

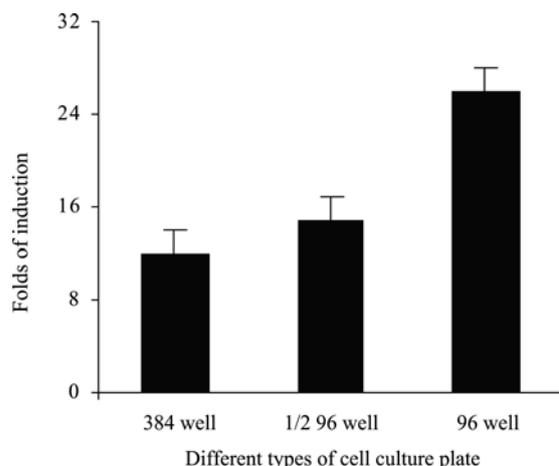


图 7 模型筛选微量化结果
 Fig. 7 Results of miniaturization of HTS assays.

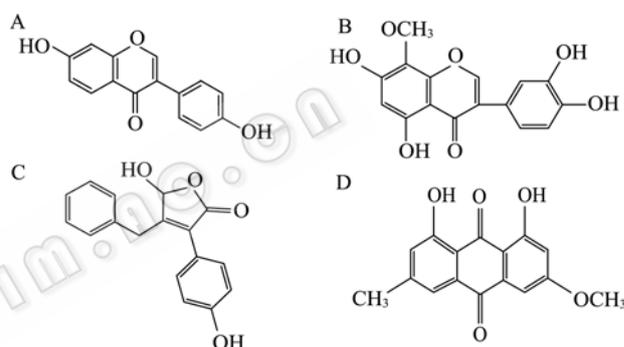


图 8 筛选得到 ERα 激动剂的化合物结构
 Fig. 8 Chemical structures of ERα agonists screened in the study. 1: genistein; 3: cyclophenol; 4: questin; 2: 3',4',5',7'-tetrahydroxy-8-methoxy isoflavone.

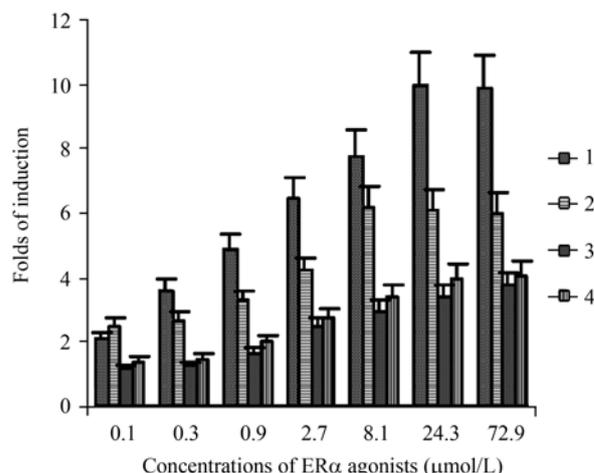


图 9 活性化合物对 ERα 的转录激活效应
 Fig. 9 Transactivities of active compounds on ERα. 1: genistein; 3: cyclophenol; 4: questin; 2: 3',4',5',7'-tetrahydroxy-8-methoxy isoflavone.

3 讨论

哺乳动物单杂交技术是将核受体的配体结合结构域(LBD)与酵母细胞转录 GAL4 的 DNA 结合结构域(DBD)融合成嵌合蛋白表达质粒, 再与含有 GAL4 特异响应元件的报告质粒共转染入哺乳动物细胞中, 通过配体刺激下游报告基因的表达定量测定报告基因的表达水平, 从而评价核受体配体的调节活性。相对于另外一种目前被广泛使用的利用 ER 响应元件(ER response element, ERE)的报告基因筛选方法^[21], 该方法是在哺乳动物细胞中利用了酵母 GAL4 转录因子的调控机制, 而由于哺乳动物细胞中没有 GAL4 的调控体系, 所以报告基因只能被外源的嵌合受体激活, 不存在内源性核受体之间的相互干扰和交叉效应的问题, 筛选体系本身具有低本底、高信号的突出优点^[2], 该方法更适用于进行特异性强的核受体配体调节剂的筛选。

本研究通过质粒构建以及多种转染条件的优化, 使激动剂和拮抗剂的阳性对照药在该模型上具有很好的剂量依赖关系和较低 EC₅₀, 说明该方法具有较好的灵敏性。Z' 因子是评价高通量筛选方法稳定性的一个重要参数^[20]。在细胞水平的筛选模型中, 当 Z' 因子大于 0.4 被认为是方法较稳定, 适用于高通量药物筛选。本研究的筛选模型 Z' 因子大于该标准, 说明该模型具有较好的稳定性。另外, 本方法还可以微量化到 384 孔板, 可进一步满足高通量筛选中增加筛选通量和节约成本的要求。

利用构建的模型对本室保存的 2000 多个来源于微生物、植物的天然产物以及化学合成化合物进行了筛选, 得到了 4 个激动剂活性化合物。其中大豆异黄酮 Genistein 作为 ER α 的激动剂对于癌症、心血管疾病、骨质疏松症的预防和治疗作用在许多文献中都已报道^[22,23], 这说明了本筛选模型有足够的灵敏度。化合物 3',4',5',7'-tetrahydroxy-8-methoxy isoflavone^[24]、Cyclophenol^[25]和 Questin 均为微生物次生代谢产物, 作为雌激素受体激动剂的活性为首次发现。将进一步对这些化合物的深入评价和药理药效学研究。

REFERENCES

[1] Webster NJ, Green S, Jin JR, *et al.* The hormone-binding

domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*, 1988, **54**: 199–207.

- [2] Lehmann JM, Moore LB, Smith OTA, *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, **270**: 12953–12956.
- [3] Green S, Walter P, Kumar V, *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to verb-A. *Nature*, 2003, **20** (13): 134–139.
- [4] Chen F, Gideon AR, Azi S. Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update*, 2000, **6**: 225–236.
- [5] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1997, **138** (3): 863–870.
- [6] Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, *et al.* Expression levels of estrogen receptor- α , estrogen receptor- β , coactivators and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**: 512–518.
- [7] Julie MH, Donald PM. The estrogen receptor β -isoform (ER- β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, 1999, **140**: 5566–5578.
- [8] Bakas P, Liapis A, Vlahopoulos S, *et al.* Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness. *Fertil Steril*, 2007, **90**(5): 1878–1885.
- [9] Matthew H, Hery NK, Suzanne AW, *et al.* Receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*, 2004, **25**(6): 869–898.
- [10] Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 2005, **19**(4): 833–842.
- [11] Matthew RS, Macct D, Phii D. Selective estrogen receptor modulators to prevent treatment-related osteoporosis. *Urology*, 2005, **7**(3): S30–S35.
- [12] Gao F, Du N. Estrogen receptor and osteoarthritis. *Med Ref*, 2008, **14**(1): 33–34.
- [13] Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol*, 2001, **11**(5): 339–852.
- [14] Cullen R, Maguire TM, Mcdermott EW, *et al.* Studies on estrogen receptor-alpha and-beta mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer*, 2001, **37** (9): 118–122.
- [15] Kodama M, Kodama T. A new trend of breast cancer research in the genome era. *Inter J Mol Med*, 2001, **8**(3): 291–302.
- [16] Pedersen SB, Bruun JM, Hube F, *et al.* Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue: Influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, **182**(1): 27–37.
- [17] Thresia T, Michael AG. Estrogen receptors as targets for

- drug development for breast cancer, osteoporosis and cardiovascular diseases. *Curr Cancer Drug Tar*, 2004, 4: 483-499.
- [18] Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 2006, 116(3): 561-570.
- [19] Zheng ZH, Lv GP, Si SY, *et al.* A cell-based high-throughput screening model for farnesoid X receptor agonists. *Biomedical Environ Sci*, 2007, (20): 465-469.
- [20] Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Sci*, 1999, 4: 67-73.
- [21] White JH, Mccuaig KA, Mader S. A simple and sensitive high-throughput assay for steroid agonists and antagonists. *Biotechnology*, 1994, 12: 1003-1007.
- [22] Tan TT, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: Mechanisms for activating cell death in cancer cells. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 615: 81-104.
- [23] Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone contents in commercial soybean foods. *J Agr Food Chem*, 1994, 42(8): 1666-1673.
- [24] Liao XL, Kretzner L, Seraphin B, *et al.* Universally conserved and yeast-specific U1 snRNA sequences are important but not essential for U1 snRNP function. *Gene Dev*, 1990, 4(10): 1766-1774.
- [25] Simone R, Joanne F, Simon O, *et al.* A novel asphalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*. *J Antibiot*, 2005, 58: 279-283.



快 讯

中国科研论文数量 9 年翻 3 倍

追求“质大于量”，是中国科技界近年来不断奋斗的目标。根据《自然中国》网站提供的一项数据分析显示，今年上半年，中国在国际顶级学术期刊上发表的论文已达到 25 篇，超过 2008 年全年发表的总数——今年具备重大影响力的中国科研论文数量有望翻倍。

《自然中国》是英国《自然》杂志出版集团 2007 年创建的一个致力聚焦中国大陆和香港高质量科学研究的网站。主编张文浩根据“研究亮点”（为论文撰写的摘要）的流行程度进行排名。

他统计了在 5 本国际顶级学术期刊——《自然》、《科学》、《细胞》、《柳叶刀》及《新英格兰医学期刊》——上发表过的中国主要研究论文（论文的通讯作者和一半以上的作者是内地的学者），发现从 2000 年到 2008 年的 9 年时间内，中国科研论文发表数量已经翻了 3 倍，2008 年达到 21 篇。

2006 年我国发表的科技论文数量已经超日赶美，跃居为世界第二大科技论文出口国，今年在质量上又有了明显提高。张文浩说，预计 2009 年具备重大影响力的中国科研论文数量将较 2008 年翻倍。

根据《自然中国》网站提供的一项数据分析显示，国际社会对中国的材料科学、食物营养学、生态学以及传统中医药的研究最感兴趣。统计结果显示，最受关注的学科是材料科学，在 2007 年和 2008 年度中，在影响最大的前十篇论文中都占有 3 个席位。张文浩解释，这说明中国在材料学研究中具备雄厚的实力，而且研究的成果正在吸引世界的目光。第二受关注的学科是食物营养学，在 2008 年度十大论文中占据首席。生态学及传统中医药的研究也依旧受到国际社会关注。

来源：文汇报

2009-06-25