

猪 *ESRRB* 启动子克隆及其调控活性检测

杨藩¹, 王亚娴¹, 杜丽霞², 王华岩¹

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学创新实验学院, 陕西 杨凌 712100

杨藩, 王亚娴, 杜丽霞, 等. 猪 *ESRRB* 启动子克隆及其调控活性检测. 生物工程学报, 2015, 31(4): 491–500.

Yang F, Wang YX, Du LX, et al. Cloning and regulation of pig estrogen related receptor β gene (*ESRRB*) promoter. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 491–500.

摘要: *Esrrb* (Estrogen related receptor β) 属于雌激素受体家族, 是一类在胚胎早期外胚层细胞中表达并对干细胞多能性维持起重要作用的基因。为了探索猪 *ESRRB* 的表达和转录调控机制, 克隆了 3.3 kb *ESRRB* 启动子片段, 构建了相应的报告载体。并将报告载体分别转染 293T 人胚肾细胞、Hela 人宫颈癌细胞和小鼠 C2C12 成肌细胞。通过 TFSEARCH 和 JASPER 方法对 *ESRRB* 启动子潜在的转录调控位点进行分析, 发现该启动子上有 SMAD、STAT3、MYC、KLF4 等多能转录因子的结合位点。将相应的转录因子与 *ESRRB* 启动子共转染, 并检测报告基因荧光素酶的活性。结果显示猪 *ESRRB* 启动子具有明显的组织特异性调控, 同时 SMAD 对 *ESRRB* 启动子活性有较明显的调控作用。进一步对 3.3 kb 片段进行了一系列的缺失, 发现猪 *ESRRB* 核心区域位于 5'上游的 -25 bp 和 -269 bp 之间。研究结果表明猪 *ESRRB* 启动子上潜在的转录因子结合位点及启动子核心区域是参与调控 *ESRRB* 表达的重要序列。

关键词: 猪, 雌激素相关受体, 启动子, 多能干细胞, 转录调控

Received: July 14, 2014; **Accepted:** October 27, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31371505), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA01002).

Corresponding author: Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

国家自然科学基金 (No. 31371505), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA01002) 资助。

Cloning and regulation of pig estrogen related receptor β gene (*ESRRB*) promoter

Fan Yang¹, Yaxian Wang¹, Lixia Du², and Huayan Wang¹

¹ Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Innovation Experimental College, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: The estrogen related receptor family member *Esrrb* (Estrogen related receptor β) is a gene that expresses in the early stage of embryo and plays an important role in the core pluripotent network. Its function has been analyzed in human and mouse, although no report so far related to pig. Therefore, to explore its mechanism of transcriptional regulation and expression pattern, we cloned a 3.3 kb pig *ESRRB* promoter by PCR and constructed the green fluorescence protein (GFP) reporter vector pE3.3. We used these vectors to study the *ESRRB* expression pattern in 293T, Hela and C2C12. Sequence was analyzed for regulatory elements that share homology to known transcription factor binding sites by TFSEARCH and JASPER program. Some pluripotency related genes such as SMAD, STAT3, MYC, KLF4 and *ESRRB* have been found within the 3.3 kb sequence by co-transfected pig *ESRRB* promoter and these potential regulators. We found that *ESRRB* only expressed in 293T and SMAD could activate *ESRRB* expression obviously. To determine the core promoter region, a series of *ESRRB* promoter fragments with gradually truncated 5'-end were produced by PCR and inserted into pGL3-Basic vector. After transient transfection into 293T, dual luciferase assay was used to measure these promoter activities. The result suggested that the core promoter of pig *ESRRB* located within -25 bp to -269 bp region. These results suggest that these transcription factor binding sites and the core promoter region may be essential for transcriptional regulation of pig *ESRRB* gene.

Keywords: pig, *Esrrb*, promoter, pluripotent cells, transcriptional regulation

多能干细胞的自我更新需要相关信号通路和各种转录因子调控来维持,其中 ERK、GSK、LIF 等通路和 Oct4、Sox2、Nanog 等因子,在其中起着关键作用^[1]。目前,小鼠胚胎干细胞 (ESCs) 可以在添加 2i/LiF 的培养基中稳定传代^[2],其中 2i 通过抑制 ERK 和 GSK3 通路发挥维持 ESCs 自我更新和多能性的作用。GSK3 通过 β -catenin 对许多基因起着负调控的作用,这其中就包括 c-Myc^[3-4]。同时,遗传分析表明 β -catenin 通过 Tcf3 协同作用负调控 ESCs 的自我更新^[5]。为了明确 Tcf3 的下游靶基因,Simth 研究团队敲除了干细胞的 *Tcf3* 基因,并结合 Tcf3 的调控位点发现雌激素相关受体 β (*Esrrb*)是 Tcf3 的下游靶

基因,对干细胞自我更新的维持起着重要的作用^[6]。Chambers 研究团队在分析 Nanog 的下游靶基因时发现,Nanog 可以激活 *Esrrb* 的表达并维持干细胞的自我更新^[7]。同时,*Esrrb* 或者 Nanog 的过表达可以在不添加 LIF 的条件下维持干细胞的自我更新。

雌激素相关受体 (Estrogen related receptor) 属于核受体家族。目前已发现 3 种亚型,即 *Esrra*^[8]、*Esrrb*^[8]、*Esrrg*^[9]。雌激素受体基因包含有相对保守的结构区域:配体结合域 (LBD) 和 DNA 结合域 (DBD)^[8,10]。该家族基因可以不经过相应激素配体的刺激而直接入核并调控基因的表达。相对于 *Esrra* 和 *Esrrg*,*Esrrb* 的时空表达特

异性较高。*Esrrb* 在小鼠胚胎发育到 5.5 d 时出现,并随着胚胎的进一步发育而逐渐消失,其缺失会导致胚胎发育不正常^[11-12]。因此,开展对该基因启动子的研究,有助于揭示多能干细胞的自我更新维持和多向分化能力的调控机制。本研究为揭示猪 *ESRRB* 基因在分子调控机理,分子克隆了启动子片段,并对启动子上的调控位点进行了系统分析,通过对猪 *ESRRB* 启动子缺失,用双荧光素酶表达载体验证了潜在转录因子对 *ESRRB* 的调控。本研究为进一步探索 *ESRRB* 对猪多能干细胞自我更新的维持和调控机理奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、载体和细胞

感受态大肠杆菌 DH5 α 、质粒 pEGFP-1、pEGFP-C1、pGL3-Basic、pMX-OCT4、pMX-CMYC、pCDNA-LIF、pEGFPC1-SMAD2、pEGFPC1-SMAD3、pEGFPC1-SMAD7、人胚肾细胞 (293T)、人宫颈癌细胞 (Hela)、小鼠成肌细胞 (C2C12) 和猪胎儿成纤维细胞 (PEF) 由陕西省干细胞工程技术研究中心保存。载体 pGEM-T Easy 及荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 均购自 Promega 公司。猪各组织器官采集于陕西万盛肉类加工有限公司的屠宰场。

1.2 试剂及耗材

总 RNA 提取试剂盒、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA marker 均购自天根公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒和 *Taq* 聚合酶均购自 Fermentas 公司;高保真 DNA 聚合 (PhantaTM HS Super-Fidelity DNA Polymerase) 购自 Vazyme 公

司;定量 PCR Mix (Power 2xSYBR Real-time PCR Premixture) 购自于 Biotek 公司;脂质体 (Lipofectamine 2 000)、Opti-MEM 和 DMEM 培养基均购自 Invitrogen 公司;非必需氨基酸 (NEAA)、L-谷氨酰胺 (L-Glu)、 β -巯基乙醇 (β -ME) 购自 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司;PCR 引物由华大基因科技服务有限公司合成。

1.3 *ESRRB* 启动子的克隆与载体构建

参照血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根公司),从 PEF 细胞中提取猪基因组 DNA。从 UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) 网站下载猪 *ESRRB* 的 5'上游序列,设计带有酶切位点 *Hind* III 和 *Xho* I 的启动子上下游引物,并扩增 3.3 kb 启动子片段。产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收,并与 pGEM-T Easy 载体连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中。挑取阳性克隆提取质粒,经限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 双酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒送华大生物工程有限公司测序。测序正确的质粒通过 *Hind* III 和 *Xho* I 与 pEGFP-1 和 pGL3-Basic 连接,并分别命名为 pE3.3 和 pL3.3。以 pE3.3 为模板,分别设计带有酶切位点 *Xho* I 和 *Hind* III 的上下游引物,扩增 2 093 bp、1 503 bp、876 bp、575 bp 和 308 bp 的启动子片段,亚克隆到 pGL3-Basic 报告载体中,分别命名为 pL2.0、pL1.5、pL0.8、pL0.5 和 pL0.3。引物序列见表 1。

1.4 细胞培养与转染

293T、Hela 和 C2C12 细胞用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、含有 5% CO₂ 的细胞培养箱内培养。按照 Lipofectine 2 000 使用说明书,首先将 pE3.3 启动子分别转入 293T、Hela 和 C2C12 细胞,转染后 48 h 在荧

表 1 引物序列表

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
F3.3 F/R	F-CCGCTCGAGACCTGGAAAACACGGGAA R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	3 307
F2.0 F/R	F-CCGCTCGAGCTCGGCACCTGGAGAAAC R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	2 093
F1.5 F/R	F-CCGCTCGAGTGGCAGGTAAGTTCCTTGTTGTA R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	1 503
F0.8 F/R	F-CCGCTCGAGAGCCACAGCCACAGCAACTC R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	876
F0.5 F/R	F-CCGCTCGAGGAGTCTTCCACCCCTGAGTCC R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	575
F0.3 F/R	F-CCGCTCGAGTAGGGTTAGTGGGCTCCAAGTC R-CCCAAGCTTGGTAGCCGAGAGGGTCCG	308
qGAPDH F/R	F-GCAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R-TCCTGGAAGATGGTGATGGCCTTT	160
qESRRB F/R	F-AGGGAGCTCGTGGTCATCAT R-CCCCAGAGAGAGGTTGGAGAA	62

光显微镜下观察绿色荧光。同时,将 293T 细胞按 2.4×10^4 /孔接种于 48 孔培养板中,待细胞完全贴壁覆盖率至 50%–60%时,将 pL3.3、pL2.0、pL1.5、pL0.8、pL0.5 和 pL0.3 等启动子荧光报告载体 (500 ng) 和 pCMV-Renilla 表达载体 (20 ng) 共同转入细胞,48 h 后收集细胞并进行荧光素酶活性检测。每个启动子做 3 次独立实验,每次 3 个重复。

1.5 荧光定量 PCR

按照总 RNA 提取试剂盒说明书 (天根公司) 提取组织总 RNA,按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 相关说明进行反转录获得 cDNA,并设计 qESRRB 和 qGAPDH 引物。荧光定量 PCR 反应体系如下:2×SYBR Green Mix 10 μL,25 mmol/L dNTPs 1 μL,上、下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L),模板 cDNA 1 μL,去离

子水 7 μL,共 20 μL。每个样本设 3 个重复。反应条件为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1。

1.6 统计学分析

所有数据均用平均值±标准偏差表示,并经双尾 *t*-test 检验差异是否具有统计学意义。*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 猪 ESRRB 启动子克隆及生物学分析

本研究从猪的基因组中克隆获得了 3 307 bp 的 ESRRB 基因 5'端上游片段 (图 1A)。用生物信息学的方法发现序列上存在很多与多能性转录因子结合的位点,如:KLF4、MYC、SMAD 和 STAT3 等 (图 1B)。但是在转录起始位点上游缺乏经典的 TATA-box (TATAAA)。

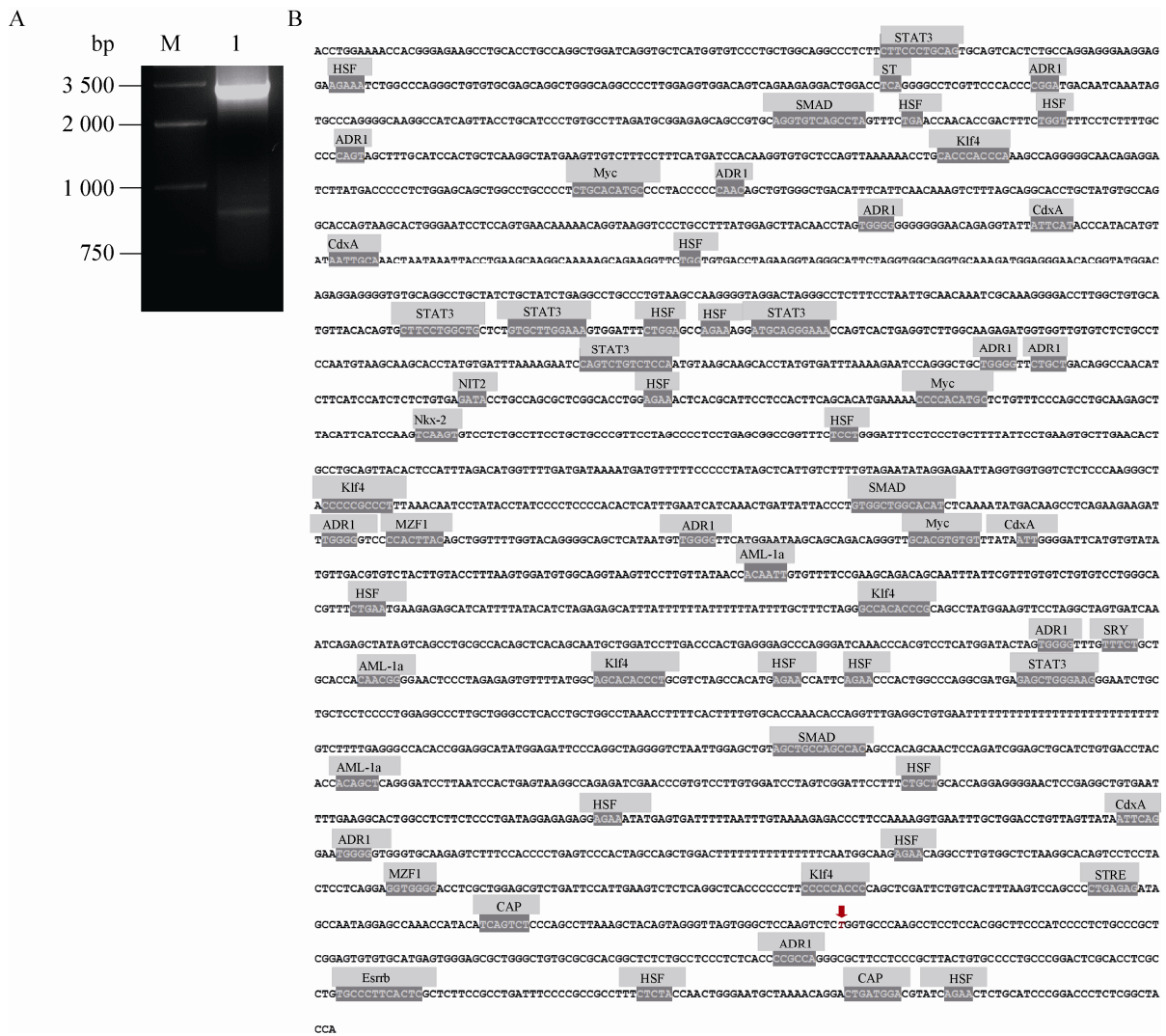


图 1 *ESRRB* 3 kb 启动子克隆及生物信息学分析

Fig. 1 *ESRRB* promoter clone and potential regulatory sequences prediction. (A) PCR amplification of 3.3 kb *ESRRB* promoter. M: DNA marker IV; 1: 3 307 bp *ESRRB* promoter. (B) Prediction of the 3.3 kb *ESRRB* promoter potential regulatory sequence. The transcription start site (TSS) is highlighted by red colour.

2.2 多能性相关基因对 *ESRRB* 调控分析

通过在线启动子分析软件 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 分析猪 *ESRRB* 启动子, 发现 KLF4 (-2 582, -1 488, -1 059, -860, -591, -123); MYC (-1 759, -1 288); STAT3 (-2 944, -2 067, -2 052, -1 316, -801)和 SMAD

(-2 723, -1 924, -1 414, -599) 等的可能结合位点。但是, 未发现 OCT4 和 SOX2 的结合位点 (图 2A)。通过将构建好的 pL3.3 分别与 pMX-CMYC、pCDNA-LIF、pEGFPC1-SMAD2、pEGFPC1-SMAD3 和 pEGFPC1-SMAD2+pEGFPC1-SMAD3 共转染 293T 细胞, 发现这些

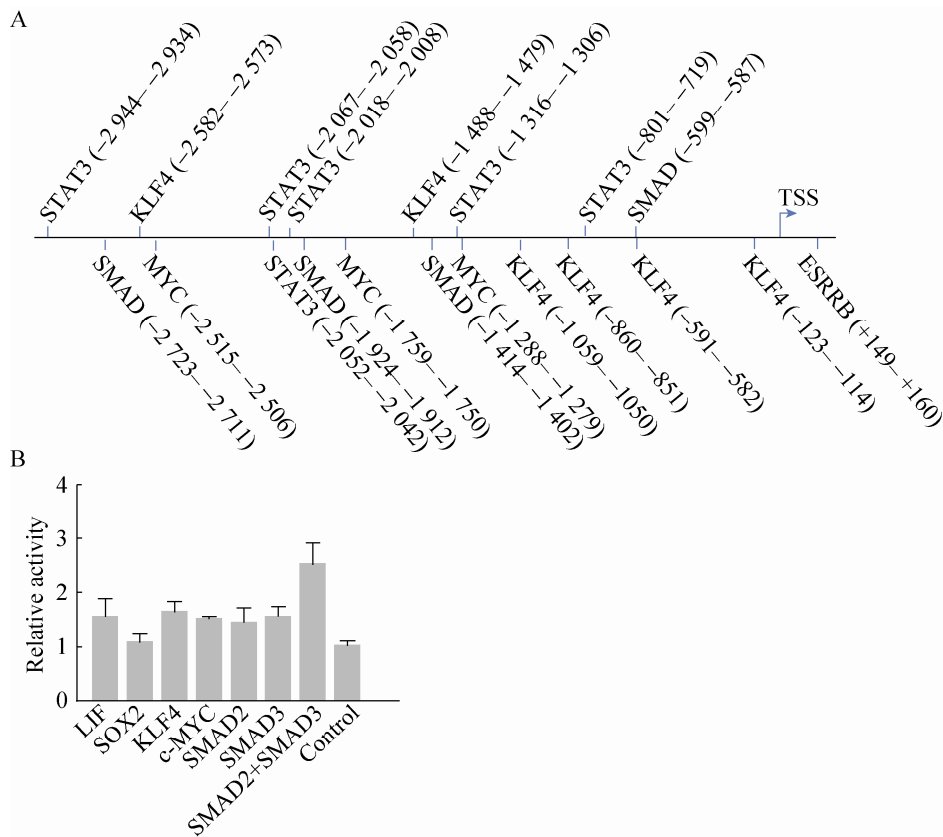


图 2 多能性基因对猪 *ESRRB* 启动子的调控

Fig. 2 Pluripotency related gene regulation on *ESRRB*. (A) Prediction of pluripotency related gene binding sites on the 3.3 kb pig *ESRRB* promoter. (B) Pluripotency related gene regulation on *ESRRB* promoter confirmed by dual luciferase assay.

因子都能一定程度地激活 *ESRRB* 启动子，其中 SMAD2 + SMAD3 的作用最为明显，是只加入 pL3.3 的对照组的 2.7 倍 (图 2B)。因为没有 SOX2 的结合位点，pEGFP-SOX2 并未提高 *ESRRB* 的表达水平。

2.3 猪 *ESRRB* 组织特异性表达检测

通过实时定量 PCR 对胸腺、脂肪、皮肤、肌肉、心脏、肝脏、脑、睾丸、卵巢、脾脏、肾脏和猪成纤维细胞中 *ESRRB* 的表达情况进行了测定。结果显示 *ESRRB* 在肾脏表达最高，在与生殖相关的组织如睾丸卵巢中也有表达。而

在脂肪、皮肤和肌肉等组织中的表达较低 (图 3A)。这个结果与人和鼠的报道相似^[13-14]。对携带 3.3 kb *ESRRB* 启动子片段的 pE3.3 进行 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切鉴定，结果表明插入片段正确 (图 3B)。将 pE3.3 报告载体分别转入 C2C12、Hela 和 293T 细胞，48 h 后在荧光显微镜下观察细胞表达 GFP 情况。结果显示，在 293T 细胞中有 GFP 的表达，而在 C2C12 与 Hela 细胞中没有 GFP 的表达 (图 3C)。这一结果印证了 *ESRRB* 启动子在肾脏细胞中的高表达特性 (图 3A)。

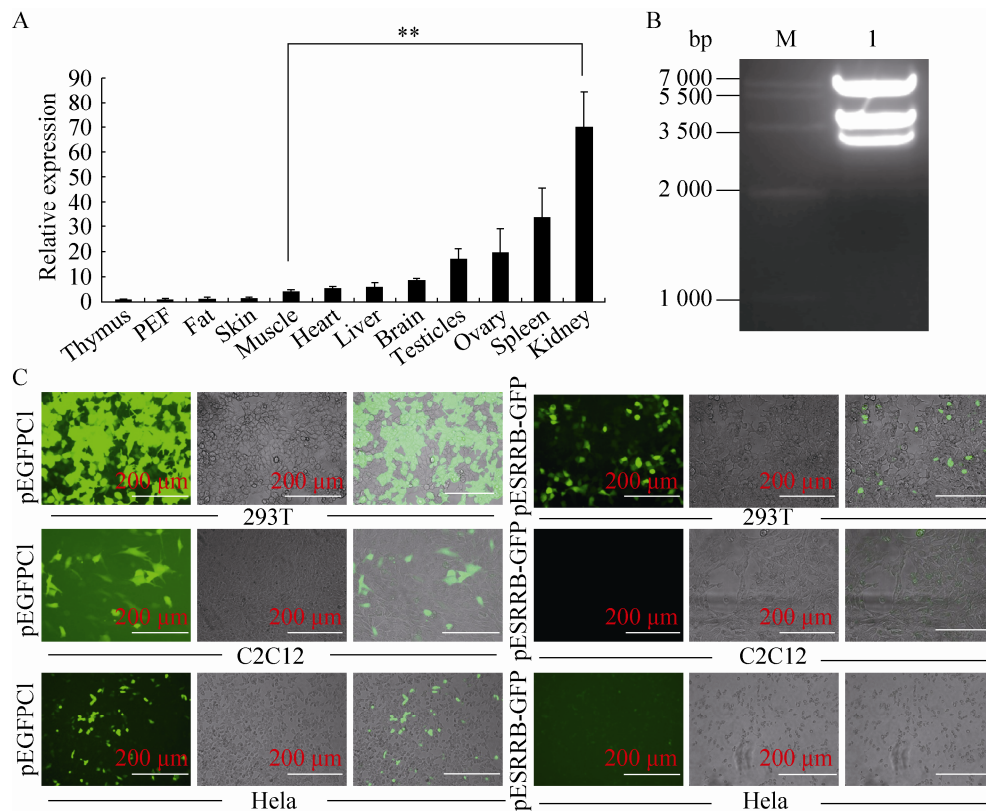


图3 定量检测 *ESRRB* 的组织特异性表达

Fig. 3 *ESRRB* tissues expression pattern analysis and the activation of promoter-directed vector pE3.3 in 293T, HeLa and C2C12 cells. (A) Pig *ESRRB* tissues expression pattern. Fold difference was calculated with respect to thymus. Bars represent the means standard errors of three independent experiments. $**P < 0.01$. (B) Identification of recombinant plasmid pE3.3 with *Xho* I and *Hind* III digestion. M= DNA marker IV; 1: 3 307 bp. (C) 293T, HeLa and C2C12 cells were transfected with pE3.3 constructs. Scale bars=200 μ m.

2.4 构建 *ESRRB* 启动子片段缺失载体

以重组质粒 pE3.3 为模板用不同的引物对 *ESRRB* 启动子 5'端上游序列进行缺失, 获得 2 093 bp、1 503 bp、876 bp、575 bp 和 308 bp 等片段, 经琼脂糖凝胶电泳分析验证, PCR 扩增产物与预期片段大小相符(图 4A)。分别将这些片段插入到 pGL3-basic 质粒, 构建 pL2.0、pL1.5、pL0.8、pL0.5 和 pL0.3 报告载体, 并经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定 (图 4B)。检测结果表明酶切目的片段大小与预期吻合, 载体构建正确。

2.5 筛选猪 *ESRRB* 启动子核心调控区

将携带不同启动子片段的质粒 pL3.3、

pL2.0、pL1.5、pL0.8、pL0.5 和 pL0.3 等, 瞬时转染 293T 细胞 48 h 后, 对报告基因荧光素酶活性进行检测。结果显示, pL0.3 没有启动子活性, 而 pL0.5 的启动子活性与对照组相比提高了约 50 倍。pL0.5 相比于 pL0.3 多出了 -269 bp 至 -25 bp 之间的序列, 表明该段序列存在一个正调控域是该启动子的核心调控区域。进一步测定显示 pL0.8、pL1.5、pL2.0 和 pL3.3 的活性比 pL0.5 的又提高了近 70%, 说明在启动子 -0.5 至 -0.8 bp 之间的序列, 还存在一个正调控域 (图 5)。这两个调控域的调控元件和生物学功能还有待进一步探索研究。

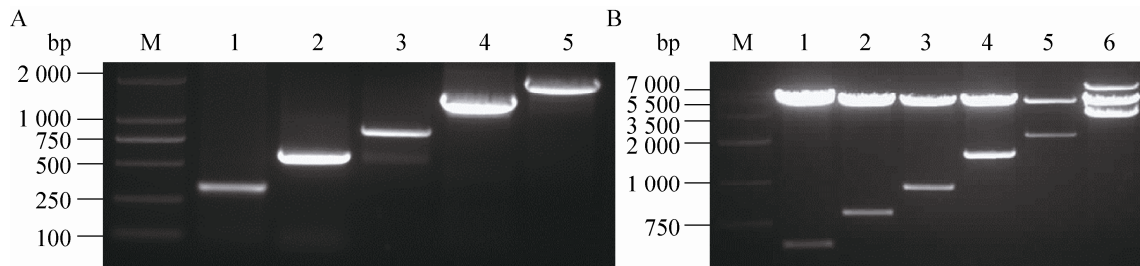


图4 *ESRRB* 启动子的 PCR 缺失及相应的荧光素酶报告载体构建

Fig. 4 PCR amplification of various length deletion fragments of *ESRRB* promoter (A) and identification of recombinant plasmids with deleted fragments (B). M: DNA marker; 1: 308 bp; 2: 575 bp; 3: 876 bp; 4: 1 503 bp; 5: 2 093 bp; 6: full length *ESRRB* promoter.

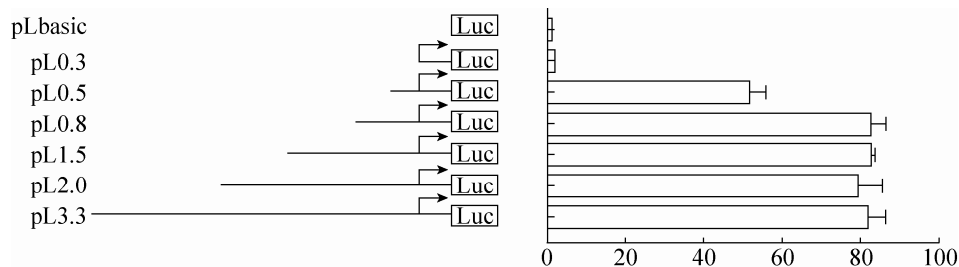


图5 猪 *ESRRB* 不同长度启动子的活性检测

Fig. 5 Results of *ESRRB* promoter fragments analysed by dual-luciferase reporter system in 293T cells. The pGL3-basic (pLbasic) was used as control.

3 讨论

雌激素家族相关受体基因 β 是维持 ESCs 自我更新的重要转录因子，抑制其表达会直接导致 ESCs 的分化^[15]。研究发现 *Esrrb* 能够与其他多能转录因子相互作用，在 ESCs 中与 Oct4、Sox2、Nanog 和 Klf4 拥有共同的结合位点^[16]；同时，*Esrrb* 启动子上存在 Oct4、Nanog 和 Tcf3 的结合位点^[6]。本研究克隆了猪 *ESRRB* 启动子，经生物信息学分析表明启动子上存在潜在的 *LIF*、*KLF4*、*MYC* 和 *SMAD* 的结合位点。通过双荧光素酶报告载体实验发现，这些转录因子都能够一定程度地激活猪 *ESRRB* 启动子活性。

其中 *SMAD2/3* 的效果最为显著。*SMAD2/3* 所介导的信号通路 Nodal/Activin 能够促进小鼠胚胎干细胞的增殖和自我更新^[17]。该结果也表明 *ESRRB* 通过与不同基因和通路的协同作用实现对自我更新的维持^[18]。

通过实时定量 PCR，我们发现 *ESRRB* 主要在肾脏、脾脏、卵巢和睾丸中表达。将 pE3.3 分别转入到人胚肾细胞 293T、宫颈癌细胞 Hela 和小鼠成肌细胞 C2C12 中，*ESRRB* 表现出组织特异性表达，只在肾脏来源的 293T 中有绿色荧光表达。对比 *ESRRB* 的组织表达谱研究表明，人的 *ESRRB* 主要分布在肾脏和睾丸^[19]；而小鼠的 *Esrrb* 主要分布于肾脏和心脏^[20]；大鼠的

ESRRB 分布要广泛一些,在肾脏、心脏、睾丸和神经内分泌相关的组织中均检测到表达^[8]。通过比较猪、人、小鼠和大鼠 *ESRRB* 的组织表达谱发现,*ESRRB* 在物种间表达有一定的差异,同时肾脏是 *ESRRB* 表达的一个重要器官。*ESRRB* 可能在其中参与调节肾脏分泌固醇类激素^[21]。

有报道通过对猪 *Uroplakin II* (UPII)^[22]、*PAQR6*^[23]和 *P53*^[24]等基因的启动子进行缺失发现了相应的核心启动子。为了进一步分析 *ESRRB* 启动子的核心调控区域,我们对其 3.3 kb 启动子进行了缺失。结果发现位于 5'端上游-25 bp 和 -269 bp 序列区有两个转录调控域,能够明显调控启动子活性。进一步分析发现,*ESRRB* 不存在 TATA box,是 TATA-less 基因。事实上 TATA box 作为典型的启动子元件并非存在于所有的基因中。相反,大多数基因在转录的时候不需要 TATA box^[25]。

本文通过对猪 *ESRRB* 组织特异表达的检测和对 *ESRRB* 启动子核心调控区的测定,初步揭示了该基因的表达和调控特点,为进一步确定 *ESRRB* 的调控机制及其对多能性的维持机理奠定了基础。同时,构建的 pE3.3 报告载体也可以用于示踪细胞重编程,为开展猪诱导多能干细胞的建系提供了新的手段。

REFERENCES

- [1] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122(6): 947-956.
- [2] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-523.
- [3] Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 2003, 116(7): 1175-1186.
- [4] Singh AM, Dalton S. The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 141-149.
- [5] Guo G, Huang Y, Humphreys P, et al. A PiggyBac-based recessive screening method to identify pluripotency regulators. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e18189.
- [6] Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, et al. *Esrrb* is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem cell*, 2012, 11(4): 491-504.
- [7] Festuccia N, Osorno R, Halbritter F, et al. *Esrrb* is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem cell*, 2012, 11(4): 477-490.
- [8] Giguère V, Yang N, Segui P, et al. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 1988, 331(6151): 91-94.
- [9] Heard DJ, Norby PL, Holloway J, et al. Human ERR gamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(3): 382-392.
- [10] Vanacker JM, Bonnelye E, Chopin-Delannoy S, et al. Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha). *Mol Endocrinol*, 1999, 13(5): 764-773.
- [11] Mitsunaga K, Araki K, Mizusaki H, et al. Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-beta results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mech Dev*, 2004, 121(3): 237-246.
- [12] Percharde M, Laval F, Ng JH, et al. *Ncoa3* functions as an essential *Esrrb* coactivator to sustain embryonic stem cell self-renewal and reprogramming. *Genes Dev*, 2012, 26(20): 2286-2298.
- [13] Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, et al. Involvement of estrogens in the process of sex

- differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(2): 154–162.
- [14] Cheng G, Weihua Z, Mäkinen S, et al. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 77–84.
- [15] Xie CQ, Jeong Y, Fu M, et al. Expression profiling of nuclear receptors in human and mouse embryonic stem cells. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(5): 724–733.
- [16] Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 133(6): 1106–1117.
- [17] Ogawa K, Saito A, Matsui H, et al. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 1): 55–65.
- [18] Papp B, Plath K. Pluripotency re-centered around Esrrb. *EMBO J*, 2012, 31(22): 4255–4257.
- [19] Zhou W, Liu Z, Wu J, et al. Identification and characterization of two novel splicing isoforms of human estrogen-related receptor beta. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(2): 569–579.
- [20] Pettersson K1, Svensson K, Mattsson R, et al. Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 1996, 54(2): 211–223.
- [21] Di Micco S, Renga B, Carino A, et al. Structural insights into estrogen related receptor- β modulation: 4-methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge as the first example of marine natural antagonists. *Steroids*, 2014, 80: 51–63
- [22] Kwon DN, Park MR, Park JY, et al. Characterization of a putative cis-regulatory element that controls transcriptional activity of the pig uroplakin II gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(2): 264–269.
- [23] Zhao X, Mo D, Li A, et al. Characterization and transcriptional regulation analysis of the porcine PAQR6 gene. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(11): 947–954.
- [24] Tao H, Mei S, Zhang X, et al. Transcription factor C/EBP beta and 17beta-estradiol promote transcription of the porcine p53 gene. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 47: 76–82.
- [25] Goodrich JA, Tjian R. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(8): 549–558.

(本文责编 郝丽芳)