

PAPSS2与人子宫内膜癌细胞顺铂耐药的研究

郭亚飞¹, 张英^{1*}, 肖兰²

¹安徽医科大学第一附属医院妇产科, 安徽 合肥

²安徽省立医院西区妇瘤外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2024年3月27日; 录用日期: 2024年4月21日; 发布日期: 2024年4月28日

摘要

目的: 探讨磷酸硫酸合成酶2 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthase 2, PAPSS2)基因与人子宫内膜癌(Endometrial Cancer, EC)细胞顺铂耐药的关系。方法: qRT-PCR法检测人I型子宫内膜癌细胞ISHIKAWA及II型子宫内膜癌细胞HEC-1-B细胞中PAPSS2的表达; 采用siRNA转染方法使I、II型子宫内膜癌细胞低表达PAPSS2, qRT-PCR观察转染细胞内PAPSS2表达情况; 平板克隆及CCK-8法分别检测低表达PAPSS2组、空载体组及空白对照组I型及II型子宫内膜癌细胞增殖活性及顺铂半数抑制浓度(IC₅₀); 免疫组化检测I型及II型子宫内膜癌及正常内膜组织中PAPSS2表达水平。结果: qRT-PCR结果表明, ISHIKAWA细胞中PAPSS2 mRNA水平中的表达明显高于II型子宫内膜癌细胞HEC-1-B细胞; 经过siRNA转染处理后, PAPSS2低表达组PAPSS2 mRNA水平相较于空载体组及空白对照组子宫内膜癌细胞显著下降(P < 0.01); PAPSS2-siRNA作用48 h后, 两株细胞增殖显著增强, 且对顺铂敏感性降低(P < 0.01); 免疫组化结果显示PAPSS2在子宫内膜癌中呈阳性表达, 且癌组织中PAPSS2表达显著低于正常子宫内膜组织。结论: PAPSS2与子宫内膜癌细胞分型及顺铂耐药相关, 且可能在子宫内膜癌的发生发展中发挥抑癌基因的作用。

关键词

子宫内膜癌, PAPSS2, 雌激素受体, 顺铂耐药

The Resrach of PAPSS2 and Human Endometrial Cancer Cells Cisplatin Resistance

Yafei Guo¹, Ying Zhang^{1*}, Lan Xiao²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

²Department of Gynecological Oncology, West District of Anhui Provincial Hospital, Hefei Anhui

Received: Mar. 27th, 2024; accepted: Apr. 21st, 2024; published: Apr. 28th, 2024

*通讯作者。

Abstract

Objective: To investigate the effects of PAPSS2 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthase 2, PAPSS2) gene on cisplatin resistance in human endometrial cancer cells. **Methods:** The expression of PAPSS2 in human ISHIKAWA (type I endometrial cancer cells) and HEC-1-B (type II endometrial cancer cells) were detected by qRT-PCR. PAPSS2 knockdown expression vectors were constructed in the two types of cells by siRNA. The expression of PAPSS2 in transfected cells were detected by qRT-PCR. Cell proliferation and the half inhibitory concentration of cisplatin (IC_{50}) in the PAPSS2 knockdown vector of ISHIKAWA and HEC-1-B cell lines, the empty vectors of the two cell lines and normal cell lines were assessed by plate clone formation assay and CCK-8 assay respectively. Immunohistochemistry was used to analyze the expression of PAPSS2 in the two types of endometrial cancer tissues. **Results:** The results of qRT-PCR show that the expression of PAPSS2 mRNA in ISHIKAWA cells is significantly higher than that of type II endometrial cancer cells HEC-1-B cells; after siRNA transfection treatment, the level of PAPSS2 mRNA in the low expression group is significantly decreased compared with the empty carrier group and negative control ($P < 0.01$). After 48 hours of PAPSS2-siRNA, the cell proliferation of the two cell lines was significantly enhanced, and the sensitivity to cisplatin was reduced ($P < 0.01$); Immunohistochemistry results showed that endometrial cancer presented positive expression of PAPSS2 and the expression of PAPSS2 in endometrial cancer tissues was lower than normal endometrial tissue. **Conclusion:** PAPSS2 is associated with cisplatin resistance of human endometrial cancer cells, and may serve as a tumor suppressor gene in human endometrial cancer.

Keywords

Endometrial Cancer, PAPSS2, ER, Cisplatin Resistance

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

子宫内膜癌(EC)是最常见的女性生殖道恶性肿瘤之一,其发生与社会经济水平、饮食环境密切相关[1]。在一些发达国家和地区,其发生率已超过卵巢癌和宫颈癌,成为影响妇女生命安全最常见的妇科恶性肿瘤。依据其与雌激素的关系,子宫内膜癌分为两型——I型和II型:I型子宫内膜癌更为常见,占子宫内膜癌的60%~70%,与雌激素刺激相关;II型子宫内膜癌包括子宫内膜样腺癌G3和非内膜样组织学类型恶性肿瘤,与雌激素刺激无关。

硫酸化代谢是人体内雌激素失活的主要途径[2]。硫酸化的雌激素无法与雌激素受体结合,因此,雌激素硫酸化可以保护细胞和组织免受过量活性雌激素的影响,这可能有助于预防激素依赖性肿瘤。雌激素硫酸化代谢过程所需硫酸盐由3-磷酸腺苷-5-磷酸硫酸盐(PAPS)供给。PAPS由PAPS合成酶(PAPSS)催化生成,有两种亚型:PAPSS1和PAPSS2,其中PAPSS2是合成PAPS的关键酶。

据报道,在肝癌细胞中,PAPSS2表达的缺失抑制细胞增殖并诱导肝癌细胞衰老[3]。有研究发现,敲低PAPSS2可减少乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移。然而,PAPSS2在子宫内膜恶性肿瘤进展中的作用尚不明确。本研究采用siRNA使I型及II型子宫内膜癌细胞低表达PAPSS2,旨在探讨PAPSS2在子宫内膜癌细胞顺铂耐药中的作用,并初步探讨其潜在的可能机制。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料与主要试剂

细胞系：人 I 型 EC 细胞 ISHIKAWA 及 II 型 EC 细胞 HEC-1-B，均保存于安徽医科大学免疫实验室；胎牛血清(FBS)购自德国 GIBCO 公司；PBS、DMEM 培养基、MEM 培养基购自美国 Hyclone 公司；TRIzol 试剂购自美国 InvitroGen 公司；PAPSS2 及 ERα 抗体购自美国 Abcam 公司；逆转录试剂盒及 SYBR Green Master Mix 购自日本 TaKaRa 公司；BCA 法蛋白浓度定量试剂盒、RIPA 裂解液、CCK-8 试剂盒、RNAlater 动物组织 RNA 保护液购自上海碧云天公司；引物由上海生工生物有限公司合成。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养

ISHIKAWA 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中；HEC-1-B 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液中；上述细胞均在 5% CO₂、37℃ 条件下，饱和湿度培养箱中培养。

2.2.2. 细胞转染

- 1) 转染前 1 天在 6 孔板中以 $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个/孔接种相应浓度处于对数期的 ISHIKAWA 和 HEC-1-B 细胞，培养过夜；
- 2) 转染分组：PAPSS2 敲低组及 NC 组；
- 3) 用 Lipo2000 为运载体行细胞瞬时转染，5% CO₂、37℃ 条件下于饱和湿度培养箱中培养 48~72 h，进行后续所需实验。

2.2.3. qRT-PCR 检测 PAPSS2 mRNA 表达情况

用 Trizol 处理细胞，提取 RNA，利用反转录合成 cDNA，反应程序为 37℃、15 min；80℃、5 s；4℃、5 min。利用合成的 cDNA 进行 qRT-PCR 实验，以 β -actin 为内参对照，反应程序为 95℃、30 s；95℃、5 s，60℃、34 s，40 次循环，每组设 3 个复孔。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法统计实验数据，计算各组细胞中 PAPSS2 mRNA 相对表达量，上述实验重复 3 次。PAPSS2 基因引物序列，上游：TAGATGATGGCGTGATCAACAT；下游：TTCATAGAATTCAGCGTCTCGT。 β -actin 基因引物序列，上游：GTGGCCGAGGACTTTGATTG，下游：CCTGTAACAACGCATCTCATATT。

2.2.4. 平板克隆

- 1) 取细胞数 500 个/孔，将空白对照 ISHIKAWA、HEC-1-B 细胞及 PAPSS2 siRNA 转染处理的 ISHIKAWA、HEC-1-B 细胞接种于 6 孔板中；
- 2) 轻柔摇板，使细胞均匀分布，于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱中培养 10~14 天，适时根据培养基颜色变化进行换液；
- 3) 当 6 孔板出现肉眼可见团块样斑点时终止培养，弃去上清液，PBS 清洗 2 遍，加入 2 mL 甲醇固定 15 min，弃去甲醇，再用 PBS 清洗 2 遍；
- 4) 加入 2 mL 吉姆萨染液染色 20 min，吸净染液，用流水漂洗 6 孔板，然后加入 2 mL PBS 过夜充分洗去背景颜色；
- 5) 次日弃去 PBS，重新加入 2 mL PBS 继续清洗后，空气干燥，计算对比各组克隆数目和克隆率，实验重复 3 次，取平均值。

2.2.5. CCK-8 检测细胞增殖活性及 IC₅₀

取细胞数 1×10^4 个/孔，将空白对照 ISHIKAWA、HEC-1-B 细胞及 PAPSS2 siRNA 转染处理的

ISHIKAWA、HEC-1-B 细胞接种于 96 孔板中；常规 24 h 后更换含有不同浓度顺铂培养基(ISHIKAWA 组顺铂浓度：0、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ；HEC-1-B 组顺铂浓度：0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$)，设 5 个复孔。48 h 后每孔加入 10 μl 的 CCK-8，避光孵育 4 h，分别在时间节点为 0.5 h、1 h、2 h、4 h 时用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值；5 个复孔的处理方式为去掉一个最高偏离值，去掉一个最低偏离值，求得中间三个 OD 值的平均值为该对应浓度的确定值，并跟其不同浓度与其余组别进行对比，分别计算出各组细胞的 IC_{50} 和细胞存活率，实验重复三次，取平均值。

2.3. 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析，均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用独立样本 t 检验和单因素方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. ISHIKAWA 细胞和 HEC-1-B 细胞中 PAPSS2 mRNA 表达

qRT-PCR 结果显示，人 I 型子宫内膜癌细胞 ISHIKAWA 中 PAPSS2 mRNA 表达高于人 II 型子宫内膜癌细胞 HEC-1-B，表达水平分别为(4.273 \pm 1.09)、(1.07 \pm 0.66)，差异具有统计学意义(P < 0.01)，见表 1，该结果提示 PAPSS2 可能与子宫内膜癌分型相关。

Table 1. PAPSS2 mRNA expression in the two types of EC cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

表 1. 两型 EC 细胞中 PAPSS2 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$, n = 3)

细胞	PAPSS mRNA 相对表达
ISHIKAWA	4.273 \pm 1.09
HEC-1-B	1.37 \pm 0.66

3.2. PAPSS2-siRNA 瞬时转染 ISHIKAWA 细胞和 HEC-1-B 细胞 PAPSS2 mRNA 表达

qRT-PCR 结果显示，PAPSS2 敲低组 ISHIKAWA 及 HEC-1-B 细胞株 PAPSS2 mRNA 表达降低。其中，空白对照及 PAPSS2 敲低组 ISHIKAWA 细胞 PAPSS2 mRNA 表达分别为(5.96 \pm 0.72)、(1.43 \pm 0.55)，差异有统计学意义(P < 0.01)；空白对照及 PAPSS2 敲低组 HEC-1-B 细胞 PAPSS2 mRNA 表达分别为(1.09 \pm 0.83)、(0.21 \pm 0.02)，差异有统计学意义(P < 0.01)，见图 1。

3.3. PAPSS2 低表达对细胞存活率及顺铂 IC_{50} 的影响

经过不同时间段顺铂作用后，PAPSS2 敲低组细胞存活率均高于空白对照组细胞，其中作用时间为 48 h 时，差异最明显(P < 0.01)。同时，PAPSS2 低表达 ISHIKAWA 细胞 IC_{50} 为(14.50 \pm 0.65) $\mu\text{mol/L}$ ，高于空白对照 ISHIKAWA 细胞 IC_{50} (9.86 \pm 0.61) $\mu\text{mol/L}$ (P < 0.01)；PAPSS2 低表达 HEC-1-B 细胞 IC_{50} 为(106.37 \pm 2.73) $\mu\text{mol/L}$ ，高于空白对照 HEC-1-B 细胞 IC_{50} (87.66 \pm 1.96) $\mu\text{mol/L}$ (P < 0.01)，见图 2 及图 3，该结果表明在 PAPSS2 敲低后增强了 ISHIKAWA 和 HEC-1-B 细胞对顺铂的耐受性，提高了细胞存活率，提示 PAPSS2 可能与顺铂耐药相关。

3.4. PAPSS2 低表达对细胞克隆形成的影响

肉眼可见 PAPSS2 低表达 ISHIKAWA 及 HEC-1-B 细胞克隆形成能力高于空白对照组细胞。其中，PAPSS2 低表达 ISHIKAWA 细胞平均克隆形成率为(64.15 \pm 6.45)%，空白对照 ISHIKAWA 细胞平均克隆

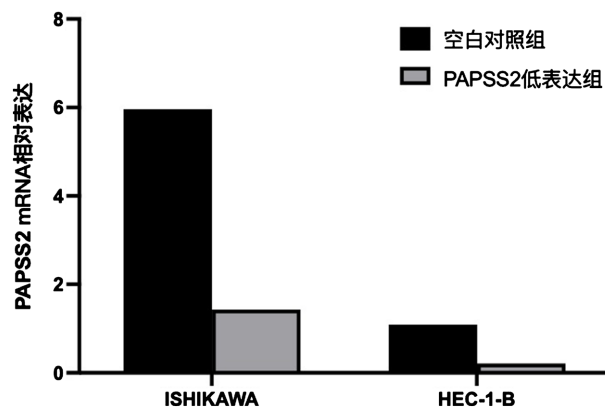


Figure 1. Changes of PAPSS2 mRNA expressions of two types of EC cells after PAPSS2 knockdown
图 1. PAPSS2 敲低前后两型 EC 细胞 PAPSS2 mRNA 表达变化

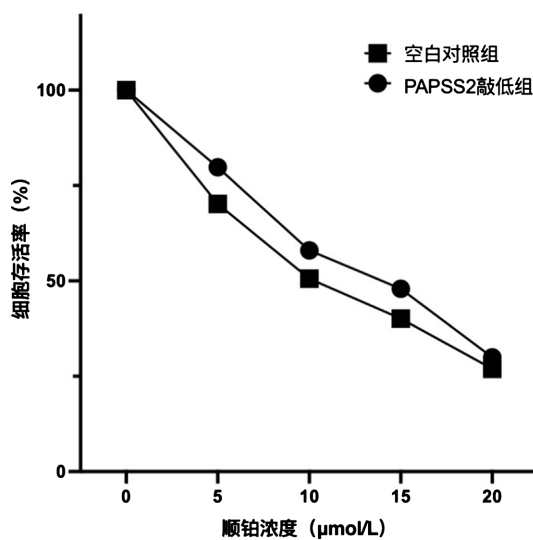


Figure 2. Survival rate of ISHIKAWA cells treated with different cisplatin concentration
图 2. 不同浓度顺铂处理后 ISHIKAWA 细胞存活率

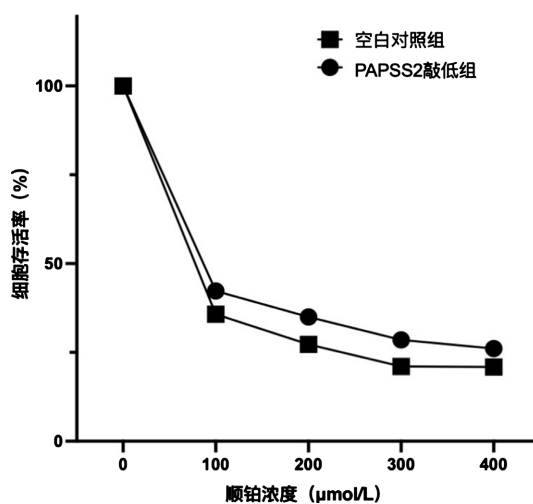


Figure 3. Survival rate of HEC-1-B cells treated with different cisplatin concentration
图 3. 不同浓度顺铂处理后 HEC-1-B 细胞存活率

形成率为 $(27.57 \pm 2.60)\%$ ，差异有统计学意义($P < 0.01$)；PAPSS2 低表达 HEC-1-B 细胞平均克隆形成率为 $(54.87 \pm 5.83)\%$ ，空白对照 HEC-1-B 细胞平均克隆形成率为 $(28.44 \pm 1.60)\%$ ，差异有统计学意义($P < 0.01$) 见图 4 及图 5。

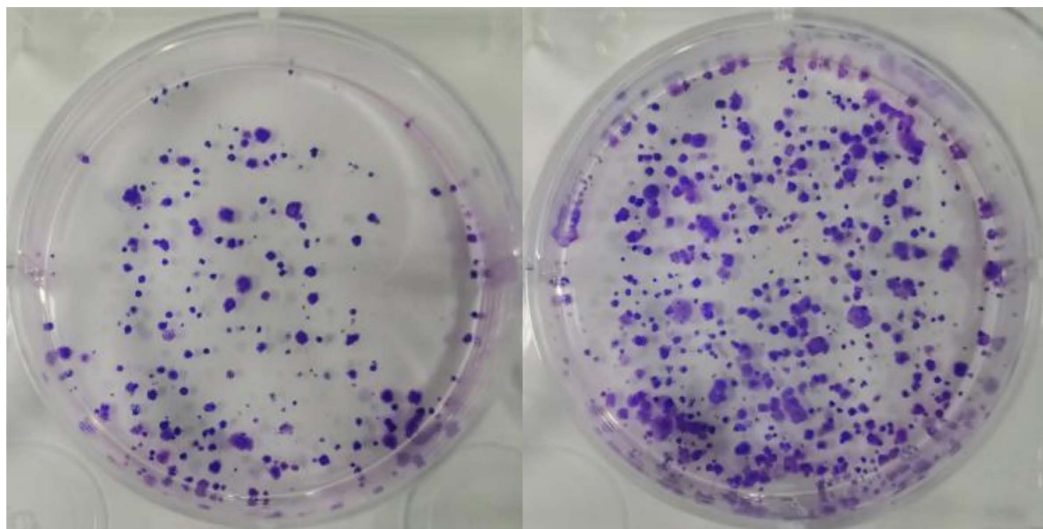


Figure 4. Negative control ISHIKAWA cell line (left image); PAPSS2 knockdown ISHIKAWA cell line (right image)
图 4. ISHIKAWA 细胞系空白对照组(左); ISHIKAWA 细胞系 PAPSS2 敲低组(右)

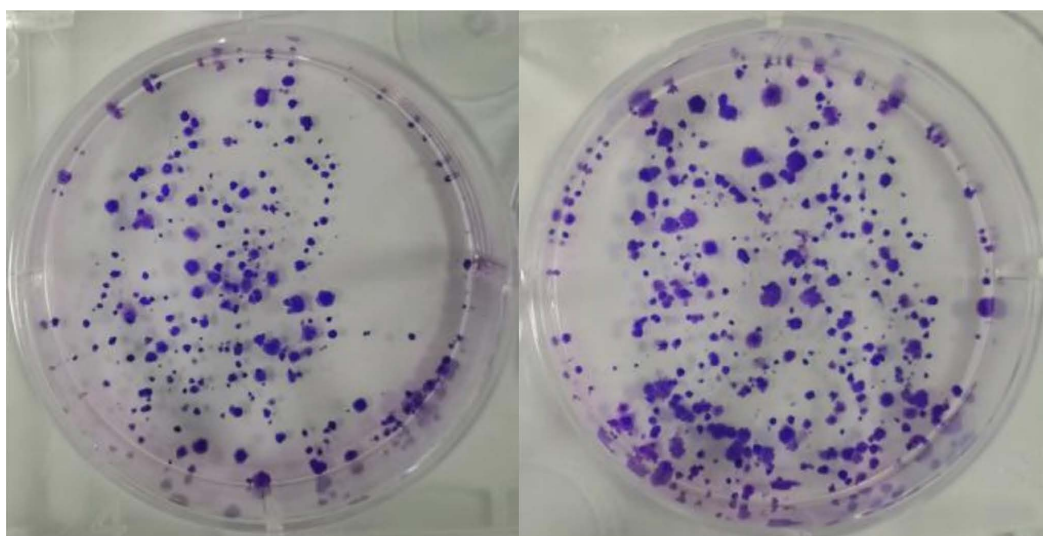


Figure 5. Negative control HEC-1-B cell line (left image); PAPSS2 knockdown HEC-1-B cell line (right image)
图 5. HEC-1-B 细胞系空白对照组(左); HEC-1-B 细胞系 PAPSS2 敲低组(右)

3.5. 免疫组化检测子宫内膜癌及正常子宫内膜组织中 PAPSS2、ER α 、E β 表达

免疫组化结果显示，PAPSS2 在 ER (-)及 ER (+)子宫内膜癌表达均高于正常子宫内膜组织；接着我们对子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织中 ER α 和 ER β 水平也进行了分析，发现 ER α 在子宫内膜癌中表达低于不典型增生子宫内膜及瘤旁子宫内膜组织，不典型增生子宫内膜中 ER α 最高；ER β 在子宫内膜癌中表达明显低于不典型增生子宫内膜及瘤旁子宫内膜组织，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见图 6 及图 7。

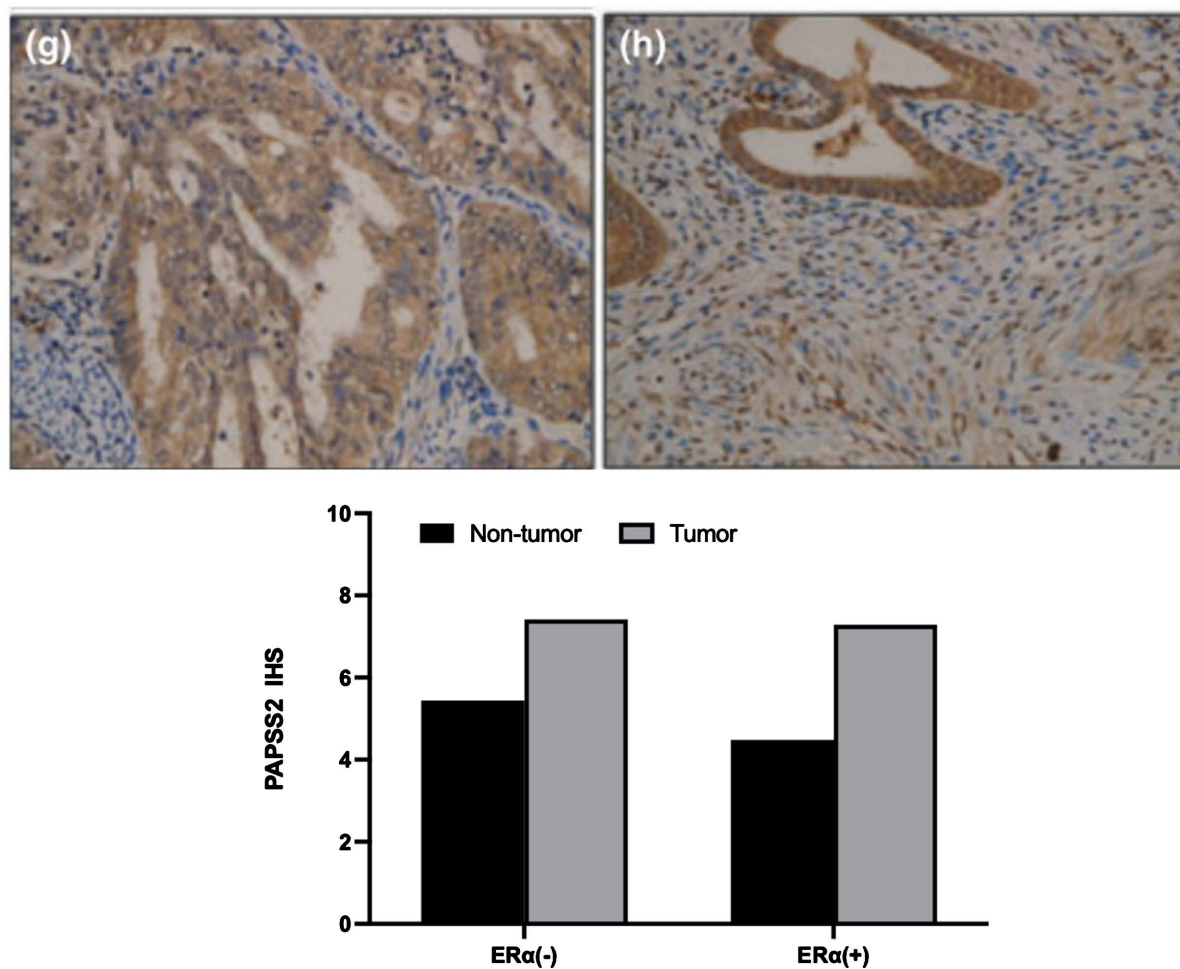


Figure 6. PAPSS2 expression in non-tumor endometrium and EC tissues
图 6. PAPSS2 在非肿瘤子宫内膜及子宫内膜癌组织中的表达

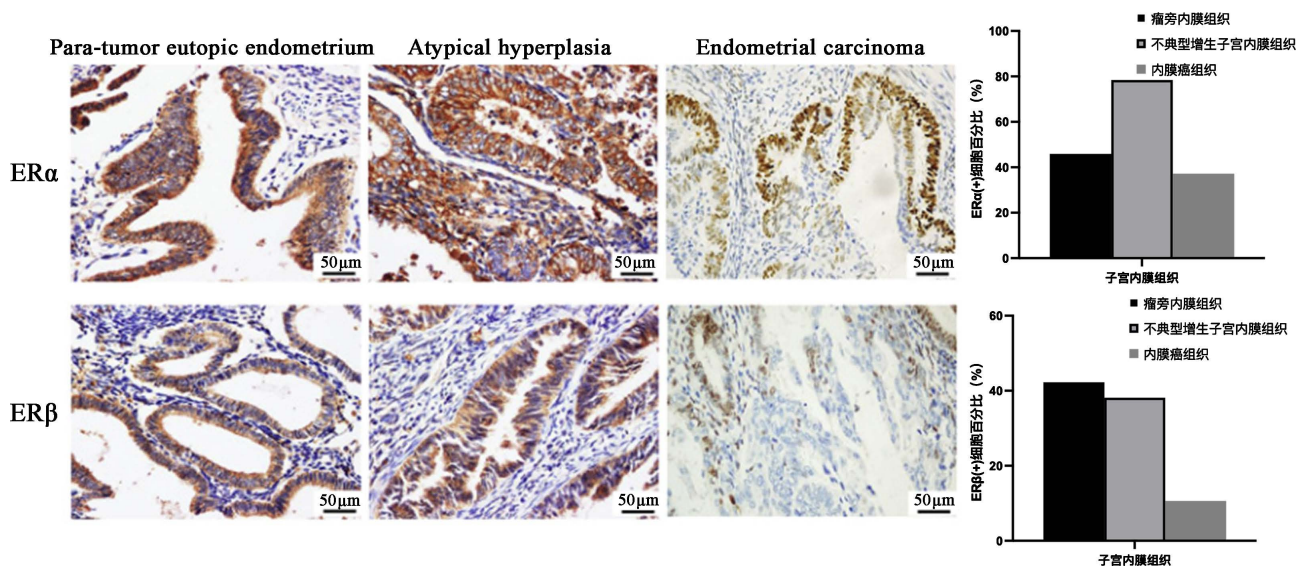


Figure 7. ERα and ERβ expression in non-tumor endometrium and EC tissues
图 7. ERα 和 ERβ 在非肿瘤子宫内膜及子宫内膜癌组织中的表达

4. 讨论

子宫内膜癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一，其发病率在发展中国家和发达国家均呈现逐年上升趋势[1]，临床流行病学研究表明子宫内膜癌患者的总生存期并没有伴随治疗方法的改进而出现明显改善，目前仍是威胁女性生命健康的重要原因之一[4]。硫酸化是人体内雌激素失活的主要途径。硫酸化的雌激素不能与雌激素受体(ER)结合，因此，与硫酸盐结合可以保护细胞和组织免受过量活性雌激素的影响，这可能有助于预防雌激素依赖性癌症。

ER 有两种亚型——ER α 和 ER β 。长久以来的研究表明，雌激素可以维持细胞存活和诱导细胞凋亡，不同的作用取决于细胞中存在的 ER 亚型[5]。虽然这两种受体具有相同的结构同源性，但它们在肿瘤发生发展中可能具有相互拮抗的作用，相关研究发现 ER α 似乎是恶性肿瘤中的主要表达形式[6] [7] [8]，而 ER β 表达降低与肿瘤进展和转移性疾病呈负相关[7] [8] [9]。据观察，E2/ER α 复合物可以激活参与细胞周期推进和凋亡级联预防的多种途径，而 E2/ER β 复合物在多数情况下可以诱导细胞凋亡。来自细胞培养和基因表达的数据也表明，E2 激活的 ER β 可以拮抗 E2 反应启动子上的 ER α 活性[10]，从而调节 ER α 增殖效应，可能具有作为肿瘤抑制剂的潜力。值得注意的是，在卵巢癌中，观察到 ER α /ER β mRNA 比率显著增加[11] [12] [13]。ER α 和 ER β 的不平衡表达可能在肿瘤的发生和发展中起着关键作用[14]。

硫酸化代谢过程所需硫酸盐由 3-磷酸腺苷-5-磷酸硫酸盐(PAPS)供给，PAPS 由人类 PAPS 合成酶(PAPSS)催化生成，包括两种亚型——PAPSS1 和 PAPSS2。研究表明 PAPSS2 的催化活性比 PAPSS1 高 10~15 倍[15]。有研究显示[2]，PAPSS 的代偿性上调可以将局部肿瘤组织中的活性雌激素硫酸化为非活性形式，以保护细胞免受雌激素的促有丝分裂作用。据报道[2]，PAPSS2 基因突变可能导致人类常染色体隐性遗传的骨骼疾病——肱骨干骺端发育不良(SEMD)。Kurimaet 等人[16] [17]报道了 PAPSS 基因的错义突变导致小鼠的畸形，包括异常的肝脏解毒、出血次数等。然而，PAPSS 在癌症，特别是在子宫内膜癌发展中的作用尚未获得足够关注。因此，探究 PAPSS2 对癌症细胞增殖、凋亡及顺铂耐药的影响及其是具有重要意义的。

本研究中，我们发现 PAPSS2 在人 I 型子宫内膜癌细胞 ISHIKAWA 中的表达显著高于人 II 型子宫内膜癌细胞 HEC-1-B，表明 PAPSS 表达可能与子宫内膜癌分型相关。我们利用 siRNA 瞬时转染使两型 EC 细胞低表达 PAPSS2，体外细胞实验结果显示，低表达 PAPSS2 提高两型 EC 细胞对顺铂的耐受性，并提升了细胞的增殖活性，提示 PAPSS2 可能在子宫内膜癌发生发展中发挥抑癌基因的作用。为进一步探究 PAPSS2 是否通过 ER 发挥作用，我们进行免疫组化实验，检测 ER α 、ER β 在子宫内膜癌组织和正常子宫内膜组织中的表达，发现 ER α 在子宫内膜癌中表达低于不典型增生子宫内膜及瘤旁子宫内膜组织，不典型增生子宫内膜中 ER α 最高，这与我们预想 ER α 的促癌作用相矛盾。ER β 在子宫内膜癌中表达明显低于不典型增生子宫内膜及瘤旁子宫内膜组织，表明 ER β 可能与子宫内膜癌分型有关。对于 PAPSS2 在子宫内膜癌中的作用通路及其下游效应因子仍需更深一步的研究。

综上所述，PAPSS2 与子宫内膜癌分型相关，且在其发生、发展中发挥抑癌作用，并且可能参与人子宫内膜癌细胞顺铂耐药。本研究有助于阐明 PAPSS2 作为人子宫内膜癌潜在治疗靶点的可能性，但其发挥作用的下游效应因子以及相关信号通路仍需进一步探究。

基金项目

国家自然科学基金青年基金(编号: 81603138); 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目(编号: gxgwfx2019006); 安徽高校自然科学基金重大项目(编号: KJ2019ZD25)。

参考文献

- [1] Morice, P., *et al.* (2016) Endometrial Cancer. *The Lancet (British Edition)*, **387**, 1094-1108. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00130-0)
- [2] Xu, Y.L., *et al.* (2012) Effect of Estrogen Sulfation by SULT1E1 and PAPSS on the Development of Estrogen-Dependent Cancers. *Cancer Science*, **103**, 1000-1009. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02258.x>
- [3] Jung, S.H., Lee, H.C., Yu, D.M., Kim, B.C., Park, S.M. and Lee, Y.S. (2016) Heparan Sulfation Is Essential for the Prevention of Cellular Senescence. *Cell Death & Differentiation*, **23**, 417-429. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.107>
- [4] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2018) Cancer Statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- [5] Song, R.X.-D. and Santen, R.J. (2003) Apoptotic Action of Estrogen. *Apoptosis*, **8**, 55-60. <https://doi.org/10.1023/A:1021649019025>
- [6] Li, A.J., Baldwin, R.L. and Karlan, B.Y. (2003) Estrogen and Progesterone Receptor Subtype Expression in Normal and Malignant Ovarian Epithelial Cell Cultures. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, **189**, 22-27. <https://doi.org/10.1067/mob.2003.328>
- [7] Rutherford, T., Brown, W.D., Sapi, E., Aschkenazi, S., Munoz, A. and Mor, G. (2000) Absence of Estrogen Receptor- β Expression in Metastatic Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology*, **96**, 417-421. <https://doi.org/10.1097/00006250-200009000-00018>
- [8] Bardin, A., Hoffmann, P., Boulle, N., Katsaros, D., Vignon, F., Pujol, P., *et al.* (2004) Involvement of Estrogen Receptor β in Ovarian Carcinogenesis. *Cancer Research*, **64**, 5861-5869. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0552>
- [9] Pujol, P., Rey, J.M., Nirde, P., Roger, P., Gastaldi, M., Laffarque, F. and Rochefort, H. (1998) Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNA as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis. *Cancer Research*, **58**, 5367-5373.
- [10] Hall, J.M. and McDonnell, D.P. (1999) 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*, **140**, 5566-5578. <https://doi.org/10.1210/en.140.12.5566>
- [11] Skliris, G.P., Munot, K., Bell, S.M., Carder, P.J., Lane, S., Horgan, K., *et al.* (2003) Reduced Expression of Oestrogen Receptor β in Invasive Breast Cancer and Its Re-Expression Using DNA Methyltransferase Inhibitors in a Cell Line Model. *The Journal of Pathology*, **201**, 213-220. <https://doi.org/10.1002/path.1436>
- [12] Iwao, K., Miyoshi, Y., Egawa, C., Ikeda, N. and Noguchi, S. (2000) Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- β mRNA and Its Variants in Human Breast Cancers. *International Journal of Cancer*, **88**, 733-736. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20001201\)88:5<733::AID-IJC8>3.3.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20001201)88:5<733::AID-IJC8>3.3.CO;2-D)
- [13] Horvath, L.G., Henshall, S.M., Lee, C.S., Head, D.R., Quinn, D.I. and Makela, S. (2001) Frequent Loss of Estrogen Receptor-Beta Expression in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **61**, 5331-5335.
- [14] Yaşar, P., *et al.* (2017) Molecular Mechanism of Estrogen-Estrogen Receptor Signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, **16**, 4-20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- [15] Fuda, H., Shimizu, C., Lee, Y.C., Akita, H. and Strott, C.A. (2002) Characterization and Expression of Human Bifunctional 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulphate Synthase Isoforms. *Biochemical Journal*, **365**, 497-504. <https://doi.org/10.1042/bj20020044>
- [16] Stelzer, C., Brimmer, A., Hermanns, P., Zabel, B. and Dietz, U.H. (2007) Expression Profile of *Papss2* (3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Synthase 2) during Cartilage Formation and Skeletal Development in the Mouse Embryo. *Developmental Dynamics*, **236**, 1313-1318. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21137>
- [17] Kurima, K., Warman, M.L., Krishnan, S., *et al.* (1998) A Member of a Family of Sulfate-Activating Enzymes Causes Murine Brachymorphism. *PNAS*, **95**, 8681-8685. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8681>