

雌激素对人乳腺癌细胞周期蛋白 E 表达及血清饥饿时细胞存活力的影响^{*}

刘晓红, 易 亮^{**}, 陈冷昕^{**}, 陈腾祥, 王旭东^{***}

(贵阳医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨雌激素对人乳腺癌细胞周期蛋白 E 表达及在血清饥饿状态下细胞存活力的影响。方法: 以 MCF-7 乳腺癌细胞为模型, 采用蛋白印迹分析法检测乳腺癌周期蛋白 E 表达、显微镜下观察细胞变化、台盼蓝染色及细胞计数法测算细胞存活力。结果: 雌激素(10 nmol/L)处理可引起乳腺癌细胞周期蛋白 E 的过度表达, 与对照组比较, 增高 56.42% ($P < 0.05$); 在无血清培养条件下, 雌激素能减少乳腺癌细胞死亡, 增强细胞的存活力, 与对照组比较, 72 h 细胞存活率增高 19.86% ($P < 0.05$)。结论: 雌激素能显著上调周期蛋白 E 的蛋白表达, 并增强乳腺癌细胞对血清饥饿的抵抗力。

[关键词] 乳腺肿瘤; 雌激素类; 细胞周期蛋白 E; 细胞存活

[中图分类号] R373.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)06-0551-03

Effects of Estrogen on the Expression of Cyclin E and Cell Viability during Serum Starvation in Human Breast Cancer Cells

LIU Xiaohong, YI Liang, CHEN Lengxin, CHEN Tengxiang, WANG Xudong

(Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of estrogen on the expression of cyclin E and cell viability during serum starvation in human breast cancer cells. **Methods:** MCF-7 human breast cancer cells were employed as study model. Western blotting was used to detect the expression of cyclin E protein. Changes of cell morphology were observed under microscope. Trypan Blue staining and cell counting were employed to determine cell viability. **Results:** In breast cancer cells, estrogen (10 nmol/L) could increase the expression of cyclin E by 56.42% as compared with that of control ($P < 0.02$). On the condition of serum-free culture, estrogen reduced cell death and increased cell viability. With the action of estrogen, cell viability increased gradually with the time passing. Cell viability increased by 19.86% in 72 h as compared with that of control ($P < 0.05$). **Conclusions:** Estrogen contributes to increased expression of cyclin E and enhances resistance of breast cancer cells to serum starvation.

[Key words] breast neoplasms; estrogens; cyclin E; cell survival

周期蛋白 E(cyclin E)属于 G1 期周期蛋白,在细胞周期 G1/S 期转换过程中发挥关键的促进作用^[1]。与正常乳腺组织和细胞不同,周期蛋白 E 在乳腺癌组织和细胞中呈现蛋白表达异常上调^[2,3]。在应急情况下,周期蛋白 E 可增强细胞活

力,对乳腺癌细胞具有保护作用。周期蛋白 E 高水平表达预示乳腺肿瘤的恶性进展、不良预后及生存期缩短^[4,5]。RNA 干扰周期蛋白 E 表达,可遏制动物乳腺癌进展,提示周期蛋白 E 在乳腺癌演进中的重要性,同时可促进乳腺癌细胞凋亡,并增强

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30860093)。

^{**} 贵阳医学院临床医学专业 2009 级本科生。

^{***} 通讯作者 E-mail: xdwang@gmc.edu.cn

乳腺癌对肿瘤治疗药物阿霉素(Doxorubicin, Dox)的敏感性^[6]。雌激素(estrogen)是促进激素依赖性乳腺癌恶性演进的重要因素^[7],在血清饥饿条件下,雌激素对乳腺癌细胞是否具有保护作用及其与周期蛋白E的关系,目前尚未见文献报道。

1 实验方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 MCF-7(ER+)购自中国科学院昆明细胞库。DMEM(含酚红或无酚红)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶及青霉素/链霉素购自 HyClone, 活性炭处理胎牛血清(charcoal-stripped fetal bovine serum, CS-FBS)购自 Bio-West, 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)购自 Sigma。抗周期蛋白E单克隆抗体购自 Santa Cruz, 抗 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling, 羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体购自博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及雌激素处理 MCF-7 细胞常规培养采用 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 青霉素及 1% 链霉素),在 37℃、潮湿环境及 5% CO₂ 条件下进行。细胞培养 50%~60% 满度后,换含无酚红 DMEM + 2.5% CS-FBS 培养 24 h,再以无血清、无酚红 DMEM 继续培养 24 h,以耗尽细胞内源性激素。将细胞分为两组:对照组(血清饥饿 + 1 ml/L DMSO)及雌激素处理组(血清饥饿 + 10 μ mol/L 雌激素),分别给予相应处理。

1.2.2 蛋白印迹分析 细胞处理结束后,加入 RIPA 细胞裂解液(碧云天)裂解细胞,取样品上清液留用,采用 BCA 法进行蛋白定量。每个泳道按 30 μ g 蛋白质样品上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后将分离蛋白电转移至 PVDF(Milipore);5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,按要求加入相应抗体室温杂交 1~2 h 和 4℃ 孵育过夜。然后以 TBST 洗膜后加入相应辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000)室温杂交 1 h, PVDF 膜以化学发光试剂盒(Milipore)进行显色。采用自动凝胶成像系统(Syngene)进行成像,并以 GeneSnap 软件分析蛋白印迹结果。

1.2.3 分组及细胞显微观察 取对数生长期细胞制成细胞混悬液并计数,调整细胞密度为 $2 \sim 3 \times 10^5$ 个/ml,按每孔 1 ml 接种于 12 孔培养板中。培养 24 h 后,换成含 2.5% CS-FBS 的无酚红 DMEM 预处理 8 h,换成无酚红 DMEM 继续培养。将细胞

随机分为对照组与实验组,分别给予血清饥饿 + 1 ml/L DMSO、血清饥饿 + 10 μ mol/L 雌激素处理,于血清饥饿 24、48 及 72 h 后,显微镜($\times 100$)下观察细胞形态、照像。

1.2.4 台盼蓝染色及细胞计数 对照组与雌激素处理组再各分为 3 组,分别于血清饥饿 24、48、72 h 后进行台盼蓝染色并计算细胞存活率。用 0.25% 胰酶消化贴壁培养细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 100 μ l 细胞重悬液重悬细胞,加入 100 μ l 台盼蓝染色液($2 \times$)轻轻混匀,染色 3 min,吸取少量经过染色的细胞,用血细胞计数板显微镜下计数。细胞存活率计算公式:细胞存活率 = (细胞总数 - 蓝色细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件对实验数据进行统计学处理和分析。数据以($\bar{x} \pm s$)标准差表示,两样本均数比较若方差齐且符合正态用 t 检验,不符合条件用秩和检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌 MCF-7 细胞周期蛋白 E 表达

雌激素处理 12 h 后,收集并裂解细胞进行蛋白印迹分析。与对照组比较,实验组周期蛋白 E/GAPDH 蛋白条带 OD 比值明显增高,较对照组增高 56.42% ($P < 0.04$)。见图 1。

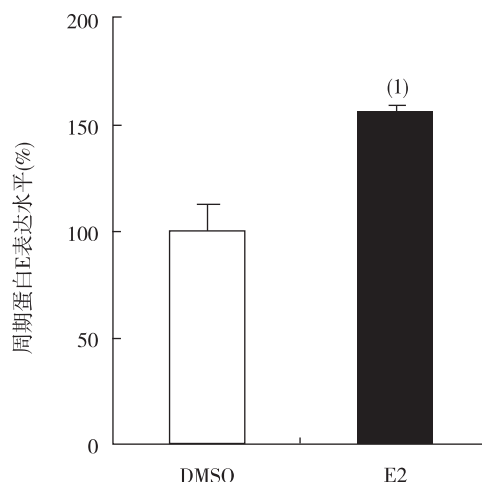


图1 雌激素对 MCF-7 乳腺癌细胞周期蛋白 E 蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of estrogen (E2) on the expression of cyclin E in MCF-7 breast cancer cells.

2.2 血清饥饿诱导的 MCF-7 乳腺癌细胞死亡

MCF-7 乳腺癌细胞在有血清培养基中呈多边形,形态饱满,较大。对照组(DMSO)血清饥饿 24 h 后,可见贴壁细胞逐渐减少,细胞形态不饱满,胞质中出现颗粒;48 h 后贴壁细胞进一步减少,出现较多死亡、漂浮细胞,部分贴壁细胞则变

圆、体积变小;72 h 后死亡、漂浮细胞显著增多,贴壁细胞明显减少。雌激素处理组:24 h 仅见少数细胞死亡、漂浮;48 h 细胞死亡、漂浮增多,但少于对照组;72 h 后贴壁细胞减少,但贴壁细胞数明显多于对照组,且漂浮细胞明显少于对照组。见图 2。

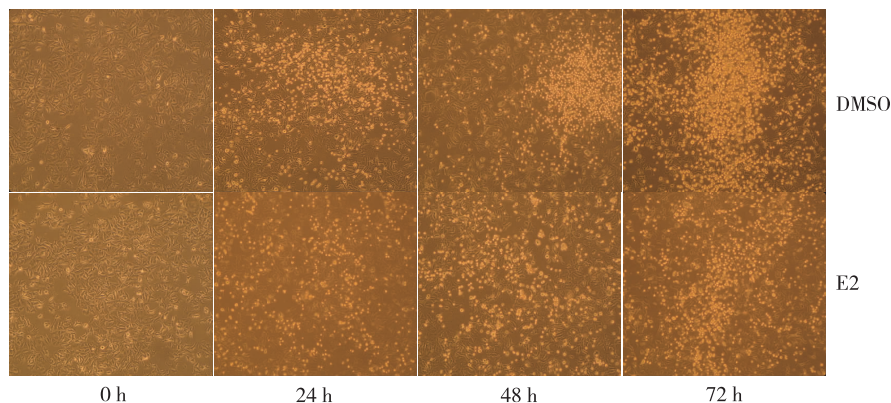


图 2 雌激素对血清饥饿引起的乳腺癌细胞死亡的影响

Fig. 2 Effect of estrogen on cell death caused by serum starvation in breast cancer cells

2.3 乳腺癌细胞在血清饥饿条件下的存活力

台盼蓝染色后细胞计数,低倍镜下可见活细胞呈光亮圆形、饱满、透光度好,且不被台盼蓝着色;而死细胞皱缩,透光度差,可被台盼蓝染成蓝色。在雌激素处理组,24 h、48 h 细胞存活率与对照组相比逐渐增高,72 h 雌激素处理组细胞存活率与对照组相比增高 19.86%,差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。见图 3。

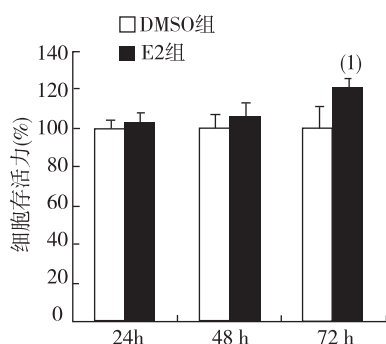


图 3 雌激素对血清饥饿时乳腺癌细胞存活力的影响

Fig. 3 Effect of estrogen on breast cancer cell viability during serum starvation

3 讨论

细胞周期调控失常是恶性肿瘤最显著的生物

学特征之一。周期蛋白 E 与周期蛋白依赖性激酶 2(cyclin-dependent kinas, CDK2) 结合形成活性复合物,促进细胞周期 G1/S 期转换,加速细胞周期进程,从而加快细胞增殖。目前对周期蛋白 E 高水平表达的细胞内信号机制研究较多,有文献显示,乳腺癌细胞过表达钙激活中性蛋白酶(calcium-activated neutral protease, CANP 或 calpain)可刺激周期蛋白 E 表达上调^[8,9]。然而,关于乳腺癌细胞周期蛋白 E 高表达的细胞外机制,还未见文献报道。本研究发现,雌激素可在 12 h 显著上调 MCF-7 乳腺癌细胞周期蛋白 E 的表达水平,这可能与雌激素刺激周期蛋白 E 基因表达上调有关。

目前对肿瘤细胞异常表达周期蛋白 E 的研究主要集中在对细胞周期的影响方面^[1],细胞生存能力增强是肿瘤的另一值得重视的生物学特征。新近研究资料显示,采用基因干扰方法沉默周期蛋白 E 表达,可引起乳腺癌细胞凋亡,同时与 Dox 产生协同杀细胞作用^[6]。说明周期蛋白不仅参与促进细胞增殖,而且对肿瘤细胞本身还具有抗凋亡作用,可增强细胞对某些细胞外不利因素的抗性。本研究显示,雌激素处理可明显减少无血清培养引起的乳腺癌细胞死亡数目,增强细胞存活力。肿瘤急速生长往往造成肿瘤细胞血液供应不足,引起细胞死亡。提示雌激素可能通过上调周期蛋白 E 表

(下转第 557 页)

- [10] Lee H K, Lee M, Roh H W, et al. DNA chip evaluation as a diagnostic device [J]. *Current Applied Physics*, 2005(5):433-437.
- [11] Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L, et al. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer [J]. *JAMA*, 2000(1):81-86.
- [12] 钱德英, 岑坚敏, 王丁, 等. 高危型人乳头状瘤病毒 DNA 检测与细胞学联合检查对子宫颈癌前病变筛查的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2006(1):34-37.
- [13] Huang S, Afonina I, Beth AM, et al. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women [J]. *Int J Cancer*, 1997(70):408-411.
- [14] LO KW, Wong YF, Chan MK, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China [J]. *Int J Cancer*, 2002(3):327-331.
- [15] Del Mistro A, Salamanca HF, Trevisan R, et al. Human papillomavirus typing of invasive cervical cancers in Italy [J]. *Infect Agent Cancer*, 2006(1):9.
- [16] 李洁, 刘宝印. Zur Hausen S, et al. 中国妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒感染及其地理分布的调查 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996(10):50-55.
- [17] 古扎丽努尔·阿不力孜, 彭芝兰, 刘珊玲, 等. HPV 及其亚型在四川西北地区汉族及新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中的差异表达 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004(5):408.
- [18] McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, et al. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005(5):1165-1170.
- [19] 陈凤, 曾转萍, 刘彬. 山西省阳城县妇女人乳头瘤病毒感染危险因素分析 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2004(4):249-351.
- [20] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002(6):464-474.
- [21] Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology [J]. *Int J Cancer*, 2001(3):412-420.

(2011-07-22 收稿, 2011-10-26 修回)

(上接第 553 页)

达, 增强肿瘤细胞对缺血的抵抗能力, 减少细胞死亡, 增强细胞的生存能力, 从而促进肿瘤的恶性演进。乳腺癌细胞周期蛋白 E 表达上调及其与雌激素保护作用的关系和信号机制还有待进一步研究阐明。

4 参考文献

- [1] Bagheri-Yarmand R, Nanos-Webb A, Biernacka A, et al. Cyclin E deregulation impairs mitotic progression through premature activation of Cdc25C [J]. *Cancer Res*, 2010(12):5085-5095.
- [2] Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP, et al. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996(26):15215-15220.
- [3] Wang XD, Rosales JL, Magliocco A, et al. Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain [J]. *Oncogene*, 2003(5):769-774.
- [4] Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002(20):1566-1575.
- [5] Potemski P, Kusińska R, Pasz-Walczak G, et al. Prognostic relevance of cyclin E expression in operable breast cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2009(2):MT34-40.
- [6] Liang Y, Gao H, Lin SY, et al. siRNA-based targeting of cyclin E overexpression inhibits breast cancer cell growth and suppresses tumor development in breast cancer mouse model [J]. *PLoS One*, 2010(9):e12860.
- [7] Cortez V, Mann M, Brann DW, et al. Extranuclear signaling by estrogen: role in breast cancer progression and metastasis [J]. *Minerva Ginecol*, 2010(6):573-783.
- [8] Libertini SJ, Robinson BS, Dhillon NK, et al. Cyclin E both regulates and is regulated by calpain 2, a protease associated with metastatic breast cancer phenotype [J]. *Cancer Res*, 2005(23):10700-10708.
- [9] 王旭东. 乳腺细胞周期蛋白 E 保持高分子量与钙激活中性蛋白酶稳态有关 [J]. *贵阳医学院学报*, 2004(2):126-128.

(2011-10-24 收稿, 2011-11-01 修回)