

GPER 抑制剂在雌激素诱导乳腺恶性转化细胞中的作用*

郭 阳**, 杨 莉, 金 爱, 张 莹, 王旭东***

(贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 观察 G 蛋白偶联雌激素受体(GPER)特异性抑制剂 G15 对 17 β -雌二醇(E2)刺激转化细胞增殖能力的影响及其机制初探。方法: 自制乳腺癌细胞, 乳腺癌 MCF-10A 细胞用 50 nmol/LE2 连续刺激至第 13 代, 以 DMSO 刺激作为对照(均标记为 P13); 显微镜观察细胞转化形态, 将 DMSO 及 E2 处理后的 P13 分别接种到裸鼠皮下, 接种后 1 周观察接种部位的成瘤情况; 将自制乳腺癌细胞分为 E2 组和 10 μ mol/L G15 组, 以 MCF-7 细胞作为阳性对照细胞, 用平板克隆形成实验观察细胞的增殖能力。结果: 镜下可见 P13 代 MCF-10A 细胞接触抑制消失、细胞胞体变大、出现克隆小球, 裸鼠乳腺脂肪垫皮下成瘤(7/10), 对照无瘤形成; 平板克隆实验中, 自制乳腺癌细胞、MCF-7 细胞与各自阴性对照比较, E2 刺激组的增殖加快, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与各自 E2 刺激组比较, G15 抑制组增殖能力下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: GPER 介导 E2 刺激转化细胞增殖能力增加过程。

[关键词] 雌激素类; G 蛋白偶联雌激素受体; 乳腺肿瘤; 细胞转化, 肿瘤; 细胞生长过程

[中图分类号] R737.9; R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)06-0625-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.002

The Fomction of GPER Inhibitor in Estrogen-induced Malignant Transformation of Breast Cells

GUO Yang, YANG Li, JIN Ai, ZHANG Ying, WANG Xudong

(Department of Physiology in School of Basic Medicine of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the role of inhibitor G15 in G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in malignantly transformed mammary epithelial cells. **Methods:** Non-tumorigenic MCF-10A mammary epithelial cells were used as the research models. MCF-7 breast cancer cells were used as the positive control in *in vitro* assay. Model cells were cultured up to the thirteenth passage, marked as P13. The morphology of treated cells was observed under the microscope, and cell proliferation was detected by plate colony formation assay. Then tumorigenicity was detected in nude mice. **Results:** In cells treated with E2 (50nM/L), cell contact inhibition disappeared and cell bodies became larger and fusiform. Transformed cells and MCF-7 cells were further stimulated with E2 (with DMSO as controls) and cell proliferation greatly increased ($P < 0.01$) and this effect could be dramatically suppressed by G15. E2-treated model cells were tumorigenic (7/10) significantly in nude mice (with controls as 0/5). **Conclusion:** Novel estrogen receptor GPER may be led to promote the proliferation ability of E2-induced transformed cells.

[Key words] estrogens; G protein-coupled estrogen receptor; breast tumor; cell transformation, neoplasm; cell growth process

*[基金项目] 国家自然科学基金(31360252, 31660345)

** 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: 1157102188@qq.com

网络出版时间: 2018-06-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180618.1502.015.html>

乳腺癌(breast cancer, BC)是女性常见的恶性肿瘤,严重危害女性的身心健康^[1-2]。雌二醇(estradiol, E2)是女性重要的性激素,在体内有着非常广泛的生物学作用^[3]亦是诱导正常乳腺细胞发生癌变的主要因素之一^[4];同时,它还可通过刺激乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[5]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)是核受体超家族的成员之一,能够调节生殖系统的生长与分化,并参与机体多种生理病理过程的调控^[6]。传统雌激素受体有 ER α 和 ER β ^[7],但是它们并不能解释 E2 所有效应。新型 G 蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)是由 GPER 基因编码的 7 次跨膜整合蛋白^[8]其在 E2 刺激乳腺肿瘤进展中的作用仍存在争议,有研究发现 GPER 在乳腺癌发展过程中表达上调^[9],但也有报道显示 GPER 抑制乳腺癌的发展^[10]。本课题组前期实验发现 E2 能够诱导 MCF-10A 细胞形态变化及细胞生长加速、且转化细胞对 E2 刺激的敏感性增高^[11],本研究采用 E2 不断刺激获得的第 13 代的转化细胞,以乳腺癌 MCF-7 细胞为体外对照,通过 G15 预处理转化细胞探讨 GPER 在雌激素刺激的转化细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂

MCF-10A 细胞由重庆三军医大学生物化学教研室惠赠,乳腺癌 MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库,马血清、DMEM/F12 和青、链霉素购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司, E2、霍乱毒素、氢化可的松、DMSO 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, GPER 抑制剂 G15 购自德国 Merck 公司,重组人胰岛素购自上海翊圣生物,表皮生长因子(EGF)购自 Peprotech 公司,实验动物(裸鼠 BALB/cA-nu)购自重庆腾鑫生物技术有限公司【动物许可证号:SCXK(京)2014-0004】。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 MCF-10A 细胞培养于 F12 完全培养液(含 10% 马血清、10 μ g/L 霍乱毒素、10 mg/L 胰岛素、50 μ g/L 氢化可的松、20 μ g/L 表皮生长因子以及 1% 青链霉素的 DMEM/F12), MCF-7 细胞培养于高糖培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素),培养条件为 37 $^{\circ}$ C、潮湿环境以及 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,在细胞满度达 70%

时,进行传代培养。

1.2.2 第 13 代乳腺癌细胞的制备及鉴定 将 MCF-10A 细胞用 50 nmol/L E2 连续刺激至第 13 代(以 0.1% DMSO 作为对照标记为 P13),鉴定 MCF-10A 细胞是否转化为乳腺癌细胞。(1)拍照观察细胞转化情况,细胞转化主要标志为细胞生长加速、贴壁依赖集落形成,形成克隆小球。(2)裸鼠移植瘤实验:将拟注射细胞消化离心, PBS 洗 1~2 遍后吹打均匀悬于装有 PBS 溶液的离心管中,将装有细胞混悬液的离心管置于冰盒上。将 4~5 周龄的 15 只裸鼠随机分为 DMSO 组 5 只(对照组)、E2 组 10 只(实验组),裸鼠皮下乳房垫为注射点,每个注射点注射 2×10^6 个细胞,在注射点形成椭圆状皮丘;接种 1 周后皮丘渐渐被吸收,观察裸鼠接种部位成瘤情况。

1.2.3 GPER 特异性抑制剂 G15 对 E2 刺激乳腺癌细胞增殖能力的影响 以 P13 乳腺癌细胞为研究细胞,以 MCF-7 细胞作为阳性对照细胞,将 2 种细胞培养分为 G15 抑制组和 E2 刺激组, G15 抑制组细胞先用 10 μ mol/L G15 预处理 1 h,两组细胞加入 50 nmol/L E2 刺激 24 h,采用平板克隆形成实验观察 2 组细胞增殖水平的变化。平板克隆形成实验,将细胞转化细胞、MCF-7 细胞分别接种于 6 cm 皿中,使细胞分散均匀,置培养箱中培养 1 周;当培养皿中出现大于 20 个细胞的克隆数时终止培养,弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 3 次,4% 甲醛固定细胞,弃去固定液;加适量 0.1% 结晶紫染色液,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥,计数克隆,克隆形成率 = (克隆数 \div 接种细胞数) \times 100%,将对照组数据设为 100%。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 11.9 统计软件进行数据分析。数据以均数 \pm 标准差表示。两独立样本组间分析采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 E2 诱导 MCF-10A 恶性转化的细胞模型建立

E2 诱导 MCF-10A 细胞形态分别用 DMSO 和 E2 刺激正常乳腺上皮细胞 MCF-10A,每周传代 1~2 次,连续刺激至 P13 时在显微镜下观察,发现与 DMSO 组比较, E2 处理组细胞接触抑制消失,细胞胞体变大,出现克隆小球见图 1。E2 诱导 MCF-

10A 细胞在裸鼠体内成瘤将 DMSO 处理的 P13 细胞和 E2 处理的 P13 细胞分别接种在裸鼠乳房垫上,接种 1 周后观察裸鼠接种部位成瘤情况。成瘤实验显示,DMSO 处理组 P13 注射处无肿块形成(0/5),而 E2 处理组 P13 注射处有肿块形成(7/10)见图 2。

2.2 E2 刺激组和 G15 抑制组细胞增殖能力

平板克隆形成实验中发现,与 DMSO 组相比,E2 组细胞克隆率明显增加,转化细胞增加($59.73 \pm 7.37\%$ 、MCF-7 细胞组增加($63.72 \pm 2.07\%$),差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。与 E2 组相比,G15 抑制组细胞克隆形成率明显减少,MCF-10A 转化细胞减少了($52.67 \pm 4.51\%$) ($P < 0.01$)、MCF-7 细胞减少了($43.78 \pm 5.66\%$) ($P < 0.05$),差异有统计学意义,见图 4。

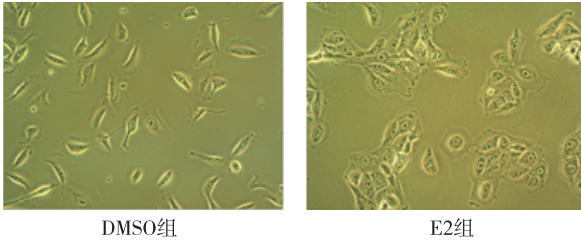
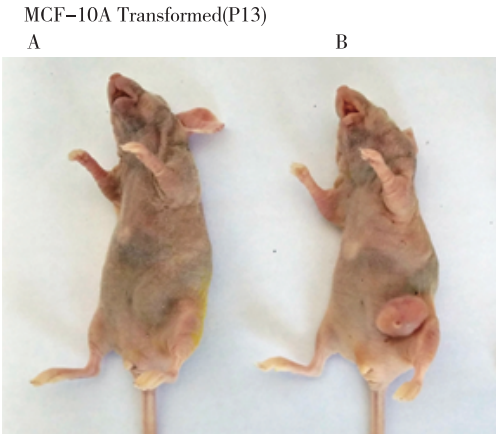


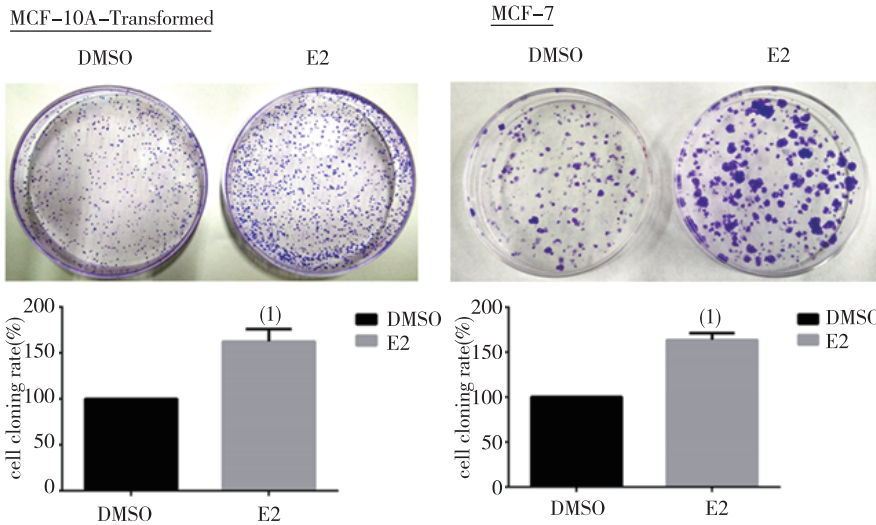
图 1 MCF-10A 细胞形态变化 (200 ×)
Fig. 1 Changes in morphology of MCF-10A cells



注:A 为 DMSO-P13 裸鼠未成瘤, B 为 E2-P13 裸鼠成瘤
图 2 恶性转化细胞在裸鼠体内成瘤
Fig. 2 Malignant transformed cells become tumorous in nude mice

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率占女性恶性肿瘤之首,每年全世界约有 130 万人被诊断为乳腺癌,近 40 万人死于该病,目前,全世界乳腺癌发病率正在以每年 3% 的速度快速递增,患者群也日趋年轻化^[12-13]。乳腺癌严重危害着女性的身形健康,因此探寻预防、治疗乳腺癌的有效方法是



⁽¹⁾ 与 DMSO 组比较, $P < 0.05$

图 3 E2 促进转化细胞的增殖能力(平板克隆形成实验)
Fig. 3 E2 promoted the proliferation of transformed cells

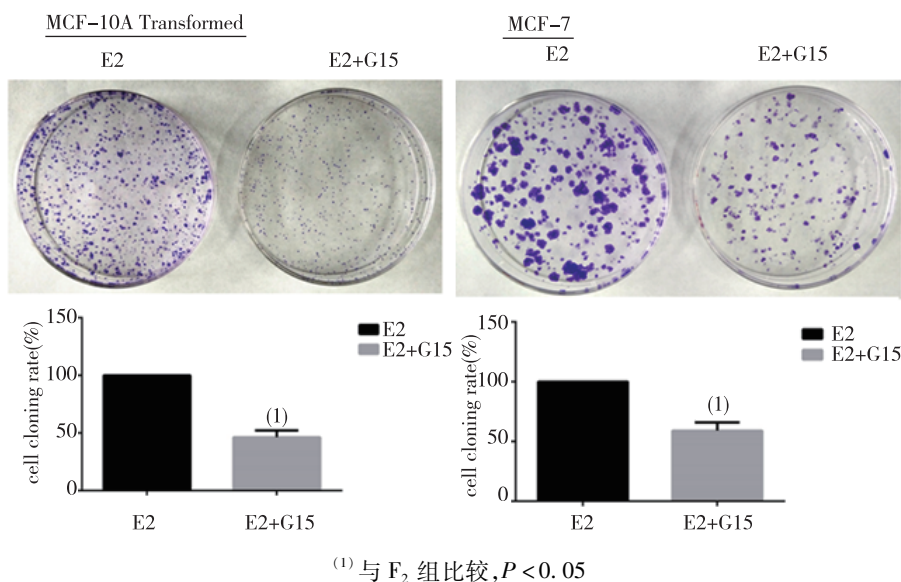


图4 G15抑制E2刺激转化细胞的增殖能力(平板克隆实验)

Fig. 4 G15 inhibited the proliferation of E2-stimulated transformed cells

当务之急。有研究认为,E2 信号通路可激活相关基因来刺激乳腺细胞不断增殖,增加 DNA 复制错误率,产生基因损伤或突变,从而引发细胞的恶性转化并最终导致肿瘤的发生^[14]。也有研究发现 E2 可引起乳腺正常细胞的恶性转化,而乳腺上皮细胞的恶性转变是乳腺肿瘤发生的主要原因^[15]。已经证实 E2 能够刺激乳腺上皮细胞增殖,促进导管延伸和形态发生变化^[16]。本研究采用 E2 连续刺激乳腺上皮细胞 MCF-10A 至 13 代,发现细胞形态发生明显变化:接触抑制消失,细胞胞体变大,出现克隆小球;并且在裸鼠体内能够成瘤,提示 E2 诱导乳腺正常细胞恶性转化的细胞模型成功建立。

MCF-7 是常用的乳腺癌细胞系,在 E2 的作用下能够增加其增殖、迁移、侵袭等能力,促进乳腺癌的恶性进展。目前关于乳腺癌离体研究多采用细胞系进行,本实验采用自制的 P13 代恶性转化细胞为研究对象,同时以 MCF-7 细胞为对照,研究 E2 对转化细胞增殖的影响及 GPER 是否参与其中。E2 通过特异性结合并激活其受体进行信号传递,广泛调控机体的各种生物学功能。E2 与 ER α 、ER β 结合后,启动特异基因的转录和翻译、合成功能蛋白质,从而诱导多种生物学效应^[17]。人们发现 ER α 、ER β 并不足以解释雌激素诱导的所有生物学效应。新型雌激素受体 GPER 除了可促进乳腺发育作用之外,还能促进乳腺癌细胞增殖,体外研究已经证明 GPER 可以调节乳腺癌细胞增殖,但

其作用机制仍然不清楚^[18]。细胞过度增殖是肿瘤发生和发展的关键因素。在卵巢癌细胞系中发现,E2 可增加细胞侵袭能力,并且上调基质金属蛋白酶 9(MMP-9),靶向敲低 GPER 可抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力,同时降低 MMP-9 表达活性,说明 GPER 通过增加 MMP-9 的表达来促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭,GPER 在卵巢癌进展中起重要作用^[19]。目前,GPER 在乳腺癌中的作用现在还存在争议,有研究发现 GPER 对 ER 阳性乳腺癌细胞系和 ER 阴性乳腺癌细胞系起抑制增殖作用^[20];而同样是这两个细胞系,又有研究发现 GPER 对 ER 阳性细胞系的增殖起到抑制作用,对 ER 阴性细胞系的增殖却是促进作用^[21]。为此,本实验采用 GPER 特异性抑制剂 G15 预处理转化细胞和 MCF-7 细胞,发现 G15 均能够抑制 E2 刺激的转化细胞和 MCF-7 细胞的增殖效应,提示 GPER 参与介导转化细胞的增殖效应。这为肿瘤的防治提供了新思路。

4 参考文献

- [1] 曾佳佳,杨润祥,刘蓉. 乳腺癌的靶向治疗研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2016,(1):7-11.
- [2] BINNS C, LOW W Y, LEE M K. Breast cancer: an increasing public health problem in the Asia pacific region[J]. Asia Pac J Public Health, 2013,25 (5): 364-367.

[3] STRÖM J O, THEODORSSON A, INGBERG E, et al. Ovariectomy and 17 β -estradiol replacement in rats and mice; a visual demonstration [J]. J Vis Exp, 2012, (64):e4013.

[4] SANTEN R J, YUE W, WANG J P. Estrogen metabolites and breast cancer[J]. Steroids, 2015, 99(PtA):61–66.

[5] ZHOU X, WANG S, WANG Z, et al. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer[J]. J Clin Invest, 2015, 125(5):2123–2125.

[6] YIP C H, RHODES A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. Future Oncol, 2014, 10(14):2293–2301.

[7] JIA M, DAHLMAN-WRIGHT K, GUSTAFSSON J A. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015, 29(4):557–568.

[8] LAPPANO R, PISANO A, MAGGIOLINI M. GPER Function in Breast Cancer: An Overview[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, (5):66.

[9] PANDEY D P, LAPPANO R, ALBANITO L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF[J]. EMBO J, 2009, 28(5):523–532.

[10] ARIAZI E A, BRAILOIU E, YERRUM S, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(3):1184–1194.

[11] 杨莉, 朱筑霞, 刘晓红, 等. 钙蛋白酶在乳腺上皮转化细胞对雌激素刺激反应中的作用[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(7):819–823.

[12] LU W L, LI H X, QIAN B Y, et al. The clinical characteristics and prognosis of Chinese early stage breast cancer patients: a retrospective study[J]. Breast J, 2010, 16(3):331–333.

[13] BINNS C, LOW W Y, LEE M K. Breast cancer: an increasing public health problem in the Asia pacific region [J]. Asia Pac J Public Health, 2013, 25(5):364–367.

[14] 谢辛慈, 吴佳, 潘芬芬, 等. 雌激素受体与肿瘤发生的研究进展[J]. 药物生物技术, 2015, 22(2):156–159.

[15] HEMACHANDRA L P, PATEL H, CHANDRASENA R E, et al. SERMs attenuate estrogen-induced malignant transformation of human mammary epithelial cells by up-regulating detoxification of oxidative metabolites [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2014, 7(5):505–515.

[16] SCALING A L, PROSSNITZ E R, HATHAWAY H J. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast[J]. Horm Cancer, 2014, 5(3):146–160.

[17] CATALANO S, BARONE I, ANDÒ S. Rapid estrogen effects on aromatase phosphorylation in breast cancer cells [J]. Methods Mol Biol, 2014, 12(4):155–163.

[18] KUMAR A, BEAN L A, RANI A, et al. Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice[J]. Hippocampus, 2015, 25(12):1556–1566.

[19] YAN Y, LIU H, WEN H, et al. The novel estrogen receptor GPER regulates the migration and invasion of ovarian cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 378(1–2):1–7.

[20] WEIBENBORN C, IGNATOV T, POEHLMANN A, et al. GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(4):663–671.

[21] ARIAZI E A, BRAILOIU E, YERRUM S, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(3):1184–1194.

(2018-03-15 收稿, 2018-05-27 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 624 页)

[21] 刘晓红, 王筑婷, 李 阳, 等. 钙激活中性蛋白酶介导雌激素增强 MCF-7 乳腺癌细胞的存活力[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(7):799–803.

[22] 武春兰, 李 阳, 刘晓红, 等. 雌二醇通过钙离子/钙激活中性蛋白酶通路诱导乳腺癌细胞迁移及 FAK 蛋白剪切[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(9):1041–1045.

[23] 曹洋, 王旭东, 丁姗姗, 等. 细胞外信号调节蛋白激酶/钙激活中性蛋白酶快速通路参与介导 17- β 雌二醇诱导的人乳腺癌细胞增殖[J]. 肿瘤, 2011, 31(2):126–130.

[24] 杨莉, 朱筑霞, 刘晓红, 等. 钙蛋白酶在乳腺上皮转化细胞对雌激素刺激反应中的作用[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(7):819–823.

[25] JEONE K H, YU H V, KWON Y. Hyperactivated m-calpain affects acquisition of doxorubicin resistance in breast cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1862(5):1126–1133.

[26] STORR S J, LEE K W, WOOLSTON C M, et al. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer [J]. Ann Oncol, 2012, 23(9):2289–2296.

[27] 于庆龙, 张莹, 王宏健, 等. 17 β -雌二醇对乳腺癌细胞迁移的影响及 CANP-FN 通路的介导作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(10):1371–1376.

(2018-03-26 收稿, 2018-05-17 修回)
编辑: 刘 平