

钙蛋白酶 2 介导雌激素调控乳腺肿瘤细胞 *GREB1* 基因表达*

郭 阳**, 金 爱, 杨 莉, 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: 探讨钙蛋白酶 2 (CANP2) 对 17 β -雌二醇 (E2) 刺激 MCF-10A 转化细胞增殖能力、*GREB1* 基因表达的影响及其机制。方法: 以乳腺癌 MCF-10A 转化细胞为研究模型, 乳腺癌 MCF-7 细胞为阳性对照, 采用 E2 (50 nmol/L) 刺激 2 种细胞 24 h 后, 平板克隆方法观察细胞的增殖能力; 以 0.1% 的二甲基亚砜 (DMSO) 刺激 MCF-10A、MCF-7 细胞作为阴性对照组, 以 CANP 抑制剂 Calpeptin (Calp) 预处理 2 刺激的 MCF-10A 转化细胞 1 h 或 shRNA-CANP2 转染 2 刺激的 MCF-10A 转化细胞沉默基因表达, 同时设立 E2 对照组和转染空载体 E2 对照组, 采用 qRT-PCR 检测细胞中 *GREB1* 基因表达水平, 平板克隆方法观察细胞的增殖能力。结果: 与阴性对照比较, E2 能上调 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞中 *GREB1* 基因表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 E2 对照组比较, Calpeptin 能抑制 E2 上调 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞的 *GREB1* 基因表达, 并促进细胞的增殖 ($P < 0.01$); 与转染空载体 E2 对照组相比, shRNA-CANP2 基因沉默能使 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞增殖能力减弱 ($P < 0.01$), 并抑制 E2 刺激的 MCF-10A 转化细胞中 *GREB1* 表达的上调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: 可能通过 CANP2 E2 诱导恶性转化乳腺上皮细胞 *GREB1* 基因的表达和细胞生长。

[关键词] 雌激素; 钙蛋白酶 2; *GREB1*; 转化乳腺细胞; 细胞生长

[中图分类号] R737.9; R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707 (2018) 06-0630-06
DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.003

Regulation of *GREB1* Gene Expression in Breast Tumor Cells by Calpain 2 Mediated Estrogen

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

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

[Abstract] Objective: To investigate the effect of calpain 2 (CANP2) on the expression of *GREB1* gene in MCF-10A transformed cells stimulated by 17 β -estradiol (E2) and its mechanism. **Methods:** E2-transformed MCF-10A mammary epithelial cells and MCF-7 breast cancer cells were used as model cells, calpain inhibitor calpeptin or calpain2. Using MCF-10A transformed cells of breast cancer as research model and MCF-7 cells of breast cancer as positive control, the proliferation ability of two kinds of cells was observed by plate cloning method after 24 h stimulation of two kinds of cells by E2 (50 nmol/L). MCF-7 cells were stimulated with 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) as negative control group. CANP inhibitor Calpeptinine (Calp) was used to pretreat the 2-stimulated MCF-10A transformed cells for 1 h or shRNA-CANP2 transfected silencing gene expression in transformed cells induced by MCF-10A. Meanwhile, E2 control group and empty vector E2 control group were set up. QRT-PCR was used to detect the expression level of *GREB1* gene in the cells, and the proliferation a-

*[基金项目] 国家自然科学基金项目资助 (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.20180618.1502.018.html>

bility of the cells was observed by plate cloning method. **Results:** E2 can up-regulate the expression of GREB1 gene in MCF-10A transformed cells and MCF-7 cells compared with negative control ($P < 0.01, P < 0.05$). Compared with E2 control group, Calpeptin inhibited E2 up-regulation of GREB1 gene expression in MCF-10A transformed cells and MCF-7 cells, and promoted cell proliferation ($P < 0.01$). Compared with the blank vector E2 control group, the silencing of shRNA-CANP2 gene decreased the proliferative ability of MCF-10A transformed cells and MCF-7 cells ($P < 0.01$), and inhibited the up-regulation of GREB1 expression in MCF-10A transformed cells stimulated by E2 ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** CANP2 E2 can induce the expression of GREB1 gene and cell growth in breast epithelial cells.

[**Key words**] estrogen; calpain 2; GREB1; transformed mammary gland cells; cell growth

雌激素 (estrogen, E2) 是女性性荷尔蒙家族成员,也是类固醇激素类,在体内有着非常广泛的作用^[1]。研究显示,E2 在乳腺癌的发生和发展过程中有着重要的促进作用,可促进乳腺癌的恶性演进^[2-3]。新型雌激素调节基因 (growth regulation by estrogen in breast cancer 1, GREB1) 已被证实是 E2 依赖性乳腺癌的靶基因,属于早期应答基因,是 E2 刺激乳腺癌细胞生长的关键调节因子^[4]。研究发现, GREB1 是 E2 诱导肿瘤进展的靶向基因,在肿瘤进展中有促增殖作用^[5-6], E2 可通过 miR-26 新型靶基因 GREB1 参与调节 E2 促进的细胞增殖^[7]。已经确定 GREB1 是 ER 共激活因子,在一半的 ER (+) 原发性乳腺癌中, GREB1 与 ER 可相互作用^[8]。Chand 等^[9]发现 LRH-1 可调节乳腺癌细胞中 E2 对 GREB1 基因的表达,敲除 GREB1 基因能降低癌细胞体外增殖率、提高体内移植癌细胞的小鼠存活时间^[8]。钙激活中性蛋白酶 (calcium-activated neutral protease, CANP) 属于 Ca^{2+} 依赖性的半胱氨酸蛋白酶水解家族,是 GPER 重要的下游信号分子^[10-11]。本课题组前期研究表明, E2 可上调并激活 CANP,从而影响乳腺癌细胞的增殖^[11]; 乳腺上皮细胞发生转化后,常常伴有钙蛋白酶 CANP 的活性增强^[12],对 CANP 是否参与 E2 刺激肿瘤细胞 GREB1 基因表达上调,目前尚未见文献报道。本研究采用 E2 刺激 MCF-10A 细胞转化,再采用 CANP 抑制剂 Calpeptin 或 shRNA-CANP2 沉默 CANP 基因表达后,观察 GREB1 基因的表达水平和细胞增殖能力的变化。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂

MCF-10A 转化细胞为本研究组制备,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 及 CANP 抑制剂 Calpeptin 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,sh-RNA 干扰慢病毒购自上海吉玛公司,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,RT-PCR 试剂盒购自美国 Takara Bio 公司。GREB1 的上游引物序列 (21 bp) 为 5'-CTGTACCACA GACGGGTTTTG-3',下游引物序列 (21 bp) 为 5'-TTCCGTGAAGTAA-CAGA AGCC-3', GAPDH 上游引物序列 (21 bp) 为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物序列 (23 bp) 为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3',均由 invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MCF-10A 转化细胞 MCF-10A 细胞培养于 F12 完全培养液 (10% 马血清、10 $\mu\text{g/L}$ 霍乱毒素、10 mg/胰岛素、50 $\mu\text{g/L}$ 氢化可的松、20 $\mu\text{g/L}$ 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 (10% 胎牛血清、1% 青/链霉素),培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、潮湿环境、5% CO_2 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 shRNA 转染敲减 CANP2 表达 转染前 1 d,将 5×10^4 个/孔的 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞铺至 24 孔板,每孔加入 500 μL 完全培养基,待细胞贴壁,加入稀释液、Polybrene (5 mg/L) 和慢病毒原液到每孔中,24 h 后更换新的完全培养基,加入 Puromycin 进行筛选 24 h。待细胞达到检测满度进行 western blot 检测转染效率。

1.2.3 Calpeptin 或 sh-RNA 转染对 E2 刺激乳腺癌细胞增殖能力的影响 以 MCF-10A 转化细胞为研究细胞,以 MCF-7 细胞作为阳性对照细胞,将 2 种

细胞先用 Calpeptin (10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h 或 sh-RNA 转染敲减 CANP2 的表达,2 组细胞再加入 E2 (50 nmol/L) 刺激 24 h,采用平板克隆形成实验观察细胞增殖水平的变化。具体操作为:将 200 个 MCF-10A 转化细胞、300 个 MCF-7 细胞分别接种于直径 6 cm 培养皿中,使细胞分散均匀,细胞培养箱中培养 1 周;当培养皿中出现 >20 个细胞克隆数时终止培养,弃去旧培养液,用 PBS 小心浸洗 3 次,4% 甲醛固定,适量 0.1% 结晶紫染色液染色,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%,再将对照组数据设为 100%,实验组得到相应百分数数据即为克隆形成率。

1.2.4 Calpeptin 或 sh-RNA 转染对 E2 刺激乳腺癌细胞 GREB1 基因表达的影响 以 MCF-10A 转化细胞为研究细胞,以 MCF-7 细胞作为阳性对照细胞,将 2 种细胞先用 Calpeptin (10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h 或 sh-RNA 转染敲减 CANP2 的表达,2 组细胞再加入 E2 (50 nmol/L) 刺激 24 h,采用荧光实时定量 PCR 实验观察细胞 GREB1 基因表达水平的变化。具体操作为:细胞处理 24 h 后,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,离心并用 PBS 洗 1 次,弃上清液,每只离心管加 1 mL 的 Trizol,混匀后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,按 Trizol 试剂说明书提取各组总 RNA,沉淀用 Rnase-free H_2O 溶解,并检测 A260/A280 处 OD 值,判断 RNA 的纯度、计算 RNA 浓度;按 cDNA 第

1 链合成试剂盒说明书合成 cDNA,PCR 扩增体系为 20 μL ,各组分见表 1。扩增反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 时进行预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 时变性 5 s,共 40 个循环,温度到达 60 $^{\circ}\text{C}$ 时退火 31 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。结果用 GraphPad Prism 6.02 软件处理。PCR 扩增体系:用 96 孔板,每孔按照 20 μL 。将所得的 cDNA 产物与配置的 PCR 反应液(反应液的配制应在冰上进行)进行扩增。扩增反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 时进行预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 时变性 5 s,共 40 个循环,温度到达 60 $^{\circ}\text{C}$ 时退火 31 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。结果用 GraphPad Prism 6.02 软件处理。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计,采用 GraphPad Prism6.02 软件进行统计制图,结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两独立样本组间分析采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 E2 刺激细胞 GREB1 基因表达上调

结果如图 1 所示,与 DMSO 组比较,E2 可刺激 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞 GREB1 基因表达上调,表达分别增加 (114.04 \pm 7.28)%、(52.02 \pm 5.39)%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

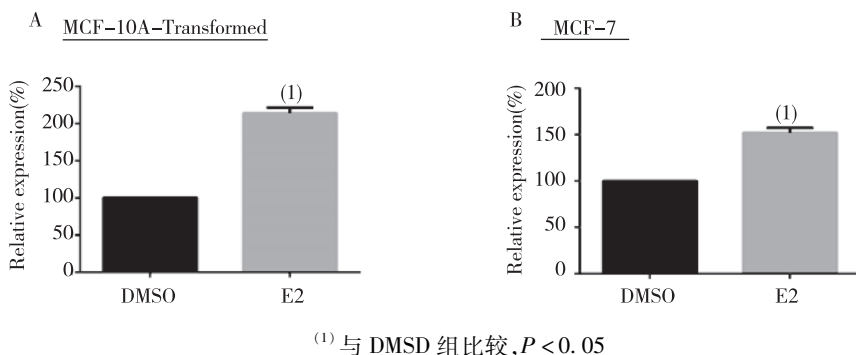


图 1 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞 GREB1 基因表达上调 (MCF-7 为阳性对照)

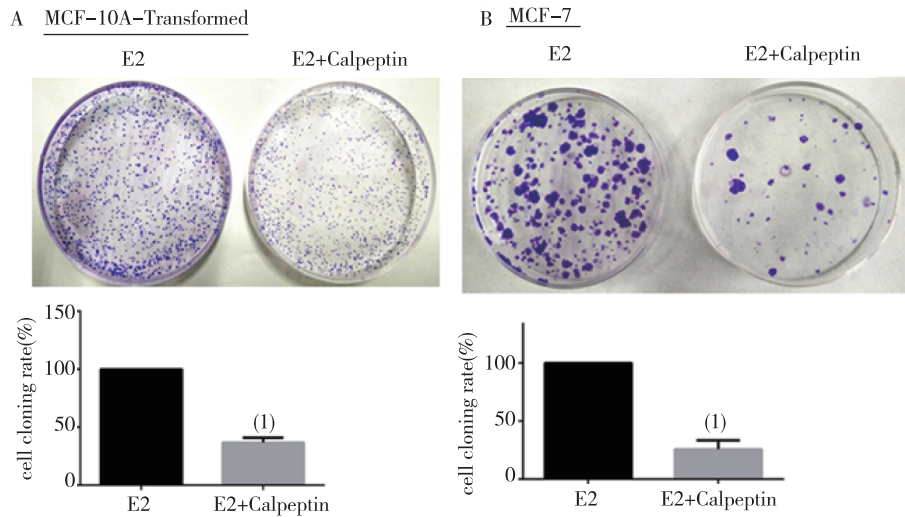
Fig.1 E2-stimulated up-regulation of GREB1 gene expression in MCF-10A transformed cells (MCF-7 as positive control)

2.2 Calpeptin 对 MCF-10A 转化细胞增殖能力及 GREB1 基因表达的影响

2.2.1 Calpeptin 抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞增殖能力

如图 2 所示,Calpeptin (10 $\mu\text{mol/L}$) 预

处理可明显抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7 细胞的克隆形成率,分别降低了 (57.80 \pm 8.62)% 和 (83.48 \pm 6.07)%,与 E2 刺激组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



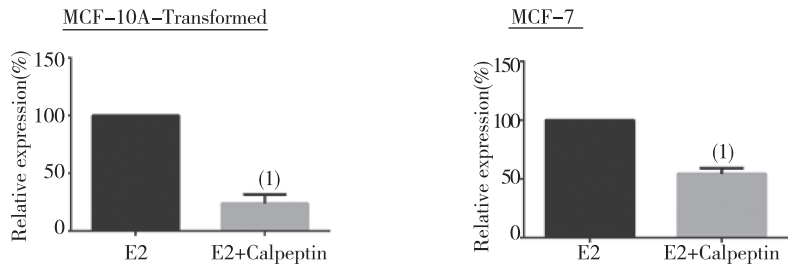
(¹) 与 E2 组比较, $P < 0.05$

图 2 Calpeptin 抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞增殖能力

Fig. 2 Inhibitory of Calpeptin on the proliferation of MCF-10A transformed cells stimulated by E2

2.2.2 Calpeptin 抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞 *GREB1* 基因表达 如图 3 所示, Calpeptin 预处理可明显抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞和 MCF-7

细胞 *GREB1* 基因的表达上调, 与对照组相比, 基因表达降低了 (76.12 ± 7.79) 和 $(46.39 \pm 7.02)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



(¹) 与 E2 组比较, $P < 0.05$

图 3 Calpeptin 抑制 E2 刺激 MCF-10A 转化细胞 *GREB1* 基因表达

Fig. 3 Inhibitory of Calpeptin on the *GREB1* gene expression of MCF-10A transformed cells stimulated by E2

2.3 shRNA-CANP2 对 MCF-10A 转化细胞增殖能力及 *GREB1* 基因表达的影响

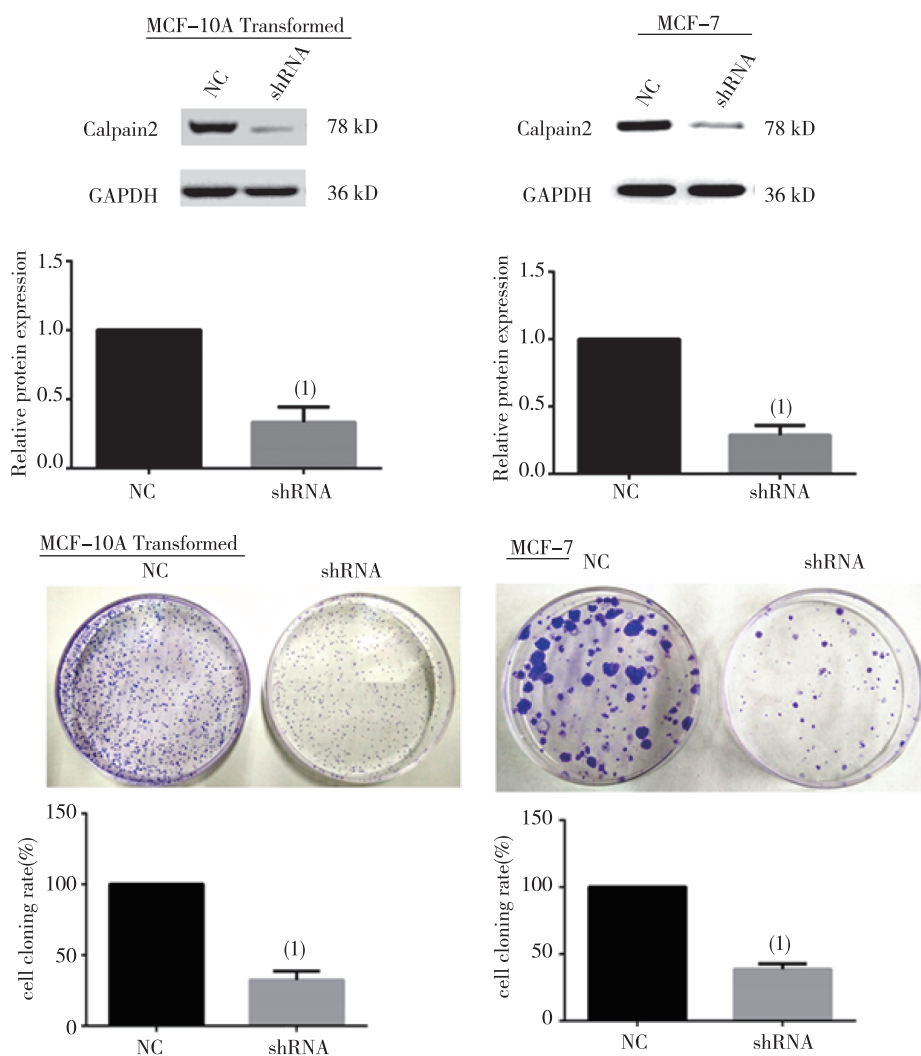
2.3.1 shRNA-CANP2 转染抑制 E2 刺激的 MCF-10A 转化细胞增殖能力 shRNA-CANP2 转染后, E2 刺激的 MCF-10A 转化细胞中 CANP2 蛋白表达抑制率约 70%; 平板克隆实验显示, 与 NC 空载对照组相比, CANP2 敲减组 MCF-10A 转化细胞克隆形成率较 NC 空载对照组降低 $(68.33 \pm 9.23)\%$, 阳性对照乳腺癌 MCF-7 细胞克隆形成率较 NC 空载对照组降低 $(61.38 \pm 4.11)\%$, 与 NC 空载对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 见图 4。

2.3.2 shRNA-CANP2 转染抑制 E2 刺激的 MCF-

10A 转化细胞 *GREB1* 基因上调 如图 5 所示, 在 MCF-10A 转化细胞或 MCF-7 细胞中敲减 CANP2 基因表达可以抑制 E2 刺激的 *GREB1* 表达上调, MCF-10A 转化细胞较对照组降低了 $(62.35 \pm 6.20)\%$, MCF-7 细胞较对照组降低了 $(41.61 \pm 3.76)\%$, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

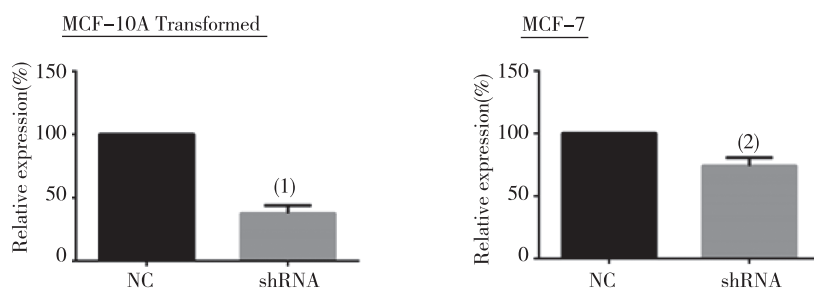
E2 通过刺激增殖细胞核抗原 (PCNA)/增殖相关抗原 Ki-67 的表达来增强乳腺癌细胞的增殖能



(1) 与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 4 shRNA-CANP2 抑制 E2 刺激的 MCF-10A 转化细胞增殖能力

Fig. 4 Inhibitory of shRNA-CANP2 on the proliferation of MCF-10A transformed cells stimulated by E2



(1) 与 NC 组比较, $P < 0.05$

图 5 shRNA-CANP2 抑制 E2 刺激的 MCF-10A 转化细胞 GREB1 基因表达上调

Fig. 5 Inhibitory of shRNA-CANP2 on the up-regulation of GREB1 gene expression of MCF-10A transformed cells stimulated by E2

力^[15],对于 E2 促进肿瘤细胞增殖的相关分子,研究者用微阵列分析鉴定了卵巢癌中 197 个 E2 上调基因和 55 个 E2 下调基因,发现上调基因中表达最明显的就是 *GREB1* 基因,它可能是肿瘤促进因子和 E2 刺激肿瘤生长的潜在介质^[5]。在人卵巢癌小鼠模型中,E2 处理组的 *GREB1* 基因表达上调,表明 *GREB1* 在人卵巢肿瘤进展中发挥作用^[5];E2 能够促进乳腺癌细胞增殖以及促进乳腺细胞增殖相关的基因 *GREB1* 表达上调,在乳腺癌细胞中敲除 *GREB1* 基因,发现细胞在琼脂糖中生长速度减慢^[6-10,16]。还有研究发现,*GREB1* 不仅可以和 ER 相互作用,在前列腺癌组织和细胞中,*GREB1* 参与前列腺癌细胞的增殖作用,雄激素可以抑制 *GREB1* 基因表达从而阻断雄激素诱导生长的作用^[11-14,17]。本研究采用转化细胞进行 PCR 实验,发现与对照组相比,E2 上调转化细胞、MCF-7 细胞 *GREB1* 基因表达,提示 E2 上调转化细胞 *GREB1* 基因表达。

CANP 属于 Ca^{2+} 依赖性的半胱氨酸蛋白酶水解家族。CANP 在细胞增殖、迁移、信号传导等方面发挥作用^[18]。CANP 可通过对蛋白进行剪切修饰,从而参与调控多种蛋白的生物学活性,在细胞骨架重构、神经发育、细胞周期调控与凋亡、细胞信号转导等生理过程中有重要作用。本课题组前期研究发现,E2 诱导的转化细胞出现明显 FAK 蛋白剪切,Calp 可阻断 E2 诱导转化细胞迁移和 FAK 蛋白剪切^[12],且在乳腺癌细胞和组织中,CANP 激活后能够引起 FAK 和周期蛋白(cyclin E)出现蛋白剪切^[11,18],提示在乳腺上皮转化细胞存在活跃的 E2-CANP-FAK 信号活动。然而 CANP 是否介导 E2 刺激 *GREB1* 基因表达上调,目前尚未有相关报道。本实验用 Calpeptin 预处理转化细胞,发现 E2 诱导的 *GREB1* 基因表达上调及细胞增殖受到明显抑制;在 MCF-7 细胞也观察到相似结果。已知 CANP 有 16 种亚型,其中 Calpain1 和 Calpain2 是最主要的同工酶^[19]。Calpeptin 可抑制 CANP1 和 CANP2,有文献报道,E2 通过上调 CANP1 基因能够激活 CANP,从而促进激素敏感性乳腺癌恶性演进^[18]。而 CANP2 在 MAPK 的介导下可以调节导管癌细胞迁移^[20],然而在乳腺癌细胞,E2 是否可通过其下游的 CANP2 来调控 *GREB1* 基因表达和细胞增殖,目前还未见文献报道,本研究采用 shRNA-CANP2 转染敲减转化细胞 CANP2 表达,发现 E2 刺激转化细胞和 MCF-7 细胞 *GREB1* 基因表达

上调和细胞增殖受到明显抑制。

综上,本研究采用 Calpeptin 抑制或 shRNA-CANP2 转染敲减转化细胞 CANP2 表达,发现 E2 刺激转化细胞和 MCF-7 细胞 *GREB1* 基因表达上调和细胞增殖受到明显抑制,推测 CANP2 介导了 E2 刺激的乳腺肿瘤细胞 *GREB1* 基因表达上调和细胞增殖。这为抑制肿瘤恶性进展,提供了新思路。

4 参考文献

[1] LAPPANO R, PISANO A, MAGGIOLINI M. GPER Function in Breast Cancer: An Overview[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014,6(5):66.

[2] ZHOU X, WANG S, WANG Z, et al. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer[J]. J Clin Invest, 2015,125(5):2123-2135.

[3] 李勇杰,于庆龙,潘际刚,等.酒精对乳腺癌细胞表皮生长因子受体-钙激活中性蛋白酶通路及细胞迁移的影响[J].中国癌症杂志,2016,26(10):820-825.

[4] GHOSH M G, THOMPSON D A, WEIGEL R J. PDZK1 and GREB1 are estrogen-regulated genes expressed in hormone-responsive breast cancer [J]. Cancer Res, 2000,168(11):6367-6375.

[5] LAVIOLETTE L A, HODGKINSON K M, MINHAS N, et al. 17 β -estradiol upregulates GREB1 and accelerates ovarian tumor progression in vivo [J]. Int J Cancer, 2014, 135(5):1072-1084.

[6] LIU M, WANG G, GOMEZ-FERNANDEZ C R, et al. GREB1 functions as a growth promoter and is modulated by IL6/STAT3 in breast cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e46410.

[7] TAN S, DING K, LI R, et al. Identification of miR-26 as a key mediator of estrogen stimulated cell proliferation by targeting CHD1, GREB1 and KPNA2[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(2):40.

[8] MOHAMMED H, DSANTOS C, SERANDOUR A A, et al. Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor[J]. Cell Rep, 2013, 3(2):342-349.

[9] CHAND A L, WIJAYAKUMARA D D, KNOWER K C, et al. The orphan nuclear receptor LRH-1 and ER α activate GREB1 expression to induce breast cancer cell proliferation [J]. PLoS One, 2012,7(2):e31593.

[10] ONO Y, SORIMACHI H. Calpains: an elaborate proteolytic system[J]. Biochim Biophys Acta, 2012 (1):224-236.