

17 β -雌二醇素对人三阴乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响*

张莹, 金爱, 王旭东**

(贵州医科大学 基础医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨 17 β -雌二醇素(E2)对人三阴乳腺癌(TNBC)细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制。方法: 以人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 468 细胞为模型细胞, 实验分为二甲基亚砷组(DMSO 组)、E2 组、E2 联合钙蛋白酶抑制剂(E2 联合 Cal)组及 E2 联合钙蛋白酶抑制剂Ⅲ组(E2 联合 CI Ⅲ组), 采用噻唑蓝(MTT)实验和平板克隆实验检测细胞增殖和克隆能力, 采用 V-FITC/PI 荧光凋亡试剂盒检测细胞程序性死亡, 采用蛋白印迹法检测细胞蛋白表达水平。结果: E2 组两种细胞的增殖率、菌落形成率均显著高于 DMSO 组($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$), 凋亡强度显著低于 DMSO 组, YAP 蛋白表达显著高于 DMSO 组($P < 0.05$); E2 联合 Cal 组和 E2 联合 CI Ⅲ组中两种细胞的增殖率、细胞菌落形成率均显著低于 E2 组($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$), 荧光凋亡强度显著高于 E2 组, YAP 蛋白表达均显著高于 E2 组($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$)。结论: E2 具有诱导模型细胞增殖、抵抗细胞凋亡的能力, Cal 和 CI Ⅲ可以阻断 E2 诱导的上述生物学效应, 提示 E2 可能通过 CANP-YAP 信号通路促进肿瘤细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 乳腺肿瘤; 雌二醇; 细胞增殖; 细胞凋亡; 钙蛋白酶; YES 相关蛋白

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)08-0886-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.004

Effect of 17 Beta-estradiol on Proliferation and Apoptosis of Human Triple Negative Breast Cancer Cells

ZHANG Ying, JIN Ai, WANG Xudong

(Department of Physiology, School of Basic Medicine of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 17 β -E2 on proliferation and apoptosis of TNBC and its mechanism. **Methods:** Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and 468 were used as model cells. The experimental groups were DMSO group, E2 group, E2 + calpeptin (E2 + Cal) group and E2 + calpain inhibitor III (E2 + CI III) group. MTT and plate cloning experiments were used to investigate cell proliferation and cloning ability; V-FITC/PI fluorescent apoptosis kit was used to detect programmed cell death; Western blot assay was used to detect the expression level of cell protein. **Results:** The proliferation rate and colony formation rate of two kinds of cells in E2 group were higher than that in DMSO group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the apoptotic intensity in E2 group was lower than that in DMSO group, the expression of YAP protein in E2 group was higher than that in DMSO group ($P < 0.05$); the proliferation rate and the colony formation rate of the two kinds of cells in E2 combined with Cal group and E2 combined with CIII group was lower than that of E2 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The fluorescent apoptotic intensity of two kinds of cells in E2 + Cal group and E2 + CIII group was significantly higher than that in E2 group, YAP protein expression was also higher than that of E2 group ($P < 0.05$, or $P < 0.01$). **Conclusions:** E2 could induce model cell proliferation, resist apoptosis, Cal and CI III could inhibit previously mentioned biological effect induced by E2; indicating E2 could promote tumor cell malignant activities by CANP-YAP signal channel.

[Key words] breast neoplasms; estrogen; cell proliferation; apoptosis; calpain; YES-associated protein

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660345, 31360252)

**通信作者 E-mail: 1157102188@qq.com

网络出版时间: 2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.004.html>

三阴乳腺癌(triple negative breast cancer, TN-BC)在各种乳腺癌亚型中具有较大的浸润性,经常发生局部复发和器官转移,是全世界女性最常见的恶性疾病之一^[1]。17β-雌二醇素(17β-Estradiol, E2)主要由卵巢分泌产生,是促进女性第二性征发育和性器官成熟的重要激素,能够促进 TN-BC 细胞的活性、增殖及转移^[2-3]。钙激活中性蛋白酶(calcium-activated neutral protease, CANP 或 Calpain)是 Ca²⁺ 依赖性的半胱氨酸蛋白酶水解家族,被某些特异性蛋白水解后可调节多种酶和蛋白质的生物学功能,并且在细胞增殖、信号转导等方面发挥着重要作用^[4-6]。目前已有研究显示, E2 可通过 CANP 介导多种癌细胞的周期蛋白水解、增殖及迁移,也可通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路介导 CANP2 影响 TNBC 的迁移及黏附^[7]。Hippo 信号通路首先在果蝇中发现,是由 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)和磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)调节^[8]; Yes 相关蛋白(yes-associated protein, YAP)是 Hippo 信号传导途径的主要下游因子,参与器官生长、组织修复,在多种恶性肿瘤中被广泛激活, YAP 过表达可以刺激肿瘤的发生和转移,因此 Hippo-YAP 信号通路已被认为是肿瘤发生和转移的重要因素^[9-10]。另有研究显示,干扰 YAP 基因的表达能有效抑制乳腺细胞的增殖并促进凋亡^[11],但 CANP 与 YAP 的相关性研究尚未见报道。因此,本研究通过细胞分子生物学手段,探讨 E2 对 TN-BC 细胞增殖和凋亡的生物学行为及 CANP-YAP 信号通路的介导作用,力图为探寻 TNBC 的临床有效治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料 人源乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 MDA-MB-468 分别购自中国科学院昆明细胞库及中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂 E2、钙蛋白酶抑制剂(calpeptin, Cal)、钙蛋白酶抑制剂Ⅲ(calpain Inhibitor Ⅲ, CI Ⅲ)、噻唑蓝(methylthiazolydiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司, YAP 抗体购自美国 CST 公司, 蛋白内参(glyceraldehyde-3-phosphate dehy-

drogenase, GAPDH)抗体购自中国巴傲德生物科技有限公司, 羊抗小鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP 购自美国 Santa Cruz 公司, 全细胞裂解液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)、蛋白酶抑制剂(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)及 BCA 蛋白定量试剂盒(bicinchoninic acid, BCA)购自中国碧云天生物技术有限公司, 广谱磷酸酶抑制剂混合物和广谱蛋白酶抑制剂混合物购自中国博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 及 MDA-MB-468 细胞均采用含有 10% 血清和 1% 青霉素-链霉素的 L-15 培养基, 在 25 cm² 不透气培养瓶于 5% CO₂ 的 37 ℃ 恒温无菌细胞培养箱中隔绝培养 48 h。

1.2.2 实验分组 实验分为 4 组, DMSO 组加 1% DMSO 处理细胞, E2 组用 10 nmol/L E2 处理细胞, E2 联合 Cal 组在用 10 μmol/L Cal 预处理细胞 2 h 后、再加入 10 nmol/L E2 处理细胞, E2 联合 CI Ⅲ 组在用 10 μmol/L CI Ⅲ 预处理细胞 2 h 后、再加入 10 nmol/L E2 处理细胞。

1.2.3 MTT 实验 取所有细胞以每孔 8 000 个细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中, 待 48 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 放回细胞培养箱孵育 3 h, 弃上清, 每孔再加 DMSO 150 μL, 室温下适当摇晃孵育 20 min 至甲臞完全溶解, 采用酶标仪测定每个孔 490 nm 处的吸光度值。所有过程均避光操作。

1.2.4 细胞平板克隆形成试验 收集生长状态良好的两种细胞, 按每孔 200 个细胞接种于 6 孔板中。按照实验分组 1.2.2 加药处理, 于细胞培养箱中培养 2~3 周, 培养板中有明显细胞集落时停止培养; 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% 结晶紫水染色 10 min, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗去非细胞染色, 自然晾干后 10 倍物镜下拍照计数, 并计算克隆形成率[克隆形成率(%) = 克隆数/200 × 100%]。

1.2.5 细胞凋亡试验 用无乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的 0.25% 胰酶消化收集 1.2.2 项下加药处理的细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 按照凯基 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明操作, 加入重悬分散细胞 500 μL, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 充分混匀低温静置 5 min, 再加入碘化丙啶 5 μL 震荡混匀、避光孵育 5~15 min, 1 h 内在倒置荧光显微镜下随机取 4 个视野拍

照记录,并用 Image J 软件检测荧光强度。

1.2.6 蛋白印迹(Western blot)检测 所有细胞培养到细胞生长对数期时,加入新鲜配置的全细胞裂解液(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂:多种蛋白酶抑制剂=100:1:1:1)充分裂解细胞,置于冰上水平振摇 20 min;用刮刀收取总蛋白后采用 BCA 法测定蛋白浓度,以 30 μ g 蛋白上样,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)至溴酚蓝条带到玻板下缘 1 cm 处,在 300 mA 恒定电流下将分离蛋白转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5% 伊利脱脂奶粉室温封闭 2 h,按实验要求稀释抗体大肿瘤抑制基因(large tumor suppressor gene 1, LATS1)(1:5 000)、YAP(1:1 000)、GAPDH(1:10 000),4 $^{\circ}$ C 摇晃孵育过夜;磷酸盐缓冲液(tris-buffered saline tween, TBST)每 10 min 洗膜 3 次,加入相应二抗(1:4 000)室温振摇孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次;将化学发光试剂均匀滴加到 PVDF 膜上, Syngene Imaging 系统进行成像,条带灰度处理分析目的蛋白表达量[目的蛋白表达量=目的条带的光密度

(optical density, OD)/内参 OD \times 100%],实验结果重复 3 次。

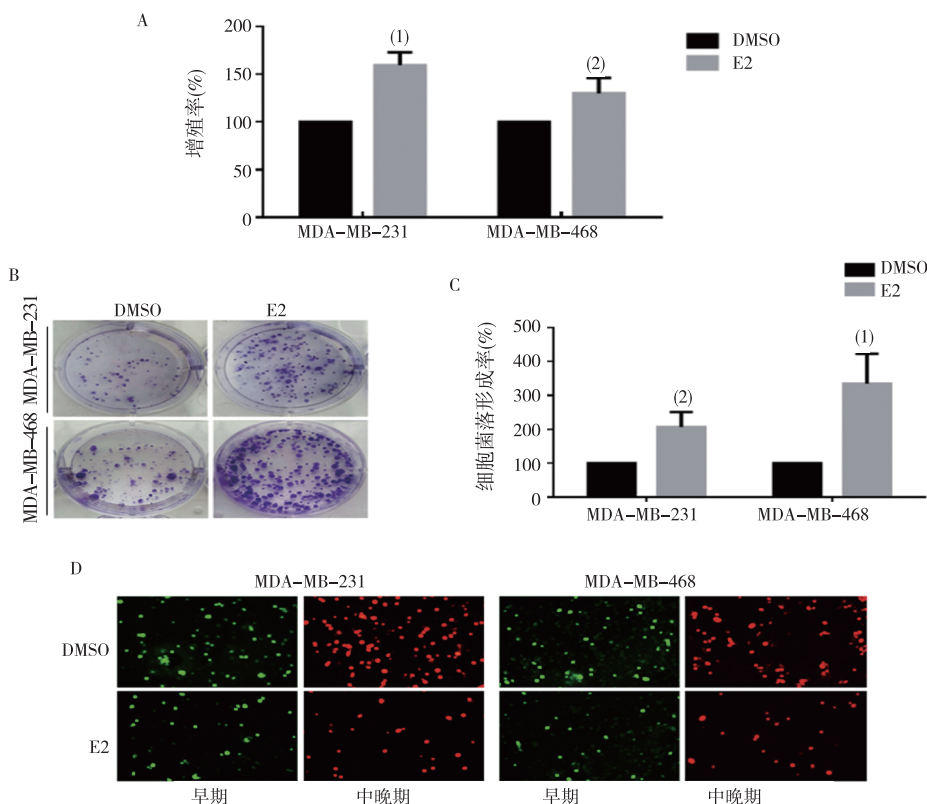
1.3 统计学方法

利用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行统计分析,所有结果以($\bar{x} \pm s$)表示,多样本采用单因素方差分析,组内比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E2 对 MDA-MB-231 及 468 细胞增殖和凋亡的影响

MTT 实验结果显示, E2 组 MDA-MB-231 及 468 细胞的增殖率均显著高于 DMSO 组,差异有统计学意义($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$), 见图 1A; 细胞平板克隆形成试验结果显示, E2 组 MDA-MB-231 及 468 细胞的菌落形成率均显著高于 DMSO 组,差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1B、1C; 细胞凋亡试验结果显示, E2 组 MDA-MB-231 及 468 细胞荧光凋亡强度显著低于 DMSO 组($P < 0.05$), 见图 1D。



注: A 为 MTT 实验, B 为平板克隆实验, C 为平板克隆实验的直条图, D 为荧光凋亡实验; 与 DMSO 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.05$ 。

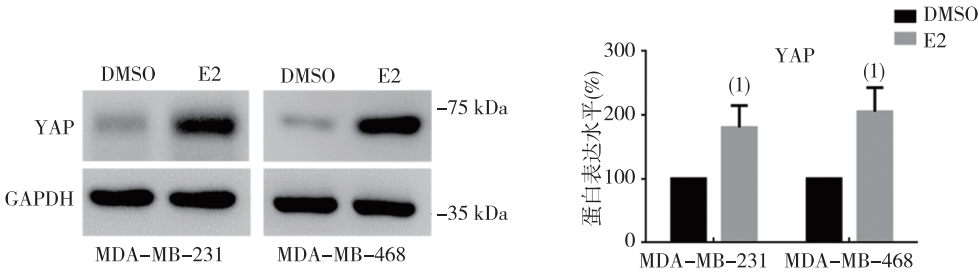
图 1 E2 对 MDA-MB-231 及 468 细胞增殖率和凋亡的影响

Fig. 1 Effect of E2 on proliferation and apoptosis of MDA-MB-23 and 468 cells

2.2 E2 对 MDA-MB-231 及 468 细胞的 YAP 蛋白表达的影响

蛋白印迹检测结果显示,E2 组 MDA-MB-231、

468 细胞中 YAP 蛋白表达显著高于 DMSO 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。提示 E2 能上调 MDA-MB-231 和 468 细胞 YAP 表达。



注:⁽¹⁾与 DMSO 组比较, $P < 0.05$ 。

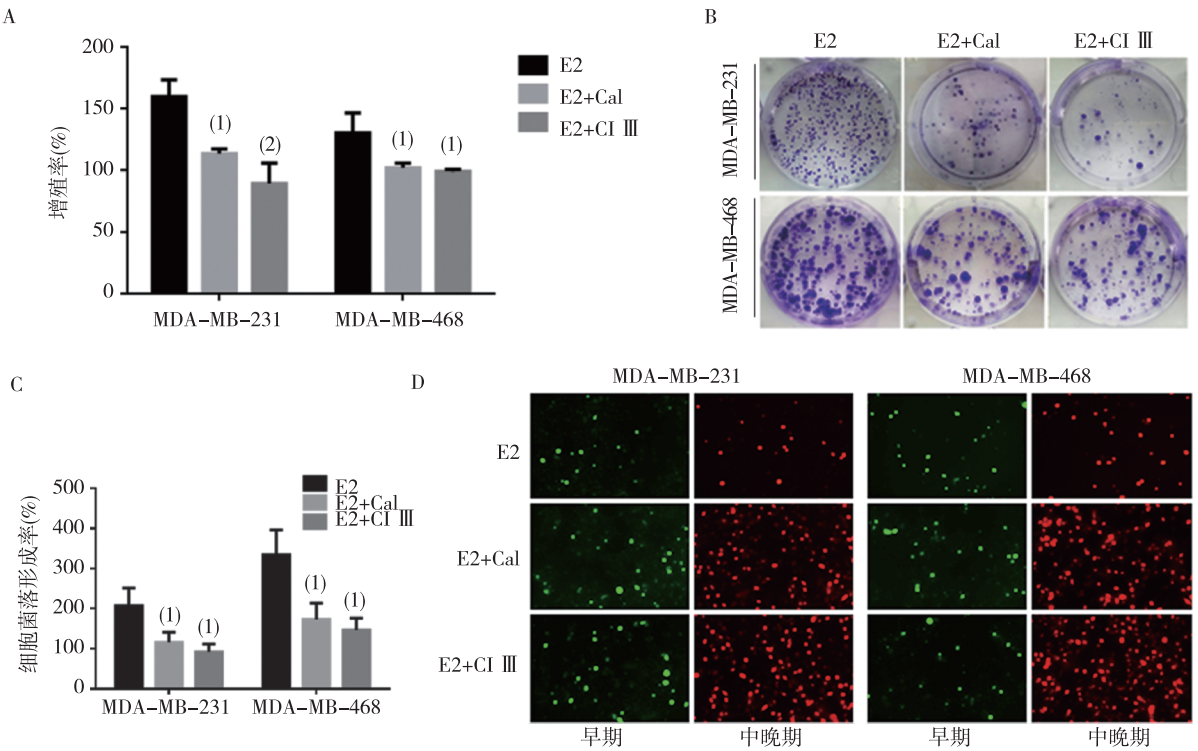
图 2 E2 对 MDA-MB-231 及 468 细胞的 YAP 蛋白表达影响

Fig. 2 Effects of E2 on YAP protein expression in MDA-MB-231 and 468 cells

2.3 CANP 抑制剂对 E2 诱导 MDA-MB-231 及 468 细胞增殖和增强抗凋亡能力的影响

MTT 实验结果显示,E2 联合 Cal 组和 E2 联合 CI Ⅲ组 MDA-MB-231、468 细胞的增殖率均显著低于 E2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,或 $P < 0.01$),见图 3A;细胞平板克隆形成试验结果显示,

E2 联合 Cal 组和 E2 联合 CI Ⅲ组 MDA-MB-231、468 细胞的菌落形成率均显著低于 E2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3B、3C;细胞凋亡试验结果显示,E2 联合 Cal 组和 E2 联合 CI Ⅲ组 MDA-MB-231、468 细胞的荧光凋亡强度显著高于 E2 组,见图 3D。



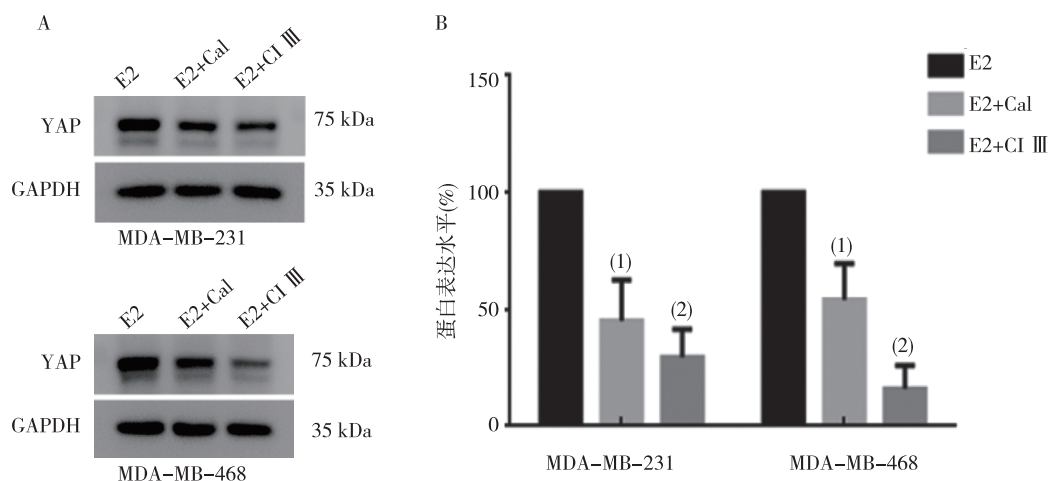
注:A 为 MTT 实验,B 为平板克隆实验,C 为平板克隆实验的直条图,D 为荧光凋亡实验;
与 E2 组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 CANP 抑制剂对 E2 诱导 MDA-MB-231 及 468 细胞增殖和增强抗凋亡能力的影响
Fig. 3 Effects of CANP inhibitors on proliferation and anti-apoptotic ability of MDA-MB-231 and 468 cells induced by E2

CANP 抑制剂对 E2 诱导 MDA-MB-231 及 468 细胞的 YAP 表达影响

Western blot 结果显示,E2 联合 Cal 组和 E2 联

合 CI Ⅲ组中 MDA-MB-231、468 细胞 YAP 蛋白表达均显著高于 E2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,或 $P < 0.01$),见图 4。



注:与 E2 组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 CANP 抑制剂对 E2 诱导 MDA-MB-231 及 468 细胞 YAP 表达的影响(Western blot)

Fig. 4 Effects of CANP inhibitors on E2-induced YAP expression in MDA-MB-231 and 468 cells

3 讨论

乳腺癌是世界范围内影响女性生命健康的最常见疾病,也是女性癌症患者死亡的主要原因,发病率呈现逐渐升高的趋势^[12]。目前该疾病已成为全球性问题,预计在未来几年内发病率和死亡率会逐年增加,并有向年轻化发展的趋势^[13]。因此探讨 TNBC 发病机制、寻找治疗方法是目前全球学者都关注的问题。有证据表明,E2 是导致乳腺癌恶性生长的重要原因,大多数人类乳腺癌初期均为雌激素依赖性^[14]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)核心蛋白在正常情况下受到严格调控,病理条件下表达缺失^[15]。ER 核因子或 ER 核外信号调节失控可促进 ER 阳性乳腺癌细胞的转移^[16]。有文献报道,雌激素可通过 GPER 促进与肿瘤发生密切相关的 Homeobox (HOX) 转录本反义基因上调和诱导乳腺癌细胞迁移^[17]。本研究发现,在 MDA-MB-231、468 细胞中,E2 刺激可明显使上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达上调,并促进细胞活性增殖、迁移、侵袭。钙蛋白酶 1 和钙蛋白酶 2 在细胞中普遍表达,是细

胞内非溶酶体细胞质需要钙激活的半胱氨酸内肽酶^[18]。CANP 的内源特异性抑制剂是钙蛋白酶抑制蛋白,具有恶性和良性组织中酶表达之间的差异^[19]。Salehin 等^[18]研究表明,CANP 信号通路参与介导包括 HER2(+)或人乳腺腺癌细胞 SKBR3 和 MDA-MB-231 凋亡;也有报道称,在 MAPK 信号的作用下 CANP2 具有影响细胞黏附与迁移的能力^[20]。以上研究表明,在癌症中 CANP 与肿瘤的许多恶性行为学相关。YAP 是人类恶性肿瘤中普遍激活的高度相关的转录调节因子,最近的研究表明,YAP 对于癌症的发生或大多数实体瘤的生长是必需的,可活化诱导癌症干细胞属性、增殖、药物抗性和转移^[21]。本研究结果表明,Cal 和 CI Ⅲ能明显抑制 E2 对模型细胞增殖、抵抗细胞凋亡和细胞内 YAP 蛋白表达的影响,提示 E2 对 TNBC 细胞的恶性增殖及 YAP 蛋白表达的影响可能与 CANP 信号通路相关。

综上所述,本研究结果表明,E2 具有诱导模型细胞增殖、抵抗细胞凋亡的能力,Cal 和 CI Ⅲ可以阻断 E2 诱导的上述生物学效应,提示 E2 可通过 CANP-YAP 信号通路促进肿瘤细胞的恶性生物学行为。

4 参考文献

[1] 朱海鹏,胡军. 三阴乳腺癌的研究进展[J]. 实用癌症杂志,2013,19(21):3885-3887.

[2] 陈腾祥,严莉莎,霍建云,等. 雌二醇对三阴乳腺癌细胞 integrin β4 水解作用的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2015,40(1):10-12.

[3] 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.

[4] SALIMI R,BANDARU S,DEVARAKONDA S,et al. Blocking the cleavage of filamin A by calpain inhibitor decreases tumor cell growth[J]. Anticancer Res,2018,38(4):2079-2085

[5] 齐曾鑫,蔡加君,姚瑜,等. 钙蛋白酶的研究进展[J]. 中国临床神经科学,2013,21(4):456-462.

[6] 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.

[7] GUO L,TENG L. YAP/TAZ for cancer therapy: opportunities and challenges(review) [J]. Int J Oncol,2015,46(4):1444-1452.

[8] PAN D. The hippo signaling pathway in development and cancer[J]. Dev Cell,2010,19(4):491-505.

[9] 张靖,朱金水. Hippo-YAP 信号通路与胃癌相关性研究[J]. 国际消化病杂志,2011,31(4):207-208.

[10] HALDER G,JOHNSONOH R L. Hippo signaling: growth control and beyond[J]. Development,2011,138(1):9-22

[11] 孙献甫,高全力,孙森森,等. YAP 基因干扰对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2014,23(5):624-628.

[12] ODLE T G. Precision medicine in breast cancer[J]. Radiol Technol,2017,88(4):401-421.

[13] AKRAM M,IQBAL M,DANIYAL M,et al. Awareness and current knowledge of breast cancer [J]. Biol Res, 2017,50(1):33.

[14] 韦庆文,迟秀文,蓝宇萍,等. 乳腺癌 VEGF 与 E2 的检测及相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2012,27(3):66-68.

[15] 刘俊峰,何琼,周建文,等. 肝组织雌激素受体 α 表达在肝癌病理诊断中的价值[J]. 山东医药,2015(44):61-62.

[16] 曾益为,刘仁斌. 雌激素受体 β 水平预测乳腺癌预后的研究进展[J]. 中华普通外科学文献,2019,13(1):58-62.

[17] 严玉钊,余腾骅,涂刚,等. 他莫昔芬抑制 G 蛋白偶联雌激素受体沉默的乳腺癌相关成纤维细胞的增殖并促进其凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(9):1189-1193.

[18] SALEHIN D,FROMBERG I,HAUGK C,et al. Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in ovarian cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2011,32(6):628-635.

[19] SUNG C O,PARK C K,KIM S H. Classification of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma is strongly associated with patient prognosis [J]. Mod Pathol, 2011, 24(8):1060-1068.

[20] BUGIDE S, DAVID D, NAIR A, et al. Hematopoietic PBX-interacting protein (HPIP) is over expressed in breast infiltrative ductal carcinoma and regulaes cell adhesion and migration through modulation of focal adhesion dynamics[J]. Oncogene,2015,21(35):4601-4612.

[21] 沈丽丽,张琦,徐智,等. YAP 与胃肠道恶性肿瘤发生发展相关性研究进展[J]. 癌症进展,2014(6):528-532.

(2019-05-20 收稿,2019-07-29 修回)

中文编辑: 严 征; 英文编辑: 赵 毅