

• 实验研究 •

雌激素受体 $\beta 1$ 上调 p21 基因表达抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖

陈莉 杨新华 任林 杨程 张玲玲 姜军

【摘要】 目的 将雌激素受体(ER) $\beta 1$ 真核表达质粒转染人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, 观察外源性 ER $\beta 1$ 基因转染 MDA-MB-231 细胞后对 p21 基因表达和细胞增殖能力的影响, 探讨 ER $\beta 1$ 在乳腺癌中的生物学作用机制。**方法** 应用脂质体法将 ER $\beta 1$ 真核表达质粒转染至乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, 流式细胞仪观察细胞凋亡率的变化; 分别用实时聚合酶连锁反应(RT-PCR)、Western Blot 检测转染前后细胞中 ER $\beta 1$ 、p21mRNA 和蛋白表达的变化; 细胞增殖曲线显示转染后细胞增殖能力的改变。统计分析采用 t 检验和单因素方差分析。**结果** 外源性 ER $\beta 1$ 真核表达质粒转染组 MDA-MB-231 细胞较未转染组 ER $\beta 1$ 、p21mRNA 和 p21 蛋白水平明显增强($P < 0.010$), 细胞增殖能力明显减弱, 细胞凋亡率从 1.4% 升至 6.14% ($t = -7.960, P = 0.001$)。**结论** ER $\beta 1$ 可以通过上调 p21 基因抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖。

【关键词】 乳腺肿瘤; 雌激素受体 $\beta 1$; p21

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

ER $\beta 1$ inhibits the growth of breast cancer MDA-MB-231 cell by upregulating p21 expression CHEN Li, YANG Xin-hua, REN Lin, YANG Cheng, ZHANG Ling-ling, JIANG Jun. Department of Breast Disease Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of exogenous estrogen receptor- $\beta 1$ (ER $\beta 1$) gene on the expression of p21 as well as the changes in proliferation ability of MDA-MB-231 cell line by transfecting recombinant eukaryotic expressing vector containing ER $\beta 1$ cDNA into human breast cancer cell MDA-MB-231, and to investigate the biological role of ER $\beta 1$ in breast cancer. **Methods** Recombinant eukaryotic expressing vector containing ER $\beta 1$ cDNA was transfected into human breast cancer cell MDA-MB-231 by using cationic liposome Lipofectamine 2000TM as transfecting agent. The expression levels in both mRNAs and the protein levels of both ER $\beta 1$ and p21 were tested by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. The changes of proliferation ability in MDA-MB-231 was displayed by cell growth curve, and the changes in cell apoptosis were detected by flow cytometry. Statistical analysis was performed using t test and analysis of variance. **Results** The proliferation ability decreased and the expression levels of both ER $\beta 1$ and p21 mRNA and protein increased significantly in the transfection group compared with the control group ($P < 0.010$). The rate of cell apoptosis increased from 1.4% to 6.14% ($t =$

-7.960, $P=0.001$). **Conclusions** ER β 1 can inhibit the cell growth of MDA-MB-231 cells by upregulating the expression of p21.

【Key words】 Breast neoplasms; Estrogen receptor- β 1; p21

乳腺癌是一种激素依赖性肿瘤,雌激素通过和受体结合介导的细胞信号参与乳腺癌的发生^[1]。雌激素受体(Estrogen receptor, ER)有 α 、 β 两种。目前公认雌激素通过 ER α 介导的细胞增殖信号在乳腺癌发生、发展中起重大作用^[2]。ER β 是1996 年从大鼠前列腺和卵巢 cDNA 文库中成功克隆出的一种新型雌激素受体^[3],与 ER α 一样,同属甾体激素受体超家族的成员,均为配体依赖的反式转录调节蛋白。但二者在染色体定位、组织分布及配体结合特性不同,提示它们在生物学作用方面存在差异^[4]。随着对 ER β 研究的深入,目前 ER β 被公认是肿瘤的抑癌基因,能抑制乳腺癌细胞的增殖^[5],但机制至今仍不清楚。在本研究中,通过观察 ER β 对乳腺癌细胞周期及细胞周期负性调控因子 p21 的影响,以期探究 ER β 抑制乳腺癌细胞增殖的分子机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

新生牛血清购自中美合资兰州民海生物制品有限公司;抗 ER β 1 单克隆抗体购自 Serotec 公司,p21 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;脂质体转染试剂 Dotap 由 Roche 公司提供;Trizol Reagent 和 AMV 逆转录试剂分别购自 Invitrogen 公司和 Promega 公司;所有引物均由上海生工合成。

1.2 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的培养

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自 ATCC,在含 100 mL/L 新生牛血清的 RPMI1640(Gibco 公司)培养液中按常规方法培养,在六孔培养板培养1~2 d,待细胞融合度达到 60%~70%时进行转染。

1.3 质粒瞬时转染细胞

采用脂质体转染法,参照 Roche 公司 Dotap 真核细胞转染试剂说明书进行优化。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,调整密度,使其转染融合度达 60%~70%,接种于 12 孔板,用含 10%血清不含抗生素的 RPMI1640 培养,次日贴壁后弃去旧培养液待转染。脂质体每孔分别加入质粒 pcDNA3.1-ER β 1(pcDNA3.1-ER β 1 转染组)或 pNegative vector 2.0 μ g(Dotap15 μ l)(空载体转染组),设置未转染的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为对照组。同时设置荧光报告基因质粒为对照,计算出转染阳性率约为 40%。

1.4 实时荧光定量 PCR

Trizol 法常规分别提取各组细胞总 RNA。提取的总 RNA 用脱氧核糖核酸酶 I(deoxyribonuclease I, DNaseI)去除基因组 DNA。按照逆转录试剂盒

操作程序进行逆转录反应,反应条件为: 70 °C 10 min,冰上 5 min,42 °C 60 min,95 °C 5 min,0 °C 5 min。荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ l, 内含 500 ng cDNA 模板、250 nmol/L 上、下游引物及 12.5 μ l 的 2 \times SYBR Green PCR Master 混合物。引物设计合成: ER β 1 上游引物: 5'-CGATAAAAAC CGGCGCAAGAGCT-3', 下游引物: 5'-T CATTAACACCTCCATCCAA AGCTCTC-3'; p21 上游引物: 5'-TGGGGATGTCCGTCAGA-3', 下游引物: 5'-G GCGTTTGGAGTGGTAGA-3'; GADPH 上游引物: 5'-GAAGGT GAAGGTCGGGTC-3', 下游引物: 5'-G AAGATGGTGATGGGATTTC-3'。将反应管置 Mx3000PTM Real Time PCR 反应仪中,反应条件为 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 40 s, 45 个循环, 荧光信号监测。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示基因的相对表达量, C_t 值代表在 PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时, 所经过的扩增循环次数, $\Delta\Delta C_t = \text{待测样本}(C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ GADPH}) - \text{为内参对照}(C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ GADPH})$, 以未转染的 MDA-MB-231 细胞为对照组。

1.5 蛋白免疫印迹

pcDNA3.1- ER β 1 转染组、pNegative vector 转染组、未转染组细胞分别以放射免疫沉淀测定(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液[150 mmol/L NaCl, 0.1 g/L NP-40, 0.05 g/L 脱氧胆汁酸盐钠, 0.01g/L 阴离子表面活性剂(SDS), 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 2 mg/L 亮肽素和 100 mg/L 苯甲基磺酰氟化物]提取细胞总蛋白。采用 BCA 法(美国 Pierce 公司试剂盒)测定总蛋白浓度。总蛋白以每个泳道 30 μ g 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后, 采用 Bio-Rad 浸渍电转移系统(转移缓冲液: 39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris 碱, 0.37 g/L SDS 及 200 mL/L 甲醇)将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(购自北京鼎国生物制品有限公司)。硝酸纤维素膜依次经过封闭、一抗(鼠抗-ER β 1 抗体 1 : 1500; 鼠抗-p21 抗体 1 : 500)孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗(羊抗鼠, 1 : 400)孵育、洗膜。最后, 采用化学发光显色试剂显影并摄像。蛋白电泳的结果用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件分析吸光度(A)值, 作半定量分析。

1.6 生长曲线绘制

将 2 组细胞以 $(1 \sim 2) \times 10^4$ /L 密度接种在 24 孔细胞培养板上, 每组 15 孔, 培养 24 h 后, 间隔 24 h 分别取两组细胞各 3 孔, 0.25% 胰蛋白酶消化、3000g 离心, 收集细胞沉淀, 加入 500 μ l 生理盐水悬浮细胞, 用细胞计数器计数。连续观察 5 d。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率

分别收取 pcDNA3.1- ER β 1 转染组及未转染组细胞各约 1×10^6 个细胞, 用 70% 乙醇 4 °C 冰箱固定 24 h, PBS 洗涤, 离心 10 min (3000 g), 弃上清液加 0.5 ml

(2 mg/ml) RNase 酶, 37 °C 水浴消化 30 min 后冰浴停止降解, 再加 0.5 ml (20 mg/ml) 的碘化丙啶染色, 振荡摇匀 4 °C 避光 30 min, 400 目尼龙网滤过, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8 统计处理

应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-ERβ1 转染组细胞中 ERβ1 和 p21 mRNA 表达的变化

结果表明: ERβ1、p21 mRNA 的表达在 3 组间差异有统计学意义 ($F = 31.626, P = 0.001; F = 26.664, P = 0.001$)。 pcDNA3.1-ERβ1 转染后转染组 MDA-MB-231 细胞中 ERβ1 mRNA 表达水平明显升高, 与未转染组和空载体转染组相比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.001, P = 0.000$), 空载体转染组与未转染组之间差异无统计学意义 ($P = 0.591$)。 p21 mRNA 在 pcDNA3.1-ERβ1 转染组中表达也明显升高, 与未转染组和空载体转染组相比较, 差异有统计学意义 (P 均 $= 0.001$), 空载体转染组与未转染组之间差异无统计学意义 ($P = 0.357$; 表 1)。

表 1 pcDNA3.1-ERβ1 转染后细胞 ERβ1、p21 mRNA 表达的变化

组别	ERβ1 mRNA	F 值	P 值	p21 mRNA	F 值	P 值
MDA-MB-231	0.109±0.018	31.626	0.001	0.187±0.055	26.664	0.001
Empty Vector ^a	0.092±0.016			0.217±0.025		
pcDNA3.1-ERβ ^{bc}	10.310±0.060			0.390±0.020		

MDA-MB-231: 对照组; Empty Vector: 空载体转染组; pcDNA3.1-ERβ1: pcDNA3.1-ERβ1 转染组; a: 与对照组比较 (ERβ1 mRNA: $P = 0.591$; p21 mRNA: $P = 0.357$); b: 与对照组比较 (ERβ1 mRNA: $P = 0.001$; p21 mRNA: $P = 0.001$); c: 和空载体转染组比较 (ERβ1 mRNA: $P = 0.000$; p21 mRNA: $P = 0.001$)

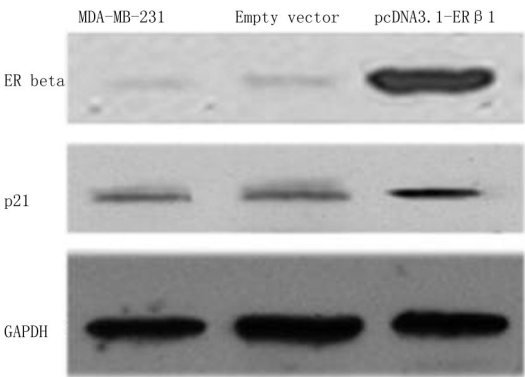
2.2 pcDNA3.1-ERβ1 转染组细胞中 ERβ1 和 p21 蛋白表达的变化

结果表明: ERβ1 和 p21 蛋白的表达在 3 组间差异有统计学意义 ($F = 381.17, P = 0.000$ 和 $F = 20.382, P = 0.002$)。 pcDNA3.1-ERβ1 转染组 MDA-MB-231 细胞中 ERβ1 蛋白表达明显增加与对照组和空载体转染组相比, 差异有统计学意义 ($P = 0.000, P = 0.000$), 空载体转染组与未转染组之间差异无统计学意义 ($P = 0.843$)。 同时, pcDNA3.1-ERβ1 转染组 MDA-MB-231 细胞中 p21 蛋白表达明显增高, 与未转染组和空载体转染组相比, 差异有统计学意义 ($P = 0.003, P = 0.001$), 空载体转染组与未转染组之间差异无统计学意义 ($P = 0.246$; 表 2, 图 1)。

表 2 pcDNA3. 1- ERβ1 转染组细胞 ERβ1、p21 蛋白表达的变化

组别	ERβ1	F 值	P 值	p21	F 值	P 值
MDA-MB-231	0.153±0.040	381.170	0.000	0.140±0.040	20.382	0.002
Empty Vector ^a	0.160±0.020			0.187±0.040		
pcDNA3. 1-ERβ ^{bc}	0.927±0.060			0.360±0.060		

MDA-MB-231;对照组, Empty Vector;空载体转染组, pcDNA3. 1-ERβ1;pcDNA3. 1- ERβ1 转染组; a: (ERβ1: $P=0.843$, p21 mRNA: $P=0.246$)与对照组比较; b: (ERβ1: $P=0.000$, p21 mRNA: $P=0.001$)与对照组比较; c: (ERβ1: $P=0.000$, p21 mRNA: $P=0.003$)和空载体转染组比较



MDA-MB-231;对照组; Empty vector;空载体转染组;pcDNA3. 1-ERβ1;pcDNA3. 1- ERβ1 转染组;GAPDH:作为内参照

图 1 pcDNA3. 1- ERβ1 转染组细胞 ERβ1、p21 蛋白表达的变化

2.3 生长曲线

生长曲线显示:pcDNA3. 1- ERβ1 转染后 pcDNA3. 1- ERβ1 转染组细胞生长曲线右移,细胞的增殖能力下降,但转染后第 1、2 天与对照组差异无统计学意义,而在转染后第 3、4、5 天明显下降, pcDNA3. 1-ERβ1 转染组细胞数均低于对照组,差异有显著统计学意义($P<0.010$,表 3)。

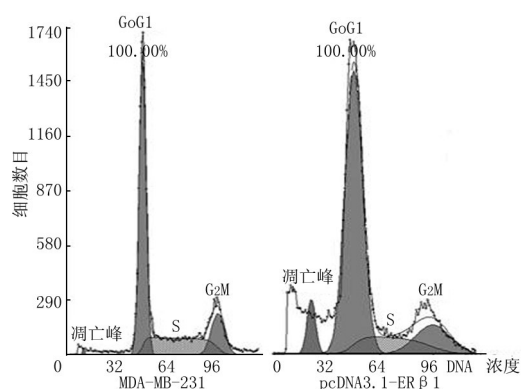
表 3 pcDNA3. 1- ERβ1 转染后的 MDA-MB-231 细胞生长的效应改变

组别	pcDNA3. 1-ERβ1 转染后(d)				
	1	2	3	4	5
MDA-MB-231	34733.330±1511.864	44300.00±5471.115	75170.67±3117.737	68701.67±4515.696	82141.33±6242.654
pcDNA3. 1-ERβ1	31546.330±1447.056	36762.33±1573.420	43284.33±3778.147	47865.33±4324.334	55021.33±3265.199
t 值	2.638	2.293	5.033	5.772	6.668
P 值	0.059	0.084	0.007	0.009	0.003

MDA-MB-231;对照组, pcDNA3. 1-ERβ1;pcDNA3. 1- ERβ1 转染组

2.4 pcDNA3. 1- ERβ1 转染组 MDA-MB-231 凋亡率的改变

pcDNA3. 1- ERβ1 转染后转染组 MDA-MB-231 细胞凋亡明显,凋亡率是(6.14±0.95)%,与对照组(1.40±0.41)%相比,差异有显著的统计学意义($t=-7.960$, $P=0.001$;图 2)。



MDA-MB-231:对照组; pcDNA3.1-ERβ1:pcDNA3.1-ERβ1 转染组

图 2 pcDNA3.1-ERβ1 转染组细胞凋亡率改变

3 讨论

ERβ 位于第 14 号染色体长臂 22-24 区段,基因长度为 24 kb。由于多种因素的影响,ERβ RNA 编码序列可以发生拼接变异,导致一个基因产生多种蛋白质。迄今为止已发现六种 ERβ 的拼接体,即 ERβ1~ERβ6。ERβ1 是其野生全长型。ERβ 作用机制与 ERα 类似,与雌激素结合后发生变构作用,形成二聚体与 ERE 结合启动基因转录、翻译,从而发生生物学效应。ERβ 也可形成同源二聚体或与 ERα 形成异源二聚体与 ERE 结合^[6]。有研究表明:在 70% 乳腺肿瘤中表达 ERβ,体外研究已证实 ERβ 对乳腺起保护作用^[7],是乳腺癌预后良好的指标之一^[8]。我们的前期研究也发现,ERβ1 能抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖^[9],但目前机制仍不清楚。在本实验中,在 ERβ1 高表达的细胞株里,细胞的增殖能力明显减弱,证明了 ERβ1 能抑制细胞的增殖,与文献^[9]报道一致。ERβ1 mRNA 变化幅度显著小于蛋白,而 p21 的 mRNA 表达大于蛋白,可能的原因之一是两种基因转录后调控差异造成的,其机制还需要进一步的研究。

本研究中强制表达 ERβ1 后,在没有增加配体浓度的情况下也会发生生物学效应,可能是由于 ERβ 存在非配体依赖的生物效应,这一现象在我们已发表的论文中已经报道^[9]。我们的前期研究已经证明 ERβ1 升高后,可以通过结合胞浆中的 Id1,释放 bHLH 家族某些转录因子的活性,上调 p21 基因的表达,从而发挥抑制增殖、促进凋亡的作用^[9]。本文进一步证明了 ERβ1 升高后,上调 p21 基因所导致的促凋亡作用确实存在。p21 基因是 1993 年底由 Harper 等发现的一种新的抑癌基因^[10],它为单拷贝基因,定位于人染色体 6p21.2 上。p21 作为野生型 p53 基因的下stream靶基因的转录产物^[11-12],是细胞周期蛋白(cyclin)与细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin2dependentkinase, CDK)的广泛抑制剂,可与多种 cyclins/CDK 复合物结合,抑制底物磷酸化作用,导致

G1 期阻滞,通过这一作用达到抑制细胞的无限增殖。p21 能优先与 CDK2、CDK4 结合,并抑制其活性,同时 p21 又能抑制 PCNA 的活性,直接抑制 DNA 的合成^[13]。在本实验中,笔者发现 pcDNA3.1-ER β 1 转染的 MDA-MB-231 细胞中 p21 蛋白表达和 mRNA 水平均显著增加,细胞的增殖能力明显下降,细胞凋亡增加,提示 ER β 1 和 p21 存在有关,ER β 1 可通过 p21 抑制细胞的增殖。ER β 1 如何通过 p21 抑制细胞增殖的机制值得进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*, 2001, 276: 36869-36872.
- [2] Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor action. *Crit. Rev Eukaryot Gene Expr*, 2002, 12: 237-257.
- [3] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5925-5930.
- [4] Kelley ST, Thackray VG. Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. *J Mol Evol*, 1999, 49: 609-614.
- [5] Lazennec G. Estrogen receptor beta: a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2006, 231: 151-157.
- [6] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 1996, 392: 49-53.
- [7] Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74: 245-248.
- [8] Honma N, Horii R, Iwase T, et al. Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 3727-3734.
- [9] Chen L, Qiu JH, Yang XH, et al. Identification of a novel estrogen receptor β 1 binding partner, inhibitor of differentiation-1, and role of ER β 1 in human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, 278: 210-219.
- [10] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell*, 1993, 75: 805-816.
- [11] Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, 2005, 65: 3980-3985.
- [12] 宋洪生, 贾伟丽, 种瑞峰, 等. p21waf1 基因转染对乳腺癌细胞增殖活性的影响. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2008, 2: 547-553.
- [13] Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, et al. IFN γ induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19: 1351-1361.

(收稿日期: 2009-09-08)

(本文编辑: 范林军)

陈莉, 杨新华, 任林, 等. 雌激素受体 β 1 上调 p21 基因表达抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖 [J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2010, 4(4): 427-433.