

· 实验研究 ·

他莫昔芬对转染 ER β 1 基因的 MCF-7 细胞生长特性的影响

周艳 姜军 杨新华 范林军 张毅 陈显春

【摘要】 目的 研究在不同处理因子作用下,外源基因 ER β 1 的表达对 MCF-7 乳腺癌细胞系生长特性的影响。**方法** 利用脂质体转染方法将 ER β 1 真核表达载体 pcDNA 3.1-EGFER β 1 导入 MCF-7 乳腺癌细胞系。采用 Western blot 方法检测转染细胞中 ER β 1 的蛋白表达水平,筛选阳性克隆。以亲本细胞 MCF-7 为对照,分别在雌激素和雌激素受体拮抗剂他莫昔芬作用下观察细胞的生长特点。**结果** 在转染 ER β 1 基因的 MCF-7 细胞系中,Western blot 检测证实 ER β 1 的蛋白表达水平显著增高。在无处理因子的情况下,外源基因 ER β 1 在 MCF-7 细胞系中的表达能抑制细胞生长。与亲本细胞 MCF-7 细胞相比,转染 ER β 1 的 MCF-7 细胞对雌激素的敏感性下降,但对他莫昔芬的敏感性无明显变化。**结论** 外源性 ER β 1 基因在 MCF-7 乳腺癌细胞中的稳定表达不增加对他莫昔芬的耐药性,但使之对雌激素的敏感性下降。

【关键词】 乳腺癌; 雌激素受体; 内分泌治疗; 基因转染

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effect of tamoxifen on the growth of breast cancer MCF-7 cells transfected with exogenous ER β 1 gene ZHOU Yan, JIANG Jun, YANG Xin-hua, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, CHEN Xian-chun. Breast Diseases Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To study the effects of exogenous ER β 1 on the growth of breast cancer MCF-7 cells under different treatment with estrogen or tamoxifen.

Methods An eukaryotic expression vector containing human entire coding sequence of ER β (pcDNA3.1-EGFER β 1) was transfected into human breast cancer MCF-7

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心

通讯作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

cells using lipofectin reagent. The biological activity of ER β 1 was detected with the expression of ER β 1 protein by Western blot. The growth properties of MCF-7, transfected MCF-7 cells under different treatment, including E2 (17 β -estradiol) and tamoxifen, were observed. **Results** Western blot analysis showed that the protein level of ER β 1 in the transfected MCF-7 cells was markedly increased. Exogenous ER β 1 expression inhibit the growth properties of MCF-7 cells under normal condition. The transfected MCF-7 cells proliferated at the same rate as naive cells in the presence of tamoxifen, whereas a strong inhibition of the proliferation of the transfected MCF-7 cells in the presence of E2 was observed. **Conclusions** Exogenous ER β 1 expression does not increase the resistance to tamoxifen, and a strong inhibition of the proliferation may occur in the presence of E2.

【Key words】 Breast neoplasia; Estrogen receptor; Endocrine therapy; Gene transfection

野生型雌激素受体 beta (Estrogen receptor β , ER β) 位于第 14 号染色体长臂 22 ~ 24 区段, 基因长度为 24 kb。ER β 1 与 ER α 一样同属甾体激素受体家族成员, 能结合 ERE 反应元件, 能调节基因的转录。但是, ER β 1 的分子结构、受体分布与 ER α 不同也预示了二者在功能上存在着差异。因此, ER β 1 在乳腺癌中的研究价值越来越受重视。ER β 1 表达提示乳腺癌对内分泌治疗敏感还是耐药? 目前的研究结果存在很大的差异^[1-3]。大多数学者都认为 ER β 1 作为激素受体, 其表达会影响以他莫昔芬 (Tamoxifen, TAM) 为代表的内分泌治疗药物的敏感性。因此, 本研究将 ER β 1 真核表达质粒转染人乳腺癌 MCF-7 细胞中, 观察他莫昔芬对强制表达 ER β 1 的 MCF-7 细胞的作用, 初步探讨 ER β 1 表达和他莫昔芬治疗间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12 培养基和新生牛血清均购自美国 Hyclone 公司; 抗 ER β 1 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。乳腺癌 MCF-7 细胞株为第三军医大学组胚学教研室梅峰博士惠赠。pcDNA3.1-EGFP-ER β 1 真核表达质粒由瑞士 Anders Strom 博士惠赠; 脂质体转染试剂 Dotap 为 Roche 公司产品。

1.2 细胞培养

乳腺癌 MCF-7 细胞在含 100 ml/L 新生牛血清的 DMEM/F12 培养液中按常规方法培养, 在 6 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 pcDNA3.1-ER β 1 质粒瞬时转染细胞

采用脂质体转染法, 参照 Roche 公司 Dotap 试剂说明书进行优化。每孔

加入质粒 pcDNA3.1-ER β 1 2.0 μ g, Dotap 15 μ l, 设置非转染对照组。

1.4 MTT 活性检测

细胞生长曲线的测定: 采用四唑盐(MTT)比色法, 分别取 MCF-7 细胞株和 ER β 1 转染 MCF-7 细胞, 以每孔 2.5×10^3 个细胞行 3 复孔接种入 96 孔细胞培养板, 待细胞生长至第 1~6 天, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l, 于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h, 弃上清液后每孔加二甲基亚砜(DMSO) 150 μ l, 轻轻振荡 10 min, 酶标仪(波长 490 nm)测定每孔的吸光度 A 值。以时间为横轴, 吸光度 A 值为纵轴绘制细胞生长曲线。然后将转染细胞以 3×10^4 /ml 接种于铺有盖玻片的 24 孔板中, 以 5×10^{-6} mol/L 的他莫昔芬和 1×10^{-6} mol/L 的 17 β -雌二醇处理 24、48、72 h, 同时设置未处理组为对照。用上述 MTT 法测定各组细胞的增殖活性。

1.5 统计学处理

用 SPSS10.0 进行统计学分析, 数据表示均为 $\bar{x} \pm s$, 采用重复测量方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染效果

荧光显微镜下呈现绿色荧光的即为成功转染 pcDNA3.1-EGFPER β 1 的乳腺癌 MCF-7 阳性表达克隆细胞(图 1)。

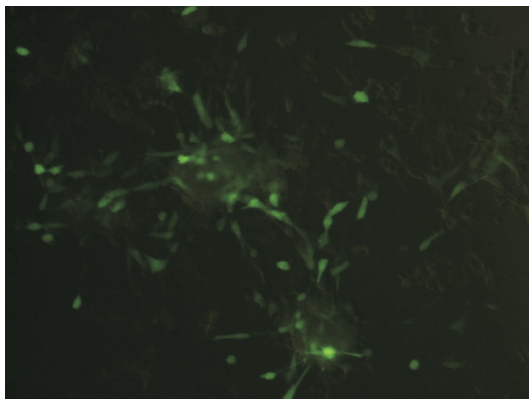


图 1 pcDNA3.1-EGFPER β 1 转染 MCF-7 细胞 24 h 的倒置
荧光显微镜激发荧光图($\times 100$)

2.2 MTT 比色试验检测 ER β 1 基因转染对 MCF-7 细胞活性和生长的影响

随着时间的延长, 细胞增殖活性升高, 观察细胞生长至第 7 天, MTT 比色试验结果显示外源性 ER β 1 基因转入后, MCF-7 乳腺癌细胞株生长活性明显降低, 与未转染对照组相比差异有统计学意义(图 2)。

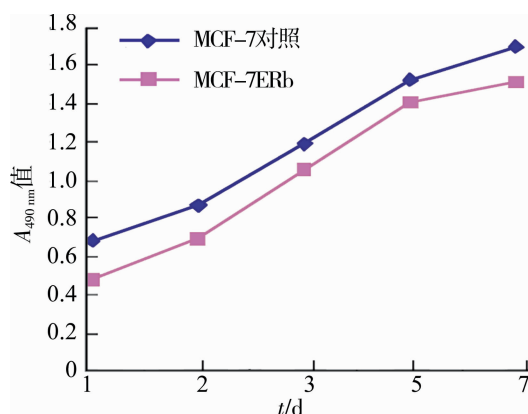


图 2 不加任何处理因素时 MCF-7 细胞和 MCF-7^{ERb1} 细胞的生长曲线

在雌二醇作用下,转染 pcDNA3.1-EGFPER β 1 的 MCF-7 细胞增殖速度受到明显抑制($P < 0.05$),即 ER β 1 表达水平的提高使乳腺癌细胞对雌二醇的敏感性下降(图 3)。在他莫昔芬作用下,转染组细胞和对照组细胞均出现生长抑制,但是二者间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4)。雌二醇和他莫昔芬对 MCF-7 细胞和 MCF-7ER β 1 细胞增殖功能的影响见表 1。

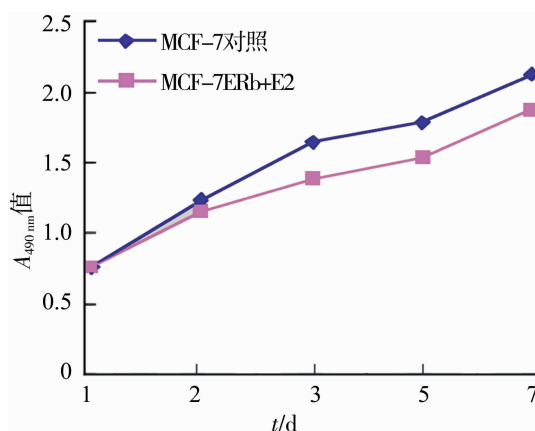


图 3 加雌激素后 MCF-7 细胞和 MCF-7^{ERb1} 细胞的生长曲线

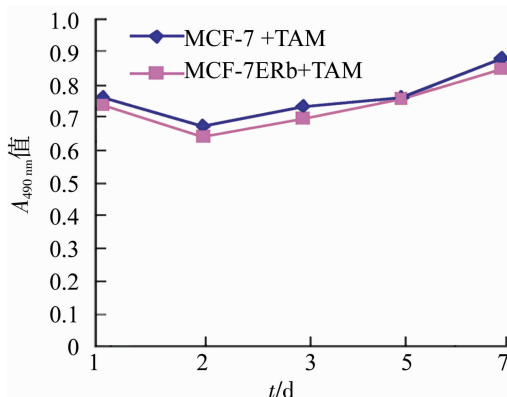


图 4 加入他莫昔芬后 MCF-7 细胞和 MCF-7ER β 1 细胞的生长曲线

表 1 雌二醇和他莫昔芬对 MCF-7 细胞和 MCF-7ER β 1 细胞增殖功能的影响

细胞及分组	吸光度 A 值				
	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
MCF-7 对照	0.683 \pm 0.047	0.872 \pm 0.040	1.194 \pm 0.050	1.525 \pm 0.009	1.702 \pm 0.059
MCF-7 + E2	0.755 \pm 0.008	1.236 \pm 0.066	1.642 \pm 0.054	1.786 \pm 0.071	2.120 \pm 0.037
MCF-7 + TAM	0.760 \pm 0.016	0.675 \pm 0.007	0.731 \pm 0.006	0.763 \pm 0.014	0.882 \pm 0.010
MCF-7 ^{ERβ} 对照 ^a	0.480 \pm 0.058	0.699 \pm 0.035	1.059 \pm 0.106	1.407 \pm 0.099	1.515 \pm 0.107
MCF-7 ^{ERβ} + E2 ^b	0.758 \pm 0.016	1.157 \pm 0.047	1.391 \pm 0.079	1.536 \pm 0.059	1.873 \pm 0.064
MCF-7 ^{ERβ} + TAM	0.737 \pm 0.011	0.644 \pm 0.039	0.685 \pm 0.008	0.745 \pm 0.009	0.836 \pm 0.007

a: $P < 0.05$, 与 MCF-7 对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 MCF-7 + E2 组比较; E2: 雌二醇; TAM: 他莫昔芬

3 讨论

ER β 1 作为雌激素受体的亚型, 和 ER α 具有相似的结构和作用方式。研究证明, 他莫昔芬等不同类型的选择性激素受体调节剂均可以作为配体和 ER β 结合, 抑制雌激素反应元件 (estrogen response element, ERE) 介导的转录活性, 表现为抑制细胞生长的作用。但是, 在具体的乳腺癌细胞和乳腺癌组织中, ER β 1 表达在内分泌治疗中扮演怎样的角色却众说纷纭。Speirs 等^[4] 利用 RT-PCR 方法检测对他莫昔芬治疗敏感和耐药的两组乳腺癌患者的 ER β mRNA 表达情况, 结果显示他莫昔芬耐药组 ER β mRNA 表达明显升高; 同样检测对他莫昔芬耐药和敏感的乳腺癌细胞株亦得到了类似结论。Peach 等^[5] 发现, 在激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) 位点上, ER α 表现出雌二醇依赖的 AP-1 位点转录活性, 和抗雌激素作用时, 丧失此转录活性。ER β 与 ER α 正好相反, 和 E2 结合时没有转录活性, 和他莫昔芬结合后却刺激 AP1 转录, 导致细胞中细胞周期素 D1 (cyclin D1, CD1) 表达增加, 引起细胞增殖。而且 Hodges 等^[6] 认为他莫昔芬介导的抗增殖作用主要通过抑制 CD1 发挥作用, 因此 ER β 和他莫昔芬结合后刺激 AP-1 转录。这一现象一直被认为是 ER β 表达导致他莫昔芬耐药的有力证据。然而 Strom 等^[7] 诱导 T47D 细胞表达 ER β 时发现, 不管是雌二醇、他莫昔芬、雷诺昔芬还是 ICI182780 均不会刺激细胞增生。Licznar 等^[8] 转染 ER α 基因到 MDA-MB-231 细胞中, 虽然 CD1 蛋白表达增加, 但是却表现为抑制细胞增殖的效应, 说明 CD1 蛋白表达并不一定都引起乳腺癌细胞的增殖效应。这两项实验提示虽然他莫昔芬和 ER β 1 结合会刺激 AP-1 位点的转录, 上调 CD1 蛋白表达, 但是并不一定会刺激细胞生长, 介导他莫昔芬治疗抵抗。因此, 仅从一个转录位点和信号通路途径来说明 ER β 1 和内分泌治疗间的关系是不够的, ER β 1 和他莫昔芬作用后有哪些基因转录发生改变, 最终导致怎样的细胞效应, 目前仍不清楚。

本研究直接将 ER β 1 基因转染至 MCF-7 乳腺癌细胞株中。通过 Western

blot 证实了转染细胞株中 ER β 的蛋白表达水平明显增高,说明 ER β 转染细胞株成功。因此,通过与亲本 MCF-7 细胞比较,可直接观察到 ER β 1 的过量表达在不同处理因子作用下对细胞生长的影响。本研究中,在未加任何处理因子情况下,转染 ER β 1 的 MCF-7 细胞生长受抑制,提示 ER β 1 本身可以通过某些信号通路改变乳腺癌细胞的增殖活性。在雌二醇作用下,转染 ER β 1 基因的 MCF-7 细胞的生长速度明显减慢。Lazennec 等^[9]通过腺病毒载体将 ER β 1 转染至 MDA-MB-231 乳腺癌细胞内,与未转染细胞比较,无论有无雌激素存在,细胞的增殖率均下降。研究表明在 ER β 1 阴性乳腺癌细胞中转染 ER β 1,能通过抑制 c-myc 基因转录,增加 p21 和 p27 表达使细胞周期阻滞于 G₂ 期,从而抑制细胞增殖^[10]。本研究结果与文献报道类似,即 ER β 1 蛋白表达有抑制乳腺癌细胞增殖的作用,尤其是在雌二醇存在的条件下,ER β 1 的过量表达明显降低乳腺癌细胞对雌激素的敏感性,抑制乳腺癌细胞生长。这说明在雌激素存在的条件下,过度表达的 ER β 1 是负性生长调控因子。

本研究发现,雌激素受体拮抗剂他莫昔芬可抑制转染 ER β 1 的 MCF-7 细胞和未转染 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖作用,对两种细胞抑制作用的差异无统计学意义。可见,增加乳腺癌细胞株中 ER β 1 的表达,并未诱导出对雌激素受体拮抗剂的耐药。有关 ER β 1 与乳腺癌内分泌耐药相关性研究得出不同结论的原因,可能是:(1)有关 ER β 1 和他莫昔芬治疗耐药相关的研究大多为利用 RT-PCR 或实时 PCR 技术检测 ER β 1mRNA 水平的表达,因此不一定反映其执行细胞功能的蛋白水平;(2)由于 ER β 1 与 ER α 在 DNA 结合区和羧基端的配体激素结合区域具有高度同源性,因此,有些公司生产的 ER β 抗体可能也能检测到 ER α ,从而使 ER β 1 的表达值偏高,干扰最终结果。

因此,本研究将表达 ER β 1 全长基因序列的真核表达质粒转染入 MCF-7 细胞中,发现细胞生长受抑,尤其抑制由雌二醇介导的细胞增殖,他莫昔芬处理转染后细胞和未转染细胞均抑制其生长,二者间没有显著差异。这说明 ER β 能抑制乳腺癌细胞生长,负性调控激素刺激的细胞生长,并且不会诱导他莫昔芬治疗耐药。

参考文献

- [1] Chang H G, Kim S J, Chung K W, *et al.* Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene. *J Mol Med*, 2005, 83:132 - 139.
- [2] Cappelletti V, Celio L, Bajetta E, *et al.* Prospective evaluation of estrogen receptor-beta in predicting response to neoadjuvant antiestrogen therapy in elderly breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 2004, 11:761 - 770.
- [3] Esslimani Sahla M, Simony Lafontaine J, Kramar A, *et al.* Estrogen receptor β (ER β) level but not its ER β cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:5769 - 5776.

- [4] Speirs V, Malone C, Walton D S, *et al.* Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res*,1999,59:5421 – 5424.
- [5] Paech K, Webb P, Kuiper G G, *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP1 sites. *Science*,1997,277:1508 – 1510.
- [6] Hodges L C, Cook J D, Lobenhofer E K,*et al.* Tamoxifen functions as a molecular agonist inducing cell cycle-associated genes in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*,2003,1:300 – 311.
- [7] Strom A, Hartman J, Foster J S, *et al.* Estrogen receptor β inhibits 17 beta -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci*,2004,101:1566 – 1571.
- [8] Licznar A, Caporali S, Lucas A, *et al.* Identification of genes involved in growth inhibition of breast cancer cells transduced with estrogen receptor. *FEBS Lett*,2003,553:445 – 450.
- [9] Lazennec G, Bresson D, Lucas A, *et al.* ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, 2001,142:4120 – 4130.
- [10] Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, *et al.* Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*,2004,64:423 – 428.

(收稿日期:2007-01-20)

(本文编辑:陈莉)

周艳,姜军,杨新华,等.他莫昔芬对转染 ER β 1 基因的 MCF-7 细胞生长特性的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2008,2(1):63 – 39.