

## • 实验研究 •

雌激素受体  $\beta 1$  对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

陈莉 杨新华 范林军 张毅 陈显春 任林 姜军

**【摘要】** 目的 观察雌激素受体  $\beta 1$ (ER $\beta 1$ )被阻断后对 Bax 和 Bcl-2 表达的影响,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,将针对人 ER $\beta 1$  基因的 siRNA 转染人类乳腺癌细胞株 MDA-MB-231。分别用 Real time-PCR、Western Blot 检测 ER $\beta 1$  被干扰前后细胞中 ER $\beta 1$ 、Bcl-2、Bax 等基因 mRNA 和蛋白表达水平的变化;通过细胞增殖曲线观察 ER $\beta 1$  基因被干扰后细胞增殖活性的变化;采用流式细胞仪分析细胞凋亡率的改变。计量资料的比较采用  $t$  检验或单因素方差分析。结果 RNA 干扰技术阻断乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 ER $\beta 1$  基因的表达后,ER $\beta 1$  mRNA 和蛋白水平显著下降( $P < 0.05$ ),生长曲线显示细胞增殖能力明显增强( $P < 0.05$ );pSilencer-ER $\beta 1$  转染组细胞的 Bax 基因 mRNA 及蛋白水平显著下降( $P < 0.01$ ),Bcl-2 基因的表达未发生变化,Bcl-2/Bax 比值明显上升;pSilencer-ER $\beta 1$  转染组细胞凋亡率较未转染组明显减少( $t=6.22, P=0.00$ )。结论 ER $\beta 1$  可通过调控细胞凋亡相关基因 Bax 而促进细胞的凋亡,是 ER $\beta 1$  抑制细胞增殖的原因之一。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;RNA 干扰;雌激素受体  $\beta 1$ **【中图分类号】** R737.9**【文献标识码】** A

Estrogen receptor  $\beta 1$  induces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells by regulating the expression of Bax gene CHEN Li, YANG Xin-hua, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, CHEN Xian-chun, REN Lin, JIANG Jun. Department of Breast Disease Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the changes in Bax and Bcl-2 expressions and to investigate the biology role of estrogen receptor (ER)  $\beta 1$  in MDA-MB-231 breast cancer cells by using RNA interference to interrupt ER $\beta 1$  expression. **Methods** pSilencer-ER $\beta 1$  was transfected into MDA-MB-231 breast cancer cells by using cationic liposome Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> as tranfecting agent. After transfection, the expression levels of mRNA and protein of ER $\beta 1$ , Bcl-2 and Bax were evaluated by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Cell apoptosis was detected using flow cytometry. Cell growth curve was performed to show the changes in proliferation ability. Comparison between quantitative data was performed sing  $t$  test and one factor analysis of variance. **Results** After ER $\beta 1$  silencing, both mRNA and protein level of ER $\beta 1$  and Bax gene decreased significantly compared with the control groups ( $P < 0.05$ ), and cell growth curve showed a marked

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072157)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心

通信作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

enhancement in cell proliferation ( $P < 0.05$ ). In the pSilencer-ER $\beta$ 1 transfection group, there was an obvious decrease in mRNA and protein level of Bax gene ( $P < 0.01$ ); no significant change in the expression of Bcl-2; and the ratio of Bcl-2/Bax increased. The results from flow cytometry showed that cell apoptosis decreased markedly in the pSilencer-ER $\beta$ 1 transfection group compared with the controls ( $t = 6.22, P = 0.00$ ). **Conclusion** ER $\beta$ 1 could induce apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells by regulating Bax gene expression, which may play an important role in ER $\beta$ 1 inhibiting the growth of MDA-MB-231 breast cancer cells.

**【Key words】** breast neoplasms; RNA interference; estrogen receptor  $\beta$ 1

近 20 年来,乳腺癌发病率呈明显上升趋势,居女性所有恶性肿瘤发病率首位。乳腺癌是一种雌激素依赖性肿瘤,目前公认雌激素通过与受体结合介导的细胞信号在乳腺癌发生、发展中具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。雌激素受体分  $\alpha$  和  $\beta$  两种。雌激素受体  $\beta$ (estrogen receptor  $\beta$ , ER $\beta$ )是 1996 年在大鼠前列腺和卵巢 cDNA 文库中成功克隆出的一种新的雌激素受体<sup>[3]</sup>。既往研究表明 ER $\beta$  是肿瘤的抑癌基因<sup>[4-5]</sup>,但其作用机制至今仍不清楚。迄今为止已发现 6 种 ER $\beta$  的拼接体,即 ER $\beta$ 1~ER $\beta$ 6,其中 ER $\beta$ 1 是其野生全长型<sup>[6]</sup>。本研究通过观察 ER $\beta$ 1 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响,以期探究 ER $\beta$  生物学作用及相关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 $\beta$ 1 单克隆抗体购自 Serotec 公司,Bcl-2 和 Bax 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,引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自美国模式培养物研究所(American Type Culture Collection, ATCC),在含 100 ml/L 新生牛血清的 RPMI1640 培养液(Gibco 公司)中常规方法培养,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。

### 1.2 siRNA 设计合成

首先在美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库中获取人 ER $\beta$ 1 全长序列(序列号:BC024181),结合设计软件和文献报道,确定 ER $\beta$ 1siRNA,序列分别:5'-GATCGACGTGCTTCGCGGGTGCAATTCAAGACGTTGCACCCGCGAAGCACGTTTTTTTAA-3'(正义链);5'-AGCTTAAAAAACGTGCTTCGCGGGTGCAACGTCTTGAATTGCACCCGCGAAGCACGTC-3'(反义链)。序列行 BLAST 比对检查以保证和其他基因没有同源性。所有实验均重复 3 次。

### 1.3 质粒瞬时转染细胞

采用脂质体转染法转染细胞,并根据 Roche 公司 Dotap 试剂说明书进行优化。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,调整细胞数,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。脂质体每孔加入质粒 pSilencer-ER $\beta$ 1、pNegative vector 2.0  $\mu$ g, Dotap 15  $\mu$ l,分别作为转染组和空载体组,设置未转染的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为未转染组。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 蛋白免疫印迹

pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组、pNegative vector 转染组(空载体组)和未转染组分别以 RIPA(radio-immunoprecipitation assay)裂解液提取细胞总蛋白。RIPA 裂解液的组成为:150 mmol/L NaCl,0.1 g/L NP-40,0.05 g/L 脱氧胆酸钠,0.01 g/L 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),2 mg/L 亮氨酸和 100 mg/L 苯甲基磺酰氟化物。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  $\mu$ 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-HCl,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 $\beta$ 1 抗体,1:1000;鼠抗-Bax 抗体,1:1500;鼠抗-Bcl 抗体,1:1500)孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗(兔抗鼠抗体,1:500)孵育、洗膜。最后采用化学发光显色试剂显影并摄像。蛋白电泳结果用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件分析吸光度(A)作半定量分析。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

用 TRIZOL 法常规分别提取各组的细胞总 RNA,提取的总 RNA 用脱氧核糖核酸酶 I(deoxyribonuclease I, DNase I)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  $^{\circ}$ C 10 min、置于冰上 4 min、42  $^{\circ}$ C 60 min、95  $^{\circ}$ C 5 min、0  $^{\circ}$ C 5 min。荧光定量 PCR 反应体系为 25  $\mu$ l,内含终质量浓度为 500 ng/ml cDNA 模板、250 nmol/L 上、下游引物及 12.5  $\mu$ l 2  $\times$  SYBR Green PCR Master 混合物。引物设计合成:ER $\beta$ 1 上游引物 5'-CGATAAAAC CGGCGCAAGAGCT-3',下游引物 5'-TCATTAACACCTCCATCCAACAGCTC TC-3';Bax-2 上游引物 5'-CTGACATGTTTTCTGACGGC -3',下游引物 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3';Bcl-2 上游引物 5'-CGACGACTTCTCCCG CCGCCGCTACCGC-3',下游引物 5'-CCGCATGCTGGGGTACAGTTCC -3';GADPH 上游引物 5'-CGTGGAAGGACTCATGACCA -3',下游引物 5'-TCCAGGGGTCTTACTCCTTG-3'。将反应管置 Mx3000P<sup>TM</sup> Real Time PCR 反

应仪中,反应条件为 94 ℃ 40 s、55 ℃ 40 s、72 ℃ 40 s,43 个循环,荧光信号监测。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ( $C_t$  代表循环阈值) 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, $\Delta\Delta C_t = \text{待测样本}(C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ GAPDH}) - \text{对照组}(C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ GAPDH})$ 。以未转染的 MDA-MB-231 细胞为对照细胞。

### 1.6 流式细胞仪观察细胞凋亡

分别收取 pSilencer-ER $\beta$ 1 转染后及未转染组细胞各约  $1 \times 10^6$  个,用 75 %乙醇于 4 ℃ 冰箱固定 24 h。PBS 洗涤,3 000 $\times g$  离心 10 min(离心机半径为 6 cm)。弃去上清液后,加入 0.5 ml(20 mg/ml)碘化银丙啶染色,振荡摇匀 4 ℃,避光 30 min,400 目尼龙网滤过,用流式细胞仪测细胞凋亡率。

### 1.7 生长曲线绘制

将各组细胞以  $(1 \sim 2) \times 10^4 \text{ L}^{-1}$  细胞数接种在 24 孔细胞培养板上,每组 15 孔,培养 24 h 后,间隔 24 h 分别获取各组细胞各 3 孔,0.25%胰蛋白酶消化,3000 $\times g$  离心 3 min(离心机半径为 6 cm),收集细胞沉淀,加 500  $\mu\text{l}$  生理盐水悬浮细胞,用细胞计数器计数。连续观察 5 d。

### 1.8 统计处理

应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。各组数据均为正态分布,且方差整齐,因此所得数据以  $\bar{x} \pm s$  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 ER $\beta$ 1 基因被干扰后 MDA-MB-231 细胞增殖能力的改变

生长曲线显示: pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组细胞生长曲线左移,细胞增殖能力明显提高,培养至第 3、4 和 5 天时, pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组细胞数均高于空载体组和未转染组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。

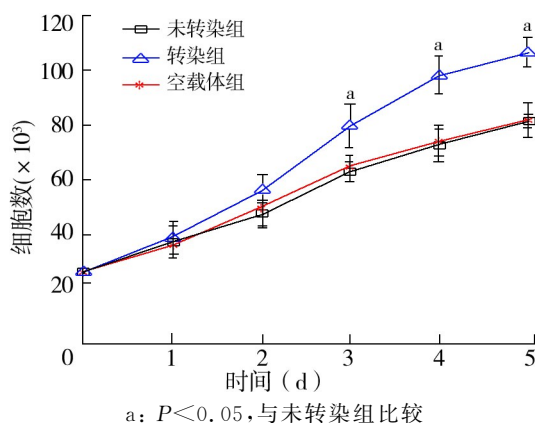


图 1 ER $\beta$ 1 siRNA 转染后 MDA-MB-231 细胞生长的效应改变

## 2.2 ER $\beta$ 1、Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的变化

荧光定量 PCR 结果表明:pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞的 ER $\beta$ 1 mRNA 表达明显下调,与未转染组相比,差异有统计学意义( $t=3.73$   $P=0.02$ )。ER $\beta$ 1 基因表达沉默后,Bax mRNA 在 ER $\beta$ 1 干扰组表达明显下降,与未转染组比较差异有统计学意义( $t=13.50$ ,  $P=0.00$ );而 pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞的 Bcl-2 mRNA 表达与未转染组比较,差异无统计学意义( $t=-0.10$ ,  $P=0.92$ )(图 2)。

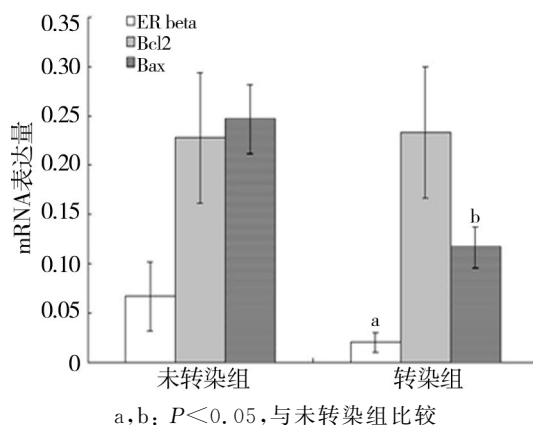


图 2 ER $\beta$ 1 基因表达沉默后 ER $\beta$ 1、Bax、Bcl-2 mRNA 在 MDA-MB-231 细胞的表达变化

## 2.3 ER $\beta$ 1、Bax、Bcl-2 蛋白在 MDA-MB-231 细胞中表达

Western blotting 结果表明:pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞的 ER $\beta$ 1 蛋白表达明显减少,与未转染组和空载体组相比,3 组间差异有统计学意义( $F=21.16$ ,  $P=0.00$ ;图 3)。pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞中 ER $\beta$ 1 蛋白表达分别与未转染组和空载体组比较,差异有统计学意义( $P=0.01$ ,  $P=0.00$ ),而空载体组与未转染组之间差异无统计学意义( $P=0.60$ )。

pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞的 Bax 蛋白表达明显下降,与空载体组和未转染组相比,3 组间差异有统计学意义( $F=49.18$ ,  $P=0.00$ ,图 3)。pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞的 Bax 蛋白表达分别与未转染组和空载体组比较,差异有统计学意义( $P$  均  $=0.00$ ),而未转染组与空载体组之间差异无统计学意义( $P=0.56$ )。

pSilencer-ER $\beta$ 1 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达无明显变化,与空载体组和未转染组相比,3 组间差异无统计学意义( $F=1.58$   $P=0.28$ ,图 3)。

## 2.4 流式细胞仪检测结果

与未转染组相比,pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组细胞的凋亡率明显下降,两组间差异有统计学意义( $t=6.22$ ,  $P=0.00$ ),提示 ER $\beta$ 1 可通过诱导凋亡抑制乳腺癌细胞的增殖(图 4)。

## 3 讨论

ER $\beta$  位于第 14 号染色体长臂 22~24 区段,基因长度为 24 kb。前期研究



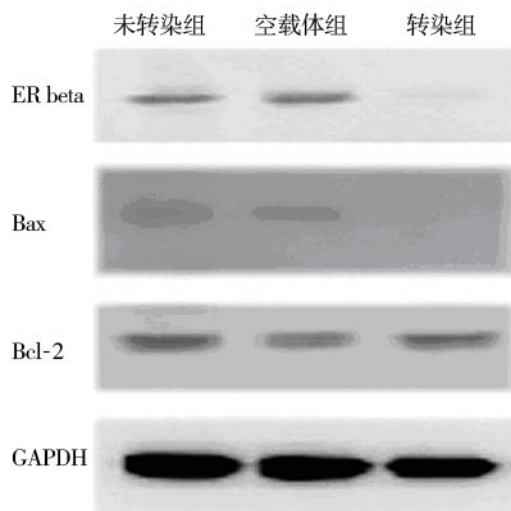


图 3 ER $\beta$  基因表达沉默后 Bax、Bcl-2 蛋白在 MDA-MB-231 细胞的表达变化

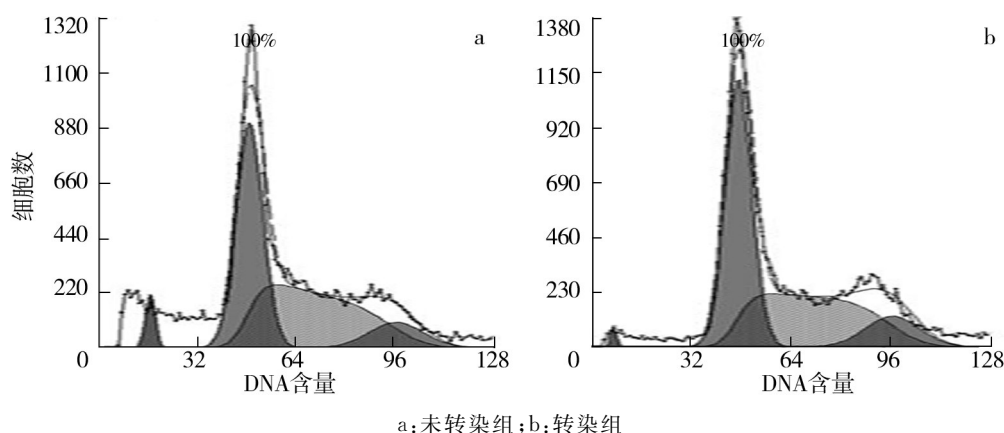


图 4 ER $\beta$  基因表达沉默后细胞凋亡率改变

表明,ER $\beta$  能抑制肿瘤细胞的增殖,是抑癌基因之一<sup>[4-5]</sup>。ER $\beta$  在人类乳腺癌等的多种癌组织中均有表达<sup>[6]</sup>。与乳腺正常组织相比,ER $\beta$  在乳腺癌中表达量明显降低<sup>[7]</sup>,提示 ER $\beta$  表达缺失在乳腺癌发生中具有重要作用。ER $\beta$  参与细胞多种信号传导,体外研究也证实 ER $\beta$  对乳腺起保护作用<sup>[8]</sup>,能抑制细胞的增殖,是乳腺癌预后良好的指标之一<sup>[9]</sup>。笔者的前期研究也证实了 ER $\beta$  能抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7 细胞增殖<sup>[10]</sup>。在本研究中,笔者用 RNA 干扰技术阻断 ER $\beta$  1 表达,细胞生长曲线显示细胞的增殖能力明显上升,提示 ER $\beta$  1 能抑制乳腺癌细胞的增殖,与文献报道一致<sup>[10-11]</sup>。但其作用机制目前仍不清楚。

细胞凋亡,即细胞程序性死亡(programmed cell death,PCD),指细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,自己结束生命的过程。细胞凋亡是一个主动的、信号依赖的过程。在胚胎发育、生物体内环境的稳定和多细胞生物防御外在及内在伤害方面均起着非常重要的作用。以往的细胞凋亡机制

研究将凋亡分为 Caspase 依赖和非 Caspase 依赖的凋亡。近年来,细胞凋亡失衡在细胞恶性肿瘤中的作用引起广泛关注。在肿瘤的发病机制中,凋亡受抑是肿瘤细胞恶性克隆增殖的基础,多种基因均与之密切相关,其中被称为细胞卫士的 Bcl-2 家族在细胞凋亡中具有重要作用。Bcl-2 家族包括 Bax 和 Bcl-2。Bcl-2 与 Bax 以二聚体形式发挥作用,Bcl-2/Bax 的比值决定细胞的凋亡与否。当比值增大时,细胞凋亡受抑制,反之则使细胞凋亡增多<sup>[12]</sup>。

Bax 是促进细胞凋亡的基因代表。其是 1993 年从表达 Bcl-2 的人 B 细胞系 RLT 中鉴定、分离出一种新型的蛋白质分子,被命名为 Bax。Bax 基因组 DNA 由 6 个外显子和 5 个内含子组成。Bax 蛋白由 192 个氨基酸组成,与 Bcl-2 蛋白有 21% 的同源性。Bax 基因能够通过其基因家族中共有的同源区与抑制凋亡基因 Bcl-2 形成异源二聚体,或与另一个 Bax 分子形成同源二聚体,使 Bcl-2 的抗凋亡能力丧失而促进凋亡。尽管 Bcl-2 和 Bax 属同一家族内的相关基因,但二者的作用却相互拮抗,Bcl-2 和 Bax 共同影响着肿瘤的生物行为。

在本研究中,pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组细胞凋亡率较未转染组明显降低( $P < 0.01$ ),说明 ER $\beta$ 1 对乳腺癌细胞凋亡具有一定的促进作用。笔者采用半定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 基因的表达,结果表明:pSilencer-ER $\beta$ 1 转染组细胞 Bax mRNA 和蛋白表达减少,而 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平无明显变化,Bcl-2/Bax 的比值增加,证明了 ER $\beta$ 1 能通过调控凋亡相关基因 Bax 的表达,诱导乳腺癌细胞的凋亡,但其具体调控机制还需进一步研究。

## 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(40): 36 869-36 872.
- [2] Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptor action[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2002, 12(4): 237-257.
- [3] Kuiper GG, Enmark E, Peltö Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5925-5930.
- [4] Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2006, 231(2): 151-157.
- [5] Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta[J]. Mol Interv, 2003, 3(5): 281-292.
- [6] Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha *in vivo* and *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243(1): 122-126.
- [7] Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, et al. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(6): 2537-2541.
- [8] 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(5): 245-248.
- [9] Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer-onlooker, passive player, or active protector[J]. Steroids, 2008, 73(11): 1039-1051.
- [10] Chen Li, Qiu JH, Yang XH, et al. Identification of a novel estrogen receptor  $\beta$ 1 binding partner, inhibitor of differentiation-1,

and role of ERb1 in human breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2009, 278(2):210-219.

- [11] 周艳,姜军,杨新华,等. 他莫昔芬对转染 ER $\beta$ 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):63-66.
- [12] Onur R , Semercioz A , Orhan I , et al . The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele[J]. Urol Res, 2004, 32(3):204-208.

(收稿日期:2010-07-08)

(本文编辑:罗承丽)

陈莉,杨新华,范林军,等. 雌激素受体  $\beta$ 1 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(1):41-48