

## • 实验研究 •

雌激素受体  $\beta$  及其剪切变异体与乳腺癌他莫昔芬耐药的关系

邱万寿 李忠山 郝俊文

**【摘要】 目的** 探讨雌激素受体(ER)亚型( $ER\beta$ )及其剪切变异体( $ER\beta_{cx}$ )的表达与乳腺癌他莫昔芬耐药的关系。**方法** (1)对乳腺癌他莫昔芬敏感 MCF-7 细胞和他莫昔芬耐药 MCF-7 细胞进行培养,利用去甲基化物 5-氮杂胞苷(5-Aza-2-deoxycytidine, 5-AZA-CdR)去甲基化的作用,对 MCF-7 细胞进行药物处理获得 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞,采用 Western blot 方法检测 3 组细胞中  $ER\beta$  和  $ER\beta_{cx}$  蛋白的表达。(2)取对数生长期生长良好的乳腺癌 MCF-7 细胞株,按  $2.5 \times 10^3$  细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板中,实验组分为他莫昔芬处理的 MCF-7 细胞(MCF-7+TAM 组)和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞(MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞+TAM 组),对照组为 MCF-7 细胞,采用 MTT 比色法,观察 3 组细胞的增殖情况。统计学分析采用单因素方差分析和重复测量方差分析。**结果** (1)  $ER\beta$  蛋白在他莫昔芬敏感 MCF-7 细胞中的表达高于他莫昔芬耐药的 MCF-7 细胞,两组细胞间差异有显著的统计学意义( $P=0.000$ ); $ER\beta_{cx}$  蛋白表达在两组之间差异无统计学意义( $P=0.366$ )。MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞  $ER\beta$  和  $ER\beta_{cx}$  蛋白表达均高于他莫昔芬敏感 MCF-7 细胞和他莫昔芬敏耐药 MCF-7 细胞( $P$  均  $=0.000$ )。(2)与对照组 MCF-7 细胞相比,他莫昔芬明显降低了 MCF-7+TAM 组和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞+TAM 组的细胞增值速度并抑制细胞生长;且他莫昔芬抑制细胞增殖作用 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞+TAM 组强于 MCF-7+TAM 组( $P=0.000$ )。**结论**  $ER\beta$  蛋白在他莫昔芬敏感 MCF-7 细胞中的表达高。MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞中  $ER\beta$  和  $ER\beta_{cx}$  蛋白的表达均高。他莫昔芬抑制细胞增殖作用在他莫昔芬处理的 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup>细胞中强。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;雌激素受体  $\beta$ ;雌激素受体  $\beta_{cx}$ ;他莫昔芬;耐药

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Relation between the expressions of  $ER\beta$  and  $ER\beta_{cx}$  and tamoxifen resistance in breast cancer** QIU Wan-shou, LI Zhong-shan, HAO Jun-wen. Department of Thyroid and Breast Surgery, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: QIU Wan-shou, E-mail: wsqiu-d@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the relationship of  $ER\beta$  (estrogen receptor  $\beta$ ) protein and its isoform ( $ER\beta_{cx}$ ) with tamoxifen resistance in human breast cancer. **Methods** (1) Tamoxifen-sensitive MCF-7 cells and tamoxifen-resistance MCF-7 cells were cultured. A demethylation drug named 5-Aza-2-deoxycytidine (5-AZA-CdR) was used to treat human breast cancer MCF-7 cells to obtain MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells. Western blot method was used to detect the expressions of  $ER\beta$  and  $ER\beta_{cx}$  proteins in the three groups. (2) Fully-developed

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院甲状腺乳腺外科

通信作者:邱万寿, E-mail: wsqiu-d@163.com

MCF-7 cells in log phase growth were seeded at  $2.5 \times 10^3$  cells/well in 96-well tissue culture plates. The experimental groups included tamoxifen-treated MCF-7 cells (MCF-7 cells + TAM group) and tamoxifen-treated MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells (MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells + TAM group), and the control group was MCF-7 cells without any treatment. MTT assay was used to observe the cell proliferation of the three groups. Statistical analysis was done using one-way analysis of variance and repeated measures. **Results** (1) The expression of ER $\beta$  protein in the tamoxifen-sensitive MCF-7 cells was higher than in the tamoxifen-resistant MCF-7 cells ( $P=0.000$ ), but there was no statistical difference in ER $\beta$ cx protein expression between the two groups ( $P=0.366$ ). The expressions of both ER $\beta$  and ER $\beta$ cx proteins in the MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells were the highest among the three groups, (both  $P=0.000$ ). (2) Compared with the control group of MCF-7 cells, tamoxifen significantly reduced the cell proliferation in the MCF-7 cells + TAM group and the MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells + TAM group, and the effect of tamoxifen inhibiting cell growth in the MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells + TAM group was greater than in the MCF-7 cells + TAM group ( $P=0.000$ ). **Conclusion** The ER $\beta$  expression in the tamoxifen-sensitive MCF-7 cells is high. The expressions of both ER $\beta$  and ER $\beta$ cx proteins in the MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells are high. The effect of tamoxifen inhibiting cell growth is high in the tamoxifen treated MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> cells.

**【Key words】** breast neoplasms; estrogen receptor  $\beta$ ; estrogen receptor  $\beta$ cx; tamoxifen; drug-resistance

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,雌激素受体(ER)在乳腺癌的发生、发展和治疗中具有十分重要的地位。以 ER $\alpha$  阳性表达作为乳腺癌他莫昔芬内分泌治疗的指标,其耐药问题一直难以解决。随着雌激素受体亚型 ER $\beta$  及其剪切异构体的发现,其与乳腺癌之间的关系受到国内外学者的广泛关注。而关于 ER $\beta$  及其剪切异构体与乳腺癌他莫西芬内分泌治疗的关系尚不明确,相关报道结果有很大矛盾。本研究拟通过细胞实验,初步探讨 ER $\beta$  及其剪切异构体与乳腺癌内分泌治疗的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

MCF-7 细胞株和他莫西芬耐药 MCF-7 细胞分别购于中山大学动物实验中心和南京医科大学动物实验中心。其他试剂及仪器包括:DMEM 高糖培养液(Genom 公司),新生牛血清(FBS,杭州四季青公司),他莫昔芬(Sigma 公司, T9262, 1g),四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司),二甲基亚砷(DMSO, Sigma 公司),5-氮杂胞苷(Sigma 公司),ER $\beta$  一抗(小鼠抗人,美国 Abcom 公司, ab288),ER $\beta$ cx 一抗(小鼠抗人,英国 Serotec 公司, MCA2279S),HRP-二抗(羊抗小鼠 IgG,武汉博士德公司),培养瓶、吸管、培养板、冻存管、枪头等(Corning 公司),超净工作台(苏州净化有限公司),CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo Forma 公司),倒置显微镜(OLYMPUS 公司),酶标仪(TECAN 公司),低温

冰箱(SANYO 公司),高速离心机(Eppendorf 公司),电泳仪(BIO-RAD 公司),纯水仪(RO-DI 公司),凝胶成像分析系统(BIO-RAD 公司)。

## 1.2 细胞培养

将他莫西芬敏感 MCF-7 细胞和耐药 MCF-7 细胞分别培养于含 10% 新生牛血清和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液中,37 °C,100% 湿度,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内。另设一组敏感 MCF-7 细胞加入去甲基化药物(5-氮杂胞苷,5-AZA-CdR)培养,取对数生长期细胞,MCF-7 细胞生长达到 60% 覆盖时,加入  $5 \times 10^{-6}$  mol/L 5-氮杂胞苷,每日换液,处理 72 h。

## 1.3 Western blot 测定

按常规方法收集他莫西芬敏感 MCF-7 细胞、他莫西芬耐药 MCF-7 细胞和敏感 MCF-7 细胞 5-氮杂胞苷处理后细胞(MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞),加入膜蛋白裂解液,超声破碎细胞,4 °C,10 000 r/min 离心 5 min(离心机半径:2.3 cm),收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度,按每 50 μg 分装于 0.5 ml 离心管,深低温 -80 °C 保存。样品加入 2×SDS 凝胶上样缓冲液混匀,水浴煮沸 5 min,经十二烷基磺酸钠聚苯烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,电转移至硝酸纤维膜上,用 5% 脱脂奶粉常温下封闭 4 h,TBS-T 液洗膜 2 次,膜置于封闭液稀释的 ERβ 鼠抗人单克隆抗体(1:200)、ERβcx 鼠抗人单克隆抗体(1:200)和内参 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(1:2000)中 4 °C 过夜,TBS-T 洗膜 3 次,5% 脱脂奶粉 TTBS (Tween20-Tris 缓冲生理盐水)稀释的辣根过氧化物酶偶联的二抗(抗鼠 IgG)(1:3000),置 37 °C 摇床温育 1 h;TBS-T 洗膜 3 次。ECL 增强发光试剂与膜片室温下振荡温育 1 min,X 线压片显影,计算机成像及图像分析系统 Quantity One 软件,分析各条带灰度值。

## 1.4 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)检测细胞增殖实验

取对数生长期生长良好的乳腺癌 MCF-7 细胞株,按  $2.5 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔细胞培养板中,按重复实验设置实验组和对照组,实验组分为他莫西芬处理( $5 \times 10^{-6}$  mol/L)的 MCF-7 细胞(MCF-7+TAM 组)和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> ( $5 \times 10^{-6}$  mol/L 5-氮杂胞苷,每日换液,处理 72 h)细胞(MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> + TAM 组),对照组为 MCF-7 细胞组,连续培养 24、48、72、96、120、144 h,每次取 3 孔,行 MTT 检测,在波长 490 nm 测量每孔吸光度值,以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

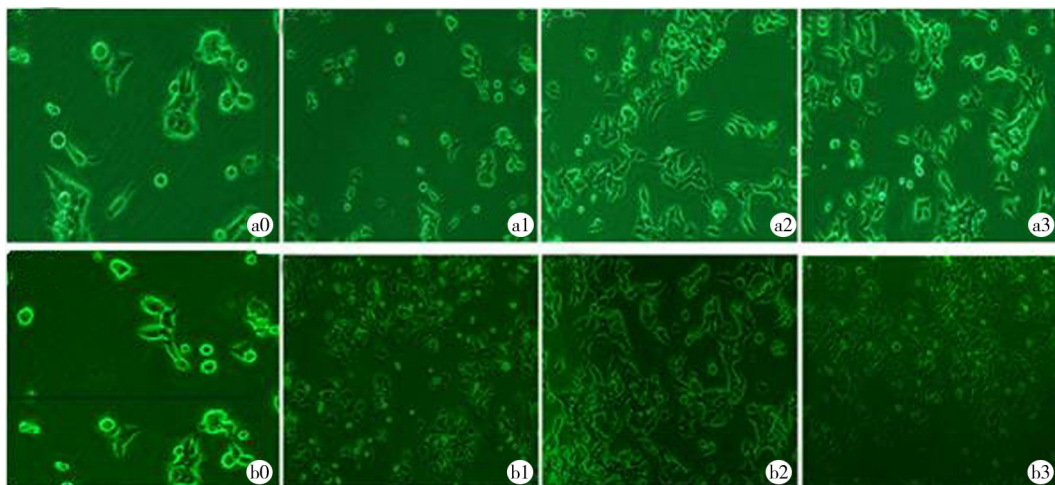
## 1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,经检验各组数据呈正态分布且方差整齐,多组间的均值比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 Bonferroni 法;重复测量资料组间比较采用重复测量的方差分析。 $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养结果

MCF-7 细胞和他莫西芬耐药 MCF-7 细胞贴壁生长,镜下细胞形态呈多边形,细胞排列规整,细胞间隙明显,生长周期相似,3~4 d 传代一次(图 1a0 和 b0)。他莫西芬处理的 MCF-7 细胞和耐药 MCF-7 细胞中,MCF-7 细胞增殖明显减慢并有一定的坏死,他莫西芬对 MCF-7 细胞有杀伤作用,约 7~8 d 传代一次;而耐药 MCF-7 细胞增殖与未处理时相同,无变化,3~4 d 传代一次(图 1)。



a0 和 b0 分别为 MCF-7 和耐药 MCF-7 细胞培养贴壁后。a1、a2、a3: MCF-7 细胞他莫西芬分别处理 24、48、72 h 细胞增殖情况,细胞增殖减慢,细胞有一定的坏死;b1、b2、b3: 耐药 MCF-7 细胞他莫西芬分别处理 24、48、72 h 细胞增殖情况,细胞生长良好,少量坏死。

图 1 他莫西芬处理 MCF-7 细胞和耐药 MCF-7 细胞不同时间细胞生长图(光镜  $\times 10$ , 无染色)

### 2.2 Western blot 蛋白印迹结果

表 1 和图 2 显示 ER $\beta$  蛋白在他莫西芬敏感 MCF-7 细胞中的表达高于他莫西芬耐药 MCF-7 细胞,两组细胞间差异有统计学意义( $P=0.000$ ),两组间 ER $\beta$ cx 蛋白表达差异无统计学意义( $P=0.366$ )。MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞 ER $\beta$  和 ER $\beta$ cx 蛋白的表达均高于他莫西芬敏感 MCF-7 细胞和他莫西芬耐药 MCF-7 细胞( $P=0.000$ )。

表 1 3 种细胞的 ER $\beta$  和 ER $\beta$ cx 蛋白灰度值比较

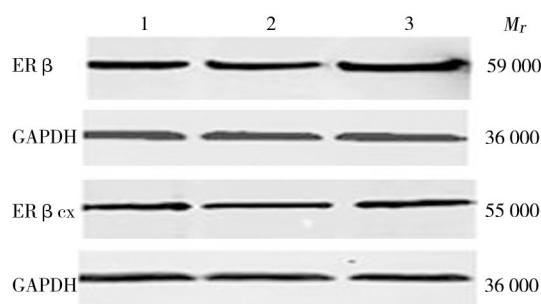
组别	ER $\beta$	ER $\beta$ cx
他莫西芬敏感 MCF-7 细胞	0.602 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.521 $\pm$ 0.009 <sup>c,d</sup>
他莫西芬耐药 MCF-7 细胞	0.412 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.518 $\pm$ 0.005 <sup>e</sup>
MCF-7 <sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞	0.737 $\pm$ 0.101	0.665 $\pm$ 0.008
F 值	4.197	3.706
P 值	0.000	0.000

a:  $P=0.000$ , 分别与他莫西芬耐药 MCF-7 细胞和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞比较;

b:  $P=0.000$ , 与 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞比较;c:  $P=0.366$ , 与他莫西芬耐药 MCF-7 细胞比较;

d,e:  $P=0.000$ , 与 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞比较





1: 他莫西芬敏感 MCF-7 细胞; 2: 他莫西芬耐药 MCF-7 细胞; 3: MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞

图 2 ERβ、ERβcx 的 Western blot 检测结果

### 2.3 MTT 检测他莫西芬对 MCF-7 细胞和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞的活性和生长的影响

MTT 检测结果显示, 他莫西芬抑制作用于 24 h 开始出现, 随着时间的进一步延长, 抑制作用更加明显(图 3、4), 但在初始 48 h 内, 抑制作用无明显差异, 96 h 开始出现差异, 且随着时间的再进一步延长, 差异更加明显(图 5), 细胞生长至第 6 天, 与对照组相比, 两个实验组的细胞生长均受到明显抑制( $P$  均 = 0.000); 两个实验组细胞比较, 他莫西芬抑制细胞生长的作用 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞 + TAM 组强于 MCF-7 细胞 + TAM 组( $P$  = 0.033; 表 2)。

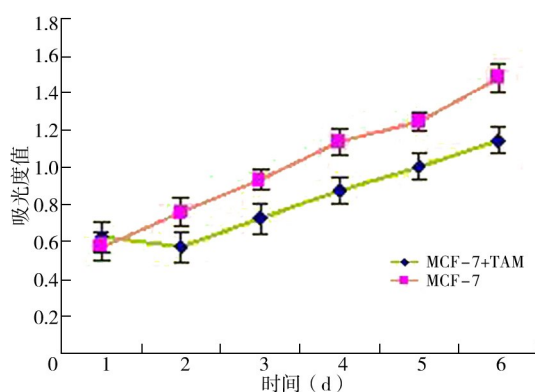


图 3 他莫西芬(TAM)处理 MCF-7 细胞和对照组 MCF-7 细胞生长曲线

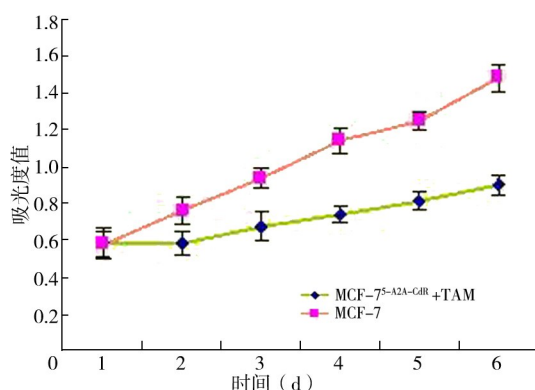


图 4 他莫西芬(TAM)处理 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞和对照组 MCF-7 细胞生长曲线

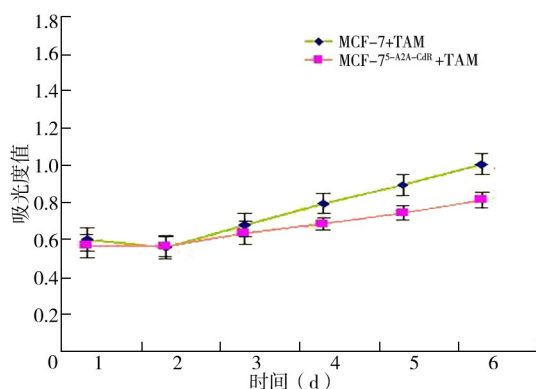


图 5 他莫西芬(TAM)处理 MCF-7 细胞和 MCF-7<sup>5</sup>-AZA-CdR 细胞生长曲线

表 2 他莫西芬(TAM)处理的 MCF-7 细胞和 MCF-7<sup>5</sup>-AZA-CdR 细胞不同时间的吸光度值

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
MCF-7 细胞+TAM <sup>a</sup>	0.630±0.015	0.575±0.006	0.729±0.011	0.877±0.008	1.005±0.014	1.147±0.009
MCF-7 <sup>5</sup> -AZA-CdR 细胞+TAM <sup>b</sup>	0.586±0.008	0.581±0.004	0.673±0.006	0.739±0.010	0.812±0.004	0.901±0.007
MCF-7 细胞	0.573±0.032	0.762±0.040	0.937±0.012	1.042±0.009	1.248±0.050	1.483±0.047

采用重复测量法;球形检验  $P=0.553$ ; a:  $P=0.033$ , 与 MCF-7<sup>5</sup>-AZA-CdR 细胞组+TAM 相比,  $P=0.000$ , 与 MCF-7 细胞相比; b:  $P=0.000$ , 与 MCF-7 细胞相比

### 3 讨论

第二种甾体类激素受体亚型 ER $\beta$  在 1996 年被发现后,它与乳腺癌之间的关系受到国内外学者的日益重视。而关于 ER $\beta$  表达对内分泌治疗的影响,目前研究结果和观点仍然不一致。Sofia 等<sup>[1]</sup>对 353 例乳腺癌免疫组织化学分析发现 ER $\beta$  阳性表达患者对内分泌治疗的敏感性呈正相关,远期生存率和总体生存率提高;尤其在 ER $\alpha$  阴性表达的患者中,生存率提高更为明显,ER $\beta$  表达是独立的良性预后因素,并且 ER $\alpha$  阴性/ER $\beta$  阳性乳腺癌患者可从他莫昔芬治疗中获益,明显降低复发率。ER $\beta$  表达与内分泌治疗耐药相关的研究发现 ER $\beta$ mRNA 的高表达提示他莫昔芬治疗耐药<sup>[2-4]</sup>。但也有学者认为他莫昔芬治疗效果和 ER $\beta$  水平无关<sup>[5]</sup>。目前 ER $\beta$  分为 ER $\beta$ 1~5 五个异构型,乳腺癌中表达的有 ER $\beta$ 1、ER $\beta$ 2 和 ER $\beta$ 5。其中人 ER $\beta$ 1 相当于野生型 ER $\beta$ ,ER $\beta$ 2 相当于 ER $\beta$ cx。ER $\beta$ cx 表达对他莫昔芬治疗的影响也存在着争议。Zhao 等<sup>[6]</sup>研究发现 ER $\beta$ cx 具有拮抗他莫昔芬抗雌激素作用。而 Miller 等<sup>[5]</sup>则认为 ER $\beta$ cx 表达与乳腺癌患者内分泌治疗耐药无关。Vinayagam 等<sup>[7]</sup>发现表达 ER $\beta$ cx 的乳腺癌比不表达 ER $\beta$ cx 的乳腺癌表现出更强的内分泌治疗敏感性。这些研究提示,ER $\beta$ cx 在乳腺癌组织中的表达,可能与野生型 ER $\beta$  一起共同影响内分泌治疗的结果。

乳腺癌组织中 ER $\beta$  基因的启动子有着不同程度的甲基化<sup>[8]</sup>,这又增添了 ER $\beta$  对内分泌治疗影响的复杂性。Kim 等<sup>[9]</sup>发现乳腺癌中 ER $\beta$  基因的甲基化率达到 50%。将甲基化抑制物 5-Aza-2-deoxycytidine(5-AZA-CdR)去甲基化可以诱导乳腺癌 ER $\beta$  表达增强或再表达<sup>[10]</sup>,同样结果在前列腺癌和卵巢癌中也已证实<sup>[11]</sup>。

本研究发现 ER $\beta$  蛋白在他莫西芬敏感 MCF-7 细胞中的表达高于他莫西芬耐药 MCF-7 细胞( $P=0.000$ ),提示 ER $\beta$  表达可能与他莫昔芬治疗敏感有关,ER $\beta$  蛋白表达在 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞中最高,说明 ER $\beta$  基因去甲基化后,可以诱导乳腺癌 ER $\beta$  蛋白表达的增强。ER $\beta$ cx 的表达水平在他莫西芬敏感 MCF-7 细胞和他莫西芬耐药 MCF-7 细胞两者间无差别( $P=0.366$ ),提示 ER $\beta$ cx 表达可能与他莫昔芬治疗效果无关。采用 MTT 检测他莫西芬对 MCF-7 细胞和 MCF-7<sup>5-AZA-CdR</sup> 细胞的活性和生长的影响,结果显示,增强 ER $\beta$  蛋白表达后,他莫昔芬对 MCF-7 细胞抑制增强,提示,增加乳腺癌细胞株中 ER $\beta$  的表达,能够促进他莫西芬抑制细胞生长的作用。分析本研究结果与文献<sup>[2-5]</sup>报道结果的差异,可能的原因有:(1)检测方法不同,大多数 ER $\beta$  和他莫昔芬治疗耐药相关的研究仅检测 ER $\beta$  mRNA 水平,并不能真实地反应其执行功能的蛋白水平;(2)免疫组织化学检测 ER $\beta$  蛋白表达水平时所采用的截点不同。本研究结果为前期体外实验;笔者正在进行临床病例的研究,探究临床上 ER $\beta$  与乳腺癌他莫西芬内分泌治疗间的关系。

#### 参考文献

- [1] Sofia K, Saal G, Bendahl PO, et al. Estrogen receptor  $\beta$  expression is associated with tamoxifen response in ER $\alpha$ -negative breast carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(7):1987-1994.
- [2] Speirs V, Malone C, Walton DS, et al. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients [J]. Cancer Res, 1999, 59(21):5421-5424.
- [3] Chang HG, Kim SJ, Chung KW, et al. Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene [J]. J Mol Med, 2005, 83( 2):132-139.
- [4] Markey GC, Cullen R, Diggin P, et al. Estrogen receptor-beta mRNA is associated with adverse outcome in patients with breast cancer [J]. Tumour Biol, 2009, 30(4):171-175.
- [5] Miller WR, Anderson TJ, Dixon JM, et al. Oestrogen receptor beta and neoadjuvant therapy with tamoxifen: prediction of response and effects of treatment [J]. Br J Cancer, 2006, 94(9):1333-1338.
- [6] Zhao C, Matthews J, Tujague M, et al. Estrogen receptor beta 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(8):3955-3962.
- [7] Vinayagam R, Sibson DR, Holcombe C, et al. Association of oestrogen receptor beta 2 (ER beta 2/ER beta cx) with outcome of adjuvant endocrine treatment for primary breast cancer: a retrospective study [J]. BMC Cancer, 2007, 7(18): 131.
- [8] Zhao C, Lam EW, Sunters A, et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation [J]. Oncogene, 2003, 22(48):7600-7606.
- [9] Kim SJ. CpG methylation of the ER alpha and ER beta genes in breast cancer [J]. Int J Mol Med, 2004, 14(2): 289-295.
- [10] Rody A, Holtrich U, Solbach C, et al. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions [J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12(4):903-916.
- [11] Kurkjian C, Kummar S, Murgu AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy [J]. Curr Probl Cancer, 2008, 32(5):187-235.

(收稿日期:2010-05-09)

(本文编辑:赵彬)

邱万寿,李忠山,郝俊文. 雌激素受体  $\beta$  及其剪切变体对乳腺癌他莫昔芬耐药的关系[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2011, 5(3):323-329.