文章编号:1000-5404(2013)02-0095-04

论著

睾酮对乳腺癌细胞中 FEN1 表达的影响

王 杨,陈 彬,姜晓梅,王 越,付晓红,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨睾酮(testosterone,T)在乳腺癌细胞中对瓣状核酸内切酶(flap endonuclease 1,FEN1)表达的影响及其机制。**方法** 以 MCF-7 作为研究对象,采用 RT-PCR 观察雌二醇(17β-estradiol,E2)单独作用以及分别与雌激素受体(estrogen receptor,ER)拮抗剂 ICI182,780(ICI)和 MAPK 途径抑制剂 U0126 共同作用时 FEN1 表达的变化。以 MCF-7aro(芳香化酶过表达的 MCF-7)作为研究对象,采用 RT-PCR 观察加入单独的睾酮以及睾酮和芳香化酶抑制剂来曲唑(letrozole)共同作用时 FEN1 表达的变化;采用 Western blot 观察睾酮单独作用以及分别与来曲唑和 U0126 共同作用时 FEN1、p-ERK和 p-Elk 的变化。**结果** 与对照组比较,加入雌二醇后 MCF-7 细胞中 FEN1 mRNA 的表达升高 2.04 倍($P<0.01$),加入 ICI 和 U0126 后分别降低 10.63 倍和 2.17 倍($P<0.01$)。加入睾酮后 MCF-7aro 细胞中 FEN1 mRNA 的表达升高 1.66 倍($P<0.01$),蛋白的表达升高 1.80 倍($P<0.01$);加入来曲唑后 FEN1 mRNA 的表达下降 2.38 倍,蛋白的表达降低 1.84 倍,加入 U0126 后蛋白的表达降低 2.28 倍($P<0.01$);加入睾酮后 ERK 和 Elk-1 的磷酸化水平分别升高 2.28 倍和 2.60 倍($P<0.01$),加入来曲唑后 ERK 和 Elk-1 的磷酸化水平分别降低 2.60 倍和 2.37 倍($P<0.01$),加入 U0126 后 ERK 和 Elk-1 的磷酸化水平分别降低 10.38 倍和 119.50 倍($P<0.01$)。**结论** 睾酮可通过 MAPK 途径上调 MCF-7 aro 细胞中 FEN1 的表达。

[关键词] 乳腺肿瘤;细胞系, 肿瘤;睾酮;DNA 瓣核酸内切酶类
[中图法分类号] R737.9;R968.1;R977.12 [文献标志码] A

Effect of testosterone on FEN1 expression in breast cancer cells

Wang Yang, Chen Bin, Jiang Xiaomei, Wang Yue, Fu Xiaohong, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of testosterone on the expression of flap endonuclease 1 (FEN1) in breast cancer. **Methods** The expression of FEN1 in MCF-7 cells was observed by RT-PCR after the cells were treated with 17β-estradiol (E2), E2 combined with ICI182, 780, an estrogen receptor antagonist, and E2 combined with U0126, a MEK inhibitor, respectively. In MCF-7 cells over-expressing aromatase (MCF-7/Aro), the expression of FEN1 was observed by RT-PCR when cells were treated with testerone or testerone combined with letrozole, one of aromatase inhibitors. The expression of FEN1 protein, p-ERK and p-Elk was observed by Western blotting when the cells were treated with testosterone, testosterone combined with letrozole, or combined with U0126. **Results** In MCF-7 cells, E2 resulted in an increase in the expression of FEN1 mRNA by 2.04 folds ($P<0.01$), which was inhibited by ICI182,780 or U0126 (10.63 and 2.17 folds, $P<0.01$). In MCF-7aro cells, testosterone resulted in an increase in the expression of FEN1 at mRNA and protein levels by 1.66 and 1.80 folds respectively ($P<0.01$), which was inhibited by letrozole (2.38 and 1.84 folds, $P<0.01$) or U0126 (2.28 folds for protein only, $P<0.01$). Testosterone increased the phosphorylation of p-ERK and p-Elk by 2.28 and 2.60 folds, which was inhibited by letrozole by 10.38 folds or U0126 by 119.50 folds ($P<0.01$). **Conclusion** Testosterone up-regulates FEN1 in MCF-7aro cells through MAPK signaling pathway.

[**Key words**] breast neoplasms;cell line, tumor;testosterone;flap endonucleases

Supported by the National Nature Science Foundation of China(81272908), the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2012jjA10121) and the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University(2009). Corresponding author: Chen Bin, Tel: 86-23-68752944, E-mail: binnchen@tom.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81272908);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10121);第三军医大学归国人员启动基金(2009)
[通信作者] 陈 彬,电话:(023)68752944,E-mail: binnchen@tom.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121123.0943.011.html(2012-11-23)

乳腺癌可分为激素依赖性和非激素依赖性两种。绝经前妇女的雌激素主要来源于卵巢,而绝经后妇女雌激素则主要由脂肪组织产生的雄激素经芳香化酶转化而来[1]。在雄烯二酮和睾酮(testosterone,T)等雄激素转化为雌酮和雌二醇(17β-estradiol,E2)的过程当中,芳香化酶(aromatase)是关键酶和限速酶。来曲唑(letrozole)作为第三代芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors,AIs)与前两代相比具有明显降低雌激素水平、对芳香化酶选择性高、患者不良反应少等特点,已在临床上大量应用。来曲唑目前成为治疗ER+乳腺癌的首选药物[2]。瓣状核酸内切酶(flap endonuclease 1,FEN1)是维持真核生物基因组稳定性的关键酶。在DNA复制中,FEN1参与冈崎片段加工中核苷酸引物(DNA和RNA)的切除;在DNA修复中,FEN1可以切除修复双链DNA断裂的非同源末端的连接,避免了不良遗传和癌症的发生;FEN1还参与维持线粒体DNA的完整性和端粒的稳定性[3]。有研究[4]显示FEN1与癌症的发生、发展有密切的关系,在多种癌症细胞当中高表达,如小细胞肺癌和非小细胞肺癌[5]、胃癌[6]、转移性前列腺癌[7]、胰腺癌[8]。在乳腺癌中也有人发现FEN1高表达[9];基因芯片检测乳腺癌细胞中受E2调节的近百个基因中,发现E2上调了FEN1约2.63倍[10],其机制目前尚不清楚。我们未发表的研究结果显示在乳腺癌中E2可以上调FEN1的表达,并且这种作用是通过ER/MAPK/Elk-1途径实现的。而E2是在芳香化酶的作用下经雄激素转变而来的,那么雄激素作用于乳腺癌细胞是否能得到类似的结果?本研究选择MCF-7aro作为研究对象,观察睾酮在乳腺癌细胞中对FEN1表达的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 乳腺癌细胞系MCF-7和MCF-7aro由本教研室保存。

1.1.2 主要试剂 2×Modified Eagle培养基和热灭活胎牛血清购自Gibco公司。经木炭葡聚糖(charcoal dextran)处理的胎牛血清,100×NEAA和100 mmoL/L丙酮酸钠购自HyClone公司。睾酮、雌二醇、ER拮抗剂ICI182,780(ICI)和letrozole、DMSO购自Sigma公司。U0126购自Promega公司。ERK及其磷酸化抗体、Gapdh抗体购自Cell Signal公司。FEN1抗体,Elk-1及其磷酸化抗体购自Santa Cruz公司。动物RNAout购自北京天恩泽基因科技有限公司。DNA Marker DL-2000,Ex *Taq* DNA聚合酶购自大连TaKaRa公司。M-MLV反转录酶购自Invitrogen公司。PCR引物由上海Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

1.2.1.1 MCF-7细胞株常规培养 采用含10%胎牛血清、1% NEAA、1 mmol/L丙酮酸钠、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的MEM培养基培养。将MCF-7细胞进行去内源性激素处理:用含5%葡聚糖-炭末吸附的胎牛血清、1% NEAA、1 mmol/L丙酮酸钠的无酚红MEM培养基培养48 h,然后用含10×10^{-9} mol/L E2,1×10^{-6} mol/L ICI,10×10^{-6} mol/L U0126,10×10^{-9} mol/L E2+1×10^{-6} mol/L ICI,10×10^{-9} mol/L E2+10×10^{-6} mol/L U0126的细胞培养液处理细胞24 h,对照组为含DMSO的细胞培养液。

1.2.1.2 MCF-7aro细胞株常规培养 采用含10%胎牛血清、1% NEAA、1 mmol/L丙酮酸钠、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素和100 μg/mL G418的2×Modified Eagle培养基培养。将MCF-7aro细胞进行去内源性激素处理:用含10%葡聚糖-炭末吸附的胎牛血清、1% NEAA、1 mmol/L丙酮酸钠的2×Modified Eagle培养基培养72 h,分别用含10×10^{-9} mol/L睾酮,200×10^{-9} mol/L Letrozole,10×10^{-6} mol/L U0126,10×10^{-9} mol/L T+200×10^{-9} mol/L Letrozole,10×10^{-9} mol/L T+10×10^{-6} mol/L U0126的细胞培养液,对照组含DMSO的细胞培养液处理细胞24 h,检测FEN1在mRNA和蛋白水平的表达情况。以上条件处理细胞15 min后,检测p-ERK和p-Elk的变化情况。

1.2.2 RT-PCR 用RNAout提取细胞的总RNA,鉴定完RNA的浓度和完整性后,取2 μg总RNA用逆转录试剂盒逆转录成cDNA,然后用PCR仪扩增。逆转录条件,65 ℃ 5 min,37 ℃ 52 min,70 ℃ 15 min,收产物于4 ℃保存。PCR条件,预变性94 ℃ 10 min,变性94 ℃ 45 s,退火60 ℃ 45 s,延伸72 ℃ 1 min,72 ℃ 10 min。GAPDH为25个循环,FEN1为30个循环。FEN1引物:上游5′-CCAGCTCTTCTTGGAACCTG-3′,下游5′-CGCTCCTCAGAGAACTGCTT-3′。GAPDH引物,上游5′-CAATGACCCCTTCATTGACC-3′,下游5′-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3′。电泳使用1%琼脂糖凝胶,120 V,25 min,于凝胶成像仪上观察结果。

1.2.3 Western blot 上述处理细胞后用PBS洗2次,用细胞裂解液(含Cocktail蛋白酶抑制剂)裂解细胞30 min。裂解物于4 ℃,12 000 r/min离心15 min,Bradford试剂(Bio-Rad公司)测定蛋白质浓度。50 μg细胞裂解物进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,蛋白质被转移到PVDF膜上,然后在含5%脱脂牛奶的TBST缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH=7.5,150 mmol/L NaCl,0.5% Tween20)中封闭1 h,将PVDF膜于5 mL封闭液(GAPDH、FEN1、T-Elk、T-ERK用含5%脱脂奶粉的TBST或p-ERK、p-Elk用含5%牛血清蛋白V的TBST)4 ℃孵育过夜,用TBST漂洗5次,每次5 min。用封闭液1∶5 000稀释二抗,将PVDF膜置于抗体溶液中,37 ℃缓慢摇荡1 h。TBST漂洗5次,每次5 min。将PVDF膜浸入化学发光试剂,暗室曝光。以GAPDH为内参。

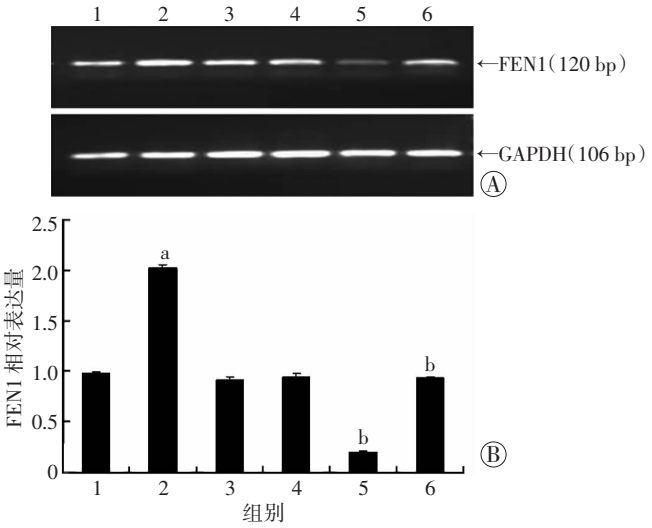
1.3 数据采集与统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示。使用Quantity One软件采集RT-PCR和Western blot结果中各条带的光密度值,将目的条带的光密度值与内参条带的光密度值之比作为相对表达量。采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 雌二醇对 MCF-7 细胞中 FEN1 mRNA 表达的影响

在 E2 作用下，FEN1 的 mRNA 水平增高 2.04 倍（$P<0.01$）；当 E2 和 ICI 共同作用时，FEN1 的 mRNA 表达量下降 10.63 倍（$P<0.01$），当 E2 和 U0126 共同作用时，FEN1 的 mRNA表达量下降 2.17 倍（$P<0.01$）。见图 1。



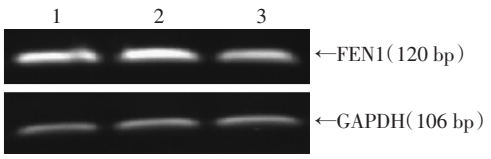
1：对照组；2：E2 组；3：ICI 组；4：U0126 组；5：E2 + ICI 组；6：E2 + U0126 组

A：RT-PCR；B：FEN1 相对表达量的灰度值比较　a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 E2 组比较

图 1　RT-PCR 检测 MCF-7 细胞中 E2、ICI、U0126 对 FEN1 表达的影响

2.2 睾酮对 MCF-7aro 细胞中 FEN1 mRNA 表达的影响

在睾酮的作用下，FEN1 的 mRNA 水平增高 1.66 倍［(1.03 ± 0.06) *vs* (1.71 ± 0.06)，$P<0.01$］，睾酮联合 Letrozole 作用后，FEN1 mRNA 表达量下降 2.38 倍［(1.71 ± 0.06) *vs* (0.72 ± 0.06)，$P<0.01$］。见图 2。



1：对照组；2：睾酮组；3：睾酮 + Letrozole 组

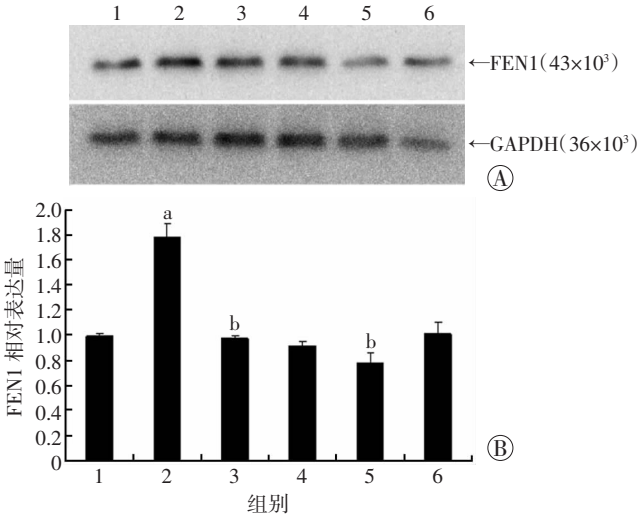
图 2　RT-PCR 检测睾酮对 MCF-7aro FEN1 mRNA 表达的影响

2.3 睾酮对 MCF-7aro 细胞中 FEN1 蛋白表达的影响

与对照组比较，睾酮使 FEN1 蛋白的表达上调了 1.80 倍（$P<0.01$）。睾酮 + Letrozole，睾酮 + U0126 组相比睾酮组，FEN1 蛋白的表达下降 1.84 倍（$P<0.01$）和 2.28 倍（$P<0.01$）。见图 3。

2.4 睾酮通过快速的 MAPK 途径调节 MCF-7aro 细胞中 ERK 和 Elk-1 的磷酸化

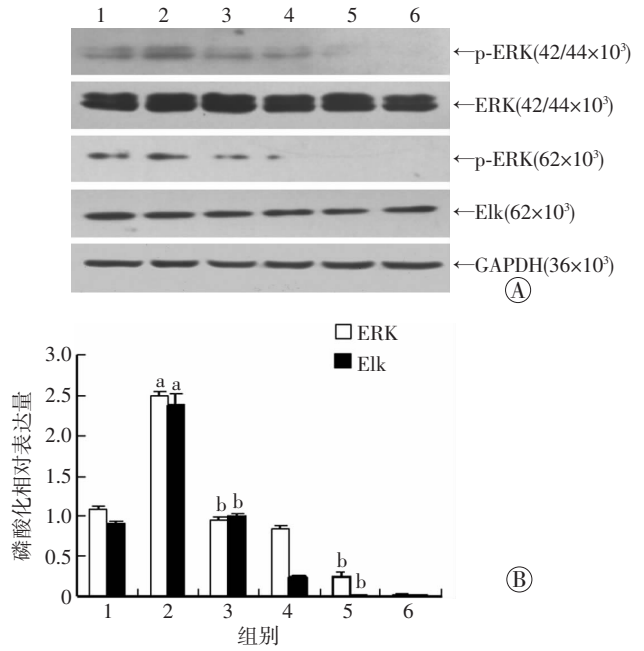
与对照组比较，睾酮使 ERK 和 Elk-1 的磷酸化水平分别上调了 2.28 倍（$P<0.01$）和 2.60 倍（$P<0.01$）。睾酮 + Letrozole、睾酮 + U0126 组相比睾酮组，ERK 的磷酸化水平分别下降 2.60 倍（$P<0.01$）和 10.38 倍（$P<0.01$），Elk-1 的磷酸化水平分别下降 2.37 倍（$P<0.01$）和 119.50 倍（$P<0.01$）。见图 4。



1：对照组；2：睾酮组；3：睾酮 + Letrozole 组；4：Letrozole 组；5：睾酮 + U0126 组；6：U0126 组

A：Western blot；B：FEN1 相对表达量的灰度值比较　a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与睾酮组比较

图 3　Western blot 检测睾酮对 MCF-7aro FEN1 蛋白表达的影响



1：对照组；2：睾酮组；3：睾酮 + Letrozole 组；4：Letrozole 组；5：睾酮 + U0126 组；6：U0126 组

A：Western blot 结果；B：p-ERK 和 p-Elk 的相对表达量的灰度值比较　a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与睾酮组比较

图 4　Western blot 检测睾酮对 MCF-7aro 细胞中 ERK 和 Elk-1 磷酸化的影响

3 讨论

乳腺癌是一种严重威胁妇女身心健康的、最常见的恶性肿瘤，占妇女全身恶性肿瘤的 7% ~10%，其发病机制涉及雌激素受体、表皮生长因子酪氨酸蛋白激酶受体（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）等多种标志基因的改变，其发病的详细机制尚

未阐明[11]。目前乳腺癌的临床治疗主要有针对雌激素和ER的内分泌治疗、针对HER2的赫赛汀(herceptin)治疗以及化疗等,但患者往往对这些治疗措施产生抵抗[12]。因此,鉴定新的乳腺癌肿瘤标志物,确定其在乳腺癌发生、发展中的作用和机制,可为临床乳腺癌的治疗寻找新的靶标。FEN1是一种参与DNA修复的结构特异性核酸酶,参与了多个DNA代谢途径,在维护基因组稳定性方面发挥了重要作用[3]。最近的研究[9-10]显示FEN1基因在临床乳腺癌组织中过表达,我们的前期工作和其他人的研究[9,13]发现它在乳腺癌细胞中的过表达受E2的调节,并可能是监控乳腺癌进程的潜在标志物之一,但FEN1表达受E2上调的信号机制和生物学意义尚不清楚。另外,最近的研究[14]表明肿瘤细胞中FEN1的过表达与顺铂、替莫唑胺等化疗抵抗有关,改变FEN1的表达可影响这些化疗药物的敏感性。因此,阐明乳腺癌组织中FEN1基因的表达受E2上调的信号机制及其生物学意义还可有助于寻找增强临床乳腺癌化疗敏感性的新措施。

我们以前的研究发现在乳腺癌中E2可以上调FEN1的表达,并且这种作用是通过ER/MAPK/Elk-1实现的(结果另发表)。本研究发现E2可以上调MCF-7细胞中FEN1 mRNA的表达水平,这种作用可以被ICI和U0126抑制,进一步证实了我们上述研究结果。由于体内的E2是通过雄激素转化而来的,芳香化酶是这一转化的关键酶。那么雄激素能否通过与E2相似的机制上调FEN1的表达呢?为此,本研究以芳香化酶过表达的MCF-7(MCF-7aro)作为研究对象,研究了睾酮在乳腺癌细胞中对FEN1表达的影响及其机制。第一代和第二代芳香化酶抑制剂主要用于治疗晚期乳腺癌,但是治疗效果比三苯氧胺差[15]。而来曲唑作为第3代芳香化酶抑制剂,相对于三苯氧胺治疗绝经后早期乳腺癌患者疗效更好[16]。来曲唑可抑制雌激素的合成,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的疗效。在本研究中,我们利用来曲唑作为睾酮作用的抑制剂。研究结果表明,睾酮可以上调MCF-7aro细胞中FEN1的mRNA和蛋白表达水平,这种作用可以被来曲唑和U0126抑制,说明睾酮通过芳香化酶转变成雌激素后,可发挥对FEN1表达的上调效应,该作用与我们前期单独应用雌激素观察到的效果相似。同时,我们观察到睾酮可以快速上调磷酸化ERK和Elk-1的表达,这种作用可以被来曲唑和U0126抑制,表明睾酮对FEN1表达的上调效应也涉及了ER/MAPK/Elk-1途径,这与睾酮通过芳香化酶转变成雌激素后发挥的非基因组调节活性有关。当然,睾酮激活的Elk-1是否如雌激素激活的Elk-1一样真正与FEN1启动子区结合,还需EMSA和ChIP分析进一步证实。

综上所述,睾酮通过芳香化酶转变为雌激素后,刺激了FEN1的表达,该效应涉及了ER/MAPK/Elk-1途径。该研究结果可进一步揭示临床上观察到的在乳腺癌中FEN1高表达的原因,并为寻找降低FEN1的表达水平以提高乳腺癌化疗敏感性的新措施奠定了基础。

参考文献:

[1] McArthur H L, Morris P G. Aromatase inhibitor strategies in metastatic breast cancer[J]. Int J Women's Health, 2009(1): 67-72.

[2] Chumsri S, Sabnis G J, Howes T, *et al*. Aromatase inhibitors and xenograft studies[J]. Steroids, 2011, 76(8): 730-735.

[3] Balakrishnan L, Stewart J, Polaczek P, *et al*. Acetylation of Dna2 endonuclease/helicase and flap endonuclease 1 by p300 promotes DNA stability by creating long flap intermediates[J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4398-4404.

[4] Zheng L, Dai H, Zhou M, *et al*. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers[J]. Nat Med, 2007, 13(7): 812-819.

[5] Yang M, Guo H, Wu C, *et al*. Functional FEN1 polymorphisms are associated with DNA damage levels and lung cancer risk[J]. Hum Mutat, 2009, 30(9): 1320-1328.

[6] Liu L, Zhou C, Zhou L, *et al*. Functional FEN1 genetic variants contribute to risk of hepatocellular carcinoma, esophageal cancer, gastric cancer and colorectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(1): 119-123.

[7] Urbanucci A, Sahu B, Seppala J, *et al*. Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer[J]. Oncogene, 2012, 31(17): 2153-2163.

[8] Kokkinakis D M, Liu X, Neuner R D. Modulation of cell cycle and gene expression in pancreatic tumor cell lines by methionine deprivation (methionine stress): implications to the therapy of pancreatic adenocarcinoma[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(9): 1338-1348.

[9] Singh P, Yang M, Dai H, *et al*. Overexpression and hypomethylation of flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(11): 1710-1717.

[10] Bourdeau V, Deschenes J, Laperriere D, *et al*. Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(1): 76-93.

[11] Lopez-Garcia M A, Geyer F C, Lacroix-Triki M, *et al*. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways[J]. Histopathology, 2010, 57(2): 171-192.

[12] Madaio R A, Spalletta G, Cravello L, *et al*. Overcoming endocrine resistance in breast cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(5): 519-528.

[13] Zheng L, Jia J, Finger L D, *et al*. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(3): 781-794.

[14] Nikolova T, Christmann M, Kaina B. FEN1 is overexpressed in testis, lung and brain tumors[J]. Anticancer Res, 2009, 29(7): 2453-2459.

[15] Nabholtz J M, Mouret-Reynier M A, Durando X, *et al*. Role of aromatase inhibitors in the upfront adjuvant hormonal therapy of postmenopausal patients with breast cancer[J]. Indian J Surg Oncol, 2010, 1(1): 19-26.

[16] Keating G M. Letrozole: a review of its use in the treatment of postmenopausal women with hormone-responsive early breast cancer[J]. Drugs, 2009, 69(12): 1681-1705.

(**收稿**:2012-09-25;**修回**:2012-11-06)

(编辑 栾 嘉)