文章编号:1000-5404(2014)04-0317-04

论著

ERβ1影响乳腺癌上皮间质转化和侵袭迁移的初步实验研究

宗贝歌,周 艳,杨新华,张 毅,范林军,张 帆,陈 莉,齐晓伟,杜俊泽,陈庆秋,姜 军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心)

[摘要] **目的** 探讨雌激素受体β1(estrogen receptor β1,ERβ1)能否通过调控E-钙粘蛋白(E-cadherin,E-cad)的表达影响乳腺癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的发生,ERβ1在乳腺癌细胞侵袭迁移中的作用。**方法** 通过脂质体法将ERβ1真核表达质粒和特异性siRNA-ERβ1转染至人乳腺癌MDA-MB-231细胞中,干预细胞中ERβ1的表达,采用RT-PCR、Western blot法分别在mRNA和蛋白水平观察干预ERβ1后对E-cad表达的影响,进行体外侵袭迁移实验,观察干预细胞中ERβ1的表达对乳腺癌细胞恶性生物学行为的改变。**结果** 过表达ERβ1后,ERβ1及E-cad在mRNA[(0.823±0.028) *vs* (0.554±0.044),$P=0.025$;(0.944±0.04) *vs* (0.724±0.28),$P=0.026$]和蛋白[(1.331±0.019) *vs* (0.463±0.019), $P=0.001$;(1.428±0.005) *vs* (0.500±0.010), $P<0.01$]水平均表达升高,侵袭[(45.8±7.4) *vs* (70.4±13.3), $P=0.039$]迁移[(75.6±8.8) *vs* (111.8±15.1), $P=0.021$]力显著下降,干扰ERβ1表达后,ERβ1及E-cad在mRNA[(0.314±0.029) *vs* (0.554±0.044),$P=0.030$;(0.444±0.042) *vs* (0.724±0.28),$P=0.001$]和蛋白[(0.353±0.017) *vs* (0.463±0.019), $P=0.032$;(0.397±0.034) *vs* (0.500±0.010), $P=0.024$]水平均表达降低,侵袭[(193±22.6) *vs* (70.4±13.3), $P<0.05$]迁移[(264.2±53.7) *vs* (111.8±15.1), $P=0.002$]力显著增强。**结论** ERβ1可能参与乳腺癌的EMT过程,进而影响乳腺癌细胞的侵袭转移能力。

[关键词] 乳腺肿瘤;雌激素受体β1;E-钙粘蛋白;上皮间质转化;细胞迁移
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

ERβ1 inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of breast cancer cells

Zong Beige, Zhou Yan, Yang Xinhua, Zhang Yi, Fan Linjun, Zhang Fan, Chen Li, Qi Xiaowei, Du Junze, Chen Qingqiu, Jiang Jun (Center of Breast Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of estrogen receptor β1 (ERβ1) in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells by regulating the expression of E-cadherin (E-cad), and to explore the effects of ERβ1 on the invasion and migration of breast cancer cells. **Methods** The recombinant eukaryotic vector containing ERβ1 cDNA or specific siRNA targeting ERβ1 was transfected to human breast cancer cells MDA-MB-231 to interfere the expression of ERβ1. RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of ERβ1 and E-cad on mRNA and protein levels. Moreover, invasion and migration assays *in vitro* were applied to assess the influence of ERβ1 expression interference on malignant biological behavior of breast cancer. **Results** When ERβ1 was over-expressed, ERβ1 and E-cad showed increased expression at mRNA (0.823±0.028 *vs* 0.554±0.044, $P=0.025$; 0.944±0.04 *vs* 0.724±0.28, $P=0.026$) and protein (1.331±0.019 *vs* 0.463±0.019, $P=0.001$; 1.428±0.005 *vs* 0.500±0.010, $P<0.01$) levels, and the cells showed decrease of invasion (45.8±7.4 *vs* 70.4±13.3, $P=0.039$) and migration (75.6±8.8 *vs* 111.8±15.1, $P=0.021$) abilities. When ERβ1 was down-regulated, ERβ1 and E-cad showed decreased expression at mRNA (0.314±0.029 *vs* 0.554±0.044, $P=0.030$; 0.444±0.042 *vs* 0.724±0.28, $P=0.001$) and protein (0.353±0.017 *vs* 0.463±0.019, $P=0.032$; 0.397±0.034 *vs* 0.500±0.010, $P=0.024$) levels, and the cells showed increase of invasion (193±22.6 *vs* 70.4±13.3, $P<0.05$) and migra-

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81102031)
[通信作者] 姜 军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn
周 艳, E-mail:13950722 qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1721.017.html(2013-11-21)

tion (264.2 ± 53.7 *vs* 111.8 ± 15.1, $P = 0.002$) abilities. **Conclusion** ERβ1 may participate in EMT of breast cancer and further influence the invasion and metastasis of breast cancer.

[**Key words**] breast neoplasms; estrogen receptor beta; E-cadherin; epithelial-mesenchymal transition; cell migration

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81102031). Corresponding author: Jiang Jun, E-mail:jcbd@medmail.com.cn; Zhou Yan, E-mail:13950722@qq.com

雌激素受体(estrogen receptor,ER)介导的雌激素信号通路在乳腺癌的发生、发展中发挥重要作用,也是乳腺癌内分泌治疗的重要靶点[1]。ER有ERα和ERβ两个亚型,目前的研究普遍认为ERβ能抑制细胞的生长,部分拮抗ERα的功能。ERβ能在结构上与ERα形成异二聚体,从而调控雌激素信号通路[2],且两者发挥不同的生物性功能[3-4]。雌激素受体β1(ERβ1)是ERβ野生全长型,广泛表达于乳腺等多种组织中。本课题组前期研究也证实,ERβ1可以通过促进P21基因的表达而抑制乳腺癌细胞的增殖[5],发挥抑癌基因的作用。那么ERβ1是否也能调控乳腺癌细胞的侵袭和迁移呢?上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是乳腺癌转移的重要分子机制,本研究通过干预人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞ERβ1表达,观察其对细胞侵袭迁移能力以及E-cad表达的影响,初步探讨ERβ1能否调控乳腺癌细胞EMT过程而影响乳腺癌细胞的转移。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ERβ1单克隆抗体及pcDNA3.1-ERβ1质粒由本科陈莉博士惠赠[6],E-cadherin单克隆抗体及羊抗兔二抗购于美国Abcam公司,人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞购自中科院上海细胞库,胎牛血清购自Gibco公司,Negative control siRNA、ERβ1-siRNA购于上海瑞博公司,Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司,RNA提取试剂及RT-PCR试剂盒购于TaKaRa公司,RIPA裂解液及BCA蛋白浓度检测试剂盒购于碧云天公司,Transwell小室购于Milipore公司,基质胶购于美国BD公司,引物均由上海生工合成。

1.2 siRNA的设计合成

从NCBI数据库中获得人全长ERβ1序列,设计ERβ1 siRNA,正义链为5′-GATCGACGTGCTTCGCGGGTGCAATTCAAGACGTTGCACCCGCGAAGCACGTTTTTTTTA-3′,反义链为5′-AGCTTAAAAAAAACGTGCTTCGCGGGTGCAACGTCTTGAATTGCACCCGCGAAGCACGTC-3′。序列行Blast比对,和其他基因无同源性。经RT-PCR验证可有效干扰ERβ1基因表达。

1.3 细胞培养及转染

人乳腺癌MDA-MB-231细胞在含10% FBS的DMEM高糖培养基中,置于含5% CO_2的37 ℃孵箱中常规培养。细胞接种于6孔板中,融合度达到50% ~60%时进行干预处理。按照Invitrogen公司转染说明书进行操作,采用脂质体转染。取对数生长期的人乳腺癌MDA-MB-231细胞用胰酶消化,计数并接种于6孔板中,在含10% FBS但不含抗生素的DMEM高糖培养基中培养,24 h后融合度达50% ~60%时进行转染。转染48 h后收集细胞进行后续实验。细胞分组:设置未转染的MDA-MB-231细胞为空白对照组;仅加入转染试剂的细胞为阴性对照组;转染siRNA-ERβ1细胞为干扰组;转染质粒pcDNA3.1-ERβ1的细胞为过表达组。

1.4 RT-PCR检测ERβ1及E-cad基因表达

常规提取各组细胞总RNA,脱氧核糖核酸酶Ⅰ(DNaseⅠ)去除基因组DNA。按TaKaRa逆转录试剂盒操作说明进行逆转录反应。ERβ1上游引物为5′-CGATAAAAACCGGCGCAAGAGCT-3′,下游引物为5′-TCATTAACACCTCCATCCAACAGCTCTC-3′,扩增片段长度为443 bp;E-cad上游引物为5′-TGGATAGAGAACGCATTGC-3′,下游引物为5′-TTGGCTGAGGATGGTGTAA-3′,扩增片段长度为263 bp;以GAPDH作为内参照,上游引物为5′-AGCCACATCGCTCAGACA-3′,下游引物为5′-TGGACTCCACGACGTACT-3′,扩增片段长度为314 bp。PCR反应条件:94 ℃预变性10 min;94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,35个循环;72 ℃总延伸10 min。取10 μL PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳(100 V,30 min),Bio-Rad成像系统下紫外照相并进行灰度值分析。实验重复3次。

1.5 Western blot检测ERβ1及E-cad蛋白表达

用RIPA(含蛋白酶抑制剂)提取各组细胞的总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。每个泳道加样量为50 μg,经聚丙烯酰胺凝胶电泳完成后,电转PVDF膜。脱脂奶粉室温封闭2 h,加1∶1 000稀释的一抗4 ℃过夜,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的1∶1 000稀释的二抗室温孵育4 h,洗膜。最后采用化学发光法显色试剂显影并照相。结果采用Quantity One软件分析灰度值,行半定量分析。实验重复3次。

1.6 细胞侵袭、迁移实验

用无血清培养基将基质胶按5∶1稀释,加入Transwell小室上室备用。将分组处理的MDA-MB-231细胞胰酶消化,离心,无血清培养基稀释后计数,加200 μL含2×10^4细胞入小室上室,将小室放入含800 μL完全培养基的24孔板中,常规培养36 h后取出小室,棉签小心擦掉上室细胞,4% 多聚甲醛固定20 min,纯水漂洗后入结晶紫染料中染色,光镜下观察,随机计数5个视野的细胞数进行统计。迁移实验不铺Matrigel,常规培养20 h后染色,余步骤同侵袭实验步骤。实验均重复3次。

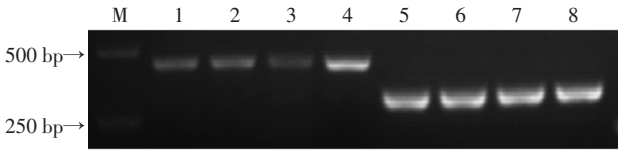
1.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料采用$\bar{x} \pm s$表示,两组数据间比较采用两个独立样本的t检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 ERβ1 mRNA 表达的变化

ERβ1 mRNA 表达阴性对照组(0.541 ±0.052)与空白对照组(0.554 ±0.044)相比差异无统计学意义(P = 0.829);ERβ1 过表达组细胞中 ERβ1 表达水平(0.823 ±0.028)明显升高,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.025);ERβ1 干扰组细胞 ERβ1 表达水平(0.314 ±0.029)明显降低,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.030)。见图 1。

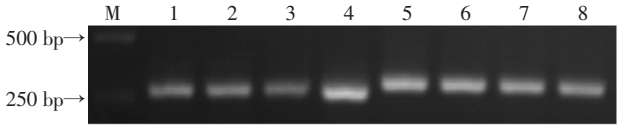


M:标准;1:空白对照组; 2:阴性对照组; 3:干扰组; 4:过表达组; 5~8:1~4 组的内参条带

图 1 RT-PCR 检测干预后各组细胞 ERβ1 mRNA 的表达变化

2.2 干预细胞 ERβ1 表达后 E-cad mRNA 表达的变化

E-cad mRNA 表达阴性对照组(0.719 ±0.015)与空白对照组(0.724 ±0.280)相比差异无统计学意义(P = 0.778);ERβ1 过表达组细胞中 E-cad 表达水平(0.944 ±0.040)明显升高,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.026);ERβ1 干扰组中 E-cad 表达水平(0.444 ±0.042)明显降低,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.001)。见图 2。



M:标准;1:空白对照组; 2:阴性对照组; 3:干扰组; 4:过表达组; 5~8:1~4 组的内参条带

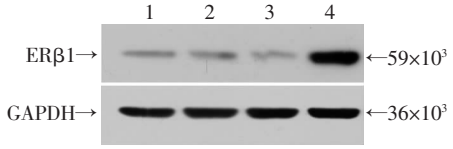
图 2 RT-PCR 检测干预后各组细胞 E-cad mRNA 的表达

2.3 ERβ1 蛋白表达的变化

ERβ1 蛋白表达阴性对照组(0.461 ±0,051)与空白对照组(0.463 ±0.019)相比差异无统计学意义(P = 0.827); ERβ1 过表达组细胞中 ERβ1 蛋白表达水平(1.331 ±0.019)明显升高,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.001);ERβ1 干扰组细胞中 ERβ1 蛋白表达水平(0.353 ±0.017)明显降低,与空白对照组相比,差异有统计学意义(P = 0.032)。见图 3。

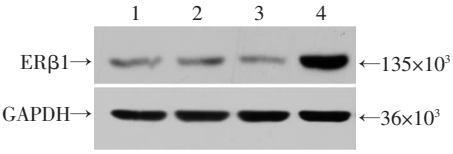
2.4 干预细胞 ERβ1 表达后 E-cad 蛋白表达的变化

E-cad 的蛋白表达阴性对照组(0.517 ±0.029)与空白对照组(0.500 ±0.010)相比差异无统计学意义(P = 0.324);ERβ1 过表达组细胞中 E-cad 表达水平(1.428 ±0.005)明显升高,与空白对照组相比差异有统计学意义(P < 0.01);ERβ1 干扰组细胞中 E-cad 表达水平(0.397 ±0.034)明显降低,与空白对照组相比差异有统计学意义(P = 0.024)。见图 4。



1:空白对照组; 2:阴性对照组; 3:干扰组; 4:过表达组

图 3 Western blot 检测干预后各组细胞 ERβ1 蛋白的表达



1:空白对照组; 2:阴性对照组; 3:干扰组; 4:过表达组

图 4 Western blot 检测干预后各组细胞 E-cad 蛋白的表达

2.5 干预细胞后细胞迁移能力的变化情况

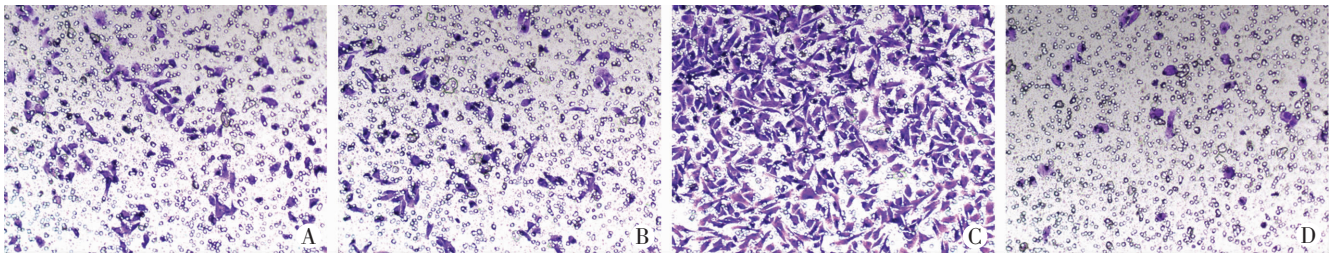
阴性对照组(115.0 ±17.1)和空白对照组(111.8 ±15.1)比较,穿膜细胞数差异无统计学意义(P = 0.707);过表达组的细胞穿膜数(75.6 ±8.8)较空白对照组明显减少,差异有统计学意义(P = 0.021);干扰组的细胞穿膜数(264.2 ±53.7)较空白对照组显著增加,差异有统计学意义(P = 0.002)。见图 5。

2.6 干预细胞后细胞侵袭能力的变化

阴性对照组(77.2 ±7.6)和空白对照组(70.4 ±13.3)比较,穿膜细胞数差异无统计学意义(P = 0.446);过表达组的侵袭迁移穿膜细胞数(45.8 ±7.4)较空白对照组明显减少,差异有统计学意义(P = 0.039),干扰组的侵袭迁移穿膜细胞数(193.0 ±22.6)较空白对照组显著增加,差异有统计学意义(P < 0.05)。见图 6。

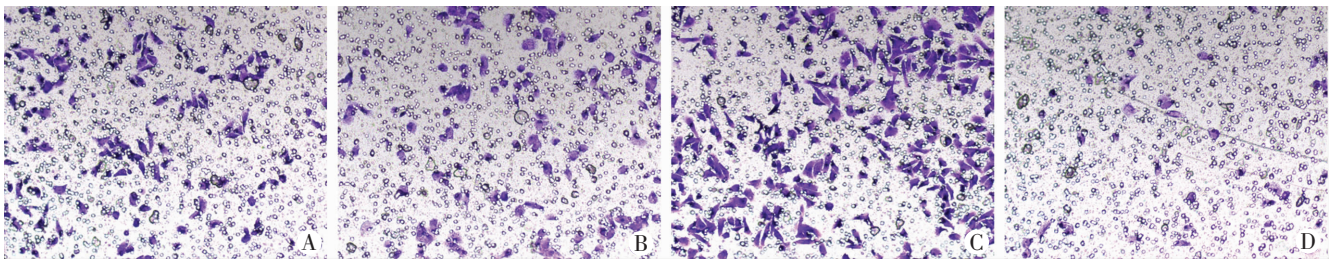
3 讨论

本研究通过干预 ERβ1 基因的表达发现,过表达 ERβ1 后,ERβ1 及 E-cad 在 mRNA 和蛋白水平均表达升高,侵袭迁移力显著下降;干扰 ERβ1 的表达,则 ERβ1 及 E-cad 在 mRNA 和蛋白水平均表达下降,侵袭迁移力显著增强。提示干预 ERβ1 的表达可以影响 E-cad 的表达及乳腺癌细胞的侵袭迁移能力。结果表明,ERβ1 能抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭转移过程。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:干扰组;D:过表达组

图 5 Transwell 迁移实验检测干预后各组细胞迁移能力的变化 (结晶紫 ×100)



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:干扰组;D:过表达组

图6 Transwell-Matrigel侵袭实验检测干预后各组细胞侵袭能力的变化 (结晶紫 ×100)

本研究结果提示,ERβ1对E-cad的调控既发生在mRNA水平也发生在蛋白水平,说明ERβ表达可能参与调控E-cad的基因转录。Goulioumis等[7]最先在喉癌的研究中发现,ERβ1表达与E-cadherin丢失、β-catenin核转位以及TNM分期负相关,认为ERβ1表达可能抑制EMT的发生。而Mak等[8]在前列腺癌的研究中也发现,ERβ能通过降低Snail的核内转位抑制EMT。且ERβ过表达可以抑制TGF-β1诱导的前列腺癌细胞EMT发生。本实验结果与文献[8]报道的结果是一致的。本研究进一步证实了ERβ1能抑制MDA-MB-231乳腺癌细胞的侵袭转移过程,并可能参与调控乳腺癌的EMT过程。

本课题组前期研究发现,ERβ1能与ID1蛋白相互作用而上调细胞周期调节蛋白P21表达[6],下调人端粒酶(hTERT)表达,进而抑制细胞增殖[9];还可调控细胞凋亡基因Bax的表达,诱导乳腺癌细胞凋亡[10]。EMT标志性事件即细胞上皮表型标志物E-cad表达下调以及间质表型标志物上调[11]。因此,本研究通过寻找ERβ表达和E-cad表达的关系,初步探讨了ERβ能否参与EMT过程进而影响乳腺癌细胞转移。本研究结果也进一步证实而ERβ1发挥抑癌基因的功能,且ERβ1能抑制乳腺癌细胞侵袭转移过程。由于E-cad是ID1转录调控的下游分子之一,结合本课题组前期研究结果,我们推测ERβ和ID1蛋白相互作用,抑制ID1和转录因子结合,进而释放下游抑制的E-cad基因启动子的活性,促进E-cad的表达,抑制EMT的发生和乳腺癌细胞的转移。由此可见,ERβ1不仅能抑制细胞增殖、促进细胞凋亡,还能通过抑制EMT从而抑制乳腺癌细胞的迁徙和侵袭。ERβ1在乳腺癌的发生、进展和转移的不同阶段,都可能发挥重要作用,进一步研究明确ERβ1信号通路的下游基因,有可能发现新的抑癌靶点。深入研究明确ERβ1调控E-cad表达的分子机制,也能为乳腺癌细胞的转移研究增加新的思路和新的信号分子。而ERβ1参与EMT调控的具体信号通路如何发挥作用,需要深入研究证实。

参考文献:

[1] Renoir J M, Marsaud V, Lazennec G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(4): 449-465.

[2] Ramsey T L, Risinger K E, Jernigan S C, *et al*. Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner[J]. Endocrinology, 2004, 145(1): 149-160.

[3] Duong V, Licznar A, Margueron R, *et al*. ERalpha and ERbeta expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors[J]. Oncogene, 2006, 25(12): 1799-1806.

[4] Williams C, Edvardsson K, Lewandowski S A, *et al*. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2008, 27(7): 1019-1032.

[5] 陈莉, 杨新华, 任林, 等. 雌激素受体β1上调p21基因表达抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖[J]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(4): 427-433.

[6] Chen L, Qiu J, Yang C, *et al*. Identification of a novel estrogen receptor beta1 binding partner, inhibitor of differentiation-1, and role of ERbeta1 in human breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2009, 278(2): 210-219.

[7] Goulioumis A K, Fuxe J, Varakis J, *et al*. Estrogen receptor-beta expression in human laryngeal carcinoma: correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition specific biomarkers[J]. Oncol Rep, 2009, 22(5): 1063-1068.

[8] Mak P, Leav I, Pursell B, *et al*. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading[J]. Cancer Cell, 2010, 17(4): 319-332.

[9] 陈莉, 杨新华, 范林军, 等. 雌激素受体β1下调人端粒酶逆转录酶基因表达抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(3): 271-275.

[10] 陈莉, 杨新华, 范林军, 等. 雌激素受体β1对乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的影响[J]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2011, 5(1): 41-48.

[11] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437.

(**收稿**:2013-09-17;**修回**:2013-10-23)

(编辑 龙 亮)