文章编号:1000-5404(2014)20-2077-06

论著

雌激素激活GPR30/ERK通路促进三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞迁移及侵袭

余腾骅[1],王智亮[2],赵晨晖[1],吴晓安[1],张 澍[1],涂 刚[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨雌激素/GPR30/ERK信号通路的激活对三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC)MDA-MB-468细胞迁移及侵袭的影响。**方法** 免疫荧光及Western blot检测MDA-MB-468细胞中雌激素受体GPR30的蛋白表达量及细胞内定位,Western blot检测药物处理后细胞中磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-extracellular regulate kinase,p-ERK)的蛋白表达变化,细胞划痕实验及Transwell小室实验分别检测细胞的迁移及侵袭能力的改变。**结果** 雌激素受体GPR30在TNBC细胞系MDA-MB-468中高表达,且主要位于细胞胞浆部位。17-β雌二醇(E2)和GPR30特异性激动剂(G1)可以显著活化细胞中GPR30/ERK信号通路($P<0.05$),上调p-ERK蛋白水平,其相对表达量分别是空白对照组的(2.07±0.11)倍和(1.98±0.06)倍。E2及G1药物处理后的细胞迁移能力得到显著提高($P<0.05$),24 h后迁移入划痕区域的相对细胞数分别为空白对照组的(2.10±0.20)倍和(2.14±0.34)倍。细胞侵袭实验也可得到类似结果。GPR30特异性拮抗剂(G15)以及ERK特异性抑制剂(U0126)均可显著抑制E2和G1引发的以上改变($P<0.05$)。**结论** 雌激素通过活化TNBC细胞MDA-MB-468中GPR30/ERK信号通路,促进细胞迁移及侵袭的恶性潜能。靶向雌激素/GPR30/ERK通路可能成为TNBC的有效治疗手段。

[关键词] 雌激素;GPR30/ERK通路;三阴性乳腺癌;细胞迁移及侵袭
[中图法分类号] R73-37;R737.9;R977.12 [文献标志码] A

Estrogen enhances migration and invasion in triple-negative breast cancer MDA-MB-468 cells *via* activating GPR30/ERK signaling pathway

Yu Tenghua[1], Wang Zhiliang[2], Zhao Chenhui[1], Wu Xiao'an[1], Zhang Shu[1], Tu Gang[1] ([1]Department of Endocriolgy and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of activated estrogen/GPR30/ERK signaling on the migration and invasion of triple-negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-468. **Methods** Immunofluorescent assay and Western blotting were used to test the expression and localization of estrogen receptor GPR30 in MDA-MB-468 cells. The expression level of phospho-extracellular regulate kinase (p-ERK) was detected by Western blotting. The changes of cell migration and invasion ability were examined by wound-healing assay and Transwell assay, respectively. **Results** Estrogen receptor GPR30 was detected with high expression level in MDA-MB-468 cells and was mostly expressed in the cytoplasm. After treating with 17-β estradiol (E2) and GPR30 specific agonist (G1), the GPR30/ERK signaling was remarkably activated. The relative protein expressions of p-ERK in the E2 and G1 treatment groups were (2.07±0.11) and (1.98±0.06) times higher than those of the control group ($P<0.05$), respectively. Moreover, E2 and G1 significantly increased the ability of cell migration. The relative migrated cell numbers in the E2 and G1 treatment groups were 2.10±0.20 and 2.14±0.34 times higher than those of the control group ($P<0.05$), respectively. Transwell assays indicated the similar results as wound-healing assays. Interestingly, these changes induced by E2 and G1 could be significantly blocked by GPR30 specific antagonist (G15) and ERK specific inhibitor (U0126) ($P<0.05$). **Conclusion** Estrogen increases the ability of cell migration and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372398)
[通信作者] 涂 刚,电话:(023)89011122,E-mail:tugang68@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140901.0925.001.html(2014-08-21)

invasion through activating GPR30/ERK signaling in TNBC cells. Inhibition of estrogen/GPR30/ERK signaling represents a novel targeted therapy in TNBC.

[**Key words**] estrogen; GPR30/ERK pathway; triple-negative breast cancer; cell migration and invasion

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81372398). Corresponding author: Tu Gang, Tel: 86-23-89011122, E-mail: tugang68@126.com

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)占乳腺癌总数的15%~20%[1],这种特殊类型的乳腺癌缺乏内分泌治疗及Her-2靶向治疗的指征,术后以化疗为主要的辅助治疗手段。尽管有研究报道,TNBC通常对化疗比较敏感,更容易达到病理完全缓解(pathological complete response, PCR)[2]。但是与非三阴性类型的乳腺癌相比,它仍然具有预后差、复发及转移率高、总体生存率低等特点[3-4]。因此,寻找一个新的治疗靶点迫在眉睫。GPR30是近几年被鉴定出的一种独立作用的新型雌激素受体,它与传统的核雌激素受体(nuclear estrogen receptors, nERs)的作用机制不同,雌激素以及雌激素受体拮抗剂他莫昔芬均可通过活化GPR30来发挥下游信号效应。越来越多的研究表明,GPR30有望成为治疗多种雌激素相关性肿瘤的潜在靶点[5-8]。然而,这种特殊的雌激素受体所介导的下游信号在TNBC中的作用目前仍不明确。本研究中拟利用17-β雌二醇(E2)、GPR30特异性激动剂(G1)[9]及GPR30特异性拮抗剂(G15)[10]等小分子化合物探讨GPR30信号通路的活化对TNBC MDA-MB-468细胞迁移及侵袭行为的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

MCF-7、MDA-MB-468、SKBR-3、MDA-MB-231细胞系购自中国科学院上海细胞库,高糖DMEM培养基(Gibco公司),高糖1640培养基(Gibco公司),南美胎牛血清(Gibco公司),E2、G1及G15(Sigma公司),FITC标记山羊抗兔IgG抗体(上海奇康科技有限公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),Transwell小室(Corning公司),基质胶(R&D公司),GPR30抗体(Abcam公司),p-ERK抗体及ERK抗体、山羊抗兔IgG抗体、山羊抗鼠IgG抗体(Bioworld Technology, Inc.),β-actin抗体(北京中杉金桥公司)。二氧化碳培养箱(Thermo scientific),多功能酶标仪(Sunrise),倒置荧光显微镜(Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-468、MDA-MB-231、MCF-7细胞均培养于10%胎牛血清的高糖1640培养基中,SKBR-3细胞培养于10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,37 ℃、5% CO_2培养箱内生长,隔日换液,待细胞生长至80%~90%时用0.25%胰酶消化离心后传代。

1.2.2 细胞免疫荧光 取对数期生长的MDA-MB-468细胞胰酶消化离心重悬后以2×10^5/mL接种于底部放有小玻片的24孔板中,置于细胞孵箱中培养,待细胞生长状态及密度合适后,取出24孔板用PBS洗3次,加入4%多聚甲醛200 μL固定20 min,PBS洗3次,10%山羊血清37 ℃封闭30 min,加入GPR30抗体(1∶100稀释)30~40 μL,4 ℃孵育过夜,PBS洗3次,暗室中加入荧光二抗(1∶200),37 ℃ 60 min,PBS洗3次,加入DAPI(1∶10)染核5 min,PBS洗3次,每次5 min,封片后,倒置荧光显微镜下拍照。

1.2.3 Western blot检测 MCF-7、SKBR-3及MDA-MB-231细胞不作处理,直接提取细胞内总蛋白。在MDA-MB-468细胞组中,待培养瓶中细胞生长至70%~80%后,更换无血清培养基饥饿24 h后,加入不同药物浓度(1、10、100 nmol/L)的E2及G1在多个时间点(5、10、20 min)处理细胞。E2及G1处理10 min,其中含G15及U0126处理组中提前加入G15及U0126分别预处理60 min和30 min,最后使E2、G1、G15及U0126的药物终浓度分别为100 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L和10 μmol/L,各组调整DMSO至一致,处理相应时间后立即终止药物处理,PBS洗3次,最后将细胞移入EP管中,以1∶100加入PMSF以及氟化钠至细胞裂解液中,冰上裂解30 min,离心后取上清蛋白溶液,用BCA试剂盒以及酶标仪测定蛋白浓度,经SDS-PAGE分离,半干法转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭液中室温封闭2 h,加入一抗p-ERK(1∶1 000)、t-ERK(1∶1 000)、GPR30(1∶250)、β-actin(1∶1 000)4 ℃过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,二抗(山羊抗鼠或山羊抗兔)(1∶1 000)置于37 ℃水浴箱中孵育1 h,TBST洗膜3次,化学发光成像,Quantity One软件进行灰度值测定。实验重复3次。

1.2.4 细胞划痕实验 将MDA-MB-468细胞接种至6孔板中,用含10%胎牛血清的1640培养基培养至细胞铺满融合,用100 μL枪头通过孔中心划1条宽度相等的横行细胞刮除带,PBS洗3次去除已刮除的细胞,更换无血清1640培养基培养,分别加入终浓度为100 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L的E2、G1、G15及U0126药物处理,处理方式同1.2.3,最后分别得到空白对照组、E2处理组、G1处理组、E2+G15处理组、G1+G15处理组、E2+U0126处理组和G1+U0126处理组。37 ℃、5% CO_2条件下继续培养,于0 h和24 h时间点在倒置显微镜下拍照。用Image J 2x软件计数各组中迁移入划痕区域的细胞数量并得出24 h后的相对细胞数。实验重复3次。

1.2.5 Transwell小室细胞侵袭实验 预冷的无血清1640培养基以1∶6体积稀释液态基质胶,将稀释后的基质胶40 μL加入置于24孔板中的Transwell小室的上室中,放于37 ℃孵育6 h。吸净基质胶表面的液体,加入70 μL无血清1640培养基,37 ℃孵育30 min。上室中每孔加入200 μL用无血清1640培养基稀释的细胞悬液,使每孔中细胞量达到8 000个。下室加入含有10%胎牛血清的1640培养基500 μL,上下室内均加入相应的药物处理,药物浓度、处理方式及分组情况同1.2.4。

37 ℃、5% CO_2条件下培养 18 h 后,用棉签抹掉上室基质胶上的细胞,PBS 洗 3 遍,将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 10 min,0.1% 结晶紫染液染色 10 min 后,PBS 洗 3 遍,用棉签吸干水分,显微镜下随机挑选 5 个视野,计数侵袭到下室的细胞数,计算每个视野的平均侵袭细胞数。实验重复 3 次。

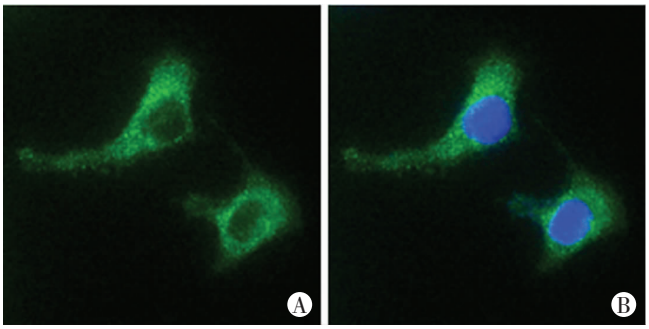
1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,进行重复测量方差分析和独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 TNBC 细胞系 MDA-MB-468 中雌激素受体 GPR30 的细胞内定位和表达

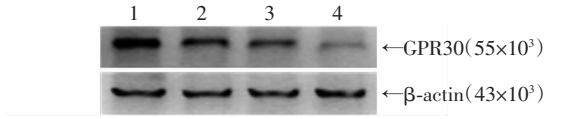
细胞免疫荧光实验表明,MDA-MB-468 细胞中雌激素受体 GPR30 主要表达于细胞胞浆部位(图 1)。Western blot 检测结果提示,另一种 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 中几乎不表达 GPR30,而在 MDA-MB-468、ER 阴性的 SKBR-3 和 ER 阳性的 MCF-7 乳腺癌细胞系中均高表达 GPR30 蛋白(图 2)。



A:GPR30;B:GPR30 + DAPI

TNBC 细胞系 MDA-MB-468 中雌激素受体 GPR30 的表达主要位于细胞胞浆部位(绿色荧光代表 GPR30,蓝色代表细胞核)

图 1　细胞免疫荧光检测 TNBC MDA-MB-468 中 GPR30 的细胞内定位及表达　(×400)

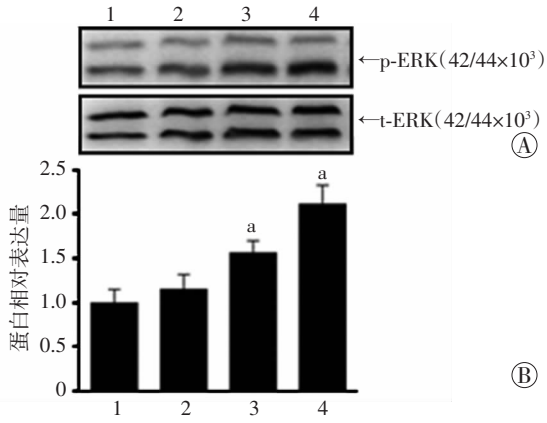


1:MCF-7;2:MDA-MB-468;3:SKBR-3;4:MDA-MB-231

图 2　Western blot 检测乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-468、SK-BR-3、MDA-MB-231 中 GPR30 的蛋白表达

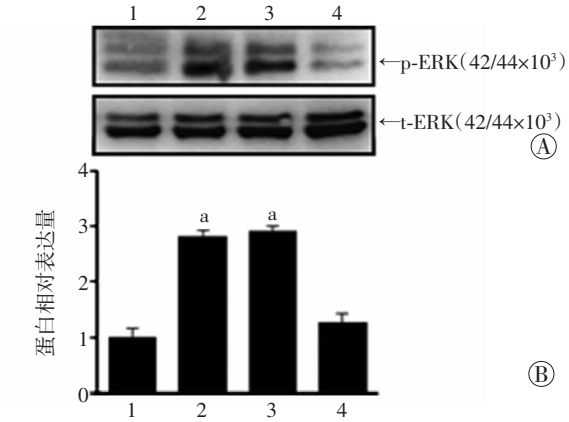
2.2 E2 及 G1 显著上调 TNBC MDA-MB-468 细胞中磷酸化 ERK 蛋白表达

雌激素受体 GPR30 在细胞内的定位提示它在激动剂作用下可能通过快速非基因组信号通路发挥下游效应。我们用时间梯度及浓度梯度法分别在不同时间点(5、10、20 min)和药物浓度(1、10、100 nmol/L)下处理细胞,Western blot 检测药物处理后细胞中 p-ERK 的蛋白表达,发现 E2 及 G1 均显著促进 MDA-MB-468 细胞中 p-ERK 蛋白表达,且具有浓度及时间依赖性,两种激动剂均可在 100 nmol/L 药物浓度和 10 min 时间点达到 p-ERK 表达峰值(图 3 ~ 6)。提示雌激素可活化 TNBC MDA-MB-468 细胞中非基因组信号。



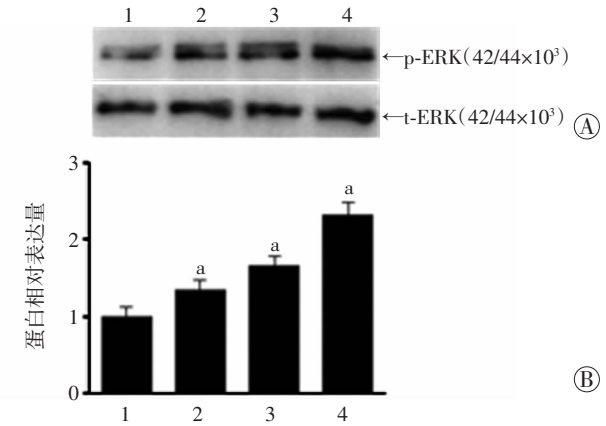
1:对照;2 ~ 4:分别为 1、10、100 nmol/L E2;A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照比较

图 3　Western blot 检测不同浓度 E2 处理 10 min 后 MDA-MB-468 细胞中 p-ERK 的蛋白表达



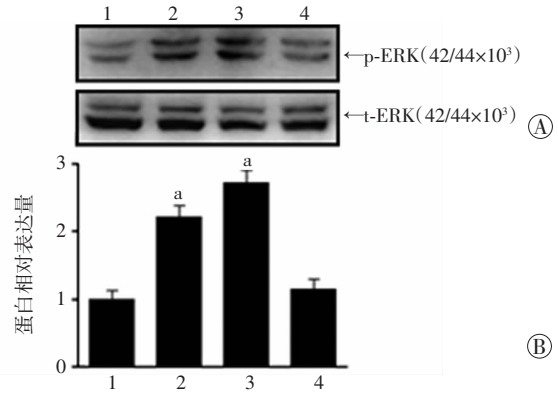
1:对照;2 ~ 4:分别为 5、10、20 min;A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照比较

图 4　Western blot 检测 100 nmol/L E2 不同时间处理后 MDA-MB-468 细胞中 p-ERK 的蛋白表达



1:对照;2 ~ 4:分别为 1、10、100 nmol/L G1;A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照比较

图 5　Western blot 检测不同浓度 G1 处理 10 min 后 MDA-MB-468 细胞中 p-ERK 的蛋白表达



1:对照;2~4:分别为5、10、20 min;A:Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对照比较

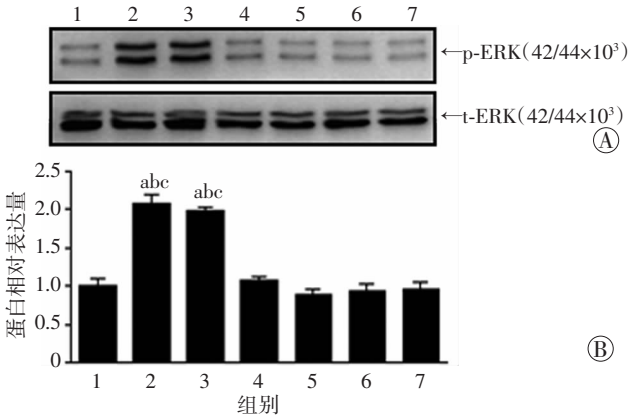
图6 Western blot检测100 nmol/L G1不同时间处理后MDA-MB-468细胞中p-ERK的蛋白表达

2.3 E2及G1活化TNBC MDA-MB-468细胞中GPR30/ERK信号通路

100 nmol/L的E2和G1处理细胞10 min后,细胞中p-ERK的蛋白表达量显著上调($P<0.05$,图7),其相对表达量分别是空白对照组的(2.07±0.11)、(1.98±0.06)倍;而相应预处理过GPR30特异性拮抗剂G15和ERK特异性抑制剂U0126的处理组与单纯加入激动剂处理组相比,其p-ERK的蛋白表达量均显著下降($P<0.05$,图7)。这提示雌激素可通过GPR30/ERK通路激活MDA-MB-468细胞中的快速非基因组信号。

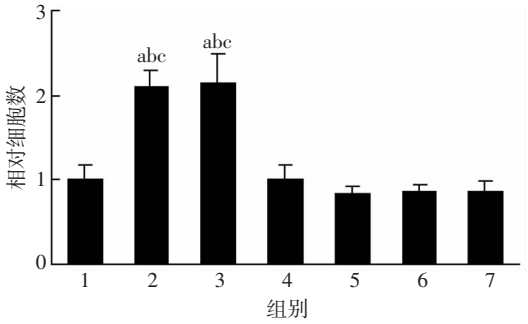
2.4 雌激素/GPR30/ERK信号的活化促进TNBC MDA-MB-468细胞迁移

细胞划痕实验显示:E2及G1处理细胞24 h后,能显著促进细胞的迁移能力,并且其促进迁移的效应被G15及U0126所抑制(图8)。根据24 h后迁移入划痕区域的相对细胞数得出E2及G1处理组分别是空白对照组的(2.10±0.20)和(2.14±0.34)倍($P<0.05$),是相应加入G15和U0126组的(2.08±0.16)、(2.49±0.59)和(2.51±0.37)、(2.48±0.28)倍,差异均有统计学意义($P<0.05$,图9)。



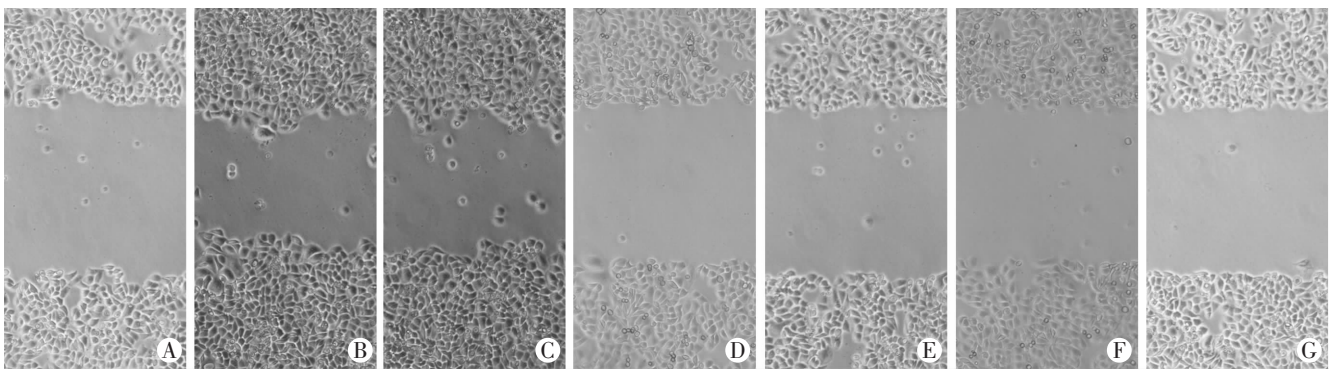
1:空白对照组;2:E2处理组;3:G1处理组;4:E2+G15处理组;5:E2+U0126处理组;6:G1+G15处理组;7:G1+U0126处理组;A:Western blot检测;B:半定量分析;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与E2+G15处理组比较;c:$P<0.05$,与E2+U0126处理组比较;d:$P<0.05$,与G1+G15处理组比较;e:$P<0.05$,与G1+U0126处理组比较

图7 E2与G1活化MDA-MB-468细胞中GPR30/ERK信号通路



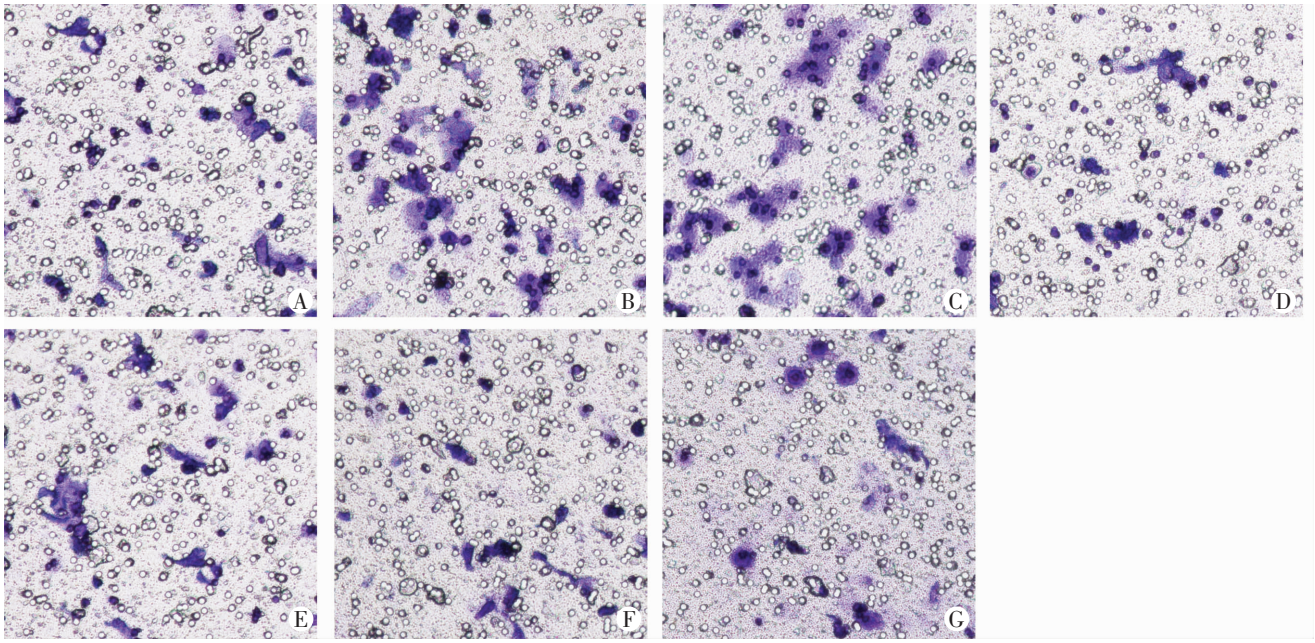
1:对照组;2:E2处理组;3:G1处理组;4:E2+G15处理组;5:E2+U0126处理组;6:G1+G15处理组;7:G1+U0126处理组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与E2+G15处理组比较;c:$P<0.05$,与E2+U0126组比较;d:$P<0.05$,与G1+G15处理组比较;e:$P<0.05$,与G1+U0126处理组比较

图9 各组MDA-MB-468细胞迁移能力分析



A:空白对照组;B:E2处理组;C:G1处理组;D:E2+G15处理组;E:E2+U0126处理组;F:G1+G15处理组;G:G1+U0126处理组

图8 划痕实验检测药物处理24 h后TNBC MDA-MB-468细胞的迁移能力 (倒置显微镜 ×40)

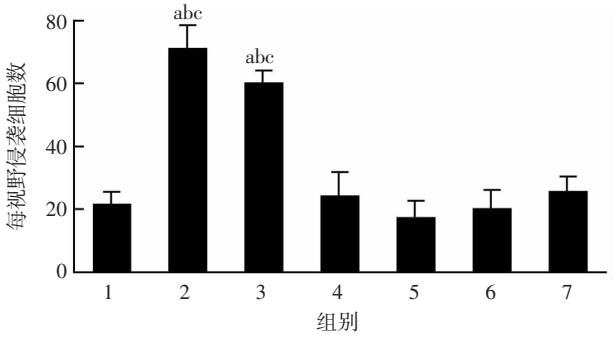


A:空白对照组; B: E2 处理组; C: G1 处理组; D: E2 + G15 处理组; E: E2 + U0126 处理组; F: G1 + G15 处理组; G: G1 + U0126 处理组

图 10 Transwell 侵袭实验检测药物处理 18 h 后 TNBC MDA-MB-468 细胞的侵袭能力 (倒置显微镜 ×100)

2.5 雌激素/GPR30/ERK 信号的活化促进 TNBC MDA-MB-468 细胞侵袭

为了进一步模拟体内环境,采用铺有基质胶的 Transwell 小室来评估药物处理后细胞的侵袭能力,结果显示:E2 及 G1 处理细胞 18 h 后,穿透 Transwell 上室基质胶及聚碳酸酯膜侵袭到下室的细胞数显著高于空白对照组($P<0.05$,图 10)。而在预处理 G15 及 U0126 后,E2 及 G1 促细胞侵袭的能力被显著抑制($P<0.05$,图 11),与细胞划痕实验检测结果一致。这说明雌激素可通过激活 GPR30/ERK 信号通路增强 TNBC MDA-MB-468 细胞迁移和侵袭潜能。



1:空白对照组; 2: E2 处理组; 3: G1 处理组; 4: E2 + G15 处理组; 5: E2 + U0126 处理组; 6: G1 + G15 处理组; 7: G1 + U0126 处理组; a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 E2 + G15 处理组比较;c:$P<0.05$,与 E2 + U0126 处理组比较;d:$P<0.05$,与 G1 + G15 处理组比较;e:$P<0.05$,与 G1 + U0126 处理组比较

图 11 各组 MDA-MB-468 细胞侵袭能力分析结果

3 讨论

雌激素在乳腺癌的进展中扮演着重要的作用,ER、PR 是介导雌激素效应的最主要媒介。尽管 TNBC 通常被认为是一种非雌激素依赖性肿瘤,但是诸多研究发现,TNBC 更易发生于绝经前状态[11]以及年龄更小[12-13]的人群,提示体内高水平的雌激素可能与 TNBC 患者的肿瘤进展密切相关。新型雌激素受体 GPR30 与雌二醇有高亲和力并且可以独立介导雌激素效应,是乳腺癌患者的一个独立的预后因素[14]。Steiman 等[11]发现绝大多数的 TNBC 组织中都有 GPR30 的表达,并且更易表达于绝经前的患者。同时,也有研究报道通过抑制 GPR30 活性后,雌激素所介导的 TNBC 细胞增殖能力显著降低[15]。以上研究均提示雌激素与 GPR30 的相互作用可能是 TNBC 发生发展的重要因素。

本研究发现,TNBC MDA-MB-468 细胞系高表达 GPR30,其表达部位主要位于细胞质是本次实验良好的体外细胞模型。GPR30 的两种激动剂 E2 及 G1 均可活化 GPR30 上调下游磷酸化 ERK 的蛋白水平。此外,雌激素/GPR30/ERK 信号的活化明显促进 MDA-MB-468 细胞迁移及侵袭,以上效应均可被 GPR30 特异性拮抗剂 G15 和 ERK 特异性抑制剂 U0126 阻断。说明,雌激素/GPR30/ERK 信号的活化可能在 TNBC 高转移性特点中扮演着重要角色。

MAPK/ERK 信号通路的激活在调节肿瘤分化、存活、生长及浸润等恶性生物学行为中起着重要的作用[16]。研究[5-6,8,17]显示雌激素可以通过活化 GPR30 激活下游信号通路发挥生物学效应,而以上信号与

EGFR/ERK 转导通路的激活密切相关。本研究也得到类似结果:用 100 nmol/L 药物浓度的 E2 及 G1 分别处理细胞 10 min 后,Western blot 检测到细胞中的磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)表达量显著增加,提示细胞中的 ERK 信号通路得到活化,但是用 GPR30 特异性拮抗剂 G15 及 ERK 特异性抑制剂 U0126 分别预处理 1 h 和 30 min 的处理组中,p-ERK 的表达量被显著抑制,提示在 TNBC MDA-MB-468 细胞中雌激素通过活化 GPR30/ERK 信号转导通路从而发挥快速非基因组效应。

细胞迁移和侵袭在原发乳腺肿瘤的转移中扮演着关键角色。有研究报道,雌激素可以通过活化 GPR30 下游信号上调结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的表达从而促进 SKBR-3 乳腺癌细胞的迁移能力[18]。有趣的是,我们用细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测 GPR30/ERK 通路的活化对 TNBC 高侵袭转移性特点的作用时,同样发现 E2 及 G1 药物处理后均可增强 MDA-MB-468 细胞的迁移和侵袭潜能,而以上的这些效应可被 G15 和 U0126 明显阻断,提示雌激素在通过激活 GPR30/ERK 信号转导通路发挥非基因组效应的同时也强化了 TNBC 高转移性的特点。这些结果也被另一项有关 GPR30/ERK 信号促进炎性乳腺癌 SUM-149 和 SUM190 细胞侵袭的研究报道支持[19]。结合目前众多的前期报道可发现,雌激素/GPR30/ERK 信号通路激活所引起的不良生物学效应广泛存在于 ER(+)/GPR30(+)[6]、ER(-)/GPR30(+)[17-18]、ER(-)/PR(-)/Her-2(-)/GPR30(+)[15]以及他莫昔芬(Tamoxifen)耐药[6]乳腺癌细胞中,因此,靶向雌激素/GPR30/ERK 通路有可能使临床中相当数量的 GPR30(+)乳腺癌患者获得受益。

综上所述,雌激素可以激活 TNBC MDA-MB-468 细胞系中 GPR30/ERK 信号通路从而增强细胞的高迁移和侵袭能力,也使得靶向雌激素/GPR30/ERK 信通路可能成为 TNBC 患者内分泌治疗的潜在靶点,为目前的临床治疗窘境拓宽思路,但是这还需要更多的临床试验及前瞻性研究来进一步支持和验证。

参考文献:

[1] Carey L A, Perou C M, Livasy C A, *et al*. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study[J]. JAMA, 2006, 295(21): 2492-2502.

[2] Gucalp A, Traina T A. Triple-negative breast cancer: adjuvant therapeutic options[J]. Chemother Res Pract, 2011, 2011: 696208.

[3] Dent R, Hanna W M, Trudeau M, *et al*. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 115(2): 423-428.

[4] Harris L N, Broadwater G, Lin N U, *et al*. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342[J]. Breast Cancer Res, 2006, 8(6): R66.

[5] Luo H, Yang G, Yu T, *et al*. GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(2): 355-369.

[6] Mo Z, Liu M, Yang F, *et al*. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(6): R114.

[7] Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, *et al*. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2012, 5(1): 35.

[8] Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia A G, *et al*. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(3): 631-646.

[9] Bologa C G, Revankar C M, Young S M, *et al*. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(4): 207-212.

[10] Dennis M K, Burai R, Ramesh C, *et al*. In vivo effects of a GPR30 antagonist[J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(6): 421-427.

[11] Steiman J, Peralta E A, Louis S, *et al*. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer[J]. Am J Surg, 2013, 206(5): 698-703.

[12] Dent R, Trudeau M, Pritchard K I, *et al*. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.

[13] Aghili M, Lashkari M, Farrokhpey A H, *et al*. Triple-negative breast cancer survival in Iranian patients[J]. Acta Med Iran, 2013, 51(8): 560-566.

[14] Tu G, Hu D, Yang G, *et al*. The correlation between GPR30 and clinicopathologic variables in breast carcinomas[J]. Technol Cancer Res Treat, 2009, 8(3): 231-234.

[15] Girgert R, Emons G, Grundker C. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(1): 199-205.

[16] Saini K S, Loi S, de-Azambuja E, *et al*. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(8): 935-946.

[17] 李维东, 罗浩军, 李振华, 等. 雌激素激活 GPER-EGFR-ERK 通路促进人乳腺癌 SKBR-3 细胞系增殖[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(22): 2283-2287.

[18] Pandey D P, Lappano R, Albanito L, *et al*. Estrogenic GPR30 signaling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF[J]. EMBO J, 2009, 28(5): 523-532.

[19] Ohshiro K, Schwartz A M, Levine P H, *et al*. Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells *via* nongenomic signaling[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30725.

(**收稿**:2014-03-31;**修回**:2014-04-03)

(编辑 龙 亮)