DOI:10.16016/j.1000-5404.201503193

论著

新型雌激素受体 GPER 在乳腺癌 MCF-7 细胞他莫昔芬耐药中的作用及机制

朱 庆[1],伍俊仪[2],袁 杰[1],杨海兵[1],陈茂山[1],杨光伦[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌外科[1];405800 重庆,重庆市巫溪县人民医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 研究乳腺癌他莫昔芬耐药细胞 MCF-7R 中新型雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)对促凋亡蛋白 Bim 的影响及其机制。**方法** 倒置显微镜下观察 MCF-7 和 MCF-7R 经过浓度为 1 μmol/L 的他莫昔芬(tamoxifen, TAM)处理后细胞形态的变化;qRT-PCR 检测人乳腺癌细胞 MCF-7 及其他莫昔芬耐药株 MCF-7R 中促凋亡蛋白 Bim(Bcl-2L11)的 mRNA 表达水平,Western blot 检测两种细胞株 Bim 蛋白表达水平和两种细胞中总的 GPER 和膜上 GPER 的表达水平;两种细胞中分别以(无水乙醇、TAM、GPER 特异性抑制剂 G15 + TAM、GPER 特异性激动剂 G1)处理后,检测 Bim 的蛋白表达水平;MCF-7R 细胞中分别抑制 PI3K-Akt 及 MAPK/Erk 两条信号通路后,再加入 TAM,检测 Bim 的蛋白水平;流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 倒置显微镜下发现 MCF-7 细胞经 TAM 处理后细胞大部分变透亮且悬浮,而 MCF-7R 无明显变化;MCF-7R 细胞中促凋亡蛋白 Bim 的 mRNA 水平及蛋白水平较 MCF-7 都降低($P<0.05$);耐药细胞中总 GPER 的蛋白表达量较 MCF-7 无明显变化而膜上的表达量升高($P<0.05$);MCF-7 经 TAM 处理后,Bim 蛋白表达量增加($P<0.05$),而 MCF-7R 中却无明显变化,但在 MCF-7R 中加入 GPER 特异性抑制剂 G15 后再用 TAM 处理,Bim 蛋白水平增加($P<0.05$);耐药细胞中 PI3K/AKT 及 MAPK/Erk 信号通路处于活化状态,抑制 MAPK/Erk 信号通路后再加入 TAM,耐药细胞中促凋亡蛋白 Bim 的表达量增加($P<0.05$);在 MCF-7 中加入 TAM 后细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),MCF-7R 经 TAM 处理后无明显差异,但抑制 GPER 或 Erk 信号通路后,再加入 TAM 处理,细胞凋亡率明显增高($P<0.05$)。**结论** 乳腺癌 TAM 耐药细胞 MCF-7R 中 TAM 作为 GPER 的激动剂,活化信号通路 MAPK/Erk 抑制 Bim 表达。抑制 GPER 或 MAPK/Erk 信号通路,可使耐药细胞对 TAM 恢复敏感性。

[关键词] 乳腺癌;他莫昔芬耐受;Bim;GPER/GPR30;细胞凋亡
[中图法分类号] R73-36;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Role of G protein-coupled estrogen receptor in tamoxifen-resistant breast cancer MCF-7 cells

Zhu Qing[1], Wu Junyi[2], Yuan Jie[1], Yang Haibing[1], Chen Maoshan[1], Yang Guanglun[1] ([1]Department of Endocrology and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, the People's Hospital of Wuxi Country, Chongqing, 405800, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) on pro-apoptotic protein Bim in tamoxifen (TAM)-resistant breast cancer cells MCF-7R and related mechanism. **Methods** Human breast cancer cells MCF-7 and the MCF-7R cells were treated with 1 μmol/L TAM, and the cell morphological change was observed with an inverted microscope. The Bim mRNA expression was

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072149)
[通信作者] 杨光伦,E-mail:guanglunyang@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151016.1309.021.html

detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in the MCF-7 cells and MCF-7R cells. The expression of Bim protein, total GPER, and GPER in the cell membrane was detected by Western blotting. After the two kinds of cells were treated with ethanol, TAM, TAM + G15 (GPER specific inhibitor), and G1 (GPER specific agonist), the Bim protein expression was analyzed by Western blotting. After inhibiting the PI3K/AKT and MAPK/Erk signaling pathways in the MCF-7R cells, TAM was added, and then the Bim protein expression was assayed. Flow cytometry was adopted to detect cell apoptosis. **Results** After treatment with TAM, most of MCF-7 cells became bright and were suspended, while the MCF-7R cells had no obvious changes. The levels of Bim mRNA and protein in the MCF-7R cells were obviously lower than those in the MCF-7 cells ($P<0.05$). The total GPER had no significant difference between the 2 kinds of cells, but GPER in the cell membrane was increased in the MCF-7R cells ($P<0.05$). The expression of Bim protein was increased in the MCF-7 cells treated with TAM ($P<0.05$), but not in the MCF-7R cells. However, Bim protein was increased in the MCF-7R cells treated with G15 and then TAM ($P<0.05$). The PI3K/AKT and MAPK/Erk signaling pathways stayed in the activated stage in the MCF-7R cells. When TAM was added after inhibiting MAPK/Erk pathway rather than PI3K/AKT pathway, the Bim protein was significantly increased ($P<0.05$). TAM could promote the apoptosis of the MCF-7 cells, but not the MCF-7R cells. However, the apoptosis of MCF-7R cells was increased after GPER or MAPK/Erk signaling pathway was inhibited and then TAM was added ($P<0.05$). **Conclusion** TAM as GPER agonist can activate the MAPK/Erk signaling pathway and inhibit the Bim expression in the MCF-7R cells. The MCF-7R cells are sensitive to TAM again through inhibiting GPER or MAPK/Erk signaling pathway.

[**Key words**] breast cancer; tamoxifen resistance; Bim; GPER/GPR30; cell apoptosis

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81072149). Corresponding author: Yang Guanglun, E-mail: guanglunyang@163.com

G蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor,GPER/GPR30)是独立于雌激素受体ERα和ERβ的一种新型雌激素受体,通过反式作用于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR),激活下游信号通路,产生一系列生物学效应。研究GPER在乳腺癌细胞MCF-7内分泌耐药中的作用时,发现他莫昔芬(tamoxifen, TAM)可作为GPER的激动剂[1-2]。本课题组前期已成功从乳腺癌MCF-7细胞中诱导出TAM耐受的细胞株MCF-7R细胞[3],并发现在耐药株中GPER总表达量没明显变化,但其从细胞质中转移到胞膜上,处于异常活化状态[1]。研究表明,乳腺癌细胞在发生他莫昔芬耐受后,细胞的恶性程度会增加,从而加快肿瘤的复发与转移[4-5]。Bcl-2家族蛋白在细胞凋亡中起到重要的作用,Bim蛋白是Bcl-2蛋白家族3种亚型中唯一有促凋亡作用的一个亚型BH3-only促凋亡蛋白(BID、BAD、BIM、PUMA、NOXA及BIK)中的一员[6-7]。Bim、BIK等Bcl-2家族蛋白在乳腺癌他莫昔芬及其他抗肿瘤药物耐药中的作用被广泛研究[8-9]。Bim在乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中作为促凋亡因子被广泛研究,且作为肿瘤细胞对阿霉素、紫杉醇等抗肿瘤药物是否有效中起到标示性的作用[10-11]。本研究发现乳腺癌细胞MCF-7发生TAM耐药后,细胞形态发生明显变化,且对他莫昔芬敏感性减低,MCF-7R中促凋亡蛋白Bim的表达水平明显降低,推测Bim可能为TAM促进细胞凋亡的作用蛋白,以及分析MCF-7R中GPER对Bim蛋白的调控及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌MCF-7细胞购自中科院上海细胞库,胎牛血清购于Biolnd公司,1640培养基购于Gibco公司,4-羟基他莫昔芬(OHT)、GPER特异性激动剂G1及其特异性拮抗剂G15等购于Sigma公司,Annexin V-FITC购于美国BD公司,细胞外信号调节激酶1/2(extra-cellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)抑制剂U0126、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K)抑制剂LY294002、BCA测蛋白浓度试剂盒、膜蛋白细胞组分提取试剂盒等购于碧云天生物技术有限公司,兔源性抗GPER购于Abcam公司。鼠

抗人β-actin单克隆抗体、qRT-PCR试剂盒购于TaKaRa公司,兔源性抗体(抗Bim、p-AKT、AKT、P-ERK1/2、Erk1/2)等购于Bioword公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌MCF-7细胞常规培养于10%胎牛血清的1640培养基、MCF-7他莫昔芬耐药株(MCF-7R细胞)前期研究中使用高浓度短期TAM冲击法诱导,已成功构建。为维持细胞的耐药性,常规培养在含有100 nmol/L OHT、5%胎牛血清的1640培养液中、37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中,细胞生长密度达80%~90%时,0.125%蛋白胰酶消化传代。用于实验或加药处理的细胞均需处于对数生长期。

1.3 倒置显微镜下观察两种细胞经TAM处理后的形态

处于对数生长期的两种细胞,经0.125%蛋白胰酶消化后,接种于6孔板中,使细胞密度在30%~40%,待细胞贴壁后,MCF-7R先换成无TAM的含5%胎牛血清的培养基撤药配药24 h,后两种细胞同时换车无血清的培养基饥饿24 h。再分别在两种细胞中加入无水乙醇作为对照组;1 μmol/L的TAM为实验组,继续培养24 h后,倒置显微镜下观察细胞情况。

1.4 qRT-PCR检测Bim基因的表达

提取MCF-7细胞及MCF-7R细胞的总RNA,并且反转录成cDNA,以β-actin为内参,进行qPT-PCR检测Bim(Bcl2L11)基因mRNA的表达水平。Bim(Bcl2L11)引物序列:上5′-CCTTTCTTGGCCCTTGTTCC-3′,下游5′-TTGTGGCTCTGTCTGTAGGG-3′,扩增片段197 bp;β-actin引物序列:上游5′-CACCCCACTTCTCTCTAAGG-3′,下游5′-AAAAAGTATTAAGGCGAAGAT-3′,扩增片段为126 bp;反应条件:95 ℃预变性15 s,95 ℃变性5 s,53 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共35个循环,重复3次实验。

1.5 Western blot检测

待MCF-7细胞及MCF-7R细胞生长密度至80%~90%,用0.125%胰蛋白酶消化,以40%~50%密度接种至培养皿内,待细胞生长至一定密度后提取细胞总蛋白。若需要加药处理的实验,接种细胞后培养24 h待细胞贴壁后,耐药细胞则先撤药(无TAM的含5%血清的培养基)培养24 h,然后两种细胞换无血清培养基继续饥饿培养24 h,两种细胞分别加入(无水乙醇为对照组;1 μmol/L的TAM、1 μmol/L的G15 1 h后再加入1 μmol/L的TAM、1 μmol/L的G1为实验组)24 h后提取总蛋白,膜蛋白提取按照厂家说明操作;MCF-7R经过相同细胞培养后分别加入(1 μmol/L无水乙醇为对照组;先10 μmol/L U0126和10 μmol/L Y294002 0.5 h后加入1 μmol/L TAM、单独加1 μmol/L TAM为实验组)24 h后提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度,经SDS-PAGE电泳分离、转膜,5%脱脂奶粉温室摇床封闭2 h或在4 ℃冰箱封闭过夜,分别加入兔抗人Bim、GPER、p-ERK、ERK1、p-AKT、AKT多克隆抗体(1∶500稀释)和鼠抗人β-actin单克隆抗体(1∶1 000稀释),4 ℃过夜>16 h;TBST洗膜3次,5~10 min/次,然后分别加入HRPG标记的羊抗兔或羊抗鼠IgG(1∶1 000稀释),室温孵育2 h;TBST洗膜3次后,ECL化学显色剂显色。Quantity One软件进行灰度值的半定量分析。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

两种细胞铺至6孔板,1×10^5个细胞每孔,待所有细胞贴壁后,MCF-7R及MCF-7各自经过撤药、饥饿处理后,加入药物处理24 h。然后消化各组细胞,收集细胞离心后倒掉上清,再用PBS重悬清晰重复2次后,用500 μL重悬加入荧光素标记的膜联蛋白V(Annexin V-FITC)室温下避光孵育10 min,再加入碘化丙啶(PI)室温避光孵育5 min,然后立即用流式细胞仪分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料数据用$\bar{x}\pm s$表示,两个独立样本资料组间数据采用t检验,多组样本均数比较采用方差分析。

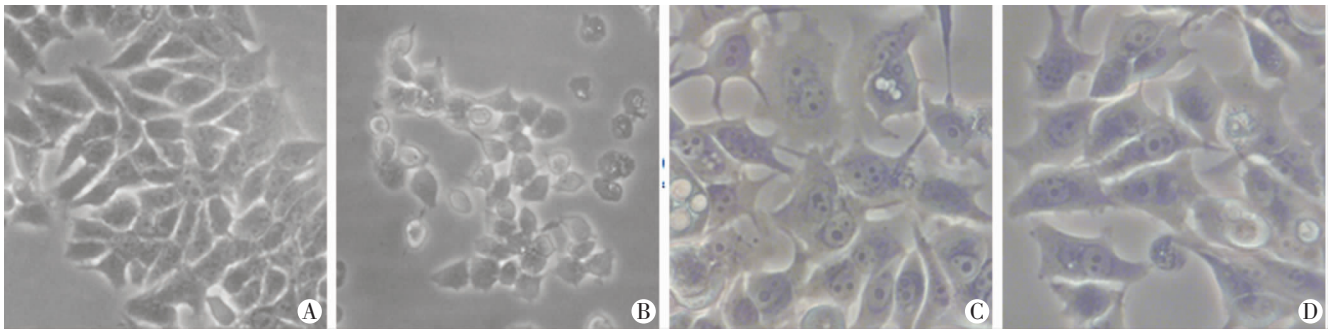
2 结果

2.1 两种细胞经他莫昔芬处理后的细胞形态变化

MCF-7细胞经TAM处理后,从完全伸展开的,扁平状贴壁细胞,变成空泡样透亮的悬浮状态,这意味着MCF-7细胞经TAM处理后,发生大量死亡;而在耐药细胞MCF-7R中,TAM处理后,细胞形态无明显变化,这说明耐药株在敏感株敏感的TAM浓度下,已失去了敏感性。见图1。

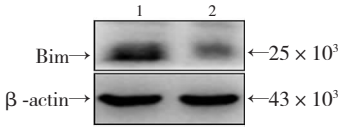
2.2 两种细胞内Bim的mRNA及蛋白表达水平

qRT-PCR检测到乳腺癌细胞MCF-7内Bim的mRNA表达(0.997±0.09),而在其他莫昔芬耐药株MCF-7R中的表达(0.278±0.021),较MCF-7明显降低($P<0.05$)。MCF-7R中的Bim蛋白表达量较MCF-7明显较低($P<0.05$),见图2。



A:MCF-7 对照组;B:MCF-7 TAM;C:MCF-7R 对照组;D:MCF-7R TAM

图1 倒置显微镜观察两种细胞经他莫昔芬处理后的形态变化 (×200)

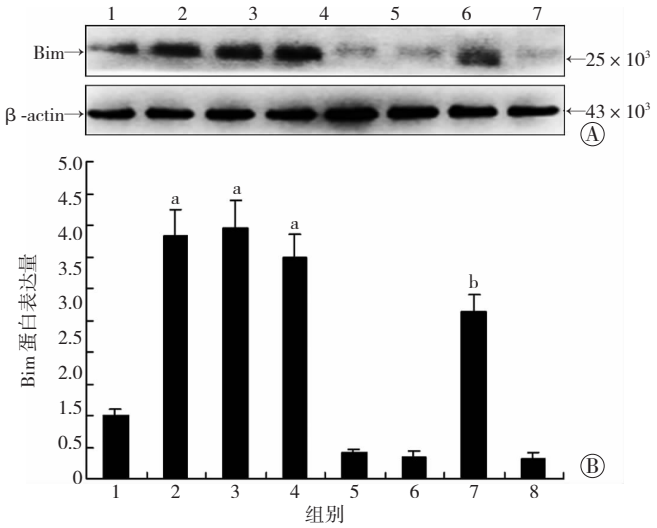


1:MCF-7;2:MCF-7R

图2 Western blot 检测两种细胞内 Bim 蛋白的表达

2.3 MCF-7R 中 GPER 的活化抑制 Bim 的蛋白水平

分别在 MCF-7 及 MCF-7R 细胞中予以无水乙醇、TAM、G15 + TAM、G15 等处理后,各组提取总蛋白。Western blot 结果显示:在 MCF-7 中加入 TAM 后 Bim 蛋白的表达量增加($P < 0.05$),在 MCF-7R 中加入 TAM 后 Bim 的表达无明显变化($P > 0.05$),而先加入 G15 后再加入 TAM 后 Bim 的表达量明显增高($P > 0.05$),见图3。

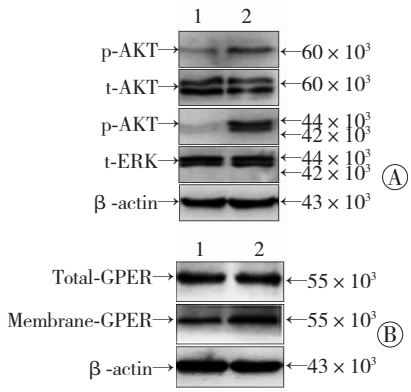


A:Western blot 检测;B:半定量分析($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1:MCF-7 对照组;2:MCF-7 TAM;3:MCF-7 G15 + TAM;4:MCF-7 G1;5:MCF-7R 对照组;6:MCF-7R TAM;7:MCF-7R G15 + TAM;8:MCF-7R G1 a:$P < 0.05$,与 MCF-7 对照组比较;b:$P < 0.05$,与 MCF-7R 对照组比较

图3 Western blot 检测两种细胞经各种处理后 Bim 蛋白表达

2.4 比较 MCF-7 和 MCF-7R 两种细胞中 PI3k/AKT 及 MAPK/Erk 两条信号通路的活化程度及 GPER 的差异

Western blot 检测结果显示:在他莫昔芬耐药细胞 MCF-7R 中,总的 GPER 蛋白较 MCF-7 未发生明显变化,但膜上的 GPER 表达较 MCF-7 明显升高[(0.453 ± 0.032) *vs* (0.125 ± 0.011), $P < 0.05$],且 p-ERK (0.382 ± 0.024) 和 p-AKT (0.118 ± 0.010) 的表达量较 MCF-7 细胞的 p-Akt (0.081 ± 0.009) 和 P-Erk (0.034 ± 0.005) 也明显增加($P < 0.05$),见图4。



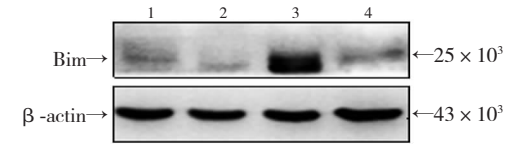
A:Western blot 检测 p-AKT 和 p-ERK;B:Western blot 检测总 GPER 和膜上 GPER 1:MCF-7;2:MCF-7R

图4 Western blot 检测两种细胞中 P-AKT 和 P-ERK 的表达及 GPER 的表达

2.5 MCF-7R 中 Bim 蛋白表达量受 MAPK/ERK 信号通路的影响

MCF-7R 分别经:无水乙醇、TAM、U0126 + TAM、LY94002 + TAM 处理后。检测耐药细胞 MCF-7R 各处理组中 Bim 的表达水平。半定量分析结果:对照组 (0.225 ± 0.020),TAM 组 (0.183 ± 0.014),U0126 + TAM 组 (1.236 ± 0.108),LY294002 组 (0.213 ± 0.018 9),

发现先加入 ERK 抑制抑制剂 U0126 后再加入 TAM 实验组，与对照组相比较明显增加，($P<0.05$)。见图 5。



1：Ctrl；2：TAM；3：Uo126 + TAM；4：Ly294002 + TAM

图 5 Western blot 检测 MCF-7R 经过不同处理后 Bim 蛋白表达

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

在 MCF-7 细胞和 MCF-7R 细胞经不同药物处理后，流式细胞检测凋亡，比较细胞凋亡率。发现 MCF-7 细胞加入 TAM 处理后凋亡率明显升高[(20.54 ± 1.97) *vs* (50.20 ± 4.70)，$P<0.05$]；MCF-7R 细胞加入相同浓度的 TAM 后，凋亡率却无明显的变化[(10.55 ± 0.95) *vs* (14.21 ± 1.06)，$P>0.05$]，而在加入 TAM 之前我们用 G15 抑制 GPER、U0126 抑制 ERK 信号通路、LY294002 抑制 AKT 信号通路，发现加入 G15 和 U0126 的处理组细胞凋亡率上升[(45.20 ± 4.02) *vs* (43.00 ± 3.69)，$P<0.05$]，而 LY294002 组无明显差异[(18.90 ± 1.79)，$P>0.05$]。

3 讨论

TAM 在雌激素受体(estrogen receptor，ER)阳性的乳腺癌患中广泛应用，相关临床试验已经证实 TAM 治疗早期 ER^+ 的乳腺癌，可使其病死率降低 31%，复发率降低 47%[12]。然而，约一半长期 TAM 治疗的乳腺癌患者会失去对 TAM 的敏感性，最终发生复发转移[13]。现对于 TAM 的耐药机制现依然不完善。

本课题组在研究 GPER 在乳腺癌内分泌他莫昔芬耐受中的作用时，发现 GPER 与 EGFR 存在密切联系，GPER 激活后反作用于 EGFR，然后通过 PI3K/AKT、MAPK/Erk 两条信号通路，发出细胞增殖、凋亡等一系列信号，在 TAM 抵抗中起到了独特的作用[1,14-15]。更有趣的是 TAM 对于 ER，是完全或不完全的拮抗剂，而对于 GPER 则是激动剂[1]。且本课题组已成功从 MCF-7 中诱导出 TAM 耐受细胞 MCF-7R，并证实两种细胞的形态变化及对 TAM 的敏感性。在比较两种细胞对 TAM 敏感性的研究时发现，MCF-7 细胞经过 TAM 处理之后，细胞的凋亡率明显升高；而在 MCF-7R 细胞中加入 TAM 处理后，起凋亡无明显变化；而在 MCF-7R 中加入 TAM 之前先加入 GPER 抑制剂 G15 后，细胞凋亡率却明显增加[1]。

相关研究报道 MAPK/ERK 和 PI3K/AKT 两条信号通路与乳腺癌内分泌耐药有关，且抑制信号通路的活化可逆转或改善耐药[1,16]。有研究发现 Bim 蛋白在乳腺癌细胞凋亡中期到明显的作用，且在乳腺癌细胞中 PI3K/AKT、MAPK/ERK 两条信号通路活化抑制 Bim 的表达[17-18]。本研究比较两种细胞中 Bim 的基因及蛋白表达水平，发现 MCF-7R 中 Bim 的基因及蛋白水平较 MCF-7 明显降低。同时验证了前期结果：MCF-7R 中 GPER 总表达量无明显变化，但处于异常活化状态，使 PI3K/AKT 及 MAPK/ERK 两条信号通路活化，p-AKT 及 p-ERK 表达量增加。在 MCF-7 中加入 TAM 后 Bim 蛋白表达明显增强，而在 MCF-7R 中加入 TAM 后 Bim 的蛋白表达无明显变化，这或许可以解释 Bim 是乳腺癌细胞对 TAM 敏感性指标之一。在 MCF-7R 中加入 TAM 之前先加入 GPER 特异性抑制剂 G15，Bim 的表达量与只加 TAM 的 MCF-7R 相比较明显高表达，可以证明在 MCF-7R 中 GPER 对 Bim 具有抑制的作用。在 MCF-7R 中加入 U0126 抑制 MAPK/ERK 通路、LY294002 抑制 PI3K/AKT 通路后，再加 TAM 处理，发现加 U0126 组 Bim 的表达较其他组明显高表达，这可以证明在乳腺癌耐药株 MCF-7R 中，MAPK/ERK 信号通路可抑制 Bim 的表达，且细胞经过以上相同处理之后，检测细胞凋亡率。我们发现 G15 抑制 GPER 和 U0126 抑制信号通路 MAPK/ERK 后，细胞凋亡数量增加明显，说明耐药细胞对 TAM 的敏感性有明显的改善，且发现 Bim 蛋白的表达和两种细胞的凋亡率变化趋势相似，这或许可以证明 Bim 蛋白是 TAM 促进细胞凋亡的作用蛋白之一。

综上，本研究证实乳腺癌他莫昔芬耐药株 MCF-7R 中，异常活化的 GPER 活化下游信号通路 MAPK/ERK，抑制促凋亡蛋白 Bim 的表达，更深入地研究了 GPER 在乳腺癌内分泌 TAM 治疗耐受中的作用，但具体调控机制仍不甚明确，需深入研究其关键调控靶点或可为解决乳腺癌 TAM 耐药提供新的方法。

参考文献：

[1] 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.

[2] Catalano S, Giordano C, Panza S, *et al*. Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(2): 273-285.

[3] 莫志强，涂刚，罗浩军，等. 人乳腺癌MCF-7他莫昔芬耐药细胞株的建立及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2011，33(21)：2256－2259.

[4] Ward A, Balwierz A, Zhang J D, *et al*. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(9): 1173－1182.

[5] Milani A, Geuna E, Mittica G, *et al*. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions[J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(5): 990－1001.

[6] Youle R J, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47－59.

[7] Barclay L A, Wales T E, Garner T P, *et al*. Inhibition of Pro-apoptotic BAX by a noncanonical interaction mechanism [J]. Mol Cell, 2015, 57(5): 873－886.

[8] Viedma-Rodriguez R, Baiza-Gutman L A, Garcia-Carranca A, *et al*. Suppression of the death gene BIK is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 43(6): 1777－1786.

[9] Dai Y, Grant S. BCL2L11/Bim as a dual-agent regulating autophagy and apoptosis in drug resistance[J]. Autophagy, 2015, 11(2): 416－418.

[10] Miller A V, Hicks M A, Nakajima W, *et al*. Paclitaxel-induced apoptosis is BAK-dependent, but BAX and BIM-independent in breast tumor[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60685.

[11] Park H K, Lee J E, Lim J, *et al*. Combination treatment with doxorubicin and gamitrinib synergistically augments anticancer activity through enhanced activation of Bim[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 431.

[12] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1687－1717.

[13] Hackshaw A, Roughton M, Forsyth S, *et al*. Long-term benefits of 5 years of tamoxifen: 10-year follow-up of a large randomized trial in women at least 50 years of age with early breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(13): 1657－1663.

[14] Sjostrom M, Hartman L, Grabau D, *et al*. Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 145(1): 61－71.

[15] Elbaz M, Nasser M W, Ravi J, *et al*. Modulation of the tumor microenvironment and inhibition of EGF/EGFR pathway: novel anti-tumor mechanisms of Cannabidiol in breast cancer[J]. Mol Oncol, 2015, 9(4): 906－919.

[16] Kim M R, Choi H K, Cho K B, *et al*. Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. Cancer Sci, 2009, 100(10): 1834－1841.

[17] Lv Y, Song S, Zhang K, *et al*. CHIP regulates AKT/FoxO/Bim signaling in MCF7 and MCF10A cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83312.

[18] Periyasamy-Thandavan S, Takhar S, Singer A, *et al*. Insulin-like growth factor 1 attenuates antiestrogen- and antiprogestin-induced apoptosis in ER + breast cancer cells by MEK1 regulation of the BH3-only pro-apoptotic protein Bim [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(2): R52.

（收稿：2015-03-30；修回：2015-04-07）

（编辑 龙 亮）