DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001000

膜雌激素受体在乳腺癌中的表达及对表皮生长因子水平的影响

薛会朝，王　雷，郑维维，李泽信，王国钱，郭长磊，李　健，王　迎
（新乡医学院第一附属医院普外科，卫辉　453100）

【摘　要】目的：探讨了乳腺癌细胞中膜雌激素受体（membraneestrogenreceptor，mER）表达情况以及对表皮生长因子水平的影响。**方法**：采用 qRT-PCR 和 Western blot 分析乳腺癌细胞乳腺癌细胞系-7（michigan cancer foundation-7，MCF-7）、MDA-MB-231和 MDA-MB-435 中膜雌激素受体mER mRNA 和蛋白质的表达水平。并选取中等表达的细胞采用慢病毒介导的 mER shRNA 建立 mER Knowdown 的稳定细胞系，并分析膜雌激素白蛋白-E2（membrane estrogen-2，mE2）和传统的雌激素（estrogen-2，E2）分别对乳腺癌细胞（ERα+和 ERα-）的生长影响及其对 EGFR 和 EGF 表达水平的影响。**结果**：3 种乳腺癌细胞系中 mER 均有表达，其中 MCF-7 细胞表达水平最高，MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞表达水平相当。采用慢病毒介导 mER shRNA 建立的 MCF-7 稳定细胞系（MCF-7/ERα-）其 mER mRNA 和蛋白质水平较正常 MCF-7 均明显下调（$P<0.05$）。传统 E2 均能促进 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞的增殖，无统计学意义（$P>0.05$），但 mE2 作用后，MCF-7/ERα-生长速度明显低于 MCF-7 细胞（$P<0.05$）。传统 E2 刺激 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞后，细胞 EGF mRNA 和蛋白质水平无差异（$P>0.05$），而 mE2 刺激 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞后，MCF-7/ERα-细胞 EGF mRNA 和蛋白质水平较 MCF-7 细胞水平明显下降（$P<0.05$）。**结论**：本研究有望为乳腺癌的治疗提供更新的分子治疗靶点，更精确的临床内分泌治疗预测指标。

【关键词】雌激素受体；乳腺癌；表皮生长因子
【中图分类号】R737.9　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-04-27

Membrane estrogen receptor expression in breast cancer and its effect on epidermal growth factor

Xue Huichao，Wang Lei，Zheng Weiwei，Li Zexin，Wang Guoqiang，Guo Changlei，Li Jian，Wang Ying
(Department of General Surgery，the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College)

【Abstract】*Objective*：To investigate the expression of estrogen receptor in breast cancer cell and its effect on epidermal growth factor. ***Methods***：The membrane estrogen receptor（mER）expression at mRNA and protein levels in human breast cancer cell line MCF-7，MDA-MB-231 and MDA-MB-435 were detected by real time fluorescent quantitative PCR and Western blot. Stable mER knowdown cell lines were constructed by lentiviral mediated mER shRNA. The effect of membrane estrogen（mE2）and traditional estrogen on growth of（ERα+ and ERα-）as well as on expression of epithelial growth factor receptor（EGFR）and epidermal growth factor（EGF）were analyzed by MTT. ***Results***：mER was expressed in MCF-7，MDA-MB-231 and MDA-MB-435 cell lines，with MCF-7 cell having the highest expression. mER mRNA and protein levels in knowdown stable cells by lentiviral mediated shRNA were significantly lower than those of MCF-7 cells（$P<0.05$）. Estrogen can promote proliferation of MCF-7 and MCF-7/ER- cell and there was not statistical significance among three lines（$P>0.05$）. But after treatment by mE2，the proliferation of MCF-7/ER- was significantly lower than that of MCF-7 cells（$P<0.05$）. After MCF-7 and MCF-7/ER alpha cells being stimulated by estrogen，there was no statistical difference in EGF mRNA and protein levels between MCF-7/ER- cells and MCF-7（$P>0.05$）. But after being stimulated by mER，EGF mRNA and protein levels was significantly decreased in MCF-7/ER- cells than in MCF-7（$P<0.05$）. ***Conclusion***：This study is expected to provide a molecular therapeutic targeting for the treatment of breast cancer.

【Key words】membrane estrogen receptor；breast cancer；epidermal growth factor

作者介绍：薛会朝，Email：xuehuichao@126.com，
研究方向：乳腺疾病基础与临床。

基金项目：河南省卫生厅科技攻关资助项目（编号：201303104）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1538.006.html
（2016-06-23）

乳腺癌是危害妇女身心健康的常见恶性肿瘤，其在全球范围内一直位居女性肿瘤的首位，并且每年以 2%的速度递增[1]。在欧美国家每 8、9 人中就有 1 人在其一生中患乳腺癌。全球每年有 120 万妇女患乳腺癌，50 万妇女死于乳腺癌，预计 2010 年全球乳腺癌年新发病例数将达到 140 万左右。虽然早发现、早诊断、早治疗可有效降低乳腺癌死亡率，但目前医学界对乳腺癌，尤其是晚期肿瘤尚无疗效确切的治疗方法。其主要原因是肿瘤自身的发生与发展中的异质性所决定的。而临床和分子特征的研究证实乳腺癌生长增殖过程中存在多基因实变的现象，其结果是同一乳腺癌肿瘤组织多种分子亚型细胞共存，如雌激素受体表达阳性的乳腺癌细胞与雌激素（estrogen-2，E2）表达阴性的乳腺癌细胞共存等[2-3]。乳腺癌这种异质性生长的特性为寻找乳腺癌新的诊断与治疗方法提供了理论基础。

乳腺癌细胞的生长受多种生长因子的调控，E2 及其受体、生长因子受体（epithelial growth factor receptor，EGFR）及其受体及多种信号蛋白分子，在乳腺癌的发生发展中起着至关重要的作用[5]。研究表明，乳腺癌细胞雌激素受体的表达是重要的预后因子及临床内分泌治疗的预测指标[6-7]。表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）作为有丝分裂原具有促进细胞增生的作用，EGF 及其受体调节乳腺癌生长的作用已经被证实，E2 与 EGF 也有交互串扰作用[8-9]。目前 E2 经雌激素受体途径作用对 EGF 调控的作用已经有明确的研究报道，但 E2 经其膜受体途径是否也对 EGF 的表达及分泌有所调控目前还没有相关的研究报道。本研究通过研究雌激素-雌激素膜受体与 EGF 及其受体间相互作用关系，更深入地了解原发性乳腺癌组织细胞雌激素受体（membraneestrogenreceptor，mER）表达的生物学意义及调控机制，本研究结果有望为乳腺癌的治疗提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

乳腺癌细胞系-7（michigan cancer foundation-7，MCF-7）、MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 乳腺癌细胞系均购自美国 ATCC 细胞库；DMEM 培养基和胎牛血清（FBS）购自 GIBCON 公司；MTT 购自 Sigma 公司；EGF ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司；含 mER shRNA 慢病毒由上海吉凯生物有限公司包装；总 RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司；RT-PCR 检测试剂盒购自美国 ABI 公司；引物由上海英俊生物技术有限公司合成；Real-time PCR 扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司；鼠抗人 mER 抗体购自美国 Abcam 公司；HRP 标记的羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物有限公司；嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司；其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 mER knowdown 稳定细胞系的构建 将处于指数生长期的 MCF-7 细胞采用胰酶消化，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，接种于 6 孔板中，每孔 500 μl。待细胞贴壁后，将病毒加入细胞中，使其感染 MCF-7 细胞，感染 24 h 后更换含 1 μg/ml 嘌呤霉素新鲜培养基进行筛选，未被感染的或者 shRNA 未整合进入染色体的细胞则会被杀死。最终建立 mER knowdown 稳定细胞系。

1.2.2 qRT-PCR 体系的建立 将 1 ml Trizol 直接加入细胞或处理的细胞中，置于 1.5 ml 离心管中，并向离心管中加入 200 μl 氯仿，剧烈震荡混匀冰上静置 15 min 使溶液分层，12 000 r/min 离心 15 min，液体出现分层后，将上清（约 500 μl）转移至 500 μl 的异丙醇中，混匀后再冰上放置使 RNA 沉淀析出，15 min 后，12 000 r/min 离心 10 min，沉淀用预冷的 75%无水乙醇洗涤 2 次，最后溶于无 RNA 酶的双蒸水中。测定样本浓度，并采用逆转录试剂盒将 RNA 转录为 cDNA，作为 PCR 的模板。设计 mER 和 EGF PCR 引物，如下：mER-F：5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3'；mER-3'：5'-CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3'；EGF-F：5'-GAAAGTTCAAACTCATCAAGATTA-3'：EGF-R：5'-GACCCATTCAGAAAAACTCTTTTGCAAAAG-3'；β-Actin-F：5'-GCGGGAAATCGTGCGTGAC-3'，β-Actin-R：CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'。然后按照下述反应体系制备反应混合物：2×SYBR Green 通用型 qPCR Master Mix 10 μl，上游/下游引物各（10 μmmol/L）各 1 μl，cDNA 1 μl，补双蒸水至终体积为 20 μl。根据下列反应条件进行 PCR：预变性：95 ℃，30 s；变性：95 ℃，3 s；退火延伸：60 ℃，30 s；构建溶解曲线。最后从 qRT-PCR 仪上直接读取数据。

1.2.3 Western blot 检测 mER 体系的建立 将不同的乳腺癌细胞系用胰酶消化后，1 500 r/min 离心 5 min 后，弃上清，用 PBS 洗涤 2 次，然后用 200 μl 细胞裂解液重悬细胞，并加入蛋白酶抑制剂，冰上静置 30 min，12 000 r/min 离心 15 min，取上清，加入 4×上样缓冲液，沸水煮沸 30 min，离心后上样，进行 SDS-PAGE 并将蛋白转移至 PVEF 膜上，用 5%的脱脂奶粉封闭，然后用鼠抗人 mER 一抗包被过夜，PBST 洗涤 3 次，然后用 HRP 偶联的羊抗鼠二抗室温包被 1 h，PBST 洗涤 3 次后，加发光液，显色，拍照。同时以 β-actin 作为内参，采用灰度计算软件分析目的蛋白条带灰度，计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 MTT 法测定细胞增殖的体系建立 将处于指数生长期的 MCF-7 和 MCF-7/ERα-采用胰酶消化，将细胞密度调

整为 1×10^5 个/ml，接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μl，待细胞完全贴壁后，更换新鲜培养基，并向细胞中 mE2 和传统的 E2，干预浓度分别为、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 和 10^{-9} mol/L，同时设立对照组。每个浓度设立 3 个复孔。然后在 5% 10^{-5} 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后，每孔加入 20 μl mg/ml 的 MTT，继续培养 3 h 后，再向孔中加入 100 μl DMSO 显色，再用酶标仪在检测波长 570 nm 处检测吸光度（absorbance，A）值。细胞的增殖率=($A_{处理组值}-A_{对照组值}$)/$A_{对照组值}\times100\%$。

1.2.5　ELISA 检测细胞分泌 EGF 体系的建立　实验方法严格按照试剂盒的操作指南进行。稀释标准品如下浓度：12、6、3、1.5、0.75 ng/ml。分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μl，待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl，然后再加待测样品 10 μl（样品最终稀释度为 5倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。用封板膜封板后置 37 ℃温育 30 min。小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 s 后弃去，如此重复 5 次，拍干。每孔加入酶标试剂 50 μl，空白孔除外。用封板膜封板后置 37 ℃温育 30 min。每孔加满洗涤液，静置 30 s 后弃去。每孔先加入显色剂 A 50 μl，再加入显色剂 B 50 μl，轻轻震荡混匀，37 ℃避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。以空白空调零，450 nm 波长依序测量各孔的 A 值。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

1.3　统计分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析，计量数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2 组剂量资料比较采用两独立样本 t 检验，检验水准 α=0.05。

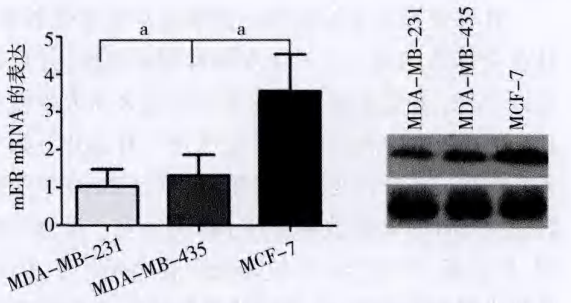
2　结　果

2.1　MCF-7 是 mER 高表达细胞系

为了开展本研究，实验首先采用 qRT-PCR 分析了本实验室收集的乳腺癌细胞系 mER 的表达水平，旨在寻求一株 mER 高表达的细胞用于后续实验，见图 1。研究结果显示，MCF-7 乳腺癌细胞中 mER 的 mRNA（3.23 ± 0.59）和蛋白质水平明显高于 MDA-MB-231（1.12 ± 0.21）和 MDA-MB-435 细胞（1.32 ± 0.32），差异有统计学意义（MCF-7 vs. MDA-MB-231，t=2.369，P<0.05；MCF-7 vs. MDA-MB-435，t=2.012，P<0.05）。本研究为后续实验奠定了基础。

2.2　慢病毒介导的 shRNA 能下调 MCF-7 细胞 mER 的表达

为了进一步验证 mER 在 MCF-7 细胞中高表达的生物学意义，采用慢病毒建立了 mER knowdown 稳定细胞系，并采用 qRT-PCR 分析了稳定细胞系的 knowdown 效率，结果如图 2A 所示，MCF-7/ERα-的稳定细胞系 mER mRNA（0.41 ± 0.19）水平较 MCF-7 细胞（1.29 ± 0.51）明显下调（t=2.598，P<0.05）。Western blot 结果如图 2B 显示，MCF-7/ERα-的稳定细胞系 mER 蛋白水平明显低于 MCF-7 细胞。

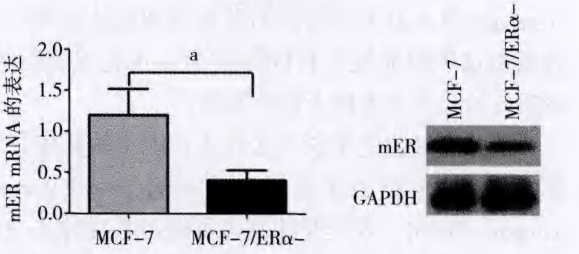


A. qRT-PCR 分析不同乳腺癌细胞系 mER mRNA 表达水平　　B. Western bot 分析不同乳腺癌细胞系 mER 蛋白表达水平

a：与 MDA-MB-231 组相比，P<0.05

图 1　mER 在不同乳腺癌细胞中的表达水平分析

Fig.1　Expression level analysis of mER in different breast cancer cell lines



A. qRT-PCR 分析 mER mRNA 水平变化　　B. Western bot 分析 mER 蛋白表达水平

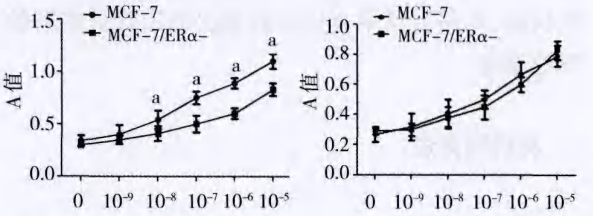
a：与 MCF-7 相比，P<0.05

图 2　mER 在 MCF-7 和 MCF-7/ERα- 细胞表达情况

Fig.2　mER expression in MCF-7and MCF-7/ERα-7 cell lines

2.3　mER knowdown 降低了 MCF-7 细胞对激素的反应性

实验分析了 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞在 mE2 和传统的 E2 刺激下的生长增殖情况，结果如图 3 所示，在 mE2 刺激下，MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞开始增殖，但是 MCF-7/ERα-细胞增殖速度明显低于 MCF-7 细胞，差异有统计学意义（P<0.05）。而传统 E2 均能刺激 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞增值，无差异（P<0.05）。见表 1、2。



A. mE2 对 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞增殖的影响　　B. E2 对 MCF-7 和 MCF-7/ERα-细胞增殖的影响

a：与 MCF-7 细胞相比，P<0.05

图 3　mE2 和 E2 对 MCF-7 和 MCF-7/ERα- 细胞增殖的影响

Fig.3　Proliferation of MCF-7 and MCF-7/ERα- in stimulation of membrane estrogen and estrogen

表 1 mE2 对 MCF-7 和 MCF-7/ERα- 细胞增殖的影响（mol/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab.1 Proliferation of MCF-7 and MCF-7/ERα- in stimulation of mE2（mol/L，$\bar{x}\pm s$）

细胞系	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
MCF-7	0.34 ± 0.05	0.40 ± 0.09	0.54 ± 0.09	0.75 ± 0.06	0.89 ± 0.06	1.10 ± 0.07
MCF-7/ERα-	0.30 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.41 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.83 ± 0.01
t 值	0.358	0.574	1.298	1.998	2.365	3.104
P 值	0.639	0.421	0.043	0.027	0.010	0.004

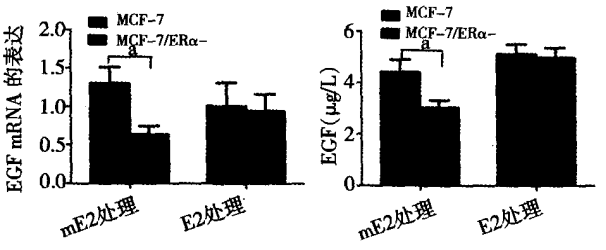
表 2 E2 对 MCF-7 和 MCF-7/ERα- 细胞增殖的影响（mol/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab.2 Proliferation of MCF-7 and MCF-7/ERα- in stimulation of E2（mol/L，$\bar{x}\pm s$）

细胞系	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
MCF-7	0.29 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.07	0.55 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.84 ± 0.11
MCF-7/ERα-	0.30 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.43 ± 0.01	0.54 ± 0.07	0.62 ± 0.01	0.89 ± 0.01
t 值	0.102	0.519	0.295	0.179	0.110	0.199
P 值	0.841	0.583	0.709	0.845	0.888	0.827

2.4 mER knowdown 的 MCF-7 细胞的 EGF 表达水平明显下调

EGF 及其受体调节乳腺癌生长的作用，EGF 介导的生物学效应需要雌激素受体表达阳性的细胞参与。因此实验进一步分析了 mER knowdown 对 MCF-7 细胞分泌 EGF 水平的能力的影响，无论是 mE2 还是传统 E2 刺激，MCF-7/ERα- 细胞 EGF 的 mRNA 表达水平明显下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。ELISA 分析显示在 mE2 和传统 E2 刺激后，MCF-7/ERα- 细胞 EGF 蛋白表达能力明显低于 MCF-7 细胞，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见图 4、表 3。



A. mER knowdown 的 MCF-7 细胞的 EGF mRNA 变化　　B. mER knowdown 的 MCF-7 细胞的 EGF 蛋白水平变化

图 4 mER knowdown 的 MCF-7 细胞的 EGF mRNA 和蛋白质表达水平

Fig.4 EGF expression in mER knowdown MCF-7 cells

表 3 mER knowdown 的 MCF-7 细胞的 EGF mRNA 和蛋白质表达水平

Tab.3 EGF expression in mER knowdown MCF-7 cells

细胞系	EGF mRNA 水平		EGF（μg/L）	
	mE2处理	E2处理	mE2处理	E2处理
MCF-7	1.27 ± 0.31	1.05 ± 0.45	4.56 ± 0.37	5.28 ± 0.26
MCF-7/ERα-	0.61 ± 0.19	0.96 ± 0.36	3.12 ± 0.30	5.15 ± 0.22
t 值	3.154	1.025	2.436	0.958
P 值	0.023	0.429	0.038	0.587

3 讨 论

乳腺癌是临床常见的妇科恶性肿瘤，随着放疗、化疗和内分泌治疗的不断发展，患者的生存率得到了显著的提高[10]。在治疗过程中，雌激素受体是一个主要的内分泌治疗依据和预后评价指标。根据雌激素受体作用的部位，目前推测可能有两种不同通路存在。基因转录效应：E2 通过与细胞核雌激素受体结合，调节特定 mRNA 转录和蛋白质合成，从而产生其最终生物学效应[11-12]。该途径有作用时间延迟（数小时或数天）以及对转录和翻译抑制剂敏感的特点，称为 E2 的经典效应/核效应[13]。非基因转录效应：E2 至少部分地通过与细胞膜/细胞内信号蛋白快速形成蛋白复合物，活化并启动丝裂源活化蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3 激酶或酪氨酸激酶等多种信号通路的传导机制发挥生理效应[14-15]。具有发生速度快（数秒或数分钟发生）以及 mRNA 和蛋白质合成阻断剂不能抑制其快速效应等特点。推测可能与细胞膜上的雌激素膜样受体产生快速信号传导有关。这个途径又称为膜快速效应（简称膜效应）。基于反应发生的部位，E2 介导的核事件被称为“核激发的类固醇信号”，E2 介导的膜事件被称为“膜激发的类固醇信号”。激素通过核激发的类固醇信号的研究比较透彻，但是关于膜激发的研究相对较少。

本研究分析了不同的乳腺癌肿瘤细胞 mER 的表达水平，结果显示 MCF-7 细胞 mER mRNA 和蛋白质的表达水平明显高于 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞，说明 MCF-7 是一株研究 mER 的合

适的细胞系。为了研究 mER 在乳腺癌中的生物学功能，实验采用慢病毒介导的 shRNA 感染 MCF-7 细胞，成功构建了 MCF-7 mER knowdown 的稳定细胞系。慢病毒在构建稳定细胞系中具有其独特的优势，其能在较短时间内将 shRNA 整合到细胞基因组染色体上，是构建稳定细胞系的理想选择[16]。本研究采用慢病毒构建的稳定细胞系明显下调了 MCF-7 细胞 mER mRNA 和蛋白质水平均显著性下调，为后续试验进行奠定了基础。

试验进一步分析了 mER knowdown 后对 mE2 和传统的 E2 的反应性，结果发现 MCF-7/ERα-细胞对 mE2 的反应性明显下降，而对传统 E2 的反应则无明显变化，说明 mER 在调节乳腺癌细胞生长过程中发挥着重要的作用。

基础研究表明，E2 及雌激素受体在乳腺癌的发生发展中也起着至关重要的作用。E2 通过刺激乳腺细胞不断增殖而增加了 DNA 复制错误的机会，从而产生基因损伤和基因突变。表皮生长因子受体是一种糖蛋白广泛分布于哺乳动物的上皮细胞膜上。正常情况下与 EGF 家族几个成员特异结合，在细胞增殖和功能的调节中发挥作用。E2 可通过 G 蛋白偶联作用来激活 EGFR[17]。E2 与 EGF 及其受体之间关系被称作交互串扰，即 EGF 介导的生物学效应需要雌激素受体表达阳性的细胞参与[18]。因此，研究 mER 与表皮生长因子受体的相互关系对于更好地理解它们在乳腺癌细胞生长和成活中的作用，寻找更多更好的治疗靶点是十分必要的。研究显示当 mER 刺激 MCF-7/ERα-细胞时，细胞分泌EGF 的水平较 MCF-7 细胞明显下调，这一结果说明 mE2 与mER 也调节者 EGF 的表达，也存在一定的串扰效应。

综上所述，MCF-7 乳腺癌细胞 mER 的表达水平较高，mER knowdown 后可降低细胞对 mE2 的反应能力，降低细胞增殖，同时下调 EGF 的表达。本研究 mER 与 EGF 的相互关系提出了初步解释。

参 考 文 献

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[2] Yang Z, Cai JH, Xie SJ, et al. Therapeutic effects of signal transducer and activator of transcription 3 siRNA on human breast cancer in xenograft mice[J]. Chin Med J(Engl), 2011, 124(12): 1854-1861.

[3] Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(8): 1160-1167.

[4] Papachristopoulou G, Avgeris M, Charlaftis A, et al. Quantitative expression analysis and study of the novel human kallikrein-related peptidase 14 gene(KLK14) in malignant and benign breast tissues[J]. Thromb Haemost, 2011, 105(1): 131-137.

[5] Hutcheson IR, Goddard L, Barrow D, et al. Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin beta1[J]. 2011, Breast Cancer Res, 13(2): R29.

[6] Liu L, Ma H, Tang Y, et al. Discovery of estrogen receptor alpha modulators from natural compounds in Si-Wu-Tang series decoctions using estrogen-responsive MCF-7 breast cancer cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(1): 154-163.

[7] De Angelis, Campos AC, Rodrigues MA, et al. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 412(2): 341-346.

[8] Lin CK, Su HY, Tsai WC, et al. Association of cortactin, fascin-1 and epidermal growth factor receptor(EGFR) expression in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathological parameters[J]. Dis Markers, 2008, 25(1): 17-26.

[9] Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al. Clinical impact of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Meta-analytical estimation and implications for therapeutic strategies[J]. Cancer, 2011, 118(6): 1523-1532.

[10] Lian SC, Tan PH. CerbB2 status in breast cancer: pathologic issues [J]. Ann Acad Med Singapore, 2002, 31(6): 793-798.

[11] Lee B, Bowden GH, Myal Y. Identification of mouse submaxillary gland protein in mouse saliva and its binding to mouse oral bacteria[J]. Arch Oral Biol, 2002, 47(4): 327-332.

[12] Luo YH, Wu CH, Wu WS, et al. Association between tumor epidermal growth factor receptor mutation and pulmonary tuberculosis in patients with adenocarcinoma of the lungs[J]. J Thorac Oncol, 2011, 7(2): 299-305.

[13] Bracke M, De Wever O. Developmental and cancer research on the mammary gland nowadays[J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(7-9): 667-669.

[14] Laskin JJ and Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(1): 1-17.

[15] Wells A, Kassis J, Solava J, et al. Growth factor-induced cell motility in tumor invasion[J]. Acta Oncol 2002, 41(2): 124-130.

[16] Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, et al. Biosafety features of lentiviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 2013, 24(2): 132-142.

[17] Pietras RJ. Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature[J]. Breast J, 2003, 9(5): 361-373.

[18] Azios NG, Dharmawardhane SF. Resveratrol and estradiol exert disparate effects on cell migration, cell surface actin structures, and focal adhesion assembly in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Neoplasia, 2005, 7(2): 128-140.

（责任编辑：冉明会）