

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.005

· 基础研究 ·

## 雌激素受体亚型对乳腺癌 MCF-7 细胞生长及微环境中 Th 平衡的影响

牛秀琰<sup>1</sup>, 叶路<sup>1</sup>, 毛立群<sup>1</sup>, 王越<sup>1,2</sup> (1. 武警医学院 免疫学教研室, 天津 300162; 2. 武警医学院 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300162)

[摘要] 目的: 研究雌激素受体(estrogen receptor, ER)亚型对人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长及 Th1/Th2 类细胞因子分泌的影响。方法: 采用 RNA 干扰技术沉默 MCF-7 细胞中 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  的表达, 获得 ER $\alpha$ /ER $\beta$  不同表达状态的 MCF-7 细胞。应用 MTT 法、流式细胞术、RT-PCR 法分别检测 MCF-7 细胞的增殖、细胞周期和凋亡抑制基因的表达, ELISA 法检测细胞上清中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的分泌水平。结果: 经 RNA 干扰后 MCF-7 细胞的 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  蛋白表达水平分别下降了(77.7  $\pm$  3.3)% 和 (68.3  $\pm$  2.1)%。与对照组相比, ER $\alpha$  基因沉默后, MCF-7 细胞生长减慢 ( $P < 0.05$ ), 受阻于 G<sub>0</sub> ~ G<sub>1</sub> 期, 凋亡抑制基因 XIAP 的表达水平降低为对照组的(43.0  $\pm$  2.0)%, IFN- $\gamma$  分泌水平增加至对照组的(1.89  $\pm$  0.34)倍; ER $\beta$  基因沉默促进 MCF-7 细胞的生长 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例增加, 凋亡抑制基因 Bcl-2、Bcl-xl、XIAP 的表达水平分别升高至对照组的(1.28  $\pm$  0.21)、(1.61  $\pm$  0.32)和(1.65  $\pm$  0.29)倍, IFN- $\gamma$  分泌水平降低为对照组的(28.0  $\pm$  4.0)%。结论: ER 亚型的表达状态可影响 MCF-7 细胞的生长, 并通过调节 IFN- $\gamma$  的自分泌水平诱导微环境发生 Th 偏移。

[关键词] 雌激素受体; RNA 干扰; Th 平衡; 乳腺癌; ER $\alpha$ ; ER $\beta$

[中图分类号] R737.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0490-06

## Effects of estrogen receptor subtype on growth of breast cancer MCF-7 cells and Th balance in microenvironment

NIU Xiu-long<sup>1</sup>, YE Lu<sup>1</sup>, MAO Li-qun<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>1,2</sup> (1. Department of Immunology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2. Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective:** To study estrogen receptor (ER) subtype on the growth of breast cancer cell line MCF-7 and the secretion of Th1 and Th2 cytokines in MCF-7 tumor microenvironment. **Methods:** ER $\alpha$  or ER $\beta$  expression in MCF-7 cells was silenced by RNA interference and MCF-7 cells with different ER $\alpha$ /ER $\beta$  expression status were obtained. MTT test, flow cytometry and RT-PCR assay were used to detect proliferation, cell cycle and expression of apoptosis suppressor genes. Secretion of IFN- $\gamma$  and IL-4 in cell supernatant were analyzed by ELISA assay. **Results:** After RNA interference, protein levels of ER $\alpha$  or ER $\beta$  in MCF-7 cells decreased by (77.7  $\pm$  3.3)% or (68.3  $\pm$  2.1)%, respectively. Compared to control group, after knocking down ER $\alpha$  gene expression, MCF-7 cells grew slower ( $P < 0.05$ ) and were arrested at phase G<sub>0</sub> ~ G<sub>1</sub>, expression of apoptosis suppressor gene XIAP decreased by (43.0  $\pm$  2.0)%. and the level of IFN- $\gamma$  increased by (1.89  $\pm$  0.34) times. However, after knocking down the ER $\beta$  gene expression, MCF-7 grew faster ( $P < 0.05$ ), and the proportion of cells entering S phase increased, the expression of apoptosis suppressor genes Bcl-2, Bcl-xl and XIAP increased by (1.28  $\pm$  0.21) times, (1.61  $\pm$  0.32) times and (1.65  $\pm$  0.29) times, respectively, while the level of IFN- $\gamma$  decreased by (28.0  $\pm$  4.0)%, compared to the control group. **Conclusion:** The expression status of ER

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81041071); 天津市自然科学基金资助项目(No. 08JCYBJC06900); 武警医学院科学技术研究面上项目资助(No. WY200802)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81041071), the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 08JCYBJC06900), and the Science and Technology Research Program of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces (No. WY200802)

[作者简介] 牛秀琰(1976 -), 女, 河北保定人, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫方面的研究。E-mail: nxlwj\_ren@126.com

[通信作者] 王越(WANG Yue, corresponding author), E-mail: wy68wy68@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1620.006.html>

subtype can affect the growth of MCF-7 cells and induce the Th bias in microenvironment by regulating the autocrine level of IFN- $\gamma$ .

[ **Key words** ] estrogen receptor( ER ); RNA interference; Th balance; breast cancer; ER $\alpha$ ; ER $\beta$

[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18( 5 ): 490-495 ]

乳腺癌是危及妇女健康乃至生命的主要恶性肿瘤,发病率仅次于宫颈癌。作为雌激素依赖性肿瘤,雌激素与雌激素受体( estrogen receptor, ER)相互作用并参与乳腺癌的发生、发展<sup>[1]</sup>。ER 有两种亚型,即 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ ,两者介导的雌激素效应完全不同。雌激素与 ER $\alpha$  结合可激活雌激素反应元件的转录活性,与 ER $\beta$  结合则产生抑制作用<sup>[2]</sup>,提示 ER 的表达类型和比例会影响乳腺癌的发展进程。辅助性 T 细胞( T helper cell, Th)1 型( Th1 )介导的细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的主要方式。大量研究<sup>[3,4]</sup>表明,肿瘤患者体内出现 Th1/Th2 比例失衡,呈现 Th1 类细胞因子( 如 IFN- $\gamma$  )弱势表达、Th2 类细胞因子( 如 IL-4 )优势表达状态。影响肿瘤细胞生长环境中 Th 平衡的因素很多,其中肿瘤细胞自身亦可通过分泌细胞因子来调节肿瘤微环境的 Th 平衡。本研究以 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  均稳定表达的人乳腺癌细胞株 MCF-7 为亲本细胞<sup>[5]</sup>,采用 RNA 干扰技术( RNA interference, RNAi )分别沉默 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  基因,构建 ER 亚型不同表达状态的乳腺癌细胞株,探讨 ER 亚型对乳腺癌细胞生长与 Th1/Th2 类细胞因子分泌水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7( ER $\alpha^{\text{high}}$ /ER $\beta^{\text{high}}$  )为本室保存,常规培养于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度孵箱培养,每 2 ~ 3 d 更换培养液并消化传代。

RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品,优质胎牛血清( FBS )购自中美合资兰州民海生物工程有限公司, M-MLV( RNase H )逆转录酶、2  $\times$  Premix Taq 购自大连宝生物( TaKaRa )工程有限公司,100 bp DNA Marker 购自北京天根生化科技有限公司,抗 ER $\alpha$  单克隆抗体、抗 ER $\beta$  单克隆抗体( 兔源性 )购自加拿大 Millipore 公司,抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体( 小鼠源性 )购自美国 Santa Cruz 公司,HRP 标记的羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗购自美国 KPL 公司,脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品。人 IFN- $\gamma$

ELISA 试剂盒、人 IL-4 ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物技术有限责任公司,BCA 蛋白定量试剂盒、化学发光底物检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。小干扰 RNA( siRNA ) pGenesil-ER $\alpha$ -siRNA( 简称 siER $\alpha$  )、pGenesil-ER $\beta$ -siRNA( 简称 siER $\beta$  )和 pGenesil-scramble-siRNA( 简称 HK, 阴性对照 )均以质粒 pGenesil-1 为载体、由武汉晶赛生物科技公司设计合成。

### 1.2 RNA 干扰技术沉默 ER $\alpha$ 或 ER $\beta$ 基因表达

采用脂质体法分别将干扰 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  基因表达的质粒( 即 siER $\alpha$ 、siER $\beta$  )和无效干扰序列 HK 导入 MCF-7 细胞。三种质粒的 RNA 干扰序列如下:siER $\alpha$  正义链为 5'-CTCATCTCTCCCACATCA-3',反义链为 5'-TGATGTGGGAGAGGGATGAG-3';siER $\beta$  正义链为 5'-TCCCTGCTGTGATGAATTA-3',反义链为 5'-TAATTCATCACAGCAGGGC-3';HK 正义链为 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3',反义链为 5'-GCATGCCCTTATGAAGTC-3'。按照脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书进行细胞稳定转染,转染后 48 h 更换选择培养基( 无抗生素、含 200 ml/L FBS 的 RPMI 1640 培养液,经预实验测定 G418 压力筛选浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  ),连续培养 15 d 后,无限稀释法挑选阳性克隆扩大培养。Western blotting 技术检测干扰效果。建立的细胞稳定表达株命名为 M/HK( ER $\alpha^{\text{high}}$ /ER $\beta^{\text{high}}$  ,阴性对照)、M/si $\alpha$ ( ER $\alpha$  基因沉默细胞株,ER 表达状态:ER $\alpha^{\text{low}}$ /ER $\beta^{\text{high}}$  )、M/si $\beta$ ( ER $\beta$  基因沉默细胞株,ER 表达状态:ER $\alpha^{\text{high}}$ /ER $\beta^{\text{low}}$  )。

### 1.3 Western blotting 检测 ER 蛋白的表达

取对数生长期各组细胞  $1 \times 10^6$  个,接种于 60 mm 细胞培养皿,培养 24 h 后常规提取各组细胞的总蛋白。以 BCA 检测定量后,将 40  $\mu\text{g}$  蛋白经 100 g/L SDS-PAGE 分离,电转移至 PVDF 膜。PVDF 膜经 5% 脱脂奶室温封闭 1 h,兔抗人 ER $\alpha$  单克隆抗体( 1:300 稀释)、兔抗人 ER $\beta$  单克隆抗体( 1:300 稀释 )4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。HRP 标记羊抗兔多克隆抗体( 1:3 000 稀释 )室温温育 1 h, TBST 洗涤 3 次,化学发光底物试剂盒检测信号强度。结果应用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件进行分析,以  $\beta$ -actin 作为内参照,以靶蛋白/ $\beta$ -actin 灰度的比值作为蛋白的相对表达丰度。

### 1.4 ELISA 法检测上清 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 的表达水平

取对数生长期细胞接种 24 孔板, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 液调整细胞密度为  $5 \times 10^4$ /ml, 每孔 1 ml。培养 24 h 后换为 5% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48 h, 同时加入  $1 \times 10^{-8}$  mol/L E2、1  $\mu$ g/ml LPS 以刺激 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的分泌。培养结束后, 收集细胞培养上清并离心 (1 500  $\times$  g, 10 min)。按照 ELISA 试剂盒说明检测 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的表达水平。

### 1.5 MTT 法检测细胞的增殖

取对数生长期细胞接种 96 孔板, 接种密度为  $4 \times 10^3$ /孔, 分别培养 24、48、72、96 h。每日结束培养前 4 h 随机取 1 块 96 孔板, 离心弃上清, 加入 MTT 溶液 (0.5 mg/ml, PBS 配制), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱继续培养 4 h, 离心弃上清, 每孔加入 DMSO 100  $\mu$ l, 充分振荡使细胞内的紫蓝色结晶完全溶解, 在酶标仪上测定波长为 490 nm 的光密度值 ( $D_{490}$ )。

### 1.6 半定量 RT-PCR 法检测凋亡抑制基因的表达

取对数生长期细胞  $1 \times 10^6$  个, 按 TRIzol 试剂说明书抽提细胞总 RNA。逆转录反应合成 cDNA, 条件参照 TaKaRa M-MLV 逆转录酶说明书。PCR 反应合成目的基因。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94  $^{\circ}$ C 30 s 变性, 59  $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72  $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。引物序列  $\beta$ -actin 正义链为 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3', 反义链为 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3' (350 bp)。Bcl-2 正义链为 5'-TGCACCTGACGC-CCTTCA-3', 反义链为 5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACA-3' (291 bp), Bcl-xL 正义链为 5'-ATGTCT-CAGAGCAACCGGAGC-3', 反义链为 5'-GCGATC-CGACTCACCAATACCT-3' (500 bp)。XIAP 正义链为 5'-ATGATACCATCTTCCAAAATCC-3', 反义链为 5'-TTTCTGTAATGAAGTCTGACTT-3' (200 bp)。PCR 反应结束后, 取产物 5  $\mu$ l 于 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果应用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件进行分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参照, 以靶基因/ $\beta$ -actin 光密度的比值作为 mRNA 的相对表达丰度。

### 1.7 流式细胞术分析细胞周期分布

收集对数生长期细胞  $1 \times 10^6$  个, 用 PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇固定于 4  $^{\circ}$ C 保存。测量时去除乙醇后, 用 50  $\mu$ g/ml RNase A、0.1% Triton X-100、50  $\mu$ g/ml PI 处理, 过 400 目筛网获得单细胞悬液, 上流式细胞仪检测。结果用 ModFit LT for Mac V3.0 软件进行分析。

### 1.8 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS11.0 统计软件, 多组资料间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 均数间多重比较采用最小显著差法 (least significant difference, LSD)。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 ER $\alpha$ /ER $\beta$ 不同表达状态的乳腺癌 MCF-7 细胞

Western blotting 检测结果 (图 1) 显示, MCF-7 细胞稳定转染 siER $\alpha$  或 siER $\beta$  后, 所筛阳性克隆中 ER $\alpha$  或 ER $\beta$  蛋白表达水平的最高抑制率分别为 (77.7  $\pm$  3.3)% 和 (68.3  $\pm$  2.1)%, 而阴性对照质粒 (HK) 转染细胞株的 ER 表达水平没有变化。说明经 RNA 干扰后成功构建 ER $\alpha$ /ER $\beta$  不同表达状态的乳腺癌细胞株, 命名为 M/HK (ER $\alpha^{high}$ /ER $\beta^{high}$ , 对照组)、M/si $\alpha$  (ER $\alpha^{low}$ /ER $\beta^{high}$ )、M/si $\beta$  (ER $\alpha^{high}$ /ER $\beta^{low}$ ) 细胞。

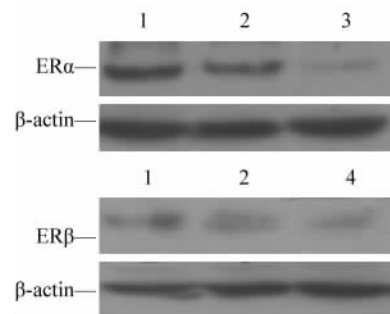


图 1 MCF-7 细胞中 ER 蛋白的表达

Fig.1 ER protein expression in MCF-7 cells

1: MCF-7; 2: M/HK; 3: M/si $\alpha$ ; 4: M/si $\beta$

### 2.2 ER 亚型对细胞上清中 IFN- $\gamma$ 和 IL-4 分泌水平的影响

ELISA 检测结果 (图 2) 显示, 各组 MCF-7 细胞的 IFN- $\gamma$  分泌水平: 对照组 M/HK 为 (0.054  $\pm$  0.002) ng/ml, M/si $\alpha$  为 (0.102  $\pm$  0.008) ng/ml。M/si $\beta$  为 (0.015  $\pm$  0.001) ng/ml。M/si $\alpha$  组的 IFN- $\gamma$  分泌水平增强, 为对照组的 (1.89  $\pm$  0.34) 倍 (P < 0.01); M/si $\beta$  组 IFN- $\gamma$  分泌水平受到抑制, 为对照组的 (28.0  $\pm$  4.0)% (P < 0.01)。各组 IL-4 的分泌水平没有明显变化。结果说明, ER 表达状态可通过影响 Th1 类细胞因子 IFN- $\gamma$  的分泌水平而致局部微环境 Th1/Th2 失衡, 表现为: ER $\alpha$ /ER $\beta$  表达比例降低促进 IFN- $\gamma$  分泌水

平,发生 Th1 偏移;ER $\alpha$ /ER $\beta$  表达比例升高抑制 IFN- $\gamma$  分泌水平,发生 Th2 偏移。

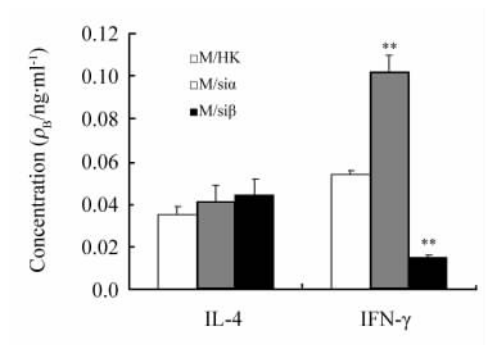


图2 MCF-7 细胞 ER 表达对 IL-4、IFN- $\gamma$  分泌水平的影响

Fig. 2 Effect of ER expression on secretion of IL-4 and IFN- $\gamma$  in MCF-7 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs M/HK group

### 2.3 ER 亚型对 MCF-7 细胞增殖的影响

MTT 结果(图3)显示,与对照组 M/HK 相比,各组细胞 24 和 48 h 的增殖程度无显著差异,72 和 96 h 时间点上 M/si $\alpha$  细胞的增殖速度降低( $P < 0.05$ ),M/si $\beta$  细胞的增殖速度加快( $P < 0.05$ )。

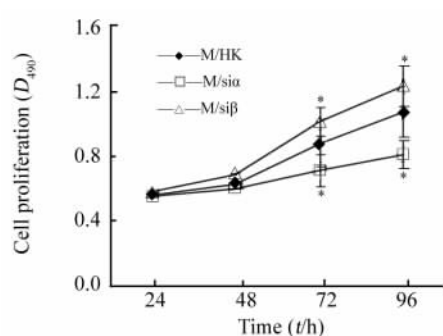


图3 ER 表达对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of ER expression on proliferation of MCF-7 cells

\*  $P < 0.05$  vs M/HK group

### 2.4 ER 亚型对 MCF-7 细胞周期的影响

流式细胞术分析细胞周期发现(表1),与阴性对照组相比,M/si $\alpha$  组  $G_0 \sim G_1$  期细胞比例增多( $P < 0.05$ ),S 期比例显著减少( $P < 0.01$ ),提示细胞在  $G_0 \sim G_1$  期受到阻滞,抑制了细胞的增殖速度;M/si $\beta$  组  $G_0 \sim G_1$  期比例降低,S 期比例升高( $P < 0.01$ ),提示细胞 S 期 DNA 合成增加,使细胞过度增殖。

### 2.5 ER 亚型对 MCF-7 细胞凋亡抑制基因表达的影响

RT-PCR 结果(图4)显示,M/si $\alpha$  组的凋亡抑制

基因 XIAP 的表达水平降低,为阴性对照组 M/HK 的(43.0  $\pm$  2.0)%( $P < 0.01$ );M/si $\beta$  组的凋亡抑制基因 Bcl-2、Bcl-xl、XIAP 的表达水平均升高,分别为对照组 M/HK 的(1.28  $\pm$  0.21)、(1.61  $\pm$  0.32)倍和(1.65  $\pm$  0.29)倍( $P < 0.01$ )。结果提示,ER 表达状态可影响 MCF-7 细胞凋亡,表现为 ER $\alpha$ /ER $\beta$  表达比例降低,可抑制凋亡抑制基因的表达,促进 MCF-7 细胞凋亡;ER $\alpha$ /ER $\beta$  表达比例升高,可促进凋亡抑制基因的表达,抑制 MCF-7 细胞凋亡。

表1 ER 表达状态对 MCF-7 细胞周期分布的影响(%)

Tab.1 Effect of ER expression status on cell cycle of MCF-7 cells

Group	$G_0 \sim G_1$	S	$G_2 \sim M$
M/HK	52.75 $\pm$ 3.43	31.04 $\pm$ 1.39	16.21 $\pm$ 2.64
M/si $\alpha$	65.25 $\pm$ 2.08*	15.90 $\pm$ 1.52**	18.86 $\pm$ 1.20
M/si $\beta$	40.56 $\pm$ 6.67**	43.16 $\pm$ 4.67**	16.28 $\pm$ 2.00

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs M/HK group

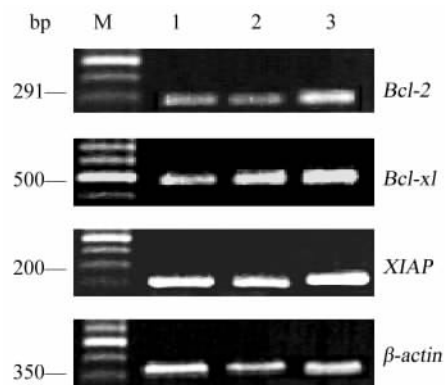


图4 RT-PCR 技术检测 MCF-7 细胞凋亡抑制基因的表达

Fig. 4 Expression of apoptosis suppression genes in MCF-7 cells as detected by RT-PCR

M: Marker; 1: M/HK; 2: M/si $\alpha$ ; 3: M/si $\beta$

## 3 讨论

ER 有两种亚型,一种为传统的 ER $\alpha$ ,另一种为新近研究发现的 ER $\beta$ 。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  分别定位于染色体 6q25.1 和 14q22 ~ 24,两者均由 8 个外显子组成,按功能结构划分为 A ~ F 6 个功能区,其中 DNA 结合区 95% 同源,配体结合区 55% 同源,其他各区相似度较低<sup>[6-7]</sup>。两者的结构差异性决定了其功能的差异。在肿瘤的发展进程中,两者究竟扮演何种

角色,目前尚无定论。研究<sup>[8-10]</sup>表明,ER $\beta$ 对正常乳腺组织具有保护作用,可对抗ER $\alpha$ 的促肿瘤生长作用,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,其表达缺失可能对乳腺癌的发生、发展具有极其重要的意义。然而有研究<sup>[11-13]</sup>发现,ER $\beta$ 过度表达对乳腺癌细胞增殖具有促进作用。因此,ER亚型的表达状态对肿瘤细胞生物学特性的影响值得进一步探讨。

基于上述考虑,本研究选择了两种ER亚型均稳定表达的人乳腺癌细胞株MCF-7,将针对ER $\alpha$ 或ER $\beta$ 的siRNA经质粒转染导入细胞,经G418压力筛选、Western blotting技术证实成功干扰MCF-7细胞内ER $\alpha$ 或ER $\beta$ 蛋白的表达,以此构建ER不同表达状态的乳腺癌细胞株。经进一步实验研究发现,稳定干扰ER $\alpha$ 表达(即M/si $\alpha$ 细胞),降低细胞内ER $\alpha$ /ER $\beta$ 表达比例,可使细胞受阻于G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub>期,抑制细胞增殖,同时下调凋亡抑制基因XIAP表达,促进细胞凋亡;反之,稳定干扰ER $\beta$ 表达(即M/si $\beta$ 细胞),提高细胞内ER $\alpha$ /ER $\beta$ 表达比例,可使S期DNA合成增加,促进细胞增殖,同时上调凋亡抑制基因Bcl-2、Bcl-xl、XIAP表达,抑制细胞凋亡。

除ER亚型的表达状态以外,肿瘤微环境中Th1/Th2平衡偏移也可影响肿瘤细胞的生物学特性。Th1类细胞因子(如IFN- $\gamma$ )可诱导Th1细胞分化,抑制Th2细胞分化,介导细胞免疫;Th2类细胞因子(如IL-4)则诱导Th2细胞分化,抑制Th1细胞分化,介导体液免疫。机体抗肿瘤免疫的主要方式是细胞免疫,IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12等Th1类细胞因子可激活NK细胞、CTL细胞、巨噬细胞的杀瘤活性或直接诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15-17]</sup>表明,肿瘤患者体内呈Th1类细胞因子弱勢表达、Th2类细胞因子优势表达状态,即发生Th2偏移,卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌等妇科肿瘤的发生发展也与Th1/Th2失衡具有密切关系。

影响Th1/Th2平衡的因素很多,其中微环境中细胞因子的种类是调节Th细胞分化方向的关键因素。本研究发现,乳腺癌细胞ER亚型表达的变化,可影响细胞自身Th1/Th2类细胞因子的分泌水平。干扰ER $\alpha$ 或ER $\beta$ 蛋白表达对MCF-7细胞Th1类细胞因子IFN- $\gamma$ 的分泌水平具有相反的调节作用,表现为M/si $\alpha$ 细胞的IFN- $\gamma$ 分泌水平得到增强,M/si $\beta$ 细胞则受到抑制,而Th2类细胞因子IL-4的分泌水平不受影响。本研究与其他研究<sup>[14,18]</sup>表明,除众多免疫细胞以外,肿瘤细胞本身亦可分泌细胞因子,调节肿瘤微环境的Th平衡。而ER表达状态不同的乳腺癌细胞,其IFN- $\gamma$ 分泌水平的变化影响了Th平

衡,其中ER $\alpha$ /ER $\beta$ 表达比例降低,可促进IFN- $\gamma$ 分泌,使Th平衡向Th1偏移;ER $\alpha$ /ER $\beta$ 表达比例升高,则抑制IFN- $\gamma$ 分泌,使Th平衡向Th2偏移。

由此可见,促进乳腺癌细胞ER $\beta$ 表达,抑制ER $\alpha$ 表达,可直接抑制乳腺癌细胞的生长,并提高IFN- $\gamma$ 的自分泌水平,在一定程度上诱导局部环境发生Th1偏移,增强细胞免疫,间接抑制肿瘤细胞的生存。因此,调节乳腺癌细胞的ER表达状态,并联合应用细胞因子免疫疗法,不失为治疗乳腺癌的一个有效手段<sup>[19-20]</sup>。此外,研究<sup>[21]</sup>表明,ERK/MAPK信号转导途径在乳腺癌的发生、发展中具有重要作用,持续激活ERK通路可促进乳腺癌肿瘤细胞的形成,而抑制该通路可抑制乳腺癌的生长。因此,ERK通路上的关键信号分子已成为研究乳腺癌发生及防治的重要靶点,而乳腺癌的ER亚型及微环境中Th1/Th2类细胞因子对该通路的调节作用也是本课题组下一步研究的重点。

## [参考文献]

- [1] Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, et al. Genomic actions of estrogen receptor alpha: What are the targets and how are they regulated [J]? *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16(4): 1073-1089.
- [2] Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, et al. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(2): 193-202.
- [3] Vella V, Mineo R, Frasca F, et al. Interleukin-4 stimulates papillary thyroid cancer cell survival: Implications in patients with thyroid cancer and concomitant Graves' disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2880-2889.
- [4] Pedicini M, Barrenäs F, Clancy T, et al. Combining network modeling and gene expression microarray analysis to explore the dynamics of Th1 and Th2 cell regulation [J]. *PLoS Comput Biol*, 2010, 6(12): e1001032.
- [5] Meacham WD, Antoon JW, Burow ME, et al. Sphingolipids as determinants of apoptosis and chemoresistance in the MCF-7 cell model system [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(11): 1253-1263.
- [6] Drummond AE, Fuller PJ. The importance of ER beta signalling in the ovary [J]. *J Endocrinol*, 2010, 205(1): 15-23.
- [7] Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen signaling via estrogen receptor (beta) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(51): 39575-39579.
- [8] Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptors alpha (ER alpha) and beta (ER beta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(44): 6605-6616.
- [9] Chen L, Qiu J, Yang C, et al. Identification of a novel estrogen receptor beta 1 binding partner, inhibitor of differentiation-1, and role of ER beta 1 in human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 278(2): 210-219.

- [ 10 ] Grober OM, Mutarelli M, Giurato G, et al. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation [ J ]. *BMC Genomics*, 2011, 14( 12 ): 36-52.
- [ 11 ] Tonetti DA, Rubenstein R, DeLeon M, et al. Stable transfection of an estrogen receptor beta cDNA isoform into MDA-MB-231 breast cancer cells [ J ]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 87( 1 ): 47-55.
- [ 12 ] Hou YF, Yuan ST, Li HC, et al. ER beta exerts multiple stimulative effects on human breast carcinoma cells [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 34 ): 5799-5806.
- [ 13 ] 侯意枫,袁胜涛,李鹤成,等. 雌激素受体  $\beta$  亚型对人乳腺癌细胞株生物学特性的影响[ J ]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27( 7 ): 389-392.
- [ 14 ] Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content [ J ]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9( 1 ): R15.
- [ 15 ] Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A A, et al. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer [ J ]. *BMC Cancer*, 2007, 14( 7 ): 158-169.
- [ 16 ] Berry KK, Varney ML, Dave BJ, et al. Expression of interleukin-8 in human metastatic endometrial carcinoma cells and its regulation by inflammatory cytokines [ J ]. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, 11( 1 ): 54-60.
- [ 17 ] Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al. A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: Possible autocrine growth stimulation by G-CSF and IL-6 [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2000, 78( 3 pt 1 ): 383-387.
- [ 18 ] Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, et al. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 3 ): 1491-1499.
- [ 19 ] 高德宗,孙靖中,高华,等.  $\gamma$ -干扰素增强他莫昔芬抗乳腺癌作用的体外研究[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13( 1 ): 45-49.
- [ 20 ] 孙桂明,李新焕,王宝中,等. 维甲酸联合他莫昔芬对人乳腺癌细胞株作用的研究[ J ]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17( 18 ): 1425-1428.
- [ 21 ] 张丰,李楠. ERK/MAPK 信号传导途径在乳腺肿瘤治疗中的意义[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 14( 5 ): 497-500.
- [ 收稿日期 ] 2011 - 07 - 13 [ 修回日期 ] 2011 - 09 - 24  
[ 本文编辑 ] 韩丹

## · 科技动态 ·

### 核苷酸缺乏在癌症早期促进基因组的不稳定性

DNA 损伤是癌细胞的标志之一,癌细胞对正常细胞的破坏由 DNA 复制的压力引起,但其分子机制还不清楚,论文作者试图从遗传学的角度分析和解释其相关的分子机制。

该研究通过逆转录病毒载体转染 HPV-16 E6/E7 病毒癌基因及细胞癌基因 Cyclin E,观察其对细胞分裂和增殖的影响。采用实时定量 PCR 的方法、DNA 分子结合技术分析细胞在增殖过程中复制叉的复制速度、相邻两个复制子之间的距离以及染色体杂合性缺失情况,以利用高效液相色谱法分析核苷酸库的变化情况,采用基因芯片分析转染癌基因后细胞全转录组中 RNA 分子的变化情况。

研究发现,转染 HPV-16 E6/E7 或 Cyclin E 癌基因会异常激活 Rb-E2F 通路,导致 DNA 复制叉的复制速率显著下降,出现更多复制缓慢的复制叉,并且相邻复制叉之间的距离也显著缩短,打破了复制子复制的平衡。该研究还发现,转染 HPV-16 E6/E7 或 Cyclin E 会导致染色体脆性位点上发生杂合性缺失,使染色体不稳定。随后,研究人员采用高效液相色谱法发现,转染 HPV-16 E6/E7 病毒癌基因后会导致核苷酸库水平的降低,影响正常 DNA 的复制,即 DNA 复制速率降低、相邻两个复制叉距离缩短、染色体 DNA 双链断裂程度增加,并能增加细胞的致癌潜能;而这种影响可被外源性核苷酸逆转。外源性核苷酸可能重新激活正常的 DNA 合成,缓解细胞损伤及可能的癌变。进一步研究发现,e-Myc 可增强核苷酸合成,增加核苷酸库的水平,修复复制诱导的 DNA 损伤。

总之,在癌症发展的早期阶段,细胞的异常增殖可导致正常 DNA 复制的核苷酸缺乏;通过补充外源性核苷酸,有可能减少 DNA 损伤,显著降低细胞癌变的可能;e-Myc 可增加细胞核苷酸数量,促进修复 DNA 损伤。利用这一研究成果,有望研发出新的方法防止细胞癌前病变,甚至有可能研发出减少 DNA 断裂的新策略。

[ 黄晓辉 摘译,万涛 审阅. Bester AC, Roniger M, Oren YS, et al. *Cell*, 2011, 145( 3 ): 435-446. ]