[文章编号] 1000 - 4718(2007)01 - 0193 - 02

雌二醇促人乳腺细胞株增殖及其 ERβ 表达

刘丽军[1], 杜惠兰[1△], 修贺明[2], 徐 铮[2], 靳亚慈[1], 刘京芳[1]
([1]河北医科大学中西医结合学院, 河北 石家庄 050091; [2]河北省石家庄市白求恩国际和平医院,河北 石家庄 050082)

[摘 要] **目的**:观察不同浓度雌二醇(E_2)对 HBL - 100 细胞的增殖作用及 ERβ 的表达。**方法**:用 MTT 法观察不同浓度 E_2 处理后细胞增殖情况,流式细胞仪分析细胞周期,免疫组化法检测 ERβ 表达。**结果**:E_2(0.01 - 1 μmol/L)可增强 HBL - 100 的增殖活性,G_1、G_2/M 期细胞增多,S 期细胞减少;ERβ 表达从胞质转至胞核。**结论**:E_2 具有促进人乳腺细胞增殖的作用,可能与 ERβ 重新分布有关。

[关键词] 雌二醇; 乳房; HBL - 100 细胞; 受体,雌二醇
[KEY WORDS] Estradiol; Breast; HBL - 100 cells; Receptors, estradiol
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

乳腺增生病是女性常见病,近年来发病呈上升趋势,在我国 30 岁以上妇女发病率占 30% - 50%,最常见于 30 - 50 岁的妇女,有一定的致癌倾向。一些研究提示乳腺增生病人血清 E_2 增高、孕酮降低,乳腺组织在 E_2 长期刺激下,使乳腺组织不能由增生转入复旧或复旧不全而增生[1,2]。E_2 是通过何种途径影响乳腺细胞增殖,目前尚不清楚。本实验通过观察 E_2 对人乳腺细胞株的增殖作用及 ERβ 的表达情况,探讨 E_2 促进其增殖的机制,为进一步阐明 E_2 在乳腺增生病的发病机制提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 材料

人乳腺细胞株 HBL - 100 购于中国科学院细胞库。17β - E_2 由上海华联制药厂生产,四甲基偶氮唑蓝(MTT)、胰蛋白酶购自 Sigma 公司,DMEM 购自 Gibco - BRL 公司。抗体 ERβ 购自 NeoMarkers 公司,PV - 6001 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 *细胞培养* HBL - 100 细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基(正常培养液)中,在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,每 2 d 换液 1 次,3 - 4 d 传代 1 次。

2.2 *细胞增殖实验(MTT 法)* 以每孔 4×10^3 个细胞加入 96 孔培养板中,细胞贴壁后 37 ℃、4% 牛血清 DMEM 培养基培养 12 h,以促进细胞同步化生长;换培养液,实验组加入不同浓度 17β - E_2 培养液 200 μL,使其终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1 和 10 μmol/L,每个浓度设 8 个平行孔,对照组加入正常培养液。继续培养 72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL,轻震荡培养板,放回培养箱内再孵育 4 h 后,弃上清液,每孔加入甲瓒溶解液(20% SDS、50% 二甲基酰胺,pH4.6)200 μL,用酶标仪测波长为 570 nm 时的吸光度值(A 值)。

2.3 E_2 *干预实验*

① 实验分组 等量 HBL - 100 细胞接种于两 25 cm^2 培养瓶,实验组用含 0.01 μmol/L E_2 正常培养液培养。对照组用不含 E_2 的正常培养液培养。

② 细胞周期测定 收集以上两组细胞。消化下来的细胞用 2.5 mL 的 PBS 离心清洗 3 次,将细胞混匀,再加入 2 mL 的 70% 乙醇立即震荡混匀,封口膜封口,4 ℃ 冰箱保存备用。送检时,用 PBS 洗涤 2 次,去除 70% 乙醇,加 100 μL PBS 将细胞吹散,调整细胞数为 6×10^8/L,碘化丙啶染色,用流式细胞仪测定 DNA 含量的变化,分析 E_2 干预后细胞周期的变化。每组用 3 份样本实验,结果以百分比均值计算。

③ ERβ 免疫组化染色 上两组细胞消化后清洗,离心涂片,甲醛溶液固定。柠檬酸缓冲液抗原修复,采用免疫组化 PV 法。操作按说明书进行。结果评价:采用阳性细胞百分比法,记数不同高倍视野 500 个细胞,计算出细胞核内表达阳性细胞百分比。细胞核内表达为蓝色的为阴性细胞,出现深棕色颗粒为阳性细胞。

结 果

1 E_2 对 HBL - 100 细胞增殖的影响

E_2 于体外可显著刺激人乳腺细胞增殖,见图 1。

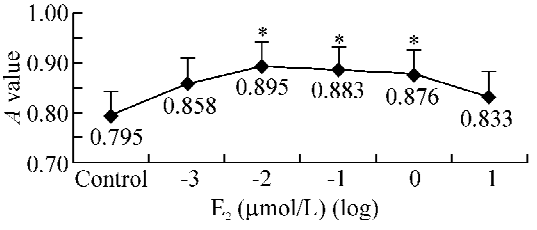

Fig 1 Effects of different concentrations of E_2 on HBL - 100 cells. $\bar{x}\pm s$. $n=8$. * $P<0.01$ *vs* control.

图 1 不同浓度 17β - E_2 对人乳腺细胞株 HBL - 100 增殖的影响

2 E_2 对 HBL - 100 细胞细胞周期的影响

E_2 作用后 G_1、G_2/M 期细胞比例增多,S 期细胞比例减少,显示有促进乳腺细胞由 S 期转入 G_2/M 期的作用,见表 1、图 2A、2B。

[收稿日期]2006 - 03 - 28 [修回日期]2006 - 05 - 23
△通讯作者
Tel: 0311 - 88380966; E - mail: duhuilan@163.com

表 1　E_2 对 HBL－100 细胞周期的影响

Tab 1　Effects of E_2 on the cell cycle of HBL－100 cells(%. $\bar{x} \pm s$. $n=3$)

	G_1	S	G_2/M
Control	44.40 ± 1.12	38.60 ± 0.68	17.03 ± 0.31
Treatment	47.80 ± 1.27*	32.90 ± 0.83*	19.30 ± 0.64*

* $P<0.01$ *vs* control.

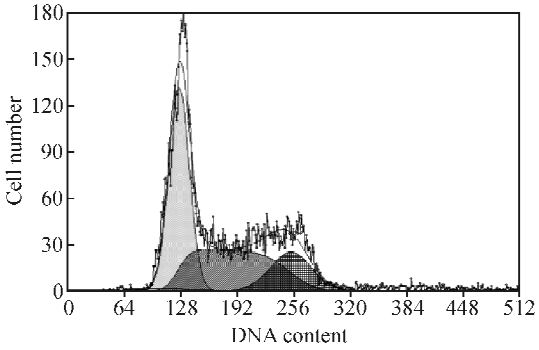

Fig 2A　Control group.

图 2A　对照组

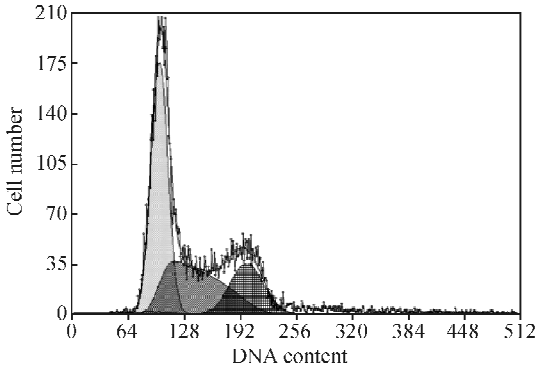

Fig 2B　Treatment group.

图 2B　实验组

3　E_2 对 HBL－100 细胞 ERβ 表达的影响

结果见图 3A、3B。对照组 HBL－100 细胞 ERβ 阳性表达主要定位于胞质内，胞核内表达较弱，占(6.00 ± 1.20)%；实验组 HBL－100 细胞 ERβ 阳性表达主要定位于细胞核内占(91.00 ± 1.34)%，呈深棕色颗粒，胞质内表达较弱。

讨　论

乳腺增生病发病原因尚不清楚，一般认为与卵巢功能失

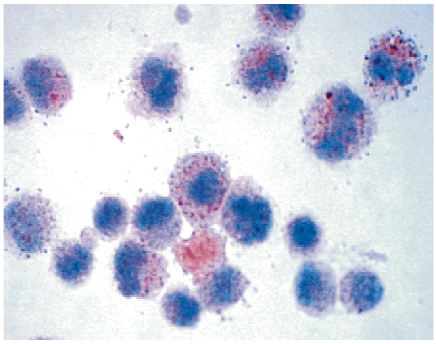

Fig 3A　Control PV staining(×400).

图 3A　对照组 PV 染色

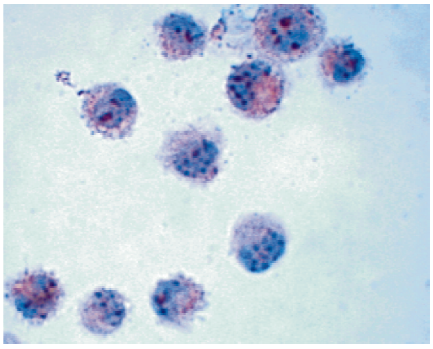

Fig 3B　Treatment PV staining(×400).

图 3B　实验组 PV 染色

调有关，雌激素相对增多，孕激素分泌减少的观点已为广大学者所公认。本实验采用 MTT 法结合流式细胞仪测定细胞周期研究 E_2 对 HBL－100 细胞增殖的影响，结果显示 E_2 可刺激 HBL－100 细胞增殖，浓度为 0.01 μmol/L 时作用最强。E_2 刺激细胞后，S 期细胞比例减少，G_1、G_2/M 期细胞比例增多，显示有促进乳腺细胞由 S 期转入 G_2/M 期，继而转入 G_1 期的作用，即有促进乳腺细胞增殖作用。

ER 目前至少发现有 ERα 和 ERβ 两种亚型，ERα 即以前经典的 ER，它们的配体结合区和 DNA 结合区几乎完全相同，但 N 端和 C 端的转录活化区别较大，提示两者与配体结合后介导的转录活性存在差异[3]。邓文慧等[4]观察了苯甲酸雌二醇对植入裸鼠体内的人正常乳腺组织的影响，发现苯甲酸雌二醇可引起乳腺上皮细胞增殖，下调 ER(即 ERα)的表达，但乳腺细胞仍能增殖，不能解释 ER 下调的现象，我们认为可能与 ERβ 存在调节功能有关。国外学者[5,6]发现，ER 具有“穿梭”功能，可以在胞质和胞核内移动。本实验免疫组织化学结果显示：HBL－100 细胞上存在 ERβ 受体。E_2 刺激细胞后，可引起 ERβ 在胞质至胞核的重新分布，E_2 刺激 HBL－100 细胞增殖，可能与 ERβ 这种变化有关。E_2 的作用机制非常复杂，这种作用受哪些胞质和胞核内因素的调节或者通过与细胞表面其它受体介导的信号转导途径相互作用，还需进一步研究。

[参　考　文　献]

[1]　王　苹，陈怡君，吴丽雅，等. 性激素水平与 ER、PR 的表达在乳腺增生病辨证分型中的意义[J]. 福建医科大学学报，2005，39(3)：291－293.

[2]　陈承祺. 乳腺癌和乳腺增生病内分泌激素变化的探讨[J]. 中华中西医杂志，2001，2(15)：1326－1363.

[3]　Paech K，Webb P，Kuiper GG，et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERα and ERβ at AP_1 sites[J]. Science，1997，277(5331)：1508－1510.

[4]　邓文慧，陆　旭，吴宜勇，等. 苯甲酸雌二醇对植入裸鼠体内的人正常乳腺组织的影响[J]. 中国医学科学院学报，2003，25(1)：70－73.

[5]　Dauvois S，White R，Parker MG，et al. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling[J]. J Cell Sci，1993，106(pt4)：1377－1388.

[6]　Maruvada P，Baumann CT，Hager GL，et al. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors[J]. Biol Chem，2003，278(14)：12425－12432.