

· 实验研究 ·

## ER $\beta$ 1 对乳腺癌 MCF-7 细胞 Efp 基因表达的抑制作用

陈莉 姜军 杨新华 范林军 张毅 陈显春

**【摘要】** 目的 了解雌激素受体  $\beta$ 1 (ER $\beta$ 1) 对雌激素敏感性指状蛋白(Efp)基因的调节作用,为进一步探讨 ER $\beta$  对 Efp 基因的调控机制奠定基础。方法 应用脂质体法将 ER $\beta$ 1 真核表达质粒转染至乳腺癌 MCF-7 细胞中,再用 Western blot 检测转染细胞中 Efp 蛋白表达的变化。MTT 比色试验观察 ER $\beta$ 1 真核表达质粒转染后 MCF-7 细胞增殖活性的变化。结果 外源性 ER $\beta$ 1 真核表达质粒组 MCF-7 细胞较未转染组 MCF-7 细胞 Efp 蛋白表达明显减弱。ER $\beta$ 1 基因转染后的 MCF-7 细胞的增殖活性降低。结论 ER $\beta$ 1 基因的表达可以抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞中 Efp 基因的表达,并抑制 MCF-7 细胞的增殖能力,可能在乳腺肿瘤发生、发展机制中具有重要的作用。

**【关键词】** 乳腺癌; MCF-7; 雌激素受体  $\beta$ 1; 雌激素敏感性指状蛋白

**【中图法分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Effects of ER $\beta$ 1 transfection on the Efp expression in MCF-7 in breast carcinoma** CHEN Li, JIANG Jun, YANG Xin-hua, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, CHEN Xian-chun. Breast Diseases Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of ER $\beta$ 1 gene on the expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) in breast cancer MCF-7 cell line. **Methods** pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 plasmid was transfected into MCF-7 cell line by lipofectin reagent. The expression of Efp was determined by Western Blot. The influence of

---

作者单位: 重庆 400038, 第三军医大学西南医院乳腺中心

通讯作者: 姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

exogenous ER $\beta$ 1 gene on proliferation of MCF-7 cell was detected by MTT test. **Results** The expression level of Efp was obviously lower in transfected MCF-7 cell than that in the control. Exogenous ER $\beta$ 1 could inhibit proliferation of MCF-7 cell. **Conclusions** ER $\beta$ 1 gene may inhibit the expression of Efp gene and proliferation of MCF-7 cell. It plays an important part in the carcinogenesis of breast cancer.

**【Key words】** Breast neoplasms; MCF-7; Estrogen receptor  $\beta$ 1; Estrogen-responsive finger protein

近 20 年来,乳腺癌的发病率呈明显上升趋势<sup>[1]</sup>,全球每年发病患者超过 100 万,严重危害了妇女的身体健康。雌激素受体  $\beta$ 1 (Estrogen Receptor  $\beta$ 1, ER $\beta$ 1) 是 1996 年在大鼠前列腺和卵巢 cDNA 文库中成功克隆出的一种新的雌激素受体,属甾体激素受体超家族的成员,为配体依赖的反式转录调节蛋白。目前的研究表明,乳腺癌组织中 ER $\beta$ 1 表达下降,与乳腺癌的发生有关<sup>[2]</sup>。雌激素敏感性指状蛋白(Estrogen responsive finger protein, Efp) 基因是雌激素-ER $\alpha$  促增殖信号调控的重要反应基因之一。既往研究发现 ER $\alpha$  能和 Efp 基因启动子上雌激素反应元件(estrogen response element, ERE) 结合,上调 Efp 蛋白的表达,促进周期依赖蛋白激酶(CDK) 和周期素 B(CycB) 释放激活,促进了肿瘤细胞的增殖<sup>[3]</sup>。近年来,乳腺癌中 ER $\beta$ 1 和 Efp 基因的关系越来越受关注,但乳腺癌中 ER $\beta$ 1 能否影响 Efp 基因的表达目前尚未清楚。本研究将外源性 ER $\beta$ 1 基因转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,观察 ER $\beta$ 1 基因对 Efp 的表达及其对细胞增殖的影响,以期研究 ER $\beta$ 1 抑制细胞增殖的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品;新生牛血清购自中美合资兰州民海生物制品有限公司;抗 ER $\beta$ 1 和 Efp 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。乳腺癌 MCF-7 细胞株购自上海细胞生物研究所。pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 真核表达质粒由美国加州大学 Kim S 博士惠赠;脂质体转染试剂 Dotap 为 Roche 公司产品。

### 1.2 细胞培养

乳腺癌 MCF-7 细胞在含 100 ml/L 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中按常规方法培养,在 6 孔培养板培养 1 ~ 2 d,待细胞融合度达到 60% ~ 70% 时进行转染。

### 1.3 pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 质粒瞬时转染细胞

采用脂质体转染法,参照 Roche 公司 Dotap 试剂说明书进行优化。每孔加入

质粒 pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 2.0  $\mu$ g, Dotap 15  $\mu$ l, 设置非转染对照组。

#### 1.4 蛋白免疫印迹

转染后 48 h, 以 RIPA 裂解液(150 mmol/L NaCl, 0.1 g/L NP-40, 0.05 g/L 脱氧胆汁酸盐钠, 0.01 g/L SDS, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 2 mg/L 亮氨酸和 100 mg/L 苯甲基磺酰氟化物)提取细胞总蛋白。采用 BCA 法(美国 Pierce 公司试剂盒)测定总蛋白浓度。总蛋白以每个泳道 30  $\mu$ g 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后, 采用 Bio-Rad 浸渍电转移系统(转移缓冲液: 39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris 碱, 0.37 g/L SDS 及 200 ml/L 甲醇)将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(购自北京鼎国生物制品有限公司)。硝酸纤维素膜依次经过封闭、一抗孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育、洗膜, 最后以增强化学发光法(ECL, Pierce 公司试剂盒)显色条带。蛋白条带采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件进行密度分析。

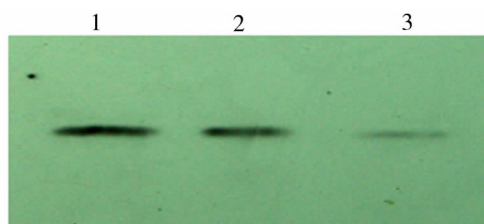
#### 1.5 MTT 活性检测

细胞生长曲线的测定: 采用四唑盐(MTT)比色法, 分别取 MCF-7 细胞株和经 G418 筛选的 ER $\beta$ 1 过表达 MCF-7 细胞(已鉴定, 另文发表), 以每孔  $2.5 \times 10^3$  个细胞行 3 复孔接种入 96 孔细胞培养板, 待细胞生长至第 1~6 天, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 于 37  $^{\circ}$ C 继续培养 4 h, 弃上清液后每孔加二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ l, 轻轻振荡 10 min, 酶标仪(波长 490 nm)测定每孔的吸光度值。吸光度值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 Excel 软件进行 *t* 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 Western blot 检测结果

pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 转染后 MCF-7 细胞中 Efp 蛋白表达发生改变, 表现为 pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 转染组 MCF-7 细胞 Efp 蛋白表达明显减少(图 1)。

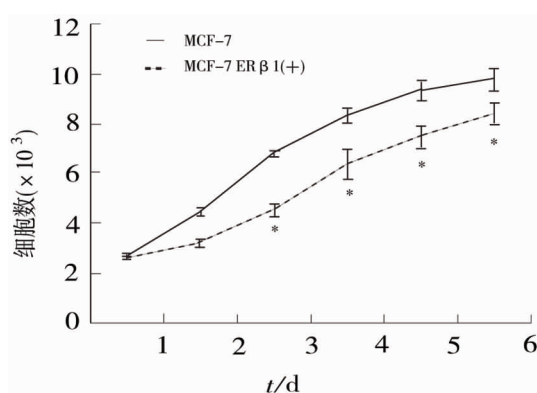


1: MCF-7 细胞; 2: pGenesile 空载体转染 MCF-7;  
3: pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 转染 MCF-7

图 1 Western blot 检测 Efp 蛋白的表达

### 2.2 生长曲线结果

pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 转染后的 MCF-7 细胞较普通 MCF-7 乳腺癌细胞株生长曲线右移, 与对照组比较差异有统计学意义(图 2), 表明 pcDNA3.1-ER $\beta$ 1 转染后 MCF-7 细胞生长受到抑制。



\*  $P < 0.01$ , 与对照组比较

图 1 pcDNA3.1-ERβ1 转染后 MCF-7 细胞生长的效应改变

### 3 讨论

ERβ1 位于第 14 号染色体长臂 22 ~ 24 区段, 基因长度为 24 kb。ERβ1 与 ERα 一样同属甾体激素受体家族成员, 同样能组成二聚体, 能结合 ERE 反应元件, 能调节基因的转录。但是, ERβ1 的分子结构、受体分布与 ERα 不同也预示了二者在功能上存在着差异。ERβ1 在乳腺正常组织、不典型增生及癌组织中的表达存在着显著差别, 表现为 ERβ1 的蛋白表达逐渐下降<sup>[4]</sup>, 并且 ERβ1 表达与乳腺肿瘤大小、组织分化及无病生存期密切相关<sup>[5]</sup>。因此, ERβ1 在乳腺癌中的潜在研究价值越来越受重视。研究 ERβ1 对于揭示乳腺癌肿瘤发病机制具有重要意义<sup>[6]</sup>。

Efp 基因是雌激素受体 α 下游靶基因, 也是雌激素-ERα 促增殖信号调控的重要反应基因之一。Efp 基因启动子活性增高后可通过 ERE 作用于雌激素受体, 从而促进乳腺癌细胞的增殖。在乳腺癌组织中, Efp 基因过表达是预后不良的指标之一。既往的研究认为 Efp 基因异常表达可能参与了乳腺癌的发生<sup>[7]</sup>。

为了解 ERβ1 是否对 MCF-7 细胞 Efp 基因表达有抑制作用, 本研究选用人乳腺癌 MCF-7 细胞株为模型, 将外源性 ERβ1 基因转染人乳腺癌 MCF-7 细胞。Western blot 结果发现转染后 Efp 蛋白表达明显减少。以上结果证明 ERβ1 基因可抑制 Efp 蛋白的表达。同时, 本研究还发现外源性 ERβ1 基因转染人乳腺癌 MCF-7 细胞后, 可抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的 MTT 活性, 可能对 MCF-7 细胞的增殖也有一定的影响。

本研究已经明确在乳腺癌细胞中, ERβ1 基因与 Efp 基因转录调控密切相关, 推测 ERβ1 对 Efp 基因转录活性抑制能力的减弱可能是乳腺癌发生的重要机制之一。这为研究 ERβ1 抑制细胞增殖机制奠定了基础, 将有利于今后对乳腺癌致癌机制、诊断、治疗和预后有更好的了解。

#### 参考文献

[1] Esteve J. Incidence of breast cancer in France and other industrialized countries. Presse Med, 2007, 36:315-321.

- [2] Treeck O, Juhasz Boess I, Lattrich C, *et al.* Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 2007,18;Epub ahead of print.
- [3] Suzuki T, Urano T, Tsukui T, *et al.* Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res*,2005,11;6148 – 6154.
- [4] Skliris G P, Munot K, Bell S M. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyltransferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol*,2003,201;213 – 220.
- [5] Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, *et al.* Clinical value of the wide-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett*,2007,163;207 – 212.
- [6] Sugiura H, Toyama T, Hara Y, *et al.* Expression of estrogen receptor beta wild type and its variant ER betacx/beta2 is correlated with better prognosis in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*,2007, 37;820 – 828.
- [7] Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, *et al.* Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett*,2000, 472;9 – 13.

(收稿日期:2007-10-16)

(本文编辑:周艳)