

文章编号:1000-5404(2012)22-2283-05

论著

## 雌激素激活 GPER-EGFR-ERK 通路促进人乳腺癌 SKBR-3 细胞系增殖

李维东, 罗浩军, 李振华, 余腾华, 杨光伦, 涂刚 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科)

**[摘要]** **目的** 探讨 G 蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)介导雌激素对人乳腺癌细胞系 SKBR-3 增殖的影响。**方法** 激光共聚焦显微镜扫描检测钙离子探针标记的细胞内钙离子浓度随时间的变化, CCK-8 法观测细胞的增殖生长, 流式细胞术检测细胞周期, Western blot 检测磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-extracellular regulate kinase, p-ERK)的相对表达量。**结果** 17-β 雌二醇(E<sub>2</sub>)与 GPER 激动剂(G1)(E<sub>2</sub>、G1 处理组)刺激 SKBR-3 细胞后, 细胞内钙离子浓度从 120 s 开始迅速升高, 细胞增殖与对照组相比显著增加, CCK-8 测定的(E<sub>2</sub>、G1 处理组)相对细胞数分别是对照组的(2.08 ± 0.07)倍和(2.00 ± 0.04)倍;流式细胞术检测 E<sub>2</sub>、G1 处理组细胞增殖指数(PI)(E<sub>2</sub>、G1 处理组)为(43.12 ± 0.38)%、(42.43 ± 0.52)%, 较对照组(29.19 ± 0.29)% 明显增加(P < 0.05);Western blot 检测结果显示 E<sub>2</sub> 处理组 p-ERK 表达量显著高于对照组(P < 0.05)。GPER 特异性抑制剂 G15、EGFR 拮抗剂 AG1478、ERK 拮抗剂 U0126 均可抑制 E<sub>2</sub>、G1 触发的相应变化, PI3K 拮抗剂 WM 则不能。**结论** 雌激素激活 GPER-EGFR-ERK 通路促进人乳腺癌 SKBR-3 细胞系增殖。

**[关键词]** 雌激素; GPER; SKBR-3; 增殖

**[中图分类号]** R730.23; R737.9; R977.12

**[文献标志码]** A

## Estrogen activates GPER-EGFR-ERK pathway to promote the proliferation of human breast cancer cell line SKBR-3

Li Weidong, Luo Haojun, Li Zhenhua, Yu Tenghua, Yang Guanglun, Tu Gang (Department of Endocrine Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of estrogen on the proliferation of human breast cancer cell line SKBR-3 mediated by G protein-coupled estrogen receptor (GPER). **Methods** Calcium influx, cell growth ability and cell cycle were examined by confocal laser scanning microscopy, CCK-8 assay and flow cytometry in the presence of different concentrations of drugs, respectively. The relative expression level of phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) was detected by Western blotting. **Results** After the cells were treated with 17-β estradiol (E<sub>2</sub>) or GPER specific agonist (G1), intracellular calcium ion concentration shifted quickly from 120 seconds, and cell proliferation increased significantly with the relative cell numbers (2.08 ± 0.07) times and (2.0 ± 0.04) times more than those of the control group. The proliferation index (PI) (43.12 ± 0.38)% and (42.43 ± 0.52)% at S phase and G2-M phase increased significantly as compared to the control group (29.19 ± 0.29)% (P < 0.05). The protein level of p-ERK was higher in the treatment group than in the control group (P < 0.05). GPER antagonist G15, EGFR antagonist AG1478 and ERK antagonist U0126 rather than PI3K antagonist wortmannin could inhibit the changes induced by E<sub>2</sub> or G1. **Conclusion** Estrogen activates GPER-EGFR-ERK pathway to promote the proliferation of human breast cancer cell line SKBR-3.

**[Key words]** estrogen; GPER; SKBR-3; proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30872520, 81072149). Corresponding author: Tu Gang, Tel: 86-23-89011191, E-mail: tugang68@126.com

雌激素通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)在乳腺癌发生、发展中发挥重要作用。雌激素 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)作

为新的雌激素膜受体,通过反式激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)等信号通路产生快速的非基因性雌激素效应,作用方式与 ERβ、ERα 显著不同。研究<sup>[1-3]</sup>表明 GPER 可以调控多种雌激素相关癌细胞的生长,如子宫内膜癌细胞、卵

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30872520, 81072149)

**[通信作者]** 涂刚, 电话: (023)89011191, E-mail: tugang68@126.com

巢癌细胞、甲状腺癌细胞等,且在乳腺癌细胞系和原发性乳腺癌组织中均有广泛表达。本研究利用 GPER 特异性激动剂 G1<sup>[4]</sup> 及 GPER 特异性拮抗剂 G15<sup>[5]</sup> 等小分子化合物探讨 GPER 对 GPER 高表达而 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  不表达的 SKBR-3 细胞系的生长增殖的影响及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SKBR-3 细胞系购自中国科学院上海细胞库、无酚红高糖 DMEM 培养基 (HyClone 公司)、胎牛血清 (HyClone 公司)、GPER 特异性激动剂 G1 及其拮抗剂 G15 (Sigma 公司)、17- $\beta$  雌二醇 (E<sub>2</sub>, Sigma 公司)、CCK-8 试剂盒 (碧云天公司)、Fluo-3AM (钙离子荧光探针, S1056, 碧云天公司)、PI3K 拮抗剂 WM、EGFR 拮抗剂 AG1478、ERK 拮抗剂 U0126 均购自 MILLIPORE 公司、p-ERK 抗体 (BS5016, Bioworld Technology, Inc.)、ERK 抗体 (BS1112, Bioworld Technology, Inc.)、山羊抗兔 IgG 抗体 (Bioworld Technology, Inc.)。二氧化碳培养箱 (Thermo Forma)、多功能酶标仪 (Spectrax M2)、Bio-RAD 凝胶成像仪 (Molecular Imager)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKBR-3 细胞在含 10% 胎牛血清的无酚红高糖 DMEM 培养基、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,细胞长至 80% ~ 90% 时用 0.25% 胰酶消化细胞以 6 × 10<sup>5</sup>/ml 的细胞浓度传代,同时换新的培养基。

1.2.2 激光共聚焦检测细胞内相对 Ca<sup>2+</sup> 浓度 取对数期细胞胰酶消化后接种于共聚焦皿中,24 h 后用含钙离子探针 Fluo-3AM (5  $\mu$ mol/L) 的培养基在 37 °C 孵育 60 min, PBS 洗 2 次后加无血清无酚红 DMEM 培养基 37 °C 孵育 30 min。在 488 nm 的激发波长下用激光共聚焦显微镜连续扫描 (3 s/帧) 细胞内荧光,前 5 帧扫描获得基线值,后加入相应药物,观察药物对细胞内钙离子浓度的影响。G15 → E<sub>2</sub>、G15 → G1 处理组均在扫描前 15 min 加入拮抗剂 G15, G1、E<sub>2</sub>、G15 的浓度<sup>[6-7]</sup> 分别为 1、100、1  $\mu$ mol/L。实验重复 3 次。

1.2.3 CCK-8 法测定不同处理因素对 SKBR-3 细胞系生长增殖的影响 取对数生长期细胞胰酶消化后以每 100  $\mu$ l 含 10% FBS 的无酚红 DMEM 培养基中 3 000 个细胞的浓度种于 96 孔板,每孔种 100  $\mu$ l 上述细胞悬液。待细胞完全贴壁后,中加入相应药物处理,含 GPER 拮抗剂 G15、EGFR 拮抗剂 AG1478、ERK 拮抗剂 U0126、PI3K 拮抗剂 WM 处理组提前 15 min 加入相应拮抗剂。最后每孔中 G1、E<sub>2</sub>、G15、AG1478、U0126、WM 的浓度<sup>[6-8]</sup> 分别为 1、100、1、10、10、10  $\mu$ mol/L,空白调零组不种细胞只加培养基,每组设 5 个复孔。各组将 DMSO 的量调整至一样 (各药物均用 DMSO 稀释)。连续培养 5 d 后,每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h,酶标仪测定各孔光密度值 (测定波长 450 nm)。重复 3 次实验,绘制细胞生长曲线。

1.2.4 细胞周期分析 取对数生长期 SKBR-3 细胞系胰酶消化后以 2 × 10<sup>5</sup>/ml 种于 6 孔板,用含 10% 胎牛血清无酚红 DMEM 培养基培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱,24 h 后移去培养

基, PBS 洗 2 次,各孔加入无血清无酚红 DMEM 培养基 2 ml 饥饿 24 h 使细胞同步于 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期。弃去培养基, PBS 洗 2 次,各孔加入含 10% 胎牛血清无酚红 DMEM 培养基 2 ml,各组加入相应药物 (浓度同 1.2.3),各孔调整 DMSO 量至相同,24 h 后收获细胞,70% 乙醇固定,置于 4 °C 冰箱过夜,PI 染色避光室温孵育 30 min,流式细胞仪检测各组细胞 DNA 含量。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 的表达变化 各组细胞在 100 ml 培养瓶长至 70% ~ 80% 后更换无血清无酚红 DMEM 培养基 3 ml 饥饿 24 h,培养瓶内细胞大约长至 90% 左右后加入相应药物,浓度同上,各组调整 DMSO 量至相同,15 min 后立即终止药物作用,弃去培养基, PBS 洗 2 次后提取总蛋白 (裂解液中按 1:100 加入叠氮钠以抗磷酸化蛋白分解) 并测量浓度,蛋白上样行 SDS-PAGE 电泳检测,经切胶、转膜后 5% BSA 在 37 °C 封闭 1 h, p-ERK、ERK 兔单抗 (1:500) 浸泡,4 °C 孵育过夜, TBST 洗 5 次,每次 8 min,山羊抗兔 (二抗) 浸泡,37 °C 孵育 1 h, TBST 洗 5 次,每次 8 min,与 ECL 发光液结合后胶片显影,凝胶成像仪照相, Image J 软件灰度值测定。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

运用 SPSS 17.0 软件分析实验数据,连续数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用重复测量方差分析和独立样本 *t* 检验比较各组均数。

## 2 结果

### 2.1 E<sub>2</sub> 对 SKBR-3 细胞中 GPER 表达的影响

用 Fluo-3AM 探针标记细胞内钙离子,在激光共聚焦显微镜下观察发现加入 E<sub>2</sub> 后细胞内相对钙离子浓度在 5 min 内 (120 s 开始明显上升) 从 60 迅速升高至 110, G1 处理可得到类似结果,用 G15 预处理的细胞加入 E<sub>2</sub> 及 G1 后细胞内相对钙离子浓度未见明显改变 (图 1A、B)。

Western blot 检测结果显示 E<sub>2</sub>、G1 处理组 p-ERK 的表达量明显高于对照组 (*P* < 0.05), G15 → E<sub>2</sub>、G15 → G1 处理组蛋白表达量明显少于 E<sub>2</sub>、G1 处理组 (*P* < 0.05)。见图 1C、D。

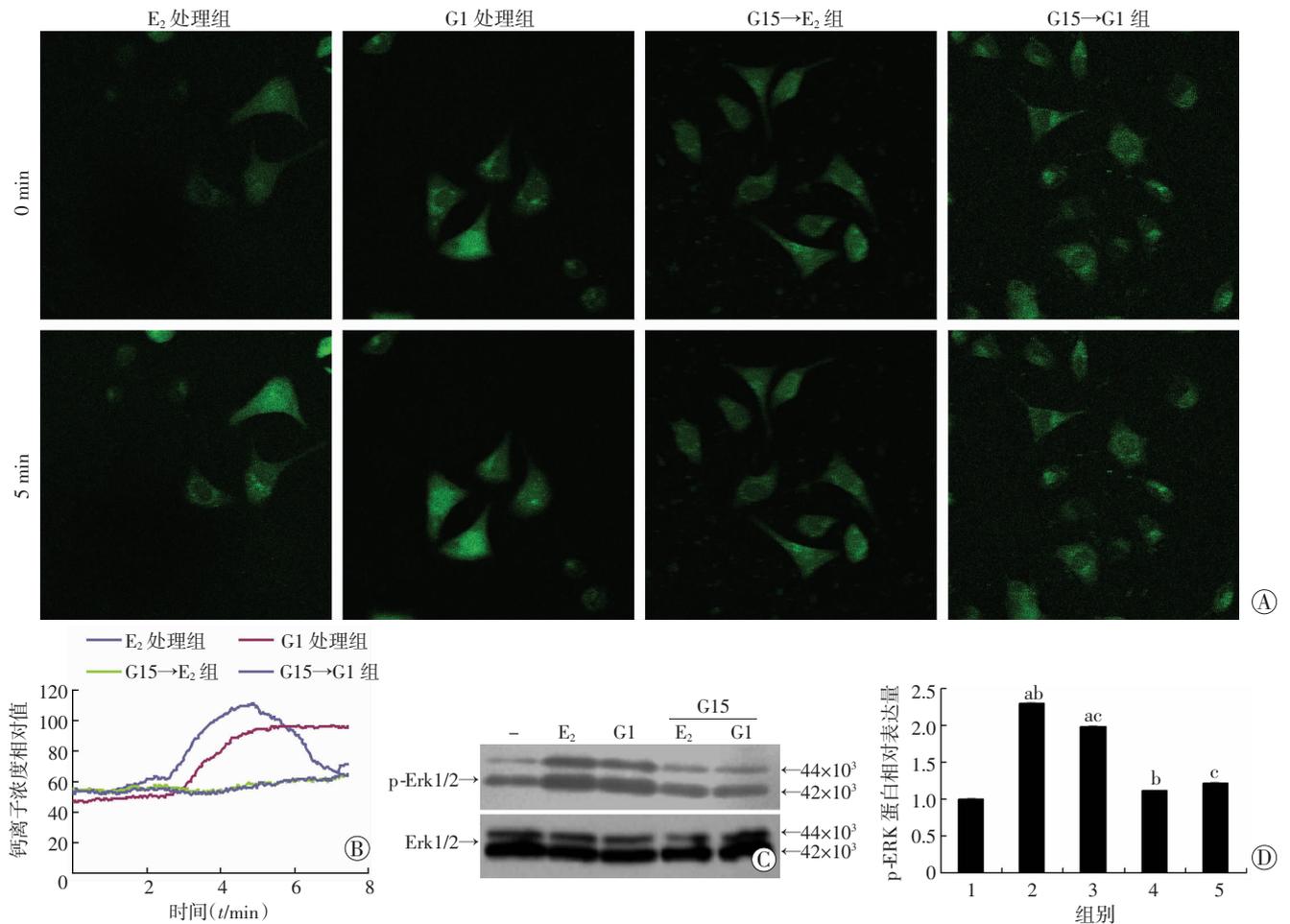
### 2.2 E<sub>2</sub> 通过 GPER 促进 SKBR-3 细胞的增殖

CCK-8 法测定细胞 5 d 生长情况, E<sub>2</sub>、G1 处理组细胞数分别是对照组的 (2.08 ± 0.07) 倍和 (2.0 ± 0.04) 倍 (*P* < 0.05), 分别是 G15 → E<sub>2</sub>、G15 → G1 处理组的 (1.56 ± 0.05) 倍和 (1.63 ± 0.04) 倍 (*P* < 0.05, 图 2A)。

流式细胞仪测定细胞周期, E<sub>2</sub>、G1 处理组的 S 期 + G<sub>2</sub>/M 期即细胞增殖指数 (proliferation index, PI) 比对照组及 G15 → E<sub>2</sub>、G15 → G1 处理组显著增加 (*P* < 0.05, 表 1)。

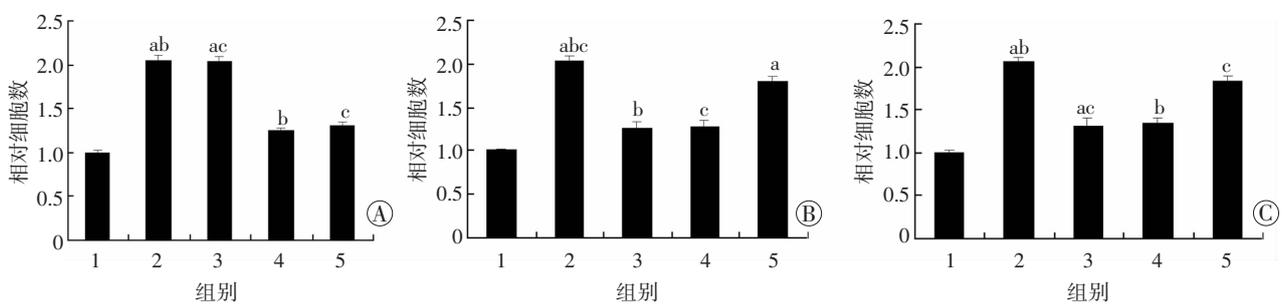
### 2.3 E<sub>2</sub> 通过 GPER-EGFR-ERK 通路促进 SKBR-3 细胞的增殖

实验组细胞生长 5 d 后通过 CCK-8 法测定, E<sub>2</sub>、G1 处理组细胞数分别是对照组的 (2.08 ± 0.07) 倍和 (2.0 ± 0.04) 倍 (*P* < 0.05), 是 AG1478 → E<sub>2</sub>、AG1478 → G1、U0126 → E<sub>2</sub>、U0126 → G1 处理组的 (1.61 ± 0.07) 倍、(1.60 ± 0.08) 倍和 (1.56 ± 0.08) 倍、(1.53 ± 0.06) 倍 (*P* < 0.05), 但 WM → E<sub>2</sub>、WM → G1 处理组并未阻断 E<sub>2</sub>、G1 的促细胞增殖作用细胞数, 分别为对照组的 (1.88 ± 0.08) 倍和 (1.91 ± 0.07) 倍 (*P* < 0.05, 图 2B、C)。



A: 离子探针标记后细胞荧光观察 (×750); B: SKBR-3 细胞内相对钙离子浓度变化; C: Western blot 检测结果; D: 半定量分析结果; 1: 对照组; 2: E<sub>2</sub> 处理组; 3: G1 处理组; 4: G15→E<sub>2</sub> 组; 5: G15→G1 组; a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 G15→E<sub>2</sub> 组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 G15→G1 组比较

图1 E<sub>2</sub>、G1 激活 SKBR-3 细胞中 GPER 的表达



A: E<sub>2</sub> 通过 GPER 促进 SKBR-3 细胞的增殖; 1: 对照组; 2: E<sub>2</sub> 处理组; 3: G1 处理组; 4: G15→E<sub>2</sub> 组; 5: G15→G1 组; a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 G15→E<sub>2</sub> 组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 G15→G1 组比较; B: E<sub>2</sub> 通过 GPER-EGFR-ERK 通路促进 SKBR-3 细胞的增殖; 1: 对照组; 2: E<sub>2</sub> 处理组; 3: AG1478→E<sub>2</sub> 组; 4: U0126→E<sub>2</sub> 组; 5: WM→E<sub>2</sub> 组; a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 AG1478→E<sub>2</sub> 组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 U0126→E<sub>2</sub> 组比较; C: G1 通过 GPER-EGFR-ERK 通路促进 SKBR-3 细胞的增殖; 1: 对照组; 2: G1 处理组; 3: AG1478→G1 组; 4: U0126→G1 组; 5: WM→G1 组; a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 AG1478→G1 组比较; c:  $P < 0.05$ , 与 U0126→G1 组比较

图2 CCK-8 检测 E<sub>2</sub>、G1 对 SKBR-3 细胞系生长的影响

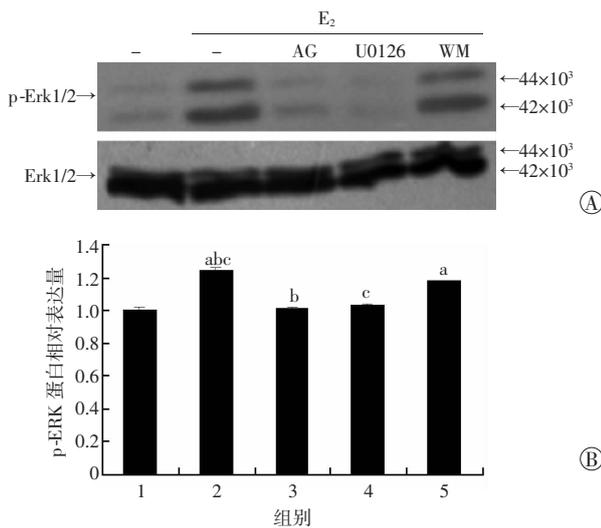
流式细胞仪测定细胞周期, E<sub>2</sub>、G1 处理组的 S 期 + G<sub>2</sub>/M 期即细胞增殖指数比对照组 AG1478→E<sub>2</sub>、AG1478→G1、U0126→E<sub>2</sub>、U0126→G1 处理组显著增加 ( $P < 0.05$ ), PI3K 拮抗剂 WM 预处理后再加 E<sub>2</sub>、G1 的处理组也比对照组显著增加 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

Western blot 检测显示磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 的表达量在 E<sub>2</sub>、G1 处理组明显高于对照组、AG1478→E<sub>2</sub>、AG1478→G1、U0126→E<sub>2</sub>、U0126→G1 处理组 ( $P < 0.05$ ), WM→E<sub>2</sub>、WM→G1 处理组蛋白表达量明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 这与上述 CCK-8 和细胞周期的结果一致。见图 3、4。

**表1 GPER 特异性激动剂 G1 等小分子化合物作用于 SKBR-3 细胞后对其周期的影响** [n=3, %,  $\bar{x} \pm s$ ]

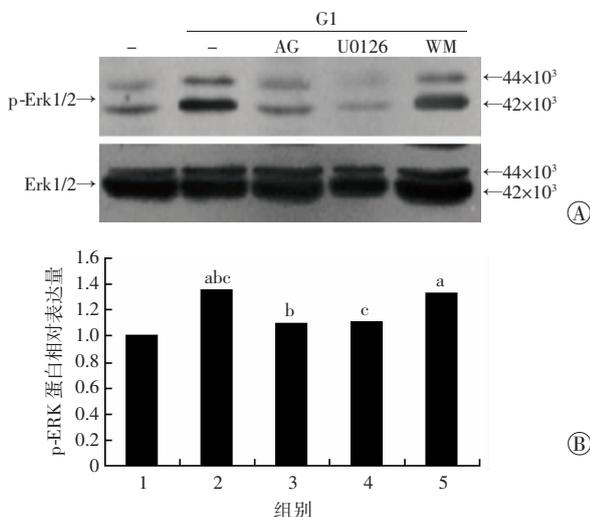
组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	G <sub>2</sub> /M期	S期	增殖指数(PI)
对照组	70.81 ± 0.29	13.59 ± 1.62	15.6 ± 1.36	29.19 ± 0.29
E <sub>2</sub> 处理组	56.88 ± 0.38	20.88 ± 1.86	22.24 ± 1.87	43.12 ± 0.38 <sup>a</sup>
G1处理组	57.56 ± 0.52	15.75 ± 2.18	26.69 ± 1.80	42.43 ± 0.52 <sup>a</sup>
G15→E <sub>2</sub> 组	67.35 ± 0.40	14.77 ± 0.37	17.88 ± 0.26	32.65 ± 0.40 <sup>b</sup>
G15→G1组	65.59 ± 0.76	11.49 ± 1.62	22.92 ± 1.69	34.41 ± 0.76 <sup>c</sup>
AG1478→E <sub>2</sub> 组	68.08 ± 0.42	14.25 ± 0.78	17.67 ± 1.16	31.92 ± 0.42 <sup>b</sup>
AG1478→G1组	70.85 ± 0.25	3.56 ± 2.15	25.60 ± 1.94	29.15 ± 0.25 <sup>c</sup>
U0126→E <sub>2</sub> 组	69.55 ± 0.36	3.45 ± 3.40	27.33 ± 3.52	30.78 ± 0.24 <sup>b</sup>
U0126→G1组	69.93 ± 0.80	9.20 ± 1.64	21.21 ± 1.60	30.41 ± 1.06 <sup>c</sup>
WM→E <sub>2</sub> 组	63.17 ± 0.58	4.49 ± 2.20	32.34 ± 1.88	36.83 ± 0.58 <sup>a</sup>
WM→G1组	60.64 ± 0.39	15.88 ± 2.20	23.48 ± 1.86	39.36 ± 0.39 <sup>a</sup>

a: P < 0.05, 与对照组比较; b: P < 0.05, 与 E<sub>2</sub> 组比较; c: P < 0.05, 与 G1 组比较



A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果; 1: 对照组; 2: E<sub>2</sub> 处理组; 3: AG1478→E<sub>2</sub> 组; 4: U0126→E<sub>2</sub> 组; 5: WM→E<sub>2</sub> 组; a: P < 0.05, 与对照组比较; b: P < 0.05, 与 AG1478→E<sub>2</sub> 组比较; c: P < 0.05, 与 U0126→E<sub>2</sub> 组比较

**图3 E<sub>2</sub> 对 SKBR-3 细胞系的 p-ERK 蛋白表达的影响**



A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果; 1: 对照组; 2: G1 处理组; 3: AG1478→G1 组; 4: U0126→G1 组; 5: WM→G1 组; a: P < 0.05, 与对照组比较; b: P < 0.05, 与 AG1478→G1 组比较; c: P < 0.05, 与 U0126→G1 组比较

**图4 G1 对 SKBR-3 细胞系的 p-ERK 蛋白表达的影响**

### 3 讨论

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤,内分泌治疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分,而只有 ER $\alpha$  阳性乳腺癌患者才能接受内分泌治疗。Filardo 等<sup>[9]</sup>在对 321 例原发性乳腺癌的研究显示 GPER 阳性表达率为 62%,其中 ER $\alpha$  阴性的乳腺癌中有 50% 的表达 GPER。我们在对 423 例乳腺癌的研究中也发现 GPER 阳性表达率为 63.8%,ER $\alpha$  阴性的乳腺癌中有 62.5% 表达 GPER<sup>[10]</sup>。这说明在 ER 阴性的乳癌细胞系中雌激素也可能通过 GPER 促进细胞增殖,在 ER 阴性的乳腺癌中 GPER 可能成为治疗靶点,使得 ER 阴性但 GPER 表达阳性的乳腺癌患者在内分泌治疗中受益。

本研究发现在 GPER<sup>+</sup>ER $\alpha$ <sup>-</sup> 的乳腺癌 SKBr3 细胞中,E<sub>2</sub> 可激活 GPER 使细胞内钙离子浓度迅速上升,E<sub>2</sub> 及 G1 可促进细胞增殖及细胞周期进程,GPER 拮抗剂 G15、EGFR 拮抗剂 AG1478、ERK 拮抗剂 U0126 可抑制 E<sub>2</sub> 与 G1 的增殖效应。

GPER 作为 GPCR 被激活后可促发细胞内第 2 信使的产生。多位学者的研究指出 E<sub>2</sub> 或环境雌激素与 GPER 结合后可使细胞内 cAMP 及 Ca<sup>2+</sup> 浓度迅速上升,这种变化被广泛用于验证特定配体与 GPER 的结合即 GPER 功能的激活<sup>[11-13]</sup>。本研究也发现 SKBR-3 细胞系加入 E<sub>2</sub> 后细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度短时间内从迅速升高,G1 处理后可得到类似结果,用 G15 预处理的细胞加入 E<sub>2</sub> 及 G1 后细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度未见明显改变。Filardo 等<sup>[14]</sup>证实 E<sub>2</sub> 刺激 GPER 表达阳性的乳腺癌细胞引起的 ERK 磷酸化的快速反应正是由 GPER 介导的。Western blot 检测显示磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 的表达量同样看到 E<sub>2</sub>、G1 处理组明显高于空白对照组和 G15 预处理再加 E<sub>2</sub>、G1 的处理组 (P < 0.05)。综上,在本实验中显示 E<sub>2</sub> 可激活乳腺癌 SKBR-3 细胞系中的 GPER。

雌激素对乳腺癌细胞具有促增殖作用,既往认为 ER $\alpha$  介导此种效应,新近研究提示 GPER 也参与其中。Albanito 等<sup>[15]</sup>的研究发现 GPER 激活后可促进 SKBR-3 细胞系的增殖,而 Ariazi 等<sup>[6]</sup>的研究中指出 GPER 对 ER 表达阳性的乳腺癌细胞系是抑制增殖的作用。另外 GPER 在甲状腺癌细胞、卵巢癌细胞、子宫内膜癌细胞中也有促增殖效应<sup>[1-3]</sup>。本研究发现,通过 CCK-8 法测各组细胞的增殖情况,流式细胞术检测细胞在各周期相的 DNA 含量,结果显示 G1 处理组和 E<sub>2</sub> 处理组细胞增长数和细胞增殖指数 PI 值明显大于对

对照组, G<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>的促增殖作用被 GPER 的特异性阻断剂 G15 抑制,这与先前研究结果一致即 GPER 促进的 ER 表达阴性的 SKBR-3 细胞系的增殖。

目前的研究表明, GPER 主要参与了 3 条信号转导途径: EGFR-MAPKs 途径<sup>[9]</sup>、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-AKT 途径<sup>[16]</sup>、cAMP-PKA 途径<sup>[17]</sup>。有研究结果显示 GPER 激活后能使甲状腺癌细胞中 EGFR-MAPKs 途径激活使 ERK1/2 磷酸化为 p-ERK1/2 从而促进甲状腺细胞的增殖;在对子宫内膜癌细胞中 GPER 则是通过激活 EGFR-MAPKs、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-AKT 两个途径从而促进子宫内膜癌细胞的增殖<sup>[1-3]</sup>。Albanito 等<sup>[2]</sup>在对卵巢癌细胞的研究中同样也发现 GPER 能通过 EGFR-MAPKs 途径促进卵巢癌细胞的增殖,但 GPER 的这个作用需要细胞内 ER $\alpha$  的表达。本实验中我们运用了 EGFR 阻断剂 AG1478、ERK 阻断剂 U0126、PI3K 阻断剂 WM 分别预处理细胞后再加 GPER 激动剂 G<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>,通过 CCK-8 法测各组细胞的增殖情况,流式细胞术检测细胞在各周期相的 DNA 含量,结果显示 G<sub>1</sub> 处理组和 E<sub>2</sub> 处理组细胞增长数和细胞增殖指数 PI 值明显大于对照组, G<sub>1</sub>、E<sub>2</sub> 的促增殖作用被 EGFR 阻断剂 AG1478、ERK 阻断剂 U0126 明显抑制,而 PI3K 阻断剂 WM 的抑制作用不明显。ERK1/2 激活后的产物为磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK1/2),我们用 Western blot 法检测 p-ERK1/2 的表达量,发现 G<sub>1</sub>、E<sub>2</sub> 处理组 p-ERK1/2 表达量较对照组显著增加, G<sub>15</sub> → E<sub>2</sub>、G<sub>15</sub> → G<sub>1</sub>、AG1478 → E<sub>2</sub>、AG1478 → G<sub>1</sub>、U0126 → E<sub>2</sub>、U0126 → G<sub>1</sub> 表达量明显少于 E<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 处理组,而 PI3K 阻断剂 WM 对 G<sub>1</sub>、E<sub>2</sub> 处理后 p-ERK1/2 表达量的增加无明显抑制。上述实验结果表明, GPER 激活后促进 SKBR-3 细胞的增殖是通过 EGFR-MAPKs 信号转导途径即 GPER-EGFR-ERK1/2 通路实现的,这与 Filardo 等<sup>[14]</sup>的研究报道一致。我们的实验结果同时也显示磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-AKT 途径对雌激素介导的 GPER 促进 SKBR-3 细胞增殖的作用无明显关系。

综上所述, E<sub>2</sub> 可以介导激活 GPER (+)、ER $\alpha$ 、ER $\beta$  均为阴性的人乳腺癌 SKBR-3 细胞系中的 GPER 从而激活 GPER-EGFR-ERK 通路促进该细胞的增殖,使 GPER 可能成为 ER 阴性而 GPER 表达阳性的乳腺癌患者内分泌治疗的靶点,但这还需要进一步动物体内实验和临床试验的验证和支持。

#### 参考文献:

[1] Lin B C, Suzawa M, Blind R D, *et al.* Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endom-

etrial cell proliferation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5415-5423.

- [2] Albanito L, Madeo A, Lappano R, *et al.* G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1859-1866.
- [3] Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, *et al.* 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30 [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(4): 1414-1423.
- [4] Bologna C G, Revankar C M, Young S M, *et al.* Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30 [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(4): 207-212.
- [5] Dennis M K, Burai R, Ramesh C, *et al.* *In vivo* effects of a GPR30 antagonist [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(6): 421-427.
- [6] Ariazi E A, Brailoiu E, Yerrum S, *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(3): 1184-1194.
- [7] Ruan S Q, Wang S W, Wang Z H, *et al.* Regulation of HRG- $\beta$ 1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression [J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(1): 131-138.
- [8] Albanito L, Madeo A, Lappano R, *et al.* G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1859-1866.
- [9] Filardo E J, Quinn J A, Sabo E. Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor [J]. *Steroids*, 2008, 73(9/10): 870-873.
- [10] Luo H J, Luo P, Yang G L, *et al.* G-protein Coupled Estrogen Receptor 1 Expression in Primary Breast Cancers and Its Correlation with Clinicopathological Variables [J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(3): 185-190.
- [11] Pang Y, Dong J, Thomas P. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(7): 3410-3426.
- [12] Revankar C M, Mitchell H D, Field A S, *et al.* Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30 [J]. *ACS Chem Biol*, 2007, 2(8): 536-544.
- [13] Cheng S B, Graeber C T, Quinn J A, *et al.* Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus [J]. *Steroids*, 2011, 76(9): 892-896.
- [14] Filardo E J, Quinn J A, Bland K I, *et al.* Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(10): 1649-1660.
- [15] Albanito L, Sisci D, Aquila S, *et al.* Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(8): 3799-3808.
- [16] 张燕彩, 郭瑞霞, 葛新, 等. GPER 在雌激素激活的子宫内膜癌细胞内 PI3K/Akt 信号通路中的作用 [J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(4): 292-296.
- [17] Wallacides A, Chesnel A, Ajj H, *et al.* Estrogens promote proliferation of the seminoma-like TCam-2 cell line through a GPER-dependent ER $\alpha$ 36 induction [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 350(1): 61-71.

(收稿:2012-06-27;修回:2012-09-18)

(编辑 汪勤俭)