

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00561

雌激素对 MCF-7 细胞 P2Y₂ mRNA 的抑制作用

Estrogen inhibits expression of P2Y₂ mRNA in human breast cancer cell line MCF-7

李菡君, 马 蓓*

第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨在 MCF-7 细胞株中雌激素是否影响 P2Y₂ mRNA 的表达。**方法** 取生长良好的 MCF-7 细胞, 以不同浓度 17 β -雌二醇(17 β -E₂)、雌激素受体(ER)拮抗剂 ICI 182 780、ER α 拮抗剂 MPP 和 ER β 拮抗剂 PHTPP 作用于细胞, 应用实时定量 RT-PCR 方法测定细胞中 P2Y₂ 受体 mRNA 表达。**结果** 在 MCF-7 细胞中, 雌激素(1 nmol/L~1 μ mol/L)下调 P2Y₂ mRNA 的表达量从对照组的(73.79 \pm 8.91)%减少至对照组的(53.68 \pm 5.90)%, 这种下调作用可以被 ER 拮抗剂 ICI 182 780(1 μ mol/L)拮抗, ER α 的拮抗剂 MPP(50 μ mol/L)可以部分阻断雌激素(0.1 μ mol/L)的作用, 而 ER β 拮抗剂 PHTPP(50 μ mol/L)对雌激素(0.1 μ mol/L)的作用无影响。**结论** 雌激素通过 ER α 抑制 P2Y₂ mRNA 的表达, 这一途径可能参与了雌激素对 MCF-7 细胞的促增殖作用。

[关键词] 乳腺肿瘤; 雌激素; P2Y 受体; 雌激素拮抗剂

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)05-0561-03

雌激素在乳腺癌的形成和发展中起重要作用, 外源性雌激素可以增加乳腺癌的患病风险^[1], 然而临床结果显示, 雌激素替代疗法在增加乳腺癌患病风险中的作用及其预后的关系尚不明确。

雌激素对乳腺癌作用的细胞内信号转导途径可分为基因组途径(genomic actions)和非基因组途径(non-genomic actions)。雌激素可以通过这两个途径影响其他受体从而影响肿瘤细胞的增殖和凋亡^[2]。研究者在利用 MCF-7 细胞进行乳腺癌酒精依赖机制的实验中发现, ER α 与 G 蛋白偶联型受体 A2AAR (A2A adenosine receptor) 具有交互作用(crosstalk)^[2]。A2AAR 是腺苷受体的一种, 酒精对 A2AAR 的激活提高了乳腺癌的患病风险^[2]。此外, 在 HER-2 高表达的 MCF-7 细胞系中, 雌激素可以通过雌激素受体(ER)上调另一种 G 蛋白偶联型受体 CXCR4(chemokine receptor), 从而促进肿瘤的转移^[3]。CXCR4 是一种趋化因子受体, 在组织特异性肿瘤转移中起关键作用^[4]。上述结果均提示, 雌激素可能通过影响 G 蛋白偶联型受体促进肿瘤的发生发展。

P2Y 受体是一类 G 蛋白偶联型 ATP 受体, 研究表明 P2Y 受体在多种癌症中通过诱导内源性 Ca²⁺ 的释放参与癌细胞的增殖调控^[5]。乳腺癌细胞中表达 P2Y₂ 受体^[6]。迄今为止, 雌激素是否可以通过对 P2Y 受体的调节来影响乳腺癌细胞的生长分化以及增殖凋亡, 国内外尚未见报道。

本研究拟通过体外实验探讨雌激素对人乳腺癌细胞系 MCF-7 的 P2Y₂ mRNA 的调节作用以及其中的机制, 为进一步阐明雌激素对恶性肿瘤产生和发展作用的分子机制提供新的线索, 为研制新一代的抗癌药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 MCF-7 细胞株由第二军医大学国际合作肿瘤研究所提供, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中单层贴壁培养。加药前 24 h 改用无激素培养液(含 8% SDT-FBS 的 DMEM/F12 无酚红培养液)培养。

1.2 试剂 DMEM 培养液、DMEM/F12 无酚红培养液(Gibco), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 活性炭(Sigma-Aldrich)处理过的无激素胎牛血清(SDT-FBS), 17 β -雌二醇(17 β -E₂)、ER 拮抗剂 ICI 182 780、ER α 拮抗剂 MPP(Sigma-Aldrich); ER β 拮抗剂 PHTPP(Tocris)。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 实时定量 RT-PCR

1.3.1 细胞总 RNA 提取 细胞种于 12 孔板中(1 \times 10⁵ 个/孔), 24 h 待细胞贴壁后更换无激素培养液培养 24 h, 按 800 μ l/孔加入 17 β -E₂ (1 nmol/L~1 μ mol/L)、ICI 182 780 (1 μ mol/L)、MPP(50 μ mol/L)、PHTPP(50 μ mol/L), 24 h 后将培养液吸干, PBS 清洗 1 次, 每孔加入 600 μ l TRIzol 到孔板中裂解细胞, RNA 提取按说明书操作。所得 RNA 的质量和浓度通过 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计鉴定分析。用于实验的 RNA 样本符合 D₂₆₀/D₂₈₀ 在 1.8~2.2 之间, RNA 电泳 28S 和 18S 两条带比值为 2:1。RNA 样本保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.3.2 RT-PCR 2 μ g RNA 于 25 μ l 体系中[dNTP 1 mmol/L, RNase 抑制剂 16 U, MLV RTase 2 U, Oligo(dT)

[收稿日期] 2009-12-08 **[接受日期]** 2010-04-10

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(06ZR14109)。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(06ZR14109)。

[作者简介] 李菡君, 硕士生。E-mail: elisadayli@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870979; E-mail: mabei08@yahoo.com.cn

primer 20 pmol]反转录为 cDNA,反应条件 72℃ 5 min, 4℃ 5 min, 42℃ 60 min, 72℃ 10 min, 4℃ 5 min。反转录产物于一20℃冰箱中保存。

通过对特异片段的 PCR 扩增测细胞系中的 P2Y₂ 受体。引物序列及反应条件如表 1。P2Y₂ 设计参考基因库中 P2Y₂

序列利用软件 Primer Premier 5.0 设计特异引物,并使上下游引物跨越一个内含子,以避免基因组污染。β-actin 引物设计参考已有文献^[7]。20 μl 反应体系包括 1 μl cDNA, 0.25 μmol/L 正反向引物对, 2×PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司)。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 用于扩增 P2Y₂ 和 β-actin 的引物序列

基因	基因库序列号	引物序列 (5'-3')	长度(bp)
P2Y ₂	NM_176072	Sense: TGG CTC GGC GAC TGC TAA A	298
		Antisense: GCA TCT CGG GCA AAG CGT A	
β-actin	NM_001101	Sense: TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT G	275
		Antisense: GGG AAA TCG TGC GTG ACA TTA AG	

1.3.3 Real-time RT-PCR 20 μl real-time PCR 反应体系包括 1.2 μl cDNA, 0.25 μmol/L 正反向引物对, 0.3 μl 10×SYBR(鼎国生物技术有限责任公司), 2×PCR Master Mix, 反应条件 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 62.5℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。产物的特异性通过溶解曲线以及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。阴性对照以双蒸无菌水代替 cDNA。采用样本拟合法分析结果得到样本中 P2Y₂ 和 β-actin 的 Ct 值。利用检测所得的 Ct 值, 以 β-actin 值为参照计算 P2Y₂ mRNA 的相对量。计算方法: ΔCt=Ct(P2Y₂)-Ct(β-actin), ΔΔCt=ΔCt(sample)-ΔCt(control), 2^{-ΔΔCt} 值为 P2Y₂ mRNA 的表达量。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据采用 SPSS 11.5 软件行单因素方差分析。检验水平 $\alpha=0.05, P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌激素对 MCF-7 细胞 P2Y₂ mRNA 表达的抑制作用 取生长良好的 MCF-7 细胞进行实验, 实时定量 PCR 结果发现, 经不同浓度的 17β-E₂ 作用 24 h 后, 在 MCF-7 细胞系中, 随着雌激素浓度的增加 (1 nmol/L ~ 1 μmol/L), P2Y₂ 受体 mRNA 的表达量从对照组的 (73.79 ± 8.91)% ($P<0.05$) 逐渐减少至对照组的 (53.68 ± 5.90)% ($P<0.01$, 图 1A)。当加入 ICI 182 780 时, P2Y₂ mRNA 的表达是对照组的 (114.00 ± 3.89)%, 较单独加雌激素组比有明显上升 ($P<0.01$), 与对照组相比较无显著差异 ($P>0.05$, 图 1B)。

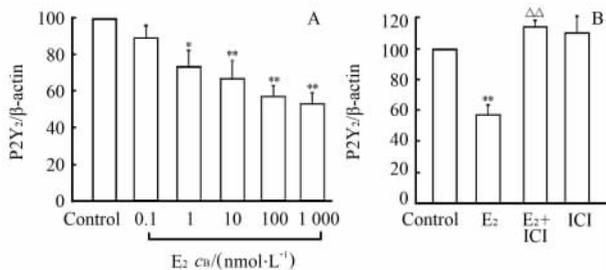


图 1 17β-E₂ (A) 和 ICI 182780 (B) 对 MCF-7 细胞系上 P2Y₂ mRNA 表达的调节

E₂: 17β-E₂; ICI: ICI 182 780. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照组比较; ΔΔ $P<0.01$ 与 17β-E₂ (0.1 μmol/L) 组比较. $n=4, \bar{x} \pm s$

2.2 ERα 在雌激素对 P2Y₂ mRNA 表达的抑制中的作

用 单独给予 MPP 和 PHTPP 对 MCF-7 细胞 P2Y₂ mRNA 的表达量分别为对照组的 (112.64 ± 14.35)% 和 (97.44 ± 8.24)%, 与对照组相比均无统计学差异 ($P>0.05$)。当同时加入 MPP 与 17β-E₂ 时, P2Y₂ mRNA 表达量是对照组的 (84.60 ± 10.73)%, 与单独给与雌激素组 [(56.50 ± 6.01)%] 相比有显著上升 ($P<0.01$), 但与对照组相比仍有统计学差异 ($P<0.05$, 图 2A)。当同时加入 PHTPP 与 17β-E₂ 时, P2Y₂ mRNA 表达量是对照组的 (61.10 ± 8.30)%, 与单独给与雌激素组比较无统计学差异 ($P>0.05$, 图 2B)。

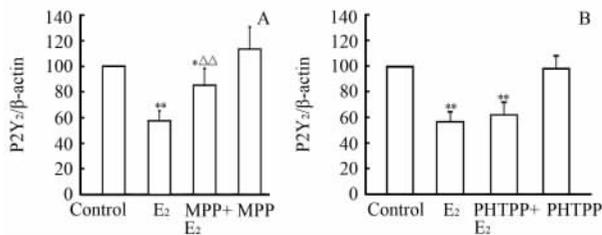


图 2 MPP (A) 和 PHTPP (B) 对 MCF-7 细胞系 P2Y₂ mRNA 表达的调节

E₂: 17β-E₂. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与对照组比较; ΔΔ $P<0.01$ 与 17β-E₂ (0.1 μmol/L) 组比较. $n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

乳腺癌被认为与血液雌激素含量密切相关^[8]。已有研究显示在绝经期妇女中, 患乳腺癌的妇女血液内雌激素水平比健康妇女血液内雌激素水平高 15%^[8]。体外研究显示, 雌激素对雌激素受体阳性 [ER(+)] 的细胞株 MCF-7 有显著的促增殖作用, 且该作用可以被 ER 的拮抗剂 ICI 182 780 所拮抗, 说明雌激素对 MCF-7 细胞的增殖作用主要通过 ER 完成^[9]。

激活的 P2Y₂ 通过激活 G 蛋白 G_{q/11}, 进而激活 PLC 途径, 介导胞内 Ca²⁺ 释放, 并产生相应的生物学效应^[5]。在黑素瘤^[10]、皮肤癌^[11]、肺癌^[12]、子宫内膜癌^[13] 中, P2Y₂ 受体促进癌细胞的增殖, 而在食管癌中, P2Y₂ 抑制细胞的增殖, 但不促进凋亡^[14]。在直肠癌中, P2Y₂ 受体在增殖中所起的作用尚不明确。在对直肠癌细胞系 HT29 的研究中, 研究者认为激活的 P2Y₂ 受体抑制细胞的增殖^[15]; 而在对直肠癌细胞系 HCT8 和 Caco-2 的研究中, 研究结果显示 P2Y₂ 受体的激活促进细胞增殖^[16]。关于 P2Y₂ 受体在不同癌症中的作用不

同,目前的研究结果并不明确。有研究者认为可能与不同来源的肿瘤细胞内第二信使系统的不同以及不同肿瘤对同一浓度 ATP 的反应不同有关^[5]。在乳腺癌中,已有报道认为在 MCF-7 细胞上,ATP 可以通过 P2Y₂ 受体介导胞内钙释放,ATP 给予 4 d 后,细胞的凋亡为对照组的 6 倍^[17]。另外在雌激素非依赖型细胞系 MDA-MB-231 上表达 P2Y₂ 受体,ATP 可抑制细胞增殖^[17]。

在本实验中,发现雌激素可以抑制 P2Y₂ mRNA 的表达,且呈浓度依赖性,这种作用可以被 ER 拮抗剂 ICI 182 780 阻断。这些结果提示雌激素可能通过 ER 下调 P2Y₂ mRNA 表达。ER α 拮抗剂 MPP 可以拮抗雌激素对 P2Y₂ mRNA 表达的下调作用,而 ER β 拮抗剂 PTHPP 对雌激素的作用无明显影响,提示雌激素对 P2Y₂ mRNA 的下调作用主要是通过 ER α 完成的。目前发现,ER 除了 ER α 和 ER β 两种亚型外,在乳腺癌细胞系 MCF-7 中还存在与 ER α 同源的膜受体 ER46^[18] 以及膜受体 GPR30^[19],实验结果发现 ER α 拮抗剂 MPP 部分拮抗雌激素 P2Y₂ mRNA 表达的下调作用,提示可能还有其他 ER 参与了雌激素对 P2Y₂ mRNA 的下调作用。

雌激素促进乳腺癌细胞增殖的细胞内信号转导途径非常复杂,目前发现至少可以包括 3 条途径。首先,雌激素可以通过 ER 依赖的基因组及非基因组途径促进细胞增殖^[9]。其次,雌激素可以通过核受体 ER 非依赖的途径作用于膜受体并进而影响靶蛋白磷酸化,从而促进细胞增殖^[9]。第三,雌激素在细胞内的代谢产物如 2-OH-E₁ (2-hydroxyl-estrone), 2-OH-E₂ (2-hydroxyl-estradiol), 能够造成正常细胞 DNA 变异,导致发生癌变^[20]。另外,已有研究认为雌激素的膜受体可以和其他膜受体相作用,从而快速激活 MARK、PI3K/AKT、PKA、PKC 以及 PLC 途径,增进胞内钙及一氧化氮含量^[21]。因而本实验中发现的雌激素对 P2Y₂ mRNA 调节的作用可能也参与了雌激素对 MCF-7 细胞的促增殖或抑制凋亡的效应。

综上所述,我们于国内外首次发现雌激素可以通过 ER α 抑制 MCF-7 细胞 P2Y₂ mRNA 的表达,这可能和雌激素对乳腺癌细胞的促增殖或抗凋亡作用有关,具体的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk[J]. JAMA, 2000, 283:485-491.

[2] Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER α mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2009, 21:977-981.

[3] Sengupta S, Schiff R, Katzenellenbogen B S. Post-transcriptional regulation of chemokine receptor CXCR4 by estrogen in HER2 overexpressing, estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117:243-251.

[4] Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M E, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410:50-56.

[5] White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006 27:211-217.

[6] Dixon C J, Bowler W B, Fleetwood P, Ginty A F, Gallagher J A, Carron J A. Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells *via* P2-purinoreceptors[J]. Br J Cancer, 1997, 75:34-39.

[7] Gao L, Lu C, Xu C, Tao Y, Cong B, Ni X. Differential regulation of prostaglandin production mediated by corticotropin-releasing hormone receptor type 1 and type 2 in cultured human placental trophoblasts[J]. Endocrinology, 2008, 149:2866-2876.

[8] Thomas H V, Reeves G K, Key T J. Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review[J]. Cancer Causes Control, 1997, 8:922-928.

[9] Chen G G, Zeng Q, Tse G M. Estrogen and its receptors in cancer[J]. Med Res Rev, 2008, 28:954-974.

[10] White N, Ryten M, Clayton E, Butler P, Burnstock G. P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas[J]. Cancer Lett, 2005, 224:81-91.

[11] Greig A V, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin M H, et al. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells[J]. J Invest Dermatol, 2003, 121:315-327.

[12] Schäfer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285:L376-L385.

[13] Katzur A C, Koshimizu T, Tomic M, Schultze-Mosgau A, Ortman O, Stojilkovic S S. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84:4085-4091.

[14] Maaser K, Hopfner M, Kap H, Sutter A P, Barthel B, von Lampe B, et al. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells *via* P2Y(2)-receptors[J]. Br J Cancer, 2002, 86:636-644.

[15] Höpfner M, Lemmer K, Jansen A, Hanski C, Riecken E O, Gavis M, et al. Expression of functional P2-purinergic receptors in primary cultures of human colorectal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251:811-817.

[16] Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung K K, de Campos N E, de Oliveira Souza C, Ojcius D M, et al. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288:G1024-G1035.

[17] Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues[J]. Cancer Lett, 1994, 86:67-73.

[18] Li L, Haynes M P, Bender J R. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100:4807-4812.

[19] Filardo E J, Quinn J A, Bland K I, Frackelton A R Jr. 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, 14:1649-1660.

[20] Yager J D, Davidson N E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer[J]. N Engl J Med, 2006, 354:270-282.

[21] Pietras R J, Marquez-Garban D C. Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13:4672-4676.