

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01221

雌激素受体 α 在乳腺癌细胞中对 Gli1 转录活性和表达的影响

赵洁莹¹, 陈欢², 王雁¹, 陈光椿¹, 卢建^{1*}

1. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**在先前研究发现 Hedgehog 信号通路的下游转录因子 Gli1 能够抑制乳腺癌细胞中的雌激素信号通路活性的基础上, 观察雌激素受体 ER α 在乳腺癌细胞 MCF-7 中对转录因子 Gli1 的转录活性和表达的影响, 以探讨两条信号通路之间是否存在交互作用。 **方法:**应用荧光素酶报告基因转录活性分析的方法, 将 Gli1 的表达质粒和 Gli1 的报告基因质粒 pGli-BS-luc 以及 ER α 的表达质粒或者空载体共同瞬时转染到乳腺癌细胞 MCF-7 中, 观察 Gli1 转录活性的变化。然后分别用实时定量 PCR 和蛋白质印迹的方法检测乳腺癌细胞中 ER α 的过表达对 Gli1 mRNA 和蛋白表达的影响。 **结果:**荧光素酶的活性随着 ER α 过表达剂量的增加而增加, ER α 的质粒量在 500 ng/孔时可将荧光素酶的活性升高到对照细胞的 3.5 倍 ($P < 0.001$)。雌激素处理后, 荧光素酶的活性无显著变化。过表达 ER α 后可将 Gli1 mRNA 的表达水平提高为原来的 2 倍 ($P < 0.01$), 也可明显增加 Gli1 蛋白的表达水平。 **结论:**ER α 在 MCF-7 细胞中的过表达能够明显增强 Gli1 的转录活性, 增加 Gli1 的表达。这表明乳腺癌细胞中, 转录因子 ER α 和 Gli1 之间存在着交互作用。

[关键词] Gli1; 乳腺肿瘤; 雌激素受体 α ; Hedgehog

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)11-1221-04

Effect of estrogen receptor α on transactivation and expression of Gli1 in breast cancer cells

ZHAO Jie-ying¹, CHEN Huan², WANG Yan¹, CHEN Guang-chun¹, LU Jian^{1*}

1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** It has been found that the expression of Hedgehog signaling molecule Gli1 can inhibit the activity of estrogen signaling pathway. The present study is to observe the effect of estrogen receptor α (ER α) on the transactivation and expression of Gli1 in breast cancer cells, so as to study whether there is a cross talk between the two pathways. **Methods:** Using luciferase reporter gene transactivation analysis, we cotransfected MCF-7 cells with pGli-BS-luc, pcDNA3.1-Gli1, pRL-CMV, pSG5-ER α or equimolar amounts of pSG5 vector. Then the cells were subjected to Luciferase Assays to analyze the change of Gli1 transactivation. The mRNA and protein expression of Gli1 following ectopic overexpression of ER α was also analyzed by quantitative real-time PCR and Western blotting analysis. **Results:** Expression of ER α induced the luciferase activity in a dose-dependent manner. ER α at 500 ng/well increased the activity of luciferase by 3.5 folds ($P < 0.001$). The luciferase activity had no obvious changes after estrogen treatment. Overexpression of ER α increased the expression of Gli1 mRNA by 2 folds ($P < 0.01$), and obviously increased the expression of Gli1 protein. **Conclusion:** Overexpression of ER α in MCF-7 cells can greatly increase the transactivity of Gli1 and increase its expression, which indicates that there is a cross talk between the two transcription factors in breast cancer cells.

[KEY WORDS] Gli1; breast neoplasms; estrogen receptor α ; Hedgehog

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1221-1224]

乳腺癌是雌激素依赖性的肿瘤, 雌激素可通过雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 的介导促进

乳腺癌细胞增殖^[1]。经典的 ER α 信号转导途径为通过与靶基因启动子上的雌激素反应元件 (estrogen

[收稿日期] 2009-03-05

[接受日期] 2009-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30670799), Supported by National Natural Science Foundation of China(30670799).

[作者简介] 赵洁莹, 硕士生, 助教, E-mail: jzhao@smmu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871018, E-mail: lujian326@163.com

response element, ERE) 结合激活基因转录。除经典的 ERE 途径外, ER α 还可通过与其他转录因子如 AP-1、Sp-1、NF- κ B 和 p53 等作用, 影响其活性而间接调节基因表达^[2-5]。

Hedgehog(Hh)/Gli 信号通路是一条在胚胎发育中起着极其重要作用的通路, 该信号通路的异常激活会引起包括前列腺、胰腺、皮肤、小脑和消化道等多种肿瘤的发生发展。锌指蛋白 Gli 是 Hh 信号通路最下游的转录因子, 其家族在脊椎动物中由 Gli1、Gli2 和 Gli3 这 3 种蛋白组成^[6]。Gli1 蛋白既是转录激活子, 又是 Gli 家族的靶基因, 因而 Gli1 mRNA 的表达是 Hh/Gli 信号通路激活的一个标志^[7]。已知 Gli1 参与了乳腺的正常发育^[8], 近期有数篇文献报道 60% 以上的乳腺癌组织中有 Gli1 的表达增多^[9-11]。

我们在前期的研究中发现, Gli1 表达增多可以明显促进乳腺癌细胞的增殖, 同时 Gli1 的过表达可以抑制 ER α 的表达和转录活性^[12]。在此基础上我们进一步观察了在乳腺癌细胞中 ER α 对 Gli1 的转录活性和表达的影响, 以探讨这 2 条信号通路之间可能存在的交互作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和化学试剂 人乳腺癌细胞系 MCF-7 为本校基础部生物化学与分子生物学教研室杨志峰馈赠, 用 RPMI 1640 培养基, 10% 新生牛血清, 5% CO₂ 常规培养。17 β -雌二醇(E₂)为 Sigma 产品。

1.2 质粒 人 ER α 真核表达质粒 pSG5-ER α 由日本东京大学的 Shigeaki Kato 博士赠送。人 Gli1 真核表达质粒 pcDNA3.1-Gli1 和含有 Gli 结合位点的荧光素酶报告基因质粒 (pGli-BS-luc) 由日本的 Hiroshi Sasaki 博士赠送。内参照质粒 pRL-SV40-luc 为本教研室保存。

1.3 脂质体介导的细胞瞬时转染 取对数生长的细胞, 铺于 6 孔或 24 孔培养板中, 培养 20 h 后转染。用 Invitrogen 公司的 LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent 将相应的质粒瞬时转染入细胞, 具体步骤按照试剂盒说明书进行。并根据实验目的, 将细胞用 10⁻⁸ mol/L 的雌二醇进行相应处理, 而对照组则用 0.1% 无水乙醇处理。

1.4 荧光素酶活性分析 本研究采用双荧光素酶 (Dual-Luciferase) 报告基因分析系统, pGli-BS-luc 中的 luc 源自萤火虫, 为消除转染效率不同所造成的误差而采用的内参照 pRL-SV40-luc 的 luc 源自水母。在 24 孔板的细胞转染 8 h 后给予换液, 含 0.5%

的 CCS(charcoal stripped calf serum, 去激素血清) 的无酚红 RPMI 1640 培养基, 加上 10⁻⁸ mol/L 的 E₂ 或者 0.1% 的无水乙醇。24 h 后, 裂解细胞, 使用购自 Promega 公司的双荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 在 Minilumat LB9506 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) 上检测 luciferase 的活性, 步骤参照厂家说明书。计算报告基因与内参照基因的 luciferase 活性值的比值, 并以每批中的阴性对照组作为基数, 比较各实验组的变化倍数。

1.5 蛋白印迹分析 将 6 孔板中的细胞用含蛋白酶抑制剂的购自 Sigma 公司细胞总蛋白裂解液裂解, 提取蛋白, 测蛋白浓度后存于 -80 $^{\circ}$ C 待电泳。取 60 μ g 蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。根据相对分子质量标记物切取所需相对分子质量范围的凝胶, 300 mA 进行电转移 70 min, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。然后将硝酸纤维素膜放在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 1~2 h, 接着用相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育慢摇过夜: 兔抗人 ER α 抗体 (1:1 000, Santa Cruz), 羊抗人 Gli1 抗体 (1:200, Santa Cruz); 鼠抗人 β -actin 抗体 (1:6 000, Sigma)。用 TBST 洗膜 3 次, 然后加入相应的二抗室温孵育 1~2 h。用 TBST 洗膜 3 次, 每次振摇 10 min。最后使用免疫印迹化学发光试剂 luminol 检测系统检测 (ECL 化学发光试剂盒)。

1.6 RNA 的抽提和 real-time PCR 检测 用 TRIzol RNA (Invitrogen) 抽提细胞的总 RNA, 取 4 μ g 模板 RNA, 用逆转录试剂盒 (MBI Fermentas 公司) 逆转录后, 稀释, 然后用 SYBR[®] Premix ExTaqTM (TaKaRa) 进行 real-time PCR 扩增。使用的引物分别为 Gli1 上游 5'-GGA AGT CAT ACT CAC GCC TCG A-3', 下游 5'-CAT TGC TGA AGG CTT TAC TGC A-3'; MRPL-19 上游 5'-AAC CGG TCA TCG TGG ACA A-3', 下游 5'-TCC CCT TCG AGG AAT GAA TTC-3'。确定其融解曲线单峰, 琼脂糖电泳无非特异性杂带。采用 ABI7300, 40 个循环 (96 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s)。MRPL-19 作为内参, 用 Light Cycler Software version 3.5 进行数据分析。

1.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据处理使用 Microsoft Excel 软件进行方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 在 MCF-7 细胞中过表达 ER α 对 Gli1 转录活

性的影响 为观察转染不同量的 ER α 质粒对 Gli1 转录活性的影响, 将质粒 pcDNA3.1-Gli1、pGli-BS-luc 和不同量的 pSG5-ER α 共同瞬时转染入 MCF-7 细胞。

结果如图 1A 所示, 在 10^{-8} mol/L E $_2$ 存在的条件下, ER α 能够以剂量依赖的方式增强 Gli1 的转录活性, 在剂量为 500 ng/孔时可将 luciferase 的活性升高到对照细胞的 3.5 倍。我们同时用蛋白质印迹的方法验证了转染不同量 pSG5-ER α 后细胞 ER α 的表达情况, 结果证实细胞 ER α 的表达量随着转染 pSG5-ER α 量的增多而增多。

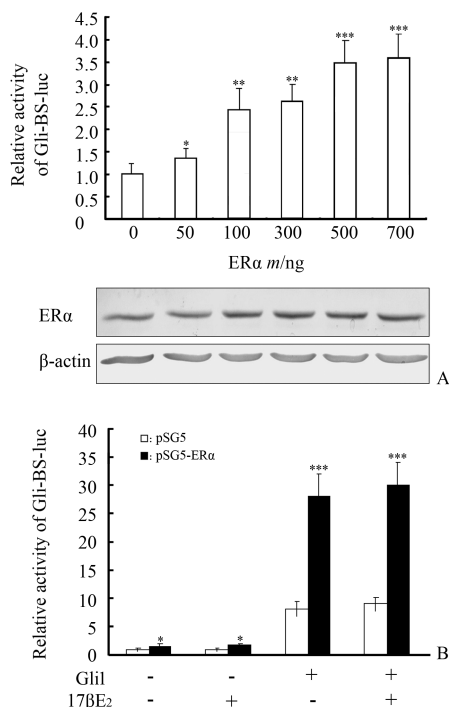


图 1 ER α 对 Gli1 转录活性的影响

Fig 1 Effect of ER α overexpression on Gli1 transactivation in MCF-7 cells

MCF-7 cells were co-transfected with a DNA mixture containing 200 ng pGli-BS-luc, 100 ng pcDNA3.1-Gli1, 1.0 ng pRL-CMV, increasing amounts (0 to 700 ng/well) of pSG5-ER α adjusted with empty pSG5 vector to produce equimolar amounts of pSG5 vector (A) or 500 ng pSG5-ER α , or equimolar amounts of pSG5 vector (B) in 24-well plate. Following transfection, cells were treated with E $_2$ or vehicle (0.1% ethanol) only for 24 h as indicated. Data presented as fold increase above empty vector control, which was arbitrarily set as 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs pSG5; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. Lower panel of A, expression of ER α was determined by Western blotting analysis of the transiently transfected MCF-7 cells corresponding to same samples in A, using anti-ER α antibody (1 : 1 000, Santa Cruz)

MCF-7 细胞中的 Gli 的基础转录活性很低, 转入 pSG5-ER α 使 ER α 过表达后, Gli 的转录活性增

强, 加入雌激素后, Gli 的转录活性增强程度没有发生变化。增加质粒 pcDNA3.1-Gli1 进行共转染, 发现 Gli1 的转录活性明显增强, 在共转了 ER α 表达载体后, Gli1 的转录活性进一步增强, 这种变化也不受雌激素的影响。结果表明 ER α 可以同时以配体非依赖的方式增强细胞内源性表达和外源性表达的 Gli 的活性(图 1B)。

2.2 在 MCF-7 细胞中过表达 ER α 对 Gli1 表达的影响 实时定量 PCR 结果显示, 转染了 pSG5-ER α 的 MCF-7 细胞中 Gli1 mRNA 的表达水平约为转染空载体细胞的 2 倍($P < 0.01$)。同时 ER α 也能够明显增加 Gli1 蛋白的表达水平(图 2)。

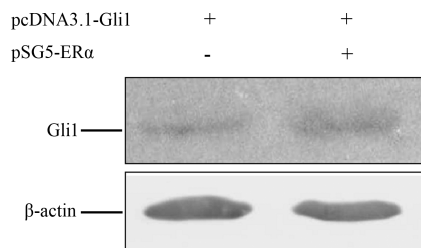


图 2 ER α 对 Gli1 蛋白表达的影响

Fig 2 Effect of ER α overexpression on expression of Gli1 in MCF-7 cells

MCF-7 cells were co-transfected with a DNA mixture containing 400 ng pcDNA3.1-Gli1, 2 000 ng pSG5-ER α or equimolar amounts of pSG5 vector in 6-well plate. Gli1 protein level was assessed by Western blotting using anti-Gli1 antibody (1 : 200)

3 讨论

Hedgehog (Hh)/Gli 信号通路在细胞增殖、分化和胚胎发育中起着极其重要的作用, 该通路的异常与多种肿瘤的发生发展有关。Hh/Gli 通路参与了乳腺的正常发育, 近期有数篇文献报道 Gli1 和乳腺癌的发生发展有着密切的关系^[10, 13-16]。我们前期的工作首次发现了 Gli1 和乳腺癌细胞增殖的直接关系: 转录因子 Gli1 的表达能够促进乳腺癌细胞的雌激素依赖性和非依赖性的增殖, 并同时降低细胞对雌激素的增殖反应性^[12]。MCF-7 细胞的增殖依赖于雌激素的存在, 而 ER α 是介导雌激素作用的关键大分子, 细胞对雌激素刺激的反应性降低往往和 ER α 信号通路的改变有关。研究中我们发现持续性过表达的 Gli1 的 MCF-7 细胞克隆中 ER α 和 PR 的表达与对照细胞相比明显减少, 部分解释了 Gli1 减弱 MCF-7 细胞对 ER 激动剂和拮抗剂生长反应性的机制^[12]。

近期, 对乳腺癌的雌激素非依赖性生长发生的

机制研究越来越多地集中在 ER α 和其他促生长存活的信号通路和蛋白之间的相互作用上。如乳腺癌中 ER α 和 NF- κ B 之间存在着相互作用, NF- κ B 的 p65 亚基可竞争性结合 ER α 的 DNA 结合位点而抑制其转录活性^[17]; 使用特异性的 NF- κ B 活性抑制剂处理雌激素非依赖性生长的细胞可以使其重新获得对雌激素刺激的生长反应性, 使其增殖能够被 ER 拮抗剂抑制^[18-19]。我们推测乳腺癌中, 2 个转录因子 ER α 和 Gli1 也可能存在着一定的相互作用。

我们前期已经发现 Gli1 能够抑制 ER α 的表达和转录活性, 本实验进一步观察 ER α 过表达对 Gli1 的转录活性和表达的影响。结果发现 ER α 在乳腺癌细胞 MCF-7 中过表达可以促进 Gli1 的转录活性, 而且这个促进作用并不受雌二醇存在与否的影响, 表明 ER α 对 Gli1 转录活性的影响是呈配体非依赖性的。我们的研究证实, ER α 的过表达能够促进 Gli1 mRNA 和蛋白的表达, 表明在乳腺癌细胞中的确存在 Gli1 和 ER α 的相互作用。这 2 个蛋白之间的相互作用是直接还是间接的, 具体机制还有待进一步研究。

综上所述, 我们的结果显示 ER α 促进 Gli1 的表达和转录活性, 而 Gli1 却抑制 ER α 的表达和活性^[12], 表明在乳腺癌细胞中的确存在 Gli1 和 ER α 的相互作用, 提示在乳腺癌的发生发展中, Gli1 可能逐渐取代 ER α 在乳腺癌中的促增殖作用。上述工作国内外均未见报道。该研究有助于阐明乳腺癌发生、发展以及内分泌治疗抵抗发生的分子机制, 为乳腺癌的治疗提供新的靶点(Gli1)。

[参考文献]

- [1] Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A, Giordano A, et al. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12: 721-747.
- [2] Liu W, Konduri S D, Bansal S, Nayak B K, Rajasekaran S A, Karuppaiyil S M, et al. Estrogen receptor-alpha binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 9837-9840.
- [3] Webb P, Lopez G N, Uht R M, Kushner P J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens[J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9: 443-456.
- [4] Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor[J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11: 1569-1580.
- [5] Stein B, Yang M X. Repression of the interleukin-6 promoter by

estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 4971-4979.

- [6] Hooper J E, Scott M P. Communicating with Hedgehogs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 306-317.
- [7] Lee J, Platt K A, Censullo P, Ruiz i Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development[J]. *Development*, 1997, 124: 2537-2552.
- [8] Fiaschi M, Rozell B, Bergstrom A, Toftgard R, Kleman M I. Targeted expression of Gli1 in the mammary gland disrupts pregnancy-induced maturation and causes lactation failure[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 36090-36101.
- [9] Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 6071-6074.
- [10] Mukherjee S, Frolova N, Sadlonova A, Novak Z, Steg A, Page G P, et al. Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 674-683.
- [11] Wolf I, Bose S, Desmond J C, Lin B T, Williamson E A, Karlan B Y, et al. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 105: 139-155.
- [12] Zhao J, Chen G, Cao D, Li Y, Diao F, Cai H, et al. Expression of Gli1 correlates with the transition of breast cancer cells to estrogen-independent growth[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, Feb 4. [Epub ahead of print].
- [13] Hatsell S, Frost A R. Hedgehog signaling in mammary gland development and breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007, 12: 163-173.
- [14] Lewis M T, Visbal A P. The hedgehog signaling network, mammary stem cells, and breast cancer: connections and controversies[J]. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 2006, 5: 181-217.
- [15] Liu S, Dontu G, Mantle I D, Patel S, Ahn N S, Jackson K W, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 6063-6071.
- [16] Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2005, 227: 99-104.
- [17] Feldman I, Feldman G M, Mobarak C, Dunkelberg J C, Leslie K K. Identification of proteins within the nuclear factor-kappa B transcriptional complex including estrogen receptor-alpha[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 196: 394, e1-e11.
- [18] Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz C C. The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12 (Suppl 1): S37-S46.
- [19] Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin D A, Goulet R J Jr, Sledge G W Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 3629-3639.

[本文编辑] 尹 茶