

The Effect of Estradiol E2 on the Proliferation of Breast Cancer by Regulating PEDF Expression

Honghai Hong*, Weiqin Yang, Xicai Tang, Yao Feng#

Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong
Email: #gaolaosao@126.com

Received: Jan. 3rd, 2018; accepted: Jan. 17th, 2018; published: Jan. 24th, 2018

Abstract

Objective: To investigate the molecular mechanism of estradiol E2 to promote the proliferation of breast cancer by regulating the expression PEDF. **Methods:** Serum PEDF level was detected by ELISA kit and estradiol E2 level was detected by radioimmunoassay; the effect of estradiol on the PEDF regulation was detected by Western blot; the proliferation of breast cancer cell line MCF-7 was detected by MTT assay. **Results:** The expression of PEDF was down regulated in breast cancer, and negatively correlated with estradiol E2 level. Estradiol E2 can reduce the expression of PEDF and promote the proliferation of breast cancer cell MCF-7. **Conclusion:** Estradiol E2 can promote the proliferation of breast cancer by regulating the expression of PEDF.

Keywords

Breast Cancer, Estradiol E2, Pigment Epithelial Cell Derived Factor PEDF, Proliferation

雌二醇E2通过调控PEDF表达促进乳腺癌增殖作用研究

洪宏海*, 杨卫琴, 唐希才, 冯 遥#

广州医科大学附属第三医院检验科, 广东 广州
Email: #gaolaosao@126.com

收稿日期: 2018年1月3日; 录用日期: 2018年1月17日; 发布日期: 2018年1月24日

*第一作者。
#通讯作者。

摘要

目的: 探讨雌二醇E2通过调控色素上皮细胞衍生因子PEDF促进乳腺癌增殖的分子机制。**方法:** ELISA法检测血清中PEDF水平;放射免疫分析法检测雌二醇E2水平;Western blot检测雌二醇对PEDF调控作用;分子克隆过表达PEDF研究其在雌二醇E2促进乳腺癌增殖中作用;MTT法检测乳腺癌细胞株MCF-7的增殖能力。**结果:** 乳腺癌中PEDF表达下调,且与雌二醇E2水平呈负相关($R = -0.69$; $***P < 0.001$);雌二醇E2可下调PEDF的表达,促进乳腺癌细胞MCF-7的增殖。**结论:** 雌二醇E2通过调控PEDF表达进而促进乳腺癌的增殖。

关键词

乳腺癌, 雌二醇E2, 色素上皮细胞衍生因子PEDF, 增殖

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤,其在女性恶性肿瘤中排第一[1][2]。乳腺癌的发病机制复杂多样,其具体分子机制尚未清楚[3]。大多数患者在诊断时已经处于晚期,其生存期一般小于1年[4],且发生远处转移[4]。研究发现乳腺癌病人血清中雌二醇异常增高,且与乳腺癌发生发展密切相关[5],随后研究发现雌二醇可促进乳腺癌的增殖,但是其详细分子尚未清楚。色素上皮衍生因子(PEDF, Pigment epithelium-derived factor)属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin, serine proteinase inhibitor)超家族,分子量为50 KD。PEDF由视网膜上皮细胞分泌,具有促进视网膜神经分化作用。随后的研究发现,PEDF有着非常多且复杂的生理和病理作用,不仅具有神经分化作用,还具有抗血管新生、诱导肿瘤凋亡、抑制肿瘤转移等作用[6]。文献报道乳腺癌中PEDF表达下调,且抑制乳腺癌的转移和生长[7][8]。但是,PEDF在雌二醇促进乳腺癌增殖中作用尚未清楚。

在这篇论文中,我们首先检测肝癌病人血清和乳腺癌细胞中PEDF的表达,同时分析其与雌二醇E2的相关性;研究雌二醇E2调控PEDF的作用以及探讨PEDF在雌二醇E2促进乳腺癌细胞增殖中作用。

2. 材料与方法

标本收集

健康人和乳腺癌病人血清来自广州医科大学附属第三医院体检中心和检验科。所有病人资料和标本收集都严格按照广州医科大学和暨南大学伦理委员会相关规定。

试剂和耗材

雌二醇E2检测试剂盒购自罗氏公司。PEDF ELISA检测试剂盒购自Abcam公司。PEDF和 β -actin一抗购自CST公司。MTT购自北京鼎国公司。细胞培养皿购自康宁公司。Western blot相关试剂购自北京鼎国。Lipo2000转染试剂购自Invitrogen公司。雌二醇购自Sigma公司。

PEDF过表达质粒构建及转染

PEDF过表达质粒构建以及转染步骤参见我们以前发表的文献[8]。具体步骤如下:提取乳腺癌细胞

RNA, 转录为 cDNA, 设计 PEDF 引物, 钩取 PDEF 片段, 通过酶切连接到 pcDNA3.1+载体上面。转染步骤: MCF-7 细胞接种于六孔板中, 待其融合度为 60% 左右, 用转染试剂 Lipo2000 转染 PEDF 过表达质粒, 6 个小时后换液, 24 小时后进行 MTT 实验。

MTT 法检测乳腺癌细胞增殖能力[8]

MTT 法, 即噻唑兰颜色反应法, 是反映细胞增殖活力的测定方法。活细胞里面线粒体琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色晶体——甲瓊, 并沉淀在细胞里面, 而死细胞则并不能使细胞里面的甲瓊沉淀。取对数生长期乳腺癌细胞 MCF-7, 接种到 48 孔细胞培养板中, 每孔加入 500 μ l 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ cell incubator 中培养; 细胞贴壁后其融合度达到 60% 左右, 瞬时转染 PEDF 过表达质粒, 48 h 加入 200 μ l 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/ml), 继续培养 4 小时; 去掉上清后每孔加入 2 ml dimethyl sulfoxide (二甲基亚砷, DMSO), 用摇床震荡摇匀, 以使蓝色结晶颗粒甲瓊完全溶解, 用酶标仪测定 OD₅₇₀ 的光密度值。实验中每个实验组设置 3 个重复的培养孔, 重复进行 3 次。

ELISA 检测乳腺癌病人血清中 PEDF 含量

PEDF ELISA 试剂盒用来检测乳腺癌病人血清中 PEDF 的含量, 具体步骤参见说明书。详细步骤如下: 收集乳腺癌病人血清, 12,000 转/min 离心 10 min, 吸取上清部分转移到干净无菌的 EP 管中。往 96 孔板中加入 100 μ l 乳腺癌血清, 37 $^{\circ}$ 孵育 90 min, 去掉孔里液体, 加入生物素标记的抗体, 37 $^{\circ}$ 孵育 60 min, 用 PBS 洗 3 遍, 随后加入 ABC 工作液, 37 $^{\circ}$ 孵育 30 min, 用 PBS 洗 3 遍, 加入 90 μ l TMB 液体, 37 $^{\circ}$ 孵育 30 min, 加入 100 μ l 终止液, 450 nM 检测 OD 值。

Western blot 实验

Western blot 实验用来检测 PEDF 蛋白水平, 具体实验方案如下: 收集处理好的 MCF-7 和 NMuMG 细胞蛋白, 进行蛋白定量, 跑胶。加入 PEDF 一抗, 4 度过夜, 收集一抗, 加入二抗, 然后加入 ECL 显色, 拍照。

统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差表示。血清中雌二醇 E2 水平和 PEDF 水平采用 t 检验。雌二醇 E2 水平和 PEDF 水平相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3. 实验结果

乳腺癌中 PEDF 表达含量下调

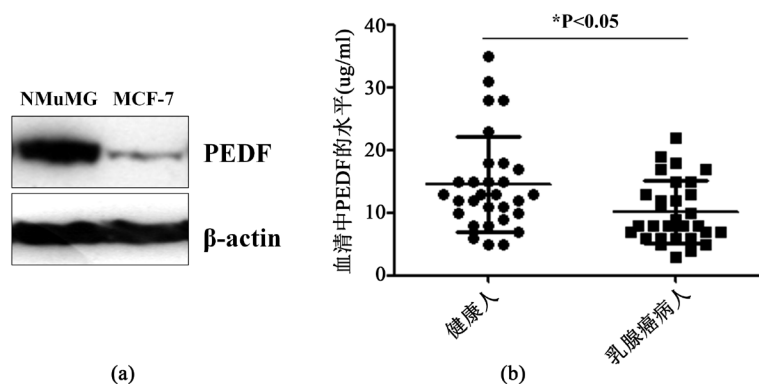
我们选取雌二醇 E2 受体阳性乳腺癌细胞 MCF-7, 用永生化的乳腺上皮细胞 NMuMG 作为对照组, Western blot 检测 PEDF 的表达。结果显示, 相对于永生化的乳腺上皮细胞 NMuMG, 乳腺癌细胞 MCF-7 的 PEDF 表达明显下调(图 1(a))。因为 PEDF 可分泌到血液中, 因此我们分别收集 30 例健康人和乳腺癌病人的血清, 检测血清中 PEDF 含量。与健康人相比, 乳腺癌病人血清中 PEDF 也明显下降(图 1(b), $P < 0.05$), 表明乳腺癌病人 PEDF 表达下调。

乳腺癌病人雌二醇 E2 与 PEDF 呈负相关

雌二醇 E2 与乳腺癌发生、发病、增殖密切相关[5]。因此, 我们下一步研究乳腺癌病人雌二醇 E2 与 PEDF 相关性(*** $P < 0.001$)。结果显示, 乳腺癌病人雌二醇 E2 与 PEDF 呈负相关(图 2)。

雌二醇 E2 下调 PEDF 蛋白水平

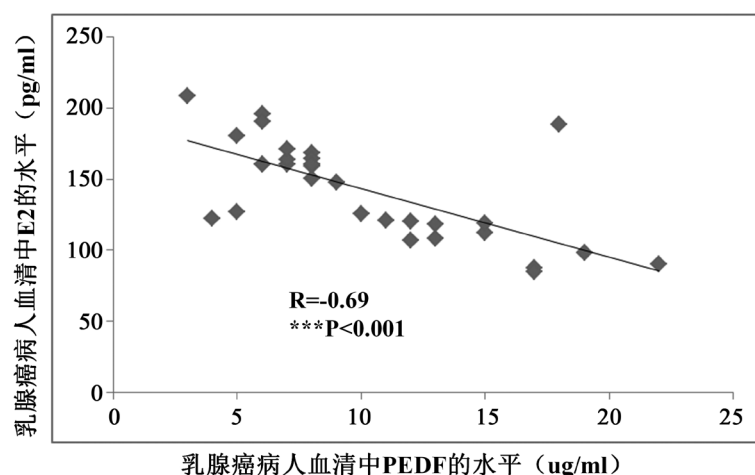
上面研究显示雌二醇 E2 水平与 PEDF 水平密切相关。下一步我们进一步在体外细胞水平研究雌二醇 E2 对 PEDF 调控作用。用雌二醇 E2 蛋白处理 MCF-7 细胞 48 小时后, Western blot 检测 PEDF 的表达。结果显示, 雌二醇 E2 明显下调乳腺癌细胞 MCF-7 的 PEDF 表达, 提示着雌二醇 E2 可能通过调控 PEDF



(a) Western blot 法检测乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺上皮细胞 NMuMG 中 PEDF 表达。
β-actin 为上样对照组。(b) ELISA 法检测乳腺癌病人血清中 PEDF 表达。* $P < 0.05$ 。

Figure 1. The expression of PEDF in breast cancer

图 1. 乳腺癌中 PEDF 的表达



注: Pearson 法对乳腺癌病人血清中 PEDF 水平与雌二醇 E2 水平相关性进行分析。

Figure 2. The correlation analysis of serum PEDF level and estradiol E2 in breast cancer patients

图 2. 乳腺癌病人血清中 PEDF 水平与雌二醇 E2 水平相关性分析

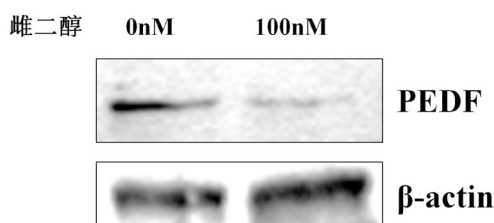
促进乳腺癌增殖(图 3)。

雌二醇 E2 通过调控 PEDF 水平促进乳腺癌细胞增殖

文献报道雌二醇 E2 促进乳腺癌的增殖[5]。PEDF 抑制乳腺癌生长[8]。前面结果提示雌二醇 E2 下调 PEDF 的表达, 为了进一步证明 PEDF 在雌二醇 E2 促进乳腺癌增殖中作用, 我们构建 PEDF 过表达质粒, 在雌二醇 E2 处理乳腺癌细胞 MCF-7 的同时过表达 PEDF, 观察其是否影响雌二醇 E2 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖作用。结果显示, 过表达 PEDF 后, PEDF 的转录水平明显升高(图 4(a), $***P < 0.001$)。过表达 PEDF 后, 抑制了雌二醇 E2 促进乳腺癌细胞增殖作用(图 4(b)), 表明雌二醇 E2 通过调控 PEDF 促进乳腺癌细胞的增殖。

4. 讨论

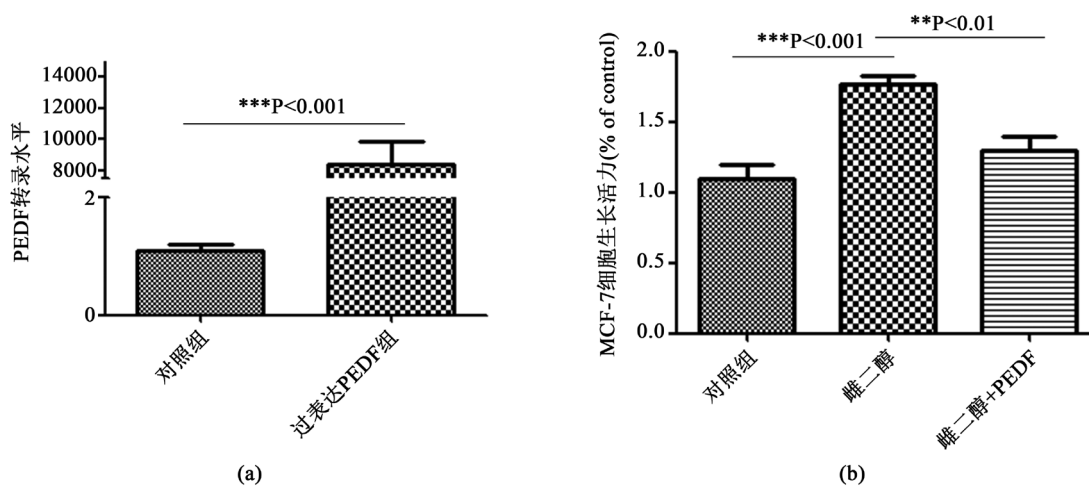
乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 其死亡率在恶性肿瘤中排名前列[1]。乳腺癌的发病机制复杂多样, 其早期诊断及治疗对病人生存期至关重要[9]。在本论文中, 我们发现乳腺癌细胞及乳腺癌病人血清中



Western blot 检测乳腺癌细胞 MCF-7 细胞 PEDF 水平。雌二醇 E2 处理 MCF-7 细胞 48 小时后, Western blot 检测 PEDF 水平。β-actin 为上样对照组。

Figure 3. Estradiol E2 down-regulates the expression of PEDF

图 3. 雌二醇 E2 下调 PEDF 蛋白水平



(a) qRT-PCR 法检测 PEDF 的转录水平。*** $P < 0.001$ 。(b) MTT 法检测 MCF-7 细胞的增殖作用。雌二醇 E2 处理的同时过表达 PEDF, 48 小时后进行 MTT。*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ 。

Figure 4. Estradiol E2 promotes the proliferation of breast cancer cells via PEDF

图 4. 雌二醇 E2 促进乳腺癌细胞增殖作用依赖于 PEDF

PEDF 明显下调, 且与雌二醇 E2 呈负相关。进一步研究发现雌二醇 E2 可下调 PEDF 水平, 且雌二醇 E2 通过调控 PEDF 表达进而促进乳腺癌的增殖。

色素上皮衍生因子(PEDF, Pigment epithelium-derived factor)属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin, serine proteinase inhibitor)超家族, 其分子量为 50KD, 在大脑、脊柱、眼睛、肝、肺和血浆等组织中表达[10]。PEDF 由视网膜细胞分泌, 具有促进视网膜神经分化作用[11]。随后的研究发现, PEDF 有着非常多且复杂的生理和病理作用, 其不仅具有神经分化作用, 还具有抗血管新生、促神经干细胞自我更新、诱导肿瘤凋亡、抗炎、调控脂质代谢、抑制肿瘤转移等功能[12]。我们前期研究表明 PEDF 抑制乳腺癌的转移和生长[8]。但是, PEDF 在乳腺癌病人血清中表达及其调控是如何的尚未清楚。我们实验结果表明, PEDF 在乳腺癌细胞和乳腺癌病人血清中表达都下调, 与文献报道类似[13]。那么, 乳腺癌中 PEDF 为什么下调呢?

雌二醇 E2 是雌性激素的主要活性物质。许多研究表明其与乳腺癌的发生、发展、增殖、转移等密切联系[5]。但是, 其与 PEDF 的关系尚未有文献报道。我们研究表明乳腺癌病人血清雌二醇 E2 水平与 PEDF 水平呈负相关, 且体外细胞实验证明其可下调 PEDF 表达, 提示着雌二醇 E2 促进乳腺癌增殖作用与 PEDF 密切相关。为了进一步验证 PEDF 参与雌二醇 E2 促进乳腺癌增殖过程, 我们用雌二醇 E2 处理 MCF-7

细胞同时过表达 PEDF, 结果显示雌二醇 E2 明显促进乳腺癌的增殖, 但是, 过表达 PEDF 后明显抑制雌二醇 E2 促进乳腺癌增殖作用, 充分表明雌二醇 E2 通过调控 PEDF 促进乳腺癌的增殖作用。

在这篇论文中, 我们分析了乳腺癌病人血清中 PEDF 与雌二醇 E2 相关性, 体外证明雌二醇 E2 通过调控 PEDF 促进乳腺癌细胞增殖作用, 阐明雌二醇 E2 促进乳腺癌增殖分子机制, 为将来靶向 PEDF 治疗乳腺癌提供实验依据和理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Patel, H.K. and Bihani, T. (2017) Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMS) and Selective Estrogen Receptor Degradors (SERDs) in Cancer Treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, in Press. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.012>
- [2] Patel, S. (2017) Breast Cancer: Lesser-Known Facets and Hypotheses. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **98**, 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.087>
- [3] Weigelt, B., Peterse, J.L. and van't Veer, L.J. (2005) Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nature Reviews Cancer*, **5**, 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>
- [4] Kodack, D.P., et al. (2015) Emerging Strategies for Treating Brain Metastases from Breast Cancer. *Cancer Cell*, **27**, 163-175. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.01.001>
- [5] Majumder, A., Singh, M. and Tyagi, S.C. (2017) Post-Menopausal Breast Cancer: From Estrogen to Androgen Receptor. *Oncotarget*, **8**, 102739-102758. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22156>
- [6] Bilak, M.M., et al. (1999) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Protects Motor Neurons from Chronic Glutamate-Mediated Neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **58**, 719-728. <https://doi.org/10.1097/00005072-199907000-00006>
- [7] Becerra, S.P. (2006) Focus on Molecules: Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF). *Experimental Eye Research*, **82**, 739-740. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.10.016>
- [8] Hong, H., Zhou, T., Fang, S., et al. (2014) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Inhibits Breast Cancer Metastasis by Down-Regulating Fibronectin. *Breast Cancer Research and Treatment*, **148**, 61-72. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3154-9>
- [9] Bae, Y.K., et al. (2013) Fibronectin Expression in Carcinoma Cells Correlates with Tumor Aggressiveness and Poor Clinical Outcome in Patients with Invasive Breast Cancer. *Human Pathology*, **44**, 2028-2037. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.03.006>
- [10] Sawant, S., et al. (2004) Regulation of Factors Controlling Angiogenesis in Liver Development: A Role for PEDF in the Formation and Maintenance of Normal Vasculature. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **325**, 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.041>
- [11] Filleur, S., et al. (2009) Characterization of PEDF: A Multi-Functional Serpin Family Protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, **106**, 769-775. <https://doi.org/10.1002/jcb.22072>
- [12] Bouck, N. (2002) PEDF: Anti-Angiogenic Guardian of Ocular Function. *Trends in Molecular Medicine*, **8**, 330-334. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02362-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02362-6)
- [13] Cai, J., et al. (2006) Decreased Pigment Epithelium-Derived Factor Expression in Human Breast Cancer Progression. *Clinical Cancer Research*, **12**, 3510-3517. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0094>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-9049，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：wjcr@hanspub.org