

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.09.005

# 新型雌激素受体 GPR30 激活 HER2-ERK1/2 促进乳腺癌 MCF-7 细胞迁移和侵袭\*

阮姝琴<sup>1</sup>, 代晓燕<sup>2△</sup>

(1. 重庆市人民医院肿瘤血液科 400013; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤科实验室, 重庆 400042)

**[摘要]** **目的** 探讨 G 蛋白耦联受体 30 (GPR30) 受体在低表达表皮生长因子受体 2 (HER2) 的乳腺癌 MCF-7 细胞中激活 HER2 的分子机制和生物学意义。**方法** 用 Western blot 的方法检测 17-β-雌二醇 (E<sub>2</sub>)、三苯氧胺 (TAM) 的活性代谢产物 (4-OHT) 或 GPR30 激动剂 (G-1) 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后 HER2 和下游信号分子 ERK1/2 磷酸化水平的变化。在 MCF-7 细胞被不同的抑制剂 GPR30 拮抗剂 (G-15)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (AG1478)、HER2 酪氨酸激酶抑制剂 (AG825)、Src 家族激酶抑制剂 (PP2) 或 MMP 抑制剂 (GM6001) 预处理 2 h 后, 再次检测 HER2 和 ERK1/2 的磷酸化水平变化。最后用 Transwell 方法检测 G-1 引起的 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的变化。**结果** MCF-7 细胞在用 E<sub>2</sub>、4-OHT 和 G-1 处理后, HER2 和 ERK1/2 的磷酸化水平增加, 该变化在用 G-15、AG1478、AG825、PP2 或 GM6001 预处理后受到抑制。而 G-1 引起的 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的增强也能被 G-15、AG1478、AG825、PP2 或 GM6001 抑制。**结论** GPR30 通过激活 HER2-ERK1/2 信号转导途径可促进 MCF-7 细胞的迁移和侵袭。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; G 蛋白耦联受体 30; 表皮生长因子受体 2; 细胞运动; 侵袭**[中图分类号]** R737.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1168-04

## GPR30 promotes MCF-7 breast cancer cell migration and invasion by activating HER2-ERK1/2 signaling pathway\*

Ruan Shuqin<sup>1</sup>, Dai Xiaoyan<sup>2△</sup>

(1. Department of Oncology and Hematology, Chongqing Municipal People's Hospital, Chongqing 400013, China;

2. Laboratory Room, Department of Oncology, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the molecular mechanism and biological significance of GPR30 activating HER2 in MCF-7 breast cancer cells with low expresses HER2. **Methods** Western blot was adopted to examine the phosphorylation of HER2 and the downstream signaling molecular ERK1/2 after 17-β-estradiol (E<sub>2</sub>), 4-OHT (the active metabolite of tamoxifen) or G-1 (the GPR30 agonist) treatment in MCF-7 cells. After different inhibitors such as G-15 (the GPR30 antagonist), AG1478 (EGFR tyrosine inhibitor), AG825 (HER2 tyrosine inhibitor), PP2 (Src family kinase inhibitor) or GM6001 (MMP inhibitor) pretreated for 2 h, the phosphorylation of HER2 and ERK1/2 were further analyzed. Finally, the altered migration and invasive capability of MCF-7 cells were detected by Transwell method. **Results** HER2 and ERK1/2 were activated in MCF-7 cells after E<sub>2</sub>, 4-OHT or G-1 treatment and these changes could be inhibited by G-15, AG1478, AG825, PP2 or GM6001 pretreatment. The enhancement of G-1-induced migration and invasion ability in MCF-7 cells could also be inhibited by those inhibitors too. **Conclusion** GPR30 promotes the migration and invasion of MCF-7 cells through activating HER2-ERK1/2 signal transduction pathway.

**[Key words]** breast neoplasms; G protein-coupled receptor 30; human epidermal growth factor receptor-2; cell movement; invasion

乳腺癌是全世界女性发病率第一的恶性肿瘤。内分泌治疗是雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性乳腺癌患者的主要治疗手段之一, 三苯氧胺 (tamoxifen, TAM) 是绝经前此类患者的最常用药物, 但其中约一半的患者最终对 TAM 耐药, 研究发现 ER 和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR/ErbB/HER) 信号系统之间的相互作用参与了耐药机制的形成<sup>[1]</sup>。ErbBs 系统包括配体和受体两大部分, 受体部分即 ErbBs 受体家族, 目前成员包括: EGFR/ErbB1、HER2/ErbB2、HER3/ErbB3、HER4/ErbB4。其中 HER2 在 25% ~

30% 的乳腺癌存在过表达, 该类乳腺癌表现为更具侵袭性且对内分泌治疗反应差。已有研究发现较长时间使用 TAM 后, 乳腺癌细胞发生 HER2 过表达且对 TAM 发生耐药<sup>[2]</sup>。

G 蛋白耦联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 属于 GPCR 家族成员, 由 G 蛋白耦联雌激素受体 (G protein-coupled estrogen receptor, GPER) 基因编码, 因其与雌激素有高度亲和力而被归类为新型 ER<sup>[3]</sup>。有研究发现, GPR30 和 EGFR 之间存在信号的正反馈, 导致乳腺癌的恶性表型增加且对内分泌治疗耐药<sup>[4-5]</sup>。GPR30 和 HER2 之间相关性的研究

This is trial version

\* 基金项目: 2013 年重庆市卫生局医学科研发资助项目 (2013-2-111)、2013 年重庆市渝中区科技计划项目 (20130144)。作者简介: 阮姝琴 (1978-), 副主任医师, 博士, 主要从事恶性肿瘤发病机制和个体化治疗的研究。通信作者: E-mail: sqquan@163.com。

www.adulpdf.com

仍少见报道, 仅在对乳腺癌组织样本的免疫组织化学研究中发现二者的表达存在正相关<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究发现, HER-3 的配体 heregulin-β1 增加了 GPR30 的表达并通过激活 HER2/HER3-MAPK/ERK 途径促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭, 并且这种效应不依赖于 ER 的表达状态<sup>[7-8]</sup>。本研究将探讨在非过表达 HER2 的乳腺癌 MCF-7 细胞中激活 GPR30 后, HER2 及其下游信号分子的变化, 并进一步检测 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的改变, 旨在为乳腺癌转移及内分泌耐药的形成机制提供新的解释。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞株: 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 使用添加 10% 胎牛血清 (FBS) 的 MEM 培养液, 培养于含 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度 37 °C 恒温培养箱中, 每隔 2~3 d 传代。(2)主要试剂: MEM 培养液购自 GIBCO。GPR30 兔抗人多克隆抗体和 ERK2 兔抗人多克隆抗体购自 ABCAM 公司, HER2 兔抗人单克隆抗体、磷酸化 Erk1 (pT202/pY204)/Erk2 (pT185/pY187) 兔抗人单克隆抗体、磷酸化 EGFR (pY1068) 兔抗人单克隆抗体购自 Epitomics 公司, 磷酸化 HER2 兔抗人单克隆抗体 (pY1221/pY1222) 购自 CST 公司。EGFR 兔抗人多克隆抗体购自 Biovision; α-tubulin 鼠抗兔单克隆抗体购自 Beyotime。17-β-雌二醇 (E<sub>2</sub>)、TAM 的活性代谢产物 (4-OHT)、HER2 酪氨酸激酶抑制剂 (AG825)、Src 家族激酶抑制剂 (PP2)、MMP 抑制剂 (GM6001) 购自 Sigma-Aldrich; EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (AG1478) 购自 CST; GPR30 激动剂 (G-1) 和抑制剂 GPR30 拮抗剂 (G-15) 购自 Merck。M-PER 哺乳动物蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白分析试剂盒购自 Thermo scientific, 毛细管电泳-电化学发光法 (EZ-ECL) 检测试剂盒 (ECL A 液 + ECL B 液) 购自 Bioind, Transwell 小室购自 Millipore, Matrigel 购自 BD。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 法检测蛋白表达 按说明书提取各细胞株总蛋白, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作说明测定蛋白浓度, 样品均定量为 5 g/L, 每条泳道上样 60 μg 蛋白, 经 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电压 80 V 经 80 min 电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 120 min, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。TBST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) 洗膜后, 用二抗室温孵育 90 min, TBST 清洗, ECL 发光并以凝胶显像仪显像。

1.2.2 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力 细胞用只含 1% FBS 的无酚红培养基培养 24 h 后, 再换用加入处理药物的无酚红无血清培养基培养 24 h。接下来, 细胞被胰酶消化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗并用相应的含有 1% 牛血清清蛋白 (BSA) 的培养基重悬。以总细胞数 1 × 10<sup>5</sup> 的 200 μL 并含有处理药物的培养基加于 Transwell 小室的上室, 下室也加入含有 10% FBS 的 400 μL 无酚红培养基, 并在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下孵育 48 h。侵袭实验与迁移实验不同之处在于上室的聚碳酸酯膜上表面预先用 40 μL Matrigel (以 matrigel : 培养基为 1 : 3 的比例配制) 包被。在孵育 48 h 后, 先将上室的多余培养基小心吸出, 然后将上室浸入 4% 多聚甲醛固定 25 min, 再浸入 0.1% 结晶紫内染色 30 min, 接着用小棉签小心擦净上室膜上表面, 而下表面附着的细胞则为穿膜的细胞, 再在倒置显

微镜下选择 8 个视野计数, 取其平均数进行分析。

1.2.3 不同药物处理后 MCF-7 细胞的 HER2 磷酸化水平检测 (1) 分别用 10 nmol/L E<sub>2</sub>、100 nmol/L TAM 代谢活性产物 4-OHT 及 1 μmol/L GPR30 特异性激动剂 G-1, 1 μmol/L GPR30 的特异性拮抗剂 G-15 处理 MCF-7 细胞, 48 h 后检测 HER2 磷酸化水平; (2) 先用 G-15 预处理 2 h 后, 再加入 E<sub>2</sub>、4-OHT 或 G-1 处理 MCF-7 细胞, 48 h 后检测 HER2 磷酸化水平; (3) 先用 10 μmol/L 的 AG1478、AG825、PP2 或 GM6001 预处理 2 h 后, 再加入 G-1 处理 MCF-7 细胞, 48 h 后检测 EGFR、HER2 和 ERK1/2 的磷酸化水平; (4) 用 G-1 处理 MCF-7 细胞, 在 0、10、20、30、45、60 min 后分别检测 EGFR、HER2 和 ERK1/2 的磷酸化水平。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 GraphPad Prism 5 进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 不同处理组间的多重比较选用 Two-way ANOVA 方法, 在此基础上的两两比较选用 Newman-Keuls 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPR30 信号在乳腺癌细胞 MCF-7 中反式激活 HER2 MCF-7 细胞同时表达经典 ER 和 GPR30, 但不过表达 HER2, 用 10 nmol/L E<sub>2</sub>、100 nmol/L TAM 代谢活性产物 4-OHT, 以及 1 μmol/L GPR30 特异性激动剂 G-1 处理 MCF-7 细胞后, HER2 磷酸化水平均增加, 但是 1 μmol/L GPR30 的特异性拮抗剂 G-15 并没有引起这种变化 (图 1)。在用 G-15 预处理 2 h 后, 加入 4-OHT 或 G-1 均未引起 HER2 磷酸化增加, 而 E<sub>2</sub> 引起的 HER2 磷酸化也被部分抑制, 见图 2。

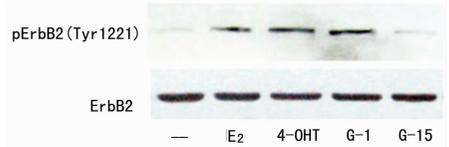


图 1 不同药物处理 48 h 后 HER2 磷酸化水平

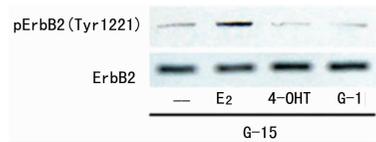


图 2 G-15 预处理后再用不同药物处理 48 h 后的 HER2 磷酸化水平

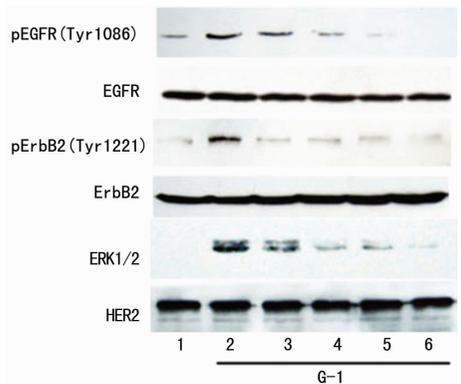


图 3 GPR30 信号在 MCF-7 细胞激活 HER2-ERK1/2 途径

1. EGFR 参与了 GPR30 反式激活 HER2 的机制 EGFR

酪氨酸激酶抑制剂 AG1478 不仅抑制了 G-1 引起的 EGFR 激酶活性及其下游的 ERK1/2 激活,同时也部分抑制了 G-1 引起的 HER2 磷酸化。而 HER2 酪氨酸激酶抑制剂 AG825 虽然明显抑制了 HER2 的激活,但仅部分抑制了 G-1 引起的 EGFR 和 ERK1/2 磷酸化。实验还发现 Src 家族激酶抑制剂 PP2 或 MMP 抑制剂 GM6001 不仅部分抑制了 G-1 引起的 EGFR 酪氨酸激酶磷酸化,也部分抑制了 G-1 引起的 HER2 激活(图 3)。而 G-1 引起 EGFR、HER2 和 ERK1/2 的持续激活,在加入 G-1 后 10 min 即能检测到并维持至少 2 h。GPR30 信号在 MCF-7 细胞引起 EGFR、HER2、ERK1/2 的持续激活,见图 4。

**2.3 GPR30 信号对 HER2 的激活促进 MCF-7 细胞的迁移和侵袭** G-1 能明显促进 MCF-7 细胞的迁移和侵袭( $P < 0.05$ );

而用 G-15、AG1478、AG825、PP2 或 GM6001 预处理 2 h 后, G-1 促进 MCF-7 细胞迁徙和侵袭的能力受到部分抑制( $P < 0.05$ ),见图 5、6。

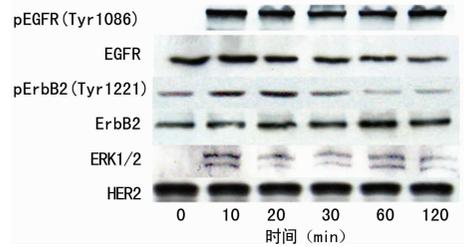


图 4 GPR30 信号在 MCF-7 细胞引起 EGFR、HER2、ERK1/2 的持续激活

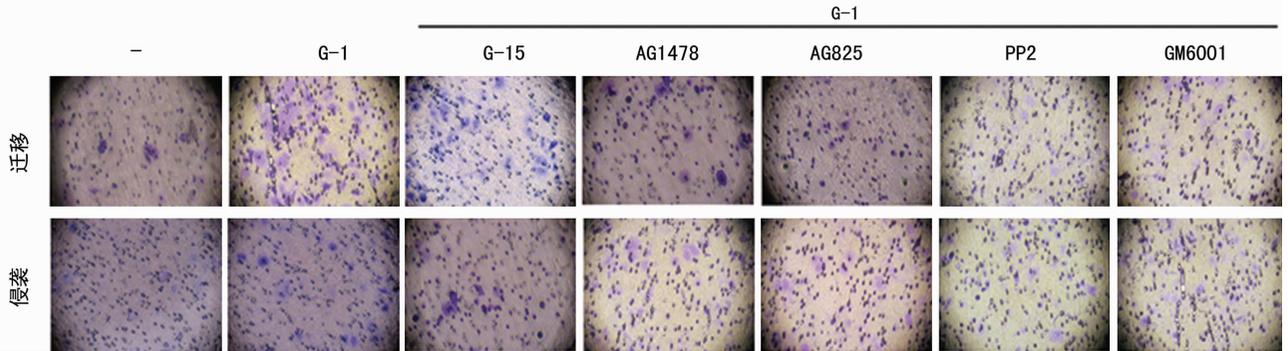
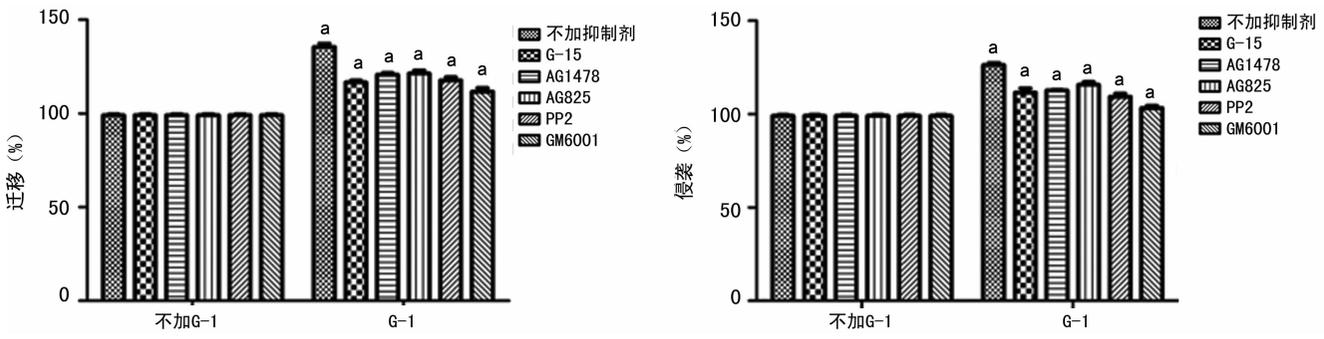


图 5 G-1 和各种信号通路抑制剂对 MCF-7 细胞迁移和侵袭能力的影响



a:  $P < 0.05$ ,与不加 G-1 比较。

图 6 GPR30 信号促进 MCF-7 细胞迁移和侵袭

**3 讨 论**

GPR30 属于 GPCR,雌激素或其他配体与其结合后,后者被激活并活化其耦联 G 蛋白,解离出  $\alpha\beta\gamma$  亚基进而激活 Src 相关酪氨酸激酶,接着活化基质金属蛋白酶(MMPs)促使肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)释放,后者反式激活 EGFR,随后快速活化 MAPKs-ERK1/2 和 PI3K/Akt 途径,继而参与细胞的增殖、迁移和分化等<sup>[9]</sup>。已有研究在宫颈癌和乳腺癌细胞中发现 EGFR 的配体 EGF、转化生长因子(TGF)- $\alpha$  能通过 EGFR-MAPK 信号途径上调 GPR30 的表达<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究证实 HER3 的配体 heregulin $\beta$ -1 能通过 HER2/HER3-MAPK/ERK 通路上调 GPR30 表达<sup>[7-8]</sup>。本研究中进一步发现 GPR30 不仅能反式激活 EGFR,也能在 EGFR 参与下激活 HER2 及其下游 MAPK/ERK 信号途径。因此,在 EGFR 系统和 GPR30 之间存在信号的正反馈,不断放大下游信号。大量的文献已经证明雌激素能激活 EGFR 和 HER2<sup>[1]</sup>。与经典 ER 不同的是, $E_2$  和 TAM 都是 GPR30 的激动剂,因此在表达

GPR30 的 ER 阳性的乳腺癌细胞,TAM 作为 ER 的拮抗剂仍然可以激活 GPR30,导致雌激素相关的信号应答,从而对 TAM 耐药<sup>[10-11]</sup>。

HER2 的配体迄今为止还未被发现,仍是孤儿受体。在 HER2 过表达的细胞,HER2 能自身形成同二聚体激活下游信号途径。在非过表达 HER2 的细胞,HER2 也能和其他 HER 家族成员形成功能性的异二聚体<sup>[12]</sup>。如为了获得完全的癌基因能力,HER2 可以和 EGFR 形成异二聚体发生相互作用从而激活下游信号途径<sup>[13]</sup>。有研究发现,让 MCF-7 细胞过表达 HER2 后,ER 和 EGFR(或 HER2)受体间的相互激活增加从而导致了下游信号途径的进一步激活,最终对 TAM 抑制作用的应答减少<sup>[11]</sup>。本研究结果提示,在 HER2 并不过表达的乳腺癌细胞,GPR30 信号引起的 HER-2 磷酸化需要 EGFR 激酶活性的参与。有研究表明,GPCR 可以调节 HER2 表达导致 HER2 激活增加。在人乳腺癌组织中,HER2 表达和 GPR30 呈正相

关<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究结果表明,HER2 上调 GPR30 表达与 ER 状态无关。在本研究中,GPR30 信号并不上调 HER2 表达,但能激活 HER2。过去的研究主要集中于 HER 表达水平改变的生物学意义,但 HER 酪氨酸激酶磷酸化才是该类受体活化并发挥生物学功能的信号标志,因此活化形式的受体比受体本身的表达水平能传达更多的信息。如磷酸化形式的人类 EGFR 可能与乳腺癌患者预后潜在的作用。单因素分析研究发现,磷酸化的 EGFR(pEGFR)、HER2 和 HER3 与较差的无病生存率呈正相关<sup>[14]</sup>。在 HER2 阴性和 HER2 阳性患者中比较,磷酸化 HER2 与总生存期显著负相关。在淋巴结阳性患者中,磷酸化的 HER2 对预后判断也有价值<sup>[13]</sup>。因此,GPR30 信号激活 HER2 应该对乳腺癌的生物学行为的影响具有更重要的意义。本课题前期对乳腺癌术后病理组织的研究,揭示 GPR30 与磷酸化 HER2 的表达呈强相关性,且 GPR30 和磷酸化 HER2 表达在淋巴结转移组明显高于淋巴结未转移组<sup>[15]</sup>。本研究发现在 MCF-7 细胞中,GPR30 信号引起 EGFR、HER2 及 ERK1/2 持久的激活,并促进了 MCF-7 细胞的迁移和侵袭。

因此,雌激素信号系统和 ErbBs 之间存在复杂的反馈机制,本研究将有助于理解两个系统之间的相互作用现象和乳腺癌内分泌治疗耐药机制,并为建立新的乳腺癌治疗方法和途径提供新的理论基础。

#### 参考文献

[1] Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer[J]. *Annu Rev Med*, 2011, 62(1): 233-247.

[2] Cui JJ, Germer K, Wu TY, et al. Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 21(72): 5625-5634.

[3] Zimmerman MA, Budish RA, Kashyap S, et al. GPER-novel membrane oestrogen receptor[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(12): 1005-1016.

[4] Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, et al. Cross-talk between GPER and growth factor signaling[J]. *J Steroid Biochem*, 2013, 137(18): 50-56.

[5] Sjostrom M, Hartman L, Grabau D, et al. Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer[J]. *Brest Cancer Res Tr*, 2014, 145(1): 61-71.

[6] Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression[J]. *Clin Cancer*

*Res*, 2006, 12(21): 6359-6366.

[7] Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, et al. Heregulin- $\beta$ 1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2): 385-390.

[8] Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH, et al. Regulation of HRG- $\beta$ 1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 131-138.

[9] Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, 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.

[10] Marjon NA, Hu C, Hathaway HJ, et al. G protein-coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(11): 1644-1654.

[11] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer[J]. *J Natl Cancer I*, 2004, 12(96): 926-935.

[12] Johnston S, Basik M, Hegg R, et al. Inhibition of EGFR, HER2, and HER3 signaling with AZD8931 in combination with anastrozole as an anticancer approach: Phase II randomized study in women with endocrine-therapy-naive advanced breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 160(1): 91-99.

[13] DeFazio-Eli L, Strommen K, Trang DP, et al. Quantitative assays for the measurement of HER1-HER2 heterodimerization and phosphorylation in cell lines and breast tumors; applications for diagnostics and targeted drug mechanism of action[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 2(13): 1-18.

[14] Frogne T, Laenkhholm AV, Lyng MB, et al. Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): 1-14.

[15] 阮姝琴, 李刚, 王善伟, 等. 乳腺癌 GPR30、HRG1 和 HER2 表达与淋巴结转移关系的研究[J]. *重庆医学*, 2015, 44(7): 878-880.

(收稿日期: 2016-08-18 修回日期: 2016-11-01)

欢迎投稿 欢迎订阅

www.adulpdf.com