

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.006

BPA 激活 GPER-EGFR-ERK1/2 信号通路诱导乳腺癌细胞增殖

茅昌飞¹ 唐金海^{1△} 孙大伟² 吴建中¹

(1 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院 江苏 南京 210009; 2 南京中医药大学 江苏 南京 210023)

摘要 目的: 研究雌激素 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)-表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路在双酚 A 促乳腺癌细胞 SKBR-3 增殖中的作用。**方法:** 采用 CCK8 试剂盒检测 SKBR-3 细胞的增殖情况, 利用 Western Blot 观察 ERK1/2 磷酸化变化。**结果:** 与对照组相比, $10^{-11} \sim 10^{-7}$ M 浓度的双酚 A 具有促乳腺癌细胞增殖作用, 10^{-9} M 浓度的双酚 A 可诱导细胞增殖最大效应(细胞活力高于对照组 38.84 %, $P < 0.001$); 预孵 GPER、EGFR、ERK1/2 特异性抑制剂 G15、AG-1478、PD98059 后, 双酚 A 诱导的乳腺癌细胞增殖明显减少, 细胞活力与单纯双酚 A (10^{-9} M) 处理相比降低约 14.27 %、12.23 % 和 17.98 % ($P < 0.05$); 双酚 A (10^{-9} M) 处理细胞 0.5、1、3 小时后, 发现磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK)的表达明显高于对照组, 双酚 A 可快速激活 ERK1/2; 而阻断 GPR30 和 EGFR 后, ERK1/2 的磷酸化表达减少。**结论:** 双酚 A 诱导的乳腺癌细胞增殖可能与 GPR30-EGFR-ERK1/2 信号通路有关, 但不是唯一通路。深入研究双酚 A 对促进乳腺癌细胞增殖机制, 可能为乳腺癌的防治提供新的方向。

关键词: 双酚 A; GPER; 乳腺癌; 细胞增殖

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)06-1024-04

Involvement of GPER-EGFR-ERK1/2 in Bisphenol A Induced Breast Cancer Cell Proliferation

MAO Chang-fei¹, TANG Jin-hai^{1△}, SUN Da-wei², WU Jian-zhong¹

(1 Nanjing Medical University, Affiliated Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210009, China;

2 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210023, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Bisphenol A on the proliferation of human breast cancer cells (SKBR-3) via GPER-EGFR-ERK1/2 signaling pathway. **Methods:** CCK8 assay was used to detect the proliferation of SKBR-3 cells, and Western Blotting was applied to observe phosphorylation of ERK1/2. **Results:** Cell proliferation increased significantly with treatment of $10^{-11} \sim 10^{-7}$ M BPA after 24 h, and 10^{-9} M BPA can induce cell proliferation maximum effect (cell viability higher approximately 38.84 % compared with the control, $P < 0.001$); with pre-incubation of G15, AG-1478 and PD98059 (specific antagonist of GPER, EGFR and ERK1/2), cell proliferation decreased remarkably. Cell viability had a decrease of approximately 14.27 %, 12.23 % and 17.98 % compared with BPA (10^{-9} M) treatment ($P < 0.05$); 0.5, 1, 3 h after BPA (10^{-9} M) treatment, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) expression increased significantly, indicating that ERK 1/2 was activated rapidly; after blocking GPR30 and EGFR, ERK 1/2 phosphorylation decreased. **Conclusions:** GPR30-EGFR-ERK 1/2 signaling pathway was involved in BPA-induced breast cancer cell proliferation. In-depth research of BPA to breast cancer cell proliferation may provide a new direction for the prevention and treatment of breast cancer.

Key words: Bisphenol A; GPER; Breast cancer; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1024-04

前言

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一类人工合成聚碳酸酯塑料, 被广泛制造用于食品包装材料、婴儿奶瓶、牙科固封剂等^[1]。根据美国 NIH 报道, 95 % 的人群长期连续暴露于双酚 A, 其血液中的浓度为 0.3~3 ng/ml^[2]。近年来的研究显示, 双酚 A 是一

种环境内分泌干扰物, 具有拟雌激素效应, 可以通过结合雌激素受体干扰正常生物体神经、生殖、内分泌、免疫等系统^[3-7], 产生可逆或不可逆的生物学效应。

流行病学调查显示, 约 80 % 的癌症与环境因素密切相关^[8]。乳腺癌作为女性发病率最高的肿瘤, 于近 20 年间呈增长趋势, 有研究表明双酚 A 可能是乳腺癌发生的潜在危险因^[9]。大量的研究证据表明幼年时暴露在双酚 A 的环境中会增加其成年后患乳腺癌的危险, 这种危险会一直持续到青春期和成年后, 且后天渐进性的接触过程会造成乳腺上皮细胞的增生分化^[10]。动物实验发现双酚 A 在乳腺癌中的潜在作用, 出生前就暴露于低剂量双酚 A 中会扰乱乳腺组织结构, 并增加了乳腺癌

作者简介: 茅昌飞 (1988-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 乳腺癌的个体化治疗, 电话: 025-83283588, E-mail: changfeimao@126.com

△通讯作者: 唐金海, 电话 025-83283588,

E-mail: lfmcfd@126.com

(收稿日期: 2014-05-22 接受日期: 2014-06-20)

的患病风险^[1]。但目前有关双酚 A 诱导乳腺癌等雌激素依赖性肿瘤的发生机制还不清楚。

雌激素 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)是一种新型的雌激素膜受体,可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。有研究表明 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^[2]。GPR30 可以介导羟泰米芬或 E2 诱导的 EGFR-MAPK/ERK 信号转导级联反应,同时增强 c-fos 表达从而间接参与子宫内膜癌细胞的增殖过程^[3]。但是有关双酚 A 与 GPR30 的具体作用机制及其可能的信号传导通路目前尚未明确。

本研究利用 GPER-EGFR-ERK 信号通路特异性拮抗剂 G15、AG-1478 和 PD98059 探讨双酚 A 对 GPR30 阳性、ERs 阴性的乳腺癌细胞 SKBR-3 的生长增殖影响及其分子机制,为研究双酚 A 诱导乳腺癌提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SKBR-3 细胞系购美国模式培养物集存库(ATCC)。无酚红高糖 DMEM 培养基(HyClone),胎牛血清(HyClone)。GPER 特异性拮抗剂 G15 (Tocris)、EGFR 特异性拮抗剂 AG-1478(Sigma)、ERK 特异性拮抗剂 PD98059 (CST)、CCK-8 试剂盒(DOJINDO)。p-ERK 抗体 (CST, 1:1000)、ERK 抗体(CST, 1:1000)、 β -actin 抗体 (Sigma, 1:5000)、山羊抗兔 IgG 抗体(Jackson, 1:100000)。二氧化碳培养箱(Thermo),多功能酶标仪(Tecan),凝胶成像仪(Bio-rad)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 SKBR-3 细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 37℃, 5%CO₂ 培养箱内培养。由于酚红含有弱刺激作用,在临实验前 4 天,将培养基换成不含酚红的 10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基。

1.2.2 CCK-8 实验 取对数生长期细胞,胰酶消化后,每孔 2000 个细胞的浓度种于 96 孔板,每孔加 100 μ L 无酚红含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。待细胞完全贴壁 24 小时后,给予 10⁻¹²、10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ 和 0 M 浓度的双酚 A 刺激。另设实验组,预孵 GPER 拮抗剂 G15(10 μ M)、EGFR 拮抗剂 AG-1478(10 μ M)、ERK 拮抗剂 PD98059(10 μ M)1 小时后加入双酚 A(10⁻⁹ M)和 0 M 双酚 A 组。设空白调零组(不加拮抗剂和处理药物,只加培养基),每组设 8 个复孔。连续培养 24 小时后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂。置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中孵育 2 小时后,酶标仪测定各孔光密度值(测定波长 450 nm),计算细胞活力。

1.2.3 Western Blot 待细胞长至 80%~90%后,给予 10⁻⁹ M 浓度的双酚 A 刺激 0.5、1、3 小时,和预孵 GPER 拮抗剂 G15(10 μ M)、EGFR 拮抗剂 AG-1478(10 μ M)1 小时后加入双酚 A(10⁻⁹ M)刺激 1 小时后,即终止药物作用。PBS 清洗后,提取总蛋白(裂解液中按 1:100 加入 cocktail)并用 BSA 试剂盒测量蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶粉室温封闭后,分别用 p-ERK、ERK 兔单抗 (1:1000)

4℃孵育过夜。TBST 漂洗后,用山羊抗兔(1:100000)室温孵育 2 小时。孵育 ECL 发光液,置于凝胶成像仪照相。图片采用 Image J 软件进行灰度值测定。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

各组实验数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析 2 组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,组间比较及组与对照组比较用 Student-Newman-Keuls (SNK)检验 Dunnett- 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 低剂量的双酚 A 诱导 SKBR-3 细胞增殖

将不同浓度的双酚 A(10⁻¹²~10⁻⁶ M)与 SKBR-3 细胞共同孵育 24 小时后,用 CCK-8 试剂盒检测细胞的增殖情况。与对照组相比,10⁻¹¹~10⁻⁷ M 浓度的双酚 A 可引起细胞增殖(差异具有统计学意义, $P<0.05$),生长曲线呈倒 U 型。10⁻⁹ M 浓度的双酚 A 可诱导细胞增殖最大效应(细胞活力高于对照组约 38.84%, $P<0.001$)。详见图 1。

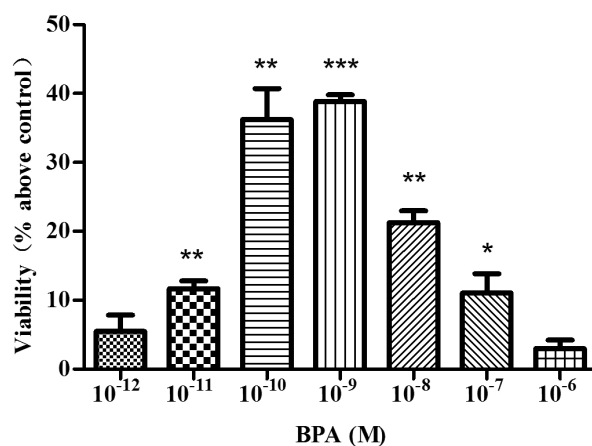


图 1 CCK8 检测 10⁻¹²~10⁻⁶ M 的双酚 A 对 SKBR-3 细胞的增殖影响

Fig. 1 CCK8 detected the effect of BPA(10⁻¹²~10⁻⁶ M) on SKBR-3 proliferation

注:*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$, 与对照组相比。

Note: *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$, compared with the control.

2.2 GPER-EGFR-ERK 信号通路参与调控双酚 A 诱导的细胞增殖

预孵 GPER 拮抗剂 G15 (10 μ M)、EGFR 拮抗剂 AG-1478 (10 μ M)、ERK 拮抗剂 PD98059(10 μ M)1 小时后,再用双酚 A(10⁻⁹ M)处理 24 小时。结果显示 G15、AG-1478 和 PD98059 可抑制双酚 A 诱导的细胞增殖。细胞活力与单纯双酚 A(10⁻⁹ M)处理相比降低约 14.27%、12.23%和 17.98% ($P<0.01$)。详见图 2。

2.3 双酚 A 激活 GPER-EGFR-ERK 信号通路

双酚 A(10⁻⁹ M)处理细胞 0.5、1、3 小时后,发现磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK)的表达明显高于对照组。在双酚 A 处理 1 小时, p-ERK 表达量最高 ($P<0.001$), 是对照组的 2.57 倍。详见图 3。

预孵 G15(10 μ M)、AG-1478(10 μ M)1 小时后,再用双酚 A(10⁻⁹ M)处理细胞 1 小时发现,与双酚 A(10⁻⁹ M)单独处理组

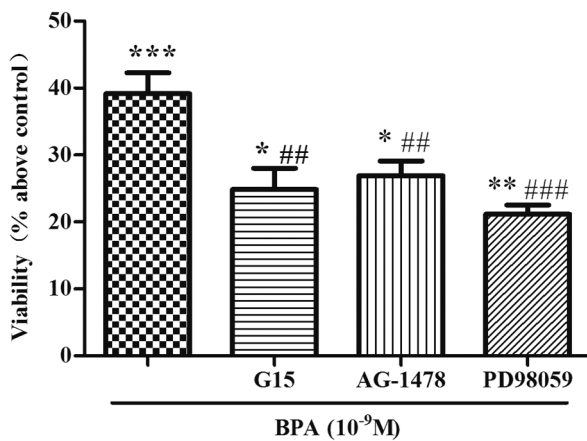


图2 CCK8 检测 G15、AG-1478、PD98059 预处理后双酚 A 对 SKBR-3 细胞的增殖影响

Fig. 2 CCK8 detected the effect of BPA(10^{-9} M) on SKBR-3 proliferation with pre-incubation of G15, AG-1478 and PD98059

注:***: $P < 0.001$, 与对照组相比; ##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$, 与双酚 A 单独处理组相比。

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, compared with the control; ##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$, compared with only-BPA.

相比, p-ERK 表达减少, 分别降低约 28.3 % 和 32.4 %, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 4。

3 讨论

双酚 A 作为环境内分泌干扰物与肥胖, 多囊性卵巢综合症, 反复性流产, 子宫内膜过度增生和雌激素依赖性肿瘤密切相关^[14,15]。研究表明双酚 A 在 10^{-12} ~ 10^{-6} M 的浓度下, 可促进细胞的增殖^[16,17], 其促增殖作用呈现倒 "U" 型。在 nM 级浓度的双酚 A 可以使细胞增殖达高峰, 而大于 10^{-5} M 浓度的双酚 A 可引起细胞的凋亡, 这与本研究结果相似。本实验通过不同浓度的双酚 A 对 GPR30 阳性的乳腺癌细胞 SKBR-3 处理, 确定了 10^{-11} ~ 10^{-7} M 浓度的双酚 A 具有促乳腺癌细胞增殖作用, 且 GPR30 参与双酚 A 诱导的乳腺癌增殖作用。

有研究表明新型的雌激素受体 GPR30 能独立介导雌激素激活 EGFR^[18], 通过 EGFR-ERK1/2 信号通路发挥生物学效应^[19]。Albanito 等研究发现, 环境雌激素能通过 GPR30-EGFR-MAPK 信号转导途径激活 c-fos 的表达, 从而引起卵巢癌细胞的增殖^[20]。本研究发现, 预孵 GPER、EGFR、ERK1/2 特异性拮抗剂 G15、AG-1478、PD98059 后, 双酚 A 诱导的乳腺癌细胞增殖有所减少, 但仍高于对照组。这表明, 可能与 GPR30-EGFR-ERK1/2 信号通路有关, 但不是唯一通路。

在进一步证明 GPR30-EGFR-ERK1/2 信号通路参与双酚 A 的促增殖作用中, 我们发现双酚 A 可快速激活 ERK1/2。双酚 A 处理 1 小时后, ERK1/2 的磷酸化表达最多。阻断 GPR30

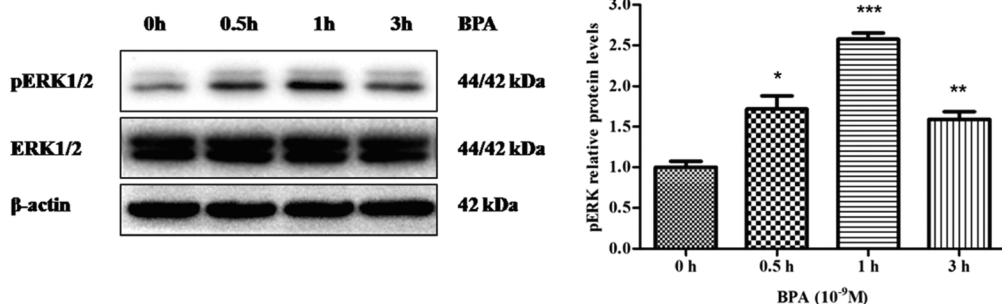


图3 Western bot 检测双酚 A 对 SKBR-3 细胞的 pERK 表达的影响

Fig. 3 Western bot detected the effect of BPA(10^{-9} M) on the expression of pERK in SKBR-3

注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, 与对照组相比。

(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, compared with the control).

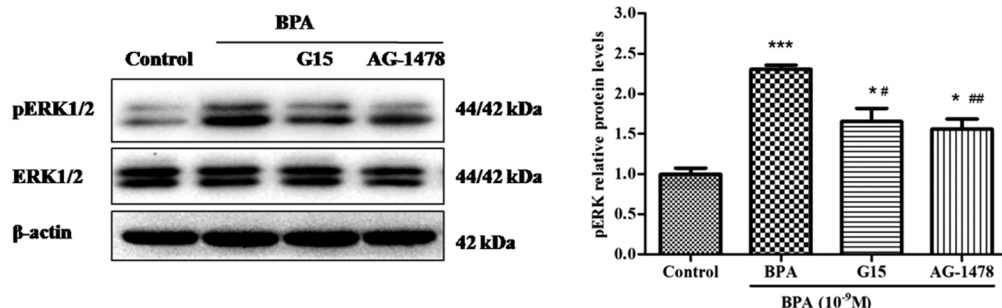


图4 Western bot 检测 G15、AG-1478、PD98059 预处理后双酚 A 对 SKBR-3 细胞的 pERK 表达的影响

Fig. 4 Western bot detected the effect of BPA(10^{-9} M) on the expression of pERK in SKBR-3 with pre-incubation of G15, AG-1478 and PD98059

注:***: $P < 0.001$, 与对照组相比; #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$, 与双酚 A 单独处理组相比。

(***: $P < 0.001$, compared with the control; ##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$, compared with only-BPA)

和 EGFR 后, ERK1/2 的磷酸化表达也相应减少。本研究证明了双酚 A 通过激活 GPER-EGFR-ERK 信号通路, 诱导乳腺癌细胞增殖, 但相互之间关系及具体的机制仍需进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol a (bpa)[J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(2): 139-177
- [2] Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenola[J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(8): 1055-1070
- [3] Berger RG, Shaw J, deCatanzaro D. Impact of acute bisphenol-a exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol[J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 26(2): 94-99
- [4] Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, et al. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-a induces mammary intraductal hyperplasias in adult cd-1 mice [J]. *Reproductive toxicology*, 2008, 26(3-4): 210-219
- [5] Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, et al. In vivo effects of bisphenol a in laboratory rodent studies [J]. *Reproductive toxicology*, 2007, 24(2): 199-224
- [6] Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, et al. Bisphenol a exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse[J]. *PLoS genetics*, 2007, 3 (1): e5
- [7] vom Saal FS, Nagel SC, Timms BG, et al. Implications for human health of the extensive bisphenol a literature showing adverse effects at low doses: A response to attempts to mislead the public [J]. *Toxicology*, 2005, 212(2-3): 244-252, author reply 253-244
- [8] Hatagima A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility [J]. *Cadernos de saude publica*, 2002, 18(2): 357-377
- [9] Yang M, Ryu JH, Jeon R, et al. Effects of bisphenol a on breast cancer and its risk factors[J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(3): 281-285
- [10] Weng YI, Hsu PY, Liyanarachchi S, et al. Epigenetic influences of low-dose bisphenol a in primary human breast epithelial cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 248(2): 111-121
- [11] Durando M, Kass L, Piva J, et al. Prenatal bisphenol a exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in wistar rats[J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(1): 80-86
- [12] Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, et al. Gpr30 predicts poor survival for ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(3): 465-471
- [13] Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, et al. The g protein-coupled receptor gpr30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(3): 631-646
- [14] Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. Iii. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol a at levels of human exposure[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(6 Suppl): S56-69
- [15] Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, et al. Developmental exposure to estradiol and bisphenol a increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5624-5632
- [16] Suzuki T, Nakagawa Y, Takano I, et al. Environmental fate of bisphenol a and its biological metabolites in river water and their xeno-estrogenic activity [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38 (8): 2389-2396
- [17] Sheng ZG, Zhu BZ. Low concentrations of bisphenol a induce mouse spermatogonial cell proliferation by g protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha [J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119 (12): 1775-1780
- [18] Filardo EJ, Quinn JA, 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
- [19] Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling [J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1625-1630
- [20] Albanito L, Lappano R, Madeo A, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(12): 1648-1655