

雌激素促进 ER 阴性乳腺癌细胞中 IL-6 的表达

王 健*,徐 杰,安雪青,吕健东

(天津市第五中心医院普外科,天津 300450)

[摘要] 目的:探讨雌激素作用下 G 蛋白偶联雌激素受体(G-protein coupled estrogen receptor, GPER)信号通路的活化对 ER 阴性乳腺癌细胞中白介素(interleukin, IL)-6 表达的影响。方法:药物处理 SKBR-3 与 MDA-MB-453 细胞后,实时定量荧光 PCR 法检测细胞中 IL-6 mRNA 的变化,ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-6 的分泌量,Western blot 法检测细胞中 p-ERK 与 p-AKT 的蛋白表达水平。结果:17- β 雌二醇(E2)和 GPER 特异性激动剂(G1)显著促进 SKBR-3 与 MDA-MB-453 细胞中 IL-6 的 mRNA 表达以及细胞上清液中 IL-6 的分泌量,GPER 特异性拮抗剂(G15)可显著抑制以上变化($P < 0.05$)。E2 及 G1 药物处理 SKBR-3 细胞后显著活化细胞内 GPER/AKT 信号通路以及 GPER/ERK 信号通路($P < 0.05$),上调 p-AKT 与 p-ERK 的蛋白表达水平,p-AKT 的相对表达量分别为对照组的(4.16 ± 0.65)、(3.21 ± 0.45)倍,p-ERK 分别为对照组的(2.87 ± 0.42)、(2.64 ± 0.24)倍,在 MDA-MB-453 细胞中也可得到类似结果。用 MEK 特异性抑制剂(U0126)可明显阻断 E2 及 G1 所引发的 IL-6 表达变化($P < 0.05$),PI3K 特异性抑制剂(Wortmannin)则不能。结论:雌激素可促进 ER 阴性乳腺癌细胞中 IL-6 的 mRNA 表达及细胞上清液中 IL-6 的分泌量,其机制可能与 GPER/ERK 信号通路的上调有关,由 GPER 介导的炎症微环境可能在 ER 阴性乳腺癌进展中发挥重要作用。

[关键词] 雌激素;GPER/ERK 信号通路;ER 阴性乳腺癌;白介素-6

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-309-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150303

Estrogen enhances expression of interleukin-6 in ER-negative breast cancer cells

Wang Jian*, Xu Jie, An Xueqing, Lü Jiandong

(Department of General Surgery, The 5th Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of activated G-protein coupled estrogen receptor(GPER) signaling pathway induced by estrogen on the production of interleukin-6(IL-6) in ER-negative breast cancer cells. **Methods:** After treatment of SKBR-3 and MDA-MB-453 cells, the expression of IL-6 mRNA was measured by Real-time qPCR. The secretion of IL-6 in supernatant was detected by ELISA. The protein expression level of p-ERK and p-AKT was determined by Western blot. **Results:** 17- β estradiol (E2) and GPER specific agonist (G1) significantly increased the mRNA expression of IL-6 in SKBR-3 and MDA-MB-453 cells, which could be blocked by GPER specific antagonist(G15). After treatment with E2 and G1, GPER/ERK and GPER/AKT signaling pathways were remarkably activated to promote the protein expression of p-ERK and p-AKT($P < 0.05$). The relative protein expressions of p-AKT and p-ERK in the E2 and G1 treatment groups were (4.16 ± 0.65), (3.21 ± 0.45) and (2.87 ± 0.42), (2.64 ± 0.24) times than those of the control group, respectively, and the same results were obtained in MDA-MB-453 cells. Interestingly, these changes induced by E2 and G1 were significantly blocked by the MEK inhibitor U0126 rather than PI3K inhibitor Wortmannin ($P < 0.05$). **Conclusion:** Estrogen enhances the expression and secretion of IL-6 in ER (-) breast cancer cells, which may associates with the up-regulation of GPER/ERK signaling pathway, and the inflammatory microenvironment mediated by GPER may play an important role in the development of ER(-) breast cancer.

[Key words] estrogen; GPER/ERK signaling pathway; ER-negative breast cancer; interleukin-6

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03):309-314]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81202275);天津市自然科学基金(13JCQNJC11000)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:wangjian120@126.com

雌激素在乳腺癌的发生发展中具有重要作用,经典的雌激素效应主要由核雌激素受体(estrogen receptors, ER)介导。然而,近几年鉴定出一种在乳腺肿瘤细胞中广泛表达的新型独立作用的膜性雌激素受体 G 蛋白偶联雌激素受体(G-protein coupled estrogen receptor, GPER),雌激素可通过活化 GPER 激活其下游的快速非基因组信号通路(MAPK/ERK 与 PI3K/AKT)发挥促进细胞增殖、侵袭等生物学效应^[1-3],有望成为 ER 阴性乳腺癌潜在的内分泌治疗靶点。

炎症微环境是促进肿瘤进展的重要因素^[4],其中白介素(interleukin, IL)-6 水平的异常升高扮演着重要角色,同时也预示着不良预后^[5]。有研究者发现,子宫内膜癌患者血清中的 IL-6 水平与体内雌激素水平呈现正相关,提示雌激素信号可能与 IL-6 表达之间存在调控网络,并且 IL-6 参与子宫内膜癌生物学行为的调控,促进肿瘤增殖、生存、侵袭等^[6]。因此,本文推测:在 ER 阴性的乳腺癌中,雌激素可能通过活化 GPER 调控 IL-6 的表达。本研究拟利用 17- β 雌二醇(E2)、GPER 特异性激动剂(G1)^[7]及 GPER 特异性拮抗剂(G15)^[8]等小分子化合物探讨 GPER 信号通路的活化对 ER 阴性乳腺癌细胞系 SKBR-3 与 MDA-MB-453 中 IL-6 表达的影响及可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SKBR-3、MDA-MB-453 细胞系购自中国科学院上海细胞库。高糖 DMEM 培养基、高糖 RPMI-1640 培养基、南美胎牛血清(Gibco 公司,美国);17- β 雌二醇 E2、GPER 特异性激动剂 G1 及 GPER 特异性拮抗剂 G15(Sigma 公司,美国),MEK 抑制剂 U0126 及 PI3K 抑制剂 Wortmannin(WM, 杭州碧云天公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天公司),IL-6 ELISA 试剂盒(武汉博士德公司),总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本),荧光定量 PCR 试剂盒(BioTeKe 公司,美国);GPER 抗体(Abcam 公司,美国),p-ERK 抗体、t-ERK 抗体、p-AKT 抗体、t-AKT 抗体及山羊抗兔 IgG 抗体(Bioworld 公司,美国)。凝胶成像仪、SDS-PAGE 蛋白电泳仪和蛋白转膜仪(上海天能公司),二氧化碳培养箱(Thermo 公司,美国),多功能酶标仪(Sunrise 公司,日本),MiniOpticon 实时 PCR 仪和稳压 DNA 电泳仪(BioRad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MDA-MB-453 细胞培养于含 20%胎牛血清的高糖 RPMI-1640 培养基中,SKBR-3 细胞培养于 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 培养箱内生长,隔日换液,待细胞密度生长至 90%左右时用 0.25%胰酶消化离心后传代。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 IL-6 mRNA 表达

待培养瓶中细胞生长至 70%~80%后,更换无血清培养基饥饿 24 h。分别加入 E2、G1 处理细胞 12 h,其中含 G15 处理组提前加入 G15 预处理 1 h,使 E2、G1 及 G15 的药物终浓度分别为 100 nmol/L、100 nmol/L 和 1 μ mol/L,各组调整 DMSO 至一致,最后分别得到对照组、E2 处理组、G1 处理组、E2+G1 处理组和 G1+G15 处理组,处理相应时间后立即终止药物处理,PBS 洗 3 次,用 TRIzol 试剂提取各组细胞中总 RNA,逆转录为 cDNA。逆转录及 PCR 反应均按照 TaKaRa 试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒说明进行操作。IL-6 上游引物序列为 5'-TGACCAGAAGAAGGAATGCC-3',下游引物序列为 5'-CACCCCTGACCCAACCACAAA-3';以 β -Actin 为内参对照,其上游引物序列为 5'-AGCGAGCATC-CCCCAAAGTT-3',下游引物序列为 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测

处理方式及分组情况同 1.2.2。E2 及 G1 的处理时间为 10 min,其中含 G15 处理组中提前加入 G15 预处理 1 h,最后使 E2、G1 及 G15 的药物终浓度分别为 100 nmol/L、100 nmol/L 和 1 μ mol/L,各组调整 DMSO 至一致,处理相应时间后立即终止药物处理,PBS 洗 3 次,最后将细胞移入 EP 管中,以 1:100 加入 PMSF 以及氟化钠至细胞裂解液中,冰上裂解 30 min,离心后取上清蛋白溶液,用 BCA 试剂盒以及酶标仪测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 分离,半干法转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h,加入一抗 p-ERK(1:1 000)、t-ERK(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、t-AKT(1:1 000)4 °C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗(山羊抗兔 IgG,1:1 000)置于 37 °C 水浴箱中孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,化学发光成像,Quantity one 软件进行灰度值测定。实验重复 3 次。

1.2.4 ELISA 法检测细胞上清中 IL-6 的分泌量

待培养瓶中细胞生长至 80%~90%后,更换无血清培养基饥饿 24 h。分别用 E2、G1、G15、U0126 及 WM 处理 SKBR-3 与 MDA-MB-453 细胞,其中含

G15 处理组提前加入 G15 预处理 1 h, 含 U0126 和 WM 处理组中提前加入 U0126 与 WM 预处理 30 min, E2 及 G1 处理时间为 24 h, 使 E2、G1、G15、U0126 及 WM 的药物终浓度分别为 100 nmol/L、100 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L 和 10 μ mol/L, 各组调整 DMSO 至一致, 最后分别得到对照组、E2 处理组、G1 处理组、E2+G15 处理组、G1+G15 处理组、E2+U0126 处理组、G1+U0126 处理组、E2+WM 处理组和 G1+WM 处理组。收集细胞上清液, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 按 ELISA 试剂盒操作说明书检测样本。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

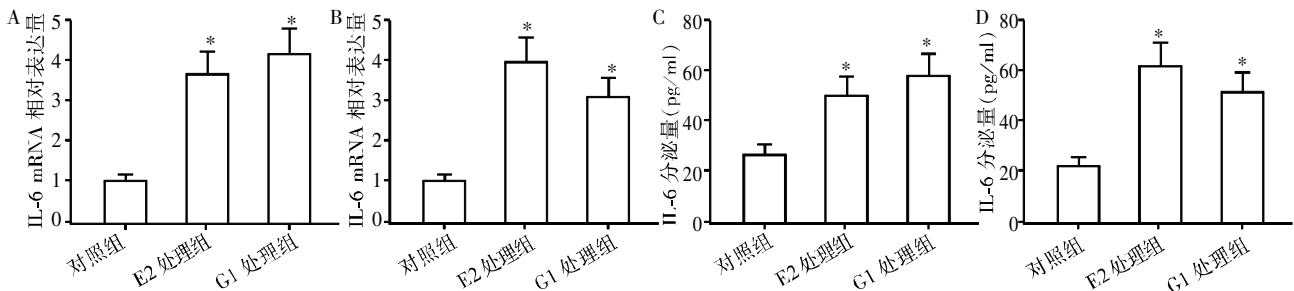
数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件, 指标进行重复测量, 多组间比较采用

方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E2 和 G1 显著促进 SKBR-3 与 MDA-MB-453 细胞系表达 IL-6

实时荧光定量 PCR 结果显示, 分别用 E2 和 G1 处理 SKBR-3 细胞 12 h 后, 均可上调细胞内 IL-6 mRNA 表达水平, 显著高于对照组 (q 值分别为 10.42 与 12.48, $P < 0.05$, 图 1A)。ELISA 结果显示, 药物处理 24 h 后, E2 及 G1 显著促进细胞上清液中 IL-6 的分泌量 (q 值分别为 7.96 与 6.07, $P < 0.05$, 图 1C)。在 MDA-MB-453 细胞中也可得到以上类似结果 ($P < 0.05$, 图 1B, D)。



A, B: E2 及 G1 上调 SKBR-3(A) 与 MDA-MB-453(B) 细胞系中 IL-6 mRNA 的表达; C, D: E2、G1 促进 SKBR-3(C) 和 MDA-MB-453(D) 细胞上清液中 IL-6 的分泌量。与对照组比较, $*P < 0.05 (n=3)$ 。

图 1 荧光定量 PCR 及 ELISA 检测 E2 及 G1 对 ER 阴性乳腺癌细胞系中 IL-6 表达的影响

Figure 1 Effects of E2 and G1 on the expression of IL-6 in ER-negative breast cancer cell lines by fluorescent quantitative PCR and ELISA

2.2 E2 及 G1 通过活化 GPER 促进 SKBR-3 与 MDA-MB-453 细胞系中 IL-6 的表达

荧光定量 PCR 及 ELISA 结果显示, 用 GPER 特异性拮抗剂 G15 阻断 SKBR-3 细胞中 GPER 的活性后, 与 E2 处理组相比, E2+G15 处理组 IL-6 mRNA 和 IL-6 分泌量均显著下调 (q 值分别为 18.52 和 10.45, P 均 < 0.05 , 图 2A, 2C); 与 G1 处理组相比, G1+G15 处理组 IL-6 mRNA 和 IL-6 分泌量也均显著下调 (q 值分别为 22.70 和 12.55, P 均 < 0.05 , 图 2A, 2C)。在 MDA-MB-453 细胞中也可得到以上类似结果 ($P < 0.05$, 图 2B, D)。以上结果提示: 膜性雌激素受体 GPER 活化后可能参与了 IL-6 表达的调控。

2.3 E2 及 G1 活化 ER 阴性乳腺癌细胞系中 GPER/ERK 与 GPER/AKT 信号通路

有研究者发现, GPER 信号通路下游两条主要的快速非基因组信号分别为 ERK 与 AKT 通路^[1,9]。本实验中 Western blot 结果显示, 在 SKBR-3 细胞系中, E2 及 G1 处理细胞 10 min 后, 可显著促进细胞中磷酸化 AKT 与磷酸化 ERK 的蛋白表达量, 与对

照组相比较, q 值分别为 11.86、8.29 (p-AKT) 和 11.20、9.82 (p-ERK), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A), p-AKT 的相对表达量分别为对照组的 (4.16 ± 0.65)、(3.21 ± 0.45) 倍, p-ERK 分别为对照组的 (2.87 ± 0.42)、(2.64 ± 0.24) 倍, 而相应的 G15 处理组中蛋白表达量显著下调, q 值分别为 13.73、12.50 (p-AKT) 和 13.31、16.20 (p-ERK), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A)。MDA-MB-453 细胞系中也可得到类似结果 ($P < 0.05$, 图 3B)。以上数据说明, 雌激素可通过 GPER/ERK 与 GPER/AKT 信号通路激活 ER 阴性乳腺癌细胞中的快速非基因组信号。

2.4 GPER/ERK 信号通路的活化调控 ER 阴性乳腺癌细胞系中 IL-6 的表达

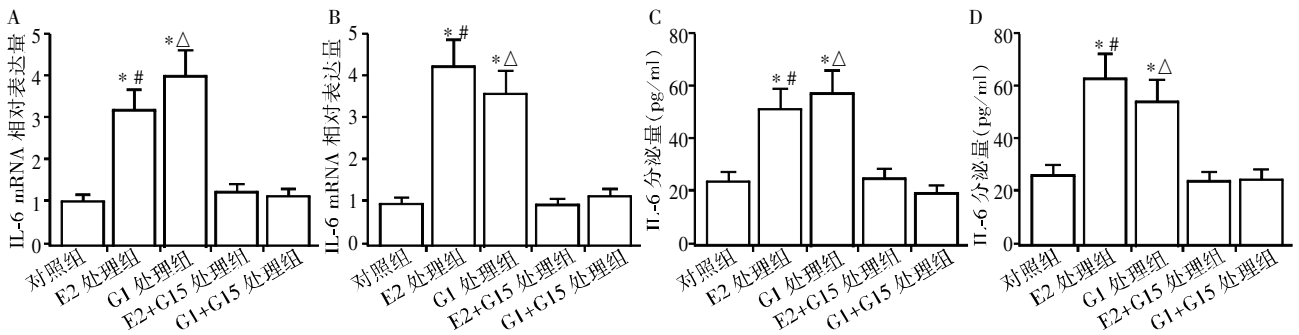
为了进一步探讨 GPER/ERK 与 GPER/AKT 信号通路是否参与调控 IL-6 的表达, 用 MEK 抑制剂 U0126 以及 PI3K 抑制剂 WM 分别预处理 SKBR-3 细胞, ELISA 结果显示, 加入 U0126 的处理组中 IL-6 分泌量显著下降, 与相应的 E2 处理组和 G1 处理组相比, 差异有统计学意义 (q 值分别 8.81 与 9.40, $P <$

0.05,图4A)。然而,加入WM处理组中IL-6的分泌量与相应激动剂处理组相比未见明显变化(q 值分别为0.71与1.56, $P > 0.05$)。在MDA-MB-453细胞系中也可得到类似结果($P < 0.05$,图4B)。以上结果提示:GPER/ERK信号通路的活化促进IL-6的表达,GPER/AKT信号通路则不能。

3 讨论

IL-6是目前发现的功能最广泛的炎性细胞因子之一,它在造血系统、免疫系统、急性反应期等均能发挥作用。此外,它还与多种雌激素相关肿瘤的生

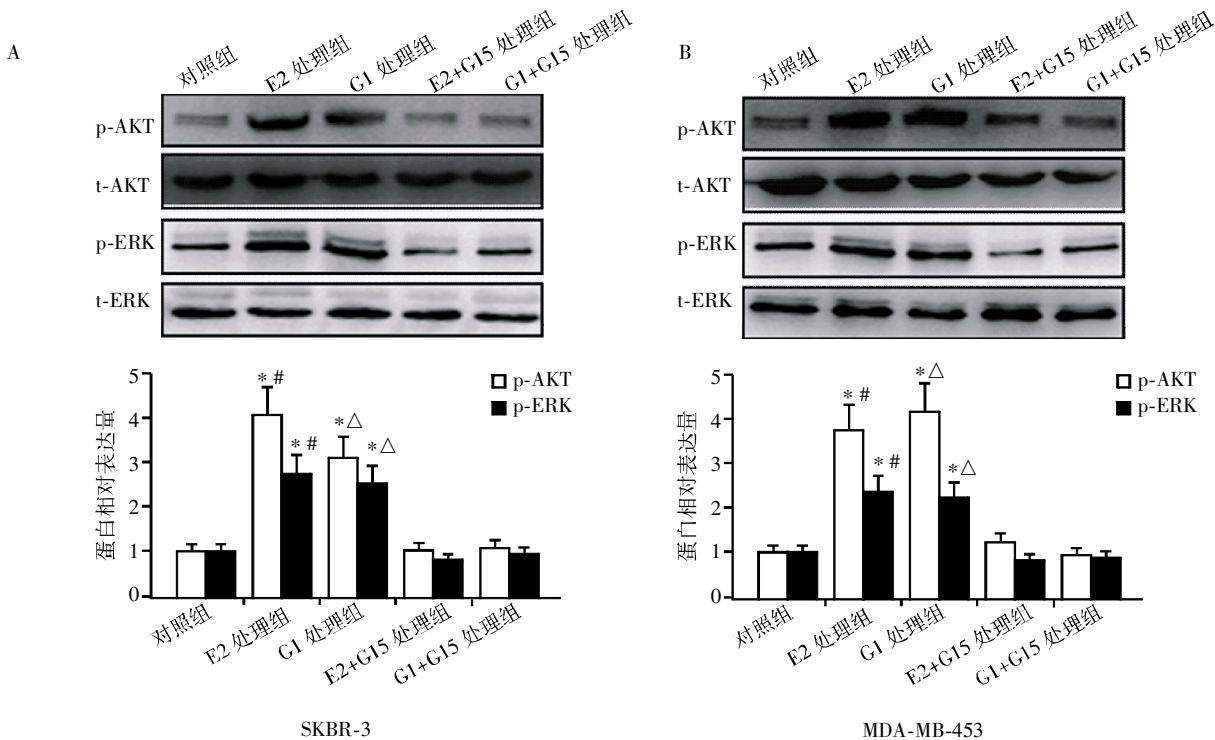
长具有显著联系,包括乳腺癌^[10]、卵巢癌^[11]、子宫内膜癌^[6]等,它在血清中的高水平表达通常预示着肿瘤患者预后不佳。有研究者发现,乳腺癌患者血清中的IL-6水平与体内雌激素水平呈正相关^[12],提示雌激素信号通路可能调控IL-6的表达。同时,Cho等^[12]学者发现子宫内膜癌患者血清中部分细胞因子的水平与其自身组织中GPER的表达呈正相关,可能预示着不良预后。以上研究提示,GPER作为一种独立作用的膜性雌激素受体,在ER阴性的乳腺癌中可能介导了雌激素对某些细胞因子表达水平的调控。



A, B: SKBR-3(A)与MDA-MB-453(B)细胞系中IL-6 mRNA的表达;C, D:SKBR-3(C)与MDA-MB-453(D)细胞系上清液中IL-6的分泌量;与对照组比较,^{*} $P < 0.05$ ($n=3$);与E2+G15处理组比较,[#] $P < 0.05$ ($n=3$);与G1+G15处理组比较,[△] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 阻断GPER活性后E2及G1对ER阴性乳腺癌细胞系中IL-6表达的影响

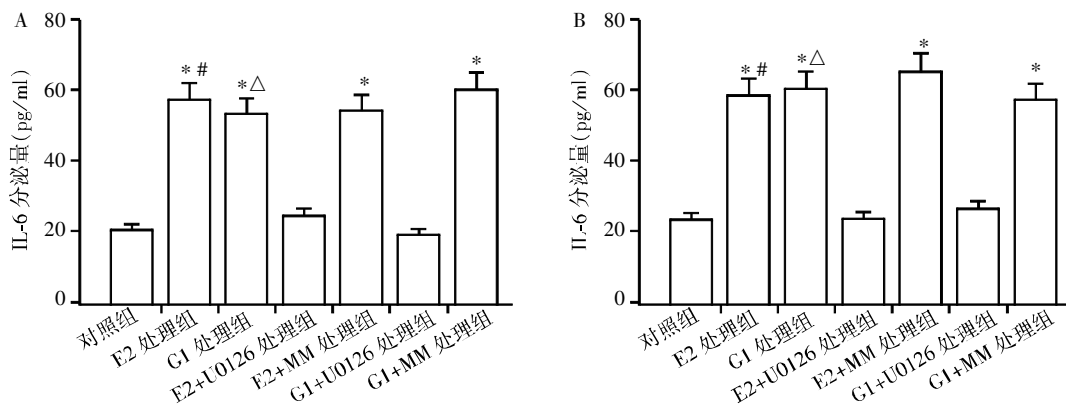
Figure 2 Effects of E2 and G1 on the expression of IL-6 after blocking GPER activity in ER-negative breast cancer cell lines



A: E2及G1活化GPER促进SKBR-3细胞系中p-AKT与p-ERK的蛋白表达;B: E2及G1活化GPER促进MDA-MB-453细胞系中p-AKT与p-ERK的蛋白表达。与对照组比较,^{*} $P < 0.05$ ($n=3$);与E2+G15处理组比较,[#] $P < 0.05$ ($n=3$);与G1+G15处理组比较,[△] $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 E2与G1活化ER阴性乳腺癌细胞中GPER/ERK与GPER/AKT信号通路

Figure 3 E2 and G1 activate GPER/ERK and GPER/AKT signal pathway in ER-negative breast cancer cells



A:SKBR-3 上清中 IL-6 分泌量;B:MDA-MB-453 上清中 IL-6 分泌量。与对照组比较,* $P < 0.05(n=3)$;与 E2+U0126 处理组比较, $^{\#}P < 0.05(n=3)$;与 G1+U0126 处理组比较, $^{\Delta}P < 0.05(n=3)$ 。

图 4 E2 与 G1 活化 ER 阴性乳腺癌细胞中 GPER/ERK 信号通路上调 IL-6 的表达

Figure 4 E2 and G1 activate GPER/ERK signal pathway to enhance the expression of IL-6 in ER-negative breast cells

本研究中发现,在 ER 阴性的乳腺癌细胞系 SKBR-3 与 MDA-MB-453 中,GPER 的激动剂 E2 与 G1 均可通过活化 GPER 调控 IL-6 的 mRNA 表达以及细胞上清液中的分泌量。此外,雌激素调控 IL-6 表达的机制与 GPER 下游的 ERK 信号通路活化有关,以上说明雌激素/GPER/ERK 信号通路的活化可促进 ER 阴性乳腺癌表达 IL-6,可能是解释 ER 阴性乳腺癌患者预后不佳的一种新机制。

MAPK/ERK 与 PI3K/AKT 信号通路在调控肿瘤的恶性表型中具有重要作用。诸多研究提示^[1-3,14],雌激素可活化 GPER 促进下游信号通路中 p-ERK 的表达发挥生物学效应,例如细胞生长、细胞迁移与侵袭、细胞凋亡、肿瘤血管生成等。本研究可得到类似结果,100 nmol/L 的 E2 与 G1 刺激细胞 10 min 后,细胞中 p-ERK 表达量显著增加;用 GPER 特异性拮抗剂 G15 预处理细胞后,ERK 通路的活化被显著抑制。此外,我们也检测到雌激素活化 GPER 信号促进 p-AKT 表达,这与其他研究者所得到的结果相似^[9,15]。然而也有研究报道雌激素不能活化乳腺癌中 p-AKT 的表达^[1],可能的原因是雌激素在不同亚型(分子分型)的乳腺癌中通过 GPER 所激活的信号通路不一致,这也在一定程度上从信号通路机制角度解释了不同亚型乳腺癌所代表的生物学行为以及预后不同的现象。

本研究进一步证明了雌激素/GPER/ERK 通路参与 IL-6 的表达调控。分别用 MEK 特异性抑制剂 U0126 以及 PI3K 抑制剂 WM 预处理细胞 30 min,包含 U0126 的处理组中细胞上清液内 IL-6 的分泌量显著下调,提示雌激素所活化的 ERK 信号通路调控细胞中 IL-6 的表达。这些结果也被另一项关于

GPER 通过介导雌激素作用调控子宫内膜癌中 IL-6 表达水平的研究所支持^[16]。然而,在含有 WM 的处理组中,本研究并未发现 IL-6 的水平明显变化,说明雌激素/GPER/AKT 信号通路虽然在细胞中得到显著活化但是并不参与 IL-6 的调控。以上结果也说明,雌激素/GPER/ERK 与雌激素/GPER/AKT 信号通路在 ER 阴性乳腺癌中所调控的生物学作用可能不一致。

综上所述,本研究证明在 ER 阴性的乳腺癌细胞系中,雌激素可促进细胞中 IL-6 的表达,其机制可能与 GPER/ERK 信号通路水平上调相关。因此,结合目前国内外所报道的 IL-6 与肿瘤发生发展的密切关系,本文推测雌激素/GPER/ERK/IL-6 通路可能在 ER 阴性乳腺癌恶性生物学行为中扮演着重要角色,由 GPER 所介导的炎症微环境可能是 ER 阴性乳腺癌患者较差预后的潜在原因之一,但是这还需要更多的体内及体外实验来进一步验证以上信号通路所发挥的具体生物学作用。

[参考文献]

- [1] Yu T, Liu M, Luo H, et al. GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 β -estradiol in triple-negative breast cancer cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 143C:392-403
- [2] Luo H, Yang G, Yu T, et al. GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(2):355-369
- [3] Mo Z, Liu M, Yang F, et al. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(6):R114
- [4] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related in-

flammation[J]. *Nature*,2008,454(7203):436-444

[5] 陈明祥,武正山,张信强,等. 胃癌患者血清 IL-6、CA724、VEGF 联合检测的临床意义[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2013,33(2):247-250

[6] He YY,Cai B,Yang YX,et al. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential,and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Cancer Sci*,2009,100(6):1051-1061

[7] Bologna CG,Revankar CM,Young SM,et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30[J]. *Nat Chem Biol*,2006,2(4):207-212

[8] Dennis MK,Burai R,Ramesh C,et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist[J]. *Nat Chem Biol*,2009,5(6):421-427

[9] Fujiwara S,Terai Y,Kawaguchi H,et al. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*,2012,5(1):35

[10] Choi YK,Cho SG,Woo SM,et al. Herbal extract SH003 suppresses tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 Breast cancer cells by inhibiting STAT3-IL-6 Signaling [J]. *Mediators Inflamm*,2014,2014(1):492-173

[11] Kumar J,Ward AC. Role of the interleukin 6 receptor family in epithelial ovarian cancer and its clinical implications[J]. *Biochim Biophys Acta*,2014,1845(2):117-125

[12] Cho Y,Sung MK,Yeon JY,et al. Prognostic Role of Interleukin-6,Interleukin-8,and leptin levels according to breast cancer subtype[J]. *Cancer Res Treat*,2013,45(3):210-219

[13] Smith HO,Stephens ND,Qualls CR,et al. The clinical significance of inflammatory cytokines in primary cell culture in endometrial carcinoma[J]. *Mol Oncol*,2013,7(1):41-54

[14] De Francesco EM,Lappano R,Santolla MF,et al. HIF-1a/GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs)[J]. *Breast Cancer Res*,2013,15(4):R64

[15] Jiang QF,Wu TT,Yang JY,et al. 17β-estradiol promotes the invasion and migration of nuclear estrogen receptor-negative breast cancer cells through cross-talk between GPER1 and CXCR1 [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2013,138(2):314-324

[16] 蔡玲玉,贺银燕,席晓薇,等. 雌激素跨膜受体 GPR30 介导子宫内膜癌中 IL-6/STAT3 炎症信号通路的激活 [J]. *现代妇产科进展*,2013,22(6):437-440

[收稿日期] 2014-08-22

(上接第 303 页)

marrow mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients inhibits osteogenic differentiation through downregulating Smad signaling [J]. *Stem Cells Dev*,2013,15(22):668-678

[4] He X,Dziak R,Yuan X,et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects[J]. *PLoS ONE*,2013,8(4):e60473

[5] Garcia-Carrasco M,Mendoza-Pinto C,Escarcega RO,et al. Osteoporosis in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Isr Med Assoc J*,2009,11(8):486-491

[6] Zwerina J,Hayer S,Tohidast-Akrad M,et al. Single and combined inhibitions of tumor necrosis factor,interleukin-1,and RANKL pathways in tumor necrosis factor induced arthritis:effects of synovial inflammation,bone erosion and cartilage destruction [J]. *Arthritis Rheum*,2004,50(1):277-290

[7] Zhao L,Huang J,Zhang HW,et al. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the Ubiquitin E3 ligase Wwp1 [J]. *Stem Cells*,2011,29(10):1601-1610

[8] Sun L,Akiyama K,Zhang H,et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multi-organ dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans[J]. *Stem Cells*,2009,27(6):1421-1432

[9] 徐 婷,金鸥阳,赵盛楠,等. 系统性红斑狼疮患者骨髓间充质干细胞多向分化能力异常[J]. *中华风湿病学杂志*,2009,13(3):185-188

[10] Kim Mj,Lee B,Yang K,et al. BMP-2 peptide-functionalized nanopatterned substrates for enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*,2013,34(30):7236-7246

[11] Prall WC,Haasters F,Heggeb J,et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation[J]. *Biochem Biophys Res Commun.*,2013,440(4):617-622

[收稿日期] 2014-07-07