

## 皮质醇对激素依赖型乳腺癌细胞 MCF-7 增殖迁移影响及机制

厉 芝,甄林林\*,韩学东,施建华,任 毅

(南京医科大学附属淮安第一医院甲乳外科,江苏 淮安 223300)

**[摘要]** 目的:研究皮质醇对激素依赖型乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、迁移的影响及其可能的作用机制。方法:不同浓度皮质醇处理激素依赖型人乳腺癌细胞株 MCF-7。采用 MTS 法检测不同浓度皮质醇对细胞增殖的影响;细胞划痕试验检测不同浓度皮质醇对细胞迁移的影响;蛋白质印迹法检测细胞增殖相关蛋白磷酸化 mTOR (p-mTOR)以及迁移相关蛋白 MMP-9、MMP-2 蛋白表达变化情况。结果:MCF-7 细胞在皮质醇剂量为 10 nmol/L 时增殖显著( $P<0.05$ )、迁移增加( $P<0.01$ )。并且在皮质醇剂量 10 nmol/L 时,MCF-7 细胞表达细胞增殖相关蛋白 p-mTOR( $P<0.05$ ),及细胞迁移相关蛋白 MMP-9( $P<0.05$ )、MMP-2( $P<0.01$ )明显升高,差异具有统计学意义。结论:小剂量(10 nmol/L)皮质醇可以导致激素依赖型乳腺癌细胞增殖、迁移增加,其机制可能是通过激活经典 mTOR 通路诱导细胞增殖及上调 MMP-9、MMP-2 蛋白表达实现。

**[关键词]** 乳腺癌;皮质醇;激素依赖型

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)08-966-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170809

## Effect and mechanism of cortisol on proliferation and migration of hormone-related breast cancer MCF-7 cells

Li Zhi, Zhen Linlin\*, Han Xuedong, Shi Jianhua, Ren Yi

(Department of Thyroid and Breast Surgery, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the proliferation and migration effect of cortisol on hormone-related breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** MCF-7 cells, originated from a hormone-related breast cancer woman, were treated with different concentration of cortisol. The effect of cortisol on cell proliferation was determined by MTS assay and the rate of cell survival was calculated. The effect of cortisol on cell migration was examined by wound-healing assay. Immunoblot analysis detected the protein expression of phospho mTOR (p-mTOR), which is involved in cell proliferation, and MMP-9, MMP-2, which are related to cell migration. **Results:** Cortisol at concentration of 10 nmol/L significantly increased cell proliferation ( $P<0.05$ ) and cell migration ( $P<0.01$ ) compared with the vehicle group. Furthermore, cortisol at concentration of 10 nmol/L obviously increased the protein expression involved in cell proliferation (p-mTOR,  $P<0.05$ ) and cell migration (MMP-9,  $P<0.05$ ; MMP-2,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Cortisol at concentration of 10 nmol/L effectively induced cell proliferation and cell migration by activating mTOR pathway and upregulating MMP-9 and MMP-2 protein expression.

**[Key words]** breast cancer; cortisol; hormone-related

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):966-970]

乳腺癌近年来发病率逐年上升,目前已经成为威胁全球女性健康的第一大恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。激素依赖型乳腺癌是一种最为常见的乳腺癌类型,其雌激素受体(estrogen receptor, ER)和(或)孕激素受体(pro-

gesterone receptor, PR)表达为阳性,临床治疗中常辅以选择性雌激素受体调节剂(如他莫昔芬)或芳香化酶抑制剂(如来曲唑)进行抗雌激素内分泌治疗,预后明显优于激素受体阴性乳腺癌<sup>[2]</sup>。

皮质醇,又被称为压力荷尔蒙,大量研究证实,恶性肿瘤患者血清中皮质醇含量明显高于正常人<sup>[3]</sup>,与多种恶性肿瘤发生、发展密切相关,如肺癌<sup>[4]</sup>、口腔癌<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>等。另一项针对

**[基金项目]** 江苏省“333 高层次人才培养工程”(BRA2014129)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: simu1027@sina.com

150 例乳腺肿瘤患者的病例对照研究也发现,良性乳腺肿瘤患者在确诊并治疗后血清皮质醇水平会恢复至正常人群水平,而恶性乳腺癌患者血清皮质醇水平在较长一段时间内维持在较高水平<sup>[7]</sup>。

以上研究表明皮质醇与乳腺癌之间存在紧密联系。然而目前对于其作用机制的研究鲜有报道。本研究通过使用皮质醇处理乳腺癌细胞 MCF-7,检测肿瘤细胞增殖迁移情况及其相关蛋白的表达,旨在探讨皮质醇对激素依赖型乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及迁移的影响及可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

皮质醇(cortisol, Sigma-Aldrich 公司,美国), DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、青霉素/链霉素(Gibco 公司,美国), MTS 检测试剂盒(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit, Promega 公司,美国), 蛋白裂解液(RIPA lysis buffer)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(Pierce 公司,美国), 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、Akt、基质金属蛋白酶(MMP)-9、MMP-2、 $\beta$ -actin 蛋白抗体(Abcam 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞株及其培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231(ATCC 公司,美国)。MCF-7 细胞株用 DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素, MDA-MB-231 细胞用 RPMI1640 培养基+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养基内培养。

#### 1.2.2 MTS 试剂盒检测细胞增殖

分别取对数生长期的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞,用相应培养基溶液配制密度为  $0.5 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液,吹匀后加入 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,预培养 24 h 后吸出培养基并用 PBS 溶液小心冲洗各孔,并用无血清培养基分别配制终末浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 nmol/L 的皮质醇溶液,每个浓度设 6 个复孔,作用 24 h,设对照组(不加药)和空白组(只有无血清培养基,无细胞),24 h 后每孔加入 MTS 试剂 20  $\mu$ L,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养 3 h 后,在 490 nm 处读取吸光度,去除空白组数值后取 6 孔平均值统计,并参照对照组数值标准化。通过 Graphpad Prism 6 软件计算不同浓度皮质醇对 MCF-7、MDA-MB-231 在 24 h 细胞生存率的影响。

#### 1.2.3 细胞划痕试验检测细胞迁移

先用记号笔于 6 孔板背面画出间隔 8 mm 的 3 条横向平行标记线。取对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,每孔初始  $2 \times 10^5$  个细胞,放置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养,每隔 24 h 换液 1 次。待细胞覆盖 90%以上底面积,取 200  $\mu$ L 移液枪头,通过 6 孔板每孔中心于细胞覆盖面划出一垂直于标记线的划痕,吸出培养基并用 PBS 溶液将划出的细胞团块小心冲出,无血清培养基分别配制终末浓度为 1、5、10、50、100 nmol/L 的皮质醇溶液,每个浓度设 3 个复孔,作用 24 h,设对照组(不加药)。运用 Image J 软件计算划痕区域像素定量,通过分析划痕区域细胞覆盖面积得出细胞迁移效率。

#### 1.2.4 蛋白印迹法检测蛋白表达情况

取对数生长期的 MCF-7 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于直径 6 cm 培养皿中,待细胞生长至 70%~80%融合度时,分别加入无血清培养基配制的 5、10 nmol/L 皮质醇溶液,同时设立对照组(不加药),24 h 后 PBS 溶液洗涤 2 次后,加入蛋白裂解液冰上裂解细胞提取总蛋白。放入预冷的 4℃离心机于 13 000 r/min 离心 30 min,取上清液用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,并倍比加入 4 $\times$ 上样缓冲液,95℃加热 5 min,行 SDS-PAGE 电泳(p-mTOR、mTOR、 $\beta$ -actin 每孔上样蛋白量 25  $\mu$ g, MMP-9、MMP-2 每孔上样蛋白量 20  $\mu$ g)、转膜、5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入特异性 p-mTOR(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、MMP-9(1:1 000)、MMP-2(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:10 000)抗体,摇床 4℃过夜, TBST 洗膜 3 次后室温下加入相应二抗(anti-mouse IgG 1:5 000, anti-rabbit IgG 1:5 000)孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次后,用 ECL 显色并采用化学发光成像系统成像, Bio-Rad 公司 Image Lab 软件分析图像。

### 1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 6 软件对实验数据统计分析,所有实验均同等条件重复 3 次,计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析和 SNK 法,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 皮质醇浓度在 10 nmol/L 时促进细胞增殖

MTS 法检测结果显示,与对照组相比,皮质醇对 MCF-7 细胞增殖呈低剂量促进、高剂量抑制的趋势, MCF-7 细胞在皮质醇剂量为 10 nmol/L 时增殖显著( $P < 0.05$ , 图 1A)。同等条件下,同样的剂量梯度

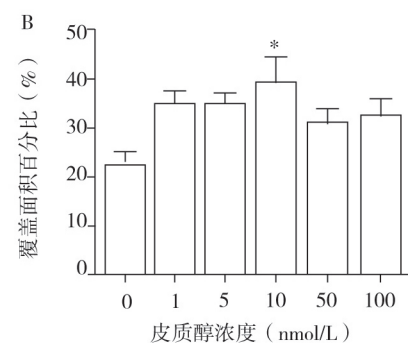
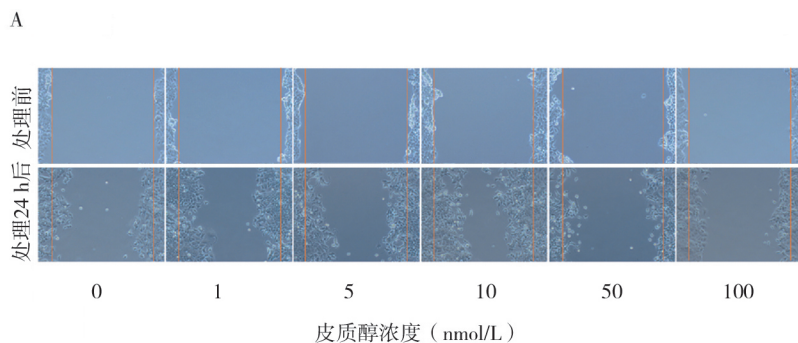
与处理时间,不同浓度皮质醇对 MDA-MB-231 细胞的增殖无作用,差异无统计学差异( $P=0.587$ ,图 1B)。

### 2.2 皮质醇浓度在 10 nmol/L 时促进细胞迁移

利用高倍生物显微镜采集划痕制造后皮质醇给药前与给药后的照片(图 2A),Image J 软件分析后显示:与对照组相比,MCF-7 在皮质醇剂量为 10 nmol/L 时划痕区域细胞覆盖占比显著增加( $P<0.01$ ,图 2B)。

### 2.3 皮质醇对各蛋白表达的影响

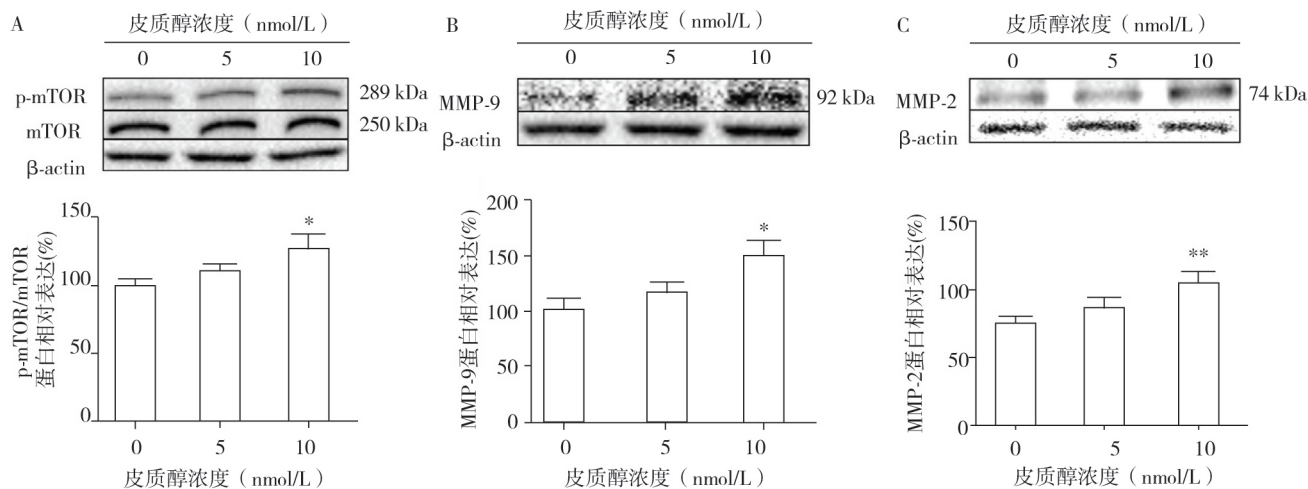
蛋白质印迹法检测各蛋白表达的结果显示(图 3),不同组别之间比较,p-mTOR、MMP-9、MMP-2 蛋白的表达有差异,与对照组相比,MCF-7 细胞经 5 nmol/L 皮质醇处理 24 h 后,p-mTOR、MMP-9、MMP-2 蛋白的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ );经 10 nmol/L 皮质醇处理 24 h 后,p-mTOR、MMP-9、MMP-2 蛋白表达均显著增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。



A:显微镜下采集不同浓度皮质醇处理前后图片( $\times 100$ );B:划痕区域细胞覆盖面积百分比,与对照组比较, $P<0.01$ 。

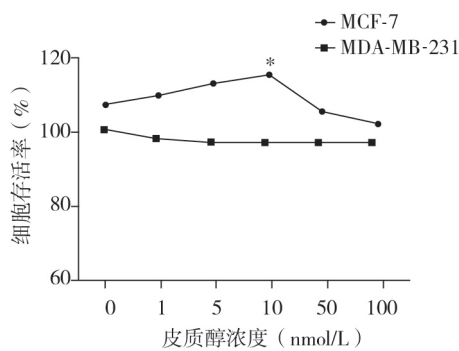
图 2 皮质醇处理后 MCF-7 细胞迁移能力

Figure 2 Migration of MCF-7 cells after treated with cortisol



与对照组比较, $*P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 3 蛋白质印迹法检测 5、10 nmol/L 浓度皮质醇处理 MCF-7 细胞株后 p-mTOR(A)、MMP-9(B)、MMP-2(C)蛋白表达水平  
Figure 3 Images of protein expression of p-mTOR(A), MMP-9(B) and MMP-2(C) in MCF-7 cells apparently treated with 5 or 10 nmol/L of cortisol measured by western blotting



与对照组比较, $*P<0.05$ 。

图 1 皮质醇对 MCF-7 和 MDA-MB-231 增殖率的影响

Figure 1 Effect of cortisol on MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation

### 3 讨论

激素依赖型乳腺癌,顾名思义,此类乳腺癌生长需要依赖体内雌激素,免疫组化检测可发现该类乳

腺癌细胞 ER 或 PR 表达呈阳性,雌激素与 ER 结合激活相关通路会导致乳腺癌细胞的增殖和远处转移。临床上采用手术、化疗辅以对抗雌激素的内分泌治疗乳腺癌已有多年历史,且效果显著<sup>[2]</sup>。MCF-7 细胞保留了激素依赖型乳腺癌的许多特性,其 ER 和(或)PR 受体为阳性,人表皮生长因子受体-2(Her-2)阴性,抗雌激素内分泌治疗敏感<sup>[8]</sup>,科学研究中常被作为激素依赖型乳腺癌的模型细胞。本研究在对三阴性乳腺癌(ER、PR、Her-2 均为阴性)来源的 MDA-MB-231 细胞做了相同浓度的皮质醇处理后,也以 MTS 法检测了其细胞增殖情况,结果是同等条件下,同样的剂量与处理时间,皮质醇对 MDA-MB-231 细胞的增殖无统计学差异。是否从侧面说明皮质醇的促乳腺癌细胞增殖作用与雌激素或孕激素受体相关?

大量研究显示,mTOR 是细胞生长和增殖的重要调节因子,其信号通路调控异常与细胞增殖密切相关<sup>[9]</sup>,同时也是恶性肿瘤治疗的一个重要靶点。有文献报道,mTOR 信号通路的激活与肿瘤细胞的生长存活密切相关<sup>[10-11]</sup>,目前已经在多种肿瘤中发现 mTOR 的异常表达<sup>[12-13]</sup>,并且这种异常表达往往与不良预后相关<sup>[14-15]</sup>。p-mTOR 作为 mTOR 的激活形式,其蛋白表达的高低可以作为反映 mTOR 通路激活状态的标志。众所周知,恶性肿瘤具有增殖速度快并常有远处转移的特点,这除了与细胞增殖失控和分化异常有很大关联,也与细胞外基质环境的改变密不可分<sup>[16]</sup>。肿瘤细胞的侵袭和转移能力与其诱导产生相关蛋白酶降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及血管基底膜密切相关<sup>[17]</sup>。MMPs 是其中最为重要的一组,近年来也作为研究热点,被证实其在肿瘤的侵袭和转移中有着非常重要的作用。有文献指出<sup>[18]</sup>,MMP-9、MMP-2 在乳腺癌细胞中表达明显升高,其表达与否可以作为判断乳腺癌预后的一项重要参考指标,其中 MMP-9 表达与激素受体情况存在正相关<sup>[19]</sup>。本研究中,p-mTOR、MMP-9、MMP-2 蛋白表达在皮质醇剂量 10 nmol/L 时显著增加,之前对于细胞增殖、迁移现象的检测,也是在皮质醇剂量 10 nmol/L 时显著增加,这正说明了 10 nmol/L 皮质醇促进激素依赖型乳腺癌增殖迁移的作用可能与 mTOR 通路激活诱导细胞增殖以及上调 MMP-9、MMP-2 蛋白表达从而降解细胞外基质导致细胞迁移有关。

以往研究多报道临床上乳腺癌患者体内血清皮质醇波动这一现象<sup>[7]</sup>,有学者提出皮质醇的作用可能与 DNA 损伤相关<sup>[20]</sup>,也可能与皮质醇下调乳腺癌

抑癌基因 BRCA1 相关<sup>[21]</sup>,但是这也仅仅停留在假说层面,具体机制截至目前并未有突破性发现。长久以来,皮质醇往往与精神障碍性疾病关联起来,而本研究证实皮质醇可以导致激素依赖型乳腺癌细胞增殖、迁移增加,其机制可能是通过激活经典 mTOR 通路诱导细胞增殖及上调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达。

然而本研究也有其局限性,仅仅阐述了皮质醇在 10 nmol/L 浓度时对细胞增殖、迁移的影响,通过检测细胞增殖及迁移相关蛋白的表达,探讨了皮质醇可能的作用机制,但是究竟皮质醇对激素依赖型乳腺癌增殖、迁移的影响涉及到哪些关键基因及上游蛋白,追根溯源将作为接下来的研究重点。从化学结构来看,皮质醇与雌二醇高度相似,从分子构象角度提出了皮质醇与雌激素受体结合产生效应的可能性。皮质醇在 10 nmol/L 时有明显促进 MCF-7 细胞增殖、迁移的作用。在应用现有治疗手段的同时抑制体内皮质醇水平,拮抗糖皮质激素受体或可为研究新型抗肿瘤辅助药物提供新思路。

#### [参考文献]

- [1] 徐兵河,江泽飞,胡夕春.中国晚期乳腺癌临床诊疗专家共识 2016[J].中华医学杂志,2016,96(22):1719-1727
- [2] Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer[J]. World J Biol Chem,2015,6(3):231-239
- [3] 罗泽民,皮惠兰.280 例恶性肿瘤病人血清皮质醇测定结果分析[J].癌症,1991,10(5):402-404
- [4] Suzuki K, Ichikawa T, Furuse H, et al. Relationship of the urine cortisol level with the performance status of patients with lung cancer: a retrospective study [J]. Support Care Cancer,2015,23(7):2129-2133
- [5] Bernabé DG, Tamae AC, Miyahara GI, et al. Increased plasma and salivary cortisol levels in patients with oral cancer and their association with clinical stage[J]. J Clin Pathol,2012,65(10):934-939
- [6] Schrepf A, Thaker PH, Goodheart MJ, et al. Diurnal cortisol and survival in epithelial ovarian cancer[J]. Psychoneuroendocrinology,2015,53(3):256-267
- [7] Ho RT, Fong TC, Chan CK, et al. The associations between diurnal cortisol patterns, self-perceived social support, and sleep behavior in Chinese breast cancer patients [J]. Psychoneuroendocrinology,2013,38(10):2337-2342
- [8] Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research[J]. BCR,2011,13(4):215
- [9] 国斌,易斌,鲁开智.哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的研究进展[J].医学研究生学报,2010,23(8):876-879

[10] Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, et al. mTOR, translation initiation and cancer[J]. *Oncogene*,2006,25(48): 6416-6422

[11] Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer[J]. *Cancer Cell*,2007,12(1): 9-22

[12] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer.[J]. *Nat Genet*,1999,21(1): 99-102

[13] Coursaris C, Kim D. A meta-analytical review of empirical mobile usability studies[J]. *J Usability Studies*, 2011,6(3): 117-171

[14] Zhou L, Huang Y, Li J, et al. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Med Oncol*,2010,27(2): 255-261

[15] Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: Implications for molecular patient selection for targeted therapy[J]. *Cancer*,2007,109(11): 2257-2267

[16] 樊晓东, 丁亦含, 邓之奎, 等. YM155 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡影响的机制探讨[J]. *中华内分泌外科杂志*,2015,9(2): 120-124

[17] 陈华江, 王杰军. 基质金属蛋白酶及其抑制物与肿瘤侵袭转移的关系[J]. *国际肿瘤学杂志*,2001,28(1): 23-26

[18] Yousef EM, Tahir MR, St-Pierre Y, et al. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer[J]. *BMC Cancer*,2014,14(1): 609

[19] Ranogajec I, Jakic-Razumovic J, Puzovic V, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients [J]. *Med Oncol*,2012,29(2): 561-569

[20] Schiewer MJ, Knudsen KE. Linking DNA damage and hormone signaling pathways in cancer [J]. *Trends Endocrinol Metab*,2016,27(4): 216-225

[21] Mantripragada K, Caley M, Stephens P, et al. Telomerase activity is a biomarker for high grade malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1 individuals[J]. *Genes Chromosomes Cancer*,2008,47(3):238-246

[收稿日期] 2016-12-27

### 参考文献的著录格式

#### 1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9950-9955

#### 2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

#### 3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵 玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471