

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.013

新型雌激素受体 GPR30 在非小细胞肺癌增殖中的作用研究*

阮姝琴¹, 黄伟^{2△}, 杨志祥¹, 韦凤¹, 唐敏¹
(重庆市人民医院:1. 肿瘤血液科;2. 胸外科 400013)

[摘要] 目的 研究 G 蛋白耦联受体 30(GPR30)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及其与临床主要病理特征的关系,并分析 GPR30 和 Ki-67 表达的相关性,探讨雌激素通过激活 GPR30 受体信号途径调节 NSCLC 增殖的分子机制。方法 采用免疫组织化学方法检测 80 例术后非小细胞肺癌组织样本中 GPR30 和 Ki-67 的表达。加入 17-β-雌二醇或 G-1 后,计数 H1299 细胞,流式细胞术检测细胞周期分布,最后通过 Western blot 方法检测 G-1 作用后 ERK1/2 的激活状态以及 cyclin D1 和 P16 蛋白的表达。结果 GPR30 更多表达在腺癌、低分化、Ⅲ期 NSCLC 肿瘤组织,差异有统计学意义($P < 0.05$); GPR30 表达和 Ki-67 呈中度相关性($r = 0.502, P = 0.000$)。E₂(或 G-1)促进 H1299 细胞增殖,并且更多的细胞进入 S 期;加入 G-1 后,磷酸化 ERK1/2 以及 cyclin D1 表达增加,而 p16 蛋白表达减少,以上效应能被 G-15 或 U0126 预处理 2 h 阻断。结论 雌激素通过激活 GPR30-EGFR-MAPKs 信号转导途径促进 H1299 增殖。阻断 GPR30 信号途径可能成为 NSCLC 治疗的新靶点。

[关键词] 癌,非小细胞肺;细胞周期;细胞增殖;G 蛋白耦联受体 30;ki-67

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)05-0615-04

Study on the role of GPR30 in the proliferation of Non-small cell lung cancer*

Ruan Shuqin¹, Huang Wei^{2△}, Yang Zhixiang¹, Wei Feng¹, Tang Min¹

(1. Department of Oncology and Hematology; 2. Department of Thoracic Surgery, Chongqing General Hospital, Chongqing 400013, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the expression of GPR30 and Ki-67 in Non-small cell lung cancer(NSCLC) and the relationship between them. The clinicopathological features of GPR30 in NSCLC were also analyzed. The molecular mechanism that estrogen mediated the proliferation of H1299 by activating GPR30 was further studied. **Methods** The expression of GPR30 and Ki-67 in 80 cases of specimens of NSCLC after surgery was examined using immunohistochemistry method. After 17-β-estradiol(E₂) or G-1 added, H1299 cells were counted and the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Finally, the activated ERK1/2 and the expression of cyclin D1 and p16 after G-1 treatment in H1299 cells were examined through western blotting. **Results** Expressions of GPR30 was more in stage III or low differentiation tissues or adenocarcinoma ($P < 0.05$). A positive correlation between GPR30 and Ki-67 was further disclosed ($r = 0.502, P = 0.000$). The proliferation of H1299 cells was promoted and more cells entered S-phase after E₂ or G-1 treatment for 3 days, which could be inhibited after G-15 or U0126 pre-treatment for 2 hours. We further discovered that the activated ERK1/2 and cyclin D1 expression increased after G-1 treatment, which was blocked after G-15 or U0126 pre-treatment for 2 hours. The change of p16 was on the opposite. **Conclusion** A positive correlation existed between GPR30 and Ki-67. GPR30-EGFR-MAPKs signaling transduction pathway was involved in the estrogen-induced proliferation of NSCLC cells. Blocking GPR30 signaling pathway may be a promising new strategy for NSCLC treatments.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; cell cycle; cell proliferation; G protein-coupled receptor 30; ki-67

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌的 80%,其发病及病理特点有明显的性别差异,不论是是否吸烟,女性更易发展为肺腺癌,雌激素信号途径的激活可能参与 NSCLC 的发生发展^[1]。G 蛋白耦联受体 30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)是新发现的雌激素受体,已被证实参与乳腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤的发病机制^[2]。但在肺癌尤其是 NSCLC 中关于 GPR30 的研究鲜见报道。本研究拟在 NSCLC 术后组织中研究 GPR30 和 Ki-67 的表达及其与临床主要病理特征的关系,并以人肺腺癌细胞株 H1299 为模型,探讨雌激素通过激活 GPR30 受体信号途径调节 NSCLC 增殖的分子机制,为研究 NSCLC 尤其是女性肺癌的发病机制以及寻找新的肺癌肿瘤标志物和分子治疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 NSCLC 术后石蜡组织样本随机选取自本院 2008 年 1 月至 2014 年 5 月收治的 80 例 NSCLC 患者,术前均未接受过化放疗,年龄 43~78 岁,平均 67 岁,均经病理检查证实。H1299 细胞购自中科院细胞库,使用添加 10% 胎牛血清的 1640 培养液,培养于含 5% CO₂ 饱和湿度的 37℃ 恒温培养箱中,适时传代。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 G-1 和 G-15 购自德国 Merck Chemicals, 17β-雌二醇购自美国 Sigma, U0126 购自美国 CST, ERK1 (pT202)/ERK2 (pT185) Phospho 单克隆抗体、Anti-ERK1 单克隆抗体、cyclin D1 单克隆抗体、p16 单克隆抗体、Ki-67 单

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研项目(2013-2-111);重庆市渝中区科技计划项目(20130144)。 作者简介:阮姝琴,博士,副主任医师,主要从事恶性肿瘤综合治疗及研究工作。 △ 通信作者, E-mail:jiangjj26@163.com。

克隆抗体, α -tubulin 单克隆抗体、GPR30 多克隆抗体购自英国 ABCAM。M-PER 哺乳动物蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 Thermo Scientific, EZ-ECL 化学发光检测试剂盒(ECL A 液+ECL B 液)购自以色列 Bioind。

1.2.2 增殖实验分组 取第三代生长状态良好的 H1299 细胞, 先根据实验第 3 天加入的不同处理药物分为溶剂、E₂、G-1 3 组, 再根据处理药物加入前 2 h 加入的抑制剂分别为 3 组, 共 9 组: 溶剂、溶剂(G-15)、溶剂(U0126), E₂、E₂(G-15)、E₂(U0126), G-1、G-1(G-15)、G-1(U0126), 括号内为抑制剂。

1.2.3 免疫组织化学 采用免疫组织化学 Elivision Plus 法检测组织中 GPR30 和 Ki-67 的表达, 用已知的阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.4 细胞增殖实验 H1299 细胞以 3×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板。用完全培养基培养 24 h 后, 换为无酚红的只含有 2% 活性炭处理过的胎牛血清的培养基, 并加入不同的处理药物, 每两天更换一次新鲜的培养基。细胞分别在处理后第 3 天用胰酶消化后收集起来, 用血细胞计数器计数。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 取对数期生长的细胞用胰酶消化制成细胞悬液(浓度为 5×10^5 /mL), 平铺于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL, 置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 去除培养基, 按不同分组进行药物处理。24 h 后消化收集细胞, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 残留 50 μ L PBS, 轻轻弹击离心管底部, 适当分散细胞, 加入 1 mL 冰浴预冷的 70% 乙醇轻轻吹打混匀, -20℃ 冰箱固定过夜, 离心去除固定液, 预冷 PBS 洗涤 1 次, 加入 500 μ L 配制好的碘化丙啶染色液 37℃ 避光温育 30 min, 300 目(孔径 40~50 μ m) 尼龙网过滤, BD Accuri C6 流式细胞仪检测样品, Flowjo 7.6 软件分析周期分布。

1.2.6 Western blot 法 Western blot 法检测 cyclin D1、p16、磷酸化 ERK1/2、Anti-ERK1 蛋白在 H1299 细胞株中的表达。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 μ g 蛋白, 经 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压 80 V 经 80 min 电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后, 用二抗室温孵育 1.5 h, TBST 清洗, ECL 发光并以凝胶显像仪显像。

1.2.7 免疫组织化学结果判断 由两位病理医师进行双盲法观察, 对免疫组织化学结果进行评估。结果判读标准: 阳性染色为棕黄色颗粒, GPR30 表达在细胞膜或细胞质; Ki-67 表达在细胞核。综合染色强度和分布范围进行评分, 阴性为 0 分; 染色弱或细胞质染色的细胞数小于 10% 为 1 分; 染色清晰或染色强者细胞数 10%~50% 为 2 分, 染色强者细胞数大于 50% 为 3 分。0~1 分为阴性, 2 分及以上者为阳性。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件对数据进行统计和分析。免疫组织化学实验相关性分析用 Spearman 法进行统计, 组间比较采用 χ^2 检验; 细胞增殖实验结果用 mean \pm SD 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GPR30 表达与 NSCLC 临床病理特征的关系 GPR30 表达在腺癌、低分化、III 期肿瘤表达率更高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 尽管和性别以及肿瘤大小的相关性差异无统计学意义($P > 0.05$), 但在女性以及直径大于 5 cm 的肿瘤表达

率更高; GPR30 表达与淋巴结转移无相关性($P > 0.05$), 见图 1 及表 1。

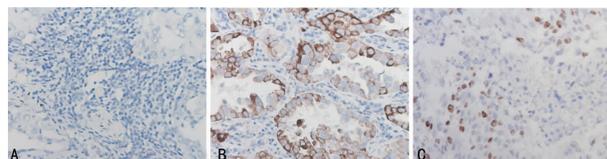


图 1 免疫组织化学检测 GPR30 和 Ki-67 在 NSCLC 组织中的表达(SP \times 400)

表 1 NSCLC 组织中 GPR30 表达与临床病理特征的关系

临床特征	<i>n</i>	GPR30[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>
性别			
男	42	16(39.10)	0.178
女	38	21(55.26)	
肿瘤直径(cm)			0.174
≤5	70	30(42.86)	
>5	10	7(70.00)	
淋巴结转移			0.254
有	48	25(45.83)	
无	32	12(46.88)	
组织类型			0.004 ^a
腺癌	56	34(60.71)	
鳞癌	16	3(18.75)	
其他	8	0(0.00)	
分化			0.017
高中分化	53	19(35.85)	
低分化	27	18(66.67)	
TNM 分期			0.001
I~II	50	16(32.00)	
III	30	21(66.67)	

^a: 腺癌与鳞癌相比较。

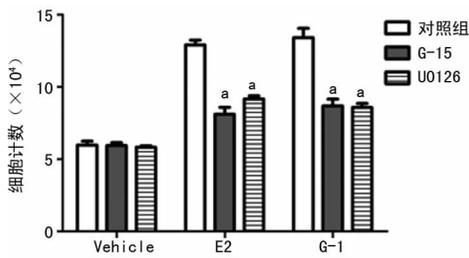
2.2 GPR30 表达在 NSCLC 组织样本中与 Ki-67 表达具有相关性 免疫组织化学结果显示 GPR30 的阳性表达率为 46.25%(37/80), Ki-67 为 60.00%(48/80), 两者经 Spearman 相关性分析呈正相关($r = 0.502$, $P = 0.000$), 见图 1 及表 2。

表 2 NSCLC 组织中 GPR30 与 Ki-67 的相关性

Ki-67	GPR30(<i>n</i>)		<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-		
+	32	16	0.502	0.000
-	5	27		

2.3 激活 GPR30 促进了 H1299 细胞增殖 GPR30 作为新的雌激素受体能与 E₂ 相结合, 从而改变细胞的生物学功能。H1299 细胞虽然不表达经典的雌激素受体 ER, 但 GPR30 表达阳性, 因而能与 E₂ 结合。发现在实验第 3 天, 加入 E₂ 或 GPR30 特异性激动剂 G-1, H1299 细胞计数明显增加($P <$

0.01, 图 2)。



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 E₂ 或 G-1 促进 H1299 细胞增殖

2.4 激活 GPR30 对 H1299 细胞周期的影响 以 G-1 作为 GPR30 的刺激因素观察 GPR30 对 H1299 细胞周期的调节作用。实验发现加入 G-1 后第 3 天, 更多的细胞进入了 S 期 (25.17%), 见图 3。

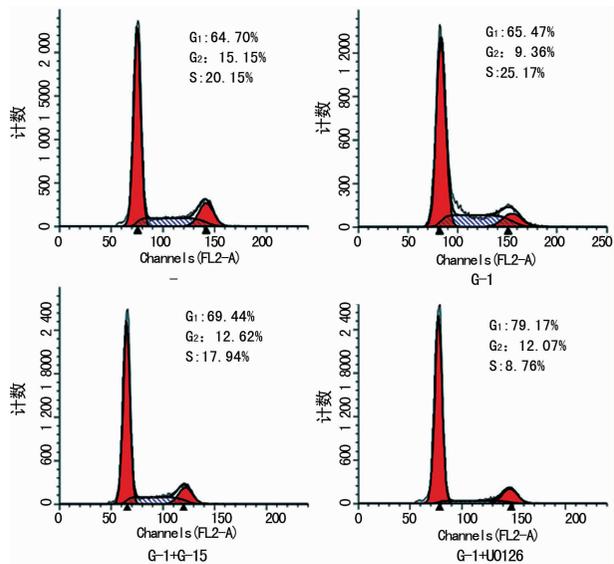


图 3 经过不同药物处理 H1299 细胞 3 d 后周期的分布

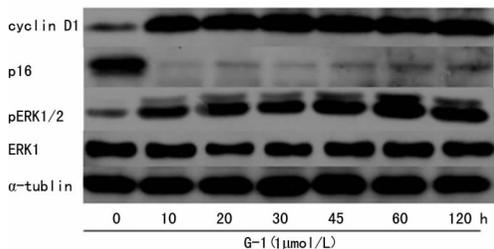


图 4 不同作用时间的 G-1 在 H1299 细胞引起 cyclin D1 和 p16 蛋白表达

2.5 GPR30 促增殖作用与 EGFR-MAPKs 信号途径相关 在细胞增殖实验中也观察到在加入 E₂ (或 G-1) 前用 GPR30 特异性拮抗剂 G-15 或 MEK1/2 抑制剂 U0126 预处理 2 h 后, E₂ (或 G-1) 的促增殖作用被抑制 ($P < 0.01$)。见图 2。类似的, 在细胞周期实验中发现用 G-15 或 U0126 预处理后, 细胞被阻滞在了 G₁ 期 (69.44%, 79.17%), 见图 3。进一步用 Western blot 方法检测了 EGFR-MAPKs 途径的重要信号分子 ERK1/2 的激活状态以及下游的细胞周期相关蛋白 cyclin D1 和 p16 蛋白的表达, 发现在加入 G-1 后, 磷酸化 ERK1/2 以及 cyclin D1 表达增加, 而 p16 蛋白表达减少; 而用 G-15 或 U0126 预处理 2

h 后, 则变化相反 (图 4, 5)。

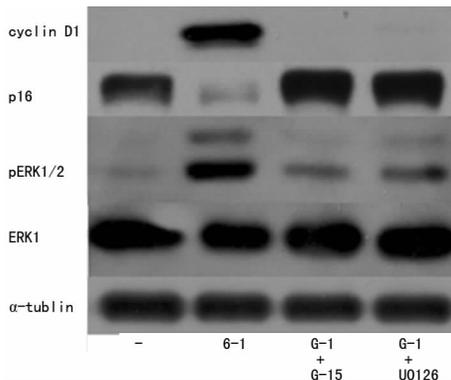


图 5 G-1 在 H1299 细胞通过 EGFR-MAPKs 信号转导途径调节 cyclin D1 和 p16 蛋白表达

3 讨论

近年来在激素相关的恶性肿瘤组织, 如乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌等中发现 GPR30 存在表达增加^[2]。GPR30 在大鼠肺部肿瘤也被检测到高水平表达, 可能与雌激素引起的扩增信号应答有关^[3]。GPR30 在人类肺癌中的表达鲜见报道, 国外 2012 年发表的一项研究结果证实, 相较于正常肺组织和正常肺支气管上皮细胞, GPR30 的表达在 NSCLC 组织及细胞系明显增高^[4]。Ki-67 是一种增殖细胞核抗原, 其功能与有丝分裂密切相关, 其表达水平与肿瘤细胞的增殖呈正相关。本研究发现 GPR30 在女性以及直径大于 5 cm 的 NSCLC 组织肿瘤表达率更高, 与 Ki-67 的表达也呈正相关, 提示 GPR30 在 NSCLC 的增殖中可能发挥作用。

GPR30 不仅能通过其他信号途径间接调节雌激素的功能, 也能直接与内源性雌激素、环境雌激素、三苯氧胺、特异性激动剂 G-1 等结合影响下游的快速 (非基因组)/慢速 (基因组) 效应^[2]。大量的研究已经证明, 雌激素能促进表达经典雌激素受体 ER α 和 ER β 的 NSCLC 细胞株增殖^[5]。NSCLC 细胞株 H1299 表达 GPR30, 但不表达经典的雌激素受体 ER, 可作为较好的研究 GPR30 的模型。本研究选用 E₂ 以及 G-1 作为 GPR30 的激活因素, 发现两者均能促进 H1299 细胞株增殖, 加入 GPR30 特异性拮抗剂 G-15 后能抑制其促增殖效应, 提示 E₂ 或 G-1 是通过激活 GPR30 受体促进增殖。

GPR30 属于 G 蛋白偶联受体 (GPCRs), 与其他 GPCRs 家族成员类似, 雌激素或其他配体与 GPR30 结合后, GPR30 活化其偶联 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, 后者反式激活表皮生长因子受体 EGFR, 随后活化下游多条信号途径, 继而参与细胞的增殖、迁徙和分化等, 其中以 EGFR-MAPKs 途径最为重要。在乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、甲状腺癌和头颈部鳞癌等多种不同来源的肿瘤细胞系中都存在 GPR30 被配体激活后通过反式激活 EGFR-MAPKs 途径而促进增殖的现象^[6]。对细胞周期的调节可能是 GPR30 影响增殖的重要机制, 如 c-fos, c-jun, cyclin D1, D2, p21, p53 等与细胞凋亡和细胞周期相关的一些重要分子位于 GPR30-EGFR-MAPKs 信号途径的下游^[7]。细胞周期蛋白 cyclin D1 是原癌基因, 其编码的蛋白产物与细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4 或 CDK6 在细胞 G₁ 期, 通过抑制 CDK4 的活性在细胞周期 G₁-S 检查点中发挥正性调控作用, 启动细

胞周期并促进 DNA 合成,加速细胞增殖。p16 基因作为肿瘤抑制基因,该基因编码的蛋白可与 cyclin D1 蛋白竞争调控 CDK4/CDK6 的活性,有效阻止细胞进入 S 期。大多数恶性肿瘤存在 p16 蛋白表达下调,在 NSCLC 组织中也检测到 p16、cyclin D1 蛋白的表达呈负相关^[8]。在甲状腺癌细胞系, GPR30 的激活通过上调 cyclin D1 表达而促进增殖^[9]。本研究发现,更多的 H1299 细胞在 G-1 作用后进入了 S 期,且 EGFR-MAPKs 信号途径的关键分子 ERK1/2 活化增加,下游的细胞周期蛋白 cyclin D1 增加,p16 蛋白表达下调,以后效应均能被 G-15 以及 MEK1/2 抑制剂 U0126 阻断,提示 EGFR-MAPKs 途径参与了 GPR30 被激活后促进 NSCLC 细胞的增殖作用。

本研究结果证实了雌激素能通过 GPR30-EGFR-MAPKs 途径促进 NSCLC 细胞增殖,为探讨 NSCLC 发病特点的性别差异提供新的思路,对其分子机制的进一步研究将有助于寻找新的治疗靶点和制定新的治疗策略。

参考文献

[1] Sathish V, Martin YN, Prakash YS. Sex steroid signaling: Implications for lung diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 150(2):94-108.

[2] Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 389(1-2):71-83.

[3] Hamilton DH, Griner LM, Keller JM, et al. Targeting estrogen receptor signaling with guleverstrant enhances immune and chemotherapy-mediated cytotoxicity of human lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(24):6204-

(上接第 614 页)

alone and radical surgery for clinical stage II - III esophageal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(6):435-441.

[8] Orditura M, Galizia G, Napolitano V, et al. Weekly chemotherapy with cisplatin and paclitaxel and concurrent radiation therapy as preoperative treatment in locally advanced esophageal cancer: a phase II study[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(8):820-827.

[9] 李国文, 郭跃信. 80 岁以上老年人食管癌的放射治疗[J]. *中华老年医学杂志*, 2007, 26(3):202-203.

[10] 张伟, 管喆, 殷海涛, 等. 放疗与低剂量奈达铂化疗联合治疗老年食管癌 40 例临床观察[J]. *山东医药*, 2015, 55(7):75-77.

[11] 杨峥, 王旻, 余杰, 等. 老年食管癌特征及放化疗结合与单纯放疗的疗效及安全性[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 2(34):778-779.

[12] 潘丁龙, 李建成, 杨燕, 等. 210 例中晚期食管癌放化疗的预后因素分析[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 2(20):140-144.

[13] 刘杨, 王昆仑, 袁翎. 食管癌根治性放疗 191 例疗效分析[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015(1):9-13.

6216.

[4] Jala VR, Radde BN, Haribabu B, et al. Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(7):624.

[5] Verma MK, Miki Y, Sasano H. Sex steroid receptors in human lung diseases[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 127(3-5):216-222.

[6] Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, et al. Heregulin- β 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.

[7] Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, et al. Crosstalk between GPER and growth factor signaling[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 137(1):50-56.

[8] Zuryn A, Litwiniec A, Safiejko-Mroczka B, et al. The effect of sulforaphane on the cell cycle, apoptosis and expression of cyclin D1 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cell line[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6):2521-2533.

[9] Adele V, Daniela B, Lidia A, et al. 17 β -Estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(4):1414-1423.

(收稿日期:2016-07-21 修回日期:2016-09-19)

[14] Park JW, Kim JH, Choi EK, et al. Prognosis of esophageal cancer patients with pathologic complete response after preoperative concurrent chemoradiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 81(3):691-697.

[15] 万钧, 韩春, 刘惠明. 食管癌的放射治疗[M]. 北京: 原子能出版社, 2006:101-111.

[16] 文黎明, 成先菊, 文成熟. 中老年人食管癌的临床和内镜下特征[J]. *临床荟萃*, 2000, 15(13):585.

[17] Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(5):1167-1174.

[18] 张署波, 繆建华. 奈达铂和 5-FU 联合放疗治疗中晚期食管癌的临床研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(23):1817-1819.

[19] 田大龙, 喻志冲, 李华, 等. 奈达铂与顺铂同步放化疗治疗中晚期食管癌的临床观察[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(12):36-39.

(收稿日期:2016-07-20 修回日期:2016-09-18)