

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)16-0048-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.16.012



# 雌激素对乳腺癌干细胞增殖、自我更新的作用研究

周勤梅<sup>1</sup>, 王 竞<sup>2</sup>, 喻允伶<sup>1△</sup>

(1. 重庆市铜梁区人民医院, 重庆 402560; 2. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

**摘要:**目的 探讨雌激素对乳腺癌干细胞(BCSC)增殖及自我更新的影响。方法 以人乳腺癌细胞 MCF-7 培养 BCSC, 并采用细胞免疫荧光实验验证; 用含 0, 1, 5, 10, 20, 100 nmol/L 雌激素的完全培养基培养 BCSC 0, 24, 48, 72 h 后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况; 用含 0, 10, 20 nmol/L 雌激素的完全培养基培养 BCSC 24 h 后, 观察细胞形态并计算成球率; 用含 0, 1, 5, 10 nmol/L 雌激素的完全培养基培养 BCSC 24 h 后, 采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)mRNA 的表达情况。结果 成功从 MCF-7 细胞中培养出 BCSC。与 0 nmol/L 比较, 1, 5, 10 nmol/L 雌激素作用下, BCSC 增殖能力显著增强( $P < 0.05$ ), 且与浓度和作用时间呈正相关; 与 0 nmol/L 比较, 10 nmol/L 和 20 nmol/L 雌激素作用下, BCSC 体积均显著增大, 数量均显著增多( $P < 0.05$ ); 与 0 nmol/L 比较, 1, 5, 10 nmol/L 雌激素作用下, BCSC 的 PI3K, AKT, mTOR mRNA 表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ), 且存在浓度依赖性。结论 较低浓度(0~10 nmol/L)的雌激素具有促进 BCSC 生长的作用, 其作用机制可能与活化 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

**关键词:** 雌激素; 乳腺癌干细胞; 增殖; 自我更新; PI3K/AKT/mTOR 信号通路

## Effects of Estrogen on Proliferation and Self-Renewal of Breast Cancer Stem Cells

ZHOU Qinmei<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, YU Yunling<sup>1</sup>

(1. The People's Hospital of Tongliang District, Chongqing, China 402560; 2. College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of estrogen on the proliferation and self-renewal of breast cancer stem cells (BCSCs). **Methods** BCSCs were cultured from human breast cancer cells MCF-7, and they were verified by the cell immunofluorescence test. After the breast BCSCs were cultured in complete medium containing 0, 1, 5, 10, 20, 100 nmol/L estrogen for 0, 24, 48, 72 h, the cell proliferation was detected by the CCK-8 method. After the BCSCs were cultured in complete medium containing 0, 10, 20 nmol/L estrogen for 24 h, the cell morphology was observed and the spheroidization rate was calculated. After the BCSCs were cultured in complete medium containing 0, 1, 5, 10 nmol/L estrogen for 24 h, the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT) and mammalian target of rapamycin (mTOR) mRNA was detected by the fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results** BCSCs were successfully cultured from MCF-7 cells. Compared with that at 0 nmol/L estrogen, the proliferation ability of BCSCs at 1, 5, 10 nmol/L estrogen significantly increased ( $P < 0.05$ ), and that was positively correlated with the concentration and time. Compared with those at 0 nmol/L estrogen, the volume and quantity of BCSCs at 10 nmol/L and 20 nmol/L estrogen significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those at 0 nmol/L estrogen, the expression levels of PI3K, AKT and mTOR mRNA in BCSCs at 1, 5, 10 nmol/L estrogen significantly increased ( $P < 0.05$ ), with a concentration-dependent manner. **Conclusion** Low concentration (0-10 nmol/L) of estrogen can promote the growth of BCSCs, and its mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**Key words:** estrogen; breast cancer stem cell; proliferation; self-renewal; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

据最新统计, 乳腺癌已成为全球女性第一大癌症<sup>[1]</sup>, 发病率和死亡率均较高。乳腺癌发生与环境、激素、表观遗传、基因突变、生活方式等多种因素相关。目前, 针对乳腺癌的主要治疗手段有手术切除及辅助放射治疗和化学药物治疗(简称放化疗)等。尽管在乳腺癌治疗方面已取得很大进展, 但仍有 20%~30% 的复发/转移率<sup>[2-3]</sup>。因此, 继续深入研究乳腺癌复发、转移、耐药的分子机制, 寻求乳腺癌早期诊断及治疗新靶

点具有重要意义。乳腺癌干细胞(BCSC)是相对于乳腺癌细胞的独立细胞亚群, 具有典型的自我更新能力, 且可特异性与乳腺癌细胞表面抗原结合。本研究团队前期研究发现, 雌激素可促进人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及 MCF-7 可诱导干细胞表达, 但具体机制尚未明晰。磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是哺乳动物肿瘤免疫中重要的信号通路, 在 70% 恶性肿瘤的癌变过程

第一作者: 周勤梅, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为妇科肿瘤, (电子信箱)1755373832@qq.com。

△通信作者: 喻允伶, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)56297828@qq.com。

中发挥了极重要的作用<sup>[4-6]</sup>。本研究中验证了MCF细胞具有乳腺癌干细胞特性,探讨不同浓度雌激素对BCSC的增殖和自我更新作用机制,以为雌激素用于乳腺癌的临床治疗提供实验数据和新的思考策略。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与细胞

仪器: CX23型荧光显微镜(日本Olympus公司); FLX800型酶标仪(BioTek公司); SpectraMax M5型荧光定量梯度聚合酶链式反应仪(美国MD公司)。

试剂: 雌二醇(批号为E8875-1G), 聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯(Poly-HEMA, 批号为P3932-10G), 均购自美国Sigma公司; DMEM/F12培养基(批号为31331093), 人白细胞抗原B27(批号为A1486701)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 批号为13256-029)、表皮生长因子(批号为RP-8661), 均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 牛血清白蛋白(BSA, 批号为A8010), 胰岛素(批号为I8830), 均购自北京索莱宝科技有限公司; Anti-CD44抗体(批号为ab189524), Anti-CD24抗体(批号为ab202073), 均购自Abcam公司。

细胞: MCF细胞系(中国科学院细胞库, 编号SCSP-531)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 BCSC的培养

取Poly-HEMA 1.2 g, 加入95%乙醇, 置10 mL容量瓶, 定容, 37℃摇床溶解过夜, 经0.22 μm过滤器滤过, 制成体积分数为1.2%的Poly-HEMA; 取适量, 铺6孔板, 每孔1 mL, 超净工作台放置过夜; 使用前以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗不少于2遍; 每孔加入 $1 \times 10^4$ 个MCF-7细胞, 并加入BCSC培养基(组成: 100 mL DMEM/F12培养基中加入2 mL人白细胞抗原B27、2 μg bFGF、20 μg EGF、0.4 g BSA、500 μg胰岛素和100 μL肝素2 mL)培养。

#### 1.2.2 细胞免疫荧光实验

收集上述培养液中悬浮的BCSC(第2代), 使用胰蛋白酶消化, 置1 mL离心管中, PBS浸洗3 min, 1 000 r/min离心5 min, 平行3次; 用4%多聚甲醛固定BCSC, 室温过夜, 0.5% Triton X-100(以PBS配制)室温通透20 min, PBS浸洗3 min, 1 000 r/min离心5 min, 平行3次, 吸干PBS。在离心管内加入正常山羊血清, 室温封闭30 min, 1 000 r/min离心5 min, 加入一抗, 4℃孵育过夜, PBS浸洗细胞3 min, 1 000 r/min离心5 min, 平行3次, 吸干多余液体后滴加荧光二抗(CD24/CD44), 暗处孵育1 h; PBS浸洗3 min, 1 000 r/min离心5 min, 浸洗3次后, 滴加DAPI染核, 避光孵育5 min, PBS浸洗3 min, 1 000 r/min

离心5 min, 平行3次, 吸干多余液体; 用含抗荧光淬灭剂的封片液重悬细胞并封片, 置荧光显微镜下观察并采集图像。

#### 1.2.3 BCSC的生长

采用CCK-8法。将BCSC以 $1 \times 10^5$ /孔密度接种于96孔板中, 每孔分别加入含0, 1, 5, 10, 20, 100 nmol/L雌激素的完全培养基培养。细胞贴壁后, 分别于0, 24, 48, 72 h时以CCK-8试剂孵育1 h。采用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(OD)值, 并对数据进行分析。

#### 1.2.4 BCSC的自我更新

采用Mammosphere形成实验将BCSC以 $1 \times 10^5$ /孔密度接种于96孔板中, 加入含0, 10, 20 nmol/L雌激素的完全培养基培养24 h, 使细胞贴壁生长。显微镜下观察孵育48 h后的BCSC球形态, 拍照。并统计成球率(细胞成球标准为紧密的非多细胞悬浮性球体, 直径大于50 μm)。细胞成球率(%) = 细胞球体数/每孔所接种细胞数 $\times 100\%$ 。

#### 1.2.5 相关基因mRNA的表达

采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法。以不同浓度(0, 1, 5, 10 nmol/L)雌激素处理BCSC 24 h后, 提取BCSC的总RNA, 计算RNA浓度。取1 μg RNA, 逆转录为cDNA, 采用荧光定量PCR法检测PI3K, AKT, mTOR mRNA的表达水平。

#### 1.2.6 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BCSC的获得

经连续2周培养, 从MCF-7细胞中成功培养出了BCSC(见图1), 且其中CD44显著表达, 而CD24不表达(见图2)。

### 2.2 BCSC的生长情况

与0 nmol/L比较, 1, 5, 10 nmol/L雌激素作用下, BCSC增殖能力显著升高, 且随着雌激素浓度的升高和作用时间延长, BCSC的增殖能力逐渐增强; 但当雌激素浓度大于10 nmol/L时, BCSC的生长开始受到显著抑制(除0 h外,  $P < 0.05$ )。详见图3。

### 2.3 BCSC自我更新情况

与0 nmol/L比较, 10 nmol/L和20 nmol/L雌激素作用下BCSC体积均显著增大, 数量显著增多(见图4); 当雌激素浓度为20 nmol/L时, BCSC的2个指标均低于浓度为10 nmol/L时。

### 2.4 BCSC相关基因mRNA的表达

与0 nmol/L比较, 1, 5, 10 nmol/L雌激素作用下,

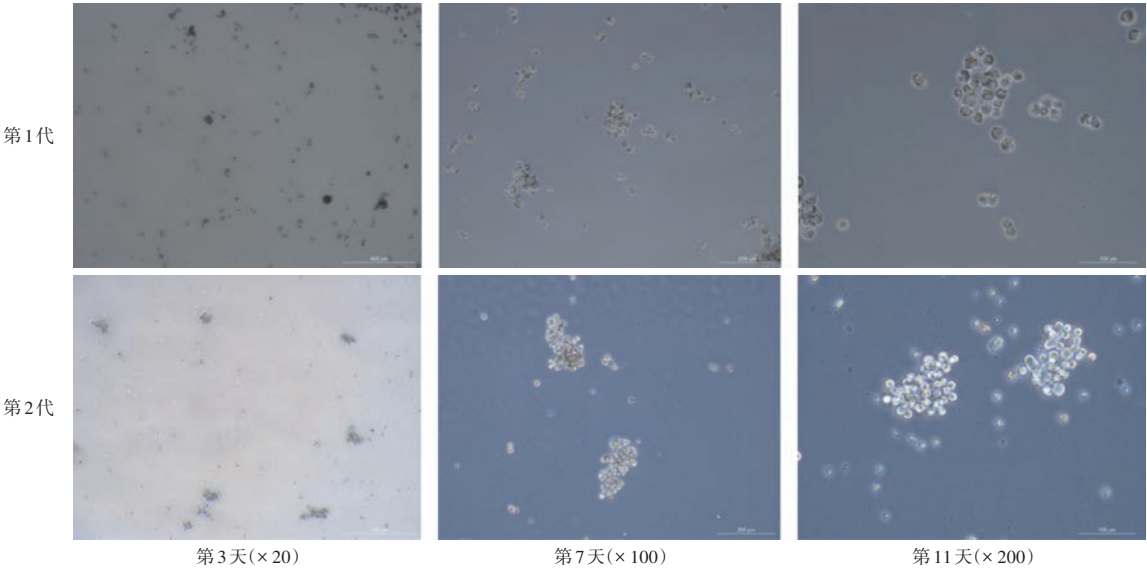


图 1 乳腺癌干细胞的培养  
Fig. 1 Culture of BCSCs

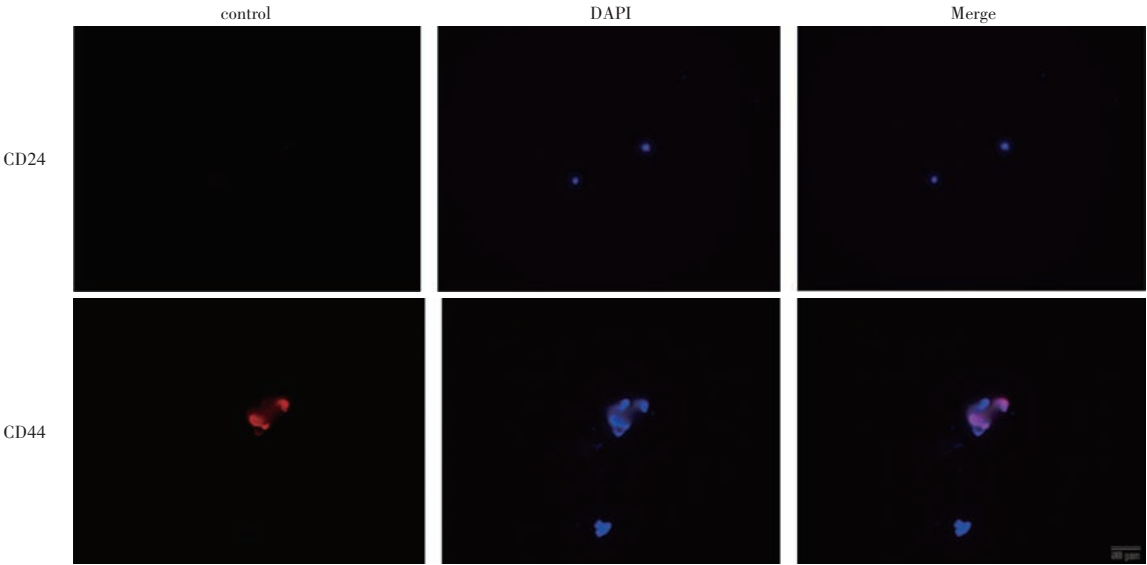


图 2 乳腺癌干细胞的鉴定  
Fig. 2 Identification of BCSCs

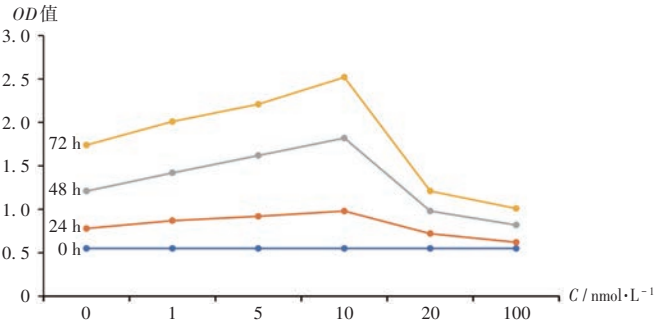


图 3 乳腺癌干细胞的生长情况  
Fig. 3 Growth of BCSCs

BCSC 的 PI3K, AKT, mTOR mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且在低浓度 (1, 5, 10 nmol / L) 雌激素作用下存在浓度依赖性 (见图 5)。

### 3 讨论

近年来, 手术切除和内分泌靶向治疗在乳腺癌治疗中已取得显著进展, 但复发和转移仍然是乳腺癌患者面临的两大死亡原因<sup>[7]</sup>。临床医师常长期补充雌激素治疗妇科内分泌疾病, 但该治疗方法存在很大争议。有研究报道, 补充雌激素会显著增加罹患妇科肿瘤的概率, 但同时也有研究者发现, 这种疗法可减少妇科肿瘤的发生<sup>[8]</sup>。通过病例比对发现, 长期服用雌二醇 ( $E_2$ ) 的绝经期妇女的卵巢癌发病率比未服用  $E_2$  者提高了 55%; 分析 1966 年至 2006 年大部分相关研究发现, 雌激素疗法实可显著增加卵巢癌的发生风险。绝经期妇女补充雌激素者乳腺癌发病率相较未补充者可显著升高<sup>[9-10]</sup>。



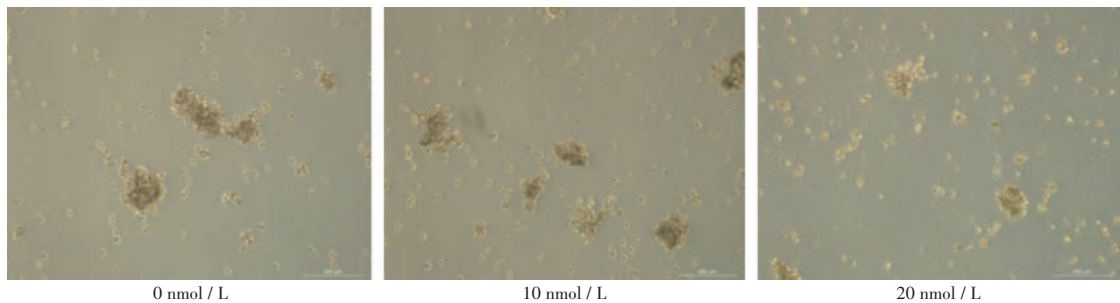
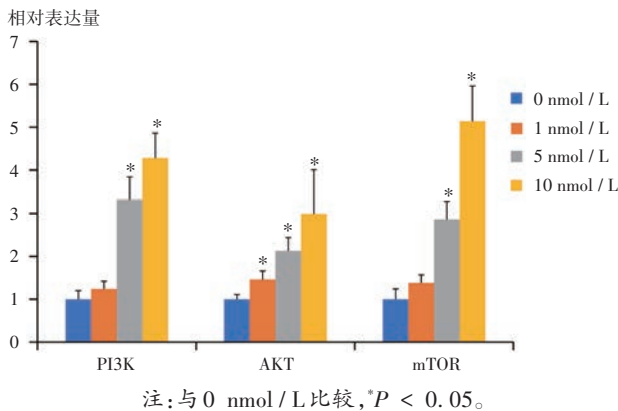


图4 乳腺癌干细胞自我更新情况  
Fig. 4 Self-renewal of BCSCs



注:与0 nmol/L比较,\* $P < 0.05$ 。

图5 乳腺癌干细胞相关基因mRNA的表达

Note: Compared with those at 0 nmol/L, \* $P < 0.05$ .

Fig. 5 Expression of related gene mRNA in BCSCs

国外近年有研究报道,不同浓度雌激素对MCF-7细胞生长的影响不同,其中,高浓度(20 nmol/L)雌激素对MCF-7细胞生长有一定抑制作用<sup>[11-12]</sup>,但高浓度的雌激素对MCF-7细胞的抑制作用可能并不依赖于雌激素受体,不同浓度的雌激素作用于MCF-7细胞,可能产生不同效果。另有报道表明,雌激素对乳腺癌肿瘤的发生发展、对化疗耐药及复发转移过程也存在相同作用<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,10 nmol/L雌激素作用24 h可明显促进BCSC的自我更新能力,但20 nmol/L雌激素反而抑制其自我更新。

PI3K/AKT/mTOR信号通路的异常激活与癌细胞的增殖、膀胱癌干细胞(BCSC)的存活和耐药性密切相关。RTK, GPCRs, Ras可激活PI3K,激活后的PI3K可活化其下游因子AKT和PDK1。此外, mTOR, p70S6K, 4E-BP1和糖原合成酶激酶3(GSK3)是AKT的下游效应因子,可被AKT激活,以刺激癌细胞的蛋白质合成、生长、增殖和迁移<sup>[14-15]</sup>。本研究结果显示,经雌激素诱导后,BCSC的PI3K, AKT, mTOR mRNA的表达水平均显著升高,且存在浓度依赖性,这可能意味着较低浓度(10 nmol/L)的雌激素能有效促进PI3K/AKT/mTOR信号通路相关基因的表达。

综上所述,低浓度(10 nmol/L)雌激素可提高BCSC

的增殖、自我更新能力,此作用可能涉及PI3K/AKT/mTOR信号通路,但仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] GALLO M, CAMPIONE S, DI VITO V, et al. Primary Neuroendocrine Neoplasms of the Breast: Still Open Issues[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 610230.
- [2] BROGI E, KRYSTEL - WHITEMORE M. Papillary neoplasms of the breast including upgrade rates and management of intraductal papilloma without atypia diagnosed at core needle biopsy[J]. Mod Pathol, 2021, 34: 78 - 93.
- [3] SMYMIOTIS V, THEODOSOPOULOS TH, MARINIS A, et al. Metastatic disease in the breast from nonmammary neoplasms[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2005, 26(5): 547 - 550.
- [4] SHARMA VR, GUPTA GK, SHARMA AK, et al. PI3K/Akt/mTOR Intracellular Pathway and Breast Cancer: Factors, Mechanism and Regulation[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(11): 1633 - 1638.
- [5] SHARMA V, SHARMA AK, PUNJ V, et al. Recent nanotechnological interventions targeting PI3K/Akt/mTOR pathway: A focus on breast cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 133 - 146.
- [6] SONG Q, ZHANG W, SHI D, et al. Overexpression of cannabinoid receptor 2 is associated with human breast cancer proliferation, apoptosis, chemosensitivity and prognosis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Med, 2023, 12(12): 13538 - 13550.
- [7] BURKE EE, KODUMUDI K, RAMAMOORTHY G, et al. Vaccine Therapies for Breast Cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2019, 28(3): 353 - 367.
- [8] HALDOSÉN LA, ZHAO CY, DAHLMAN - WRIGHT K. Estrogen receptor beta in breast cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1): 665 - 672.
- [9] FUHRMAN BJ, TETER BE, BARBA M, et al. Equol status modifies the association of soy intake and mammographic density in a sample of postmenopausal women [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(1): 33 - 42.
- [10] MACKEY RH, FANELLI TJ, MODUGNO F, et al. Hormone therapy, estrogen metabolism, and risk of breast cancer in the