

## 环境雌激素双酚 AF 诱导神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系增殖与侵袭的体外实验

王常丽<sup>1</sup>, 贾辉<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 梁尔光<sup>2</sup>, 王一仁<sup>3</sup>, 马宏达<sup>1</sup>, 赵庆春<sup>1</sup>, 王莉莉<sup>2</sup>, 叶棋浓<sup>2</sup>, 侯明晓<sup>1</sup>, 冯帆<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 沈阳军区总医院 药学部, 辽宁沈阳 110016; <sup>2</sup> 军事医学科学院, 北京 100850; <sup>3</sup> 沈阳药科大学, 辽宁沈阳 110016

**摘要:** **目的** 探讨环境雌激素双酚 AF(bisphenol AF, BPAF) 对神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 增殖, 及雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER  $\alpha$ ) 转录活性的影响。**方法** SH-SY5Y 细胞转染 ERE-Luc 或 CatD-Luc 荧光素酶报告基因后, 使用 0.01  $\mu\text{mol/L}$ 、0.03  $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.3  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、3  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度的 BPAF 处理 SH-SY5Y 细胞, 采用荧光素酶报告基因实验 (luciferase) 检测 BPAF 对 ER  $\alpha$  转录活性的影响; 使用 BPAF 作用诱导 ER  $\alpha$  转录活性的  $\text{EC}_{\text{max}}$  浓度处理 SH-SY5Y 细胞, 采用 CCK-8 实验检测细胞样品在 450 nm 波长的吸光度值; 在 ER  $\alpha$  表达阴性的三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 细胞系 MDA-MB-231 中转染 ER  $\alpha$  表达载体; 在 SH-SY5Y 细胞中转染 ER  $\alpha$  的小干扰 RNA (siRNA) 或使用 ER  $\alpha$  的拮抗剂 ICI-182780 (100 nmol/L) 预处理 SH-SY5Y 细胞后, 检测 BPAF 对 ER  $\alpha$  转录活性的诱导作用或对 SH-SY5Y 细胞增殖 / 侵袭的促进作用。**结果** BPAF 能够剂量依赖性地 ( $R^2=0.94$ ,  $P=0.0076$ ) 在 SH-SY5Y 细胞中提高 ER  $\alpha$  的转录活性, 其  $\text{EC}_{50}$  值为  $(0.44 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}$ ,  $\text{EC}_{\text{max}}$  值为 3  $\mu\text{mol/L}$ ; 在 SH-SY5Y 细胞中转染 ER  $\alpha$  的 siRNA 载体, 或使用 ER  $\alpha$  的拮抗剂 (100 nmol/L ICI-182780) 处理 SH-SY5Y 细胞能够显著下调 BPAF 诱导的 ER  $\alpha$  转录活性 (抑制率分别为 76.97% 和 77.75%), 及其对 SH-SY5Y 细胞增殖 (抑制率分别为 77.42% 和 86.76%)、侵袭的促进作用 (抑制率分别为 95.87% 和 105.56%)。**结论** BPAF 可能通过诱导 ER  $\alpha$  的转录活性, 促进神经母细胞瘤细胞系的增殖与侵袭。

**关键词:** 环境雌激素; 双酚 AF; 神经母细胞瘤; SH-SY5Y 细胞系; 雌激素受体  $\alpha$ ; 转录活性; 增殖与侵袭

中图分类号: R 73-3 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2016)03-0251-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2016.03.015

网络出版时间: 2015-12-24 10:36:52 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20151224.1036.004.html>

### Environmental estrogen bisphenol AF enhanced proliferation and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cell line in vitro

WANG Changli<sup>1</sup>, JIA Hui<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, LIANG Erguang<sup>2</sup>, WANG Yiren<sup>3</sup>, MA Hongda<sup>1</sup>, ZHAO Qingchun<sup>1</sup>, WANG Lili<sup>2</sup>, YE Qinong<sup>2</sup>, HOU Mingxiao<sup>1</sup>, FENG Fan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Command Area, Shenyang 110016, Liaoning Province, China;

<sup>2</sup>Military Medical Science Academy of the Chinese PLA, Beijing 100850, China; <sup>3</sup>Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Corresponding author: FENG Fan. Email: fengfanbio@126.com

**Abstract: Objective** To declare the activity of environmental estrogen bisphenol AF (BPAF) in neuroblastoma proliferation or invasion and the effect of BPAF on the transcriptional activity of estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ). **Methods** SH-SY5Y cells, which were transfected with ERE-Luc or CatD-Luc, were treated with indicated dose (0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 0.03  $\mu\text{mol/L}$ , 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\mu\text{mol/L}$ , 3  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of BPAF. Next, cells were harvested and analyzed by luciferase assays. Then, SH-SY-5Y cells were seeded in 96-well plates and were treated by  $\text{EC}_{\text{max}}$  of BPAF. The growth curves for each cell group were drawn according to the volume of O.D. 450 nm. The siRNA (small interfere RNA) of ER  $\alpha$  or its antagonist (ICI-182780) was used to declare the specificity of BPAF function, and ER  $\alpha$  expression vector was transfected by MDA-MB-231 cells in triple negative breast cancer (TNBC). SH-SY5Y cells were treated with  $\text{EC}_{\text{max}}$  of BPAF after transfection with ER  $\alpha$  siRNA or treatment with ICI-182780 (100 nmol/L). Then, the induction of BPAF to ER  $\alpha$  transcriptional activity and its promoted effect on proliferation and invasion of SH-SY5Y cells was detected. **Results** Treatment of BPAF induced the transcriptional activity of ER  $\alpha$  in a dose dependent manner [ $\text{EC}_{50}=(0.44 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}$ ,  $R^2=0.94$ ,  $P=0.0076$ ], and the  $\text{EC}_{\text{max}}$  value of BPAF on ER  $\alpha$  activity was 3  $\mu\text{mol/L}$ . Transfection of ER  $\alpha$  siRNA could disrupt the activity of ER  $\alpha$  induced by BPAF (3  $\mu\text{mol/L}$ ) significantly (inhibition rate, IR=76.97%), SH-SY5Y proliferation (IR=77.42%) and invasion (IR=95.87%). Treatment of 100 nmol/L ICI-182780 also inhibited ER  $\alpha$  activity (IR=77.75%), SH-SY5Y proliferation (IR=86.76%) and invasion (IR=105.56%).

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”项目 (2013ZX09J13109-03B)

Supported by “Major Country to Create a Special New Drugs” S&T Major Project(2013ZX09J13109-03B)

作者简介: 王常丽, 女, 硕士, 药师。研究方向: 生化和肿瘤药理学。Email: wchl0918@163.com

通信作者: 冯帆, 男, 博士, 主管药师。Email: fengfanbio@126.com

**Conclusion** BPAF will promote the proliferation or invasion of neuroblastoma cells by inducing the transcription factor activity of ER  $\alpha$ .

**Keywords:** environmental estrogen; bisphenol AF; neuroblastoma; SH-SY5Y cell line; estrogen receptor  $\alpha$ ; transcription factor activity; proliferation and invasion

内分泌干扰物质 (endocrine disrupt chemicals, EDCs) 是一类存在于环境中能够干扰人体各种激素的合成、转运、释放与代谢, 进而影响内分泌系统调控的化学物质<sup>[1]</sup>。以双酚 AF (bisphenol AF, BPAF) 为代表的化工原料、增塑剂、各种色素、防腐剂等均有诱导雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER  $\alpha$ ) 转录活性的潜在作用, 因此又被称为环境雌激素 (environmental estrogens, EEs)<sup>[2-4]</sup>。目前对 EEs 的研究多停留在初步识别阶段, 而 EEs 与 ER  $\alpha$  相互作用在内分泌依赖 / 相关肿瘤发生发展中的作用细节鲜有报道。神经母细胞瘤是儿童及婴幼儿最常见的颅外肿瘤, 目前对其发生机制尚不清楚<sup>[5]</sup>。已有研究指出, ER  $\alpha$  在神经母细胞瘤组织标本和细胞系中表达阳性<sup>[5-8]</sup>。为深入研究环境雌激素类物质对内分泌依赖 / 相关肿瘤的影响, 本研究选取 BPAF 为模型药物进行体外研究, 观察给药后 BPAF 对神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 增殖和侵袭的影响。

## 材料和方法

**1 药品、试剂和设备** BPAF 和 ER  $\alpha$  拮抗剂 ICI-182780 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司; Luciferase 试剂盒购自美国 Promega 公司; CCK-8 试剂购自美国 Amerresco 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; Trans-well 细胞 24 孔培养板和 Trans-well 小室以及 96 孔细胞培养板等购自美国 Corning 公司。TS-100 相差倒置显微镜购自日本 Nikon 公司; 多功能酶标仪 (Wallac 公司)。

**2 细胞培养和转染** 神经母细胞系 SH-SY5Y 和乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自中国医学科学院细胞中心<sup>[9]</sup>, 培养于添加 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液中; 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。表达载体: ERE-Luc 和 CatD-Luc 报告基因载体由军事医学科学院叶棋浓研究员惠赠<sup>[6]</sup>, ER  $\alpha$  表达载体和 siRNA 载体<sup>[9]</sup> 为沈阳军区总医院曹鹏博士惠赐。转染实验: 将 0.5  $\mu$ l 的 Lipofectamine 2000 转染试剂和 200 ng 核酸 (由 0.5  $\mu$ l 无血清无抗生素的 MDEM 培养基溶解与稀释) 分别加入到 2 个 EP 管 (各含 24.5  $\mu$ l 无血清无抗生素培养基) 中, 充分混匀, 室温静置 15 min 后, 将两管液体等比例混合, 轻轻混匀后室温静置 15 min, 备用。

**3 荧光素酶报告基因实验** 参照 Zhang 等<sup>[10]</sup> 的方法进行实验: SH-SY5Y 或 MDA-MB-231 细胞转染相应质粒后, 使用药物处理 (0.01  $\mu$ mol/L、0.03  $\mu$ mol/L、0.1  $\mu$ mol/L、0.3  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L、3  $\mu$ mol/L 和 10  $\mu$ mol/L BPAF 或 100 nmol/L ICI-182780), 按照 Promega 公司提供的说明书进行实验, 分别检测 Luciferase 的活性和内标  $\beta$ -galactosidase 的活性。

**4 细胞增殖实验** 将 SH-SY5Y 接种于 96 孔板中, 加入特定浓度的药物 (3  $\mu$ mol/L BPAF, 100 nmol/L ICI-182780), 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 于 0 d、1 d、2 d、3 d 和 4 d 时每孔分别加入 20  $\mu$ l CCK-8 试剂, 再置于 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 4 h 后, 使用多功能酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值<sup>[11-12]</sup>。

**5 Trans-well 实验** 参照 Yang 等<sup>[12]</sup> 和 Chen 等<sup>[13]</sup> 的方法进行实验: 使用无血清 RPMI-1640 培养基按 1:5 比例稀释 ECM 胶 (美国 Sigma 公司) 预铺 Trans-well 小室 (每孔 30  $\mu$ l), 37°C 孵育 2~4 h; 使用药物处理 SH-SY5Y 细胞后 (3  $\mu$ mol/L BPAF, 100 nmol/L ICI-182780), 消化并使用无血清 RPMI-1640 培养基重悬至  $5 \times 10^5$ /ml 的细胞浓度, 加入 Trans-well 小室中, 每孔 0.2 ml; 24 孔细胞培养板中加入含有 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基后, 将小室放入 24 孔板; 37°C 孵育 4~6 h 后使用结晶紫染色 (无水乙醇配置, 0.25% 溶液), 每孔 5 个视野拍照, 使用乙酸洗脱后检测吸光度值 (OD<sub>590nm</sub>)。相对侵袭细胞数<sup>[14-15]</sup> = 实验组 OD<sub>590nm</sub> / 对照组 OD<sub>590nm</sub>。

**6 统计学分析** 应用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

**1 BPAF 诱导 ER  $\alpha$  的转录活性** 结果如图 1 所示, 与溶剂对照 (1% DMSO) 相比, BPAF 能够剂量依赖性地诱导 ERE-Luc (雌激素应答元件荧光素酶报告基因) 和 catD-Luc (ER  $\alpha$  应答基因 CTSD 的荧光素酶报告基因) 的活性, 其 EC<sub>50</sub> 值为 (0.44  $\pm$  0.09)  $\mu$ mol/L,  $R^2$  和  $P$  值分别为 0.94 和 0.007 6, 其作用的 EC<sub>max</sub> 浓度为 3  $\mu$ mol/L。ER  $\alpha$  的拮抗剂 ICI-182780 (100 nmol/L) 能够显著抑制 BPAF 诱导的 ER  $\alpha$  转录活性 (抑制率为 77.75%)。EC<sub>max</sub> 浓度 BPAF (3  $\mu$ mol/L) 仅能够在转染 ER  $\alpha$  表达载体的

ER $\alpha$  表达阴性的 MDA-MB-231 中诱导 ER $\alpha$  的转录活性 (图 1C)。在 SH-SY5Y 细胞转染 ER $\alpha$  的小干扰 RNA(siRNA, 图 1D) 能够下调 3  $\mu$ mol/L BPAF 诱导的 ER $\alpha$  转录活性 (抑制率为 76.97%)。

**2 BPAF 诱导细胞增殖** 如图 2A 所示, 与对照组相比, BPAF 能够促进 SH-SY5Y 细胞的增殖作用。进一步实验显示, ER $\alpha$  的抑制剂 (图 2B) 或 siRNA (图 2c) 都能够抑制 BPAF 的活性 (抑制率分别为 86.76% 和 77.42%)。这表明 BPAF 可能通过 ER $\alpha$  诱导 SH-SY5Y 细胞增殖。

**3 BPAF 诱导细胞侵袭** 如图 3 所示, 与对照组相比, BPAF 能够促进 SH-SY5Y 细胞的侵袭作用, ER $\alpha$  的抑制剂或 siRNA 都能够抑制 BPAF 的活性 (抑制率分别为 105.56% 和 95.87%)。这表明 BPAF 可能通过 ER $\alpha$  诱导 SH-SY5Y 细胞侵袭。

## 讨论

ER $\alpha$  是一种重要的核受体, 具有配体结合结构域、AF-1 和 AF-2 等 2 个转录激活结构域以及

DNA 结合结构域<sup>[6,16]</sup>。ER $\alpha$  能够为雌激素等配体活化, 进而转位进入细胞核, 与其应答基因启动子区的识别元件相结合并介导其应答基因的转录, 最终产生相关的生理学效应<sup>[6,17]</sup>。作为内分泌依赖和相关肿瘤的调控枢纽, 发现和识别具有激动活性的环境雌激素/污染物具有重要意义。计算化学技术、分子生物学技术、特别是荧光素酶报告基因技术等环境雌激素快速发现技术得到了广泛应用<sup>[18-19]</sup>, 但上述方法也存在着操作烦琐、灵敏度低等缺点。在此基础上我们利用基于荧光标记细胞模型的高内涵分析 (high content analysis, HCA), 建立了在稳定表达绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)-ER $\alpha$  细胞核颗粒形成 (Foci 作用) 的活细胞模型内, 利用图像分析技术高通量和定量检测和识别 EEs 的新方法<sup>[19]</sup>。尽管上述研究为 EEs 污染的监控和防治奠定了基础, 但仍局限在 EEs 的发现和识别层面, 对其生理学作用和分子机制仍需深入研究。包括 BPAF、壬基酚、BPA、PCB (多氯联苯) 类有机氯农药、二恶英等毒性气体和氟利

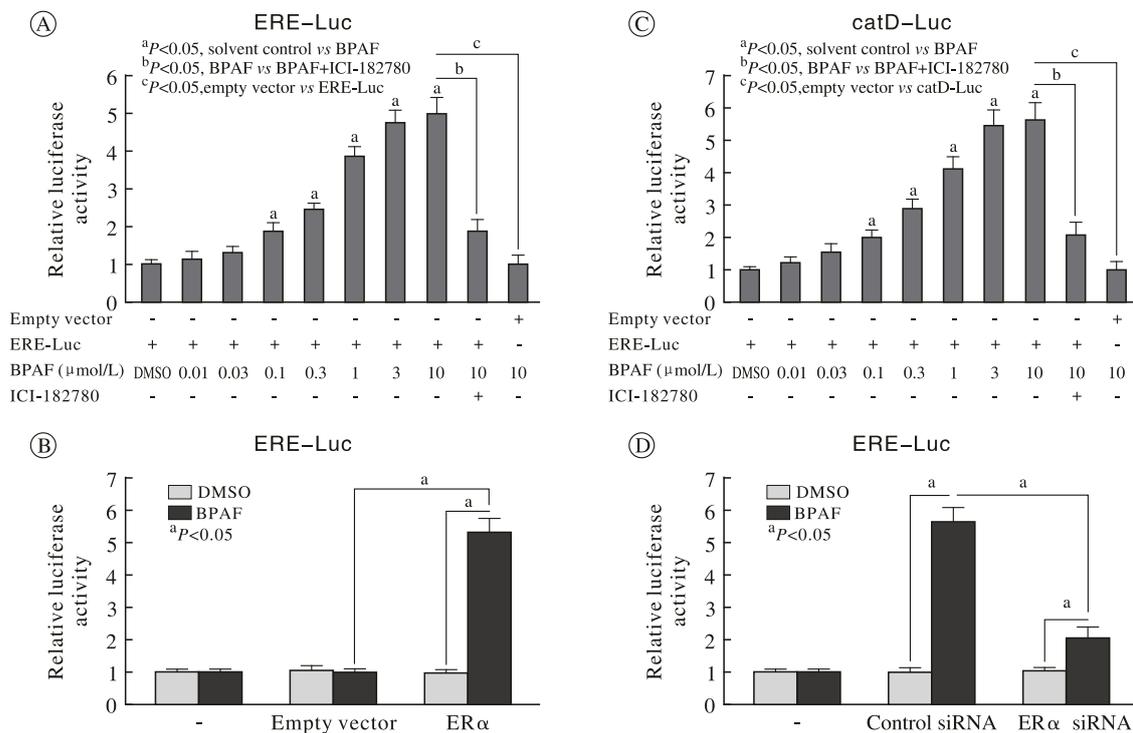


图 1 BPAF 能够诱导 ER $\alpha$  的转录活性 A: SH-SY5Y 细胞受不同剂量 BPAF 或 100 nmol/L ICI-182780 处理后进行检测 ERE-Luc 活性; B: SH-SY5Y 细胞受不同剂量 BPAF 或 100 nmol/L ICI-182780 处理后进行检测 catD-Luc 活性; C: MDA-MB-231 细胞转染空载体 (empty vector) 或 ER $\alpha$  表达载体, 受 3  $\mu$ mol/L BPAF 处理后进行检测 ERE-Luc 活性; D: SH-SY-5Y 细胞转染对照小干扰 RNA 载体 (control siRNA) 或 ER $\alpha$  小干扰 RNA 载体 (siRNA), 受 3  $\mu$ mol/L BPAF 处理后进行检测 ERE-Luc 活性

Fig.1 BPAF induces the activity of ER $\alpha$  A: SH-SY5Y cells were treated with indicated amount of BPAF and then harvested for luciferase analysis for ERE-Luc activity; B: SH-SY5Y cells were treated with indicated amount of BPAF and then harvested for luciferase analysis for catD-Luc activity; C: MDA-MB-231 cells, which were transfected with empty vector or ER $\alpha$  vector, were treated with 3  $\mu$ mol/L BPAF and then harvested for luciferase analysis for ERE-Luc activity; D: SH-SY5Y, which were transfected with control siRNA or ER $\alpha$  siRNA, were treated with 3  $\mu$ mol/L BPAF and then harvested for luciferase analysis for ERE-Luc activity

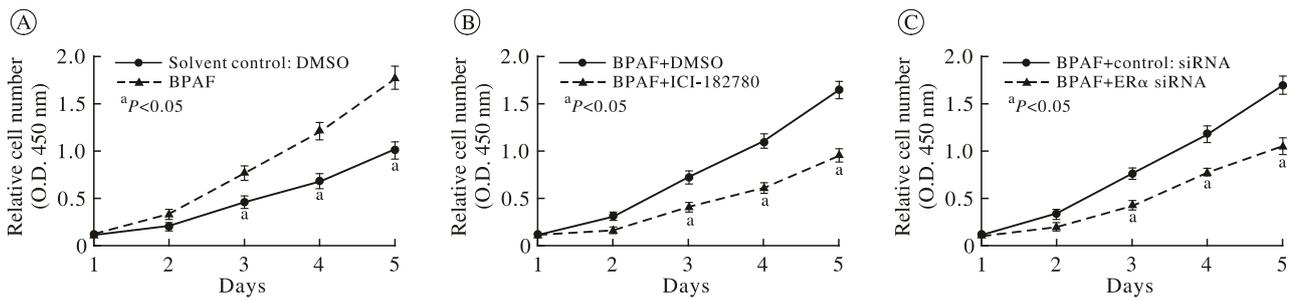


图 2 BPAF 能够 ER $\alpha$  依赖地诱导 SH-SY5Y 细胞增殖 A: 3  $\mu$  mol/L BPAF 处理 SH-SY5Y 细胞进行 CCK-8 实验; B: SH-SY5Y 细胞受 3  $\mu$  mol/L BPAF 或 3  $\mu$  mol/L BPAF + 100 nmol/L ICI-182780 处理后进行 CCK-8 实验; C: SH-SY5Y 细胞转染 control siRNA 或 ER $\alpha$  siRNA, 受 3  $\mu$  mol/L BPAF 处理后进行 CCK-8 实验; <sup>a</sup>P < 0.05

Fig.2 BPAF induces the proliferation of SH-SY5Y cells via ER $\alpha$  A: SH-SY5Y cells were treated with 3  $\mu$  mol/L of BPAF and harvested for CCK-8 analysis; B: SH-SY5Y cells were treated with 3  $\mu$  mol/L of BPAF or 3  $\mu$  mol/L of BPAF + 100 nmol/L of ICI-182780, and then harvested for CCK-8 analysis; C: SH-SY5Y cells, which were transfected with control siRNA or ER $\alpha$  siRNA, were then treated with 3  $\mu$  mol/L of BPAF, and then harvested for CCK-8 analysis. <sup>a</sup>P < 0.05

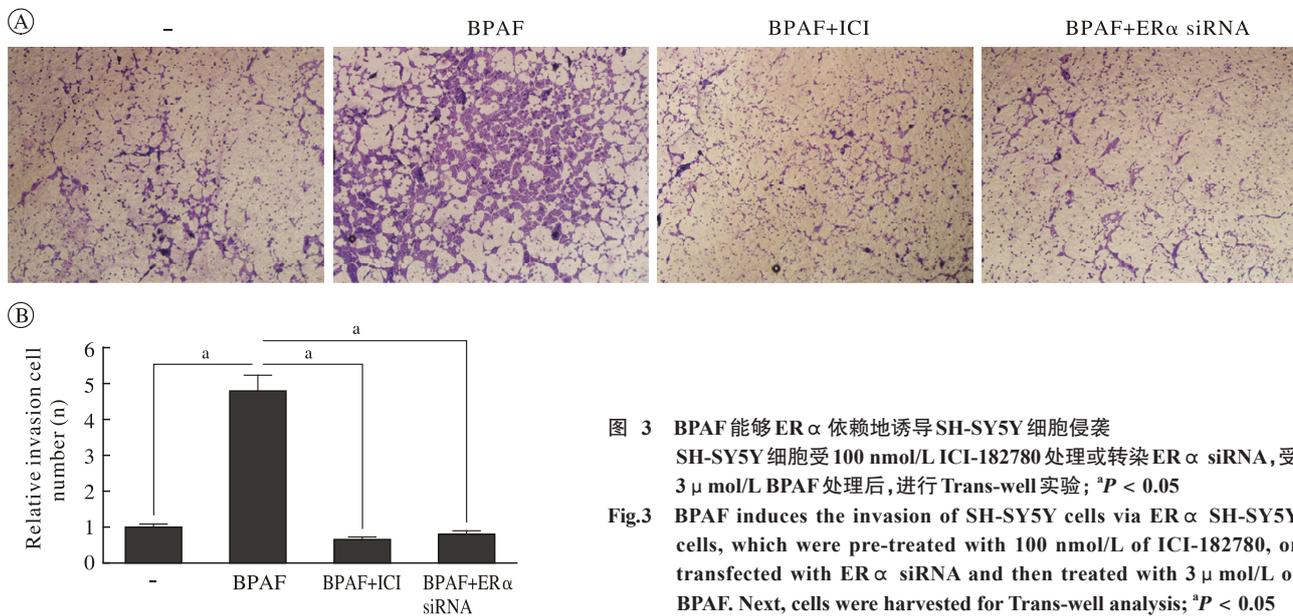


图 3 BPAF 能够 ER $\alpha$  依赖地诱导 SH-SY5Y 细胞侵袭 SH-SY5Y 细胞受 100 nmol/L ICI-182780 处理或转染 ER $\alpha$  siRNA, 受 3  $\mu$  mol/L BPAF 处理后, 进行 Trans-well 实验; <sup>a</sup>P < 0.05

Fig.3 BPAF induces the invasion of SH-SY5Y cells via ER $\alpha$  SH-SY5Y cells, which were pre-treated with 100 nmol/L of ICI-182780, or transfected with ER $\alpha$  siRNA and then treated with 3  $\mu$  mol/L of BPAF. Next, cells were harvested for Trans-well analysis; <sup>a</sup>P < 0.05

昂等多种塑化剂、工业原料、药物、环境污染物质和添加剂等, 其分子量小、亲脂性强, 易于透过生物膜并在脂肪组织中蓄积, 在生物体内吸收迅速且不易被肾排泄, 具有对生物体的持久作用<sup>[1-4, 18-19]</sup>。随着老龄化和环境污染, 以 BPAF 为代表的 EEs 能够在成人血液中被检测到, 其对人类健康的影响已经成为一项公共卫生问题<sup>[1-4]</sup>。

本研究首次报道了以 BPAF 为代表的 EEs 具有诱导神经母细胞瘤增殖的活性。我们的结果显示, BPAF 处理 SH-SY5Y 细胞, 能够显著促进其增殖和侵袭作用。值得一提的是, 如何定量 Trans-well 实验中侵袭细胞的数量并减少误差具有重要意义。本研究使用乙酸或无水乙醇洗脱的方法有可能引入误差, 而人工细胞计数效率低且容易出错, 因此未来应利用高内涵分析等定量图像分析系统对相关结果进行分析。在此基础上, 我们对 BPAF 的作用机制进行了分析, BPAF 能够剂量依赖性地在

SH-SY5Y 细胞和转染外源 ER $\alpha$  的 MDA-MB-231 细胞中诱导 ER $\alpha$  的转录活性, 而 ER $\alpha$  的 siRNA 或拮抗剂均能够抑制 BPAF 对 ER $\alpha$  转录活性和 SH-SY5Y 细胞增殖/侵袭的影响。神经母细胞瘤是儿童和婴幼儿最常见的肿瘤, 我们的前期结果<sup>[9]</sup>和本研究均揭示了其内分泌依赖的特性, 因此少年儿童通过各种途径摄入的 EEs 不仅有可能扰乱其内分泌平衡、干扰其正常发育, 也有可能是神经母细胞瘤发生的危险因素, 进一步对此进行肿瘤流行病学调查研究具有重要意义。

参考文献

- Kim HS, Han SY, Yoo SD, et al. Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by in vitro and in vivo combination assays [J]. J Toxicol Sci, 2001, 26 (3): 111-118.
- Henley DV, Korach KS. Physiological effects and mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals that alter estrogen signaling [J]. Hormones (Athens), 2010, 9 (3): 191-205.
- Huang R, Sakamuru S, Martin MT, et al. Profiling of the Tox21 10K compound library for agonists and antagonists of the estrogen receptor

- alpha signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2014, 4 : 5664.
- 4 Zhang L, Sedykh A, Tripathi A, et al. Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and structure-based virtual screening approaches [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272 (1) : 67-76.
  - 5 Lovén J, Zinin N, Wahlström T, et al. MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor- $\alpha$  (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (4) : 1553-1558.
  - 6 Cao P, Feng F, Dong G, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  enhances the transcriptional activity of ETS-1 and promotes the proliferation, migration and invasion of neuroblastoma cell in a ligand dependent manner [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 : 491.
  - 7 Li Y, Luh CJ, Burns KA, et al. Endocrine-Disrupting chemicals (EDCs) : in vitro mechanism of estrogenic activation and differential effects on ER target genes [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (4) : 459-466.
  - 8 Chai J, Lee KF, Ng EH, et al. Ovarian stimulation modulates steroid receptor expression and spheroid attachment in peri-implantation endometria : studies on natural and stimulated cycles [J]. *Fertil Steril*, 2011, 96 (3) : 764-768.
  - 9 Cheng L, Li J, Han Y, et al. PES1 promotes breast cancer by differentially regulating ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (8) : 2857-2870.
  - 10 Zhang F, Feng F, Yang P, et al. Four-and-a-half-LIM protein 1 down-regulates estrogen receptor  $\alpha$  activity through repression of AKT phosphorylation in human breast cancer cell [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44 (2) : 320-326.
  - 11 马德宾, 冯帆, 张帆, 等. MicroRNA122 促进吉西他滨对体外非小细胞肺癌细胞系 A549 的杀伤作用 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35 (11) : 1160-1163.
  - 12 Yang Q, Feng F, Zhang F, et al. LINE-1 ORF-1p functions as a novel HGF/ETS-1 signaling pathway co-activator and promotes the growth of MDA-MB-231 cell [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (12) : 2652-2660.
  - 13 Chen Y, Feng F, Gao X, et al. MiRNA153 reduces effects of chemotherapeutic agents or small molecular kinase inhibitor in HCC cells [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, 15 (3) : 176-187.
  - 14 Egloff AM, Rothstein ME, Seethala R, et al. Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (21) : 6529-6540.
  - 15 Feng FY, Brenner JC, Hussain M, et al. Molecular pathways : targeting ETS gene fusions in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (17) : 4442-4448.
  - 16 Kalet BT, Anglin SR, Handschy A, et al. Transcription factor Ets1 cooperates with estrogen receptor  $\alpha$  to stimulate estradiol-dependent growth in breast cancer cells and tumors [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7) : e68815.
  - 17 Ding L, Niu C, Zheng Y, et al. FHL1 interacts with oestrogen receptors and regulates breast cancer cell growth [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (1) : 72-85.
  - 18 Teng C, Goodwin B, Shockley K, et al. Bisphenol a affects androgen receptor function via multiple mechanisms [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 203 (3) : 556-564.
  - 19 冯帆, 王莉莉. 基于 ER  $\alpha$ -EGFP 核颗粒形成的荧光成像分析快速识别环境中雌激素样物质 [J]. *军事医学*, 2015, 39 (1) : 12-17.