

GPR30 在卵巢癌的亚细胞定位及临床意义

祝彩霞, 于帆, 杨娟, 热艳古丽·达吾提, 牛刚
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究 GPR30 在卵巢癌中的亚细胞定位及临床意义。【方法】应用免疫组化技术检测我院 2000–2010 年的 110 例卵巢癌组织中 GPR30 的表达, 分析 GPR30 与卵巢癌的临床病理特点的关系。同时应用流式分选技术和免疫荧光技术检测 GPR30 在卵巢癌的亚细胞定位。【结果】GPR30 在 62.7% 的卵巢癌组织中表达, 其中包括 51 例浆液性腺癌和 4 例黏液性腺癌 ($P = 0.102$)。肿瘤残余组 (R1, 33/45) 中 GPR30 表达率高于无残留组 (R0, 34/65), 具有统计学差异 ($P = 0.030$)。在卵巢癌复发组中, 73.7% 的卵巢癌组织 (42/57) 可检测到 GPR30 表达阳性, 而 GPR30 在 50.9% 的非复发组卵巢癌组织 (27/53) 中表达阳性 ($P = 0.018$)。进展型卵巢癌及低分化卵巢癌中 GPR30 表达率较早期卵巢癌和高分化卵巢癌中 GPR30 表达率高, 但无统计学差异。5 年随访发现, 存活的患者中有 33 例的卵巢癌组织表达 GPR30, 而 GPR30 表达于 66.7% 的死亡病例中, 二者无统计学差异。流式分选及免疫荧光技术卵巢癌细胞系 SKOV-3 细胞内 GPR30 表达, 其中细胞核上 GPR30 表达明显高于细胞质上 GPR30。【结论】GPR30 表达阳性的卵巢癌肿瘤残留率、术后复发率增加, 不同病理类型、临床病理分期及组织分级的卵巢癌中 GPR30 表达无明显差异。卵巢癌细胞中 GPR30 具有核聚集表达现象, 从而诱导卵巢癌发生发展的新机制。

关键词: 卵巢癌; GPR30; 亚细胞定位; 临床意义

中图分类号: R73

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2016)02-0235-07

Cellular Localization and Clinical Relevance of GPR30 in Ovarian Cancer

ZHU Cai-xia, YU Fan, YANG Juan, REYANGULI·Dawuti, NIU Gang

(Department of Obstetrics & Gynecology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: NIU Gang, E-mail: ningdr@163.com

Abstract: 【Objective】 To demonstrate the cellular localization and clinical relevance of G protein-coupled estrogen receptor (GPR30) in ovarian cancer. 【Method】 The expression of GPR30 was determined by using immunohistochemistry in 110 epithelial ovarian cancers from our hospital. Thus, we correlated GPR30 expression with clinicopathological characteristics of ovarian cancer, especially in advanced and/or dedifferentiated ovarian cancer. Further, localization of GPR30 was described via immunofluorescence and FACS in ovarian cancer cell line SKOV-3. 【Result】 In brief, GPR30 expression was observed in 62.7% of ovarian cancer samples, containing 51 cases of serous adenocarcinoma and 4 cases of mucinous adenocarcinoma ($P = 0.102$). The expression of GPR30 was significantly elevated in R1 group (Residual tumor status positive) as compared to R0 group (Residual tumor status negative) patients (R1, 33/45; R0, 34/65; $P = 0.030$). In addition, GPR30 was detected in 73.7% of recurrence-group, whereas 50.9% of non-recurrence patients had GPR30 expression. In spite of the GPR30 expression was observed more frequently in advanced ovarian cancer (FIGO III/IV) and dedifferentiated ovarian cancer (G3/4), the difference didn't reach significant level. In 5-year survival we observed that 58.9% (33/56) of survival patient expressed GPR30 while expression of GPR30 was detected from 36 cases (66.7%) of dead. Furthermore, there was significant difference of GPR30 expression in intracellular of ovarian cancer cells. In addition, concentrated GPR30 was detected with great intensity around nucleus, rather than cytoplasm, of SKOV-3 cells. 【Conclusion】 GPR30 expression was observed more frequently in R1 group and recurrence-group of ovarian cancer. There was no significantly correlation between GPR30 expression and other characteristics of ovarian cancer, involving in FIGO stage, subtypes, grading level and response to chemotherapy. Moreover, intracellular GPR30 aggregating toward nucleus suggested a potential regulation for the progression of ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; GPR30; cellular localization; clinical relevance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2):235-241]

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B031800297)

作者简介: 祝彩霞, 临床医学博士, 医师, 研究方向: 妇科肿瘤学, E-mail: cxzhu88@aliyun.com; 牛刚, 通信作者, 中山大学附属第一医院妇产科, E-mail: ningdr@163.com

卵巢癌是恶性女性生殖系统肿瘤之一, 由于缺乏早期诊断手段及有效的治疗方案, 大部分患者确诊时已是进展型卵巢癌, 预后较差, 是死亡率最高的女性恶性肿瘤。近年来研究发现新型雌激素受体 GPR30(G protein-coupled estrogen receptor) 在女性生殖系统疾病的发生发展中起到重要作用^[1]。目前普遍认为 GPR30 在细胞膜上表达, 但仍有报道发现细胞内有 GPR30 的表达^[2]。GPR30 不仅在正常组织细胞中表达并参与正常生理机制, 同时 GPR30 与肿瘤发生发展相关^[3]。随着 GPR30 的发现, 大量研究聚焦雌激素诱导 GPR30 的机制, 但 GPR30 激活的信号通路至今仍是不明确的。本文主要研究 GPR30 在卵巢癌中的亚细胞定位及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 一般资料

随机选取中山大学附属第一医院卵巢癌标本共 110 例, 所有患者均在 2000 年至 2010 年期间在中山大学附属第一医院妇产科因卵巢肿瘤行手术, 术后病理学检查确诊为上皮来源的卵巢肿瘤。卵巢癌的临床病理特征及 5 年随访数据见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 应用 GPR30 特异性抗体 LS-A4290 及 SP4674P 检测卵巢癌组织 (N=110) 中 GPR30 的表达, 其中 GPR30 表达阳性的乳腺癌细胞作为阳性对照和应用同型对照抗体作为阴性对照。所有切片经加热抗原修复及内源性过氧化酶封闭后加入 GPR30 特异性抗体 LS-A4290 (3.3 μg/mL) 和 SP4674P (4 μg/mL) 孵育。所有切片经 Nano Zoomer digital slide scanner 扫描后由两名独立的病理学家根据染色程度及阳性细胞数进行评分, 其中染色程度分为阴性(0 分)、弱阳性(1 分)、中等阳性(2 分)和强阳性(3 分), 阳性细胞数由阳性表达率评估(0 ~ 1%, 1 分; 1% ~ 10%, 2 分, 11% ~ 30%, 3 分; 31% ~ 60%, 4 分; 61 ~ 100%, 5 分)。两者之和低于 5 分为表达阴性, 反之为阳性。

1.2.2 流式细胞分选 卵巢癌细胞系 SKOV-3 的活细胞分别予 0.1% Saponin 和 PBS 预处理, 而 PFA-固定细胞分别予 0.1% Saponin、0.2% Triton X-100 及 PBS 预处理后加入特异性抗体 SP4674P (5 μg/mL)、LS-A4290 (10 μg/mL) 和非特异性抗

表 1 卵巢癌标本的临床病理特点

Table 1 Clinical and histomorphological features of ovarian cancer patients and cancer tissues (n = 110)

Age/years	Median (range)
< 60	51 (19 ~ 59)
≥ 60	71 (60 ~ 88)
Variable	Number (%)
FIGO stage	
I	35 (31.8)
II	1 (9)
III	57 (51.8)
IV	17 (15.5)
Lymphnode status	
Negative	59 (53.6)
Positive	51 (46.4)
Nuclear grading	
G1/G2	41 (37.3)
G3/G4	69 (62.8)
Histology	
Serous	76 (69.1)
Mucinous	10 (9.1)
Endometrioid	6 (5.5)
Clear cell	2 (1.8)
Others	16 (14.5)
Residual tumor status	
R0	65 (59.1)
R1	45 (40.9)
Ascites/mL	
< 500	33 (30.0)
≥ 500	36 (32.7)
None	38 (34.5)
No data	3 (2.7)
Response to chemotherapy	
Progress	10 (9.1)
No change	5 (4.5)
Remission	58 (52.7)
Unknown	37 (33.6)
Relapse	
Yes	57 (51.8)
No	53 (48.2)

体 IgG (1 μg/mL), 荧光二抗 Alexa 488 加入标本中后放置 FACS Calibur™ System 检测 GPR30 在卵巢癌细胞(活细胞及 PFA-固定细胞)中的细胞内定位。

1.2.3 免疫荧光 相同细胞数的卵巢癌细胞系 SKOV-3 的活细胞和 PFA-固定细胞培养于

Neubauer Sperm Counting Chamber, 予以 0.1% Saponin、0.2% Triton X-100 或 PBS/1% BSA 预处理后加入特异性抗体或非特异性抗体(SP4674P, 5 μg/mL; LS-A4290, 10 μg/mL; IgG, 1 μg/mL), 二抗 Alexa-488 (检测特异性受体)、BODIPY 650/665-phalloid(检测细胞质定位的受体)及 DAPI(检测细胞核定位受体)加入细胞中避光孵育后应用 Con-focal Laser Scanning Microscope (CLSM)扫描检测 GPR30 的细胞内定位。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件分析系统进行分析, 卵巢癌基本资料为计数资料, 用率或构成比表述, 其与 GPR30 表达的相关性分析应用 χ^2 检验; 卵巢癌细胞内 GPR30 荧光表达为计量资料, 用均数与标准差描述, 其表达比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 卵巢癌中 GPR30 的表达

GPR30 的表达与卵巢癌组织 ($N = 110$) 的临床病理特点(表 2)分析, 不同病理类型的卵巢癌组织中 GPR30 表达情况不同(图 1), 62.7%的卵巢癌组织 GPR30 表达阳性, 其中 51 例(67.1%)浆液性腺癌和 4 例 (36.4%) 黏液性腺癌可检测到 GPR30 ($P = 0.102$)。不同的腹水严重程度的卵巢癌患者, 肿瘤中 GPR30 的表达率无统计学差异($P = 0.121$)。在不同的术后淋巴结分级(N^+ vs N^- , $P = 0.120$ 、组织学分级 ($G1/2$ vs $G3/4$, $P = 0.839$)之间, 卵巢癌中 GPR30 阳性表达率无明显差异。进展型卵巢癌(FIGO III/IV)中的 GPR30 表达率似有增多(FIGO III/IV, 50/74, 67.6%; FIGO I/II, 17/36, 47.2%; $P = 0.146$), 但无统计学意义。根据化疗敏感性不同分组中的卵巢癌中 GPR30 表达无统计学差异 ($P = 0.144$)。但在有肿瘤残余(Residual tumor statu, R1)的卵巢癌组织中 GPR30 表达明显增多(R1, 33/45; R0, 34/65; $P = 0.030$)。在卵巢癌复发组中, 73.7%的卵巢癌组织(42/57)可检测到 GPR30 表达阳性, 而 GPR30 在 50.9%的非复发组卵巢癌组织 (27/53) 中表达阳性 ($P = 0.018$)。5 年随访发现, 存活的患者中有 33 例的卵巢癌组织中 GPR30 表达阳性, 而 GPR30 表达于 66.7%的死亡病例中, 两者无统计学差异。

表 2 GPR30 在卵巢癌中的表达及临床联系
Table 2 Correlation between expression of GPR30 and clinicopathological features in ovarian cancer (n = 110)

Variable ¹⁾	Number of GPR30 positive ²⁾	Number of GPR30 negative ³⁾	P-value
FIGO stage			0.146
I / II	19	17	
III / IV	50	24	
Lymphnode status			0.120
Negative	33	26	
Positive	36	15	
Nuclear grading			0.839
G1/2	25	16	
G3/4	44	25	
Histology			0.102
Serous	51	25	
Mucinous	4	6	
Others	14	10	
Residual tumor status			0.030
R0	34	31	
R1	33	12	
Ascites/mL			0.563
< 500	23	10	
≥ 500	23	13	
None	21	17	
No data	2	1	
Response to chemotherapy			0.139
Progress	7	3	
No change	2	3	
Remission	42	16	
Unknown	18	19	
Relapse			0.018
Yes	42	15	
No	27	26	
5-year survival			0.435
Yes	33	23	
No	36	18	

1) GPR30 staining positive: 2+, 3+ with antibody against GPR30
2) GPR30 staining negative: 0, 1+ with antibody against GPR30
3) Statistical significance was tested by χ^2 test among groups

2.2 流式分选结果

在流式分选实验可证实 GPR30 在卵巢癌细胞系 SKOV-3 细胞内表达阳性, 在活细胞中, 未经细胞膜预处理组的 GPR30 信号强度与空白对照组接近, 而经 0.1% Saponin 预处理的活细胞中抗

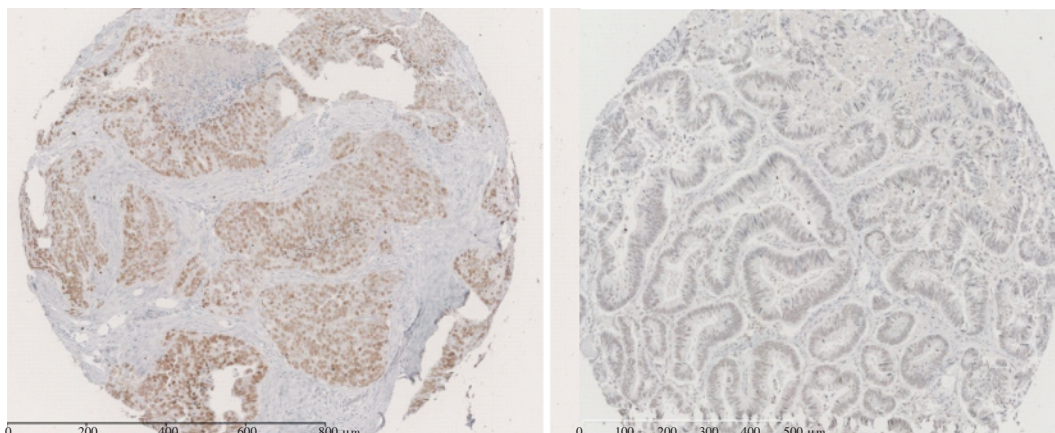


图 1 GPR30 在卵巢癌组织中表达

Fig.1 Variant expression of GPR30 was observed in different subtypes of ovarian cancer

体 LS-A4290 组的 GPR30 表达信号强度为 84.25, SP4674P 组强度为 39.53(图 2)。经 0.2% Triton X-100 预处理的 PFA-固定细胞,抗体 SP4674P 绑定的 GPR30 表达信号强度为 851.59, 是抗体 LS-A4290 组的 8 倍, 且明显高于未经预处理组(图 3)。

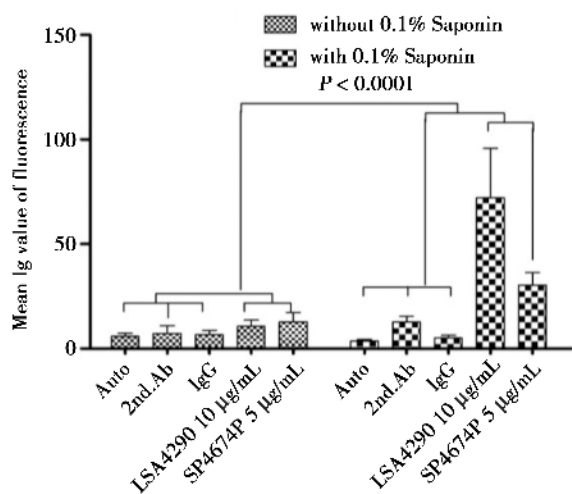


图 2 GPR30 在卵巢癌细胞系 SKOV-3 活细胞内表达情况

Fig.2 Fluorescent signal value of GPR30 in viable SKOV-3 with different antibodies

2.3 GPR30 在细胞内表达

在共聚焦显微镜下,应用不同的抗体 SP4674P 及 LS-A4290 可检测到的荧光信号基本一致。未经细胞膜预处理的 SKOV-3 活细胞中均未检测到 GPR30 荧光信号, 但经 0.1% Saponin 预处理后的 SKOV-3 活细胞中, 可在细胞核上检测到 GPR30 荧光信号(图 4)。在 PFA-固定的 SKOV-3 细胞

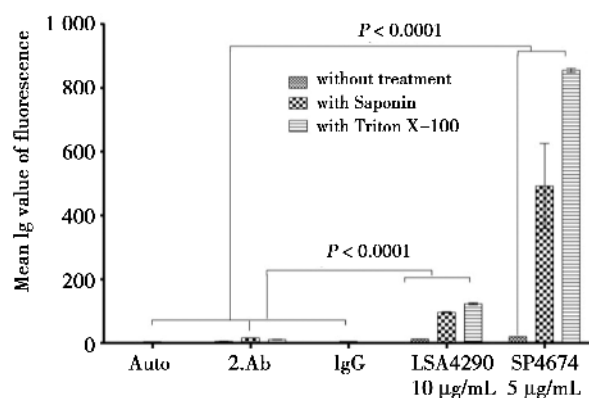


图 3 GPR30 在在卵巢癌细胞 PFA-固定细胞内表达情况

Fig.3 Fluorescent signal value of GPR30 in PFA-fixed SKOV-3 cells with different antibodies

中,经 0.1% Saponin 预处理后,可在细胞质中检测到较弱的 GPR30 荧光信号(图 5), 但经 0.2% Triton X-100 预处理组中细胞核上 GPR30 荧光信号明显强于细胞质中信号(图 6)。

3 讨论

卵巢肿瘤是三大女性生殖系统肿瘤之一,虽然其发病率低于宫颈癌,但卵巢肿瘤的致死率却占据女性生殖系统肿瘤的首位。卵巢癌的病因不明确,根据组织来源,卵巢肿瘤主要分为生发上皮肿瘤、性索-间质肿瘤、生殖细胞肿瘤和转移性肿瘤,其中生发上皮肿瘤约占卵巢肿瘤的 2/3,因而本研究主要研究生发上皮肿瘤,即卵巢癌。卵巢癌的临床表现缺乏特异性,主要包括腹部肿块、腹水、月经紊乱和转移性病灶并发症。由于卵巢癌早

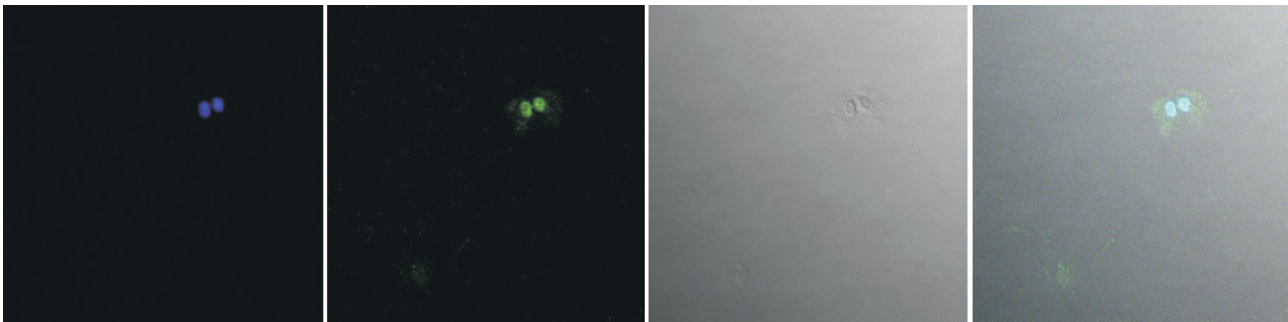


图 4 GPR30 在卵巢癌细胞系 (SKOV-3) 活细胞中的亚细胞定位 (400×)
Fig.4 GPR30 located in nucleus was observed in viable SKOV-3 cells (400×)

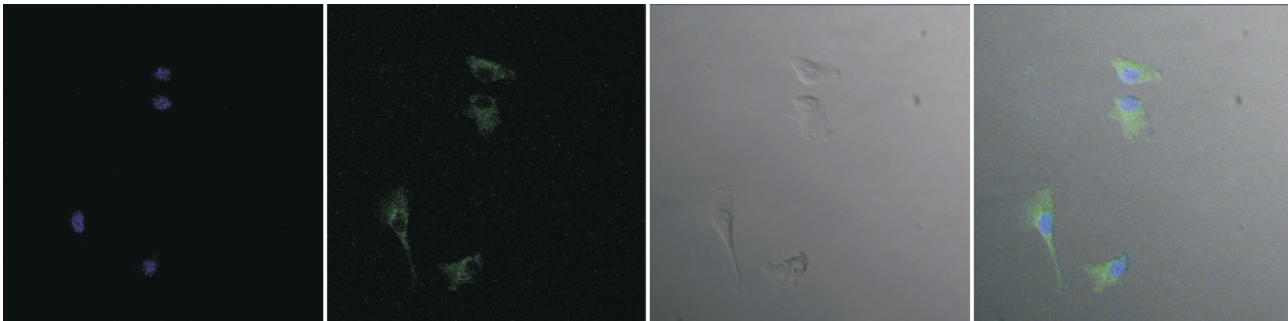
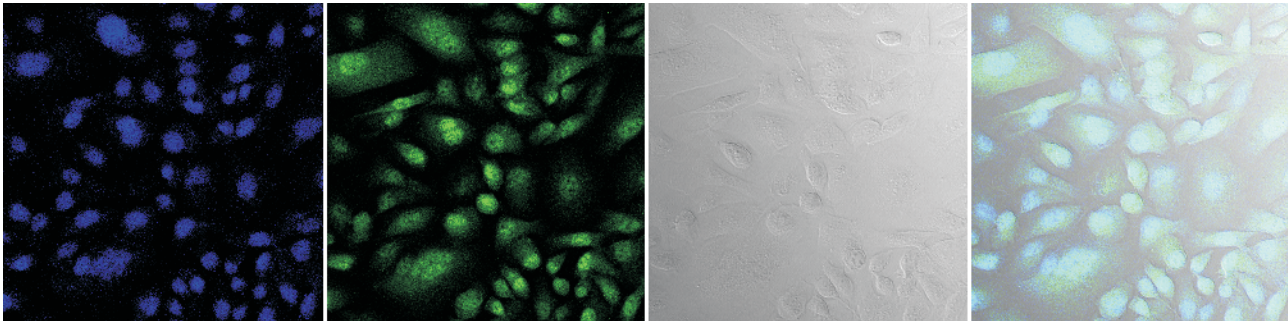


图 5 GPR30 在 PFA-固定的卵巢癌 (SKOV-3) 的亚细胞定位 (0.1% Saponin 预处理, 400×)
Fig.5 GPR30 located in cytoplasm was observed in PFA-fixed SKOV-3 cells (400×)



Pretreated with 0.2% Triton X-100

图 6 GPR30 在 PFA-固定的卵巢癌 (SKOV-3) 的亚细胞定位 (400×)
Fig.6 GPR30 was detected with great intensity around nucleus, rather than cytoplasm, of SKOV-3 cells (400×)

期症状不典型以及缺乏特异性诊断方法，大部分卵巢癌患者确诊为进展型卵巢癌。然而目前对于进展型卵巢癌的治疗较为局限，预后相对较差。GPR30 是独立于传统雌激素受体 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 的新型雌激素受体^[4]。多项研究认为 GPR30 不仅在甲状腺、乳腺、子宫、卵巢及睾丸等正常组织器官中有表达^[5-6]，同时在乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌等癌组织中有表达^[7]。研究发现 GPR30 在激素相关性肿瘤乳腺癌发生发展及预后评估上起着重要作用^[8-10]，但目前关于卵巢癌中 GPR30 表达

的临床意义仍是不明确的。

本研究发现，不同组织类型的卵巢癌中 GPR30 的表达不同，因而 GPR30 可能是潜在的肿瘤标志物。GPR30 在进展型卵巢癌中表达高于非进展型卵巢癌，低分化的卵巢癌组织中的 GPR30 表达率高于高分化组，但 GPR30 与卵巢癌预后相关因子（淋巴结分级、临床病理分期及组织学分级）无显著相关性，这提示其可能是卵巢癌预后的独立生物学标志物。有研究发现 GPR30 可诱导卵巢癌细胞增殖，这佐证了本实验结果^[10]。目前在卵

巢癌治疗中缺乏针对进展型卵巢癌(FIGO III/IV)和低分化卵巢癌(G3/4)的预后和治疗的敏感的肿瘤标志物。虽然在卵巢癌的诊治中,血清 CA125 是重要的肿瘤标志物^[11],但血清 CA125 主要应用于卵巢癌术后复发的预测和评估治疗有效性,其对于进展型卵巢癌的诊断和预后作用不大。本研究发现,卵巢癌复发组中的 GPR30 表达率明显高于非复发组,这提示 GPR30 的表达有预测卵巢癌术后复发的潜在作用。但 5 年随访发现,GPR30 表达情况与 5 年生存率之间无直接联系。因此,GPR30 对卵巢癌预后的影响及其机制仍有待进一步随访和研究。

GPR30 的亚细胞定位对研究 GPR30 功能具有一定作用,仍是目前具有争议的焦点之一。GPR30 是作为膜受体被发现的^[12],但 Yu 等^[13]通过免疫组化技术发现 GPR30 仅在乳腺癌组织的胞质中表达,同时 Revankar 等^[14]在共聚焦荧光显微镜下观察到 GPR30 在乳腺癌细胞内质网上聚集。本研究首次提出 GPR30 在卵巢癌细胞核上表达。流式分选试验中,未经细胞膜预处理的卵巢癌细胞系 SKOV-3 的细胞膜上 GPR30 表达阴性。在 PFA (Formalin) 固定的 SKOV-3 细胞中,经 0.1% Saponin 预处理后可检测到 GPR30 在细胞质中表达,Saponin 能与细胞膜上胆固醇发生反应从而在细胞膜上产生空洞,同时具有双亲极性的 Saponin 犹如表面活性物质一样加强了大分子物质通过细胞膜的穿透力,从而使抗体能与细胞质中的 GPR30 结合^[15]。有趣的是,经 Saponin 预处理后,仅在细胞质中表达的 GPR30 能被检测,但经 0.2% Triton X-100 预处理后,我们可检测到 SKOV-3 细胞核中 GPR30。Triton X-100 能使细胞膜通透性增加和溶解细胞膜蛋白^[16],而 Saponin 不具备此功能,因而我们可以假设细胞核上的 GPR30 可能与其他蛋白共表达,因而经 Triton X-100 预处理后我们可检测到细胞核上 GPR30。

本研究首次提出具有核聚集现象的 GPR30 可诱导新的信号通路。在共聚焦显微镜下,经 0.1% Saponin 预处理的 SKOV-3 活细胞的细胞核中可检测到 GPR30 的表达,这与 PFA-固定细胞观察的现象不同。Prossnitz 等^[3]认为 GPR30 是跨膜雌激素受体,近年来研究认为雌激素激活的 GPR30 可激活快速的基因转录机制^[17]。雌激素与 GPR30 结合后可激活一系列第一信号因子,如 SRF、ETS 和

CREB 等^[18-19],从而诱导 FOS/JUN、EGFR、ATF3、C/EBP and NR4A2 等调控细胞周期蛋白家族 (Cyclins family) 的基因转录信号因子^[20-21]和 Bcl2, NGF, CTGF, TNF 等影响细胞凋亡的肿瘤发生发展等信号因子^[22-23]。但这些机制假说与我们实验观察到的现象相悖,实验发现卵巢癌细胞膜上 GPR30 表达阴性。因此,我们假设雌激素激活的 GPR30 可能存在新的细胞内作用机制,同时实验发现卵巢癌细胞内 GPR30 具有核聚集现象,这提示聚集于细胞核上的 GPR30 可诱导新的基因作用机制。本研究应用不同的 GPR30 特异性抗体,均检测到核聚集现象,同时在免疫荧光实验中我们观察到经 0.1% Triton X-100 预处理后的卵巢癌细胞,细胞核上的 GPR30 的荧光信号明显高于细胞质中的荧光信号。因而推测卵巢癌细胞内 GPR30 可能具有流动性并诱导新的信号转录通路。本实验发现卵巢癌细胞中的 GPR30 表达具有核聚集现象,这提示细胞内 GPR30 在卵巢癌发生发展中可能起着至关重要的作用,同时,具有核聚集现象的 GPR30 可作为新型的治疗靶点。

本研究仍存在不足,GPR30 核聚集现象需要进一步的动态试验观察方可进一步得以证实。同时,在卵巢癌细胞中核聚集的 GPR30 的具体原因仍然不明,在将来,仍需要大量的实验进一步证实卵巢癌细胞中的 GPR30 的具体作用机制。

参考文献

- [1] CIMINO DF, SKLAR LA, ARTERBURN JB, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling [J]. *Science*, 2005, 307 (5715): 1625-1630.
- [2] FUNAKOSHI CM, YANAI A, SHINODA K, et al. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2006, 346(3): 904-910.
- [3] PROSSNITZ ER, ARTERBURN JB, SKLAR LA. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 265/266: 138-142.
- [4] HAZELL GG, YAO ST, ROPER JA, et al. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues [J]. *J Endocrinol*, 2009, 202 (2): 223-236.
- [5] PROSSNITZ ER, BARTON M. The G-protein-coupled

- estrogen receptor GPER in health and disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(12): 715–726.
- [6] THOMAS P, ALYEA R, PANG Y, et al. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish[J]. *Steroids*, 2010, 75(8–9): 595–602.
- [7] BURNETT LA, LIGHT MM, MEHROTRA P, et al. Stimulation of GPR30 increases release of EMMPRIN-containing microvesicles in human uterine epithelial cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(12): 4613–4622.
- [8] CHAKRABORTY P, ROY SK. Expression of estrogen receptor alpha 36 (ESR36) in the hamster ovary throughout the estrous cycle: effects of gonadotropins [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58291.
- [9] CHEVALIER N, BOUSKINE A, FENICHEL P. Role of GPER/GPR30 in tumoral testicular germ cells proliferation[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(1): 2–3.
- [10] ARIAS-PULIDO H, ROYCE M, GONG Y, et al. GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 123(1): 51–58.
- [11] AIHARA M, YAMAMOTO S, NISHIOKA H, et al. Optimizing high-resolution melting analysis for the detection of mutations of GPER/GPR30-1 in breast cancer[J]. *Gene*, 2012, 501(2): 118–126.
- [12] ALBANITO L, LAPPANO R, MADEO A, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(12): 1648–1655.
- [13] YU X, FILARDO EJ, SHAIKH ZA. The membrane estrogen receptor GPR30 mediates cadmium-induced proliferation of breast cancer cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(1): 83–90.
- [14] REVANKAR CM, MITCHELL HD, FIELD AS, et al. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30 [J]. *ACS Chem Biol*, 2007, 2(8): 536–544.
- [15] CHAN QK, LAM HM, NG CF, et al. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G (2) cell-cycle arrest[J]. *Cell Death Differenti*, 2010, 17(9): 1511–1523.
- [16] FRANCO R, BOSCIA F, GIGANTINO V, et al. GPR30 is over-expressed in post puberal testicular germ cell tumors[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(6): 609–613.
- [17] SANDEN C, BROSELID S, CORNMARK L, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments[J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 79(3): 400–410.
- [18] BARTON M. Position paper: the membrane estrogen receptor GPER—Clues and questions [J]. *Steroids*, 2012, 77(10): 935–942.
- [19] REN J, WU JH. 17 β -estradiol rapidly activates calcium release from intracellular stores via the GPR30 pathway and MAPK phosphorylation in osteocyte-like MLO-Y4 cells [J]. *Calcif Tissue Int* 2012, 90(5): 411–419.
- [20] 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.
- [21] BERANIC N, RIZNER TL. Effects of progestins on local estradiol biosynthesis and action in the Z-12 endometriotic epithelial cell line[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 132(3–5): 303–310.
- [22] 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.
- [23] ARIAS-PULIDO H, ROYCE M, GONG Y, et al. GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 123(1): 51–58.

(编辑 徐杰)