

Titolo: Il recettore dell'ormone di rilascio delle gonadotropine inibisce la proliferazione e le metastasi del cancro al seno triplo negativo - Gonadotropin-releasing hormone receptor inhibits triple-negative breast cancer proliferation and metastasis

Codice: GnRH001

Autore: Chen e Lu

Data: 2022

Rivista: *Journal of International Medical Research* 50(3)

Argomento: GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine)

Accesso libero:

DOI/URL: <https://doi.org/10.1177/03000605221082895>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2025/04/16/gnrh001-chen-e-lu-2022/>

Parole chiave: Recettore dell'ormone di rilascio delle gonadotropine, carcinoma mammario triplo negativo, proliferazione, metastasi, apoptosi, prognosi

Tumore: carcinomi mammari tripli negativi (TNBC)

Traduzione: l'articolo è stato tradotto in tutte le sue sezioni, con semplificazioni nella sezione "Materiali e Metodi" e "Risultati".

Punti di interesse: I carcinomi mammari tripli negativi (TNBC) hanno un grado di malignità relativamente elevato. Non esprimono il recettore degli estrogeni (ER), il recettore del progesterone (PR) o il recettore del fattore di crescita epidermico umano di tipo 2 (HER2), quindi non sono sensibili alla terapia endocrina o alla terapia mirata a HER2.

Il recettore dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRHR) è un recettore transmembrana accoppiato a proteine G espresso principalmente nell'ipofisi, ma anche in una varietà di tessuti tumorali, inclusi tumori ormono-dipendenti (tumore al seno ER/PR-positivo, cancro alla prostata e cancro ovarico) e tumori ormono-indipendenti (tumore al seno ER/PR-negativo, glioma e cancro al fegato). Le cellule tumorali attivano la via del GnRHR attraverso meccanismi autocrini e paracrini per regolare il comportamento biologico. Studi preclinici hanno dimostrato che il GnRHR inibisce la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi delle cellule tumorali. Tuttavia, gli effetti biologici del GnRHR sulle cellule TNBC non sono chiari. Questo studio ha indagato l'effetto del GnRHR sulla prognosi del TNBC e i suoi effetti biologici su colture di cellule di TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-468 in vitro.

MATERIALI E METODI: I dati sull'espressione di mRNA sono stati elaborati su 224 casi con dati completi. Il GnRHR è stato attivato nelle cellule studiate con leuprolide acetato e antagonizzato da elagolix sodico. È stata valutata la proliferazione cellulare, la formazione di colonie, metastasi, apoptosi, il ciclo cellulare e l'espressione proteica del GnRHR.

RISULTATI:

Un'elevata espressione di GnRHR è associata a un aumento della sopravvivenza priva di malattia

Il GnRHR attivato inibisce la proliferazione delle cellule del carcinoma triplo negativo

Il GnRHR attivato inibisce le metastasi nelle cellule del carcinoma triplo negativo

Il GnRHR attivato promuove l'apoptosi nelle cellule del carcinoma triplo negativo

DISCUSSIONE: Questo studio ha dimostrato che l'espressione di GnRHR e di mRNA del GnRH nelle pazienti con TNBC era significativamente più alta rispetto a quelle con carcinoma mammario HR+/HER2- o HER2+, suggerendo che GnRHR e GnRH svolgono un ruolo importante nell'insorgenza e nello sviluppo del TNBC. Anche l'espressione di mRNA di GnRHR nelle pazienti più anziane con TNBC era più alta rispetto alle pazienti più giovani, il che potrebbe essere dovuto al fatto che molte erano in menopausa e bassi livelli di estrogeni sovra-regolano l'espressione di

GnRHR attraverso un meccanismo di feedback. Il presente studio non ha analizzato l'espressione della proteina GnRHR. Dato che l'espressione dell'mRNA non è direttamente correlata ai livelli di proteina poiché la traduzione è influenzata da molteplici fattori, prevediamo di valutare gli effetti della proteina GnRHR in uno studio futuro.

Abbiamo utilizzato cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 come modelli in vitro di TNBC, entrambe linee cellulari confermate per TNBC. L'aggiunta di leuprolide a queste colture di cellule ha attivato GnRHR, con conseguente riduzione della proliferazione e della mobilità e aumento dell'apoptosi, mentre l'aggiunta di elagolix ha antagonizzato GnRHR, con conseguente aumento della proliferazione e della mobilità cellulare. Questi risultati suggeriscono che il GnRHR attivato inibisce la proliferazione e la metastasi del TNBC, il che è coerente con il miglioramento della sopravvivenza osservato nei pazienti con elevata espressione di GnRHR, ed è simile al ruolo del GnRHR in altri tumori maligni.

CONCLUSIONI: Questo studio ha dimostrato che il GnRHR inibisce la proliferazione e la metastasi e promuove l'apoptosi nelle cellule TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-468. Una volta compreso il meccanismo molecolare di questo effetto, potrebbe essere possibile utilizzare il GnRHR come bersaglio terapeutico per migliorare il trattamento del TNBC.

Traduzione articolo

Riassunto

Contesto

Il recettore dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRHR) è espresso in diversi tumori maligni e inibisce la proliferazione e la metastasi delle cellule tumorali, ma il suo ruolo nei carcinomi mammari tripli negativi (TNBC) non è chiaro. Questo studio ha indagato gli effetti biologici del GnRHR e la loro influenza sulla prognosi del TNBC.

Metodi

Il database GSE21653 è stato utilizzato per ottenere informazioni sull'espressione del GnRHR e sui fattori clinico-patologici in pazienti con TNBC. Il GnRHR è stato attivato in cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 in coltura da leuprolide acetato e antagonizzato da elagolix sodico. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante il kit di conteggio cellulare 8 e i test di formazione di colonie. Le metastasi cellulari sono state rilevate mediante il test di guarigione delle ferite e il test Transwell. L'apoptosi e il ciclo cellulare sono stati studiati mediante citometria a flusso. L'espressione proteica del GnRHR è stata determinata mediante Western Blotting.

Risultati

L'espressione dell'mRNA di GnRHR era significativamente più alta nelle pazienti con TNBC rispetto alle pazienti con carcinoma mammario con recettore ormonale positivo/recettore del fattore di crescita epidermico umano (HER)2- e HER2+. Le pazienti con elevata espressione di GnRHR hanno avuto una sopravvivenza libera da malattia significativamente migliore rispetto a quelle con espressione inferiore. Il GnRHR attivato ha inibito significativamente la proliferazione cellulare e le metastasi, aumentato l'apoptosi e aumentato i livelli di espressione proteica di GnRHR.

Conclusione

Il GnRHR inibisce la proliferazione e le metastasi del TNBC, suggerendo che potrebbe essere un bersaglio per il trattamento del TNBC.

Contesto

I carcinomi mammari tripli negativi (TNBC) hanno un grado di malignità relativamente elevato.

Non esprimono il recettore degli estrogeni (ER), il recettore del progesterone (PR) o il recettore del fattore di crescita epidermico umano di tipo 2 (HER2), quindi non sono sensibili alla terapia endocrina o alla terapia mirata a HER2 (1). Uno studio condotto su oltre 140.000 pazienti con TNBC ha riportato un tasso di sopravvivenza specifico per il cancro al seno a 5 anni del 78,78%, inferiore a quello di altri sottotipi di cancro al seno (2). L'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il TNBC migliorerà il trattamento e la sopravvivenza delle pazienti (3).

Il recettore dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRHR) è un recettore transmembrana accoppiato a proteine G espresso principalmente nell'ipofisi, ma anche in una varietà di tessuti tumorali, inclusi tumori ormono-dipendenti (tumore al seno ER/PR-positivo, cancro alla prostata e cancro ovarico) e tumori ormono-indipendenti (tumore al seno ER/PR-negativo, glioma e cancro al fegato). Le cellule tumorali attivano la via del GnRHR attraverso meccanismi autocrini e paracrini per regolare il comportamento biologico (4–9). Lo studio POEMS ha rilevato che l'aggiunta di analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) alla chemioterapia postoperatoria per il carcinoma mammario ER/PR-negativo ha migliorato significativamente la sopravvivenza libera da malattia (DFS) e la sopravvivenza globale (OS) (rispettivamente $P = 0,09$ e $0,06$) (10). Nella chemioterapia neoadiuvante, è stato anche osservato che gli analoghi del GnRH hanno migliorato il tasso di remissione tumorale completa dei tumori mammari ER/PR-negativi (11). Questi risultati indicano che la via del GnRHR potrebbe essere coinvolta negli effetti terapeutici del carcinoma mammario triplo negativo (TNBC). Studi preclinici hanno dimostrato che il GnRHR inibisce la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi delle cellule tumorali (12–16). Tuttavia, gli effetti biologici del GnRHR sulle cellule TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-468 non sono chiari. Questo studio ha indagato l'effetto del GnRHR sulla prognosi del TNBC e i suoi effetti biologici sulle cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 in vitro.

Materiali e metodi

Analisi bioinformatica

Questo studio è stato approvato dal comitato etico medico dell'Ospedale Affiliato dell'Università di Jiaying. I dati sull'espressione di mRNA sono stati ottenuti dal database GEO (n. GSE21653), che includeva età, tipo patologico, grado istologico, pT, pN, ER, PR, HER2 e stato DFS di 266 pazienti con carcinoma mammario (17,18). Quarantadue pazienti sono state escluse a causa di dati incompleti; i dettagli mancanti includevano età ($n = 1$), informazioni patologiche ($n = 3$), stato pT o pN ($n = 11$), grado istologico ($n = 3$), stato HER2 ($n = 15$) e stato DFS ($n = 9$). Per l'analisi sono stati utilizzati 224 casi con dati completi (Figura 1).

Coltura cellulare e raggruppamento

Le cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Leuprolide acetato o elagolix sodico (Selleck, Shanghai, Cina) sono stati aggiunti alle cellule per 72 ore a una concentrazione finale di $10 \mu\text{mol/L}$, che è stata confermata dal produttore come priva di effetti significativi su canali ionici, enzimi o trasportatori.²¹ Le cellule non trattate sono state utilizzate come controlli.

Saggio Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il saggio CCK-8.

Saggio di formazione di colonie

Le cellule sono state seminate in piastre da 12 pozzetti a 400 cellule per pozzetto, quindi incubate per 7 giorni. Sono state fissate in metanolo e colorate con cristalvioletto, quindi le immagini delle colonie cellulari sono state fotografate al microscopio Leica DM500 con ingrandimento 10x (Leica, Heidelberg, Germania). La procedura sperimentale è stata eseguita almeno tre volte. Il tasso di

formazione delle colonie è stato calcolato come: $(\text{numero di colonie cellulari}/400) \times 100\%$.

Saggio di apoptosi

L'apoptosi cellulare è stata determinata mediante citometria a flusso utilizzando un kit Annexin V-FITC/PI (4A Biotech, Pechino, Cina) secondo le istruzioni del produttore.

Saggio del ciclo cellulare

La distribuzione del ciclo cellulare è stata determinata utilizzando un kit per l'analisi del ciclo cellulare (4A Biotech, Pechino, Cina) seguendo le istruzioni del produttore.

Saggio Transwell

L'invasione cellulare è stata misurata in camere Transwell (Millipore, Billerica, MA, USA) con rivestimento in Matrigel e con Saggio di guarigione delle ferite.

Western blotting

Le proteine totali sono state estratte dalle cellule, sottoposte a elettroforesi su gel e sottoposte a elettroblotting su membrane di polivinilidenefluoruro. Le membrane sono state incubate con un anticorpo primario anti-GnRHR (Immunoway, Suzhou, Cina), poi incubate con un anticorpo secondario di capra anti-IgG di coniglio (Proteintech Group, Wuhan, Cina). La visualizzazione è stata effettuata utilizzando un sistema a chemiluminescenza (Leica).

Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati analizzati con il software statistico SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). I dati con distribuzione non normale sono stati testati con il test U non parametrico di Mann-Whitney e il metodo del coefficiente di correlazione dei ranghi di Kendall è stato utilizzato per l'analisi di correlazione. Il test del chi-quadrato di Pearson è stato utilizzato per analizzare i dati categoriali. Il metodo di Kaplan-Meier è stato utilizzato per l'analisi di sopravvivenza e il test dei ranghi logaritmici è stato utilizzato per testare la differenza nelle curve di sopravvivenza tra i gruppi. L'analisi di sopravvivenza multivariata è stata eseguita con il modello di regressione di Cox. I dati cellulari sono stati mediati da tre esperimenti indipendenti. Tutti i test statistici erano bilaterali e le differenze sono state considerate statisticamente significative con $P < 0,05$.

RISULTATI

Un'elevata espressione di GnRHR è associata a un aumento della DFS

Delle 224 pazienti con dati completi ottenuti da GSE21653, 81 avevano un carcinoma mammario TNBC, 120 avevano un tumore HR+/HER2- e 23 un tumore mammario HER2+ (Tabella 1).

L'espressione di mRNA di GnRHR ($P < 0,05$) e GnRH ($P < 0,001$) era significativamente più alta nelle pazienti con TNBC rispetto alle altre pazienti (Figure 2a, b). Nel gruppo TNBC, c'era una correlazione positiva tra GnRHR e GnRH (coefficiente di correlazione = 0,247, $P = 0,001$, Figura 2c). Nel gruppo TNBC, le pazienti sono state suddivise in gruppi a bassa, media e alta espressione in base all'espressione di mRNA di GnRHR, con 27 casi in ciascun gruppo. La differenza di età tra i tre gruppi era statisticamente significativa, con l'espressione di GnRHR nei pazienti di età ≤ 55 anni nel gruppo a bassa espressione significativamente inferiore rispetto ai gruppi a media e alta espressione ($P = 0,023$, Tabella 2). L'analisi di sopravvivenza ha mostrato che la DFS era significativamente più lunga nei pazienti con TNBC con elevata espressione di GnRHR rispetto a quelli con espressione di GnRHR bassa o media ($P = 0,038$; Figura 2d). L'analisi di sopravvivenza multivariata ha suggerito che il GnRHR fosse un fattore di influenza indipendente sulla DFS ($P = 0,004$; odds ratio 0,428, intervallo di confidenza al 95%: 0,242-0,757); Tabella 3).

Il GnRHR attivato inibisce la proliferazione delle cellule TNBC

Per studiare l'effetto del GnRHR attivato sulla proliferazione delle cellule TNBC, abbiamo utilizzato leuprolide acetato per simulare l'attivazione del GnRHR ed elagolix sodico per simulare l'antagonismo del GnRHR nelle cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 in vitro (22–24). I risultati indicano che il GnRHR attivato inibisce la vitalità cellulare, mentre l'antagonismo del GnRHR la promuove, il GnRHR attivato inibisce la formazione di colonie, il leuprolide ha aumentato l'espressione proteica del GnRHR nelle cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468, mentre l'elagolix l'ha ridotta (Figura 3c).

Il GnRHR attivato inibisce le metastasi nelle cellule del carcinoma triplo negativo (TNBC)

Per esplorare l'effetto del GnRHR attivato sulla migrazione e l'invasione delle cellule del carcinoma triplo negativo (TNBC), abbiamo utilizzato il test di guarigione delle ferite e il test Transwell. Dopo l'aggiunta di leuprolide acetato per 24 ore, sia la velocità di migrazione ($P < 0,001$; Figura 4a) che l'invasione ($P < 0,01$; Figura 4b) delle cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 erano significativamente inferiori rispetto a quelle del gruppo di controllo. Ciò suggerisce che il GnRHR attivato inibisce la migrazione e la capacità di invasione delle cellule TNBC.

Il GnRHR attivato promuove l'apoptosi nelle cellule TNBC

Successivamente, abbiamo utilizzato la citometria a flusso per determinare gli effetti del GnRHR attivato sull'apoptosi delle cellule TNBC e sul ciclo cellulare. Dopo l'aggiunta di leuprolide acetato per 72 ore, è stato rilevato un numero significativamente maggiore di cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 apoptotiche rispetto ai controlli, suggerendo che il GnRHR attivato promuove l'apoptosi ($P < 0,01$; Figura 5a). I risultati suggeriscono inoltre che l'attivazione o l'antagonismo del GnRHR non ha avuto alcun effetto sul ciclo cellulare (Figura 5b).

Discussione

Questo studio ha dimostrato che l'espressione di GnRHR e di mRNA GnRH nelle pazienti con TNBC era significativamente più alta rispetto a quelle con carcinoma mammario HR+/HER2– o HER2+, suggerendo che GnRHR e GnRH svolgono un ruolo importante nell'insorgenza e nello sviluppo del TNBC. Anche l'espressione di GnRHR mRNA nelle pazienti più anziane con TNBC era più alta rispetto alle pazienti più giovani, il che potrebbe essere dovuto al fatto che molte erano in menopausa e bassi livelli di estrogeni sovregolano l'espressione di GnRHR attraverso un meccanismo di feedback (25). Tuttavia, questo risultato differiva da studi precedenti; ad esempio, Paradiso et al. è stata rilevata una percentuale maggiore di casi positivi alla proteina GnRHR nelle pazienti con carcinoma mammario in premenopausa (26) Il presente studio non ha analizzato l'espressione della proteina GnRHR. Dato che l'espressione dell'mRNA non è direttamente correlata ai livelli di proteina poiché la traduzione è influenzata da molteplici fattori, prevediamo di valutare gli effetti della proteina GnRHR in uno studio futuro.

Abbiamo utilizzato cellule MDA-MB-231 e MDA-MB-468 come modelli in vitro di TNBC, entrambe linee cellulari confermate per TNBC (27,28) L'aggiunta di leuprolide a queste cellule ha attivato GnRHR, con conseguente riduzione della proliferazione e della mobilità e aumento dell'apoptosi, mentre l'aggiunta di elagolix ha antagonizzato GnRHR, con conseguente aumento della proliferazione e della mobilità cellulare. Questi risultati suggeriscono che il GnRHR attivato inibisce la proliferazione e la metastasi del TNBC, il che è coerente con il miglioramento della DFS osservato nei pazienti con elevata espressione di GnRHR, ed è simile al ruolo del GnRHR in altri tumori maligni (12–16).

Conclusioni

Abbiamo dimostrato che il GnRHR inibisce la proliferazione e la metastasi e promuove l'apoptosi

nelle cellule TNBC MDA-MB-231 e MDA-MB-468. Una volta compreso il meccanismo molecolare di questo effetto, potrebbe essere possibile utilizzare il GnRHR come bersaglio terapeutico per migliorare il trattamento del TNBC.