

PGE₂ 上调 AREG 表达促进胆管癌细胞生长的机制研究

郭燕, 马娟, 张海, 白小明, 张丽, 冷静*

(南京医科大学肿瘤中心, 生殖医学重点实验室, 病理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 AREG 蛋白在前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)促进人胆管上皮癌细胞 CCLP1 增殖能力中的作用和机制。方法:用 PGE₂、4 种 EP 受体激动剂(17-phenyltrilor Prostaglandin E₂、Butaprost、Sulprostone 和 Prostaglandin E1 Alcohol)、EP2 受体拮抗剂 AH6809、PKA 抑制剂 H89、AC 抑制剂 SQ22536 处理 CCLP1 细胞,通过 Western blot、WST 等实验检测 AREG 蛋白表达水平以及 CCLP1 细胞增殖能力的变化。结果:10 μmol/L PGE₂ 处理 CCLP1 细胞后,AREG 蛋白的表达水平与对照组相比升高了 44.2%($P < 0.05$);20 μmol/L AREG 中和抗体 Mab262 和 SAB1402118 分别处理 1 h 后的 WST 实验结果显示,PGE₂ 诱导的 CCLP1 细胞增殖可被 AREG 中和抗体抑制,分别下降了 18%、20%($P < 0.01$)。10 μmol/L 4 种 EP 受体激动剂处理 CCLP1 细胞的结果表明,EP2 受体激动剂具有明显促进 AREG 蛋白表达的作用(表达水平上调了 20.1%, $P < 0.05$),而 EP1、EP3、EP4 无明显促进表达作用;10 μmol/L EP2 受体拮抗剂 AH6809 处理 CCLP1 细胞后,AREG 蛋白的表达水平较 EP2 受体激动剂处理组下调了 20%($P < 0.05$)。用 PKA 抑制剂 H89 处理后,AREG 蛋白的表达水平和 CREB 蛋白的磷酸化水平较 PGE₂ 处理组分别下降了 54.4%、45%($P < 0.05$);用 CMV500-DN-CREB 质粒转染 CCLP1 细胞抑制了 CREB 的表达和磷酸化后,AREG 的表达量较对照组明显下降约 65%($P < 0.01$)。结论:PGE₂ 可通过 EP2 受体激活 cAMP-PKA-CREB 信号转导通路上调 CCLP1 细胞 AREG 的表达,从而促进 CCLP1 细胞的增殖。

[关键词] PGE₂; EP2 受体; AREG; 胆管细胞癌

[中图分类号] R735.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-437-06

PGE₂ promotes the proliferation of cholangiocellular carcinoma cells by up-regulating AREG protein expression

GUO Yan, MA Juan, ZHANG Hai, BAI Xiao-ming, ZHANG Li, LENG Jing*

(Cancer Center, Laboratory of Reproductive Medicine, Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of AREG in PGE₂-induced proliferation of cholangiocarcinoma cells (CCLP1 cells). **Methods:** CCLP1 cells were treated with PGE₂, EP1-4 receptor agonist, EP2 receptor antagonist H89, PKA inhibitor H89, cAMP inhibitor SQ22536. Western blot and WST were used to examine the expression of AREG protein and the cell proliferation ability in CCLP1 cells. **Results:** The level of AREG protein increased by 44.2% ($P < 0.05$) after treated with 10 μmol/L PGE₂. It was previously proved that PGE₂ could promote the proliferation of CCLP1 cells, however, this effect was obviously inhibited by 20% ($P < 0.01$) when CCLP1 cells were pretreated with the 20 μmol/L neutralizing-antibody (Mab262 and SAB1402118) of AREG. Then four selective EP receptor agonists (17-phenyltrilor Prostaglandin E₂, Butaprost, Sulprostone and Prostaglandin E1 Alcohol) 10 μmol/L were used to stimulate CCLP1 cells, it were found that only EP2 agonist could induce the expression of AREG protein, increased by 20.1% ($P < 0.05$), whereas the other three agonists downregulated the protein expression of AREG. In agreement with this result, the expression of AREG protein improved by EP2 agonist was indeed suppressed by 20%, when CCLP1 cells were pretreated with 10 μmol/L AH6809, the EP2 antagonist. After treated with EP2 receptor agonist (10 μmol/L) for 24 h, the proliferation ability of CCLP1 cells increased by 26.5%. PKA inhibitor H89 and cAMP inhibitor SQ22536 can restrict the AREG protein increase induced by PGE₂, and the AREG protein expression was downregulated by 54.4% and 46.6% respectively, compared with PGE₂ treated group. It was reported that PGE₂ could induce the phosphorylation of CREB in CCLP1 cells, which could bind and activate the CRE element of AREG promoter. However, H89 and SQ22536 could strikingly inhibit the phosphorylation of CREB induced by PGE₂. At the same

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30470784, 30871015)

*通讯作者, E-mail: lengjing@njmu.edu.cn

time, CMV500-DN-CREB plasmid was transfected into CCLP1 cells, resulting in a striking restriction of AREG protein expression induced by PGE₂. **Conclusion:** Prostaglandin E₂ might promote the cell proliferation of CCLP1 cells through EP2 receptor, which consequently upregulates the expression of AREG by activation of cAMP-PKA-CREB pathway.

[Key words] PGE₂; EP2 receptor; AREG; cholangiocellular carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 437-442]

肝癌是我国的高发肿瘤之一,尤其是胆管细胞癌,确诊时往往已是晚期,错过手术最佳时期,且对化疗治疗反应差,5 年生存率极低,严重危及人类的健康和生命,因此,阐明其发病机制早期防治极其重要。

前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)是花生四烯酸经过环氧合酶-2(COX-2)催化的代谢产物,通过 4 种特异的膜 G 蛋白偶联受体 (EP1、EP2、EP3 和 EP4)发挥作用^[1]。可以促进肿瘤细胞的增殖^[2]、肿瘤血管的形成^[3]和侵袭转移^[4]。

AREG 是表皮生长因子(EGF)家族成员之一,由 252 个氨基酸组成的跨膜前体(pro-AREG)通过 ADAM-17 剪切后与表皮生长因子受体(EGFR)结合激活下游信号转导通路^[5],在不同类型肿瘤细胞中都表现出促增殖及凋亡抑制作用。有报道,在正常的肝组织中几乎检测不到 AREG 的表达,而在肝癌组织中表达明显增高^[6]。

本实验室前期工作证明, PGE₂ 可以促进胆管癌 CCLP1 细胞的增殖^[7],而目前在肝癌中, AREG 和 PGE₂ 之间是否存在调节关系以及在 CCLP1 细胞增殖能力调控中的作用机制还不清楚。本研究应用 PGE₂、4 种 EP 受体激动剂、AC 抑制剂 SQ22536 及 PKA 抑制剂 H89 等处理人胆管上皮癌细胞 CCLP1,观察其 AREG 表达水平的变化及与 CCLP1 细胞增殖能力变化的关系,意在阐明 AREG 蛋白在 PGE₂ 调控 CCLP1 细胞生长中的作用及其可能的信号转导通路。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌胆管上皮癌细胞 CCLP1 细胞株(美国匹兹堡大学医学院),DMEM 培养基、胎牛血清(Introgen 公司,美国),PGE₂、EP1 受体激动剂(17-phenyl-trinor Prostaglandin E₂)、EP2 受体激动剂(butaprost)、EP3 受体激动剂(sulprostone)、EP4 受体激动剂(prostaglandin E1 alcohol)(Cayman 公司,美国),兔抗人 AREG IgG 抗体(Abcam 公司,美国),鼠

抗人 β-actin 单克隆抗体(Sigma 公司,美国),兔抗鼠、羊抗兔二抗(Sigma 公司,美国),EP2 拮抗剂 AH6809(Sigma 公司,美国),PKA 抑制剂 H89(Sigma 公司,美国),AC 抑制剂 SQ22536 (Sigma 公司,美国),CMV500 和 CMV500-DN-CREB 质粒(美国马里兰州国立癌症中心生化实验室 Charles Vinson 教授馈赠)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

胆管上皮癌细胞株 CCLP1 置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中常规培养,0.125%胰酶+0.020%EDTA 消化传代,6 孔板每孔接种 2 × 10⁵ 个细胞,96 板每孔接种 5 × 10³ 个细胞,贴壁 24 h 后用于实验。

1.2.2 CREB 表达抑制转染实验

取对数生长期的 CCLP1 细胞,6 孔板每孔接种 2 × 10⁵ 个细胞,待细胞贴壁后,每孔取 2 μg 质粒 CMV500-DN-CREB 与 5 μl 脂质体进行转染,以空质粒 CMV500 作为内参,转染 24 h 后给予 10 μmol/L 的 PGE₂ 处理,24 h 后提取总蛋白,进行 AREG 的免疫印迹分析。实验均重复 3 次以上。

1.2.3 细胞生长及活力测定试验(WST 实验)

96 孔板每孔种细胞 100 μl(细胞浓度为 5 × 10³ 个/ml),待细胞贴壁后,以 DMSO 为对照,加相关试剂处理相应的时间,弃培养上清液后,加入 100 μl 无血清 DMEM + 10 μl Cell Counting Kit-8,450 nm 检测细胞增殖能力。实验均重复 3 次以上。

1.2.4 AREG 蛋白表达水平测定(Western blot)实验

6 孔板每孔接种 2 × 10⁵ 个细胞,贴壁 24 h,以 DMSO 为对照,加入相关药物处理相应的时间后,PBS 终止反应,用细胞刮匙收集细胞,加入适量细胞裂解液冰上作用 30 min,冰浴下超声粉碎,15 000 r/min 离心 30 min。取上清,用 BSA 法定量蛋白浓度。取 60~100 μg 上述蛋白在 12%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转至硝酸纤维素膜,封闭 1 h,加兔抗人 AREG 抗体 4℃孵育过夜,PBS-T 两次洗涤后加过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体孵育 2 h,ECL 显色系

统检测 AREG 的表达,以 β -actin 为内参照。X 线胶片上电泳条带用 Image-J 软件进行测试分析。实验均重复 3 次以上。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件,所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用方差分析做总体差异评估,并用 Bonfferoni-*t* 检验进行组间差异性比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

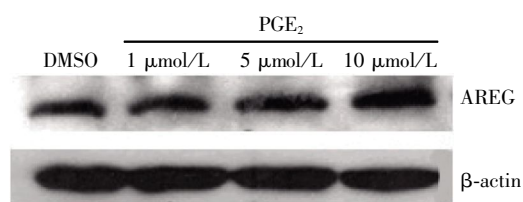
2 结 果

2.1 PGE₂ 对 CCLP1 细胞中 AREG 蛋白表达的影响

以 DMSO 为对照,实验组分别用 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 外源性 PGE₂ 处理 CCLP1 细胞,Western blot 实验发现 AREG 的表达量与对照组相比分别增加了 13.4%、28.5%、44.2% ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 AREG 在 PGE₂ 促进的 CCLP1 细胞增殖能力中的作用

以 DMSO 为对照,实验组用 5 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 处理 CCLP1 细胞 24、36、48 h,以 WST 实验检测细胞

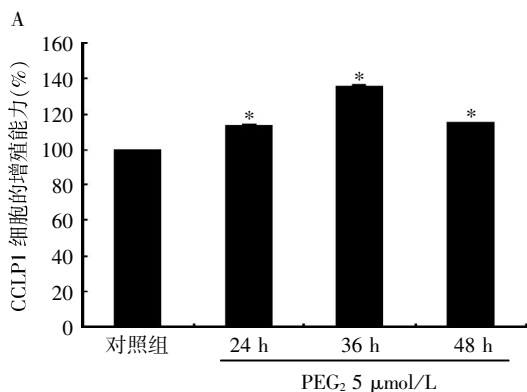


和对照组相比, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。

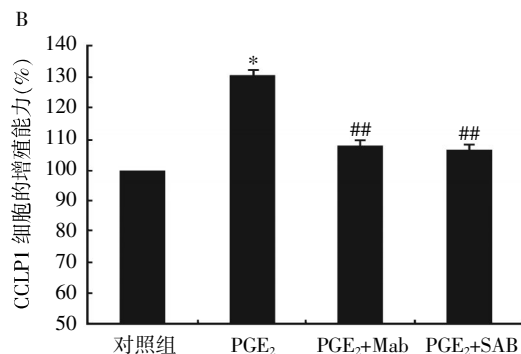
图 1 Western blot 检测 PGE₂ 对 CCLP1 细胞中 AREG 蛋白表达的影响

Figure 1 The effect of PGE₂ on the expression of AREG in CCLP1 cells

的增殖情况,结果显示 CCLP1 细胞的增殖能力分别增长了 13.9%、34.3%、15.1% ($P < 0.05$, 图 2A),即增殖效果在 36 h 达到最大值。因此我们接着用 2 种 AREG 中和抗体 Mab262、SAB1402118 各 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 CCLP1 细胞 1 h 后再加入 5 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 继续处理至 36 h,以 WST 实验检测细胞增殖情况。结果显示,PGE₂ 诱导的 CCLP1 细胞增殖可被 AREG 中和抗体抑制,分别下降了 18%、20% ($P < 0.01$, 图 2B)。



和对照组相比, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。



和对照组相比, * $P < 0.05$; 与 PGE₂ 组比较, # $P < 0.01$ ($n = 3$)。

A: 5 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 处理 CCLP1 细胞 24 h、36 h、48 h; B: AREG 中和抗体 (Mab262 20 $\mu\text{mol/L}$, SAB1402118 20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h 后,再加入 5 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 继续作用至 36 h。

图 2 WST 实验检测 AREG 在 PGE₂ 促进的 CCLP1 细胞增殖中的作用

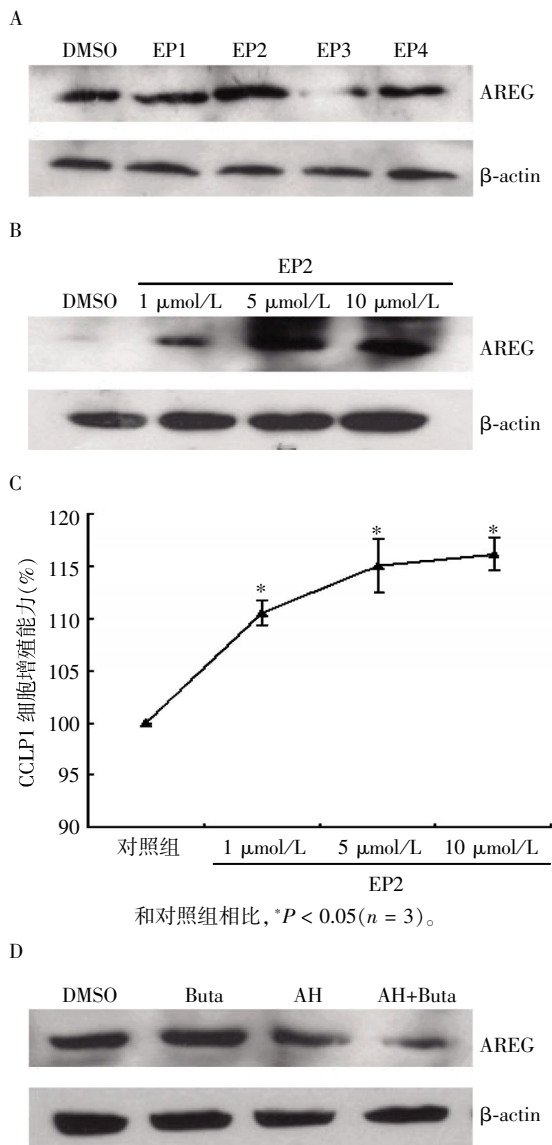
Figure 2 The role of AREG in proliferation ability of CCLP1 promoted by PGE₂

上述结果表明,PGE₂ 能上调 CCLP1 细胞中 AREG 蛋白的表达,同时促进 CCLP1 细胞的增殖能力,并且这种促增殖作用与 AREG 有关。

2.3 EP 受体类型对 CCLP1 细胞 AREG 蛋白表达及促增殖能力的影响

以 DMSO 为对照,实验组分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ 外源性 EP1、EP2、EP3、EP4 受体激动剂处理 24 h,Western blot 实验观察到 EP2 受体激动剂 Butaprost 具有明显的上调 AREG 蛋白表达的作用 (AREG 蛋白水平升高了 20.1%, $P < 0.05$), 而 EP1、EP3、EP4

则未见明显增高(图 3A)。用 1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ EP2 受体激动剂 Butaprost 处理 CCLP1 细胞后,AREG 蛋白的表达量分别升高了 30.5%、31.2%、37.6% ($P < 0.05$, 图 3B), 而 CCLP1 细胞的增殖能力分别上升了 10.5%、14.9%、16.1% ($P < 0.05$, 图 3C),表明 EP2 受体激动剂 Butaprost 能够促进 AREG 蛋白的表达并呈浓度依赖性关系,同时能够促进 CCLP1 细胞的增殖。而用 EP2 拮抗剂 AH6809 预处理 CCLP1 细胞后再用 EP2 激动剂 Butaprost 刺激,则 AREG 的表达较 EP2 激动剂组下降了约 20% ($P < 0.05$, 图 3D)。这说明



A: 分别用 10 μmol/L 4 种 EP 受体激动剂 EP1 (17-phenyltrior Prostaglandin E₂)、EP2 (Butaprost)、EP3 (Sulprostone) 和 EP4 (Prostaglandin E1 Alcohol) 处理 CCLP1 细胞 24 h 后, Western blot 实验检测 AREG 蛋白的表达水平; B: 1、5、10 μmol/L EP2 激动剂处理 CCLP1 细胞 24 h 后, Western blot 实验检测 AREG 蛋白的表达水平; C: WST 实验检测 CCLP1 细胞的增殖能力; D: 10 μmol/L EP2 受体拮抗剂 AH (AH6809) 预处理 1 h 后, 再加入 10 μmol/L EP2 激动剂 Buta (Butaprost) 继续处理至 24 h, Western blot 检测 AREG 的蛋白表达。

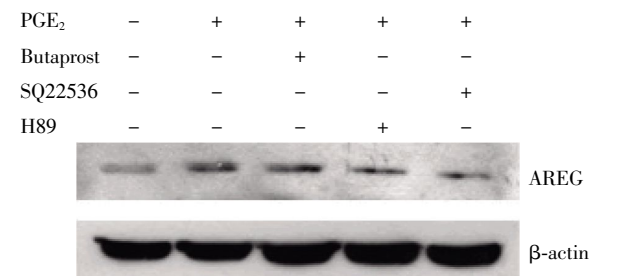
Figure 3 The effect of EP receptor agonists on the expression of AREG protein and proliferation of CCLP1 cells

PGE₂ 可能主要通过 EP2 受体来完成对 AREG 表达的上调作用从而促进 CCLP1 细胞的增殖。

2.4 AC 和 PKA 抑制剂在 PGE₂ 上调 AREG 蛋白表达中的作用

为探讨 PGE₂ 上调 CCLP1 细胞 AREG 蛋白表达

的作用是否与 cAMP/PKA 信号通道相关, 以 DMSO 为对照, 实验组分别用 10 μmol/L PGE₂、10 μmol/L Butaprost 和 100 μmol/L AC 抑制剂 SQ22536、10 μmol/L PKA 抑制剂 H89 预处理 1 h 后再加入 10 μmol/L PGE₂ 处理 24 h, Western blot 实验结果表明, PGE₂ 处理后 AREG 的蛋白表达明显上升, 而 SQ22536、H89 处理则显著抑制了 CCLP1 细胞中 PGE₂ 诱导的 AREG 蛋白表达升高, SQ22536、H89 处理组较对照组 (PGE₂ 组) 分别降低了 46.6%、54.4%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。



分别用 10 μmol/L PGE₂、10 μmol/L Butaprost 和 100 μmol/L SQ22536、10 μmol/L H89 预处理 1 h 后再加入 10 μmol/L PGE₂ 处理至 24 h, AREG 的蛋白表达水平。

Figure 4 Western blot 检测 AC 和 PKA 抑制剂在 PGE₂ 诱导的 AREG 表达上调中的作用

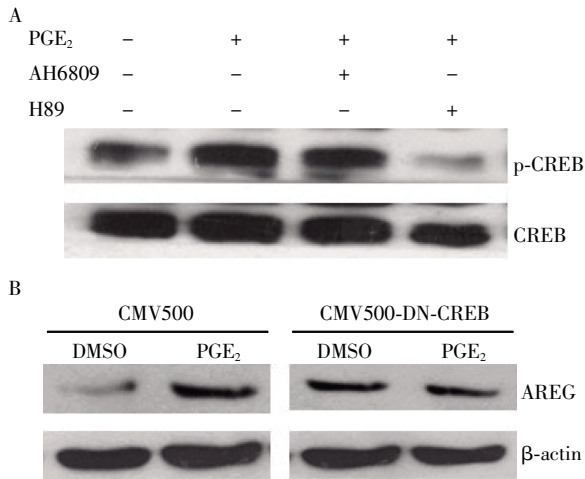
Figure 4 The role of cAMP /PKA on the expression of AREG protein induced by PGE₂

2.5 CREB 在 PGE₂ 上调 AREG 蛋白表达中的作用

已经证实 AREG 启动子区域包含一个 CRE 位点, 为进一步探讨 CREB 在 PGE₂ 对 CCLP1 细胞中 AREG 蛋白的调节中的作用, 以 DMSO 为对照, 实验组分别用 10 μmol/L PGE₂ 和 10 μmol/L EP2 受体拮抗剂 AH6809、10 μmol/L PKA 抑制剂 H89 预处理 1 h 后再加入 10 μmol/L PGE₂ 继续处理 30 min, Western blot 实验结果显示 PGE₂ 处理组细胞中 CREB 蛋白的磷酸化水平较对照组 (DMSO 组) 上升了 26.9%, 而 H89 + PGE₂ 处理组较单纯 PGE₂ 处理组细胞中 CREB 蛋白的磷酸化水平下降了 45.5% (图 5A)。

CMV500-DN-CREB 是突变型 CREB 基因质粒, 表达的蛋白能和正常的 CREB 形成异二聚体与 CRE 位点结合并抑制其活性^[8]。Western blot 实验检测 10 μmol/L PGE₂ 处理 CMV500-DN-CREB 质粒瞬时转染 CCLP1 细胞, 和空载 CMV500 质粒转染的对照 CCLP1 细胞的 AREG 蛋白水平。结果表明, PGE₂ 能上调空载对照转染组 AREG 的表达, 而不能上调 CMV500-DN-CREB 转染组 AREG 的表达 (图 5B)。

上述结果表明,PGE₂可通过 cAMP/PKA/CREB 通路激活 AREG 启动子上的 CRE 元件,从而促进 AREG 蛋白的表达。



A: 分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂、EP2 受体拮抗剂 AH6809、PKA 抑制剂 H89 预处理 1 h 后再加入 10 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 继续处理至 30 min; B: CMV500-DN-CREB 质粒转染 CCLP1 细胞, 24 h 后分别给予 DMSO, 10 $\mu\text{mol/L}$ PGE₂ 处理 24 h, 以空载质粒 CMV500 为阴性对照转染。

图 5 Western blot 检测 CREB 在 PGE₂ 上调 CCLP1 细胞 AREG 蛋白表达中的作用

Figure 5 The role of cAMP /PKA on the expression of AREG protein induced by PGE₂

3 讨论

PGE₂是由活化的环氧合酶-2(COX-2)催化花生四烯酸而形成的,PGE₂是一种介导炎症反应的物质,近年来人们发现它与肿瘤的发生密切相关。PGE₂可与 4 种细胞膜表面受体 (EP1、EP2、EP3 和 EP4) 结合,这 4 种受体与 G 蛋白不同的亚基偶联并激活相应的信号转导通路,而发挥调控细胞内 cAMP 水平、钙离子浓度及磷脂酰肌醇激活等的作用^[9]。目前证实,多种恶性肿瘤组织中 PGE₂的水平明显增高,通过一系列的信号分子促进肿瘤细胞的生长和迁移,包括 EGFR^[10]、AKT^[11]、MAPK^[12]等。

EGF 家族成员之一的双调蛋白 amphiregulin (AREG)也是目前公认的影响细胞生长,抑制细胞凋亡的重要蛋白分子。人类 AREG 基因相对较小,全长约 10 kb,和其他 EGF 家族成员一样由 6 个外显子组成,编码一个 1.4 kb 的短转录体^[12]。AREG 启动子激活与 PKC^[13]和(或)cAMP/PKA 信号转导通路的激活有关^[14]。合成的 AREG 先以前体的形式分泌到细胞膜上,即 pro-AREG 跨膜蛋白,由 252 个氨基酸组成,由膜上的肿瘤坏死因子- α 转化酶 (TACE),也称 ADAM17 所切割释放到细胞外液,与

膜上的 EGFR 结合,激活一系列的下游信号发挥促生长的作用。而且 AREG 也可被 GPCRs 激动剂等多种信号分子所激动^[6,15]。

许多研究表明,AREG 可以促进肿瘤细胞自我生长信号转导,抑制细胞凋亡、促进肿瘤侵袭等过程^[16]。在体外研究中,用 AREG 处理肿瘤细胞,或用特异性的 siRNA 干扰 AREG 基因的表达后发现,AREG 在转化细胞的增殖和生存能力中发挥重要作用^[17],AREG 同时还参与这些细胞癌基因的激活、肿瘤转移特性的维持和对化疗的抵抗^[18]。据报道,AREG 蛋白在正常肝组织几乎不表达,而在肝癌组织中表达水平则显著增高。

然而至今为止,有关 PGE₂ 和 AREG 之间的关系却不是很清楚,即 PGE₂ 能否上调 AREG 的水平及通过其相应的信号转导通路从而促进胆管癌细胞的增殖仍待阐明。

本实验室前期研究证实,PGE₂ 能够促进胆管癌上皮细胞 CCLP1 的增殖。而本研究观察到,使用 AREG 的中和抗体阻断 AREG 蛋白作用后显著抑制了 PGE₂ 诱导的 CCLP1 细胞增殖。这些结果表明,AREG 蛋白很可能参与了 PGE₂ 介导的细胞增殖作用。本研究结果还表明用 PGE₂ 处理 CCLP1 细胞可上调 AREG 的表达且呈浓度依赖性。

PGE₂ 可与 4 种细胞膜表面受体 (EP1、EP2、EP3 和 EP4) 结合,这 4 种受体与 G 蛋白不同的亚基偶联并激活相应的信号转导通路。本课题组前期的研究已经证明此 4 种 EP 受体在胆管癌细胞中均有表达,本研究的目的之一是阐明 PGE₂ 通过哪一型 EP 受体及其信号转导通路上调 CCLP1 细胞的 AREG 表达。实验结果表明 EP2 受体激动能明显提高 AREG 蛋白的表达,其余 3 种受体激动没有明显上调 AREG 蛋白表达的作用,而 EP2 受体拮抗剂能明显抑制受体激动剂所诱导的 AREG 蛋白表达上调。这提示 EP2 受体可能是 PGE₂ 影响 AREG 蛋白表达最主要的 EP 受体。

通过大鼠和人胚肾细胞 EP 受体转染实验^[19],推测 EP2 受体可能与 G 蛋白的 G_s 亚单位偶联,并通过激活腺苷酸环化酶促进 cAMP 生成,进一步激活蛋白激酶 A(PKA)发挥作用。本研究分别用 AC 抑制剂 SQ22536、PKA 抑制剂 H89 处理 CCLP1 细胞,结果发现它们均能抑制 PGE₂ 上调 CCLP1 细胞 AREG 蛋白的表达,说明 PGE₂ 上调 AREG 蛋白表达的途径是 EP2 受体激动—G_s 偶联—cAMP/PKA 激活^[12]。本研究证实,PGE₂ 能使胆管癌细胞中 CREB

磷酸化激活, 研究同样发现 PGE₂ 在上调 CCLP1 细胞 AREG 蛋白表达的过程中 CREB 磷酸化水平增高, 而且此作用可被 PKA 抑制剂 H89 所阻断; 用 CREB 功能抑制性质粒 CMV500-DN-CREB 转染 CCLP1 细胞可阻断 PGE₂ 上调 AREG 蛋白的表达, 此结果提示 PGE₂ 有可能是通过上述信号转导途径激活核转录因子 CREB, 上调 AREG 基因转录和蛋白表达, 从而促进 CCLP1 细胞增殖的。

综上所述, 本研究结果表明, PGE₂ 能够上调 CCLP1 细胞 AREG 蛋白的表达, 从而促进 CCLP1 细胞的增殖, 此作用可能是通过 EP2R/Gs/cAMP/PKA/CREB 信号转导通路实现。本研究为阐明 PGE₂ 促进肿瘤细胞增殖的机制提供了新的理论依据。

[参考文献]

[1] Komuro M, Kamiyama M, Furuya Y, et al. Gene and protein expression profiles of prostaglandin E2 receptor subtypes in the human corpus cavernosum[J]. *Int J Impot Res*, 2006, 18(3): 275-281

[2] Zhang L, Jiang L, Sun Q, et al. Prostaglandin E2 enhances mitogen-activated protein kinase/Erk pathway in human cholangiocarcinoma cells; involvement of EP1 receptor, calcium and EGF receptors signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 305(1-2): 19-26

[3] Chang SH, Liu CH, Conway R, et al. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(2): 591-596

[4] Bai XM, Zhang W, Liu NB, et al. Focal adhesion kinase: important to prostaglandin E2-mediated adhesion, migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(1): 129-136

[5] Normanno N, Bianco C, De Luca A, et al. Target-based agents agonist ERB receptors and their ligand; a novel approach to cancer treatment [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(1): 1-21

[6] Castillo J, Erroba E, Perugorria MJ, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6129-6138

[7] 黄文勇, 张丽, 束为, 等. PGE₂ 通过 EP2 受体激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路上调 SnoN 的表达而促进 CCLP1 细胞的增殖[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(2): 13-18

[8] Ahn S, Olive M, Aggarwal S, et al. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(2): 967-977

[9] Doré S. GPCR antagonists as an alternative to COX-2 inhibitors; a case for the PGE₂ EP1 receptor [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(9): 458-460

[10] Han C, Michalopoulos GK, Wu T. PGE₂ receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinase and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(1): 261-270

[11] Wu T, Leng J, Han C, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of AKT and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3): 299-307

[12] Rao R, Redha R, Macias-Perez K, et al. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 16959-16968

[13] Plowman GD, Green JM, McDonald V, et al. The amphiregulin gene codes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(5): 1969-1981

[14] Johanson CC, Yndestad A, Enserink JM, et al. The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3'5'-monophosphate pathway in various cell types [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5177-5184

[15] Gschwind A, Hart S, Fisher OM, et al. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells [J]. *EMBO J*, 2003, 22(10): 2411-2421

[16] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer; the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674

[17] McBryan J, Howlin J, Napoletano S, et al. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008, 13(2): 159-169

[18] Eckstein N, Servan K, Girard L, et al. Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(2): 739-750

[19] Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, et al. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(7): 1187-1205

[收稿日期] 2011-12-27