

## EP3 受体各亚型对肝癌 Huh-7 细胞生长和侵袭的作用

施 凤,夏树开,马 娟,张 丽,白小明,张 海,杜明占,汪亦品,程珊玉,冷 静\*

(南京医科大学肿瘤中心,病理学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨在肝细胞肝癌 Huh-7 细胞中前列腺素 E<sub>2</sub> EP3 各受体亚型对肿瘤细胞生长与侵袭的作用。**方法:**对常规培养的人肝细胞肝癌 Huh-7 细胞,瞬时转染 EP3 受体的 4 个亚型 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R、EP3-7R,应用 RT-PCR 实验检测转染细胞 EP3 受体各亚型的 mRNA 表达水平;应用 Western blot 实验检测相关蛋白水平。对转染后的 Huh-7 细胞,分别给予不同浓度的 EP3 受体激动剂 sulprostone 作用 24 h,用 WST-8 细胞增殖测定试剂检测细胞的增殖情况;应用划痕实验检测细胞的侵袭性;应用 Western blot 实验检测细胞内 ERK 蛋白磷酸化水平的变化。**结果:**RT-PCR 及 Western blot 实验结果显示 Huh-7 细胞 EP3 受体表达水平明显增高。WST-8 实验显示,经 10 μmol/L sulprostone 处理 24 h 后,过表达 EP3-4R、EP3-5R 和 EP3-7R 亚型的细胞增殖率分别达到 126.7%、124.0%、123.8%。划痕实验结果显示,过表达细胞的侵袭性分别增加到 135.8%、123.5%、128.7%。Western blot 显示,EP3-4R、EP3-5R 和 EP3-7R 转染细胞内 ERK 磷酸化水平分别上调了 54.8%、33.4%、44.3%。而过表达 EP3-6 受体亚型细胞的增殖率、侵袭率和胞内 ERK 磷酸化水平改变不明显。**结论:**Huh-7 肝癌细胞中,EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 这 3 种受体亚型对细胞的生长及侵袭有显著促进作用,而 EP3-6R 亚型则无明显的促进作用。EP3 受体促进肝癌细胞生长和侵袭的作用与 ERK 激活的现象一致。

**[关键词]** 肝细胞肝癌;EP3 受体亚型;肿瘤细胞生长与侵袭;ERK

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)04-503-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150412

## Functions and mechanisms of EP3 receptor subtypes in promoting hepatoma Huh-7 cell growth and invasion

Shi Feng, Xia Shukai, Ma Juan, Zhang Li, Bai Xiaoming, Zhang Hai, Du Mingzhan, Wang Yipin, Cheng Shanyu, Leng Jing\*

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

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the functions and mechanisms of EP3 receptor subtypes in promoting hepatoma Huh-7 cell growth and invasion. **Methods:**Human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells were transiently transfected with EP3-4, EP3-5, EP3-6 and EP3-7 receptor. The expression of EP3 receptor in the transfected cells was detected by RT-PCR and Western blot. The cells were treated with various concentrations of selective EP3 agonist sulprostone. Cell viability was detected in the transfected cells by WST-8. Scratch test was performed to detect invasion ability in the transfected cells. Western blot was employed to detect the phosphorylation level of P-ERK. **Results:**The expression of EP3 receptor subtypes was markedly increased in the transfected cells by analysis of RT-PCR and Western blot. Under the treatment of 10 μmol/L sulprostone for 24 hours, the cell growth rate of Huh-7 cells transiently transfected with EP3-4, EP3-5 and EP3-7 receptor was increased to 126.7%, 124.0%, and 123.8%, respectively. The growth of cell invasion rate separately came to 135.8%, 123.5%, and 128.7%. The concentration of intracellular P-ERK in Huh-7 cells over-expressed of EP3-4, EP3-5 and EP3-7 receptor increased by 54.8%, 33.4%, and 44.3% individually after 30 minutes exposure of 10 μmol/L sulprostone. However, over-expression of EP3-6 receptor cells had no significant difference in cell growth, cell invasion and the level of intracellular ERK phosphorylation. **Conclusion:**Our results suggest that EP3 receptor subtypes, including EP3-4, EP3-5 and EP3-7, mediate a great progress of the ability of proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma Huh-7 cells, whereas EP3-6 receptor does not. Additionally, the function of EP3 receptor in accelerating cell growth and invasion of Huh-7 cells is in line with

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81172003)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lengjing@njmu.edu.cn

the activation of ERK.

[Key words] hepatocellular carcinoma; EP3 receptor subtypes; growth and invasion of cancer cell; ERK

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 503-509]

据世界卫生组织 2014 年世界癌症报告数据, 中国新增癌症病例高居世界第 1 位, 其中肝癌新增病例和死亡人数均居世界首位<sup>[1]</sup>。说明对于肝癌防治, 目前仍缺乏有效手段。

近年来, 炎症介质前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 在肿瘤发生发展中所起的作用备受关注。国内外研究结果表明 PGE<sub>2</sub> 可显著促进结肠癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤的血管生成、细胞增殖、侵袭及转移等<sup>[2-4]</sup>。在肝癌研究也不乏相关报道, 但其作用机制不十分明确。已知 PGE<sub>2</sub> 有 4 种受体 (E prostanoïd receptor, EPR), 即: EP1R、EP2R、EP3R 以及 EP4R<sup>[5]</sup>, PGE<sub>2</sub> 主要通过细胞膜表面的这 4 种 EP 受体激活相关信号转导通路, 发挥相应的生物学功能。

有关 EP1R、EP2R 以及 EP4R 在肿瘤演进过程中的角色及信号通路已有许多报道, 而对 EP3R 的报道很少。EP3 受体存在多种亚型, 人们对这些亚型在肿瘤中的表达情况和功能几乎不了解。因此, 研究 EP3 受体亚型对肿瘤生长侵袭的作用和调控机制, 对阐明 PGE<sub>2</sub> 促进肿瘤细胞生长和侵袭转移的机制有重要意义。本研究采用 EP3 受体过表达、受体激动、细胞增殖和侵袭检测实验, 来阐明人肝细胞癌 Huh-7 细胞 EP3 各受体亚型对肿瘤细胞生长和侵袭力的影响及可能调控机制, 为更好地认识肝癌的发病机制以及发掘新的抗癌靶向治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肝细胞肝癌细胞株 Huh-7 (ATCC 公司, 美国), EP3 受体激动剂 sulprostone 和 EP3 受体抗体 (Cayman 公司, 美国), DMEM 培养基和小牛血清 (Gibco 公司, 美国), 兔抗 p-ERK 和鼠抗 ERK (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 抗鼠和抗兔二抗 (Dako 公司, 丹麦), 鼠抗  $\beta$ -actin (Sigma 公司, 美国); 质粒抽提试剂盒和 PCR 所需试剂 (TaKaRa 公司, 日本)。胰蛋白酶/细胞裂解用蛋白酶抑制剂混合片 (complete ultra tablets, Mini, EDTA-free, EASY-pack), 转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche 公司, 德国), RNA 抽提试剂 Total RNA kit I (OMEGA 公司, 美国), WST-8 (Dojin-

do 研究所, 日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

Huh-7 细胞使用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中常规培养, 使用 D-Hank's 液清洗, 0.05% 胰酶+0.02% EDTA 消化传代, 取生长良好、对数生长期细胞用于实验。

#### 1.2.2 Huh-7 细胞 EP3 受体亚型质粒瞬时转染

本课题组前期利用 real-time PCR 和 DNA 测序方法鉴定出 Huh-7 细胞中 EP3 受体剪接体亚型的类型为 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 4 种<sup>[6]</sup>。根据鉴定结果, 由南京金思特科技有限公司构建上述 4 种 EP3 受体亚型 cDNA 的表达质粒, 并将得到的 cDNA 进行了测序, 结果与 NCBI 公布的 EP3 受体亚型序列完全一致。

选择上述 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 亚型设计过表达转染实验。Huh-7 细胞接种于 6 孔板, 过夜后细胞融合 80% 左右时, 每孔以 1  $\mu$ g 质粒按步骤瞬时转染细胞, 转染后 24 h 进行下一步实验。

#### 1.2.3 细胞内总 RNA 提取及 RT-PCR 分析

按试剂盒提取细胞总 RNA, 溶于灭菌的 DEPC 处理后的三蒸水中, Colibri 超微量分光光度计测定 RNA 的浓度及  $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$  值, 分析 RNA 的浓度及纯度。取 1  $\mu$ g RNA 用于逆转录, 按说明书合成 cDNA。按 20  $\mu$ l PCR 的反应体系合成目的片段, 其中 cDNA 2  $\mu$ l (逆转录产物稀释 10 倍)。EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 4 种受体亚型主要区别在于 3' 末端氨基酸序列不同。本实验根据其 DNA 序列的差别, 选择特异性引物扩增目的片段 (表 1)。同时以 GAPDH 为内参照, 扩增片段长度为 175 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像系统进行检测。

#### 1.2.4 WST-8 细胞增殖测定实验

转染细胞培养 24 h 后, 胰酶消化, 按  $1 \times 10^4$  个/孔细胞接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。细胞贴壁次日分别给予不同浓度的 sulprostone 作用, 培养 24 h 后每孔中加入 WST-8 工作液 10  $\mu$ l, 37°C 孵育 30 min 和 1 h, 用 CliniBio128 酶标仪于 450 nm 波长处读取吸光度值。

#### 1.2.5 划痕实验

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

剪接体亚型	序列号	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
全长	PTGER3	F:GGTAAACCCAAGGATCCAAGA R:CATCAGTTGAGCACTGCAAGA	111
EP3-4R	NM_198719.1	F:TGCATCCAGCTCCACCTCT R:GCAAATTCAGGGAAGCAGGAATTGC	125
EP3-5R	NM_198715.2	F:TGTTCGCCTGGCTTCACTGAACC R:AGAGCAGCTGGAGACAGCATTTC	112
EP3-6R	NM_198716.1	F:TGTTCGCCTGGCTTCACTGAACC R:TGTGATCCTGGCAGAAAGGCAGG	158
EP3-7R	NM_198717.1	F:TTTTGCCAGGAGGAATTTGGGGAA R:TTTGGGAGGTGGGTGTTTCTGTGA	123

转染细胞培养 24 h 后,每孔划“井”字线,清洗细胞后以不同浓度 sulprostone 处理细胞,用相机分别拍取培养 0、24 h 时划痕交叉处空白区域的图样。用 Image-pro Plus 软件分析细胞 24 h 后迁移的距离。

### 1.2.6 蛋白质印迹免疫分析(Western blot)实验

取按实验设计培养的细胞,细胞裂解液冰上作用 30 min,细胞刮收集细胞,冰浴下超声粉碎,离心后取上清。蛋白定量后,取 10 μl 上述蛋白在 8%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转至硝酸纤维素膜上,封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜,二抗孵育 2 h,ECL 发光曝片。信号用 Image-J 图像分析软件进行统计分析。

### 1.3 统计学方法

运用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,多组间比较采用单因素方差分析,如组间存在差异则做 Dunnett's *T* 检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 过表达转染后,Huh-7 细胞 EP3 受体亚型高表达

为了探讨 EP3 各亚型受体对细胞生长和侵袭的影响,将各亚型重组质粒分别转染 Huh-7 细胞,使细胞瞬时过表达 EP3 受体各亚型。为了检测转染效果,转染后 24 h 抽提 Huh-7 细胞内总 RNA,用特异性引物检测目的片段。同时,将转染后细胞常规培养 48 h,提取胞内蛋白,用 EP3 受体抗体检测过表达细胞目的蛋白水平。RT-PCR 和 Western blot 实验结果显示,与 pcDNA 对照组相比,过表达 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 及 EP3-7R 各受体亚型的细胞内,EP3 受体的 mRNA(图 1A)和蛋白(图 1B)水平有明显增高。从而从转录和翻译水平证实转染后的 Huh-7 细胞内有 EP3 各亚型表达的增高。

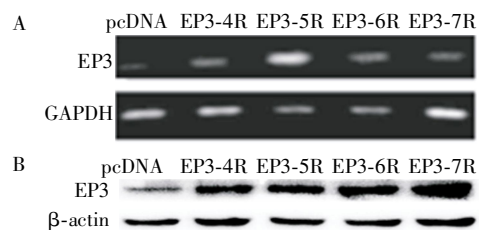


图 1 过表达转染后 Huh-7 细胞中 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R mRNA(A)和蛋白(B)的表达情况

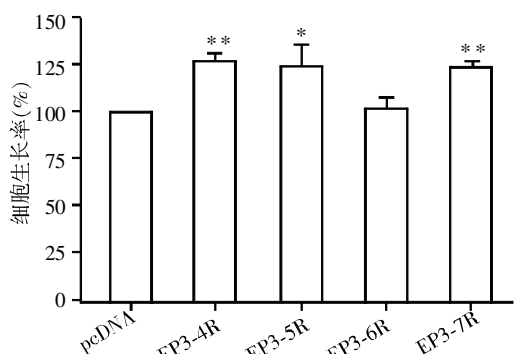
Figure 1 Over-expression of EP3-4R, EP3-5R, EP3-6R and EP3-7R in the transfected Huh-7 cells

### 2.2 EP3 受体亚型过表达对 Huh-7 细胞生长的影响

为测定不同 EP3 受体亚型过表达对 Huh-7 细胞生长的影响,根据本实验室前期工作的结果,选取 0、5、10 μmol/L 3 个浓度剂量的 EP3 受体激动剂 sulprostone,分别处理过表达 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 及 EP3-7R 的细胞以及转染空载 pcDNA 对照组的细胞。预实验结果显示,过表达各 EP3 受体亚型和转染 pcDNA 的 Huh-7 细胞增殖率随 sulprostone 浓度依赖性增加,sulprostone 处理浓度为 10 μmol/L 时细胞增殖能力最高 ( $P < 0.05$ )。因此,选用 10 μmol/L sulprostone 分别处理 pcDNA 转染对照组和 EP3 各亚型过表达组细胞。实验结果显示,过表达 EP3-4R、EP3-5R 和 EP3-7R 的 Huh-7 细胞增殖率分别为:126.7%、124.0%和 123.8%;而 EP3-6R 亚型过表达后细胞增殖率与 pcDNA 转染对照组相比未见显著性差异(图 2)。结果表明,EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 亚型的过表达可显著地促进 Huh-7 细胞的生长,而过表达 EP3-6R 亚型则无明显的促细胞生长作用。

### 2.3 EP3 受体亚型过表达对 Huh-7 细胞侵袭性的影响

预实验结果显示,空载 pcDNA 组和过表达各



与 pcDNA 转染对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n \geq 3$ )。

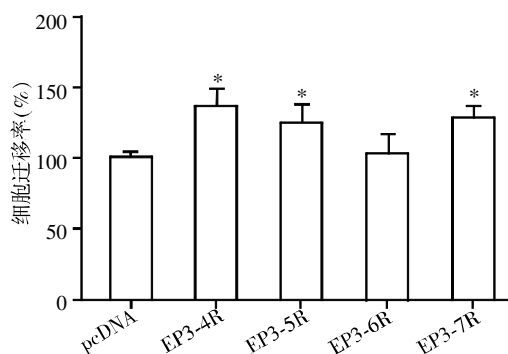
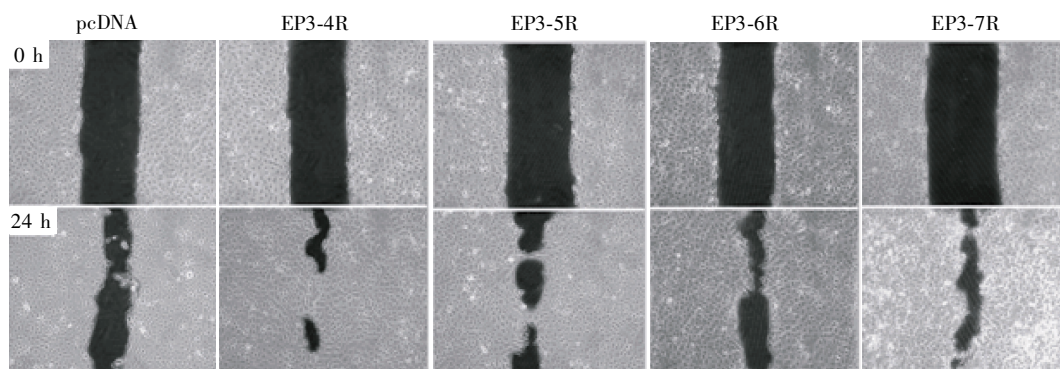
图2 EP3受体激动剂 sulprostone 对 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 过表达转染 Huh-7 细胞生长能力的影响

Figure 2 The effects of sulprostone on cell growth in EP3-4R, EP3-5R, EP3-6R and EP3-7R transfected Huh-7 cells

EP3受体亚型的细胞划痕恢复能力在 10  $\mu\text{mol/L}$  sulprostone 处理时达到最大值。据此,选用 10  $\mu\text{mol/L}$  sulprostone 分别处理 pcDNA 转染对照组和 EP3R 各亚型过表达组细胞。划痕实验结果显示,与 pcDNA 对照相比,过表达 EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 受体亚型的 Huh-7 细胞的划痕恢复率分别达到: 135.8%、123.5%和 128.7%。而 EP3-6R 受体过表达后,细胞的划痕恢复能力与对照组相比未见显著差异(图3)。由此可知,EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 受体亚型可显著地促进 Huh-7 细胞的侵袭作用,而 EP3-6R 亚型则无明显的促进作用。

### 2.4 EP3受体亚型过表达对 Huh-7 细胞 p-ERK 水平的影响

预实验结果显示 EP3受体亚型过表达组和空载质粒转染对照组细胞 ERK 的磷酸化水平在 30 min



与 pcDNA 转染对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n \geq 3$ )。

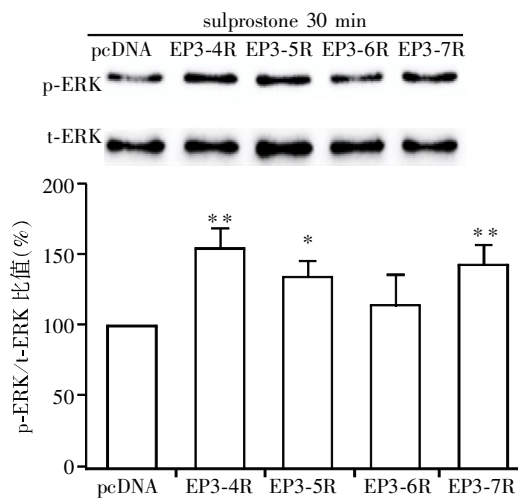
图3 EP3受体激动剂 sulprostone 对 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 过表达转染 Huh-7 细胞侵袭性的影响  
Figure 3 The effects of sulprostone on invasion ability in EP3-4R, EP3-5R, EP3-6R and EP3-7R transfected Huh-7 cells

时达到最高值。因此选用 10  $\mu\text{mol/L}$  sulprostone 处理各受体亚型过表达组以及对照组 30 min 后,应用 Western blot 实验检测细胞的 ERK 磷酸化水平。结果显示:过表达 EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 亚型的 Huh-7 细胞 p-ERK 水平分别增加了 54.8%、33.4%、44.3%。而 EP3-6R 过表达后与对照组相比,p-ERK 值差异无显著性(图4)。结果说明,EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 亚型过表达可明显上调 Huh-7 细胞 ERK

的磷酸化水平,而 EP3-6R 亚型过表达后不能明显上调细胞的 ERK 磷酸化水平。

### 3 讨论

肝癌的全球癌症致死率排名第3,我国是高发地区<sup>[7]</sup>。原发性肝癌中组织学类型最常见的是肝细胞肝癌,约占 85%~90%。目前临床上还缺乏有效的早期诊断及治疗手段,中晚期肝癌术后 5 年生存率



与空载质粒对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n \geq 3$ )。

图 4 EP3 受体激动剂 sulprostone 对过表达 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 和 EP3-7R 的 Huh-7 细胞 ERK 磷酸化水平的影响

Figure 4 The effects of sulprostone on p-ERK level in EP3-4R, EP3-5R, EP3-6R and EP3-7R transfected Huh-7 cells

不超过 9%<sup>[8]</sup>。因此探索肝癌的生长及侵袭转移机制,对肝癌的预防和治疗具有极重要的意义。

PGE<sub>2</sub> 是诱导型环加氧酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的主要产物之一,在人类肝癌、结肠癌、胃癌和肺癌等多种恶性肿瘤组织中表达增高<sup>[9]</sup>。COX-2 来源的高水平 PGE<sub>2</sub> 与肿瘤细胞的分化、生长和血管生成密切相关<sup>[10]</sup>。文献报道 COX-2 过表达或外源性 PGE<sub>2</sub> 处理可促进肝癌细胞的生长和侵袭;COX-2 抑制剂 celecoxib 可抑制肝癌细胞的增殖并诱导其凋亡<sup>[11]</sup>。关于 PGE<sub>2</sub> 通过下游一系列蛋白分子显著促进肿瘤的增殖、侵袭与转移的报道很多,本课题组前期研究成果表明,PGE<sub>2</sub> 可通过 snail、 $\beta$ 1-integrin、MMP2 和 c-Myc 等分子显著地促进肝癌细胞的生长、侵袭和转移<sup>[12-16]</sup>。

已知 PGE<sub>2</sub> 主要通过细胞膜上的 4 种前列腺素受体:EP1R、EP2R、EP3R 和 EP4R 发挥作用。EP 受体属于 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)家族的成员,受体激活后通过与之耦联的 G 蛋白传递信号。G 蛋白耦联受体的下游信号通路有多种,主要取决于 G 蛋白  $\alpha$  亚基的种类( $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i/o}$ 、 $G_{\alpha q/11}$ 、 $G_{\alpha 12/13}$ )<sup>[17]</sup>。大鼠和人胚肾细胞(HEK293 细胞)EP 受体转染实验结果表明<sup>[18]</sup>,EP1 受体主要与  $G_{\alpha q}$  蛋白相耦联,引起细胞内  $Ca^{2+}$  浓度上调以及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活;EP<sub>2</sub> 受体和 EP4 受体主要与  $G_{\alpha s}$  蛋白相耦联,激活腺苷酸环化

酶 (adenylate cyclase, AC), 导致细胞内环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 浓度上升而诱导蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 激活;EP3 受体则与  $G_{\alpha i}$  蛋白相耦联,激活后抑制 AC, 导致细胞内 cAMP 浓度下降。近年来也有文献报道在肿瘤中 EP3 受体可与  $G_{\alpha s}$  蛋白耦联,激活腺苷酸环化酶 AC, 导致细胞内 cAMP 浓度升高,促进肿瘤细胞的生长<sup>[19]</sup>。

与 EP1、EP2 和 EP4 受体不同,EP3 受体比较复杂,其 mRNA 在胞浆域 C 末端存在至少 8 种以上的剪接体亚型,编码至少 5 种以上的受体蛋白<sup>[20-21]</sup>。而关于 EP3 受体在肿瘤中的作用及机制研究比较少,涉及到 EP3 受体亚型在肿瘤细胞上的分布类型、相关作用以及它们在肿瘤发生发展中作用机制的研究报道则更少。不同文献对 EP3 受体在肿瘤中作用的报道存在较大分歧。有报道认为 PGE<sub>2</sub> 通过激活 EP3 受体能够显著地抑制细胞的生长和侵袭,如在细胞增殖和血管形成的研究中发现,EP3 受体激动剂可抑制雄激素依赖性前列腺癌细胞的增殖,及抑制 SUM149 乳腺癌的血管生成<sup>[22-23]</sup>。也有相反的报道表明 PGE<sub>2</sub> 可以通过激活 EP3 受体促进 CCLP 胆管细胞癌细胞、A549 肺腺癌细胞的增殖及动物模型肺癌细胞的转移<sup>[24-25]</sup>。本文认为,这些有争议的研究结果很可能是由于 EP3 受体在不同组织或肿瘤细胞中表达不同的亚型引起的,有些亚型可能通过激活  $G_{\alpha i}$  发挥作用,而有些亚型可能激活  $G_{\alpha s}$  从而通过不同信号转导通路引起不同的生物学反应。

上述有关 EP3 受体剪接体亚型的报道以及 EP3 受体在不同肿瘤细胞系中表现出的功能不一致性,使我们更加关注 EP3 受体亚型在调控肝癌细胞生长和侵袭中的作用及其机制。本课题组前期研究结果表明,Huh-7 细胞可同时表达 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R 及 EP3-7R 4 种受体亚型。本研究期望通过在 Huh-7 中分别过表达这 4 种受体亚型,再用 EP3 受体激动剂 sulprostone 刺激过表达后的 Huh-7 细胞,以观这些 EP3 受体亚型对肝癌细胞生长和侵袭的调控作用。实验结果显示,在过表达 EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 3 种受体亚型的细胞中,EP3 受体激动剂可以明显地促进 Huh-7 细胞的增殖与侵袭能力,而 EP3-6R 过表达后细胞增殖和侵袭力则无明显改变。本实验室的前期研究已证实在胆管细胞癌 CCLP 细胞中 EP3-4 受体与  $G_{\alpha s}$  偶联,激活 cAMP-PKA,上调细胞 FBP1 蛋白水平,从而促进 CCLP 细胞的生长<sup>[19]</sup>,说明 EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 亚型很可能与  $G_{\alpha s}$  偶联,促进肝癌细胞的生长与侵袭;

而 EP3-6R 亚型很可能与 G $\alpha$ i 亚基偶联,通过抑制 AC 的活性而下调 c-AMP 的生成、抑制 PKA 的激活,从而不促进肿瘤细胞的生长和侵袭。

人体内存在数以千计的控制系统,甚至在 1 个细胞内也存在许多精细复杂的控制系统,精确地调控细胞的各种功能活动。有文献报道,在 T 细胞的激活过程中<sup>[26]</sup>,第二信号(激活信号)来自协同刺激受体与其配体的结合。协同刺激分子及其受体 B7 家族成员中,有的发挥正向激发作用,有的行使负向调节功能。能够为 T 细胞提供激发性第二信号的受体主要为 CD28,抑制性受体主要包括 CTLA-4 等。有意思的是:激活性受体 CD28 及抑制性受体 CTLA-4 的配体分子,都是 B7-1 和 B7-2。免疫系统对此作出的“安排”是:CD28 组成性地先表达,CTLA-4 的表达一般在 T 细胞获得双重激活信号后约 24 h 诱导性表达。由于 B7-1/B7-2 与 CTLA-4 结合的亲和力明显高于同 CD28 结合的亲和力,因此 CTLA-4 一旦诱导表达,激活信号随即被 CTLA-4 与 B7-1/B7-2 相互配接所传递的抑制信号所取代。开启对 T 细胞活化的反馈调节。由此本文推测,在细胞水平 PGE<sub>2</sub> 发挥作用时也存在这种正向激活和负向抑制的调节作用,而这种精细调节正是通过细胞膜上的多种 EP 受体来实现的。

本课题前期研究结果表明,肝癌细胞(包括肝细胞癌细胞和胆管细胞癌细胞)均同时表达 EP1R、EP2R、EP4R 和 EP3-4R、EP3-5R、EP3-6R、EP3-7R<sup>[27]</sup>,在同一细胞膜上同时表达 7 种 PGE<sub>2</sub> 受体的意义目前尚不清楚。本实验结果显示,EP3-4R、EP3-5R 及 EP3-7R 激动后显著促进肿瘤细胞生长和侵袭的作用,而 EP3-6R 激动后则不促进肝癌细胞的生长和侵袭。说明 EP3 受体的 4R、5R、7R 3 个亚型对肿瘤的发生发展有正向促进作用,而 EP3-6R 很可能与 G $\alpha$ i 耦联作为一种抑制性受体,负反馈性调控其他 EP3 受体亚型或 EP1R、EP2R 和 EP4R 的作用。

为了进一步明确 EP3 受体亚型功能和调控性质的不一致,本实验检测了肿瘤中常见的涉及促进细胞生长和侵袭的信号分子 ERK。ERK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)家族的成员之一,是细胞信号转导的重要靶点。磷酸化激活的 ERK(p-ERK)可进入细胞核作用于 c-myc、c-fos、NF- $\kappa$ B 等转录因子,参与促进前列腺癌、非小细胞肺癌和肝癌等多种肿瘤细胞生长和侵袭的调控<sup>[29-30]</sup>。本研究结果证实,EP3-4R、EP3-5R、EP3-7R 亚型过表达 Huh7 细胞 p-ERK 水平明显增

高,而 EP3-6R 亚型过表达细胞 p-ERK 的水平无明显增高,进一步证明了 EP3 受体亚型之间功能和调控性质的差异。

研究肝癌细胞 EP3 受体亚型的分布、功能和调控机制,可为最终阐明 PGE<sub>2</sub> 促进肝癌发生发展的机制提供理论依据,并为肝癌的预防和治疗提供新思路。

#### [参考文献]

- [1] International Agency for Research on Cancer. World cancer report 2014[M]. United States: World Health Organization, 2014: 16-53
- [2] Dufour M, Faes S, Dormond-Meuwly A, et al. PGE<sub>2</sub>-induced colon cancer growth is mediated by mTORC1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(4): 587-591
- [3] Jee YS, Jang TJ, Jung KH. Prostaglandin E(2) and interleukin-1beta reduce E-cadherin expression by enhancing snail expression in gastric cancer cells[J]. *J Korean Med Sci*, 2012, 27(9): 987-992
- [4] Bocca C, Ievolella M, Autelli R, et al. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(2): 121-135
- [5] 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
- [6] 陈萌, 马娟, 夏树开等. 肝癌细胞中 EP3 受体亚型表达及其调控肝癌细胞生长的研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(1): 16-21
- [7] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917
- [8] Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, et al. Inflammation and liver cancer: new molecular links[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155: 206-221
- [9] Han C, Demetris AJ, Liu Y, et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE)2/EP1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signaling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF-beta-induced mitoinhibition[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44344-44354
- [10] Misra S, Sharma K. COX-2 signaling and cancer: new players in old arena[J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(3): 347-359
- [11] Leng J, Han C, Demetris AJ, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt

- activation;evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis[J]. *Hepatology*,2003,38(3):756-768
- [12] Cheng SY,Zhang H,Zhang M,et al. Prostaglandin E(2) receptor EP2 mediates Snail expression in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*,2014,31(5):2099-2106
- [13] Bai X,Wang J,Guo Y,et al. Prostaglandin E2 stimulates beta1-integrin expression in hepatocellular carcinoma through the EP1 receptor/PKC/NF-kappaB pathway [J]. *Sci Rep*,2014,4:6538
- [14] Zhang M,Zhang H,Cheng S,et al. Prostaglandin E2 accelerates invasion by upregulating Snail in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Tumour Biol*,2014,35(7):7135-7145
- [15] Sun B,Rong R,Jiang H,et al. Prostaglandin E2 receptor EP1 phosphorylate CREB and mediates MMP2 expression in human cholangiocarcinoma cells[J]. *Mol Cell Biochem*,2013,378(1-2):195-203
- [16] Xia S,Ma J,Bai X,et al. Prostaglandin E2 promotes the cell growth and invasive ability of hepatocellular carcinoma cells by upregulating c-Myc expression via EP4 receptor and the PKA signaling pathway[J]. *Oncol Rep*,2014,32(4):1521-1530
- [17] Hamm HE. The many faces of G protein signaling[J]. *J Biol Chem*,1998,273(2):669-672
- [18] Sugimoto Y,Narumiya S. Prostaglandin E receptors[J]. *J Biol Chem*,2007,282(16):11613-11617
- [19] Ma J,Chen M,Xia SK,et al. Prostaglandin E2 promotes liver cancer cell growth by the upregulation of FUSE-binding protein 1 expression [J]. *Int J Oncol*,2013,42(3):1093-1104
- [20] Namba T,Sugimoto Y,Negishi M,et al. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity[J]. *Nature*,1993,365(6442):166-170
- [21] Kotani M,Tanaka I,Ogawa Y,et al. Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing:multiple second messenger systems and tissue-specific distributions[J]. *Mol Pharmacol*,1995,48(5):869-879
- [22] Kashiwagi E,Shiota M,Yokomizo A,et al. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells[J]. *Endocr Relat Cancer*,2013,20(3):431-441
- [23] Robertson FM,Simeone AM,Lucci A,et al. Differential regulation of the aggressive phenotype of inflammatory breast cancer cells by prostanoid receptors EP3 and EP4 [J]. *Cancer*,2010,116(11 Suppl):2806-2814
- [24] Yamaki T,Endoh K,Miyahara M,et al. Prostaglandin E2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3[J]. *Cancer Lett*,2004,214(1):115-120
- [25] Amano H,Ito Y,Suzuki T,et al. Roles of a prostaglandin E-type receptor,EP3,in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis[J]. *Cancer Sci*,2009,100(12):2318-2324
- [26] 周光炎. 免疫学原理[M]. 2 版.上海,上海科学技术出版社,2007:209
- [27] 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
- [28] Jin F,Irshad S,Yu W,et al. ERK and AKT signaling drive MED1 overexpression in prostate cancer in association with elevated proliferation and tumorigenicity[J]. *Mol Cancer Res*,2013,11(7):736-747
- [29] Zhang J,Cao J,Ma S,et al.Tumor hypoxia enhances non-small cell lung cancer metastasis by selectively promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling[J]. *Oncotarget*,2014,5(20):9664-9677
- [30] Zhang H,Cheng S,Zhang M,et al.Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through upregulation of YB-1 protein expression[J]. *Int J Oncol*,2014,44(3):769-780

[收稿日期] 2014-12-17

(上接第 484 页)

- [14] Chen J,Zhou Y,Mueller-Steiner S,et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling[J]. *J Biol Chem*,2005,280(48):40364-40367
- [15] 胡爱平,游 娜,徐家蓉,等. Resveratrol 对高糖所致大鼠肾小球系膜细胞 TGF-β1 表达的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2009,29(4):475-478
- [16] Huang K,Chen C,Hao J,et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating Sirt1 to resist AGEs-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor-β1 in rat glomerular mesangial cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2015,399:178-189
- [17] 杜月光,柴可夫,钱俊文,等. SIRT1 通过降低 NF-KB 06S 乙酰化减轻高糖应激引起的大鼠肾小球系膜细胞损伤[J]. *中国病理生理杂志*,2014,30(4):664-669

[收稿日期] 2014-12-16