

## PGE<sub>2</sub> 通过 Gαs-cAMP-PKA 通路上调子宫内膜癌细胞 VEGF 的表达

许燕<sup>1</sup>, 卢顺麟<sup>2</sup>, 冷静<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>泰州职业技术学院医学技术学院基础医学与药理学系, 江苏 泰州 225300; <sup>2</sup>泰州市第四人民医院心内科, 江苏 泰州 225300; <sup>3</sup>南京医科大学病理系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨 PGE<sub>2</sub>(prostaglandinE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达的影响及其可能涉及的信号转导通路。方法:用 PGE<sub>2</sub>、4种 EP受体激动剂(17-phenyltrilor prostaglandin E<sub>2</sub>, butaprost, sulprostone 和 prostaglandin E1 alcohol)、EP2受体拮抗剂 AH6809、PKA抑制剂 H89、腺苷酸环化酶(AC)抑制剂 SQ22536 处理 Ishikawa 细胞,通过 Western blot 实验检测 VEGF 蛋白表达水平的变化。结果:PGE<sub>2</sub>明显提高 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白的表达水平,10 μmol/L PGE<sub>2</sub> 处理 Ishikawa 细胞后,VEGF 蛋白的表达水平与对照组相比升高 31.56%( $P < 0.05$ );10 μmol/L EP1-4 受体激动剂处理 Ishikawa 细胞后,VEGF 蛋白的表达水平与对照组相比明显增高,其中 EP2 受体激动剂处理组上升了 87.80%( $P < 0.05$ );10 μmol/L EP2 受体拮抗剂 AH6809 处理 Ishikawa 细胞后,Ishikawa 蛋白的表达水平较 PGE<sub>2</sub> 处理组下调了 45.66%( $P < 0.05$ )。25 μmol/L AC 抑制剂 SQ22536、10 μmol/L PKA 抑制剂 H89 处理 Ishikawa 细胞后,VEGF 蛋白的表达水平较 EP2 受体激动剂处理组分别下降了 29.00%( $P < 0.05$ )和 57.50%( $P < 0.05$ )。结论:PGE<sub>2</sub> 可通过 EP2 受体激活 cAMP-PKA 信号转导通路上调 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白的表达。

**[关键词]** PGE<sub>2</sub>; EP2 受体; VEGF; 子宫内膜癌

**[中图分类号]** R737.33

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-553-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140504

## Increased expression of VEGF by prostaglandin E2 through activation of Gα s-cAMP-PKA pathway in endometrial cancer cell

Xu Yan<sup>1</sup>, Lu Shunlin<sup>2</sup>, Leng Jing<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Basic Medical Science and Pharmacy, Institute of Medical Technology, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Taizhou Forth People's Hospital, Taizhou 225300; <sup>3</sup>Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore VEGF expression induced by PGE<sub>2</sub> in endometrial cancer cell and possibly involved signal transduction pathways. **Methods:** Ishikawa cells were treated with PGE<sub>2</sub>, EP1-4 receptor agonist, EP2 receptor antagonist AH6809, PKA inhibitor H89, and adenylate cyclase (AC) inhibitor SQ22536. Western blot was used to examine the expression of VEGF protein in Ishikawa cells. **Results:** PGE<sub>2</sub> up-regulated the protein level of VEGF in Ishikawa cells. The level of VEGF protein was increased by 31.56% ( $P < 0.05$ ) compared with the control group after treated with 10 μM PGE<sub>2</sub> for 24 h. Treated with 10 μM four selective EP receptor agonists (17-phenyltrilor Prostaglandin E<sub>2</sub>, Butaprost, Sulprostone and Prostaglandin E1 Alcohol) respectively, the protein expressions of VEGF in Ishikawa cells was increased compared with the control group. We found that EP2 receptor agonist increased the expression of VEGF protein to 87.8% ( $P < 0.05$ ). The protein level of VEGF decreased by 45.66% ( $P < 0.05$ ) after treated with 10 μM EP2 receptor antagonist compared with the group treated with PGE<sub>2</sub>. When treated with 25 μM AC inhibitor SQ22536 and 10 μM PKA antagonist H89 for 24 h, respectively, the protein levels of VEGF were decreased by 29% ( $P < 0.05$ ) and 57.5% ( $P < 0.05$ ) compared with the group treated with EP2 receptor agonist. **Conclusion:** PGE<sub>2</sub> may up-regulate the protein expression of VEGF through EP2 receptor and Gαs-cAMP-PKA signaling pathway in Ishikawa cells.

**[Key words]** PGE<sub>2</sub>; EP2 receptor; VEGF; endometrial cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 553-556]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81172003); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10131801021)

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

子宫内膜癌又称子宫体癌,为女性生殖道常见三大恶性肿瘤之一,在我国其发病率仅次于子宫颈癌,占女性生殖道恶性肿瘤的20%~30%,并且近年来其发病率呈现明显上升趋势。因此,如何有效防治子宫内膜癌的发病近年来成为我国学者关注的重点。

前列腺素E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)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<sup>[1]</sup>。可以促进肿瘤细胞的增殖<sup>[2]</sup>、肿瘤血管的形成<sup>[3]</sup>和侵袭转移<sup>[4]</sup>。近期大量研究显示子宫内膜癌的发生和发展亦与PGE<sub>2</sub>密切相关<sup>[5-6]</sup>。

血管内皮生长因子(VEGF)是肝素结合糖蛋白,以二聚体的形式作用在血管内皮细胞,是促进肿瘤血管形成的主要因子。VEGF在人类多种肿瘤细胞中高表达<sup>[7-8]</sup>。有学者研究发现PGE<sub>2</sub>可以诱导VEGF的表达<sup>[9]</sup>,因此PGE<sub>2</sub>可能通过VEGF参与了肿瘤促血管生成的调节作用。

既然子宫内膜癌的发生和PGE<sub>2</sub>相关,而PGE<sub>2</sub>又可以诱导VEGF的表达,因此PGE<sub>2</sub>是否可影响子宫内膜癌细胞中VEGF的表达且涉及的信号转导通路就成为本课题关注的焦点。

本研究应用PGE<sub>2</sub>、4种EP受体激动剂、EP2受体抑制剂AH6809、AC抑制剂SQ22536、PKA抑制剂H89处理人子宫内膜癌Ishikawa细胞,观察其VEGF表达水平变化,初步阐明在Ishikawa细胞中PGE<sub>2</sub>通过EP受体途径调控VEGF表达的机制及其可能涉及的信号转导通路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人子宫内膜癌细胞Ishikawa细胞株(KeyGEN公司,美国),RPMI1640培养基(Invitrogen公司,美国),小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),PGE<sub>2</sub>(Cayman公司,美国),EP1受体激动剂(17-phenyltrilor prostaglandin E<sub>2</sub>)、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),EP2受体拮抗剂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),兔抗人VEGF多克隆抗体(Santa Cruz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)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人子宫内膜癌细胞株Ishikawa置于含10%小牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中常规培养,0.125%胰酶+0.020%EDTA消化传代,取生长良好,处于对数生长期的细胞用于实验。

#### 1.2.2 VEGF蛋白表达水平测定(Western blot)

6孔板每孔接种2×10<sup>5</sup>个细胞,贴壁24h,以DMSO为对照,分别以10 μmol/L PGE<sub>2</sub>处理细胞24h,10 μmol/L EP1-4受体激动剂处理24h,10 μmol/L EP2受体抑制剂AH6809预处理细胞1h后加10 μmol/L PGE<sub>2</sub>处理至24h,25 μmol/L AC抑制剂SQ22536、10 μmol/L PKA抑制剂H89预处理细胞1h后加10 μmol/L EP2受体激动剂处理至24h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 g,离心30 min。取上清,用BSA法定量蛋白浓度。取30~50 μg上述蛋白在10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转至硝酸纤维素膜,非特异蛋白封闭液处理1h,一抗4℃孵育过夜,PBS-T洗涤后加二抗孵育2h,ECL显色系统检测VEGF的表达,以β-actin为内参照。X线胶片上的信号用Image-J软件进行统计分析。实验均重复3次。

#### 1.3 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件进行数据分析,所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用*t*检验,*P*≤0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PGE<sub>2</sub>促进Ishikawa细胞VEGF蛋白表达

以DMSO为对照组,实验组用10 μmol/L PGE<sub>2</sub>处理Ishikawa细胞24h后,Western blot实验发现VEGF蛋白表达水平与对照组相比上升了31.56% (*P*<0.05,图1)。结果表明,PGE<sub>2</sub>能上调Ishikawa细胞中VEGF蛋白的表达。

### 2.2 EP受体激动剂以及EP2受体抑制剂对Ishikawa细胞VEGF蛋白表达的影响

以DMSO为对照,实验组用10 μmol/L EP1-44种受体激动剂(17-phenyltrilor prostaglandin E<sub>2</sub>、butaprost、sulprostone和prostaglandin E1 alcohol)分别处理Ishikawa细胞24h后,Western blot实验结果表明EP2受体激动剂组细胞中VEGF蛋白表达水平升高最明显,与对照组相比上升了87.80% (*P*<0.05,图2A)。而以PGE<sub>2</sub>为对照,实验组用10 μmol/L

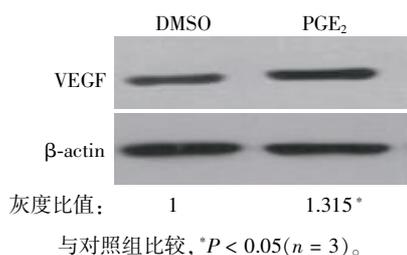


图 1 Western blot 检测 10  $\mu$ mol/L PGE<sub>2</sub> 对 Ishikawa 细胞中 VEGF 蛋白表达的影响

Figure 1 The effect of PGE<sub>2</sub> on the expression of VEGF in Ishikawa cells

EP2 受体抑制剂(AH6809)预处理 1 h 后再加入 10  $\mu$ mol/L PGE<sub>2</sub> 处理 23 h, VEGF 蛋白的表达水平与对照组相比下降了 49.14% ( $P < 0.05$ , 图 2B)。

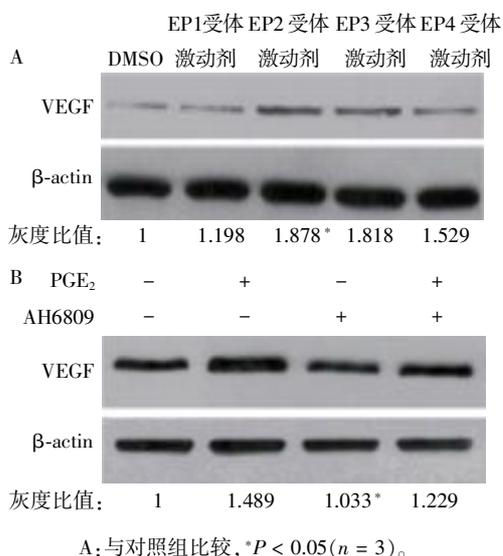


图 2 Western blot 检测 EP2 受体激动剂(A)和抑制剂(B)对 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白表达的影响

Figure 2 The effect of EP2 receptor agonists (A) and antagonists (B) on the expression of VEGF protein in Ishikawa cells

结果表明, EP2 受体激动剂能够促进 VEGF 蛋白的表达; 而用 EP2 拮抗剂 AH6809 预处理 Ishikawa 细胞后再用 PGE<sub>2</sub> 刺激, 则 VEGF 的表达较对照组 PGE<sub>2</sub> 组明显下降, 这说明 PGE<sub>2</sub> 可能主要通过 EP2 受体来完成对 VEGF 表达的上调作用。

### 2.3 AC 抑制剂 SQ22536、PKA 抑制剂 H89 对 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白表达的影响

为探讨 PGE<sub>2</sub> 对 Ishikawa 细胞中 VEGF 蛋白的调节作用是否与 cAMP-PKA 信号通道相关, 以 EP2 受体激动剂(Butaprost)为对照, 实验组分别用 25  $\mu$ mol/L SQ22536、10  $\mu$ mol/L H89 预处理 1 h 后再加入 10  $\mu$ mol/L EP2 受体激动剂(Butaprost)处理

24 h, SQ22536、H89 处理组较对照组(Butaprost 组) VEGF 蛋白的表达水平分别下降了 29.00%, 57.50%, 差异均具有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

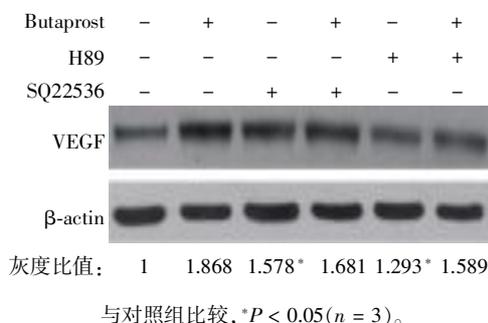


图 3 Western blot 检测 cAMP-PKA 在 PGE<sub>2</sub> 上调 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白表达中的作用

Figure 3 The role of cAMP-PKA on the expression of VEGF protein induced by PGE<sub>2</sub> in Ishikawa cells

## 3 讨论

PGE<sub>2</sub> 是重要的炎症相关因子, 它可通过复杂的信号转导作用促进炎细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等增生。PGE<sub>2</sub> 不仅与炎症的发生发展有关, 而且与肿瘤的发生发展也密切相关, 在多种人类的肿瘤中都可见 PGE<sub>2</sub> 高表达的现象。PGE<sub>2</sub> 促进肿瘤生长和侵袭的机制研究正在受到愈来愈多的重视。

目前已知 PGE<sub>2</sub> 通过与细胞膜表面的 4 种 EP 受体(E prostanoind receptor)相结合, 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<sup>[9]</sup>。EP 受体是一类 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR), 通过大鼠和人胚肾细胞 EP 受体转染实验, 人们推测 4 种 EP 受体与 G 蛋白偶联的方式可能为: EP1 受体与 G 蛋白的 G $\alpha$ q 部分偶联; EP3 受体与 G 蛋白的 G $\alpha$ i 部分偶联; EP2 和 EP4 受体与 G 蛋白的 G $\alpha$ s 部分偶联。

目前已知当 G $\alpha$ s 亚单位与激活的 GPCR 受体偶联后, 可与 G $\beta$  $\alpha$  亚基分离, 从而激活腺苷酸环化酶(AC), 产生第二信使 cAMP。有报道, cAMP 可进一步激活包括 PKA 在内的下游的调控元件, 从而调节细胞内活动<sup>[10]</sup>。研究表明, 第二信使 cAMP 激活与 VEGF 的表达相关<sup>[11-12]</sup>。

VEGF 是主要的促血管形成因子, 与肿瘤血管形成密切相关<sup>[13]</sup>, 而血管生成在肿瘤的发生发展, 特别是侵袭转移过程中起着重要作用。Zhao 等<sup>[14]</sup>发现通过抑制肝癌细胞 PGE<sub>2</sub> 的合成可抑制包括 VEGF 在内的一系列促血管生成因子的表达, 说明 PGE<sub>2</sub> 可以促进肝癌细胞 VEGF 的表达。但是, 对于 PGE<sub>2</sub>

是否能上调人子宫内膜癌细胞的 VEGF 表达, 以及通过何种 EP 受体及相应信号转导通路上调其表达尚未阐明。

本研究通过 Western blot 实验发现 PGE<sub>2</sub> 能够上调人子宫内膜癌细胞 Ishikawa 中 VEGF 蛋白表达量的水平。为了观察 EP2 受体在促进 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白上调中的作用, 用 10 μmol/L EP 受体激动剂处理 Ishikawa 细胞 24 h 后, Western blot 实验观察发现, EP2 受体激动剂处理组细胞中 VEGF 蛋白的表达水平与对照组相比升高最明显, 这说明 PGE<sub>2</sub> 对 VEGF 蛋白的调控可能与 EP2 受体通路有关。为了进一步证实 PGE<sub>2</sub> 通过 EP2 受体对 VEGF 蛋白水平进行调控, 用 EP2 受体抑制剂 AH6809 处理 Ishikawa 细胞后发现 VEGF 蛋白表达水平较对照组明显下降; 而为了证实 PGE<sub>2</sub> 可能通过 cAMP-PKA 信号转导通路对 VEGF 蛋白水平进行调控, 用腺苷酸环化酶(AC)抑制剂 SQ22536 及 PKA 抑制剂 H89 处理 Ishikawa 细胞后发现 VEGF 蛋白表达水平较对照组明显下降。由此证实了 PGE<sub>2</sub> 促进子宫内膜癌细胞 Ishikawa 细胞 VEGF 蛋白表达可能是通过 EP2 受体/Gαs 亚基, 激活 cAMP-PKA 信号通路上调所致。

本实验证实了 PGE<sub>2</sub> 可以通过 EP2 受体上调 Ishikawa 细胞 VEGF 的表达, 并且此上调作用是通过激活 Gαs-cAMP-PKA 信号通路实现的, 为阐明子宫内膜癌的发生机制以及探索临床治疗子宫内膜癌新靶点提供了新的依据, 也为 PGE<sub>2</sub> 促进肿瘤细胞生长侵袭的机制研究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] Banerjee P, Sapru K, Strakova Z, et al. Chronic gonadotropin regulates prostaglandin E synthase via a phosphatidylinositol 3-Kinase-Extracellular regulatory kinase pathway in a human endometrial epithelial cell line; Implications for Endometrial Responses for Embryo Implantation [J]. *Endocrinology* 2009, 150: 4326-4337
- [6] 张静渊, 白小明, 张丽, 等. PGE<sub>2</sub> 通过 Wnt/β-catenin 信号转导通路促进子宫内膜癌细胞生长的研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(8): 1255-1260
- [7] Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(3): 179-213
- [8] An FQ, Matsuda M, Matsumoto Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 126(3): 153-160
- [9] Majima M, Hayashi I, Muramatsu M, et al. Cyclooxygenase-2 enhance basic growth factor induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130(3): 641-649
- [10] Doré S. GPCR antagonists as an alternative to COX-2 inhibitors: a case for the PGE<sub>2</sub> EP1 receptor [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(9): 458-460
- [11] Fujino H, Xu W, Regan JW, et al. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 12151-12156
- [12] Amano H, Ando K, Minamida S, et al. Adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in vivo [J]. *J Pharmacol*, 2001, 87(3): 181-188
- [13] Namkoong S, Kim CK, Cho YL, et al. Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(6): 906-915
- [14] Zhao QT, Yue SQ, Cui Z, et al. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in hepatocellular carcinoma-associated angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2007, 80(5): 484-492

[收稿日期] 2013-11-23