

## PGE<sub>2</sub>通过上调 CXCR4 表达促进 SKOV3 细胞侵袭的机制研究

汪亦品<sup>1</sup>,冯晓敏<sup>2</sup>,张 海<sup>1</sup>,张 丽<sup>1</sup>,杨沁怡<sup>1</sup>,施 凤<sup>1</sup>,冷 静<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系,肿瘤中心,生殖医学重点实验室,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>南京市妇幼保健院病理科,江苏 南京 210004)

**[摘要]** 目的:探讨前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)上调人卵巢癌 SKOV3 细胞 CXC 趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 的表达从而促进细胞侵袭能力的机制。方法:用 PGE<sub>2</sub>、EP1 受体激动剂或抑制剂、CXCR4 抑制剂、蛋白激酶 C(PKC)抑制剂和钙离子螯合剂处理 SKOV3 细胞,通过 real-time PCR、Western blot、Transwell 实验检测 CXCR4 mRNA 水平、蛋白水平以及细胞的侵袭能力。结果:5 μmol/L PGE<sub>2</sub> 处理 SKOV3 细胞后, CXCR4 mRNA 及蛋白水平与对照组相比分别上升了 60.33%、122.88%(*P* 均 < 0.01),细胞的侵袭能力较对照组增强了 112.24%(*P* < 0.01); 而经 10 μmol/L CXCR4 抑制剂 AMD3465 处理后,细胞的侵袭水平较 PGE<sub>2</sub> 处理组下降了 54.00%(*P* < 0.05); 5 μmol/L EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 SKOV3 细胞后, CXCR4 mRNA 及蛋白水平与对照组相比分别上升了 47.90%(*P* < 0.01)、85.56%(*P* < 0.05),细胞的侵袭能力较对照组增强了 108.79%(*P* < 0.01); 而 10 μmol/L EP1 受体抑制剂 sc-51322 处理后, CXCR4 蛋白表达水平较 PGE<sub>2</sub> 处理组下降了 54.86%(*P* < 0.05),细胞的侵袭水平较 PGE<sub>2</sub> 处理组下降了 65.37%(*P* < 0.05); 5 μmol/L PKC 抑制剂 BIS-1、10 μmol/L 钙离子螯合剂 BAPTA-AM 处理后, CXCR4 蛋白表达水平较 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理组分别下降了 57.38%、56.14% (*P* 均 < 0.05),细胞的侵袭水平较 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理组下降了 52.63%、55.26%(*P* < 均 0.05)。结论:PGE<sub>2</sub> 可通过激活 EP1 受体经 Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号转导通路上调卵巢癌 SKOV3 细胞 CXCR4 的表达,从而增强肿瘤细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 卵巢癌; PGE<sub>2</sub>; CXCR4; EP1 受体; Gαq

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)04-510-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150413

## Prostaglandin E<sub>2</sub> promote invasion ability of SKOV3 cell via upregulating CXCR4

Wang Yipin<sup>1</sup>, Feng Xiaomin<sup>2</sup>, Zhang Hai<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Yang Qinyi<sup>1</sup>, Shi Feng<sup>1</sup>, Leng Jing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Cancer Center, Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 210029;  
<sup>2</sup>Department of Pathology, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) on the invasion ability of ovarian cancer SKOV3 cell via upregulating the receptor of stromal cell-derived factor-1 (chemokine receptor 4, CXCR4). **Methods:** SKOV3 cells were treated with PGE<sub>2</sub>, EP1 receptor agonist, CXCR4 antagonist, EP1 receptor antagonist, protein kinase C (PKC) inhibitor and Ca<sup>2+</sup> chelating agent. Real-time PCR, Western Blot and Transwell were performed to detect the levels of CXCR4 mRNA and CXCR4 protein as well as the invasion ability in SKOV3 cells. **Results:** The mRNA level of CXCR4 increased by 60.33% (*P* < 0.01), while the level of CXCR4 protein increased by 122.88% (*P* < 0.01), and the invasion ability of SKOV3 cells increased by 112.24% (*P* < 0.01) after treated with 5 μmol/L PGE<sub>2</sub>. The invasion ability of SKOV3 cells decreased by 54.00% (*P* < 0.05) after treated with 10 μmol/L CXCR4 antagonist AMD3465 compared with the cells treated with PGE<sub>2</sub>. When treated with 5 μmol/L EP1 receptor agonist 17-PT-PGE<sub>2</sub>, the mRNA level of CXCR4 increased by 47.90% (*P* < 0.01), the level of CXCR4 protein increased 85.56% (*P* < 0.05), and the invasion ability of SKOV3 cells increased by 108.79% (*P* < 0.01). The protein level decreased by 54.86% (*P* < 0.05) and the invasion ability of SKOV3 cells decreased by 65.37% (*P* < 0.05) after treated with 10 μmol/L EP1 receptor antagonist sc-51322 compared with the cells treated with PGE<sub>2</sub>. When treated with 5 μmol/L PKC inhibitor BIS-1 and 10 μmol/L Ca<sup>2+</sup> chelating agent BAPTA-AM, the protein levels of CXCR4 were decreased by 57.38% (*P* < 0.05) and 56.14% (*P* < 0.05) respectively, and the invasion ability of SKOV3 cells decreased by 52.63% (*P* < 0.05) and 55.26% (*P* < 0.05) respectively compared with the cells treated with 17-PT-PGE<sub>2</sub>.

**[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

**Conclusion:** PGE<sub>2</sub> might up-regulate the expression level of CXCR4 through EP1 receptor which could be partly related to the Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC signaling pathway in ovarian cancer SKOV3 cells, and promote the tumor cells invasion.

**[Key words]** ovarian cancer; PGE<sub>2</sub>; CXCR4; EP1 receptor; Gαq

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04): 510-516]

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,由于发病隐匿,易转移和复发,故其病死率高。因此了解卵巢癌发生发展的机制并控制其进展,改善患者预后已引起广大学者的关注。

肿瘤细胞的侵袭转移是一个多因素过程,目前研究已发现多种趋化因子及其受体参与了肿瘤的侵袭转移。其中 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 为主要研究靶点之一, CXCR4 经其配体基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 特异性结合激活后可促进肝癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤的侵袭转移。

近来有文献报道,前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin, E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 可通过上调 CXCR4 蛋白表达而增强造血干细胞的骨髓归巢,本实验室前期研究结果也表明 PGE<sub>2</sub> 通过激活 EP1 受体能够显著地增强肝癌细胞的侵袭转移能力,同时还发现 PGE<sub>2</sub> 能够促进 SKOV3 细胞的侵袭能力。因此本文推测:在卵巢癌细胞 SKOV3 中, PGE<sub>2</sub> 有可能通过诱导 CXCR4 蛋白的高表达从而增强 SKOV3 细胞的侵袭能力,有关这方面的研究尚未见报道。

本研究采用 Transwell 实验检测 PGE<sub>2</sub>、CXCR4 特异性抑制剂对卵巢癌侵袭能力的影响;应用特异性 EP1 受体激动剂、抑制剂及蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂、细胞内钙离子螯合剂处理 SKOV3 细胞,运用 real-time PCR、Western blot 等实验综合分析 PGE<sub>2</sub> 通过 EP1 受体上调 CXCR4 表达进而促进 SKOV3 细胞侵袭的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人卵巢癌细胞 SKOV3 细胞株 (ATCC 公司, 美国); RPMI 1640 培养基 (Invitrogen 公司, 美国); 小牛血清 (杭州四季青公司); PGE<sub>2</sub>、EP1 受体激动剂 17-phenyltrilor-prostaglandin E<sub>2</sub> (17-PT-PGE<sub>2</sub>)、EP1 受体抑制剂 sc-51322 (Cayman 公司, 美国); anti-CXCR4 (Sigma 公司, 美国); anti-GAPDH (南京赛博公司); 抗兔二抗 (Thermo 公司, 美国); High Pure RNA Isolation Kit、Power SYBR Green PCR Master Mix

(Roche 公司, 德国); RT 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); PKC 抑制剂 bisindolylmaleimide 1 (BIS-1, MERCK 公司, 美国), 钙离子螯合剂 (BAPTA-AM, 同仁化学所, 日本), 引物合成 (南京金斯瑞公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

卵巢癌细胞株 SKOV3 接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中常规培养, 0.125% 胰酶+0.020% EDTA 消化传代, 取生长良好, 处于对数期的细胞用于实验。

#### 1.2.2 细胞侵袭能力检测实验

用冰的无血清 RPMI1640 培养基配制 10% Matrigel 溶液, 取 12 孔 Transwell 小室, 在小室膜上表面包被 10% Matrigel 溶液 40 μl, 室温晾干。取生长良好的细胞, 用胰蛋白酶消化, 加无血清 RPMI1640 培养基吹打均匀, 制备细胞悬液, 按每个小室 100 μl 细胞悬液 (含 5×10<sup>4</sup> 个细胞) 接种于 Transwell 小室内, 下室加入 600 μl 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 形成一定的血清浓度差异, 有利于细胞侵袭, 并给予实验设计的处理, 每组 3 个复孔。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 19 h 后, 取出小室弃上清, 甲醇固定细胞 20 min, 室温下自然晾干。然后用 0.1% 结晶紫溶液浸泡小室下表面 30 min, 使细胞染成紫色。PBS 反复洗涤小室 3 次以上, 至洗液变清, 室温下自然晾干, 用棉签小心擦去小室膜上表面的细胞与 Matrigel, 在倒置相差显微镜下观察侵袭至小室膜下表面的细胞并拍照。随机选取 8 个视野, 计数穿膜细胞, 以上实验重复 3 次以上。

#### 1.2.3 细胞总 RNA 提取与 real-time PCR 实验

每孔 2×10<sup>5</sup> 个细胞接种 6 孔板, 以 DMSO 为对照, 5 μmol/L PGE<sub>2</sub>、5 μmol/L EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 SKOV3 细胞, 24 h 后按 RNA 提取试剂盒 High Pure RNA Isolation Kit 说明书进行操作; 取 1 μg 总 RNA 进行反转录 (反应体系为 20 μl)。设计合成的引物如下: CXCR4 Forward: 5'-CTCT-GAAGAAGTGGGGTCTGG-3'; Reverse: 5'-AAGTA-GATGGTGGGCAGGAAG-3'; GAPDH Forward: 5'-TTC-CAGGAGCGAGATCCCT-3'; Reverse: 5'-CACCCAT-GACGAACATGGG-3'。取 5 μl 模板 cDNA、上下游引

物各 1 μl、Reaction Mix 10 μl、3 μl ddH<sub>2</sub>O 进行 real-time PCR(20 μl 反应体系),以上实验重复 3 次以上。

### 1.2.4 CXCR4 蛋白表达水平测定(Western blot)实验

6 孔板接种 2×10<sup>5</sup> 个/孔细胞,贴壁 24 h,以 DMSO 为对照,加入相关药物处理相应时间后,PBS 终止反应,每孔加入 60 μl 三去污裂解液,用细胞刮匙收集细胞,冰浴 30 min,超声粉碎,4℃,15 000 g 离心 30 min。吸取蛋白上清,BCA 法定量蛋白浓度。取 60~100 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,封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜,PBS-T 洗涤后加二抗孵育 2 h,ECL 显色系统检测 CXCR4 的表达,以 GAPDH 为内参照,化学发光凝胶成像系统曝光成像,并进行分析,以上实验重复 3 次以上。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件,所有数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析做总体差异评估,并用 SNK *q* 检验进行组间两两差异性比较,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

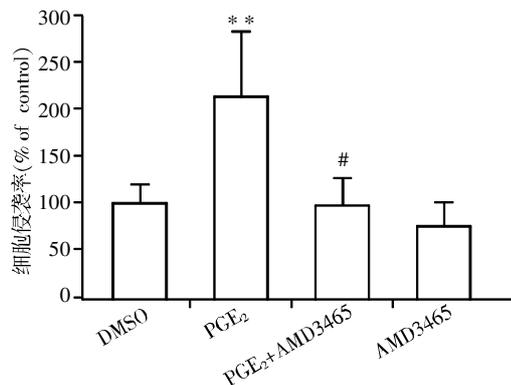
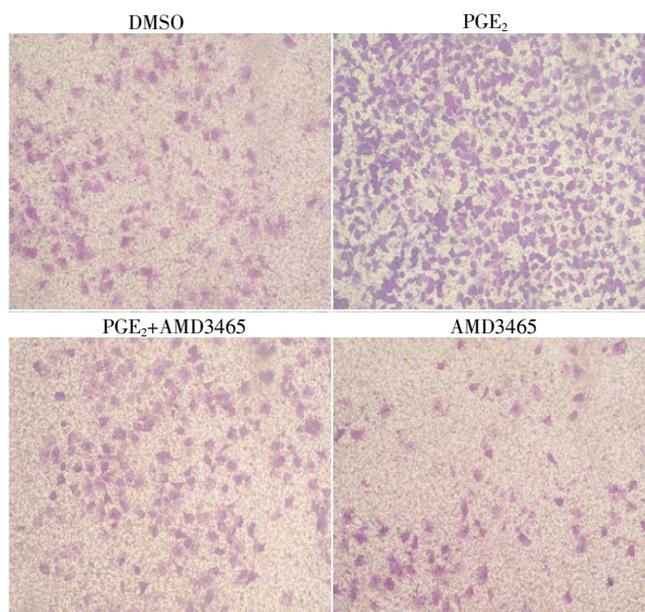
## 2 结果

### 2.1 CXCR4 蛋白在 PGE<sub>2</sub> 促进卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭迁移中的作用

为明确 PGE<sub>2</sub> 是否影响卵巢癌 SKOV3 细胞的侵袭迁移能力,采用 5 μmol/L 外源性 PGE<sub>2</sub> 处理 SKOV3 细胞,19 h 后 Transwell 实验检测显示侵袭细胞数较对照组(DSMO 处理组)增加了 112.24%( $P < 0.01$ ,图 1);为进一步确定 CXCR4 蛋白在 PGE<sub>2</sub> 促进卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭迁移中的作用,先给予 10 μmol/L CXCR4 特异性抑制剂 AMD3465 预处理 SKOV3 细胞 1 h 后,再加入 5 μmol/L PGE<sub>2</sub> 处理,18 h 后 Transwell 实验检测显示侵袭细胞数较 PGE<sub>2</sub> 组减少了 54.00%( $P < 0.05$ ,图 1)。

### 2.2 PGE<sub>2</sub> 通过 EP1 受体上调 SKOV3 细胞 CXCR4 水平

以 DMSO 处理为对照组,实验组经外源性 5 μmol/L PGE<sub>2</sub>、5 μmol/L EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 分别处理 24 h。Real-time PCR 实验显示:经 PGE<sub>2</sub>、17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理后 CXCR4 mRNA 表达水平较 DMSO 组分别上升了 60.33%和 47.90%( $P$  均  $< 0.01$ ,图 2A)。Western blot 实验结果显示: CXCR4 蛋白表达水平较对照组分别上升了 122.88%( $P < 0.01$ )和 85.56%( $P < 0.05$ ,图 2B);以 PGE<sub>2</sub> 为对照组,实



与 DMSO 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PGE<sub>2</sub> 组相比较, # $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

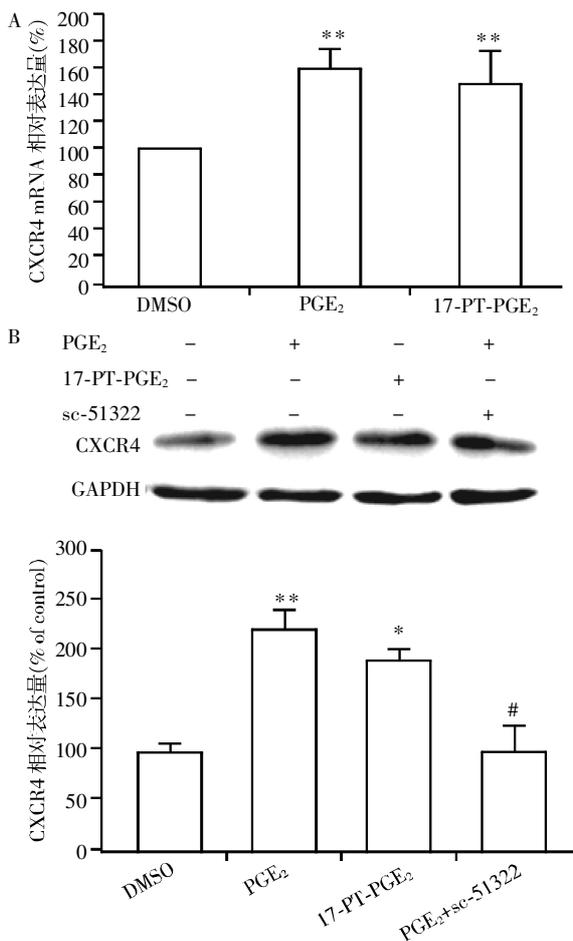
图 1 CXCR4 蛋白在 PGE<sub>2</sub> 促进卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭迁移中的作用

Figure 1 Effects of CXCR4 protein on SKOV3 cell invasion and migration in ovarian cancer promoted by PGE<sub>2</sub>

验组先经 10 μmol/L EP1 受体抑制剂 sc-51322 预处理 1 h 后,再加入 5 μmol/L PGE<sub>2</sub> 处理,23 h 后 Western blot 实验显示: CXCR4 蛋白表达水平较 PGE<sub>2</sub> 组下降了 54.86%( $P < 0.05$ ,图 2B)。

### 2.3 EP1 受体激动后经 Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号通路上调 CXCR4 蛋白表达

PGE<sub>2</sub> 能够通过 EP1 受体上调 CXCR4 mRNA 表达水平和蛋白表达水平,而有文献报道 EP1 受体可以与 G 蛋白的 Gαq 亚基相偶联,引起细胞外钙离子内流,从而激活 PKC 发挥作用,因此实验分别经 5 μmol/L PKC 抑制剂 BIS-1、10 μmol/L 钙离子螯合剂 BAPTA-AM 预处理 SKOV3 细胞 1 h 后,再加入 5 μmol/L 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 23 h。Western blot 实验结果显示: CXCR4 蛋白表达水平较 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理组分别下降了 57.38%和 56.14% ( $P$  均  $<$

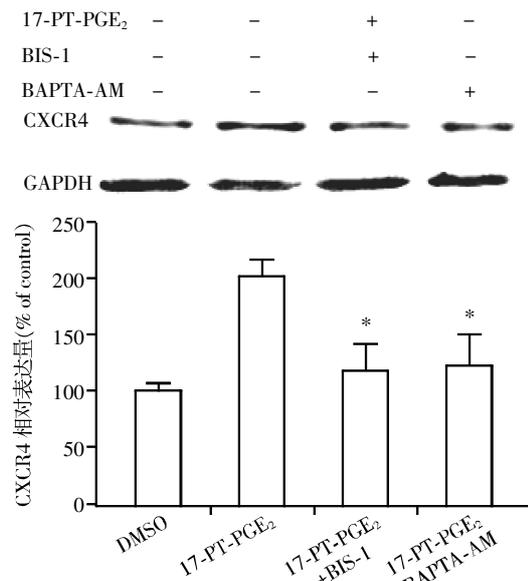


A: 5  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub>, 5  $\mu\text{mol/L}$  EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 分别处理 24 h 后, real-time PCR 实验检测 CXCR4 mRNA 表达水平; B: 5  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub>, 5  $\mu\text{mol/L}$  EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 24 h, 或 10  $\mu\text{mol/L}$  EP1 受体抑制剂 sc-51322 预处理 1 h 后, 再加入 5  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 处理, 23 h 后 Western blot 实验检测细胞 CXCR4 蛋白水平。与 DMSO 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 PGE<sub>2</sub> 组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。图 2 PGE<sub>2</sub> 通过 EP1 受体上调 SKOV3 细胞 CXCR4 表达水平  
Figure 2 PGE<sub>2</sub> unregulated CXCR4 expression of SKOV3 cells through EP1 receptor

0.05, 图 3)。

#### 2.4 EP1 受体信号通路在调控卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭迁移中的作用

5  $\mu\text{mol/L}$  EP1 受体激动剂 17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 SKOV3 细胞 19 h 后, Transwell 实验检测显示侵袭细胞数较 DMSO 组增加了 108.79% ( $P < 0.01$ , 图 4); 10  $\mu\text{mol/L}$  EP1 受体抑制剂 sc-51322 预处理 SKOV3 细胞 1 h 后, 再加入 5  $\mu\text{mol/L}$  PGE<sub>2</sub> 处理 18 h, Transwell 实验检测显示侵袭细胞数较 PGE<sub>2</sub> 组减少了 65.37% ( $P < 0.05$ , 图 4); 5  $\mu\text{mol/L}$  PKC 抑制剂 BIS-1 和 10  $\mu\text{mol/L}$  钙离子螯合剂 BAPTA-AM 分别预处理 SKOV3 细胞 1 h 后, 再加入 5  $\mu\text{mol/L}$  17-PT-PGE<sub>2</sub> 处理 18 h, 侵袭细胞数



与 17-PT-PGE<sub>2</sub> 组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 3 EP1 受体激动后经 G $\alpha$ <sub>q</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号通路上调 CXCR4 蛋白表达

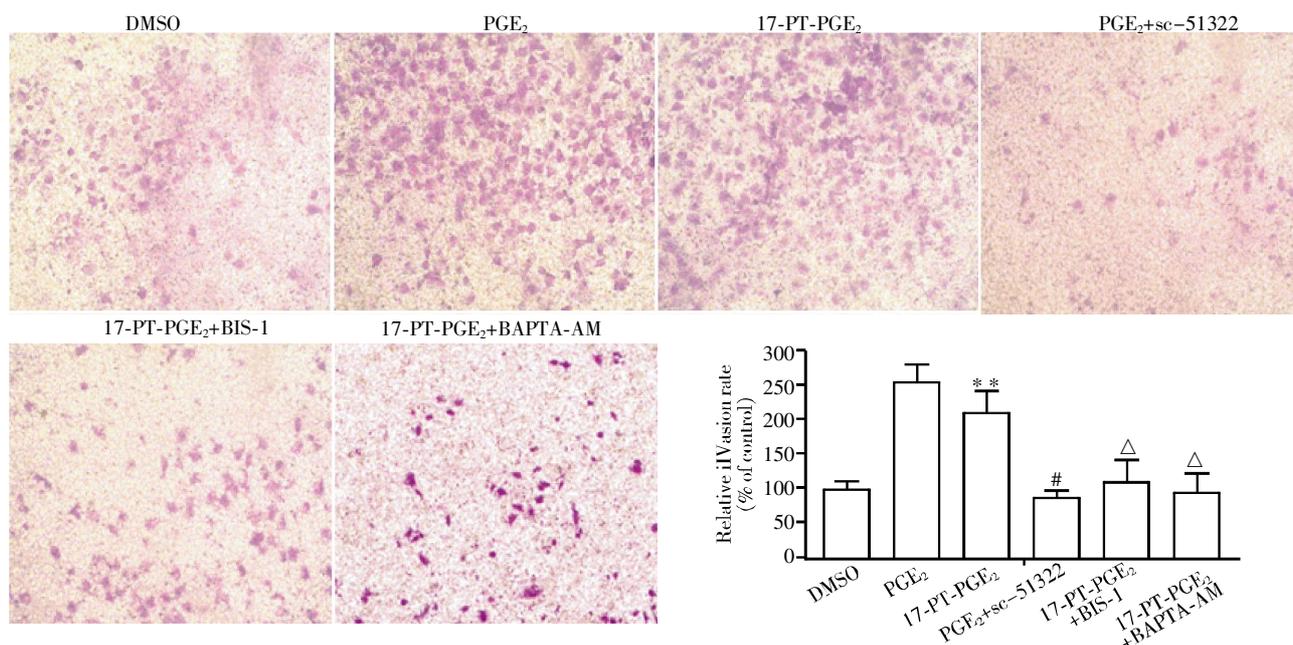
Figure 3 EP1 receptor unregulated CXCR4 protein expression by G $\alpha$ <sub>q</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC signaling pathway

较 17-PT-PGE<sub>2</sub> 组分别减少了 52.63%、55.26% ( $P$  均  $< 0.05$ , 图 4)。

### 3 讨论

卵巢癌是妇科肿瘤领域中具有挑战性的疾病, 由于其起病隐匿, 早期无明显症状, 70% 患者就诊时已为疾病晚期, 且多数患者已发生远处转移, 转移是卵巢癌治疗失败和患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>, 卵巢癌的主要转移途径不是通过血管, 而是腹腔转移, 这种特性除了与其解剖等原因有关外, 主要是由于腹腔液和腹水中存在腹膜间皮细胞产生的趋化因子等发挥了重要作用。

肿瘤细胞可以限定性地表达参与各种免疫反应的趋化因子或趋化因子受体, 提示趋化因子及其受体在恶性肿瘤细胞的侵袭转移中起重要作用<sup>[2]</sup>。趋化因子是一类具有趋化作用的细胞因子, 除参与炎症反应外, 在淋巴细胞归巢、免疫应答、感染、自身免疫性疾病、移植免疫排斥及血管生成等众多生理、病理过程中起着非常重要的作用<sup>[3]</sup>。研究已经发现多种趋化因子及其受体与肿瘤的生长和侵袭转移有关<sup>[4]</sup>, 其中 CXCR4 为主要研究靶点。CXCR4 与其配体 SDF-1 特异性结合形成 SDF-1/CXCR4 轴, 在多种恶性肿瘤的转移中起重要作用<sup>[5]</sup>。在对卵巢癌的研究中发现, 卵巢癌细胞高表达 CXCR4 蛋白,



与 DMSO 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PGE<sub>2</sub> 组相比, # $P < 0.05$ ; 与 17-PT-PGE<sub>2</sub> 组相比,  $\Delta P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 4 EP1 受体信号通路在调控卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭迁移中的作用

Figure 4 Effects of signaling pathway of EP1 receptor on regulation of SKOV3 cell invasion and migration in ovarian cancer

同时卵巢癌腹水中有较高浓度的 SDF-1, 而正常的卵巢上皮中却无 CXCR4 表达, 且 SDF-1/CXCR4 生物轴与卵巢癌的播散和器官特异性转移密切相关<sup>[6-12]</sup>。

近年来研究表明环加氧酶-2(COX-2)及其产物 PGE<sub>2</sub> 与肿瘤细胞的生长和侵袭转移密切相关<sup>[13-15]</sup>。PGE<sub>2</sub> 通过细胞膜表面的受体 EP 受体(EPR)发挥作用, EPR 有 4 种亚型, 分别为 EP1R、EP2R、EP3R 和 EP4R, EP 受体属于 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR), 当 PGE<sub>2</sub> 与 EPR 结合后可以通过与 G 蛋白偶联而传递信息, 从而发挥促进肿瘤细胞增殖、侵袭转移的作用。

由于同一肿瘤细胞存在多种 EPR 亚型, 因此 PGE<sub>2</sub> 通过经 EP 受体传递信号的过程比较复杂。通过无 EP 受体的 HEK293 细胞的 EP 受体转染实验, 人们初步认识了 4 种 EP 受体与 G 蛋白的偶联方式<sup>[16]</sup>: EP1 受体与 G 蛋白的 G $\alpha_q$  亚基偶联, 引起细胞外 Ca<sup>2+</sup>内流进而活化 PKC 通路; EP2 和 EP4 受体与 G 蛋白的 G $\alpha_s$  部分偶联, 活化腺苷酸环化酶(AC)促进 cAMP 生成/激活蛋白激酶 A (PKA); EP4 受体除了通过激活腺苷酸环化酶 AC/促进 cAMP 生成/激活 PKA, 还可通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/激活蛋白激酶 B (PKB 或称 Akt); EP3 受体与 G 蛋白的 G $\alpha_i$  部分偶联, 抑制 AC 的活性。

既往研究已证实 EP1 受体在肿瘤的侵袭转移过程中起着重要作用: PGE<sub>2</sub> 与 EP1 受体结合后激

活 PKC $\delta$ /C-Src/AP-1 通路上调细胞间黏附分子-1(ICAM-1) 蛋白的表达可促进口腔鳞癌细胞转移<sup>[17]</sup>; PGE<sub>2</sub> 通过 EP1 受体上调  $\alpha 2\beta 1$ -integrin 蛋白水平可促进人软组织肉瘤细胞的侵袭转移<sup>[18]</sup>; 而在肝细胞癌细胞中 PGE<sub>2</sub> 可通过 EP1 受体通路激活 PI3K/AKT, 增强癌细胞的侵袭能力<sup>[19]</sup>; 本实验室前期实验亦表明 PGE<sub>2</sub> 可通过 EP1 受体促进肝癌细胞的侵袭转移<sup>[20-21]</sup>。

有研究显示, 在造血干细胞中, PGE<sub>2</sub> 可通过上调 CXCR4 的蛋白表达来增强造血干细胞的骨髓归巢<sup>[22]</sup>; PGE<sub>2</sub> 与 EP2 受体结合可促进骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)中 CXCR4 的表达, 卵巢癌微环境中 SDF-1 对其趋化作用增强, 从而引起 MDSC 在肿瘤微环境中的集聚, 抑制机体的免疫系统功能<sup>[23]</sup>; 骨髓源性的造血细胞是肿瘤基质的重要组成部分, 对肿瘤的微环境和其表型起决定性作用, PGE<sub>2</sub> 通过 EP4 受体上调 CXCR4 表达水平可促肿瘤微环境中血管的形成<sup>[24]</sup>。

PGE<sub>2</sub> 能显著促进肿瘤的侵袭转移, 而 CXCR4 亦在恶性肿瘤的转移中发挥着重要作用, 两者在促进卵巢癌细胞侵袭转移时有何相关性以及调控机制尚未见报道。根据以上研究报道和本课题组的前期工作基础推测: 在卵巢癌细胞 SKOV3 中, PGE<sub>2</sub> 有可能通过诱导 CXCR4 蛋白的高表达, 以致 SDF-1 对 SKOV3 细胞的趋化作用增强, 从而上调 SKOV3

细胞的侵袭能力。

本研究通过 Transwell 实验检测到 PGE<sub>2</sub> 能够显著增强 SKOV3 细胞的侵袭能力,为明确 CXCR4 在此过程中的作用,采用 CXCR4 特异性抑制剂 AMD3465 处理 SKOV3 细胞后,细胞侵袭能力明显下降,说明 PGE<sub>2</sub> 可通过 CXCR4 通路上调 SKOV3 的侵袭水平。既然 PGE<sub>2</sub> 通过激动 EP1 受体在多种恶性肿瘤细胞的侵袭过程中起重要作用,而 CXCR4 与 SKOV3 细胞的侵袭作用又密切相关,同时本实验室前期的实验结果也表明 PGE<sub>2</sub> 可以引起胆管细胞癌细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度增高,并且 EP1 受体抑制剂对该 Ca<sup>2+</sup>浓度升高具有抑制作用<sup>[25]</sup>。由此本文推测在卵巢癌 SKOV3 细胞中 PGE<sub>2</sub> 有可能通过 EP1 受体/Gαq 信号通路上调 CXCR4 的表达。

Real-time PCR 实验以及 Western blot 实验证实:PGE<sub>2</sub>、EP1 受体激动剂均能够显著上调 CXCR4 mRNA 和蛋白水平,但是对 CXCR4 磷酸化水平影响不明显。为了进一步明确 EP1 受体/Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号通路对 CXCR4 蛋白表达水平的影响,给予 SKOV3 细胞钙离子螯合剂和 PKC 抑制剂处理,结果表明 CXCR4 的蛋白表达水平较 EP1 受体激动剂处理组明显下降。通过 Transwell 实验检测到 17-PT-PGE<sub>2</sub> 能够显著增强 SKOV3 细胞的侵袭能力;而 EP1 受体抑制剂、钙离子螯合剂和 PKC 抑制剂处理后,细胞侵袭能力明显下降,由此证实了本文的推测:EP1 受体/Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号通路参与了 PGE<sub>2</sub> 对 SKOV3 细胞 CXCR4 的表达和细胞侵袭能力的调控。

有研究表明在结肠癌细胞,CXCR4 特异性抑制剂可以明显抑制 MMP2 的活性,从而减弱了癌细胞的侵袭能力<sup>[26]</sup>,而本课题组前期实验发现,PGE<sub>2</sub> 能够显著促进胆管细胞癌细胞的侵袭转移,而且此调控作用可能是通过 EP1 受体/Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC 信号通路上调 MMP2 的表达与活性来实现的<sup>[27]</sup>。综上所述本文推测:PGE<sub>2</sub> 与 EP1 受体结合可能通过 Gαq/Ca<sup>2+</sup>/PKC/SDF-1/CXCR4/MMP2 信号通路调控卵巢癌细胞的侵袭转移,这为 PGE<sub>2</sub> 促进肿瘤细胞侵袭的机制研究提供了新的理论依据。

#### [参考文献]

[1] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J, 2004, 54(1):8-29

[2] Bonechi R, Galliera E, Borroni EM, et al. Chemokines and chemokine receptors: an overview[J]. Front Biosci, 2009, 14:540-551

[3] Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers[J]. Cancer Res, 2005, 65(2):465-472

[4] Moser B, Wolf M, Walz A, et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control[J]. Trends Immunol, 2004, 25(2):75-84

[5] Raman D, Baugher PJ, Thu YM, et al. Role of chemokines in tumor growth[J]. Cancer Lett, 2007, 256(2):137-165

[6] Guo L, Cui ZM, Zhang J, et al. Chemokine axes CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 correlate with lymph node metastasis in epithelial ovarian carcinoma[J]. Chin J Cancer, 2011, 30(5):336-343

[7] Barbolina MV, Kim M, Liu Y, et al. Microenvironmental regulation of chemokine(C-X-C-motif) receptor 4 in ovarian carcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(5):653-664

[8] Shen X, Wang S, Wang H, et al. The role of SDF-1/CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(3):363-367

[9] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, et al. Involvement of SDF-1α/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 122(1):91-99

[10] Yuecheng Y, Xiaoyan X. Stromal-cell derived factor-1 regulates epithelial ovarian cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2[J]. Eur J Cancer Prev, 2007, 16(5):430-435

[11] Jiang YP, Wu XH, Xing HY, et al. Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(14):1251-1255

[12] 郭清, 吴小华, 吕英璞, 等. CXCL12-CXCR4 趋化因子轴与卵巢上皮性癌关系的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2014, 93(21):1677-1680

[13] Wu T. Cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(1):28-44

[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

[15] Rizzo MT. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(9-10):671-687

[16] 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

[17] Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, et al. Prostaglandin E2/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285(39):29808-

- 29816
- [18] Liu JF, Fong YC, Chang CS, et al. Cyclooxygenase-2 enhances alpha2beta1 integrin expression and cell migration via EP1 dependent signaling pathway in human chondrosarcoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2010, 23(1):9-43
- [19] Han C, Michalopoulos GK, Wu T. Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(1):261-270
- [20] Bai X, Wang J, Zhang L, et al. Prostaglandin E(2) receptor EP1-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase enhances cell adhesion and migration in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(5):1833-1841
- [21] Zhang H, Cheng S, Zhang M, et al. Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through up-regulation of YB-1 protein expression[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(3):769-780
- [22] Hoggatt J, Mohammad KS, Singh P, et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation[J]. *Blood*, 2009, 113(22):5444-5455
- [23] Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, et al. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24):7463-7470
- [24] Katoh H, Hosono K, Ito Y, et al. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(3):1469-1483
- [25] 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
- [26] Li JK, Yu L, Shen Y, et al. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(15):2308-2313
- [27] 汪亦品, 张丽, 冷静, 等. EP1受体介导PGE2对胆管细胞癌HuCCT1细胞MMP2表达和活性的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2011, 31(7):930-934

[收稿日期] 2014-12-08

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。