

• 论 著 •

前列腺素 E2 诱导前列腺间质细胞肌成纤维细胞表型转化和白细胞介素-8 的表达

田亚琼¹, 张 琚², 彭雁飞³, 刘树业^{1△}

(1. 天津市第三中心医院检验科 300170; 2. 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071; 3. 天津中医药大学中西医结合学院生物化学教研室, 天津 300193)

摘要:目的 探讨前列腺素 E2(PGE2)在前列腺间质活化过程中的作用。方法 体外培养人前列腺间质细胞人正常前列腺基质永生化细胞(WPMY-1),用二甲亚砜(DMSO)和 10^{-9} mol/L 前列腺素 E2(PGE2)处理后进行免疫荧光染色,检测肌成纤维细胞表型的变化。实时定量聚合酶链反应(PCR)检测细胞中炎症因子白细胞介素-8(IL-8)的表达,并测定 IL-8 的浓度。结果 PGE2显著增加 WPMY-1 细胞中 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和波形蛋白共定位的细胞比例。PGE2 促进 WPMY-1 细胞中 IL-8 的表达。结论 PGE2 能增加体外培养的 WPMY-1 肌成纤维细胞表型,促进 IL-8 的表达,在前列腺癌发生、发展中具有重要的作用。

关键词:间质细胞活化; 荧光染色; 成纤维细胞表型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3300-03

Prostaglandin E2 induced myofibroblast phenotype inversion and interleukin 8 expression in prostate stromal cells

TIAN Yaqiong¹, ZHANG Ju², PENG Yanfei³, LIU Shuye^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Municipal Third Central Hospital, Tianjin 300170, China;

2. Key Laboratory of Bioactive Materials of Education Ministry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

3. Teaching and Research Section of Biochemistry, Chinese and Western Medicine Institute,

Tianjin Chinese Medicine University, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of prostaglandin E2(PGE2) in prostate mesenchymal cell activation. **Methods** To culture human prostate stromal cells WPMY-1 in vitro, implement immunofluorescence staining after treating with DMSO and 10^{-9} mol/L PGE2 and detect the change of the myofibroblast phenotype. The expression of cellular inflammatory factor interleukin 8(IL-8) was detected by real-time quantitative PCR and the concentration of IL-8 was detected. **Results** PGE2 significantly increased the cellular proportion of colocalization with alpha SMA and Vimentin in WPMY-1 cells. PGE2 promoted the expression of IL-8 in WPMY-1 cells. **Conclusion** PGE2 can increase myofibroblast phenotype in human prostate mesenchymal cells WPMY-1 in vitro culture, promotes the IL-8 expression, which has an important role in the occurrence and development of prostate cancer.

Key words: mesenchymal cell activation; immunofluorescence staining; myofibroblast phenotype

上皮细胞转变成活化的间质细胞^[1],活化间质在前列腺上皮内瘤(PIN)组织中出现,表现出波形蛋白和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)共定位的肌成纤维细胞表型^[2]。从前列腺癌组织中分离出的活化间质细胞与良性前列腺增生的上皮细胞系 BPH-1 在裸鼠体内重构能够诱导出前列腺癌,而从正常前列腺组织中分离的间质细胞没有这个作用,表明活化的间质细胞能促进前列腺癌发生^[3]。活化的间质细胞能够分泌胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和肝细胞生长因子(HGF)促进癌细胞增殖和侵袭^[4],分泌 CXCL12 促进血管生成和癌细胞迁移^[5],分泌白细胞介素(IL)-6 促进上皮细胞增殖^[6]。

与正常组织相比,前列腺癌和 PIN 组织中环氧合酶-2(COX-2)的表达升高^[7],其产物 PGE2 在前列腺癌组织中的表达显著升高^[8]。PGE2 能够促进 PIN 细胞和癌细胞的增殖以及血管形成^[9-11],也通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路介导癌细胞的迁移和侵袭^[12]。研究发现 PGE2 能够通过诱导前列腺间质细胞旁分泌基质衍生因子-1(SDF-1)从而促进癌细胞的迁移^[13],提示 PGE2 可能诱导间质细胞活化。文献报道,IL-8 能

够促进前列腺间质细胞的活化,增加 α -SMA 和波形蛋白共定位的肌成纤维细胞的表型^[14]。本研究检测了 PGE2 对人正常前列腺基质永生化细胞(WPMY-1)中 IL-8 表达和肌成纤维细胞表型的调节,结果表明,PGE2 能够促进 IL-8 的 mRNA 和蛋白表达,同时发现 PGE2 能够显著增加共表达 α -SMA 和波形蛋白的细胞比例。

1 材料与方法

1.1 材料 人前列腺间质细胞 WPMY-1 购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

1.2 试剂 改良杜氏伊格尔(DMEM)培养液,购于美国 Sigma 公司;5%胎牛血清,购于美国 Invitrogen 公司;PGE2,购于美国 Cayman Chemical 公司; α -SMA 抗体,购于北京博奥森公司;Vimentin,购于武汉博士德公司;荧光二抗 Alexa Fluor[®] 488 驴抗兔 IgG(H+L)及 Alexa Fluor[®] 594 驴抗小鼠 IgG(H+L),购于美国 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录试剂盒,购于美国 Promega 公司;UltraSYBR Mixture,购于北京康为世纪公司;人 IL-8 引物,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;

酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,购于武汉博士德公司。

1.3 实验设备 荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)仪,购于美国 MJ Research 公司;倒置荧光显微镜,购于 Nikon 公司;紫外光可见分光光度计,购于 Pharmacia 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养人前列腺间质细胞 WPMY-1 使用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4.2 免疫荧光染色将体外培养的 WPMY-1 细胞种植在直径为 1.5 cm 的圆玻璃片上,细胞贴壁后,换成含有 1% 活性炭处理血清继续培养 36 h,分别使用 DMSO 和 10⁻⁹ mol/L PGE₂ 处理细胞 96 h。预冷的丙酮固定细胞后使用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,再用含有 10% 胎牛血清的 PBS 封闭。 α -SMA 抗体和 Vimentin 用来孵育细胞玻片,荧光二抗为 Alexa Fluor® 488 驴抗兔 IgG(H+L)及 Alexa Fluor® 594 驴抗小鼠 IgG(H+L)。

1.4.3 实时定量 PCR 检测细胞中 IL-8 的表达将体外培养的 WPMY-1 种植在 6 孔板中,细胞贴壁后,换成含有 1% 活性炭处理血清继续培养 36 h,分别使用二甲基亚砜(DMSO)和 10⁻⁹ mol/L PGE₂ 处理细胞 24 h。Trizol 法提取细胞总 RNA,对 RNA 进行反转录,进行实时定量聚合酶链反应(PCR)检测。人 IL-8 引物上游序列:5'-CTC TGG CAG CCT TCC TGA TT-3';下游序列:5'-TAT GCA CTG ACA TCT AAG TTC TTT AGC-3'。

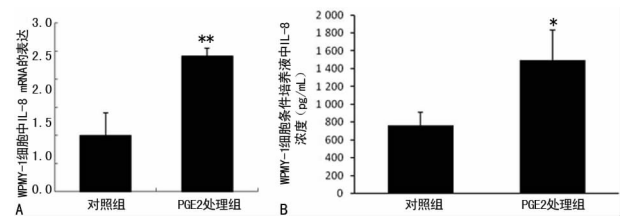
1.4.4 条件培养液中 IL-8 浓度的测定将体外培养的 WPMY-1 种植在 6 孔板中,细胞贴壁后,换成含有 1% 活性炭处理血清继续培养 36 h,分别使用 DMSO 和 10⁻⁹ mol/L PGE₂ 处理细胞 48 h。收集各孔细胞的条件培养液,并对每孔细胞进行计数。检测条件培养液中 IL-8 的浓度,并根据细胞数计算同等细胞数 IL-8 分泌的差别。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGE₂ 增加体外培养的 WPMY-1 肌成纤维细胞表型 体外培养的 WPMY-1,分别种植在 6 张圆玻璃片上,1% 活性炭血清处理 36 h 后,分别用 DMSO 和 10⁻⁹ mol/L PGE₂ 处理 WPMY-196 h,通过 α -SMA(绿色荧光)和 Vimentin(红色荧光)的表达检测细胞表型的变化,该实验重复 3 次,每张圆片随机选取 5 个视野,使用荧光显微镜进行拍照分析。结果表明,PGE₂ 显著增加 WPMY-1 中 α -SMA 和 Vimentin 共定位的细胞比例。

2.2 PGE₂ 促进 WPMY-1 细胞中 IL-8 的表达 将体外培养的 WPMY-1 细胞分别种植在两个 6 孔板中,1% 活性炭血清培养 36 h 后,每板中 3 个孔作为对照组,3 个孔用 10⁻⁹ mol/L PGE₂ 处理,24 h 后提取总 RNA,在 48 h 后收集两组细胞的条件培养液并细胞计数。通过实时定量 PCR 检测两组细胞中 IL-8 mRNA 相对持家基因 HpRT 的表达量,用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法进行计算,结果表明 PGE₂ 能够上调 WPMY-1 细胞中 IL-8 的表达。同时,ELISA 分析显示 PGE₂ 处理的 WPMY-1 细胞的条件培养液中 IL-8 蛋白的浓度显著高于 DMSO 处理组。见图 1。



注: A 为 PGE₂ 处理 WPMY-1 细胞 24 h 后; B 为 PGE₂ 处理 WPMY-1 细胞 48 h 后。与对照组比较, * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01。

图 1 WPMY-1 细胞中 IL-8 mRNA 的表达和 IL-8 蛋白的浓度

3 讨论

肿瘤微环境是近十年来发展最快的研究领域之一,越来越多的证据表明前列腺癌的发展很大程度上依赖于其所处的微环境。前列腺间质细胞在前列腺癌发生、发展的过程中转变为类似于损伤修复过程中出现的肌成纤维细胞表型,因此也有学者将癌症称为永不愈合的损伤。癌间质中的肌成纤维细胞也被称为癌相关成纤维细胞(CAF),通过旁分泌细胞因子和炎症因子构建适合癌细胞生长和有利于免疫逃逸的微环境,因此可作为癌症治疗中的有效靶标。活化间质细胞的确切来源目前还不是十分清楚,其主要来源被认为是由病灶周围正常的成纤维细胞通过间质-间质转化(MMT)转变为具有肌成纤维细胞表型的活化间质细胞^[15]。间质细胞活化的机制还不完全清楚,文献表明转化生长因子 β (TGF- β)、IL-6 和 IL-8 是介导前列腺间质细胞活化的关键因子^[14,16-17]。

PGE₂ 是 COX-2 催化花生四烯酸产生的一种重要物质,能够通过与细胞膜受体的结合激活下游信号通路,引起细胞生理改变,COX-2/PGE₂ 信号通路在介导炎症反应和癌症进程中起到关键作用。然而,COX-2/PGE₂ 信号通路与 CAF 的关系仍不清楚,研究表明,PGE₂ 能够诱导体外培养的前列腺间质细胞 WPMY-1 中 IL-8 的表达,并且能够诱导 WPMY-1 细胞转变为肌成纤维细胞。这一结果表明,前列腺癌中高表达的 COX-2,可以通过局部 PGE₂ 浓度的升高诱导前列腺间质细胞的活化,并且 IL-8 可能参与介导了这一过程。

参考文献

- [1] Khan MI, Hamid A, Adhami VM, et al. Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis [J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(10): 1240-1248.
- [2] Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2912-2923.
- [3] Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium [J]. Cancer Res, 1999, 59(19): 5002-5011.
- [4] Franco OE, Shaw AK, Strand DW, et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis [J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(1): 33-39.
- [5] Wang J, Wang J, Sun Y, et al. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate

- cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis[J]. *Cell Signal*, 2005, 17(12): 1578-1592.
- [6] Paland N, Kamer I, Kogan-Sakin I, et al. Differential influence of normal and cancer-associated fibroblasts on the growth of human epithelial cells in an in vitro cocultivation model of prostate cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(8): 1212-1223.
 - [7] Denkert C, Thoma A, Niesporek S, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia-association with increased expression of Polo-like kinase-1 [J]. *Prostate*, 2007, 67(4): 361-369.
 - [8] Mohammed SI, Coffman K, Glickman NW, et al. Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2001, 64(1): 1-4.
 - [9] Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, et al. Prostaglandin E (2) stimulates prostatic intraepithelial neoplasia cell growth through activation of the interleukin-6/GP130/STAT-3 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(1): 249-255.
 - [10] Ruan D, So SP. Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo[J]. *Life Sci*, 2014, 116(1): 43-50.
 - [11] Jain S, Chakraborty G, Raja R, et al. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7750-7759.
 - [12] Vo BT, Morton D, Komaragiri S, et al. TGF- β effects on prostate cancer cell migration and invasion are mediated by PGE2 through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(5): 1768-1779.
 - [13] Peng Y, Shi J, Du X, et al. Prostaglandin E2 induces stromal cell derived factor-1 expression in prostate stromal cells by activating protein kinase A and transcription factor Sp1[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(3): 521-30.
 - [14] Schauer IG, Ressler SJ, Tuxhorn JA, et al. Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia [J]. *Urology*, 2008, 72(1): 205-213.
 - [15] Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, et al. Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive Oxygen species[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(13): 2727-2738.
 - [16] Sampson N, Koziel R, Zenzmaier C, et al. ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma[J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(3): 503-515.
 - [17] Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6945-6956.

(收稿日期: 2016-04-28 修回日期: 2016-07-12)

(上接第 3299 页)

PG 与 CA199 和 CA50 有关, 与相关的研究报道相一致^[10]。由于肿瘤标志物存在灵敏度和特异性的局限性, 在健康体检人群中将 Hp、PG 和肿瘤标志物等联合检测, 可以作为健康体检人群中筛查良、恶性胃病的方法之一, 对于预防和干预良、恶性胃病的发生、发展有较为重要的价值。

参考文献

- [1] Ferreccio C, Rollan A, Harris PR, et al. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence count[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(4): 662-667.
- [2] Di MF, Cavallaro LG, Moussa AM, et al. Usefulness of serum pepsinogens in *Helicobacter Pylori* Chronic gastritis: relationship with inflammation, activity, and density of the bacterium[J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(10): 1791-1795.
- [3] Freddy Sitas. Twenty five years since the first prospective study by Forman et al. (1991) on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol*, 2016, 41(2): 159-164.
- [4] 黄荣根, 宋晓华, 王春敏, 等. 健康体检人群幽门螺杆菌感染程度与血清胃蛋白酶原水平的关系[J]. *标记免疫分析与临床*, 2013, 20(4): 203-204.
- [5] 吴伟晴, 廖淑萍, 孙岩, 等. 胃蛋白酶原在体检胃病及胃癌筛查中的应用[J]. *医药前沿*, 2015, 5(22): 237-239.
- [6] 张玲霞, 张沂. 胃蛋白酶原与 Hp 相关性胃疾病的关系[J]. *陕西医学杂志*, 2008, 37(12): 1680-1682.
- [7] 何思春, 庞红全, 焦鑫, 等. 胃癌患者血清 CA724, CA199, CEA 检测的临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(19): 2058-2059.
- [8] Bian J, Li B, Kou XJ, et al. Clinical applicability of multi-tumor marker protein chips for diagnosing ovarian cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(19): 8409-8011.
- [9] 张金锋. 血清胃蛋白酶原、CEA、CA19-9 及 CA72-4 检测对胃癌的诊断价值探讨[J]. *检验医学*, 2014, 29(8): 831-833.
- [10] 杜娟, 杨磊, 席妍, 等. 血清胃蛋白酶原及肿瘤标志物联合检测在老年胃癌诊断中的意义[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(32): 96-98.

(收稿日期: 2016-03-12 修回日期: 2016-05-30)