

◇ 基础医学研究 ◇

## PGE2 对 LPS 诱导小鼠骨髓源性树突细胞成熟及 EP4 受体表达影响

盛康亮\* 李影\* 付静静 陈镜宇 张玲玲 魏伟

**摘要** 目的 观察不同浓度前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 刺激对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠骨髓源性树突细胞 (DCs) 成熟及 EP4 受体表达的影响。方法 采用重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素 4 (rmIL-4) 刺激小鼠骨髓源细胞,诱导生成 DCs;经 LPS(100 ng/ml) 诱导成熟后,用不同浓度 PGE<sub>2</sub>(0.625、1.25、2.5、5、10、20 nmol/L) 刺激 DCs 24 h,流式细胞术检测 DCs 表型 CD40、CD83、MHC-II 的表达和抗原摄取功能,荧光间标法检测小鼠骨髓源 DCs 细胞膜上 EP4 的表达,以平均荧光强度表示表达的高低;MTT 法检测经 PGE<sub>2</sub> 及 LPS 诱导成熟的 DCs 对 T 细胞增殖的作用。结果 流式细胞术结果显示 PGE<sub>2</sub> (2.5、5、10 nmol/L) 能明显上调 CD40、CD83、MHC-II 的表达;PGE<sub>2</sub> (1.25、2.5、5、10、20 nmol/L) 能明显抑制 DCs 的抗原摄取功能;MTT 法检测结果显示 PGE<sub>2</sub> (2.5、5、10 nmol/L) 刺激 DCs 能促进 T 细胞增殖的作用;荧光间标法检测结果显示 PGE<sub>2</sub> (2.5、5、10 nmol/L) 明显升高 DCs 细胞膜上 EP4 表达。结论 PGE<sub>2</sub> 可以调节 DCs 功能,该作用可能与其调节 EP4 受体表达相关。

**关键词** EP4 受体;树突细胞;PGE<sub>2</sub>

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0879-06

前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 是花生四烯酸类物质的重要代谢产物,具有较强的免疫活性,可以调节免疫细胞的发育、功能以及存活<sup>[1]</sup>。前列腺素 E<sub>2</sub> 受体 (E-prostanoid receptors, EPs) 分为 4 个亚型,即 EP1、EP2、EP3 和 EP4。EP2 和 EP4 受

体通过偶联 G<sub>s</sub> 蛋白,激活腺苷酸环化酶,从而增加细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的水平<sup>[2]</sup>。PGE<sub>2</sub> 与其不同 EP 受体结合,促进了白细胞介素 (interleukin) 6 和组胺的释放,影响血管的通透性,导致炎症的发生<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup> 显示多数免疫细胞均表达 EP 受体。但研究<sup>[5]</sup> 多集中在巨噬细胞、T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞。树突细胞 (dendritic cells, DCs) 作为目前发现的功能最强大的专职抗原呈递细胞,在参与免疫反应中起重要作用<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup> 报道,体外培养 DCs 能产生花生四烯酸产物,特别是 PGE<sub>2</sub>。另有报道<sup>[8]</sup> PGE<sub>2</sub> 主要通过 EP4 调节 DCs 的功能。但不同浓度 PGE<sub>2</sub> 对 DCs 成熟有怎样的调节作用,其对 DCs 成熟的调节是否通过影响 EP4 受体的表达来发挥作用,目前未见相关研究。该研究观察不同浓度 PGE<sub>2</sub> 对 DCs 功能的影响以及与 EP4 表达的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级健康 C57BL/6 小鼠,雄性,体质量 (20 ± 2) g,7~8 周龄,购自安徽医科大学实验动物中心,标准化清洁环境中饲养。

**1.2 主要试剂** 重组小鼠白细胞介素 4 (recombinant IL-4, rmIL-4)、重组小鼠粒-巨噬细胞集落刺激因子 (rm granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)、FITC 标记的羊抗兔二抗购自美国 Peprotech 公司;RPMI-1640 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;红细胞裂解液购自上海碧云天生物技术研究所;PE 标记的 CD40、CD80、CD83、MHC-II 及同型对照 IgG 购自美国 Biolegend 公司;EP4 受体-抗购自美国 Santa 公司;脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、FITC-Dextran (40 ku) 购自美国 Sigma 公司。

**1.3 DCs 的分离与培养** 小鼠脱臼处死后,在超净台无菌条件下分离小鼠后肢股骨和胫骨,75% 酒精浸泡 3 min,用 5 ml 注射器用 PBS 反复洗 2 次;去除骨两端,用 5 ml 注射器抽取灭菌后的 PBS 液反复冲洗出骨髓直至骨髓腔变白;用 200 目纱网过滤冲洗出的骨髓悬液,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清

2015-03-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81330081,31100640,81173075,81473223);中国博士后科学基金第 54 批面上资助(编号:2013M540509)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:盛康亮,男,硕士研究生;

张玲玲,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: llzhang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

\* 对本文具有同等贡献

液 根据骨髓细胞数量 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞数量调整到  $5 \times 10^9$  /L; 铺在 6 孔培养板中, 每孔 2 ml, 置 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱培养 3 h, 使得细胞贴壁 3 h 更换新鲜培养基, 并加入 rmGM-CSF(终浓度 20 μg/L) 和 rmIL-4(终浓度 20 μg/L); 于第 3、5 天, 隔日半量换液, 弃去半量上清液, 重新加入含 10% 胎牛血清和 rmGM-CSF(20 μg/L)、rmIL-4(20 μg/L) 的 RPMI-1640 培养基。培养至第 6 天, 吹打、收集粘附的细胞, 采用流式细胞仪检测相关指标<sup>[4]</sup>。

#### 1.4 DCs 的鉴定

**1.4.1 形态学及 DCs 细胞表型的鉴定** 细胞培养至第 3、5、7 天, 分别镜下观察细胞是否具有成簇生长、突起、毛刺等树突细胞特征。收集培养至第 7 天的细胞, 轻轻吹打, 收集粘附的细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, PBS 重悬, 调整细胞数量  $5 \times 10^6$  /ml, 加入流式管中, 每管 100 μl。分别加入 FITC 标记的 CD11c(小鼠 DCs 特异性表面标记物) 抗体及同型对照抗体, 4 °C 孵育 30 min 后, 再加入 300 μl PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测。检测 CD11c 细胞比例, 鉴定 DCs 并确定相关培养条件。

**1.4.2 对 DCs 的干预** 培养至第 6 天 根据实验需要, 设空白对照组、阳性对照组 LPS(100 ng/ml)、处理组 PGE<sub>2</sub>(0.625、1.25、2.5、5、10、20 nmol/L) + LPS(100 ng/ml) 24 h 后收集 DCs 检测相关指标。

#### 1.5 DCs 的表型及功能检测

**1.5.1 骨髓源 DCs 表型和 EP4 表达的检测** 细胞培养至第 7 天, 轻轻吹打、收集粘附的细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, PBS 重悬, 调整细胞数量  $5 \times 10^6$  /ml, 每管 100 μl。DCs 表型检测每管细胞分别加入 PE 标记的 CD40、CD80、CD83、MHC-II 及同型对照 IgG, EP4 表达的检测每管细胞加入兔源性抗 EP4 受体一抗(1:100), 孵育, PBS 洗涤, 加 FITC 标记的羊抗兔二抗(1:250) 避光孵育, 用仅加入 FITC 标记的羊抗兔二抗孵育的 DCs 作为同型对照。4 °C 避光孵育 30 min 后, 加入 300 μl PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测。去除非特异性染色后, 比较平均荧光强度的变化。流式细胞仪检测, 以 X 轴平均荧光强度的变化表示 DCs 表型的表达。

**1.5.2 DCs 摄取功能的检测** 细胞培养至第 7 天, 轻轻吹打、收集粘附的细胞, 2 000 r/min, 离心 10 min, PBS 重悬, 调整细胞数量  $5 \times 10^6$  /ml, 培养于 1.5 ml EP 管中, 每管 100 μl, 加入 PBS 稀释的 FITC-Dextran(终浓度为 1 mg/ml), 置于 37 °C 温育

2 h 后取出, PBS 洗涤重悬于 400 μl PBS 中, 流式细胞仪检测。其他条件相同 4 °C 孵育作为对照。以 X 轴平均荧光强度的变化表示 DCs 的吞噬能力。

**1.5.3 混合淋巴细胞反应** 超净台内无菌条件下取小鼠脾脏, 制成单细胞悬液, 用红细胞裂解液处理, 除去红细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 采用尼龙毛柱法, 去除细胞悬液中的 B 淋巴细胞, 用 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  /ml, 作为反应细胞。分别以培养至第 7 天的各处理组 DCs 为刺激细胞, 以 25 μg/ml 的丝裂霉素 C 加入刺激细胞中, 将其置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min 灭活。将刺激细胞和反应细胞按不同比例混合, 加入 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48 h。MTT 法分析 DCs 对 T 淋巴细胞的增殖能力的影响。预实验结果显示, 刺激细胞和反应细胞(1:10) 比例混合具有刺激 T 淋巴细胞增殖的能力。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较用方差分析。

## 2 结果

**2.1 DCs 的培养与鉴定** 小鼠骨髓细胞经 rmGM-CSF 和 rmIL-4 刺激, 培养 3 d 后, 细胞成簇生长。第 5 天, 多数细胞呈悬浮状, 可见突起, 呈毛刺状。收集培养至第 7 天的细胞, 用于后续实验。

#### 2.2 PGE<sub>2</sub> 对 DCs 表型及功能的影响

**2.2.1 PGE<sub>2</sub> 对 DCs 表面分子 CD40、CD83、MHC-II 表达的影响** 与 LPS(100 ng/ml) 组比较, PGE<sub>2</sub>(2.5、5、10 nmol/L) 组能明显上调 CD40、MHC-II 的表达( $P < 0.01$ ); PGE<sub>2</sub>(2.5、5 nmol/L) 组能明显上调 CD83 的表达( $P < 0.01$ ); PGE<sub>2</sub>(0.625、20 nmol/L) 对 CD40、CD83、MHC-II 的表达均无明显影响, 所有剂量组对 CD80 均无明显影响, 见图 1。

**2.2.2 PGE<sub>2</sub> 对 DCs 抗原摄取能力的影响** 与 LPS(100 ng/ml) 组比较, PGE<sub>2</sub>(1.25、2.5、5、10、20 nmol/L) 刺激组 DCs 的抗原摄取能力明显降低( $P < 0.01$ ), PGE<sub>2</sub>(0.625 nmol/L) 刺激组 DCs 的抗原摄取能力无变化, 见图 2。

**2.2.3 PGE<sub>2</sub> 处理的 DCs 对 T 细胞增殖的影响** 与 LPS(100 ng/ml) 组比较, PGE<sub>2</sub>(2.5、5、10 nmol/L) 处理的 DCs 能明显增强 T 细胞增殖( $P < 0.01$ ), PGE<sub>2</sub>(0.625、1.25、20 nmol/L) 处理的 DCs 对 T 细胞增殖无增强作用, 见图 3。

**2.2.4 PGE<sub>2</sub> 对小鼠 DCs 表面 EP4 表达的影响**

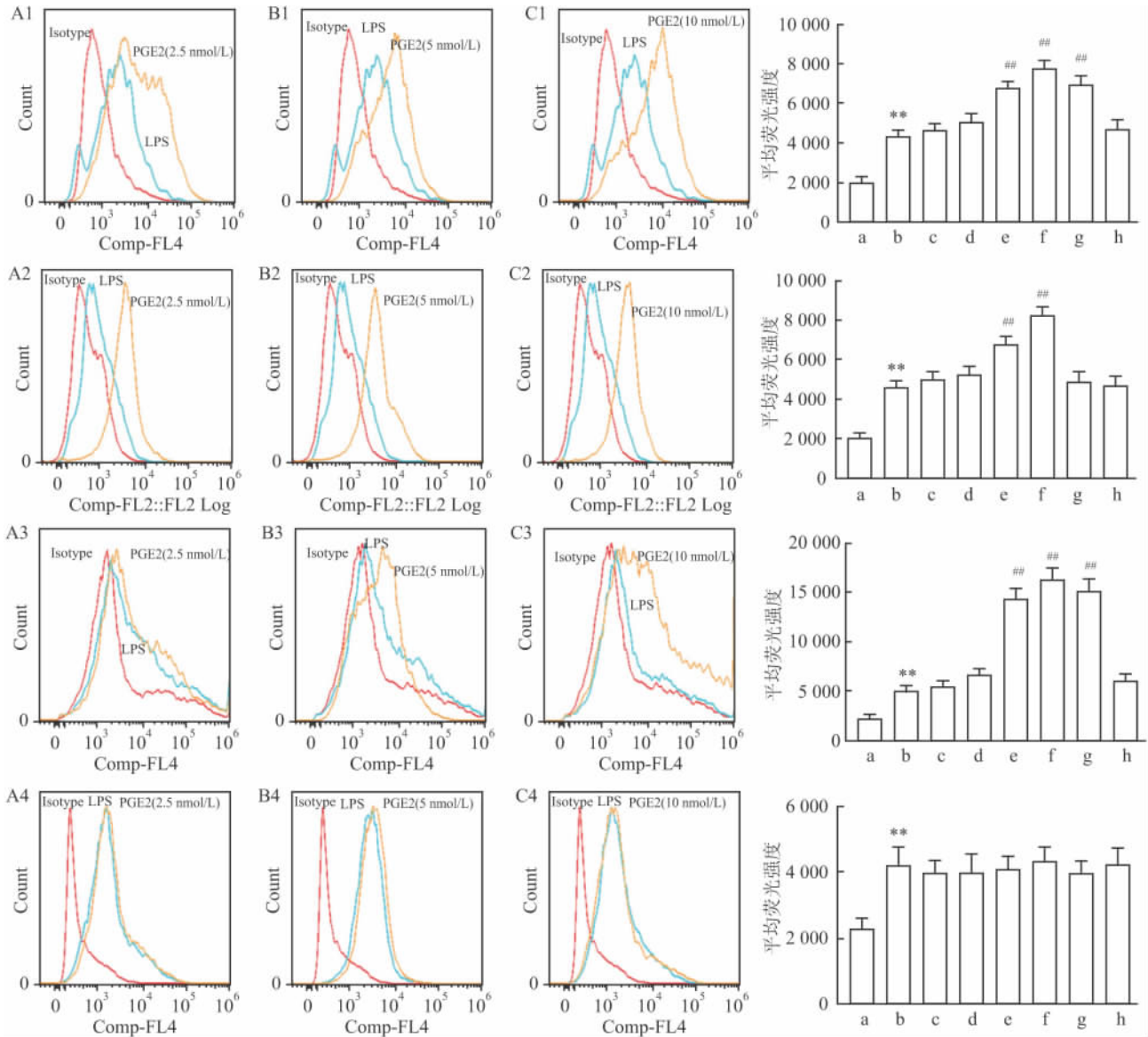


图1 流式细胞术检测 PGE2 对 mDCs 上 CD40、CD83、MHC II、CD 80 表达的影响

A: PGE2 (2.5 nmol/L); B: PGE2 (5 nmol/L); C: PGE2 (10 nmol/L); 1: CD40; 2: CD83; 3: MHC II; 4: CD80; a: 空白对照组; b: LPS (100 ng/ml) 组; c: PGE2 (0.625 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; d: PGE2 (1.25 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; e: PGE2 (2.5 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; f: PGE2 (5 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; g: PGE2 (10 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; h: PGE2 (20 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS (100 ng/ml) 组比较: ##  $P < 0.01$

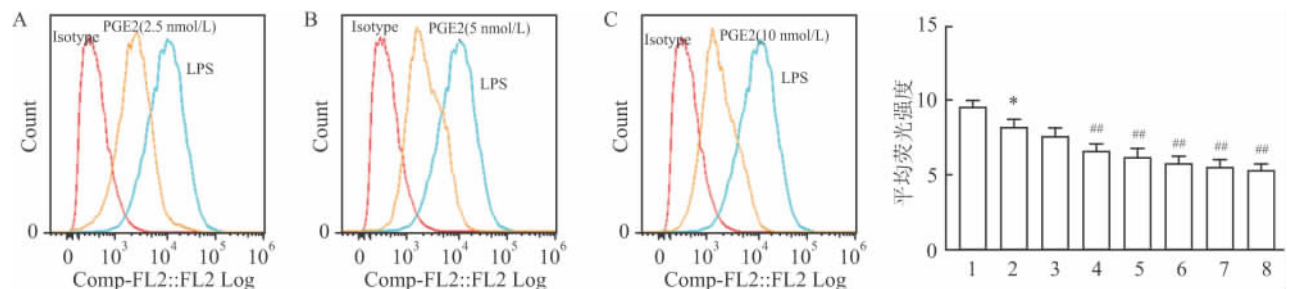


图2 流式细胞术检测 PGE2 对 DC 摄取能力的影响

A: PGE2 (2.5 nmol/L); B: PGE2 (5 nmol/L); C: PGE2 (10 nmol/L); 1: 空白对照组; 2: LPS (100 ng/ml) 组; 3: PGE2 (0.625 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 4: PGE2 (1.25 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 5: PGE2 (2.5 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 6: PGE2 (5 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 7: PGE2 (10 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 8: PGE2 (20 nmol/L) + LPS (100 ng/ml) 组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS (100 ng/ml) 组比较: ##  $P < 0.01$

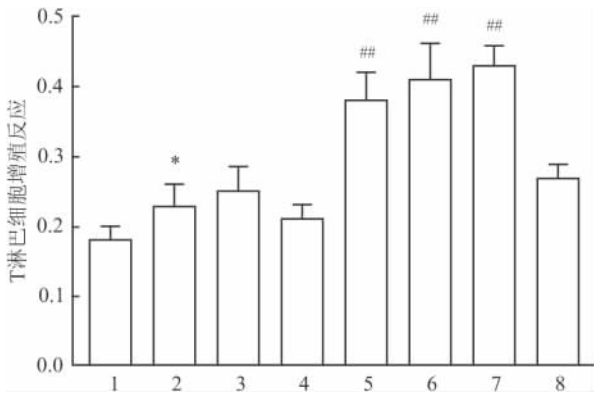


图3 PGE2 刺激的 DC 对 T 淋巴细胞增殖反应的影响

1: T 淋巴细胞组; 2: LPS( 100 ng/ml) 组; 3: PGE2( 0. 625 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 4: PGE2( 1. 25 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 5: PGE2( 2. 5 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 6: PGE2( 5 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 7: PGE2( 10 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 8: PGE2( 20 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 与 T 淋巴细胞组比较: \* P < 0. 05; 与 LPS( 100 ng/ml) 组比较: ## P < 0. 01

与 LPS( 100 ng/ml) 组比较 刺激组 DCs 经较高浓度 PGE2( 2. 5、5、10 nmol/L) 刺激后 FITC 平均荧光强度均显著增强 ( P < 0. 01) ,提示 PGE2 刺激后 EP4 胞膜表达明显上升。但 PGE2 ( 0. 625、1. 25、20 nmol/L) 刺激后 ,FITC 平均荧光强度无明显变化 , EP4 胞膜表达无明显变化 ,见图 4。

### 3 讨论

PGE2 调节多种免疫和炎症性过程 ,如细胞因子的产生 抗体的形成 ,吞噬和细胞增殖。PGE2 有促炎和抗炎双重作用。有报道<sup>[9]</sup> PGE2 通过抑制 T 细胞增殖和 IL-2 受体的表达 ,降低 IL-2 的释放 ,发挥抗炎和免疫抑制作用 ,进而抑制了干扰素-γ 的分泌 ,因此 PGE2 抑制辅助性 T 细胞 1 功能;但 Yao et

al<sup>[10]</sup> 报道 PGE2 通过 EP4 受体作用于 T 淋巴细胞 ,促进辅助性 T 细胞 1 的分化和辅助性 T 细胞 17 的扩增。PGE2 在不同的微环境下表现出对 DCs 功能截然不同的作用。在外周组织中 PGE2 对 DCs 有促进作用 ,诱导其成熟和转移。一旦 DCs 转移到淋巴器官 ,PGE2 呈现抑制 DCs 功能 ,抑制其成熟及抗原的呈递功能。此外 ,PGE2 在不同的促炎因子及免疫细胞作用下也表现出对 DCs 功能截然不同的作用。PGE2 降低 IL-12 并通过抑制 MHC II 分子的表达调节抗原呈递。PGE2 可以加强 DCs 的分化并影响辅助性 T 细胞的能力。PGE2 联合促炎因子如 IL-1 肿瘤坏死因子-α ,IL-6 等促进 DCs 的成熟<sup>[11]</sup>。

本研究显示不同剂量的 PGE2 对 DCs 的功能有不同的作用 ,PGE2 ( 2. 5、5、10 nmol/L) 能促进 DCs 的成熟 ,而 PGE2 ( 0. 625、1. 25、20 nmol/L) 对 DCs 成熟没有明显作用。这种不同浓度的 PGE2 对 DCs 功能影响的不同 ,可能由于其通过不同 EP 受体诱导不同的细胞内信号途径产生的。实验显示 ,PGE2 ( 2. 5、5、10 nmol/L) 刺激后 EP4 胞膜表达上升 ,促进 DCs 成熟 ,而 PGE2 ( 0. 625、1. 25、20 nmol/L) 刺激后 ,EP4 胞膜表达下降 ,对 DCs 成熟无作用。研究<sup>[10]</sup> 报道 EP4 激动剂( ONO-AE1-329) 增强 DCs 表面 CD83 的表达 ,促进 DCs 成熟 ,而 EP1 和 EP3 无明显作用。PGE2 作用于 DCs 可以增强其表面分子 CD83 的表达 ,与 EP4 受体激动剂( ONO-AE1-329) 呈现相似的表现。PGE2 促进 DCs 成熟的作用是通过 EP4 受体调节这一现象 ,可以用选择性 EP4 受体拮抗剂( ONO-AE3-208) 作用于经过 PGE2 刺激后的 DCs 证实。用 cAMP 类似物模拟 PGE2 的作用 ,表明 PGE2 促进 DCs 成熟的作用是通过 cAMP 调节的<sup>[12]</sup>。不仅 EP4 在 DCs 的成熟中发挥作用 ,还参

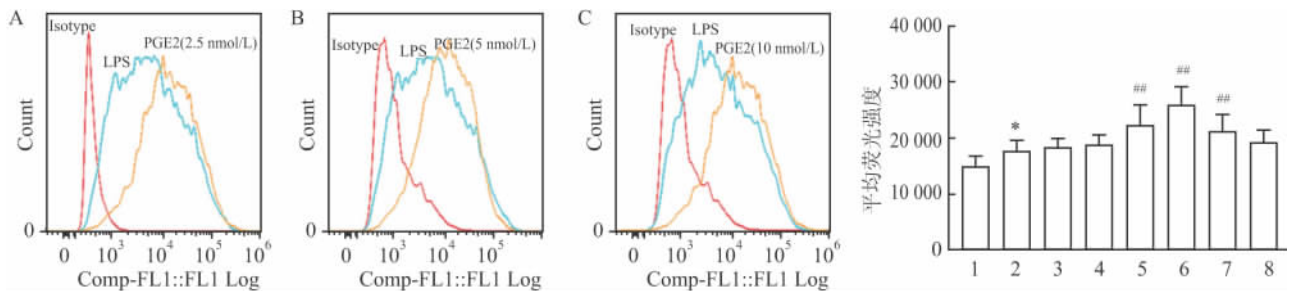


图4 流式细胞术检测 PGE2 对 DCs 表面 EP4 受体表达的影响

A: PGE2( 2. 5 nmol/L) ; B: PGE2( 5 nmol/L) ; C: PGE2( 10 nmol/L) ; 1: 空白对照组; 2: LPS( 100 ng/ml) 组; 3: PGE2( 0. 625 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 4: PGE2( 1. 25 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 5: PGE2( 2. 5 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 6: PGE2( 5 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 7: PGE2( 10 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 8: PGE2( 20 nmol/L) + LPS( 100 ng/ml) 组; 与空白对照组比较: \* P < 0. 05; 与 LPS( 100 ng/ml) 组比较: ## P < 0. 01

与了 T 淋巴细胞功能的调节, T 淋巴细胞在缺乏 EP1 和 EP3 的情况下一样对 PGE2 敏感, 而在缺乏 EP4 表达的情况下抵抗 PGE2 的作用<sup>[13]</sup>。PGE2 通过 EP4 影响下游 Gas 蛋白的表达和 cAMP 水平, 进而发挥促进 DCs 功能的作用<sup>[14]</sup>。根据这些研究推测, 不同浓度 PGE2 对 LPS 诱导小鼠骨髓源性 DCs 成熟的差异与其调节 EP4 受体的表达的高低有关。

### 参考文献

- [1] Hayashi A, Hirokawa Y S, Kagaya M, et al. Inflammatory suppressive effect of prostate cancer cells with prolonged exposure to transforming growth factor on macrophage-differentiated cells *via* downregulation of prostaglandin E2 [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1513–8.
- [2] Eskildsen M P, Hansen P B, Stubbe J, et al. Prostaglandin I2 and prostaglandin E2 modulate human intrarenal artery contractility through prostaglandin E2-EP4, prostacyclin-IP, and thromboxane A2-TP receptors [J]. *Hypertension*, 2014, 64(3): 551–6.
- [3] Hao S, Hernandez A, Quiroz-Munoz M, et al. PGE(2) EP(3) receptor down-regulates COX-2 expression in the medullary thick ascending limb induced by hypertonic NaCl [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(6): 736–46.
- [4] Fu J, Liang J, Kang H, et al. The stimulatory effect of different CpG oligonucleotides on the maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Poult Sci*, 2014, 93(1): 63–9.
- [5] Haque S, Yan X J, Rosen L, et al. Effects of prostaglandin E2 on p53 mRNA transcription and p53 mutagenesis during T-cell-independent human B-cell clonal expansion [J]. *FASEB J*, 2014, 28(2): 627–43.
- [6] Jia X Y, Chang Y, Sun X J, et al. The role of prostaglandin E2 receptor signaling of dendritic cells in rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 163–9.
- [7] Harizi H, Gualde N. Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002, 66(5–6): 459–66.
- [8] Poloso N J, Urquhart P, Nicolaou A, et al. PGE2 differentially regulates monocyte-derived dendritic cell cytokine responses depending on receptor usage (EP2/EP4) [J]. *Mol Immunol*, 2013, 54(3–4): 284–95.
- [9] Saha A, Biswas A, Srivastav S, et al. Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis [J]. *J Immunol*, 2014, 193(5): 2330–9.
- [10] Yao C, Sakata D, Esaki Y, et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion [J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 633–40.
- [11] Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting M D, et al. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3): 269–83.
- [12] Hedi H, Christophe G, Norbert G. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function *via* EP2 and EP4 receptor subtypes [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(6): 756–63.
- [13] Mašlanka T, Spodniewska A, Barski D, et al. Prostaglandin E2 down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 160(3–4): 192–200.
- [14] Xia S, Ma J, Bai X, et al. Prostaglandin E2 promotes the cell growth and invasive ability of hepatocellular carcinoma cells by up-regulating c-Myc expression *via* EP4 receptor and the PKA signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4): 1521–30.

## The effect of prostaglandin E2 on maturation and EP4 expression on dendritic cell induced by LPS

Sheng Kangliang, Li Ying, Fu Jingjing, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University; Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education; Co-Innovation Center for Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the effects of PGE2 in the different concentrations on the maturation of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) of mouse stimulated by LPS and EP4 expression. **Methods** The bone marrow-derived DCs were induced in the presence of recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor (rmGM-CSF) and rmIL-4. Matured DCs were induced by LPS (100 ng/ml), and then were treated with PGE2 in different concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 nmol/L) for 24 h. The ability of antigen uptake and the expressions of CD40, CD83 and MHC-II on DCs surface were analyzed by flow cytometry; EP4R expression was also measured by flow cytometry. T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction was analyzed by MTT assay. **Results** PGE2 (2.5, 5, 10 nmol/L) significantly enhanced the expression of CD40, CD83, MHC class II molec-

# 自噬抑制剂在内质网应激状态下 对肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02 作用的差异

李文成, 刘加涛, 高爽, 于瀚卿, 吴圣, 范璐璐, 孙国平

**摘要** 目的 研究自噬在内质网应激(ERS)状态下对肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02 作用的差异。方法 体外常规培养的人肝癌 HepG2 细胞和正常肝细胞 L-02, 分别给予衣霉素(TM) 单药和 TM 联合自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(TM + 3-MA) 或氯喹(TM + CQ) 作用 12、24、48 h 后, 采用噻唑蓝(MTT) 法检测细胞活力变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测自噬蛋白 LC3 的变化。结果 TM 可引起 HepG2 细胞和 L-02 细胞死亡并呈时间依赖关系, 3-MA 或 CQ 均可增加 TM 对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 24 h 细胞存活率分别为 TM + 3-MA 组(60%)、TM + CQ 组(72%)、TM 组(86%), 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 但对于 L-02 细胞, 其存活率分别为 83%、84%、83%, 活力没有明显差异; 流式细胞术显示 TM + 3-MA、TM + CQ 和 TM 组对 HepG2 细胞的凋亡率分别为 15%、11%、7%, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 但对 L-02 细胞, 凋亡率分别为 16%、17%、16%, 未见明显差异; Western blot 法结果显示 TM 作用引起两种细胞自噬增加, 自噬抑制剂 3-MA 与 CQ 可引起两种细胞自噬作用减弱。结论 自噬抑制剂(3-MA 或 CQ) 均可显著增加 TM 对肝癌 HepG2 细胞的生长抑制作用, 但对正常肝细胞 L-02 的生长抑制作用差异无统计学意义。自噬在 ERS 状态下可对肝癌细胞的生存提供保护, 但对正常肝细胞无保护作用。

**关键词** 自噬抑制剂; 内质网应激; 肝癌; 肝正常细胞

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0884-05

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,

2015-03-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272739); 安徽省科技攻关项目(编号: 12010402122)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 李文成, 女, 硕士研究生;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunguoping@ahmu.edu.cn

HCC) 在我国的发病率仅次于肺癌和胃癌, 死亡率在所有肿瘤中位居前三位<sup>[1]</sup>。肝癌细胞对化学治疗药物相对不敏感, 有效率  $\leq 20%$ <sup>[2]</sup>。如何能提高 HCC 的化疗敏感性已成为当今研究的热点。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS) 是细胞对一系列可以干扰内质网稳态的因素所做出的反应。自噬是细胞对恶劣环境及压力的一种反应, 但其对细胞生存的意义并不清楚<sup>[3]</sup>。该研究旨在观察自噬在 ERS 状态下对肝癌 HepG2 细胞及正常肝细胞 L-02 生存影响的差异, 探寻肿瘤特异性治疗的新方法。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 噻唑蓝(MTT)、衣霉素(tunicamycin, TM)、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、氯喹(chloroquine, CQ)、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 多克隆抗体均购自美国 Sigma 公司; 抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC 细胞双染凋亡试剂购自上海贝博公司。

**1.2 主要仪器设备** 包括 Acpo-6100 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国杜邦公司); YJ-1450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司); 倒置式显微镜(日本 Olympus 公司); Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器公司); EPICS XL/XL-MCL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); ImageQuant™ LAS-4000 型发光成像系统(日本通用电气医疗集团生命科学部)。

**1.3 细胞系** 人 HepG2 肝癌细胞株购自中科院上海生命科学院细胞库; 人 L-02 细胞购自武汉细胞库。

ules. However, PGE2 had no effect on CD80 expression in all of concentrations. PGE2(1.25, 2.5, 5, 10, 20 nmol/L) significantly inhibited the ability of antigen uptake of DCs. DCs stimulated by PGE2 (2.5, 5, 10 nmol/L) could promote T cell proliferation. PGE2 (2.5, 5, 10 nmol/L) increased EP4 expression on DCs surface. **Conclusion** PGE2 could regulate DCs function, which might be related to EP4 receptor expression affected by PGE2.

**Key words** EP4R; dendritic cells; PGE2