

EP4 对人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞生长的影响

周丹莉^{1,3}, 艾鹤英^{2,3}, 徐芬^{2,3}, 郑晓彬^{2,3}, 周冰¹, 钟荣誉¹, 孙辽¹

(1.中山大学附属第五医院内分泌与代谢病科,广东珠海 519000;2.中山大学附属第三医院内分泌与代谢病科,广东广州 510630;3.广东省糖尿病防治重点实验室,广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨前列腺素 E 受体 4(EP4)对人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞生长的影响。【方法】体外培养人甲状腺乳头状癌细胞株 TPC-1 及人甲状腺滤泡上皮细胞株 Nthy-ori 3-1, Nthy-ori 3-1 细胞作为对照,用 ELISA 法检测细胞上清液中前列腺素 E2(PGE2)含量;用实时荧光定量 PCR 法检测四种前列腺素 E2 受体亚型(EP1、EP2、EP3、EP4)mRNA 表达水平;用 Western Blot 法检测 EP1-4、PKA 及 PI3K 两种亚型(p110 α 、p110 γ)蛋白的表达情况。用噻唑蓝(MTT)比色法检测 EP4 受体拮抗剂 L-161982 对两种细胞生长的作用。【结果】两种细胞均分泌 PGE2。与 Nthy-ori 3-1 细胞相比,TPC-1 细胞 EP2、EP4 表达显著上调($P < 0.05$),EP4 下游信号因子 PI3K 亚型 p110 α 、p110 γ 蛋白表达升高($P < 0.05$)。L-161982 呈浓度依赖性抑制 TPC-1 细胞生长($P < 0.05$)。【结论】EP4 受体拮抗剂 L-161982 可抑制 TPC-1 细胞生长。

关键词: 甲状腺乳头状癌,前列腺素 E2,前列腺素 E 受体 4,L-161982

中图分类号: R736.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2016)03-0396-06

Effect of EP4 on the Growth of Human Papillary Thyroid Carcinoma Cell Line TPC-1

ZHOU Dan-li^{1,3}, AI He-ying^{2,3}, XU Fen^{2,3}, ZHENG Xiao-bin^{2,3}, ZHOU Bing¹, ZHONG Rong-yu¹, SUN Liao¹

(1.Department of Endocrinology & Metabolism, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China;
2.Department of Endocrinology & Metabolism, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
3.Key Lab of Diabetology of Guangdong Province, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: SUN Liao, E-mail:sunliao_sx@126.com

Abstract:【Objective】 To explore the effect of prostaglandin E receptor 4 (EP4) on the growth of human papillary thyroid carcinoma cell line TPC-1.【Methods】 Human papillary thyroid carcinoma cell line TPC-1 and human thyroid follicular epithelial cell line Nthy-ori 3-1 were cultured. ELISA assay was used to measure the level of PGE2 in cell supernatants. The mRNA expression of four EP receptor subtypes(EP1, EP2, EP3 and EP4) was examined by quantitative real-time PCR(qRT-PCR). The levels of EP1-4, PKA and PI3K(p110 α and p110 γ) protein were determined by Western blotting. The effects of selective EP4 antagonist L-161982 on cell viability were determined using MTT assay.【Results】 PGE2 production can be detected in both TPC-1 and Nthy-ori 3-1 cells. EP2 and EP4 expression appeared to increase in TPC-1 cells compared with Nthy-ori 3-1 cells($P < 0.05$). Meanwhile, TPC-1 cells expressed elevated protein levels for PI3K isoforms p110 α and p110 γ in comparison with Nthy-ori 3-1 cells ($P < 0.05$).L-161982 decreased TPC-1 cell viability in a dose-dependent manner($P < 0.05$).【Conclusion】 EP4 antagonist L-161982 can inhibit the growth of TPC-1 cells.

Key words: papillary thyroid carcinoma; prostaglandin E2; prostaglandin E receptor 4; L-161982

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2016,37(3):396-401]

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤,其中,甲状腺乳头状癌是最主要的病理类型,约占

全部甲状腺癌的 75% ~ 85%。尽管甲状腺乳头状癌患者 5 年生存率一般较高,但约 20%病人即使

收稿日期:2015-11-10

基金项目:2013 年珠海市科技计划重点项目(2013D0401990008)

作者简介:周丹莉,硕士研究生,E-mail: zhou dl7@mail2.sysu.edu.cn; 孙辽,通信作者,医学博士,硕士生导师,主任医师,E-mail: sunliao_sx@126.com。

经过积极治疗后,依然出现了复发和远处转移,预后较差,甚至导致死亡,进一步寻找能够改善这部分患者预后的新的治疗策略非常重要^[1-3]。既往研究表明,环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)及其主要产物前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)参与了甲状腺乳头状癌的发生发展^[4-6],而 PGE2 是通过细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体——前列腺素 E 受体(prostaglandin E receptor, EP)发挥作用的,EP 受体有 4 种亚型,分别为 EP1、EP2、EP3 和 EP4。近年越来越多的研究表明,PGE2 及其受体,尤其是 EP4,在多种恶性肿瘤的生长、发展、浸润及转移过程中扮演重要的角色^[7-8]。但目前对于 EP 受体与甲状腺乳头状癌的关系的研究在国内外尚属罕见。我们的前期研究发现,甲状腺乳头状癌患者癌组织存在 EP4 的高表达^[9],因此,本研究以人甲状腺乳头状癌细胞株 TPC-1 为研究对象,检测其 EP 受体的表达情况,研究 EP4 受体拮抗剂 L-161982 对 TPC-1 细胞生长的作用,进一步认识 EP4 与甲状腺乳头状癌的关系,为甲状腺乳头状癌患者的临床诊断治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人甲状腺乳头状癌细胞株 TPC-1 和人甲状腺滤泡上皮细胞株 Nthy-ori 3-1 均购自广州吉妮欧公司,TPC-1 细胞来源于 Institute of Interdisciplinary Research (IRIBHM),Nthy-ori 3-1 细胞来源于 European Collection of Cell Cultures (ECACC)。RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶(GIBCO,美国),青霉素-链霉素溶液(碧云天,中国)。PGE2 ELISA 试剂盒(Cayman,美国)。总 RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen,美国),

逆转录试剂盒 (TAKARA, 日本),SYBR Green I Master 试剂盒(Roche,瑞士),引物设计(广州赛哲生物科技有限公司),引物合成(广州吉格生物科技有限公司)。总蛋白提取试剂 RIPA、EDTA、蛋白酶抑制剂 (Thermo, 美国),EP1、EP3、EP4 抗体 (Cayman, 美国),EP2 抗体 (Abcam, 美国),PI3K p110 α 、PI3K p110 γ 、PKA 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国)。噻唑蓝 (MTT) 试剂 (Sigma-Aldrich, 美国)。L-161982(Cayman, 美国)。

1.2 细胞培养

Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养,定期换液、传代,取生长状态良好的对数生长期细胞用于实验。

1.3 ELISA 法检测细胞上清 PGE2 含量

取处于对数生长期的细胞,胰酶消化后制成细胞悬液接种于 6 孔板上,待细胞生长至约 80% 密度时,每孔更换为 1 mL 无血清 RPMI 1640 培养基,8 h 后收集细胞上清,按试剂盒说明书测定其 PGE2 浓度。同时,采用 BCA 法测定细胞上清蛋白浓度。PGE2 含量用每孔上清的 PGE2 浓度与总蛋白浓度之比(pg/mg total protein)表示。

1.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法

采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA。按照试剂盒说明书建立总体积为 20 μ L 的 PCR 反应体系,其中 cDNA 2 μ L,SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,10 μ mol/L 的上、下游引物各 0.5 μ L,去离子水 7 μ L。PCR 反应过程:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 反应 5 s,65 $^{\circ}$ C 反应 1 min。 β -actin 为内参基因,其检测结果以 2^(- $\Delta\Delta$ CT) 法计算各基因 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

Gene	Product size(bp)	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
EP1	143	TTGGGCTCCACCTTCTTTG	CACCAACACCAGCATTGGGCT
EP2	127	GCTCCTTGCCTTTCACGATTT	AGGATGGCAAAGACCCAAGG
EP3	96	GTCGTGTACCTGTCCAAGCA	GGAGAGCCCGAAAACAGTCA
EP4	81	AATTGGTCCGCCTCCTTGAG	CACCACCCCGAAGATGAACA
β -actin	109	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT	CTTGCACATGCCGGAGCCGTT

1.5 Western Blot 法

用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 根据所测得蛋白浓度, 取等量蛋白与 $5 \times$ 上样缓冲液混匀, 煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。利用湿电转膜仪将分离的蛋白质转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 COX-2 (1:1 000)、EP1 (1:200)、EP2 (1:200)、EP3 (1:500)、EP4 (1:500)、PI3K p110 α (1:1000)、PI3K p110 γ (1:500)、PKA (1:1 000)、 β -actin (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBS 洗膜, 加入红外荧光染料标记的二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h。洗膜后用红外荧光扫描成像系统显像。 β -actin 为内参蛋白。用 Image-Pro Plus 软件进行图像分析, 以目的蛋白/内参蛋白的灰度比值表示目的蛋白的相对含量。

1.6 噻唑蓝比色法

取对数生长期的细胞制成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ (即 1×10^4 个细胞/孔) 的密度接种于 96 孔板内, 待细胞贴壁后, 更换为无血清培养基, 加入不同浓度的 L-161982 使终浓度分别为 1、5、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 同时设空白组 (调零) 和溶媒对照组, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h 后每孔加 5 g/L MTT 溶液 $20 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪测 570 nm 波长下各孔吸光度 (A 值), 按以下公式计算细胞生长抑制率 (%) :

$$\left[1 - \left(\frac{\text{实验组平均 A 值} - \text{空白组平均 A 值}}{\text{溶媒对照组平均 A 值} - \text{空白组平均 A 值}} \right) \right] \times 100\%$$

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 进行统计分析, Graphpad Prism 6.0 作图, 正态分布的计量资料均以均数 \pm 标准差表示, 两组之间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

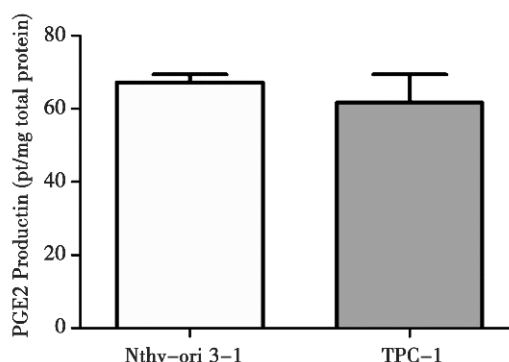
2 结果

2.1 TPC-1 细胞可产生 PGE2

为了了解 TPC-1 细胞是否能分泌 PGE2, 采用 ELISA 法测定 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞上清 PGE2 含量。结果显示: 两种细胞均可产生 PGE2, 但两种细胞 PGE2 含量并无统计学差异 (图 1)。

2.2 EP 受体在 TPC-1 细胞中的表达

分别采用 qRT-PCR 法和 Western Blot 法检测



Secretion of PGE2 in Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells were measured using ELISA. Values are mean \pm SEM, $n = 3$.

图 1 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞上清 PGE2 水平
Fig.1 PGE2 levels of Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells

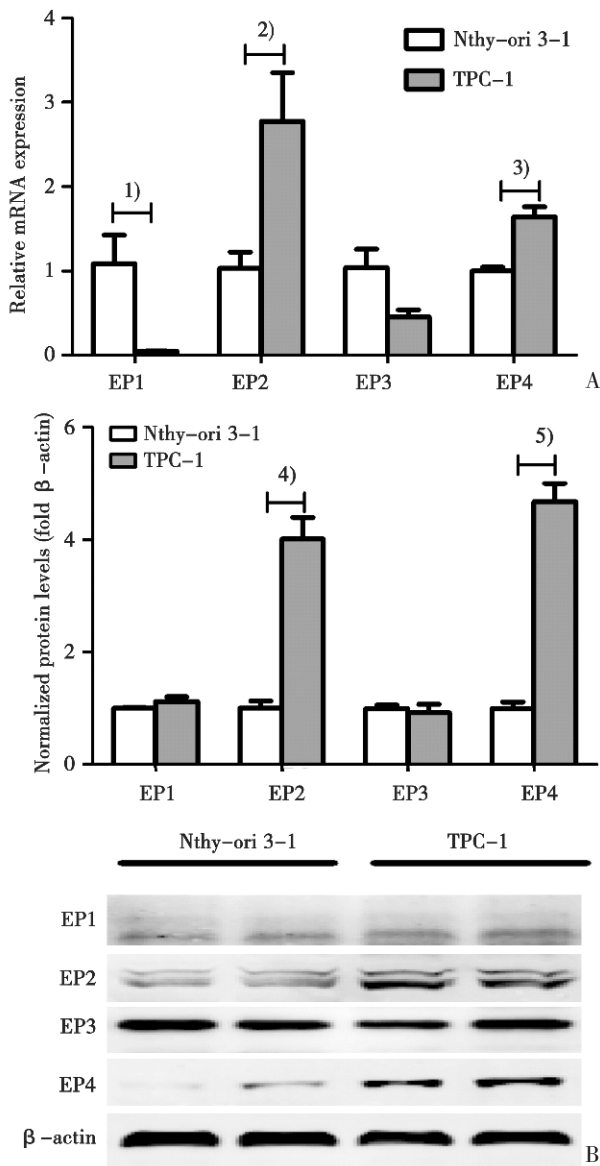
Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞 EP1、EP2、EP3、EP4 受体 mRNA、蛋白的表达情况, 结果显示: 与 Nthy-ori 3-1 细胞比较, TPC-1 细胞 EP1 mRNA 表达下调, EP2 和 EP4 mRNA 表达上调, 而 EP3 mRNA 表达无显著差异 (图 2A); 并且, TPC-1 细胞 EP2、EP4 蛋白表达水平明显升高 (图 2B)。

2.3 TPC-1 细胞 EP2 和 EP4 下游主要信号因子的表达

我们发现, TPC-1 细胞 EP2 和 EP4 表达水平明显高于 Nthy-ori 3-1 细胞, 为进一步明确 EP2 和 EP4 在甲状腺乳头状癌发生发展中的作用, 采用 Western Blot 法测定其下游信号因子 PKA 和 PI3K 蛋白的表达水平。结果显示: 与 Nthy-or 3-1 细胞相比, TPC-1 细胞 PI3K 两种亚型 p110 α 及 p110 γ 蛋白表达均明显升高, 而 PKA 蛋白表达则无显著性差异 (图 3)。

2.4 L-161982 抑制 TPC-1 细胞生长

基于上述结果和我们前期研究的发现, 我们用一种特异性 EP4 抑制剂 L-161982 分别干预两种细胞, 探讨抑制 EP4 对细胞生长的影响。MTT 结果显示, L-161982 对 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞的生长均有一定的抑制作用, 但 TPC-1 细胞对 L-161982 更为敏感。1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ L-161982 作用于 Nthy-ori 3-1 细胞 24 h 的抑制率分别为: $(13.15 \pm 3.08)\%$ 、 $(7.38 \pm 1.87)\%$ 、 $(14.63 \pm 6.79)\%$; 同等浓度的 L-161982 作用于 TPC-1 细胞 24 h 的抑制率分别为: $(29.95 \pm$



A: qRT-PCR analysis showed that expression levels of EP2 and EP4 mRNA were increased in TPC-1 cells compared with Nthy-ori 3-1 cells, whereas EP1 mRNA level decreased. B: Western blot analysis revealed that EP2 and EP4 protein expression were elevated in TPC-1 cells compared with Nthy-ori 3-1 cells. Values are mean \pm SEM, $n = 3$. 1) $t = 3.092$, $P = 0.036$, 2) $t = -2.892$, $P = 0.044$, 3) $t = -5.261$, $P = 0.006$, 4) $t = -7.463$, $P = 0.0003$, 5) $t = -10.812$, $P = 0.0004$ vs Nthy-ori 3-1 cells.

图2 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞 4 种 EP 受体亚型的表达

Fig.2 Expression of EP receptors in Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells

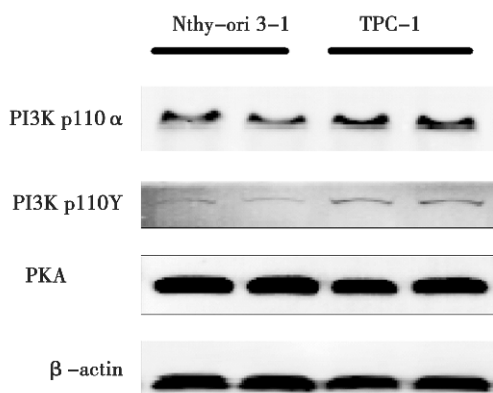
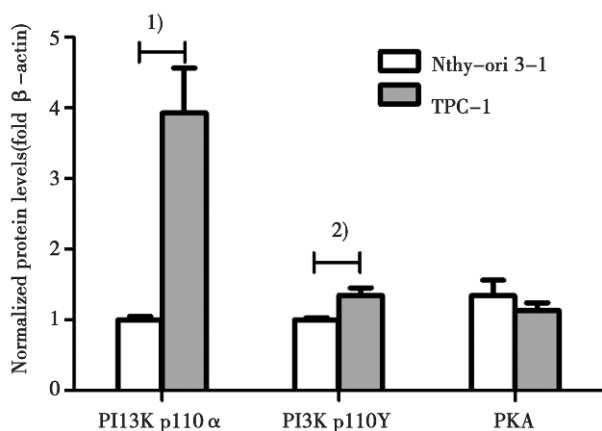
3.69)%、(49.57 \pm 6.28)%、(85.82 \pm 5.01)%，其抑制生长作用呈明显的浓度依赖关系(图4)。

3 讨论

COX-2 是催化花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶,它属于诱导酶,正常生理状态下在大多数组织或细胞中不表达或表达很少,而在炎症、肿瘤等病理过程中表达显著增强^[10]。近年越来越多的研究^[5-6,11-13]表明,COX-2 在甲状腺乳头状癌中呈高表达,并与预后不良因素密切相关。Kajita 等人发现,COX-2 抑制剂 NS-398 可抑制 TPC-1 细胞生长^[13]。而 Scarpino 等人报道,NS-398 显著抑制 TPC-1 细胞的迁徙和侵袭^[4,12]。RET/PTC 重排是甲状腺乳头状癌发生的早期事件,Puxeddu 等人将 RET/PTC3 突变体转染到大鼠正常甲状腺细胞株 PCCL3 后,COX-2 表达增加,PGE2 合成也显著增加^[14]。上述结果提示,COX-2 表达上调伴随 PGE2 合成增加,参与调控甲状腺乳头状癌的生长、侵袭及转移。但许多临床研究表明,COX-2 抑制剂增加心血管疾病发生风险,其临床应用的安全性问题仍有争议^[15],因此下游的 EP 受体逐渐成为人们新的研究热点。

PGE2 通过结合 4 种 EP 受体发挥多种生物学效应。随着分子生物学的发展,EP 受体介导的下游信号转导通路和分子机制^[7]也逐渐为人们所了解:EP1 与 Gq 蛋白偶联,增加细胞内 Ca²⁺浓度,EP3 则是偶联 Gi 蛋白,抑制腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)使环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)合成减少;EP2 和 EP4 均可和 Gs 蛋白偶联,通过激活 AC/增加 cAMP 浓度/激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),参与细胞增殖、血管形成等的调控;EP4 还可偶联 Gi 蛋白,激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 或 Akt)信号通路,该通路肿瘤细胞的增殖、存活及肿瘤的侵袭、转移等密切相关,发挥与 EP2 截然不同的作用。

在多种恶性肿瘤,如乳腺癌^[16]、前列腺癌^[17]、结肠癌^[18]等,均存在 EP4 的高表达,EP4 可调控多种肿瘤细胞的生长及转移,并且,抑制 EP4 具有抗肿瘤作用^[7]。本课题组的前期研究表明,与癌旁正常组织及结节性甲状腺肿组织比较,甲状腺乳头状癌组织中仅发现 EP4 表达明显上调,而 EP1-3 表达水平在 3 组之间均无显著性差异^[9]。但是迄

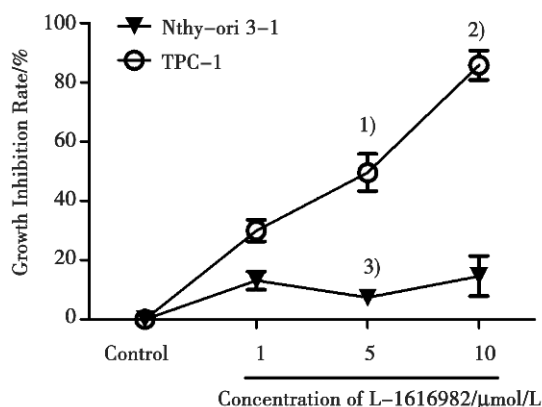


Western Blot analysis showed that PI3K p110 α and p110 γ protein expression were increased in TPC-1 cells compared with Nthy-ori 3-1 cells. Values are mean \pm SEM, $n = 3$. 1) $t = -4.572$, $P = 0.002$, 2) $t = -3.114$, $P = 0.036$ vs Nthy-ori 3-1 cells.

图3 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞 PI3K、PKA 蛋白的表达
Fig.3 Expression of PI3K, PKA protein in Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells

今为止,人们对于 EP 受体与甲状腺乳头状癌的关系仍缺乏了解。因此,本研究采用 TPC-1 细胞为研究对象,探讨 EP 受体的表达水平。结果显示,与 Nthy-ori 3-1 细胞比较,TPC-1 细胞 EP4 表达明显上调,此发现与前期发现一致;然后用 EP4 受体拮抗剂 L-161982 处理 2 种细胞,发现 L-161982 对 TPC-1 的抑制生长作用更为明显,并呈浓度依赖性;虽然 L-161982 对良性的 Nthy-ori 3-1 细胞的生长也有一定抑制作用,但平均抑制率低于 15%,并且不随着药物浓度增加而增加。上述结果提示 PGE2 促进甲状腺乳头状癌发生发展可能主要是通过介导 EP4 发挥作用的,EP4 有可能成为甲状腺乳头状癌的一个新的治疗靶点。

为了了解 EP4 调控甲状腺乳头状癌的分子机



EP4 antagonist (L-161982) significantly inhibited TPC-1 cell growth. Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cell was treated with different concentrations of L161982. After 24 h, cell viability relative to control groups was evaluated using MTT assay. Values are mean \pm SEM, $n = 3$. 1) $t = -5.392$, $P = 0.002$, 2) $t = -17.967$, $P = 1.91E-006$, 3) $t = 3.58$, $P = 0.007$ vs 1 $\mu\text{mol/L}$ L-161982 group.

图4 L-161982 对 Nthy-ori 3-1 和 TPC-1 细胞生长的影响

Fig.4 Effect of L-161982 on the growth of Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells

制,我们另外检测了其下游主要信号因子的表达,结果显示:TPC-1 细胞 PI3K 两种亚型 p110 α 和 p110 γ 蛋白的表达水平均明显高于 Nthy-ori 3-1 细胞。PI3K 分为 3 型,研究最广泛的是 I 型, I 型 PI3K 根据所结合亚基的不同分为 I A 和 I B 两种亚型, I A 型催化亚基包括 p110 α 、p110 β 、p110 δ , 其中 p110 α 与肿瘤密切相关,近年来备受瞩目; I B 型催化亚基主要是 p110 γ ,其与肿瘤之间的关系尚不清楚^[19]。我们发现,TPC-1 细胞中 PI3K p110 α 和 p110 γ 均表达上调,提示 I A 型和 I B 型 PI3K 可能在甲状腺乳头状癌的病理过程中起着一定的作用。

此外,结果发现 TPC-1 细胞和 Nthy-ori 3-1 细胞的 PGE2 分泌水平无显著性差异,与 Puxeddu 等人的研究结果^[14]不一致,考虑原因可能为:①种属不同,Puxeddu 等人是以大鼠正常甲状腺癌细胞株 PCCL3 为研究对象,而本研究采用的 TPC-1 细胞是人甲状腺乳头状癌细胞株;②基因型不同,PCCL3 细胞转染了 RET/PTC3 突变体后 PGE2 合成明显增加,而 TPC-1 细胞存在 RET/PTC1 基因重排,没有 RET/PTC3 基因重排^[20]。另外,本研究还发现,TPC-1 细胞 EP2 表达水平明显升高,这与

前期研究结果^[9]不相符,考虑与体外实验不能完全反映人体肿瘤特性有关,需要在其他的甲状腺乳头状癌细胞株进行研究证实。

综上所述,本研究发现 EP4 及其下游的 PI3K 两种亚型 p110 α 和 p110 γ 在 TPC-1 细胞中表达上调,EP4 受体拮抗剂可抑制 TPC-1 细胞生长。但具体作用机制仍需要进一步研究,从而为 EP4 应用于甲状腺乳头状癌的临床诊断及治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.
- [2] MPH RLS. Cancer statistics, 2015[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,2015,65(1):5-29.
- [3] 吴艺捷. 甲状腺癌已成为严重的公共健康问题 [J]. *中华内分泌代谢杂志*,2015,31(1):1-3.
WU YJ. Thyroid cancer has become a problem that gravely impacts public health, 2015[J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*,2015,31(1):1-3.
- [4] SCARPINO S, DURANTI E, GIGLIO S, et al. Papillary carcinoma of the thyroid: high expression of COX-2 and low expression of KAI-1/CD82 are associated with increased tumor invasiveness[J]. *Thyroid*,2013,23(9):1127-1137.
- [5] SIIRONEN P, RISTIMAKI A, NARKO K, et al. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer[J]. *EndocrRelat Cancer*,2006,13(2):465-473.
- [6] LO CY, LAM KY, LEUNG PP, et al. High prevalence of cyclooxygenase 2 expression in papillary thyroid carcinoma [J]. *Eur J Endocrinol*,2005,152(4):545-550.
- [7] O'CALLAGHAN G, HOUSTON A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets [J]? *Br J Pharmacol*,2015,172(22):5239-5250.
- [8] KONYA V, MARSCHE G, SCHULIGOI R, et al. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy [J]. *PharmacolTher*,2013,138(3):485-502.
- [9] SUN L, WEI X, LIU X, et al. Expression of prostaglandin E2 and EP receptors in human papillary thyroid carcinoma[J]. *Tumor Biology*,2015.
- [10] O'BANION MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology [J]. *Crit Rev Neurobiol*,1999,13(1):45-82.
- [11] ERDEM H, GUNDOGDU C, SIPAL S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma [J]. *ExpMolPathol*,2011,90(3):312-317.
- [12] SCARPINO S, DURANTI E, STOPPACCIARO A, et al. COX-2 is induced by HGF stimulation in Met-positive thyroid papillary carcinoma cells and is involved in tumour invasiveness [J]. *J Pathol*,2009,218(4):487-494.
- [13] KAJITA S, RUEBEL K H, CASEY MB, et al. Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth [J]. *Mod Pathol*,2005,18(2):221-227.
- [14] PUXEDDU E, MITSUTAKE N, KNAUF JA, et al. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 is induced by conditional expression of RET/PTC in thyroid PCCL3 cells through the activation of the MEK-ERK pathway [J]. *J BiolChem*,2003,278(52):52131-52138.
- [15] BACK M, YIN L, INGELSSON E. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk in a nation-wide cohort study after the withdrawal of rofecoxib [J]. *Eur Heart J*,2012,33(15):1928-1933.
- [16] KUNDU N, MA X, KOCHER T, et al. Prostaglandin E receptor EP4 is a therapeutic target in breast cancer cells with stem-like properties[J]. *Breast Cancer Res Treat*,2014,143(1):19-31.
- [17] XU S, ZHANG Z, OGAWA O, et al. An EP4 antagonist ONO-AE3-208 suppresses cell invasion, migration, and metastasis of prostate cancer [J]. *Cell BiochemBiophys*,2014,70(1):521-527.
- [18] DOHERTY GA, BYRNE SM, MOLLOY ES, et al. Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*,2009,9:207.
- [19] WARFEL NA, KRAFT AS. PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors [J]. *PharmacolTher*,2015,151:41-49.
- [20] MEIRELES AM, PRETO A, ROCHA AS, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines [J]. *Thyroid*,2007,17(8):707-715.

(编辑 孙慧兰)