前列腺素 E_2 体外主要通过活化受体 EP_4 促进人 $CD34^+$ 细胞增殖

唐 晶，苏 畅，赖淑萍，戚永磊，冯 春，邹外一，陈惠珍，王荷花，许多荣*
（中山大学附属第一医院血液科，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】明确介导前列腺素 E_2(PGE_2)促进人 $CD34^+$细胞增殖的具体受体亚型。【方法】收集 2013 年 6 月至 2014 年 10 月期间 18 例健康志愿者经 G-CSF 动员的外周血，采用免疫磁珠法分选人 $CD34^+$细胞，并用流式细胞术鉴定其纯度；用 qRT-PCR 检测经 PGE_2 作用后的人 $CD34^+$细胞中 PGE_2 四个亚受体（EP_1 ~ EP_4)mRNA 表达情况；根据处理方法不同，将人 $CD34^+$细胞分为对照组、前列腺素 E_2(PGE_2)组、前列腺素 E_2 受体 EP_2 激动剂(EP_2A)组、EP_2A+前列腺素 E_2 受体 EP_2 拮抗剂(EP_2AA)组、前列腺素 E_2 受体 EP_4 激动剂(EP_4A)组及 EP_4A+前列腺素 E_2 受体 EP_4 拮抗剂(EP4AA)组，每组 3 例，分别接受上述组药物处理，采用集落形成实验检测红系集落形成单位 CFU-E、红系爆式集落形成单位 BFU-E、粒系集落形成单位 CFU-G、单核系集落形成单位 CFU-M、粒-单核系集落形成单位 CFU-GM 及粒、红、单核、巨核系集落形成单位 CFU-GEMM 集落形成情况；用流式细胞术检测细胞周期分布；用 Real time-PCR 检测 $CD34^+$细胞内 survivin-mRNA 水平、Western blot 检测胞浆内 β-catenin 和 survivin 蛋白表达情况。【结果】人 $CD34^+$细胞可表达 PGE_2 的四个亚受体，但主要表达受体 EP_2 和 EP_4；PGE_2 作用后，EP_2 和 EP_4 mRNA 表达量较对照组明显升高，而 EP_1 和 EP_3 的 mRNA 表达变化不明显；EP_4A 可促进人 $CD34^+$细胞各系造血集落形成；EP_4A 可促进人 $CD34^+$细胞进入细胞周期，使 G_2/M 期比例增加；EP_4A 可促进凋亡抑制蛋白 survivin 的 mRNA 和蛋白表达、β-catenin 蛋白表达。【结论】前列腺素 E_2 体外主要通过受体 EP4 促进人 $CD34^+$细胞增殖。

关键词：异基因造血干细胞移植；植入功能不良；PGE_2 受体；PGE_2 受体激动剂；增殖
中图分类号：R551.3 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2015)06-0809-07

Prostaglandin E_2 Promotes Human $CD34^+$ Cells Proliferation through EP_4 Prostanoid Receptor

TANG Jing, SU Chang, LAI Shu-ping, QI Yong-lei, FENG Chun, ZOU Wai-yi, CHEN Hui-zhen, WANG He-hua, XU Duo-rong*
(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)
Corresponding to: XU Duo-rong; E-mail: xudr@hotmail.com

Abstract: 【Objective】 To identify the receptors involved in PGE_2 promoting human $CD34^+$cells proliferation. 【Methods】 18 samples of peripheral blood mobilized by G-CSF from 2013.6~2014.10 was collected. Human $CD34^+$ cells were isolated by magnetic activated cell sorting (MACS) microbeads kits, and the purity of $CD34^+$ cells was identified by flow cytometry. Four PGE_2 receptors (EP_1 ~ EP_4) expressed on human $CD34^+$ cells which were treated with $dmPGE_2$ were detected by qRT-PCR. The human $CD34^+$ cells were divided into 6 groups. Each group cells were treated with control, PGE_2, EP_2 agonist (EP_2A), EP_2A+EP_2 antagonist (EP_2AA), EP_4 agonist (EP_4A) and EP_4A+EP_4 antagonist (EP_4AA), respectively. Twenty four hours later, burst forming unit-Erythrocyte (BFU-E) number, colony forming unit-Erythrocyte (CFU-E)number, colony forming unit-Granulocyte (CFU-G) number, colony forming unit-Monocyte (CFU-M) number, colony forming unit-Granulocyte monocyte (CFU-GM) number and colony forming unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte and Megakaryocyte (CFU-GEMM) were evaluated by colony-forming assay. Furthermore, cell cycle

收稿日期：2015-05-11
基金项目：国家自然科学基金(81370663)；广东省科技计划项目(2013B021800239)；广东省自然科学基金博士启动项目(S2013040011541)；广东省卫生厅基金(A2013191)
作者简介：唐晶，硕士研究生，研究方向：血液病学，E-mail：tangj26@163.com；* 许多荣，通信作者，教授，硕士生导师，主任医师，研究方向：血液病学，E-mail：xudr@hotmail.com

distribution was analyzed by flow cytometry, and the expression of survivin mRNA, β-catenin and survivin protein of human CD34$^+$ cells was detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. 【Results】 Human CD34$^+$ cells could express four PGE_2 receptors. While the relative expression of EP_2 and EP_4 mRNA were significantly higher than EP_1 and EP_3 mRNA. The EP_2 and EP_4 mRNA relative expression in human CD34$^+$ cells which were treated with $dmPGE_2$ were significantly up-regulated compared with control groups, while the EP_1 and EP_3 mRNA relative expression had no obviously changed. After exposured to PGE_2, EP_2A, EP_2A+EP_2AA, EP_4A and EP_4A+EP_4AA, we observed that EP_4A stimulates CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M and CFU-GM formation, while EP_4AA plays a negative effects on those colony formations. We also found that EP_4A induces human CD34$^+$ cells entering into cell cycle (G_2/M phase) from rest period (G_0/G_1 phase). In addition, we found that EP_4A elevates survivin mRNA, survivin and β-catenin protein expression by real time-PCR and Western blot analysis.【Conclusion】 PGE_2 enhancing human CD34$^+$ cells proliferation could mainly mediate by EP_4 prostanoid receptor.

Key words: Allo-HSCT; poor graft function; PGE_2 receptor; PGE_2 receptor agonist; proliferation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(6): 809-815]

异基因造血干细胞移植(Allo-HSCT)是治疗部分血液系统恶性肿瘤的重要手段,甚至是治愈某些血液系统疾病的唯一方法。而在影响移植成功的众多因素中,促进供者造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)顺利归巢与增殖是维持其移植后稳定植入的关键措施之一[1]。近来国外学者和我们在体外均证实了前列腺 E_2 (prostaglandin E_2, PGE_2)可促进人 CD34$^+$细胞增殖[2-3],但如果直接将 PGE_2 应用于临床,势必产生多种严重副反应。而 PGE_2 有四个亚受体(EP_1-EP_4),各亚受体介导着不同的生物学效应,究竟是哪一个受体发挥作用,国外极少数报道初步表明在小鼠骨髓细胞中可能通过 EP_4 受体介导发挥其促进增殖能力[4],而国内目前尚无相关报道。因此,本文拟进一步探讨介导 PGE_2 发挥促进人 CD34$^+$增殖的具体受体亚型,以期为后续基于促进供者 HSC 增殖而开发特异性药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

经健康志愿者同意,收集 2013 年 6 月-2014 年 10 月期间 18 例健康志愿者经 G-CSF 动员后的外周血采集产物;16,16-二甲基前列腺素 E_2 (16,16-Dimethyl prostaglandin E_2, $dmPGE_2$)购于 Cayman 公司;PGE_2 受体 EP_2 特异性激动剂 EP_2A (ONO-AE1-259)、PGE_2 受体 EP_4 特异性激动剂 EP4A(ONO-AE1-329)和 PGE_2 受体 EP_4 特异性拮抗剂 EP_4AA (ONO-AE3-208)均由日本 Ono Pharmaceutical Co. Ltd 馈赠;PGE_2 受体 EP_2 特异性拮抗剂 EP_2AA(AH-6809)购于 Cayman 公司;人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque)购于 MP Biomedicals;CD34$^+$免疫磁珠试剂盒购于德国 MiltenyiBiotec 公司;甲基纤维素购于 Sigma 公司;EP_1、EP_2、EP_3、EP_4、Survivin 及 GAPDH 引物购于英韦杰津公司;PCR 试剂盒购于 Takara 公司;survivin 及 β-catenin 抗体购于 CST 公司。

1.2 人 CD34+细胞磁珠分选

具体见参考文献[3]。

1.3 人 CD34$^+$细胞的药物处理方法

将分选后的人 CD34$^+$细胞用 RPMI1640/10%-FBS 重悬至 5×10^5/mL,将其分成 6 组,即:对照组(DMSO 浓度<1/1 000)、PGE_2 (终浓度 1 μmol/L)组、EP_2A(终浓度 100 nmol/L)组、EP_2A+EP_2AA(终浓度均为 100 nmol/L)组、EP4A(终浓度 l00 nmol/L)组及 EP_4A+EP_4AA(终浓度分别为 100 nmol/L)组,每组细胞中均加入 rhSCF(100 ng/mL)。若以下无特别说明,细胞培养方式均为:冰上孵育 2 h,后将其放入 37 ℃、体积分数为 5%的 CO_2 恒温培养箱中继续培养 22 h。收集经或未经药物处理后的细胞用于以下实验。

1.4 qRT-PCR 检测人 CD34$^+$细胞 PGE2 四个亚受体及 Survivin mRNA 的表达水平

收集按方法 1.4 处理后的 CD34$^+$细胞,TRIZOL 一步法分别提取细胞总 RNA;取 2 μg RNA,将其逆转录成 cDNA;然后在 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR。反应条件为:95 ℃ 5 min,然后 95 ℃ 15 s,62 ℃ 30 s,65 ℃ 5 s,共 45 循环。对 PCR 反应过程中的每一循环系统荧光强度进行实时检测,以 GAPDH 为内参照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\Omega}$ 值分析结果。引物序列如表 1。

1.5 集落形成实验

将按方法 1.3 处理后的人 CD34$^+$细胞接种至 24 孔培养板中,具体方法参照参考文献[3]。2 周

表 1　PGE2 四个亚受体及 Survivin 的引物序列

Table 1　Primer sequences of sub-receptors of PEG2 and survivin

	Up	Down
EP 1	TTGGCGGCTCTCGGA	GCCACCAACACCAGCATT
EP 2	AGGAGAGGGGAAAGGGTGTC	AATCGTGAAAGGCAAGGAGC
EP 3	AAGGCCACGGCATCTCAGT	TGATCCCCATAAGCTGAATGG
EP 4	CTTGGAGGCAGGAATTTGCTT	AAAGTCCTCAGTGAGGTGGTGTCT
Survivin	TCCACTGCCCCACTGAGAAC	CCTTCCAGCTCCTTGAAGCA
GAPDH	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

后倒置显微镜下识别和计数 CFU-E、BFU-E、CFU-G、CFU-GM、CFU-GM 及 CFU-GEMM 集落。

1.6　流式周期测定

收集按方法 1.3 处理后的人 $CD34^+$ 细胞,行细胞周期测定,具体操作参照参考文献[3]。

1.7　Western-blot 法检测 β-atenin 和 survivin 蛋白的表达

收集按方法 1.3 处理后的人 $CD34^+$ 细胞,提取蛋白,具体操作参照参考文献[3]。

1.8　统计学分析

所有数据均采用 SPSS13.0 统计软件包处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据方差齐采用组间差异采用单因素方差分析 (ANOVA)和 LSD-t 检验，方差不齐采用多组定量资料的 Kruskal-Wallis 秩和检验及 Bonferroni 法。所有检验以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

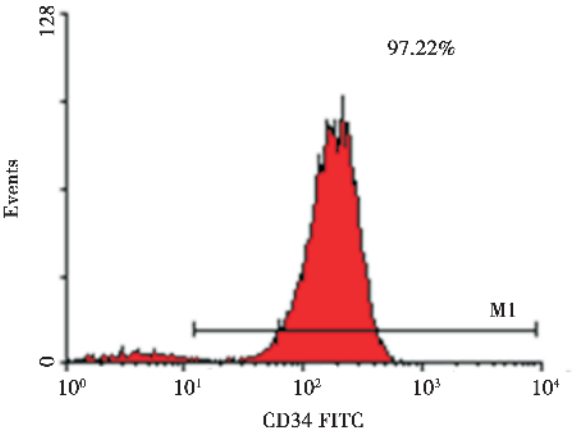


图 1　流式细胞术检测分选后 CD34+ 细胞纯度

Fig.1　Identification of the purity of CD34+cells by flow cytometry

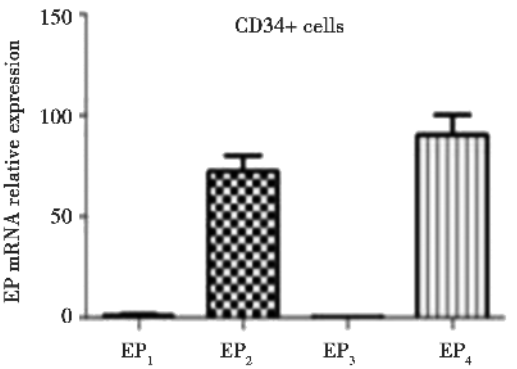


图 2　人 $CD34^+$ 细胞 EP mRNA 的表达水平

Fig.2　Expression of EP mRNA in human $CD34^+$ cells

2　结　果

2.1　人 $CD34^+$ 细胞的分选与鉴定

人外周血采集物经 $CD34^+$ 磁珠分选后,用流式鉴定分选细胞的纯度，结果示 $CD34^+$ 细胞纯度达 90%以上(图 1),符合实验要求,可用于后续实验。

2.2　人 $CD34^+$ 细胞表面 PGE_2 四个亚受体 EP_1 ~ EP 4 mRNA 的表达情况

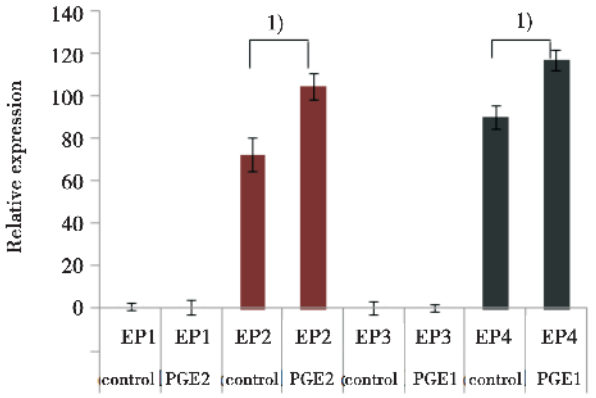
采用 qRT-PCR 检测未经药物干预的人 $CD34^+$ 细胞中 PGE 2 4 个受体 EP_1 ~ EP_4 mRNA 的表达水平。结果示:人 $CD34^+$ 细胞表达 4 个 EP 受体 mRNA,其中主要表达 EP_2 和 EP_4 受体(图 2)。

2.3　PGE_2 处理后人 $CD34^+$ 细胞中受体 EP_1 ~ EP_4 mRNA 的表达情况

采用 qRT-PCR 检测经 PGE_2 干预 24 h 后的人 $CD34^+$ 细胞 PGE_2 4 个受体 EP_1 ~ EP_4 mRNA 的表达水平。结果表明:经 PGE_2 处理后,EP_2 和 EP_4 mRNA 的相对表达量较对照组分别升高 1.44 倍和 1.3 倍 (P 值分别为 0.035,0.029)，而 EP_1 和 EP_3 mRNA 的相对表达量变化不明显(图 3)。据此,我们推断:PGE_2 可能是通过 EP_2 和 EP_4 对人 $CD34^+$ 细胞发挥作用。因此,在如下实验中,我们选择 EP_2 和 EP_4 为研究受体，进一步探讨 EP_2A 和 EP_4A 对人 $CD34^+$ 细胞增殖的影响。

2.4　PGE_2、EP_2A 及 EP_4A 处理后人 $CD34^+$ 细胞各造血集落形成情况

集落形成实验反映造血祖细胞的增殖能力,间接反映 HSC 向各系造血分化的能力。我们采用甲基纤维素半固体培养基培养分别经 PGE_2、EP_2A、EP_2A +EP_2AA、EP_4A 及 EP_4A +EP_4AA 处理后的人 $CD34^+$ 细胞 14 d，倒置显微镜下识别和计数 CFU-E、BFU-E、CFU-GEMM、CFU-G、CFU-M 及



The CD34$^+$ cells were treated with PGE_2 (1 μmol/L) and the expression of EP sub-receptor mRNA was assayed by RT-PCR. $n = 3$, 1) stands for $P < 0.05$.

图 3 PGE_2 干预后的人 CD34$^+$细胞 EP_1~EP_4 mRNA 的表达水平

Fig.3 Expression of EP_1 ~ EP_4 mRNA in human CD34$^+$ cells treated with PGE_2

CFU-GM 集落(表 2 及图 4),结果发现:在 PGE_2 或 EP4A 作用下,上述各系集落较对照组明显增加,差异比较具有统计学意义($P < 0.05$);当 EP_4A 组加入 EP_4AA 后,EP_4A 的促造血能力被拮抗。EP_2A 对各系集落的形成与对照组比较无明显差异。

2.5 EP_4A 对人 CD34$^+$细胞进入细胞周期的影响

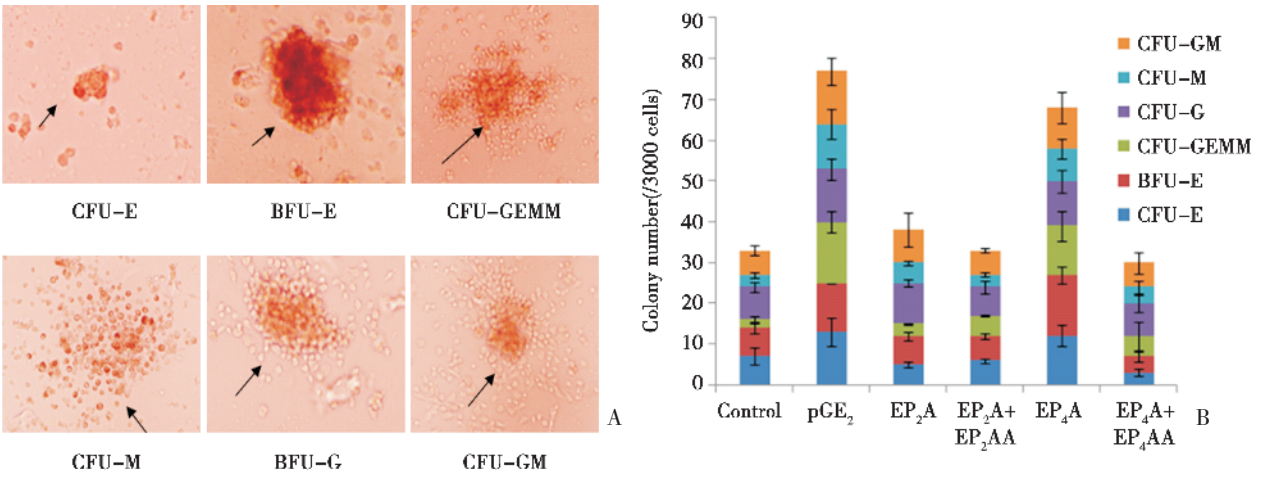
采用流式细胞术检测分别 PGE_2、EP_2A、EP2A+EP_2AA、EP_4A 及 EP_4A +EP_4AA 处理 24 h 后人 CD34$^+$细胞(表 3 及图 5),结果发现:PGE_2 组及 EP_4A 组处于 G0/G1 期的细胞比例分别为(82.4 ± 6.2)%和(80.8 ± 5.7)%较对照组(86.7 ± 5.1)%下降,差异比较具有统计学意义(P 值分别为 0.032, 0.027),EP 2A 组处于 G0/G1 期的细胞比例(89.5 ± 7.2)%较对照组无明显差异;各药物处理组处于 S 期的细胞比例较对照组无明显差异;PGE_2 组及 EP_4A 组处于 G2/M 期的细胞比例分别为(12.3 ± 0.7)%和(13.5 ± 1.6)%,较对照组(8.1 ± 0.32)%明

表 2 经不同方式处理后各系集落数目

Table 2 The number of every colony forming unit treated by different means

	Control	PGE_2	EP_4A	EP_4A+ EP_4AA	EP_2A	EP_2A+ EP_2AA	F value	P value
CFU-E	7.0 ± 0.6	13.0 ± 1.1$^{1)}$	12.3 ± 1.5$^{1)}$	3.3 ± 0.3$^{2)}$	5.7 ± 0.4	5.3 ± 0.5	23.005	< 0.001
BFU-E	7.3 ± 0.7	12. ± 0.9$^{1)}$	14. ± 0.6$^{1)}$	4.3 ± 0.4$^{2)}$	7.0 ± 1.2	7.0 ± 0.6	23.690	< 0.001
CFU-GEMM	2.7 ± 0.3	15. ± 2.3$^{1)}$	13. ± 1.9$^{1)}$	5.3 ± 0.5$^{2)}$	3.4 ± 0.8	5.0 ± 0.2	19.222	< 0.001
CFU-G	8.3 ± 0.9	13. ± 1.2$^{1)}$	11. ± 1.7$^{1)}$	8.0 ± 1.2$^{2)}$	10.0 ± 0.6	7.3 ± 0.9	3.650	0.031
CFU-M	3.0 ± 0.7	11. ± 0.9$^{1)}$	8.3 ± 2.2$^{1)}$	4.3 ± 1.4$^{2)}$	4.7 ± 0.3	3.3 ± 0.4	9.037	0.001
CFU-GM	6.0 ± 0.6	13. ± 2.9$^{1)}$	10.0 ± 1.2$^{1)}$	6.0 ± 2.3$^{2)}$	8.0 ± 2.3	6.0 ± 0.5	9.800	0.001

1)PGE_2 group, EP_4A group compared with control group, $P < 0.05$, 2) EP_4A+EP_4AA group compared with EP_4A group, $P < 0.05$. $n = 3$.



A: the morphology of every colony forming unit; B: human CD34+cells were seeded in methylcellulose semi-solid culture medium and treated with control, PGE_2, EP_2A, EP_2A+EP_2AA, EP_4A, EP_4A+EP_4AA, respectively.Fourteen days later,the numbers of clony forming units were detected by inverted microscope. $P < 0.05$ vs control group or EP_4 group, $n = 3$.

图 4 不同方式处理后各系集落数

Fig.4 The number of every colony forming unit treated by different means

显升高，差异比较具有统计学意义（P 值分别为 0.035,0.031），EP_2A 组处于 G_2/M 期的细胞比例较对照组无明显差异。由此可知：PGE_2 可通过 EP_4 促进人 $CD34^+$细胞由静止期进入细胞周期。

2.6　EP_4A 对人 $CD34^+$细胞中 survivin-mRNA 和 survivin 蛋白表达的影响

Survivin 对造血干/祖细胞由静止期进入细胞分裂期起着关键的作用。我们分别采用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测经 PGE_2、EP_2A、EP_2A + EP_2AA、EP_4A 及 EP_4A+EP_4AA 干预后的人 $CD34^+$细胞中 survivin mRNA 和蛋白表达水平（图 6）。结果发现：在 mRNA 水平，PGE_2 组和 EP_4A 组的 survivin 相对表达量分别为对照组的 6.45 和 16.60 倍，因为该组数据方差不齐，所以采用 Kruskal-Wallis 秩和检验进行多组数据的比较（$\chi^2 = 16.14$，$P = 0.006$），并用 Bonferroni 法进行两两比较，差异显著有统计学意义（P 值均 < 0.05）；当加入 EP_4AA 后，EP_4A 组 survivin 相对表达量较未加时减低，差异具有统计学意义（$P = 0.0089$；图 6）。在蛋白表达水平，经 PGE_2 及 EP_4A 干预后的人 $CD34^+$细胞中 survivin 蛋白表达水平较对照组明显升高，分别增加 1.98 倍及 1.85 倍（P 值均 < 0.001）。当 EP4A 组中加入其对应的受体拮抗剂 EP_4AA 后，survivin 的蛋白表达量较未加入拮抗剂组明显下降（P <0.001）。EP_2A 对 survivin 的表达无明显影响。

2.7　EP_4A 处理对人 $CD34^+$细胞中 β-catenin 蛋白表达水平的影响

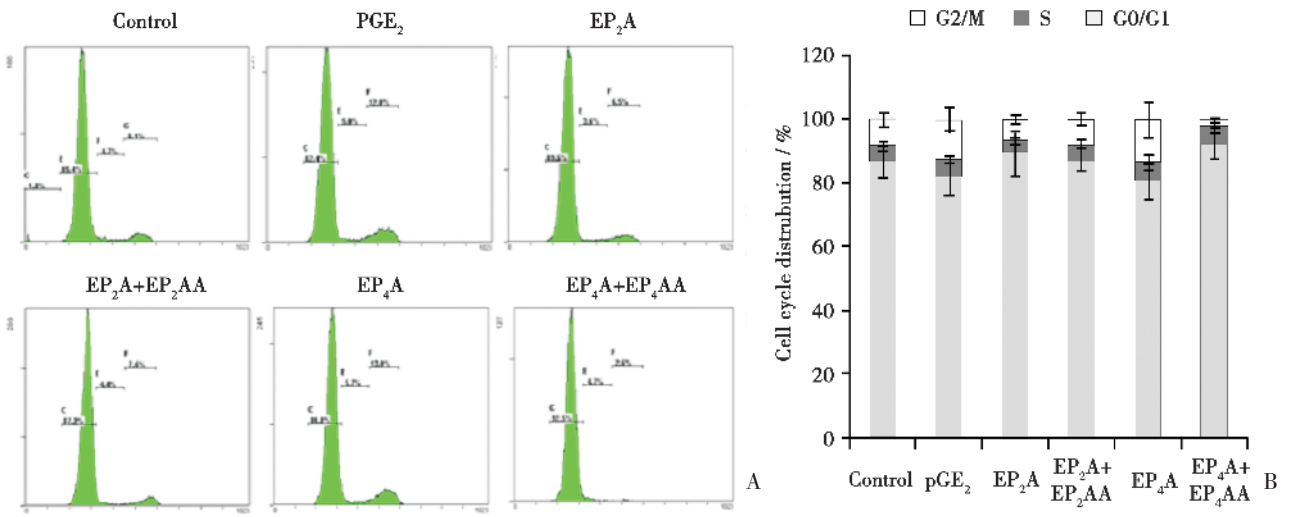
采用 Western blot 方法检测经 PGE_2、EP_2A、EP_2A +EP_2AA、EP_4A 及 EP_4A +EP_4AA 干预后的人 $CD34^+$细胞中 β-catenin 蛋白的表达变化情况（图 7）。结果发现：经 PGE_2 及 EP4A 干预后的人 $CD34^+$细胞中 β-catenin 蛋白表达水平较对照组明显升高 3.86 倍和 3.15 倍（P 值分别为 0.002,0.035）。当 EP4A 组中加入其对应的受体拮抗剂 EP 4AA 后，β-catenin 蛋白表达量较未加入拮抗剂组明显下降（$P < 0.001$）。EP_2A 对 β-catenin 的表达无明显影响。以上结果说明，PGE_2 主要通过受体 EP_4 促进 β-catenin 蛋白表达。

表 3　不同方式处理后细胞具体周期分布比例表

Table 3　The cell cycle distribution of human CD34+cell after different treatments

	Control	PGE_2	EP_4A	EP_4A+ EP_4AA	EP_2A	EP_2A+ EP_2AA	F value	P value
G0/G1	86.7 ± 5.1	82.4 ± 6.2[1)]	80.8 ± 5.7[1)]	92.7 ± 4.7[2)]	89.5 ± 7.2	87.6 ± 3.6	3.581	0.033
S	5.2 ± 1.4	5.3 ± 1.1	5.7 ± 2.5	4.7 ± 1.6	3.8 ± 0.8	4.6 ± 1.4	0.300	0.904
G2/M	8.1 ± 0.3	12.3. ± 0.7[1)]	13.5 ± 1.6[1)]	2.6 ± 0.7[2)]	6.7 ± 1.3	7.8 ± 2.1	5.985	0.005

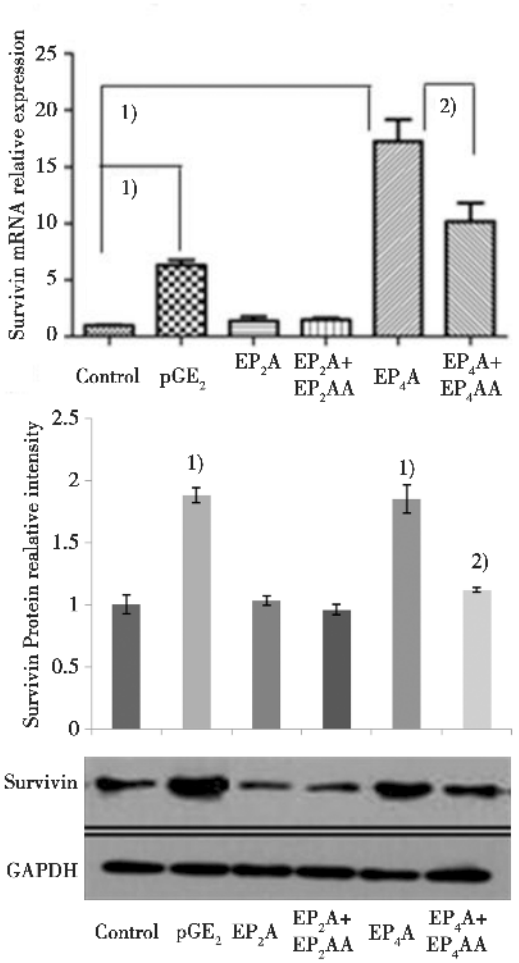
1) $P < 0.05$ vs control group, 2) $P < 0.05$ vs EP4A group, $n = 3$



Human $CD34^+$ cells were dealt with control, PGE_2, EP_2A, EP_2A + EP_2AA, EP_4A, EP_4A + EP_4AA for 24 h, respectively, then cell cycle distribution was measured by FCM. PGE_2 or EP_4A can induce human $CD34^+$ cells entering into S/G_2M phase. $P < 0.05$ vs control group, $n = 3$.

图 5　不同药物处理后对 CD34+细胞细胞周期分布的影响

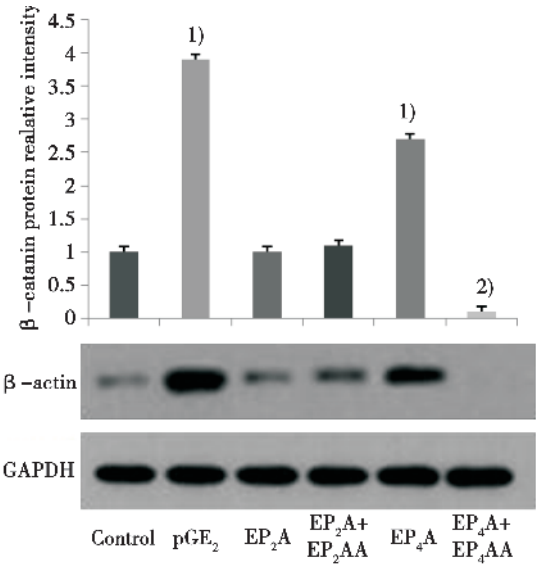
Fig.5　Effects of different treatments on the cell cycle distribution of human $CD34^+$cell



A. The six groups of human CD34⁺ cells were dealt with control, PGE_2, EP_2A, EP_2A+EP_2AA, EP_4A and EP_4A+EP_4AA for 24 h, respectively, then we measured the expression of survivin mRNA of every group by RT-PCR; B. Human CD34⁺ cells were treated with control, PGE_2, EP_2A, EP_2A+EP_2AA, EP_4A and EP_4A+EP_4AA for 24 h, respectively, then we measured the expression of survivin protein of every group by western blot. 1) $P < 0.05$ vs control, 2) $P < 0.05$ vs EP_4 group, $n = 3$.

图 6 EP_2A 和 EP_4A 处理后的人 CD34⁺细胞中 survivin mRNA 和蛋白的表达变化

Fig.6 The expression of surviving mRNA and protein after EP_2 A and EP_4A treatment in CD34⁺ cells



Human CD34⁺ cells were treated with different means. Western blot indicates that EP 4A significantly increased the expression of survivin protein. Data are from three independent experiment (P = 0.021 compared with control group).

图 7 不同药物处理后 β-catenin 蛋白的表达变化

Fig.7 The expression of β-catenin of every group dealt by different drugs

3 讨 论

PGE_2 对造血的调控具有多向性。1970 至 1990 年间大量的研究证实 PGE_2 体外可抑制人和鼠 CFU-GM 形成[4-6],直接抑制粒系造血[7-8]。相反,PGE_2 可直接或间接通过 T 细胞释放的细胞因子促使 BFU-E 及 CFU-GEMM 形成。但是,Goessling 等[9]证实当 PGE_2 作用于人脐血干细胞 3 h 后可显著增强 CFU-GM 集落形成;Dupuis 等[10]证实 PGE_2 作用于纯化的人外周血 CD34⁺细胞后可增强粒系和红系造血祖细胞形成。这提示 PGE_2 的作用时间及 HSC 的纯度在反应 PGE_2 的造血调节效应中起着关键作用。我们的研究显示:当经磁珠分选后 CD34⁺细胞达 90%以上的细胞经 PGE_2 和 EP_4A 作用 24 h 后,各系造血集落的形成均增加;当 EP_4A 被 EP_4AA 拮抗后,其促造血能力被抑制;EP_2A 对各系造血祖细胞的生成无明显影响。这说明 PGE_2 可通过 EP_4 促进各系造血集落形成。

正常生理条件下,人体约 80%~90%的 HSC处于静止状态。在疾病、应急等条件刺激下,部分HSC从静止期进入细胞周期,以不对称的方式进行分裂,以维持造血[11]。本实验检测到,当人 CD34⁺细胞经 PGE_2 和 EP_4A 处理后,G0/G1 期细胞比例明显下降,而 G2/M 期细胞比例较对照组分别增加 1.52 倍和 1.67 倍,当 EP_4A 组加入相应的受体拮抗剂 EP_4AA 后,处于细胞周期比例下降,即经 PGE_2 和 EP_4A 处理后,静止期的人 CD34⁺细胞比例明显减少,而处于细胞周期的人 CD34⁺细胞比例明显增加。EP_2A 对细胞周期分布影响不明显。另外研究报道,PGE_2 可刺激 HSC 抗凋亡蛋白

survivin的表达,而后者在促进 HSC 进入细胞周期和维持其处于细胞周期中起着重要作用[11-12]。我们在实验中检测到,PGE_2 及 EP_4A 组人 $CD34^+$细胞中 survivin 在 mRNA 及蛋白水平表达均明显升高,当 EP_4A 组中加入其特异性受体拮抗剂 EP_4 AA 后,survivin 的表达明显下降。EP_2A 对 survivin 的表达无明显影响。这说明 PGE_2 可通过 EP_4 促进人 $CD34^+$细胞中 survivin 表达，后者进一步介导人 $CD34^+$细胞由静止期进入细胞周期[13]。在一项随访研究中,Goesslin 等观察到胚胎形成[14]中 PGE_2 途径可稳定 HSC 中 β-catenin，并促进其存活与增殖。而 PGE_2 可通过 EP_2 和 EP_4 两受体磷酸化 Wnt 通路的下游 GSK-3β,从而增加 β-catenin[14]。此外，通过 EP_4 途径可直接通过激活 cAMP/PKA 途径增加 β-catenin[15-16],这说明 PGE_2-EP_4 途径和 Wnt 通路间存在交叉。本实验观察到，经 PGE_2 和 EP_4A 处理后的人 $CD34^+$细胞 β-catenin 表达明显增加,当 EP_4A 组中加入 EP_4AA 后 β-catenin 表达下降。EP_2A 对 β-catenin 的表达无明显影响。

综上所述,我们认为 PGE_2 通过受体 EP_4 促进人 $CD34^+$细胞增殖。其具体机制可能与 PGE_2 在 EP_4 介导下促进抗凋亡蛋白 survivin 表达增加,从而使更多细胞由静止期进入细胞周期，并且激活 cAMP/PKA 途径在与 Wnt-β-catenin 通路的相互作用下促进人 $CD34^+$细胞增殖。

参考文献

[1] Champlin RE, Horowitz MH, van Bekkum DW, et al. Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results [J]. Blood, 1989, 73(2):606-613.

[2] Jonathan H, Pratibha S, Janardhan S, et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation[J].Blood,2009,113(22):5444—5455.

[3] 赖淑萍,许多荣,戚永磊.前列腺素 E2 体外可促进人 CD34+细胞增殖 [J]. 中山大学学报：医学科学版,2013, 34(1):110-115.
Lai SP,Xu DR,Qi YL. Prostaglandin E2 promotes human CD34+Cells proliferation [J].J SUN Yat-sen Univ:Med Sci,2013,34(1):110-115.

[4] Yoshiko MI, Fumio A, Kentaro H, et al. Prostaglandin E2 regulates murine hematopoietic stem/progenitor cellsdirectly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells [J]. Blood, 2013,121(11):1995-2007.

[5] Pelus LM, Broxmeyer HE, Kurland JI, et al. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. Specificities of prostaglandin E and lactoferrin [J]. J Exp Med, 1979, 150(2): 277-292.

[6] Taetle R, Koessler A. Effects of cyclic nucleotides and prostaglandins on normal and abnormal human myeloid progenitor proliferation[J]. Cancer Res, 1980, 40(4): 1223-1229.

[7] Pelus LM, Broxmeyer HE, Moore MA. Regulation of human myelopoiesis by prostaglandin E and lactoferrin [J]. Cell Tissue Kinet, 1981,14(5):515-526.

[8] Kurland JI, Broxmeye HE, Pelus LM, et al. Roleformonocyte-macrophage-derived colony-stimulating factor and prostaglandin E in the positive and negative feedback control of myeloid stem cell proliferation [J]. Blood, 1978, 52(2): 388-407.

[9] Goessling W, Allen RS, Guan X, et al. Prostaglandin e2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4): 445-458.

[10] Dupuis F, Gachard N, Allegraud A, et al. Prostaglandin E2 stimulates the growth of human blood CD34+ progenitors[J]. Mediators Inflamm, 1998, 7(2):99-103.

[11] Valcourt JR, Lemons JM, Haley EM, et al. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence [J]. Cell Cycle, 2012, 11(9):1680-1696.

[12] Fukuda S, Foster RG, Porter SB, et al. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34 (+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells[J]. Blood, 2002, 100(7):2463-2471.

[13] Fukuda S, Pelus LM. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry[J]. Cell Cycle, 2002, 1(5): 322-326.

[14] Goessling W, North TE, Loewer S, et al. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration[J]. Cell, 2009, 136(6): 1136-1147.

[15] Regan JW. EP_2 and EP_4 prostanoid receptor signaling [J]. Life Sci, 2003, 74(2-3): 143-153.

[16] Wang D, Mann JR, DuBois RN. WNT and cyclooxygenase-2 cross-talk accelerates adenoma growth [J]. Cell Cycle, 2004, 3(12): 1512-1515.

(编辑　孙慧兰)