

阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路 对神经母细胞瘤细胞生长及凋亡的影响

张继红¹, 李爱敏², 陈松^{1,4}, 佟海侠¹, 张可仞³, 张锦华¹

(1. 中国医科大学盛京医院(第二临床学院)血液研究室, 辽宁 沈阳 110022; 2. 烟台市毓璜顶医院, 山东 烟台 ; 3. 中国医科大学盛京医院(第二临床学院)儿外科, 辽宁 沈阳 110022; 4. 中国医科大学盛京医院(第二临床学院)学生科, 辽宁 沈阳 110022)

[摘要] 目的 脑源性神经生长因子(BDNF)和其酪氨酸激酶受体 B(TrkB)与神经母细胞瘤(NB)细胞的化疗耐药及恶性预后密切相关。该研究探讨阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路后,NB 细胞对化疗药物敏感性的变化。**方法** 常规培养 SH-SY5Y NB 细胞,用 nM 浓度全反式维甲酸(ATRA)诱导 TrkB 高表达,加入 BDNF、化疗药顺铂(CDDP)和特异性酪氨酸酶抑制剂 K252a 处理。MTT 实验方法检测应用 K252a 前后细胞的存活率的变化;同时应用 Western-blot 方法检测应用 K252a 前后 TrkB 的磷酸化水平的变化;流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率;透射电镜(TEM)观察凋亡细胞的形态与结构。**结果** ATRA + BDNF + CDDP 组细胞的存活率及凋亡率与对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$)。而经 K252a 处理后,细胞对顺铂的敏感性增加,细胞的存活率明显降低,凋亡率明显升高,差异有显著意义。Western-blot 分析显示 K252a 能够阻断 TrkB 的磷酸化。**结论** 阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路可提高 NB 的化疗敏感性,逆转耐药。

[中国当代儿科杂志,2007,10(1):47-50]

[关键词] 神经母细胞瘤;TrkB-BDNF 信号传导通路;K252a;细胞株
[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0047-04

Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells

ZHANG Ji-Hong, LI Ai-Min, CHEN Song, TONG Hai-Xia, ZHANG Ke-Ren, ZHANG Jin-Hua. Laboratory of Hematology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004 (Email: zhangjihong_cmu@sina.com)

Abstract: Objective Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its specific tyrosin kinase receptor-B (TrkB) are highly correlated to the chemoresistance of neuroblastoma (NB) cells and poor prognosis. This study observed the changes of the sensibility of NB cells to chemotherapy drug cisplatin (CDDP) before and after blockage of TrkB-BDNF signal pathway by specific tyrosin kinase inhibitor K252a. **Methods** Human NB cell line SH-SY5Y (SY5Y) was routinely cultured. Expression of TrkB was induced with nM all trans-retinoid acid (ATRA). Then BDNF, CDDP or K252a were added to the cultured SY5Y cells. Cell livability was assessed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. TrkB autophosphorylation was determined by Western blot analysis. Cell apoptosis rate was detected by flow cytometry (FCM). The conformation of apoptosis cells was observed by transmission electron microscopy (TEM). **Results** The livability and apoptosis rate in SY5Y cells treated with ATRA, BDNF and CDDP were not different from the blank control group. However, after K252a together with ATRA, BDNF and CDDP treatment, the sensibility of SY5Y cells to chemotherapy drug CDDP increased, the livability decreased and the apoptosis rate increased in SY5Y cells when compared with the blank control group ($P < 0.01$). K252a treatment resulted in blockage of TrkB autophosphorylation. **Conclusions** The blockage of TrkB-BDNF signal pathway by K252a use can increase sensibility of NB cells to chemotherapy and thus decrease the livability of NB cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1):47-50]

Key words: Neuroblastoma; TrkB-BDNF signal pathway; K252a; Cell line

神经母细胞瘤(NB)是最常见的儿童实体肿瘤。本病恶性度极高,对目前的治疗非常抵抗,包括大剂量化疗及干细胞移植^[1~3]。因此如何逆转耐药,提高化疗敏感性是目前亟待解决的难题。脑源性神经生长因子(BDNF)和其酪氨酸激酶受体 B(TrkB)在神经元细胞的存活和发育过程中起着至关重要的作用。国外研究报道^[4]TrkB 高表达是 NB 不良预后的生物标记。高表达 TrkB 的 NB 预后不

[收稿日期]2007-04-30;[修回日期]2007-06-25
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(39470739);卫生部科学研究基金资助项目(20122167);辽宁省教育厅科研基金资助项目(202013122);辽宁省博士启动科研基金资助项目(20041047);辽宁省科学技术厅资助项目(2005225013-5)。
[作者简介]张继红,女,博士,副教授,研究室主任。主攻方向:血液、肿瘤的基因诊断与治疗。

良,可能与 NB 细胞化疗耐药有关^[5];TrkB 的配体 BDNF 能保护神经细胞免受物理、化学等因素的损伤,能促进 NB 细胞的存活^[6]。以往的研究发现^[7],激活 TrkB-BDNF 信号转导通路可导致化疗耐药,在本实验中我们用特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 阻断 TrkB 受体通路,观察该通路阻断前后 NB 细胞对化疗药敏感性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

①SY5Y 细胞系为美国国立癌症研究所希尔教授提供。②主要试剂:四甲基偶氮唑蓝 (MTT,美国 Sigma 公司);全反式维甲酸 (ATRA, ICN 产品);抗 TrkB 抗体及抗磷酸化 TrkB 抗体 (Santa Cru 产品);BDNF (PeproTech,公司产品);K252a 为美国国立癌症研究所希尔教授提供;顺铂 (CDDP,山东齐鲁制药厂);Annexin-V-FITC 试剂盒购自北京宝赛公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 分析 实验分 5 组:1 组 (对照组);2 组 (CDDP 组);3 组 (BDNF + ATRA + CDDP 组);4 组 (ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组);5 组 (BDNF + ATRA + K252a 组);

单细胞悬液以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞浓度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,24 h 后更换培养液,顺铂组及对照组继续用 DMEM 培养液,其他组改换含 10nM/L ATRA 的 DMEM 培养液,5 d 后再更换 McCoy's 无血清培养液 24 h 后,按分组加药。顺铂处理 24 h 后,行 MTT 分析:每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL ,37℃ 继续培养 4 h,小心吸弃孔内培养液,每孔加 150 μL DMSO,震荡 15 min,于 1 h 内在酶标仪上分别测出波长 570 nm 处各孔吸光度 (A) 值,每组设 3 个复孔,取 3 次实验的平均数,计算各组细胞的相对存活率 (%) = (实验组吸光度 - 空白组吸光度 / 对照组吸光度 - 空白组吸光度) $\times$ 100%。(ATRA 应用剂量为 10 nM/L, BDNF 应用剂量 100 ng/mL, CDDP 应用剂量为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, K252a 1.0 $\mu\text{M}/\text{L}$)

1.2.2 FCM 检测细胞凋亡率 实验分组同 MTT 分析:取对数生长期细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞浓度接种于 6 孔板中,每组设 2 孔,培养 24 h 后更换培养液,2 组及 1 组继续用 DMEM 培养液,其他组改换含 10 nM/L ATRA 的 DMEM 培养液,5 d 后再更换 McCoy's 无血清培养液 24 h,按上述分组加药。顺铂处理 24 h 后细胞以 0.25% 胰酶消化,4℃ 预冷

的 PBS 洗两遍后加 binding-buffer 200 μL ,再加 Annexin-V 10 μL 、PI5 μL ,避光作用 15 min 后,再加 Binding-buffer 300 μL ,于 1 h 内在流式细胞仪上检测。本实验重复 3 次。

1.2.3 Western-blot 分析检测 TrkB 及 p-TrkB 表达 实验分 3 组:1 组:10 nM/L ATRA 处理 5 d, McCoy's 无血清培养 24 h 组;2 组:1 组结束后加 1.0 $\mu\text{M}/\text{L}$ K252a 预处理 0.5 h 再加 100 ng/mL BDNF 刺激 15 min 组;3 组:1 组结束后直接加 100 ng/mL BDNF 刺激 15 min 组。收集以上 3 组细胞,超声均浆机粉碎细胞,酚试剂法以牛血清蛋白作为标准进行蛋白定量 (取上清 50 μL + 2.5 mL 碱性铜 A 液 + 0.25 mL 酚试剂后置室温半小时,722 s 分光光度计比色,计算蛋白浓度)。浓度的调整与样品的处理:把样品调成相同浓度,浓度高的用水补充,然后加 buffer,放 EP 管中 100℃ 沸水中煮 5 min,使蛋白变性。取 100 μL 细胞裂解液进行不连续 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,150 v,1 h。转膜:50 v,100 mA,1.5 h,电转移到硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭,封闭非特异性蛋白,室温封闭 2 h。封闭好的膜用 TTBS (0.5 mL Tween-20 加到 1 L TBS 中。TBS 组成:4.84 g Tris, 58.48 g NaCl,溶于去离子水中,用 HCl 调 pH 至 7.5) 冲洗 2 次,每次 5 min,再加兔抗人 TrkB、P-TrkB 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜。一抗为 1:300 稀释 (用含 1% 牛血清的 TTBS 液稀释)。加 1:2 000 稀释的羊抗兔碱性磷酸酶标记的二抗,室温孵育 2 h。取出膜,放入皿中,TTBS 冲洗 2 次,每次 5 min, TBS 冲洗 1 次,5 min,加显色剂,10 ~ 30 min 后看结果。

1.2.4 透射电镜检测细胞凋亡的形态 细胞分两组:① ATRA + K252a + BDNF + CDDP 处理组;② ATRA + BDNF + CDDP 组。两组细胞分别以戊二醛固定,梯度丙酮脱水, Epon812 包埋,制超薄切片,于透射电镜下观察照相。

1.3 统计学方法

利用方差分析法及采用 SPSS11.0 统计软件进行分析。所有实验结果取 3 次实验的平均值。

2 结果

2.1 K252a 对顺铂作用下 NB 细胞存活率的影响

ATRA + BDNF + CDDP 组细胞的存活率与对照组相比,差异无显著性 ($P > 0.05$);而经 K252a 处理后,细胞对顺铂的敏感性增加,细胞的存活率明显降低 (图 1)。

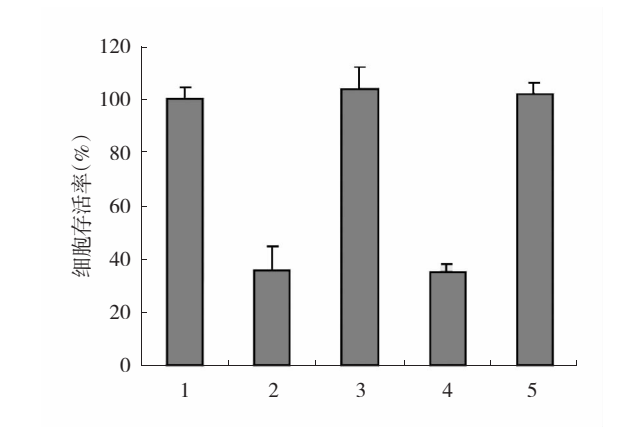


图1 各组细胞存活率变化 1:对照组;2:CDDP 组;3: ATRA + BDNF + CDDP 组;4: ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组;5: ATRA + BDNF + K252a 组。

2.2 K252a 对顺铂作用下 SY5Y 细胞早期凋亡率的影响

ATRA + BDNF + CDDP 处理组的细胞凋亡率与对照组相比,差异无显著性 ($P > 0.05$); ATRA + K252a + BDNF 处理组的细胞的凋亡率与对照组相比,差异亦无显著性 ($P > 0.05$); 而 ATRA + K252a + BDNF + CDDP 处理组细胞的凋亡率明显高于对照组及 ATRA + BDNF + CDDP 处理组和 ATRA + K252a + BDNF 处理组 ($P < 0.01$) (图2)。

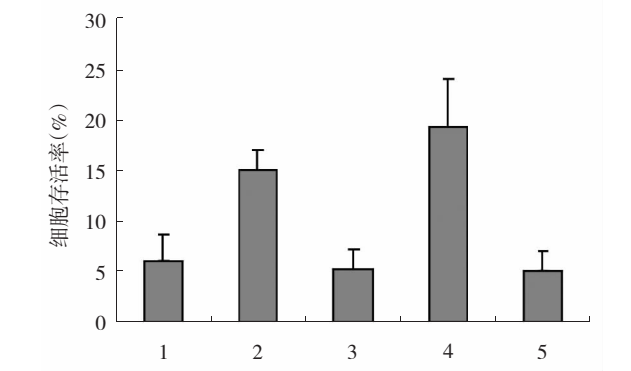


图2 各组细胞凋亡率变化 1:对照组;2:CDDP 组;3: ATRA + BDNF + CDDP 组;4: ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组;5: ATRA + BDNF + K252a 组。

2.3 Western-blot 分析检测 p-TrkB 表达

ATRA 组 p-TrkB 蛋白的表达为阴性, ATRA + BDNF 组 p-TrkB 蛋白的表达为阳性, ATRA + K252a + BDNF 组 p-TrkB 蛋白表达为阴性(图3)。

2.4 透射电镜检测凋亡细胞的形态

透射电镜下 ATRA + BDNF + CDDP 组细胞形态多数核内染色质均匀,核膜清晰。ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组细胞多数染色质固缩,核膜破损及核碎裂,细胞体积缩小(图4A,B)。

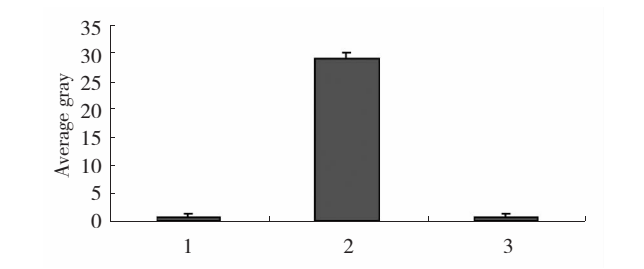


图3 各组 p-TrkB 蛋白表达 1. ATRA 组;2. ATRA + BDNF 组; 3. ATRA + K252a + BDNF 组。

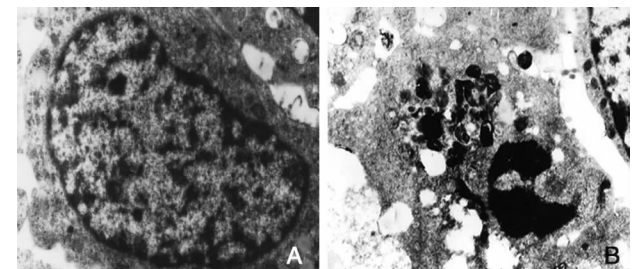


图4 透射电镜检测凋亡细胞的形态(800 ×) A: ATRA + BDNF + CDDP 组细胞核内染色质均匀,核膜清晰;B: ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组染色质固缩,核膜破损及核碎裂。

3 讨论

神经母细胞瘤的生物特性具有明显的异质性,而有些特性可能导致了化疗药耐药。肿瘤耐药机制异常复杂,涉及癌基因的活化、抑癌基因的失活、肿瘤细胞的凋亡抑制等^[8]。编码酪氨酸激酶受体的 Trk 癌基因家族与其配体在神经元分化、凋亡方面起重要作用,它们在 NB 的生物学特性及临床表现方面起着至关重要的作用。TrkB 及 BDNF 的表达最初在 N-Myc 扩增的瘤组织中被发现,而 N-Myc 扩增是不良预后的标志^[9,10]。在同时表达全长 TrkB 和 BDNF 的 NB 中,二者形成了一个自分泌通路,成为促进 NB 存活和生长的重要因素^[11,12]。顺铂是治疗 NB 最常用的化疗药物之一,其作用机制为抑制 DNA 合成,诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。李爱敏等^[7]前期观察到 TrkB-BDNF 信号传导通路激活与 NB 细胞系 SH-SY5Y 对化疗药顺铂产生耐药有关。

本实验中我们选择了特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 来阻断 TrkB-BDNF 通路。特异性酪氨酸激酶抑制剂有多种,包括 CEP-751, CEP-2563, CEP-1347, K252a 等,其中 K252a 是众所周知的、有效的特异性酪氨酸激酶抑制剂^[14,15]。本实验中我们先用小剂量 ATRA 诱导 TrkB 表达,然后提前 30 min 加用 K252a,再加 BDNF 及化疗药顺铂,检测细胞存活率、凋亡率的变化以及 p-TrkB 蛋白的表达变化,

并分析其中的关系;再通过透射电镜进一步观察凋亡细胞的形态。在实验结果中表明,TrkB-BDNF 信号传导通路的激活可抑制顺铂对 NB 细胞的杀伤作用;K252a 本身对 SY5Y 细胞的生长无影响,而是通过阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路而使 SY5Y 细胞恢复对化疗药顺铂的敏感性,进而杀伤肿瘤细胞;实验结果还表明各组间早期凋亡率总体差异有显著性 ($P < 0.01$);进一步各组间两两比较,对照组与 ATRA + BDNF + CDDP 组间差异无显著性 ($P > 0.05$),说明 TrkB-BDNF 信号传导通路激活后可抑制顺铂对 SY5Y 细胞的诱导凋亡作用,使 NB 细胞对化疗药耐药;ATRA + K252a + BDNF + CDDP 组细胞凋亡率明显高于 ATRA + BDNF + CDDP 组 ($P < 0.01$),说明 K252a 阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路后,顺铂的诱导凋亡作用得以恢复;而 ATRA + K252a + BDNF 组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),说明 K252a 本身对 TrkB、BDNF 共表达的 NB 细胞无诱导凋亡作用,而是通过阻断 TrkB-BDNF 信号传导通路使顺铂发挥了对 NB 细胞的诱导凋亡作用。提前用 K252a 组未出现 p-TrkB 蛋白的表达,而未用 K252a 组 p-TrkB 表达阳性,这进一步说明特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 是通过阻断 TrkB 受体通路,使 TrkB 受体不能磷酸化而发挥作用;透射电镜技术也从形态学上支持 K252a 可使顺铂恢复对 SY5Y 的诱导凋亡作用。这就为 TrkB、BDNF 共表达的 NB 的治疗提供了理论依据。Nakagawara 等^[16]检测了 74 份 NB 病人瘤组织,发现有 31% 的 NB 病人共表达 TrkB 及 BDNF-mRNA,占病人总数的三分之一,因此本研究具有重要的临床意义。

[参 考 文 献]

[1] 张海燕,方军,谢小志,高宝辉. 儿童恶性肿瘤 275 例临床病理分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2002, 4(4): 323-324.
[2] 唐锁勤,黄东生,王建文,冯晨,杨光. 大剂量化疗、造血干细胞移植治疗Ⅳ期神经母细胞瘤的长期疗效研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 93-96.
[3] Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(3): 203-216.
[4] Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V,

Sieverts H, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1-2): 143-153.
[5] Kim S, Kang J, Qiao J, Thomas RP, Evers BM, Chung DH. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma[J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(4): 516-521.
[6] Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1314-1319.
[7] 李爱敏,张锦华,马力,荣道建. 脑源性神经营养因子对顺铂诱导的神经母细胞瘤细胞生长与凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(11): 1292-1293.
[8] Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, Klenk M, Wessels H, Hauffa BP, et al. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas[J]. Oncogene, 2005, 24(1): 165-177.
[9] Feng X, Jiang H, Baik JC, Edgar C, Eide FF. BDNF dependence in neuroblastoma[J]. J Neurosci Res, 2001, 64(4): 355-363.
[10] Edsjo A, Lavenius E, Nilsson H, Hoehner JC, Simonsson P, Culp LA, et al. Expression of TrkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment[J]. Lab Invest, 2003, 83(6): 813-823.
[11] Ruiz-Leon Y, Pascual A. Induction of tyrosine kinase receptor B by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Neuroscience, 2003, 120(4): 1019-1026.
[12] Wu K, Len GW, McAuliffe G, Ma C, Tai JP, Xu F, et al. Brain-derived neurotrophic factor acutely enhances tyrosine phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR1 via NMDA receptor-dependent mechanisms[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 130(1-2): 178-186.
[13] Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, Bando H, Mutoh M, Uchida T, et al. Expression of multi-drug resistance-related transporters in human breast carcinoma[J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92(4): 452-458.
[14] Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, et al. K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49473-49480.
[15] Serres F, Carney SL. Nicotin regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor[J]. Brain Res, 2006, 1101(1): 36-42.
[16] Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TrkB and BDNF in human neuroblastoma[J]. J Mol Cell Biol, 1994, 14(1): 759-767.

(本文编辑:吉耕中)