

论著 · 实验研究

TrkB-BDNF 信号通路对神经母细胞瘤 细胞分泌血管内皮生长因子的影响

李坤霞¹ 李爱敏¹ 张继红²

(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院儿科, 山东 烟台 264000;
2. 中国医科大学附属盛京医院血液研究室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨 TrkB-BDNF 信号通路对神经母细胞瘤(NB)细胞 SH-SY5Y 分泌血管内皮生长因子(VEGF)的影响。方法 Western blot 方法检测全反式维甲酸(ATRA)诱导前后 SY5Y 细胞 TrkB 蛋白表达及脑源性神经生长因子(BDNF)刺激后 SY5Y 细胞磷酸化-TrkB(p-TrkB)蛋白表达;ELISA 技术检测 ATRA、BDNF、特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 及 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后 SY5Y 细胞培养上清中 VEGF 含量。结果 ATRA 诱导前,SY5Y 细胞中未检测到 TrkB 蛋白表达;1,10,100 nM/L ATRA 处理后,SY5Y 细胞中可检测到 TrkB 蛋白表达,且 TrkB 蛋白表达水平随 ATRA 浓度增加逐渐升高,差异有统计学意义。10 nM/L ATRA 单独处理组未检测到 p-TrkB 表达,ATRA + BDNF 组可检测 p-TrkB 蛋白表达。ATRA + BDNF 组的 VEGF 含量明显高于对照组及 ATRA 组($P < 0.01$);ATRA + K252a + BDNF 组 VEGF 含量明显低于 ATRA + BDNF 组($P < 0.05$);ATRA + LY294002 + BDNF 组 VEGF 含量亦明显低于 ATRA + BDNF 组($P < 0.01$)。结论 激活 TrkB-BDNF 信号通路可促进 NB 细胞合成、分泌 VEGF;用 K252a 阻断 TrkB-BDNF 信号通路或用 LY294002 阻断 TrkB-BDNF 信号下游通路 PI3K/Akt 均可有效抑制 NB 细胞合成、分泌 VEGF。

[中国当代儿科杂志,2011,13(3):240-243]

[关键词] 神经母细胞瘤; TrkB-BDNF; LY294002; 血管内皮生长因子; SH-SY5Y 细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0240-04

Effects of TrkB-BDNF signal pathway on synthesis and secretion of vascular endothelial growth factor in human neuroblastoma cells

Li Kun-Xia, Li Ai-Min, ZHANG Ji-Hong. Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University School of Medicine, Yantai, Shandong 264000, China (Li A-M, Email: Liaimin 652002@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effects of TrkB-BDNF signal pathway on the synthesis and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neuroblastoma cells (NB). **Methods** TrkB protein expression in SY5Y cells before and after all-trans-retinoic acid (ATRA) treatment was detected by Western blot. p-TrkB protein expression in SY5Y cells before and after the treatment of ATRA along with BDNF was also detected by Western blot. VEGF concentrations in the SY5Y cell culture supernatants were measured using ELISA after the treatment with ATRA, BDNF, tyrosine kinase inhibitor K252a and PI3k inhibitor LY294002. **Results** TrkB protein was undetectable in SY5Y cells before ATRA treatment. After the treatment of 1, 10 and 100 nM/L ATRA for five days, TrkB protein was expressed in SY5Y cells and the TrkB protein level increased with the increasing ATRA concentration. p-TrkB protein was not expressed in SY5Y cells treated only with 10 nM/L ATRA, but it was detectable after the treatment of ATRA along with BDNF. VEGF concentrations in the group treated with ATRA + BDNF were significantly higher than those in the untreated control and the ATRA alone treatment groups ($P < 0.01$). VEGF concentrations in the K252a pretreated ATRA + BDNF group were significantly lower than those in the group treated with ATRA + BDNF ($P < 0.05$). VEGF concentrations in the LY294002 treatment group (ATRA + LY294002 + BDNF group) were also significantly lower than those in the group treated with ATRA + BDNF ($P < 0.01$). **Conclusions** Activation of TrkB-BDNF signal pathway may increase the synthesis and secretion of VEGF in human NB cells. The synthesis and secretion of VEGF can be inhibited by blocking TrkB-BDNF signal pathway with K252a or blocking the TrkB-BDNF downstream signal pathway PI3K/Akt with LY294002.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):240-243]

Key words: Neuroblastoma; TrkB-BDNF; LY294002; Vascular endothelial growth factor; SH-SY5Y cell

[收稿日期]2010-06-23;[修回日期]2011-01-15
[基金项目]烟台市科学技术计划项目(2008142-19)。
[作者简介]李坤霞,女,硕士,主治医师。
[通信作者]李爱敏,主任医师。

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童常见的恶性肿瘤,其生物特性及预后具有明显的异质性。近年研究表明神经营养素受体的表达与NB的预后关系密切:酪氨酸激酶受体A(tyrosin-kinase receptor A, TrkA)的高表达者预后良好,酪氨酸激酶受体B(tyrosin-kinase receptor B, TrkB)高表达者预后不良^[1]。TrkB的配体脑源性神经营养因子(binderived neurotrophic factor, BDNF)能提高NB细胞的存活、轴突延伸及细胞侵袭。特异性酪氨酸激酶受体抑制剂在体内体外均能够抑制NB的生长^[2-3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的血管生长因子之一,已证实与肿瘤生长、浸润、转移密切相关。VEGF的表达与NB的分期密切相关,VEGF水平在发生转移的NB病人明显高于未发生转移者^[4-5]。VEGF高表达是NB不良预后的标志^[6]。高表达TrkB的NB预后不良的机制是否与提高了VEGF的分泌有关,国内迄今未见报道。本研究采用ELISA技术检测NB细胞培养上清中VEGF含量,探讨TrkB-BDNF信号通路对VEGF的合成、分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

SH-SY5Y NB细胞系由美国国立癌症研究所希尔教授提供。BDNF为PeproTech, Inc产品,全反式维甲酸(ATRA)为ICN产品,McCoy's-5 A无血清培养基(美国sigma公司),抗TrkB抗体及抗磷酸化TrkB抗体(Santa Cruz产品),磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂LY294002(美国Sigma公司),K252a(特异性酪氨酸激酶抑制剂)购自美国sigma公司。VEGF定量ELISA试剂盒由上海森雄科技实验有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 SH-SY5Y细胞培养 人NB细胞株SY5Y培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM培养液中,培养条件为37℃、5%CO₂培养箱中。实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 Western-blot方法检测ATRA诱导前后TrkB、磷酸化-TrkB(p-TrkB)蛋白表达 TrkB蛋白表达检测中,SY5Y细胞分4组:(1)对照组;(2)1 nM/L ATRA组(1 nM/L ATRA处理5d);(3)10 nM/L ATRA组(10 nM/L ATRA处理5d);(4)100 nM/L ATRA组(100 nM/L ATRA处理5d)。p-TrkB蛋白表达检测中,SY5Y细胞分3组:(1)对照组;(2)ATRA组

(10 nM/L ATRA处理5d);(3)ATRA + BDNF组(10 nM/L ATRA处理5d后再加入100 ng/mL BDNF刺激15 min)。以上药物浓度均为终浓度。

收集好的细胞EP管中加入500 μL裂解液,用超声匀浆机匀浆,粉碎后置4℃冰箱过夜。电转移到硝酸纤维素膜上。封闭好的膜加入1:300稀释得兔抗人TrkB、p-TrkB多克隆抗体,4℃孵育过夜。加1:2000稀释的羊抗兔碱性磷酸酶标记的二抗,室温孵育2 h后取出膜,加碱性磷酸酶标记的显色剂,10~30 min后检测蛋白表达。

1.2.3 ELISA方法检测细胞培养上清中VEGF含量 实验分5组,均为对数生长期细胞。第1组为对照组;第2组:10 nmol/L ATRA处理5d;第3组:10 nmol/L ATRA处理5d后,再加100 ng/mL BDNF继续培养15 min;第4组为ATRA处理5d后,先加1.0 μM/L K252a预处理0.5 h再加100 ng/mL BDNF继续培养15 min;第5组细胞在10 nmol/L ATRA处理5d后,先加100 ng/mL BDNF继续培养15 min,再加20 μM/L LY294002。以上所有药物浓度均为终浓度。5组细胞在24 h后均更换McCoy's5A无血清培养基继续培养24 h,收获培养上清,离心后将上清液进行ELISA试验检测VEGF蛋白含量。按ELISA试剂盒说明检测培养上清液中VEGF蛋白含量。

1.3 统计学分析

采用SPSS11.5统计软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA诱导前后TrkB和p-TrkB蛋白表达

Western-blot检测结果:ATRA诱导前SY5Y细胞中未检测到TrkB蛋白表达。1、10、100 nmol/L ATRA处理5d后可检测到TrkB蛋白表达,且TrkB蛋白水平随ATRA浓度升高逐渐升高,见图1。

ATRA + BDNF组p-TrkB蛋白表达阳性,而对照组及ATRA组p-TrkB蛋白表达阴性。

2.2 ELISA检测细胞培养上清中VEGF含量

ATRA组VEGF蛋白含量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而ATRA + BDNF组VEGF蛋白含量较对照组及ATRA组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);TrkB-BDNF信号通路被阻断后,ATRA + K252a + BDNF组的VEGF蛋白含量较ATRA + BDNF组明显降低($P < 0.01$),与对照组及

ATRA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。加入 PI3K 抑制剂的 ATRA + LY294002 + BDNF 组 VEGF 蛋白含量较 ATRA + BDNF 组明显降低($P<0.01$)，而与对照组、ATRA 组及 ATRA + K252a + BDNF 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

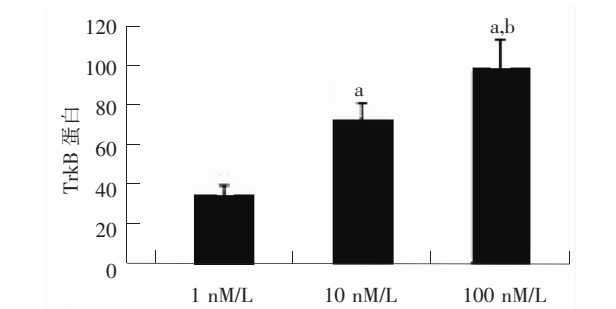


图 1 Western blot 检测不同浓度 ATRA 处理后的 TrkB 蛋白表达 a: 与 1 nM/L ATRA 组比较, $P<0.01$; b: 与 10 nM/L ATRA 组比较, $P<0.05$

表 1 ELISA 检测细胞培养上清中 VEGF 含量 ($\bar{x}\pm s$)	
组别	VEGF (pg/mL)
对照组	268 ± 85
ATRA 组	260 ± 78
ATRA + BDNF 组	476 ± 79 ^{a,b}
ATRA + K252a + BDNF 组	273 ± 64 ^c
ATRA + BDNF + ly294002 组	329 ± 66 ^c
F 值	11.84
P 值	<0.01

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与 ATRA 组比较, $P<0.01$; c: 与 ATRA + BDNF 组比较, $P<0.01$

3 讨论

神经营养素是一族由神经元、神经支配的靶组织或神经胶质细胞等分泌的多肽,是神经系统发育过程中的关键信号分子,它们与各自的受体结合引发了多种细胞反应,如存活、生长、分化、凋亡。神经营养素的受体酪氨酸激酶受体家族包括 TrkA、TrkB、TrkC 等被认为与 NB 的预后有关^[7]。研究发现 TrkA 和 TrkC 在预后良好的神经母细胞瘤中高表达,而在许多进展期 NB 中 TrkB 和 BDNF 表达水平较高,即 TrkB 和 BDNF 高表达是 NB 预后不良的标志。NB 容易发生转移,初诊时 70% 的病人已经发生了转移,而发生转移的病人总体存活率不超过 40%^[8]。VEGF 被认为是肿瘤生长和转移过程中最关键的因子^[9]。VEGF 增高的肿瘤更容易表现出肿瘤血管的增加、转移、对化疗药耐药和预后不良。不

少学者认为分化不良的 NB 中往往同时表达 TrkB 和 VEGF,且 VEGF 的表达与 TrkB 的表达呈明显正相关^[10]。但二者的关联未见报道。本研究选择了来源于 NB 患者的骨髓活检组织的 SY5Y 细胞株进行研究,发现对照组未检测到 TrkB 蛋白的表达,1、10、100 nM/L ATRA 诱导 5 d 均可检出 TrkB 蛋白,且蛋白表达量随 ATRA 浓度增加而增加。用 TrkB 的配体 BDNF 刺激 SY5Y 细胞后检测到了 p-TrkB 蛋白的表达。这表明 ATRA 可诱导 TrkB 蛋白的表达,且其诱导的 TrkB 是可以被配体激活的。而且 ATRA + BDNF 组的 VEGF 蛋白含量较对照组升高,提示 TrkB-BDNF 信号通路的激活可提高 NB 细胞分泌 VEGF,进而可能促进肿瘤的血管生成及肿瘤的转移。K252a 是一种特异性酪氨酸激酶抑制剂^[11-12],用 K252a 阻断 TrkB-BDNF 后 VEGF 含量明显下降,提示阻断 TrkB-BDNF 信号通路可减低 VEGF 合成,进而可能减少肿瘤血管生成,抑制肿瘤侵袭转移。

PI3K/丝氨酸-苏氨酸激酶信号通路(PI3K-Akt)为 TrkB-BDNF 的下游信号通路。多种研究表明,PI3K-Akt 信号通路在肿瘤的发生发展中起重要作用^[13]。该通路调节肿瘤细胞的增殖和存活,其活性异常不仅能导致细胞恶性转化,而且与肿瘤的迁徙、转移、血管生成以及细胞外基质的降解密切相关。本研究用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 阻断 PI3K-Akt 信号通路后,VEGF 含量明显下降。提示 TrkB-BDNF 信号通路激活后可能通过进一步激活其下游 PI3K-Akt 信号通路促进肿瘤细胞 VEGF 的合成,故阻断 PI3K-Akt 信号通路同样能抑制 VEGF 的合成分泌,进而抑制肿瘤的血管生成及迁徙转移。

综上所述,TrkB-BDNF 信号通路的激活可引起 VEGF 分泌增加,阻断 TrkB-BDNF 信号通路及其下游 PI3K-Akt 信号通路均能抑制 VEGF 的合成分泌。这提示高表达 TrkB 的 NB 预后不良的原因可能与增加了肿瘤细胞的 VEGF 合成、分泌有关,TrkB-BDNF 信号通路是 NB 血管生成的潜在刺激因素,阻断该信号通路可抑制肿瘤的血管生成,从而抑制肿瘤的转移。这也为 NB 的抗血管治疗提供了新靶点。

[参 考 文 献]

[1] Iyer R, Evans AE, Qi X, Ho R, Minturn JE, Zhao H, et al. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(5): 1478-1485.
[2] 张继红,张锦华,李爱敏,范莹. 神经生长因子受体对神经母细

胞瘤血管生成作用的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6 (2): 93-97.

[3] 杨华强, 张荣环, 章正华, 石楚成, 夏云金. 急性淋巴细胞白血病患者血浆血管内皮生长因子及组织因子的测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 526-528.

[4] Nowicki M, Konwerska A, Ostalska-Nowicka D, Derwich K, Mis-kowiak B, Kondraciuk B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C-a potent risk factor in children diagnosed with stadium 4 neuroblastoma[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(4): 493-499.

[5] El-Houseini ME, Abdel-Azim SA, El-Desouky GI, Abdel-Hady S, El-Hamad MF, Kamel AM. Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2004, 16(1): 57-61.

[6] Jakovijević G, Culić S, Stepan J, Bonevski A, Seiwerth S. Vascular endothelial growth factor in children with neuroblastoma: a retrospective analysis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 143.

[7] Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 5962-5967.

[8] Zhu H, Zheng J, Xiao X, Zheng S, Dong K, Liu J, et al. Envi-ronmental endocrine disruptors promote invasion and metastasis of SK-N-SH human neuroblastoma cells[J]. Oncol Rep, 2010, 23 (1): 129-139.

[9] Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(3): 247-256.

[10] Zhang J, Zheng Y, Wang Y, Tong H. The studies on the correla-tion for gene expression of tyrosine-kinase receptors and vascular endothelial growth factor in human neuroblastomas[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2010, 32(3): 180-184.

[11] Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, Ponzetto C. K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor[J]. Oncogene, 2002, 25, 21(32): 4885-4893.

[12] Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, et al. K252a and CEP1347 are neuroprotective com-pounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49473-49480.

[13] Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor out-growth and metastasis[J]. J Cancer Res, 2010, 70(10): 4151-4162.

(本文编辑:俞 燕)