

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201506005

· 论著 ·

## 阻断 BDNF-TrkB 通路对鼻咽癌细胞 血管内皮生长因子表达的影响

陈月红<sup>1</sup>, 李仕晟<sup>2</sup>, 杨新明<sup>2</sup>

(1. 湖南省人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410005; 2. 中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410011)

**摘要:** 目的 分析酪氨酸激酶受体抑制剂 K252a 抑制酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinases B, TrkB) 表达, 观察 K252a 对 TrkB 基因与蛋白表达及 VEGF 表达的影响。方法 MTT 实验比较不同浓度 K252a 对鼻咽癌 CNE-1 细胞生长的影响, 并计算细胞生存率, 筛选出 K252a 最佳干预浓度; 分别用 RT-PCR、Western-blot 检测 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞后 TrkB、VEGF 在 mRNA 以及蛋白层面表达的改变并与对照组比较差异。结果 MTT 实验: K252a 能明显抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞的增殖, 且抑制作用与 K252a 干预时间、浓度呈正相关。400 nmol/L 为 K252a 最佳干预浓度。K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞后, 与对照组相比, TrkB 蛋白表达水平及 mRNA 表达下调, 同时, VEGF 蛋白表达水平及 mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ )。结论 抑制 TrkB 表达可降低鼻咽癌 CNE-1 细胞生长增殖能力并降低 VEGF 表达, 从而减弱生长与迁移能力, 从而通过调控 VEGF 影响鼻咽癌血管形成。

**关键词:** 鼻咽癌; 血管形成; 酪氨酸激酶 B

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)06-0453-05

## Influence of BDNF-TrkB channel inhibition on expression of VEGF in human nasopharyngeal carcinoma

CHEN Yue-hong, LI Shi-sheng, YANG Xin-ming

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the influence of K252a, an inhibitor of tyrosine kinases B (TrkB) receptor, on expression of TrkB and VEGF in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE-1. **Methods** Human NPC cell line CNE-1 was treated with K252a of different concentration. Cell proliferation in different groups was measured by MTT assay. Optimal concentration for intervention of K252a was determined. After treated with K252a of optimal concentration, changes in expression of VEGF and TrkB at mRNA and protein level were examined with Western blot and real-time PCR. **Results** ① MTT assay showed that K252a could inhibit proliferation of cell line CNE-1, which was positively correlated with the intervention time and concentration of K252a. Optimal concentration for intervention of K252a was 400 nmol/L. ② Western blot revealed that K252a led to significantly decreased expression of both TrkB protein and VEGF protein (both  $P < 0.05$ ). ③ Real-time PCR showed significantly decreased expression of TrkB mRNA and VEGF mRNA (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhibition of TrkB expression leads to inhibition of tumor growth and down-regulation of VEGF expression, which indicates that TrkB plays a role in angiogenesis of NPC via regulating VEGF expression.

**Key words:** Nasopharyngeal neoplasm; Angiogenesis; Tyrosine kinase receptor B

酪氨酸激酶受体 B (tyrosine Kinases B, TrkB) 是脑源性神经生长因子 (brain derived neurotrophic fac-

tor, BDNF) 的特异性受体<sup>[1]</sup>。近年的大量研究发现 BDNF 及其受体 TrkB 参与了多种实体瘤 (胰腺导管腺癌、前列腺癌、膀胱癌) 和血液系统恶性肿瘤 (多发性骨髓瘤) 的发病过程<sup>[2]</sup>。TrkB 可能为一种癌基因<sup>[3]</sup>, 赋予癌细胞生存和侵袭转移的特性, 还可

作者简介: 陈月红, 女, 博士研究生, 住院医师。  
通信作者: 杨新明, Email: x16y2003@dllyen.com

通过神经营养作用及促进瘤内新生血管生成,支持肿瘤的生长。由于鼻咽癌具有高转移特性,已有研究证实 TrkB 的抗凋亡作用<sup>[4]</sup>,促进上皮间质化<sup>[5]</sup>作用而促进肿瘤的生存和侵袭转移。BDNF-TrkB 信号传导通路不仅神经系统中产生多种生物学效应,而且还促进内皮细胞生存,诱导缺血组织血管新生以及上调肿瘤血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平<sup>[6]</sup>。本研究探讨通过酪氨酸激酶受体抑制剂 K252a 抑制 TrkB 表达,观察 K252a 对 TrkB 基因及蛋白表达影响及对 VEGF 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

本实验使用 CNE-1 细胞由中南大学湘雅二医院耳鼻喉科库存于中心实验室鼻咽癌 CNE-1 细胞。置于含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基常规培养,取对数生长期细胞进行实验。

### 1.2 MTT 实验

$4.5 \times 10^3$  个接种于 96 孔培养板,培养 24 h 待其贴壁后,以无血清培养基洗涤 2 次,实验组分别用 200  $\mu$ l 不同浓度梯度的 TrkB(0、100、200、300、400、500、800 nmol/L)干预;以 10% FBS RPMI-1640 为对照组,分别于培养 24、48、72 h 后吸去培养液,每孔再加入 MTT 至终浓度为 500  $\mu$ g/ml,继续培养 4 h。弃培养液,加入 DMSO 150  $\mu$ l,振荡使结晶溶解后酶标仪读取 A490 值。增殖率 = (实验组 A 值/对照组 A 值 - 1)  $\times$  100%。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。以时间为横坐标,增殖率为纵坐标绘制细胞生长曲线。

### 1.3 RT-PCR

细胞总 RNA 提取:采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法提取干预前后 CNE-1 细胞的总 RNA,用 DNA/RNA 紫外检测仪测定其含量及浓度。取总 RNA 9  $\mu$ l 加入 M-MLV 逆转录酶 1  $\mu$ l 逆转录,利用软件 Primer Premier 5.0 设计上下游引物,VEGF、TrkB 退火温度( $T_m$ )分别为 50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C,最后按照此条件进行所有样品的 PCR 扩展。

Product length 492 bp 用 1  $\times$  TAE 配制 1% 琼脂糖凝胶,灌胶前加入 0.5  $\mu$ l EB 使终浓度为 0.5  $\mu$ g/ml;4.5  $\mu$ l 反应产物中加入 0.5  $\mu$ l 10  $\times$  loading buffer,上样。150 V 恒压电泳。溴酚蓝迁移至电

泳胶 2/3 处停止电泳;凝胶成像系统下观察。

### 1.4 Western blot

收集 K252 干预的和未干预的 CNE-1 细胞经冷 PBS 冲洗,加入预冷的细胞裂解液溶解,置于冰上 30 min,4 $^{\circ}$ C、12 000  $\times$  g 离心 20 min,收集上清。蛋白质经 Bradford(BioRad)分析定量后调整蛋白浓度一致。加等量的 2  $\times$  SDS 上样缓冲液,94 $^{\circ}$ C 变性 10 min。60  $\mu$ g 的细胞总蛋白质经 10% SDS-PAGE 电泳分离、转移至硝酸纤维素膜;室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h;兔抗人 VEGF 多克隆抗体 1:200;兔抗人 TrkB 多克隆抗体 1:500;兔抗人  $\beta$ -Actin 单克隆抗体 1:1 000,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBS /0.1% Tween-20 洗涤 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:2 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;TBS /0.1% Tween-20 洗涤 3 次后,用 ECL 发光法(Amersham Biosciences),常规显影。抗体经缓冲液剥脱后,再以抗  $\beta$ -actin 抗体二次检测  $\beta$ -actin,作为校正上样量。

## 2 结果

### 2.1 MTT 实验检测 TrkB 对鼻咽癌 CNE-1 细胞生长的影响

本研究发现,不同浓度 K252a(0、50、100、200、300、400、500、800 nmol/L)作用于 CNE-1 细胞后,细胞生长受抑制(图 1),K252a 对 CNE-1 细胞生长的抑制作用与其干预时间、浓度呈正相关。K252a 作用 48 h 使鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖率抑制最明显的浓度为 400 nmol/L,生存减少 50% (与对照组相比),故选取此浓度为 K252a 最佳干预浓度。

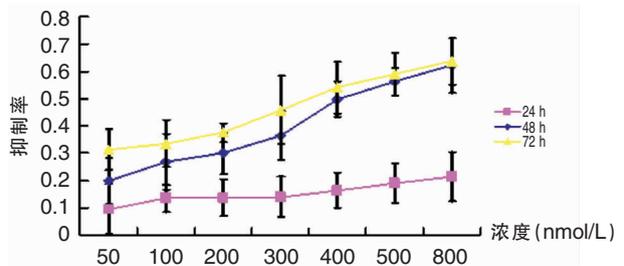


图 1 K252a 对鼻咽癌细胞 CNE-1 的生长的影响

### 2.2 K252a 抑制 CNE-1 细胞中 TrkB 蛋白及 mRNA 表达的影响

Western blot 检测实验组和对照组 TrkB 蛋白表达,以  $\beta$ -actin 为参考。结果显示:K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞 48h 后,TrkB 蛋白表达及转录水平下调(图 2、3;表 1)。

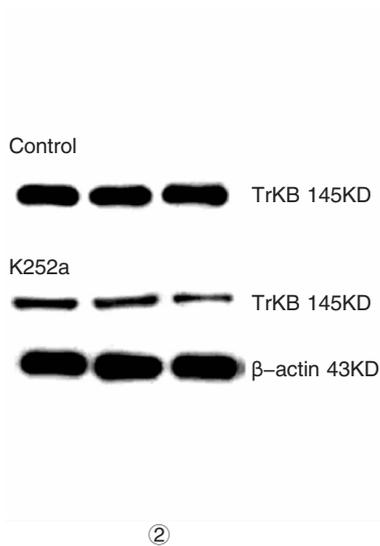


图2 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TrkB 相对蛋白量 PCR 产物电泳图

表1 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TrkB 相对蛋白量及 RT-PCR OD 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	实验组	P
相对蛋白量	0.631 ± 0.015	0.313 ± 0.028	0.006
RT-PCR OD 值	0.67 ± 0.037	0.435 ± 0.063	0.005

### 2.3 K252a 下调鼻咽癌 CNE-1 细胞 VEGF 蛋白表

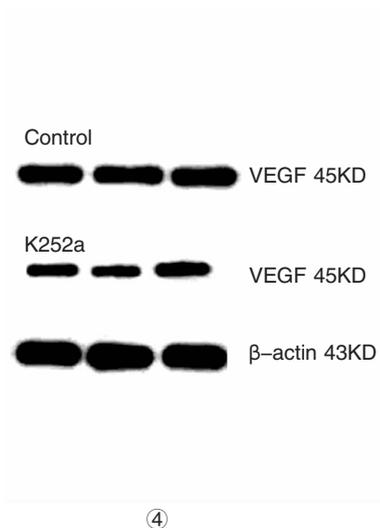


图4 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 VEGF 相对蛋白量

表2 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 VEGF 相对蛋白量及 RT-PCR OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	K252a 组	P
相对蛋白量	0.6883 ± 0.019	0.378 ± 0.044	0.002
RT-PCR OD 值	0.692 ± 0.049	0.425 ± 0.017	0.002

### 2.4 TrkB 蛋白表达下调降低 VEGF 的蛋白表达及

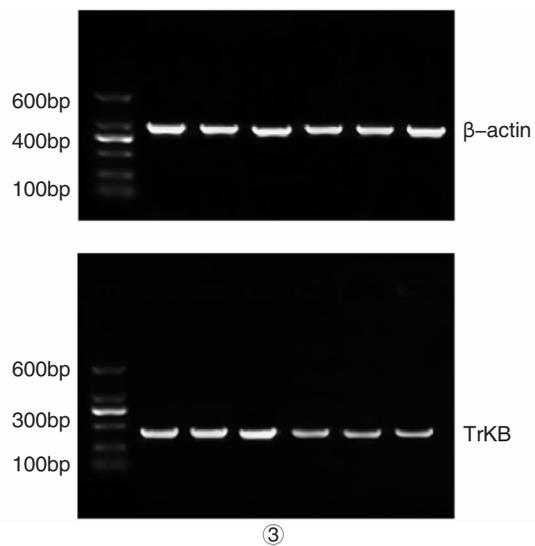


图3 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞后 TrkB mRNA 表达 RT-PCR 产物电泳图

### 达及转录水平

K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 VEGF 相对蛋白量及 VEGF mRNA 表达 RT-PCR 产物电泳图具体结果见图4、5。K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 VEGF 相对蛋白量及 RT-PCR OD 值比较差异均具有统计学意义( $P=0.002$ ),具体结果见表2。

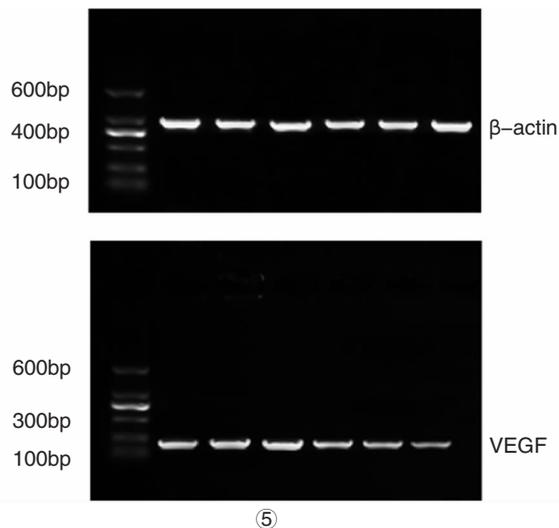


图5 VEGF mRNA 表达 RT-PCR 产物电泳图

### 转录水平

K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TrkB、VEGF 相对蛋白量比较具体结果见图6;K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TRKB、VEGF mRNA 的 RT-PCR OD 值具体结果见图7;两者差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

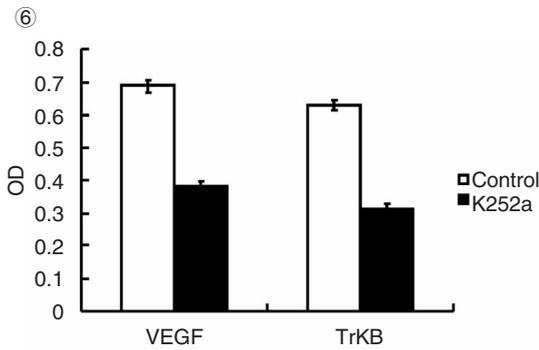


图 6 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TrkB、VEGF 相对蛋白量比较图

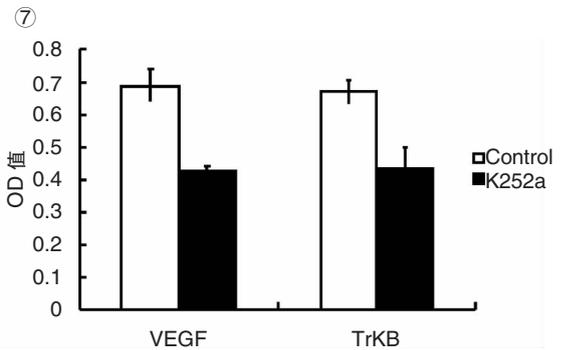


图 7 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞前后 TRKB、VEGFmRNA 的 RT-PCR 值比较

### 3 讨论

近年来研究发现 TrkB 的过度表达或过度激活参与多种肿瘤如神经母细胞瘤 NB<sup>[7]</sup>、多发性骨髓瘤 (MM)<sup>[8]</sup> 等的发生发展过程,一些非神经源性的肿瘤如视母细胞瘤、肾母细胞瘤以及肺、前列腺癌等<sup>[9-12]</sup> 均发现有 TrkB 受体的表达,EB 病毒转化的 B 淋巴细胞及 EB 病毒相关的鼻咽癌细胞中也可见过度表达。

K252a 是一种特异性酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, Trk) 抑制剂,可特异性阻断在高浓度时可通过阻断 Trk 信号转导通路,降低 TrkB 磷酸化的程度,抑制神经生长因子的分泌。本部分用不同浓度 K252a (0、50、100、200、300、400、500、800 nmol/L) 分别作用于 CNE-1 细胞 24、48、72 h 后,结果发现 K252a 明显抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞的增殖,使细胞数量减少、密度减低、细胞生存率下降, K252a 对鼻咽癌细胞生长的抑制作用随浓度提高和作用时间延长而逐渐增强。表明 K252a 能抑制鼻咽癌细胞中 TrkB 的表达,并降低鼻咽癌细胞的增殖能力。400 nmol/L 的 K252a 作用 48 h 时抑制率为  $(49.7 \pm 0.021)\%$ ,且抑制作用最明显,因此,我们将此浓度和干预时间作为此后鼻咽癌细胞的干预的浓度和时间。

经最佳浓度干预后我们发现鼻咽癌细胞 CNE-1 中 TrkB 蛋白及基因表达下调,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明降低 TrkB 表达后鼻咽癌细胞的增殖能力减弱,与胞内的表达水平有关,从而影响鼻咽癌增殖及侵袭转移能力。

VEGF 是目前发现的最重要的血管生成因子,VEGF 通过促进肿瘤血管形成参与与肿瘤发生发展

的过程,有研究表明在头颈恶性肿瘤中,VEGF 对肿瘤新生血管有诱导作用,而且可能作为判断头颈肿瘤发展及转移潜能及预后的指标。国内外少数涉及 TrkB 通过 VEGF 影响肿瘤的新生血管能力的研究。最新研究发现 BDNF/TrkB 不仅能提高内皮细胞存活,刺激 TrkB 阳性的内皮细胞表达 VEGF 受体,还能提高 HUVE 细胞增殖、迁移能力,并促进网状血管形成<sup>[13]</sup>。Lam 等<sup>[14]</sup> 发现高表达 TrkB 通过提高肝细胞肝癌的 VEGF 和基质蛋白水平,增强肿瘤的新生血管形成和侵袭能力。Katsuya Nakamura 等<sup>[15]</sup> 发现神经母细胞瘤中,BDNF/TrkB 通过活化 PI3K 与 mTOR 途径引起 HIF-1 $\alpha$  的增加,从而促进 VEGF 表达和复制,进而可能促进肿瘤的血管生成及肿瘤的转移。亦有研究报道<sup>[16]</sup> 多发性骨髓瘤浆细胞表面 TrkB 活化可提高其分泌促血管新生因子 VEGF 的能力,促进肿瘤转移。有关 TrkB 通过影响 VEGF 在鼻咽癌的在体内外实验环境中对鼻咽癌细胞生物学行为的影响鲜有研究。本实验发现降低 TrkB 表达水平后鼻咽癌增殖能力减弱是由于促血管生成因子 VEGF 表达下调有关。本实验通过 Western-blot 发现鼻咽癌细胞 CNE-1 中 TrkB、VEGF 蛋白表达水平,结果表明, K252a 干预的鼻咽癌 CNE-1 细胞 TrkB 表达下调 ( $P = 0.006$ ),代表血管生成能力血管生成因子 VEGF 表达下调 ( $P = 0.002$ ),差异有统计学意义。说明干预后,抑制人鼻咽癌 CNE-1 细胞中的 TrkB 表达可以导致 VEGF 水平下降,从而影响鼻咽癌侵袭转移能力。但是如何使 VEGF 下调机制尚不明确。

我们进一步通过通过 RT-PCR 实验检测 K252a 干预鼻咽癌 CNE-1 细胞对 VEGF 的转录是否有影响。RT-PCR 实验结果显示,鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞经 K252a 干预处理后,细胞内 VEGF mRNA 表达

下调,这提示我们 K252a 在转录水平上对 VEGF 进行了调控,具体机制还需要进一步的探索。我们进一步实验验证,降低 TrkB 水平能下调 VEGF 表达,抑制鼻咽癌血管形成,抑制肿瘤细胞增殖和侵袭转移。

降低 TrkB 表达水平能通过降低其 VEGF 表达,从而减弱鼻咽癌体外生长及迁移能力。上述结果表明,TrkB 在鼻咽癌的恶性发展中发挥重要作用,并与鼻咽癌新生血管形成关系密切。

#### 参考文献:

[1] Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, et al. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group*[J]. *Neuron*, 1993 Aug,11(2):321-331.

[2] ME Kupferman, Jiffar T, El-Naggar A, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*,2010,29(14):2047-2059.

[3] Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. *Nature*, 2004, 430(7003):1034-1039.

[4] Thomas R. Geiger and Daniel S. Peeper Critical Role for TrkB Kinase Function in Anoikis Suppression, Tumorigenesis, and Metastasis[J]. *Cancer Res*, 2007,67(13):6221-6229.

[5] ME Kupferman1, T Jiffar1, A El-Naggar2, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2010,29:2047-2059.

[6] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization[J]. *Development*, 2000, 127(21):4531-4540.

[7] Li Z1, Zhang Y, Tong Y. Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in

vitro and in vivo[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015,16(3):477-483.

[8] Ai LSI, Sun CY, Wang YD. Gene silencing of the BDNF/TrkB axis in multiple myeloma blocks bone destruction and tumor burden in vitro and in vivo[J]. *Int J Cancer*, 2013 Sep 1, 133(5):1074-1084.

[9] Wagner N, Wagner KD, Sefton M, et al. An abnormal response of retinoblastoma cells (Y 79) to neurotrophins[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41:1932-1939.

[10] Siyang Zhang, Dawei Guo, Wenting Luo, et al. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells BMC[J]. *Cancer*, 2010, 10(1):43.

[11] SinkeviciusKW, KrieglC, BellariaKJ. Neurotrophinreceptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014 Jul 15, 111(28):10299-10304.

[12] Montano X, amgoz MB. Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer[J]. *FEBS Lett*, 2004, 571(1-3):1-8.

[13] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization[J]. *Development*, 2000, 127(21):4531-4540.

[14] Lam CT, Yang ZF, Lau CK, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization; implication in hepatocellular carcinoma Clinical[J]. *Cancer Research*, 2011,17(10):3123-3133.

[15] Katsuya Nakamura, Kelly C. Martin, et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1A in neuroblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8):4249-4255.

[16] Sun CY, Hu Y, Guo T, et al. Study of brain-derived neurotrophic factor activating TrkB signaling cascades in the pathogenesis of multiple myeloma[J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2008 Apr, 29(4):238-242.

(修回日期:2015-10-01)

## · 消息 ·

### 版权说明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊已被《中国学术期刊网络出版总库》及 CNKI 系列数据库收录,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时向本刊声明,本刊将作适当处理。