

外源性神经生长因子对人胰腺癌 MIA PaCa-2 细胞增殖能力的影响

Nerve Growth Factor on the Proliferation of Human Pancreatic Carcinoma Cells

MENG Ling-xin¹, DING Zhao-jun¹, CHEN Xi-ping¹,
ZHANG Hong¹, CHI Yu-hua¹, ZHAO Zhi-gang², SHI Yu-rong²
(1. Oncology Department, Jining Medical College Affiliated Rizhao People's Hospital, Rizhao Cancer Therapy Center, Rizhao 276826, Shandong; 2. 211-Projects State Key Laboratory of Experimental Cancer, Tianjin Medical University Cancer Hospital, Tianjin 300060, China)

孟令新¹/丁兆军¹/陈希平¹/张红¹/

迟玉华¹/赵智刚²/史玉荣²

(1. 济宁医学院附属日照市人民医院肿瘤科, 日照市肿瘤治疗中心, 山东日照 276826; 2. 天津医科大学肿瘤医院国家肿瘤学“211工程”中心实验室 天津 300060)

【摘要】背景与目的: 观察外源性神经生长因子(β -NGF)对人胰腺癌 MIA PaCa-2 细胞增殖及细胞周期的影响, 为深入探讨胰腺癌侵袭转移及调控机制提供实验依据。材料与方法: 将不同浓度的 β -NGF 和酪氨酸激酶特异性抑制剂 K252a 作用于体外培养的 MIA PaCa-2 细胞不同时间, 应用克隆平板实验、MTT 实验和流式细胞术检测外源性 β -NGF 对 MIA PaCa-2 细胞增殖及细胞周期的影响。结果: 经 β -NGF 处理的 MIA PaCa-2 细胞平均克隆形成率均明显高于对照组($P < 0.05$), 100 ng/ml β -NGF 克隆形成率最高。随着 β -NGF 浓度的增加和培养时间的延长, 吸光度 OD 值逐渐增加, 100 ng/ml 浓度组培养 72 h 时 OD 值达最高, 增殖率达 48.68%。而随着 K252a 浓度的增加, MIA PaCa-2 细胞在 24、48、72 h 和 96 h 时细胞 OD 值与对照组相比逐渐降低($P < 0.05$), 100 ng/ml 作用 72 h 组细胞 OD 值抑制率最大, 为 18.05%。 β -NGF 诱导 MIA PaCa-2 细胞 G_0/G_1 期百分比升高, 而 S 期、 G_2/M 期百分比降低, 其诱导作用的最佳质量浓度是 100 ng/ml, 最佳时间为 72 h。结论: β -NGF 具有促进胰腺癌 MIA PaCa-2 细胞增殖的作用。

【关键词】胰腺癌; 神经生长因子; 细胞培养; 流式细胞仪; 增殖

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2009)05-0334-05

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To investigate the effect of nerve growth factor(β -NGF) on the proliferative ability and cell cycle of human pancreatic carcinoma cells MIA PaCa-2. **MATERIALS AND METHODS:** Colony forming efficiency of MIA PaCa-2 cells treated with β -NGF was higher than normal group($P < 0.05$), especially with the 100 ng/ml β -NGF group. Absorbance gradually increased, along with β -NGF concentration enhancement and culture time prolongation. Proliferation rate reached 48.68% when cultured 72 hours in 100 ng/ml β -NGF group. However, absorbance gradually decreased in K252a group at 24, 48, 72 h and 96 h. Inhibition rate was reduced to 18.05% in 100 ng/ml K252a group. Effect of different concentrations of β -NGF and K252a on MIA PaCa-2 cells proliferation was evaluated by MTT and Flow Cytometry. **RESULTS:** β -NGF promoted MIA PaCa-2 proliferation and growth which were markedly inhibited by K252a($P < 0.05$). **CONCLUSION:** β -NGF could enhance the proliferation of MIA PaCa-2 pancreatic carcinoma cells.

【KEY WORDS】 pancreatic carcinoma; nerve growth factor(β -NGF); cell culture; flow cytometry; proliferation

胰腺癌是一种恶性程度高、诊治困难、预后极差的消化系统恶性肿瘤。根治性手术切除是胰腺癌唯一有效的治疗手段。尽管近年来诊治技术有了较快发展, 其 5 年存活率仍然不到 4%。沿神经间隙浸润和转移是胰腺癌的重要生物学特性之一, 也是胰腺癌难以根治和容易

复发的重要原因。在此过程中, 多种细胞因子发挥作用, 神经生长因子(nerve growth factor, NGF) 是其中的重要一员。我们曾经成功建立了胰腺癌原位移植瘤动物模型^[1], 并探讨了 β -NGF 对 MIA PaCa-2 胰腺癌细胞的浸润、侵袭能力的影响^[2-3]。为进一步探讨 β -NGF 在人胰

收稿日期: 2009-03-19; 修改日期: 2009-04-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(30801051), 日照市人民医院博士科研启动基金资助项目

作者简介: 孟令新(1979-), 男, 山东省日照人, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤的基础研究与临床治疗。E-mail: menglx001623@163.com; Tel: 0633-3365377

腺癌 MIA PaCa-2 细胞增殖中的作用, 笔者观察了 β -NGF 和酪氨酸激酶 (TrKA) 特异性抑制剂 K252a 在不同浓度和不同时间对 MIA PaCa-2 细胞增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验仪器与材料

Tecan A-5082 Sunrise 全自动酶标仪 (Austria); Coulter EPICS-XL 流式细胞仪 (FCM, USA); 细胞培养瓶/96 孔培养板 (Costar, 美国); 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS IX 70, 日本)。 β -NGF (Recombinant Human-NGF, CytoLab Ltd/PEPROTECH ASIA, 美国); K252a (ALEXIS, Switzerland); FBS、DMEM 培养液 (天津圣东生物科技公司); 胰蛋白酶 (TRYPsin 生物制剂公司); 青霉素/链霉素 (华北制药公司)。

1.2 细胞培养

MIA PaCa-2 细胞 (MD Anderson Cancer Center 馈赠) 为高转移未分化人胰腺癌细胞系, 具成瘤率高和稳定的生物学特性。该细胞置于 37 °C、相对湿度 100%、5% CO₂ 培养箱、含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中培养, 每 3~4 d 换液 1 次, 0.25% 胰蛋白酶每 5~6 d 消化传代 1 次, 呈贴壁生长。

1.3 平板克隆形成实验

取生长旺盛的 MIA PaCa-2 细胞, 用 0.25% 胰酶 (含 0.01% EDTA) 消化、离心、弃上清, 制成单细胞悬液。在 6 孔板中分别加入含 500 个细胞的单细胞悬液, 孵箱内培养 24 h 后分别加入含不同终浓度 β -NGF (0、10、50、100、150、500 ng/ml) 的 DMEM 培养液, 每个浓度组设 3 个复孔, 置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 10 d。至肉眼可见细胞克隆时, 终止培养, 甲醇固定 15 min; 姬姆萨染色 20~30 min。显微镜下计数细胞数大于 50 的克隆数, 按下式计算克隆形成率 (%)。

$$\text{克隆形成率}(\%) = (\text{集落形成数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

1.4 MTT 细胞增殖实验

待生长状态良好的细胞覆盖培养瓶 90% 时, 用 0.25% 胰酶消化 3~5 min 配成单细胞悬液, 以每孔 2×10^4 / ml 的浓度接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l。实验分 4 组: 对照组 (只加培养基)、单独 β -NGF 组、单独 K252a 组和 β -NGF + K252a 联合组。每孔分别加入含不同终浓度 (0、50、100、150 ng/ml) 的 β -NGF、K252a、 β -NGF + K252a 至无血清培养液中, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱分别培养 24、48、72 h 及 96 h。培养 3~5 d 后, 取出 96 孔板, 弃上清, 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μ l 继续培养 4 h 后终止。每孔加入 150 μ l DMSO 终止反应, 震荡 15 s, 使结晶物充分溶解。570 nm 波长, 自动酶标仪测定各孔吸光

度 OD 值, 每个浓度组设 5 个复孔, 实验重复 3 次, 记录结果取均值。以细胞生长时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线, 并按下式计算细胞增殖率 (proliferation rate, PR) 和抑制率 (inhibitor rate, IR)。

$$\text{增殖率}(\%) = (\beta\text{-NGF 组吸光度值} - \text{对照组吸光度值}) / \text{对照组吸光度值} \times 100\%$$

$$\text{K252a 抑制率}(\%) = (\text{对照组吸光度值} - \text{K252a 组吸光度值}) / \text{对照组吸光度值} \times 100\%$$

1.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞同步化后, 实验 I 组分别加入 0、50、100 和 150 ng/ml β -NGF、K252a 和 β -NGF + K252a 200 μ l 连续培养 72 h, 每天换液。实验 II 组分别加入浓度为 100 ng/ml 的 β -NGF、K252a 和 β -NGF + K252a 200 μ l, 连续观察 96 h, 每天进行流式检测。实验 II 组细胞用 0.25% 胰酶消化 3~5 min, 制成 5×10^5 / ml 单细胞悬液, 将 1 ml 悬液移至 15 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加 4 °C 70% 预冷乙醇 8 ml, 吹打均匀, 4 °C 固定 12 h 以上, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 洗涤去乙醇, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次; 0.5 ml PBS 重悬细胞, 加入碘化丙啶 (PI) 至 RNaseA 终浓度 50 μ g/ml, 室温避光 30 min 后上机检测。计算各细胞周期细胞百分比, 每组重复 3 次, 取均值。

1.6 统计学方法

以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 15.0 软件进行分析。组间用独立样本 *t* 检验, 多组比较采用方差分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结 果

2.1 平板克隆形成实验

在 0~100 ng/ml 之间随 β -NGF 浓度增高, 克隆形成率呈逐渐增加趋势, 与对照组相比较, 差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。100~500 ng/ml 浓度之间, 克隆形成率逐渐降低, 但仍明显高于对照组 (*P* < 0.05)。100 ng/ml β -NGF 的克隆形成率最高, 而 100 ng/ml 组与 150 ng/ml 组克隆形成率相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见图 1~3。

2.2 MTT 细胞增殖实验

2.2.1 单独 β -NGF 组

结果见表 1。100 ng/ml 浓度组培养 72 h 时 OD 值达最高, 之后逐渐进入平台期。除 50 ng/ml 浓度组在 24 h 时与对照组相比差异无统计学意义外, 其它各组均显著高于对照组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.2.2 单独 K252a 组

随着 K252a 浓度的增加, 各组 OD 值呈逐渐降低的



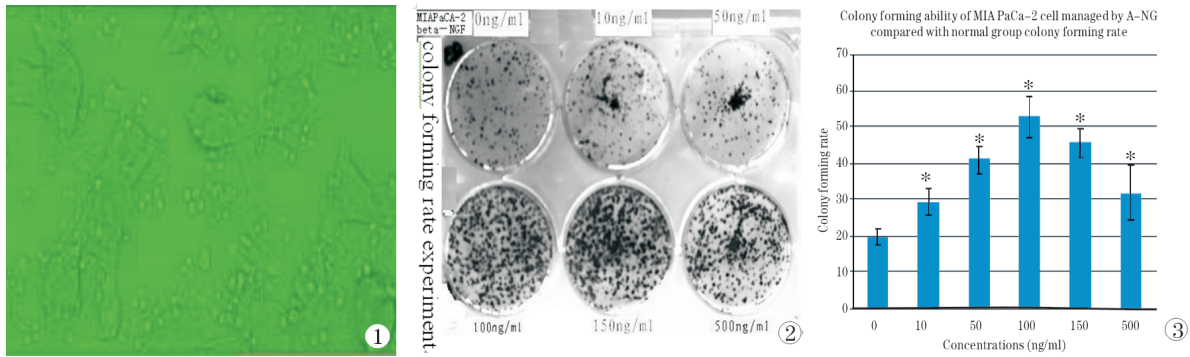


图 1 倒置荧光显微镜下对照组 MIA PaCa-2 细胞克隆形成情况 (× 200) ;图 2 不同浓度 β-NGF 处理组与对照组 MIA PaCa-2 细胞克隆形成情况 ;图 3 不同浓度 β-NGF 处理组与对照组 MIA PaCa-2 细胞克隆率比较

Figure 1 MIA PaCa-2 cell colony forming in normal group (× 200) ; Figure 2 MIA PaCa-2 cell colony forming in different concentrations of β-NGF and normal group ; Figure 3 MIA PaCa-2 cell colony forming in different concentrations of β-NGF and normal group

表 1 β-NGF及K252a不同浓度、不同时间组MIA PaCa-2 细胞吸光度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison for MIA PaCa-2 cell absorbance at different β-NGF, K252a concentrations and time($\bar{x} \pm s$)

Groups (ng/ml)	n	24 h		48 h		72 h		96 h		
		OD	PR/IR (%)	OD	PR/IR (%)	OD	PR/IR (%)	OD	PR/IR (%)	
Control	-	5	0.406 ± 0.031	0.00	0.478 ± 0.024	0.00	0.532 ± 0.016	0.00	0.558 ± 0.025	0.00
β-NGF	50	5	0.443 ± 0.032	9.11 ± 3.22	0.569 ± 0.025 [#]	19.04 ± 4.17	0.653 ± 0.027 [*]	22.74 ± 6.88	0.680 ± 0.022 [*]	21.86 ± 10.12
	100	5	0.507 ± 0.013 [#]	24.88 ± 5.80	0.629 ± 0.034 [#]	31.59 ± 12.47	0.791 ± 0.035 [#]	48.68 ± 11.86	0.751 ± 0.063 [#]	34.59 ± 12.25
	150	5	0.504 ± 0.032 [#]	24.14 ± 3.22	0.623 ± 0.025 [#]	30.33 ± 4.26	0.724 ± 0.028 [#]	36.09 ± 17.25	0.743 ± 0.042 [#]	33.15 ± 13.53
K252a	50	5	0.386 ± 0.032	4.93 ± 3.22	0.446 ± 0.035	6.69 ± 3.23	0.491 ± 0.025 [*]	7.71 ± 3.36	0.508 ± 0.034	8.96 ± 3.12
	100	5	0.357 ± 0.021 [#]	12.07 ± 8.47	0.408 ± 0.033 [#]	14.64 ± 6.82	0.436 ± 0.033 [#]	18.05 ± 7.32	0.458 ± 0.053 [#]	17.92 ± 4.67
	150	5	0.345 ± 0.027 [#]	15.02 ± 12.90	0.401 ± 0.029 [#]	16.11 ± 5.36	0.437 ± 0.026 [#]	17.86 ± 6.45	0.458 ± 0.037 [#]	17.92 ± 6.83
β-NGF + K252a	50	5	0.414 ± 0.026	1.97 ± 0.13	0.496 ± 0.046	3.77 ± 1.27	0.557 ± 0.046	4.69 ± 1.68	0.585 ± 0.043	4.84 ± 2.90
	100	5	0.427 ± 0.037	5.17 ± 2.26	0.518 ± 0.042	8.37 ± 2.53	0.613 ± 0.048 [*]	15.22 ± 6.41	0.604 ± 0.056	8.24 ± 3.67
	150	5	0.446 ± 0.031 [*]	9.85 ± 3.59	0.531 ± 0.036 [*]	11.09 ± 4.78	0.603 ± 0.026 [*]	13.35 ± 5.15	0.601 ± 0.067	7.71 ± 3.91

Compared with control group, [#] P < 0.01, ^{*} P < 0.05

趋势。K252a 各浓度组的各时间点 OD 值均较对照组低,其中 50 ng/ml 作用 72 h 组以及 100、150 ng/ml 各浓度组均较对照组显著降低 (P 均 < 0.01)。当 100 ng/ml 作用 72 h 时细胞 OD 值抑制率最大,为 18.05%。

2.2.3 β-NGF + K252a 联合组

随着作用时间延长,各浓度组 OD 值有逐渐增加趋势,但 100、150 ng/ml 时细胞的 OD 值从 72 h 后均开始降低;在 48 h 内随着浓度增加,细胞 OD 值有逐渐升高趋势。100 ng/ml 组仅在 72 h 时与对照组相比差异有统计学意义 (P < 0.05),而 150 ng/ml 组在 24、48 和 72 h 与对照组相比差异均有统计学意义 (P < 0.05)。

2.3 流式细胞术检测结果

2.3.1 不同浓度 β-NGF 及 K252a 诱导 MIA PaCa-2 细胞 72 h 细胞周期时相比较

结果见表 2。β-NGF 组:与对照组比较 G₀/G₁ 期时相细胞百分比从 50 ng/ml 开始降低,至 100 ng/ml 降至最低,之后呈上升趋势;S 期和 G₂/M 期从 50 ng/ml 诱导开始升高,至 100 ng/ml 达高峰,之后呈降低趋势,除 150 ng/ml 诱导组 G₂/M 期较对照组差异无统计学意义外,其它各组与对照组比较,差异均有统计学意义 (P < 0.05

或 P < 0.01)。G₀/G₁ 期、S 期时相细胞比例 100 ng/ml 组与 50、150 ng/ml 组相比,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01),且 G₂/M 期时相细胞比例 100 ng/ml 组显著高于 150 ng/ml 组 (P < 0.01)。

K252a 组:G₀/G₁ 期时相细胞百分比至 100 ng/ml 达最高,之后呈下降趋势;S 期从 50 ng/ml 浓度诱导开始降低,至 100 ng/ml 降至最低,之后呈增加趋势;G₂/M 期表 2 不同浓度 β-NGF、K252a 诱导 MIA PaCa-2 细胞 72 h 细胞周期的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison for MIA PaCa-2 cell cycle at different concentrations of β-NGF and K252a in 72 hours($\bar{x} \pm s$)

Groups	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	
Control	-	50.4 ± 2.9	20.4 ± 2.7	29.2 ± 1.5
β-NGF (ng/ml)	50	37.0 ± 2.8 [*]	28.4 ± 1.7 [▲]	34.6 ± 1.2 [▲]
	100	24.3 ± 2.4 [*] #	40.6 ± 3.3 [*] #	35.1 ± 4.5 [*] ◆
	150	39.3 ± 4.3 [*]	32.6 ± 3.5 [*]	28.1 ± 3.2
K252a (ng/ml)	50	43.8 ± 2.6 [▲]	16.4 ± 2.2	39.8 ± 2.9 [▲]
	100	65.5 ± 3.7 [*]	13.4 ± 1.4 [▲]	21.1 ± 2.4 [▲]
	150	52.3 ± 5.2	18.6 ± 2.5	29.1 ± 3.0
β-NGF + K252a (ng/ml)	50	47.1 ± 3.6	22.4 ± 3.8	30.5 ± 3.4
	100	35.0 ± 6.9 [*]	32.7 ± 4.1 [*]	32.3 ± 5.8
	150	44.9 ± 8.5 [▲]	26.5 ± 4.6 [▲]	28.6 ± 3.9

Compared with control, ^{*} P < 0.01, [▲] P < 0.05. β-NGF groups: compared with 50 ng/ml, 150 ng/ml in G₀/G₁ and S phase, [#] P < 0.01; compared with 150 ng/ml in G₂/M phase, [◆] P < 0.01.

至 100 ng/ml 达到最低,50 ng/ml 组 G₀/G₁ 期、G₂/M 以及 100 ng/ml 各诱导组与对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01)。

β-NGF + K252a 联合组:与对照组相比,G₀/G₁ 期时相细胞百分比从 50 ng/ml 诱导开始有降低趋势,至 100 ng/ml 降至最低,之后呈增加趋势;S 期和 G₂/M 期从 50 ng/ml 浓度诱导开始增加,至 100 ng/ml 达高峰,之后呈降低趋势,100、150 ng/ml 诱导组 G₀/G₁ 期和 S 期与对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.01 或 P < 0.05),而 G₂/M 期各组与对照组相比均无明显差异(P > 0.05)。

2.3.2 100 ng/ml β-NGF 及 K252a 诱导 MIA PaCa-2 不同时间细胞周期时相比较

结果见表 3。β-NGF 组 G₀/G₁ 期时相细胞百分比从诱导 24 h 开始降低,至 72 h 降至最低,之后呈上升趋势;S 期从诱导 24 h 开始升高,至 72 h 达到高峰,之后呈降低趋势;G₂/M 期诱导 24 h 降低,从 48 h 后开始升高,诱导 72 h 和 96 h 组均明显高于对照组(P < 0.05 或 P < 0.01)。G₀/G₁ 期、S 期诱导各时间组与对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01),且 72 h 组与其它时间组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。

K252a 组 G₀/G₁ 期时相细胞百分比从诱导 24 h 开始增加,至 72 h 升至最高,72 h 之后呈下降趋势;S 期和 G₂/M 期从诱导 24 h 开始降低,至 72 h 降至最低,之后呈增加趋势,诱导 48 h、72 h 与对照组比较,差异均有统计学意义(P < 0.05 或 P < 0.01)。

β-NGF + K252a 联合组:G₀/G₁ 期时相细胞百分比自 24 h 起开始降低,从 48 h 起均较对照组明显降低(P < 0.01);而 S 期从诱导 24 h 起开始升高,从 48 h 起均明显高于对照组(P < 0.05 或 P < 0.01),G₂/M 期时相细胞百分比仅 96 h 组显著高于对照组(P < 0.05)。

表 3 β-NGF及K252a诱导MIA PaCa-2细胞不同时间周期时相比较
Table 3 Comparison for MIA PaCa-2 cell cycle at different concentrations of β-NGF,K252a and times

Groups		G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Control	0 h	50.4 ± 2.9	20.4 ± 2.7	29.2 ± 1.5
β-NGF (100 ng/ml)	24 h	42.6 ± 4.8 [▲]	29.6 ± 4.6 [▲]	27.8 ± 3.6
	48 h	36.2 ± 4.2 [*]	33.3 ± 5.3 [*]	30.5 ± 4.2
	72 h	24.3 ± 2.4 ^{*#}	40.6 ± 3.3 ^{*#}	35.1 ± 4.5 [▲]
	96 h	31.4 ± 5.6 [*]	32.5 ± 4.6 [*]	36.1 ± 5.3 [▲]
K252a (100 ng/ml)	24 h	57.4 ± 5.5 [▲]	17.3 ± 2.4	25.3 ± 2.3
	48 h	60.3 ± 4.8 [*]	15.2 ± 3.6 [▲]	24.5 ± 4.7 [▲]
	72 h	65.5 ± 3.7 [*]	13.4 ± 1.4 [*]	21.1 ± 2.1 [▲]
	96 h	54.2 ± 4.1	19.6 ± 3.3	26.2 ± 3.5
β-NGF + K252a (100 ng/ml)	24 h	48.2 ± 3.6	25.3 ± 3.9	26.5 ± 2.6
	48 h	40.5 ± 4.5 [*]	28.4 ± 4.3 [▲]	31.1 ± 5.2
	72 h	35.0 ± 6.9 [*]	32.7 ± 4.1 [*]	32.3 ± 5.8
	96 h	37.2 ± 2.8 [*]	27.2 ± 3.8 [▲]	35.6 ± 6.3 [▲]

Compared with control, *P < 0.01, ▲P < 0.05; β-NGF groups: compared with other groups, #P < 0.01.

3 讨论

胰腺癌起病隐匿,易向临近重要解剖结构侵犯和转移。胰腺癌细胞的转移方式除了淋巴管、血行转移以外,还可沿神经鞘膜下间隙发生神经浸润和转移。沿神经间隙浸润和转移是胰腺癌的重要生物学特性之一,也是胰腺癌难以根治、易于复发的重要原因之一。14% 具神经浸润的肿瘤出现局部复发,而无神经浸润者无复发;多种细胞因子参与该过程,NGF 就是其中重要一员^[4]。

NGF 作为神经营养因子家族成员的典型代表,含有 α、β、γ 3 个亚基。其中 β-NGF 是神经生长因子的活性亚单位,发挥全部生物学效应,α 和 γ 亚基的作用是维持 β 亚基的稳定性、调节其生物活性。NGF 有两种细胞膜受体:TrkA 和 p75NGFR 受体。NGF 高表达于胰腺癌细胞,与分布于神经束膜上的高亲和力受体 TrkA 相互作用,使神经与癌细胞相接触,导致 TrkA 介导的周围神经浸润^[5]。此外,NGF 还能通过旁分泌或自分泌途径刺激胰腺癌细胞生长、增殖^[6],通过上调基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases, MMP-2) 表达促进细胞侵袭力^[7]。目前抑制 NGF/TrkA 传导通路的方法已用于某些疾病的实验性治疗。例如:三苯氧胺可抑制 NGF 诱导乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖^[8],抗 NGF 单抗可抑制乳腺癌细胞的增殖和转移,促进凋亡^[9]。

平板克隆形成实验和 MTT 实验提示,应用 β-NGF 具有促进 MIA PaCa-2 细胞克隆形成作用,β-NGF 组胰腺癌细胞增殖能力均显著高于对照组(P < 0.05),在 0~100 ng/ml 范围内呈量效关系,100 ng/ml 为 β-NGF 最佳作用浓度。本结果与 Zhu 等^[6] 研究结果一致。而 MTT 实验显示 K252a 可明显抑制胰腺癌细胞增殖,100 ng/ml 为 K252a 最佳浓度。Chuenkova MV^[10] 报道 NGF 和 TrkA 结合后,TrkA 发生磷酸化,进而通过激活 PI3K/Akt 激酶途径引起癌细胞增殖。K252a 作为 TrkA 特异性抑制剂,可能通过阻断 NGF 与 TrkA 结合,进而阻断 PI3K/Akt 激酶途径激活而抑制胰腺癌细胞增殖。K252a 可部分抑制细胞生长增殖,高浓度 β-NGF + K252a 作用于细胞,可引起细胞增殖降低,推测癌细胞 TrkA 表达水平有一定量限制,当 β-NGF 达到一定浓度使 TrkA 饱和后,β-NGF 还可作用于受体 P75NGFR,通过激活 NF-κB 信号传导通路引起细胞凋亡。

我们用 50、100、150 ng/ml β-NGF 诱导 MIA PaCa-2 细胞 72 h,结果表明,G₀/G₁ 期细胞百分比降低,S 和 G₂/M 期细胞百分比增加,100 ng/ml NGF 诱导组与 50、150 ng/ml 组差异显著。为何 150 ng/ml β-NGF 使 G₀/G₁ 期



百分比升高,而S期、G₂/M期百分比降低,原因尚不清楚。推测100 ng/ml为β-NGF最佳浓度,此时β-NGF和高亲和力受体TrkA充分结合,将配体-受体结合信号传递给细胞内影响细胞内某些基因的表达和调控,最终引起细胞增殖。β-NGF浓度高于100 ng/ml时,可能与P75结合进而诱导细胞进入静息期或凋亡。我们用100 ng/ml β-NGF诱导MIA PaCa-2细胞不同时间,从诱导24 h开始,G₀/G₁期细胞百分比降低,72 h达最低值;而S期和G₂/M期细胞百分比增加,诱导72 h达最高,可认为对照组大部分细胞停滞在G₀/G₁期,仅少部分癌细胞进入增殖周期参与细胞增殖。癌细胞在β-NGF诱导作用下可使细胞由G₀/G₁期进入S期、G₂/M期,增加DNA合成、促进癌细胞有丝分裂,从而促进MIA PaCa-2细胞分裂增殖。但是何种原因导致100 ng/ml β-NGF作用72 h后使得G₀/G₁期百分比升高,而S期、G₂/M期百分比降低,原因尚不清楚,推测也与癌细胞TrkA表达量有关。β-NGF诱导MIA PaCa-2细胞最佳时间为72 h,此时β-NGF可诱使处于G₀/G₁期细胞进入S期。因此,β-NGF调控细胞分裂增殖与细胞增殖周期密切相关。

属于TNF受体超家族的P75膜蛋白,可通过阻滞前列腺癌PC-3细胞于G₀/G₁期和减少S期时相而延迟细胞周期进展。无相应配体时,表达p75的细胞发生凋亡是经由内源性线粒体途径、引起caspase-9和caspase-7激酶激活、阻滞细胞周期运行、增加凋亡核片段,而导致凋亡。故p75可诱发不依赖配体的细胞凋亡。但有NGF存在时,NGF可打断对细胞周期的阻滞,通过cyclin/cdk全酶复合体启动周期正常运行^[11]。可见,NGF低亲和力受体P75NGFR主要介导细胞凋亡,本实验发现在G₁期前往往会出现矮小凋亡峰,推测是由P75受体诱导MIA PaCa-2细胞引起的,与MIA PaCa-2细胞自身表达P75受体有关,具体机制有待深入研究。

总之,外源性β-NGF可通过TrkA、P75NGFR共同调节胰腺癌细胞的增殖与凋亡,K252a可通过特异性抑制TrkA受体,部分抑制β-NGF促细胞增殖作用。此外,胰腺癌细胞本身可能还分泌一定量β-NGF,一方面促进自身增殖;另一方面,可能与表达于神经束膜的高亲和力受体TrkA结合,为神经细胞轴突的生长提供适宜的微环境和化学趋向性,促进神经细胞轴突向肿瘤方向

生长,进而造成癌细胞对神经纤维的浸润,与形成肿瘤沿神经纤维转移有关。

参考文献:

- [1] 孟令新,李强,李杰,等.人胰腺癌细胞系MIA PaCa-II神经侵袭原位移植瘤动物模型的建立[J].中华实验外科杂志,2008,25(6):805.
- [2] 孟令新,李强,薛英杰,等.神经生长因子对人胰腺癌细胞系MIA PaCa-2侵袭能力的初步研究[J].中华肝胆外科杂志,2008,14(11):796-800.
- [3] 孟令新,薛英杰,李强,等.β-NGF对人胰腺癌细胞系浸润与运动能力影响及其机制的初步研究[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(15):1136-1139.
- [4] 郭伟,邹声泉.胆胰肿瘤神经浸润和转移的研究进展[J].国外医学外科学分册,2002,29(3):158-160.
- [5] Zhu ZW, Friess H, Fabio F, et al. Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(8): 2419-2428.
- [6] Zhu Z, Kleeff J, Kaye H, et al. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells[J]. Mol Carcinogenesis, 2002, 35(3): 138-147.
- [7] Okada Y, Eibl G, Guha S, et al. Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells[J]. Clin Exp Meta, 2004, 21(4): 285-292.
- [8] Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, et al. Tamoxifen inhibits nerve growth factor induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7[J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 3002-3008.
- [9] Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 346-351.
- [10] Chuenkova MV, Pereira PM. Chagas' disease parasite promotes neuron survival and differentiation through TrkA nerve growth factor receptor[J]. J Neurochem, 2004, 91(2): 385-394.
- [11] Khwaja F, Tabassum A, Allen J, et al. The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(4): 1184-1192.