

BDNF 和 TrkB 在肝细胞癌中的表达及其功能研究*

郭大伟^① 侯学忠^② 张弘彬^① 孙文郁^① 朱磊^① 姜晓峰^① 梁健^①

摘要 目的:研究 BDNF 及其受体 TrkB 在人肝细胞癌(HCC)中的表达,并探讨二者在 HCC 发生、发展中的作用。**方法:**采用免疫组织化学方法检测 BDNF 和 TrkB 在 65 例 HCC 组织中的表达。在人 HCC 细胞系 HepG2 中,采用 ELISA 方法检测 BDNF 在培养上清中的分泌水平,分别采用流式细胞术和 Transwell 细胞侵袭方法测定 BDNF 中和抗体或 TrkB 激酶活性抑制剂 K252a 处理对细胞凋亡和侵袭的影响。**结果:**65 例 HCC 组织标本中,41 例(63.1%)高表达 BDNF,36 例(55.4%)TrkB 阳性表达,而且 BDNF 高表达于多发性 HCC($P < 0.01$),TrkB 阳性率在多发性 HCC 中较高($P < 0.05$)。此外,BDNF 高表达和 TrkB 阳性均与晚期 HCC 显著相关(P 均 < 0.05)。BDNF 在 HepG2 细胞培养上清中的浓度为(88.56±7.45)pg/mL。BDNF 抗体或 K252a 均可有效诱导 HepG2 细胞凋亡,并抑制细胞侵袭。**结论:**BDNF/TrkB 可能对 HCC 细胞的存活和侵袭具有重要的支持作用,并促进 HCC 的发展演进。

关键词 脑源性神经营养因子 Tropomyosin 相关激酶 B 肝细胞癌 凋亡 侵袭

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.13.007

Expression and Functions of BDNF and TrkB in Hepatocellular Carcinoma

Dawei GUO¹, Xuezhong HOU², Hongbin ZHANG¹, Wenyu SUN¹, Lei ZHU¹, Xiaofeng JIANG¹, Jian LIANG¹

Correspondence to: Jian LIANG, E-mail: liangj63110@vip.sina.com

¹Department of General Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

²Department of General Surgery, No. 463 Hospital of PLA of China, Shenyang 110042, China

This work was supported by the Scientific Research Foundation of the Higher Education Institutions of Liaoning Province (No. 2009A729)

Abstract Objective: To investigate the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its primary receptor, tropomyosin-related kinase B (TrkB) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and to evaluate the functions of these proteins in the oncogenesis and progression of HCC. **Methods:** The expression of BDNF and TrkB in 65 HCC cases was evaluated via immunohistochemical staining. In the human HCC HepG2 cell lines, the secretory BDNF in the supernatant liquid was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The effects of BDNF-neutralizing antibody and the Trk tyrosine kinase inhibitor K252a on apoptosis and invasion were examined using flow cytometry and a Transwell assay, respectively. **Results:** Higher BDNF expression (63.1%) or positive TrkB expression (55.4%) was found in the HCC specimens. More cases of intrahepatic multiple tumors were found in HCCs with higher BDNF expression ($P < 0.01$). Similarly, HCCs with negative for TrkB tended to be solitary tumors ($P < 0.05$). In addition, patients with higher levels of BDNF expression or positive TrkB expression had more advanced stages of HCC ($P < 0.05$). The level of BDNF secretion in HepG2 cells was 88.56 pg/ml ± 7.45 pg/ml. Both anti-BDNF and K252a antibodies effectively induced apoptosis and suppressed the invasion of the HepG2 cells. **Conclusion:** BDNF and TrkB are essential for the survival and invasion of the HCC cells. BDNF/TrkB signaling may be an effective target for promoting HCC advancement.

Keywords Brain-derived neurotrophic factor; Tropomyosin-related kinase B; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis; Invasion

肝细胞癌(HCC)是全世界致死率最高的肿瘤之一,HCC 细胞很容易经门静脉及其分支播散,形成肝内多发肿瘤结节,患者常预后不良^[1]。多发性 HCC 通常指肝内发现多个肿瘤结节,在临床上认为是肝内转移或多中心发生形成的 HCC^[2]。HCC 细胞侵袭并进入血管存活下来,是形成肝内转移所必需的。深入研究 HCC 细胞肝内转移的相关分子机制有可能显著改善患者预后。BDNF(brain-derived neurotrophic factor)属于神经生长因子家族,在维持神经元细胞的

存活和生长方面具有重要作用。TrkB(Tropomyosin-related kinase B)是 BDNF 最主要的受体,具有受体酪氨酸激酶的活性。研究显示,BDNF 和 TrkB 在多种人类肿瘤中表达上调,包括神经母细胞瘤^[3]、乳腺癌^[4]等,TrkB 高表达预示着胃癌出现远隔转移且患者预后不良^[5]。TrkB 经 BDNF 活化,诱导下游一系列信号通路分子的活化,如 Akt^[6]和 ERK^[7],调节多种细胞生物学行为,如细胞增殖、分化、凋亡和侵袭。对 HCC 的研究发现,BDNF 和 TrkB 在脱壁培养的 HCC

作者单位:①中国医科大学附属第四医院普外科(沈阳市 110032);②中国人民解放军 463 医院普外科

* 本文课题受辽宁省教育厅 2009 年度高等学校科研项目(编号:2009A729)资助

通信作者:梁健 liangj63110@vip.sina.com

BEL7402细胞中表达上调,促进细胞以不依赖于锚定的方式生长,可以抵抗脱壁诱导的细胞凋亡^[8]。尽管目前有较多关于BDNF和TrkB促进肿瘤进展方面的研究,但其在多发性HCC的作用还不明确。本研究在65例HCC组织标本中检测了BDNF和TrkB的表达,再利用BDNF中和抗体或Trk受体酪氨酸激酶抑制剂K252a分析其对HCC细胞凋亡和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 选取中国医科大学附属第四医院肝胆外科2006年1月至2011年6月间手术切除,经术后病理诊断为肝细胞癌65例患者,术前未经过任何治疗。对肿瘤组织切片常规HE染色,由2位副高级病理科医师准确诊断,并根据AJCC/UICC TNM分期系统(2003年第6版)进行肿瘤分期。临床病理学特征包括肿瘤分布(单发或多发)、分化、分期及淋巴结转移等(表1,2)。

表1 65例HCC组织中BDNF表达与临床病理学参数的关系
Table 1 Correlation between the clinicopathologic characteristics and BDNF expression in 65 HCC cases

项目		BDNF		P
		高表达(n=41)	低表达(n=24)	
分布	单发	10	15	0.002
	多发	31	9	
组织学分级	高分化	23	7	0.036
	中低分化	18	17	
TWM分期	I+II	7	12	0.005
	III	34	12	
淋巴结转移	+	19	4	0.016
	-	22	20	

表2 65例HCC组织中TrkB表达与临床病理学参数的关系
Table 2 Relationship between clinicopathologic characteristics and TrkB expression in 65 HCC cases

项目		TrkB		P
		阳性(n=36)	阴性(n=29)	
分布	单发	10	15	0.049
	多发	26	14	
组织学分级	高分化	20	10	0.090
	中低分化	16	19	
TWM分期	I+II	6	13	0.013
	III	30	16	
淋巴结转移	+	14	9	0.510
	-	22	20	

1.1.2 人HCC细胞系 人HCC细胞系HepG2购自南京凯基公司,HepG2细胞使用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,37℃、5%CO₂条件培养。

1.1.3 主要试剂及抗体 BDNF兔多抗和TrkB兔多抗(Santa Cruz公司);SP免疫组织化学试剂盒和DAB显色试剂盒(福州迈新公司);RPMI-1640培养基(Gibco公司);Annexin V-FITC Kit和Matrigel基质胶(BD Biosciences公司);Transwell小室(Costar公司);人BDNF Quantikine™ ELISA Kit(R&D Systems公司);K252a(Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 65例HCC组织切片常规脱蜡并水化。抗原修复后,3% H₂O₂于37℃孵育30 min,羊血清于37℃孵育30 min,一抗抗-BDNF(1:100)或抗-TrkB(1:50)于4℃孵育过夜。羊抗兔IgG于37℃孵育30 min,SP复合物于37℃孵育30 min,最后DAB显色。胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒视为阳性细胞,由2名病理科医师分别评分。随机选取5个400×镜下视野,分别评价BDNF染色强度(1为弱,2为强)和阳性细胞百分比(0~5%为0,6%~50%为1,≥51%为2),上述两项相乘作为每个组织标本BDNF染色的最后评分:阴性0分,低表达≤2分,高表达4分。随机选取5个400×镜下视野,计数TrkB阳性细胞百分比,>10%为TrkB阳性标本。

1.2.2 ELISA 细胞培养24 h后离心收集上清液用于检测BDNF的分泌水平。采用人BDNF Quantikine™ ELISA试剂盒,50 μL待测样品或标准品用100 μL Assay Diluent稀释后,加到孔板中室温孵育2 h,再加入100 μL BDNF偶联抗体室温孵育1 h。充分漂洗后加入200 μL底物溶液显色。多功能酶标仪校正波长设定570 nm,于450 nm波长处读取吸光度值。

1.2.3 细胞处理 为了中和培养上清中的BDNF,80%~90%融合的细胞用Anti-BDNF(20 μg/mL)处理24 h。为了干扰TrkB受体酪氨酸激酶活性,80%~90%融合的细胞用K252a(0.1 μmol/L)处理24 h,处理后的细胞再进行凋亡或侵袭测定。将细胞分为对照组、Anti-BDNF组和K252a处理组。

1.2.4 Annexin V-FITC双染法测定细胞凋亡 细胞处理24 h后,用冰冷的PBS漂洗2次,重悬于1×Binding Buffer(1×10⁶/mL)。取100 μL细胞悬液(1×10⁵细胞)与5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI充分混匀,室温避光孵育15 min。再加入400 μL 1×Binding Buffer,上流式细胞仪测定凋亡细胞百分比,实验重复3次。

1.2.5 Transwell小室检测细胞侵袭能力 处理24 h后消化细胞(1×10⁴)并接种在含有8 μm孔径膜的Transwell上室,膜预包被含Matrigel基质胶,上室含有1% FBS的RPMI-1640培养基,下室含10% FBS的RPMI-1640培养基,继续培养24 h。用棉签小心擦去膜上表面未发生迁移的细胞,而膜下表面细胞用4%

多聚甲醛固定,结晶紫染色。随机选取5个200×镜下视野计数侵袭细胞数,结果为3个复孔的平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件处理数据。BDNF或TrkB表达与HCC临床病理学参数之间的关系用 χ^2 检验,单向方差分析用于比较不同处理组细胞之间的差异用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色检测65例HCC组织标本中BDNF和TrkB的表达

BDNF表达于57例(87.7%)HCC组织,其中41例(63.1%)高表达,24例(36.9%)低表达(包括阴性表达)。TrkB在HCC组织中的阳性表达率为55.4%(36/65),阴性表达率为44.6%(29/65)。BDNF/TrkB表达与临床病理学参数关系(表1),BDNF高表达于多发性HCC($P=0.002$),同时TrkB阳性率在多发性HCC中较高($P=0.049$)。此外,BDNF高表达和TrkB阳性均与晚期HCC显著相关($P=0.005, P=0.013$),而且BDNF在不同分化程度和有无淋巴结转移HCC中的表达差异有统计学意义($P=0.036, P=0.016$)。Spearman分析发现,BDNF和TrkB的表达正相关($r=0.275, P=0.026$,表3);同时还发现,二者共表达与临床病理分期相关($P=0.008$,表4,图1)。

表3 65例HCC组织中BDNF与TrkB表达的相关分析 例

Table 3 Correlation analysis of BDNF and TrkB expression in 65 HCC cases

BDNF	例数	TrkB		<i>r</i>	<i>P</i>
		阳性(<i>n</i> =36)	阴性(<i>n</i> =29)		
高表达	41	27	14	0.275	0.026
低表达	24	9	15		

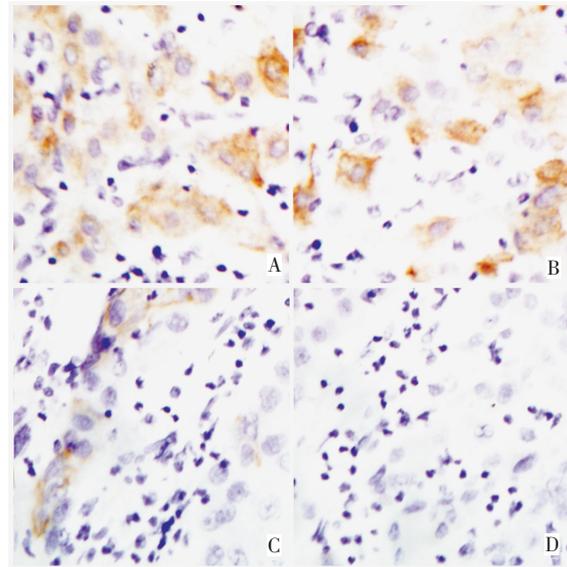
表4 BDNF和TrkB共表达与临床病理学参数的关系 例

Table 4 Correlation between BDNF/TrkB coexpression and clinicopathologic characteristics in 65 HCC cases

项目		BDNF/TrkB		<i>P</i>
		共表达(<i>n</i> =35)	均不表达(<i>n</i> =7)	
分布	单发	10	5	0.077
	多发	25	2	
组织学分级	高分化	23	3	0.397
	中低分化	12	4	
TNM分期	I+II	10	6	0.008
	III	25	1	
淋巴结转移	+	13	5	0.118
	-	22	2	

2.2 HepG2细胞分泌BDNF水平检测结果

多种人类肿瘤均能分泌BDNF,帮助肿瘤细胞生长和存活。本研究采用ELISA方法检测HepG2细胞培养上清中BDNF的分泌水平。结果显示,HepG2细胞培养上清中BDNF的浓度为(88.56±7.45)pg/mL,提示HepG2细胞分泌BDNF,对细胞本身具有一定的生物学功能。



A, B:多发性HCC组织标本,BDNF高表达,TrkB阳性表达;C, D:单发HCC组织标本,BDNF低表达,TrkB阴性表达

图1 免疫组化方法检测BDNF和TrkB在HCC组织中的表达(×400)

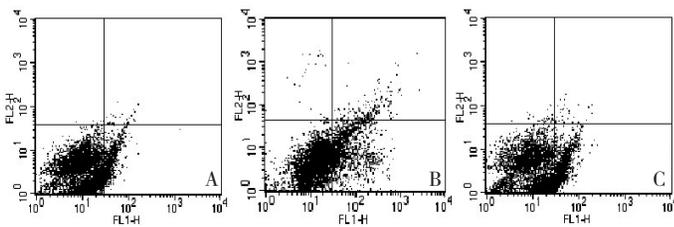
Figure 1 Immunohistochemical assay for BDNF and TrkB expression in HCC (×400)

2.3 Anti-BDNF中和抗体或Trk激酶抑制剂促进细胞凋亡

BDNF/TrkB保护肿瘤细胞耐受失巢凋亡,因此本研究检测了阻断BDNF/TrkB对HCC细胞凋亡的影响。结果显示,对照组、Anti-BDNF组、K252a组处理24h后,HepG2细胞的凋亡率分别为(10.2±0.4)%、(19.1±0.9)%和(19.4±0.8)%,差异有统计学意义($P<0.001$,图2)。结果表明,BDNF中和抗体或TrkB激酶活性抑制剂K252a均可不同程度的拮抗BDNF/TrkB对HepG2细胞的保护作用,诱导HepG2细胞发生凋亡。

2.4 Anti-BDNF中和抗体或TrkB激酶活性抑制剂抑制HCC细胞侵袭

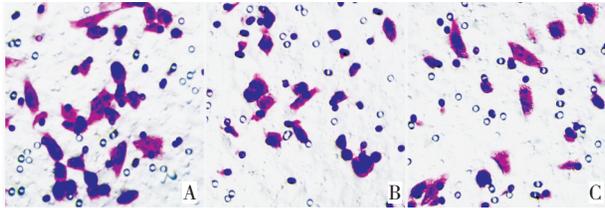
为了检测BDNF/TrkB对HCC细胞侵袭能力的影响,用Anti-BDNF或K252a处理HepG2细胞,Transwell小室测定侵袭细胞数的变化。对照组、Anti-BDNF组、K252a组处理24h后,HepG2细胞的侵袭细胞数分别为38.6±1.8、30.3±1.5和32.2±1.7($P=0.002$,图3)。结果表明,Anti-BDNF或K252a可以有效阻断HepG2细胞的侵袭。



► A: 对照组; B: Anti-BDNF 组; C: K252a 组

图2 Anti-BDNF 或 K252a 促进 HepG2 细胞凋亡

Figure 2 Promotion of cell apoptosis under anti-BDNF or K252a treatment



A: 对照组; B: Anti-BDNF 组; C: K252a 组

图3 anti-BDNF 或 K252a 干扰 HepG2 细胞侵袭能力 (×200)

Figure 3 Interruption of cell invasion by anti-BDNF or K252a treatment (×200)

3 讨论

在很多国家中 HCC 是致死性最高的恶性肿瘤, 因为发现时已处于肝癌晚期并发生转移。肿瘤细胞肝内播散是 HCC 患者预后不良的主要原因, 因此明确促进 HCC 转移的分子机制对于改善患者预后是非常关键的。研究显示, BDNF 及其高亲和力受体 TrkB 在促进肿瘤细胞耐受凋亡和转移肿瘤细胞的存活方面具有重要作用^[9]。

本研究发现 BDNF 和 TrkB 在多发性 HCC 组织中的表达水平高于单发性肿瘤, 而且 BDNF 的表达在高分化和中分化 HCC 之间差异具有统计学意义。同时发现 BDNF 高表达与 HCC 淋巴结转移相关。BDNF 和 TrkB 在晚期 HCC 中表达水平均较高, 而且二者表达之间呈正相关, 共表达还与临床病理分期相关。这些结果表明, BDNF 和 TrkB 可能通过分泌途径在影响 HCC 进展方面具有关键作用。

本研究探讨了 BDNF 中和抗体或 TrkB 受体酪氨酸激酶活性抑制剂对 HepG2 细胞凋亡和侵袭的影响。在 HepG2 细胞的培养上清中检测到 BDNF, 可能对细胞本身具有相关的生物学功能。特异性中和抗体常用来抑制细胞因子的不同生物学功能^[10]。本研究发现 BDNF 中和抗体能诱导细胞凋亡, 表明 BDNF 可能是 HepG2 细胞存活所必需的。而且 BDNF 抗体能显著减少侵袭细胞数, 表明 BDNF 具有促进 HepG2 细胞侵袭的作用。K252a 是一种选择性 Trk 家族癌基因和神经营养因子受体酪氨酸激酶活性抑制剂^[11], 本研究发现 K252a 处理后的凋亡细胞数显著增加, 提示 BDNF 可能通过活化受体 TrkB 促进 HepG2 细胞的存活。而且 BDNF 诱导的 HepG2 细胞侵袭能力的增加也与 TrkB 激酶活性相关。BDNF/TrkB 调节 HCC 细胞存活和侵袭的下游信号通路的活化情况有待于进

一步深入研究。

综上所述, BDNF 和 TrkB 均高表达于多发性 HCC, 而且与肿瘤进展正相关。HepG2 细胞能分泌 BDNF, BDNF 中和抗体或 Trk 酪氨酸激酶抑制剂 K252a 能诱导 HepG2 细胞凋亡并抑制细胞侵袭。因此本研究结果提示 BDNF/TrkB 在促进 HCC 细胞存活和侵袭方面具有重要作用, 可能作为肝癌治疗的新靶点。

参考文献

- Budhu A, Forgues M, Ye QH, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(2): 99–111.
- Oda T, Tsuda H, Scarpa A, et al. Mutation pattern of the p53 gene as a diagnostic marker for multiple hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(13): 3674–3678.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(10): 3244–3250.
- Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2011, 11(1): 23.
- Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, et al. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma[J]. *Oncology*, 2008, 75(1–2): 17–26.
- Yu X, Liu L, Cai B, et al. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(3): 543–552.
- Huang YT, Lai PC, Wu CC, et al. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(6): 1469–1476.
- Zhang Z, Han L, Liu Y, et al. Up-regulation of Tropomyosin related kinase B contributes to resistance to detachment-induced apoptosis in hepatoma multicellular aggregations[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 1211–1216.
- Smit MA, Geiger TR, Song JY, et al. A Twist–Snail axis critical for TrkB-induced epithelial–mesenchymal transition–like transformation, anoikis resistance, and metastasis[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(13): 3722–3737.
- Ho R, Eggert A, Hishiki T, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6462–6466.
- Perez-Pinera P, Hernandez T, García-Suárez O, et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295(1–2): 19–26.

(2011–12–19 收稿)(2012–02–13 收稿)

(本文编辑: 邢颖)