

口腔医学和眼科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002269

proBDNF通过上调 p75NTR 表达促进口腔鳞状细胞癌 SCC-4 细胞迁移侵袭

李鹏程, 张旭凤, 云 蔓, 何 龙

(海南医学院第一附属医院口腔科, 海口 570000)

【摘要】目的:探索前体形式——脑源性神经营养因子前体(precursor brain derived neurotrophic factor, proBDNF)对口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) SCC-4 细胞迁移与侵袭能力的影响及其潜在机制。**方法:**对 SCC-4 细胞给予 20 ng/mL proBDNF 刺激后,通过 Transwell 迁移实验和划痕实验检测 SCC-4 细胞迁移,通过 Transwell 侵袭实验检测 SCC-4 细胞侵袭,通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验检测 SCC-4 细胞 p75 神经营养素受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR) mRNA 与蛋白表达。进一步采用免疫荧光法观察 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞的亚细胞定位。敲除 p75NTR 后,分别通过 Transwell 迁移实验、划痕实验、Transwell 侵袭实验和 qRT-PCR 检测 proBDNF 对 SCC-4 细胞迁移、侵袭及促迁移侵袭相关基因表达的影响。**结果:**20 ng/mL proBDNF 可明显促进 SCC-4 细胞迁移和侵袭(均 $P=0.000$),且 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞存在亚细胞共定位。proBDNF 可促进 SCC-4 细胞 p75NTR mRNA 和蛋白表达(均 $P=0.000$)。敲除 p75NTR 能逆转 proBDNF 引起的 SCC-4 细胞迁移、侵袭反应,以及降低结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、波形蛋白(vimentin, VIM)、酪氨酸蛋白激酶受体 UFO(anexelekto, AXL)、高迁移率族蛋白 A2(high mobility group A2, HMGA2)、解整合素金属蛋白酶 19(a disintegrin and metalloproteinase 19, ADAM19)、纤连蛋白富含亮氨酸跨膜蛋白 2(fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2, FLRT2)和磷酸二酯酶 1C(phosphodiesterase 1C, PDE1C) mRNA 表达水平(均 $P<0.05$)。**结论:**proBDNF 依赖上调 p75NTR 表达来促进 SCC-4 细胞迁移和侵袭,其机制可能为 proBDNF 结合 p75NTR 通过上调下游促迁移侵袭相关基因 CTGF、VIM、AXL、HMGA2、ADAM19、FLRT2 和 PDE1C 表达有关。

【关键词】proBDNF; p75NTR; 口腔鳞状细胞癌; 迁移; 侵袭**【中图分类号】**R780.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-25

ProBDNF promotes migration and invasion of SCC-4 cells in oral squamous cell carcinoma by up-regulating p75NTR expression

Li Pengcheng, Zhang Xufeng, Yun Man, He Long

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of precursor brain-derived neurotrophic factor(proBDNF) on the migration and invasion of SCC-4 cells in oral squamous cell carcinoma(OSCC), and to explore its underlying mechanism. **Methods:** After stimulation of SCC-4 cells with 20 ng/mL proBDNF, the cell migration was evaluated by Transwell migration assay and wound healing assay, the cell invasion was evaluated by Transwell invasion assay, and the mRNA and protein expression of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in SCC-4 cells was determined by qRT-PCR and Western blot, respectively. Furthermore, immunofluorescence assay was used to observe the subcellular localization of proBDNF and p75NTR in SCC-4 cells. After knockout of p75NTR, the effects of proBDNF on cell migration, cell invasion, and expression of genes promoting cell migration and invasion were evaluated by Transwell migration assay and wound healing assay, Transwell invasion assay, and qRT-PCR, respectively. **Results:** Twenty ng/mL proBDNF significantly promoted the migration and invasion of SCC-4 cells

作者介绍: 李鹏程, lipengchengddt@163.com,

研究方向: 口腔颌面部肿瘤基础与临床研究。

通信作者: 张旭凤, Email: zhangxufengwwee@163.com。

基金项目: 海南省科学技术厅重点研发计划资助项目(编号: ZDYF2018169); 海南省卫生计生行业科研资助项目(编号: 18A200158)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1001.002.html> (2019-09-18)(both $P=0.000$). Moreover, pro-BDNF and p75NTR were colocalized in SCC-4 cells. ProBDNF promoted the mRNA and protein expression of p75NTR in SCC-4 cells(both $P=0.000$). Knock-out of p75NTR reversed proBDNF-induced SCC-4 cell migration and invasion and reduced the mRNA expression levels of connective tissue growth factor(CTGF), vimentin(VIM), anex-

elektro (AXL), high-mobility group A2 (HMGA2), a disintegrin and metalloproteinase 19 (ADAM19), fibronectin leucine-rich trans-membrane protein 2 (FLRT2), and phosphodiesterase 1C (PDE1C) (all $P < 0.05$). **Conclusion:** ProBDNF promotes the migration and invasion of SCC-4 cells by up-regulating p75NTR expression, and its mechanism of action may be related to the up-regulation of the expression of downstream migration and invasion-promoting genes (namely, CTGF, VIM, AXL, HMGA2, ADAM19, FLRT2, and PDE1C) through the binding between proBDNF and p75NTR.

[Key words] proBDNF; p75NTR; oral squamous cell carcinoma; migration; invasion

头颈癌是常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率有增高趋势^[1]。头颈癌最常见的形式是口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC),我国年发病人数超过 5 万^[2-3]。由于局部复发、局部淋巴结转移和远处转移,OSCC 治疗常常潜在失败风险^[4],因此迫切需要提高对 OSCC 进展和转移机制的认识,以推出更好的 OSCC 治疗方案。以往的研究表明,神经营养素在不同癌症中发挥了恶性生物学功能^[5],脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)由前体形式——脑源性神经营养因子前体(precursor brain derived neurotrophic factor, proBDNF)合成^[6],并被发现在多种恶性肿瘤中发挥肿瘤进展作用^[7]。比如,proBDNF 在胶质瘤中表达上调并促进胶质瘤进展^[8]。p75 神经营养素受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)是一种 1 型跨膜蛋白,属于 TNF 受体超家族,是成熟神经营养素及其前体的共同受体^[9]。proBDNF 与 p75NTR 具有高亲和力,通过作用于细胞受体发挥其生物学功能^[10]。已在多种癌症中发现,p75NTR 与肿瘤细胞迁移和侵袭之间存在多重联系^[11],但 proBDNF 与 p75NTR 在 OSCC 中的作用尚不十分清楚。本研究对 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞迁移、侵袭中的作用及机制进行探索。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

DMEM/F-12 混合培养基购于美国 HyClone 公司;胎牛血清、青霉素、链霉素购于美国 Thermo Fisher Science 公司;4%多聚甲醛、Triton X-100、驴血清购于美国 Sigma 公司;p75NTR 抗体、proBDNF 抗体、 β -actin 抗体购于美国 Santa Cruz 公司;proBDNF 试剂购于美国 Alomone 研究所;含 DAPI 封片剂购于美国 Vector 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂

盒购于美国 Promega 公司;RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒、Western blot 试剂盒购于中国江苏碧云天生物公司;SYBR Real-Time PCR 试剂盒、p75NTR 引物、GAPDH 引物、CTGF 引物、VIM 引物、AXL 引物、HMGA2 引物、ADAM19 引物、FLRT2 引物、PDE1C 引物、GAPDH 引物、p75NTR siRNA 和阴性对照 siRNA (negative control siRNA, NC-siRNA)均购于上海吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 口腔鳞状细胞癌 SCC-4 细胞系购自上海斯信生物科技有限公司。以 6×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔聚苯乙烯板中,培养在含有 10%胎牛血清、1%链霉素和 1%青霉素的 DMEM/F-12 混合培养基中,置于 5%CO₂、37 °C 的加湿细胞培养箱中。培养基每 3 d 换液 1 次。

1.2.2 p75NTR siRNA 转染 取 Lipofectamine™ 3000 质粒分别与 p75NTR siRNA、NC-siRNA 均匀混合,孵育 10 min;然后分别将混合物转入含有 SCC-4 细胞中,无血清、青霉素和链霉素的培养基中孵育 6 h 后,吸取培养基,PBS 洗 2 遍,加入新的含 10%胎牛血清、1%链霉素和 1%青霉素的 DMEM/F-12 混合培养基继续培养细胞 48 h。转染效率通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测表达验证。此细胞用于后续实验。

1.2.3 Transwell 细胞迁移实验 采用孔径 8 μ m 的 Transwell 小室(康宁,cat:354578)进行细胞迁移分析。取未/已转染的细胞,按照实验要求制备无血清培养基的细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,接种 200 μ L 于穿孔室。下腔室加入含 650 μ L 含有 10%胎牛血清或 10%胎牛血清+20 ng/mL proBDNF 的培养基。细胞在 37 °C 培养 48 h。通过擦除穿孔室上侧膜未迁移的细胞,PBS 洗 2 遍后,4%多聚甲醛固定穿孔室下侧膜细胞,0.1%结晶紫染色。随机选择 6 个视野统计计数。

1.2.4 细胞划痕试验 用划痕法分析细胞的迁移能力。取未/已转染的细胞,按照实验要求,细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至完全融合后,通过使用无菌 20 μ L 移液枪头尖端在细胞层上沿 6 孔板直径划痕。用 PBS 轻轻冲洗以去除游离细胞,将贴壁细胞继续培养 48 h,在相差显微镜下捕获刮伤区域的图像,并通过 Image J 软件分析细胞愈合面积。

1.2.5 细胞侵袭实验 侵袭试验采用 Matrigel 基底膜基质胶侵袭室(康宁, cat:354483)。方法同 Transwell 细胞迁移实验部分。

1.2.6 免疫荧光分析 p75NTR 与 proBDNF 亚细胞定位 细胞在室温条件下用 4%多聚甲醛固定 30 min,用 0.5%Triton X-100(Sigma, 美国)通透后,用 5%驴血清(Sigma, 美国)在室温条件下孵育 30 min 封闭阻断非特异性结合。使用 p75NTR (1:1 000)、proBDNF(1: 4 000)抗体孵育过夜。次日 PBS 冲洗后使用对应荧光二抗在室温下孵育 2 h,用 4',6'-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核染色 5 min,最后使用 LSM 510 型激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss 公司,德国)拍摄照片。

1.2.7 细胞分组与处理 细胞分为对照组(SCC-4 细胞正常培养)、proBDNF 处理组(20 ng/mL proBDNF 刺激 SCC-4 细胞 48 h)、NC-siRNA+proBDNF 处理组(转染 NC-siRNA 的 SCC-4 细胞再给予 20 ng/mL proBDNF 刺激 48 h)和 p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组(转染 p75NTR siRNA 的 SCC-4 细胞再给予 20 ng/mL proBDNF 刺激 48 h)。

1.2.8 qRT-PCR 反应 各组细胞根据 RNA 提取试剂盒的说明书来提取待检测细胞的 RNA 表达。RNA 样品用无 RNase 的超纯水稀释。用紫外分光光度计分别测量 260 nm 和 280 nm 处的光密度(optical density, OD)值,并计算 RNA 的浓度和纯度。然后逆转录为 cDNA。取 cDNA 分别与 p75NTR 引物、GAPDH 引物、CTGF 引物、VIM 引物、AXL 引物、HMGA2 引物、ADAM19 引物、FLRT2 引物、PDE1C 引物和 GAPDH 引物按照 SYBR Real-Time PCR 试剂盒说明书步骤通过 ABI7500 系统(Applied Biosystems 公司,美国)进行 qRT-PCR 检测,最后以 GAPDH 为内部参照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因相对表达。

1.2.9 蛋白质印迹分析 各组细胞使用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白。蛋白经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,取含有

50 μ g 蛋白的裂解物加入凝胶泳道中,并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法在各泳道中分离,100 V 下电泳 2 h,然后湿法电转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5%脱脂奶粉封闭 PVDF 后,使用以下一抗 P75NTR(1:1 000)、 β -actin(1:2 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后加入相应的 HRP 标记的二抗(1:2 000),室温孵育 40 min;洗膜后通过化学发光显色后使用 Tanon 5500 成像系统(天能,中国上海)成像,用 Image J 软件扫描灰度值后,以 β -actin 为内参进行半定量分析。

1.3 统计学处理

使用 Graphpad Prism 7.0 软件对数据进行分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。4 组计量资料的比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 Bonferroni 校正 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 敲除 p75NTR 能逆转 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞迁移和侵袭

首先对培养的 SCC-4 细胞加入 proBDNF 后,观察其对迁移和侵袭能力的影响。细胞划痕实验结果显示,与对照组(图 1A)比较,proBDNF 可明显提高 SCC-4 细胞愈合面积(图 1B)。Transwell 细胞迁移实验显示,与对照组(图 2A)比较,proBDNF 可明显提高 SCC-4 细胞迁移细胞数(图 2B)。Transwell 细胞侵袭实验显示,与对照组(图 3A)比较,proBDNF 可明显提高 SCC-4 细胞侵袭细胞数(图 3B)。进一步采用转染 p75NTR siRNA 的 SCC-4 细胞与 proBDNF 处理组比较,发现 p75NTR siRNA 转染后能明显逆转 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞愈合面积(图 1D)、迁移细胞数(图 2D)和侵袭细胞数(图 3D)。与 proBDNF 处理组比较,NC-siRNA 转染的

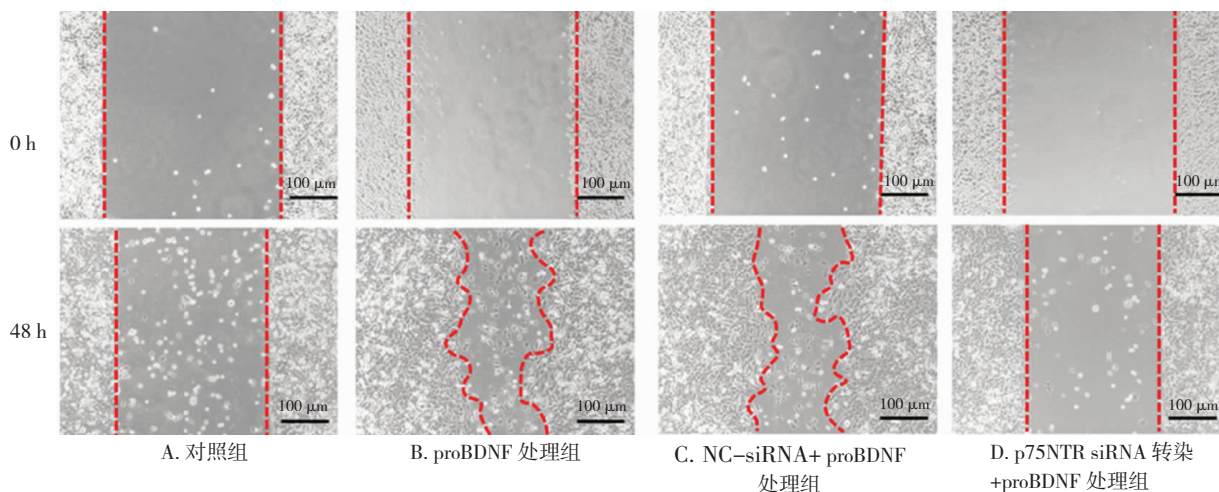


图1 细胞划痕实验检测 p75NTR siRNA 对 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞愈合的影响

SCC-4 细胞并不影响细胞愈合面积(图 1C)、迁移细胞数(图 2C)和侵袭细胞数(图 3C)。详细数据见表 1。

2.2 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞中共定位,且 proBDNF 促进 p75NTR 表达

在确认 proBDNF 对 SCC-4 细胞有促迁移和侵袭作用后,对 SCC-4 细胞中 proBDNF 与 p75NTR 的亚细胞定位进行了研究,结果显示 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞中共表达且共定位(图 4),提示 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4

细胞中结合发挥作用。本研究进一步使用 proBDNF 处理 SCC-4 细胞,并对 p75NTR 的表达情况进行检测。以对照组为参照(1.00 ± 0.00),p75NTR mRNA 在 proBDNF 处理组、NC-siRNA+proBDNF 处理组和 p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组的表达量分别为 4.23 ± 0.53 、 4.14 ± 0.57 、 1.13 ± 0.13 ,方差分析显示方差齐($F=123.452, P=0.000$)(图 5A)。进一步通过方差分析后的 Bonferroni 校正 t 检验分析发现,与对照组相比,proBDNF 处理组 p75NTR mRNA 表达明显增

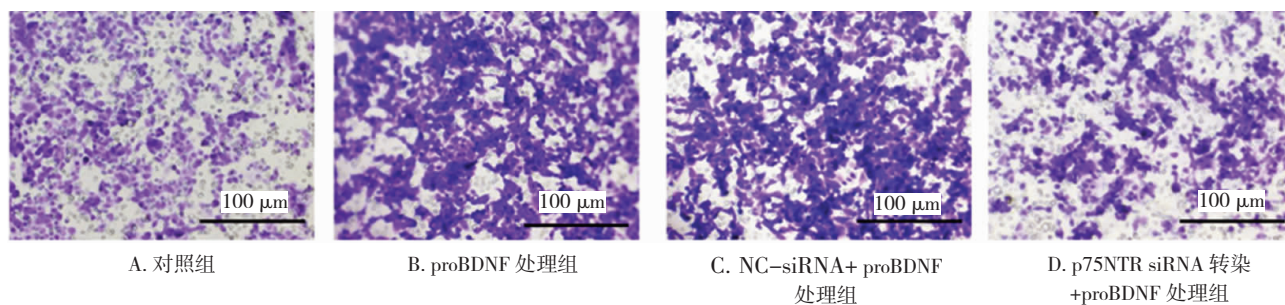


图 2 Transwell 细胞迁移实验检测 p75NTR siRNA 对 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞迁移的影响

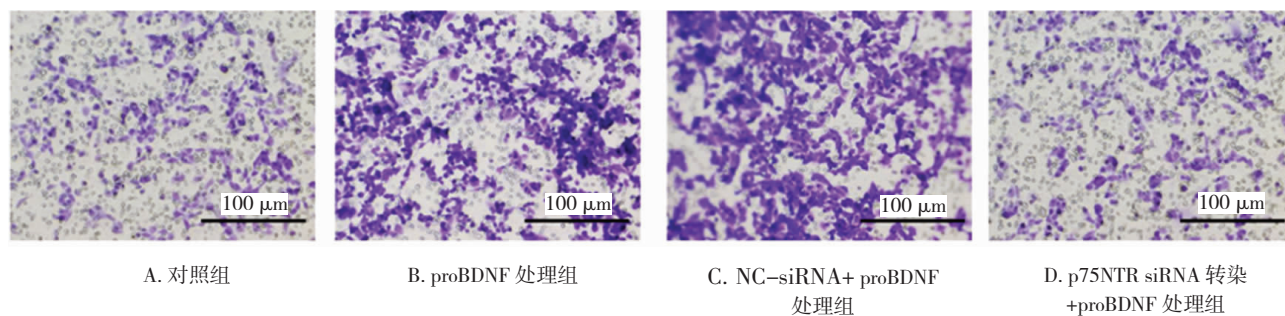


图 3 Transwell 细胞侵袭实验检测 p75NTR siRNA 对 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞侵袭的影响

表 1 p75NTR siRNA 对 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	细胞划痕实验 愈合面积 (%)	Transwell 细胞迁移实验 迁移细胞数	Transwell 细胞侵袭实验 侵袭细胞数
对照组	18.52 ± 2.16	435 ± 57	163 ± 21
proBDNF 处理组	61.39 ± 7.74^a	1476 ± 152^c	542 ± 73^d
NC-siRNA+proBDNF 处理组	58.76 ± 6.83^a	1549 ± 167^c	582 ± 84^d
p75NTR siRNA 转染 +proBDNF 处理组	21.45 ± 3.12^b	485 ± 64^d	151 ± 26^e
F 值	112.362	79.875	64.319
P 值	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P=0.000$,^b $P=0.000$,^c $P=0.000$;与 proBDNF 处理组比较,^b $P=0.000$,^d $P=0.000$,^e $P=0.000$

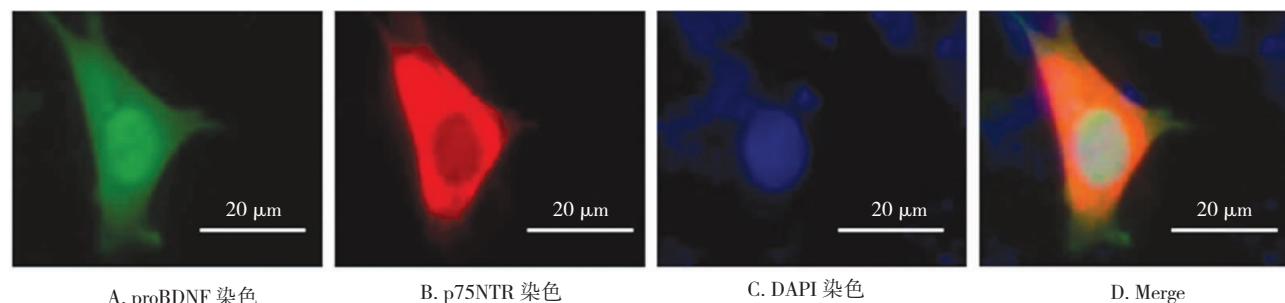


图 4 免疫荧光显示 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞中共表达且共定位

加,差异有统计学意义($P=0.000$);与 proBDNF 处理组相比, p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组 p75NTR mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义($P=0.000$)(图 5A)。以对照组为参照(1.00 ± 0.00),p75NTR 蛋白在 proBDNF 处理组、NC-siRNA+proBDNF 处理组和 p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组的表达量分别为 2.56 ± 0.31 、 2.48 ± 0.35 、 1.24 ± 0.16 ,方差分析显示方差齐($F=45.741$, $P=0.000$)(图 5B)。进一步通过方差分析后的 Bonferroni 校正 t 检验分析发现,与对照组相比,proBDNF 处理组 p75NTR 蛋白表达明显增加,差异有统计学意义($P=0.000$);与 proBDNF 处理组相比,p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组 p75NTR 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P=0.002$)(图 5C)。

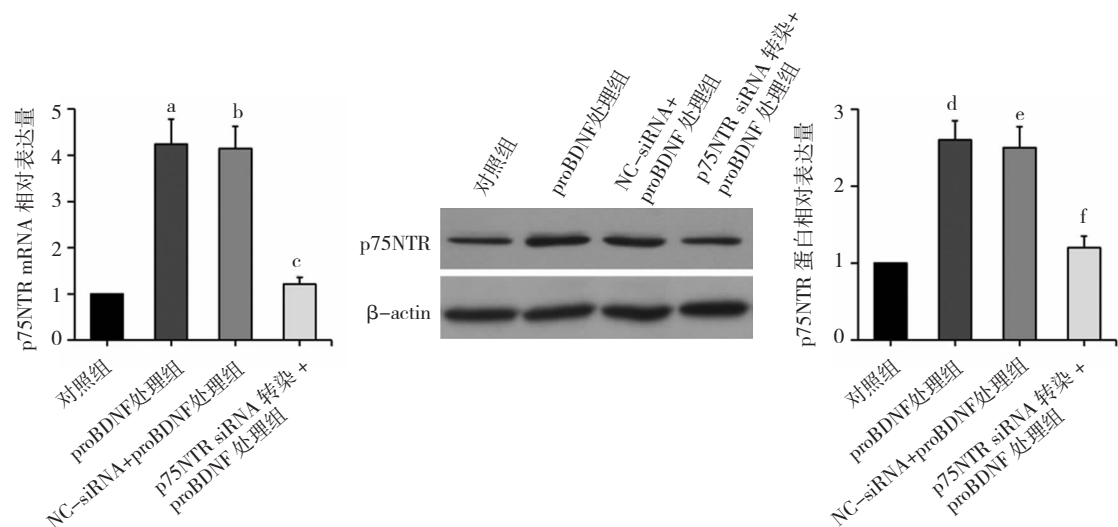
2.3 proBDNF 结合 p75NTR 参与控制 SCC-4 细胞迁移与侵袭相关基因的表达

为深入了解 p75NTR 在 SCC-4 细胞迁移与侵袭中的作用,本研究采用 qRT-PCR 检测与迁移和侵袭相关的基因结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)、波形蛋白(vimentin,VIM)、酪氨酸蛋白激酶受体 UFO(anexelekto,

AXL)、高迁移率族蛋白 A2(high mobility group A2,HMGA2)、解整合素金属蛋白酶 19(a disintegrin and metalloproteinase 19,ADAM19)、纤连蛋白富含亮氨酸跨膜蛋白 2(fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2,FLRT2)和磷酸二酯酶 1C(phosphodiesterase 1C,PDE1C) mRNA 的表达变化。结果显示,与对照组相比,proBDNF 促进 CTGF、VIM、AXL、HMGA2、ADAM19、FLRT2 和 PDE1C 表达;与 proBDNF 处理组相比,敲除 p75NTR 能逆转 proBDNF 对这些基因的促进效应;而 NC-siRNA 对 proBDNF 诱导的这些基因表达无影响,详细数据见表 2。这些结果提示,proBDNF 结合 p75NTR 可能通过上调 CTGF、VIM、AXL、HMGA2、ADAM19、FLRT2 和 PDE1C 基因表达来促进 SCC-4 细胞迁移和侵袭。

3 讨论

OSCC 是头颈癌肿瘤中常见的恶性肿瘤之一,且 OSCC 发病率一直居高不下。而 OSCC 预后不佳的主要原因是 OSCC 细胞发生了侵袭转移^[4]。最近



A. qRT-PCR 检测 p75NTR mRNA 表达

B. Western blot 检测 p75NTR 蛋白表达

C. p75NTR 蛋白表达半定量分析数据

注:与对照组比较,^a $P=0.000$,^b $P=0.000$,^c $P=0.000$,^d $P=0.000$;与 proBDNF 处理组比较,^e $P=0.000$,^f $P=0.002$

图 5 qRT-PCR 和 Western bolt 分别检测各组 p75NTR mRNA 和蛋白表达水平

表 2 各组 CTGF、VIM、AXL、HMGA2、ADAM19、FLRT2 和 PDE1C mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	CTGF	VIM	AXL	HMGA2	ADAM19	FLRT2	PDE1C
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
proBDNF 处理组	3.56 ± 0.45 ^a	3.12 ± 0.34 ^c	3.79 ± 0.22 ^e	2.82 ± 0.31 ^g	4.49 ± 0.58 ⁱ	2.51 ± 0.19 ^k	3.25 ± 0.36 ^m
NC-siRNA+proBDNF 处理组	3.45 ± 0.52 ^a	3.27 ± 0.29 ^c	3.65 ± 0.25 ^e	2.91 ± 0.26 ^g	4.31 ± 0.61 ⁱ	2.63 ± 0.24 ^k	3.43 ± 0.44 ^m
p75NTR siRNA 转染+proBDNF 处理组	0.86 ± 0.11 ^b	1.24 ± 0.14 ^d	1.35 ± 0.09 ^f	1.17 ± 0.12 ^h	1.45 ± 0.16 ^j	0.91 ± 0.13 ^l	0.74 ± 0.08 ⁿ
F 值	123.706	98.636	124.724	78.492	187.643	19.651	147.725
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

注:与对照组比较,^a $P=0.000$,^b $P=0.000$,^c $P=0.000$,^d $P=0.000$,^e $P=0.000$,^f $P=0.000$,^g $P=0.000$,^h $P=0.000$,ⁱ $P=0.000$,^j $P=0.000$,^k $P=0.000$,^l $P=0.000$,^m $P=0.000$,ⁿ $P=0.000$

研究显示,OSCC 患者组织中存在 BDNF 高表达现象^[12]。BDNF 是神经营养素家族的成员,以往的研究发现 BDNF 可促进神经母细胞瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌和结肠癌等人类恶性肿瘤的发生发展^[13],提示 BDNF 在肿瘤的发生发展中起重要作用。BDNF 信号转导参与了细胞增殖或侵袭,BDNF 与肿瘤进展密切相关,并且已成为潜在的治疗靶点^[14]。而 proBDNF 为 BDNF 的前体,已有研究发现,proBDNF 同样可以参与调控细胞运动、增殖、凋亡等生物学行为^[15]。

已有研究表明,p75NTR 为 proBDNF 的结合受体之一^[9-10,15]。p75 NTR 为低亲和力神经生长因子 (nerve growth factor,NGF)受体,参与诱导多种生物学效应,包括促进细胞增殖、存活和凋亡^[8,15]。在多种癌症类型中,p75NTR 的表达与细胞迁移和侵袭相关^[8,11,15],但它们在 OSCC 中的意义尚未被报道。本研究发现,proBDNF 也可以独立参与口腔鳞状细胞癌 SCC-4 细胞迁移和侵袭,且本研究检测到 proBDNF 与 p75NTR 在 SCC-4 细胞中共表达且共定位,提示 proBDNF 与其受体 p75NTR 在 SCC-4 细胞中可能具有协同作用。本研究进一步通过敲除 p75NTR 后,观察其对 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞迁移与侵袭的影响,发现敲除 p75NTR 能明显减弱 proBDNF 诱导的 SCC-4 细胞迁移和侵袭。这与之前的研究结果相符,p75NTR 可以促进 OSCC 细胞迁移^[16]。本研究通过 qRT-PCR 进一步对 proBDNF 及其受体 p75NTR 参与 SCC-4 细胞的迁移和侵袭机制进行了研究,发现 proBDNF 能促进下游与促迁移侵袭相关基因 *CTGF*、*VIM*、*AXL*、*HMG A2*、*ADAM19*、*FLRT2* 和 *PDE1C* 的 mRNA 表达水平,敲除 p75NTR 后能抑制 proBDNF 诱导的迁移、侵袭和以上促迁移侵袭相关基因表达。本研究还发现,proBDNF 能促进其受体 p75NTR 表达。这些结果说明,proBDNF 促进 SCC-4 细胞迁移与侵袭依赖其受体 p75NTR 表达。

综上所述,本研究结果显示,proBDNF 依赖上调其受体 p75NTR 表达来实现促进 SCC-4 细胞转移和侵袭,p75NTR 有望成为口腔鳞状癌治疗的靶点。

参 考 文 献

- [1] Jou A, Hess J. Epidemiology and molecular biology of head and neck cancer[J]. *Oncol Res Treat*, 2017, 40(6):328-332.
- [2] Chen X, Yuan Z, Lu M, et al. Poor oral health is associated with an increased risk of esophageal squamous cell carcinoma—a population-based case-control study in China[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3):626-635.
- [3] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401:63-71.
- [4] Lau A, Li KY, Yang WF, et al. Induction chemotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity: a cumulative meta-analysis[J]. *Oral Oncol*, 2016, 61:104-114.
- [5] Choy C, Ansari KI, Neman J, et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1):51.
- [6] Sen A, Nelson TJ, Alkon DL. ApoE isoforms differentially regulates cleavage and secretion of BDNF[J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1):19.
- [7] Kang HJ, Kim JM, Kim SY, et al. A longitudinal study of BDNF promoter methylation and depression in breast cancer[J]. *Psychiatry Investig*, 2015, 12(4):523-531.
- [8] Wang TC, Luo SJ, Lin CL, et al. Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(1):73-81.
- [9] Fayard B, Loeffler S, Weis J, et al. The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80(1):18-28.
- [10] Riffault B, Kourdougli N, Dumon C, et al. Pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF)-mediated p75NTR activation promotes depolarizing actions of GABA and increases susceptibility to epileptic seizures[J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28(2):510-527.
- [11] Yang WH, Cheng CY, Chen MF, et al. Cell subpopulations over-expressing p75NTR have tumor-initiating properties in the C6 glioma cell line[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(9):5183-5192.
- [12] Moriwaki K, Ayani Y, Kuwabara H, et al. TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral-squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(38):25225-25243.
- [13] Radin DP, Patel P. BDNF: an oncogene or tumor suppressor[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8):3983-3990.
- [14] Roesler WH, de Farias CB, Abujamra AL, et al. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(10):1473-1475.
- [15] De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, et al. p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23):34480-34497.
- [16] 佟冬冬, 张风河, 姚 瑶, 等. p75 神经生长蛋白受体阳性舌鳞状细胞癌细胞的生物学特性研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2014, 32(1):18-22.

(责任编辑:冉明会)