



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3956.shtml

· 基础研究 ·

脑源性神经营养因子对肝癌细胞氟尿嘧啶化疗敏感性的影响

张克兰, 陈能志, 黄跃衡, 彭剑波, 黎辉, 叶劲松, 李斌, 赵凯, 罗涛, 武冲

(湖南省常德市第一人民医院 普通外科, 湖南 常德 415003)

摘要

目的: 探讨外源性脑源性神经营养因子 (BDNF) 对人肝癌 Bel-7402 细胞氟尿嘧啶 (5-FU) 化疗敏感性的影响。

方法: 分别用 5-FU (5-FU 组) 和 5-FU+BDNF (5-FU+BDNF 组) 处理 Bel-7402 细胞, 以无干预的 Bel-7402 细胞作为对照组。用 MTT 法、克隆形成试验和流式细胞仪检测细胞生长与凋亡情况, RT-PCR 法检测细胞 bcl-2 mRNA 的表达。

结果: 5-FU 组细胞 OD 值、克隆形成数明显降低, 细胞凋亡率明显升高, bcl-2 mRNA 表达明显下调 (均 $P < 0.05$), 与对照组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 而 5-FU+BDNF 组以上指标的改

变均不明显, 与对照组的差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。
结论: BDNF 能降低肝癌 Bel-7402 细胞 5-FU 化疗敏感性, 该作用可能与 BDNF 上调 bcl-2 的表达, 从而抑制细胞凋亡有关。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(7):931-935]

关键词

癌, 肝细胞; 脑源性神经营养因子; 细胞凋亡; 基因, bcl-2
中图分类号: R735.7

Effect of brain-derived neurotrophic factor on chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells to fluorouracil

ZHANG Kelan, CHEN Nengzhi, HUANG Yueheng, PENG Jianbo, LI Hui, YE Jinsong, LI Bin, ZHAO Kai, LUO Tao, WU Chong

(Department of General Surgery, the First People's Hospital of Changde, Changde, Hunan 415003, China)

Corresponding author: ZHANG Kelan, Email: zhangkl.88@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells to fluorouracil (5-FU).

Methods: Bel-7402 cells were treated with 5-FU alone (5-FU group) or 5-FU plus BDNF (5-FU+BDNF group) respectively, and the Bel-7402 cells without treatment served as control group. The cell growth and apoptosis were determined by MTT assay, colony formation assay, and flow cytometry respectively, and the bcl-2 mRNA expression in the cells was measured by RT-PCR method.

Results: The OD value and number of colonies were significantly decreased, apoptosis rate was significantly increased, and bcl-2 mRNA expression was markedly down-regulated in the cells of 5-FU group, and all the

收稿日期: 2013-11-04; 修订日期: 2014-03-26。

作者简介: 张克兰, 湖南省常德市第一人民医院主任医师, 主要从事肝胆胰理论与临床方面的研究。

通信作者: 张克兰, Email: zhangkl.88@163.com

differences had statistical significance compared with those of control group (all $P < 0.05$); the changes in all of the above variables in cells of 5-FU+BDNF group were not evident, and the differences showed no statistical significance compared with those of control group (all $P > 0.05$).

Conclusion: BDNF can reduce the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells to 5-FU, and this effect may be associated with BDNF up-regulating the bcl-2 expression and thereby inhibiting cell apoptosis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):931-935]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; Brain-Derived Neurotrophic Factor; Apoptosis; Genes, bcl-2

CLC number: R735.7

脑源性神经营养因子 (BDNF) 在人类多种实体肿瘤 (包括胰腺癌、胃癌等) 中有表达, 与肿瘤的增殖、侵袭、转移、凋亡等多种劣性生物学行为有关。近来研究发现, BDNF 基因还与原发性肝癌有一定关系^[1]。5-氟尿嘧啶 (5-FU) 为临床上最常使用的化疗药物之一, 能诱导肿瘤细胞发生凋亡效应。本研究主要探讨外源性 BDNF 对肝癌细胞株 5-FU 化疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂

人肝癌细胞株 Bel-7402 由中南大学湘雅医学院细胞中心提供。兔抗人 BDNF 多克隆抗体、外源性 BDNF、鼠抗人 GAPDH 抗体、DMEM 培养基、二甲亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、碘化丙啶 (PI) 均购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清购自杭州四季清公司; RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 引物由上海博亚公司合成。

1.2 实验分组

取对数生长的 Bel-7402 细胞, 分为 3 组: (1) 5-FU 组 (用含 5-FU 的 10% 胎牛血清完全培养液培养); (2) 5-FU+BDNF 组 (用含 5-FU 和外源性 BDNF 的 10% 胎牛血清完全培养液培养); (3) 对照组 (用含 10% 胎牛血清的完全培养液)。5-FU 终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[2], BDNF 终浓度为 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ ^[3]。

1.3 MTT 试验检测细胞增殖

取对数生长期的 Bel-7402 细胞, 细胞计数后以 5×10^3 个细胞 / 孔接种于 96 孔培养板, 加入无血清培养液 $200 \mu\text{L}$ / 孔, 常规培养 12 h, 使各组细胞同步化。分别换入含 10% 胎牛血清的完全培养液、含终浓度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU 10% 胎牛血清的完全培养液、 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ BDNF 10% 胎牛血清的完全

培养液, 继续培养到达各观察时点 (24、48、72、96 h) 后, 每孔加入 MTT 溶液 ($5 \text{ mg}/\text{mL}$) $20 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 后终止培养。每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 再测定各孔 490 nm 吸光度值 (OD 值)。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.4 克隆形成实验检测 BDNF 对 5-FU 诱导 Bel-7402 凋亡的抑制效应

取对数生长期的单层培养细胞, 制单个细胞悬液, 细胞悬液置入含 10% 胎牛血清的完全培养液, 按上要求加入药物后, 调整 3 组受试细胞浓度至 $1 \times 10^3/\text{mL}$, 取各组细胞各 400 个, 分别接种于含 10 mL、预温 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养液的培养皿中, 静止培养 14 d。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。肉眼及显微镜下观察, 计数大于 50 个细胞的克隆体数。克隆形成率 (%) = (各组克隆数 / 接种细胞数) $\times 100\%$ 。实验重复 4 次。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 Bel-7402 细胞, 细胞计数后以 5×10^3 个细胞 / 孔接种于 6 孔培养板, 常规培养 12 h, 各组按要求加入药物后, 继续培养 48 h 后, $1\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心收获细胞。冷 PBS 洗涤 2 遍, 取浓度 1×10^6 个细胞 / mL 细胞 1 mL, 加入 2 mL 在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的无水乙醇, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定过夜。 $1\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心弃上清, 冷 PBS 离心洗涤两次, $500 \mu\text{L}$ PBS 重悬, 制成 1×10^6 的单细胞悬液, 加入 RNaseA 至终浓度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min。加样入流式细胞分析仪样品室检测, 使用 Cellquest 分析软件检测细胞凋亡率。

1.6 RT-PCR 法检测 bcl-2 mRNA 表达

取对数生长期的 Bel-7402 细胞, 细胞计数后以 5×10^3 个细胞 / 孔接种于培养皿中, 常规培养 12 h, 各组按要求加入药物后, 继续培养 24 h 后, 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 取 $5 \mu\text{g}$ RNA 逆转录为 cDNA, 取 $3 \mu\text{L}$ cDNA 进行 PCR 反应。每

组均设3个平行培养瓶。bel-2引物:5'-CTG GCT ACC CTG GTT CAC AT-3';5'-GAC TTC CAT CCT CCC TGT CA-3';以GAPDH为内参,5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3';5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。扩增条件为94℃,预变性5 min,94℃,45 s变性,退火58℃,45 s,延伸72℃,2 min,扩增循环均为35个循环。将各目的基因与GAPDH基因的电泳条带的平均光密度和面积乘积的相对比值,作为目的基因的相对表达量,并照像保存。各目的基因扩增重复3次,取均值。

1.7 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用SPSS 13.0统计软件包辅助分析,各组间比较采用方差分析、SNK 检验两两比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BDNF 对 5-FU 诱导 Bel-7402 细胞增殖抑制的影响

从各组细胞的生长曲线(图1)可以看出,对照组细胞一直处于增殖中,5-FU组和5-FU+BDNF组生长趋势一致,前2 d OD值均有下降,5-FU组下降更明显,但自第3天开始,5-FU+BDNF组OD值出现明显上升状况,而5-FU组仅呈现缓慢上升状况。5-FU组OD值明显低于对照组($P < 0.01$)。5-FU+BDNF组较5-FU组OD值明显增高($P < 0.05$),但与对照组OD值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

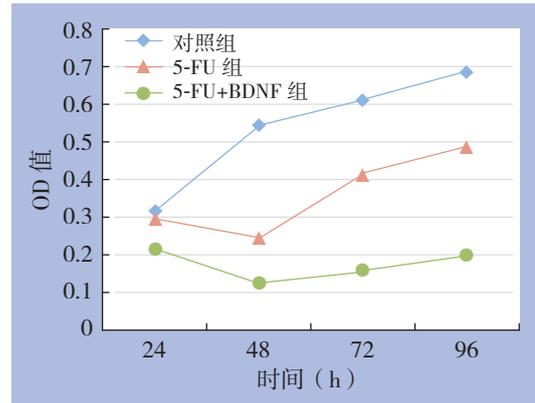


图1 各组细胞生长曲线图

Figure 1 Growth curves of the cells in each group

表1 各组细胞吸光度值(OD值)比较(72h)

组别	OD值
5-FU组	0.17 ± 0.04 ¹⁾
5-FU+BDNF组	0.36 ± 0.11 ²⁾
对照组	0.54 ± 0.16

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$; 2)与5-FU组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.01$ vs. control group; 2) $P < 0.01$ vs. 5-FU group

2.2 BDNF 对 5-FU 诱导 Bel-7402 克隆集落形成的影响

实验结果显示,对照组细胞在培养第9天即可见明显克隆体形成,至第15天时克隆体数目增多、体积大,5-FU+BDNF组第12天出现克隆体,5-FU组至第15天时才出现明显克隆体,而且克隆体数目少,体积小(图2)。5-FU组克隆体形成数目明显低于对照组($P < 0.01$),5-FU+BDNF组克隆体形成数目则较5-FU组增多($P < 0.01$),且与对照组较接近($P > 0.05$)(表2)(图2)。



图2 各组克隆集落形成情况 A: 5-FU组; B: 5-FU+BDNF组; C: 对照组

Figure 2 Colony formation status in each group A: 5-FU group; B: 5-FU+BDNF group; C: Control group

表2 各组克隆形成率比较

组别	克隆形成率 (%)
5-FU组	35.4 ± 3.8 ¹⁾
5-FU+BDNF组	58.1 ± 3.9 ²⁾
对照组	65.3 ± 3.1

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与5-FU组比较, $P < 0.01$

Note: 1) $P < 0.01$ vs. control group; 2) $P < 0.01$ vs. 5-FU group

2.3 BDNF对5-FU诱导Bel-7402细胞凋亡的影响

化疗药物5-FU能明显诱导肝癌细胞系Bel-7402细胞发生凋亡, 5-FU组凋亡率达(7.66 ± 1.43)%, 而对照组凋亡率为(3.43 ± 0.42)%, 两者比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而

5-FU+BDNF组为(5.45 ± 1.07)%, 较5-FU组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 但5-FU+BDNF组凋亡率与对照组较接近, 差异无统计学意义($P > 0.05$) (图3) (表3)。

2.4 外源性BDNF对Bel-7402 bcl-2 mRNA的影响

Bel-7402细胞系表达bcl-2 mRNA, 通过对目的基因bcl-2 RT-PCR产物与GAPDH内参照定性分析发现, 5-FU+BDNF组条带较亮, 面积较大, 而5-FU组、对照组条带则较暗, 面积较小(图4)。产物定量分析显示: 5-FU+BDNF组Bel-7402 bcl-2 mRNA的表达, 明显高于5-FU组、对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。但5-FU组与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$) (表4)。

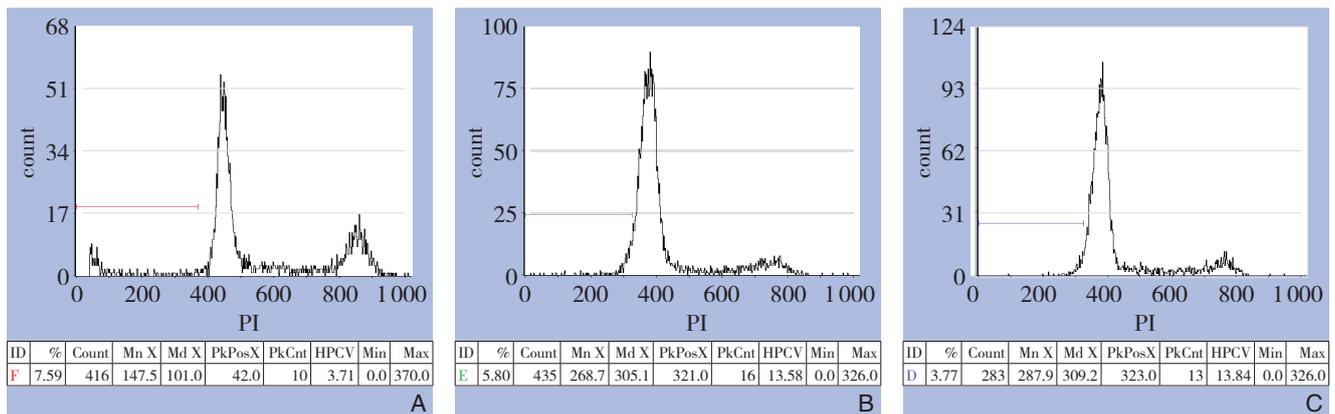


图3 各组细胞凋亡流式图 A: 5-FU组; B: 5-FU+BDNF组; C: 对照组

Figure 3 Flow cytometry images for cell apoptosis in each group A: 5-FU group; B: 5-FU+BDNF group; C: Control group

表3 各组细胞凋亡率比较

组别	凋亡率 (%)
5-FU组	7.66 ± 1.43 ¹⁾
5-FU+BDNF组	5.45 ± 1.07 ²⁾
对照组	3.43 ± 0.42

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与5-FU组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.01$ vs. control group; 2) $P < 0.01$ vs. 5-FU group

表4 各组bcl-2 mRNA灰度值比较

组别	bcl-2/GAPDH mRNA
5-FU组	0.27 ± 0.12 ¹⁾
5-FU+BDNF组	0.59 ± 0.18 ²⁾
对照组	0.31 ± 0.06

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与5-FU组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. 5-FU group

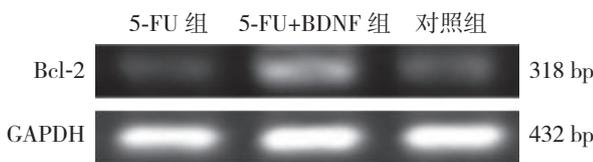


图4 各组细胞bcl-2 mRNA表达

Figure 4 Bcl-2 mRNA expressions in reach group of cells

3 讨论

众所周知, 化疗是恶性肿瘤治疗中不可缺少的手段。5-FU为临床最常使用的化疗药物之一, 然而5-FU对进展期肝癌并不敏感, 是影响肝癌疗效

因素之一。目前其耐药分子机制仍不十分清楚。文献^[2-3]报道, BDNF在许多实体肿瘤,如甲状腺癌、食管癌、胃癌、胰腺癌等有表达,在原发性肝癌中也有表达。其不仅与肿瘤血管生成、增殖、迁移、侵袭、凋亡等有关,也与对抗化疗药物有关^[4-5]。化疗耐药与肿瘤细胞凋亡密切相关,凋亡机制的缺陷可以使肿瘤细胞逃避机体免疫系统监控,抵抗化疗药物诱导的细胞凋亡,从而导致肿瘤的恶性进展和化疗耐药性的产生^[6-7]。许多肿瘤相关基因如 p53、c-myc、bcl-2、bax、Fas、FasI 等参与凋亡的调控。其中抗凋亡基因 bcl-2 基因尤为重要^[8],它被看作是细胞凋亡调控的最后通路之一。研究^[9-10]发现, BDNF 通过激活多条凋亡相关信号转导途径,再激活 bcl-2 等下游信号分子,阻止肿瘤细胞凋亡进程。阻断这些通路,能抑制肝癌细胞系 Bel-7402 的生长,提高肝癌细胞对丝裂霉素及 5-FU 的敏感性^[11]。

本实验结果显示, 5-FU 组肝癌细胞系 Bel-7402 因细胞凋亡生长明显受到抑制,而 5-FU+BDNF 组由于 BDNF 抗凋亡效应, Bel-7402 细胞较 5-FU 组增殖增加,凋亡明显减低。外源性 BDNF 能上调抗凋亡基因 bcl-2 的表达^[2],本实验中,外源性 BDNF 通过上调抗凋亡基因 bcl-2 的表达,增强肝癌细胞的抗凋亡能力,使 Bel-7402 细胞增殖能力加强。因此, 5-FU 对肝癌细胞系 Bel-7402 有一定的诱导凋亡效应,但这种效应能被外源性 BDNF 所对抗、抑制。笔者推测,进展期肝癌组织有可能通过上调 BDNF 的表达,进一步上调 bcl-2 的表达,因而可能是进展期肝癌对化疗不敏感原因之一。通过一定方法上调或下调凋亡相关基因表达,诱导肿瘤细胞发生凋亡效应已成为目前治疗恶性肿瘤的重要策略之一^[12]。本研究可能为原发性肝癌提供一种潜在的治疗,即将基因治疗与化疗药物相结合,以增强肿瘤细胞对化学药物的敏感性,降低化疗药物的临床用量,减小药物的毒副作用。

参考文献

- [1] Yang ZF, Ho DW, Lau CK, et al. Significance of the serum brain-derived neurotrophic factor and platelets in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(6):1237-1243.
- [2] Kozmin SG, Stepenkova EI, Chow SC, et al. A critical role for the putative NCS2 nucleobase permease YjcD in the sensitivity of *Escherichia coli* to cytotoxic and mutagenic purine analogs[J]. *MBio*, 2013, 4(6):e00661-13. doi: 10.1128/mBio.00661-13.
- [3] 张克兰, 王志明, 陈能志, 等. BDNF、TrkB 在原发性肝癌中的表达及 BDNF 对肝癌细胞株 Bel-7402 的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(5):516-524.
- [4] Thress K, Macintyre T, Wang H, et al. Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(7):1818-1827.
- [5] Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival[J]. *Blood*, 2005, 105(11):4429-4436.
- [6] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nature Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [7] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(18):11177-11182.
- [8] Sagar S, Esau L, Moosa B, et al. Cytotoxicity and apoptosis induced by a plumbagin derivative in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(1):170-180.
- [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] Yang T, Massa SM, Longo FM. LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways[J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(13):1420-1436.
- [11] Guan HG, Xue WJ, Qian HX, et al. RASSF1A expression inhibits cell growth and enhances cell chemosensitivity to mitomycin in BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(11):1328-1332.
- [12] Li Z, Zhang J, Liu Z, et al. Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(2):318-326.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 张克兰, 陈能志, 黄跃衡, 等. 脑源性神经营养因子对肝癌细胞氟尿嘧啶化疗敏感性的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(7):931-935. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.013
Cite this article as: ZHANG KL, CHEN NZ, HUANG YH, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells to fluorouracil[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(7):931-935. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.013