

proBDNF – p75NTR 通路抑制 C6 细胞增殖

熊 静 李志伟 韩剑虹 殷 梅 李馨蕊 朱榆红

摘 要 **目的** proBDNF 和成熟 BDNF 分别通过 p75NTR 受体和 TrkB 受体介导相反的生物学作用。微环境变化时, proBDNF – p75 信号通路和成熟 BDNF – TrkB 通路不平衡可能对细胞生长和增殖产生不同影响。本研究拟探讨不同培养条件下, C6 细胞表达 proBDNF 及其受体 p75NTR 的变化, 对 C6 细胞生长和增殖的作用。**方法** 用细胞免疫荧光双标和 Western blot 方法, 检测在含不同浓度血清培养液中培养的 C6 细胞 proBDNF 及其受体 p75NTR 表达。分别用特异性的 proBDNF 抗体阻断内源性 proBDNF, 用 p75NTR – ECD – Fc 阻断 p75NTR, 用 MTT 法和 Brdu 法分别测定内源性 proBDNF 及其受体 p75NTR 对 C6 细胞生长和增殖的作用。**结果** proBDNF 和 p75NTR 在无血清培养的 C6 细胞中共表达明显上调, 加入 proBDNF 抗体 (10 µg/ml) 处理细胞后, C6 细胞的生长和增殖明显增加。p75NTR 的作用取决于其在不同环境下结合的配体。**结论** proBDNF – p75NTR 通路起到平衡成熟 BDNF – TrkB 通路的作用, 一定环境下, 二者平衡打破, 可能对细胞生长或增殖产生不同影响。

关键词 脑源性神经营养因子前体 p75 神经营养因子受体 C6 细胞

中图分类号 R74 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.025

ProBDNF – p75NTR Pathway Inhibits C6 Cells Proliferation. Xiong Jing, Li Zhiwei, Han Jianhong, et al. Department of Neurology of The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan 650101, China

Abstract **Objective** ProBDNF and mature BDNF play opposing roles through p75NTR receptor and TrkB receptor. The imbalance between proBDNF – p75 pathway and mature BDNF – TrkB pathway under some microenvironment may impact cell growth and proliferation differently. In the study the expression of proBDNF and its receptor p75NTR was investigated in C6 cells cultured in medium containing different concentration of FBS. The potential roles of proBDNF and p75NTR to C6 cells growth and proliferation were also focused under different culture medium. **Methods** The expression of proBDNF and its receptor – p75NTR was assayed in C6 cells cultured in medium containing different concentration of FBS by immunofluorescence double labelling and Western blot methods. C6 cells were treated with specific proBDNF antibody and p75NTR – ECD – Fc blocker. MTT and Brdu assays were performed to investigate the effects of proBDNF and p75NTR on C6 cells growth and proliferation. **Results** The coexpression of proBDNF and p75NTR was significantly upregulated in C6 cells cultured in FBS free medium. The C6 glioma cells growth and proliferation were increased after treatment with proBDNF antibody (10 µg/ml) *in vitro*. The role of p75NTR may depend on which ligands it binds under different circumstances. **Conclusion** These findings *in vitro* suggest that proBDNF – p75 pathway may be a balancing signal to mature BDNF – TrkB pathway. The balance broken under certain circumstances may contribute to diverse role in cell growth and proliferation.

Key words Precursor of brain derived neurotrophic factor; p75 neurotrophin receptor; C6 cell

脑源性神经因子前体 (precursor of brain derived neurotrophic factor, proBDNF) 是由 BDNF 基因编码的前体肽。细胞内 proBDNF 可以被前体蛋白内切酶 (fusin) 或蛋白前酶转化酶 (proproteinconvertases) 裂解为成熟 BDNF (mature BDNF, mBDNF)^[1]。分泌到细胞外的 proBDNF 可被细胞外蛋白酶, 如血纤维蛋白溶解酶和基质金属蛋白酶裂解为 mBDNF^[2]。P75 神经营养因子受体 (neurotrophin receptor, NTR) 是肿

瘤坏死家族的一个特殊成员, 它既能与络氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, Trk) 协同作用, 增强神经营养因子依赖的 Trk 活化途径, 也可以通过自身信号转导途径诱导细胞凋亡。p75NTR 在细胞中的具体效应与 p75NTR 所在细胞的类型、生理状态、发育阶段以及局部环境密切相关。其作用可以是促进或抑制, 与其和不同配体结合时发挥作用不同有关^[3]。研究证明, proBDNF 不仅是 mBDNF 前体, proBDNF 与 p75NTR 及其共受体 sortilin 具有高亲和力, 诱导细胞凋亡^[4, 5]。proBDNF 在不同发育阶段和环境下的分布和含量是动态的, 和 p75NTR/Trk 受体的相对表达相关, 推测 proBDNF 通过 p75NTR 发挥作用也和细

基金项目: 云南省卫生厅内设机构基金资助项目 (2012WS0080)

作者单位: 650101 昆明医科大学第二附属医院神经内科 (熊静、韩剑虹、殷梅、李馨蕊、朱榆红), 中心实验室 (李志伟)

通讯作者: 朱榆红, 博士, 教授, 电子信箱: zyh0304@msn.com

胞类型、生理状态、发育阶段以及局部环境密切相关。BDNF 是研究最多的由胶质细胞和神经元产生的神经营养因子^[6]。大鼠 C6 细胞系是一个成熟的研究神经胶质细胞的细胞系。本研究检测了不同血清浓度培养时 C6 细胞内源性 proBDNF 及其主要受体 p75NTR 表达,分析不同培养条件下 proBDNF 和 p75NTR 对 C6 细胞生长和增殖的作用。

材料与方法

1. 材料:大鼠 C6 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库,DMEM 培养基培养(含 10% FBS,青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml),5% CO₂、饱和湿度、37℃ 恒温培养箱内培养传代。一抗:兔抗 - proBDNF 抗体(澳大利亚南澳大学周新富教授惠赠),羊抗 - p75NTR 抗体(美国 Santa Cruz 公司),羊抗 BrdU 抗体(美国 Abcam 公司),鼠抗 - β - tubulin 抗体(美国 Sigma 公司)。二抗:荧光二抗(美国 Invitrogen 公司),HRP 结合二抗(美国 Santa Cruz 公司)。P75NTR - ECD - Fc 由澳大利亚南澳大学周新富教授惠赠。

2. 细胞免疫荧光双标:C6 细胞分别在含 5% FBS 的 DMEM 培养液和不含 FBS 的 DMEM 培养液中培养 48h 后,4% 多聚甲醛室温固定细胞 30min;PBS 浸洗细胞后,PBS/0.5% Triton X - 100/10% 驴血清,室温封闭 1h。同时加入兔抗 - proBDNF 抗体(1:400)和羊抗 - p75NTR 抗体(1:200)(一抗用 PBS/0.5% Triton X - 100/5% 驴血清稀释),4℃ 孵育过夜。0.3% PBST 洗去一抗后,同时滴加驴抗羊 Alexa - 546(红色)和驴抗兔 Alexa - 488(绿色)荧光二抗(PBS/0.5% Triton X - 100/5% 驴血清稀释至 1:1000),室温避光孵育 2h。PBS 避光洗去二抗,甩干水分,DAPI 染核,避光保存,Leica 荧光显微镜拍照,比较不同浓度血清培养时 C6 细胞 proBDNF/p75NTR 共表达变化。

3. 免疫印迹分析:(1)细胞蛋白提取:5% FBS - DMEM 和无 FBS - DMEM 培养液培养 C6 细胞 48h 后,分别用预冷至 0℃ 的细胞裂解液(50mmol/L Tris HCL pH7.4, 150mmol/L NaCl, 1% NP40, 1% sodiumdeoxycholate, 0.1% SDS)裂解细胞,冰上刮取细胞碎片和裂解液,收集于离心管中。4℃, 13000r/min,离心 20min;收集上清,测定蛋白质浓度,按比例加入电泳样品缓冲液,沸水浴中煮 10min, - 80℃ 保存备用。(2)Western blot 法检测:配置 5% 浓缩胶、10% 分离胶,50 微克/孔加样,电压 90 ~ 120V,SDS - PAGE 电泳 1.5 ~ 2.0h。按顺序放置转膜装置,恒电流 400mA 转膜 2h。TBST 洗膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 1h。同时加入兔抗 proBDNF 抗体(1:500)和羊抗 p75NTR 抗体(1:200)孵育 PVDF 膜,4℃ 过夜。TBST 洗膜后,HRP 结合的二抗(1:1000)室温孵育 PVDF 膜 2h。TBST 洗膜后,ECL 显影剂显影条带,Bio - Rad 凝胶成像仪拍照。用膜再生液洗膜后,鼠抗 - β - tubulin 抗体(1:2000)作为内参,孵育相同的膜。用 Quantity One 软件对 Western blot 法条带进行光密度分析,用目的蛋白的光密度与

内参蛋白 β - tubulin 光密度比值代表目的蛋白的相对含量,进行目的蛋白表达量比较。

4. 四甲基偶氮唑蓝法检测内源性 proBDNF 和 p75NTR 对 C6 细胞生长作用:C6 细胞按 15000 个细胞/孔,接种至 96 孔培养板中,先于 10% FBS - DMEM 培养液中,5% CO₂、饱和湿度、37℃ 恒温培养箱培养,使细胞贴壁,并生长至 60% ~ 70% 汇合度。实验当天,用不含血清的培养液冲洗细胞两次,分别加入用 5% FBS - DMEM 和无 FBS - DMEM 培养液稀释的 10μg/ml 兔抗 proBDNF 抗体、5μg/ml p75NTR - ECD - Fc(阻断 C6 细胞上的 p75NTR),对照孔只加入 5% FBS - DMEM 和无 FBS - DMEM 培养液,每种处理至少加 3 孔,每孔 100μl,继续培养 24 ~ 48h。分别在 0h(未加处理)、加入处理后 24h 和 48h,进行 3 - (4,5 - 二甲基吡唑 - 2 - 基) - 2,5 - 二溴化苯基(MTT)检测。用酶标仪 560nm 波长处测量各孔吸光度(OD 值)。实验结果至少重复 3 次。记录不同培养时间的 OD 值(与存活的细胞数相关),并以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制不同处理情况下 C6 细胞生长曲线。为尽量减少重复实验结果变异,将对照孔的 OD 值视为 100%,实验孔与对照孔 OD 值相比。

5. BrdU 掺入实验检测内源性 proBDNF 和 p75NTR 对 C6 细胞增殖作用:BrdU 能选择性掺入处于细胞周期 S 期细胞的单链 DNA 核苷酸序列中,成为细胞增殖的重要标志。使用 BrdU 特异反应的单克隆抗体,进行免疫细胞染色,观察 proBDNF 和 p75NTR 对 C6 细胞增殖的作用。C6 细胞爬片分别经如上处理 48h 后,取出细胞爬片,室温晾干;置于 60℃ 预热的 0.1mol/L 盐酸中,孵育 20min;PBS 洗去盐酸;5% (体积/体积)马血清,室温封闭 1h;加入羊抗 BrdU 抗体(1:200),4℃ 孵育过夜;PBS 洗片后,加入驴抗羊 Alexa - 488 绿色荧光二抗(1:1000),室温孵育 2h;PBS 洗片后,DAPI 染核。荧光显微镜拍照,计数 BrdU 阳性细胞(细胞核呈绿色荧光)和总细胞数,计算 BrdU 阳性细胞百分比。为尽量减少重复实验结果变异,将对照孔的 BrdU 阳性细胞百分比视为 100%,实验孔与对照孔 BrdU 阳性细胞百分比相比较。

6. 统计学方法:采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞表达 proBDNF 和 p75NTR 上调:细胞免疫荧光结果显示,proBDNF 和 p75NTR 共表达于 C6 细胞质。细胞免疫荧光(图 1)和 Western blot 法(图 2)实验结果证明,无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞中,proBDNF 和 p75NTR 的表达均上调。本研究使用的抗 proBDNF 抗体,其特异性已经在之前的研究中阐述,这个抗体只特异性识别 proBDNF(相对分子质量 34kDa)^[7,8]。Western blot 法定量分析,和 5% FBS - DMEM 培养的 C6 细胞相

比,无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞 proBDNF 表达上调了 1.91 ± 0.1 倍 ($P < 0.01$,图 2 中 A、B),p75NTR 表达上调了 1.69 ± 0.09 倍 ($P < 0.01$,图 2 中 C、D)。C6 细胞共表达 proBDNF 和 p75NTR 呈一致性变化,并且二者的表达变化受到培养环境的影响,提示 proBDNF 可能通过自分泌机制激活 p75NTR,影响 C6 细胞的生物学行为。

2. 内源性 proBDNF 抑制了无血清培养的 C6 细胞的存活和增殖:MTT 结果显示,加入 p75NTR - ECD - Fc($5\mu\text{g/ml}$)至无血清培养的 C6 细胞中 48h,阻断 C6 细胞 p75NTR,细胞生长率无显著变化(图 3 中 A、B)。用特异性的 proBDNF 抗体($10\mu\text{g/ml}$)阻断内源性 proBDNF 作用,无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞 24h 后生长明显增加(图 3A, $P < 0.01$),48h 后生长增加了 1.36 ± 3.45 倍(图 3, $P < 0.01$)。而在 5% FBS - DMEM 培养的 C6 细胞中加入以上处理,细胞生长率无明显变化。BrdU 结果显示,和对照组(图 4 中 A、B)相比,加入 p75NTR - ECD - Fc($5\mu\text{g/ml}$)至无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞中 48h,细胞增殖率无显著变化(图 4 中 C、D、G)。加入 proBDNF 抗体($10\mu\text{g/ml}$) 48h 后,无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞增殖增加了 1.52 ± 5.44 倍(图 4 中 E、F、G, $P < 0.01$)。而在 5% FBS - DMEM 培养的 C6 细胞中加入以上处理,C6 细胞增殖率无明显变化。MTT 和 BrdU 结果提示,无 FBS - DMEM 培养时 C6 细胞 proBDNF 和 p75NTR 表达上调,抑制了 C6 细胞的生长和增殖,上调的 p75NTR 需要与内源性 proBDNF 结合发挥作用。

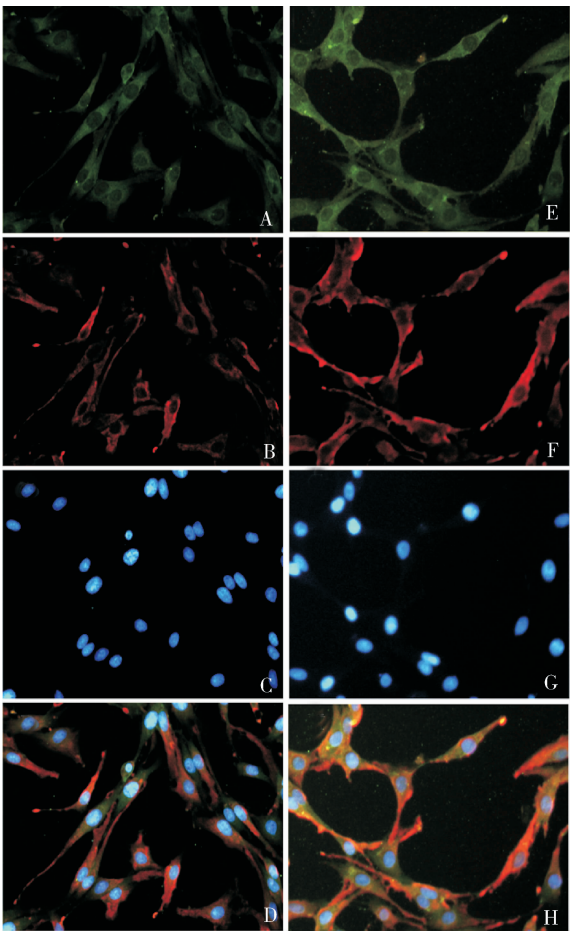


图 1 proBDNF 和 p75NTR 在无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞表达(荧光染色, $\times 400$)

A ~ D. proBDNF /p75NTR 在 5% FBS - DMEM 培养的 C6 细胞的共表达;E ~ H. proBDNF/p75NTR 在无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞的共表达。A、E. proBDNF (绿色荧光);B、F. p75NTR (红色荧光);D、H. proBDNF 和 p75NTR 共表达(黄色荧光),DAPI 核染色(蓝色荧光)

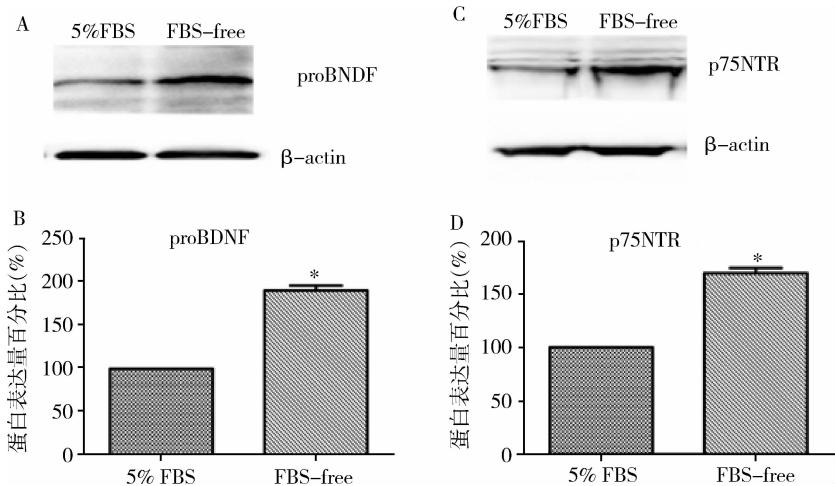


图 2 Western blot 法检测无 FBS - DMEM 培养的 C6 细胞 proBDNF 和 p75NTR 表达

A ~ B. proBDNF;C ~ D. p75NTR;与 5% FBS 相比,* $P < 0.01$

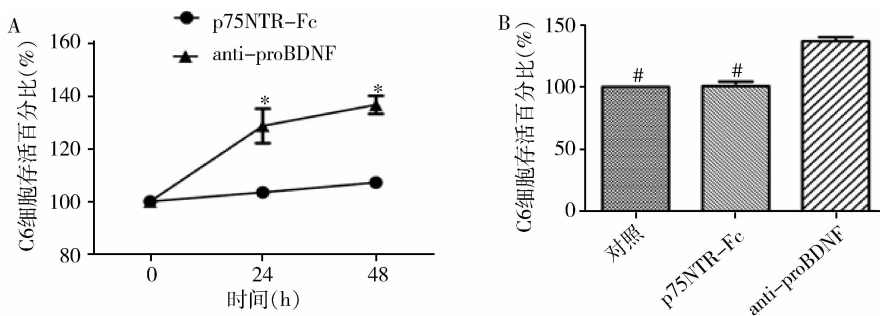


图3 anti-proBDNF对无FBS-DMEM培养的C6细胞存活的影响

A. 无FBS-DMEM培养的C6细胞用proBDNF抗体/p75NTR-ECD-Fc处理后0~48h的生长曲线; B. 无FBS-DMEM培养的C6细胞用proBDNF抗体/p75NTR-ECD-Fc处理48h的MTT结果; 与0h相比, * $P < 0.01$; 与anti-proBDNF相比, # $P < 0.01$

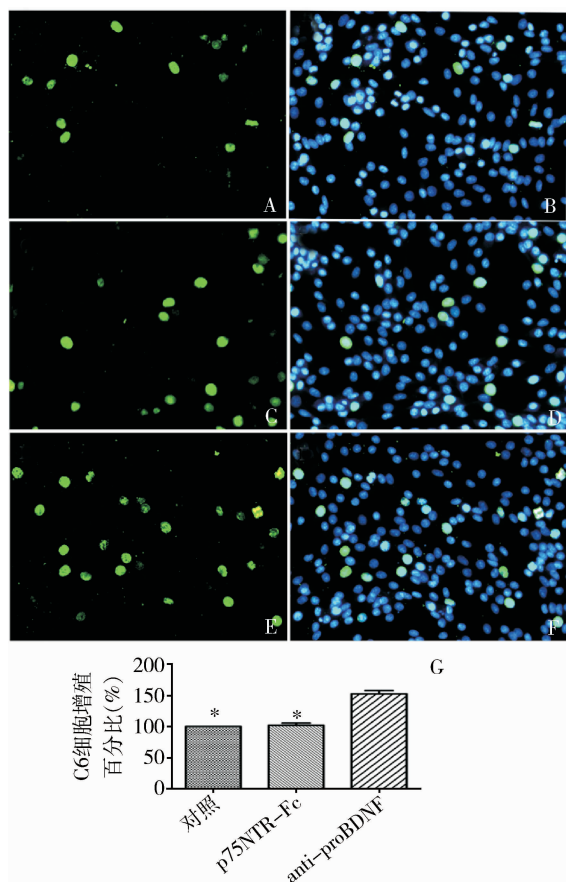


图4 anti-proBDNF对无FBS-DMEM培养的C6细胞增殖的影响(荧光染色, $\times 400$)

A、B. 对照组; C、D、G. p75NTR-ECD-Fc处理组; E、F、G. proBDNF抗体处理组。BrdU阳性细胞(绿色荧光), DAPI核染色(蓝色荧光)。与anti-proBDNF相比, * $P < 0.01$

讨 论

两种形式的BDNF(proBDNF和mBDNF)都存在于胶质细胞和神经元中,已有研究结果表明,两者通过两个不同的跨膜受体信号系统介导不同的生物学作用。mBDNF主要与TrkB受体结合,对细胞的生

长、分化、存活起重要作用。而研究证明proBDNF不仅是mBDNF的前体,本身也具有多种生物学作用。proBDNF与p75NTR的高亲和力结合,通过p75NTR及其共受体sortilin可以诱导细胞凋亡,抑制细胞迁移。

本研究探索了不同培养条件下大鼠C6胶质细胞表达proBDNF和p75NTR的变化,对C6细胞的生长和增殖的影响。免疫荧光双标显示proBDNF和p75NTR共表达于C6细胞质中,同时表达免疫荧光双标和Western blot法检测均证明无FBS-DMEM培养的C6细胞二者的表达呈一致性上调,提示细胞不同生长环境影响proBDNF和p75NTR的表达,proBDNF可能通过自分泌作用发挥其生物学作用。用特异性抗proBDNF抗体阻断C6细胞内源性proBDNF后,MTT实验和BrdU实验结果分别显示C6细胞的生长和增殖增加,提示上调的内源性proBDNF具有抑制C6细胞生长的作用。用p75NTR-ECD-Fc阻断C6细胞p75NTR后,C6细胞生长和增殖没有明显变化,提示上调的p75NTR作用依赖于与其结合的配体。

本研究结果提示无FBS-DMEM培养时,C6细胞proBDNF和p75NTR表达上调,提示proBDNF通过p75NTR抑制细胞生长和增殖的作用与细胞所处的环境相关。与之前研究结果一致,有研究证明,缺血状态下proBDNF和p75NTR的表达上调,诱导了细胞死亡^[9,10]。5%FBS-DMEM培养时,内源性proBDNF抑制细胞生长和增殖的作用不明显,还要考虑proBDNF被血清中蛋白酶降解,或血清中存在其他生长因子的促生长作用,掩盖了proBDNF本身的抑制效应^[11]。

proBDNF和mBDNF共存于细胞中,二者存在相互平衡制约的关系,如神经发育、棘突生长过程中。

proBDNF - p75 通路可能起到平衡 mBDNF - TrkB 通路的作用,proBDNF 和 mBDNF 及其受体的相对表达水平决定了这两条通路在细胞存活和增殖中谁的作用为主,而这个平衡是一个动态过程,受细胞生长环境的影响。无 FBS - DMEM 培养时,proBDNF 和 p75NTR 表达均上调,阻断内源性 proBDNF 效应时,C6 细胞存活和增殖均明显增加,提示不同环境下二者的变化,proBDNF - p75NTR 和 mBDNF - TrkB 平衡打破,proBDNF - p75NTR 抑制细胞生长和增殖的作用占优势。这可能有助于解释在一些疾病中,“微环境”的变化,打破了 proBDNF 和 mBDNF 平衡,引起疾病进展。因此,调节 proBDNF 向 mBDNF 的裂解过程或者控制 p75NTR 和 TrkB 之间的平衡,可能成为对一些疾病治疗的新靶点。

志谢:感谢澳大利亚南澳大学生命科学研究院周新富教授提供研究所需的抗体和技术支持。

参考文献

- 1 Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, *et al.* Biosynthesis and post - translational processing of the precursor to brain - derived neurotrophic factor[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (16) : 1260 - 1266
- 2 Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, *et al.* Cleavage of proBDNF by tPA/ plasmin is essential for long - term hippocampal plasticity[J]. Science, 2004, 306 (5695) : 487 - 491
- 3 Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, *et al.* Ligand - dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons[J]. Neuron,

- 2006, 50 (2) : 219 - 232
- 4 Teng HK, Teng KK, Lee R, *et al.* ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin[J]. J Neurosci, 2005, 25 (22) : 5455 - 5463
- 5 Fan YJ, Wu LL, Li HY, *et al.* Differential effects of pro - BDNF on sensory neurons after sciatic nerve transection in neonatal rats[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27 (9) : 2380 - 2390
- 6 Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, *et al.* Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses[J]. Neuron Glia Biol, 2004, 1 (4) : 1 - 11
- 7 Sun Y, Lim Y, Li F, *et al.* ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA[J]. LloS One, 2012, 7 (4) : e35883
- 8 Xu ZQ, Sun Y, Li HY, *et al.* Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33 (8) : 1376 - 1384
- 9 Wei Y, Wang HZ, Zhang FK, *et al.* Enhanced expression of proneurotrophins in elevated introcular pressure - induced rat retinal ischemia[J]. Chin Med J:Engl, 2012, 125 (21) : 3875 - 3879
- 10 Angelo MF, Aviles - Reyes RX, Villarreal A, *et al.* p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization[J]. J Neurosci Res, 2009, 87 (8) : 1892 - 1903
- 11 Suter - Crazzolaria C, Unsicker K. GDNF mRNA levels are induced by FGF - 2 in rat C6 glioblastoma cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 41 (1 - 2) : 175 - 182

(收稿日期:2014 - 07 - 21)

(修回日期:2014 - 09 - 17)

百里醌诱导膀胱癌细胞凋亡作用机制的研究

王大文 朱诗建 木海琦 李 晟 周鹏飞 杨 森 南存金 陈映鹤

摘 要 **目的** 探讨百里醌对人膀胱癌细胞株 BIU - 87 细胞凋亡的影响及对其诱导凋亡的潜在作用机制。**方法** 应用 CCK8 法检测细胞增殖活性,Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡,荧光定量 PCR 检测基因 Bcl - 2、Bax、caspase - 3、c - myc mRNA 的表达水平,Wsetern blot 法检测不同浓度百里醌作用后 Bcl - 2、Bax、c - myc 蛋白表达水平的变化。**结果** 细胞增殖抑制曲线结果显示百里醌能明显抑制 BIU - 87 细胞增殖,其 24、48、72h 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别是 38.75 ± 0.58、34.33 ± 1.01 和 32.43 ± 0.71 μmol/L。百里醌能以剂量依赖性方式诱导膀胱癌细胞凋亡。百里醌作用于 BIU - 87 细胞后,Bcl - 2、c - myc mRNA 及 Bcl - 2、c - myc 蛋白的表达量呈浓度依赖性降低,而 caspase - 3、Bax mRNA 及 caspase - 3、Bax 蛋白表达水平呈浓度依赖性递增。**结论** 百里醌能抑制 BIU - 87 细胞的增殖,且能诱导 BIU - 87 细胞的凋亡,其诱导凋亡机制可能与 Bcl - 2、c - myc 表达水平降低及 caspase - 3、Bax 表达水平上调有关。

关键词 百里醌 膀胱癌 Bcl - 2 Bax c - myc caspase

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项目(2011ZB092);浙江省卫生厅基金资助项目(2012KYB134)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:陈映鹤,硕士生导师,电子信箱:chenyh@ wzhealth. com