

NGF 中和抗体、DAPT 对食管癌 Eca109 细胞 p75^{NTR} 核表达及细胞增殖、侵袭能力的影响

邓江华,李秋实,朱兵兵,陈晶晶,慕晓玲

摘要 目的 探究神经生长因子(NGF)中和抗体、 γ -分泌酶抑制剂 3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S-苯基甘氨酸-t-丁酯(DAPT)对食管癌 Eca109 细胞 p75 神经生长因子受体(p75^{NTR})核表达及细胞增殖、侵袭能力的影响。方法 采用免疫荧光细胞化学技术,检测 NGF 中和抗体、DAPT 处理 Eca109 细胞前后 p75^{NTR}、Ki67 的表达变化;分别采用 CCK-8 法和 Transwell 细胞侵袭实验,检测 NGF 中和抗体、DAPT 单独或联合处理 Eca109 细胞前后其增殖能力及侵袭能力的变化。结果 免疫荧光细胞化学技术检测结果显示 NGF 中和抗体、DAPT 处理细胞后,p75^{NTR}核表达的细胞数量均减少,且 NGF 中和抗体和 DAPT 联合处理细胞后,p75^{NTR}核表达的细胞数量最少,差异有统计学意义($P < 0.05$);CCK-8 法及 Transwell 细胞侵袭实验结果显示 NGF 中和抗体、DAPT 处理细胞后,细胞增殖、侵袭能力较处理前均相应减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NGF 中和抗体、DAPT 抑制 p75^{NTR}的核转移,降低 p75^{NTR}的核表达率,减弱细胞增殖、侵袭能力。

关键词 食管癌 Eca109 细胞;NGF 中和抗体; γ -分泌酶抑制剂 DAPT;p75^{NTR}

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1536-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.005

食管癌(esophageal cancer, EC)一直以来都因其高发病率和死亡率而备受关注,据 2020 年统计数据其发病率居全球癌症发病的第 7 位,死亡率居第 6 位^[1]。肿瘤干细胞理论的提出以及近年来的研究进展为食管癌的靶向治疗提供了新途径。

p75 神经生长因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75^{NTR})可作为食管癌的肿瘤标志物,同时也是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的受体。

本课题组李秋霞等^[2]发现食管癌 Eca109 细胞不仅表达且自分泌 NGF,并通过对比 NGF 处理前后 p75^{NTR}在 Eca109 细胞及细胞球中的核表达变化,推断 NGF 促进了 p75^{NTR}向细胞核转移。本研究将继续探讨 NGF 中和抗体、 γ -分泌酶抑制剂 3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S-苯基甘氨酸-t-丁酯(3,5-difluorophenylacetyl-L-alanyl-S-ph-enylglycine-t-butyl ester, DAPT)对 Eca109 细胞 p75^{NTR}核表达的影响,用 NGF 处理所有 Eca109 细胞,同时单独或联合使用 NGF 中和抗体、DAPT 处理,通过分析 p75^{NTR}、Ki67 的表达变化,进一步证实 NGF 和 γ -分泌酶对 p75^{NTR}向细胞核转移的促进作用,并探究 NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞增殖能力和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管鳞癌 Eca109 细胞(中国科学院上海细胞库);高糖 DMEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青链霉素混合液(双抗)(上海索莱宝生物科技有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)核染色液、DAPT(美国 Sigma 公司);外源性重组人 NGF、小鼠抗人 Ki67 单克隆抗体、兔抗人 NGF 单克隆抗体、兔抗人 p75^{NTR}单克隆抗体(英国 Abcam 公司);山羊抗兔 IgG-FITC 二抗、山羊抗鼠 IgG-TRITC 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);1.2 μ m 孔径 Matrigel Matrix 基质胶(美国 BD 公司);24 孔 Transwell 小室(美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞准备 Eca109 细胞接种于含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24~48 h 期间,用普通光学显微镜观察细胞生长状态,选取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 免疫荧光细胞化学检测 取对数生长期的细胞,以外源性重组人 NGF(100 ng/ml)处理细胞 6

2022-05-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460310);新疆兵团科技支撑计划项目(编号:2013AB024)

作者单位:石河子大学医学院,新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室,石河子 832000

作者简介:邓江华,男,硕士研究生;

慕晓玲,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xiaoling-mr@163.com

h,对于使用 NGF 中和抗体、DAPT 单独或联合处理细胞,则是在加入外源性重组人 NGF(100 ng/ml)的基础上分别加入 NGF 中和抗体(兔抗人 NGF 单克隆抗体,1:2 500)、DAPT(10 μ mol/L)以及联合加入 NGF 中和抗体(1:2 500)和 DAPT(10 μ mol/L),均处理 24 h。用含 EDTA 的胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,再用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基重悬细胞后进行细胞计数,细胞以 8×10^3 个/ml 浓度滴加在放有盖玻片的 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行细胞爬片,24 h 后取出盖玻片进行固定以及封闭。用稀释好的一抗(兔抗人 p75^{NTR} 单克隆抗体、小鼠抗人 Ki67 单克隆抗体,均为 1:100)充分覆盖进行孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日复温后用 PBS 泡洗(泡洗 3 次,每次 3 min),滴加稀释好的荧光二抗(山羊抗兔 IgG-FITC、山羊抗鼠 IgG-TRITC,均为 1:100),室温孵育 2 h 后再用 PBS 泡洗(泡洗 3 次,每次 3 min),DAPI 染色 10 min,用 PBS 泡洗(泡洗 3 次,每次 3 min),封片后在激光共聚焦显微镜下观察着色部位及荧光强度。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖情况 按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作,将细胞用含 EDTA 的胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,稀释成 1×10^5 个/ml 浓度,按每孔 100 μ l 接种至 96 孔板,单独或联合加入 NGF、NGF 中和抗体和 DAPT,并设空白组(未作任何处理),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中,分别于 24、48、72 h 滴加 CCK-8 工作液(每孔 10 μ l),孵育 2 h。酶标仪 450 nm 处检测各孔吸光度(optical density, OD)值,对结果进行记录、统计,并描绘细胞增殖曲线。

1.2.4 Transwell 细胞侵袭实验 用无血清的

DMEM 高糖培养基稀释基质胶(基质胶:培养基 = 1:8),稀释后的工作液加入上室面,4 $^{\circ}$ C 条件下晾干。吸弃残余培养基,各孔均加入 60 μ l 含有 10 g/L BSA 的无血清培养基,37 $^{\circ}$ C 作用 30 min。用无血清培养基将细胞密度调为 1×10^5 /ml,取 100 μ l 加入上室,下室加入 600 μ l 含有 20% FBS 的培养基,去除气泡,放入培养箱,48 h 后取出 Transwell 小室,弃去上室内的培养基和基质胶,用棉签拭去上室残留的细胞,特别是边缘,将棉签弄尖沿壁转一圈,4% 多聚甲醛固定 20 min。0.1% 结晶紫染色后用 PBS 洗去残留染液,每个小室在显微镜下选取上、下、左、右、中 5 个 200 \times 视野的细胞,对显色细胞进行计数。对于单独或联合应用 NGF、NGF 中和抗体和 DAPT 处理的细胞,则是预先加入处理剂培养 24 h,再进行 Transwell 细胞侵袭实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGF、NGF 中和抗体和 DAPT 对 Eca109 细胞 p75^{NTR}、Ki67 表达的影响 结果显示,两种蛋白在细胞上均有表达,其中 Ki67 荧光在 NGF 处理前后均位于细胞核;p75^{NTR} 荧光在 NGF 处理前,位于细胞核的数量很少,主要位于细胞质,在 NGF 处理后,p75^{NTR} 荧光位于细胞核的数量增多,见图 1。

此外,为了进一步观察 NGF 中和抗体、DAPT 对 p75^{NTR} 核表达的影响,课题组在用 NGF 处理所有 Eca109 细胞的同时,单独或联合加入 NGF 中和抗体、 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 处理后检测 p75^{NTR}、Ki67

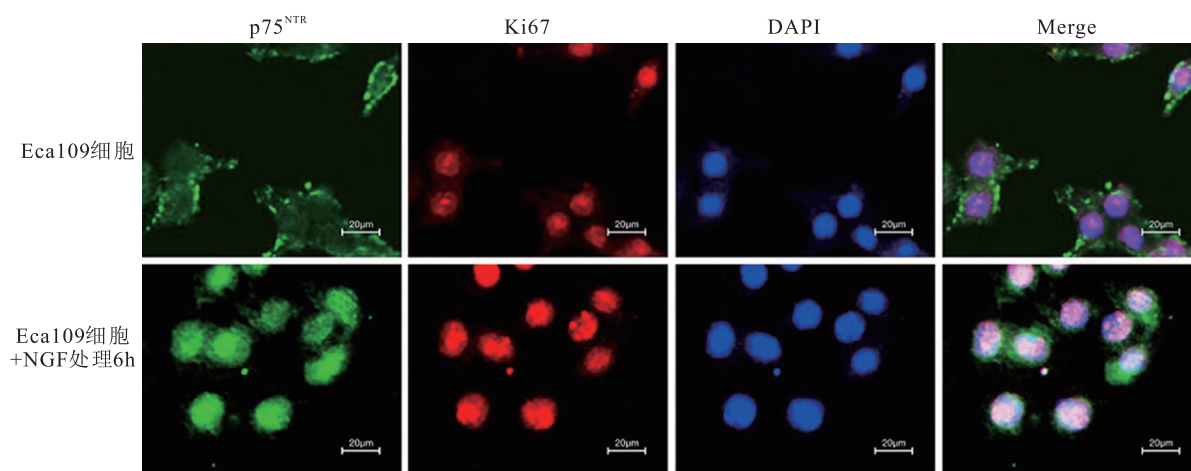


图1 NGF 对 Eca109 细胞 p75^{NTR}、Ki67、DAPI 表达的影响 $\times 200$

的表达定位。结果显示,NGF 中和抗体、 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 处理后,p75^{NTR} 和 Ki67 在细胞中均有表达,与 NGF 中和抗体、DAPT 处理前相比,Ki67 荧光在 Eca109 细胞中仍全都位于细胞核,p75^{NTR} 荧光位于细胞核的数量均减少,且 NGF 中和抗体和 DAPT 联合使用后,p75^{NTR} 荧光位于细胞核的数量最少,差异有统计学意义 ($F = 106.074, P < 0.001$),见图 2、3。

2.2 NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞增殖能力的影响 CCK-8 法检测结果显示,NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞的增殖能力均有抑制作用,且使用 NGF 中和抗体和 DAPT 联合处理细胞,其抑制作用较单独使用更强,差异有统计学意义 ($F = 52.261, P < 0.001$),见图 4。

此外,为了进一步观察在 NGF 作用下,NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞增殖能力的影响,用 NGF 处理所有 Eca109 细胞,同时单独或联合使用 NGF 中和抗体、DAPT 处理细胞,结果显示,Eca109

细胞的增殖能力同样被抑制,且 NGF 中和抗体和 DAPT 联合处理的抑制作用较单独使用也更强,差异有统计学意义 ($F = 148.086, P < 0.001$),见图 5。

2.3 NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞侵袭能力的影响 Transwell 细胞侵袭实验结果显示,经 NGF 中和抗体、DAPT 处理后,穿膜细胞数量明显减少,因细胞侵袭能力的大小与穿膜细胞数量呈正相关,即经 NGF 中和抗体、DAPT 处理后,Eca109 细胞的侵袭能力降低,且使用 NGF 中和抗体和 DAPT 联合处理细胞,其抑制作用较单独使用更强,差异有统计学意义 ($F = 63.13, P < 0.001$),见图 6。

同样地,用 NGF 处理所有 Eca109 细胞,同时单独或联合使用 NGF 中和抗体、DAPT 处理细胞,结果显示,Eca109 细胞的侵袭能力同样降低,且 NGF 中和抗体和 DAPT 联合使用的抑制作用较单独使用也更强,差异有统计学意义 ($F = 52.191, P < 0.001$),见图 7。

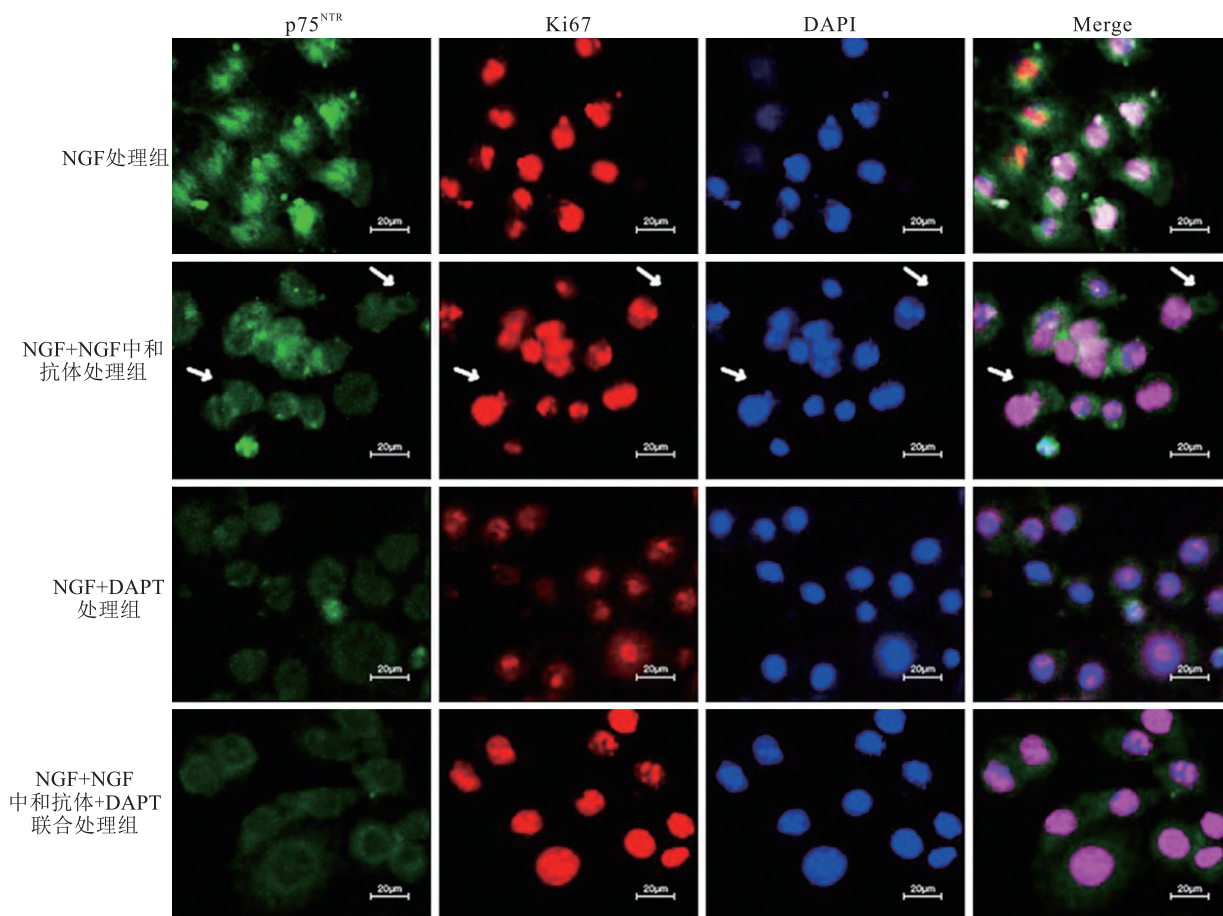


图2 NGF 联合 NGF 中和抗体、DAPT 对 Eca109 细胞 p75^{NTR}、Ki67、DAPI 表达的影响 ×200

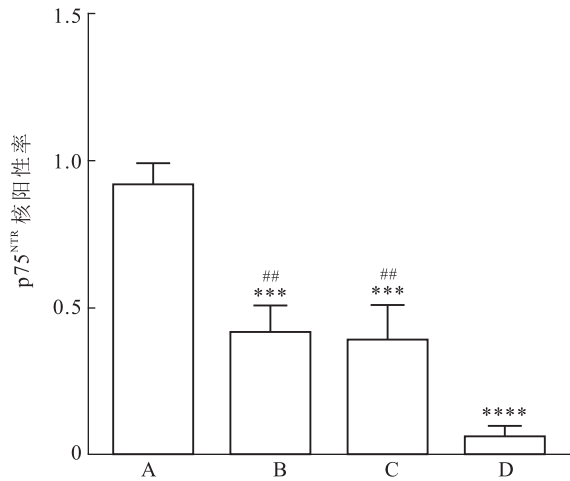


图3 p75^{NTR}核定位表达统计结果

A:NGF组;B:NGF+NGF中和抗体组;C:NGF+DAPT组;D:NGF+NGF中和抗体+DAPT组;与NGF组比较:*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与NGF+NGF中和抗体+DAPT组比较:## $P < 0.01$

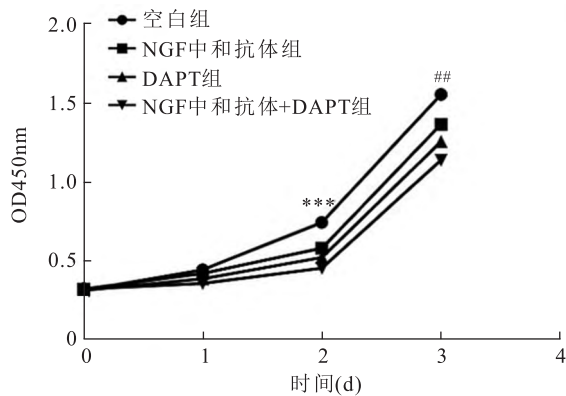


图4 NGF中和抗体、DAPT对Eca109细胞增殖能力的影响

与空白组比较:*** $P < 0.001$;与NGF中和抗体+DAPT组比较:## $P < 0.01$

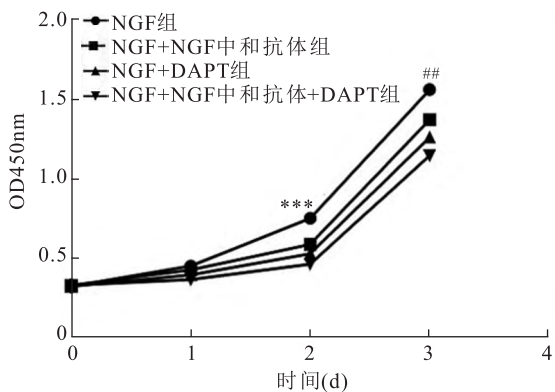


图5 NGF作用下NGF中和抗体、DAPT对Eca109细胞增殖能力的影响

与NGF组比较:*** $P < 0.001$;与NGF+NGF中和抗体+DAPT组比较:## $P < 0.01$

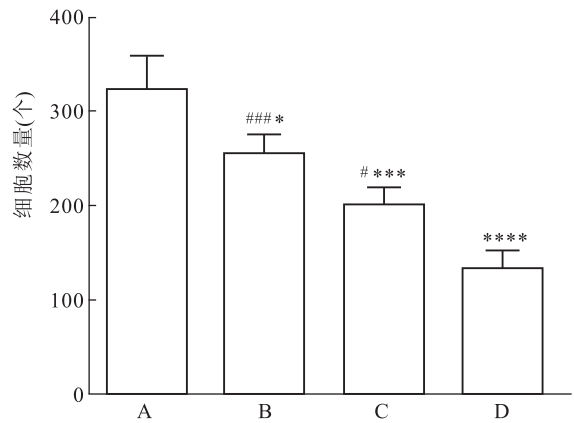
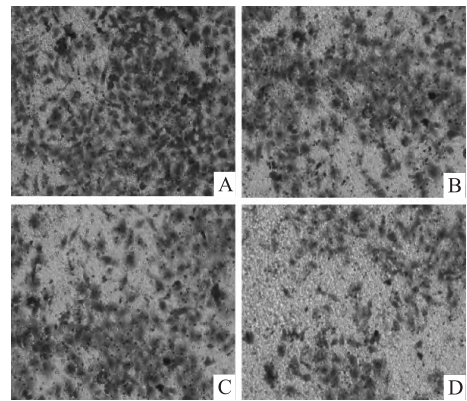


图6 NGF中和抗体、DAPT对Eca109细胞侵袭能力的影响 ×200

A:空白组;B:NGF中和抗体组;C:DAPT组;D:NGF中和抗体+DAPT组;与空白组比较:* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;与NGF中和抗体+DAPT组比较:## $P < 0.05$,### $P < 0.001$

3 讨论

NGF发挥作用的途径是与其两种受体结合,分别是酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TrkA)受体和p75^{NTR}[3]。其中,NGF能诱导p75^{NTR}的裂解,伴随γ-分泌酶调控的膜内部裂解而释放p75^{NTR}的胞内结构域,并以γ-分泌酶依赖的方式促进其胞内结构域的核转移[4]。p75^{NTR}目前已被鉴定为食管癌干细胞的标志物,在食管癌中,与不表达p75^{NTR}的癌细胞相比,表达p75^{NTR}的癌细胞具有较高的自我更新和增殖能力,且癌症的存活和维持依赖于p75^{NTR}的表达。表达p75^{NTR}的癌细胞显示出干细胞相关基因表达量的增加[5]。本课题组前期研究[6-7]中,以无血清成球培养法富集食管癌Eca109干细胞样细胞,发现p75^{NTR}核阳性表达的Eca109细胞球表现出食管癌干细胞的某些特性,且随着细胞球p75^{NTR}核阳性表达率的增加,其表现的干细胞特性增强,由此建立了p75^{NTR}的核表达情况与食管癌干细胞的联系,即

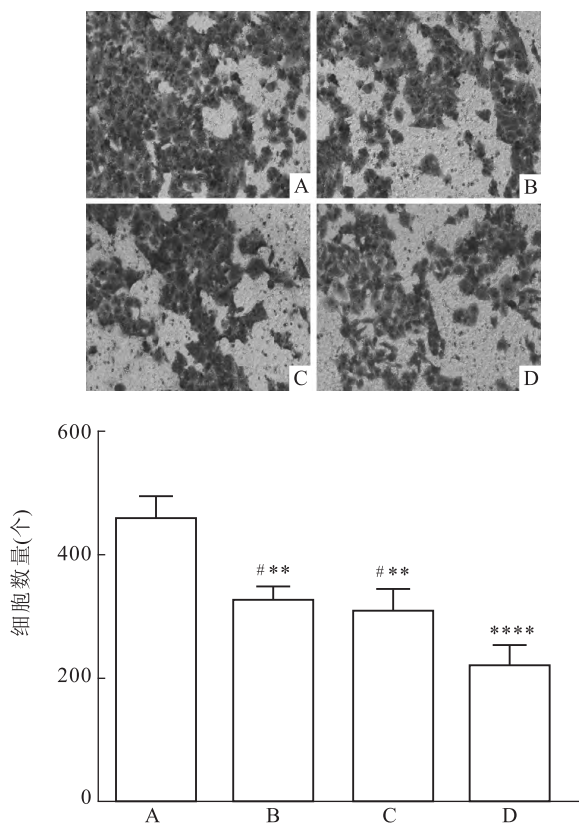


图7 NGF作用下NGF中和抗体、DAPT对Eca109细胞侵袭能力的影响 ×200

A: NGF组; B: NGF + NGF中和抗体组; C: NGF + DAPT组; D: NGF + NGF中和抗体 + DAPT; 与NGF组比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与NGF + NGF中和抗体 + DAPT组比较: # $P < 0.05$

p75^{NTR}核表达阳性的食管癌细胞可能为食管癌干细胞。

近年来,NGF在肿瘤领域所发挥的作用受到越来越多的关注。在人神经胶质瘤中,NGF可以促进脑肿瘤起始细胞增殖,并且NGF中和抗体可以抑制脑肿瘤起始细胞的增殖^[8];在乳腺癌组织中,NGF及其受体TrkA出现异常的高表达^[9];在胰腺癌组织中,NGF的表达水平远高于正常组织,且NGF对胰腺癌细胞的生长作用取决于TrkA和p75^{NTR}表达量的水平以及它们之间的比率^[10]。肿瘤细胞是通过自分泌和旁分泌NGF,促进自身细胞增殖,在乳腺癌、胰腺癌中已经研究确切。本课题组前期已发现食管癌Eca109细胞表达且自分泌NGF,在使用NGF处理细胞后检测p75^{NTR}的表达变化,发现NGF促进了p75^{NTR}的核转移^[2]。本研究继续探讨NGF中和抗体对p75^{NTR}核转移的影响,进一步证实了课题组前期的发现。

本研究基于前期实验结果,应用NGF处理食管

癌Eca109细胞,同时单独或联合使用NGF中和抗体、DAPT处理细胞,结果显示,NGF可以促进p75^{NTR}的核转移,NGF中和抗体、DAPT处理Eca109细胞后,Eca109细胞中p75^{NTR}核阳性率明显降低,其增殖、侵袭能力也相应被抑制,且NGF中和抗体与DAPT联合使用较单独使用的抑制作用更强。总之,NGF中和抗体、DAPT均可抑制p75^{NTR}的核转移,降低Eca109细胞的增殖、侵袭能力。

DAPT, γ -分泌酶的小分子抑制剂,因其有效的抗癌作用获得广泛关注。包括DAPT能有效减少乳腺导管内原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)诱导的细胞球形成^[11];DAPT可阻断NGF介导的脑肿瘤起始细胞的增殖^[8]。Wang et al^[12]发现,侵袭性脑胶质瘤中,p75^{NTR}发生可调控的膜内蛋白水解,促进肿瘤的迁移和侵袭,而 γ -分泌酶抑制剂的使用可明显抑制该作用。同样地,在结肠癌、子宫颈癌中也有相关报道^[13-14]。因此, γ -分泌酶可能是癌症中潜在的广泛治疗靶标。然而,目前 γ -分泌酶抑制剂对食管癌的影响的相关报道仍较少。

基于肿瘤干细胞理论,现已初步明确NGF在维持肿瘤干细胞未分化状态方面发挥着关键作用。Tomellini et al^[15]在探究NGF及其前体proNGF对乳腺癌干细胞的影响中,发现NGF或proNGF是以增加静止/慢增殖的肿瘤干细胞对称分裂的数量来富集乳腺癌干细胞,其受体p75^{NTR}通过调控多能性转录因子,介导乳腺癌干细胞的自我更新,证实NGF/proNGF-p75^{NTR}轴在调控乳腺癌干细胞的自我更新方面起着关键作用。本实验证实,在食管癌中,NGF-p75^{NTR}轴同样参与调控食管癌干细胞的自我更新,但具体NGF-p75^{NTR}轴发挥作用的机制及p75^{NTR}核转移的方式尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] 李秋霞, 裴学莲, 刘洋, 等. 神经生长因子在食管鳞癌细胞中的表达及分泌[J]. 解剖学报, 2015, 46(3): 348-53.
- [3] Huang E J, Reichardt L F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 609-42.
- [4] Frade J M. Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding[J]. J Neurosci, 2005, 25(6): 1407-11.
- [5] Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, et al. The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell

- carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006,12(17): 5096 - 103.
- [6] 李秋实,王 飒,王文强,等. 人食管鳞癌细胞球细胞的干细胞特性研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2018,36(3): 272 - 7.
- [7] 王文强,陈雅琳,朱兵兵,等. 人食管鳞癌 p75^{NTR} 的核阳性表达细胞特性的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2019,37(2): 251 - 8.
- [8] Forsyth P A, Krishna N, Lawn S, et al. p75 neurotrophin receptor cleavage by alpha- and gamma-secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells[J]. J Biol Chem, 2014,289(12): 8067 - 85.
- [9] Dollé L, Adriaenssens E, Yazidi-Belkoura I E, et al. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004,4(6): 463 - 70.
- [10] Zhu Z W, Friess H, Wang L, et al. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2001,7(1): 105 - 12.
- [11] Islam F, Gopalan V, Wahab R, et al. Cancer stem cells in oesophageal squamous cell carcinoma: Identification, prognostic and treatment perspectives[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2015,96(1): 9 - 19.
- [12] Wang L, Rahn J J, Lun X, et al. Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor[J]. PLoS Biol, 2008,6(11): e289.
- [13] Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, et al. Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells[J]. Gastroenterology, 2008,134(1): 131 - 44.
- [14] Liu J, Ye F, Chen H, et al. Expression of differentiation associated protein Hes1 and Hes5 in cervical squamous carcinoma and its precursors[J]. Int J Gynecol Cancer, 2007,17(6): 1293 - 9.
- [15] Tomellini E, Touil Y, Lagadec C, et al. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment[J]. Stem Cells, 2015,33(2): 342 - 53.

Effects of anti-NGF and DAPT on nuclear expression of p75^{NTR} and proliferation and invasion ability of esophageal cancer Eca109 cells

Deng Jianghua, Li Qiushi, Zhu Bingbing, Chen Jingjing, Mu Xiaoling

(School of Medicine, Shihezi University, Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832000)

Abstract Objective To explore the effects of the nerve growth factor neutralizing antibody (anti-NGF) and γ -secretase inhibitor 3,5-difluorophenylacetyl-L-alanyl-S-ph-enylglycine-t-butyl ester (DAPT) on the nuclear expression of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) in esophageal cancer Eca109 cells and on cell proliferation and invasion. **Methods** Immunofluorescence cytochemistry was used to detect the expression changes of p75^{NTR} and Ki67 in Eca109 cells before and after treatment with the anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT; CCK-8 kit and Transwell cell invasion experiment were used to detect the changes of cell proliferation and invasion ability before and after treatment of Eca109 cells with the anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT alone or in combination. **Results** Immunofluorescence cytochemistry showed that after treatment of cells with the anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT, the number of cells expressing p75^{NTR} in the nucleus decreased, and after the combined treatment of cells with the anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT, the number of cells expressing p75^{NTR} in the nucleus was the least, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); CCK-8 method and Transwell cell invasion experiment showed that after treatment of cells with the anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT, cell proliferation and invasion ability were correspondingly weaker than those before treatment, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The anti-NGF and γ -secretase inhibitor DAPT not only inhibit the nuclear transfer of p75^{NTR}, but also reduce the nuclear expression rate of p75^{NTR} and weaken the cell proliferation and invasion ability accordingly.

Key words esophageal cancer Eca109 cells; anti-NGF; γ -secretase inhibitor DAPT; p75^{NTR}