DOI:10.16016/j.1000-5404.201501001

论著

迷走神经递质P物质对人类肝癌细胞侵袭转移能力的影响及其分子机制

吴黎雳[1],宦宏波[1],温旭东[1],张 亮[1],杨大鹏[1],钱 程[2],夏 锋[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[1],全军临床病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨迷走神经递质P物质对肝癌细胞侵袭转移能力的影响及其相关分子机制。**方法** 实时荧光定量PCR及琼脂糖凝胶电泳检测并分析两种人肝癌细胞株HepG2和SMMC-7721中神经肽-1(NK-1)受体表达;CellTiter Blue检测不同浓度P物质(0、100、250、500 nmol/L)在不同时间点(0、24、48、72、96、120 h)对肝癌细胞增殖能力的影响;肝癌细胞均经不同浓度的(0 nmol/L,对照组;100 nmol/L,实验组)P物质处理48 h,Transwell实验检测细胞迁移和侵袭功能,Western blot检测细胞中上皮-间质转化蛋白质标志表达变化,实时荧光定量PCR及Western blot检测NK-1受体表达变化。**结果** HepG2和SMMC-7721两种人肝癌细胞中均有NK-1受体表达;不同浓度P物质(0、100、250、500 nmol/L)在96 h内不影响两种细胞的增殖能力($P>0.05$),而在120 h 250 nmol/L和500 nmol/L P物质可抑制两种细胞增殖($P<0.05$);100 nmol/L P物质明显促进两种细胞迁移和侵袭能力($P<0.05$);与对照组相比,实验组细胞NK-1受体表达明显上调($P<0.05$),同时,细胞中上皮-间质转化蛋白质标志E-Cadherin表达下调,N-Cadherin和Slug表达上调($P<0.05$)。**结论** 迷走神经递质P物质与人肝癌细胞中表达的NK-1受体相互作用并使其表达上调,促进细胞发生上皮-间质转化,进而提高其侵袭转移能力。

[关键词] 迷走神经;P物质;肝细胞癌;侵袭转移;上皮-间质转化
[中图法分类号] R73-37; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Substance P improves invasive and migrative capacity in human hepatocellular carcinoma

Wu Lili[1], Huan Hongbo[1], Wen Xudong[1], Zhang Liang[1], Yang Dapeng[1], Qian Cheng[2], Xia Feng[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the vagal neurotransmitter, substance P, on the change of the invasive and migrative capacity in human hepatocellular carcinoma and its possible molecular mechanism. **Methods** Real-time RT-PCR and agarose gel electrophoresis were used to detect the expression of neurokinin-1 (NK-1) receptor in hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and SMMC-7721. After the cells were treated by substance P at different concentrations (0, 100, 250 or 500 nmol/L) for different times (0, 24, 48, 72, 96 or 120 h), CellTiter Blue cell viability assay was used to measure cell proliferation. Then after the cells were treated by 0 and 100 nmol/L substance P for 48 h, transwell chamber assay was used to detect cell invasion and migration, Western blotting to test the proteins (E-cadherin, N-cadherin and Slug) considered as the landmarks of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and RT-PCR and Western blotting to measure the expression of NK-1 receptor. **Results** NK-1 receptor was expressed in both HepG2 and SMMC-7721 cells. Treatment of different concentrations of substance P (0, 100, 250 and 500 nmol/L)

[基金项目] 教育部肿瘤免疫病理学重点实验室开放课题(2012jsz108)
[通信作者] 夏 锋,E-mail: frankfxia@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.017.html(2015-03-19)

for 96 h had no effect on the proliferation of the both kinds of cells ($P>0.05$), however, when the dose increasing to 250 and 500 nmol/L and the time elapsing to 120 h, the proliferation was inhibited obviously ($P<0.05$). Substance P (100 nmol/L) remarkably enhanced the capacity of invasion and migration in the both kinds of cells ($P<0.05$). Compared with control group, the expression of NK-1 receptor was significantly up-regulated ($P<0.05$), and that of E-Cadherin decreased, whereas, that of N-Cadherin and Slug increased ($P<0.05$) in the cells after substance P treatment (100 nmol/L, for 48 h). **Conclusion** Substance P interacts with NK-1 receptor and induces its up-regulation, and then improves the process of EMT and enhances the invasive and migrative capacity in the hepatocellular carcinoma cells.

[**Key words**] vagus; substance P; hepatocellular carcinoma; invasion and migration; epithelial-to-mesenchymal transition

Supported by the Open Project of Key Laboratory of Tumor Immunology and Pathology of Ministry of Education (2012jsz108). Corresponding author: Xia Feng, E-mail: frankfxia@163.com

肝细胞癌发病率目前在所有肿瘤发病率中处于第6位,其致死率位居第3。肝细胞癌经各种治疗后复发转移率高已成为临床亟待解决的问题[1-2]。慢性炎症、病毒感染及长期肝纤维化和肝硬化状态是已被公认的肝细胞癌复发的重要危险因素[3]。目前最新的观点认为,在肿瘤的发生、发展过程中神经系统的支配及其对肿瘤组织的营养作用必不可少[4]。迷走神经在内脏器官中分布极其广泛,是支配肝脏的主要神经之一,在肝脏的病理生理过程中发挥着相当重要的调控作用[5]。P物质是迷走神经感觉纤维末梢所释放的主要神经递质,具有调控免疫反应和肿瘤发生发展的作用[6]。然而对于迷走神经在肝细胞癌发生发展过程中所起的作用,尤其是其感觉神经纤维末梢所释放的P物质对肝癌细胞生物学功能的影响及其可能的分子机制还少见报道。本研究旨在证实迷走神经递质P物质对人类肝癌细胞增殖及侵袭转移能力的影响,并探讨其可能的分子机制,以期为临床开创新的肝细胞癌治疗方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

P物质(美国Sigma公司),兔抗人N-Cadherin多抗和兔抗人Slug多抗(Epitomics公司),兔抗人NK-1受体多抗(Santa Cruz公司),小鼠抗人E-Cadherin多抗(Abcam公司),兔抗人GAPDH多抗(BioVision公司),辣根过氧化酶标记山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗(中杉金桥生物技术公司),RNA提取试剂TRIzol、反转录试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司),CellTiter Blue细胞增殖活性检测试剂盒(美国Promega公司),Metrigel生物基质胶(美国BD公司),DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司),Transwell小室(美国Millipore公司)。实时荧光定量PCR仪、蛋白质凝胶电泳、电转系统、凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),紫外分光光度计(美国Themo Fisher公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 实验所使用的人肝癌细胞株HepG2和SMMC-7721来源于美国ATCC细胞库。两种细胞均培养在含有10%胎牛血清的DMEM细胞培养液中。细胞培养箱内培养条件设置为恒温37℃,恒定5% CO_2浓度。每隔2天换液,对数生长期传代。

1.2.2 细胞RNA提取、反转录及实时定量荧光PCR 取1~5×10^6个细胞,用TRIzol提取细胞总RNA,检测其纯度、浓度和完整性后,反转录为cDNA并进行实时荧光定量PCR检测。10 μL反应体系如下配制:0.5 μL cDNA+0.4 μL前引物+0.4 μL后引物+5 μL SYBR+3.7 μL无酶水配制成。按如下反应条件扩增45个循环:95 ℃解链30 s,60 ℃退火10 s,72 ℃延伸30 s。其中以无酶水代替cDNA模板作为阴性对照,以扩增GAPDH作为阳性对照。用Bio-Rad CFX Manager软件对两种细胞NK-1受体表达进行定量分析。取各扩增产物2 μL在1%琼脂糖凝胶上电泳定性检测分析PCR扩增产物长度与预期产物长度的一致性。PCR反应体系中以无酶水代替cDNA模板作为阴性对照,扩增GAPDH作为阳性对照及内参照。所用引物序列及预计扩增产物长度见表1。

表1 Real-time PCR引物序列及预计产物长度

引物名称	序列	预计产物长度
NK-1受体	上游:5′-AGGTTCCGTCTGGGCTTCAA-3′	134 bp
	下游:5′- TCCAGGCGGCTGACTTTGTA-3′	
GAPDH	上游:5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′	258 bp
	下游:5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′	

1.2.3 CellTiter Blue 检测细胞的增殖活性 取对数生长期的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞消化、离心后制成单细胞悬液。在流式细胞仪下按 300 个细胞/孔，接种到 96 孔细胞培养板中。设置 P 物质浓度梯度：0、100、250、500 nmol/L。每种细胞每个药物浓度设 3 个复孔，含 10% FBS 的 DMEM 培养基（不含细胞）作为空白对照。分别于 0、24、48、72、96、120 h 在避光条件下，向每次所要检测的孔中，每孔加入 100 μL 检测试剂（CellTiter Blue：含 10% FBS 的 DMEM 培养基 = 1∶9）。将细胞培养板放入培养箱中恒温 37 ℃，恒定 5% CO_2 浓度继续培养 2 h 后，用酶标仪以 560 nmol/L 波长激发荧光并于 590 nmol/L 波长处检测每孔光密度值。每组取 3 个复孔的均值及标准差作为统计量进行分析。

1.2.4 Transwell 细胞迁移和侵袭能力分析 实验组 SMMC-7721 和 HepG2 细胞经 100 nmol/L P 物质预处理 48 h 后，将含有 5×10^4 个细胞的 DMEN 细胞悬液 300 μL 加入未经 Metrigel 生物基质胶包被的小室中，检测细胞迁移能力；加入经 Metrigel 生物基质胶包被的小室中，检测细胞侵袭能力。在相应培养孔中加入含 30% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液 1 100 μL，并于小室及相应培养孔中均加入 P 物质，调整浓度为 100 nmol/L。用等体积 PBS 代替 P 物质，在相同条件下处理细胞作为对照组。各组在细胞培养箱中恒温 37℃，恒定 5% CO_2 浓度，让检测迁移能力的细胞穿膜 24 h，而检测侵袭能力的细胞穿膜 48 h。取小室固定染色后充分拭去小室内面的细胞。在 ×100 光学显微镜下每个小室随机取 3 个视野进行拍照，并对每个视野中的细胞进行计数，计算各小室所对应视野中细胞数均值及标准差作为统计量进行分析。

1.2.5 细胞蛋白质提取及 Western blot 检测 取 $1\sim5\times10^6$ 个细胞提取细总蛋白，用 RCDC 法测定各组样品中蛋白质浓度。各组蛋白质在 10% SDS-PAGE 凝胶中充分电泳后电转至 NC 膜上。5% 脱脂牛乳封闭 NC 膜 2 h，用兔抗人 NK-1 受体多抗（1∶500 稀释）、兔抗人 N-Cadherin 多抗（1∶1 000 稀释）、小鼠抗人 E-Cadherin 多抗（1∶1 000 稀释）、兔抗人 Slug 多抗（1∶1 000 稀释）和兔抗人 GAPDH（1∶1 000 稀释）于 4℃下孵育相应 NC 膜条带 8 h，洗涤后用辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗（1∶5 000 稀释）室温孵育 2 h，用 ECL 在凝胶成像系统中显影。用 Quantity One 软件测量蛋白质条带进行灰度值。各组按下列公式（相对表达量 = 目的条带灰度值/对应 GAPDH 灰度值）计算后对目的蛋白进行半定量分析。

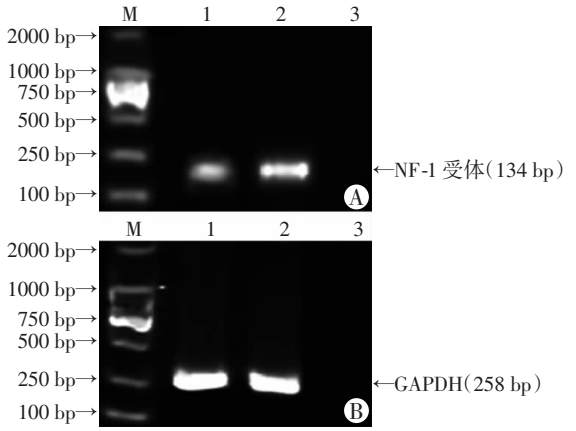
1.3 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组非配对数据均值间比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 人类肝癌细胞系 HepG2 和 SMMC-7721 中均有 NK-1 受体表达

经实时荧光定量 PCR 检测发现：HepG2 和 SMMC-7721 细胞中均扩增出 NK-1 受体基因的目的片段，阴性对照组无目的片段扩增，而阳性对照组可扩增出 GAPDH 基因片段。根据琼脂糖凝胶电泳分析，PCR 扩增产物长度与预计扩增产物长度一致，其中 NK-1 受体扩增产物片段长度约为 130 bp，GAPDH 扩增产物片段长度约为 260 bp（图 1），且扩增产物融解曲线为单峰，证明 PCR 扩增目的片段为 NK-1 受体基因片段。



M：标准；1：HepG2；2：SMMC-7721；3：阴性对照

图 1 实时荧光定量 PCR 检测 HepG2 和 SMMC-7721 细胞中 NK-1 受体表达

2.2 P 物质短期内不影响 HepG2 和 SMMC-7721 细胞的增殖能力

为了探讨 P 物质是否影响人肝癌细胞的增殖能力，用不同浓度的 P 物质（0、100、250、500 nmol/L）分别对 HepG2 和 SMMC-7721 两种细胞进行处理并对其增殖能力进行检测。表 2、3 示两种细胞在前 96 h，实验组（P 物质浓度为 100、250、500 nmol/L）与对照组（P 物质浓度为 0 nmol/L）相比，增殖能力未见明显变化，无显著统计学差异（$P>0.05$）。而在 120 h 较高浓度的 P 物质（250 nmol/L 和 500 nmol/L）具有抑制两种细胞增殖的趋势（$P<0.05$）。证明在 96 h 内各种浓度的 P 物质对两种人肝癌细胞的增殖能力不产生影响。

表2 不同浓度P物质作用下HepG2细胞的增殖变化[$D(590)$]

	0 nmol/L	100 nmol/L	250 nmol/L	500 nmol/L
0 h	119.55±2.05	119.61±2.37	117.95±2.06	120.17±3.07
24 h	219.06±16.15	200.92±1.43	217.43±7.57	213.63±5.48
48 h	400.70±16.35	437.68±58.00	408.62±12.03	355.62±49.86
72 h	689.13±132.05	819.31±90.78	694.64±160.69	858.80±62.30
96 h	1 436.36±301.57	1 464.02±90.92	1 288.35±73.05	1 248.21±156.30
120 h	2 321.79±210.42	1 975.57±13.98	1 658.49±54.43	1 658.40±68.21

表3 不同浓度P物质作用下SMMC-7721细胞的增殖变化[$D(590)$]

	0 nmol/L	100 nmol/L	250 nmol/L	500 nmol/L
0 h	142.50±1.93	144.35±2.20	144.96±1.25	143.63±1.28
24 h	220.03±10.37	221.65±3.92	233.62±4.73	222.88±2.99
48 h	382.09±21.22	382.83±12.99	420.79±25.05	356.70±19.20
72 h	545.80±37.20	563.79±24.58	508.47±33.87	519.51±16.61
96 h	766.71±6.52	841.08±71.11	774.17±13.74	785.74±62.33
120 h	1 294.62±90.58	1 164.99±33.03	1 044.78±36.59	934.83±27.69

2.3 P物质提高HepG2和SMMC-7721细胞迁移和侵袭能力

进一步探讨P物质对人肝癌细胞侵袭转移能力的影响,在100 nmol/L浓度的P物质作用下对HepG2和SMMC-7721细胞进行Transwell迁移和侵袭实验。各组在光学显微镜下随机取3个视野进行分析,发现实验组细胞的迁移(图2A、C)和侵袭(图2B、D)穿膜能力均较对照组明显增加。对所取视野中的细胞计数,分析发现实验组穿膜细胞数与对照组相比均具有显著统计学差异($P<0.05$,表4)。说明P物质能够促进人肝癌细胞迁移和侵袭。

表4 HepG2和SMMC-7721细胞的穿膜细胞数($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	迁移实验(个/视野)	侵袭实验(个/视野)
HepG2		
对照组	70.33±6.36	65.33±15.78
实验组	250.00±11.15	212.00±7.64
SMMC-7721		
对照组	176.00±5.03	128.00±17.62
实验组	355.70±14.05	219.70±8.09

2.4 P物质上调HepG2和SMMC-7721细胞中NK-1受体表达,并促进两种细胞发生上皮-间质转化

为了探讨P物质促进人肝癌细胞迁能和侵袭能力的分子机制,用100 nmol/L P物质处理SMMC-7721和HepG2两种细胞48 h后提取细胞总RNA和蛋白质,分别用RT-PCR和Western blot检测细胞中NK-1受体表达变化;并用Western blot检测上皮-间质转化蛋白质标志的表达情况。发现经P物质处理后,两种细胞中的NK-1受体表达在mRNA水平(表5)和蛋白质水平(图4)均较对照组明显上调($P<0.05$)。同时,上皮样细胞标志蛋白质E-Cadherin表达量较对照组细胞明显下调,而间质样细胞标志蛋白质N-Cadherin及E-Cadherin抑制蛋白Slug的表达明显上调(图3A、C)。进行半定量分析发现上述3种目的蛋白在实验组中的表达量与对照组相比具有显著统计学差异($P<0.05$,图3B、D)。

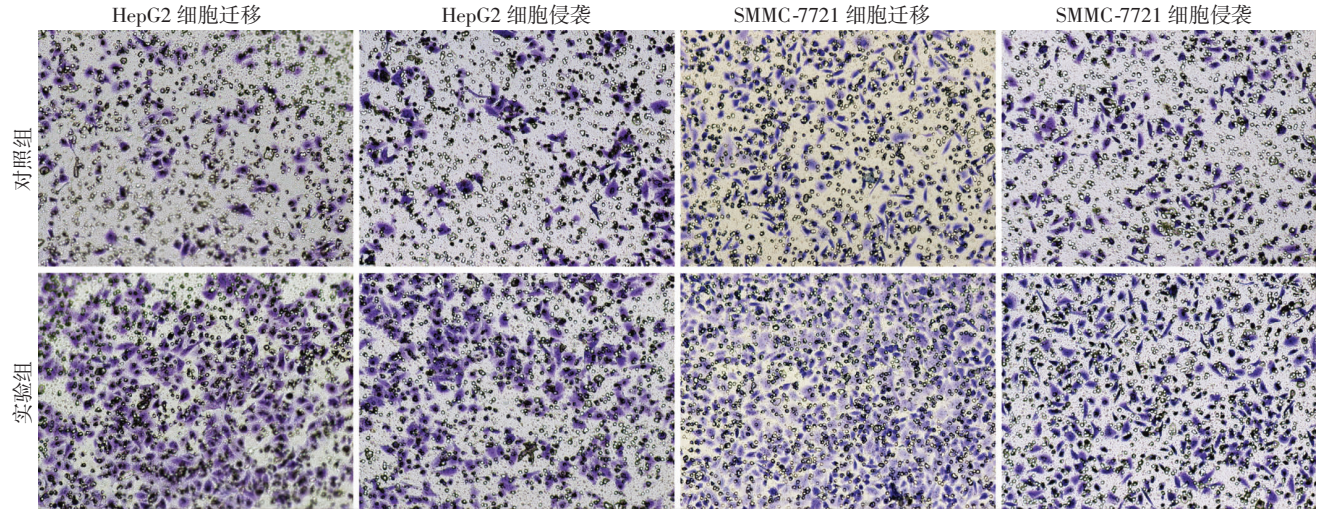
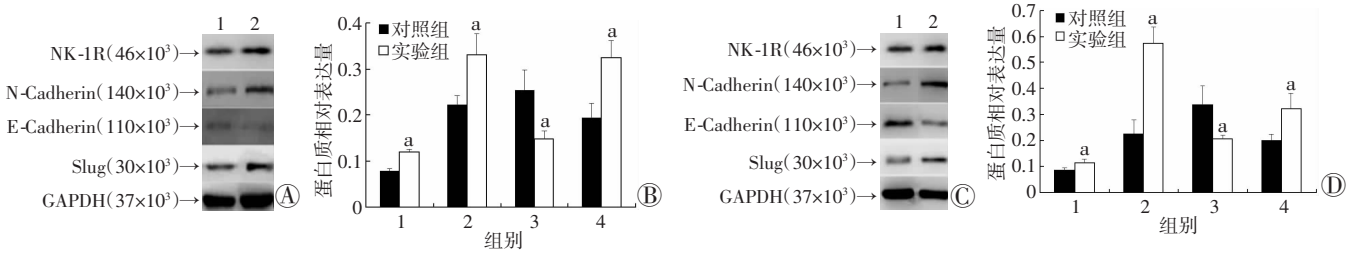


图2 P物质对HepG2和SMMC-7721细胞迁移和侵袭能力的影响 (结晶紫 ×100)



A、C:Western blot 检测结果　1:对照组;2:实验组;B、D:半定量分析　1:NK-1 受体;2:N-Cadherin;3:E-Cadherin;4:Slug;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　Western blot 检测 HepG2(A、B)和 SMMC-7721(C、D)细胞与 P 物质作用后 NK-1 受体及 EMT 标志蛋白质表达变化

表 5　HepG2 和 SMMC-7721 细胞 NK-1 受体 mRNA 相对表达量($n=3$)

细胞	HepG2	SMMC-7721
对照组	0.33 ± 0.06	0.73 ± 0.07
实验组	0.92 ± 0.10	3.04 ± 0.15

3　讨论

迷走神经递质 P 物质作为速激肽家族的成员之一,包含 11 个氨基酸残基,主要由感觉神经纤维分泌,是重要的感觉神经递质[7-8]。在疼痛和慢性炎症等方面发挥重要的生理功能[8]。最近的研究发现,在前列腺癌发生转移的过程中,新生迷走神经的参与十分关键[9]。另外,在胰腺癌中,普遍存在的肿瘤噬神经生长现象与迷走神经感觉纤维末梢所释放的 P 物质及 NK-1 受体有密切关系[10]。肝脏中的感觉神经纤维由迷走神经发出,所以肝脏中的 P 物质主要由迷走神经末梢释放。但在肝细胞癌中,迷走神经感觉纤维末梢通过释放 P 物质,对疾病进展的影响尚待进一步研究。

本研究发现 HepG2 和 SMMC-7721 两种人类肝癌细胞中均表达 NK-1 受体。经 100 nmol/L P 物质作用 48 h 后,上述两种人类肝癌细胞的迁移和侵袭能力明显增强,NK-1 受体表达也显著升高,且其表达的上皮样细胞标志蛋白 E-Cadherin 下调,而间质样细胞标志蛋白 N-Cadherin 及 E-Cadherin 抑制蛋白 Slug 表达上调。说明在此过程中,P 物质既上调了人类肝癌细胞中的 NK-1 受体,也有效促进了其发生上皮-间质转化(EMT)。另外 ,在 0、100、250、500 nmol/L 浓度梯度的 P 物质作用下,实验所使用的两种人类肝癌细胞增殖能力在短期(96 h)内未受影响,且低浓度(100 nmol/L)P 物质对细胞增殖的作用相对更小。基本可以排除细胞增殖在 48 h 内对细胞迁能和侵袭功能检测产生影响。

P 物质主要通过与神经激肽受体结合后发挥作用。在众多神经激肽受体中 P 物质与 NK-1 受体亲合力最高,因此 NK-1 受体也被称为 P 物质受体[7,11]。NK-1 受体属于七次跨膜的 G 蛋白藕连受体[12],可以通过 G 蛋白调控 β-arrestin 分子活性[13],进一步激活下游 PKC/ERK/JNK/MAPK 等信号通路[14],也可通过 G 蛋白 α 亚基激活 PKA,调节环磷酸腺苷反应物结合蛋白(CREB)活性,进而调控细胞侵袭转移相关基因的表达,增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。目前也有研究发现 P 物质与 NK-1 受体结合后,可在肿瘤组织中上调 NK-1 受体,并通过激活下游信号通路促进肿瘤增殖、血管生成和侵袭转移[15-16]。结合本研究的结果,可以推断:迷走神经末梢所释放的 P 物质与肝癌细胞中表达的 NK-1 受体结合,在上调 NK-1 受体的同时,激活细胞内下游信号分子,调控细胞侵袭转移相关基因表达,促进细胞发生 EMT,进而增强肝癌细的迁移和侵袭能力。

随着当今社会医疗水平的不断提高,及生物-心理-社会医学模式的提出,医学界普遍认同心理因素对身体疾病的发生、发展过程会产生不可忽视的影响,而神经调控在这当中起到了至关重要的作用。已有研究者发现手术切除迷走神经或用辣椒素化学性失活迷走神经感觉神经纤维后乳腺癌的转移能力被提升[17-18],而用塞马莫德刺激迷走神经后,可以抑制乳腺癌转移[6]。迷走神经不但可以释放 P 物质,也能够调控组织中可以水解 P 物质而产生 P 物质片段的脑啡肽酶和金属肽酶水平[17]。完整的 P 物质可以促进肿瘤细胞增殖和迁移[10,13,16],而一些 P 物质水解片段却发挥着抗炎和抗肿瘤的作用[19]。另外,目前已有研究证明一些 P 物质类似物可以与 P 物质相拮抗而产生抗癌

效应[20]。所以基于本研究的结论,对于肝细胞癌而言,是否可以通过药物或其他方式调节迷走神经兴奋性,进而调整肝脏中P物质、脑啡肽酶等水解P物质的酶类以及P物质水解片段含量而起到防治肝癌的作用,将是今后进一步研究的方向。

参考文献:

[1] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245 - 1255.

[2] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893 - 2917.

[3] Alazawi W, Cunningham M, Dearden J, *et al*. Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 32(3): 344 - 355.

[4] Chedotal A, Kerjan G, Moreau-Fauvarque C. The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(8): 1044 - 1056.

[5] Jensen K J, Alpini G, Glaser S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver[J]. Compr Physiol, 2013, 3(2): 655 - 665.

[6] Erin N, Duymus O, Ozt rk S, *et al*. Activation of vagus nerve by semapimod alters substance P levels and decreases breast cancer metastasis[J]. Regul Pept, 2012, 179(1/3): 101 - 108.

[7] Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides[J]. J Intern Med, 2001, 249(1): 27 - 40.

[8] Harrison S, Geppetti P. Substance p[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(6): 555 - 576.

[9] Magnon C, Hall S J, Lin J, *et al*. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression[J]. Science, 2013, 341(6142): 1236361.

[10] Li X, Ma G, Ma Q, *et al*. Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion *via* NK-1R in cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(3): 294 - 302.

[11] Steinhoff M S, von-Mentzer B, Geppetti P, *et al*. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease[J]. Physiol Rev, 2014, 94(1): 265 - 301.

[12] Pennefather J N, Lecci A, Candenas M L, *et al*. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family[J]. Life Sci, 2004, 74(12): 1445 - 1463.

[13] Lang K, Drell T L 4th, Lindecke A, *et al*. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs[J]. Int J Cancer, 2004, 112(2): 231 - 238.

[14] Heasley L E. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(13): 1563 - 1569.

[15] Munoz M, Covenas R. Neurokinin-1 receptor: a new promising target in the treatment of cancer[J]. Discov Med, 2010, 10(53): 305 - 313.

[16] Friess H, Zhu Z, Liard V, *et al*. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer[J]. Lab Invest, 2003, 83(5): 731 - 742.

[17] Erin N, Zhao W, Bylander J, *et al*. Capsaicin-induced inactivation of sensory neurons promotes a more aggressive gene expression phenotype in breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(3): 351 - 364.

[18] Erin N, Akdas-Barkan G, Harms J F, *et al*. Vagotomy enhances experimental metastases of 4THMpc breast cancer cells and alters substance P level[J]. Regul Pept, 2008, 151(1/3): 35 - 42.

[19] Sakurada C, Watanabe C, Sakurada T. Occurrence of substance P(1 - 7) in the metabolism of substance P and its antinociceptive activity at the mouse spinal cord level[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2004, 26(3): 171 - 176.

[20] MacKinnon A C, Waters C, Jodrell D, *et al*. Bombesin and substance P analogues differentially regulate G-protein coupling to the bombesin receptor. Direct evidence for biased agonism[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 28083 - 28091.

(收稿:2014-10-20;修回:2014-12-22)

(编辑 邓强庭)