DOI:10.16016/j.1000-5404.202003047

P 物质及其受体 NK-1R 在鼻咽癌组织中的表达及意义

张 渝,杨玉成,杨 昆,冯丹丹,黄江菊 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科

[摘要] **目的** 探讨 P 物质(substance P, SP)及其受体神经激肽-1(neurokinin-1 receptor, NK-1R)在鼻咽癌组织中的表达及意义。**方法** 收集鼻咽癌患者的肿瘤组织及鼻中隔偏曲患者的正常鼻咽黏膜组织,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 SP/NK-1R mRNA 和蛋白表达水平;免疫组织化学法观察 SP/NK-1R 表达与分布规律,分析 SP/NK-1R 表达与鼻咽癌患者临床参数之间的相关性;CCK-8 和 Transwell 检测 SP 对鼻咽癌 HNE1 细胞株增殖、侵袭的影响。**结果** SP 和 NK-1R mRNA 在鼻咽癌组织中相对表达量(7.96±1.75, 7.12±1.54)比正常鼻咽黏膜组织(1.05±0.34, 1.04±0.28)明显增高($P<0.01$);SP 和 NK-1R 蛋白在鼻咽癌组织中相对表达量(1.18±0.27, 0.81±0.17)比正常鼻咽黏膜组织(0.56±0.06, 0.48±0.05)明显增高($P<0.01$);SP 和 NK-1R 在鼻咽癌组织阳性表达率高于正常鼻咽黏膜组织(64% *vs* 11%, 68% *vs* 22%, $P<0.01$),并且 SP 和 NK-1R 在 TNM 分期Ⅲ/Ⅳ期患者肿瘤组织中的阳性表达率高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$);SP(10^{-9}~10^{-7} mol/L)可诱导 HNE1 细胞增殖($P<0.05$)、侵袭($P<0.01$)。**结论** SP/NK-1R 在鼻咽癌组织中高表达并与鼻咽癌 TNM 分期具有相关性,有望成为鼻咽癌新的诊治靶点。

[关键词] 鼻咽癌;P 物质;受体神经激肽-1

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.63 [文献标志码] A

Expression of substance P and neurokinin-1 receptor in nasopharyngeal carcinoma and their clinical significance

ZHANG Yu, YANG Yucheng, YANG Kun, FENG Dandan, HUANG Jiangju Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of substance P (SP) and its receptor, neurokinin-1 receptor (NK-1R), in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues and their correlation with the clinicopathological parameters of the patients. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting were used to detect the expression of SP and NK-1R mRNAs in the specimen of tumor tissues of NPC patients and normal tissues from patients with deviated nasal septum, and their protein expression and distribution in the tissues were observed using immunohistochemistry. *Chi*-square test was used to analyze the correlation of the expression of SP and NK-1R with the clinicopathological characteristics of the patients. CCK8 and Transwell assays were used to evaluate the effects of SP on the proliferation and invasion of HNE1 cells. **Results** The mRNA levels of SP and NK-1R were significantly increased in NPC tissues (7.96±1.75 and 7.12±1.54, respectively) as compared with the normal tissues (1.05±0.34, 1.04±0.2; $P<0.01$); the protein expression of SP and NK-1R were also significantly upregulated in the NPC tissues (1.18±0.27 and 0.81±0.17, respectively) in comparison with the normal tissues (0.56±0.06, 0.48±0.05; $P<0.01$). The positive expression rate of SP and NK-1R in the NPC tissues was 64% and 68%, respectively, significantly higher than the rates in normal tissues (11% and 22%, respectively; $P<0.01$). The positive expression rates of SP and NK-1R were significantly higher in stage Ⅲ and stage Ⅳ NPC cases

[通信作者] 黄江菊, E-mail: huangjiangju@foxmail.com

[网络首发] https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.r.20200601.0907.001.html

than in stage Ⅰ-Ⅱ cases ($P<0.05$). Exogenous SP significantly enhanced the proliferation ($P<0.05$) and invasion ($P<0.01$) of HNE1 cells *in vitro*. **Conclusion** SP and NK-1R are over-expressed in NPC tissues, and their expression levels are correlated with the TNM stages of NPC, suggesting their value as potential new targets for diagnosis and treatment of NPC.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; substance P; neurokinin-1 receptor

Corresponding author: HUANG Jiangju, E-mail: huangjiangju@foxmail.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)因其发病部位隐匿,难以早期发现,并且恶性程度高,转移较早,难以及时治疗,严重威胁着人类的生命健康[1-2]。目前鼻咽癌的发病机制尚不清楚,普遍认为其发生与遗传、EB病毒和环境等因素有关[3]。目前常用的治疗策略包括放射治疗、化学药物治疗、外科手术治疗等,但是上述治疗方法对鼻咽癌的预后仍不尽人意,并且目前临床上尚缺乏特异性的鼻咽癌诊断标志物[4-5]。因此,寻找鼻咽癌的特异性分子标志物对鼻咽癌的诊断和治疗具有十分重要的意义。

P物质(substance P, SP)是一种广泛分布于人体内的速激肽,主要通过与其受体神经激肽-1(neurokinin-1 receptor, NK-1R)相结合,从而发挥多种生物学效应[6-9]。近年来,国内外学者发现SP/NK-1R系统在恶性肿瘤中具有重要作用,与肿瘤的发生、发展关系密切,在多种恶性肿瘤如食管癌[10]、喉癌[11]、肺癌[12]、结直肠癌[13]、胰腺癌[14]和乳腺癌[15]等中均有过度表达。有研究报道SP/NK-1R系统具有降低肿瘤细胞凋亡,增强肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,促使微环境血管的生成等能力,而给予NK-1R拮抗剂后,多种肿瘤细胞生长、迁移受到抑制[16-17]。

SP/NK-1R系统在鼻咽癌组织中的表达特点尚不清楚,SP/NK-1R系统对鼻咽癌细胞的增殖和侵袭作用也鲜见报道。因此,本研究探讨SP/NK-1R在鼻咽癌组织中的表达及意义,探究SP/NK-1R在鼻咽癌发生、发展中的作用,为进一步揭示鼻咽癌的发病机制和为鼻咽癌寻找新的诊治靶点提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 组织取材

本研究符合医学伦理原则并经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审批通过(审批号:2019121)。选取2018年6-12月在我院经病理科证实为鼻咽癌且未接受治疗的患者20例和同期行鼻中隔偏曲矫正术患者(经病理证实为正常鼻咽黏膜组织)(Control)20例作为研究对象。病理组织离体后立即放入液氮冷冻后转入-80 ℃冰箱保存,进行RT-qPCR及Western blot检测。选取2019年1-6月在我院耳鼻喉科行鼻咽部活检的经病理证实为鼻咽癌患者56例为研究组,其中男性41例,女性15例,年龄38~70岁,平均年龄52岁。收集整理患者的临床资料,根据鼻咽癌TNM分期:Ⅰ~Ⅱ期6例,Ⅲ期28例,Ⅳ期22例。病例均为初次发病且未接受放化疗治疗,经全身检查排除其他肿瘤病史。取同期行鼻中隔偏曲矫正术患者经病理证实为正常鼻咽黏膜组织9例为对照组,年龄38~60岁,平均年龄45岁。病理组织离体后立即无菌取材,4%的多聚甲醛固定、常规脱水、石蜡包埋、切片,进行免疫组化检测。

1.2 细胞与试剂

实验细胞采用人鼻咽癌HNE1细胞株和人正常鼻咽上皮NP69细胞株,均由重庆医科大学实验研究中心馈赠。胎牛血清购自天津康源公司;RPMI1640购自美国Corning公司;SP和CCK-8试剂购自美国MedchenExpress(MCE)公司;基质胶(Matrigel)购自美国BD公司;兔抗人P物质多克隆抗体、兔抗人GAPDH多克隆抗体、羊抗兔IgG(H+L)HRP多克隆抗体购自美国Affinity公司;兔抗人NK-1R多克隆抗体购自美国Novus公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE胶试剂盒购自中国碧云天生物技术研究院;ECL发光液购自美国Advansta公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;RNA提取剂RNAiso Plus,反转录试剂盒,实时荧光定量PCR SYBR Green试剂盒购自日本TaKaRa公司;SP-9001试剂盒和DAB显色剂购自北京中杉公司。

1.3 实时荧光定量PCR检测SP/NK-1R mRNA表达

使用RNAiso Plus来提取组织及细胞的总mRNA,干燥后用DEPC水溶解。经分光光度计测定总RNA的浓度和纯度,筛选后根据反转录试剂盒说明进行反转录,然后以cDNA为模板应用TB Green™试剂盒进行PCR扩增。引物序列如下:GAPDH上游引物:5′-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3′,下游引物:5′-AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTG-3′,扩增片段为119 bp;SP上游引物:5′-ACTGGTCCGACTGGTACGACA-3′,下游引物:5′-AAGAACTGCTGAGGCTTGGGT-3′,扩增片段为106 bp;NK-1R上游引物:5′-CTAACACCTCGGAACCCAATC-3′,下游引物:5′-CCACAATGACCGT-

GTAGGCAG-3′,扩增片段为 81 bp。PCR 反应条件:95 ℃预变性 30 s;95 ℃ 5 s,62 ℃ 30 s,45 个循环。采用 CFX96™ Real-Time 系统(Bio-Rad 公司产品)进行 PCR 扩增及产物分析,用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法定量分析 SP/NK-1R mRNA 在组织和细胞中的相对表达水平。

1.4　Western blot 检测 SP/NK-1R 蛋白表达

使用 RIPA 组织裂解液提取组织总蛋白,匀浆 30 min 后 4 ℃、12 000×*g* 离心 15 min。取上清对蛋白进行定量。电泳使用 10%的 SDS-PAGE 分离胶和 5%的 SDS-PAGE 浓缩胶,每孔上样量为 30 μg 总蛋白。电泳结束后切取目的蛋白胶转移至 PVDF 膜上,转膜后封闭 20 min。分别加入兔抗人 SP 抗体(1∶1 000)、兔抗人 NK-1R 抗体(1∶500)、GAPDH 抗体(1∶3 000),4 ℃孵育过夜。加入山羊抗兔二抗(1∶5 000)室温孵育 60 min。ECL 发光液显色,并经 Bio-Rad 凝胶成像系统显影。光密度分析(ImageJ v. 1. 8. 0)定量,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.5　免疫组化检测 SP/NK-1R 表达及分布

石蜡切片脱蜡、水化,枸橼酸钠盐溶液微波 95 ℃热修复,3%过氧化氢 15 min,0.5%的 Triton X-100 正常山羊血清封闭液 37 ℃ 30 min,加兔抗人 SP 抗体(1∶200)、兔抗人 NK-1R 抗体(1∶100),加 PBS 缓冲液作为阴性对照,湿盒内 4 ℃过夜。复温滴加二抗,DAB 显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,脱水透明封片,光学显微镜观察。每张切片随机选取 5 个高倍视野(×400)进行图像分析,SP、NK-1R 的表达以细胞质或细胞膜出现棕黄色为阳性。根据染色强度评分:无色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。根据每个视野阳性细胞所占百分比评分:<1%为 0 分,1%~10%为 1 分,11%~50%为 2 分,>50%为 3 分。两者之和作为最终得分,0~3 分为阴性,4~6 分为阳性。

1.6　CCK-8 检测 HNE1 细胞株的增殖能力

选取对数生长期的 HNE1 细胞,制成细胞悬液。按照每孔 2×10^3 个细胞加入 96 孔板中培养过夜,弃培养血清,分别加入含不同浓度 SP(10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9} mol/L)的培养基 100 μL,每组设 4 个孔,培养 48 h 后,加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 2 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔光密度值 *D*(450),以空白孔作为标准调零,计算细胞增殖率。细胞增殖率=[加 SP 组 *D*(450)值-对照组 *D*(450)值]/[对照组 *D*(450)值-空白组 *D*(450)值]。

1.7　Transwell 检测 HNE1 细胞株的侵袭能力

将 HNE1 细胞与不同浓度 SP(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L)共培养 24 h 后,制成细胞悬液。在 Transwell 板上室面铺上无血清培养基稀释的 Matrigel 胶 100 μL,37 ℃ 温育 5 h 后,取各浓度 SP 培养的细胞悬液,以每孔 2×10^5 个细胞接种于上室,下室加入含 20%胎牛血清的培养液 600 μL,每组设 3 个孔,培养 24 h,甲醇固定,结晶紫染色,于显微镜下随机选取 3 个视野(×200)观察并拍照,计数每个视野中穿过滤膜的细胞数,统计结果。

1.8　统计学分析

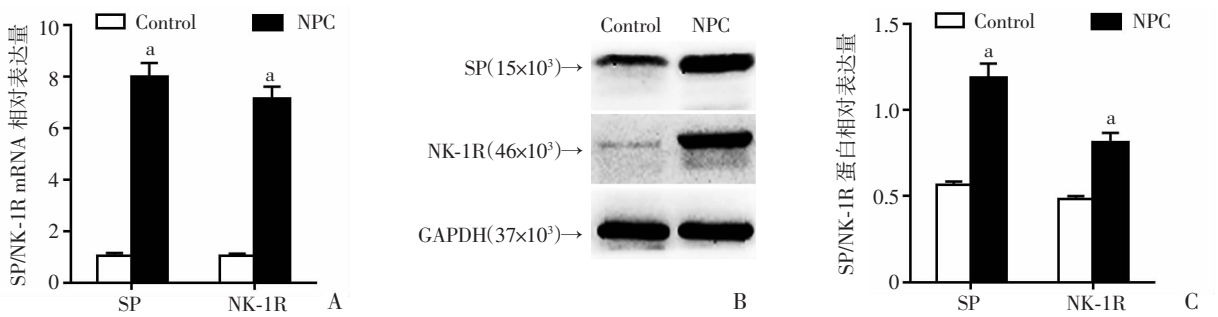
选用 SPSS 17.0 统计软件,本实验数据满足正态性分布。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验分析或单因素方差分析比较各组差异;计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验或者精确概率法比较组间差异。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　SP/NK-1R 在鼻咽癌组织中呈高表达

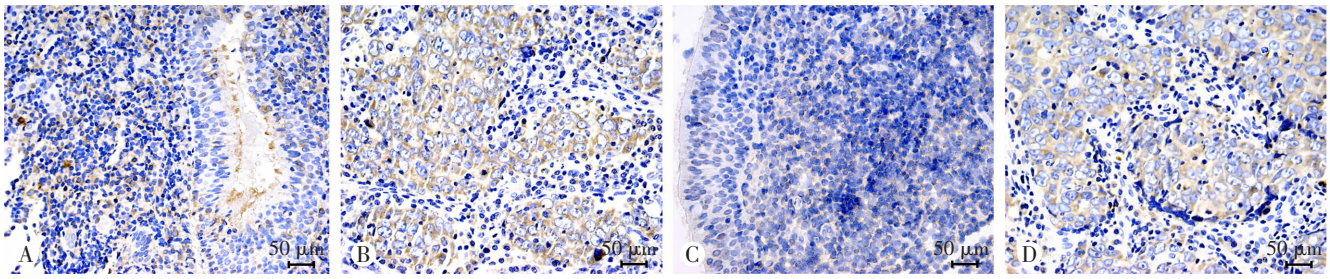
RT-qPCR 检测结果显示:在鼻咽癌组织中的 SP 表达量明显高于正常鼻咽黏膜组织,NK-1R 在鼻咽癌组织的表达量明显高于正常鼻咽黏膜组织($P<0.01$,图 1A)。

Western blot 检测结果显示:鼻咽癌组织中的 SP 表达量明显高于正常鼻咽黏膜组织,NK-1R 在鼻咽癌组织的表达量明显高于正常鼻咽黏膜组织($P<0.01$,图 1B、C)。



a:$P<0.01$,与正常鼻咽黏膜组织(Control)比较

图 1　RT-qPCR(A)和 Western blot(B、C)检测 SP/NK-1R 在鼻咽癌组织及正常鼻咽黏膜组织中的表达



A、B:分别为 SP 在正常鼻咽黏膜组织和鼻咽癌组织中的表达;C、D:分别为 NK-1R 在正常鼻咽黏膜组织和鼻咽癌组织中的表达

图 2 免疫组织化学检测 SP/NK-1R 在鼻咽癌组织及正常鼻咽黏膜组织中的表达 (S-P)

表 1 SP/NK-1R 表达与鼻咽癌患者临床参数的关系 [例(%),n=56]

临床参数	n	SP 表达		P 值	NK-1R 表达		P 值
		阳性	阴性		阳性	阴性	
性别				0.057			0.751
男	41	23(0.56)	18(0.44)		27(0.66)	14(0.34)	
女	15	13(0.87)	2(0.13)		11(0.73)	4(0.27)	
年龄				0.348			0.763
≤60 岁	38	26(0.68)	12(0.32)		25(0.66)	13(0.34)	
>60 岁	18	10(0.56)	8(0.44)		13(0.72)	5(0.28)	
T 分期				0.010			0.322
T1+T2	32	16(0.50)	16(0.50)		20(0.62)	12(0.38)	
T3+T4	24	20(0.83)	4(0.17)		18(0.75)	6(0.25)	
N 分期				0.520			0.341
N0+1	14	10(0.71)	4(0.29)		8(0.57)	6(0.43)	
N2+3	42	26(0.62)	16(0.38)		30(0.71)	12(0.29)	
M 分期				0.010			0.022
M0	46	26(0.57)	20(0.43)		28(0.61)	18(0.39)	
M1	10	10(1.00)	0(0)		10(1.00)	0(0)	
TNM 分期				0.024			0.003
Ⅰ+Ⅱ	6	2(0.33)	4(0.67)		2(0.33)	4(0.67)	
Ⅲ	28	17(0.61)	11(0.39)		14(0.50)	14(0.50)	
Ⅳ	22	19(0.86)	3(0.14)		20(0.91)	2(0.09)	

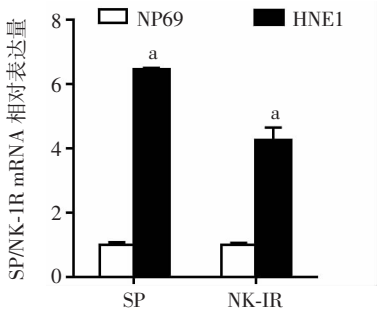
2.2 SP/NK-1R 与鼻咽癌患者临床参数之间的关系

免疫组化结果显示:SP、NK-1R 主要表达于鼻咽癌细胞的胞质中,在 56 例鼻咽癌组织中阳性率分别为 64%、68%;在 9 例正常鼻咽黏膜组织中阳性率分别为 11%、22%,鼻咽癌组织中 SP、NK-1R 的阳性表达率明显高于正常鼻咽黏膜组织(P=0.019、0.008,图 2)。

χ^2 检验或精确概率法统计分析发现:肿瘤局限在 T1~T2 期鼻咽癌组织的 SP 阳性表达率明显低于肿瘤侵犯 T3~T4 期鼻咽癌组织(P=0.010);无远处转移的鼻咽癌组织中 SP、NK-1R 的阳性表达率明显低于有远处转移的组织(P=0.010、0.022);SP、NK-1R 在Ⅰ~Ⅱ期患者中的阳性表达率明显低于Ⅲ或Ⅳ期患者(P=0.024、0.003)。表明 SP/NK-1R 参与了鼻咽癌的临床进展、转移。SP/NK-1R 的表达与鼻咽癌患者年龄及性别无关(表 1)。

2.3 SP/NK-1R 在 HNE1 细胞株呈高表达

SP、NK-1R 在 HNE1 癌细胞株中的相对表达量明显高于 NP69 正常细胞株(P<0.01,图 3)。

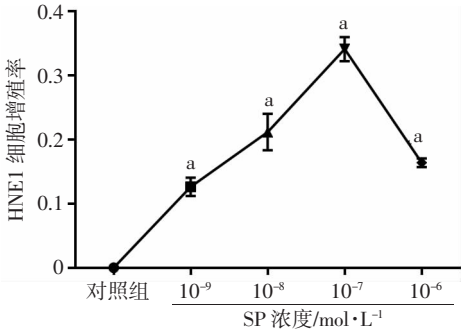


a:P<0.01,与 NP69 细胞株比较

图 3 RT-qPCR 检测 SP/NK-1R 在鼻咽癌 HNE1 细胞和正常鼻咽上皮 NP69 细胞中 mRNA 的表达

2.4　SP 促进 HNE1 细胞增殖

CCK-8 检测结果显示:不同浓度 SP(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6} mol/L)作用于鼻咽癌 HNE1 细胞的增殖率均明显高于对照组(0 mol/L)($P<0.05$)。当 SP 浓度在 $10^{-9}\sim10^{-7}$mol/L 时,细胞增殖能力随着 SP 浓度的增加逐渐增强,但当 SP 浓度增加到 10^{-6}mol/L,细胞增殖能力有所下降,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　CCK-8 检测 SP 对 HNE1 细胞增殖能力的影响

2.5　SP 增强 HNE1 细胞侵袭能力

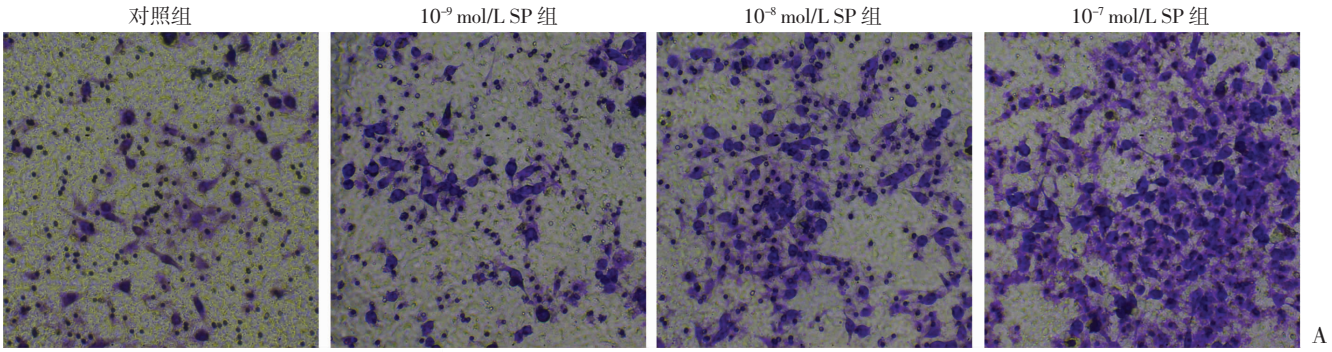
Transwell 实验检测结果显示:随着 SP 浓度增加侵袭细胞数逐渐增多,各组与对照组(0 mol/L)相比差异有统计学意义($P<0.01$,图 5)。

3　讨论

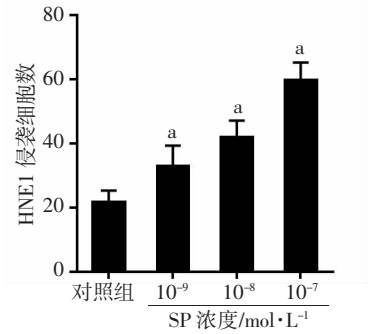
鼻咽癌是我国常见的头颈部恶性肿瘤,目前研究认为鼻咽癌的发生与遗传、EB 病毒和环境等多种因素有关。尽管研究者们在鼻咽癌的研究中取得了很大进展,但鼻咽癌的具体发病机制目前仍不清楚[1-5]。

SP 是速激肽家族重要的一员,其生物作用主要通过 G 蛋白偶联受体 NK-1R 介导,从而发挥多种生物学效应[6-9]。研究发现,SP/NK-1R 系统参与肿瘤发生和发展过程中信号通路的启动和激活。SP/NK-1R 系统偶联激活磷脂酶 C 和腺苷酸环化酶,产生 IP3/DAG 和 cAMP,并最终向丝裂原活化蛋白激酶(MAPKK)发出信号,MAPKK 激活胞外的 ERK1/2,促进肿瘤细胞有丝分裂及 DNA 合成[18]。此外,有研究认为 SP/NK-1R 系统可激活抗凋亡因子 Akt,保护肿瘤细胞不受 Fas 配体等凋亡因子的影响[19]。SP/NK-1R 系统激活 Ras/Raf/MAPK 和 PI3K/Akt/mTOR 等信号通路,这些活化的丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶刺激参与蛋白质合成起始阶段的下游蛋白,促进肿瘤细胞生长、侵袭和转移[20]。因此,研究 SP/NK-1R 在鼻咽癌组织中的表达情况对于进一步研究鼻咽癌的发病机制具有十分重要的意义。

目前为止,SP/NK-1R 系统在鼻咽癌组织中的表达情况尚不清楚。本研究采用 RT-qPCR 及 Western blot 证实了 SP/NK-1R 在鼻咽癌组织及细胞中明显高表达。免疫组化检测结果显示:SP/NK-1R 在鼻咽癌组织中的高表达与鼻咽癌 TNM 分期显著相关。CCK-8 增殖实验和 Transwell 侵袭实验结果表明:当 SP 浓度在 $10^{-9}\sim10^{-7}$mol/L 时,细胞的增殖、侵袭能力随着 SP 浓度的增加而逐渐增强,说明一定浓度的 SP 可以促进鼻咽癌细胞的体外增殖和侵袭,SP 可能参与了鼻咽癌细胞增殖、侵袭的过程。但是 SP 作用于鼻咽癌细胞增殖、侵袭的分子机制尚需要进一步研究。



A



B

A:各组 HNE1 细胞的侵袭情况(×200);B:各组 HNE1 细胞的侵袭细胞数

a:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　Transwell 实验检测 SP 对 HNE1 细胞侵袭能力的影响

本研究存在样本量较少、未直接进行特异性阻断干扰实验等不足。未来将补充完成特异性阻断实验,观察 SP/NK-1R 通路对鼻咽癌增殖、侵袭的影响,深入了解 SP/NK-1R 在鼻咽癌发生、发展中的作用;进一步扩大鼻咽癌的样本量,随访鼻咽癌患者生存情况,分析 SP/NK-1R 对鼻咽癌患者预后及生存率的影响。

综上所述,SP/NK-1R 系统在鼻咽癌细胞增殖、侵袭过程中发挥重要作用,SP/NK-1R 有望成为鼻咽癌诊断及治疗的新的分子靶点。

参考文献:

[1] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, *et al*. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)30956-0.

[2] TANG L L, CHEN W Q, XUE W Q, *et al*. Global trends in incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2016, 374(1): 22-30. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.040.

[3] 丁静华, 苏法仁, 薄琳. 鼻咽癌研究进展[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 41(1): 43-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4106.2017.01.011.
DING J H, SU F R, BO L. Research development of nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Otolaryngol Head Neck Surg, 2017, 41(1): 43-46. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4106.2017.01.011.

[4] YEO E L L, LI Y Q, SOO K C, *et al*. Combinatorial strategies of radiotherapy and immunotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Clin Oncol, 2018, 7(2): 15. DOI: 10.21037/cco.2018.04.05.

[5] CHEN J W, LIU P, WANG Q, *et al*. Influence of intensity-modulated radiation therapy on the life quality of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 73(3): 731-736. DOI: 10.1007/s12013-015-0638-0.

[6] MUÑOZ M, COVEÑAS R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression[J]. Peptides, 2013, 48: 1-9. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.07.024.

[7] 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. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.039.

[8] MUÑOZ M. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(9): 2321. DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2321.

[9] MUÑOZ M, ROSSO M, COVEÑAS R. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(6): 909-921. DOI: 10.2174/138945011795528796.

[10] DONG J Q, FENG F, XU G H, *et al*. Elevated SP/NK-1R in esophageal carcinoma promotes esophageal carcinoma cell proliferation and migration[J]. Gene, 2015, 560(2): 205-210. DOI: 10.1016/j.gene.2015.02.002.

[11] ESTEBAN F, GONZALEZ-MOLES M A, CASTRO D, *et al*. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression[J]. Histopathology, 2009, 54(2): 258-260. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03193.x.

[12] MUÑOZ M, GONZÁLEZ-ORTEGA A, ROSSO M, *et al*. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists[J]. Peptides, 2012, 38(2): 318-325. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.09.024.

[13] MOU X Z, CHEN X, RU G, *et al*. High expression of substance P and its receptor neurokinin-1 receptor in colorectal cancer is associated with tumor progression and prognosis[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3595-3602. DOI: 10.2147/OTT.S102356.

[14] MUÑOZ M, COVEÑAS R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(9): 2321-2334. DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2321.

[15] DAVOODIAN M, BOROUMAND N, MEHRABI BAHAR M, *et al*. Evaluation of serum level of substance P and tissue distribution of NK-1 receptor in breast cancer[J]. Mol Biol Rep,2019,46(1): 1285-1293. DOI: 10.1007/s11033-019-04599-9.

[16] ORTIZ-PRIETO A, BERNABEU-WITTEL J, ZULUETA-DORADO T, *et al*. Immunolocalization of substance P and NK-1 receptor in vascular anomalies[J]. Arch Dermatol Res, 2017, 309(2): 97-102. DOI: 10.1007/s00403-016-1707-y.

[17] MUNOZ M, COVENAS R, ESTEBAN F, *et al*. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs[J]. J Biosci, 2015, 40(2): 441-463. DOI: 10.1007/s12038-015-9530-8.

[18] KOON H W, ZHAO D Z, NA X, *et al*. Metalloproteinases and transforming growth factor-alpha mediate substance P-induced mitogen-activated protein kinase activation and proliferation in human colonocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(44): 45519-45527. DOI: 10.1074/jbc.M408523200.

[19] KOON H W, ZHAO D Z, ZHAN Y N, *et al*. Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(6): 2013-2018. DOI: 10.1073/pnas.0610664104.

[20] JAVID H, MOHAMMADI F, ZAHIRI E, *et al*. The emerging role of substance P/neurokinin-1 receptor signaling pathways in growth and development of tumor cells[J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(4): 415-421. DOI: 10.1007/s13105-019-00697-1.

(**收稿**:2020-03-04;**修回**:2020-04-28)

(编辑 张 维)