

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.011

神经生长导向因子 SLIT2 抑制结肠癌细胞迁移的作用研究*

张向远¹ 贺艳² 董加强¹ 王娜¹ 帖君^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院 肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710000; 2 安徽蚌埠医学院 安徽 蚌埠 233030)

摘要 目的:研究 SLIT2 基因对结肠癌细胞迁移能力的影响。**方法:**通过 western blot 技术检测 SLIT2 在各种结肠癌细胞系中的表达,采用小干扰 RNA 转染技术,在低转移细胞系 RKO 中沉默 SLIT2 基因表达,并采用 PCR 和 western blot 技术验证其干扰效率。采用质粒转染技术,在高转移细胞系 LOVO 中上调 SLIT2 基因表达后,通过 Transwell 迁移实验和划痕愈合实验检测 SLIT2 表达变化对结肠癌细胞系迁移能力的影响。**结果:**SLIT2 在高转移细胞系 LOVO 和 HCT116 中表达明显低于低转移细胞系 RKO 和 HT-29。在低转移细胞系 RKO 中敲减 SLIT2 后,Transwell 结果显示细胞的迁移能力得到了明显增强($P<0.05$)。在高转移细胞系 LOVO 中过表达 SLIT2 后,细胞的划痕愈合能力和迁移能力则均受到明显抑制($P<0.05$)。**结论:**神经生长导向因子 SLIT2 的表达与结肠癌细胞的迁移潜能相关,体外实验表明 SLIT2 可抑制结肠癌细胞系 LOVO、RKO 的迁移能力。

关键词:SLIT2; 结肠癌; Transwell; 肿瘤转移

中图分类号:R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3045-04

Axon Guidance Cues Slit2 Inhibited the Migration Ability of Colorectal Cancer Cell Lines*

ZHANG Xiang-yuan¹, HE Yan², DONG Jia-qiang¹, WANG Na¹, TIE Jun^{1Δ}

(1 State key Laboratory of Cancer Biology and Xijing Hospital of Digestive Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China; 2 Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233030, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of SLIT2 on the migration ability of different colorectal cancer (CRC) cell lines. **Methods:** Western blot were performed to detect the expression level of SLIT2 in several CRC cell lines. Based on the expression level of SLIT2, RKO and LOVO were selected for further functional test. siRNA targeting SLIT2 was transfected into RKO, followed by Transwell assay to test the changed migration ability it may induce. LOVO cells transfected with the plasmid containing the coding sequence of SLIT2 were then detected the effect of ectopic SLIT2 on cell migration. **Results:** SLIT2 silencing facilitated the migration of the RKO. And ectopic expression of SLIT2 distinctly suppressed the wound closure and migration ability of LOVO with high metastasis potential. **Conclusion:** SLIT2 may exert an inhibitory effect on the migration ability of CRCs.

Key words: SLIT2; Colorectal cancer; Transwell; Tumor metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3045-04

前言

SLIT 家族(SLIT1-3)和其受体 ROBO 家族(ROBO1-4)最早鉴定于神经系统中,它们和 Netrin 等神经迁移因子一样在神经元细胞的定向迁移中发挥着举足轻重的作用^[1,2]。肿瘤细胞与神经元细胞的迁移可能共用一些相同的信号通路^[3]。近年来陆续有文献报导 SLIT/ROBO 参与结肠癌^[4]、胃癌^[5]、乳腺癌^[6]等肿瘤转移。然而无论是 SLIT,还是 ROBO 在肿瘤转移中的作用都存在争议。有报道在化学诱导的皮肤肿瘤模型中,SLIT2 可促进肿瘤的侵袭^[7],而 Kong, R 等研究者则发现 SLIT2 可通过结合 ROBO1 抑制肺癌的转移^[8]。那么 SLIT2 在结肠癌中到底起着什么样的作用,本研究用功能缺失和功能获得的方法,在

体外细胞水平上证实了 SLIT2 抑制结肠癌细胞的迁移。

1 材料与方法

1.1 材料

兔源 SLIT2 多克隆抗体购买自 Abcam 公司,鼠源 β -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司。Transwell 小室($8\mu\text{m}$)购自 Corning 公司。脂质体转染试剂 lipo2000 购自 invitro gene 公司。靶向 SLIT2 的小干扰 RNA 均由锐博公司合成。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。细胞计数板购自 Bio-rad 公司。SLIT2 过表达质粒载体名称:GV146;载体元件顺序:CMV-MCS-IRES-EGFP-SV40-Neomycin。胎牛血清(FBS)购自 BI 公司。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272649)

作者简介:张向远(1992-),硕士研究生,主要研究方向:胃癌、结肠癌、肿瘤转移、血管生成,电话:15877556763, E-mail: zhangxy131@yeah.net

Δ 通讯作者:帖君,副主任医师,副教授,主要研究方向:消化道肿瘤转移的分子机制, E-mail: tiejun7776@163.com

(收稿日期:2017-02-10 接受日期:2017-03-05)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 实验所用结肠癌细胞系 LOVO, RKO, HCT116, HT-29 均培养于 DMEM+10 % FBS+1 % 青链霉素混合液。培养条件为 37℃, 5 % CO₂ 浓度。细胞转染时培养于混有 0.5 % lipo2000 及转染核酸的 Opti-MEM 中, 6-8 h 后换为 DMEM+10 % FBS 培养液。

1.2.2 Transwell 小室迁移实验, 划痕愈合实验 Transwell 迁移实验步骤具体如下: 胰酶消化细胞, 用 10 % FBS+DMEM 中和后加入含有 0.5% BSA 的 DMEM 培养液重悬细胞。细胞计数板计数三次取平均值, 加入 200 μ L 细胞悬液至 Transwell 小室上层(具体细胞数依据细胞迁移能力而定)。下层加入 600 μ L 含有 10 % FBS 的 DMEM 培养液。24 h 后取出小室, 用 PBS 清洗三次后, 将其放入 24 孔板中, 加入 1 mL 无水乙醇固定 10 min。将小室用 PBS 清洗三次后放入 24 孔板中加入适量结晶紫溶液染色 3 min。取出小室用 PBS 清洗 3 次后, 用棉签小心擦拭小室内层细胞, 室温下静止干燥后放入显微镜下观察计数。划痕愈合实验具体步骤见文献^[9]。

1.2.3 RNA 提取、反转录及荧光定量 PCR Trizol 法提取细胞内 RNA 具体步骤如下: 吸取六孔板中培养基, 用 PBS 清洗三次后加入 1 mL Trizol 试剂。常温下静止 5 min 使细胞充分裂解。转移细胞裂解液到 1.5 mL EP 管中反复吹打, 加入 200 μ L 氯仿后, 在振荡器上充分混合震荡 12-14 s。静止 5 min 后使用 12000 rpm 转速 4℃ 下离心 15 min。取出 EP 管小心吸取上清液 500 μ L 至新的无酶 EP 管中。加入事先预冷的异丙醇 500 μ L 颠倒混匀, 室温静止 10 min。将混合液置于离心机中 12000 rpm 离心 10 min, 弃上清液可见白色沉淀。加入 1 mL 75 % 无水乙醇清洗沉淀后, 于 7500 rpm, 4℃ 下离心 5 min, 弃去上清, 用 100 μ L DEPC 水溶解沉淀, 测定 RNA 浓度及纯度后 -80℃ 下保存。RNA 反转录及荧光定量 PCR 参考 TAKARA 试剂盒说明。引物序列: SLIT2 上游 CGTTTGGAATGTGCAGCATAA, 下游 TTCGATTGCTTCTCAACATCAAAGT。

1.2.4 Western Blot 简单步骤如下: 配置 SDS-PAGE 凝胶, 将蛋白样品取出混匀后加入凝胶上层。设置电泳条件 80V 使样品跑样至下层分离胶时更改电压为 140 V 直至电泳结束。配置转膜缓冲液, 将凝胶放于转膜槽中。湿转条件设置为 300 mA, 200 min 充分转膜后, 用 5 % 脱脂牛奶封闭 40 min。将封闭后的 NC 膜置于摇床上, TBST 清洗 5 min。取出 NC 膜置于抗体孵育盒中, 加入事先配置的抗体溶液, 使其完全浸没 NC 膜。将抗体孵育盒置于摇床 4℃ 下过夜。第二日取出 NC 膜, 摇床下 TBST 清洗 5 min, 重复三次。加入一抗种属所对应的二抗溶液。室温下孵育 40 min 后, TBST 清洗 5 min, 重复三次后显色。

1.2.5 数据分析 Transwell 实验结果在 200 倍放大显微镜下观察, 随机选取 5 个视野拍照, 采用 Image-Pro Plus 软件对细胞进行计数后分析。划痕愈合实验结果采用 Image-Pro Plus 软件测量迁移距离。Western 结果采用 Image J 对条带进行灰度分析后, 以 β -actin 作为内参得出各组中目的基因的相对灰度值并进行统计分析。所有定量数据组间分析采用两独立样本的 t 检验。p<0.05 时认为有统计学差异。绘图采用 GraphPad 软件。

2 结果

2.1 SLIT2 在结肠癌细胞系中的表达

我们首先收集了常用的结肠癌细胞系 LOVO, RKO, HCT116, HT-29。分别提取其蛋白后检测了 SLIT2 在蛋白水平的表达, 如图 1 所示。蛋白水平上 SLIT2 在各种结肠癌细胞系中均有明显条带, 其中 SLIT2 在低转移细胞系 RKO 及 HT-29 细胞中表达明显高于高转移细胞系 HT-116 和 LOVO。

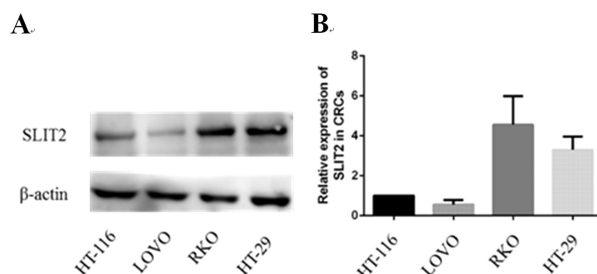


图 1 SLIT2 在不同结肠癌细胞系中的表达

Fig.1 The expression of SLIT2 in different CRCs

Note: A: western blot analysis of SLIT2 expression level in CRCs; B: Quantification of the image by analysis of the gray value.

2.2 下调 SLIT2 表达可增强 RKO 细胞的迁移能力

为进一步探索 SLIT2 在结肠癌细胞系中的作用。我们首先选取了高表达 SLIT2 的结肠癌细胞系 RKO, 采用小干扰 RNA 沉默基因表达技术抑制 RKO 细胞中 SLIT2 的表达, 并分别用 PCR 和 Western blot 检测其干扰效率。如图 2A-C 所示, 小干扰 RNA SLIT2 si (1) 及 SLIT2 si (2) 在 RKO 细胞中均有明显抑制 SLIT2 表达作用。随后我们通过 Transwell 迁移实验观察了 SLIT2 下调对 RKO 迁移能力的影响。如图 2D 结果显示, SLIT2 下调后 RKO 的迁移能力得到明显的提高。

2.3 SLIT2 过表达抑制 LOVO 细胞系的划痕愈合和定向迁移能力

为了验证 SLIT2 过表达对 LOVO 迁移的影响。我们成功构建了 SLIT2 过表达质粒。如图 3A 所示, 转染了 SLIT2 表达质粒的 LOVO 细胞系中 SLIT2 的表达得到了明显的上调。在这一基础上我们通过 Transwell 实验发现 SLIT2 过表达后 LOVO 细胞的迁移能力受到了明显的抑制(图 3B)。随后我们又通过划痕愈合实验观察发现 SLIT2 过表达可显著抑制 LOVO 细胞的划痕愈合能力(图 3C)。

3 讨论

在本次研究中, 为探索 SLIT2 在结肠癌中的作用, 我们首先检测了 SLIT2 在不同结肠癌细胞系中的表达。随后在低转移结肠癌细胞系 RKO 细胞中降低 SLIT2 的表达, 在高转移结肠癌细胞系 LOVO 细胞中上调 SLIT2 的表达, 并通过 Transwell 和划痕实验检测 SLIT2 对结肠癌细胞迁移能力的影响, 结果显示 SLIT2 可抑制结肠癌细胞的迁移。

SLIT2 是一种分泌性蛋白, 其受体是 ROBO 家族。SLIT2/ROBO1 的生理功能主要是引导神经轴突的准确定位。肿瘤细胞的转移与神经元细胞的迁移可能共用一些细胞运动相关的信号通路。例如: DCC 在引导神经生长和迁移中发挥了重要作用^[10], 而其表达缺失也与结直肠癌发生进展密切相关^[11]。

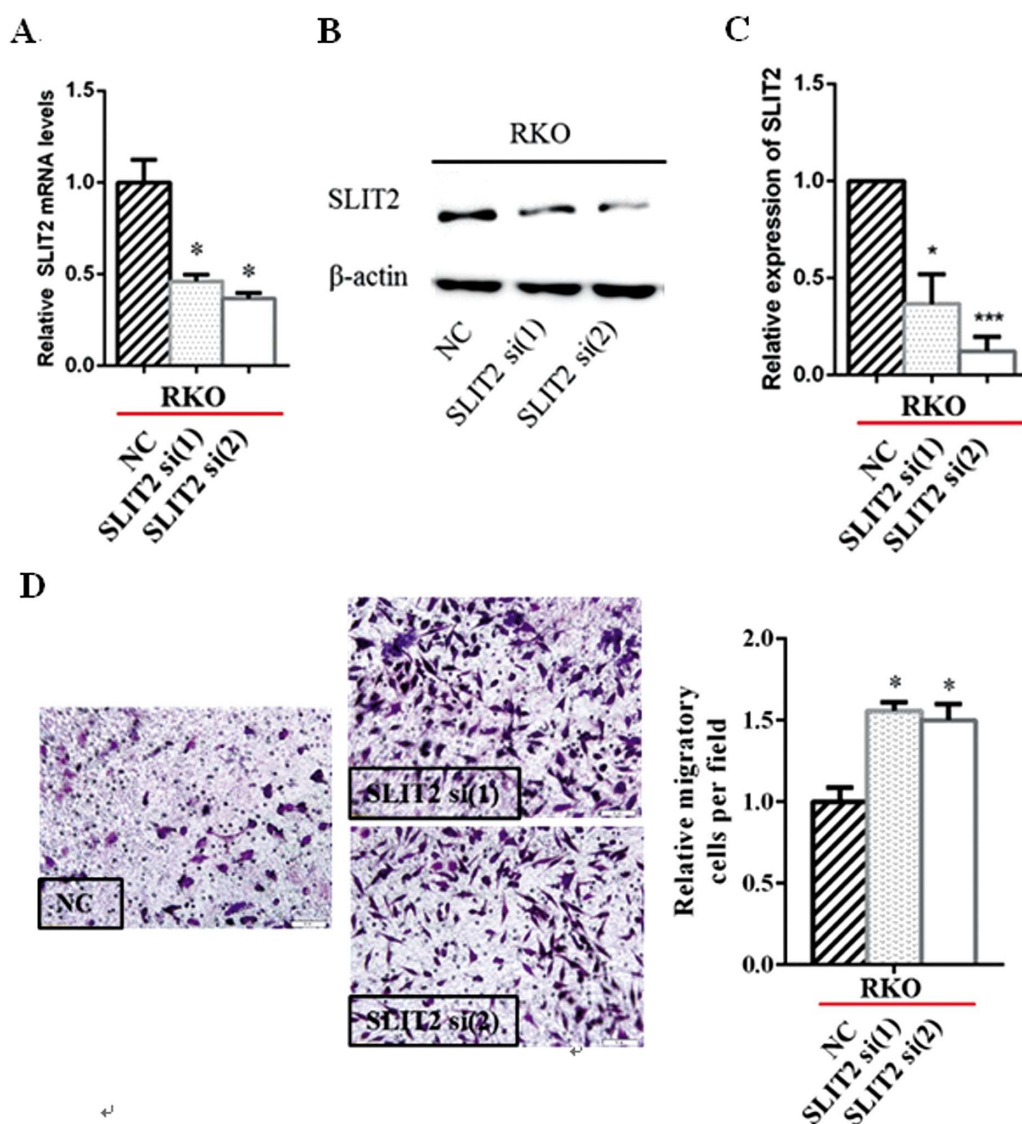


图2 下调 SLIT2 可增强 RKO 细胞的迁移能力

Fig.2 Down regulation of SLIT2 facilitated RKO migration

Note: A: quantitative RT-PCR analysis of SLIT2 expression in RKO transfected with SLIT2-targeting siRNA. Data were plotted as mean $\pm$ s.e.m. (n=3),

*P<0.05. B-C: interfering efficiency validated by western blot. The result was quantified and shown as mean $\pm$ s.e.m. (n=3), *P<0.05, ***P<0.001. D:

Transwell assay of the RKO cells transfected with SLIT2 siRNA or NC. Data were shown as mean $\pm$ s.e.m. (n=3), *P<0.05.

因此,与神经元迁移相关的信号通路 SLIT2/ROBO1 近年来在肿瘤中有大量的研究报导。

然而不同研究者们对其作用却有不同认识。即便在同一肿瘤中,也有截然相反的报道^[4,12]。例如在前列腺癌,恶性黑色素瘤和侵袭性乳腺癌中 SLIT2 呈现出高表达^[13,14],提示其促进肿瘤转移的作用。而相反的是在肺癌和神经胶质瘤^[15]等肿瘤中,SLIT2 的表达则通常由于基因甲基化等原因而受到抑制。

如何理解这一矛盾的现象?我们认为:1.肿瘤起源不同,其转移的分子机制有所差异。例如 SLIT2 可以抑制肺癌,乳腺癌和神经胶质瘤细胞的迁移和侵袭^[8,16,17],却可促进皮肤鳞状细胞癌的侵袭^[7]。相似的情况还见于细胞因子 IL10。IL10 在肺癌中被报道与肿瘤浸润转移和不良预后相关^[18,19]。其可通过肿瘤细胞自分泌的方式,促进下游分子 SIRT6 的活化进而促进肿瘤的转移^[19]。而也有报道称 IL10 可抑制黑色素瘤转移^[20],其机制可能在于抑制了 VEGF 和 MMP9 的表达水平。2. SLIT2 结合的

受体不同,所发挥作用不同。研究证明所有 SLIT 配体 (SLIT1-3)均可通过其 N 端与 ROBO 家族成员 (ROBO1-4)的胞外段相结合^[21],而 SLIT2 和不同的 ROBO 结合可能产生不同的生物学效应。比如:在乳腺癌中 SLIT2 通过结合 ROBO1 可促进细胞迁移^[22]。而在口腔鳞状细胞癌中,SLIT2 刺激可增加 ROBO3 和 P-cadherin 的结合从而抑制肿瘤细胞的迁移^[23]。研究发现 ROBO2 和 ROBO1 在神经导向中作用迥异^[24],其在肿瘤是否如此尚待进一步研究证实。3.SLIT2 在结肠癌细胞中的作用是一种分子网络的合力。比如 SLIT2/ROBO1 是促进结肠癌迁移的,SLIT2 与其他受体结合是抑制迁移,如果 SLIT2 与其他受体结合的抑制作用大于与 ROBO1 结合后促进作用,在 SLIT2 表达升高时,细胞最终表现的是转移抑制表型。

当然,上述只是我们基于理论的分析 and 推测,而 SLIT2 抑制结肠癌细胞迁移的分子机制尚需进一步的研究。此外,本研究仅仅只是细胞水平的体外的研究,SLIT2 对结肠癌细胞转移

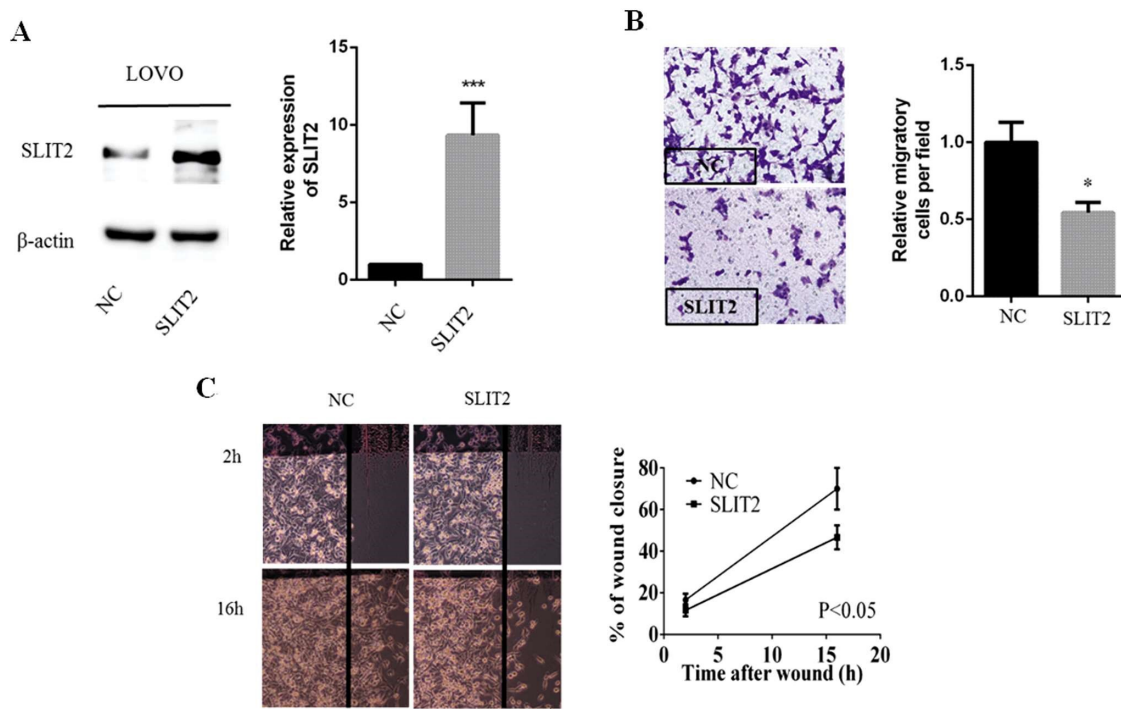


图3 SLIT2 过表达抑制 LOVO 细胞系的迁移和划痕愈合

Fig.3 Ectopic expression of SLIT2 inhibited the migration and wound healing of LOVO

Note: A: levels of SLIT2 in LOVO transfected with SLIT2 plasmid or NC. B: Transwell assay of the LOVO cells transfected with SLIT2 plasmid or NC. Data were shown as mean $\pm$ s.e.m. (n=3), *P<0.05. C: images of scratch assay in LOVO. Quantification of the migratory distance were shown as mean $\pm$ s.e.m. (n=3), P<0.05.

表型的影响,还需进一步的体内研究证实。

参考文献(References)

- [1] Brose K, Bland KS, Wang KH, et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance [J]. Cell, 1999, 96(6): 795-806
- [2] Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(3): 165-180
- [3] Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(12): 978-987
- [4] Zhang QQ, Zhou DL, Lei Y, et al. Slit2/Robo1 signaling promotes intestinal tumorigenesis through Src-mediated activation of the Wnt/beta-catenin pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(5): 3123-3135
- [5] Shi R, Yang Z, Liu W, et al. Knockdown of Slit2 promotes growth and motility in gastric cancer cells via activation of AKT/beta-catenin[J]. Oncol Rep, 2014, 31(2): 812-818
- [6] Qin F, Zhang H, Ma L, et al. Low Expression of Slit2 and Robo1 is Associated with Poor Prognosis and Brain-specific Metastasis of Breast Cancer Patients[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14430
- [7] Qi C, Lan H, Ye J, et al. Slit2 promotes tumor growth and invasion in chemically induced skin carcinogenesis [J]. Lab Invest, 2014, 94(7): 766-776
- [8] Kong R, Yi F, Wen P, et al. Myo9b is a key player in SLIT/ROBO-mediated lung tumor suppression [J]. J Clin Invest, 2015, 125(12): 4407-4420
- [9] Zhu K, Pan Q, Zhang X, et al. MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(9): 2071-2079
- [10] Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene[J]. Nature, 1997, 386(6627): 796-804
- [11] Duman-Scheel M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor[J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(11): 1445-1453
- [12] Huang Z, Wen P, Kong R, et al. USP33 mediates Slit-Robo signaling in inhibiting colorectal cancer cell migration[J]. Int J Cancer, 2014:
- [13] Latil A, Chene L, Cochant-Priollet B, et al. Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors[J]. Int J Cancer, 2003, 103(3): 306-315
- [14] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. Cancer Cell, 2003, 4(1): 19-29
- [15] Dallol A, Krex D, Hesson L, et al. Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in gliomas[J]. Oncogene, 2003, 22(29): 4611-4616
- [16] Yiin JJ, Hu B, Jarzynka MJ, et al. Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity [J]. Neuro Oncol, 2009, 11(6): 779-789
- [17] Prasad A, Paruchuri V, Preet A, et al. Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(39): 26624-26633
- [18] Karlicic V, Vukovic J, Stanojevic I, et al. Association of locally produced IL10 and TGFb1 with tumor size, histological type and presence of metastases in patients with lung carcinoma [J]. J BUON, 2016, 21(5): 1210-1218

(下转第 3004 页)

此,中剂量和高剂量天麻素对抑郁样行为的改善作用与其保护海马星形胶质细胞的活性和维持 BDNF 的释放水平有关。

综上所述,本研究发现天麻素可以改 CUS 大鼠的抑郁行为,并且能够上调海马的 GFAP 和 BDNF 的表达水平。但本研究具有一定的局限性,观察只局限于 CUS 大鼠模型的部分抑郁行为以及海马 GDNF 和 BDNF 的表达水平的改善情况,缺乏更深层次的机制研究。

参考文献(References)

- [1] Gibson T B, Jing Y, Smith C G, et al. Cost burden of treatment resistance in patients with depression[J]. *Am J Manag Care*, 2010, 16(5): 370-377
- [2] Berlim M T, Turecki G. Definition, assessment, and staging of treatment-resistant refractory major depression: a review of current concepts and methods[J]. *Can J Psychiatry*, 2007, 52(1): 46-54
- [3] Murata A, Kanbayashi T, Shimizu T, et al. Risk factors for drug nonadherence in antidepressant-treated patients and implications of pharmacist adherence instructions for adherence improvement [J]. *Patient Prefer Adherence*, 2012, 6: 863-869
- [4] Berlim M T, Turecki G. Definition, assessment, and staging of treatment-resistant refractory major depression: a review of current concepts and methods[J]. *Can J Psychiatry*, 2007, 52(1): 46-54
- [5] Brent D A, Birmaher B. Treatment-resistant depression in adolescents: recognition and management[J]. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 2006, 15(4): 1015-1034
- [6] Ridet J L, Malhotra S K, Privat A, et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(12): 570-577
- [7] Castren E, Voikar V, Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(1): 18-21
- [8] 刘文学, 张广芬, 王菁, 等. 星形胶质细胞功能障碍在抑郁症发病中的作用研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(6): 1187-1190
Liu Wen-xue, Zhang Guang-fen, Wang Jing, et al. Progress in Roles of Astrocyte Dysfunction in the Onset of Depression [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(6): 1187-1190
- [9] Kumar H, Kim IS, More SV, et al. Gastrodin protects apoptotic dopaminergic neurons in a toxin-induced Parkinson's disease model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, (2013): 514-527
- [10] Chen W C, Lai Y S, Lin S H, et al. Anti-depressant effects of Gastrodia elata Blume and its compounds gastrodin and 4-hydroxybenzyl alcohol, via the monoaminergic system and neuronal cytoskeletal remodeling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 18(2): 190-199
- [11] Koo J W, Duman R S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2): 751-756
- [12] Xu X, Lu Y, Bie X. Protective effects of gastrodin on hypoxia-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons [J]. *Planta Med*, 2007, 73(7): 650-654
- [13] Zhao X, Zou Y, Xu H, et al. Gastrodin protect primary cultured rat hippocampal neurons against amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity via ERK1/2-Nrf2 pathway [J]. *Brain Res*, 2012, 14(28): 13-21
- [14] Banasr M, Valentine G W, Li X Y, et al. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat [J]. *Biol Psychiatry*, 2007, 62(5): 496-504
- [15] Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4-5): 525-546
- [16] Conti B, Maier R, Barr A M, et al. Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electroconvulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine [J]. *Mol Psychiatry*, 2007, 12(2): 167-189
- [17] Sillaber I, Panhuysen M, Henniger M S, et al. Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008, 200(4): 557-572
- [18] Allaman I, Fiumelli H, Magistretti P J, et al. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2011, 216(1): 75-84
- [19] Deltheil T, Guiard B P, Cerdan J, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(6): 1006-1014
- [20] Shirayama Y, Chen A C, Nakagawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(8): 3251-3261
- [21] Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, et al. Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2010, 13(6): 759-774
- [19] Hsu TI, Wang YC, Hung CY, et al. Positive feedback regulation between IL10 and EGFR promotes lung cancer formation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20840-20854
- [20] Huang S, Xie K, Bucana CD, et al. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 1996, 2(12): 1969-1979
- [21] Ypsilanti AR, Chedotal A. Roundabout receptors[J]. *Adv Neurobiol*, 2014, 8: 133-164
- [22] Schmid BC, Reznicek GA, Fabjani G, et al. The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 106(3): 333-342
- [23] Bauer K, Doweiko A, Bosserhoff AK, et al. Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(6): 935-943
- [24] Kim M, Roesener AP, Mendonca PR, et al. Robo1 and Robo2 have distinct roles in pioneer longitudinal axon guidance [J]. *Dev Biol*, 2011, 358(1): 181-188

(上接第 3048 页)