

维生素K₂对大鼠HepG2细胞侵袭和凋亡的影响及机制

余华良, 朱隽, 田新社 (湖北省襄阳市中心医院北区 消化内科, 湖北 襄阳 441000)

摘要: 目的 探讨维生素K₂对大鼠HepG2细胞侵袭和凋亡的影响及机制。方法 选取对数生长期的HepG2细胞, 培养48 h后加入不同浓度(1 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L)的维生素K₂, 同时设置对照组(仅加培养液), 培养48 h后检测HepG2细胞的增殖、侵袭和凋亡以及肝癌衍生生长因子(hepatoma derived growth factor, HDGF)的表达。结果 维生素K₂呈现剂量依赖性抑制HepG2细胞增殖、增加细胞凋亡指数并抑制HepG2细胞的穿透能力, 与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。维生素K₂可呈现剂量依赖性抑制HDGF mRNA与蛋白表达水平, 实验组表达水平显著低于对照组($F = 20.332$, $P < 0.001$)。结论 维生素K₂可抑制大鼠HepG2细胞的增殖、侵袭并促进凋亡, 其作用机制可能与抑制HDGF基因与蛋白表达有关。

关键词: 维生素K₂; 肝癌; HepG2细胞; 侵袭; 肝癌衍生生长因子

Effects and mechanisms of vitamin K₂ on the invasion and apoptosis of HepG2 cells in rats

YU Hua-liang, ZHU Jun, TIAN Xin-she (Department of Gastroenterology, North District of Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441000, Hubei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of vitamin K₂ on the invasion and apoptosis of HepG2 cells in rats. **Methods** HepG2 cells in logarithmic growth phase were selected and cultured for 48 hours, then vitamin K₂ of different concentrations (1 μmol/L, 10 μmol/L and 20 μmol/L) were added. The control group was also set up (only added culture solution). The proliferation, invasion and apoptosis of HepG2 cells and the expression of hepatoma derived growth factor (HDGF) were detected after 48 hours' culture. **Results** Vitamin K₂ inhibited the proliferation, increased the apoptosis index and inhibited the penetrability of HepG2 cells in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Vitamin K₂ inhibited the expression of HDGF mRNA and protein in a dose-dependent manner, which was significantly lower than that of the control group ($F = 20.332$, $P < 0.001$). **Conclusions** Vitamin K₂ can inhibit the proliferation, invasion and enhance the apoptosis of HepG2 cells in rats, and the mechanism may be related to the inhibition of HDGF gene and protein expression.

Key words: Vitamin K₂; Liver cancer; HepG2 cells; Invasion; Hepatoma derived growth factor

当前我国肝癌呈高发趋势, 沿海地区发病率高于内地, 华南地区显著高于中原地区, 预后差、病死率高^[1,2]。病毒感染、饮酒、吸烟、黄曲霉毒素、环境污染及遗传易感性为肝癌发病的主要诱因。由于肝癌早期症状隐匿, 确诊时可能已错过最佳手术时机, 施行有效的姑息治疗及延长患者生存时间成为临床医生面临的重要问题^[3,4]。常规药物治疗可能引起肝功能严重失代偿。维生素在人体代谢活动中具有重要作用, 可通过调控酶化学反应以维持机

体正常功能^[5,6]。维生素K含有2-甲基-1,4-萘醌基团, 为人体内多种蛋白依赖性维生素。维生素K₂是维生素K家族中具有抗肿瘤作用的成员, 其本身就是一种强氧化应激诱导剂, 可对多种肿瘤细胞的生命周期进行调节, 诱导肿瘤细胞发生凋亡及分化, 抑制肿瘤细胞和肝癌细胞的增殖, 具有广谱抗癌效应^[7-9], 但具体机制尚未明确。肝癌衍生生长因子(hepatoma derived growth factor, HDGF)是从大鼠HepG2细胞株培养液中分离出的一种具有细胞增殖活性的肽类物质, 可促进细胞增殖、浸润转移、组织分化及新生血管的形成^[10,11]。本文具体探

讨了维生素K₂对大鼠肝癌HepG2细胞侵袭、凋亡与HDGF表达的影响,以期和维生素K₂治疗肝癌提供理论基础。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 维生素K₂由Sigma公司提供,保存于-80℃环境中,在进行实验时以PBS溶解,然后以RPMI-1640培养基将其稀释至所需浓度。大鼠肝癌HepG2细胞来自日本理化学研究所细胞库,RPMI-1640培养基为美国Gibco BRL公司产品,四甲基偶氮唑蓝(MTT)为美国Sigma公司产品,小牛血清由美国MP Biomedicals生物医学公司生产。PCR检测相关试剂由上海生工公司提供,Western检测相关试剂由美国Sigma公司成产。HDGF引物序列(扩增片段210 bp):上游引物5'-CGAAGCACTGACCTCCCTA-3',下游引物5'-CCTCCAGATGTTGGACC-3';β-actin引物序列(扩增片段461 bp):上游引物5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGAAGGG-3',下游引物5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCACTA-3'。

1.2 细胞培养 HepG2细胞培养于RPMI-1640+10%胎牛血清培养基中,置37℃(5% CO₂)孵箱中生长,在传代培养中,以0.25%胰蛋白酶进行消化。取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 MTT实验 提取处在对数生长期的HepG2细胞,将细胞浓度调整到5000个/孔,在96孔培养板中培养48 h,然后加入不同浓度(1 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L)的维生素K₂,每个浓度设立3个平行孔;建立对照组,仅加入培养液。培养48 h后加入MTT 20 μl/孔,使用酶标仪检测570 nm下的A值。生长抑制率=[(A_{对照组}-A_{给药组})/A_{对照组}] \times 100%。

1.4 流式细胞实验 将细胞接种于6孔板中,每孔 15×10^4 个细胞,低温离心收集细胞,PBS洗涤2遍,添加300 μl结合缓冲液悬浮细胞,添加Annexin V-FITC至5 μl,混匀,避光,在室温下孵育15 min;上机前5 min再加入5 μl PI染色,机前补加200 μl结合缓冲液,置于流式细胞仪分析。

1.5 细胞侵袭实验 将5 μg Matrigel铺于Transwell侵袭小室聚碳酸酯微孔膜的上表面,37℃放置30 min。HepG2细胞与不同浓度的维生素K₂培养24 h时进行消化。Transwell上室中分别添加各组细胞 100×10^5 个,下室加入600 μl RPMI-1640培养基,培养48 h后取出,固定并染色微孔膜下层细胞,在400倍光学显微镜下任意选取5个视野,对每个视野穿过微孔的细胞数目进行统计,以判定侵袭能力。

1.6 RT-PCR与Western blot 采用半定量RT-PCR检

测HDGF表达水平。Western blot实验时收集细胞后加入RIPA裂解液溶解震荡,使用BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,进行SDS-PAGE电泳,转膜后一抗与二抗孵育,采用ELC法进行条件显色与分析。

1.7 统计学处理 采用SPSS 23.00统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和t检验进行统计,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长抑制率 药物处理48小时后,1 μmol/L、10 μmol/L和20 μmol/L维生素K₂对HepG2细胞的生长抑制率分别为(76.30 \pm 9.11)%、(56.82 \pm 10.98)%和(85.02 \pm 7.18)%,对照组HepG2细胞生长抑制率为(98.43 \pm 2.10)%,组间差异有统计学意义($F=7.922$, $P=0.006$)。

2.2 细胞凋亡指数 药物处理48 h后,1 μmol/L、10 μmol/L和20 μmol/L维生素K₂处理的HepG2细胞凋亡指数分别为(3.87 \pm 1.47)%、(6.20 \pm 1.22)%和(9.72 \pm 2.18)%,对照组凋亡指数为(0.98 \pm 0.13)%,组间差异有统计学意义($F=30.482$, $P<0.001$)。

2.3 细胞侵袭情况 药物处理48 h后,1 μmol/L、10 μmol/L和20 μmol/L维生素K₂处理的HepG2细胞侵袭穿透指数分别为(37.48 \pm 6.33)%、(20.17 \pm 3.92)%和(9.78 \pm 2.19)%,对照组为(72.94 \pm 7.39)%,组间差异有统计学意义($F=14.834$, $P<0.001$)。

2.4 HDGF mRNA的表达水平 药物处理48 h后,1 μmol/L、10 μmol/L和20 μmol/L维生素K₂处理的HepG2细胞HDGF mRNA的表达水平分别为(8.19 \pm 2.50)%、(4.56 \pm 1.82)%和(1.24 \pm 0.45)%,对照组为(12.39 \pm 4.11)%,组间差异有统计学意义($F=20.332$, $P<0.001$)。

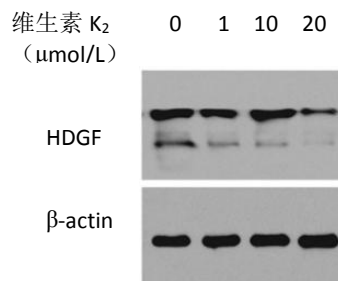


图1 不同浓度维生素K₂处理对HDGF蛋白表达的影响

3 讨论

我国肝癌年发病率和病死率逐年升高,严重威胁人们的健康^[12]。由于肝癌患者肝功能严重失代偿,许多疗法均受到限制。随着生命医学研究的不断深入,与肿瘤细胞相关的周期调节、凋亡诱导等过程正被阐明,生物靶向治疗已成为目前抗肿瘤研究的热门课题之一^[13,14]。

大量临床研究表明,维生素K₂具有较好的抗肿瘤作用,其可作用于特异的受体蛋白,调节Ca²⁺信号系统、蛋白激酶A途径和受体酪氨酸激酶途径,增强抑癌基因的表达^[15]。有研究表明,维生素K₂可抑制以肝癌细胞株HepG2植瘤后裸鼠体内肝癌细胞的生长,且维生素K₂能呈剂量依赖性抑制内皮细胞的生长与增殖^[16]。本研究中维生素K₂呈剂量依赖性抑制HepG2细胞的增殖。维生素K₂可预防病毒性肝炎向肝癌的转变,并且可作为谷氨酰化酶的关键辅助因子辅助治疗肝癌^[17,18]。体外实验表明,维生素K₂可极大抑制转移潜能较高的肝癌细胞,可明显抑制肝癌细胞的黏附和体外迁移,且呈剂量依赖性^[19]。

本研究中维生素K₂可剂量依赖性增加HepG2细胞的凋亡指数。维生素K₂还可使肝癌细胞G₁期停滞,并出现凋亡,维生素K₂处理HepG2后,cyclin D1和CDK4蛋白表达均显著下调^[20]。维生素K₂对肝细胞癌的抑制机制尚未明确,其可能是通过促进正常凝血酶原RNA的表达增加血液内正常凝血酶原的比例,从而降低肝癌细胞的黏附性,抑制肿瘤微血管的形成,降低肝癌细胞的侵袭与浸润能力。研究表明,维生素K₂能够抑制人肝癌细胞株MHCC97H的侵袭与黏附,当维生素K₂浓度升高时,其抑制率也升高^[21]。本研究中维生素K₂在1~20 μmol/L浓度范围可显著抑制HepG2细胞的穿透能力,且呈剂量依赖关系,提示维生素K₂能抑制肝癌微血管形成,抑制肝癌细胞的浸润与转移。也有研究表明维生素K₂对细胞周期具有调节作用,可使多种肿瘤细胞的生命周期停滞^[22]。

HDGF是从肝癌细胞株培养液中分离出的一种具有细胞增殖活性的肽类物质,存在于多种正常组织及恶性肿瘤中,对细胞凋亡、细胞增殖、胚胎发育和血管生成等生物学行为具有重要作用。肝癌组织中HDGF的表达水平是肝癌的独立预后指标,与肿瘤的分化程度密切相关,其在肝癌组织中的水平显著高于邻近的正常肝组织^[23,24]。有研究表明维生素K₂可作用于HDGF基因启动子区-1~-150位点,使HDGF在启动区表达下调^[25,26]。本研究表明,维生素K₂呈剂量依赖性抑制HDGF mRNA与蛋白的表

达,提示维生素K₂可通过抑制HDGF基因与蛋白的表达水平而抑制肝癌细胞的生长。

综上,维生素K₂可抑制大鼠肝癌HepG2细胞的增殖、侵袭和凋亡,其作用机制可能与抑制HDGF基因及蛋白表达有关。

参考文献

- [1] Li L, Wang L, Song R, et al. Cytochrome P450 2E1 increases the sensitivity of hepatoma cells to vitamin K₂[J]. *Int J Oncol*,2017,50(5): 1832-1838.
- [2] 李鸣,游建,何鑫,等. 维生素K₂对肝癌细胞株内的肝癌衍生生长因子表达的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*,2015,32(1):67-68.
- [3] Qin XY, Fujii S, Shimizu A, et al. Carboxylic derivatives of vitamin K₂ inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through Caspase/Transglutaminase-related signaling pathways[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*,2015,61(4):285-290.
- [4] Mizuta T, Ozaki I. Hepatocellular carcinoma and vitamin K₂[J]. *Clin Calcium*,2015,25(11):1645-1651.
- [5] Wang CH, Wey KC, Mo LR, et al. Current trends and recent advances in diagnosis, therapy, and prevention of hepatocellular carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2015,16(9):3595-3604.
- [6] 游建,何鑫,李鸣,等. 维生素K₂抑制肝癌细胞增殖及肝癌衍生生长因子表达[J]. *中华实验外科杂志*,2012,29(12):2460-2462.
- [7] 谭立业,李立德,汪晶,等. miR-214对HepG2细胞增殖及细胞周期影响[J]. *中国公共卫生*,2017,33(4):614-617.
- [8] Setoguchi S, Watase D, Matsunaga K, et al. Enhanced antitumor effects of novel intracellular delivery of an active form of menaquinone-4, menahydroquinone-4, into hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*,2015,8(2):129-138.
- [9] Lu LC, Cheng AL, Poon RT. Recent advances in the prevention of hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *Semin Liver Dis*,2014,34(4): 427-434.
- [10] 王光丽,周小辉. 维生素K₂抑制肝癌细胞增殖的机制研究[J]. *实用癌症杂志*,2016,31(1):14-17.
- [11] Zhong JH, Mo XS, Xiang BD, et al. Postoperative use of the chemopreventive vitamin K₂ analog in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e58082.
- [12] Zhong JH, Ma L, Li LQ. Postoperative therapy options for hepatocellular carcinoma[J]. *Scand J Gastroenterol*,2014,49(6):649-661.
- [13] Ahn H, Kim H, Abdul R, et al. Overexpression of forkhead box O3a and its association with aggressive phenotypes and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Clin Pathol*,2018,149(2):117-127.
- [14] 李璐,董斌,宋睿,等. 乙醇激活细胞色素P450 2E1增强维生素K₂抑制肝癌细胞活力[J]. *实用医学杂志*,2015,31(2):182-185.
- [15] Meng F, Zhang W, Wang Y. RASAL1 inhibits HepG2 cell growth via HIF-2α mediated gluconeogenesis[J]. *Oncol Lett*,2017,14(6):7344-7352.
- [16] Liao Z, Wang X, Wang X, et al. DEPDC7 inhibits cell proliferation, migration and invasion in hepatoma cells[J]. *Oncol Lett*,2017,14(6): 7332-7338.
- [17] Wang G, Fang X, Han M, et al. MicroRNA-493-5p promotes apoptosis and suppresses proliferation and invasion in liver cancer cells by targeting VAMP2[J]. *Int J Mol Med*,2018,41(3):1740-1748.

- [18] 张锋, 苗江永. 维生素K₂调控Wnt/ β -catenin信号对肝癌细胞侵袭、凋亡的影响及机制研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(11): 1222-1225.
- [19] Wang N, Chen S, Zhang B, et al. Su, a pro-apoptosis/cell cycle arrest compound, suppresses invasion and metastasis through HSP90 α downregulating and PI3K/Akt inactivation in hepatocellular carcinoma cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 309.
- [20] 张毅敏, 王明丽, 单绿虎, 等. 肝癌组织中PIVKA-II水平及维生素K₂对肝癌细胞中PIVKA-II的影响[J]. 中华全科医学, 2017, 15(5): 838-840.
- [21] Ren H, Ren B, Zhang J, et al. Androgen enhances the activity of ETS-1 and promotes the proliferation of HCC cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(65): 109271-109288.
- [22] 武文娟, 崔灿, 康品方, 等. SLeX对肝癌HepG2细胞迁移和侵袭的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 23(4): 688-693.
- [23] Zhang R, Lin P, Yang H, et al. Clinical role and biological function of CDK5 in hepatocellular carcinoma: A study based on immunohistochemistry, RNA-seq and in vitro investigation[J]. Oncotarget, 2017, 8(65): 108333-108354.
- [24] 邓益斌, 肖树荣, 许桂丹, 等. 反义锁核酸封闭c-myc第二外显子翻译起始区对肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(9): 1602-1605.
- [25] 韩秋青, 姜锦, 王玉亮. DC-GPC3联合CIK细胞的体外抗肝癌作用[J]. 天津医药, 2018, 46(2): 118-121.
- [26] 何靖炀, 刘秋英, 魏玲, 等. BORIS通过表观修饰对人肝癌细胞SOCS3表达的调控[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(1): 1-7.

收稿日期: 2018-06-02

余华良, 朱隽, 田新社. 维生素K₂对大鼠HepG2细胞侵袭和凋亡的影响及机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(1): 81-84.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿图片格式的要求

本刊要求来稿中的每张照片(图)片均应有必要的图题及说明性文字标注于图的下方, 并在注释中标明图中使用的全部非公知公用的缩写; 图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记, 病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度, 并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短, 不应超过50字, 所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用jpg格式, 分辨率不低于300像素/英寸, 并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像: 分别按其在正文中出现的先后次序连续编码, 文中应标记为“动态图×”。视频资料要求图像清晰稳定, 剪接顺畅, 保持可能获得的最高清晰度模式, 视频文件采用AVI格式, 大小在5M以内。每个文件名均应与文中的名称相符, 如“动态图×”。

本刊编辑部