

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

张毅敏¹, 王明丽¹, 单绿虎¹, 张剑英¹, 徐笑红¹, 夏文进²

1. 浙江省肿瘤医院检验科, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省中山医院

摘要:目的 观察肝癌组织中维生素 K 缺乏或拮抗剂- II 诱导的蛋白质 (protein induced by vitamin K absence or antagonist- II, PIVKA- II) 表达情况及维生素 K₂ (vitamin K₂, VitK₂) 对肝癌细胞中 PIVKA- II 的影响, 探讨 PIVKA- II 与肝癌的关系及可能机制。方法 选择浙江省肿瘤医院、浙江省中山医院 2012 年 1 月—2015 年 12 月 100 对手术切除的原发性肝癌组织及癌旁组织标本, 采用 ABC 免疫组织化学法测定组织中 PIVKA- II 的阳性表达情况, 采用化学发光免疫分析法测定标本中 PIVKA- II 水平; 将 HepG-2 细胞和浓度为 20 μM 的 VitK₂ 共同培养, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞 PIVKA- II 表达的影响, MTT 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞生长的影响, Transwell 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞侵袭能力的影响。结果 肝癌组织中 PIVKA- II 阳性率 (74.0%) 高于癌旁组织中 PIVKA- II 阳性表达率 (25.0%, $P < 0.05$); 肝癌组织中 PIVKA- II 水平 (3 786.23 ± 143.24) mAU/g 高于癌旁组织中 PIVKA- II 水平 (167.34 ± 21.54) mAU/g, $P < 0.05$ 。对照组肝癌细胞 PIVKA- II 水平为 (3.43 ± 0.04) ng/(ml · 10⁶ 细胞), VitK₂ 组肝癌细胞 PIVKA- II 水平为 (2.57 ± 0.02) ng/(ml · 10⁶ 细胞), VitK₂ 组肝癌细胞 PIVKA- II 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$)。VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞共同培养, 第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天时 VitK₂ 对 HepG-2 细胞的抑制率分别为 9.2%、16.5%、26.7%、34.8%、41.2%、46.7%。VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞培养 24 h 后, VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞侵袭的抑制率为 37.2%。结论 肝癌组织中 PIVKA- II 呈高表达, VitK₂ 能够降低肝癌细胞中 PIVKA- II 水平、抑制肝癌细胞生长、降低肝癌细胞侵袭能力。

关键词: 肝细胞癌; 维生素 K₂; 维生素 K 缺乏或拮抗剂- II 诱导的蛋白质

中图分类号: R735.7 R446.61 R977.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2017)05-0838-03

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2017.05.033

PIVKA- II levels in HCC tissues and effect of vitamin K₂ on the expression of PIVKA- II in HCC cells ZHANG Yi-min, WANG Ming-li, SHAN Lu-hu, et al. Department of Clinical Oncology, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310022, China

Abstract: Objective To observe the expression of Vitamin K deficiency or antagonist- II -induced protein (PIVKA- II) in human hepatocellular carcinoma (HCC) and the effect of vitamin K₂ on the expression of PIVKA- II in HCC cells, to explore the relationship between PIVKA- II and HCC and its possible mechanism. **Methods** One hundred pairs of primary liver cancer tissue and adjacent tissue samples of surgical resection in Zhejiang Cancer Hospital from January, 2012 to December, 2015 were selected. The expression of PIVKA- II in tissues was determined by ABC immunohistochemical method. The level of PIVKA- II in the samples was determined by electrochemiluminescence immunoassay. HepG-2 cells were co-cultured with VitK₂ at concentration of 20 μM. The effect of VitK₂ on the expression of PIVKA- II in HepG-2 cells was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MTT assay was used to determine the effect of VitK₂ on the growth of HepG-2 cells. The effect of VitK₂ on the invasive ability of HepG-2 cells was determined by Transwell method. **Results** The positive rate of PIVKA- II in hepatocellular carcinoma (74.0%) was higher than that in para-cancerous tissues (25.0%), $P < 0.05$. The level of PIVKA- II in hepatocellular carcinoma (3 786.23 ± 143.24) mAU/g was higher than that in para-cancerous tissues (167.34 ± 21.54) mAU/g ($P < 0.05$). The level of PIVKA- II in hepatocarcinoma cells in control group was (3.43 ± 0.04) ng/(ml · 10⁶ cells), the level of PIVKA- II in VitK₂ group was (2.57 ± 0.02) ng/(ml · 10⁶ cells). The PIVKA- II level in VitK₂ group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). On the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 6th day of VitK₂ was co-cultured with HepG-2 cells, the inhibitory rates of VitK₂ on HepG-2 cells were 9.2%, 16.5%, 26.7%, 34.8%, 41.2% and 46.7%, respectively. After 24 h of VitK₂ was co-cultured with HepG-2 cells, VitK₂ on HepG-2 liver cancer cell invasion inhibition rate was 37.2%. **Conclusion** The expression of PIVKA- II in hepatocellular carcinoma was high. VitK₂ can reduce the level of PIVKA- II in hepatocarcinoma cells, inhibit the growth of hepatocarcinoma cells and reduce the invasiveness of HCC cells.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Vitamin K₂; Vitamin K deficiency or antagonist- II -induced protein

原发性肝癌包括胆管细胞癌、肝细胞癌和混合型肝癌 3 种主要类型, 临床上以肝细胞癌为主。肝细胞癌恶性程度高, 其发病和病毒性肝炎演变成肝硬化关

系密切。肝脏内弥漫性小病灶, 或单结节病灶周围伴随卫星灶为主要是肝细胞癌的主要病理学特点, 因此肝细胞癌容易形成肝内外转移。PIVKA- II 又称为脱-γ-羧基凝血酶原, 是肝细胞癌特异性产生的凝血酶原, 失去了正常凝血酶原的功能, 和肝细胞癌发生发展、浸润

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2014-KYB-043)

通信作者: 徐笑红, E-mail: zjhxxh@163.com

转移等关系比较密切,近年来受到广泛重视^[1-3]。PIVKA-II为肝细胞癌在维生素K缺乏或者摄取障碍时产生,和维生素K的关系密切。PIVKA-II作为肝细胞癌新的标记物,应用与肝细胞癌的诊断中。但关于肝细胞癌 PIVKA-II 的研究主要集中在血清方面^[4,6]。本文对肝细胞癌患者肝癌组织中 PIVKA-II 进行研究,并探讨维生素 K₂ 对肝癌细胞 PIVKA-II 的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择浙江省肿瘤医院、浙江省中山医院 2012 年 1 月—2015 年 12 月原发性肝癌患者 100 例,取 100 对手术切除的原发性肝癌组织及癌旁组织标本进行研究。100 例患者均经病理证实为原发性肝癌,年龄 49~81 岁,年龄(66.47±11.24)岁;男性 71 例,女性 29 例;伴肝硬化 56 例;I 期肝癌 15 例,II 期肝癌 48 例,III 期肝癌 37 例。100 例患者签署知情同意书,研究经医院伦理委员会审批。HepG-2 肝癌细胞株购自 American Type Culture Collection 公司。实验材料主要包括:PIVKA-II 单克隆抗体(美国 Sigma 公司)、DAB-HCL 显色剂和 ABC 试剂(东京 Nichirei 公司)、RPMI-1640(美国 Sigma 公司)、CCK-8 试剂盒(美国 Sigma 公司)、维生素 K₂(美国 Sigma 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 肝癌组织中 PIVKA-II 表达的测定 取肝癌组织和癌旁组织,采用 ABC 免疫组织化学法测定组织中 PIVKA-II 的表达情况,一抗为 PIVKA-II 单克隆抗体,并设立对照组,对照组以 PBS 液代替一抗,免疫组织化学染色阳性物质位于细胞质中,取 8 个高倍视野观察标本中 PIVKA-II 阳性细胞率,标本中 PIVKA-II 阳性细胞率≥15%为 PIVKA-II 阳性病例,PIVKA-II 阳性细胞率<15%为 PIVKA-II 阴性病例;采用电化学发光免疫分析法测定标本中 PIVKA-II 水平:将肝癌组织和癌旁组织标本洗涤后匀浆,离心机中离心取上清液,按照电化学发光免疫分析法试剂盒说明进行 PIVKA-II 水平测定。

1.2.2 HepG-2 肝癌细胞培养 将 HepG-2 肝癌细胞接种到 RPMI-1640 培养基中培养,取对数生长细胞进行后续实验。

1.2.3 ELISA 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞 PIVKA-II 表达的影响 取对数生长的 HepG-2 细胞接种到 6 孔板中,加入浓度为 20 μM 的 VitK₂,并设立空白对照组,培养 48 h 后取细胞上清液,采用 ELISA 法测定上清液中 PIVKA-II 水平。

1.2.4 MTT 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞生长的影响 取对数生长的 HepG-2 细胞接种到 96 孔板中,培养 24 h 后加入浓度为 20 μM 的 VitK₂,设立 7 个复孔,并设置空白对照组,培养 24 h 后加入 MTT 过夜培

养,酶标仪上测定波长 570 nm 的吸光值,计算 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞生长的抑制率,抑制率=(对照组吸光值 - VitK₂ 组吸光值)/对照组吸光值×100%。

1.2.5 Transwell 法测定 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞侵袭能力的影响 将对数生长的 HepG-2 细胞加入浓度为 20 μM 的 VitK₂ 培养 24 h 后加入到 Transwell 上室中,下室中加入 RPMI-1640 培养基,设为 VitK₂ 组,对照组为未加 VitK₂ 的 HepG-2 细胞,培养 24 h 后将侵入微孔膜下层的细胞进行 hematoxylin 染色,显微镜下观察穿过微孔的细胞数。计算 HepG-2 肝癌细胞侵袭抑制率。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析,计量资料比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织中 PIVKA-II 的表达情况 肝癌组织中 PIVKA-II 阳性率为 74.0% (74/100),癌旁组织中 PIVKA-II 阳性表达率为 25.0% (25/100),肝癌组织中 PIVKA-II 阳性率高于癌旁组织 ($\chi^2 = 48.025, P < 0.05$);肝癌组织中 PIVKA-II 水平为 (3 786.23 ± 143.24) mAU/g,癌旁组织中 PIVKA-II 水平为 (167.34 ± 21.54) mAU/g,肝癌组织中 PIVKA-II 水平明显高于癌旁组织 ($t = 121.243, P < 0.05$)。

2.2 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞 PIVKA-II 表达的影响 对照组肝癌细胞 PIVKA-II 水平为 (3.43 ± 0.04) ng/(ml · 10⁶ 细胞),VitK₂ 组肝癌细胞 PIVKA-II 水平为 (2.57 ± 0.02) ng/(ml · 10⁶ 细胞),VitK₂ 组肝癌细胞 PIVKA-II 水平明显低于对照组 ($t = 56.770, P < 0.05$)。

2.3 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞生长的影响 VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞共同培养,第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天时 VitK₂ 对 HepG-2 细胞的抑制率分别为 9.2%、16.5%、26.7%、34.8%、41.2%、46.7% (见图 1),随着时间的延长,VitK₂ 对 HepG-2 细胞的抑制作用不断增强。

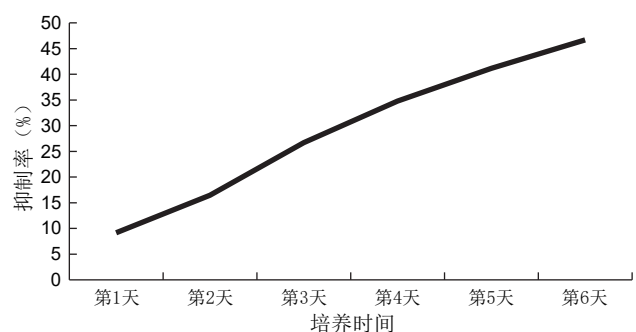
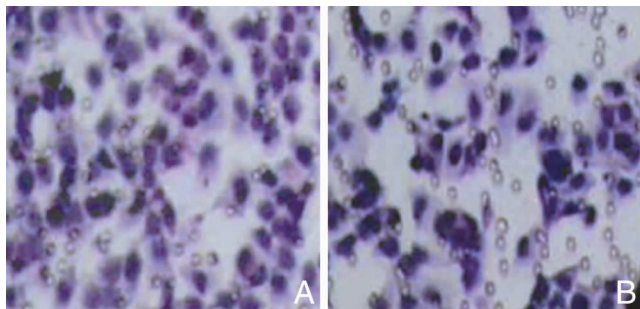


图 1 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞生长的抑制率

2.4 VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞侵袭能力的影响 VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞培养 24 h 后, VitK₂ 对

HepG-2 肝癌细胞侵袭的抑制率为 37.2%, 见图 2。



注:图 2A 为对照组细胞,图 2B 为 VitK₂ 组细胞。

图 2 2 组 HepG-2 肝癌细胞侵袭能力

3 讨论

在依赖 VitK 的 γ 谷氨酰羧化酶的参与下,正常凝血酶原将结构中的多个谷氨酸残基羧化,生成 γ 羧基谷氨酸,成为正常的具有活性的凝血酶原。当 VitK 不足时,谷氨酸区的一个或多个谷氨酸残基不能被羧化为 γ 羧基谷氨酸, γ 羧基谷氨酸羧基能够与钙结合, γ 羧基谷氨酸羧基的缺失使 PIVKA- II 无法与钙结合,从而失去正常凝血酶原功能。大量研究对肝癌患者 PIVKA- II 的研究^[7-9]证实血清 PIVKA- II 可以作为肝癌新的血清标志物。钟志敏等^[10]研究发现血清 PIVKA- II 对原发性肝癌具有比较高的诊断价值;朱宇等^[11]研究发现血清 PIVKA- II 对肝癌的诊断效能较 AFP 的诊断效能好,可作为肝癌筛查的血清标志物。本研究对肝癌组织中 PIVKA- II 表达进行研究,结果发现:肝癌组织中 PIVKA- II 阳性率为 74.0%、PIVKA- II 水平为 $(3\ 786.23 \pm 143.24)$ mAU/g,癌旁组织中 PIVKA- II 阳性表达率为 25.0%、PIVKA- II 水平为 (167.34 ± 21.54) mAU/g,肝癌组织中 PIVKA- II 阳性率和 PIVKA- II 水平均高于癌旁组织,表明 PIVKA- II 也是肝癌的组织病理标志物。

PIVKA- II 的产生机制可能为:肝癌细胞对 VitK 的摄取异常,引起肝癌局部组织 VitK 缺乏,导致 PIVKA- II 的产生;肝癌组织中凝血酶原前体表达增加,导致 PIVKA- II 水平的升高;肝癌组织中 γ -谷氨酰羧化酶活性下降;肝癌细胞中 VitK 利用下降。PIVKA- II 的产生和 VitK 的缺乏和利用障碍有关,VitK 在 γ 谷氨酰羧化酶活性表达中具有重要意义。有研究发现 VitK 药物对肝癌患者的治疗有一定帮助^[12-15]。本文对肝癌细胞和 VitK 共同培养,观察 VitK 对肝癌细胞 PIVKA- II 的影响及对肝癌细胞生长和侵袭能力的影响,结果发现:VitK₂ 组肝癌细胞 PIVKA- II 水平明显低于对照组,VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞共同培养,第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天时 VitK₂ 对 HepG-2 细胞的抑制率分别为 9.2%、16.5%、26.7%、34.8%、41.2%、46.7%,VitK₂ 与 HepG-2 肝癌细胞培养 24 h

后,VitK₂ 对 HepG-2 肝癌细胞侵袭的抑制率为 37.2%,表明 VitK₂ 能够降低肝癌细胞中 PIVKA- II 水平,抑制肝癌细胞生长和侵袭能力。由此可见 VitK₂ 对肝癌的抑制作用可能和 VitK₂ 能够降低肝癌细胞中 PIVKA- II 水平有关,其机制可能为 VitK₂ 调节 γ 谷氨酰羧化酶活性;VitK₂ 促进正常凝血酶原的生成,降低 PIVKA- II 生成;VitK₂ 减少 PIVKA- II 与肝细胞表面受体结合,从而抑制肝癌细胞的生长和侵袭能力。

参考文献

- [1] Seo SI, Kim HS, Kim WJ, et al. Diagnostic value of PIVKA- II and alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(13): 3928-3935.
- [2] 王文欢,曹建彪. 脱- γ 羧基凝血酶原与原发性肝细胞癌的研究进展[J]. 北京医学, 2015, 37(1): 44-46.
- [3] Poté N, Cauchy F, Albuquerque M, et al. Performance of PIVKA- II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion [J]. J Hepatol, 2015, 62(4): 848-854.
- [4] Tanaka T, Taniguchi T, Sannomiya K, et al. Novel des- γ -carboxy prothrombin in serum for the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(8): 1348-1355.
- [5] Choi JY, Jung SW, Kim HY, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA- II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(3): 339-346.
- [6] 濮珏彪,王学锋,彭奕冰,等. 血清异常凝血酶原检测在原发性肝癌临床诊断中的应用[J]. 检验医学, 2014, 29(3): 270-273.
- [7] Song P, Feng X, Inagaki Y, et al. Clinical utility of simultaneous measurement of alpha-fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma in China: A multi-center case-controlled study of 1,153 subjects [J]. Biosci Trends, 2014, 8(5): 266-273.
- [8] Kim JM, Kwon CH, Joh JW, et al. PIVKA- II is a useful marker in patients with modified UICC T3 stage hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(126): 1456-1462.
- [9] Hadziyannis E, Sialevis K, Georgiou A, et al. Analysis of serum α -fetoprotein-L3% and des- γ carboxyprothrombin markers in cases with misleading hepatocellular carcinoma total α -fetoprotein levels [J]. Oncol Rep, 2013, 29(2): 835-839.
- [10] 钟志敏,王维,莫云丹,等. 脱- γ 羧基凝血酶原对原发性肝癌的诊断价值探讨[J]. 检验医学, 2013, 28(5): 382-386.
- [11] 朱宇,王海,王宏洁,等. 血清 PIVKA- II 在肝癌诊断中的应用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(7): 513-516.
- [12] 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.
- [13] Ha TY, Hwang S, Hong HN, et al. Synergistic effect of sorafenib and vitamin K on suppression of hepatocellular carcinoma cell migration and metastasis [J]. Anticancer Res, 2015, 35(4): 1985-1995.
- [14] Zhang YS, Chu JH, Cui SX, et al. Des- γ -carboxy prothrombin (DCP) as a potential autologous growth factor for the development of hepatocellular carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(3): 903-915.
- [15] Song P, Gao J, Inagaki Y, et al. Biomarkers: evaluation of screening for and early diagnosis of hepatocellular carcinoma in Japan and china [J]. Liver Cancer, 2013, 2(1): 31-39.

(本文编辑:赵瑞)

收稿日期:2016-12-02