

本文引文格式:牛荣婷,黄丽艳,梁秋菊,等. AFP、AFB1对HepG2和Bel-7404细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(1): 28-32.

【论著与临床报道】

AFP、AFB1对HepG2和Bel-7404细胞增殖、迁移及侵袭的影响

牛荣婷^{1,2}, 黄丽艳^{1,2}, 梁秋菊^{1,2}, 龙喜带^{1,2}

- (1. 右江民族医学院附属医院临床病理诊断与研究中心, 广西 百色 533000;
2. 广西卫健委肝胆疾病分子病理学重点实验室, 广西 百色 533000)

摘要:目的 该实验旨在研究AFP和AFB1对人源性肝癌细胞HepG2和Bel-7404细胞增殖、迁移及侵袭的影响。方法 选取未做任何处理的HepG2和Bel-7404细胞作为空白对照组(NC组),以AFP药物处理组即为AFP组,以AFB1药物处理组即为AFB1组,以联合用药组为AFP+AFB1组。采用CCK8试剂盒检测各组细胞增殖能力的变化,划痕实验检测各组细胞迁移能力的改变,Transwell实验检测各组细胞侵袭能力的变化。结果 与空白组比较,自第4天开始,在HepG2细胞的增殖、迁移及侵袭实验中均表现为NC组<AFP组<AFB1组<AFP+AFB1组($P < 0.05$);而侵袭实验12h后表现为NC组<AFP组<AFB1组<AFP+AFB1组($P < 0.05$);与空白组比较,第4天开始,在Bel-7404细胞的增殖、迁移及侵袭实验中均表现为NC组<AFB1组<AFP组<AFP+AFB1组($P < 0.05$)。而侵袭实验12h后表现为NC组<AFB1组<AFP组<AFP+AFB1组($P < 0.05$)。结论 AFP和AFB1单独或联合作用对HepG2和Bel-7404细胞增殖、迁移及侵袭均具有促进作用,且二者具有协同作用,联合作用更明显。

关键词:甲胎蛋白类;黄曲霉毒素B1;肝肿瘤

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)01-0028-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.005

Effects of AFP and AFB1 on the proliferation, migration and invasion of HepG2 and Bel-7404 cells

Niu Rongting^{1,2}, Huang Liyan^{1,2}, Liang Qiuju^{1,2}, Long Xidai^{1,2}

- (1. Center for Clinical and Pathological Diagnosis and Research, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Key Laboratory of Molecular Pathology of Hepatobiliary Diseases, Guangxi Health Care Commission, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of AFP and AFB1 on the proliferation, migration and invasion of human-derived hepatocellular carcinoma cells HepG2 and Bel-7404. **Methods** HepG2 and Bel-7404 cells without any treatment were selected as blank control group (NC group); those treated with AFP drug as AFP group; those treated with AFB1 as AFB1 group; and those with combined drugs as AFP+AFB1 group. CCK8 kit was used to detect the changes of cell proliferation capacity of each group; scratch assay was used to detect the changes of cell migration capacity of each group; Transwell assay was employed to detect the changes of cell invasion capacity of each group. **Results** In comparison with the blank group, the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells were shown as NC group<AFP group<AFB1 group<AFP+AFB1 group ($P < 0.05$) since the fourth day, while after 12 h of invasion experiment, the results showed that NC group<AFP group<AFB1 group<AFP+AFB1 group ($P < 0.05$). In comparison with the blank group, the proliferation, migration and invasion of Bel-7404 cells in assays were shown as NC group<AFB1 group<AFP group<AFP+AFB1 group ($P < 0.05$) since the fourth day, while after 12 h of invasion experiment, the results

基金项目:国家自然科学基金项目(81860489);广西科技计划项目(桂科AD19245174);广西医学高层次人才学科带头人培养计划[桂卫科教发(2020)15号];百色市人才小高地[百人才办(2020)3号]

第一作者简介:牛荣婷(1993-),女,在读硕士研究生,研究方向:肝癌的基础与临床综合研究,E-mail:2480985034@qq.com

通讯作者简介:龙喜带(1973-),男,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:肝癌的基础与临床综合研究,E-mail:sjtulongxd@263.net

showed that NC group < AFB1 group < AFP group < AFP + AFB1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** AFP and AFB1 alone or in combination can promote the proliferation, migration and invasion of HepG2 and Bel-7404 cells, and the two have a synergistic effect and the combined effect is more obvious.

Key words: alpha-fetoprotein; aflatoxin B1; liver tumor

肝癌是全球第六大常见癌症,也是目前全世界第三大癌症死亡原因^[1]。肝癌具有发病隐匿、预后差、病死率高的特点。我国肝癌发病和死亡人数约占全球一半,肝癌位居我国恶性肿瘤致死率第 2~3 位,5 年生存率仅为 14.1%^[2]。目前,手术、放疗、化疗和移植是肝癌治疗的主要策略。接受移植的肝癌患者 5 年生存率约 80%,而接受切除手术的肝癌患者 5 年生存率仅约为 50%^[3]。因此,筛选肝癌有效的诊断标志物和治疗靶点至关重要。

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是肝癌的一种分泌蛋白,也是目前临床应用最广泛的肝癌辅助诊断血清标志物。近年来研究发现,AFP 不仅是诊断肝癌的肿瘤生物标志物,而且在调节细胞增殖、凋亡、自噬和抑制细胞的免疫反应方面起着非常复杂的作用^[4-5]。黄曲霉毒素暴露是全球原发性肝癌发生的重要危险因素,其中黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1, AFB1)是毒性最强的黄曲霉毒素之一,具有致癌性^[6]。目前研究表明 AFP 与 AFB1 均可导致肝癌的发生及发展,但这两种危险因素在肝癌的发生发展中是否具有协同作用尚不清楚。因此,本实验旨在探究 AFP 及 AFB1 对人源性肝癌细胞的增殖、迁移及侵袭的影响,进一步研究二者在肝癌的发生发展中是否具有协同作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株 人肝癌细胞 HepG2、Bel-7404 均来自右江民族医学院生命科学研究院细胞库。

1.2 药物与试剂 AFP[货号:D111404,厂家:生工生物工程(上海)股份有限公司], AFB1 粉剂[5 毫克/瓶,货号:A606874,厂家:生工生物工程(上海)股份有限公司], DMEM 高糖培养基、PBS 无菌磷酸盐缓冲液、FBS 胎牛血清(上海雅酶生物科技有限公司), 12 孔板、24 孔板、96 孔板、35 mm 培养皿[康宁(上海)有限公司生命科学部], CCK-8 试剂盒(产品编号:40203ES60*, 厂家:上海翊圣生物技术有限公司), Transwell 小室[康宁(上海)有限公司生命科学部], Matrigel 基质胶(产品编号:356234, 厂家:碧迪医疗), 4%多聚甲醛固定液(产品编号:P0099, 厂家:碧云天生物技术有限公司), 结晶紫染色液(产品编号:C0121, 厂家:碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器 CO₂ 细胞培养箱(型号:MCO-18AIC; 厂家:三洋), 倒置荧光显微镜(型号:IX53+DP73; 厂家:奥林巴斯), 小型台式离心机(型号:SORVALL Legend Micro17; 厂家:ThermoFisher), 恒温水浴锅(型号:DK-8AXX; 厂家:一恒), 多功能酶标仪(型号:SpectraMax i3x; 厂家:Molecular Devices)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养及分组 人源性肝癌细胞(HepG2、Bel-7404)培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,并放置于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中孵育。待显微镜下两种细胞密度达 80%~90%时进行传代培养,并取对数生长期细胞进行研究。以未做 AFP 和 AFB1 处理的 HepG2 和 Bel-7404 细胞均作为空白对照组即为 NC 组,以 AFP 药物处理 HepG2 和 Bel-7404 细胞组即为 AFP 组,以 AFB1 药物处理 HepG2 和 Bel-7404 细胞组即为 AFB1 组,以 AFP+AFB1 联合用药处理 HepG2 和 Bel-7404 细胞组即为 AFP+AFB1 组。

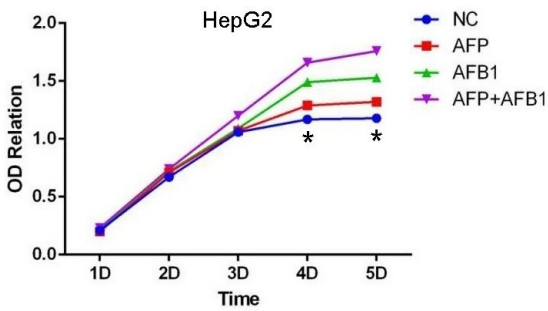
1.4.2 CCK-8 法检测细胞增殖 将处于对数生长期的 HepG2 和 Bel-7404 细胞以 1×10^5 个/孔接种于无菌 12 孔板,放置于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱培养过夜让其贴壁,第 2 天对贴壁细胞进行药物(AFP、AFB1)处理,每隔 24 h 进行 OD 值检测时弃去旧的培养基,然后每孔加入 500 μ L 检测试剂(完全培养基:CCK-8=9:1),37 °C 恒温细胞培养箱中培养 2 h 后用排枪将 12 孔板中各组的培养基转移至 96 孔板,每孔 100 μ L 体积,每组细胞做 3 个复孔,用酶标仪测定每孔在 450 nm 波长处的吸光度(A)值,根据 A 值判定药物对细胞增殖的影响,并计算细胞增殖活力。细胞增殖活力=[A(加药)-A(空白)]/[A(0 加药)-A(空白)] \times 100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.4.3 划痕实验检测细胞的迁移能力 将处于对数生长期的 HepG2 和 Bel-7404 细胞以 2×10^6 个/孔接种于无菌 6 孔板,放置于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱培养过夜让其贴壁,待细胞密度达 80%~90%时用 10 μ L 移液枪头垂直与 6 孔板底面由上至下画 3 直线,画线结束后用 PBS 轻柔清洗 6 孔板内细胞 2~3 次,以保证被刮下来的悬浮细胞被完全清洗掉,然后每孔加入 2 mL 2.5%含胎牛血清的完全培养基,实验组再进行药物(AFP、AFB1)处理,每隔 24 h 镜下观察各组同一位置的细胞向划痕线中心迁移的情况并拍照记录。使用 Image J 软件计算划痕面积。

1.4.4 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 用 DMEM 高糖培养液将 Matrigel 基质胶稀释(1:8)后用预冷的枪头均匀地滴加在 Transwell 小室上室膜上,每个小室加 Matrigel 基质胶 45 μ L,并放置培养箱至少孵育 1 h 或过夜孵育。取处于对数生长期的 HepG2、Bel-7404 细胞调整细胞浓度为 1×10^4 个/毫升。Transwell 小室上室部都加入不含血清的细胞悬液 200 μ L,下室部每孔加入含 20%胎牛血清的

DMEM 培养基 600 μ L 及 AFP、AFB1, 并放置在培养箱中孵育 12 h 后用 1 次性棉签轻柔地拭去上室未侵袭的细胞。用 4% 多聚甲醛固定液固定膜下的细胞 20 ~ 30 min, 用 PBS 漂洗 2 次, 再用 1% 结晶紫染液按比例稀释后染色 20 min, 并用流动水冲洗小室中残留的结晶紫染液。结束后用 1 次性棉签轻柔地擦除残留的结晶紫染液, 并放置于阴凉处晾干。最后用荧光倒置显微镜将穿透细胞在 3 个随机选取的区域进行拍照记录并使用 ImageJ 软件计数。

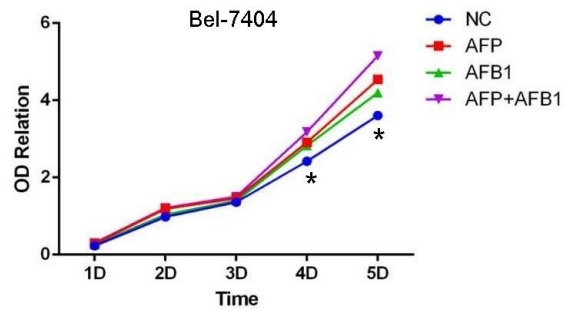
1.5 统计学方法 应用 SPSS 24.0 软件对结果进行统计学分析, 检测数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。



注: * 代表与其它组比较 $P < 0.05$ 。

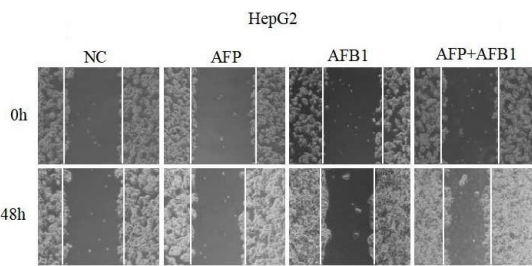
图 1 增殖实验检测 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖的影响

2 结果
2.1 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖的影响 与空白组比较, AFP 和 AFB1 单独或联合用药对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖能力均有促进作用, 但第 1 天至第 3 天差异无统计学意义。第 4 天开始对 HepG2 细胞增殖能力的促进作用 AFB1 强于 AFP ($P < 0.05$), 对 Bel-7404 细胞增殖能力的促进作用 AFP 强于 AFB1 ($P < 0.05$), AFP 和 AFB1 联合用药组对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖能力的促进作用更明显 ($P < 0.05$), 且差异均具有统计学意义。见图 1。



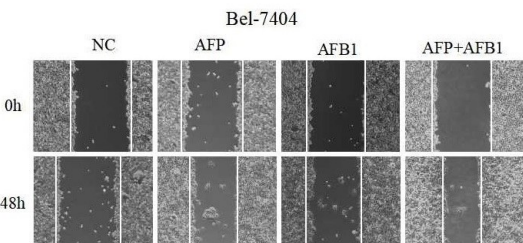
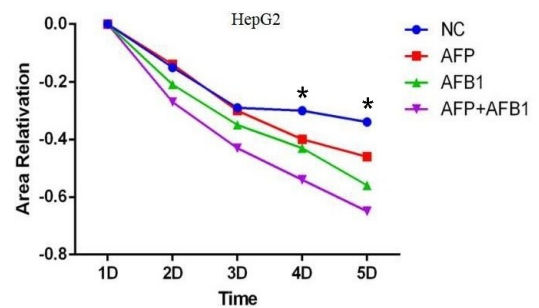
2.2 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 和 Bel-7404 细胞迁移的影响 与空白组比较, AFP 和 AFB1 单独或联合用药对 HepG2 和 Bel-7404 细胞迁移能力均有促进作用, 划痕面积愈合均增强, 但第 1 天至第 3 天差异无统计学意义。第 4 天开始对 HepG2 细胞迁移能

力促进作用 AFB1 强于 AFP ($P < 0.05$), 对 Bel-7404 细胞迁移能力促进作用 AFP 强于 AFB1 ($P < 0.05$), AFP 和 AFB1 联合用药组对 HepG2 和 Bel-7404 细胞迁移能力促进作用更明显, 划痕面积愈合更明显 ($P < 0.05$), 差异均具有统计学意义。见图 2 和图 3。



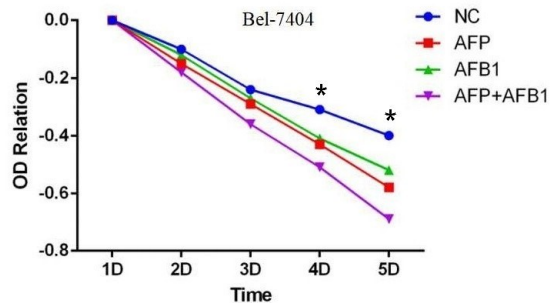
注: * 代表与其它组比较 $P < 0.05$ 。

图 2 划痕实验检测 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 细胞迁移能力的影响



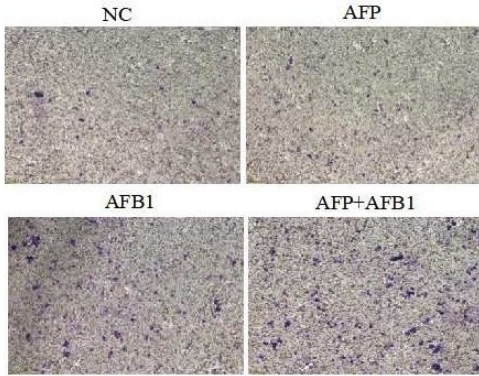
注: * 代表与其它组比较 $P < 0.05$ 。

图 3 划痕实验检测 AFP 和 AFB1 单独或联合对 Bel-7404 细胞迁移能力的影响



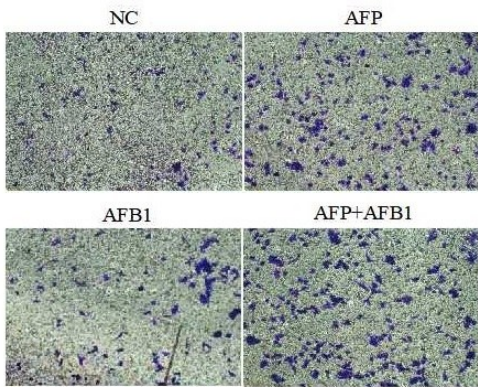
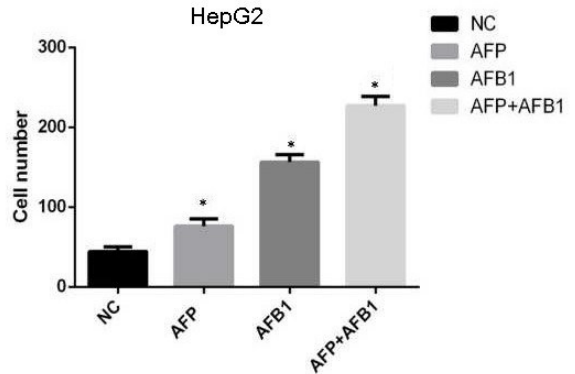
2.3 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 和 Bel-7404 细胞侵袭的影响 与空白组比较, AFP 和 AFB1 单独用药对 HepG2 和 Bel-7404 细胞穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量增加, 但 AFB1 对 HepG2 细胞穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量较 AFP 多 ($P < 0.05$), 差异具

有统计学意义; AFP 对 Bel-7404 细胞穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量较 AFB1 多, AFP 和 AFB1 联合用药对 HepG2 和 Bel-7404 细胞穿过 Matrigel 基质胶的细胞数量明显增多 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。见图 4 和图 5。



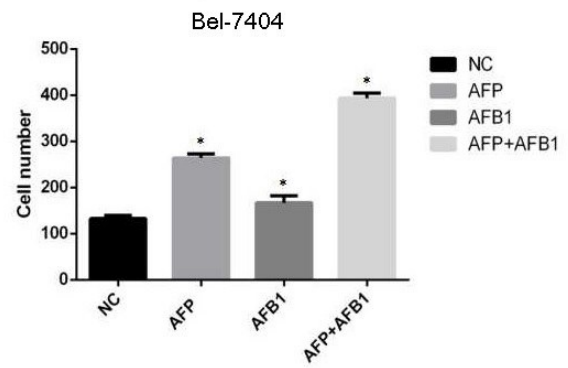
注: * 代表与其它组比较 $P < 0.05$ 。

图 4 侵袭实验检测 AFP 和 AFB1 单独或联合对 HepG2 细胞迁移能力的影响



注: * 代表与其它组比较 $P < 0.05$ 。

图 5 侵袭实验检测 AFP 和 AFB1 单独或联合对 Bel-7404 细胞迁移能力的影响



3 讨论

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 其相关的高死亡率是由于其具有易迁移、侵袭性强的特点。在过去的 20 年中, AFP 被认为是肝癌的诊断和预后的肿瘤标志物, 高达 70% 的肝癌患者显示血清中的 AFP 水平升高。近年来研究表明 AFP 不仅能促进肝癌细胞增殖, 还抑制肿瘤细胞凋亡和逃避机体的免疫监视, 在肝癌发生发展进程中发挥重要作用^[7]。YANG Y 等^[8]研究发现, AFP 在肝细胞恶性转化的早期阶段, 抑制了免疫细胞对将成为恶性的肝细胞的攻击, 使这些肝细胞在体内存活, 成为癌细胞后分泌更多的 AFP, 抑制细胞免疫和体液免疫, 且在转移过程中逃避免疫监视, 促进疾病的发生和发展。AFP 可以激活 PI3K/ AKT 信号通路, 从而刺激增殖相关的致癌基因的表达, 促进转移相关基因 MMP2/9、CK19、EpCAM 和 CXCR4 的表达, 在癌细胞增殖、侵袭和远处转移中起关键作用^[9-10]。本实验选用的 HepG2 和 Bel-7404

人肝源性癌细胞具有与原代肝癌细胞相似的生物学特性, 特性稳定, 无限制传代, 且具有易于获得、操作简单、条件可控和可重复等优点, 是肝癌研究理想的体外模型, 是除动物实验外肝癌疾病研究的常用替代物。本研究通过细胞增殖实验观察到 AFP 能增加 HepG2 和 Bel-7404 细胞细胞的增殖。通过细胞划痕实验发现, AFP 可使 HepG2 和 Bel-7404 细胞的迁移能力增强。经 Transwell 实验证实, AFP 也可使 HepG2 和 Bel-7404 细胞的侵袭能力得到增强。这些发现表明, AFP 可能作为一种新的治疗靶点, 用于对抗肝癌的增殖、侵袭和转移。

在中国, 广西西南部为黄曲霉毒素高污染区, 加上乙型肝炎病毒的高感染, 造成地区性肝癌异常高发^[11]。黄曲霉毒素主要由黄曲霉和寄生曲霉产生, 其中 AFB1 是致癌性最强的黄曲霉毒素, 被世界卫生组织和国际癌症研究机构确定为最有力的天然 1A 类致癌物之一^[12]。经证实 AFB1 是一种重要的肝癌致病

原^[13],全球 4.6%~28.2%的肝癌病例归因于接触 AFB1^[14]。一方面,AFB1 可以通过靶向 ROS、COX2、Nrf2 和其他信号通路诱导氧化应激、炎症和线粒体功能障碍,从而诱发肝损伤甚至肝癌^[15-17]。另一方面,AFB1 在肝脏中代谢,释放出中间代谢物 AFB1-exo-8,9 epoxide(AFBO)诱导 p53 基因突变,增加肝癌的发生风险^[18-19]。p53 基因是一种肿瘤抑制因子,突变后通过抑制细胞凋亡和增加增殖率促进肿瘤的发展^[20-21]。本研究结果表明,AFB1 对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖、迁移及侵袭能力也具有促进作用。

肿瘤的发展除了表现为增殖能力的增强,还有最重要的生物学特征是具有侵袭和转移的能力,这是造成恶性肿瘤患者预后不良和死亡的主要原因。本研究证实 AFP 和 AFB1 均对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖、迁移及侵袭均具有促进作用。进一步研究发现,AFP 和 AFB1 二者合用对 HepG2 和 Bel-7404 细胞增殖、迁移及侵袭能力促进作用更明显,表明二者在肝癌的发生发展中具有协同作用,但这种协同作用的机制仍然不清楚,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [2] 潘锋. 我国肝癌主要病因预防取得长足进展——访国家癌症中心/中国医学科学院肿瘤医院曲春枫教授[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(17):1-4.
- [3] GENTILE D, DONADON M, LLEO A, et al. Surgical treatment of hepatocholangiocarcinoma: a systematic review[J]. *Liver Cancer*, 2020, 9(1):15-27.
- [4] XU Y, GUO Q L, WEI L B. The emerging influences of alpha-fetoprotein in the tumorigenesis and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(20):5096.
- [5] ZHENG Y F, ZHU M Y, LI M S. Effects of alpha-fetoprotein on the occurrence and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(10):2439-2446.
- [6] FERREIRA R G, CARDOSO M V, DE SOUZA F K M, et al. Epigenetic alterations caused by aflatoxin b1: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma [J]. *Transl Res*, 2019, 204:51-71.
- [7] WANG X P, WANG Q X. Alpha-fetoprotein and hepatocellular carcinoma immunity [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018:9049252.
- [8] YANG Y, YE Y C, CHEN Y, et al. Crosstalk between hepatic tumor cells and macrophages via Wnt/ β -catenin signaling promotes M2-like macrophage polarization and reinforces tumor malignant behaviors [J]. *Cell Death Dis*,

2018, 9(8):793.

- [9] LU Y, ZHU M Y, LI W, et al. Alpha fetoprotein plays a critical role in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3):549-558.
- [10] WANG H Y, XU L T, ZHU X Y, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates sorafenib-induced invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(4):1465-1472.
- [11] 陈可和, 陈甲信. 广西肝癌高发区黄曲霉毒素 B1 与乙型肝炎病毒的协同致癌机制的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2016, 9(8):759-762.
- [12] RAYSAN A, EREMIN S A, BELOGLAZOVA N V, et al. Immunochemical approaches for detection of aflatoxin B1 in herbal medicines [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(5):662-669.
- [13] KUCUKCAKAN B, HAYRULAI-MUSLIU Z. Challenging role of dietary aflatoxin b1 exposure and hepatitis b infection on risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2015, 3(2):363-369.
- [14] YU J J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination [J]. *Toxins (Basel)*, 2012, 4(11):1024-1057.
- [15] SINGH K B, MAURYA B K, TRIGUN S K. Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepatocarcinogenesis in rat [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 401(1-2):185-196.
- [16] ZHANG L Y, ZHAN D L, CHEN Y Y, et al. Aflatoxin B1 enhances pyroptosis of hepatocytes and activation of Kupffer cells to promote liver inflammatory injury via dephosphorylation of cyclooxygenase-2: an in vitro, ex vivo and in vivo study [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(11):3305-3320.
- [17] LIU Y, WANG W J. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes [J]. *Anim Sci J*, 2016, 87(12):1490-1500.
- [18] MA Y L, KONG Q B, HUA H, et al. Aflatoxin B1 up-regulates insulin receptor substrate 2 and stimulates hepatoma cell migration [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47961.
- [19] WANG X H, HE Y, TIAN J L, et al. Ferulic acid prevents aflatoxin B1-induced liver injury in rats via inhibiting cytochrome P450 enzyme, activating Nrf2/GST pathway and regulating mitochondrial pathway [J]. *Eco-toxicol Environ Saf*, 2021, 224:112624.
- [20] 王娟, 黄炳臣, 卢运龙, 等. POLD3、p53 在肝癌中的表达及临床意义分析 [J]. *右江民族医学院学报*, 2017, 39(6):436-439.
- [21] PAN M W, BLATTNER C. Regulation of p53 by E3s [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4):745.

收稿日期:2022-10-26;修回日期:2022-11-13