

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.007

· 基础研究 ·

KIF2C 对肝细胞癌细胞恶性生物学行为和人脐静脉内皮细胞血管生成的影响

安海英, 涂建成(武汉大学中南医院 检验科, 湖北 武汉 430071)

[摘要] **目的:** 探究驱动蛋白-13 家族 2C(KIF2C)对肝细胞癌(HCC)细胞增殖、侵袭和迁移以及人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血管生成的影响,为HCC治疗提供潜在靶点。**方法:** 用数据库数据分析 KIF2C mRNA 和蛋白在 HCC 组织中的表达及其与血管生成相关因子(VEGFR2 和 HIF-1 α)表达的相关性,常规培养人正常肝细胞 QSG-7701、HUVEC 和 HCC 细胞 Huh-7、Hep3B2.1-7,用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 sh-NC 和 sh-KIF2C 转染至 Huh-7、Hep3B2.1-7 细胞, qPCR 检测各组 QSG-7701、Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C mRNA 的表达, WB 法检测各组细胞中 KIF2C 蛋白的表达,细胞克隆形成实验检测敲低 KIF2C 对 Hep3B2.1-7 和 Huh-7 细胞克隆形成的影响,小管生成实验检测敲低 KIF2C 表达的 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的条件培养液对 HUVEC 血管生成能力的影响。**结果:** 数据库分析结果显示, KIF2C mRNA 和蛋白在 HCC 组织中均呈高表达(均 $P < 0.01$),用 qPCR 和 WB 法检测人 HCC 中 KIF2C mRNA 和蛋白的表达水平,结果显示其 mRNA 和蛋白在各 HCC 细胞中也呈高表达(均 $P < 0.01$),与数据库数据分析结果相符。数据库数据分析还显示, KIF2C 与 HCC 组织中 VEGFR2、HIF-1 α 的表达水平呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。成功构建了稳定低表达 KIF2C 的 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞(均 $P < 0.01$),敲低 KIF2C 表达均可明显抑制 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的增殖能力(均 $P < 0.01$)、侵袭和迁移能力(均 $P < 0.01$),敲低 KIF2C 表达的 HCC 细胞条件培养液均可显著抑制体外 HUVEC 的血管生成能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** KIF2C 可促进 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞增殖、侵袭和迁移以及 HUVEC 血管生成的能力,提示 KIF2C 可能是治疗 HCC 的潜在靶点。

[关键词] 驱动蛋白-13 家族 2C; 肝细胞癌; Huh-7 细胞; Hep3B2.1-7 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 人脐静脉内皮细胞; 血管生成

[中图分类号] R730.2; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0477-07

Effect of KIF2C on the malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma cells and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

AN Haiying, TU Jiancheng (Medical Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital Affiliated to Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of kinesin-13 family member 2C (KIF2C) on hepatocellular carcinoma (HCC) cell proliferation, invasion and migration as well as human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) angiogenesis to provide potential targets for HCC treatment. **Methods:** Database data were used to analyze the expression of KIF2C mRNA and protein in HCC tissues and its correlation with the expression of angiogenesis-associated factors (VEGFR2 and HIF-1 α). Human normal hepatocytes QSG-7701, HUVEC, and HCC cells Huh-7 and Hep3B2.1-7 were routinely cultured, and sh-NC and sh KIF2C were transfected into Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells with Lipofectamine 3000 transfection reagent. qPCR was performed to detect the expression of KIF2C mRNA in QSG-7701, Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells of each group, and WB was performed to detect the expression of KIF2C protein in cells of each group, and the effect of KIF2C knockdown on the clone formation of Huh3B2.1-7 and Huh-7 cells was examined in the clonogenic assay. Tubulogenesis assay to detect the effect of conditioned cultures of knockdown KIF2C-expressing Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells on the angiogenic capacity of HUVEC cells. **Results:** Database analysis showed that KIF2C mRNA and protein were highly expressed in HCC tissues (both $P < 0.01$). In addition, database analysis suggested that KIF2C mRNA may also be highly expressed in HCC cells, and the results of KIF2C mRNA and protein expression detected by qPCR and WB showed that its mRNA and protein were highly expressed in HCC cells (both $P < 0.01$), consistent with the database data analysis. Database data analysis also showed that KIF2C was positively correlated with the expression levels of VEGFR2 and HIF-1 α in HCC tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Stable low KIF2C-expressing Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells were successfully constructed (both $P < 0.01$), and knockdown of KIF2C expression significantly inhibited the proliferative (all $P < 0.01$), invasive and migratory (all $P < 0.01$) capacities

[基金项目] 武汉大学中南医院科技创新培育基金(WJ2019H034/ZNPY2018067)

[作者简介] 安海英(1998—),女,硕士生,主要从事肝癌发生发展的分子机制及早期诊断标志物的研究。E-mail: An2021@whu.edu.cn

[通信作者] 涂建成, E-mail: jianchengtu@whu.edu.cn

of Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells, and the conditioned culture medium of HCC cells with knockdown of KIF2C expression could significantly inhibit the angiogenic capacity of HUVEC cells *in vitro* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** KIF2C promotes the ability of Huh-7 and Hep3B2.1-7 cells to proliferate, invade and migrate as well as HUVEC angiogenesis, suggesting that KIF2C may be a potential target for the treatment of HCC.

[Key words] kinesin-13 family member 2C (KIF2C); hepatocellular carcinoma (HCC); Huh-7 cell; Hep3B2.1-7 cell; proliferation; migration; invasion; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); angiogenesis

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 477-483. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.007]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是高发病率和致死率的恶性肿瘤之一,对人类健康构成巨大威胁^[1]。其恶性程度高,治疗仍是中国医疗卫生领域急需解决的难题之一^[2]。研究^[3]发现,血管生成与HCC发生发展和预后密切相关,为HCC提供了一种有前景的新疗法,可能有助于改善HCC治疗困境。因此,寻找有价值的抗血管生成治疗靶点以改善患者预后是临床HCC治疗的重要目标之一。驱动蛋白-13家族是一组高度保守的分子马达蛋白,其家族成员在多种肿瘤中表达上调^[4-5],并可促进肿瘤血管生成^[6],被认为是近年来新兴的血管生成研究热点。驱动蛋白-13家族2C(kinesin-13 family member 2C, KIF2C)是驱动蛋白-13家族成员之一,其在HCC中差异表达最显著^[7]。目前,KIF2C在调节HCC血管生成中的功能尚未被研究。因此,本研究通过一系列实验探究KIF2C在HCC血管生成中的作用,以期HCC抗血管生成靶向治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 组织标本、细胞和主要试剂

人正常肝细胞 QSG-7701 购自巨洲生物科技有限公司, HCC 细胞 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自巨洲生物科技有限公司, RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、PBS、青霉素-链霉素溶液均购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清(FBS)购自以色列 Bioind 公司, 靶向 KIF2C 的短发夹核糖核酸(sh-KIF2C)和阴性对照(sh-NC)购自武汉擎科生物科技有限公司, 兔抗 KIF2C 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔或小鼠二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司, Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, CCK-8 试剂盒购自 Biosharp 公司。

1.2 用数据库数据分析 KIF2C mRNA 和蛋白在 HCC 组织中的表达及其与 VEGFR2 和 HIF1A 表达的相关性

2022 年 10 月从 UCSC Xena 数据库(<http://xena.ucsc.edu/>)下载癌症基因组图谱计划(The Cancer Genome Atlas, TCGA)中的 RNA 测序数据, 共下载了

369 个可用的 HCC 组织和 50 个癌旁组织的 mRNA 表达谱, 分析 KIF2C mRNA 的表达, 用临床蛋白质组学肿瘤分析联盟(Clinical Proteomics Tumor Analysis Consortium, CPTAC)数据库(<https://proteomics.cancer.gov/programs/cptac>)数据分析 KIF2C 蛋白在 HCC 组织中表达。为研究 KIF2C 与 HCC 中血管生成因子之间的相互作用, 通过 TCGA-LIHC 和基因型-组织表达数据库分析 KIF2C 与 VEGFR2(KDR)和 HIF-1 α (HIF1A)之间的基因表达相关性。中分析 KIF2C 与 VEGFR2(KDR)和 HIF-1 α (HIF1A)之间的基因表达相关性。

1.3 细胞培养与转染

QSG-7701 细胞用含 10% FBS、1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, Huh-7、Hep3B2.1-7 细胞用含 10% FBS、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基培养, 所有细胞均置于 37 °C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 每 2 d 更换一次培养基或进行传代培养。采用转染试剂 Lipofectamine 3000 将 sh-KIF2C 和 sh-NC 转染到 Hep3B2.1-7、Huh-7 细胞中, 转染成功后用 1 μ g/mL 的嘌呤霉素筛选, 最后获得稳定敲减 KIF2C 的 Hep3B2.1-7 和 Huh-7 细胞和相应的阴性对照细胞。

1.4 qPCR 检测各组 QSG-7701、Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C mRNA 的表达

收集各组细胞提取其总 RNA, 并按照说明书使用诺唯赞公司的逆转录试剂盒和 SYBR 荧光试剂盒进行 qPCR。PCR 反应参数: 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 65 °C 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的基因的相对表达量, 引物序列如下: KIF2C (F: 5'-CGCGTTTCTCTTCCTTGCTG-3', R: 5'-TCTTGATAGCGAGACCGGGA-3'); GAPDH (F: 5'-TGTGATCATCAATGACCCCTT-3', R: 5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3')。

1.5 WB 法检测各组细胞中 KIF2C 蛋白的表达

收集各组细胞并提取其总蛋白质, 将各组等量蛋白质上样行 SDS-PAGE, 然后将其转移至 PVDF 膜, 随后用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 60 min, 然后用 1:5 000 稀释 KIF2C 和 GAPDH 一抗 4 °C 下处理过夜, 后用与匹配的二抗(均 1:10 000 稀释)在室温下处理 1 h, 最后通过 Tanon 5200 ECL 化学发光成

像系统显示、拍照和半定量分析。

1.6 CCK-8 法检测敲低 KIF2C 对 Hep3B2.1-7 和 Huh-7 细胞增殖活力的影响

将 sh-KIF2C 和 sh-NC 组的 Huh-7 细胞和 Hep3B2.1-7 细胞(4×10^3 个/孔)接种于 96 孔板, 每组设置 4 个复孔。在 1、2、3、4 和 5 d 时, 加入 CCK-8 试剂, 按照 CCK-8 细胞计数试剂盒说明书进行操作, 使用多功能酶标仪测定每个孔在 450 nm 处的光密度(D)值, 以 D 值代表细胞的增殖活力。

1.7 细胞克隆形成实验检测敲低 KIF2C 对 Hep3B2.1-7 和 Huh-7 细胞克隆形成的影响

将 sh-KIF2C 和 sh-NC 组的 Huh-7 细胞和 Hep3B2.1-7 细胞(7×10^2 个/孔)接种于 6 孔板中, 在培养箱中培养 2 周后, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 最后在显微镜下观察并对可见细胞克隆进行计数。

1.8 Transwell 小室实验检测敲低 KIF2C 对 Hep3B2.1-7 和 Huh-7 细胞迁移与侵袭的影响

细胞迁移实验用 sh-KIF2C 和 sh-NC 组的 Huh-7 (2×10^4 个/孔)和 Hep3B2.1-7 细胞(3×10^4 个/孔)接种至 Transwell 板上室中; 在下室加入 600 μ L 20% FBS 的 DMEM 培养液, 随后放置于细胞培养箱中处理适当时间(Huh-7 为 24 h, Hep3B2.1-7 为 36 h)。将迁移入下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 接着用 PBS 缓冲液清洗, 再用棉签将上室中接种侧的未迁移细胞擦除干净, 使用显微镜捕获迁移细胞并计算。在细胞侵袭实验时使用 Transwell 小室的上室预先铺有基质胶, Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞均为 5×10^4 个/孔, 其他条件与上述迁移实验相同。

1.9 血管生成相关实验检测敲低 KIF2C 对体外 HUVEC 血管生成能力的影响

内皮细胞迁移实验先用 sh-KIF2C 和 sh-NC 组 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的条件培养液处理 HUVEC 48 h, 然后将 HUVEC (2×10^4 个/孔)接种于 Transwell 小室上室中, 其余操作同方法 1.8 中 Huh-7 细胞迁移实验。小管形成实验是将 HUVEC 提前饥饿, 随后用每孔 200 μ L Matrigel 基质胶铺于 24 孔板, 放置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱 30 min, 然后取出 24 孔板每孔铺 1×10^5 个 HUVEC 于基质胶上, 每组分别加入 200 μ L sh-KIF2C 和 sh-NC 组的 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的条件培养液, 之后放回细胞培养箱培养 24 h, 最后在显微镜下观察小管形成情况并拍照。

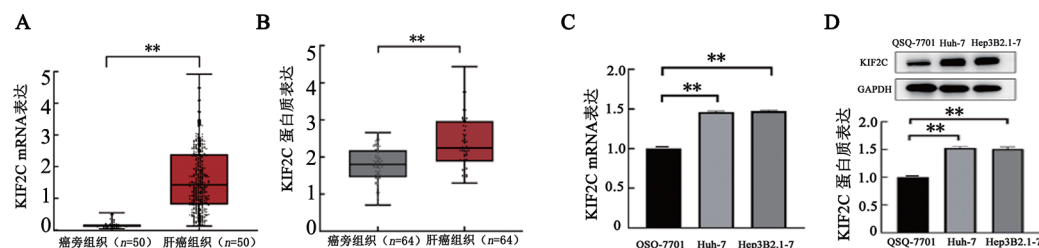
1.10 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。数据均采用 GraphPad Prism9.0 软件统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KIF2C mRNA 和蛋白在 HCC 组织和 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中呈高表达

TCGA 数据分析结果(图 1A)显示, 与癌旁组织比较, KIF2C mRNA 在 HCC 组织中呈高表达($P < 0.01$), CPTAC 数据库数据分析结果(图 1B)显示, 与癌旁组织比较, KIF2C 蛋白在 HCC 组织中也呈高表达($P < 0.01$)。通过 qPCR 和 WB 法验证人正常肝细胞 QSG-7701、Huh-7、Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C 表达水平的差异, 结果(图 1C、D)显示, 与 QSG-7701 细胞相比, 在 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C mRNA 和蛋白表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$), 本实验检测结果与数据库数据分析结果相符。因此, 选择 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞进行后续实验。



A: 基于 TCGA 数据库分析配对癌旁组织组织和肝癌组织中 KIF2C 的 mRNA 表达水平; B: 基于 CPTAC 数据库分析配对癌旁组织和肝癌组织中 KIF2C 的蛋白表达水平; C、D: qPCR 法(C)或 WB 法(D)检测 QSG-7701、Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C mRNA 或蛋白的表达。* $P < 0.01$ 。

图 1 KIF2C 在 HCC 组织和细胞中的表达

2.2 数据库数据分析显示 KIF2C 与 HCC 组织中血管生成因子 VEGFR2、HIF-1 α 的表达水平呈正相关

TCGA-LIHC 和基因型-组织表达数据库分析结果(图 2)显示, 在 HCC 组织中 KIF2C 的表达与 VEGFR2

($R=0.11$, $P<0.05$)及HIF-1 α ($R=0.297$, $P<0.01$)的表达呈显著正相关,由此可见,KIF2C可能具备促进HCC血管生成的能力。

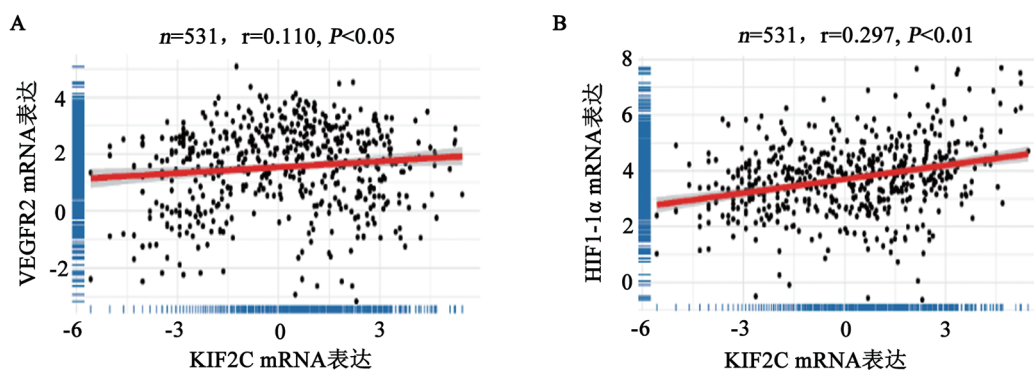
2.3 成功构建了稳定低表达 KIF2C 的 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞

为验证 KIF2C 在 HCC 细胞恶性表型和血管生成中的作用,使用 shRNA (阴性对照 sh-NC 和靶向 KIF2C 的 sh-KIF2C) 转染 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞。qPCR、WB 法检测结果(图3)显示,与 sh-NC 组细胞相比,sh-KIF2C 组 Huh-7、Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C

mRNA 和蛋白表达水平均明显降低(均 $P<0.01$)。实验结果表明,本实验在 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中成功敲低 KIF2C 的表达,可进行后续功能实验。

2.4 敲低 KIF2C 表达可明显抑制 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的增殖能力

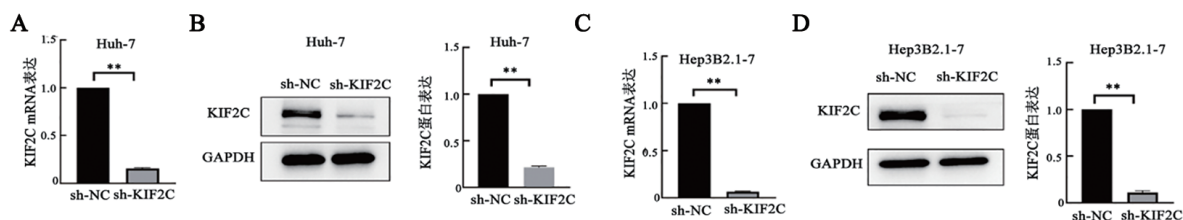
CCK-8 法、细胞平板克隆形成实验检测结果(图4)显示,与 sh-NC 组比较,sh-KIF2C 组 Huh-7、Hep3B2.1-7 细胞的增殖能力均明显降低(均 $P<0.01$)。实验结果表明,敲低 KIF2C 表达可抑制 HCC 细胞的增殖能力。



A: KIF2C 与 VEGFR2 的表达相关性;

B: KIF2C 与 HIF-1 α 的表达相关性

图2 HCC 组织中 KIF2C 基因表达与 VEGFR2、HIF1A 表达的相关性分析



A、C: qPCR 法检测转染后各组 Huh-7(A)、Hep3B2.1-7 细胞(C)中 KIF2C mRNA 的表达; B、D: WB 法检测转染后各组 Huh-7(B)、Hep3B2.1-7(D)细胞中 KIF2C 蛋白的表达。* $P<0.01$ 。

图3 sh-NC 组和 sh-KIF2C 组 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞中 KIF2C 的表达

2.5 敲低 KIF2C 抑制 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞侵袭和迁移能力

Transwell 小室实验检测结果(图5)显示,与 sh-NC 组比较,sh-KIF2C 组 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的迁移和侵袭细胞数均显著减少(均 $P<0.01$)。实验结果表明,敲低 KIF2C 表达可明显抑制 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞侵袭和迁移能力。

2.6 敲低 KIF2C 表达的 HCC 细胞条件培养液可抑制体外 HUVEC 的血管生成能力

内皮细胞迁移实验和小管形成实验检测结果(图6)显示,与 sh-NC 组比较,sh-KIF2C 组 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的条件培养液处理 HUVEC 的迁移细胞数和管状结构数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验结果

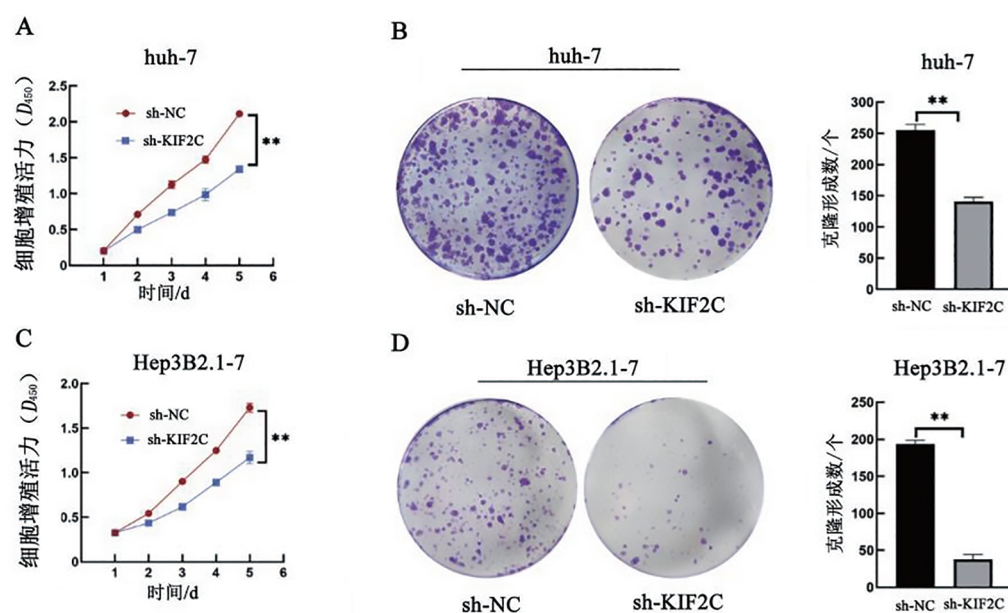
表明,敲低 HCC 细胞中 KIF2C 表达水平可在体外抑制 HUVEC 的血管形成能力。

3 讨论

HCC 是世界范围内最常见的十大恶性肿瘤之一,据统计非转移性 HCC 的 5 年生存率低于 40%,转移性 HCC 的 5 年生存率不足 20%^[8]。研究^[9]发现,肿瘤发展过程中会出现异常的血管生成状态,这为肿瘤细胞的生存和转移提供了有利条件,抑制肿瘤血管生成的抗血管生成疗法也应运而生。HCC 是典型的高血管增生性肿瘤,抗血管生成疗法是其最具前景的治疗策略之一^[10]。目前,索拉菲尼和仑伐替尼等抗血管药物已经纳入晚期 HCC 的一线治疗,但这些药物带来的生存

获益仍不容乐观^[11]。因此,寻找新的血管生成治疗靶点是HCC的重点研究方向。有研究证实KIF2C mRNA和蛋白表达水平在多种癌组织中表达上调,例如非小细胞肺癌^[12-13]、甲状腺癌^[14]、子宫内膜癌^[15]、胃癌^[16]等,本研究用HPA数据库数据分析发现,KIF2C mRNA在HCC细胞中也呈高表达,这与ZHANG等^[17]的研究结果相符。目前,已有研究^[6]证实,KIF2A在HCC细胞血管生成过程中发挥重要作用。BioGRID数据库(<http://thebiogrid.org>)显示KIF2A与KIF2C存在潜在互作关系,提示KIF2C可能也参与HCC的血管生成。此外,KIF2C在HCC中调控EMT^[18]和Wnt/ β -catenin^[7]信号通路,而MEK/ERK^[19]和Wnt/ β -catenin信号通路^[20]在HCC血管生成中发挥关键作用,表明KIF2C可能通过影响EMT和Wnt/ β -catenin

通路参与HCC血管生成。上述研究结果提示,KIF2C可能与HCC血管生成有关,但目前尚未有明确的研究报道KIF2C在HCC血管生成中的作用。此外,血管生成与血管生成因子的表达水平密切相关。VEGFR2主要在血管内皮细胞中表达,其作为VEGF的受体参与重塑或刺激肿瘤血管生成的过程^[21]。缺氧诱导因子-1可引发肿瘤血管生成,HIF-1 α 是该家族成员^[22]。CHEN等^[23]研究显示,VEGFR2和HIF-1 α 是重要的血管生成因子,可用于HCC血管生成研究,因此本研究基于公共数据库分析HCC组织中KIF2C与VEGFR2和HIF-1 α 的表达相关性,首次发现HCC组织中KIF2C与血管生成因子表达水平呈正相关,说明KIF2C可能促进HCC血管形成。



A、C: CCK-8法检测转染后各组Huh-7(A)和Hep3B2.1-7细胞(C)的增殖能力; B、D: 细胞克隆形成实验检测转染后各组Huh-7(B)和Hep3B2.1-7细胞(D)的克隆形成能力。* $P<0.01$ 。

图4 敲低KIF2C对Huh-7和Hep3B2.1-7细胞增殖能力的影响

肿瘤组织丰富的血管生成是由于血管生成因子表达失调造成的^[24]。VEGFR2^[25]和HIF-1 α ^[26]是HCC中重要的血管生成因子。肿瘤血管形成的主要作用是为肿瘤细胞提供丰富的细胞因子和营养物质,进而增强肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力^[27]。为验证KIF2C促进HCC血管生成这一结论,本研究首先通过公共数据库(TCGA, CPTAC和HPA), qPCR和WB分析KIF2C在HCC组织和细胞的表达水平,发现KIF2C在HCC组织和细胞中高表达,然后选择Huh-7和Hep3B2.1-7细胞进行敲降构建稳定低表达KIF2C的HCC细胞株,通过细胞实验验证敲低KIF2C抑制HCC细胞的增殖、侵袭和迁移,表明敲低KIF2C表达水平确实会减弱HCC细胞的增殖、侵袭和迁移能力。HAN等^[25]研究表明,血管生成基因对HCC血管形成

的影响可以通过收集条件培养基处理HUVEC细胞进行体外血管生成相关实验。内皮细胞迁移实验和小管生成实验都属于血管生成相关实验。因此本研究随后收集HCC细胞株条件培养基处理HUVEC细胞,通过血管生成相关实验验证敲低KIF2C的HCC细胞条件培养基会减弱HUVEC细胞体外血管生成能力,表明KIF2C促进HCC血管生成。

综上所述,本研究结果表明,KIF2C基因在HCC组织和细胞中高表达,其促进HCC血管生成并且增强HCC细胞的增殖、侵袭和迁移,这一发现对于深入了解HCC血管生成的相关机制和治疗靶点具有重要意义,因此靶向KIF2C可能是针对晚期HCC患者抗血管生成治疗的新希望。

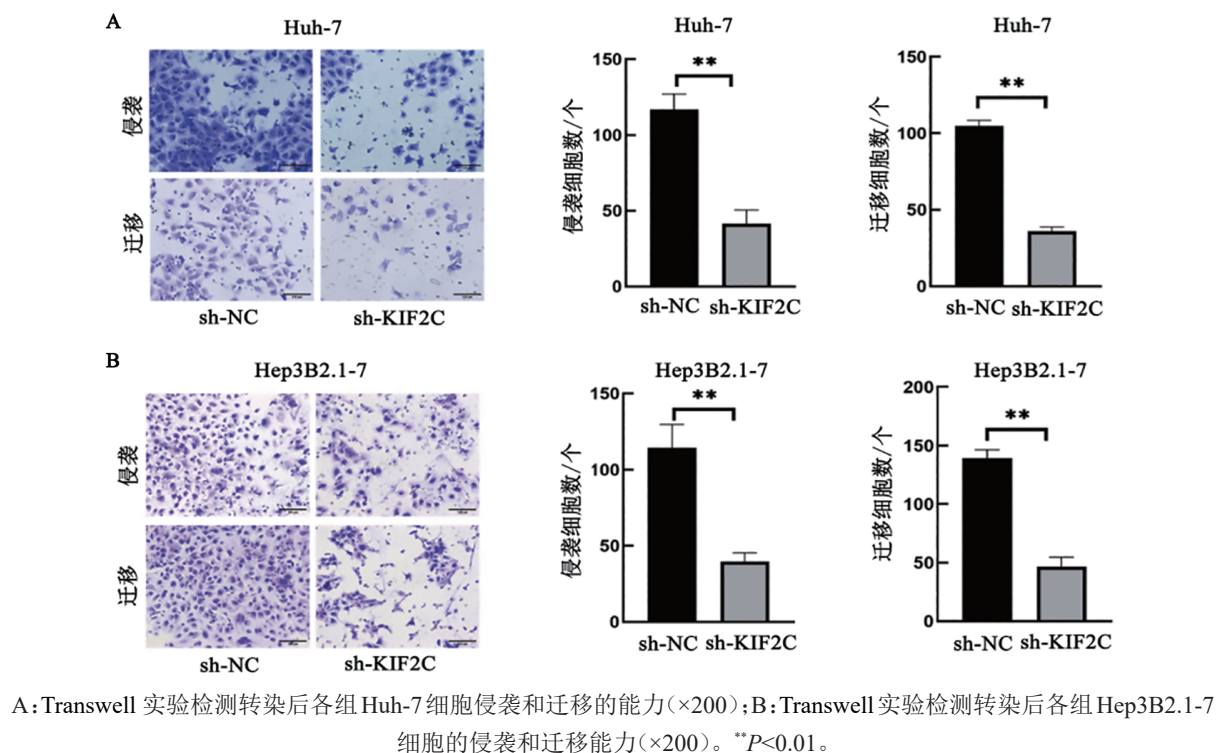
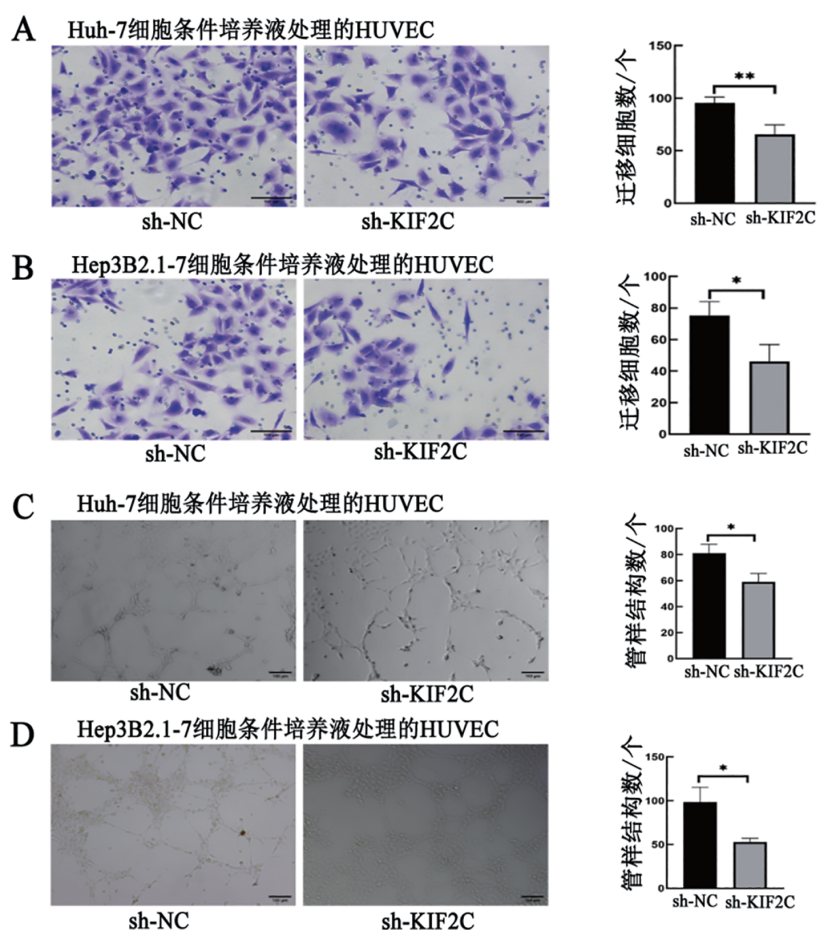


图5 敲低 KIF2C 对 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞侵袭和迁移的影响



A、B: Transwell 迁移实验检测转染后各组 Huh-7(A) 和 Hep3B2.1-7(B) 细胞的条件培养基对体外 HUVEC 迁移能力的影响($\times 200$); C、D: 小管生成实验检测转染后各组 Huh-7(C) 和 Hep3B2.1-7(D) 细胞的条件培养基对体外 HUVEC 管样结构形成的影响($\times 100$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 敲低 KIF2C 表达的 Huh-7 和 Hep3B2.1-7 细胞的条件培养基对体外 HUVEC 血管生成的影响

[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. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] CHEN Z Q, XIE H, HU M M, *et al.* Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(9): 2993-3036.
- [3] ZHU J R, WU Y Q, YU Y J, *et al.* MYBL1 induces transcriptional activation of ANGPT2 to promote tumor angiogenesis and confer sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 727[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35987690/>. DOI: 10.1038/s41419-022-05180-2.
- [4] HUANG X, ZHAO F, WU Q, *et al.* KIF2C facilitates tumor growth and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *Cancers*, 2023, 15(5): 1502[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36900292/>. DOI: 10.3390/cancers15051502.
- [5] ZHANG X, WANG Y Y, LIU X M, *et al.* KIF2A promotes the progression via AKT signaling pathway and is upregulated by transcription factor ETV4 in human gastric cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109840[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32106376/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109840.
- [6] WU Q, REN X T, CHEN Y, *et al.* KIF2A participates in the progression of hepatocellular carcinoma and angiogenesis by interacting with Notch1[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(5): 683 [2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36277155/>. DOI: 10.3892/etm.2022.11619.
- [7] WEI S, DAI M M, ZHANG C, *et al.* KIF2C: a novel link between Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(10): 788-809. DOI: 10.1007/s13238-020-00766-y.
- [8] BROWN Z J, TSILIMIGRAS D I, RUFF S M, *et al.* Management of hepatocellular carcinoma: a review[J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4): 410-420. DOI: 10.1001/jamasurg.2022.7989.
- [9] MOSHE D L, BAGHAIE L, LEROY F, *et al.* Metamorphic effect of angiogenic switch in tumor development: conundrum of tumor angiogenesis toward progression and metastatic potential[J/OL]. *Biomedicines*, 2023, 11(8): 2142[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37626639/>. DOI: 10.3390/biomedicines11082142.
- [10] ZHU Y, LIU W W, WANG Z S, *et al.* ARHGEF2/EDN1 pathway participates in ER stress-related drug resistance of hepatocellular carcinoma by promoting angiogenesis and malignant proliferation [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 652[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35896520/>. DOI: 10.1038/s41419-022-05099-8.
- [11] YAO C Y, WU S L, KONG J, *et al.* Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and anti-angiogenic therapies[J]. *Cancer Biol Med*, 2023, 20(1): 25-43. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0449.
- [12] GUO J M, ZHANG W, SUN L P, *et al.* KIF2C accelerates the development of non-small cell lung cancer and is suppressed by miR-186-3p via the AKT-GSK3 β - β -catenin pathway[J/OL]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 7288[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37142638/>. DOI: 10.1038/s41598-023-30073-5.
- [13] GAN H Z, LIN L, HU N J, *et al.* KIF2C exerts an oncogenic role in nonsmall cell lung cancer and is negatively regulated by miR-325-3p [J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(6): 424-431. DOI: 10.1002/cbf.3420.
- [14] LIN Q Y, QI Q L, HOU S, *et al.* Activation of the TGF- β 1/Smad signaling by KIF2C contributes to the malignant phenotype of thyroid carcinoma cells[J/OL]. *Tissue Cell*, 2021, 73: 101655[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34624565/>. DOI: 10.1016/j.tice.2021.101655.
- [15] AN L F, ZHANG J, FENG D L, *et al.* KIF2C is a novel prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in endometrial cancer [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 1434856[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34650608/>. DOI: 10.1155/2021/1434856.
- [16] LI S, MA Y L, WU C, *et al.* Knockdown of kinesin family member 2C restricts cell proliferation and induces cell cycle arrest in gastric cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(8): 907-916. DOI: 10.14670/HH-18-556.
- [17] ZHANG B X, LIU P, LI Y C, *et al.* Multi-omics analysis of kinesin family member 2C in human tumors: novel prognostic biomarker and tumor microenvironment regulator[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(11): 4954-4976.
- [18] DING Q, JIANG C H, ZHOU Y J, *et al.* Kinesin family member 2C promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis via activating MEK/ERK pathway[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(11): 2241-2249. DOI: 10.1093/bbb/zbab154.
- [19] AO J J, CHIBA T, SHIBATA S, *et al.* Acquisition of mesenchymal-like phenotypes and overproduction of angiogenic factors in lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 549: 171-178. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.097.
- [20] YUAN W D, ZHAO H W, ZHOU A, *et al.* Interference of EFNA4 suppresses cell proliferation, invasion and angiogenesis in hepatocellular carcinoma by downregulating PYGO2[J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23(1): 1-12. DOI: 10.1080/15384047.2022.2149039.
- [21] YANG Y, CAO Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(3): 251-261. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.03.011.
- [22] MANUELLI V, PECORARI C, FILOMENI G, *et al.* Regulation of redox signaling in HIF-1-dependent tumor angiogenesis[J]. *Febs j*, 2022, 289(18): 5413-5425. DOI: 10.1111/febs.16110.
- [23] CHEN H, NIO K, TANG H, *et al.* BMP9-ID1 signaling activates HIF-1 α and VEGFA expression to promote tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1475 [2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35163396/>. DOI: 10.3390/ijms23031475.
- [24] LAWLER J. Counter regulation of tumor angiogenesis by vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 2): 126-135. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.09.006.
- [25] HAN L, LIN X, YAN Q, *et al.* PBLD inhibits angiogenesis via impeding VEGF/VEGFR2-mediated microenvironmental cross-talk between HCC cells and endothelial cells[J]. *Oncogene*, 2022, 41(13): 1851-1865. DOI: 10.1038/s41388-022-02197-x.
- [26] WEI H M, XU Z M, CHEN L C, *et al.* Long non-coding RNA PAARH promotes hepatocellular carcinoma progression and angiogenesis via upregulating HOTTIP and activating HIF-1 α /VEGF signaling[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 102[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35110549/>. DOI: 10.1038/s41419-022-04505-5.
- [27] QI S Y, DENG S L, LIAN Z X, *et al.* Novel drugs with high efficacy against tumor angiogenesis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 6934[2023-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35805939/>. DOI: 10.3390/ijms23136934.

[收稿日期] 2023-12-14

[修回日期] 2024-02-25

[本文编辑] 向正华