

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.21.001

· 基础研究 ·

维生素 K3 通过调控 Ras 信号通路抑制前列腺癌细胞增殖 *

颜廷芒 董 凯 周文豪 刘海涛 荆翌峰[△]

(上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080)

摘要 目的:研究维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的影响及其机制。**方法:**CCK-8 检测维生素 K3 对前列腺癌细胞系增殖的影响;应用 siRNA 干扰 Siah2 表达之后, CCK-8 检测维生素 K3 对前列腺癌细胞系增殖的影响; Western Blot 检测维生素 K3 对前列腺癌细胞 Siah2 和 Spry2 表达的影响;免疫共沉淀技术检测维生素 K3 对 Siah2 介导的 Spry2 泛素化水平的影响; Western Blot 检测维生素 K3 对 Ras 信号通路中 pERK 表达的影响;构建裸鼠皮下前列腺癌模型,研究维生素 K3 对肿瘤生长的影响。**结果:**维生素 K3 抑制前列腺癌细胞系增殖,并且维生素 K3 浓度越高,对细胞抑制增殖作用越明显。前列腺癌细胞中干扰 Siah2 表达后, 10 μ M 维生素 K3 对细胞增殖无明显抑制作用即维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖抑制作用依赖 Siah2。10 μ M 维生素 K3 能减弱 Siah2 对 Spry2 的泛素化水平使 Spry2 表达升高。维生素 K3 能使前列腺癌细胞中 Ras 信号通路中的 pERK 蛋白表达降低。动物实验显示维生素 K3 治疗 12 天后,对照组和维生素 K3 组间肿瘤体积大小具有统计学差异,说明维生素 K3 能够有效地抑制裸鼠皮下前列腺癌生长。**结论:**维生素 K3 通过抑制 Siah2 泛素连接酶活性,介导其底物 Spry2 表达升高,进而抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路起到抑制前列腺细胞增殖作用。

关键词:维生素 K3; Siah2; Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路; 前列腺癌

中图分类号:R-33; R737.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)21-4001-06

Effect of Vitamin K3 on Proliferation of Prostate Cancer Cells
by the Regulation of Ras Signal Pathway*YAN Ting-mang, DONG Kai, ZHOU Wen-hao, LIU Hai-tao, JING Yi-feng[△]

(Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of vitamin K3 on proliferation of prostate cancer cells and its mechanism. **Methods:** CCK-8 was used to detect the effects of vitamin K3 on the proliferation of prostate cancer cells; CCK-8 were used to detect the effects of vitamin K3 on the proliferation of prostate cancer cells after treating with siSiah2; Western Blot was used to detect the effects of vitamin K3 on the expression of Siah2 and Spry2; Immunoprecipitation was performed to detect the effect of vitamin K3 on the ubiquitination of Spry2. Western Blot was used to detect the effects of vitamin K3 on the expression of pERK in Ras signal pathway. Constructing nude subcutaneous prostate cancer model to investigate the effects of vitamin K3 on the growth of the tumors. **Results:** Vitamin K3 can inhibit the proliferation of prostate cancer cells and the higher the concentration of vitamin K3, the more obvious the inhibition effect on cell proliferation. There were no inhibition effects of vitamin K3 on cell proliferation after treating with siSiah2, which means the inhibiting effects were Siah2 dependent. 10 μ M Vitamin K3 increased the protein level of Siah2 and its substrate-Spry2 through decreasing its ubiquitination level of Spry2. Vitamin K3 decreased the pERK expression in Ras signal pathway. Animal experiments showed that after 12 days of vitamin K3 treatment, there was a statistical difference in tumor volume between control and vitamin K3 group, indicating that vitamin K3 can effectively inhibit the growth of subcutaneous prostate cancer in nude mice. **Conclusions:** Vitamin K3 inhibits the proliferation of prostate cancer cells dependent on Siah2 by down regulating Ras/Raf/MEK/ERK signal pathway.

Key words: Vitamin K3; Siah2; Ras/Raf/MEK/ERK signal pathway; Prostate cancer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)21-4001-06

前言

前列腺癌是美国男性泌尿生殖系统发病最高的恶性肿瘤^[1]。近年来,我国前列腺癌发病率急剧上升,目前已经超过膀胱癌,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81402091)

作者简介:颜廷芒(1991-),硕士研究生,主要研究方向:前列腺癌, E-mail: 15800557151@163.com

[△] 通讯作者:荆翌峰(1979-),副教授,主要研究方向:前列腺癌, E-mail: jyf_123@163.com, 电话: 13918839913

(收稿日期:2018-04-28 接受日期:2018-05-23)

在男性泌尿生殖系统恶性肿瘤中排名第一。有研究显示维生素 K3 对多种肿瘤细胞的生长具有抑制作用,如膀胱癌、前列腺癌、宫颈癌、卵巢癌、慢性粒细胞白血病和恶性黑色素瘤等^[2-7]。此外,维生素 K3 是 E3 泛素连接酶 Siah2 的抑制剂^[8],并且 Siah2 在前列腺癌的发生、进展过程中起着重要作用^[9]。目前有研究表明,维生素 K3 能够诱导前列腺癌细胞发生胞质自切从而引起细胞死亡,电子投射显微镜下观察发现细胞核、线粒体、溶酶体等结构发生改变,导致细胞骨架损伤而引起细胞死亡^[9]。而联合应用维生素 C 和维生素 K3 比两种维生素分别单独使用时介导的细胞死亡现象更明显^[7]。胞质自切是指细胞不断丢失不含细胞器的胞浆的现象,它不同于传统的细胞凋亡,是一种新的细胞死亡方式^[10]。维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的影响及其作用机制尚不明确,因此,本课题旨在研究维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的影响及其机制,为临床上前列腺癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1 和 C4-2 由上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科研究所提供;DMEM 和 RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司;CCK8 试剂盒、BCA 试剂盒、购自碧云天公司;维生素 K3、二甲基亚砜(DMSO)购自于美国 Sigma-Aldrich 公司;Siah2 抗体购自于美国 Novus Biologicals 公司,Sprouty2 抗体购自于美国 SANTA CRUZ 公司,ERK、pERK 抗体购自于美国 Cell Signaling Technology 公司;Tubulin 抗体购自于上海爱必信生物科技有限公司;雄性 4-5 周龄 BALB/c nu/nu 裸鼠购自于上海交通大学附属第一人民医院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 配制培养细胞所需要的完全培养基,在 DMEM 培养基(或 RPMI1640)中加入胎牛血清,浓度为 10%,之后加入 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。从液氮罐中取出冻存管,迅速放入 37℃ 水浴箱中解冻,待细胞解冻后,用吸管吸出解冻液至离心管中,1000 r/min,5 min 离心,弃上清,加入配制好的培养基并摇匀。将细胞放置于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每隔 24 h 至 48 h 观察细胞状态并根据需要更换培养液和传代。

1.2.2 CCK-8 将生长至对数期的 C4-2、LNCaP 和 22RV1 细胞以每孔 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板,每种细胞分为三组,各组细胞做 3 个复孔,实验组细胞的培养基内分别加入 10 μM、20 μM 维生素 K3,对照组中加入相应体积的 DMSO,连续在每天相同时间点处理并观察四天。检测时,每孔加入 40 μL 的 CCK-8 溶液和 400 μL 的 PBS,之后将培养板放置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 2 小时。用酶标仪测定其在波长为 450 nm 条件下的吸光度值,对每组所测定的吸光度值进行统计分析并绘制细胞生长曲线。

1.2.3 蛋白印记(Western Blot) 收集各组细胞,加入细胞裂解液提取蛋白,并用 BCA 试剂盒对蛋白样品进行定量。再将蛋白样品与上样缓冲液混匀,100℃,10 min 沸水使蛋白变性。其后将蛋白样品分别进行电泳、转膜。用 5%脱脂奶粉溶液进行封

闭。孵育一抗(Siah2、Spry2、ERK、pERK、Tubulin),4℃摇床过夜,次日 TBST 溶液洗膜三次,每次 10 分钟,孵育二抗,室温 2 小时,TBST 溶液洗膜三次,每次 10 分钟,ECL 化学发光剂显影。分析各组蛋白表达水平。

1.2.4 转染 选取前列腺癌细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔板培养,当细胞融合度达约 80%时进行转染,按照 Lipofectamine2000 试剂说明书进行转染。将 Siah2 siRNA 干扰或对照组片段、Lipofectamine2000 分别与无血清无抗的培养基进行混合,静置 10 分钟后,将二者混匀,继续静置 10 分钟后加入预先用无血清无抗的培养基饥饿 1 小时的细胞中,37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 6 小时后,换 RPMI1640 完全培养基继续放置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。前列腺癌细胞分为 Siah2 干扰组和对照组用作后续 CCK-8 和蛋白印记检测。

1.2.5 免疫共沉淀 293T 细胞分为两组,按照 Lipofectamine2000 试剂说明书用上述转染方法转染 Siah2、Spry2 和 Ub 质粒,实验组予以 20 μM 维生素 K3 处理。收细胞前 4-6 小时可加入 MG132 阻断蛋白降解(终浓度约 20 μM)。加入细胞裂解液提取蛋白,从其中吸取 50 μL 蛋白样品作为 input 样品。剩余的蛋白样品中加 30 μL Preotein A/G agarose beads,4℃ Rotator 上旋转混匀 10-30 分钟;之后 12000 rpm,4℃离心 10 分钟;取上清,弃沉淀。将预纯化裂解物中加入约 30 μL 的纯 Flag-beeds,4℃转盘过夜。次日离心后吸弃上清液,用 PBS 洗 beads 3 次,最后一次洗涤后,去除上清,加入 25-50 μL 2×电泳上样缓冲液,95-100℃煮沸 5 分钟。离心后取上清,弃沉淀。得到的上清即可进行后续 Western blot 分析或 -80℃保存。

1.2.6 裸鼠皮下前列腺癌模型建立及处理 收集处于对数期的 LNCaP 细胞,将其重悬于不含血清的培养液或 PBS 中,并进行细胞计数,将细胞悬液浓度调整为 1×10⁷/mL,取雄性 4-5 周龄 BALB/c nu/nu 裸鼠,实验前均应适应性饲养一周。用 1 mL 注射器按 100 μL 细胞悬液/鼠将细胞注射于裸鼠背部皮下。将其随机分为两组。当至肉眼可以看见皮肤接种处实质性肿块时,实验组裸鼠予以腹腔注射维生素 K3(使用 DMSO 溶解,剂量为 10 mg/kg,每周两次);对照组裸鼠予以腹腔注射相应体积的 DMSO,观察各组肿瘤生长速度,测量瘤体大小(用长径和短径表示,每周两次),连续观察 5 周,5 周后处死裸鼠,取出移植瘤组织并拍照。计算不同时间点瘤体体积(体积=长径×短径²,mm³),并绘制移植瘤生长曲线。

1.2.7 统计学方法 采用 GraphPad Prism 6.0 对实验数据进行统计分析,计量资料用平均数±标准差表示。两组间比较用独立样本 t 检验或单因素方差分析对数据进行分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维生素 K3 对不同前列腺癌细胞系增殖的影响

10 μM、20 μM 维生素 K3 处理前列腺癌细胞 0、24、48、72、96 h 后,CCK-8 检测细胞的增殖情况,根据所测得 OD 值绘制细胞生长曲线。结果显示,维生素 K3 能够抑制前列腺癌细胞系增殖,并且维生素 K3 浓度越高,对细胞生长抑制作用越明显(P<0.05,具有统计学差异,图 1)。

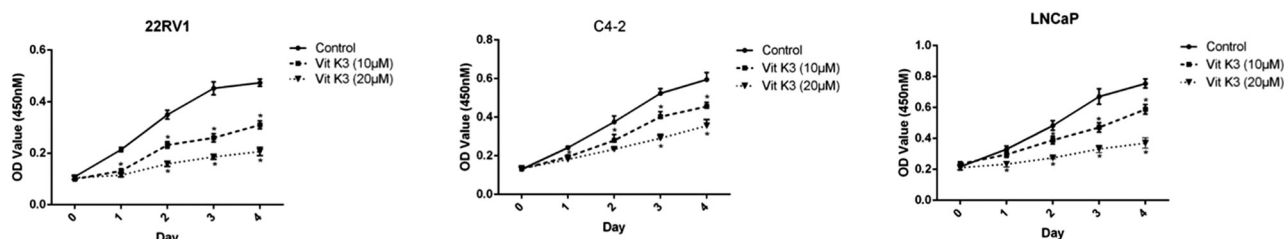


图1 维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of vitamin K3 on the proliferation of prostate cancer cells

所有的数值均用均值± 标准差表示,* 与对照组相比 $P<0.05$ 。Data represent mean $\pm$ SD.* $P<0.05$.

2.2 维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的抑制作用依赖 Siah2

我们利用 siRNA 干扰前列腺癌细胞中 Siah2 表达,Western Blot 检测各组前列腺癌细胞中 Siah2 表达水平以显示 siRNA 的干扰效果(图 2A)。前列腺癌细胞经 siSiah2 处理后 Siah2 表达明显低于对照组($P<0.05$,具有统计学差异,图 2B)。CCK-8

检测 10 μ M 维生素 K3 对 Siah2 干扰组和对照组细胞的影响。实验结果显示,在前列腺癌细胞中干扰 Siah2 表达后,维生素 K3 对细胞增殖无明显抑制作用,二者之间无统计学差异(图 2C),说明维生素 K3 对前列腺癌细胞增殖的抑制作用依赖 Siah2。

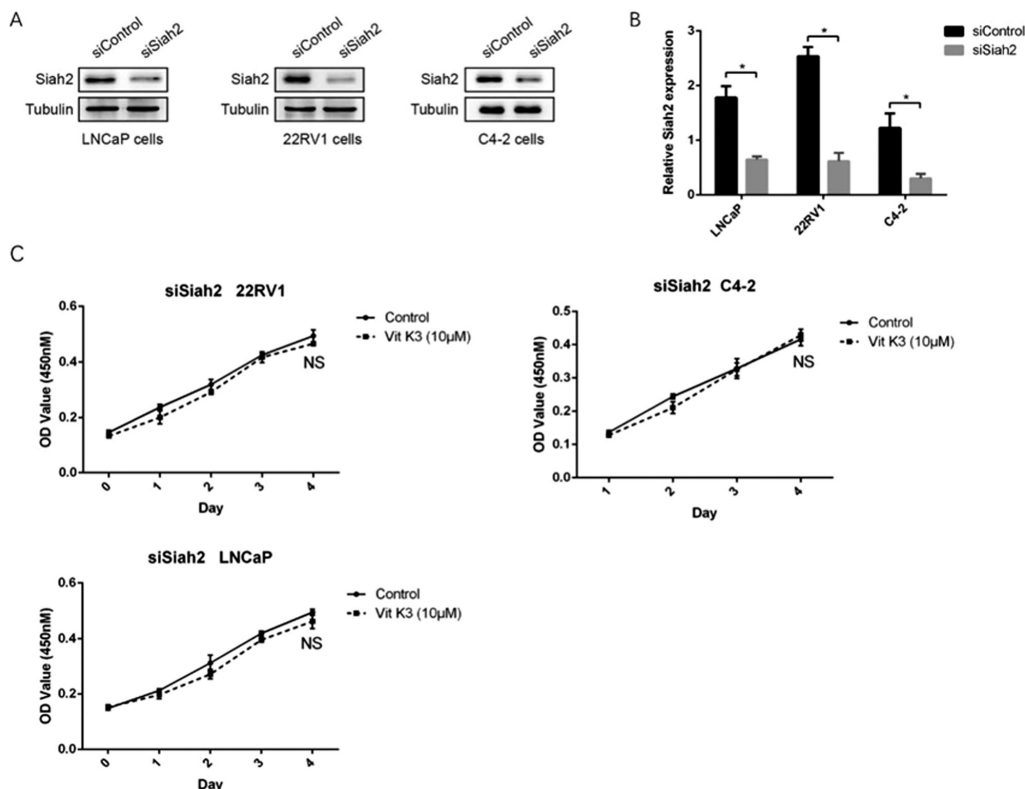


图2 维生素 K3 对干扰 Siah2 表达后的前列腺癌细胞增殖的影响 A: Western Blot 检测各组前列腺癌细胞中 Siah2 表达水平; B: Siah2 蛋白相对表达量; C: CCK-8 检测维生素 K3 对干扰 Siah2 后的前列腺癌细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of vitamin K3 on the proliferation of prostate cancer cells with siSiah2 A: Siah2 expression were detected by Western blotting; B: Siah2 relative protein expression level; C: CCK-8 were used to detect the effects of vitamin K3 on the proliferation of prostate cancer cells with siSiah2

所有的数值均用均值± 标准差表示,* 与对照组相比 $P<0.05$ 。Data represent mean $\pm$ SD. * $P<0.05$.

2.3 维生素 K3 对 Siah2 表达及其底物 Spry2 的影响

Western Blot 检测维生素 K3 处理 LNCaP 细胞 48 小时后的 Siah2 和 Spry2 表达的变化(图 3A),结果发现维生素 K3 组 Siah2 和 Spry2 表达较对照组明显上升,维生素 K3 浓度越高, Siah2 和 Spry2 表达上升越明显($P<0.05$,具有统计学差异,图 3B)。Siah2 是一种 E3 泛素连接酶,能介导 Spry2 蛋白酶体途径降解, Spry2 可以反映 Siah2 泛素连接酶活性, Spry2 表达升高

说明 Siah2 酶活性降低,也验证了维生素 K3 能够抑制 Siah2 酶活性。

我们利用免疫共沉淀技术检测维生素 K3 对 Spry2 泛素化水平的影响。Western blot 检测 Ub 多聚泛素化的条带来显示 Spry2 的泛素化水平。实验结果显示,维生素 K3 处理之后 Spry2 多聚泛素化条带变淡(图 3C),即说明维生素 K3 能减弱 Siah2 介导 Spry2 蛋白酶体途径降解,使得 Spry2 表达升高。

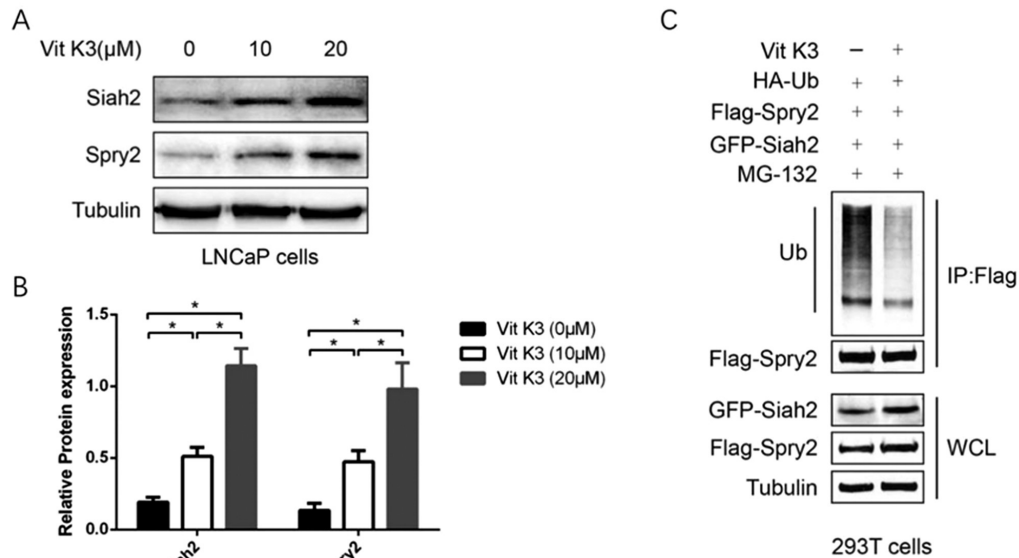


图3 维生素 K3 对 Siah2、Spry2 表达及 Spry2 泛素化的影响 A: Western Blot 检测维生素 K3 对 Siah2 和 Spry2 表达的影响; B Siah2 和 Spry2 蛋白相对表达量; C: 免疫沉淀检测维生素 K3 对 Spry2 泛素化水平的影响。

Fig.3 Effects of vitamin K3 on the expression of Siah2 and Spry2 and ubiquitination of Spry2 A: Western blotting was used to detect effects of vitamin K3 on the expression of Siah2 and Spry2; B: Siah2 and Spry2 relative protein expression level; C: Immunoprecipitation was performed to detect the effect of vitamin K3 on the ubiquitination of Spry2

所有的数值均用均值±标准差表示, * 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

Data represent mean ± SD. * $P < 0.05$.

2.4 维生素 K3 对 ERK 蛋白表达的影响

Western blotting 检测 20 μM 维生素 K3 处理 LNCaP 细胞 48 h 后 Ras 信号通路中 ERK 的蛋白表达, 结果显示, Spry2 表达升高的同时, pERK 蛋白表达明显降低, 验证了 Spry2 是 Ras 信号通路的负调控因子。

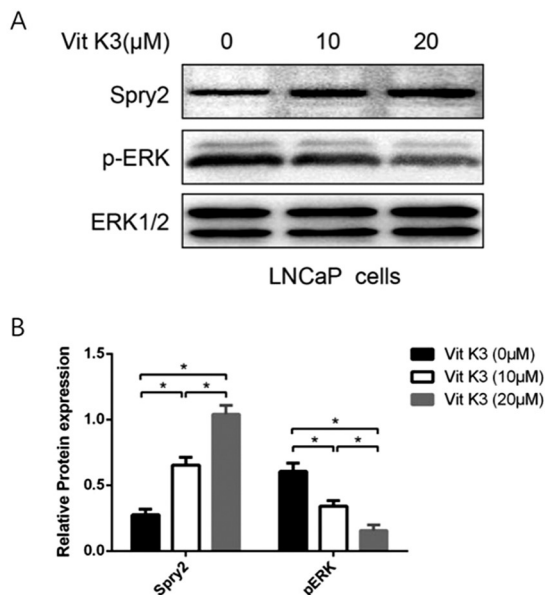


图4 维生素 K3 对 Ras 信号通路中 ERK 表达的影响 A: 维生素 K3 对 Spry2 和 pERK 表达的影响; B: Spry2 和 pERK 的蛋白相对表达量

Fig.4 Effects of vitamin K3 on the expression of ERK in Ras signal pathway A: Western blotting were used to detect effects of vitamin K3 on the expression of Spry2 and pERK; B: Spry2 and pERK relative protein expression level.

所有的数值均用均值±标准差表示, * 与对照组相比 $P < 0.05$ 。

Data represent mean ± SD. * $P < 0.05$.

2.5 维生素 K3 抑制裸鼠皮下前列腺癌生长

我们通过向裸鼠皮下注射 LNCaP 前列腺癌细胞构建裸鼠皮下前列腺癌模型, 实验组裸鼠予以腹腔注射维生素 K3, 我们计算不同时间点肿瘤体积大小, 绘制生长曲线, 结果显示, 维生素 K3 治疗组肿瘤生长速度较缓慢, 在治疗 30 天后, 肿瘤体积平均达 400 mm³ 左右, 而此时对照组肿瘤体积达 1000 mm³ 左右, 且其生长速度较快。在维生素 K3 治疗 12 天之后, 两组间肿瘤体积差异 $P < 0.05$, 具有统计学意义。因此, 我们得出结论维生素 K3 能够有效地抑制肿瘤生长。

3 讨论

维生素 K3 能够抑制多种肿瘤细胞的生长, 已经受到越来越多的关注。有文献报道, 维生素 K3 能够接受一个或两个电子形成氧化还原异构体, 在氧化还原过程中会产生活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 从而诱发线粒体和溶酶体功能障碍, 导致细胞凋亡和肿瘤抑制^[1]。例如, 维生素 K3 导致 PARP1 激活, 诱导 DNA 损伤和细胞凋亡抑制肝癌细胞生长^[12]; 还有研究表明, 维生素 K3 能竞争性结合微管蛋白, 使得微管蛋白不可逆性解聚而丧失功能, 我们知道微管蛋白在保持细胞形态结构、细胞内物质运输等方面发挥重要作用^[13], 因此, 维生素 K3 起到抑制细胞增殖作用; 此外还有研究证明维生素 K3 能够抑制肿瘤发生发展过程中的重要信号通路起到抑制肿瘤生长的作用。例如维生素 K3 抑制 Siah2/Spry2/Ras 通路抑制恶性黑色素瘤的生长^[4]。本研究主要侧重于维生素 K3 对前列腺癌发生发展中重要的信号通路的影响研究其抑制肿瘤生长的机制。

Siah2 是一种环指 E3 泛素化连接酶, 表达于哺乳动物中, 与果蝇 sina 基因同源。Siah2 位于第三号染色体上, 其 N 端是催化结构域, 中间有两个锌指结构, C 端是底物结合区域^[14]。Siah2 是一种 E3 泛素连接酶, Siah2 能够通过对底物泛素化修饰来调节多种生物学过程^[15,16], 有研究表明抑制 Siah2 的表达

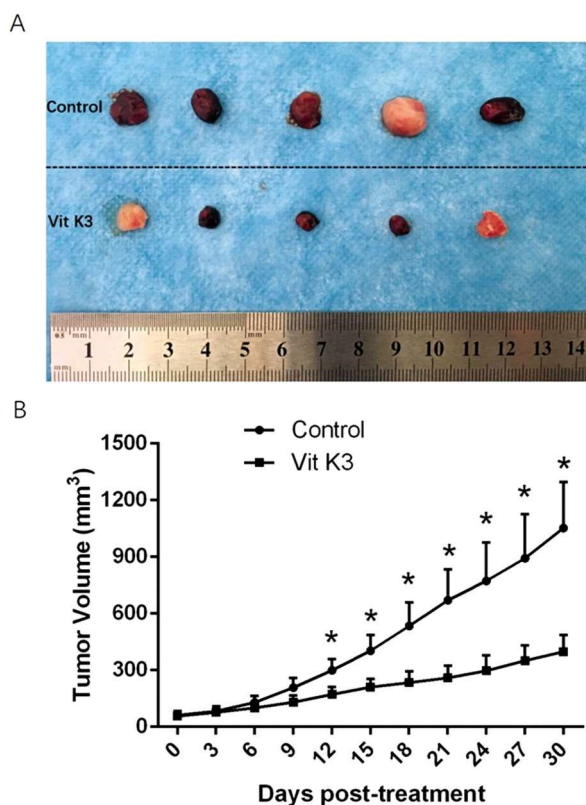


图5 裸鼠皮下前列腺癌模型肿瘤大体图片及其生长曲线 A: 对照和
维生素 K3 组肿瘤大体图片 B: 肿瘤生长曲线

Fig.5 Gross image of tumors and tumor growth curve A: Gross image of
tumors in control and vitamin K3 group B: tumor growth curve
所有的数值均用均值 $\pm$ 标准差表示, *与对照组相比 $P<0.05$ 。
Data represent mean $\pm$ SD. * $P<0.05$.

可以阻止恶性肿瘤的进展,说明 Siah2 是一种促肿瘤因子^[17],最近研究发现,Siah2 在去势抵抗性前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, CRPC) 的形成中起重要作用,通过组织样本的芯片数据分析发现 Siah2 在高级别前列腺癌和 CRPC 中高表达,泛素连接酶 Siah2 基因缺失的 TRAMP 小鼠不能形成 CRPC,而将 CRPC 细胞中 Siah2 敲减后的移植瘤能恢复对去势的敏感性^[8],还有研究表示剪接因子 DHX15 与 Siah2、AR (Androgen Receptor, AR) 三者构成复合体,从而稳定 Siah2,介导雄激素受体持续激活使前列腺癌向 CRPC 进展^[18]。这些研究都表明 Siah2 对 CRPC 的发生发展具有关键作用。还有研究表明,维生素 K3 是 Siah2 抑制剂,维生素 K3 能够通过抑制 Siah2 阻断恶性黑色素瘤的发生^[4]。其中的主要机制维生素 K3 抑制 Siah2 泛素连接酶活性,减少其两种下游底物即 PHD3 和 Spry2 的蛋白酶体途径降解来稳定 PHD3 和 Spry2 的表达。一方面 PHD3 能够降低 HIF-1 α 表达,从而抑制肿瘤细胞低氧应答来抑制肿瘤生长;另一方面 Spry2 通过抑制 Ras 信号通路来抑制肿瘤生长。

本研究实验结果显示,维生素 K3 能够抑制前列腺癌细胞增殖,这种抑制作用呈剂量依赖性,维生素 K3 浓度越高,抑制作用越明显。前述我们知道 Siah2 在前列腺癌的发生发展过程中发挥重要作用,而维生素 K3 又是 Siah2 酶活性抑制剂,我们进一步验证维生素 K3 对前列腺癌细胞的抑制增殖作用是否依赖于 Siah2。因此我们在前列腺癌细胞中用 siRNA 干扰

Siah2 表达后,发现维生素 K3 失去抑制肿瘤细胞增殖作用,说明维生素 K3 抑制细胞增殖作用依赖于 Siah2。我们通过免疫沉淀验证维生素 K3 对 Siah2 介导 Spry2 泛素化水平的影响,发现维生素 K3 能够抑制 Spry2 的泛素化,提示维生素 K3 抑制 Siah2 泛素连接酶活性,另一方面通过检测 Siah2 下游底物 Spry2 表达发现维生素 K3 使 Spry2 表达升高,这也说明维生素 K3 使 Siah2 酶活性降低,这与先前研究结果相一致。有文献报道,当成纤维生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 信号通路激活时, Spry2 得到表达,而且 Spry2 能够抑制 FGF 依赖性 ERK 活化,因此 Spry2 起到 FGF 介导的增殖的反馈抑制的作用^[19]。也有研究表明, Spry2 能够负性调控 Ras 信号通路^[4],本研究中我们检测了维生素 K3 作用细胞后 Ras 信号通路中的 ERK 蛋白水平,结果显示维生素 K3 处理后, Spry2 表达上调而 pERK 表达下降,也验证了维生素 K3 能够抑制前列腺癌中 Spry2 介导的 Ras 信号通路。

Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路是一条可被广泛激活的有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路^[20],它能够将细胞外信号传递至细胞核内,引起细胞内多种生物学功能相关的蛋白表达变化,从而进一步影响细胞的各种功能,如参与调控细胞增殖与分化、细胞形态的维持、细胞骨架的建立、细胞凋亡和细胞的恶变等多种生物学反应^[21]。它也是研究细胞增殖、分化及凋亡等生物过程所涉及最为广泛的信号通路之一。Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路由三级酶联反应功能单位组成,即 Raf 激酶、MEK 激酶、ERK 激酶依次被磷酸化而激活^[20]。ERK 在该信号通路中发挥着核心作用,当 ERK 被磷酸化激活后,其可以通过磷酸化方式激活细胞膜、细胞质及细胞核内的类核蛋白体 S6 蛋白激酶的蛋白激酶底物,并与其激活后的底物共同进入细胞核,使得其下游重要的转录因子磷酸化,从而进一步调控即刻早期基因的转录表达,如 Myc、Fos、Jun 等^[22]。即刻早期基因是指当细胞受外部刺激后在细胞内最先得到表达的一组基因,它是联系细胞内生物化学变化与细胞对外界刺激发生特异性反应的中介物,它能够参与细胞内信息传递、能量代谢、细胞正常增殖和分化等过程^[23]。此外,ERK 在该信号通路中发挥着核心作用,ERK 能够调控嘧啶核苷酸的合成、染色体重塑、核糖体合成以及蛋白质转录,这些过程都对细胞增殖起着不可替代的作用^[24-28]。还有研究表示,该信号通路的异常激活和多种肿瘤发生密切相关^[29-32],针对该信号通路的抗肿瘤靶向治疗药物如索拉非尼等已经应用于临床^[33]。本研究动物实验结果显示,维生素 K3 能够有效抑制裸鼠皮下前列腺癌生长,尤其在维生素 K3 治疗 12 天后,维生素 K3 治疗组肿瘤体积和对照组相比具有统计学差异,结合细胞实验结果维生素 K3 能抑制 Ras 信号通路,因此我们推测其抑制裸鼠皮下肿瘤生长可能也是通过抑制 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路实现的。

参考文献 (References)

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2017, 67(1): 5
- [2] Huang J, Lu Z, Xiao Y, et al. Inhibition of Siah2 Ubiquitin Ligase by Vitamin K3 Attenuates Chronic Myeloid Leukemia Chemo-Resistance in Hypoxic Microenvironment[J]. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research*, 2018, 24: 727-735
- [3] Santana N D C S, Lima N A, Desoti V C, et al. Vitamin K3 induces

- antiproliferative effect in cervical epithelial cells transformed by HPV 16 (SiHa cells) through the increase in reactive oxygen species production [J]. Archives of Gynecology & Obstetrics, 2016, 294 (4): 797-804
- [4] Shah M, Stebbins J L, Dewing A, et al. Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis [J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2009, 22(6): 799-808
- [5] Kim Y J, Shin Y K, Sohn D S, et al. Menadione induces the formation of reactive oxygen species and depletion of GSH-mediated apoptosis and inhibits the FAK-mediated cell invasion [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2014, 387(9): 799-809
- [6] Gilloteaux J, Jamison J M, Neal D R, et al. Cell damage and death by autschizis in human bladder (RT4) carcinoma cells resulting from treatment with ascorbate and menadione[J]. Ultrastructural Pathology, 2010, 34(3): 140
- [7] Gilloteaux J, Jamison J M, Neal D, et al. Synergistic antitumor cytotoxic actions of ascorbate and menadione on human prostate (DU145) cancer cells in vitro: nucleus and other injuries preceding cell death by autschizis[J]. Ultrastructural Pathology, 2014, 38(2): 116
- [8] Qi J, Tripathi M, Mishra R, et al. The E3 Ubiquitin Ligase Siah2 Contributes to Castration-Resistant Prostate Cancer by Regulation of Androgen Receptor Transcriptional Activity [J]. Cancer Cell, 2013, 23 (3): 332
- [9] Gilloteaux J, Jamison J M, Summers J L. Pro-oxidant treatment of human prostate carcinoma (DU145) induces autschizis cell death: autophagosomes build up out of injured endomembranes and mitochondria[J]. Ultrastructural Pathology, 2014, 38(5): 315-328
- [10] Jamison J M, Gilloteaux J, Taper H S, et al. Autschizis: A Novel Cell Death[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 33(48): 1773-1783
- [11] Rane S Y, Khan A A, Badave K D. Anticancer Vitamin K3 Analogs: A Review [J]. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2016, 16(8)
- [12] Oztöpcü-Vatan P, Sayitoglu M, Günindi M, et al. Cytotoxic and apoptotic effects of menadione on rat hepatocellular carcinoma cells [J]. Cytotechnology, 2015, 67(6): 1003-1009
- [13] Acharya B R, Choudhury D, Das A, et al. Vitamin K3 disrupts the microtubule networks by binding to tubulin: a novel mechanism of its antiproliferative activity[J]. Biochemistry, 2009, 48(29): 6963
- [14] Nakayama K, Qi J, Ronai Z. The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response[J]. Molecular Cancer Research, 2009, 7(4): 443-451
- [15] Tanimura S, Takeda K. ERK signalling as a regulator of cell motility [J]. Journal of Biochemistry, 2017, 162(3): 145-154
- [16] Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 600-604
- [17] Qi J, Kim H, Scortegagna M, et al. Regulators and effectors of Siah ubiquitin ligases [J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2013, 67(1): 15-24
- [18] Jing Y, Nguyen M M, Wang D, et al. DHX15 promotes prostate cancer progression by stimulating Siah2-mediated ubiquitination of androgen receptor[J]. Oncogene, 2017
- [19] Nadeau R J, Toher J L, Yang X, et al. Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 100(1): 151-160
- [20] Asati V, Mahapatra D K, Bharti S K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 109: 314-341
- [21] Murphy L O, MacKeigan J P, Blenis J. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration [J]. Molecular & Cellular Biology, 2004, 24(1): 144-153
- [22] Chambard J C, Lefloch R, Pouyssegur J, et al. ERK implication in cell cycle regulation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2007, 1773(8): 1299-1310
- [23] Azad G K, Ito K, Sailaja B S, et al. PARP1-dependent eviction of the linker histone H1 mediates immediate early gene expression during neuronal activation[J]. Journal of Cell Biology, 2017[Epub ahead of print]
- [24] Zhang X, Ma L, Qi J, et al. MAPK/ERK signaling pathway-induced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2015, 410(1-2): 101-110
- [25] Mulner-Lorillon O, Chassé H, Morales J, et al. MAPK/ERK activity is required for the successful progression of mitosis in sea urchin embryos[J]. Developmental Biology, 2016, 421(2)
- [26] Chidambaram A, Kavaya S H, Chidambaram R K, et al. Design, synthesis and characterization of α , β -unsaturated carboxylic acid and its urea based derivatives that explores novel epigenetic modulators in human non-small cell lung cancer A549 cell line[J]. Journal of Cellular Physiology, 2017[Epub ahead of print]
- [27] Stefanovsky V Y, Langlois F, Bazett-Jones D, et al. ERK modulates DNA bending and enhances some structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF[J]. Biochemistry, 2006, 45(11): 3626-3634
- [28] Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, et al. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling [J]. Molecular Cell, 2006, 21(5): 629
- [29] Lee S K, Hwang J H, Choi K Y. Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis [J]. Advances in Biological Regulation, 2018[Epub ahead of print]
- [30] Wu R S, Qiu E H, Zhu J J, et al. MiR-101 promotes nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis through inhibiting Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway[J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2018, 22(1): 150
- [31] Zhang X, Liu G, Ding L, et al. HOXA3 promotes tumor growth of human colon cancer through activating EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017[Epub ahead of print]
- [32] Guo H, Zhang X Y, Peng J, et al. RUVBL1, a novel C-RAF-binding protein, activates the RAF/MEK/ERK pathway to promote lung cancer tumorigenesis [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2018
- [33] Rosenberg L, Yoon C H, Sharma G, et al. Sorafenib inhibits proliferation and invasion in desmoid-derived cells by targeting Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Carcinogenesis, 2018[Epub ahead of print]