

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.22.005

肝细胞癌组织中 OATP1B3 的表达及其作用的初步研究*

陈施翰¹ 李 昆² 楚理家¹ 张春旭¹ 王全晖^{1Δ}

(1 中国人民解放军联勤保障部队第 988 医院普通外科 河南 郑州 450000;

2 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院肝胆外科 重庆 400038)

摘要 目的:探讨有机阴离子转运多肽 1B3(OATP1B3)在肝细胞癌(肝癌)组织中的表达及作用。**方法:**通过免疫组化实验和免疫印迹试验(Western blot)检测肝癌组织及其癌旁组织中 OATP1B3 情况,并分析其与患者临床病理特征的相关性。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 OATP1B3 在多种肝癌细胞中的表达情况,选择表达量相对较低的人肝癌细胞(HepG2 和 Huh7)细胞进行过表达实验,细胞毒实验(MTT)和流式细胞术分别检测 OATP1B3 对细胞增殖及凋亡的影响。**结果:**肝癌组织中 OATP1B3 表达水平明显低于癌旁组织($P<0.05$),且与患者恶性肿瘤国际临床分期(TNM 分期)、肿瘤分化程度、有无肿瘤复发显著相关($P<0.05$)。过表达 OATP1B3 可抑制 HepG2 和 Huh7 细胞增殖,促进细胞凋亡。**结论:**OATP1B3 在肝癌组织中低表达,上调其表达可抑制肝癌细胞增殖和促进细胞凋亡。OATP1B3 可能是肝癌的抑癌基因,对肝癌的发生、发展具有重要作用。

关键词:OATP1B3;肝细胞癌;临床病理特征;增殖;凋亡

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)22-4223-07

Preliminary Study on the Expression and Role of OATP1B3
in Hepatocellular Carcinoma Tissue*CHEN Shi-han¹, LI Kun², CHU Li-jia¹, ZHANG Chun-xu¹, WANG Quan-hui^{1Δ}

(1 Department of General surgery, the 988th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Zhengzhou, Henan, 450000, China; 2 Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Army Medical University of Chinese PLA, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and role of organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) in hepatocellular carcinoma tissue. **Methods:** OATP1B3 in hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry and Western blot, and its correlations with clinicopathological characteristics of patients was analyzed. The expression of OATP1B3 in multiple hepatoma cell lines was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR), human hepatoma cells (HepG2 and Huh7) cells with relatively low expression were selected for overexpression experiments, and the effects of OATP1B3 on cell proliferation and apoptosis were investigated by cytotoxicity assay (MTT) and flow cytometry. **Results:** The expression level of OATP1B3 in hepatocellular carcinoma tissues was significantly lower than that in adjacent tissues, and was significantly correlated to International Classification of Clinical Stages for Patients with Malignant Tumors (TNM stage), tumor differentiation and tumour recurrence. Overexpression of OATP1B3 significantly inhibited the proliferation of HepG2 and Huh7 cells and promoted apoptosis. **Conclusion:** OATP1B3 is low expressed in hepatocellular carcinoma tissues, and its up regulation can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and promote cell apoptosis. OATP1B3 may be a tumor suppressor gene, which plays an important role in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma.

Key words: OATP1B3; Hepatocellular carcinoma; Clinicopathological characteristics; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)22-4223-07

前言

肝细胞癌(肝癌)是常见的消化系统恶性肿瘤,在我国发病率和死亡率极高^[1,2]。肝癌的主要治疗手段包括手术、射频消融术、肝移植、血管介入治疗、放射治疗、化学治疗和生物免疫治

疗等,但 5 年生存率仍不尽如人意^[3,4]。肝癌发生、发展、复发和转移等生物学过程的确切机制不明确是导致其治疗效果不佳的主要原因。有机阴离子转运多肽 1B3(OATP1B3)是表达在肝细胞窦状隙侧细胞膜上的一种转运蛋白,具有 12 个跨膜结构域,属于溶质转运体(SLC)超家族,能将多种内外源性物质(胆

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划科研项目(LHGJ20210807)

作者简介:陈施翰(1990-),男,博士,主治医师,从事肝癌基础与临床研究工作,E-mail:chenshihan988@163.com

Δ 通讯作者:王全晖(1976-),男,博士,副主任医师,从事肝胆肿瘤临床研究,E-mail:wangqh1016@sina.com

(收稿日期:2023-06-06 接受日期:2023-06-30)

红素、前列腺素、类花生酸、胆酸盐、甲状腺激素、甲氨蝶定、紫杉醇、钆塞酸二钠等)从细胞外转运入细胞内^[5,6]。越来越多的研究发现,OATP1B3在结直肠癌^[7]、乳腺癌^[8]、前列腺癌^[9]、胰腺癌^[10]等多种肿瘤中异常表达,且与肿瘤的发生密切相关。已有研究报道OATP1B3在肝细胞癌中表达显著下调,并与肿瘤分化程度相关^[11],然而,OATP1B3在其中发挥何种作用仍不得而知。本研究通过检测OATP1B3在肝癌组织中的表达情况,并通过体外实验研究OATP1B3表达对肝癌细胞系增殖和凋亡的影响,以期对肝癌的防治提供新线索。

1 材料和方法

1.1 临床资料

回顾性收集60例2020年7月-2020年12月在陆军军医大学第一附属医院肝胆外科行根治性肝癌切除术的肝癌及相应癌旁组织样本,纳入标准:①术前患者均未行放、化疗等其他抗肿瘤治疗;②均为根治性肝癌切除术;③术后病理均证实为肝细胞癌。将每一例手术切除的新鲜肝癌组织及癌旁组织样本切分为两部分,一部分组织样本福尔马林固定后石蜡包埋以待切片,另一部分组织迅速放入液氮,-80℃冰箱冷冻保存。患者相关临床信息见表1。本研究已经通过陆军军医大学第一附属医院伦理委员会批准(KY201972),所有患者已签署知情同意书。

1.2 主要试剂

肝癌细胞株HepG2、Huh7、SMMC-7721及人永生化正常肝细胞L02为本实验室保存,胎牛血清(FBS)、高糖培养基(DMEM)、青-链霉素双抗购自Gibco公司,OATP1B3过表达慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建包装,BCA蛋白浓度测定试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司,OATP1B3抗体(ab222900和ab139120)购自Abcam公司,兔SP试剂盒(SP-9001)、山羊抗小鼠及抗兔IgG(H+L)、 β -actin抗体购自中杉金桥公司,RNA提取试剂、反转录试剂盒及聚合酶链式反应(PCR)试剂盒购自日本Takara公司,引物设计与合成由上海生物工程公司完成,细胞毒实验(MTT)细胞增殖检测试剂盒购自江苏凯基生物公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人肝癌细胞培养于含10%FBS的DMEM培养基中,放入5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养,每隔1-2天换液一次,当细胞生长密度超过80%时用0.25%胰酶消化2500rpm离心3min后传代,取对数期细胞进行实验。

1.3.2 免疫组化方法及评分原则 石蜡切片经60℃烤片、二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,柠檬酸盐缓冲液中进行抗原修复,加热至沸腾,维持10min,冷却至室温。滴加适量内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育10min,山羊血清工作液封闭15min,弃去血清,滴加OATP1B3抗体(1:200),4℃孵育过夜,次日滴加生物素标记的山羊抗兔IgG,室温孵育15min,再滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,室温孵育15min,DAB显色,苏木素复染后脱水,风干后中性树脂封片。采用人工计数法对免疫组化结果进行判读,由3名高年资病理科医生在光镜下独立完成,每个标本随机挑选5个视野进行观察(×400)。染色强度分4级:0分为无色,1分为淡黄色,2分为黄色,3分为棕黄色或棕褐色。按阳性细胞所占百分比打分,0-5%为0分,6%-25%为1分,26%-50%为2分,51%-75%为3分,>75%记4分。将两项指

标的数值相乘,得分0-4为低表达,得分5-12为高表达。

1.3.3 免疫印迹试验 (Western blot) 提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度。电泳,转膜,室温封闭1h,分别加入OATP1B3抗体(1:250)、内参 β -actin(1:1000),4℃孵育过夜,洗膜3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h,洗膜3次后,在凝胶成像系统下显影,保存图像。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) RNAiso Plus试剂提取总RNA,反转录为cDNA,利用特异性引物进行定量PCR扩增反应,OATP1B3正向引物:GGAGCAACAGTACG-GTCAGT,反向引物:TTCCAGTTGCAACCGTAGGAAT,扩增片段长度80bp; β -actin正向引物:CCTGGCACCCAGCA-CAA,反向引物:GGGCCGGACTCGTCATAC,扩增片段长度144bp,每组设定3个复孔。扩增条件:96℃预温5min,随后进行95℃5s,60℃30s和72℃30s的扩增,共40个循环,最后65℃延伸5min。

1.3.5 过表达慢病毒载体感染肝癌细胞 将处于对数生长期的HepG2和Huh7细胞按照6×10⁴/孔接种于24孔板中,培养24h后,每孔加入500 μ L慢病毒配合增强液(HitranSGP)稀释液,将过表达慢病毒及阴性对照慢病毒液以感染复数(MOI)为50(10 μ L)分别感染HepG2和Huh7细胞,共4组,分别为OATP1B3-OE1组、OE-NC1组、OATP1B3-OE2组和OE-NC2组。培养箱内孵育15h后更换新鲜培养液,3天后荧光显微镜下观察每组荧光强度。

1.3.6 MTT 细胞增殖检测 将空白组、OATP1B3过表达组及阴性对照组的HepG2和Huh7细胞接种于96孔板,每组设3个复孔,每24h检测一次。将20 μ L浓度为5mg/mL的MTT加到96孔板中,置入细胞培养箱中37℃孵育4h,弃去培养液,每孔加入150 μ L二甲亚砜(DMSO),低速震荡10min,在0、24h、48h和72h时间点用酶标仪分别检测各组在570nm波长下光密度值,代表细胞的增殖能力。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 按照前述实验分组,收集转染后细胞,用4℃预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞2次,500 μ L结合缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度至1×10⁵/mL,加Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)各5 μ L,室温避光静置15min后上机检测细胞凋亡率。

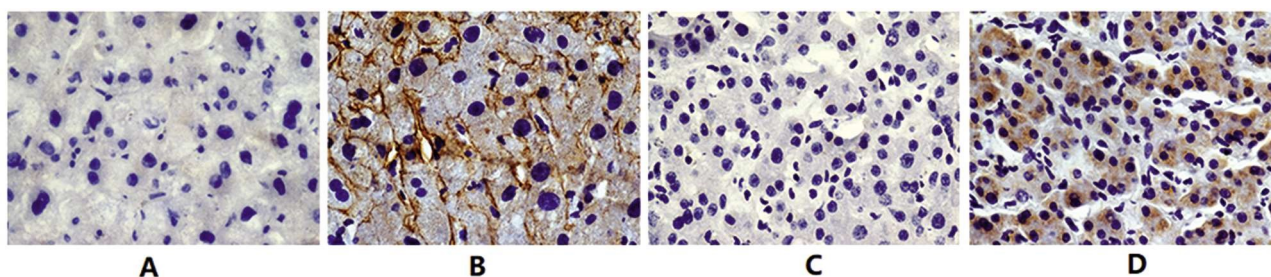
1.4 统计学方法

采用统计学软件SPSS 22.0进行数据分析,定量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布的两组数据比较采用t检验,OATP1B3表达与肝癌患者临床病理特征关系的分析采用卡方检验/Fisher's精确概率检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OATP1B3在肝癌组织中的表达水平低于癌旁组织

免疫组化染色结果显示:在60例肝癌组织样本中,有39例样本为OATP1B3低表达,余21例样本为高表达。而在13例癌旁组织样本中OATP1B3为低表达,余47例为高表达,因此,OATP1B3在肝癌组织中表达较癌旁组织低($\chi^2=22.941$, $P < 0.001$),见图1。为了验证OATP1B3免疫组化染色结果,随机选取8例冰冻肝癌组织及其配对癌旁组织用于Western blot检测,Western blot结果进一步证实OATP1B3蛋白在肝癌组织中的表达显著低于癌旁组织。见图2。

图1 肝癌和癌旁组织中 OATP1B3 免疫组化染色结果($\times 400$)Fig.1 Immunohistochemical staining results of OATP1B3 expression in hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues($\times 400$)

Note: A. Low expression of OATP1B3 in adjacent tissues; B. High expression of OATP1B3 in adjacent tissues; C. Low expression of OATP1B3 in hepatocellular carcinoma tissues; D. High expression of OATP1B3 in hepatocellular carcinoma tissues.

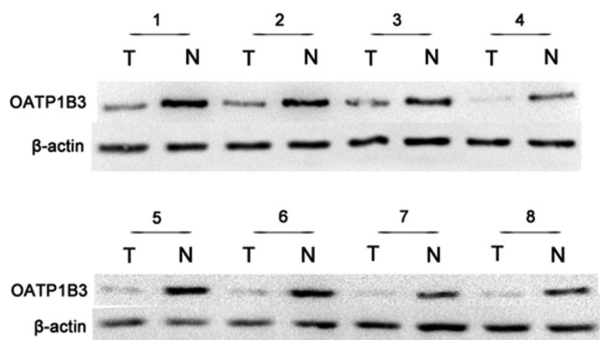


图2 肝癌和癌旁组织中 OATP1B3 蛋白的表达

Fig.2 OATP1B3 protein expression in hepatocellular carcinoma tissues and adjacent tissues

Note: T: Hepatocellular carcinoma tissues; N: Adjacent tissues.

2.2 OATP1B3 在肝癌组织中的表达水平与临床病理特征的关系

OATP1B3 蛋白表达水平与恶性肿瘤国际临床分期(TNM)分期、肿瘤分化程度、有无复发有关,差异有统计学意义($P<0.05$),而与年龄、性别、肿瘤大小、血清甲胎蛋白(AFP)水平、有无血管侵犯、肿瘤数目和有无肿瘤包膜等无关($P>0.05$),见表1。

2.3 OATP1B3 mRNA 在不同肝癌细胞系中的表达

通过 qRT-PCR 法检测 OATP1B3 mRNA 在肝癌细胞株 HepG2、Huh7、SMMC-7721 及人永生正常肝细胞 L02 中的表达情况,OATP1B3 mRNA 在 L02 细胞株中表达量最高,在 Huh7 细胞株中表达量最低,见图3。因此选择在肝癌细胞株中表达量相对较低的 HepG2 和 Huh7 细胞株用于后续研究。

2.4 过表达 OATP1B3 可抑制肝癌细胞的增殖

在 HepG2 和 Huh7 细胞中分别感染 OATP1B3 过表达慢病毒 OATP1B3-OE1 和 OATP1B3-OE2 及其阴性对照 OE-NC1、OE-NC2。qRT-PCR 检测各组感染慢病毒后 OATP1B3 过表达效果,结果显示,OATP1B3-OE1 组 HepG2 细胞中 OATP1B3 表达水平(46.43 ± 6.57)明显上升,高于 OE-NC1 阴性对照组(1.31 ± 0.19)($P<0.01$);OATP1B3-OE2 组 Huh7 细胞中 OATP1B3 表达水平(20.78 ± 1.39)显著高于 OE-NC2 阴性对照组(1.91 ± 0.31)($P<0.01$),见图4。为观察 OATP1B3 对肝癌细胞增殖的影响,通过 MTT 法检测细胞的增殖能力,结果发现在 24 h、48 h、72 h 时间点,OATP1B3-OE1 组 HepG2 细胞的光密度(OD)值(0.51 ± 0.01 、 1.02 ± 0.12 、 1.49 ± 0.09)均显著低于 OE-NC1 阴性对照组(0.73 ± 0.03 、 $1.60 \pm$

0.07 、 2.50 ± 0.13)($P<0.01$);在上述时间点上,OATP1B3-OE2 组 Huh7 细胞的 OD 值(0.34 ± 0.02 、 0.63 ± 0.01 、 0.97 ± 0.07)也分别显著低于 OE-NC2 阴性对照组(0.50 ± 0.03 、 1.04 ± 0.11 、 1.51 ± 0.09)($P<0.01$);而 HepG2 和 Huh7 细胞空白对照组(0.77 ± 0.05 、 1.69 ± 0.08 、 2.66 ± 0.08 ; 0.51 ± 0.05 、 1.11 ± 0.09 、 1.54 ± 0.07)和阴性对照组(同前)在各时间点相比,差异均无统计学意义($P>0.05$),见图5,说明 OATP1B3 过表达导致 HepG2 和 Huh7 细胞增殖速率减慢。

2.5 过表达 OATP1B3 可促进肝癌细胞凋亡

流式细胞仪检测细胞凋亡情况,OE-NC1 阴性对照组 HepG2 细胞的总凋亡率(16.47 ± 0.38)%显著低于 OATP1B3-OE1 组(21.77 ± 0.67)%($P<0.01$);且 OATP1B3-OE2 组 Huh7 细胞的总凋亡率(19.59 ± 0.74)%显著高于 OE-NC2 阴性对照组(12.61 ± 0.41)%($P<0.01$)。结果表明 OATP1B3 过表达后,HepG2 和 Huh7 细胞凋亡增加,所以 OATP1B3 可抑制肝癌生存,见图6。

3 讨论

OATP1B3 的编码基因定位于人类 12 号染色体 1 区 2 带,可编码 702 个氨基酸,其跨膜结构包含 5 个细胞内环和 6 个细胞外环,其氨基端与羧基端均位于细胞内侧。OATP1B3 可通过 Na^+ 和腺苷三磷酸(ATP)非依赖方式将内外源性物质从高浓度的细胞外侧转运入低浓度的细胞内侧进行代谢^[5,12]。从肿瘤耐药角度,OATP1B3 高表达会导致前列腺癌去势治疗产生耐药,细胞色素 P450 17(CYP17)抑制剂阿比特龙可下调微小核糖核酸 579-3p(miR-579-3p)诱导前列腺癌中 OATP1B3 表达增加^[13]。从基因工程的角度,OATP1B3 可作为磁共振成像(MRI)报告基因递送到靶细胞内,避免病毒载体引发的副作用^[14,15],结合高分辨率和高灵敏度的检测手段追踪癌细胞在体内的扩散情况^[16]。从生物治疗的角度,近红外光疗技术可通过吡啶青绿的光动力和光热效应诱导 OATP1B3 高表达的纤维肉瘤同时发生凋亡和铁死亡,由此设想将吡啶青绿靶向表达 OATP1B3 的癌症细胞,通过成像方式观察这些肿瘤细胞,并将其杀死,可能是一种有益的癌症治疗策略^[17]。近些年来,关于 OATP1B3 表达与肿瘤密切关系的研究逐渐引起研究人员们的重视。已有相当部分研究支持 OATP1B3 可能成为肿瘤早期生物学标志物,并影响肿瘤进展^[18-21]。278 例结肠癌组织芯片结果表明,OATP1B3 阳性组患者术后复发率更低,生存时间明显更长,说明结肠癌中

表 1 OATP1B3 蛋白差异表达水平与肝癌患者各临床病理参数的关系

Table 1 The relationship between differential expression level of OATP1B3 protein and various clinical pathological parameters in hepatocellular carcinoma patients

Clinicopathological parameters		n	OATP1B3 Low	OATP1B3 High	χ^2	P
Age (yr)	≥ 50	26	16	10	0.242	0.623
	<50	34	23	11		
Sex	Male	49	31	18	0.354	0.552
	Female	11	8	3		
Tumor size (cm)	≥ 5	41	28	13	0.617	0.432
	<5	19	11	8		
TNM stage	I, II	27	13	14	6.128	0.013
	III, IV	33	26	7		
	Well	2	0	2		
Tumor differentiation	Moderate	52	33	19	6.243	0.035
	Poor	6	6	0		
Serum AFP	≥ 20 ng/mL	39	26	13	0.136	0.712
	<20 ng/mL	21	13	8		
Recurrence	Yes	52	37	15	4.622	0.032
	No	8	2	6		
Invasion	Yes	24	17	7	0.598	0.439
	No	26	22	14		
Tumor number	Single	42	26	16	0.590	0.443
	Multiple	18	13	5		
Tumor capsule	Yes	19	13	6	0.143	0.705
	No	41	26	15		

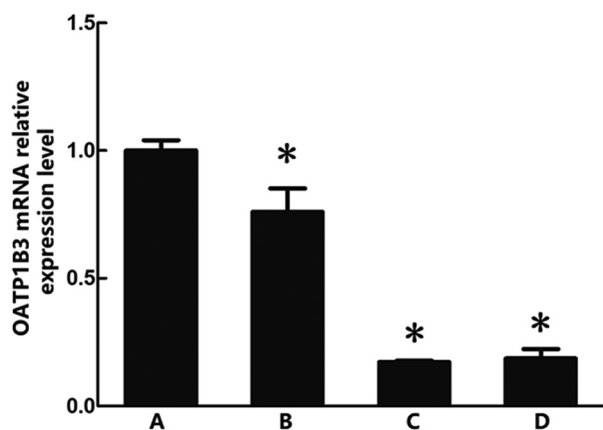


图 3 OATP1B3 mRNA 在不同肝癌细胞中的表达

Fig.3 The expression of OATP1B3 mRNA in different hepatocellular carcinoma cell lines

Note: A. L02; B. SMMC-7721; C. Huh7; D. HepG2. compared with L02, * $P<0.01$.

OATP1B3 表达与患者预后显著相关^[18]。在雌激素受体阳性 (ER+) 的乳腺癌患者中, OATP1B3 低表达组预后更差, 复发率更高^[21]。Lee 等^[22]的研究发现过表达 OATP1B3 可以通过抑制细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 P21 (P21WAF1)、烟酰胺腺嘌呤

二核苷酸磷酸氧化酶 A (NOXA) 和 p53 上调凋亡调节因子重组蛋白 (PUMA) 基因转录, 抑制结肠癌细胞凋亡, 降低化疗敏感性, 说明 OATP1B3 有利于结肠癌细胞生存。然而, 目前关于该基因与肝癌的关系研究较少。

本研究结果显示, 免疫组化染色和 Western blot 结果均提示, OATP1B3 在肝癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织, 与之前的报道相一致^[23]。在 OATP1B3 表达水平与肿瘤 TNM 分期的关系研究中, OATP1B3 在 I、II 期乳腺癌患者癌组织中的表达显著高于 III 期患^[21]。在胰腺癌中, I 期患者癌组织中 OATP1B3 明显高于 II 期, III 期几乎未见表达, OATP1B3 有望成为早期胰腺癌的肿瘤学标志物^[20]。与上述现象类似, 本研究发现, 肝癌组织中 OATP1B3 蛋白的表达量与 TNM 分期也显著相关, 高表达 OATP1B3 蛋白的肝癌患者肿瘤 TNM 分期较早。此外, OATP1B3 蛋白表达水平与肝癌分化程度、是否复发也显著相关, 高表达 OATP1B3 蛋白的肝癌患者肿瘤分化程度较高, 复发率更低。这之前 OATP1B3 表达增加, 肝癌分化程度增加的报道相一致^[11], 又因 OATP1B3 是造影剂钆塞酸二钠进入肝细胞的主要转运体, OATP1B3 在肝细胞癌中的表达水平可以预测肝癌细胞摄取钆塞酸二钠的程度, 并与磁共振肝胆期信号强度与增强率密切相关^[24], 上述结果也支持了 Kim 关于

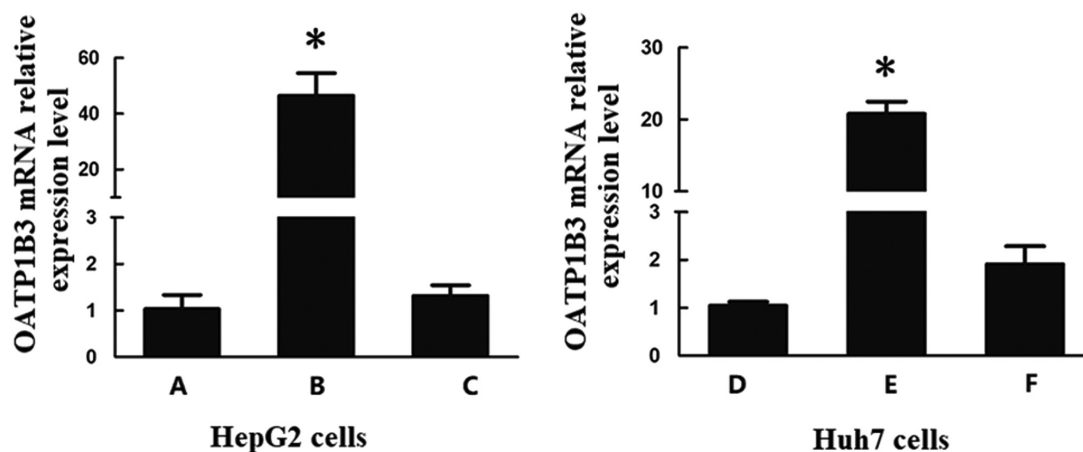


图4 OATP1B3 过表达效果鉴定

Fig.4 Identification of overexpression effect of OATP1B3

Note: A.blank group, B.OATP1B3-OE1 group, C.OE-NC1 group, compared with OE-NC1 group, $*P<0.01$; D.blank group, E.OATP1B3-OE2 group, F.OE-NC2 group, compared with OE-NC2 group, $*P<0.01$.

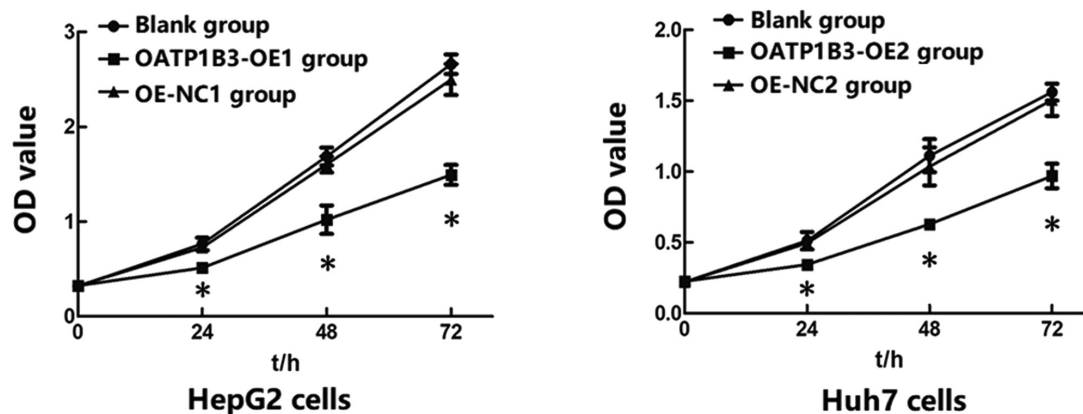


图5 过表达 OATP1B3 对肝癌细胞增殖的影响

Fig.5 The effect of OATP1B3 overexpression on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

Note: compared between OATP1B3-OE1 group and OE-NC1 group at 24, 48, and 72 hours $*P<0.01$; compared between OATP1B3-OE2 group and OE-NC2 group at 24, 48, and 72 hours, $*P<0.01$.

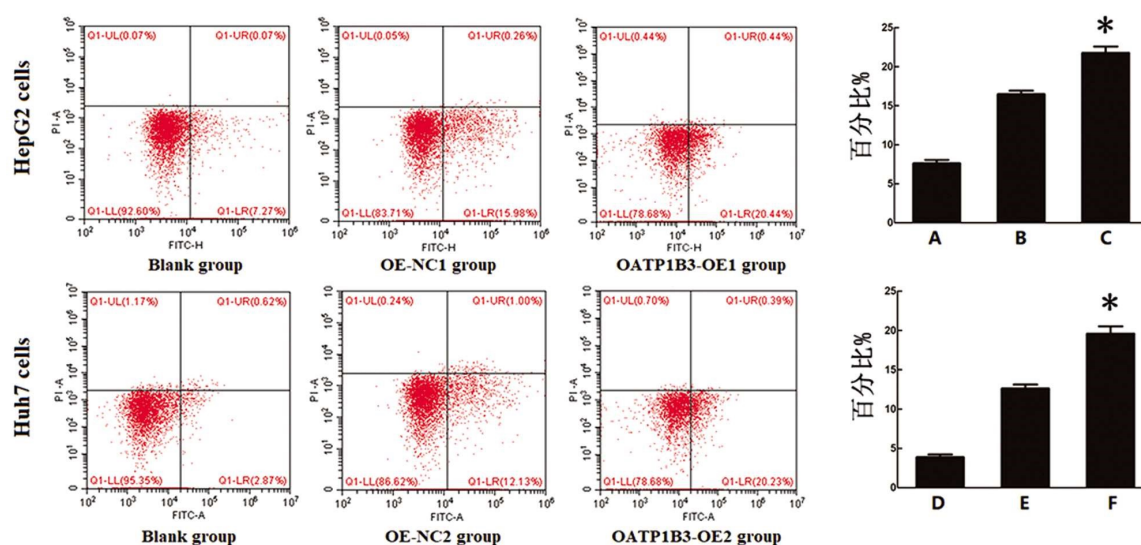


图6 OATP1B3 对 HepG2 和 Huh7 细胞凋亡的影响

Fig.6 The effect of OATP1B3 on apoptosis of HepG2 and Huh7 cells

Note: A.blank group, B.OATP1B3-OE1 group, C.OE-NC1 group, compared with OE-NC1 group, $*P<0.01$; D.blank group, E.OATP1B3-OE2 group, F.OE-NC2 group, compared with OE-NC2 group, $*P<0.01$.

通过影像学钆塞酸二钠增强的磁共振的方法无创预测肝癌组织分化程度的观点^[25]。因此,我们推测 OATP1B3 有望成为临床上一个用于肝癌病情预测和疗效评价的潜在参考指标。

值得注意的是,我们的组化染色结果发现与 OATP1B3 蛋白仅表达在正常肝细胞膜上不同,在肝癌中 OATP1B3 蛋白不仅表达在细胞膜上,在细胞质中同样有表达。出现这一现象的原因我们猜测可能肝癌组织种有一定量的肿瘤型 OATP1B3 (ct-OATP1B3)蛋白表达有关,ct-OATP1B3 的转录起始位点在肝脏型 OATP1B3(lt-OATP1B3)第 2 号内含子中,ct-OATP1B3 mRNA 比 lt-OATP1B3 mRNA 少 1 个外显子,仅有 14 个外显子,且 ct-OATP1B3 氨基酸比 lt-OATP1B3 少 28 个,只有 674 个,有学者认为 ct-OATP1B3 蛋白主要表达在肿瘤的细胞质中,且物质转运能力不及 lt-OATP1B3^[26]。目前虽然 ct-OATP1B3 mRNA 的存在已得到公认^[8],然而 ct-OATP1B3 蛋白是否存在目前尚有争议^[27],但已有大量关于 ct-OATP1B3 与肿瘤进展及预后相关的研究报道^[28,29]。ct-OATP1B3 可显著提高非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭能力,通过上调间质标志物 N 型神经钙粘素(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin),下调 E 型神经钙粘素(E-cadherin),促进 EMT 的发生,而对细胞凋亡和周期无明显影响^[30]。与此同时,在卵巢癌细胞中也观察到 ct-OATP1B3 可促进人胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2 (IGF2BP2)同源二聚体的形成,诱导肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A (CPT1A)和席夫酮氧化还原酶亚单位 A2(NDUFA2)上调,增强卵巢癌细胞长链脂肪醇氧化酶 (FAO) 和线粒体氧化磷酸化酶 (OXPHOS)的活性,促进侵袭性伪足形成^[31]。目前市面上购买不到专门针对 ct-OATP1B3 的商品化的蛋白抗体^[9],因此,本研究免疫组化和 Western blot 既能检测到 ct-OATP1B3,也能检测到 lt-OATP1B3,即总 OATP1B3 表达水平。后续我们的研究将深入阐明肝癌组织中 lt-OATP1B3 与 ct-OATP1B3 的比率,并设法对二者的功能分别进行研究。

为了进一步研究 OATP1B3 在肝癌中的作用,我们选取了 OATP1B3 表达量较低的两株细胞 HepG2 和 Huh7 为对象,观察过表达 OATP1B3 对细胞增殖及凋亡的影响。结果发现,与阴性对照组相比,OATP1B3 表达上调,显著抑制细胞增殖活性,同时细胞凋亡率明显增加,说明 OATP1B3 在肝癌中可能扮演 " 抑癌 " 作用,与 OATP1B3 抑制结肠癌细胞凋亡的 " 促癌 " 作用相反^[32],OATP1B3 在不同肿瘤中发挥着不同功能,这背后的具体机制有待进一步探究。

综上所述,OATP1B3 在肝癌中表达下调,通过体外上调 OATP1B3 表达可以抑制肝癌细胞增殖,促进细胞凋亡。本研究为进一步探讨 OATP1B3 在肝癌抑癌作用中的相关机制奠定了基础,并为肝癌治疗策略的制定提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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
- [3] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362
- [4] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular Carcinoma: New Developments [J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85-102
- [5] Li TT, An JX, Xu JY, et al. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver[J]. World J Clin Cases, 2019, 7(23): 3915-3933
- [6] Anabtawi N, Drabison T, Hu S, et al. The role of OATP1B1 and OATP1B3 transporter polymorphisms in drug disposition and response to anticancer drugs: a review of the recent literature [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2022, 18(7-8): 459-468
- [7] Haberkorn B, Lowen D, Meier L, et al. Transcriptional Regulation of Liver-Type OATP1B3 (Lt-OATP1B3) and Cancer-Type OATP1B3 (Ct-OATP1B3) Studied in Hepatocyte-Derived and Colon Cancer-Derived Cell Lines[J]. Pharmaceuticals, 2023, 15(3)
- [8] Alam K, Farasyn T, Ding K, et al. Characterization of Liver- and Cancer-type-Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B3 Messenger RNA Expression in Normal and Cancerous Human Tissues[J]. Drug Metab Lett, 2018, 12(1): 24-32
- [9] Lochrin SE, Turkbey B, Gasmi B, et al. Pilot study of gadoxetate disodium-enhanced mri for localized and metastatic prostate cancers [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5662
- [10] Kounnis V, Chondrogiannis G, Mantzaris MD, et al. Microcystin LR Shows Cytotoxic Activity Against Pancreatic Cancer Cells Expressing the Membrane OATP1B1 and OATP1B3 Transporters[J]. Anticancer Res, 2015, 35(11): 5857-5865
- [11] Kitao A, Matsui O, Yoneda N, et al. Gadoteric acid-enhanced MR imaging for hepatocellular carcinoma: molecular and genetic background[J]. Eur Radiol, 2020, 30(6): 3438-3447
- [12] Schulte RR, Ho RH. Organic Anion Transporting Polypeptides: Emerging Roles in Cancer Pharmacology [J]. Mol Pharmacol, 2019, 95(5): 490-506
- [13] Barbier RH, Mccrea EM, Lee KY, et al. Abiraterone induces SLCO1B3 expression in prostate cancer via microRNA-579-3p[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10765
- [14] Baek SE, Ul-Haq A, Kim DH, et al. Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3 Applied as an MRI-Based Reporter Gene[J]. Korean J Radiol, 2020, 21(6): 726-735
- [15] Wu MR, Liu HM, Lu CW, et al. Organic anion-transporting polypeptide 1B3 as a dual reporter gene for fluorescence and magnetic resonance imaging[J]. FASEB J, 2018, 32(3): 1705-1715
- [16] Nystrom NN, Mcrae SW, Martinez FM, et al. A Genetically Encoded Magnetic Resonance Imaging Reporter Enables Sensitive Detection and Tracking of Spontaneous Metastases in Deep Tissues [J]. Cancer Res, 2023, 83(5): 673-685
- [17] Tseng HC, Kuo CY, Liao WT, et al. Indocyanine green as a near-infrared theranostic agent for ferroptosis and apoptosis-based, photothermal, and photodynamic cancer therapy[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1045885
- [18] Lockhart AC, Harris E, Lafleur B J, et al. Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2008, 1: 1-7
- [19] Hamada A, Sissung T, Price DK, et al. Effect of SLCO1B3 haplotype

- on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(11): 3312-3318
- [20] Hays A, Apte U, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in pancreatic cancer may serve as potential diagnostic markers and therapeutic targets for early stage adenocarcinomas[J]. Pharm Res, 2013, 30(9): 2260-2269
- [21] Muto M, Onogawa T, Suzuki T, et al. Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(10): 1570-1576
- [22] Lee W, Belkhir A, Lockhart AC, et al. Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(24): 10315-10323
- [23] Ueno A, Masugi Y, Yamazaki K, et al. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/beta-catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2014, 61(5): 1080-1087
- [24] Zhou X, Long L, Mo Z, et al. OATP1B3 Expression in Hepatocellular Carcinoma Correlates with Intravenous Gd-EOB-DTPA Uptake and Signal Intensity on Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 1169-1177
- [25] Kim HY, Choi JY, Kim CW, et al. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging predicts the histological grade of hepatocellular carcinoma only in patients with Child-Pugh class A cirrhosis [J]. Liver Transpl, 2012, 18(7): 850-857
- [26] Thakkar N, Kim K, Jang ER, et al. A cancer-specific variant of the SLC01B3 gene encodes a novel human organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) localized mainly in the cytoplasm of colon and pancreatic cancer cells [J]. Mol Pharm, 2013, 10(1): 406-416
- [27] Furihata T, Sun Y, Chiba K. Cancer-type Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3: Current Knowledge of the Gene Structure, Expression Profile, Functional Implications and Future Perspectives [J]. Curr Drug Metab, 2015, 16(6): 474-485
- [28] Sun Y, Harada M, Shimozato O, et al. Cancer-type OATP1B3 mRNA has the potential to become a detection and prognostic biomarker for human colorectal cancer[J]. Biomark Med, 2017, 11(8): 629-639
- [29] Morio H, Sun Y, Harada M, et al. Cancer-Type OATP1B3 mRNA in Extracellular Vesicles as a Promising Candidate for a Serum-Based Colorectal Cancer Biomarker [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(3): 445-449
- [30] 郑玉洁, 李亚霖, 吴兰香. Ct-OATP1B3 对人非小细胞肺癌细胞增殖、周期、凋亡、侵袭的影响及其机制[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(Z1): 2039-2050
- [31] Huang Y, Du Y, Zheng Y, et al. Ct-OATP1B3 promotes high-grade serous ovarian cancer metastasis by regulation of fatty acid beta-oxidation and oxidative phosphorylation [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(6): 556

(上接第 4256 页)

- [20] Xiao X, Tang W, Yuan Q, et al. Epigenetic repression of Krüppel-like factor 4 through Dnmt1 contributes to EMT in renal fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2015, 35(6): 1596-1602
- [21] Luo DD, Zhao F. KLF4 suppresses the proliferation and metastasis of NSCLC cells via inhibition of MSI2 and regulation of the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. Transl Oncol, 2022, 22: 101396
- [22] Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT [J]. Nature, 2018, 556(7702): 463-468
- [23] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196
- [24] 张霞, 李惠萍. 上皮间质转化的分子标志物 [J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(17): 1358-1361
- [25] Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(35): 4769-4780
- [26] Paulin D, Lilienbaum A, Kardjian S, et al. Vimentin: Regulation and pathogenesis[J]. Biochimie, 2022, 52(197): 96-112