

# 多巴胺受体 1 在肝细胞癌中的表达与预后的关系及其对肝癌细胞增殖的影响

严 俨<sup>1,3</sup>, 潘家浩<sup>1</sup>, 陈东泰<sup>1</sup>, 陈泳花<sup>1</sup>, 元云飞<sup>2</sup>, 曾维安<sup>1\*</sup>

(1,2. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 麻醉科<sup>1</sup>, 肝胆科<sup>2</sup>, 广东 广州 510060;  
3. 惠州市中心人民医院, 广东 惠州 516001)

**摘要:**【目的】通过探讨多巴胺受体 1(DRD1)蛋白在肝细胞癌组织的表达,分析其与肝癌患者临床病理因素及预后的关系,初步探讨 DRD1 的激动剂 SKF38393 和拮抗剂 SCH23390 对肝癌细胞株 HepG2 增殖的影响。【方法】采用免疫组织化学方法检测 147 例肝细胞癌组织中 DRD1 蛋白的表达情况,通过统计分析其与临床病理因素和预后的关系,同时使用 SKF38393 和 SCH23390 分别作用于肝癌细胞 HepG2,利用细胞增殖实验检测其对细胞增殖率的影响。【结果】在 147 例肝细胞癌组织中 DRD1 阳性表达的有 89 例(60.5%);相关性分析结果显示,DRD1 在肝癌中高表达与乙肝表面抗原以及血管侵犯相关( $P < 0.05$ )。DRD1 蛋白阳性表达的患者无复发生存期( $P < 0.05$ )与总生存期( $P < 0.001$ )明显较短。Cox 多因素分析结果揭示,DRD1 表达水平是肝癌患者术后无复发生存期独立危险因素之一( $P < 0.05$ ),且具有重要的预后预测价值。肝癌细胞 HepG2 的细胞增殖实验结果表明 SCH23390 明显抑制 HepG2 增殖( $P < 0.05$ );SKF38393 明显促进 HepG2 增殖( $P < 0.05$ )。【结论】DRD1 蛋白在肝细胞癌组织中表达阳性与侵袭转移相关;DRD1 可作为预测肝癌患者预后的独立分子标志物;DRD1 可能与肝癌细胞的增殖相关。

**关键词:**肝细胞癌;多巴胺受体 1;肝癌细胞株 HepG2;Cox 多因素分析;预后;细胞增殖

**中图分类号:**R738.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2015)06-0833-08

## Correlation of the Expression of Dopamine Receptor 1 with Clinicopathological Parameters in Human Hepatocellular Carcinomas and Its Affection on the Proliferation of HepG2 Hepatoma Carcinoma Cell

YAN Yan<sup>1,3</sup>, PAN Jia-hao<sup>1</sup>, CHEN Dong-tai<sup>1</sup>, CHEN Yong-hua<sup>1</sup>, YUAN Yun-fei<sup>2</sup>, ZENG Wei-an<sup>1\*</sup>

(1.Department of Anesthesiology, 2.Department of Hepatobiliary Oncology, Key Laboratory of Oncology in South China // Cancer Center of Sun Yat-sun University, Guangzhou 510060, China; 3.Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, China)

Corresponding to: ZEHG Wei-an, E-mail: zengwa@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 This study aims to investigate the correlation of DRD1 protein expression with clinicopathological characteristics and the prognosis in human hepatocellular carcinomas(HCC), and investigate the impact on the proliferation of HepG2 with the agonist SKF38393 and the antagonist SCH23390. 【Methods】 The method of immunohistochemistry was utilized to examine protein expression of DRD1 in 147 cases of HCC tissues. The clinical/prognosis significance of DRD1 expression was statistically analyzed and test the proliferation of HepG2 by cell proliferation assay after the treatment of SKF38393 and SCH23390. 【Results】 High expression of DRD1 was observed in 89 of 147 (60.5%) of HCC. Correlation analysis demonstrated that high expression of DRD1 in HCC was significantly correlated with HBsAg and vascular invasion ( $P < 0.05$ ). In addition, DRD1-positive expression was associated with poor recurrence-free survival (RFS) ( $P < 0.05$ ) and overall survival (OS) ( $P < 0.001$ ). Importantly, DRD1 expression was significant independent factor for RFS in HCC in Cox multivariate analysis ( $P < 0.05$ ), and had certain prognostic value. The result of the experiment about the proliferation of HepG2 indicated that SCH23390 inhibit the proliferation of HepG2, while

收稿日期:2015-05-05

基金项目:国家自然科学基金(30972849)

作者简介:严俨,硕士生,E-mail: 670589857@qq.com; \* 曾维安,通信作者,教授,博士生导师,E-mail: zengwa@mail.sysu.edu.cn

SKF38393 promote the proliferation of HepG2 apparently ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】 The findings provide evidence that intensive expression of DRD1 might be important in the tumor differentiation, invasive and metastasis of HCC, and serve as independent biomarker to predict the HCC prognosis. DRD1 might relate to the proliferation of hepatocellular carcinomas cell.

**Key words:** human hepatocellular carcinomas; DRD1 protein; Cox multivariate analysis; prognosis; proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2015, 36(6): 833-840]

肝细胞癌是世界上第五大恶性肿瘤以及世界上第三大常见肿瘤相关性死亡的肿瘤,占肝脏原发性恶性肿瘤超过 2/3,每年有超过 50 万例新病例,其中有 75%在亚太地区<sup>[1]</sup>。肝细胞癌的发生、发展以及转移的过程复杂,而由于异常信号通路所引起的细胞异常增值和凋亡是其重要的因素之一。多巴胺受体 1(dopamine receptor D1, DRD1)是由 7 个跨膜区域组成的 G 蛋白偶联受体<sup>[2]</sup>,不仅在人体多个系统、疼痛等发挥着重要的作用,而且可以通过正性调节细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平,进一步激活蛋白激酶 A(PKA),同时调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,参与细胞的增殖和凋亡<sup>[3]</sup>。近年研究发现多巴胺受体抑制剂可改善恶性肿瘤的预后和复发,多巴胺受体有可能成为肿瘤治疗的靶点<sup>[4]</sup>,而其中 DRD1 的相关研究较少,在肝癌中的作用还未见报道。该研究主要通过免疫组织化学技术检测 DRD1 蛋白在肝细胞癌组织的表达,并通过 DRD1 的特异性激动剂 SKF38393 以及拮抗剂 SCH23390 对肝细胞株 HepG2 的细胞增殖率影响,从而初步探讨 DRD1 影响肝癌增殖中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料和标本

147 例肝细胞癌的石蜡标本,收集自中山大学肿瘤防治中心肝胆科 2002 年 1 月至 2003 年 12 月期间行肝癌手术切除术的患者,所有的患者术前均未接受各种肿瘤相关治疗,如放、化疗等,都采用肝癌根治性手术切除的方式,并经术后病理检查诊断证实为肝细胞癌。出院后定期采用信件、电话或病历跟踪等方式进行随访。在 147 例肝癌患者中,有男性 125 例,女性 22 例;年龄在 20~77 岁,中位年龄为 50 岁。

### 1.2 人细胞系

肝癌细胞系 HepG2、QGY7703、SMMC7721、

LO2,来自中山大学肿瘤防治中心肝胆外科。细胞系培养于在含有体积分数为 100 mL/L 的胎牛血清(Gibco)、100 g/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 DMEM(高糖)培养基(Gibco)中,置于湿度 85%、恒温 37 ℃、体积分数为 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中连续传代培养。

### 1.3 试剂

兔抗人 DRD1 多克隆抗体(LS-A44, 1:200 稀释),购自 LifeSpan Biosciences 公司;免疫组织化学检测试剂盒为 EnVision 超敏试剂盒(Cat. NO: GK500710),购自 Gene Tech 公司;DRD1 激动剂 SKF38393(S101 5 mg),购自 Sigma-Aldrich 公司;DRD1 拮抗剂 SCH23390(D054 5 mg),购自 Sigma-Aldrich 公司;细胞增殖-毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8),购自同濟化工研究所。

### 1.4 免疫组化检测肝癌中 DRD1 蛋白的表达

每个肝癌标本用体积分数 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋后,按 5 μm 规格连续切片,贴于防脱玻片上备用。标本玻片经 60 ℃烘烤 2 h 后,陆续二甲苯脱蜡、梯度酒精水化;然后用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性的过氧化物酶 45 min, PBS 多次冲洗;玻片放置在 CB 液(pH = 6.0)中,高压抗原修复 10 min,室温冷却 30 min;室温下孵育山羊血清封闭非免疫性反应 60 min;兔抗人 DRD1 多克隆抗体 4 ℃孵育过夜, PBS 多次冲洗;在 37 ℃温箱中孵育二抗 30 min, PBS 多次冲洗;DAB 显色(B 液:C 液=1:50);苏木素染细胞核后用中性树脂封片。以已知染色强阳性玻片作为阳性对照;PBS 作为一抗孵育过夜作为阴性对照。标本染色结果均采用盲法,由两位经过正规培训的病理科医生在不给予其他相关临床资料的情况下单独阅片评分。以显微镜下评估阳性细胞的比例与阳性细胞的染色强度作为判定标准。在标本细胞中,若细胞浆呈棕黄至棕褐色颗粒反应的为阳性细胞;每个标本随机选择 5 个视野,每个视野在高倍镜下(200×)下计数 100 个细胞,算出阳性细胞的比例,并按以下标准评分:阳性细胞的比例 < 10%者

为0分,10%~30%者为1分,31%~50%者为2分,>50%者为3分;同时按染色强度再次评分:无色为0分;淡黄色为1分;棕黄色为2分;棕褐色为3分;最后每个标本的总分为两个评分的乘积,并将分数 $\geq 2$ 分定为阳性,<2分为阴性<sup>[5]</sup>。

### 1.5 免疫印迹检测肝癌细胞株中DRD1蛋白的表达

收集 HepG2、QGY7703、SMMC7721、LO2 细胞提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% SDS-PAGE 胶,各孔加入 15  $\mu\text{g}$  蛋白样品,凝胶电泳后蛋白转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次,4  $^{\circ}\text{C}$  DRD1 抗体 (1:500) 及 GAPDH 抗体(1:1 000)过夜。室温下孵育山羊抗兔抗体 1 h。用 ECL 显影曝光,图片经 Quantity One 软件分析灰度值。

### 1.6 肝细胞株 HepG2 细胞增殖实验

选用细胞状态较好的 HepG2 细胞配成 60 个/ $\mu\text{L}$  浓度的细胞悬液,96 孔培养板中选中央 35 个孔,每个种植 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,以 5 个孔为一组,共 7 组,分别是 SKF38393 (100、10、1  $\mu\text{mol/L}$ ) 3 组;SCH23390 (100、10、1  $\mu\text{mol/L}$ ) 3 组,对照组;另外在板中央取 5 个空白孔,加入不含细胞的培养基,作为空白组;细胞培养箱中培养 24 h 后,除空白组和对照组外,其余 6 组按照上述浓度加入药

物;培养 24 h 后,除空白组外,其余 7 组每个孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ,培养箱孵育 2 h 后,使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值  $A_{450\text{nm}}$ , 每组取均值,分别为  $A_s$ (药物组), $A_c$ (对照组), $A_b$ (空白组),每一组的细胞增殖率为  $[(A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100\%$ 。重复试验 3 次。

### 1.7 统计学方法

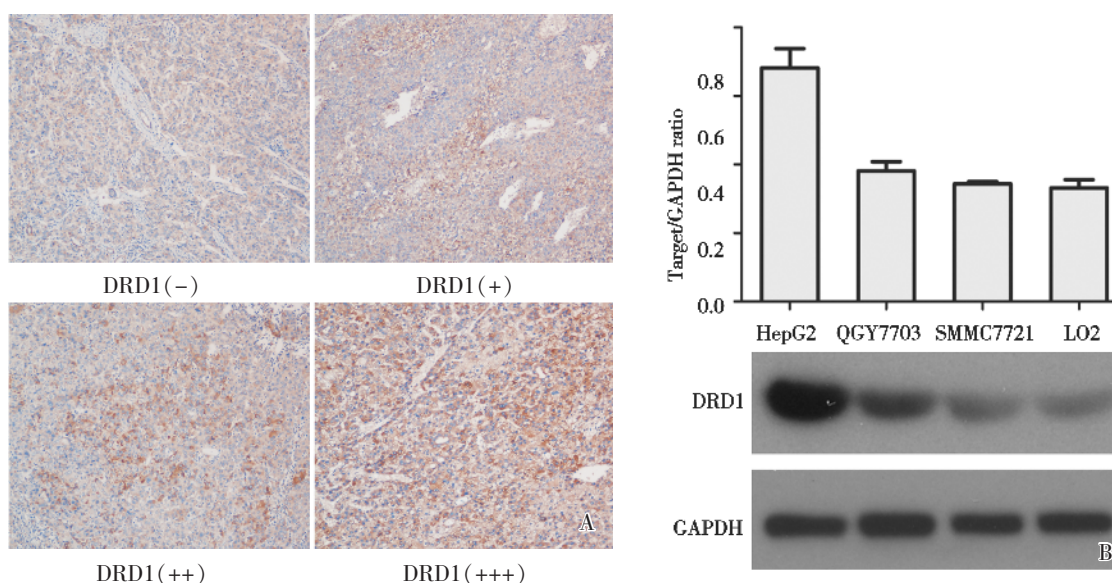
所有实验数据运用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析:采用  $\chi^2$  检验分析 DRD1 蛋白表达与临床病理因素的相关性;生存分析则采用 Kaplan-Meier 法计算;而单因素分析和多因素生存分析分别采用 Log-rank 法以及 Cox 回归模型;最后细胞增殖率采用独立样本  $t$  检验,所有分析均以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 随访结果

本研究的所有病例均有较完整的临床与随访资料,平均随访时间为 48 个月(5~81 个月)。截至末次随访时间(2012 年 10 月),出现复发或其他器官转移的病例占 61.9% (91/147);由肿瘤所导致的死亡病例占 59.9% (88/147)。

### 2.2 DRD1 蛋白在肝癌组织及肝癌细胞系中的表达



A: Negative (-) or weak (+) expression was considered as score < 2 and defined as negative expression; Moderate (++) or strong (+++) staining was considered as score  $\geq 2$  and defined as positive expression, magnification  $\times 200$ . B: Expression of DRD1 in HCC cell lines.

图 1 DRD1 在肝癌组织中的表达

Fig.1 Immunohistochemical staining of DRD1 protein expression in human hepatocellular carcinomas

经过免疫组织化学检测后,在 147 例肝癌标本中有 89 例(60.5%)为阳性表达 DRD1 蛋白,而阳性染色主要定位在肿瘤细胞的细胞浆,并呈不同染色强度的棕黄至棕褐色颗粒反应;DRD1 蛋白在肝癌组织中表达增高(图 1A)。通过免疫印迹方法检测肝癌细胞株 HepG2、QGY7703、SMMC7721、LO2 中 DRD1 的表达,结果显示肝癌细胞株 HepG2 中 DRD1 的表达较高(图 1B)。

### 2.3 DRD1 蛋白表达与肝癌患者临床病理因素的相关性

DRD1 蛋白在肝癌中高表达与乙肝表面抗原以及血管侵犯的相关性具有显著的统计学差异( $P < 0.05$ );而与肝癌患者的年龄、性别、肿瘤大小( $> 5$  cm)、肿瘤分化程度(III/IV 级)、无包膜、有卫星结节、术前 AFP、GGT 水平、术前 Child-Pugh 分级和肝硬化程度等因素的相关性无统计学意义( $P > 0.05$ ;表 1)。

### 2.4 147 例肝癌患者的无复发生存期及总生存期的单因素分析结果

该研究引入包括患者年龄、性别、乙肝表面抗原、术前 AFP 水平、GGT 水平、术前 Child-Pugh 分级、肿瘤大小、肿瘤分化程度、肿瘤包膜、卫星结节、血管侵犯和肝硬化程度等共 12 项可能影响肝癌切除术后患者生存的临床病理因素。结果,乙肝表面抗原、肿瘤大小、卫星结节、肝硬化程度均为可能影响因素( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 2.5 肝癌 DRD1 蛋白表达水平和无复发生存率与总生存率的关系

本研究采用 Kaplan-Meier 法分析 DRD1 蛋白与肝癌患者术后生存率的关系。表 2 结果显示不同 DRD1 表达水平的患者生存期有着明显差异,DRD1 蛋白阳性表达的患者无论是术后无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)还是总生存期(overall survival, OS)均较其阴性表达者短( $P < 0.05$ )。

在本次研究中 DRD1 蛋白表达阴性患者的中位生存期为(97.0 ± 5.9)个月,而 DRD1 蛋白表达阳性患者的中位生存期仅为(67.0 ± 4.1)个月,DRD1 表达阳性患者的中位生存期较短;肝癌中 DRD1 表达阳性的术后无复发生存率与总生存率较低,两者比较有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 2)。

### 2.6 147 例肝癌患者的无复发生存期及总生存期的 Cox 多因素分析结果

表 1 肝癌 DRD1 蛋白表达与临床病理因素的关系  
Table 1 Clinicopathological correlation of DRD1 protein expression in HCC [n(%)]

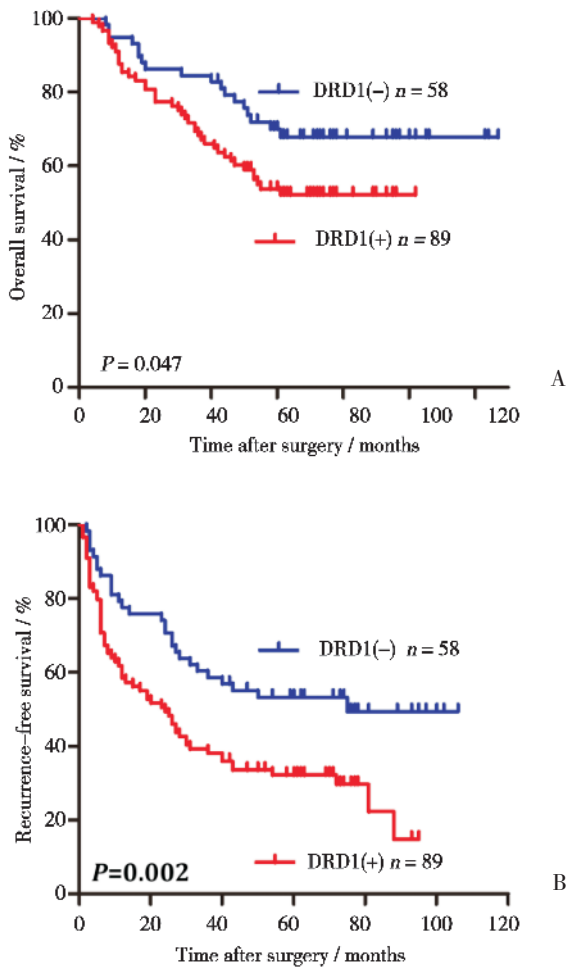
Characteristics	DRD1 protein			P value
	Cases	Negative expression	Positive expression	
Gender				0.082
Female	22	5(22.7)	17(77.3)	
Male	125	53(42.4)	72(57.6)	
Age/years				0.799
≤ 50	83	32(38.6)	51(61.4)	
> 50	64	26(40.6)	38(59.4)	
HBsAg				0.043
Negative	20	12(60.0)	8(40.0)	
Positive	127	46(36.2)	81(63.8)	
Child-Pugh classification <sup>1)</sup>				0.158
A	144	58(40.3)	86(59.7)	
B	3	0(0)	3(100)	
AFP/(ng/mL)				0.998
< 20	44	17(38.6)	27(61.4)	
20-400	37	14(35.1)	24(64.9)	
>400	66	26(39.4)	40(60.6)	
GGT/(U/L)				0.596
≤ 50	67	28(41.8)	39(58.2)	
> 50	80	30(37.5)	50(62.5)	
Tumor size/cm				0.508
≤ 5	61	26(46.0)	35(54.0)	
> 5	86	32(37.2)	54(62.8)	
Satellite nodule				0.113
No/incomplete	126	53(42.1)	73(57.9)	
Yes	21	5(23.8)	16(76.2)	
Tumor capsule				0.465
No	63	27(42.9)	36(57.1)	
Yes	84	31(36.9)	53(63.1)	
Vascular invasion				0.048
No	137	57(41.6)	80(58.4)	
Yes	10	1(10.0)	9(90.0)	
Cirrhosis				0.354
No	27	12(44.4)	15(55.6)	
Mild	70	23(32.9)	47(67.1)	
Moderate	46	24(52.2)	22(47.8)	
Severe	4	1(25.0)	3(75.0)	
Tumor differentiation				0.697
I/II	84	32(38.1)	52(61.9)	
III/IV	63	26(41.3)	37(58.7)	

1) no patients of Child-Pugh class C group

表 2 147 例肝癌术后患者无复发生存率和总生存率的单因素分析

Table 2 Univariate analyses of RFS and OS rates for 147 HCC patients after curative resection (%)

Variables	Cases	RFS rate		P value	OS rate		P value
		3 years	5 years		3 years	5 years	
Gender				0.208			0.237
Female	22	36.4	27.3		67.2	44.1	
Male	125	46.4	43.0		75.2	60.7	
Age/years				0.231			0.195
≤ 50	83	49.4	43.8		74.7	64.4	
> 50	64	42.2	32.0		74.7	50.2	
HBsAg				0.008			0.034
Negative	20	75.0	70.0		89.5	84.2	
Positive	127	41.7	35.9		72.4	54.8	
Child-Pugh classification				0.127			0.820
A	144	47.2	41.4		74.9	58.2	
B	3	33.3	0		66.7	0	
AFP/(ng/mL)				0.500			0.689
< 20	44	53.5	46.0		74.4	64.1	
20-400	37	44.4	26.9		77.8	57.1	
>400	66	40.9	36.5		70.0	55.6	
GGT/(U/L)				0.286			0.244
≤ 50	67	56.7	43.1		80.4	62.3	
> 50	80	41.3	36.5		60.8	55	
Tumor size/cm				0.014			0.006
≤ 5	61	60.7	50.4		83.6	71.2	
> 5	86	36.0	33.7		67.2	50.7	
Satellite nodule				0.038			0.035
No	126	49.2	43.4		79.3	63.2	
Yes	21	28.6	22.9		47.6	42.3	
Tumor capsule				0.590			0.558
No	63	44.4	38.4		73.0	55.7	
Yes	84	47.6	41.4		76.0	60.6	
Vascular invasion				0.129			0.074
No	137	47.4	41.3		76.5	59.8	
Yes	10	30.0	0		50.0	40.0	
Cirrhosis				0.007			0.173
No	27	51.9	0		70.4	66.7	
Mild	70	42.9	36.8		71.4	52.5	
Moderate	46	52.2	43.5		84.0	68.8	
Severe	4	25.0	0		50.0	25.0	
Tumor differentiation				0.079			0.598
I / II	84	52.4	45.1		77.4	59.6	
III / IV	63	36.5	34.6		71.1	56.8	
DRD1 expression				0.002			0.047
Negative	58	58.6	53.3		82.8	67.8	
Positive	89	38.2	32.2		68.3	52.2	



The RFS and OS rates was significantly decreased in HCC patients with DRD1 expression (+) compared with patients with DRD1 expression (-) ( $P < 0.05$ ).

图 2 肝癌 DRD1 蛋白表达水平和无复发生存率与总生存率的关系

Fig.2 DRD1 expression of HCC patients in correlation with overall survival (A) and recurrence-free survival (B) rates by Kaplan-Meier survival analysis

将表 2 单因素分析结果中如乙肝表面抗原、肿瘤大小、卫星结节、肝硬化程度和 DRD1 蛋白表达水平等有统计学意义的肝癌预后影响因素均纳入 Cox 多因素回归分析。从表 3 的结果显示肿瘤大小是影响肝癌患者术后无复发生存期与总生存期的独立预后因素,具有显著的统计学差异( $P < 0.05$ )。同时在本研究中发现 DRD1 蛋白是影响肝细胞癌患者预后的独立分子标志物,并且对于肝癌患者的术后无复发生存期具有重要的预测价值( $P < 0.05$ ),但是对于肝癌患者的术后总生存期无

表 3 147 例肝癌术后患者无复发生存期和总生存期的预后因子多因素分析

Table 3 Cox multivariate analysis of prognostic factors to RFS and OS in 147 HCC patients after curative resection

Variables	$\beta$	SE	Hazard ratio (95%CI) <sup>1)</sup>	P value
RFS				
HBsAg	0.811	0.434	2.251(0.962-5.265)	0.061
Tumor size	0.614	0.235	1.848(1.166-2.929)	0.009
Satellite formation	0.474	0.287	1.607(0.915-2.821)	0.099
Cirrhosis	0.218	0.165	1.244 (0.901-1.717)	0.185
DADR1	0.561	0.233	1.753(1.111-2.765)	0.016
OS				
HBsAg	1.068	0.600	2.909(0.898-9.422)	0.075
Satellite formation	0.515	0.330	1.674(0.878-3.194)	0.118
Tumor size	0.727	0.289	2.068(1.175-3.641)	0.012
DADR1	0.374	0.291	1.454(0.823-2.569)	0.198

1) 95% CI, 95% confidence interval.

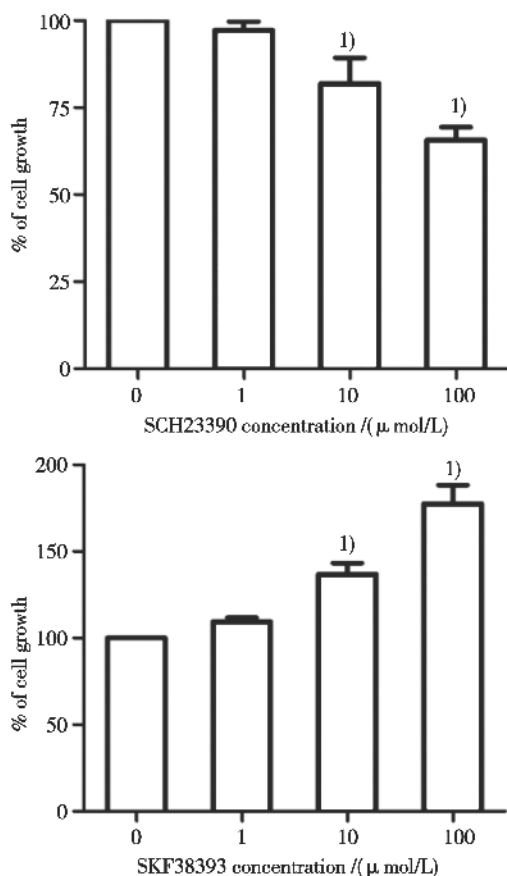
显著的统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 2.7 肝癌细胞 HepG2 的细胞增殖实验结果

为进一步研究 DRD1 在肝癌的发生发展中的影响,本研究通过细胞增殖实验(CCK-8)进行研究,结果表明经过 24 h 的 DRD1 拮抗剂 SCH23390 处理后,HepG2 增殖不同程度下降,其中 10、100  $\mu\text{mol/L}$  下降明显( $P < 0.05$ );相反,经过 DRD1 激动剂 SKF38393 处理后,HepG2 增殖不同程度上升,其中 10、100  $\mu\text{mol/L}$  上升明显 ( $P < 0.05$ ;图 3)。

## 3 讨论

多巴胺受体 (DR) 为 7 个跨膜区域组成的 G 蛋白偶联受体家族,目前已分离出 5 种受体,根据其生物活性和药理性质可分为 D1 类 (包括 DRD1、DRD5)和 D2 类受体(包括 DRD2、DRD3、DRD4)。DR 在人体分布广泛,参与多种生理病理活动,包括运动、药物成瘾、学习记忆、脑老化、长时程活动等<sup>[6-10]</sup>。近年来,DR 及其拮抗药和肿瘤预后复发、细胞增殖分化的研究屡有报道<sup>[4]</sup>。多巴胺拮抗剂甲硫哒嗪作用于胃癌、卵巢癌、淋巴瘤和前列腺癌等肿瘤细胞上,表现为抑制癌细胞增殖和促进凋亡。具体机制尚不清楚,可能与许多细胞周期信号通路有关<sup>[11-13]</sup>,提示 DR 有可能成为肿瘤治



SCH23390 can inhibit the proliferation of HepG2, while SKF38393 can induce the proliferation of HepG2 apparently. 1)  $P < 0.05$  vs  $0 \mu\text{mol/L}$

图 3 SCH23390 以及 SKF38393 不同浓度作用 24 h 后 HepG2 的增殖率

Fig.3 The proliferation of HepG2 after 24 h treatment by SCH23390 and SKF38393 in different concentration

疗的靶点,其中 DRD1 作为 DR 家族的重要成员,是本次研究的重点对象。

肝细胞癌的发生、发展、转移和复发涉及多种因素,其详细的机制尚待进一步研究。本次研究 Kaplan-Meier 分析结果表明 DRD1 蛋白阳性表达的患者比阴性表达的患者无复发生存期和总生存期明显下降 ( $P < 0.05$ ),阳性表达的患者预后较差。而 DRD1 蛋白表达和临床病理因素相关性分析结果显示:DRD1 蛋白表达水平与血管侵犯有关,进一步提示了 DRD1 在肿瘤侵袭转移和复发中起着重要作用。

DRD1 为 Gs 偶联蛋白受体,当受体被激活,信号将传递到腺苷酸环化酶的催化单位上,促进

cAMP 合成,而 cAMP 作为第二信使激活 cAMP 依赖的 PKA,PKA 可以通过一种小型 G 蛋白 Rap1 激活丝苏氨酸蛋白激酶(RAF)中的 B-Raf,从而激活 MAPK 家族信号通路以及细胞外调节蛋白激酶(ERK)的活性<sup>[14]</sup>。其中 ERK 作为 MAPK 家族的重要一员,在细胞增殖、分化、凋亡、代谢中发挥重要作用<sup>[15]</sup>,有报道表明 DRD1 拮抗剂可以阻断 ERK,从而抑制细胞的增殖<sup>[16]</sup>,与本研究的细胞增殖实验结果相符合。结合目前研究表明 MAPK 相关通路蛋白与肝癌的发展密切相关<sup>[17]</sup>,提示了 DRD1 可能通过影响 ERK 的活性从而影响肿瘤的发生发展;同时 B-Raf 与肿瘤的血管生成也密切相关<sup>[18]</sup>,能够促进新生血管生成,这与该研究生存相关分析中 DRD1 的表达与血管侵袭以及 DRD1 表达水平是肝癌患者术后无复发生存期独立危险因素之一的结果相一致。因此,DRD1 可能是通过调节肿瘤细胞的增殖和凋亡以及血管生成等途径影响肿瘤的发生发展的。目前,DRD1 蛋白与肿瘤相关的研究较少,DRD1 与肝癌的关系尚未有报道。在现有的研究结果中,Baisakhi 等<sup>[19]</sup>报道 DADR1 激动剂 SKF38393 对 CD4+ 和 CD5+ 的细胞增殖起抑制作用,由于细胞增殖和凋亡机制复杂,与本研究结果不符的原因可能与肿瘤细胞类型、药物浓度、作用时间以及组织亲和力不一致等有关。但在最新研究发现多巴胺受体拮抗剂 Thioridazin 可以抑制乳腺癌的增殖并且与抑制血管形成有关,与本研究中 DRD1 拮抗剂抑制肝癌细胞增殖的结果相符,且进一步表明 DRD1 通过血管形成影响肿瘤增殖的潜在作用<sup>[20]</sup>。由于多巴胺受体在机体分布广泛,涉及多种病理生理变化,机制复杂,具体原因仍需进一步研究。

综上所述,DRD1 蛋白在肝细胞癌中表达量显著上调,与肿瘤侵袭转移复发相关,可成为预测肝癌患者预后的独立分子标志物,在今后的工作将重点探索 DADR1 对肝癌影响的机制研究。

#### 参考文献

- [1] Yang J, Li J, Dai W, et al. Golgi protein 73 as a biomarker for hepatocellular carcinoma: A diagnostic meta-analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1413-1420.
- [2] Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptor[J]. *Annu Rev*

- Neurosci, 1993, 16: 299-321.
- [3] Zhen X, Uryu K, Wang HY, et al. D1 Dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-NMC human neuroblastoma cells [J]. Mol Pharmacol, 1998, 54(3):453-8.
- [4] Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. Cell, 2012, 149(6):1284-97.
- [5] 陈东泰, 钟伟强, 邢蔚, 等. N-甲基-D-天冬氨酸受体在肝细胞癌中表达与临床病理及预后的关系 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2012, 33(1):65-70.  
Chen DT, Zhong WQ, Xing W, et al. Expression of NMDA receptor 1 correlates with clinicopathological parameters in human hepatocellular carcinomas [J]. J SUN Yat-sen Univ; Med Sci, 2012, 33(1):65-70.
- [6] Xu M, Mratalla R, Gold LH, et al. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine mediated behavioral responses [J]. Cell, 1994, 79(4):729-42.
- [7] Wise RA. Neurobiology of addiction [J]. Curr Opin Neurobiol, 1996, 6(2):243-51.
- [8] Schultz W, Apicella P, Ljungberg T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task[J]. J Neurosci, 1993, 13(3):900-13.
- [9] Hemby SE, Trojanowski JQ, Ginsberg SD. Neuron-specific age-related decreases in dopamine receptor subtype mRNAs [J]. J Comp Neurol, 2003, 456(2):176-83.
- [10] Manahan-Vaughan D, Kulla A. Regulation of depotentiation and longterm potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors [J]. Cerebral Cortex, 2003, 13(2):123-35.
- [11] Choi AR, Kim JH, Yoon S. Thioridazine specifically sensitizes drug-resistant cancer cells through highly increase in apoptosis and P-gp inhibition [J]. Tumour Biol, 2014, 35(10):9831-8.
- [12] Park MS, Dong SM, Kim BR, et al. Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts [J]. Oncotarget, 2014, 15,5(13):4929-34.
- [13] Csonka Á, Spengler G, Martins A, et al. Effect of thioridazine stereoisomers on the drug accumulation of mouse lymphoma and human prostate cancer cell lines in vitro [J]. In Vivo, 2013, 27(6):815-820.
- [14] Jaiswal RK, Moodie SA, Wolfman A, et al. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21Ras [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14:6944-6953.
- [15] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response [J]. Oncotarget, 2012, 3(9):954.
- [16] Mizoquchi H, Yamada K, Mizuno M, et al. Regulations of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors [J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(5):1293-301.
- [17] Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development [J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1):10-20.
- [18] Mikula M, Schreiber M, Husak Z, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene[J]. EMBO J, 2001, 20(8):1952-62.
- [19] Saha B, Mondal AC, Basu S, et al. Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4q and CD8q T cells by D1 dopamine receptors: an in vitro analysis[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(7):1363-74.
- [20] Yin T, He S, Shen G, et al. Dopamine receptor antagonist thioridazine inhibits tumor growth in a murine breast cancer model[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):4103-8.

(编辑 刘清海)