

·基础研究·

多巴胺受体4对肝癌细胞增殖转移的影响及预后

严 俨^{1,3}, 张红英⁴, 潘家浩¹, 王冬音¹, 周晓爽¹, 元云飞², 曾维安¹, 陈东泰¹

(中山大学肿瘤防治中心//华南肿瘤学国家重点实验室//肿瘤医学协同创新中心, 1. 麻醉科, 2. 肝胆外科, 广东 广州 510060; 3. 惠州市中心人民医院麻醉科, 广东 惠州 516001; 4. 惠州市中医医院, 广东 惠州 516001)

摘要:【目的】探讨多巴胺受体4(DRD4)在肝细胞癌组织以及癌旁组织的表达,分析其表达情况与肝癌术后患者预后相关临床病理因素的关系和预后意义;探讨DRD4激动剂PD-168077以及阻滞剂L-745870对肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并分析其可能的机制。【方法】通过免疫组化以及实时定量PCR(qPCR)技术检测肝癌以及癌旁组织DRD4蛋白和mRNA表达情况,并分析DRD4表达的预后意义;采用Cell Counting Kit 8(CCK8)和Transwell实验检测PD-168077以及L-745870对肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的作用,蛋白免疫印迹(Western blot)技术检测信号通路蛋白,并使用通路抑制剂验证。【结果】在196例肝癌组织中有85例(43.4%)有DRD4蛋白高表达,在74对肝癌以及非癌组织中,非癌组织的DRD4 mRNA高表达,非肝癌细胞株Miha表达较肝癌细胞系高;DRD4高表达患者包括无复发生存期(RFS)和总生存期(OS)较长,并且DRD4是肝癌切除术后患者RFS和OS的独立预后因素($P<0.05$);PD-168077显著抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭,并呈剂量依赖性($P<0.05$),而1 nmol/L浓度的L-745870能显著增强肝癌细胞增殖、迁移和侵袭($P<0.05$);PD-168077抑制ERK蛋白的磷酸化,而L-745870则可促进ERK蛋白的磷酸化,ERK抑制剂PD98059可以逆转L-745870的作用。【结论】DRD4高表达的患者预后较好,有可能成为预测肝癌术后患者预后的分子标志物;DRD4可能成为肝癌治疗的潜在靶点。

关键词:多巴胺受体4;肝细胞癌;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭;预后

中图分类号:R738.1 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2020)05-0669-12

Effect of Dopamine Receptor 4 on Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells and Its Prognostic Significance

YAN Yan^{1,3}, ZHANG Hong-ying⁴, PAN Jia-hao¹, WANG Dong-yin¹, ZHOU Xiao-shuang¹,
YUAN Yun-fei², ZENG Wei-an¹, CHEN Dong-tai¹

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Hepatobiliary Oncology, Sun Yat-sen University Cancer Center// State Key Laboratory of Oncology in South China//Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Guangzhou 510060, China; 3. Department of Anesthesiology, Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, China; 4. Huizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huizhou 516001, China)

Correspondence to: CHEN Dong-tai, E-mail: chendt@sysucc.org.cn

Abstract: 【Objective】 To explore the correlation of dopamine receptor 4 (DRD4) expression with clinicopathological characteristics and the prognostic significance after examining the expression of DRD4 in hepatocellular carcinoma (HCC) and non-tumor tissues; to show the effect of DRD4 agonist PD-168077 and inhibitor L-745870 on proliferation, migration and invasion of HCC cells, and to reveal its possible mechanism. 【Methods】 Immunohistochemistry and real time qPCR were implemented to detect the expression of DRD4 protein and mRNA in tumor and non-tumor tissues and prognostic significance of DRD4 expression was analyzed. To reveal the impact of PD-168077 and L-745870 on HCC cells, CCK8 and Transwell were performed; the signaling pathway was monitored by Western blot, and was verified with

收稿日期:2020-03-09

基金项目:国家自然科学基金(81902490,81971057)

作者简介:严俨,在读博士生, E-mail: 670589857@qq.com; 陈东泰,通信作者,硕士生导师,研究方向:麻醉与肿瘤, E-mail: chendt@sysucc.org.cn

a specific inhibitor. 【Results】 Eighty-five (43.4%) of 196 HCC tissues had high expression of DRD4 protein; non-tumor tissues had higher expression of DRD4 mRNA in 74 pairs tissues, and DRD4 mRNA was highly expressed in non-tumor cell line Miha compared with HCC cell lines. Patients with high DRD4 expression significantly had longer recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS), and DRD4 was an independent prognostic factor for RFS and OS in patients after HCC resection ($P<0.05$). PD-168077 showed a dose-dependent inhibition on proliferation, migration and invasion of HCC cells ($P<0.05$), while 1nmol/L of L-745870 significantly enhanced the proliferation, migration and invasion of HCC cells ($P<0.05$). PD-168077 inhibited the phosphorylation of ERK, while L-745870 promoted the phosphorylation of ERK. The ERK inhibitor PD98059 could reverse the effect of L-745870. 【Conclusions】 HCC patients with high DRD4 expression had better prognosis and DRD4 might be a biomarker for prognosis of HCC patients. DRD4 might become a target of targeted therapy for HCC.

Key words: dopamine receptor 4; hepatocellular carcinomas; proliferation; migration; invasion; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(5):669-680]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球每年约出现70万例新增病例,其中大部分发生在亚洲,而在某些地区,死亡率与发病率的比值接近1,如今肝癌已经成为全球威胁性疾病^[1-3]。现阶段,早期肝癌的主要治疗仍然是根治性手术,然而,肝癌早期诊断困难,一旦错过手术时机,只能依靠非手术治疗,其中一种确切有效的治疗途径就是分子靶向治疗^[4-5]。多巴胺受体分为D1类(DRD1、DRD5)和D2类(DRD2、DRD3、DRD4)受体并具有不同的理化特性^[6],这些年来,有关多巴胺受体对不同肿瘤发生发展影响的报道日益增多,如:DRD1表达阳性的乳腺癌病人预后较差^[7],已有报道证明多巴胺受体抑制剂不仅能够通过诱导肿瘤干细胞分化而终止肿瘤细胞的自我更新^[8],而且还可以通过抑制AKT信号通路从而导致乳腺肿瘤的生长受限^[9],而DRD2不仅在胰腺癌病人中的表达增加,而且其相关的阻滞剂可以抑制ERK信号通路的激活,从而限制肿瘤进展^[10];ERK作为MAPK家族成员之一,已有大量研究证明其功能的激活可影响多种肿瘤细胞的生物学特性^[11-12]。多巴胺受体与肝癌的关系已有报道,DRD2激动剂可以有效抑制肝癌细胞的增殖和转移^[13],DRD4与DRD2同为D2类受体,但肿瘤相关研究相对比较少见,而DRD4对肝癌包括预后以及治疗相关的报道仍然没有。本次研究旨在尝试探讨DRD4是否可以用于预测肝癌患者预后,以及DRD4对肝癌细胞的作用,从而初步揭示DRD4在肝癌发生发展中扮演的角色,并为以后更深层次的研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 肝癌组织样本

本研究经中山大学肿瘤防治中心临床研究伦理委员会(中国广州)批准,并获得受试者的知情同意。本研究使用了196例HCC患者的组织样本做免疫组化检测,以及收取74例患者的肝癌组织和相邻非肝癌组织做real time qPCR检测。所有患者都是在2003年至2008年间在中山大学肿瘤防治中心(中国广州)肝胆外科接受了同一位外科医生执行的原发性肝癌切除术。其中男168人,女28人,平均年龄49.7岁(20~79岁)。中位随访期为54个月(1~127个月)。

1.2 肝癌细胞系

人肝癌细胞株包括MHCC-97H、MHCC-97L、Hep-3B、SK-Hep-1、PLC-8024、Huh7、Hep-G2以及非肝癌细胞(Miha)均来自中科院上海细胞库。细胞培养基采用混匀100 mL/L胎牛血清(GIBCO, USA)的DMEM(GIBCO, USA)并内含0.1 g/L青霉素以及0.1 g/L streptomycin,细胞培养箱保持37℃恒温,CO₂浓度体积比为5%,湿度为85%。细胞培养至3~6代作为实验材料。

1.3 试 剂

DRD4抗体(LS-C22901),购自LifeSpan(USA);EnVision免疫组化超敏试剂盒(Cat. NO: GK500710),购自Gene Tech;Dimethyl Sulfoxide(DMSO, 20-139),DRD4激动剂PD-168077(P233)以及DRD4阻滞剂L-745870(L131),购自Sigma(USA);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒从同

济化工研究所购置;ERK抑制剂PD98059(S1177)购自Selleck(USA);ERK(4695S), p-ERK(4370S)以及抗兔二抗购买自Cell signaling technology(USA)。

1.4 免疫组化

用100 mL/L福尔马林固定HCC患者的组织标本,用石蜡包埋后进行连续切片备用。组织玻片经过2 h 60 °C烘烤并脱蜡后,使用酒精梯度水化并用30 mL/L H₂O₂封闭45 min。在柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中使用中高火微波5 min以及中火15 min修复抗原,4 °C DRD4抗体孵育过夜,一抗稀释液为阴性对照;多次PBS清洗抗体后,37 °C温箱孵育二抗30 min, DAB试剂套装(DAKO, Carpinteria, CA)显色并用苏木素染细胞核。显微镜下进行检测。两位经正规培训的病理科医生采用双盲法并根据德国免疫反应评分(IRS)对结果进行评估。根据染色强度,将DRD4蛋白染色分为:0=无染色,1=染色弱,2=染色中等,3=染色强。另外,肿瘤阳性组织的百分比分别为0(<10%)、1(10%~25%)、2(26%~50%)、3(51%~75%)、4(>75%)。将两个评分相乘,并对每个病例进行加权评分,确定结果分为两组:≥2分定为DRD4高表达,<2分为DRD4低表达^[14-15]。

1.5 实时定量PCR

实时定量PCR(real-time quantitative PCR, Real time qPCR)实验按照说明书操作步骤使用TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA)从HCC组织以及细胞系中提取RNA。采用PrimeScriptRT试剂盒(Takara, Dalian)进行逆转录得到cDNA。以GAPDH为内源性对照,GADPH和DRD4的特异性引物序列(Invitrogen)见表1。使用SYBR Green qPCR Super Mix和ABI7900HT序列检测系统运行程序进行反应并以每个反应曲线只有一个峰视为有效结果。

表1 用于Real time qPCR的引物序列

Table 1 Primer sequences used in the Real time qPCR

Locus	Primers
GADPH-F	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3'
GADPH-R	5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
DRD4-F	5'-GCCTCCATCTTCAACCTGTG-3'
DRD4-R	5'-AGCACACGGACGAGTAGACC-3'

1.6 细胞增殖实验

参照肝癌细胞系 Real time qPCR的结果,选择合适的细胞株进行细胞增殖实验。根据实验需要共分8组,其中PD-168077(100、10、1 nmol/L)3组,对照组1组;L-745870(10、1、0.1 nmol/L)3组,对照组1组。在96孔培养板上接种细胞,每组5个孔,每个孔 6×10^3 个细胞,总体积为100 μ L;过夜后加入对应浓度的药物,对照组加入1 mL/L DMSO,经过24 h作用后每个孔加入10 μ L CCK-8,细胞培养箱孵育2 h,使用酶标仪在450 nm(OD450)处检测各孔的OD值。

1.7 蛋白免疫印迹实验

HCC细胞分为3组:Control组,PD-168077(100 nmol/L)处理组以及L-745870(1 nmol/L)处理组,药物处理24 h后,使用含蛋白酶抑制剂Cocktail Set I(Calbiochem)的细胞裂解缓冲液(Cell Signaling)提取蛋白,并根据BCA蛋白检测试剂盒(Pierce)的说明书测定蛋白浓度。待测蛋白用100 mL/L的SDS-PAGE电泳完毕后便电转至polyvinylidene fluoride膜(PVDF, Millipore)。一抗[(ERK(1:1 000稀释)、p-ERK(1:1 000稀释)]4 °C孵育过夜后再用兔二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h。使用BeyoECL plus发光液(Beyotime Biotechnology)发光并拍摄。

1.8 细胞迁移和侵袭实验

该实验通过Transwell小室法测定,其中迁移实验使用具有8- μ m孔聚碳酸酯膜的小室(BD Bioscience, Becton, NJ),而侵袭实验则使用具有基质胶的小室(Corning, NY, USA)。将SK-Hep-1的 1×10^4 个细胞分别加入含有PD-168077,L-745870和1 mL/L DMSO的无血清DMEM的小室中,接着将小室放入含血清DMEM的24孔板中。培养箱孵育24 h后,用棉签擦拭未转移的细胞,无水酒精固定穿过膜的细胞后使用结晶紫染色。显微镜下拍片并计数。

1.9 统计学方法

所有数据分析使用GraphPad和SPSS 22.0版本进行。卡方检验用于校验DRD4与临床相关病理因素的关系。DRD4预后生存分析通过使用Kaplan-Meier法。Log-rank和逐步Cox回归分析法分别对所有预后因素进行单因素以及多因素分析。独立样本Student's *t*检验用来分析比较两组数据的差异;多组数据比较,采用One way-

ANOVA 进行方差齐性分析,差异有统计学意义时采用 Bonferroni 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DRD4 蛋白在肝癌组织切片中的表达情况

组织切片免疫组化染色结果显示,在 196 例肝癌组织中有 85 例(43.4%)有 DRD4 蛋白表达,表达定位主要在细胞浆中,而其余 111 例(56.6%)则没有表达 DRD4 蛋白,证明 DRD4 蛋白在肝癌组织中表达比例较低;本研究根据染色强度以及面积,把免疫组化结果分为 DRD4 高表达以及 DRD4 低表达(图 1)。

2.2 DRD4 mRNA 在肝癌以及非肝癌细胞株、肝癌组织以及相邻非肝癌组织中的表达情况

Real time qPCR 结果显示:在 74 对肝癌以及非癌组织中,非癌组织中的 DRD4 mRNA (1.151 ± 0.382) 表达要高于癌组织 (0.220 ± 0.055 ; $t = 2.414$, $P = 0.017$; 图 2A); 在蛋白和 mRNA 表达水平上,DRD4 在不同细胞株的表达中并不一致(图 2B, C)。

2.3 DRD4 与 HCC 术后患者预后相关临床病理因素的分析

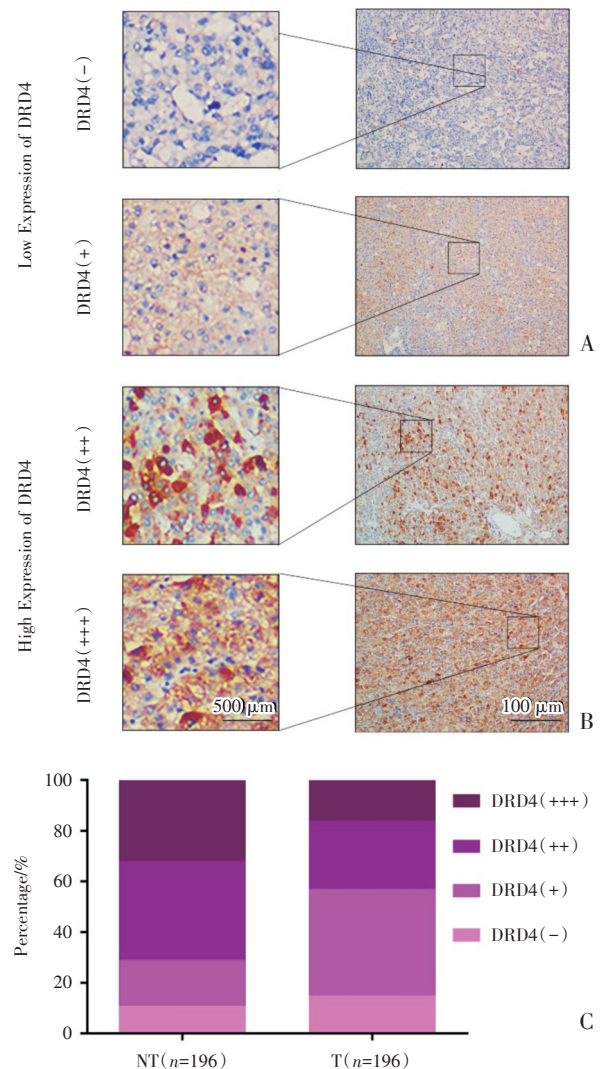
由表 2 的结果可见 DRD4 的表达与患者年龄相关并差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 DRD4 的表达与其他预后相关临床病理因素无显著相关性 ($P > 0.05$; 表 2)。

2.4 所有预后相关临床病理因素与肝癌术后患者无复发生存期以及总生存期的单因素分析

本课题引入已有的临床病理资料可能会影响患者完成肝癌切除术后的预后相关各种生理病理因素,而根据研究者的结果提示了乙肝表面抗原阳性、肿瘤大小、卫星结节、肿瘤分期、TNM 分期以及 DRD4 的表达都与无复发生存期 (recurrence-free survival, RFS) 相关,除此之外,肿瘤大小、卫星结节、血管侵犯、肿瘤分期以及 DRD4 的表达还与总生存期 (overall survival, OS) 相关(表 3)。

2.5 196 例肝癌切除术后患者 DRD4 表达与预后的生存分析

通过 Kaplan-Meier 法进行的 DRD4 与术后患者预后生存分析,DRD4 表达阳性患者的 RFS 中位生存期为 60(26.5~88.5)个月;OS 中位生存期为 74(51~91.5)个月;DRD4 表达阴性患者的 RFS 中



A: Low expression group includes DRD4 (-) and DRD4 (+);
B: High expression group includes DRD4 (++) and DRD4 (+++);
C: The percentage of different DRD4 expression levels in tumor and non-tumor tissues.

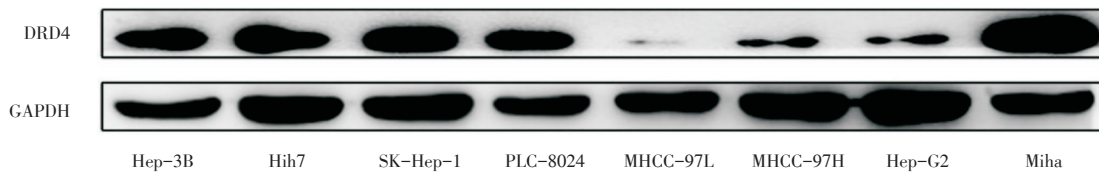
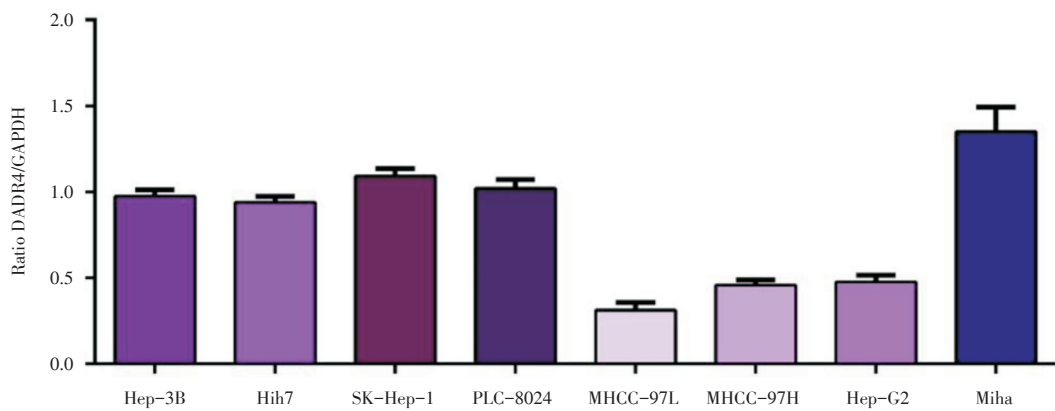
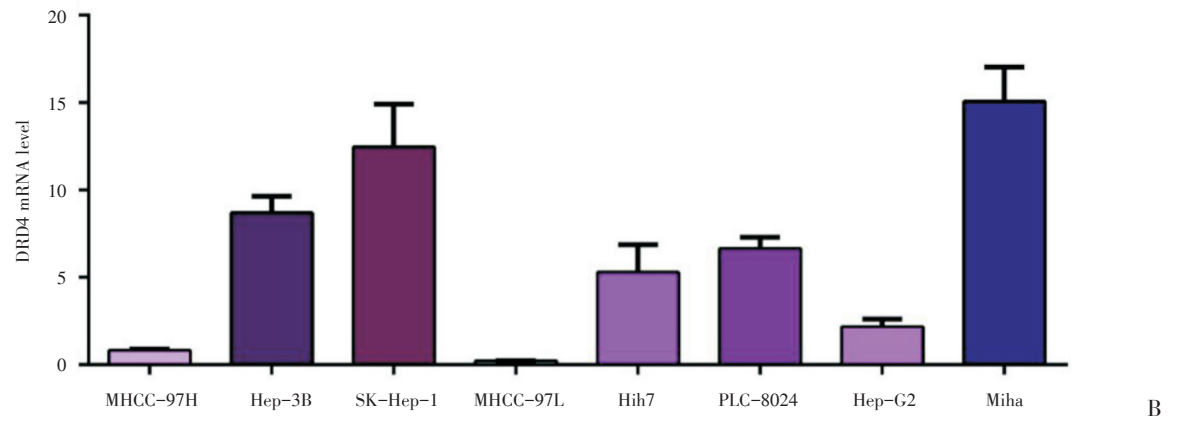
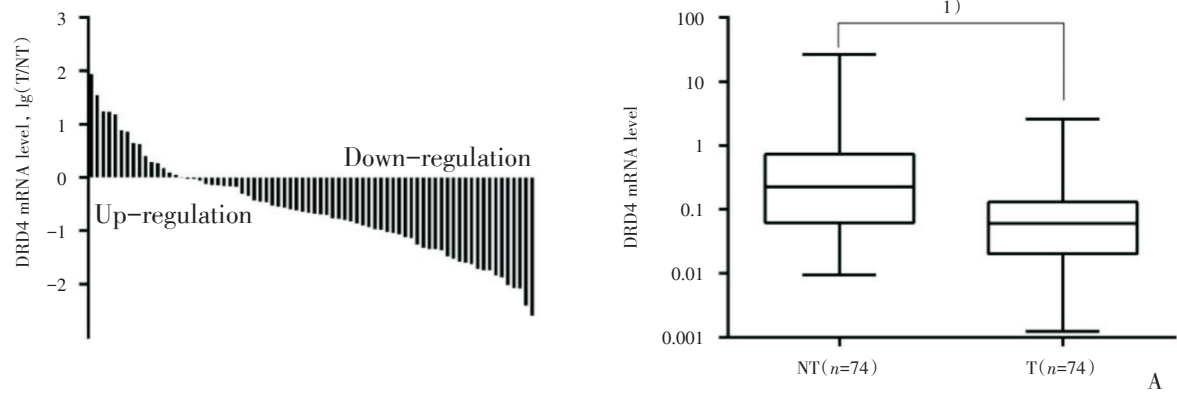
图 1 DRD4 在肝癌组织中的表达

Fig.1 Immunohistochemical staining of DRD4 protein expression in HCC

位生存期为 30(12~77)个月;OS 中位生存期为 62(40~88)个月。研究者发现 DRD4 在肝癌组织中表达高的患者包括 RFS 和 OS 都要比 DRD4 表达低的患者生存期长,而且差异具有统计学意义 (RFS 的 $\chi^2 = 5.235$, $P = 0.022$, 图 3A; OS 的 $\chi^2 = 7.866$, $P = 0.005$, 图 3B)。

2.6 影响预后的临床病理因素与肝癌术后患者 RFS 以及 OS 的多因素分析

通过逐步 Cox 多因素回归分析所知的与 RFS 以及 OS 预后相关的临床病理因素包括乙肝表面



A : DRD4 mRNA expression in 74 pairs of tumor (T) tissues and non-tumor (NT) tissues, ¹⁾P=0.017; B, C : DRD4 mRNA and protein expression in HCC cell lines.

图2 DRD4 mRNA在肝癌与非癌组织以及肝癌细胞系中的表达
Fig.2 DRD4 expression in tumor (T) tissues, non-tumor (NT) tissues and HCC cell lines

表2 196例肝癌组织DRD4表达与临床病理因素的关系
 Table 2 DRD4 expression and clinic pathological characteristics of 196 HCC¹⁾ [n(%)]

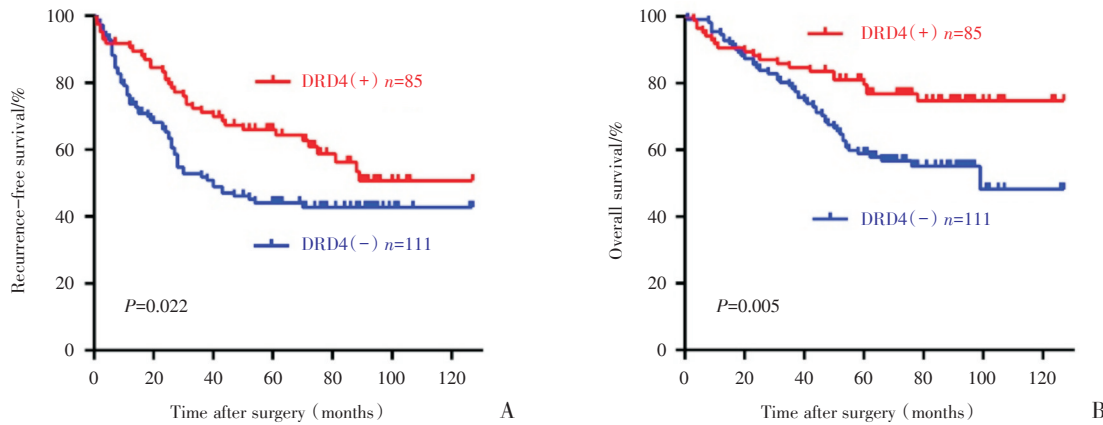
Characteristics	Cases	DRD4 protein		Chi square	P Value
		Low expression	High expression		
Gender				0.585	0.444
Female	28	14 (50.0)	14 (50.0)		
Male	168	97 (57.7)	71 (42.3)		
Age /years				4.135	0.042
≤ 50	106	53 (50.0)	53 (50.0)		
> 50	90	58 (64.4)	32 (35.6)		
HBsAg				0.495	0.482
Negative	22	14 (63.6)	8 (36.4)		
Positive	174	97 (55.7)	77 (44.3)		
Child-Pugh classification ²⁾				2.639	0.104
A	194	111 (57.2)	83 (42.8)		
B	2	0 (0)	2 (100)		
AFP / (ng/mL)				0.079	0.961
< 20	71	40 (56.3)	31 (43.7)		
20-400	48	28 (58.3)	20 (41.7)		
> 400	77	43 (55.8)	34 (44.2)		
GGT / (units/L)				0.094	0.759
≤ 50	99	55 (55.6)	44 (44.4)		
> 50	97	56 (57.7)	41 (42.3)		
Tumor size/cm				3.511	0.061
≤ 5	98	49 (50.0)	49 (50.0)		
> 5	98	62 (63.3)	36 (36.7)		
Satellite nodule				0.055	0.815
No/incomplete	167	94 (56.3)	73 (43.7)		
Yes	29	17 (58.6)	12 (41.4)		
Tumor capsule				0.429	0.513
No	62	33 (53.2)	29 (46.8)		
Yes	134	78 (58.2)	56 (41.8)		
Vascular invasion				0.782	0.377
No	173	96 (55.5)	77 (44.5)		
Yes	23	15 (65.2)	8 (34.8)		
Cirrhosis				3.454	0.063
No	37	26 (70.3)	11 (29.7)		
Yes	159	85 (53.5)	74 (46.5)		
Tumor differentiation				0.325	0.568
I / II	165	92 (55.3)	73 (46.7)		
III / IV	31	19 (67.6)	12 (32.4)		
TNM classification				1.519	0.218
I / II	129	69 (53.5)	60 (46.5)		
III / IV	67	42 (62.7)	25 (37.3)		

1) Values of statistical significance are in bold. 2) There was no patient with Child-Pugh Class C. AFP: alpha-fetoprotein; GGT: gamma-glutamyl transferase; TNM: tumor node metastasis

表3 196例肝癌切除术后患者无复发生存期以及总生存期的单因素分析
Table 3 Univariate analyses of RFS and OS rates for 196 HCC patients after curative

Variables	Cases	RFS rate (%)		Chi square	P value	OS rate (%)		Chi square	P value
		3 year	5 year			3 year	5 year		
Gender									
Female	28	67.2	48.5			78.6	63.2		
Male	168	59.0	54.4	0.038	0.845	81.5	68.5	0.394	0.530
Age /years									
≤ 50	106	63.4	59.4			81.1	72.3		
> 50	90	56.4	46.6	2.280	0.131	81.1	62.4	2.104	0.147
HbsAg									
Negative	22	80.4	75.4			86.4	77.3		
Positive	174	57.7	50.9	4.651	0.031	80.5	66.7	1.007	0.316
Child-Pugh classification ¹⁾									
A	194	60.9	54.1			81.4	68.0		
B	2	0	0	2.585	0.108	50.0	50.0	0.318	0.573
AFP/(ng/mL)									
< 20	71	61.4	52.2			77.5	71.6		
20-400	48	61.6	54.9			85.4	63.8		
> 400	77	58.1	54.0	0.157	0.925	81.8	66.7	0.150	0.928
GGT/(units/L)									
≤ 50	99	63.7	55.2			81.8	72.5		
> 50	97	56.5	51.9	0.659	0.417	80.4	62.8	0.551	0.458
Tumor size/cm									
≤ 5	98	72.1	62.3			86.7	78.2		
> 5	98	47.9	44.6	8.801	0.003	75.5	57.3	7.680	0.006
Satellite nodule									
No	167	64.0	57.7			85.6	71.4		
Yes	29	36.7	27.5	9.346	0.002	55.2	46.7	10.117	0.001
Tumor capsule									
No	62	65.1	61.4			75.8	65.9		
Yes	134	58.3	50.2	1.348	0.246	83.6	68.7	0.210	0.647
Vascular invasion									
No	173	59.6	53.4			83.8	70.5		
Yes	23	66.5	55.4	0.072	0.788	60.9	47.4	4.949	0.026
Cirrhosis									
No	37	60.8	60.8			75.7	70.3		
Yes	159	60.1	52.0	0.494	0.482	82.4	67.4	0.154	0.695
Tumor differentiation									
I / II	165	63.7	56.5			86.7	72.1		
III / IV	31	41.1	37.0	5.494	0.019	51.6	44.9	12.948	<0.001
TNM classification									
I / II	129	66.7	58.4			82.9	69.3		
III / IV	67	47.6	44.2	4.364	0.037	77.6	64.8	1.029	0.310
DRD4 expression									
Negative	111	51.9	44.1			78.4	58.9		
Positive	85	71.1	66.0	5.235	0.022	84.7	79.7	7.866	0.005

1) There was no patient with Child-Pugh Class C. AFP: alpha-fetoprotein; GGT: gamma-glutamyl transferase; TNM: tumor node metastasis



A, B: The patients with low DRD4 expression have significant poor RFS and OS than the patients with high DRD4 expression ($\chi^2=5.235$ and $P=0.022$ for RFS, $\chi^2=7.866$ and $P=0.005$ for OS).

图3 DRD4表达水平与肝癌切除术后患者预后的生存分析

Fig.3 DRD4 expression in correlation with RFS and OS of HCC patients after curative resection by Kaplan-Meier survival analysis

抗原阳性、肿瘤大小、卫星结节、血管侵犯、肿瘤分期、TNM分期以及DRD4表达水平等。研究者发现DRD4表达水平是影响肝癌切除术后患者RFS以及OS的独立预后因素($P<0.05$),另外乙肝表面抗原、肿瘤大小以及卫星结节是影响患者RFS的独立因素,而肿瘤分级是影响患者OS的独立预后因素($P<0.05$;表4)。

2.7 细胞增殖实验

根据肝癌细胞系DRD4的表达情况,选择SK-Hep-1作为实验细胞株,结果表明经过24 h的DRD4激动剂PD-168077处理后,细胞增殖受到抑制,并随药物浓度梯度递增,其中100 nmol/L浓度抑制

明显($t=4.834$, $P<0.001$);而经过DRD4阻滞剂L-745870的处理后,研究者发现细胞增殖在药物浓度0.1 nmol/L以及1 nmol/L的时候有不同程度的升高,而且1 nmol/L浓度L-745870的效果更加显著($t=5.212$, $P<0.001$),而当使用10 nmol/L浓度处理细胞后,细胞增殖不明显(图4)。

2.8 细胞迁移和侵袭实验

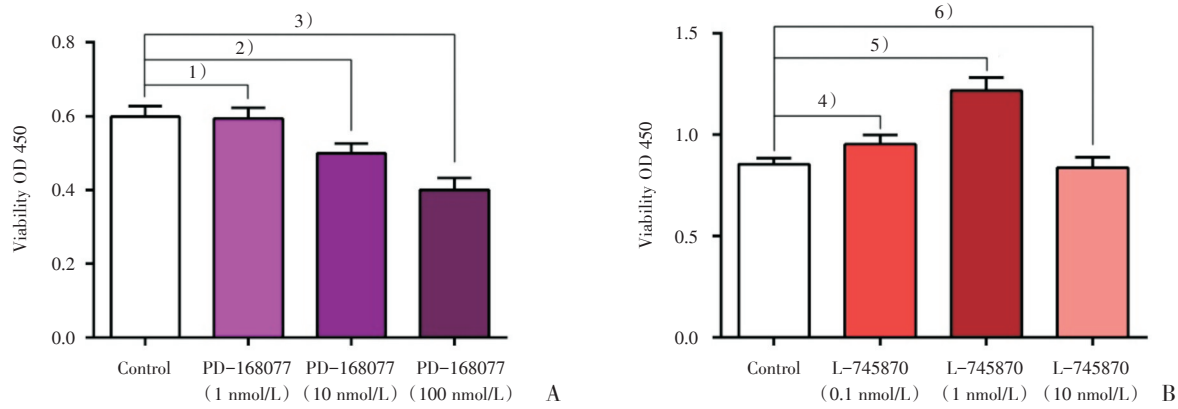
根据不同浓度PD-168077和L-745870对SK-Hep-1增殖的影响,选择100 nmol/L浓度的PD-168077和1 nmol/L浓度的L-745870进行细胞迁移(Migration)和侵袭(Invasion)实验。结果显示PD-168077能显著抑制SK-Hep-1的Migration

表4 196例肝癌切除术后患者无复发生存期和总生存期的逐步Cox多因素回归分析

Table 4 Cox multivariate analysis of prognostic factors to RFS and OS in 196 HCC patients after curative resection

Variables	β	SE	Wald	P value	Exp(B)	95% CI
RFS						
HbsAg	1.079	0.461	5.470	0.019	2.941	(1.191~7.262)
Tumor size	0.525	0.213	6.086	0.014	1.691	(1.114~ 2.566)
Satellite nodule	0.641	0.262	6.001	0.014	1.898	(1.137~3.168)
DRD4	-0.429	0.216	3.950	0.047	0.651	(0.426~0.994)
OS						
Tumor differentiation	0.908	0.275	10.881	0.001	2.479	(1.445~ 4.252)
DRD4	-0.692	0.266	6.756	0.009	0.500	(0.297~ 0.843)

Only the factors that significantly affected RFS or OS are showed in this table.



A: PD-168077 shows a concentration-dependent suppression of the proliferation of SK-Hep-1, ($F=10.42$, $P<0.001$, $n=5$). 1) $t=0.127$, $P>0.999$, 2) $t=2.428$, $P=0.082$, 3) $t=4.834$, $P<0.001$. B: L-745870 significantly promotes the proliferation of SK-Hep-1 in 1 nmol/L. ($F=12.67$, $P<0.001$, $n=5$). 4) $t=1.416$, $P=0.528$, 5) $t=5.212$, $P<0.001$, 6) $t=0.236$, $P>0.999$.

图4 PD-168077与L-745870对SK-Hep-1增殖的影响

Fig.4 The influence on proliferation of SK-Hep-1 after treatments with PD-168077 or L-745870

($t=6.313$, $P=0.002$)以及Invasion($t=3.051$, $P=0.045$); 而L-745870则出现相反的结果并明显促进SK-Hep-1的Migration($t=9.443$, $P<0.001$)以及Invasion($t=4.049$, $P=0.014$;图5)。

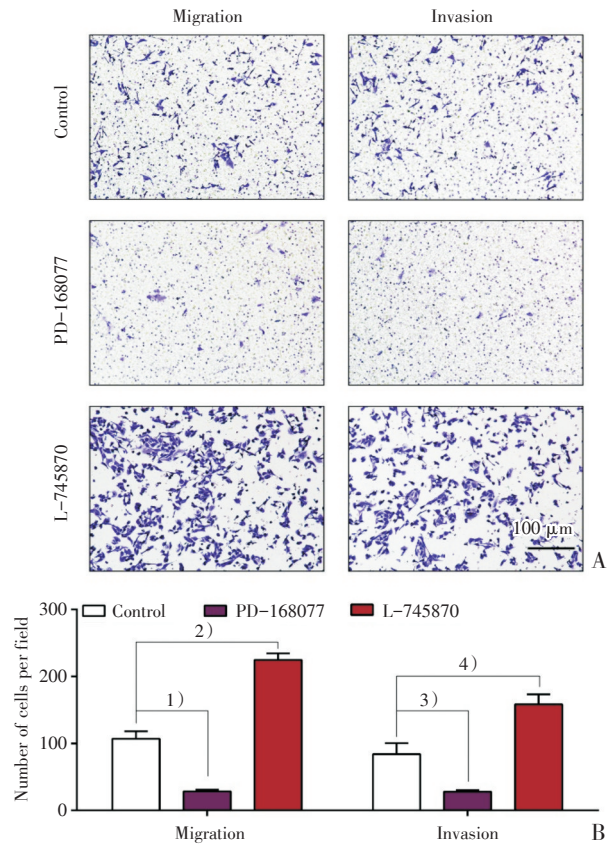
2.9 DRD4可能通过ERK信号通路影响肝癌细胞功能

通过查询KEGG信号通路数据库得知DRD4可调节MAPK信号家族,而ERK是MAPK家族中重要的一员。Western blot结果显示PD-168077抑制ERK蛋白的磷酸化($t=3.318$, $P=0.032$),而L-745870则可促进ERK蛋白的磷酸化($t=3.734$, $P=0.019$);而使用ERK抑制剂PD98059($10\ \mu\text{mol/L}$)可以逆转L-745870($1\ \text{nmol/L}$)的效应,提示DRD4可以通过调节ERK信号通路的活动从而影响肝癌细胞的功能(图6)。

3 讨论

学习已有的研究,我们发现多巴胺受体与肺癌、乳腺癌、胃癌等涵盖在内的多种肿瘤的增殖转移等生物学特性有关,然而现有的研究对象多为DRD1、DRD2^[7, 10, 13, 16-21]两种受体,而DRD4与肿瘤相关的研究较少,据我们所知,DRD4涉及肝癌的研究尚未见有报道,本研究首次尝试探讨DRD4与肝癌术后患者的预后关系以及对肝癌细胞增殖转移等生物学行为的影响。

通过免疫组化检测肝癌组织切片,我们发现DRD4蛋白在肝癌中的表达比例较低(43.4%),除



A, B: PD-168077 significantly suppresses the migration and invasion of SK-Hep-1, while L-745870 shows an opposite effect. ($F=125.8$, $P<0.001$ for Migration, $F=25.37$, $P=0.001$ for Invasion, $n=3$). 1) $t=6.313$, $P=0.002$, 2) $t=9.443$, $P<0.001$, 3) $t=3.051$, $P=0.045$, 4) $t=4.049$, $P=0.014$.

图5 PD-168077与L-745870对SK-Hep-1迁移和侵袭的影响

Fig.5 The influence on migration and invasion of SK-Hep-1 after treatments with PD-168077 or L-745870

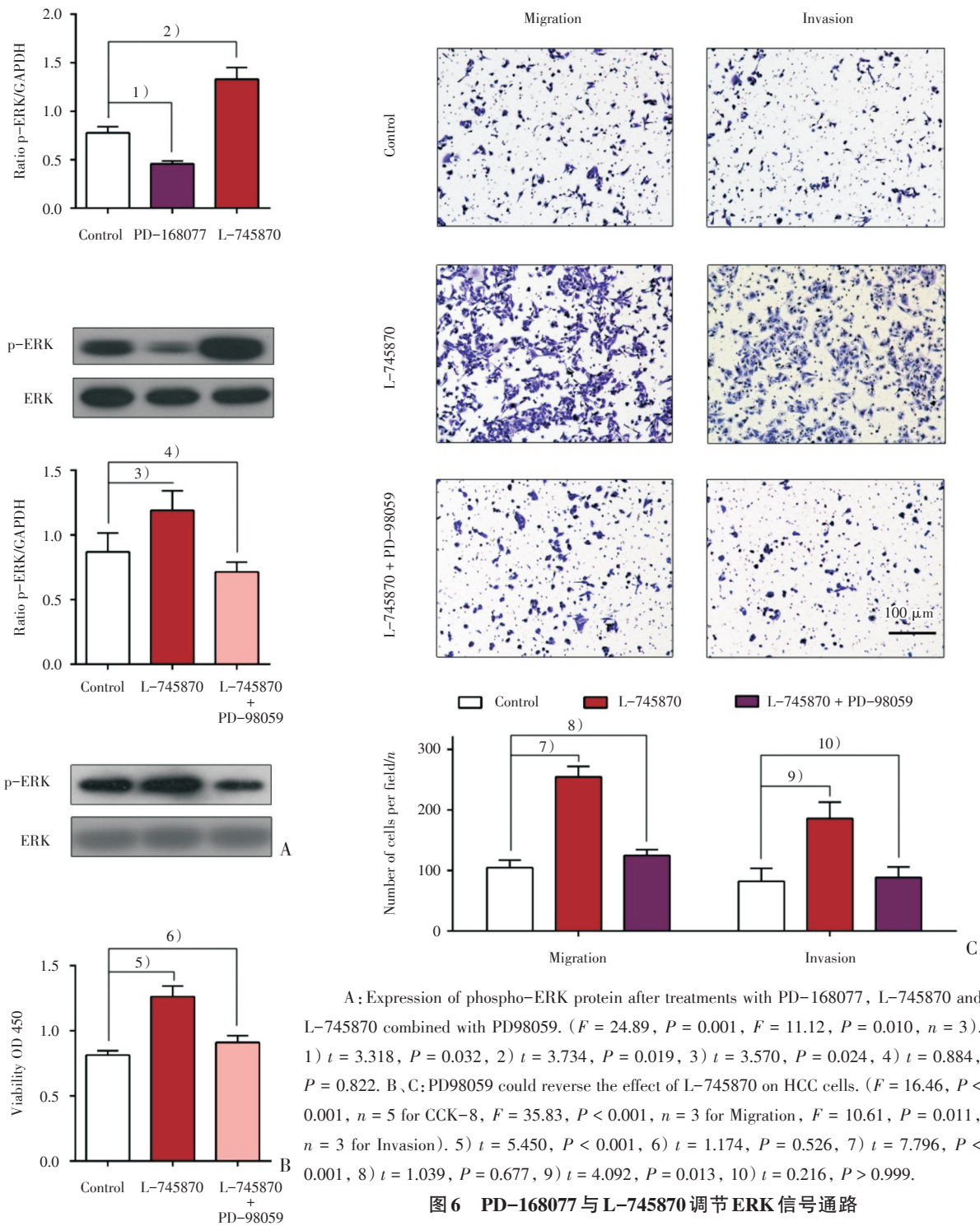


图6 PD-168077与L-745870调节ERK信号通路
Fig.6 DRD4 might regulate the activities of HCC cells via ERK signaling pathway

此之外单因素分析结果显示DRD4高表达患者的RFS和OS均比低表达的患者显著延长($P < 0.05$),而且多因素分析结果提示DRD4更是与肝癌切除术后患者OS预后相关的独立因素($P < 0.05$)。另

外Real time qPCR结果显示DRD4 mRNA在肝癌组织中的表达要低于相邻非肝癌旁组织,由此可知DRD4从蛋白水平以及mRNA水平在肝癌组织中都是处于低表达,而且非肝癌细胞株Miha与肝

癌细胞系相比较DRD4 mRNA表达较高,这些结果都提示了DRD4在肝癌中可能是一个潜在的抑癌分子。而细胞增殖、迁徙和侵袭实验结果更是验证我们的猜想。

通过查询KEGG信号通路数据库得知在神经系统中DRD4可通过抑制腺苷酸环化酶的催化活性,减少cAMP合成,cAMP作为信号传递中的第二信使可以调控MAPK家族信号通路,最终影响细胞的各种行为特性等,其中ERK分子是MAPK家族信号通路分子中的重要成员,该信号通路分子参与调控细胞的多种生物学特性其中包括肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁徙、侵袭和血管生存等行为^[14, 22-24]。Dolma等人发现DRD4阻滞剂可以抑制ERK信号通路,从而阻碍胶质瘤干细胞的增殖自噬等^[25];而本次研究的结果发现DRD4的激动剂和阻滞剂可以抑制或者激动ERK分子磷酸化,调控ERK信号通路,可能从而影响

肝癌细胞的恶性生物学行为,该结果与已有的报道不一致,可能的原因是多巴胺受体在不同的肿瘤类型和细胞类型扮演的角色是不一样的,例如:DRD2在脑胶质瘤以及在肺癌中起到的作用是相反的^[16, 26];多巴胺可以促进胆管癌细胞增殖^[27],也可以抑制胶质瘤的生长^[28]。然而,肿瘤的发生发展机制及其复杂,仍需进一步的研究明确具体的原因。

综上所述,DRD4在肝癌组织中高表达预示着患者有更好的预后,有可能成为独立预测患者无复发生存期以及总生成期的分子标志物。DRD4的激动剂和阻滞剂可以通过调节ERK信号通路相应增强或者减弱肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的能力,预示着DRD4可能可以成为肝癌靶向分子治疗的作用靶点。本次研究的结果可以为肝癌患者提供新的治疗思路。

参考文献:

- [1] Dufour JF, Bargellini I, De Maria N, et al. Intermediate hepatocellular carcinoma: current treatments and future perspectives [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(2): 24-29.
- [2] Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(2): 333-345.
- [3] 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.
- [4] Pannem RR, Dorn C, Ahlqvist K, et al. CYLD controls c-MYC expression through the JNK-dependent signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(2): 461-468.
- [5] Rodriguez-Rivera A, Galicia-Moreno M, Reyes-Gordillo K, et al. Methyl palmitate prevents CCl₄-induced liver fibrosis [J]. *J Appl Toxicol*, 2008, 28(8): 1021-1026.
- [6] Wang X, Wang ZB, Luo C, et al. The Prospective value of dopamine receptors on bio-behavior of Tumor [J]. *J Cancer*, 2019, 10(7): 1622-1632.
- [7] Borcherding DC, Tong W, Hugo ER, et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(24): 3103-3113.
- [8] Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1284-1297.
- [9] 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): 4103-4108.
- [10] Jandaghi P, Najafabadi HS, Bauer AS, et al. Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice [J]. *Gastroenterology*, 2016, 34(25): 103-113.
- [11] Lin X, Liao J, Geng X, et al. Concurrent inhibition of ErbB family and MEK/ERK kinases to suppress non-small cell lung cancer proliferation [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3): 847-856.
- [12] Fang QX, Zheng XC, Zhao HJ. L1CAM is involved in lymph node metastasis via ERK1/2 signaling in colorectal cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3): 837-846.
- [13] Zhang QB, Zhang BH, Zhang KZ, et al. Moderate swimming suppressed the growth and metastasis of

- the transplanted liver cancer in mice model: with reference to nervous system [J]. *Oncogene*, 2016, 35(31): 4122-4131.
- [14] Okabe S, Miwa A, Okado H. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(16): 6105-6114.
- [15] 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.
- [16] Cherubini E, Di Napoli A, Noto A, et al. Genetic and functional analysis of polymorphisms in the human dopamine receptor and transporter genes in small cell lung cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(2): 345-56.
- [17] Huang H, Wu K, Ma J, et al. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39(1): 13-20.
- [18] Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, et al. Dopamine receptor type 2 (DRD2) inhibits migration and invasion of human tumorous pituitary cells through ROCK-mediated cofilin inactivation [J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(2): 279-286.
- [19] 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): 4103-4108.
- [20] 严俨, 潘家浩, 陈东泰, 等. 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 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(6): 833-840.
- Yan Y, Pan JH, Chen DT, et al. 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 [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2015, 36(6): 833-840.
- [21] 沈智勇, 张海骏, 邱永娟. 20 kHz 超声辐照 SonoVue 联合 DDP、MMC、5-FU 对裸鼠肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *影像诊断与介入放射学*, 2018, 27(3): 232-236.
- Shen ZY, Zhang HJ, Qiu YJ. Effects of SonoVue irradiation combined with DDP, MMC and 5-fu with 20kHz ultrasound on proliferation and apoptosis of nude hepatoma cells [J]. *J Diagn Imag Intervent Radiol*, 2018, 27(3): 232-236.
- [22] Lendvai B, Stern EA, Chen B, et al. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo [J]. *Nature*, 2000, 404(6): 876-881.
- [23] Mccubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1263-1284.
- [24] Eblen ST. Extracellular-regulated kinases: signaling from ras to ERK substrates to control biological outcomes [J]. *Adv Cancer Res*, 2018, 138(9): 139-142.
- [25] Dolma S, Selvadurai HJ, Lan X, et al. Inhibition of dopamine receptor D4 impedes autophagic flux, proliferation, and survival of glioblastoma stem Cells [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 859-873.
- [26] Jie Li, Shan Zhu, David Kozono, et al. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between dopamine receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(4): 882-893.
- [27] Coufal M, Invernizzi P, Gaudio E, et al. Increased local dopamine secretion has growth-promoting effects in cholangiocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2112-2122.
- [28] Qin T, Wang C, Chen X, et al. Dopamine induces growth inhibition and vascular normalization through reprogramming M2-polarized macrophages in rat C6 glioma [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 286(2): 112-123.

(编辑 孙慧兰)