

网络出版时间: 2024-07-19 15:02:28 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1520.004>

# UROCI 在肝细胞癌中的表达及对肿瘤发生的影响

严洪遥<sup>1</sup>, 劳远翔<sup>2</sup>, 孙倍成<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究尿刊酸酶(UROCI)在肝细胞癌(HCC)中的表达及其对HCC发生发展的影响。方法 分析蛋白质质谱和TCGA数据库中UROCI在癌和癌旁组织中的表达及预后数据。利用免疫组织化学染色、实时定量PCR(qPCR)和Western blot实验验证HCC中UROCI表达情况。利用HE染色判断肿瘤分化水平,分析UROCI表达水平与其相关性。构建稳定过表达UROCI和其突变体的Hep3B、LM3细胞系,开展体外细胞表型实验。通过细胞计数试剂盒8(CCK-8)、平板克隆实验、EdU实验、划痕实验和Transwell实验探究UROCI对HCC细胞增殖和迁移的影响。结果 TCGA数据库分析结果显示,与癌旁组织相比,UROCI在HCC组织中普遍下调( $P < 0.0001$ ),UROCI低表达组较表达组的患者预后更差( $P < 0.05$ )。免疫组织化学染色及评分、qPCR和Western blot实验验证了UROCI在HCC中低表达。不同分化水平癌组织的免疫组织化学染色结果提示分化越差的HCC组织中UROCI表达水平越低( $P < 0.05$ )。平板克隆实验结果显示,过表达UROCI的细胞克隆形成数目较对照组明显减少。CCK-8和EdU染色实验结果显示,UROCI过表达的细胞增殖速度显著低于对照组( $P < 0.001$ )。划痕实验结果显示,UROCI过表达的HCC细胞迁移距离明显小于对照组细胞( $P < 0.0001$ )。Transwell实验显示,过表达UROCI后细胞穿过小室的数目显著减少( $P < 0.0001$ )。但是UROCI的活性位点突变后上述实验表型的结果和对照组趋于一致。结论 UROCI在HCC组织中低表达,在HCC细胞中过表达UROCI可能对细胞增殖和迁移能力有抑制作用。

**关键词** 肝细胞癌;UROCI;组氨酸代谢

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1339-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.008

2024-05-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81930086、82120108012);安徽省高校科研项目(编号:2022AH010070);安徽省临床医学研究转化专项(编号:202204295107020008)

作者单位:<sup>1</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科,南京 210008

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科,合肥 230022

作者简介:严洪遥,女,博士研究生;

孙倍成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sunbc@ahmu.edu.cn

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占原发性肝癌的85%~90%,是第三大癌症相关死亡原因<sup>[1]</sup>。临床索拉非尼<sup>[2]</sup>、乐伐替尼<sup>[3]</sup>和瑞戈非尼<sup>[4]</sup>等药物只能将HCC患者的生存时间延长数月,探索新的治疗策略具有重要意义。有研究<sup>[5]</sup>表明HCC中高水平的精氨酸通过代谢重编程促进肿瘤进展,提示氨基酸代谢组中各物质水平的改变可能影响HCC的发生发展。组氨酸是一种饮食必需氨基酸<sup>[6]</sup>,研究表明组氨酸代谢通路中关键酶的缺陷使得通路流量减少,叶酸消耗减少,叶酸池的蓄积导致甲氨蝶呤不敏感<sup>[7]</sup>。但是由于关键酶尿刊酸酶(urocanase domain containing 1, UROCI)仅在肝脏特异性表达,上述研究并未涉及。目前对UROCI的研究局限在临床UROCI缺乏症的病例报道。UROCI在HCC中的表达情况及其对于肿瘤生物学特征的影响仍然不清楚。因此,明确UROCI在HCC癌组织和癌旁组织中的表达差异,探究UROCI对HCC细胞增殖、迁移的影响,对HCC的诊疗具有潜在价值。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞系Hep3B、LM3购买于中国科学院细胞库。DMEM培养基、PBS、胎牛血清、青链霉素双抗、胰酶购自南京维森特生物技术公司;Lipofectamine 3000转染试剂购自美国Thermo Fisher Scientific公司;总RNA提取、ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒购自南京诺唯赞公司;UROCI抗体及相应的二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;QuickBlock<sup>TM</sup>免疫染色封闭液、polybrene、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、RIPA裂解液、BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;免疫组织化学染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自日本同仁化学研究所;Transwell小室购自美国Corning公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 病例资料** 本项课题研究所使用的临床样本收集自南京大学医学院附属鼓楼医院HCC患

者的手术切除标本。组织离体后立刻对癌组织、癌旁组织(距肿瘤边缘 > 2 cm) 取样, 4% 甲醛溶液和液氮冻存罐中各留存一份, 分别用于制备石蜡切片和组织 RNA 及蛋白的提取。所有的样本使用均获得患者知情同意。

**1.2.2 RNA 提取及实时定量 PCR**(real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 将液氮中冻存的 HCC 患者癌以及癌旁样本冰上剪碎、研磨, 按照南京诺维赞公司的总 RNA 提取试剂盒步骤说明, 提取总 RNA 并测定浓度。将总 RNA 逆转录成 cDNA 后, 使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 进行 qPCR 检测实验。PCR 扩增所使用的引物序列如下: UROCI1, (正义链) 5'-TGACAGAGGAG-CAGACTTTGGT-3'; (反义链) 5'-GAGCCCAGAGGT-GACAAAGAC-3';  $\beta$ -actin, (正义链) 5'-GTCTTC-CCCTCCATCGTG-3'; (反义链) 5'-AGGCTGAGGAT-GCCTCTCTT-3'。

**1.2.3 质粒构建及细胞转染** 用于过表达 UROCI1 的质粒由南京科瑞斯生物科技公司合成。根据文献<sup>[8]</sup>报道的 UROCI1 功能活性位点, 使用 Quick change 定点突变法构建 UROCI1 突变体质粒(p. L70P 和 p. R450C) 并测序验证序列正确无误后, 抽提质粒。使用 Lipofectamine 3000 对 293T 细胞进行转染, 收集 48 h 后病毒液感染 Hep3B 和 LM3 细胞并加入促感染试剂 polybrene, 使用嘌呤霉素筛选后获得稳转株细胞。

**1.2.4 蛋白提取及 Western blot 实验** 从液氮中取出新鲜组织样本, 冰上剪碎并加入研磨珠研磨; 对于细胞, 弃去培养基并用 PBS 洗涤 1 遍, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上获得组织和细胞蛋白, 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min 后收集上清液, 使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 根据定量结果加入上样缓冲液。95 °C 金属浴 8 min, 用于 Western blot 实验蛋白上样。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离不同分子量的蛋白后转至醋酸纤维素薄膜, 5% BSA 封闭后孵育 UROCI1 抗体(1 : 500) 4 °C 冰箱过夜。次日 TBST 洗 3 遍后, 孵育相应种属来源的二抗抗体, 室温摇床 2 h, TBST 洗 3 遍后显影。

**1.2.5 免疫组织化学染色及评分** 将组织切片放入 60 °C 烘箱烘烤 2 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化。使用一抗对应 PH 的修复液抗原修复, 免疫组化笔勾画组织范围以便孵育反应液, 加入内源性过氧化物酶封闭液室温孵育 10 min 后 PBS 洗 3 遍, 然后利

用山羊血清封闭 10 min, 孵育 UROCI1 抗体(1 : 200) 4 °C 冰箱过夜。次日洗去一抗后孵育对应的二抗, DAB 显色, 苏木精染核。逆上述梯度乙醇顺序以及二甲苯进行脱水透明, 最后使用中性树胶封片, 病理扫描系统扫片。利用 Image J 软件和“IHC-Profiler”算法计算出反应每张组织 UROCI1 染色强度和染色面积的免疫组织化学染色 H-score 评分<sup>[9-10]</sup>。

**1.2.6 细胞增殖实验** 胰酶消化细胞, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 将细胞重悬并计数, 梯度稀释至  $2 \times 10^4$ /ml, 96 孔板中每孔加入 100  $\mu$ l 重悬液铺板(即 2 000 个细胞/孔), 之后连续 5 d 每天重复以下检测方法: 每个孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液 37 °C 孵育 1 h 后, 利用酶标仪检测在波长 450 nm 处的吸光度值。

**1.2.7 平板克隆实验** 取对数生长期的细胞胰酶消化后离心, 细胞重悬计数后, 梯度稀释至  $0.5 \times 10^3$ /ml, 然后 6 孔板的每个孔中加入 2 ml 细胞重悬液。放入细胞培养箱中培养 2 周后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫染色, 最后拍照、计数。

**1.2.8 Transwell 小室实验** 细胞胰酶消化, 使用无血清培养基重悬细胞, 计数后梯度稀释至浓度为  $5 \times 10^4$ /ml, 取 200  $\mu$ l 加入 Transwell 上室, 取 600  $\mu$ l 含有 10% 胎牛血清的完全培养基加入下室。37 °C 培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定细胞, 结晶紫染色, 然后用棉签轻柔擦去上室中的细胞, 拍照并统计穿过小室的细胞数。

**1.2.9 细胞划痕实验** 6 孔板细胞铺板, 待细胞汇合度达到 100% 后, 使用 200  $\mu$ l 枪头垂直于细胞培养板进行划线, 用 PBS 轻柔冲洗, 拍照 0 h 的划痕状态, 37 °C 培养箱中培养 24、48 h 后对相同部位进行拍照, 记录划痕宽度变化情况并统计学分析。

**1.2.10 EdU 染色法细胞增殖检测** 细胞胰酶消化, 重悬计数后梯度稀释至浓度  $8 \times 10^4$ /ml, 取 500  $\mu$ l 加入 24 孔板中, 细胞培养箱培养至细胞汇合度 50% 时, 按照 BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒说明书, 加入 500  $\mu$ l  $2 \times$  EdU 工作液(20  $\mu$ mol/L) 37 °C 培养箱孵育 2 h 后, 弃去培养液, 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 用 QuickBlock™ 免疫染色封闭液洗涤细胞 3 遍, 用通透液(含 0.3% Triton X-100 的 PBS) 室温孵育 15 min。接着加入 100  $\mu$ l Click 反应液室温避光孵育 30 min, 洗涤 3 次后, 每孔加入 1 ml  $1 \times$  Hoechst 33342 室温避光孵育 10 min, 洗涤 3 次, 倒置荧光显微镜下拍照。

**1.3 统计学处理** 使用 Graphpad Prism 9 软件统

计学分析,实验都进行3次重复,结果使用均数±标准差表示。正态分布且方差齐的组间均值比较使用 Student's *t* 检验,多组间均值比较使用单因素方差分析(ANOVA),两组间构成比的比较使用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生信分析 UROC1 在 HCC 中表达

通过对 HCC 患者癌组织和癌旁组织的蛋白质质谱数据<sup>[11]</sup> 分析,结果显示质谱检测到 UROC1 表达的 82 例配对样本中,UROC1 在癌与癌旁组织的差异性表达显著,73 例(89.0%) 癌旁组织与配对的癌组织表达量比值大于 2,仅 3 例(3.7%) 显示癌组织比癌旁组织的表达水平高。利用 TCGA 数据库中 HCC 病人的预后信息绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,结果显示 UROC1 低表达组的生存期短于 UROC1 高表达组 ( $P = 0.012$ )。见图 1。

### 2.2 UROC1 表达降低与 HCC 发生发展的相关性

对转移性和非转移性 HCC 病人癌组织和癌旁组织切片进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,

HE) 染色和 UROC1 免疫组织化学染色,可以观察到 UROC1 差异性表达情况的代表性图像(图 2A)。利用临床 HCC 病人的癌组织和癌旁组织样本制作组织芯片,通过对免疫组织化学染色的病理学评分(图 2B),结果显示 HCC 组织中 UROC1 表达水平显著低于癌旁组织( $\chi^2 = 68.97, P < 0.0001$ )。另外,Western blot(图 2C)和 qPCR(图 2D) 实验检测了配对 HCC 组织样本中 UROC1 的蛋白( $n = 16$ )和 mRNA( $n = 38$ ) 表达水平,差异性表达结果与免疫组化染色结果趋势一致( $t = 8.574, P < 0.0001$ )。说明 UROC1 低表达和 HCC 发生发展具有相关性。

### 2.3 UROC1 表达与 HCC 低分化的相关性

通过 HE 染色判断肿瘤组织的分化水平,按照 WHO 经典的肿瘤分化程度分级进行样本归类后,免疫组织化学染色的结果提示分化水平越差的肝癌组织 UROC1 表达水平越低。见图 3。

### 2.4 过表达 UROC1 对 HCC 细胞增殖的影响

肝癌细胞系中 UROC1 的表达水平普遍较低,Western blot 实验中使用超敏曝光液检测了常见的 8 种肝癌细胞系内 UROC1 的表达水平(图 4A),选择 Hep3B

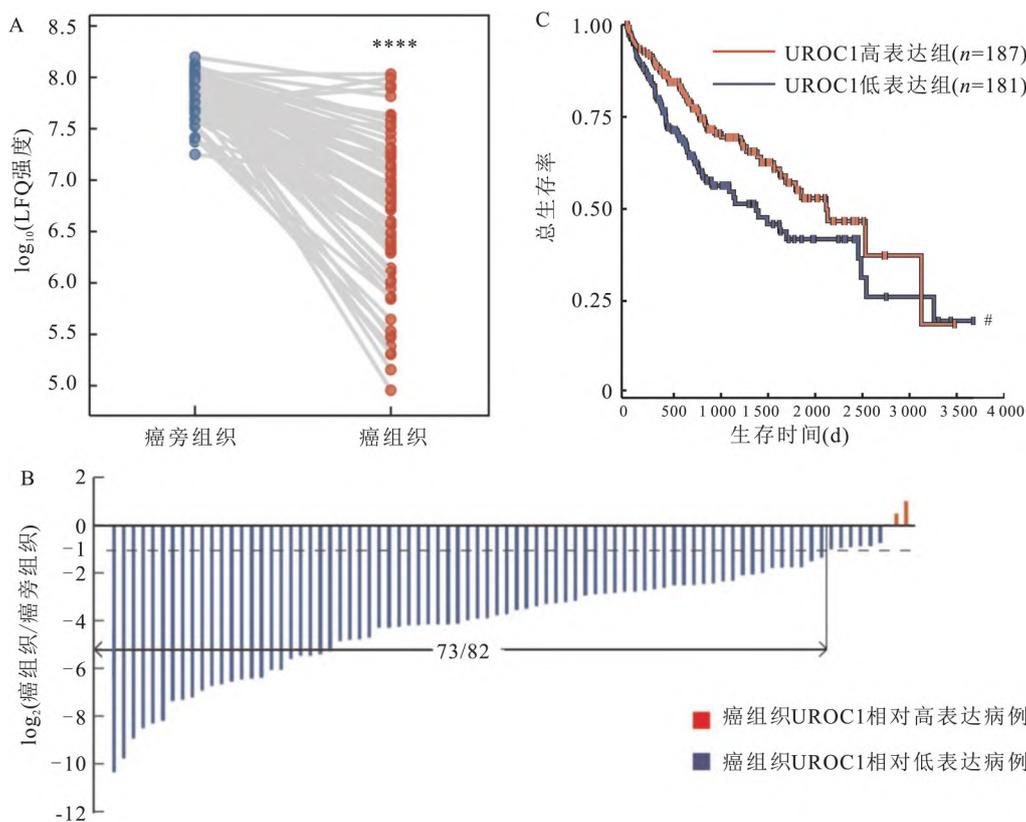


图1 生物信息学分析 UROC1 在 HCC 组织中的差异性表达

A: 基于蛋白质质谱数据对 UROC1 在 HCC 癌旁组织和癌组织中表达水平的比较分析;与癌旁组织比较: \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; B: 相比于癌旁组织,每一例样本癌组织中 UROC1 表达水平的相对高低; C: 基于 TCGA 数据库的 UROC1 表达情况与 HCC 患者临床生存时间的相关性分析;与 UROC1 高表达组比较: #  $P < 0.05$

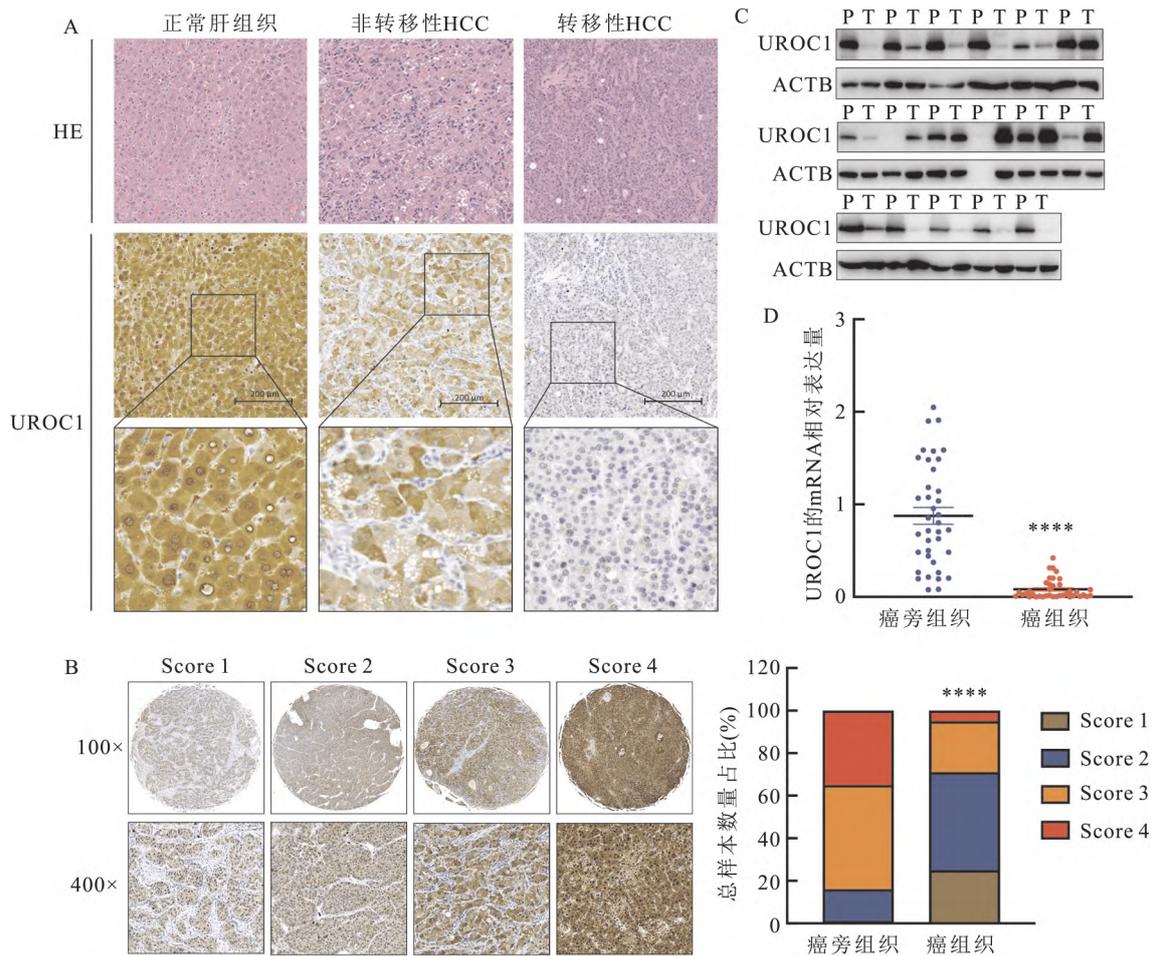


图2 HCC 癌组织和癌旁组织样本中 UROCI 表达水平的验证

A: HCC 癌和癌旁组织的 HE 染色及 UROCI 免疫组织化学染色结果的代表性图像  $\times 200$ ; B: HCC 组织芯片免疫组织化学染色病理学评分结果及 Score 1~4 在癌和癌旁组织样本中的构成比; Score 1~4: UROCI 表达从低到高的代表性图像; 与癌旁组织比较: \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; C: Western blot 实验检测配对 HCC 癌组织和癌旁组织 ( $n = 16$ ) 中 UROCI 蛋白水平; P: 癌旁组织; T: 癌组织; D: qPCR 实验检测配对 HCC 癌和癌旁组织 ( $n = 38$ ) 中 UROCI 的 mRNA 水平; 与癌旁组织比较: \*\*\*\*  $P < 0.0001$

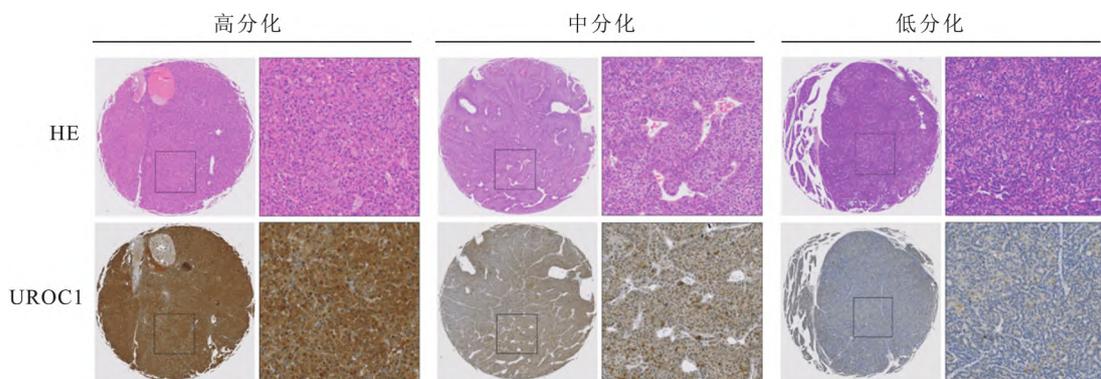


图3 不同分化水平的 HCC 组织中 UROCI 的表达情况  $\times 100$

和 LM3 构建过表达 UROCI 和其活性位点突变体的细胞系 (p. L70P 和 p. R450C) ,并验证转染效率 (图 4B) 。CCK-8 实验结果显示 ,UROCI 过表达组的吸光度较对照组降低 (图 4C) 。EdU 染色实验 (图 4E) 结果提示 ,过表达 UROCI 的 HCC 细胞增殖速

度低于对照组 ( $F = 48.7, P < 0.001$ ) ;平板克隆实验 (图 4D) 结果表明 ,UROCI 过表达后细胞克隆形成数目明显减少 ( $F = 229.9, P < 0.0001$ ) ,而过表达 UROCI 突变体的 HCC 细胞表型和对照组趋于一致。

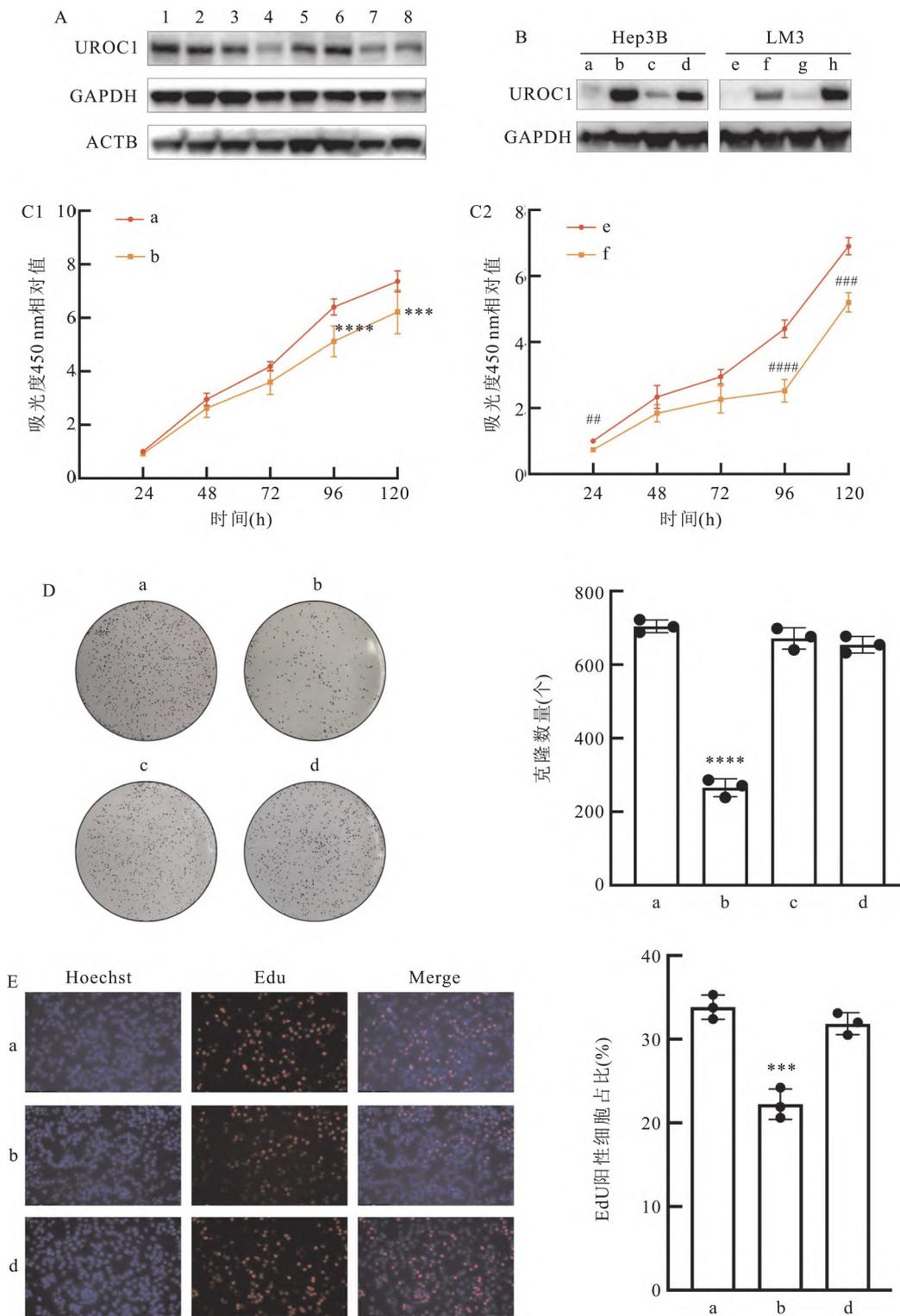


图4 UROCI对HCC细胞增殖能力的影响

A: Western blot 检测 UROCI 在 8 种 HCC 细胞系中的表达水平; 1: HepRG; 2: Hep3B; 3: 97L; 4: Huh7; 5: LM3; 6: SMMC-7721; 7: HepG2; 8: 97H; B: Western blot 验证细胞转染效率; C ~ E: CCK-8、平板克隆、EdU 实验 (×10) 检测过表达 UROCI 及其突变体的 HCC 细胞增殖能力; a: Hep3B 对照组; b: Hep3B UROCI 过表达组; c: Hep3B UROCI 突变体 L70P 过表达组; d: Hep3B UROCI 突变体 R450C 过表达组; e: LM3 对照组; f: LM3 UROCI 过表达组; g: LM3 UROCI 突变体 L70P 过表达组; h: LM3 UROCI 突变体 R450C 过表达组; 1: Hep3B; 2: LM3; 与 Hep3B 对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; 与 LM3 对照组比较: ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; #### $P < 0.0001$

**2.5 过表达 UROC1 对 HCC 细胞迁移的影响** 划痕实验结果显示, UROC1 过表达后划痕愈合速度慢于对照组, 而过表达活性位点突变的 UROC1 后, 划痕愈合速度和对照组几乎一致 ( $F = 113.6, P < 0.0001$ ) (图 5A、B)。Transwell 实验结果显示 UROC1 过表达的 HCC 细胞相同时间内穿过 Transwell 小室的数量显著低于对照组, 而活性位点突变后 UROC1 对 HCC 细胞迁移的抑制作用消失 ( $F = 264.9, P < 0.0001$ ) (图 5C、D)。说明 UROC1 表达水平的增加会抑制 HCC 细胞的迁移。

### 3 讨论

作为第三大癌症相关死亡原因, 肝癌已成为全球严重的健康威胁, 预计到 2025 年每年将影响超过 100 万人<sup>[1]</sup>。虽然近年来系统治疗的发展一定程度上延长了 HCC 患者的总生存期, 但 HCC 的发病率和病死率仍居高不下, 许多患者早期缺乏典型症状, 确诊后常常无法进行根治性手术, 而临床又缺乏疗效好、副作用小的治疗药物。因此, 探索 HCC 发生发展的机制, 寻找指导 HCC 早期诊断的生物标志物和新的治疗策略对临床 HCC 病人的生存和预后具

有重要意义。

本研究首先通过生物信息学分析发现癌和癌旁组织中差异性表达的蛋白 UROC1, 并通过免疫组织化学染色、Western blot、qPCR 实验对收集的临床组织样本进行验证, 发现癌组织中 UROC1 表达水平显著低于对应的癌旁组织。组氨酸不能在人体内合成, 其分解代谢可以通过肝脏和皮肤中的组氨酸解氨酶转化为反式尿刊酸, 而皮肤中的紫外线又可以将反式尿刊酸转化成顺式尿刊酸, 对皮肤起保护作用。但是催化组氨酸代谢通路中尿刊酸进一步反应的 UROC1 仅在肝细胞中特异性表达。因此, UROC1 在组氨酸代谢中的地位不容忽视。过去的研究<sup>[12]</sup>中, 对于 UROC1 的认知局限在代谢催化酶, 为了在体外进一步探究 UROC1 对 HCC 细胞肿瘤生物学的影响, 该研究通过免疫组织化学染色及评分、qPCR 和 Western blot 实验验证了 UROC1 在 HCC 中低表达, CCK-8、平板克隆及 EdU 实验结果表明, 过表达 UROC1 抑制 HCC 细胞增殖; 划痕实验和 Transwell 实验结果表明, 过表达 UROC1 抑制 HCC 细胞迁移。而过表达 UROC1 的活性位点突变体后对 HCC 细胞的增殖和迁移能力未观察到显著差异。

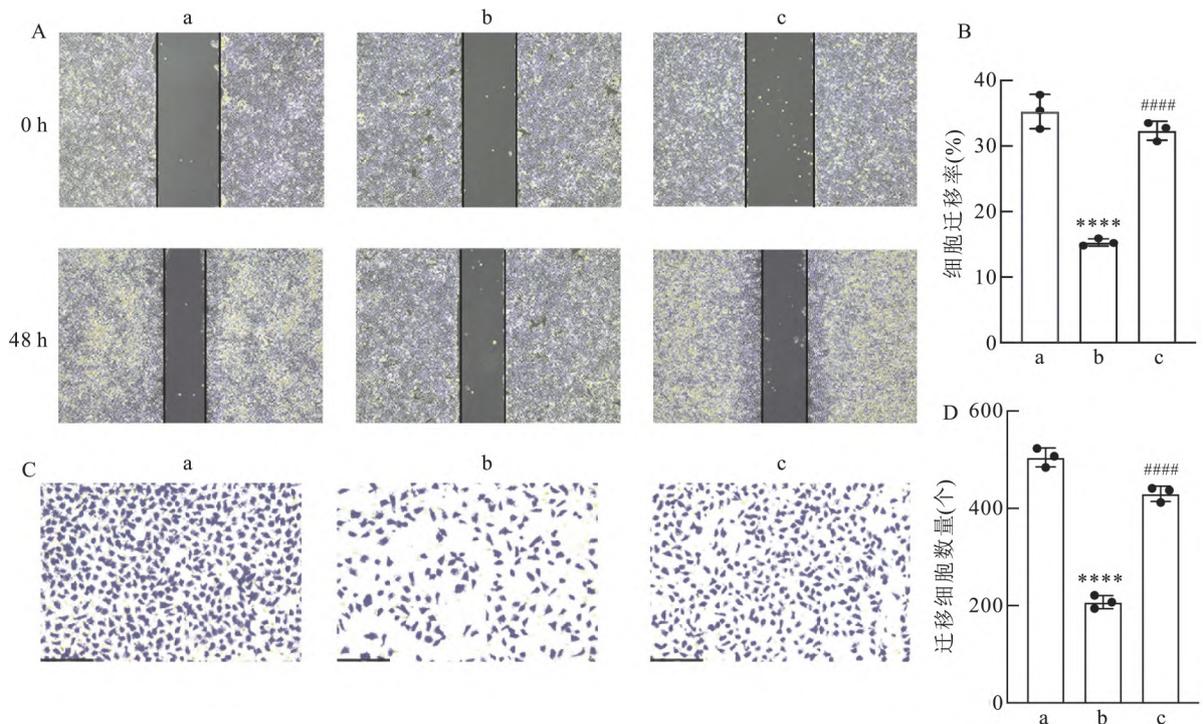


图 5 UROC1 对 HCC 细胞迁移的影响

A: 划痕实验验证 UROC1 对 Hep3B 细胞迁移能力的影响  $\times 4$ ; B: 不同组中细胞划痕愈合面积占划痕总面积百分比(细胞迁移率)的统计直方图; C: Transwell 实验验证 UROC1 对 Hep3B 细胞迁移能力的影响  $\times 10$ ; D: 不同组中迁移细胞数量的统计直方图; a: Hep3B 对照组; b: Hep3B UROC1 过表达组; c: Hep3B UROC1 突变体 R450C 过表达组; 与 Hep3B 对照组比较:  $*** P < 0.0001$ ; 与 Hep3B UROC1 过表达组比较:  $#### P < 0.0001$

因此, UROC1 的表达水平对 HCC 患者的预后评估具有潜在价值, UROC1 在 HCC 发生发展中发挥的作用使其有望成为 HCC 治疗的新靶点, 值得进一步探究。

综上所述, UROC1 在 HCC 组织中表达下调, UROC1 的低表达与 HCC 细胞分化水平降低、肿瘤转移、增殖和迁移能力增强具有相关性。但该研究尚且存在一定的不足之处: 一方面, UROC1 对 HCC 肿瘤生物学特性的研究局限于细胞水平, 未开展动物实验的探究, 后续课题组将构建肝癌动物模型, 在体内进一步验证 UROC1 对肿瘤的抑制作用; 另一方面, UROC1 在抑制 HCC 发生发展过程中的具体机制没有深入探究, 没有对组氨酸分解代谢的其它产物变化和旁路途径进行探究。可以深入开展代谢组、同位素标记组氨酸的代谢流等实验, 对下游产物谷氨酸的变化及其促癌机制<sup>[13]</sup> 相关问题进行深入探讨。

### 参考文献

- [1] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [2] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-90.
- [3] Kudo M, Finn R S, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163-73.
- [4] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hep-

atocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10064): 56-66.

- [5] Mossman D, Muller C, Park S, et al. Arginine reprograms metabolism in liver cancer via RBM39[J]. *Cell*, 2023, 186(23): 5068-83. e23.
- [6] Brosnan M E, Brosnan J T. Histidine metabolism and function[J]. *J Nutr*, 2020, 150(Suppl 1): 2570S-5S.
- [7] Kanarek N, Keys H R, Cantor J R, et al. Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity[J]. *Nature*, 2018, 559(7715): 632-6.
- [8] Espinos C, Pineda M, Martinez-Rubio D, et al. Mutations in the urocanase gene *UROCI* are associated with urocanic aciduria[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(6): 407-11.
- [9] Jensen E C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using Image J[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2013, 296(3): 378-81.
- [10] Varghese F, Bukhari A B, Malhotra R, et al. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96801.
- [11] Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-61.
- [12] Grinton K E, Levy H L, Kennedy A D, et al. Untargeted metabolomics identifies unique though benign biochemical changes in patients with pathogenic variants in *UROCI* [J]. *Mol Genet Metab Rep*, 2019, 18: 14-8.
- [13] Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 163-94.

## Expression of UROC1 in hepatocellular carcinoma and its effect on tumor development

Yan Hongyao<sup>1</sup>, Lao Yuanxiang<sup>2</sup>, Sun Beicheng<sup>1, 2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; <sup>2</sup>Dept of Hepatobiliary Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the expression of urocanase domain containing 1 (UROCI) in Hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the development of HCC. **Methods** UROC1 expression and prognostic data in tumor and para-tumor tissues from protein mass spectrometry and TCGA database were analyzed. Immunohistochemical staining, real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot experiments were utilized to verify the expression of UROC1 in HCC. The effect of UROC1 expression level on tumor differentiation was analyzed by HE staining to determine the tumor differentiation level. Hep3B and LM3 cell lines stably overexpressing UROC1 and its mutants were constructed for *in vitro* phenotyping experiments. Effects of UROC1 on HCC cell proliferation and migration were explored by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, colony formation, EdU assay, scratch

# NDRG1 通过 ERK 通路增强肝细胞癌对索拉菲尼的耐药

宋博娇<sup>1</sup> 孙倍成<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探究 N-myc 下游调控基因 1 (NDRG1) 对肝细胞癌 (HCC) 的作用, 以及 NDRG1 是否影响 HCC 对索拉菲尼 (Sorafenib) 的敏感性。方法 通过 TCGA 数据库预测 NDRG1 在 HCC 中的表达水平, 并通过蛋白质印迹 (WB) 实验和免疫组织化学 (IHC) 染色进行验证。构建 NDRG1 敲除细胞系进行体外实验, 通过肿瘤功能学实验细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)、EdU 染色、细胞划痕、Transwell 实验研究 NDRG1 及联合 Sorafenib 对 HCC 细胞增殖、迁移与侵袭以及凋亡的影响。利用裸鼠皮下荷瘤进行体内实验, 研究 NDRG1 和 Sorafenib 对 HCC 成瘤的影响; 通过 WB 实验和 IHC 染色确定 NDRG1 调节 HCC 对 Sorafenib 敏感性的通路。结果 WB 实验和 IHC 染色显示, NDRG1 在 HCC 中高表达, 与 TCGA 数据结果一致。肿瘤功能学实验结果表明 NDRG1 敲除或 Sorafenib 刺激使 HCC 细胞增殖、迁移及侵袭能力减弱, 肿瘤细胞凋亡增加, 而 NDRG1 敲除联合 Sorafenib 使 HCC 细胞增殖、迁移与侵袭能力进一步减弱, 肿瘤细胞凋亡进一步增加 ( $P < 0.0001$ )。小鼠皮下荷瘤模型结果表明 NDRG1 敲除或 Sorafenib 刺激使荷瘤体积及质量减小, 而 NDRG1 敲除联合

Sorafenib 使荷瘤体积及质量进一步减小 ( $P < 0.0001$ )。WB 和 IHC 结果表明 NDRG1 敲除联合 Sorafenib 可降低 Erk1/2 的磷酸化水平。结论 NDRG1 在 HCC 中高表达, 高表达 NDRG1 促进 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 并抑制肿瘤细胞凋亡。NDRG1 通过 ERK 信号通路增强 HCC 对 Sorafenib 的耐药。

**关键词** N-myc 下游调控基因 1; 肝细胞癌; 索拉菲尼; ERK 通路

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1346-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.009

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝脏恶性肿瘤, 也是导致癌症相关死亡的第三大因素。由乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染引起的慢性肝炎肝硬化仍是 HCC 的主要病因<sup>[1]</sup>。目前, 早期治疗手段包含手术切除、射频消融、经动脉化疗栓塞等, 但 5 年内复发率高达 70%; 对于晚期不可切除 HCC, 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 是目前一线治疗方案<sup>[2]</sup>。索拉菲尼 (Sorafenib) 是一种口服多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂, 已被证明能阻断 HCC 肿瘤细胞增殖、抑制血管生成, 而且能诱导肿瘤细胞凋亡, 具有良好的抗肿瘤活性, 但仅约 30% 患者对药物敏感, 总生存期仅延长 3 个月<sup>[3]</sup>。因此, 亟需寻找缓解 Sorafenib 耐药的机制, 提供有效的治疗策略。

N-myc 下游调控基因 1 (N-myc downstream regu-

2024-05-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81930086、82120108012); 安徽省高校科研项目 (编号: 2022AH010070); 安徽省临床医学研究转化专项 (编号: 202204295107020008)

作者单位: <sup>1</sup> 南京中医药大学鼓楼临床医学院肝胆外科, 南京 210008

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰及移植外科, 合肥 230022

作者简介: 宋博娇, 女, 硕士研究生;

孙倍成, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunbc@ahmu.edu.cn

assay and Transwell assay. **Results** The results of database analysis showed that UROC1 was generally downregulated in HCC tissues, and patients in the UROC1 low-expression group had a worse prognosis. Immunohistochemical staining and scoring, qPCR and Western blot experiments verified the low expression of UROC1 in HCC. Immunohistochemical staining of tumor tissues with different differentiation levels demonstrated that the poorer the differentiation of HCC tissues, the lower the expression level of UROC1. CCK-8, colony formation and EdU assays suggested that overexpression of UROC1 inhibited the proliferation of HCC cells. The results of scratch and Transwell assays showed that overexpression of UROC1 inhibited the migration of HCC cells. However, the results of the above experimental phenotypes after active site mutation converged with those of the control group. **Conclusion** UROC1 is lowly expressed in HCC tissues, and overexpression of UROC1 in HCC cells may inhibit the ability of cell proliferation and migration.

**Key words** hepatocellular carcinoma; UROC1; histidine metabolism