

网络出版时间: 2024-06-11 14:56:55 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1657.030>

NDRG1 通过 ERK 通路增强肝细胞癌对索拉菲尼的耐药

宋博娇¹ 孙倍成^{1,2}

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^[1]。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^[2]。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^[3]。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: ¹ 南京中医药大学鼓楼临床医学院肝胆外科, 南京 210008

² 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

lated gene-1, NDRG1) 是一种低氧相关蛋白,参与细胞增殖和分化、应激反应、肿瘤进展和转移。在不同类型癌症中表达有差异并与不良预后显著相关^[4]。靶向 NDRG1 在 HCC 化疗中的作用机制仍不清晰,该研究拟探究 NDRG1 对 HCC 化疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 人肝癌细胞系 MHCC97L、MHCC97H、Hep3B、HepG2、HCC-LM3、Huh-7、SMMC-7721 及正常对照细胞 HepRG 均购于中国科学院细胞库。以上细胞均在含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 °C、5% CO₂。培养细胞所需的胎牛血清、DMEM 培养基、PBS、青链霉素双抗及胰酶购自南京维森特生物技术公司。

1.1.2 实验动物 BALB/c-Nude 6 周龄雄性小鼠购买于江苏集萃药康生物科技有限公司。小鼠在无特定病原体(SPF)的设施中饲养,所喂养的食物和水均经过高压灭菌,并每天进行 12 h/12 h 的光暗循环。实验获得安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准(编号:LLSC20221301)。所有动物实验符合实验动物伦理学要求。

1.1.3 主要试剂 蛋白提取所需的 RIPA 裂解液、磷酸酶及蛋白酶抑制剂、蛋白浓度 BCA 试剂盒购自南通碧云天生物技术公司;细胞培养板、Transwell 小室购自美国康宁公司;细胞转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国赛默飞公司;其他实验所需的细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒、结晶紫染液、苏木精染液、EdU 染色检测试剂盒购自南通碧云天生物技术公司;免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司;中性甲醛固定液来自武汉塞维尔生物科技有限公司。小鼠皮下荷瘤模型所需的索拉非尼购自美国 MCE 公司。目的蛋白一抗: AKT(#9272)、P-AKT(Ser473) (#9271)、Erk1/2(#4695)、P-Erk1/2(Thr202/Tyr204) (#4370)、HSP90(#4874)、NDRG1(#5196) 购自美国 CST 公司,GAPDH(#60004-1-Ig) 购自武汉三鹰公司。

1.1.4 病例资料 本研究使用的人类 HCC 样本均来自南京中医药大学鼓楼临床医学院,所用样本的患者及家属已签署知情同意书,并同意使用其组织和病理信息进行实验研究。组织离体后切取肿瘤组织和癌旁组织(距离肿瘤边缘大于 2 cm),浸泡于

4% 甲醛组织固定液中,用于包埋组织和石蜡切片;将切取的新鲜组织放入液氮中保存,用于提取组织蛋白。

1.2 方法

1.2.1 敲除细胞系构建 通过蛋白质印迹(Western blot, WB) 筛选正常肝细胞 HepRG 与人肝癌细胞系 MHCC97L、MHCC97H、Hep3B、HepG2、HCC-LM3、Huh-7、SMMC-7721 中 NDRG1 的蛋白表达水平,选取高表达 NDRG1 的 Hep3B 细胞通过 Lipofectamine 3000 构建 NDRG1 敲除细胞系。靶向 NDRG1 的 sgRNA 购自南京科瑞斯生物技术有限公司。通过 WB 实验验证敲除效率(sgNDRG1-1: caccgCTCTTGCAGGAGCCGGTGA; sgNDRG1-2: aaacT-CACCGGCCTCCTGCAAGAGc),其中 sgNDRG1-1 定义为 Hep3B NKO, sgNDRG1-2 定义为 Hep3B NKO1,选择敲除效率更好的 Hep3B NKO 进行后续实验。

1.2.2 蛋白提取及 WB 实验 使用含有蛋白解酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液收集细胞。冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,95 °C 金属浴 5 min。将蛋白定量加到 10% 的 SDS-PAGE 上,80 ~ 120 V 恒定电压下进行电泳,再以 250 mA 恒定电流转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶孵育 1 h,4 °C 摇床一抗孵育过夜。辣根过氧化物酶(HRP) 偶联二抗室温下孵育 1 h, TBST 洗脱后进行显影。

1.2.3 IHC 染色 石蜡切片在 60 °C 烘箱中放置 1 h。在二甲苯和梯度乙醇中进行脱蜡水化。酸性修复液进行微波炉抗原修复。依照说明书常温下阻断内源性过氧化物酶并封闭,目标抗体 1 : 200 稀释后覆于切片组织并 4 °C 孵育过夜。第 2 天滴加二抗并进行 DAB 显色。使用组织学评分(H-Score) 系统半定量评估 IHC 染色组织中的蛋白表达量。用阳性面积百分比乘以染色强度计算 H-Score^[5]。

1.2.4 CCK-8 实验、EdU 染色检测细胞增殖 ① CCK-8 实验: 将 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每个孔加入 10 μ l CCK-8 溶液置于培养箱 1 h 后测量。在相对应的时间点使用酶标仪在 450 nm 测定吸光度。② EdU 染色实验: 将 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中,次日细胞贴壁后按照说明书使用 EdU 检测试剂盒进行 EdU 染色及 DAPI 染色,染色完成后于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.5 细胞划痕实验 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,次日细胞贴壁伸展后,使用 200 μ l 枪头对细胞进行划线拍照,48 h 后再次进行拍照,计算划痕

宽度变化。

1.2.6 Transwell 细胞侵袭实验 下室加入 600 μl 含 10% FBS 的 DMEM 培养基; Transwell 小室内接种 1×10^5 个细胞加入无胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 48 h。PBS 洗涤细胞, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min; PBS 洗涤 3 次, 结晶紫染色 20 min; PBS 洗涤干净, 自然烘干, 在显微镜下进行图形采集, 随机选择不同的视图并取平均值进行分析。

1.2.7 流式细胞术 收集诱导凋亡后产生的培养基上清液, 使用胰酶(不含 EDTA) 消化剩余贴壁细胞, 1 200 r/min 离心 5 min 收集培养基上清液中已悬浮细胞及后消化的贴壁细胞, PBS 洗涤 3 次弃上清液, 加入 100 μl 1 \times Buffer 重悬细胞; 在细胞悬液中加入 5 μl Annexin V-FITC 和 PI 染料, 涡旋混匀后室温避光孵育 20 min 后通过流式细胞仪检测。

1.2.8 小鼠皮下实体瘤种植 首先消化细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, PBS 重悬细胞进行计数至 3×10^7 个/ml。将实验小鼠随机分成 4 组, 2 组接种 Hep3B 细胞, 2 组接种 Hep3B NKO 细胞。固定小鼠四肢, 在腹股沟处将混匀的细胞悬液(按照 3×10^6 个/100 μl) 进行皮下注射。

1.2.9 Sorafenib 治疗 ① 小鼠体内模型: 接种皮下荷瘤后第 5 日, 通过灌胃的方式予以 Sorafenib 治疗, 每周 5 次, 10 mg/kg, 按照 10% DMSO、90% 玉米油的比例溶解药物。在末次治疗 48 h 后收集肿瘤, 拍摄肿瘤大体照片并测量体积及质量。② 细胞体外模型: 使用 5 $\mu\text{mol/L}$ Sorafenib 刺激 Hep3B 以及 Hep3B NKO 细胞 48 h, 并分别定义为 Hep3B + Sorafenib 和 Hep3B NKO + Sorafenib 组。

1.2.10 GEPIA 及 UALCAN 公共数据库分析 通过 GEPIA 在线数据平台 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), 分析肝细胞癌样本中高表达 NDRG1 和低表达 NDRG1 对患者总体生存率的影响, cut-off 值设定为 50%, 分别有 182 例高表达 NDRG1 样本和 182 例低表达 NDRG1 样本。使用 UALCAN 在线数据分析平台 (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 基于 TCGA 公开数据集分析不同分化程度肝细胞癌中 NDRG1 mRNA 的表达水平。

1.3 统计学处理 使用 Image J 进行统计, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。所有值以平均值 \pm 标准误 (SEM) 表示。采用 t 检验、单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NDRG1 在 HCC 中的表达水平 WB 实验显示, NDRG1 在 HCC 肿瘤组织中高表达 ($t = 8.976$, $P = 0.0003$; 图 1A、B)。配对 HCC 及癌旁组织 IHC 染色证实 NDRG1 在肿瘤组织中高表达 (图 1C)。使用 GEPIA2 数据库进行生存分析, 结果显示, 与高表达 NDRG1 患者相比, 低表达的患者能获得更长的总生存期 ($HR = 1.5$, $P = 0.015$; 图 1D)。用 TCGA 数据分析正常肝组织和不同分化程度 HCC 样本中 NDRG1 的表达情况, 结果显示, 与正常肝组织相比, 其余各组 NDRG1 表达水平增高 ($P < 0.0001$; 图 1E)。

2.2 敲除 NDRG1 对 HCC 细胞增殖能力的影响 通过 WB 筛选 NDRG1 高表达的细胞系 (图 2A), 选用高表达 NDRG1 的 Hep3B 细胞构建 NDRG1 敲除细胞株 Hep3B NKO 细胞, 用于后续实验 (图 2B)。使用 Sorafenib 刺激 Hep3B 细胞后发现 NDRG1 蛋白表达水平先降低后升高 ($F = 301.70$, $P < 0.0001$; 图 2C)。CCK-8 实验结果显示, Hep3B 组吸光度值高于其他三组 ($F = 288.40$, $P < 0.0001$); 且 Hep3B + Sorafenib 组吸光度值高于 Hep3B NKO + Sorafenib 组 ($t = 14.29$, $P < 0.001$; 图 2D)。EdU 实验结果显示, Hep3B 组增殖细胞的比例相比其他三组升高 ($F = 708.00$, $P < 0.0001$), 且 Hep3B + Sorafenib 组高于 Hep3B NKO + Sorafenib 组 ($t = 14.52$, $P < 0.001$; 图 2E、F)。

2.3 敲除 NDRG1 对 HCC 细胞迁移、侵袭能力以及肿瘤细胞凋亡的影响 划痕实验结果显示, 与 Hep3B 组相比, 其他三组细胞迁移率减慢 ($F = 49.83$, $P < 0.0001$); 与 Hep3B + Sorafenib 组相比, Hep3B NKO + Sorafenib 组细胞迁移率进一步减慢 ($t = 5.82$, $P < 0.01$; 图 3A)。Transwell 实验结果表明, 与 Hep3B 组相比, 其他三组细胞穿透小室的数目减少 ($F = 77.48$, $P < 0.0001$); 与 Hep3B + Sorafenib 组相比, Hep3B NKO + Sorafenib 组细胞穿透小室的数目进一步减少 ($t = 10.97$, $P < 0.001$; 图 3B)。此外, 流式细胞术检测四组细胞凋亡情况, 结果显示, 与 Hep3B 组相比, 其他三组细胞凋亡比例增加 ($F = 1023.00$, $P < 0.0001$); 与 Hep3B + Sorafenib 组相比, Hep3B NKO + Sorafenib 组细胞凋亡比例进一步增加 ($t = 12.78$, $P < 0.001$; 图 3C)。

2.4 敲除 NDRG1 对 HCC 对 Sorafenib 的敏感性的影响 使用 BALB/c-Nude 小鼠皮下荷瘤模型进

行体内实验 结果显示 ,与 Hep3B 相比 ,其他三组荷瘤体积及质量明显减小 ($F_{\text{肿瘤体积}} = 10.17, P < 0.001$; $F_{\text{肿瘤质量}} = 92.36, P < 0.0001$)。与 Hep3B + Sorafenib 组相比 ,Hep3B NKO + Sorafenib 组荷瘤体积及质量进一步减小 ($t_{\text{肿瘤体积}} = 39.97, t_{\text{肿瘤质量}} = 6.34$ 均 $P < 0.0001$; 图 4A ~ C)。WB 检测 AKT 和 ERK 的磷酸化水平 ,结果显示 ,与 Hep3B 相比 ,Sorafenib 刺激组 P-Erk1/2 水平明显降低 ,P-AKT 水平无明显改变 ($F_{\text{P-AKT}} = 0.7319, P = 0.5615$; $F_{\text{P-Erk1/2}} = 1.033, P < 0.0001$)。与 Hep3B + Sorafenib 相比 ,Hep3B NKO + Sorafenib 组 P-Erk1/2 水平进一步降低 ($t_{\text{P-Erk1/2}} = 20.24, P < 0.0001$; 图 4D)。IHC 检测

P-Erk1/2 和 Ki67 的表达 结果显示 ,与 Hep3B 组相比 ,Sorafenib 刺激组 P-Erk1/2 和 Ki67 H-评分降低 ($F_{\text{Ki67}} = 91.26, P < 0.0001$; $F_{\text{P-Erk1/2}} = 207.7, P < 0.0001$) ; 与 Hep3B + Sorafenib 相比 ,Hep3B NKO + Sorafenib 组 P-Erk1/2 和 Ki67 H-评分进一步降低 ($t_{\text{Ki67}} = 4.24, P < 0.05$; $t_{\text{P-Erk1/2}} = 6.73, P < 0.01$; 图 4E、F)。

3 讨论

HCC 是最常见的原发性恶性肿瘤 ,起病隐匿、进展迅速、早期临床症状不具特异性 ,多数患者在初诊时已处于中晚期 ,并且治疗后复发率高 ,导致预后不

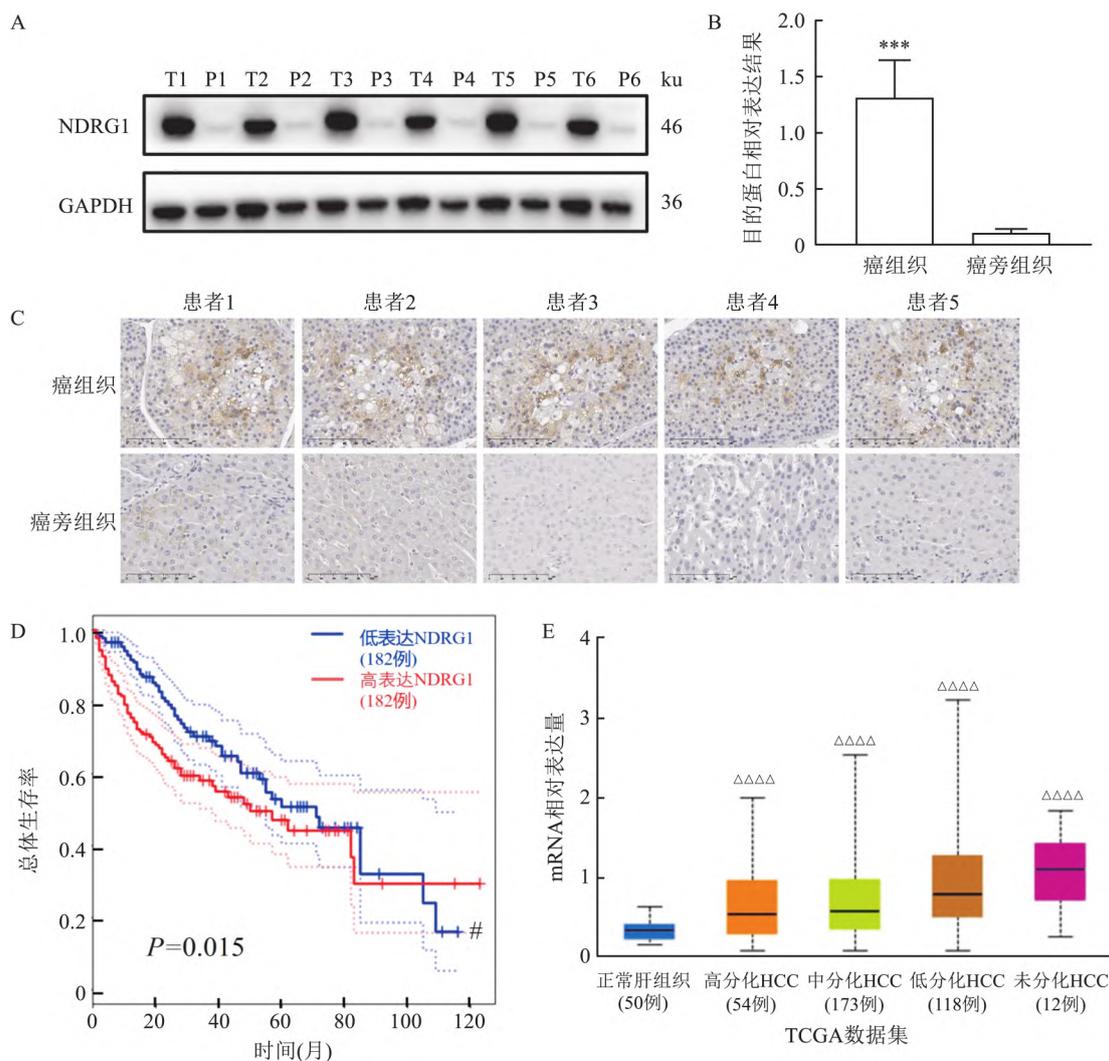


图 1 NDRG1 在 HCC 中表达情况

A: WB 检测临床样本中 NDRG1 蛋白表达水平; T: 癌组织; P: 癌旁组织; 1 ~ 6: 标本序号; B: 癌组织、癌旁组织中 NDRG1 蛋白表达的比较; 与癌旁组织比较: $***P < 0.001$; C: IHC 检测临床样本石蜡切片中 NDRG1 的表达情况 $\times 40$; D: GEPIA2 数据库中对 HCC 患者根据 NDRG1 表达水平进行生存分析; 与高表达 NDRG1 组比较: $\#P < 0.05$; E: TCGA 数据中 NDRG1 在不同分化程度 HCC 组织中的表达水平; 与正常肝组织比较: $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$

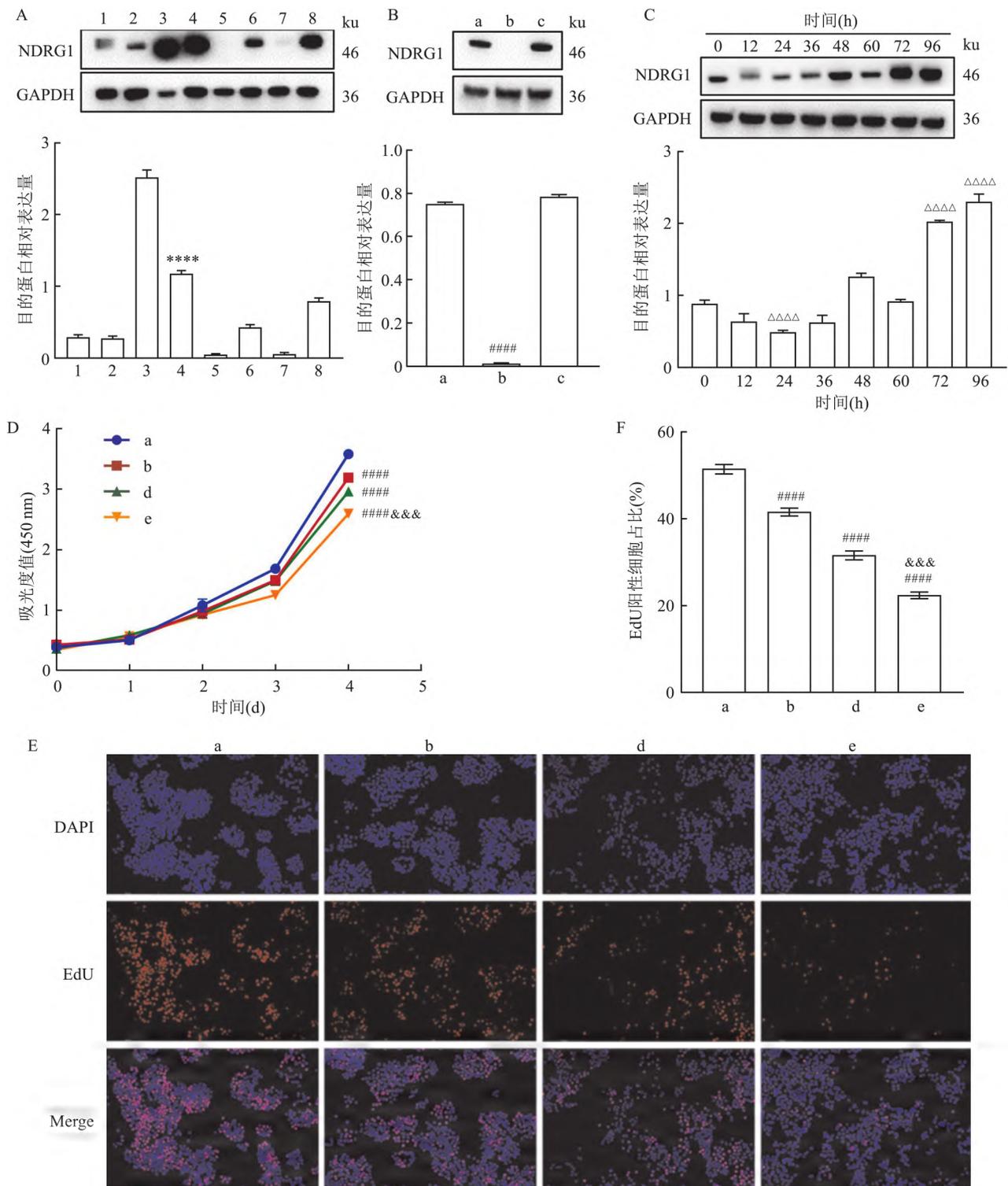


图2 敲除 NDRG1 对 HCC 细胞增殖能力的影响

A: WB 筛选 NDRG1 高表达的人源 HCC 细胞系; 1: HepRG; 2: MHCC97L; 3: MHCC97H; 4: Hep3B; 5: HepG2; 6: HCC-LM3; 7: Huh-7; 8: SMMC-7721; 与 HepRG 比较: *** $P < 0.0001$; B: WB 检测细胞敲除效率; C: WB 检测经过 5 $\mu\text{mol/L}$ Sorafenib 不同时间梯度处理 Hep3B 细胞 NDRG1 蛋白表达; 与 0 h 比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$; D: CCK-8 检测四组细胞的增殖能力; E、F: EdU 染色检测四组细胞增殖能力及其统计直方图 $\times 10$; a: Hep3B 组; b: Hep3B NKO 组; c: Hep3B NKO1 组; d: Hep3B + Sorafenib 组; e: Hep3B NKO + Sorafenib 组; 与 Hep3B 组比较: $#### P < 0.0001$; 与 Hep3B + Sorafenib 组比较: $\&\&\& P < 0.001$

良。针对晚期 HCC 患者,放化疗、免疫治疗是其可选择的 治疗手段,但常存在耐药的问题^[6-7]。

NDRG1 在胰腺导管腺癌中已被证明是一种肿瘤抑制蛋白^[8],但其在不同肿瘤中表达水平有差

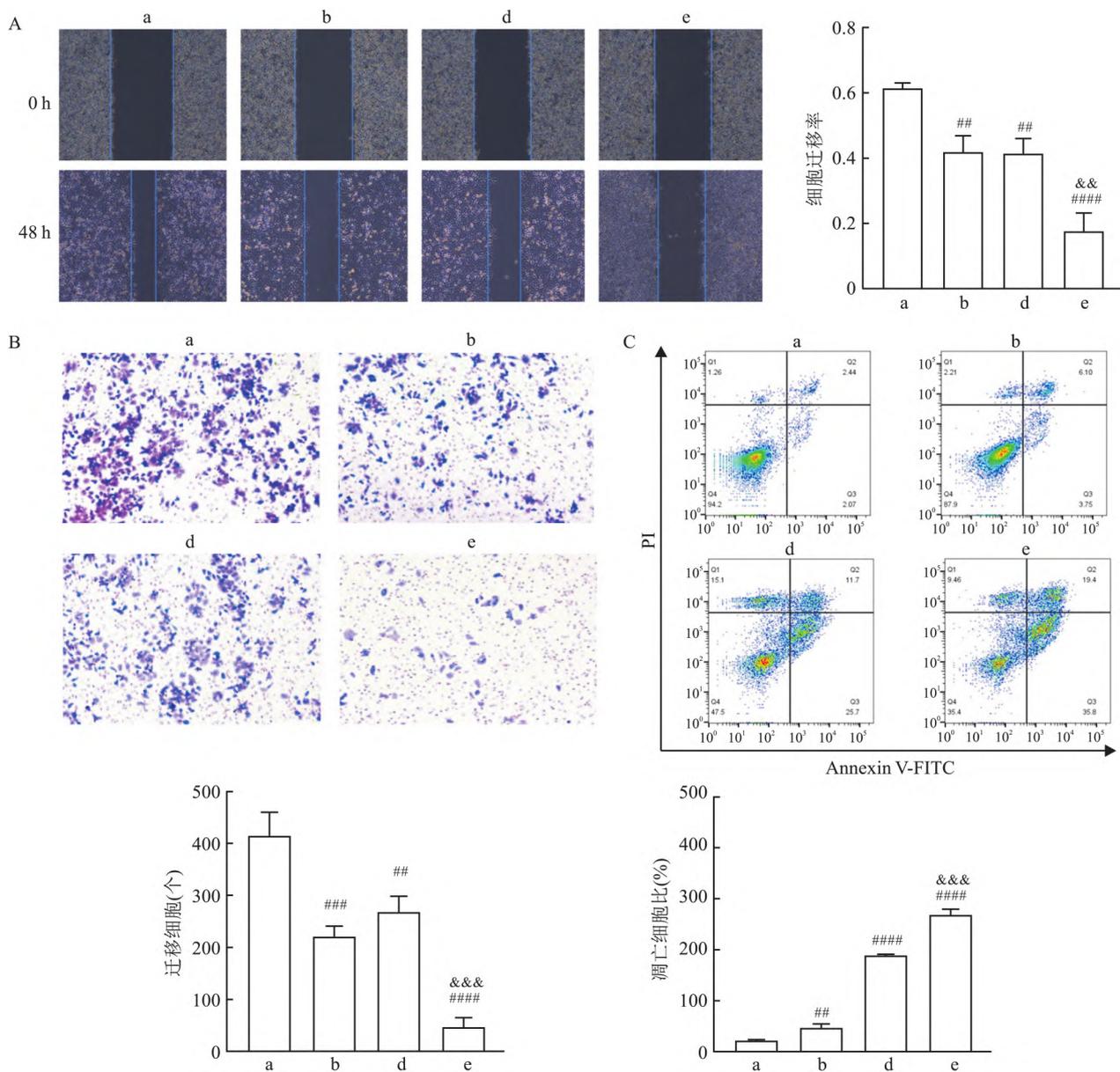


图3 敲除 NDRG1 对 HCC 细胞迁移、侵袭能力以及肿瘤细胞凋亡的影响

A: 细胞划痕实验检验四组细胞的迁移能力 ×10; B: Transwell 实验检测四组细胞的侵袭能力 结晶紫染色 ×10; C: 细胞流式分析四组细胞的凋亡情况; a: Hep3B 组; b: Hep3B NKO 组; d: Hep3B + Sorafenib 组; e: Hep3B NKO + Sorafenib 组; 与 Hep3B 组比较: ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$, ^{####} $P < 0.0001$; 与 Hep3B + Sorafenib 组比较: ^{&&} $P < 0.01$, ^{&&&} $P < 0.001$

异,且与不良预后有关,而在 HCC 中的作用机制尚不清楚。通过 WB 实验、IHC 染色以及 TCGA 数据验证 NDRG1 在肝癌患者中高表达,构建敲除 NDRG1 细胞系发现敲除 NDRG1 抑制 HCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力,促进肿瘤细胞凋亡。Sorafenib 是晚期 HCC 患者全身治疗的唯一选择,只有大约 30% 的患者可以从 Sorafenib 中获益,且获得性耐药会在 6 个月内产生^[9]。因此,迫切需要寻找缓解 Sorafenib 耐药的策略。该研究结果显示 Sorafenib 刺激 Hep3B 细胞引起 NDRG1 的蛋白表达水平先降

低后增高,这或许解释了 Sorafenib 耐药的原因。短时间的 Sorafenib 使用降低 NDRG1 的蛋白表达,并且体内外模型证实 Sorafenib 刺激抑制肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭,促进肿瘤细胞凋亡,且 NDRG1 敲除进一步促进 Sorafenib 的肿瘤杀伤能力。但随着 Sorafenib 刺激时间的延长,NDRG1 蛋白表达增加,Sorafenib 的肿瘤杀伤功能或许失效。然而,靶向 NDRG1 联合 Sorafenib 治疗后产生获得性耐药的时间还需要进一步研究。

近年的研究^[10-11]表明,Sorafenib 以多种激酶为

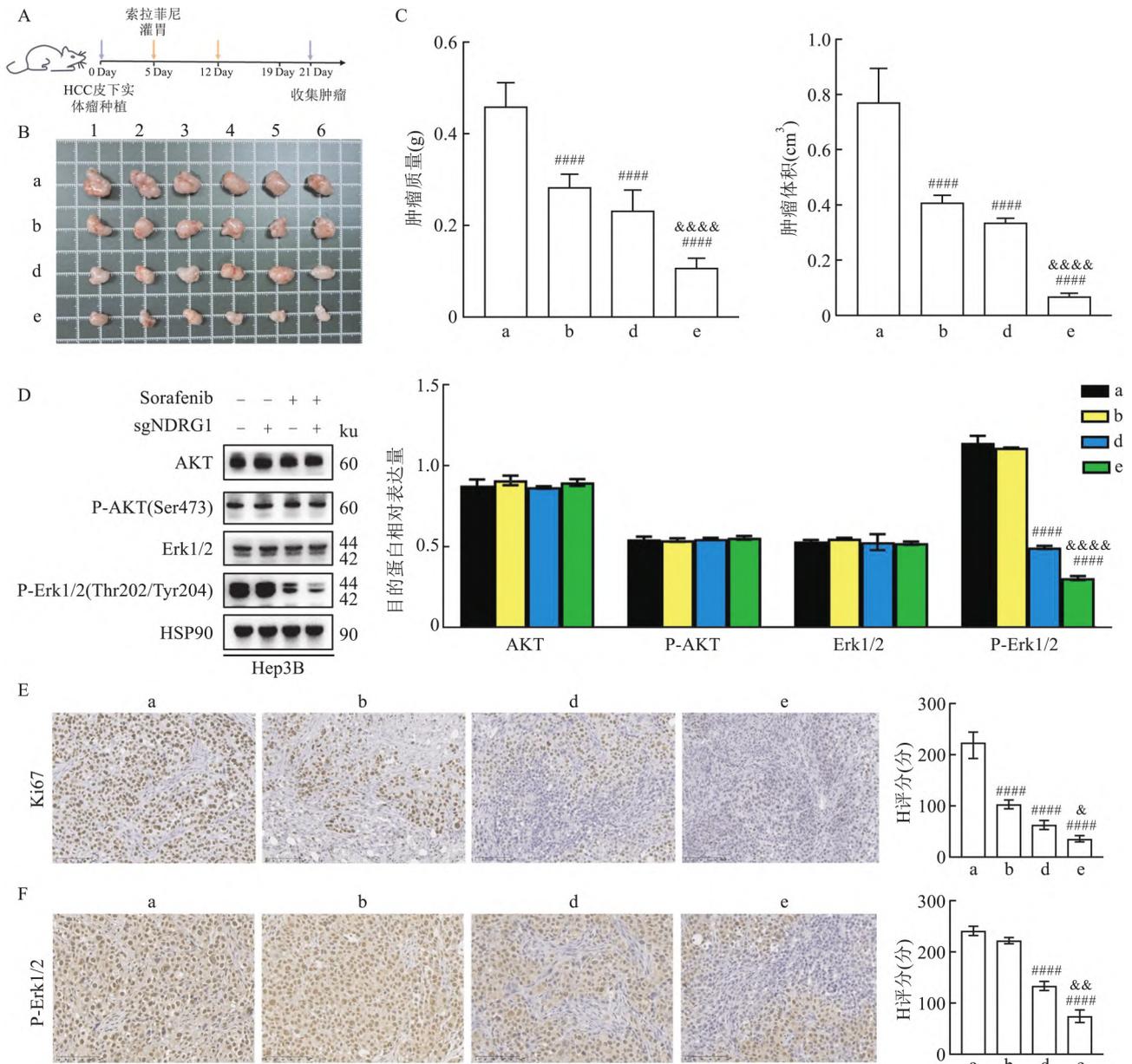


图4 敲除 NDRG1 对 HCC 对 Sorafenib 的敏感性的影响

A: BALB/c-Nude 裸鼠皮下荷瘤 Sorafenib 治疗模型示意图; B: 四组荷瘤大体对比图; 1~6: 6 只荷瘤小鼠编号; C: 四组荷瘤肿瘤质量和体积的统计图; D: WB 检测四组荷瘤 AKT、P-AKT(Ser473)、Erk1/2、P-Erk1/2、HSP90 的蛋白表达; E: IHC 染色检测四组荷瘤 Ki67 表达 ×20; F: IHC 染色检测四组荷瘤 P-Erk1/2 表达 ×20; a: Hep3B 组; b: Hep3B NKO 组; d: Hep3B + Sorafenib 组; e: Hep3B NKO + Sorafenib 组; 与 Hep3B 组比较: #### $P < 0.0001$; 与 Hep3B + Sorafenib 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.0001$

靶点,通过抑制 HCC 所涉及的不同通路,联合有前景的靶向疗法,比如联合使用小分子化学物或联合免疫疗法,可能会获得更好的生存结果。而前期亦有研究^[4]报道 NDRG1 可以增强胰腺导管腺癌免疫治疗的效果。因此,后续课题组可对 Sorafenib 联合免疫治疗进行研究。Raf/MAPK 信号通路是 Sorafenib 的主要靶点来源,阻断该通路可抑制 HCC 的肿瘤发展和血管生成^[12]。该研究表明靶向 NDRG1

可促进 HCC 对 Sorafenib 的敏感性,且可能通过 ERK 信号通路发挥作用。因此,靶向 NDRG1 可能为 HCC 缓解 Sorafenib 耐药提供新的治疗策略。

参考文献

- [1] Toh M R, Wong E Y T, Wong S H, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2023, 164(5): 766-82.
- [2] Brown Z J, Tsimlimigras D I, Ruff S M, et al. Management of

- hepatocellular carcinoma: a review [J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4): 410–20.
- [3] Tang W, Chen Z, Zhang W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 87.
- [4] Zhang Z, Song B, Wei H, et al. Ndr1 overcomes resistance to immunotherapy of pancreatic ductal adenocarcinoma through inhibiting atg9a-dependent degradation of mhc-I [J]. *Drug Resist Updat*, 2024, 73: 101040.
- [5] Sun X, Jin Z, Song X, et al. Evaluation of kif23 variant 1 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 961.
- [6] Ladd A D, Duarte S, Sahin I, et al. Mechanisms of drug resistance in HCC [J]. *Hepatology*, 2024, 79(4): 926–40.
- [7] 吴婧婧, 黄琦, 孙婉弋, 等. 原发性肝细胞癌免疫治疗药物的临床药理研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(11): 1842–6.
- [8] Liu W, Zhang B, Hu Q, et al. A new facet of ndr1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: suppression of glycolytic metabolism [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1792–800.
- [9] Huang A, Yang X R, Chung W Y, et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 146.
- [10] Llovet J M, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 151–72.
- [11] Rimassa L, Finn R S, Sangro B. Combination immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 506–15.
- [12] Eun J W, Yoon J H, Ahn H R, et al. Cancer-associated fibroblast-derived secreted phosphoprotein 1 contributes to resistance of hepatocellular carcinoma to sorafenib and lenvatinib [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2023, 43(4): 455–79.

NDRG1 enhances Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma through ERK pathway

Song Bojiao¹, Sun Beicheng^{1,2}

(¹*Dept of Hepatobiliary Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008*; ²*Dept of Hepatobiliary, Pancreatic and Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the effect of N-myc downstream regulatory gene 1 (NDRG1) on Hepatocellular carcinoma (HCC) and whether NDRG1 affects the sensitivity of HCC to Sorafenib. **Methods** The expression level of NDRG1 in HCC was predicted by TCGA database, and verified by Western blot (WB) and Immunohistochemistry (IHC). NDRG1 knockout cell lines were constructed, followed by cell counting kit-8 (CCK-8), EdU, cell scratches and Transwell experiment to investigate the effects of NDRG1 and its combination with Sorafenib on the proliferation, migration and invasion of HCC cells. In addition, flow cytometry was used to detect the apoptosis of HCC cells. The effect of NDRG1 and Sorafenib on HCC tumor formation was studied *in vivo* by subcutaneous tumor bearing in nude mice. WB and IHC were used to determine the pathway regulating the sensitivity of HCC to Sorafenib. **Results** WB and IHC confirmed that NDRG1 is highly expressed in HCC, consistent with the results of TCGA data. Tumor functional experiments showed that NDRG1 knockout or Sorafenib stimulation weakened the proliferation, migration, and invasion ability of HCC cells, and increased tumor cell apoptosis. However, NDRG1 knockout combined with Sorafenib further weakened the proliferation, migration and invasion ability of HCC cells, and further increased tumor cell apoptosis ($P < 0.0001$). Mouse subcutaneous tumor model showed that NDRG1 knockout or Sorafenib stimulation reduced the tumor volume and quality, while NDRG1 knockout combined with Sorafenib further reduced the tumor volume and quality ($P < 0.0001$). The WB and IHC results indicated that NDRG1 knockout combined with Sorafenib could reduce the phosphorylation level of Erk1/2. **Conclusion** NDRG1 is highly expressed in HCC, which promotes the proliferation, migration and invasion of HCC cells, and restricts apoptosis. NDRG1 knockout enhances HCC sensitivity to Sorafenib by reducing ERK signaling pathway phosphorylation.

Key words N-myc downstream regulated gene-1; hepatocellular carcinoma; Sorafenib; ERK pathway