

地西他滨通过去甲基化调节肝癌细胞对索拉非尼的耐药性

张 苗^{1,2,3}, 王 泽^{2,3,4}, 傅恒涛⁵, 文蕊鑫^{1,2}, 韩巧巧^{1,2}, 崔 涛^{2,4}, 伊秀林^{1,2,4}, 闫凤英^{2,3,4}, 刘昌孝^{2,4}

(1 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 2 天津药物研究院释药技术与药动学国家重点实验室, 天津 300301; 3 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301; 4 中国医学科学院药物代谢新技术创新单元, 北京 100730; 5 华北理工大学药学院, 唐山 063210)

[摘要] **目的:**从表观遗传学角度探讨索拉非尼(sorafenib, Sora)治疗肝细胞癌发生耐药的机制,考察表观遗传药物地西他滨(decitabine, DAC)对索拉非尼肝细胞癌敏感性的影响,为肝癌的临床治疗提供新的思路与方法。**方法:**利用 GEPIA 2 数据库检索 508 例原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者信息,通过 Kaplan-Meier 法分析有机阴离子转运多肽 1B3 (organic anion transporting polypeptide 1B3, OATP1B3)表达与患者生存时间的相关性;采用亚硫酸氢盐甲基化法检测基因溶质载体有机阴离子转运体 1B3 (solute carrier organic anion transporter 1B3, SLCO1B3)启动子的甲基化率;采用 RT-qPCR, Western Blot 检测 DAC 作用前后肝癌细胞株 OATP1B3 的表达变化;采用 RTCA-eSight 检测索拉非尼与 DAC 联用对肝癌细胞增殖的影响;采用 LC-MS/MS 检测索拉非尼与 DAC 联用后肝癌细胞对索拉非尼摄入量的变化。**结果:**GEPIA 2 数据库分析结果显示, OATP1B3 高表达的 HCC 患者总体生存率均显著高于低表达者;亚硫酸氢盐甲基化测序结果显示 Hep3B, HepG2 中 SLCO1B3 的启动子甲基化率较高;RT-qPCR, Western Blot 结果表明,肝癌细胞株 Hep3B, HepG2 中 OATP1B3 的 mRNA 及蛋白表达相对较低,且 DAC 孵育后 OATP1B3 的表达均上调;RTCA-eSight 实验结果显示,联用 DAC 后 Hep3B, HepG2 的增殖率显著低于索拉非尼组;LC-MS/MS 结果显示, HEK293-OATP1B3 对索拉非尼的摄入量是 HEK293-Wild 的 2.10 倍。联用 DAC 后, Hep3B, HepG2 对索拉非尼的摄入量提高 1.87 和 2.47 倍。**结论:**DAC 通过抑制 SLCO1B3 DNA 甲基化,上调 OATP1B3 的表达,提高转运索拉非尼的能力,增加索拉非尼在肝癌细胞中的蓄积,增强对肝癌细胞的敏感性,从而逆转索拉非尼的耐药。

[关键词] DNA 甲基化;地西他滨;索拉非尼;有机阴离子转运多肽 1B3;肝细胞癌**[中图分类号]** R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)16-1660-08

Mechanism of decitabine regulating resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib through demethylation

ZHANG Miao^{1,2,3}, WANG Ze^{2,3,4}, FU Heng-tao⁵, WEN Rui-xin^{1,2}, HAN Qiao-qiao^{1,2}, CUI Tao^{2,4},
YI Xiu-lin^{1,2,4}, YAN Feng-ying^{2,3,4}, LIU Chang-xiao^{2,4}

(1 School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2 State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China; 3 Tianjin Hechuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China; 4 Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 5 School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of drug resistance occurring in hepatocellular carcinoma treated with sorafenib from epigenetic perspective, and examine the effect of sensitivity of sorafenib on hepatocellular**[基金项目]** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2019-I2M-5-020);天津市“项目+团队”重点培养专项资助项目(创新类)(XC202030)**[作者简介]** 张苗,女,硕士研究生,主要从事肿瘤药理研究。E-mail: z15735010767@163.com。**[通讯作者]** 崔涛,女,副研究员,主要从事肿瘤药理药效研究工作。联系电话:(022)84478813, E-mail: cuitao0909@126.com。伊秀林,男,研究员,主要从事药动学研究工作。联系电话:(022)84478813, E-mail: yixl@tjipr.com.cn。

carcinoma after in vitro combination of epigenetic drug decitabine (DAC), so as to provide new ideas and methods for clinical treatment of hepatocellular carcinoma. **Methods:** The GEPIA 2 database was used to retrieve information of 508 primary hepatocellular liver cancer patients, and the correlation between the expression of OATP1B3 and survival time was analyzed by Kaplan-Meier method. The methylation rate of SLCO1B3 promoter was detected by bisulfite methylation method. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression changes of cancer cell lines OATP1B3 before and after liver DAC treatment. RTCA-eSight experiment was performed to monitor the effect of sorafenib in combination with DAC on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. Changes in the uptake of sorafenib by hepatocellular carcinoma cells after the combination of the two drugs were detected by experimental LC-MS/MS. **Results:** The results of GEPIA2 database analysis showed that the overall survival rate of patients with hepatocellular carcinoma with high OATP1B3 expression was significantly higher than those with low expression. Bisulfite methylation sequencing showed that the promoter methylation rate of SLCO1B3 was higher in Hep3B and HepG2. RT-qPCR and Western blot showed that the mRNA and protein expressions of OATP1B3 in hepatocellular carcinoma cell lines Hep3B and HepG2 were relatively low, and the expression of OATP1B3 was upregulated after incubation with DAC. RTCA-eSight experiment showed that DAC combination treatment significantly enhanced the effect of sorafenib on Hep3B and HepG2 inhibition. LC-MS/MS determination showed that the uptake of HEK293-OATP1B3 on sorafenib was 2.10 times higher than that of HEK293-Wild. The uptake of sorafenib by Hep3B and HepG2 was increased by 1.87-fold and 2.47-fold after being combined with DAC. **Conclusion:** DAC can inhibit SLCO1B3 DNA methylation, up-regulate the expression of OATP1B3, improve the capacity of sorafenib transport, increase the accumulation of sorafenib in liver cancer cells, and enhance the sensitivity of liver cancer cells, so as to reverse the resistance of sorafenib.

[Key words] DNA methylation; decitabine; sorafenib; organic anion transporting polypeptide 1B3; hepatocellular carcinoma

原发性肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上第五大常见肿瘤, 也是我国常见的恶性肿瘤之一^[1]。手术治疗是早期原发性肝癌首选, 也是最有效的方法之一, 但不适合中晚期肝癌患者, 因此药物在肝癌治疗中是不可或缺的^[2]。随着医学技术进步, 靶向治疗已经成为治疗恶性肿瘤的首选方法, 目前索拉非尼在国际上已经成为原发性肝癌中末期临床靶向治疗首选方法之一^[3-4]。

索拉非尼是一种多酪氨酸激酶抑制剂^[5], 通过抑制肿瘤细胞的增殖、阻断肿瘤新生血管的形成发挥作用, 已被批准用于治疗晚期肝癌^[6]。但是长期用药导致索拉非尼的耐药现象日益严重, 原因可能是由于摄取/外排转运蛋白或参与药物代谢酶基因表达失调导致其在肝癌组织内暴露量降低^[7]。有研究表明, 索拉非尼可通过溶质载体有机阴离子转运体 1B3 (solute carrier organic anion transporter 1B3, SLCO1B3) 基因编码的人有机阴离子转运多肽 1B3 (organic anion transporting polypeptide 1B3, OATP1B3) 摄入细胞内发挥药效^[8-9]。OATP1B3 表达下调被认为是肝细胞癌、胆管细胞癌和肝母细胞瘤发生多药耐药的共同特征^[10]。OATP1B3 的表达受一系列复杂因素的调控。而启动子 DNA 甲基化是调控转

运体基因在肝癌表达的主要因素之一^[11-13]。

地西他滨 (5-氮-2'-脱氧胞苷, DAC) 是一种去甲基化药物, 本品最早由 Piskala 和 Sorm 在 1964 年首先合成, 属于胞嘧啶核苷酸类似物, 能逆转异常 DNA 甲基化, 掺入 DNA 序列捕获 DNA 转移酶, 消耗细胞内 DNA 甲基转移酶从而使许多失活基因重新表达^[14]。因此, 在肿瘤性疾病的治疗中具有不可替代的优势和效率, 也是研究最多、应用前景最广的 DNA 甲基化酶抑制剂^[15]。

本研究将通过亚硫酸氢盐甲基化测序和 RT-qPCR, Western Blot, RTCA-eSight, LC-MS/MS 等方法从细胞水平、分子水平探讨 DNA 甲基化与 OATP1B3 表达调控的关系及 DAC 增强索拉非尼对肝癌细胞敏感性的分子机制^[13], 为阐明临床肿瘤治疗机制提供数据支撑。

材料与方 法

1 药品与试剂

索拉非尼 (Solarbio 公司, 批号: 1105S021, 50 mg, 纯度: $\geq 99.0\%$); DAC (MCE 公司, 批号: 29075, 50 mg, 纯度: $\geq 99.0\%$); Anti-OATP1B3 抗体 (Proteintech 公司, 批号: 10004006); ECL 发光液 (上海碧

云天生物技术有限公司,批号:111921220509);无酶无菌水(Solarbio公司,批号:20200813);Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche公司,批号:04897030001);FastStart Universal SYBR Green Master(Roche公司,批号:57313500)。

2 主要仪器

倒置显微镜(日本 Olympus 公司);LightCycler 480 高通量实时荧光定量 PCR(罗氏公司);RTCA-eSight(Agilent 公司);电泳、转膜槽(Bio-Rad 公司);超灵敏全自动成像分析仪(美国 Protein Simple 公司);台式高速离心机(Eppendorf 公司)。

3 细胞株

人肝癌细胞系 Hep3B, HepG2 购自北京协和细胞资源中心;SNU182, SNU387 购自普诺赛公司;HEK-293-Wild, HEK-293-OATP1B3 来自天津药物研究院转运体实验室。

4 数据库分析

检索 GEPIA 2 数据库^[16],采用 Kaplan-Meier 法对比分析不同癌症中 OATP1B3 的表达差异及 508 例 HCC 患者的生存时间与 OATP1B3 mRNA 表达量的相关性。

5 细胞培养

人肝癌细胞系 HepG2, Hep3B, SNU182 和 SNU387 液氮复苏后,重悬于相应培养基,37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱培养。传代 3 次后,取对数生长期、生长状态良好的细胞用于实验。

6 亚硫酸氢盐甲基化测序

使用数据库检索 SLC01B3 启动子序列查找 CpG 岛,预测可能存在的甲基化位点。待 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 培养 24 h,常规试剂盒提取全基因组 DNA,测定样品浓度,亚硫酸氢盐处理^[17],PCR 扩增,产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后测序, SnapGene 对比测序结果,计算相应甲基化率。

7 检测肝癌细胞株 OATP1B3 的 mRNA 及蛋白表达水平

对数生长期 HepG2, Hep3B, SNU182 和 SNU387 分别接种于 6 孔细胞培养板 24 h 后,加入 TRNzol 总 RNA 提取试剂并按照说明书提取总 RNA。按照转录第一链 cDNA 合成试剂盒(transcriptor first strand cDNA synthesis kit)说明书制备 cDNA,按照实时荧光定量试剂盒[fast start universal SYBR green master (Rox)]说明书进行 OATP1B3 和 GAPDH 基因的扩增,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算给药组与空白组 OATP1B3

mRNA 表达差异。

取对数生长期 HepG2, Hep3B, SNU182 和 SNU387 分别接种于 24 孔细胞培养板 24 h 后加入 RIPA 裂解细胞提取总蛋白,并测定蛋白浓度。采用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳法分离细胞蛋白,湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 40 min,一抗溶液 4 °C 过夜孵育。TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,二抗溶液室温孵育 1 h, TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min。采用增强型化学发光液(ECL)曝光成像,Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

8 DAC 对 Hep3B, HepG2 中 OATP1B3 mRNA 及蛋白表达水平的影响

对数生长期的 HepG2, Hep3B 分别接种于 24 孔细胞培养板 24 h 后,分别加入浓度为 0, 0.3, 1, 3 和 10 μmol·L⁻¹ 的 DAC, 双复孔。孵育 72 h 后,按照“7”项下方法提取总 RNA、总蛋白进行后续实验。

9 表观遗传药物地西他滨增强人肝癌细胞对索拉非尼敏感性研究

9.1 不同浓度 DAC 或索拉非尼对 Hep3B, HepG2 增殖的影响

取对数生长期 Hep3B, HepG2 接种于 E-Plate View 96 孔板(RTCA-eSight 专用)中,过夜检测细胞增殖曲线。24 h 后更换含 0, 1, 3, 10 μmol·L⁻¹ 的 DAC 或索拉非尼新鲜培养基,3 复孔,持续监测。

9.2 索拉非尼联合 DAC 对 Hep3B, HepG2 细胞活力的影响

取对数生长期 Hep3B, HepG2 接种于 E-Plate View 96 孔板中,设 Control 组、DAC 组、索拉非尼组、联用组,3 复孔,过夜检测细胞增殖曲线。待细胞指数(cell index, CI)值约为 1 左右时,DAC 组和联用组更换含 3 μmol·L⁻¹ DAC 的新鲜培养基,Control 组和索拉非尼组更换新鲜培养基。孵育 72 h 后索拉非尼组与联用组更换含 3 μmol·L⁻¹ 索拉非尼的新鲜培养基,观察细胞增殖情况,一定时间后计算细胞存活率,GraphPad Prism 作图。

9.3 DAC 对索拉非尼的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)影响

取对数生长期 Hep3B, HepG2 分别接种于 96 孔板中,设索拉非尼组、联用组,3 复孔,过夜培养,待细胞贴壁稳定,联用组更换含 3 μmol·L⁻¹ DAC 的新鲜培养基,索拉非尼组更换新鲜培养基。孵育 72 h 后更换含不同浓度索拉非尼的新鲜培养基,24 h 后加入 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁)(MTS)溶液,37 °C 放置 2~4 h,观察到细

胞变色后,酶标仪测量吸光度(optical density, OD)值,计算各组细胞存活率,GraphPad Prism 作图,计算 IC_{50} 。

10 DAC 增强 OATP1B3 对索拉非尼的摄入

对数生长期 HEK293-Wild, HEK293-OATP1B3 接种于 24 孔 *D*-聚赖氨酸包被板,24 h 后更换含 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 索拉非尼的培养基孵育 2 min,双复孔。冰磷酸盐缓冲液(PBS)终止反应,甲醇裂解细胞。LC-MS/MS 检测索拉非尼的摄入量。

对数生长期的 Hep3B, HepG2 接种于 24 孔板,24 h 后更换含 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DAC 孵育 72 h 后,更换含不同浓度(0, 1, 3, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 索拉非尼的培养基孵育 1 h,3 复孔。冰 PBS 终止反应,甲醇裂解细胞。LC-MS/MS 检测索拉非尼的摄入量。

色谱条件:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(50 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相 A:0.1% 甲酸, B:乙

睛,比例:20:80,等度洗脱;流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样 $2 \mu\text{L}$;柱温 37°C 。质谱条件:电喷雾离子源,采用正离子模式;质谱扫描方式为多反应监测。索拉非尼的 m/z 跃迁为 $465.1 \sim 252.0$ 和 $270.0 \text{ m/z}^{[18]}$ 。

11 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8 统计分析,所有实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组比较采用独立样本 *t* 检验,多重比较采用单因素方差分析, $P < 0.005$ 表明差异有显著性。

结 果

1 对临床 508 例肝癌患者 OATP1B3 表达的分析

检索 GEPIA 2 数据库^[16],采用 Kaplan-Meier 法对比分析表明,SLCO1B3 在肝癌患者癌旁组织与肝癌组织中表达差异显著(见图 1A),且低表达的患者存活率较低(见图 1B)。

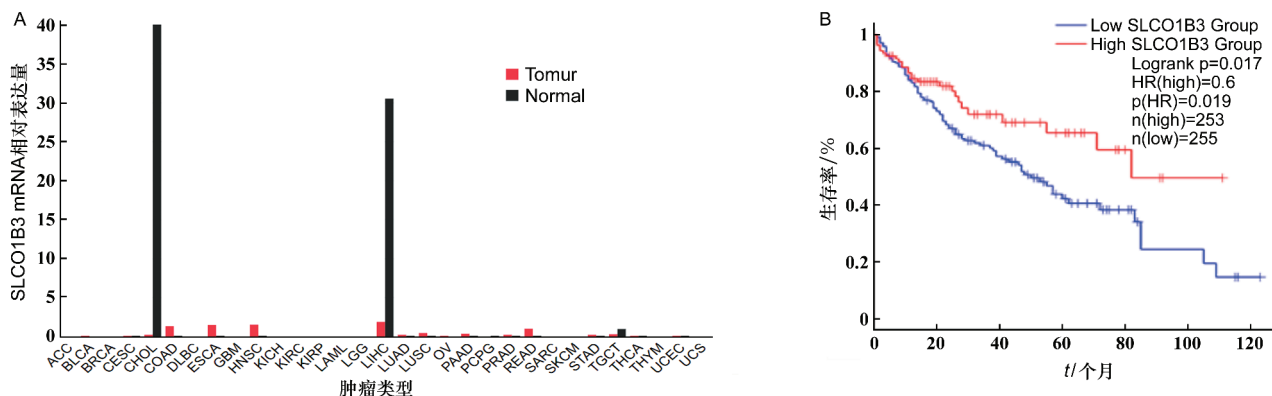


图 1 泛癌中 SLCO1B3 表达差异(A)及肝癌患者生存分析(B)

2 亚硫酸氢盐检测细胞甲基化率

琼脂糖凝胶电泳结果显示 PCR 扩增产物条带清晰(见图 2A);经亚硫酸氢盐甲基化检测,Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 的 OATP1B3 DNA 启动

子甲基化率分别为 97.6%、65.3%、3.5% 和 8.2% (见图 2B)。因此选择 OATP1B3 DNA 甲基化率较高的 Hep3B, HepG2 进行后续实验。

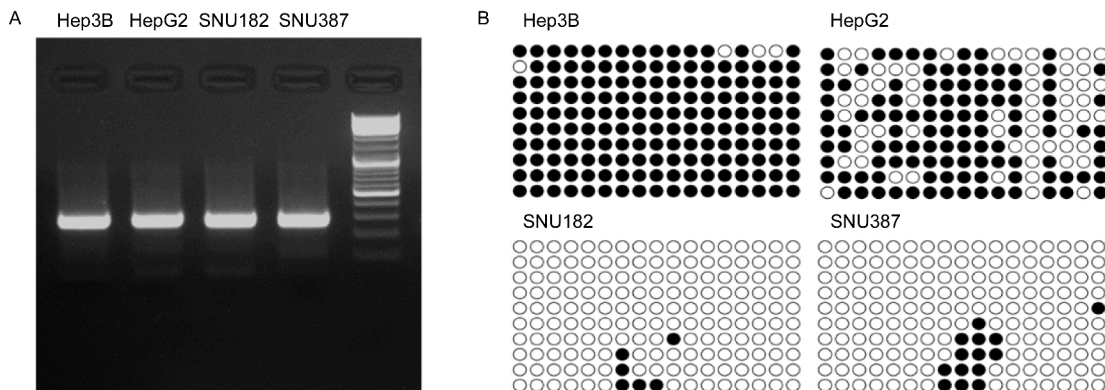


图 2 产物琼脂糖凝胶电泳(A)及 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 甲基化测序珠型图(B)

3 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 的 mRNA 及蛋白表达

RT-qPCR, Western Blot 实验结果表明, Hep3B,

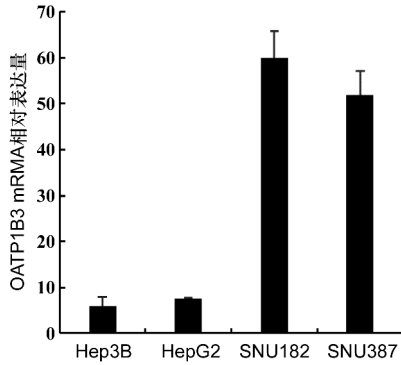


图3 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 的 OATP1B3 mRNA 表达

HepG2 中 OATP1B3 mRNA 及蛋白表达均较低(见图3和图4)。

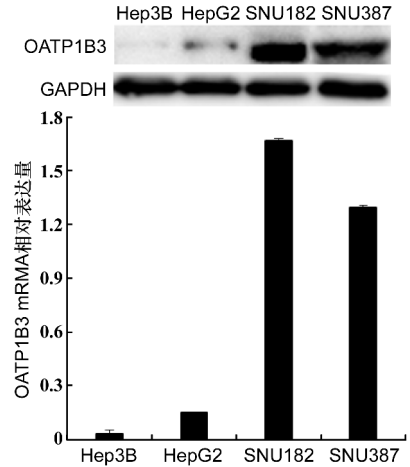
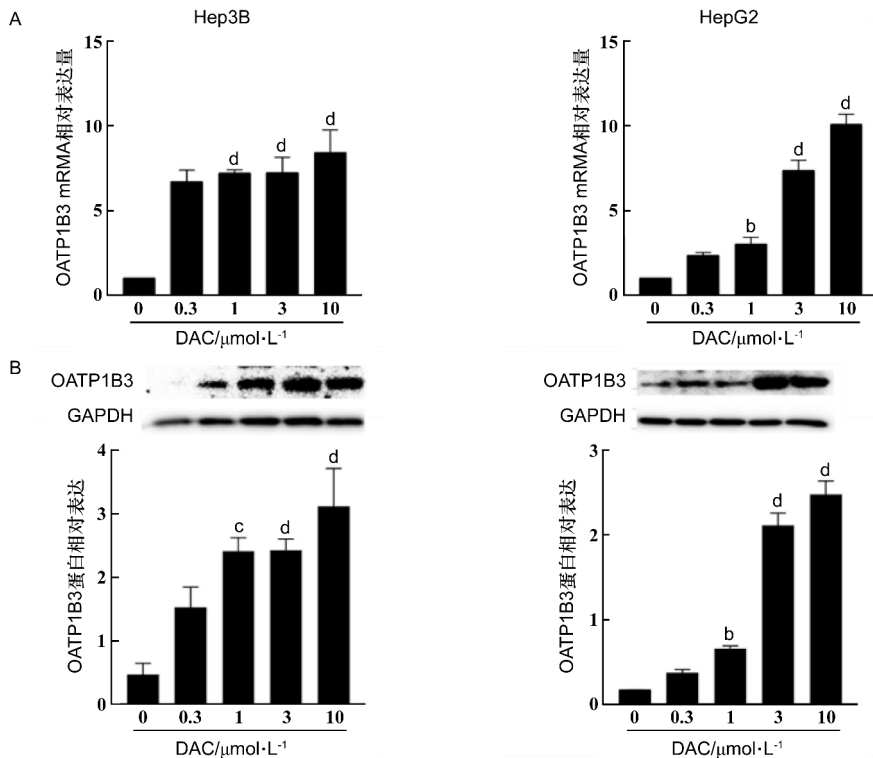


图4 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 的 OATP1B3 蛋白表达

4 DAC 上调 OATP1B3 mRNA 及蛋白表达

DAC 处理后, OATP1B3 在 Hep3B, HepG2 中 mRNA 及蛋白表达均上调。RT-qPCR 检测显示, 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DAC 孵育 72 h 后, Hep3B, HepG2

中 OATP1B3 的 mRNA 表达水平分别上调 7.72 和 11.23 倍(见图5A), Western Blot 结果表明 OATP1B3 蛋白的表达水平分别上调 6.67 和 13.70 倍(见图5B)。



与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.005$, d: $P < 0.0001$

图5 DAC 上调 Hep3B, HepG2 中 OATP1B3 的 mRNA 表达(A)及蛋白表达(B)

5 DAC 增强人肝癌细胞对索拉非尼的敏感性

为进一步确定药物对细胞增殖的影响,使用 RT-CA-eSight 实时监测细胞的生长状态,绘制生长曲线。如图 6A 所示,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAC 明显抑制 Hep3B, HepG2 增殖,而 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAC 无明显影响;如图 6B 所示,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 索拉非尼明显抑制 Hep3B, HepG2 增殖,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 索拉非尼对 Hep3B, HepG2 增殖的抑制作用较弱。因此,选取 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAC 与 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 索拉非尼联合用药考察 DAC 对索拉非尼抗肿瘤效果的影响;如图 6C 所示,Hep3B 孵育 DAC 前后,索拉非尼的 IC_{50} 分别是 6.645, 2.598

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; HepG2 孵育 DAC 前后,索拉非尼的 IC_{50} 分别是 7.041, 2.260 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如图 7A 所示,与单用相比,联用 DAC 后,索拉非尼对 Hep3B, HepG2 增殖的抑制作用明显增强;如图 7B 所示,给予索拉非尼后, DAC、索拉非尼、DAC + 索拉非尼组 Hep3B 细胞存活率分别为 94.2%, 54.2%, 31.9%, HepG2 细胞存活率分别为 94.3%, 71.5%, 52.2%。DAC + 索拉非尼组细胞存活率均极显著低于索拉非尼单独给药组 ($P < 0.0001$),提示 DAC 可增强索拉非尼对人肝癌细胞的敏感性。

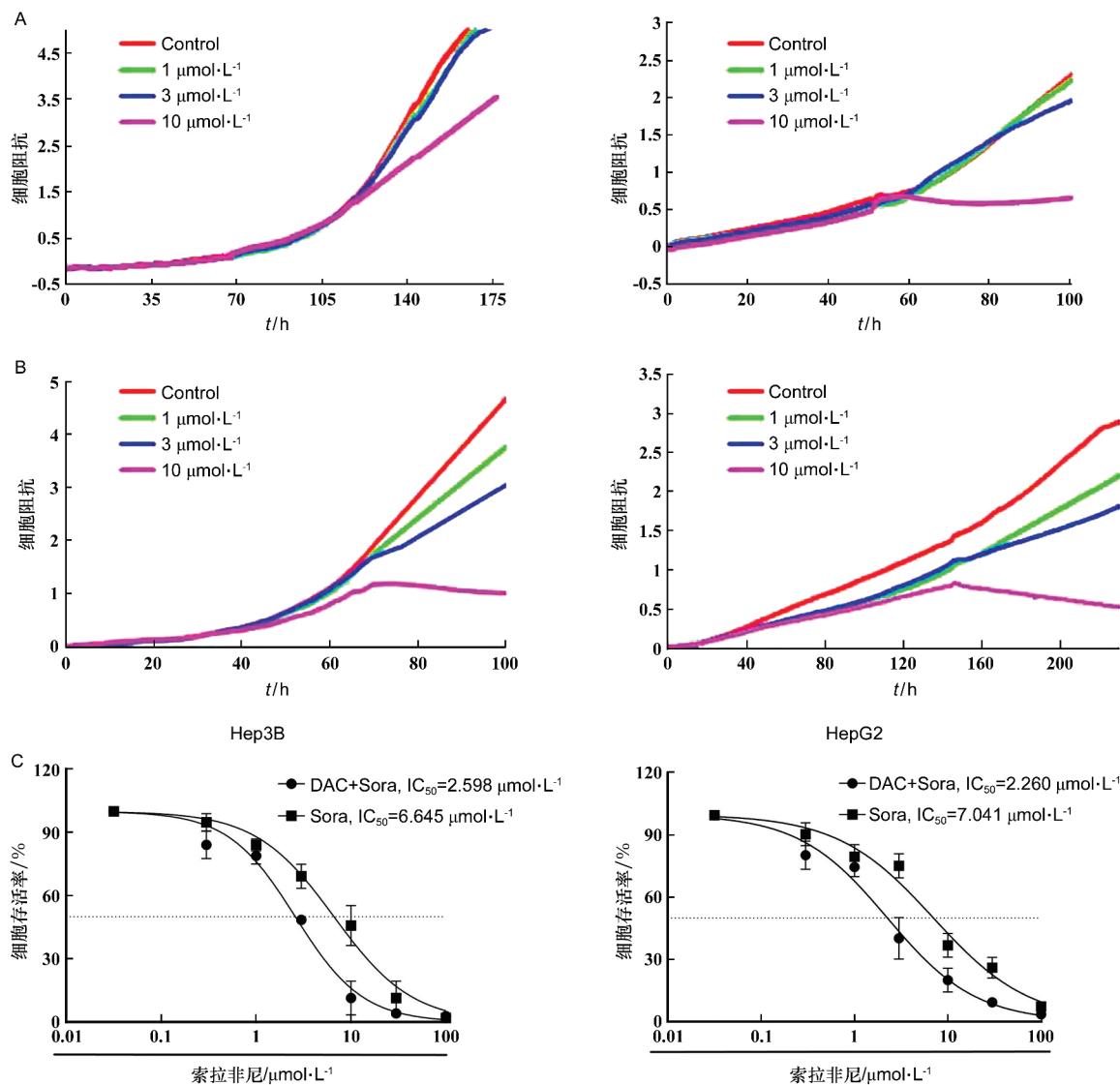
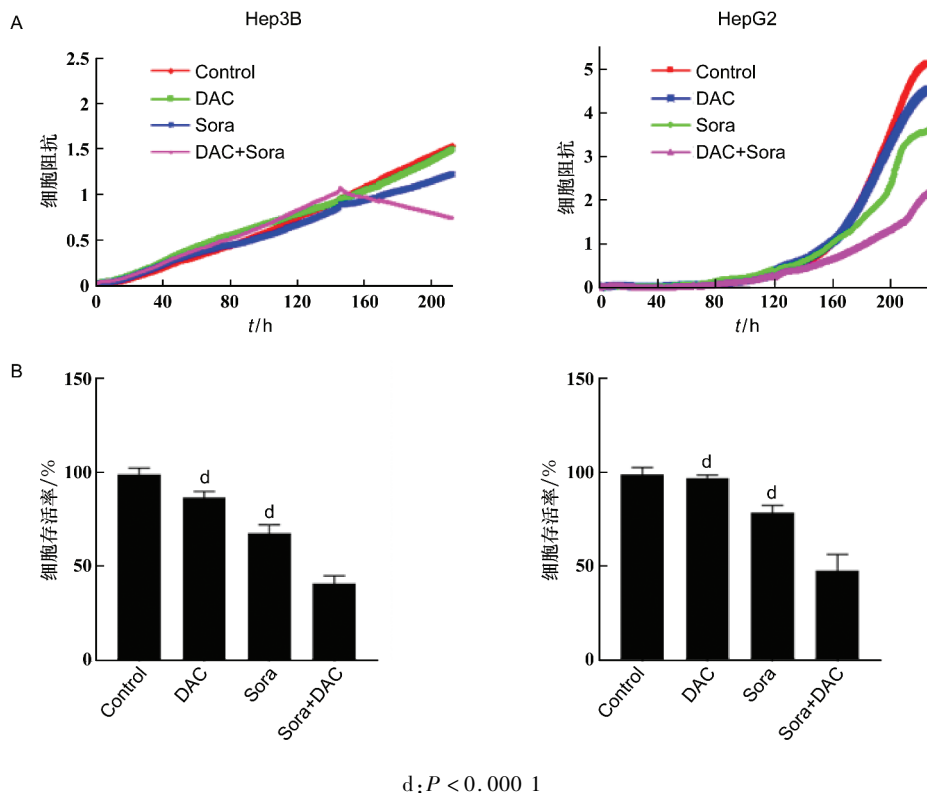


图 6 DAC 对 Hep3B, HepG2 增殖影响 (A) 与索拉非尼对 Hep3B, HepG2 增殖影响 (B) 以及索拉非尼 IC_{50} (C)



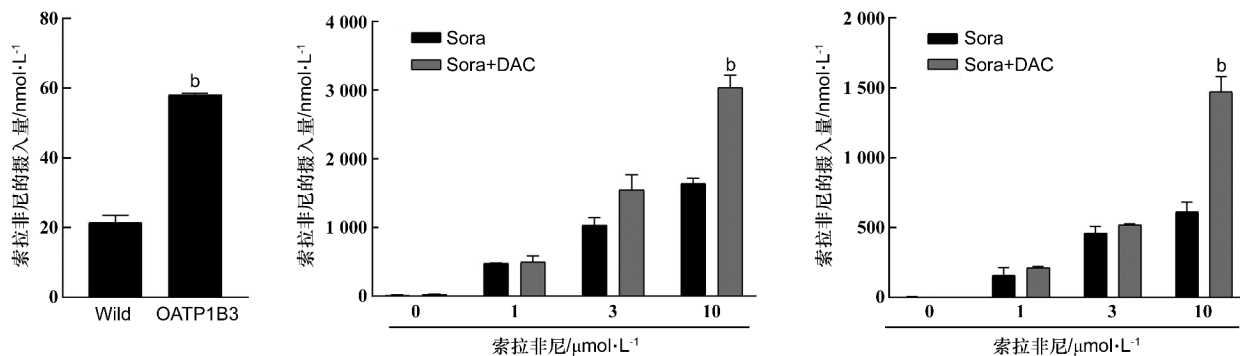
d; $P < 0.0001$

图7 联用后 Hep3B, HepG2 细胞活力 (A) 及存活率 (B)

6 DAC 增强 OATP1B3 对索拉非尼的摄入

如图 8 所示, HEK-293-OATP1B3 对 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 索拉非尼的摄入量是 HEK-293-Wild 的 2.10 倍, 表明 OATP1B3 介导了索拉非尼的跨膜转运。 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

DAC 与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 索拉非尼联用后, Hep3B, HepG2 对索拉非尼的摄入量提高 1.87 和 2.47 倍, 表明 DAC 增加了索拉非尼在 OATP1B3 低表达的肝癌细胞中的暴露量。



与 HEK-293-Wild 相比, $b; P < 0.01$, 与同一浓度 Sora 组相比, $b; P < 0.01$

图8 HEK-293 细胞对索拉非尼的摄入及联用后 Hep3B, HepG2 对索拉非尼的摄入变化

讨论

HCC 是最常见的原发性肝癌之一, 也是全球癌症死亡的第四大原因^[19]。而多药耐药对 HCC 临床治疗带来巨大挑战。目前, 肝癌治疗方法包括手术切除、局部消融、化学栓塞、肝移植和分子靶向等。

由于早期血管侵犯、生长速度快、潜在的慢性肝炎或肝硬化, 肝细胞癌预后较差。索拉非尼是目前批准的临床上用于治疗晚期肝癌的一线药物。但是随着用药时间延长, 索拉非尼的耐药现象日益明显, 极大地限制了该药的应用。索拉非尼临床用药中产生的耐药机制主要有 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激

活、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激活^[20]、上皮-间质化^[21]、细胞自噬、缺氧和表观遗传^[22]中 DNA 甲基化介导等方面。

大量研究表明, DNA 甲基化作为最常见的一种表观遗传方式^[24], 能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而下调基因表达, 对细胞的分化及功能起着重要作用。随着基因组学研究的深入, 发现了表观遗传学、基因表达、肿瘤发生发展三者之间的密切联系。研究表明, 当基因组特定序列出现异常的高/低甲基化时, 往往能导致相关基因表达的改变, 影响肿瘤的发生发展^[25]。DAC 是一种有效和特异的去甲基化药物, 通过抑制 DNA 甲基化转移酶活性, 逆转 DNA 的甲基化, 从而发挥抗肿瘤作用^[23]。研究显示, 不同浓度的 DAC 对细胞产生不同的影响, 高浓度时存在较明显的细胞毒性作用, 本研究选择较低的 DAC 浓度, 该浓度条件下可激活因过度甲基化沉默的抑癌基因、周期调控基因、转运体相关基因。

本研究通过检测 Hep3B, HepG2, SNU182 和 SNU387 的 OATP1B3 甲基化水平, 发现 Hep3B, HepG2 中 OATP1B3 甲基化水平较高, 推测可能与基因表达的抑制有关。为探索其机制, 使用甲基转移酶抑制剂 DAC 处理 Hep3B, HepG2, 结果表明给药后 Hep3B, HepG2 细胞 OATP1B3 的 mRNA 及蛋白表达水平上调。进一步的研究发现, 与索拉非尼单独用药相比, 联合使用 DAC 能显著提高索拉非尼对细胞的增殖抑制能力。研究结果显示, 索拉非尼的耐药可能由于 OATP1B3 的高甲基化引起, 联合使用表观遗传学药物 DAC 可降低 OATP1B3 的甲基化程度, 显著增强索拉非尼对肝癌细胞的毒性作用, 为临床肝癌联合用药提供新的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] BRUIX J, HAN KH, GORES G, *et al.* Liver cancer; approaching a personalized care[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1 Suppl): S144 - S156.
- [2] PHILIPS CA, RAJESH S, NAIR DC, *et al.* Hepatocellular carcinoma in 2021: an exhaustive update[J]. *Cureus*, 2021, 13(11): e19274.
- [3] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301 - 1314.
- [4] LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378 - 390.
- [5] LI YC, XIA J, SHAO FC, *et al.* Sorafenib induces mitochondrial dysfunction and exhibits synergistic effect with cysteine deple-

tion by promoting HCC cells ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 877 - 884.

- [6] GARCIA-LEZANA T, LOPEZ-CANOVAS JL, VILLANUEVA A. Signaling pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 63 - 101.
- [7] MARIN JGG, BRIZ O, MONTE MJ, *et al.* Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(4): 402 - 438.
- [8] DURMUS S, VAN HOPPE S, SCHINKEL AH. The impact of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) on disposition and toxicity of antitumor drugs: insights from knockout and humanized mice[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 27: 72 - 88.
- [9] MARADA VVVR, FLÖRL S, KÜHNE A, *et al.* Interaction of human organic anion transporter polypeptides 1B1 and 1B3 with antineoplastic compounds[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 92: 723 - 731.
- [10] ZIMMERMAN EI, HU SY, ROBERTS JL, *et al.* Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the disposition of sorafenib and sorafenib-glucuronide[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(6): 1458 - 1466.
- [11] ZHOU TF, LI SC, XIANG DM, *et al.* m6A RNA methylation-mediated HNF3 γ reduction renders hepatocellular carcinoma dedifferentiation and sorafenib resistance[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2020, 5: 296.
- [12] GLAVINAS H, KRAJCSI P, CSEREPES J, *et al.* The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity[J]. *Curr Drug Deliv*, 2004, 1(1): 27 - 42.
- [13] MUPPIDI MR, PORTWOOD S, GRIFITHS EA, *et al.* Decitabine and sorafenib therapy in FLT-3 ITD-mutant acute myeloid leukemia[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, 1(15 Suppl): S73 - S79.
- [14] BENDER CM, PAO MM, JONES PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(1): 95 - 101.
- [15] JONES PA, TAYLOR SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation[J]. *Cell*, 1980, 20(1): 85 - 93.
- [16] TANG ZF, KANG BX, LI CW, *et al.* GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W556 - W560.
- [17] FENG LF, LOU JL. DNA Methylation Analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1894: 181 - 227.
- [18] HAOUALA A, ZANOLARI B, ROCHAT B, *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(22): 1982 - 1996.
- [19] DEEPITHA M. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 7.
- [20] MARIN JGG, ROMERO MR, BRIZ O. Molecular bases of liver cancer refractoriness to pharmacological treatment[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(8): 709 - 740.
- [21] LIU HY, WANG M, LIANG N, *et al.* PDCD2 sensitizes HepG2 cells to sorafenib by suppressing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2173 - 2179.
- [22] 纪雷, 纪道林, 鲍冬冬, 等. lncRNA 在肝细胞癌索拉非尼耐药中的最新研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2021, 35(6): 562 - 567.
- [23] HENNESSY BT, GARCIA-MANERO G, KANTARJIAN HM, *et al.* DNA methylation in haematological malignancies: the role of decitabine[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12(12): 1985 - 1993.
- [24] DAWSON MA, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 12 - 27.
- [25] KELLY AD, ISSA JPJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 42: 68 - 77.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-10-19