

## 牛磺胆酸钠转运蛋白在肝癌大鼠肝组织中的表达状况

张孟瑜, 王洁萍, 夏先明

张孟瑜, 夏先明, 泸州医学院附属医院肝胆外科 四川省泸州市 646000

王洁萍, 泸州医学院附属医院康复科 四川省泸州市 646000  
张孟瑜, 主治医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础和临床研究。

四川泸州市科技局课题基金资助项目, No. 2013-s-48

作者贡献分布: 课题设计由张孟瑜与夏先明完成; 研究过程及论文写作由张孟瑜与王洁萍完成; 数据分析由王洁萍完成; 试剂由夏先明提供。

通讯作者: 夏先明, 教授, 646000, 四川省泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院附属医院肝胆外科. xxm6206@126.com  
电话: 0830-3165903

收稿日期: 2015-05-24 修回日期: 2015-06-08

接受日期: 2015-06-15 在线出版日期: 2015-08-08

### Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide expression in hepatocellular carcinoma in rats

Meng-Yu Zhang, Jie-Ping Wang, Xian-Ming Xia

Meng-Yu Zhang, Xian-Ming Xia, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Jie-Ping Wang, Department of Rehabilitation, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: Project of Science and Technology Bureau of Luzhou City, No. 2013-s-48

Correspondence to: Xian-Ming Xia, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. xxm6206@126.com

Received: 2015-05-24 Revised: 2015-06-08

Accepted: 2015-06-15 Published online: 2015-08-08

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of sodium/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) in hepatocellular carcinoma in rats.

**METHODS:** Sixty Wistar rats were randomly divided into a control group and an experimental group, with 30 rats in each group. The control group was fed an ordinary diet, and the experimental group was fed diethylnitrosamine for 20 wk to induce primary liver cancer. After successful induction, liver tissues were taken to detect the expression of Ntcp protein by immunohistochemistry and Western blot.

**RESULTS:** Both immunohistochemistry and Western blot analysis showed that the expression of Ntcp protein was significantly higher in the experiment group than in the control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of Ntcp protein increases significantly in primary liver cancer in rats, which suggests that drugs targeting Ntcp may provide a new treatment method for primary liver cancer.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** *Ntcp*; Primary liver cancer; Expression

Zhang MY, Wang JP, Xia XM. Sodium/taurocholate cotransporting polypeptide expression in hepatocellular carcinoma in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(22): 3587-3591 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3587.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i22.3587>

### 摘要

**目的:** 本研究通过建立肝癌大鼠模型, 以牛磺胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象,

### 背景资料

肝癌的发生发展和变化过程非常复杂, 目前临床上一些手术及非手术治疗手段有限, 且治疗效果并非十分理想。

### 同行评议者

刘亮, 副主任医师, 复旦大学胰腺癌研究所; 复旦大学附属肿瘤医院胰腺肝胆外科

## ■ 研发前沿

目前研究的热点和重点为新型的治疗肝癌的方法和药物, 而基因治疗是目前尚未在临床广泛应用又极具前景的治疗方式, 所以尝试从相关基因入手, 为肝癌治疗找到新的方法。

初步了解Ntcp在肝癌大鼠中的表达状况, 以期能找到新的手段和方法进行肝癌的治疗。

**方法:** 取Wistar大鼠(♂、体质量160 g±8 g) 60只, 随机分为2组, 每组30只: 普通饮食对照组(简称对照组)予以普通饮食、二乙基亚硝胺饮食实验组(简称实验组)予以含二乙基亚硝胺饮水。经过20 wk, 建立肝癌大鼠模型, 取对照组和实验组肝脏组织: (1)石蜡切片后用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测两组模型肝脏组织的Ntcp蛋白表达的强度; (2)Western blot法检测两组模型肝脏组织的Ntcp蛋白表达的强度。

**结果:** 免疫组织化学SP法及Western blot法结果均显示, 实验组Ntcp表达阳性率高于对照组Ntcp表达阳性率(25.7%), 他们之间的表达差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.62, P < 0.05$ )。

**结论:** 实验组大鼠的Ntcp蛋白的表达较对照组增多, 提示我们在肝癌的治疗中, Ntcp有可能成为新的治疗靶点和方向。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** Ntcp基因; 肝癌; 表达

**核心提示:** 建立肝癌大鼠模型, 以牛磺胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)为研究对象, 初步了解Ntcp在肝癌大鼠中的表达状况, 以期能找到新的手段和方法进行肝癌的治疗。

张孟瑜, 王洁萍, 夏先明. 牛磺胆酸钠转运蛋白在肝癌大鼠肝组织中的表达状况. 世界华人消化杂志 2015; 23(22): 3587-3591 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3587.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i22.3587>

## 0 引言

肝癌是消化系恶性肿瘤之一, 据资料统计, 在消化系恶性肿瘤中近年来每年被肝癌夺去生命的人数在逐年增加, 但目前治疗方法和手段有限。在各种方法中, 首选的方法是手术切除肝癌, 但手术有适应证和禁忌证, 能行根治性切除的患者不多, 对不能行根治性切除的患者部分可行姑息性切除, 但二者术后5年生存率皆不高。对无法进行手术或放弃手术的患者, 包括存在身体各器官严重功能障碍, 肿瘤浸及周围组织或转移者, 因自身条件有限放弃

手术者等, 进行介入治疗、放疗、化疗、射频消融等非手术治疗后发现效果有限, 治疗后的生存率未得到大的改善。那么, 是否存在更为有效而又实用的方法呢? 基因治疗是目前尚未在临床广泛应用而又极具前景的治疗方法之一, 所以, 我们尝试从相关基因入手, 牛磺胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)基因与胆汁酸重吸收关系密切<sup>[1-3]</sup>, 而胆汁酸如果淤积, 则可能形成结石, 进而可能导致胆管及肝脏组织的恶变, 那么其在肝癌组织中有无表达呢? 表达情况又如何呢? 所以, 本项目拟以Ntcp为研究对象, 分析其在肝癌大鼠肝细胞中的表达状况, 尝试为肝癌治疗提供新的方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar大鼠(♂、体质量160 g±8 g)60只(购自泸州医学院动物实验中心), 随机分为2组, 每组30只: 普通饮食对照组(简称对照组)予以普通饮食、二乙基亚硝胺(DEN)饮食实验组(简称实验组)予以含DEN饮水。入选前大鼠无其他疾病存在。主要仪器有冰冻切片机, HFsafe生物安全柜, 显微摄像系统(PM-10A)等; 主要试剂有Western blot试剂盒(购自大连宝生物TaKaRa工程有限公司), Ntcp单克隆抗体(购自CHEMICON公司, 美国)等。

**1.2 方法** 首先制备肝癌大鼠模型, 实验组饲以含DEN饮水, 连续12 wk后改为自由饮水。对照组, 自由进食及饮水。每天观察动物的精神状态、饮食状况及皮毛的变化等一般情况。于实验第8、16、20周, 分别取出模型组动物各2、2、2只, 剖腹观察肝脏情况, 记录肝脏的大小、质地、形态等的变化情况。经病理检查证实建立肝癌大鼠模型成功后, 取对照组和实验组肝脏组织: (1)石蜡切片后用免疫组织化学SP(streptavidin-peroxidase)法检测两组模型肝脏组织的Ntcp蛋白表达情况; (2)Western blot法检测两组模型肝脏组织的Ntcp蛋白表达的强度。Quantity One软件计算比较Western blot产物条带与β-actin条带的光密度的相对比值, 通过分析, 最终得出其在肝脏组织中表达相对含量。

**统计学处理** 采用SPSS19.0统计软件进行分析, 统计学方法测得数据用mean±SD表示, 判断组间差异采用t检验及 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## ■ 相关报道

Veloso Alves Pereira等发现了初级胆汁酸可以抑制牛磺胆酸钠转运蛋白(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, Ntcp)调控的丁型肝炎病毒进入肝细胞, 提示胆汁酸池的调节可以影响肝细胞中丁型肝炎病毒的感染。



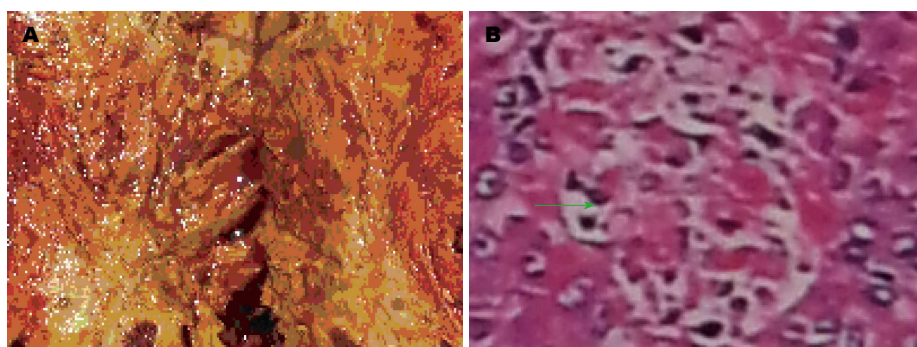


图1 病理检查证实肝癌大鼠模型建立. A: 大鼠肝癌组织剖面图; B: 200倍物镜下所显示的肝癌组织情况, 可见核分裂的肿瘤细胞(图中绿色箭头所指)( $\times 200$ ).

#### 创新盘点

本文从肝癌相关基因 *Ntcp* 入手, 初步发现了 *Ntcp* 在肝癌组织中的表达状况, 为肝癌治疗找寻新的思路.

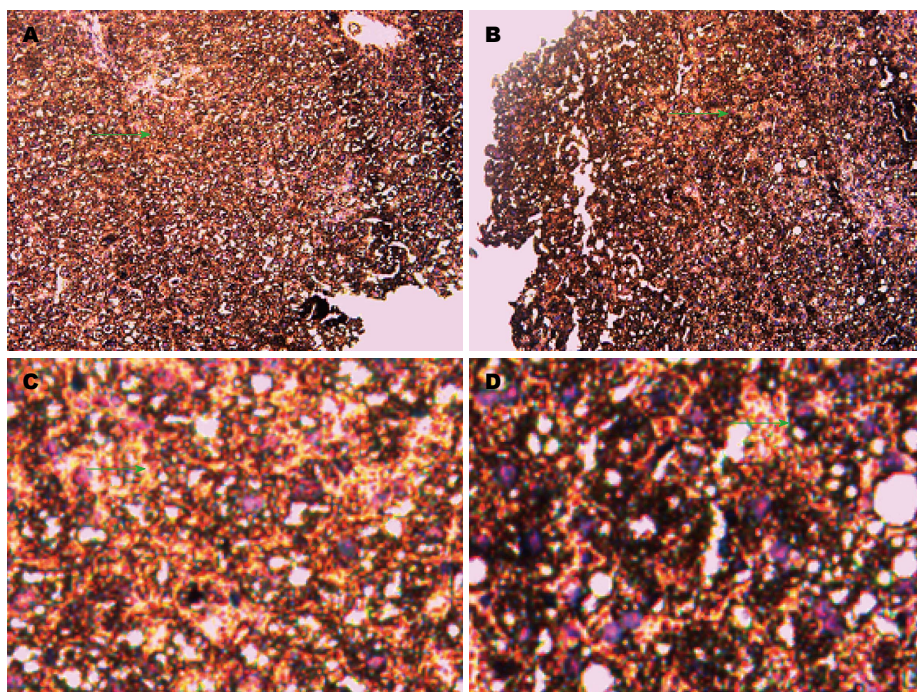


图2 免疫组织化学结果. A: *Ntcp* 基因实验组, *Ntcp* 蛋白在实验组中的阳性表达( $\times 100$ ); B: *Ntcp* 基因对照组, *Ntcp* 蛋白在对照组中的阳性表达( $\times 100$ ); C: *Ntcp* 基因实验组, *Ntcp* 蛋白在实验组中的阳性表达( $\times 200$ ); D: *Ntcp* 基因对照组, *Ntcp* 蛋白在对照组中的阳性表达( $\times 200$ ). 绿色箭头所指即为 *Ntcp* 蛋白. *Ntcp*: 牛磺胆酸钠转运蛋白.

## 2 结果

**2.1 一般情况** 实验组大鼠自第5周开始, 进食开始出现减少的情况, 部分大鼠体重与对照组相比降低明显, 喂食至20 wk后死亡2只. 对照组大鼠饮食情况及身体情况较好, 未出现死亡病例. 20 wk后经病理检查证实已建立肝癌大鼠模型(图1).

**2.2 免疫组织化学SP法染色结果** 光学高倍(100倍及200倍)物镜下: 肝脏组织中 *Ntcp* 蛋白出现黄色染色颗粒为阳性细胞(绿色箭头所指). 每张切片随机选取6个视野, 每个视野内观察80个细胞, 阳性细胞  $\geq 10\%$  为阳性, 否则为阴性.

$\chi^2$  检验显示: 实验组 *Ntcp* 蛋白表达阳性率为76.3%, 对照组 *Ntcp* 蛋白表达阳性率为25.7%, 他们之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.62$ ,  $P < 0.05$ )(图2).

**2.3 Western blot法检测结果** 我们发现, 在51 kDa处出现了 *Ntcp* 蛋白表达, 利用Quantity One软件, 我们得到实验组 *Ntcp* 蛋白表达较高( $0.775 \pm 0.016$ ), 对照组 *Ntcp* 蛋白表达较低( $0.253 \pm 0.011$ ); *Ntcp* 蛋白在对照组和实验组中表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3).

## 3 讨论

在消化系恶性肿瘤中, 包括肝癌、胃癌、胰腺

## 应用要点

通过初步发现 *Ntcp* 在肝癌大鼠肝组织中的表达状况, 为进一步寻找作用于 *Ntcp* 基因的药物打下基础, 从而改善目前肝癌治疗的局限性。

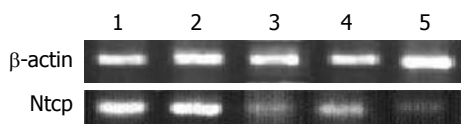


图3 Western blot结果. 1, 2: 实验组; 3-5: 对照组. *Ntcp*: 牛磺胆酸钠转运蛋白.

癌等等; 肝癌是恶性程度较高的肿瘤之一, 虽然长时间的基础研究和临床实践为肝癌的诊治积累了大量的经验, 但目前肝癌的发病机制、病理生理变化、内环境等的改变过程尚不是完全明确, 目前考虑其发病是各种因素、各种条件综合作用的结果、中间变化发展可能涉及一系列基因、受体、信号传递介质等的改变, 其步骤变化多而繁杂, 所需时间和过程均较长, 不同的影响条件和不同的状况改变均可能对此过程产生较多影响. 就目前而言, 已经明确的情况是, 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染、肝硬化、亚硝胺类物质、黄曲霉素、一些特殊的药物等都与肝癌发病相关, 但变化的过程、经历的时间、具体的信号传递等并不明确. 由于经过研究发现肝癌可能是各种因素和条件积累并相互作用后出现的结果, 所以目前的治疗存在困难. 就从目前治疗方法来看, 早期的肝癌, 包括微小肝癌、小肝癌、局限于部分叶、段的肝癌可以行根治性的手术切除, 但如果肿瘤发生周围组织浸润或转移, 在身体多个器官或组织发现病灶, 那么手术则可能无法完全切除, 不能再作为首要考虑的治疗方法, 而射频消融、灌注化疗、放疗、介入栓塞等治疗方法效果有限, 即便是进行了上述的治疗, 肝癌在治疗后复发率和转移率也较高, 5年生存率并未达到理想的结果. 所以, 由于上述原因, 我们不断进行思考和探索, 能不能找到一种行之有效的办法呢? 而目前, 基因治疗是一种尚未广泛应用于临床但又极具前景和挑战性的治疗方案, 可能让肝癌的治疗方法产生较为明显的重要的变化, 因此, *Ntcp* 基因进入了我们的思考范围并在此前提下我们设计了上述的对比试验, 以期能发现一些与肝癌相关的变化<sup>[4-6]</sup>.

我们已进行实验发现在肝癌大鼠中存在法尼基衍生物X受体(farnesyl derivatives X receptor, *FXR*)基因, 并且其在肝脏中的表达减弱, 那么, 作为*FXR*的靶基因, *Ntcp*在肝癌大鼠肝组织中是否出现了相似的变化, 其作用是增

强还是减弱, 继续引导我们深入研究和思考<sup>[7,8]</sup>. *Ntcp*是一种具有胆酸转运功能的多肽类物质, 通常表达在人肝细胞表面, 对胆汁酸盐的排泄、胆汁酸盐浓度的稳定具有重要作用、而更重要的是, 在胆汁酸盐的肠肝循环胆汁酸重吸收过程中, 其更是不可或缺的. 胆汁酸的肠肝循环需要各种转运体的配合和相互调节来完成, 胆汁酸首先由肝细胞合成, 接下来胆汁酸在胆盐输出泵(bile salt export pump, *Bsep*)作用下主动分泌后转运至肠道<sup>[9,10]</sup>, 当被排入小肠后结合胆汁酸约95%通过顶端钠依赖胆汁酸转运蛋白(apical sodium-dependent bile acid transport, *ASBT*)、细胞内胆汁酸结合蛋白和基侧膜的终末腔面钠盐依赖的胆汁酸转运体(terminal apical sodium-dependent bile acid transporter, *tASBT*)被重吸收, 其中的80%的胆汁酸在*Ntcp*协助下被摄入肝细胞内并再次被分泌到胆汁中形成胆汁酸的肠肝循环<sup>[11,12]</sup>. 而如果*Ntcp*功能紊乱导致胆汁重吸收出现紊乱, 则可能出现肝内胆汁淤积, 而由于胆汁淤积, 则可能出现胆固醇、胆色素等在肝内胆管的沉积, 从而形成结石, 而肝内胆管结石的长期存在, 正是我们目前了解的可能产生胆管细胞性肝癌的原因之一. 所以, *Ntcp*基因是否表达, 以及表达的情况是我们所关注的和了解的重点<sup>[13,14]</sup>.

我们通过设计试验并观察发现, 经过20 wk时间含DEN饮水的喂养成功建立肝癌大鼠模型, 在试验中使用免疫组织化学、Western blot等方法进行试验和检测后, 证实了肝癌大鼠的肝脏组织中*Ntcp*基因出现了显而易见的变化, 表达显著增强, 较对照组有明显的增多, 该情况也就说明肝癌时胆汁酸的肠肝循环出现了变化, 重吸收开始增多, 出现了较为显著的加强, 由此我们初步考虑如果胆汁酸进入肠道增加, 则会伴随*Ntcp*基因表达增强<sup>[15]</sup>, 从而加快胆汁酸的重吸收, 维持胆汁酸浓度的稳定, 而肝癌时则出现了胆汁酸的重吸收大幅度增强, 已超过了正常肝细胞的代偿范围, 因此导致肝细胞出现转化. 在目前所用治疗肝癌的药物广泛存在不同种类的问题, 可能无法完全达到治疗目的、效果不明显, 药物服用时间偏长、胃肠道反应大, 患者可持续接受性差等缺点, 而这些情况阻碍了其作为临床治疗药物的普遍应用, 但目前所研究的药物中尚无可直接作用



于肝癌相关基因又可在临床广泛应用、且不良反应较小的药物。由此, *Ntcp* 基因表达变化的发现, 可能为基础研究和临床治疗肝癌提供新的药物治疗靶点<sup>[16,17]</sup>, 找到不同于以往的新的治疗方法和治疗方向。

#### 4 参考文献

- 1 Veloso Alves Pereira I, Buchmann B, Sandmann L, Sprinzel K, Schlaphoff V, Döhner K, Vondran F, Sarrazin C, Manns MP, Pinto Marques Souza de Oliveira C, Sodeik B, Ciesek S, von Hahn T. Primary biliary acids inhibit hepatitis D virus (HDV) entry into human hepatoma cells expressing the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *PLoS One* 2015; 10: e0117152 [PMID: 25646622 DOI: 10.1371/journal.pone.0117152]
- 2 Troeller A, Yan D, Marina O, Schulze D, Alber M, Parodi K, Belka C, Söhn M. Comparison and limitations of DVH-based NTCP models derived from 3D-CRT and IMRT data for prediction of gastrointestinal toxicities in prostate cancer patients by using propensity score matched pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 91: 435-443 [PMID: 25636766 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.09.046]
- 3 Song P, Rockwell CE, Cui JY, Klaassen CD. Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 283: 57-64 [PMID: 25582706 DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.005]
- 4 Elinger S. HBV: Stowaway of NTCP. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014; 38: 661-663 [PMID: 25178832 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.009]
- 5 Fattah S, Augustijns P, Annaert P. Age-dependent activity of the uptake transporters Ntcp and Oatp1b2 in male rat hepatocytes: from birth till adulthood. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1-8 [PMID: 25305012 DOI: 10.1124/dmd.114.059212]
- 6 Romero MR, Monte MJ, Marin JJ. Pathophysiological and pharmacological implications of elucidating the molecular bases of the interaction between HBV and the bile acid transporter NTCP. *Ann Hepatol* 2015; 14: 143-144 [PMID: 25536655]
- 7 Benadjaoud MA, Blanchard P, Schwartz B, Champoudry J, Bouaita R, Lefkopoulos D, Deutsch E, Diallo I, Cardot H, de Vathaire F. Functional data analysis in NTCP modeling: a new method to explore the radiation dose-volume effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90: 654-663 [PMID: 25304951 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.07.008]
- 8 Zhang G, Zhou Y, Rao Z, Qin H, Wei Y, Ren J, Zhou L, Wu X. Effect of Yin-Zhi-Huang on up-regulation of Oatp2, Ntcp, and Mrp2 proteins in estrogen-induced rat cholestasis. *Pharm Biol* 2015; 53: 319-325 [PMID: 25420584 DOI: 10.3109/13880209.2014.918156]
- 9 Tong S, Li J. Identification of NTCP as an HBV receptor: the beginning of the end or the end of the beginning? *Gastroenterology* 2014; 146: 902-905 [PMID: 24576732 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.024]
- 10 Erlinger S. NTCP deficiency: a new inherited disease of bile acid transport. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 7-8 [PMID: 25193235 DOI: 10.1016/j.clinre.2014.07.011]
- 11 Dong Z, Ekins S, Polli JE. Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition. *Eur J Pharm Sci* 2014; 66C: 1-9 [PMID: 25220493 DOI: 10.1016/j.ejps.2014.09.005]
- 12 Wopken K, Bijl HP, van der Schaaf A, van der Laan HP, Chouvalova O, Steenbakkers RJ, Doornaert P, Slotman BJ, Oosting SF, Christianen ME, van der Laan BF, Roodenburg JL, Leemans CR, Verdonck-de Leeuw IM, Langendijk JA. Development of a multivariable normal tissue complication probability (NTCP) model for tube feeding dependence after curative radiotherapy/chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 2014; 113: 95-101 [PMID: 25443500 DOI: 10.1016/j.radonc.2014.09.013]
- 13 Fu LL, Liu J, Chen Y, Wang FT, Wen X, Liu HQ, Wang MY, Ouyang L, Huang J, Bao JK, Wei YQ. In silico analysis and experimental validation of azelastine hydrochloride (N4) targeting sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) in HBV therapy. *Cell Prolif* 2014; 47: 326-335 [PMID: 24965018 DOI: 10.1111/cpr.12117]
- 14 Vojtišek R, Mužik J, Slampa P, Budíková M, Hejsek J, Smolák P, Ferda J, Fínek J. The impact of PET/CT scanning on the size of target volumes, radiation exposure of organs at risk, TCP and NTCP, in the radiotherapy planning of non-small cell lung cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 2014; 19: 182-190 [PMID: 24944819 DOI: 10.1016/j.rpor.2013.09.006]
- 15 König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D. Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J Hepatol* 2014; 61: 867-875 [PMID: 24845614 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.05.018]
- 16 Marada VV, Flörl S, Kühne A, Müller J, Burckhardt G, Hagos Y. Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs. *Pharmacol Res* 2015; 91: 78-87 [PMID: 25481222 DOI: 10.1016/j.phrs.2014.11.002]
- 17 Brouwer CL, Steenbakkers RJ, Gort E, Kamphuis ME, van der Laan HP, Van't Veld AA, Sijtsma NM, Langendijk JA. Differences in delineation guidelines for head and neck cancer result in inconsistent reported dose and corresponding NTCP. *Radiother Oncol* 2014; 111: 148-152 [PMID: 24560759 DOI: 10.1016/j.radonc.2014.01.019]

#### 同行评价

肝癌是高致命性癌症。本研究建立肝癌大鼠模型, 通过免疫组织化学及Western blot检测了Ntcp在肝癌大鼠肝脏肿瘤及正常大鼠肝脏组织中的表达情况, 探索肝癌治疗的潜在靶点, 有一定的研究价值及意义。

编辑: 韦元涛 电编: 闫晋利

