

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0101-04

抑制人肺腺癌细胞 MCT1 基因的表达对其增殖、凋亡的影响

张桂芝, 黄桂君, 成党校, 郭先健, 钱桂生(第三军医大学新桥医院呼吸研究所, 重庆 400037)

[摘要] 目的: 研究抑制单羧酸转运蛋白第1亚型(MCT1)基因的表达对肿瘤细胞增殖、凋亡的影响。方法: 用电穿孔法将 MCT1 反义基因表达载体转染进入人肺腺癌 A549 细胞中, 以抑制 MCT1 基因表达。经 G418 筛选阳性克隆。用 PCR, RT-PCR 方法鉴定 MCT1 反义基因与 A549 基因组的整合; 用分光光度法和生物发光法分别测定细胞内 pH(intracellular pH, pH_i)、乳酸含量和 ATP 含量。用原位凋亡试剂盒测定细胞凋亡情况, 并接种转染 MCT1 反义基因的细胞和 A549 细胞于裸鼠皮下, 观察移植瘤的生长。结果: 与 A549 细胞比较, 转染 MCT1 反义基因的细胞 pH_i 降低($P < 0.05$), 乳酸显著升高($P < 0.001$), ATP 含量明显降低($P < 0.05$)。转染 MCT1 反义基因的细胞凋亡率明显高于 A549 细胞($P < 0.01$)。接种转染 MCT1 反义基因的细胞移植瘤明显比接种 A549 细胞的轻且小($P < 0.001$)。结论: MCT1 基因对肿瘤细胞增殖凋亡具有重要的调节作用。

[关键词] 单羧酸转运蛋白基因; 肺肿瘤; pH_i; 乳酸; ATP; 移植瘤

[中图分类号] R394.2; R734.2 [文献标识码] A

Effect of Inhibiting the Expression of the First Subtype of the Monocarboxylate Transporter(MCT1) Gene on Proliferation and Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma Cells

ZHANG Gui-zhi, HUANG Gui-jun, CHENG Dang-xiao, Guo Xian-jian, Qian Gui-sheng (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of inhibiting the expression of the first subtype of the monocarboxylate transporter(MCT1) gene on proliferation and apoptosis in tumor cells. **Methods:** MCT1 antisense gene expression vector was introduced into A549 cells with electroporation to inhibit the expression of MCT1 gene. The positive colonies were selected by G418. The integration of MCT1 antisense gene and A549 genomic DNA was confirmed by PCR and RT-PCR technique. The pH_i, lactate content and ATP content were detected with spectrophotometry and bioluminescence method respectively. The conditions of cell apoptosis were measured with *in situ* apoptosis assay kit. And cells transfected MCT1 antisense gene and A549 cells were inoculated in nude mouse subcutaneous to observe the growth of transplantation tumor. **Results:** Compared with A549 cells, the pH_i of cells transfected MCT1 antisense gene was remarkably decreased ($P < 0.05$), and lactate content was remarkably increased ($P < 0.001$), ATP content was remarkably decreased ($P < 0.05$). Apoptosis rate of cells transfected MCT1 antisense gene was remarkably higher than A549 cells($P < 0.01$). And the nude mouse transplantation tumors inoculated cells transfected MCT1 antisense gene were significantly lighter and smaller than that ones inoculated A549 cells($P < 0.001$). **Conclusion:** MCT1 gene plays an important role in proliferation and apoptosis of tumor cells.

[Key words] monocarboxylate transporter gene; lung neoplasm; pH_i; lactate; ATP; transplantation tumor

* 肿瘤细胞的反巴士德效应导致大量的乳酸、丙酮酸等酸性产物增多, 这样势必导致细胞内酸化, 抑制细胞生长。1994 年, 跨膜的单羧酸转运泵第 1 亚型(monocarboxylate transporter, MCT1) 基因首先被克隆出来, 此后该家族的其它成员先后被克隆出来。而 MCT1

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39900067); 重庆市科委课题

[作者简介] 张桂芝(1971-), 女, 江苏丰县人, 主治医师, 主要从事肿瘤基因诊断治疗方面的研究。E-mail: zhang-gz7781@sina.com

几乎在肿瘤组织中均有表达。因此推测 MCT1 可能在细胞内外的乳酸转运及 pH_i 值调节方面起着重要作用。本实验应用反义技术抑制该基因在肿瘤细胞的表达,进而研究 MCT1 基因对肿瘤细胞增殖、凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

人肺腺癌细胞 A549 为我所保存细胞株;MCT1 基因反义表达载体由我所构建^[1]。Gene-pluser 电穿孔仪和流式细胞仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 质粒 DNA 的扩增和提取

按文献[2]碱裂解方法进行。

1.3 细胞培养

A549 细胞用 RPMI-1640 培养液,在 37℃,5% CO₂ 孵箱中常规传代培养,细胞贴壁生长。

1.4 电穿孔转染

处于对数生长期的 A549 细胞分为 3 组:1)A549 细胞对照组(A549);2)转染 pLXSN 组(A549-pLXSN);3)转染 A549 反义基因表达载体 pLXSN-MCT1 组(A549-MCT1)。转染方法参见文献[3]。

1.5 G418 筛选

细胞转染 48 h 后接入新培养瓶培养液中含 G418 500 μg/ml,5 d 后改用 200 μg/ml 维持培养。

1.6 pH_i 测定

按文献[4-5]方法进行。

1.7 细胞内乳酸测定

将 A549, A549-MCT1 和 A549-pLXSN 细胞制成单细胞悬液,离心,加入低渗盐溶液,细胞终浓度为 1 × 10⁶/ml,室温静置 1 h,留上清。按乳酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)操作说明加样,Bio-20 紫外分光光度计(美国 PE 公司),测各管 530 nm 吸光度,求乳酸浓度。

1.8 细胞原位凋亡测定

按原位凋亡检测试剂盒(德国 BM 公司)方法进行。

1.9 细胞 ATP 测定

按 ATP 检测试剂盒(Roche 产品)方法进行。

1.10 裸鼠移植瘤实验

按文献[6]方法进行。

BALB/c 裸小鼠 20 只,雌雄不拘,4~5 周龄,平均重量为(20.13 ± 0.56)g,随机确定其中 10 只裸小鼠颈部皮下接种 A549-MCT1 细胞,背部皮下接种 A549-MCT1-NHE1 细胞,另外 10 只裸小鼠颈部皮下接种 A549-MCT1-NHE1 细胞。常规消毒裸鼠皮肤,用 6 号

针头的注射器抽取癌细胞悬液接种于裸鼠的颈部或背部皮下,每个点接种 1 × 10⁷ L⁻¹ 细胞(0.2 ml)。

接种瘤细胞后,将裸小鼠送回无特殊病原体饲养室饲养。自接种之日起,每 2 天观察肿瘤结节生长情况,10 d 后每天观察 1 次,实验结束时用游标卡尺测量记录皮下移植瘤最大直径(a)和横径(b),按公式计算瘤体积(V) = a × b² × π/6,并拍照,于接种后 45 d 处死动物,取下肿瘤,称取重量,10% 中性甲醛固定,切片观察。

1.11 统计学分析本文数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 8.0 软件作 t 检验。

2 结 果

2.1 抗性克隆的鉴定

2.1.1 PCR 结果

由引物合成的 pLXSN 大小为 139 bp, MCT1 大小为 640 bp,由此得出 PCR 扩增出的产物大小为 779 bp,与预计结果相符(见图 1)。

图 1 抗性克隆的鉴定

Fig. 1 The identification of resistance cloning

1: Marker (λDNA/EcoR I + Hind III); 2: A549 - MCT1

2.1.2 RT-PCR 结果

由引物合成的 A549-MCT1, A549-pLXSN 细胞的 neo 基因产物大小均为 429 bp,证实已经将 MCT1 反义基因成功转染进入 A549 细胞基因组中(见图 2)。

2.2 pH_i 标准曲线、回归方程及 pH_i 测定结果

2.2.1 pH_i 标准曲线,在不同的 pH_i 设定点下(pH_i 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4),细胞内 495 nm/440 nm 的荧光强度比值 FIR($\bar{x} \pm s, n = 3$)分别为 3.81 ± 0.04, 4.67 ± 0.02, 5.51 ± 0.03, 6.36 ± 0.03, 7.21 ± 0.02。其回归方程为 Y = -26.164 + 4.237X (r = 0.991, P < 0.01)。

回归方程: $Y = -26.164 + 4.237X$ ($r = 0.991, P < 0.001$)。

2.2.2 pH_i 测定结果

A549-MCT1 细胞 12 h, 24 h, 48 h pH_i 比 A549 细胞相同时相点的 pH_i 要低, 差异有显著性(见表 1)。

2.3 乳酸测定结果

从 A549, A549-pLXSN, A549-MCTr 细胞乳酸测定结果可以看出, 随着时间的延长前两者乳酸无明显改变, 而后者较前两者显著升高(见表 1)。

2.4 原位细胞凋亡检测结果

转染细胞(A549-MCT1)凋亡率: $(18.9 \pm 0.37)\%$, 对照细胞(A549)凋亡率: $(1.05 \pm 0.24)\%$, 有显著差异($P < 0.01$)。

2.5 ATP 标准曲线回归方程

$Y = 9.3024 + 0.7552X$ ($r = 0.9868, P < 0.01$)。经测定 A549 细胞、A549-pLXSN 细胞、A549-MCT1 细胞的 ATP 含量分别为 7.8×10^{-6} mol/L, 6.99×10^{-6} mol/L, 5.27×10^{-6} mol/L。由此看出, 与 A549 细胞相比, A549-MCT1 细胞的 ATP 含量明显降低($P < 0.05$)。

2.6 裸鼠移植瘤结果

A549 组第 6 天即肉眼可见肿瘤组织生长, 而 A549-MCT1 组第 8 天、A549-MCT1-NHE1 组第 28 天可见肿瘤生长。A549 组和 A549-MCT1 组 10 只裸小鼠均长出肿瘤, 而 A549-MCT1-NHE1 组 10 只裸小鼠仅有 8

只长出肿瘤(见表 3)。

病理表现: 肿瘤大体呈卵圆形, 表面光滑, 有薄层包膜, 切面灰白色、质脆、部分区域有坏死。镜下表现: 数只动物的肿瘤细胞形态大致相同。癌细胞呈浸润生长, 瘤细胞呈宽片状密集排列, 部分区域呈不典型乳头状或不典型腺样结构。癌细胞体积中等偏小, 大小形态不一致, 多数胞浆较少, 嗜碱性, 核间变明显, 深染, 可见散在分裂相。

图 2 neo 基因的鉴定

Fig. 2 The identification of neo gene

1: Marker (λ DNA/EcoR I + Hind III);

2: A549 - pLXSN; 3: A549 - MCT1

表 1 A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 细胞不同时相点的细胞 pH_i

Tab. 1 The pH_i of A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 cells in different time

	A549			A549-pLXSN *			A549-MCT1 ^Δ		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
FIR	6.02 ± 0.03	5.98 ± 0.02	5.93 ± 0.04	5.94 ± 0.03	5.69 ± 0.05	5.31 ± 0.04	5.73 ± 0.06	5.05 ± 0.02	4.50 ± 0.03
pH _i	7.12	7.11	7.10	7.10	7.04	6.95	7.05	6.89	6.76

* A549-pLXSN vs A549 $P > 0.05$; ^Δ A549-MCT1 vs A549 $P < 0.05$

表 2 A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 细胞的乳酸测定结果(mmol/L)

Tab. 2 The result of lactate of A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 cells(mmol/L)

Cells	1 st day	4 th day	7 th day	10 th day
A549	0.2506 ± 0.03	0.2519 ± 0.04	0.2523 ± 0.02	0.2540 ± 0.05
* A549-pLXSN	0.2719 ± 0.02	0.2837 ± 0.01	0.2875 ± 0.03	0.2901 ± 0.03
^Δ A549-MCT1	0.4536 ± 0.02	0.4878 ± 0.03	0.5413 ± 0.02	0.5726 ± 0.04

* A549-pLXSN vs A549 $P > 0.05$; ^Δ A549-MCT1 vs A549 $P < 0.001$

表3 A549, A549-MCT1 接种裸鼠体内成瘤情况及肿瘤重量($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 3 growth and weight of tumors after inoculating A549 and A549-MCT1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Inoculating cells	Cells number (1×10^7 /ml)	Growth of tumors			
		Incidence	Mean latency(d)	Volume(cm^3)	Weight (g)
A549	1.0	10/10	6	1.3718 ± 0.5355	1.3412 ± 0.3860
A549-MCT1	1.0	10/10	8	$0.726 \pm 0.2902^*$	$0.6073 \pm 0.1207^*$

* A549-MCT1 vs A549 $P < 0.001$

3 讨论

MCT1 作为一种跨膜转运蛋白,存在于很多肿瘤细胞中。MCT1 主要参与乳酸及其它单羧酸的跨膜转运,特别是对乳酸有较高的亲和力^[7]。乳酸的跨膜转运是与 H^+ 以 1:1 等摩尔的方式相偶连同向转运,从而消除糖酵解的终产物乳酸及 H^+ , 维持细胞的内稳态环境。因此认为此转运蛋白在参与乳酸循环、能量代谢及细胞 pH_i 调节方面发挥着重要作用。如果能用反义核酸抑制其表达,阻断上述作用,癌细胞就可能会因为乳酸堆积、细胞内酸化而抑制细胞生长并诱导细胞凋亡。

本实验用电穿孔基因转染方法将 MCT1 反义基因转染进入人肺腺癌 A549 细胞中,并通过 PCR, RT-PCR 方法证实转染成功。我们分别测定了转染细胞 pH_i 值和乳酸含量,结果发现 A549-MCT1 细胞, pH_i 明显下降而乳酸含量升高。这可能是由于 MCT1 反义基因抑制了 MCT1 基因的表达,胞膜上的 MCT1 大量减少,有限的 MCT1 不能有效转运逐渐增多的乳酸,而胞膜上 MCT1 又得不到有效补充,从而引起 MCT1 对乳酸的转运功能逐渐减弱,胞内环境逐渐酸化, pH_i 降低。这也表明 MCT1 基因在肿瘤细胞中的一个重要功能是消除胞内过多的乳酸根和 H^+ , 以避免胞内酸化,使 pH_i 稳定在中性环境。

A549 肿瘤细胞在正常情况下通过糖酵解获得较高的能量,以维持其生长代谢和生命活动的需要。本研究用生物发光分析法测定细胞内 ATP 含量,发现 A549-MCT1 细胞的 ATP 含量与 A549 细胞相比明显降低($P < 0.05$)。这说明, MCT1 反义基因的导入,封闭了 MCT1 基因转运泵转运乳酸,使胞内乳酸含量升高,反馈抑制了糖酵解,使 ATP 生成降低。此结果表明, MCT1 基因在肿瘤细胞中对能量调节的功能可能赋予了它调控细胞增殖生长的重要作用。

通过原位凋亡检测,发现转染 A549-MCT1 的细胞比未转染的 A549 细胞凋亡率显著增高,可能是细胞内酸化通过激活核酸内切酶 II (DNase II) 诱发人肺癌细

胞凋亡^[8-9]。说明 MCT1 反义基因的稳定表达显著降低了该细胞系的恶性行为。

本实验还观察了 MCT1 基因对 A549 细胞系体内成瘤性的影响。结果显示,与接种 A549 细胞相比,接种 A549-MCT1 细胞后裸小鼠移植瘤生长速度减慢且局限,说明 MCT1 反义基因的导入显著降低了 A549 细胞系的体内致瘤性。其原因可能是由于转染细胞 pH_i 降低、内环境紊乱、能量代谢失衡、导致其恶性生长程度减弱而体内成瘤能力明显减低。

以上结果提示,用反义技术阻抑 MCT1 基因的表达,可显著降低肿瘤细胞的 pH_i 调节和乳酸转运功能, ATP 合成减少并影响其生长性质,使肿瘤细胞生长速率减慢,而且发生凋亡。这表明 MCT1 基因在肿瘤细胞 pH_i 调节、能量代谢及细胞的增殖生长和凋亡中发挥着重要的调节作用。MCT1 基因有可能成为肿瘤治疗的攻击新靶点,具有潜在的应用价值。

[参考文献]

- [1] 成党校, 黄桂君, 钱桂生, 等. 单羧酸转运泵基因反义真核表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(8): 807-809.
- [2] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 5-6.
- [3] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 156-157.
- [4] Madiom RP, Cragoe EJJ, Tannock IF. Therapeutic potential of analogues of amiloride: Inhibition of the regulation of intracellular pH as a possible mechanism of tumor selective therapy[J]. Br J Cancer, 1993, 67(2): 297-303.
- [5] Rink TJ, Tisen RY, Pozzan T. Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes[J]. J cell Biol, 1982(1), 95: 189-196.
- [6] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司. 1996. 299-304.
- [7] Andrew P, Halestrap, Nigel T Price. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: Structure, function and regulation[J]. Biochem J, 1999, 343(2): 281-299.
- [8] 邓友平, 肖培根. 核酸内切酶在细胞凋亡中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(1): 26-31.
- [9] Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis[J]. Arch biochem biophys, 1993, 300(1): 440-450.