文章编号:1000-5404(2010)20-2193-04

论著

CD147/HAb18G 单克隆抗体对人脑胶质瘤细胞乳酸转运及细胞生长的影响

王晓澍[1],游 潮[2],孙晓川[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];610041 成都,四川大学华西医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 研究 CD147/HAb18G 基因工程单克隆抗体对体外培养 U251 细胞单羧酸转运蛋白-1(monocarboxylate transporter-1,MCT1)表达分布和糖酵解乳酸代谢的影响。**方法** 体外培养 U251 细胞分为对照组、低剂量组和高剂量组,分别加入不同剂量的 CD147/HAb18G 单抗封闭细胞表面 CD147 分子。免疫荧光法检测各组细胞膜上 MCT1 表达分布改变,分光光度计检测各组细胞内乳酸含量,分别绘制生长曲线并记录生长数据。**结果** 低剂量组和高剂量组 MCT 表达分布改变,相比对照组其胞膜有效表达减少[随机计数 500 个细胞中胞膜完整表达细胞数:对照组(367.34±6.92),低剂量组(161.92±7.33),高剂量组(54.58±4.80),$P<0.01$],胞质无效表达增多[胞质表达细胞数:对照组(12.08±3.03),低剂量组(70.83±4.71),高剂量组(264.58±6.14),$P<0.01$];细胞内乳酸浓度在低、高剂量组明显增高[对照组(0.222±0.020) mmol/L,低剂量组(0.418±0.015) mmol/L,高剂量组(0.713±0.018) mmol/L,$P<0.01$],生长指标抑制,生长曲线低平[对照组最大细胞密度(5.24±0.37)×10^5/ml,低剂量组(4.23±0.48)×10^5/ml,高剂量组(3.19±0.46)×10^5/ml,$P<0.01$]。以上改变在低剂量组和高剂量组间差异亦有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CD147/HAb18G 单抗通过干扰 CD147 对 MCT1 表达的引导使胶质瘤细胞膜上 MCT1 有效分布减少,影响其糖酵解产生乳酸的排出,具有抑制肿瘤生长作用。

[关键词] 单羧酸转运蛋白-1;CD147;单克隆抗体;糖酵解
[中图法分类号] R73-36;R730.23;R739.41 **[文献标志码]** A

CD147/HAb18G monoclonal antibody suppresses glycolysis lactic acid metabolism in human glioma cells *in vitro*

Wang Xiaoshu[1], You Chao[2], Sun Xiaochuan[1] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[Abstract] Objective To explore the effects of CD147/HAb18G genetic engineering monoclonal antibody on the distribution of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) in U251 cells, and its influence on lactic metabolism of glycolysis. Methods U251 glioblastoma cells were divided into control (10 mg/L human IgG 0.5 ml), low dose (5 mg/L CD147/HAb18G Mab 0.5 ml) and high dose (10 mg/L CD147/HAb18G Mab 0.5 ml) groups. The change of MCT1 expression and distribution in each group were demonstrated by immunofluorescence staining. Intracellular lactic acid content were detected by spectrophotometer, and cell growth curves and data of each group recorded for statistical comparison. Results The expression and distribution of MCT1 were significantly changed in low and high dose groups. Compared with control group, valid expression of MCT1 on cell membrane was decreased (random observation of 500 cells for each sample, the cell counts of completed membrane expression in contrast group: 367.34±6.92, low dose group: 161.92±7.33, high dose group: 54.58±4.80, $P<0.01$), while invalid accumulation of MCT1 in plasma was increased (the cell counts of plasma expression in control group 12.08±3.03, low dose group 70.83±4.71, high dose group 264.58±6.14, $P<0.01$). Intracellular lactic acid content was significantly enhanced (the lactic acid content in con-

[通信作者] 王晓澍,E-mail:bigbearwxs@21cn.com

trast group: 0.222 ± 0.020 mmol/L, low dose group: 0.418 ± 0.015 mmol/L, high dose group: 0.713 ± 0.018 mmol/L, $P<0.01$). Growth curves and data also showed difference among 3 groups [the mean max cell density in control group: (5.24 ± 0.37) × 10^5/ml, low dose group: (4.23 ± 0.48) × 10^5/ml, high dose group: (3.19 ± 0.46) × 10^5/ml, $P<0.01$]. The variations mentioned above also had statistical difference between low and high dose group ($P<0.05$). **Conclusion** CD147/HAb18G monoclonal antibody reduces valid expression of MCT1 on cell membrane by interfering CD147 guiding interactions with MCT1, and restrains the drainage of intracellular lactic acid generated by glycolysis. It has suppression on tumor cell growth.

[Key words] monocarboxylate transporter-1; CD147; monoclonal antibody; glycolysis

Corresponding author: Wang Xiaoshu, E-mail: bigbearwxs@21cn.com

高级别胶质瘤的治疗一直是神经外科的棘手问题。该肿瘤生长旺盛,复发迅速,侵袭广泛,上述生物学特性的重要基础是其极强的糖酵解代谢供能能力。在我们的前期研究中发现单羧酸转运蛋白-1(monocarboxylate transporter-1,MCT1)在高级别胶质瘤明显上调表达,是肿瘤细胞糖酵解乳酸代谢的关键细胞膜转运蛋白;细胞表面抗原 CD147 同时随之上调协助 MCT1 表达和行使功能;两者的表达显著影响患者的预后[1]。本研究拟使用 CD147/HAb18G 基因工程单克隆抗体改变体外培养的人胶质瘤 U251 细胞膜上 MCT1 正常分布,影响其乳酸代谢,探讨其抑制胶质瘤细胞生长的效果。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

人脑胶质母细胞瘤细胞株 U251,由重庆医科大学超声研究所细胞实验室提供,常规复苏、传代和培养。CD147/HAb18G 基因工程单克隆抗体蒙第四军医大学细胞工程中心惠赠,MCT1 一抗(SANTA 公司),FITC 免疫荧光二抗和人源普通 IgG(中山公司),乳酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),国产 722 型分光光度计,奥林巴斯 CK40 相差显微镜和 CX40 荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U251 细胞株复苏,传代后,配制成浓度 1×10^5/ml的细胞悬液。采用单层附壁培养法,分为对照组、低剂量组和高剂量组,每组 4 个 6 孔培养板,放入细胞爬片。对照组每孔加入浓度为 10 mg/L 的人源普通 IgG 0.5 ml;低剂量组加入浓度 5 mg/L 的 CD147/HAb18G 单抗 0.5 ml;高剂量组加入浓度 10 mg/L 的单抗 0.5 ml。恒温细胞孵箱培养,第 3 天更换培养液和同剂量抗体,第 6 天取出每组 24 张爬片行免疫荧光染色。

1.2.2 免疫荧光染色 爬片固定后室温下孵育灭活内源性酶,0.1% Triton 液处理,PBS 液冲洗。按 MCT1 一抗(1∶100)和 FITC 荧光二抗(1∶100)说明书行免疫荧光染色。30% 甘油封片,荧光显微镜下观察计数。

1.2.3 细胞膜 MCT1 表达分布形式的观察 MCT1 阳性表达在 488 nm 波长激发下呈绿色荧光。荧光显微镜下观察 MCT1 各种表达分布形式,并对各表达形式分别在 400 倍镜下每张爬片随机计数 500 个细胞,记录其中呈相应表达形式的细胞个数,并计算出各组平均值以进行统计分析。

1.2.4 细胞内乳酸浓度测定 用乳酸标准品和分光光度计得出乳酸标准方程 $Y=0.023X+0.065$(Y 为光密度值,X 为乳酸浓度,$n=8$, $r=0.999\ 8$)。细胞培养方法同 1.2.1,第 6 天收获细胞,离心,细胞沉淀加入低渗盐溶液,并使其细胞浓度均为 1×10^6/ml,室温静置 1 h,超声波振荡 5 min 进一步破膜,再次离心,保留上清,以分光光度计检测 530 nm 处光密度值,代入乳酸标准方程中得出各样本乳酸浓度。

1.2.5 细胞生长曲线描绘 细胞培养方法同 1.2.1。培养 24 h 后,每组随机选取标本于相差显微镜下以血细胞计数法计数并取平均值,记录各组当前时点细胞浓度绘制细胞生长曲线。

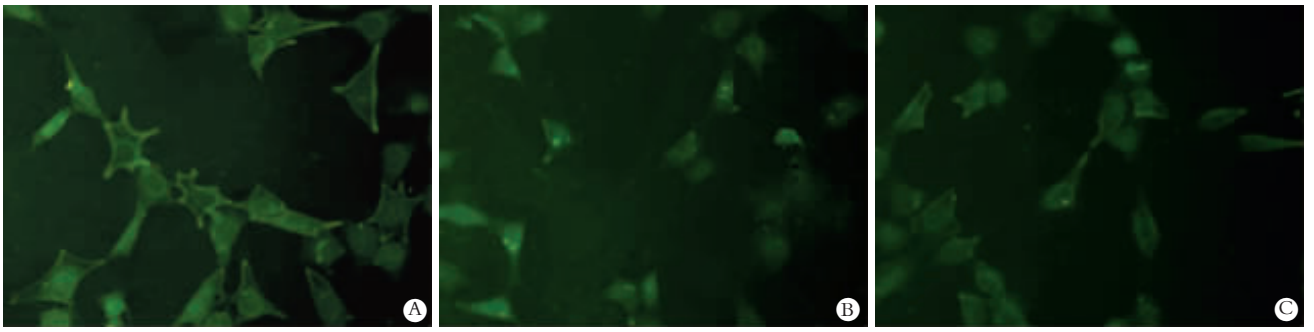
1.3 统计学分析

检验方差齐性后采用成组设计方差分析比较 3 组间数据差异,再用 q 检验作两组间两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$,统计软件为 SPSS 13.0。

2 结果

2.1 细胞膜 MCT1 表达分布形式的改变

观察所见 MCT1 表达分布形式有 3 种。胞膜完整表达:MCT1 荧光沿细胞膜呈完整的线状分布;胞质表达:MCT1 荧光在胞质内呈颗粒状或团块状表达;胞膜不完整表达:MCT1 荧光在胞膜上少量断续分布,胞质内可见少量荧光颗粒。经成组方差分析:以上各表达形式细胞数在 3 组间差异均有统计学意义($P<0.01$)。再经组间两两比较:各表达形式细胞数在对照组与低(高)剂量组间,低剂量组与高剂量组间差异亦有统计学意义($P<0.05$)。单抗作用后,MCT1 表达形式发生变化:对照组中 MCT1 多为胞膜完整表达,高剂量组中胞质表达最多见,低剂量组中则以胞膜不完整表达为主(表 1,图 1)。



A:对照组;B:高剂量组;C:低剂量组

图 1　荧光显微镜下观察 MCT1 在各组中表达分布形式的改变（×400）

表 1　3 组中 MCT1 的不同表达分布形式比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	胞膜完整表达	胞质表达	胞膜不完整表达
对照组	367.34 ± 6.92	12.08 ± 3.03	38.25 ± 3.86
低剂量组	161.92 ± 7.33[a]	70.83 ± 4.71[a]	212.83 ± 5.06[a]
高剂量组	54.58 ± 4.80[ab]	264.58 ± 6.14[ab]	88.50 ± 5.42[ab]

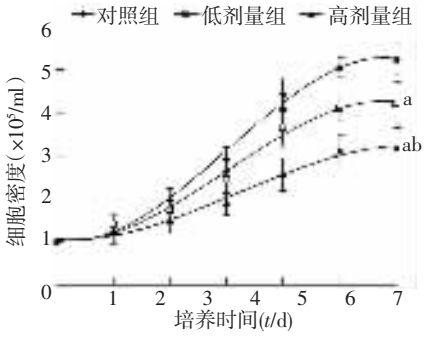
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与低剂量组间比较

2.2　细胞内乳酸浓度变化

随着 MCT1 表达形式的变化,低、高剂量组出现不同程度的细胞内乳酸堆积,细胞内乳酸浓度在对照组(0.222 ± 0.020) mmol/L,低剂量组(0.418 ± 0.015) mmol/L,高剂量组(0.713 ± 0.018) mmol/L。3 组细胞内乳酸浓度差异有统计学意义($P<0.01$)。经组间两两比较:对照组与低剂量组间,低剂量组与高剂量组间的乳酸浓度差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3　细胞生长曲线的改变

对照组生长快、细胞倍增时间短、最大密度高;高剂量组生长曲线低平;低剂量组介于两者之间(图 2)。3 组间细胞最大密度差异[对照组:(5.24 ± 0.37) × 10^5/ml,低级别组:(4.23 ± 0.48) × 10^5/ml,高级别组:(3.19 ± 0.46) × 10^5/ml]有统计学意义($P<0.01$),且对照组与低剂量组间,低剂量组与高剂量组间两两比较差异仍有统计学意义($P<0.05$)。结果显示细胞内乳酸堆积造成细胞生长抑制。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与低剂量组比较

图 2　3 组细胞培养不同时间的生长曲线

3　讨论

肿瘤细胞的能量代谢的主要特征是从有氧氧化转变为糖酵解[2],已证实胶质瘤细胞活跃的糖酵解代谢在为肿瘤细胞迅速供能同时,在细胞内产生大量以乳酸为主的代谢产物[3,4]。单羧酸转运蛋白(MCT)的主要功能即将这部分乳酸迅速转运至细胞外,以维持糖酵解持续进行和细胞内环境稳定。

MCT 的转运功能必须有 CD147 的参与和协助才能实现。对照组中,我们发现在没有 CD147/HAb18G 单克隆抗体作用的情况下,U251 细胞的 MCT1 主要呈胞膜完整表达,这也是肿瘤细胞 MCT1 的天然表达方式。在这种情况下,MCT1 依靠细胞膜上 CD147 的引导,进入胞膜正确表达位点,并以 2∶1的比例与 CD147 结合,将乳酸通道跨过细胞膜正确锚定并行使转运功能[5,6]。此种胞膜完整表达提示对照组中 MCT1 的胞膜表达位置正确,乳酸通道构建正常。

与以往直接下调 MCT1 的研究思路不同[7],在低剂量和高剂量组中,CD147/HAb18G 单克隆抗体并未改变 MCT1 的整体表达水平,3 组中 MCT1 的荧光表达总量无明显差别,呈阳性表达细胞数基本相同,但 MCT1 表达位置从细胞膜转向胞质。Kirk 等[8]发现只有在同时转染 CD147 和 MCT1 基因的细胞中,MCT1 方可在细胞膜上正常表达;而仅转染 MCT1 基因时,MCT1 仅能在胞质内表达。这种胞质内的 MCT1 在功能上是无效表达,无法跨细胞膜形成乳酸通道。我们通过使用单克隆抗体达到同样效果,统计学检验表明:高剂量组中 MCT1 胞质表达最多,难见正常胞膜表达;而低剂量组中以胞膜不完整表达为主,胞浆表达也比对照组更多见。这一效果是通过干预前述 CD147 和 MCT1 之间的特异性结合实现的,其结合相关功能域

主要位于 CD147 的穿膜区[9,10]。而 CD147/HAb18G 单克隆抗体的主要作用部位即包括其穿膜区相关结构,即 CD147 第 206～229 位的 24 个氨基酸形成的袢状结构域,单克隆抗体与 CD147 的结合改变了穿膜区构象,封闭了其对 MCT1 等细胞内源性物质产生作用的结构域,阻止了对胞质内 MCT1 的引导结合作用,使 MCT1 无法正确进入细胞膜表达。高剂量组中,足量的单抗已足以将绝大部分细胞表面 CD147 封闭,抑制效果完全,MCT1 进入胞膜而滞留于胞质内;低剂量组中,单抗剂量相对不足,不能完全封闭所有的 CD147,故其效果呈半抑制状态,胞膜不完整表达为对照组和高剂量组之间的过渡形式。低、高剂量组间不同的主要表达方式同时提示:MCT1 表达位置的改变对 CD147/HAb18G 单克隆抗体具有剂量依赖性。

MCT1 表达位置的改变使其在不同程度上失去了转运功能,细胞内乳酸的堆积造成两方面不良影响:乳酸负反馈抑制糖酵解,反应难以正向进行从而影响供能[10];细胞内环境紊乱,细胞内 pH 值(Phi)降低,严重影响肿瘤细胞的生长增值并使细胞酸化死亡[11]。我们的研究证实了上述观点:通过单抗干预 MCT1 表达位置后,3 组间细胞内乳酸含量存在明显差异,其从对照组到高剂量组逐渐上升,高剂量细胞内乳酸含量已达对照组的 3.2 倍,提示单抗介导的 MCT1 分布异常已足以引起细胞内乳酸堆积。同时 3 组间生长曲线也已出现差异,且随培养时间延长 3 组曲线分离趋势进一步增大,其生长增殖差异具有统计学意义,提示随着乳酸堆积,肿瘤细胞生长代谢出现紊乱和抑制,且以上效果随着单抗剂量增加而加大。Mathupala 等[12]曾通过 RNA 干涉直接下调 MCT1 表达水平使肿瘤细胞乳酸含量增加,乳酸外流减少 Phi 降低,增加细胞凋亡和坏死,与我们的结果可相互印证,而单抗技术相对应用简便、成本低廉,在我们的体外实验中取得了较满意的抑瘤效果。若能够在给药途径、血脑屏障通透性等问题上获得进展,在胶质瘤治疗的动物实验中有望取得进一步成果。更为重要的是:CD147/HAb18G 单抗在影响 MCT1 分布的同时,也可同时干预 CD147 其他功能,如抑制 CD147 介导的基质金属蛋白酶(MMP)分泌和肿瘤细胞趋化运动[13,14],从而从代谢、生长、侵袭等多方面达到抑瘤效果[15],具有深入研究探讨的价值。

参考文献:

[1] 王晓澍,游潮,孙晓川. MCT1、CD147 在人胶质瘤中的表达、相关性及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报,2010,32(9):985－988.

[2] Seyfried T N, Shelton L M. Cancer as a metabolic disease[J]. Nutr Metab (Lond), 2010, 7:7.

[3] Bouzier A K, Voisin P, Goodwin R, *et al*. Glucose and lactate metabolism in C6 glioma cells: evidence for the preferential utilization of lactate for cell oxidative metabolism[J]. Dev Neurosci, 1998, 20(4/5):331－338.

[4] Oliver L, Olivier C, Marhuenda F B, *et al*. Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy[J]. Curr Mol Pharmacol, 2009, 2(3):263－284.

[5] Wilson M C, Meredith D, Halestrap A P. Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5):3666－3672.

[6] Slomiany M G, Grass G D, Robertson A D, *et al*. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(4):1293－1301.

[7] 张桂芝,黄桂君,成党校,等. 抑制人肺腺癌细胞 MCT1 基因的表达对其增殖、凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2002,9(2):101－104.

[8] Kirk P, Wilson M C, Heddle C, *et al*. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression[J]. EMBO J, 2000, 19(15):3896－3904.

[9] Luo J, Teplyakov A, Obmolova G, *et al*. Structure of the EMMPRIN N-terminal domain 1: dimerization *via* beta-strand swapping[J]. Proteins, 2009, 77(4):1009－1014.

[10] Baba M, Inoue M, Itoh K, *et al*. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1):111－116.

[11] 成党校,钱桂生,黄桂君. 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.

[12] Mathupala S P, Parajuli P, Sloan A E. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an *in vitro* study[J]. Neurosurgery, 2004, 55(6):1410－1419.

[13] Sameshima T, Nabeshima K, Toole B P, *et al*. Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts[J]. Cancer Lett, 2000, 157(2):177－184.

[14] Kanekura T, Chen X. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers[J]. J Dermatol Sci, 2010, 57(3):149－154.

[15] Kennedy K M, Dewhirst M W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation[J]. Future Oncol, 2010, 6(1):127－148.

(收稿:2010-05-22 修回:2010-06-30)

(编辑 张 维)