论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1418-04

LAT1及CD98hc在胃癌细胞SGC-7901中的表达及LAT1对其细胞生物学行为的影响

史良会[1],张才全[1],黄士隋[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院胃肠外科[1];241001 安徽 芜湖,皖南医学院附属弋矶山医院胃肠外科[2])

[摘要] **目的** 观察L型氨基酸转运载体1(LAT1)与其异二聚体CD98hc在胃癌细胞SGC-7901中的表达及LAT1对细胞增殖与迁移能力的影响。**方法** 将胃癌细胞SGC-7901分为1、10、100 μmol/L BCH干预和空白对照共4组,RT-PCR、IF与Western blot检测胃癌细胞SGC-7901中LAT1与CD98hc mRNA、蛋白的表达。不同浓度的BCH作用于胃癌细胞SGC-7901 48 h后,新型四唑氮盐(MTS)比色法检测各组细胞生长情况,流式细胞仪检测各组细胞周期分布情况,Transwell细胞迁移小室检测各组细胞迁移能力的变化。**结果** LAT1及其异二聚体CD98hc在胃癌细胞SGC-7901中呈高表达。与空白对照组相比,随着BCH浓度的提高,胃癌细胞SGC-7901的增殖能力与迁移能力逐渐降低。细胞周期分析发现,BCH处理的胃癌细胞组S期细胞减少,而G_0/G_1期细胞增加($P<0.05$)。**结论** LAT1及其异二聚体CD98hc在SGC-7901细胞中有表达,LAT1可能促进SGC-7901细胞的增殖,加快细胞周期进程,增强SGC-7901细胞的迁移能力。

[关键词] 胃癌;L型氨基酸转运载体1;CD98hc;增殖;细胞周期;迁移
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Expression of L amino acid transporter 1 and its heterodimer CD98hc in gastric cancer SGC-7901 cells and effect of the former on biological behaviors of the cells

Shi Lianghui[1], Zhang Caiquan[1], Huang Shisui[2] ([1]Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Gastrointestinal Surgery, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui Province, 241000, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression of L amino acid transporter 1 (LAT1) and its heterodimer CD98hc in gastric cancer SGC-7901 cells and the effect of LAT1 on proliferation and migration of SGC-7901 cells. **Methods** Gastric cancer SGC-7901 cells were divided into 1 μmol/L BCH intervention group, 10 mol/L BCH intervention group, 100 μmol/L BCH intervention group and control group. Expression of LAT1 and CD98hc mRNA in gastric cancer SGC-7901 cells was detected by RT-PCR, IF and Western blotting, respectively. After the SGC-7901 cells were cultured with BCH at different concentrations for 48 h, their proliferation was detected by MTS colorimetry, distribution of cell cycle in different groups was assayed by flow cytometry, and cell migration in different groups was observed in Transwell chamber. **Results** LAT1 and CD98hc were highly expressed in SGC-7901 cells. The proliferation and migration level in SGC-7901 cells decreased with the increasing BCH concentration and were significantly lower in 3 BCH intervention groups than in control group. Cell cycle analysis showed that the number of SGC-7901 cells was lesser in S phase and greater in G_0/G_1 phase after BCH treatment ($P<0.05$). **Conclusion** LAT1 and CD98hc are expressed in SGC-7901 cells. LAT1 may promote the proliferation and migration of SGC-7901 cells and speed up their cell cycle process.

[**Key words**] gastric cancer; L amino acid transporter 1; CD98hc; proliferation; cell cycle; migration

Supported by the Key Project of Natural Scientific Research Foundation From Department of Education of Anhui Province (KJ2011A264). Corresponding author: Zhang Caiquan, Tel: 86-23-89011172, E-mail: zhangyu0323@21cn.com

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究基金重点项目(KJ2011A264)
[通信作者] 张才全,电话:(023)89011172,E-mail: zhangyu0323@21cn.com

恶性肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭过程得益于大量的营养物质的支持,氨基酸是其不可缺少的营养元素之一。氨基酸的跨膜运输是由氨基酸转运载体完成的。L 型氨基酸转运载体 1(L-type amino acid transporter-1,LAT1)为 L 型氨基酸转运载体中主要成员。LAT1 功能的发挥需要在细胞膜上与一种 2 型糖基化蛋白-4F2hc(又称 CD98hc)结合,形成异二聚体,将氨基酸由细胞外转运至细胞内。目前公认的是 LAT1 与 CD98hc 在恶性肿瘤中表达异常,为细胞增殖提供氨基酸[1-4]。但 LAT1 在胃肠道肿瘤中的研究尚处于起步阶段。本研究以胃癌细胞 SGC-7901 为模型,探讨 LAT1 与 CD98hc 在胃癌细胞中的表达及 LAT1 对细胞增殖与迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃腺癌细胞株 SGC-7901 与人卵巢癌 SKOV3 购于中科院上海细胞库,RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司,鼠抗人 LAT1 单克隆抗体购于日本 Cosmo 生物公司,兔抗人 CD98hc 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 生物公司,Transwell 小室购于 BD 公司,LAT1 拮抗剂 BCH 购于 Sigma 公司,Western blot 相关试剂购于碧云天公司。根据 GenBank 发布的 LAT1、CD98hc、GAPDH 编码区序列,采用 PrimerPre mier5.0 设计引物,Blast 同源性比较后,送于上海生工合成。LAT1,NM_003486,上游引物:5′-GCATGCGCAGAGGCCAGTTAA-3′,下游引物:5′-TATGGTCAGGAGTCCATCGGG-3′,产物片段长度为 619 bp。CD98hc,NM_002394,上游引物:5′-CCAGGTTCGGGACATAGAG-3′,下游引物:5′-TGGTAGAGTCGGAGAAGTTGAG-3′,产物片段长度为 326 bp;GAPDH,NM_002046.3,上游引物:5′-TGAAGGTCGGAGTCAACGG-3′,下游引物:5′-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3′,产物片段长度为 258 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 胃癌细胞与人卵巢癌 SKOV3 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,调节细胞浓度备用。

1.2.2 免疫荧光检测 将无菌盖玻片铺于 24 孔细胞培养板中,取对数生长期的细胞接种至 24 孔细胞培养板,贴壁后,取出玻片,按免疫荧光常规步骤操作。一抗以 1∶600 稀释,以 PBS 代替一抗为阴性对照,卵巢癌细胞 SKOV3 结果为阳性对照。结果采用激光共聚焦显微镜扫描成像。

1.2.3 RT-PCR 检测 按照细胞及组织总 RNA 试剂盒提取步骤提取总 RNA,随后进行两步法实施 RT-PCR。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,退火温度 58.4 ℃(LAT1)、56 ℃(CD98)、57.5 ℃(内参 GAPDH)30 s,延伸温度 72 ℃ 42 s,进行 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。所得产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像仪扫描分析。用 Bio-Rad 图像分析软件对条带灰度值进行半定量分析。

1.2.4 Western blot 检测 将生长至 90% 以上的细胞经预冷 PSB 洗涤,按照总蛋白提取试剂盒步骤提取。4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,采用 BCA 测定蛋白浓度后,实施 SDS-PAGE,将凝胶半干转于 PVDF 膜,10% TBST 室温封闭 1 ~ 2 h,一抗 4 ℃孵育过夜,加入羊抗兔二抗,室温孵育 1 h,ECL 显色,拍照。以 GAPDH 为内参,用 Bio-Rad 图像分析软件对条带灰度值进行定量分析。

1.2.5 MTS 检测 取对数生长期细胞,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基调整细胞为 2.5×10^4/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl 细胞悬液,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,然后分别加入终浓度为 1、10、100 μmol/L 的 BCH,每个浓度设 5 个平行孔,并同时设置空白对照组,48 h 后每孔加入 MTS 液 10 μl,继续培养 48 h,用全自动酶标仪于 492 nm 波长检测各孔光密度值[D(492)],空白对照调零并计算增殖率或抑制率,实验重复 3 次。抑制率 = [1 − 药物组 D(492)值/对照组 D(492)值] ×100%。以抑制率为纵轴,以浓度为横轴绘图。

1.2.6 流式细胞仪检测 取对数生长期细胞,调整细胞数为 1×10^5/孔,分别加入终浓度为 1、10、100 μmol/L 的 BCH,以不加 BCH 的细胞为空白对照组。48 h 后收集细胞,4 ℃、1 000 r/min 离心 10 min,PBS 清洗 2 次,每次 10 min,随后用 70% 冰乙醇固定,4 ℃过夜,离心后去乙醇,PBS 清洗 2 次,每样品管中加 1 ml 碘化丙啶(PI)染液,4 ℃避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期变化,实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 细胞迁移实验 Transwell 小室加入 50 μl 无血清 1640 培养基置于 37 ℃孵育 30 min。取对数生长期的细胞,用含 BSA 的无血清培养基重悬,调整细胞数为 1×10^5/ml,小室上层加 100 μl 细胞悬液,并加入终浓度为 1、10、100 μmol/L 的 BCH;下室为含胎牛血清 10% 的 1640 培养基。37 ℃、5% CO_2 孵育 24 h,取出聚碳酸酯膜,擦净膜上的未穿过的细胞,经甲醇固定 15 min、常规 HE 染色,随机于 200 倍光镜下取上、下、左、右、中心 5 个视野,计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数,取每个视野的平均数表示肿瘤细胞的迁移能力。

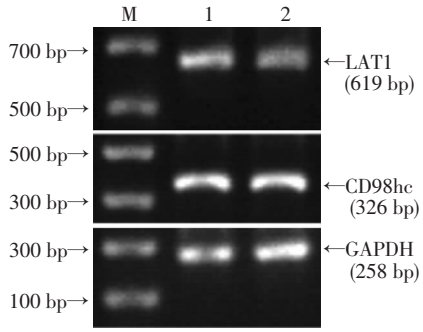
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件,对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 LAT1 与 CD98hc mRNA 在 SGC-7901 中的表达

在 619 bp 和 326 bp 处,胃癌细胞 SGC-7901 与卵巢癌细胞 SKOV3 中可见清楚条带(图 1),提示 LAT1 与 CD98hc mRNA 在胃癌细胞 SGC-7901 中表达,卵巢癌细胞 SKOV3 结果为阳性对照。



M:标准;1:卵巢癌细胞SKOV3;2:胃癌细胞SGC-7901

图1 RT-PCR检测胃癌细胞SGC-7901与卵巢癌细胞SKOV3中LAT1和CD98hc mRNA表达

2.2 免疫荧光定性检测LAT1、CD98hc蛋白在SGC-7901细胞中表达

LAT1、CD98hc明显表达于胃癌SGC-7901细胞及阳性对照的卵巢癌SKOV3细胞膜及细胞质。FITC标记,激光共聚焦激发出绿色荧光,红色为PI染核(图2)。阴性对照未见阳性表达。

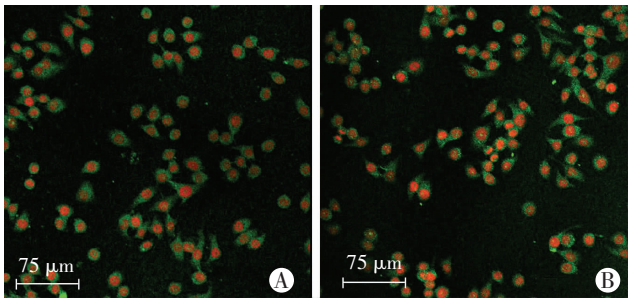
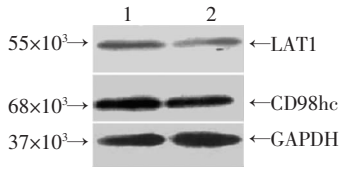


图2 免疫荧光检测LAT1(A)及CD98hc(B)在SGC-7901细胞中的表达

2.3 Western blot检测LAT1、CD98hc蛋白在SGC-7901细胞中表达

在人胃癌细胞SGC-7901中,可见LAT1及CD98hc的表达,卵巢癌细胞SKOV3结果为阳性对照(图3)。



1:卵巢癌细胞SKOV3;2:胃癌细胞SGC-7901

图3 Western blot检测卵巢癌细胞SKOV3与胃癌细胞SGC-7901中LAT1和CD98hc蛋白表达

2.4 MTS检测不同浓度的BCH对细胞增殖的影响

1、10、100 μmol/L BCH作用SGC-7901细胞48 h后,细胞的抑制率分别为8.3%、17.5%、20.3%,可见10 μmol/L BCH可显著抑制细胞的增长率($P<0.01$)。

2.5 流式细胞仪检测不同浓度的BCH对SGC-7901细胞周期的影响

1、10、100 μmol/L BCH处理的SGC-7901细胞G_0/G_1期细胞比例明显高于空白对照组($P<0.05$),100 μmol/L BCH作用的SGC-7901细胞G_0/G_1期细胞比例达最高。而1、10、100 μmol/L BCH处理的SGC-7901细胞的S期细胞比例明显低于空白对照组($P<0.05$),100 μmol/L BCH作用的SGC-7901细胞的S期细胞比例达最少(表1)。

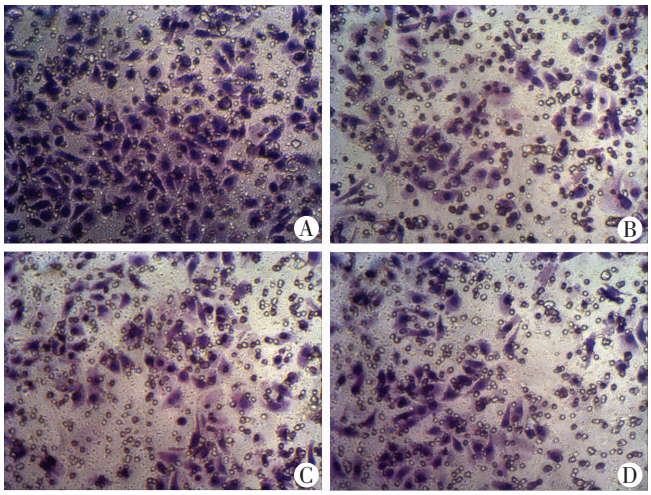
表1 不同浓度BCH对细胞周期变化的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照组	44.95±3.07	43.67±2.92	11.38±2.81
BCH 1 μmol/L组	54.31±1.38[a]	39.47±2.07[a]	6.22±1.93[a]
10 μmol/L组	68.47±1.37[a]	24.54±2.16[a]	5.99±2.09[a]
100 μmol/L组	71.19±2.25[a]	24.02±1.11[a]	4.61±1.78[a]

a: $P<0.01$,与空白对照组比较

2.6 Transwell小室检测不同浓度的BCH对SGC-7901细胞迁移能力的影响

随着BCH浓度的增加,其对细胞迁移能力的抑制作用逐渐加强。1、10、100 μmol/L BCH组与空白对照组比较,200倍显微镜视野下的穿膜细胞数量分别为(67.2±5.6)、(55.6±4.2)、(49.6±5.1)个和(92.4±3.8)个($P<0.01$,图4)。



A:空白对照组;B:1 μmol/L BCH组;C:10 μmol/L BCH组;D:100 μmol/L BCH组

图4 不同浓度LAT1拮抗剂BCH对细胞迁移能力的影响 (×200)

3 讨论

近些年来,胃癌发生的分子生物学机制研究已取得了巨大进展,包括胃癌发生过程中致病分子的陆续发现和认定[5-6]。然而在肿瘤研究的另一领域,癌细胞营养代谢活动的研究甚少,也正成为近年来肿瘤研究的新热点。氨基酸的跨膜运输,依赖于氨基酸转运

载体(氨基酸跨膜转运蛋白)的介导。LAT1是L型氨基酸转运载体中的重要成员,主要功能是提供营养,负责转运大的、支链的、芳香族的和中性氨基酸,包括一些必需氨基酸如亮氨酸。人类的LAT1由SLC7A5基因编码,有12个跨膜单元,其基因定位于人的16号染色体。在正常组织中,LAT1的表达主要在胎儿肝脏、骨髓、脑、胎盘及睾丸等,其表达水平根据组织部位及细胞类型的不同而不同[7]。在很多恶性肿瘤中LAT1亦异常高表达,如脑胶质瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌等。我们近期研究结果也表明,在胃癌组织中LAT1也呈高表达[8],与Ichinoe等[9]的结果一致。但LAT1功能的发挥依赖于与4F2hc(又称为CD98hc)形成的异二聚体。在鼠纤维细胞系中已研究证实,L系统活性的提高需要LAT1与CD98hc的共表达。本研究发现LAT1和CD98hc mRNA与蛋白在胃癌SGC-7901细胞中也均呈高表达。因LAT1在人卵巢癌细胞SKOV3中呈过表达[10],故本研究中将其设为阳性对照。本研究中LAT1表达水平与卵巢癌细胞SKOV3相当。LAT1及其异二聚体CD98hc在胃癌细胞中均大量表达,说明可能是为这些细胞快速增殖提供所需的必需氨基酸。

2-氨基二环(2,2)庚二羧酸(2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid, BCH)是LAT1的特异性抑制剂[11]。Nawashiro等[12]研究BCH对胶质瘤细胞生物学特性的影响,发现BCH抑制了体内与体外的神经胶质瘤生长。本实验通过不同浓度的LAT1拮抗剂BCH作用于胃癌细胞SGC-7901,发现BCH对胃癌细胞的增殖与迁移能力有抑制作用。同时发现在低浓度范围内(BCH < 10 μmol/L),其对胃癌细胞的增殖与迁移能力的抑制作用随着浓度的提高逐渐增强;高浓度范围内(BCH > 10 μmol/L),BCH的抑制效果增强却不很明显。说明BCH特异性抑制肿瘤细胞中的LAT1活性而使其缺乏必需氨基酸,可以抑制肿瘤细胞的生长,同时BCH的抑制效果具有浓度依赖性。本研究结果也显示,当LAT1的表达被其特异性抑制剂BCH下调后,G_0/G_1期细胞比例明显增高,并随着BCH浓度的增加而增加,而S期细胞比例明显减少,说明BCH将细胞阻滞于G_0/G_1期进入S期,达到抑制细胞增殖效果。BCH如何影响胃癌细胞周期及其引起何种周期蛋白的变化,值得进一步研究。目前关于LAT1在恶性肿瘤中的研究尚处于起步阶段,在胃癌中的研究甚少。本实验为研究LAT1与信号传导机制奠定了基础,同时为胃癌的基因治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Kaira K, Oriuchi N, Imai H, *et al*. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is frequently expressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas[J]. J Surg Oncol, 2009, 99(7): 433-438.

[2] Xia Luo, Coon J S 5th, Su E, *et al*. LAT1 regulates growth of uterine leiomyoma smooth muscle cells[J]. Reprod Sci, 2010, 17(9): 791-797.

[3] Takeuchi K, Ogata S, Nakanishi K, *et al*. LAT1 expression in non-small-cell lung carcinomas: analyses by semiquantitative reverse transcription-PCR (237 cases) and immunohistochemisty (295 cases)[J]. Lung Cancer, 2010, 68(1): 58-65.

[4] Imai H, Kaira K, Oriuchi N, *et al*. L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage Ⅰ non-small cell lung cancer[J]. Histopathology, 2009, 54(7): 804-813.

[5] 史良会, 张才全. γ-氨基丁酸及其A型受体在胃癌SGC-7901细胞的表达及对细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(20): 2132-2135.

[6] 黄镇, 王子卫, 张能, 等. KLF4对胃癌SGC-7901细胞株体外生长增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(8): 822-825.

[7] Asano S, Kameyama M, Oura A, *et al*. L-type amino acid transporter-1 expressed in human astrocytomas, U343MGa[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(3): 415-422.

[8] 史良会, 张才全, 彭小壮. LAT1、CD98hc在胃癌组织中表达与临床病理特征的关系[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(12): 1361-1366.

[9] Ichinoe M, Mikami T, Yoshida T, *et al*. High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions[J]. Pathol Int, 2011, 61(5): 281-289.

[10] Fan X, Ross D D, Arakawa H, *et al*. Impact of system L amino acid transporter 1 (LAT1) on proliferation of human ovarian cancer cells: a possible target for combination therapy with anti-proliferative aminopeptidase inhibitors [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(6): 811-818.

[11] Ishizuka Y, Kakiya N, Nawa H, *et al*. Leucine induces phosphorylation and activation of p70S6K in cortical neurons *via* the system L amino acid transporter[J]. J Neurochem, 2008, 106(2): 934-942.

[12] Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, *et al*. L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors [J]. Int J Cancer, 2006, 119(3): 484-492.

(**收稿**:2012-01-01;**修回**:2012-02-14)

(编辑 龙 亮)