DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.004
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
128 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0128-03

单羧酸转运蛋白反义基因转染人肺腺癌细胞对其生物学特性的影响

张桂芝,黄桂君,郭先健,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 研究单羧酸转运蛋白基因第一亚型(MCT1)反义表达载体转染肿瘤细胞对其细胞内pH(pHi)调节、乳酸转运及生长性质的影响。方法 通过电穿孔法将单羧酸转运蛋白MCT1基因反义表达重组子pLXSN-MCT1转染于肺腺癌细胞系A549中,经G418筛选转染细胞阳性克隆。用PCR方法鉴定MCT1反义表达重组载体在基因组的转染整合;以分光光度法测定pHi及乳酸含量变化,并以细胞生长曲线研究细胞的生长情况。结果 与未转染的A549细胞比较,转染MCT1反义表达重组载体的细胞pHi降低、乳酸显著升高($P<0.001$);且细胞的生长受到明显抑制。结论 单羧酸转运蛋白MCT1基因在肿瘤细胞pHi调节、乳酸转运及细胞的生长中起着重要的调节作用。

关键词:单羧酸转运蛋白基因;基因转染;pHi;乳酸;肺肿瘤
中图法分类号:R394.2;R734.2 文献标识码:A

Effect of antisense transfection of monocarboxylate transporter on cell biological characteristics in human lung adenocarcinoma cells

ZHANG Gui-zhi, HUANG Gui-jun, GUO Xian-jian, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of transfecting anti-sense expression vector of the first subtype of the monocarboxylate transporter (MCT1) gene into human lung adenocarcinoma cells on intracellular pH (pHi) regulation, lactate transportation and cell growth. Methods MCT1 antisense gene recombinant vector pLXSN-MCT1 was introduced into human lung cancer cells A549 with electroporation. The cell colonies resistant to G418 were selected. Positive clones were examined by PCR to confirm the integration of genomic A549 DNA and antisene MCT1 gene. The changes of pHi and lactate transportation were detected with spectrophotometry. Cell growth was studied with cell growth curve. Results pHi and lactate transport were remarkably decreased in the transfected cells, and the cell growth was inhibited compared with the cells without transfection ($P<0.001$). Conclusion MCT1 gene may play an important role in pHi regulation, lactate transport and cell growth in lung tumor cells.

Key words: monocarboxylate transporter gene; transfecting; pHi; lactate; lung neoplasm

糖酵解是实体肿瘤组织获取能量的一种主要方式,它产生大量的乳酸、丙酮酸等酸性产物,势必造成细胞内酸化,使细胞生长受到抑制。但实验证明肿瘤组织细胞内pH(pHi)值非酸性,反而高于细胞外[1]。目前研究提示,肿瘤细胞膜上除有Na^+/H^+交换离子泵起细胞内排酸保碱作用外,跨膜的单羧酸转运泵(Monocarboxylate transporter, MCT)亦可能在细胞内外的乳酸转运及pHi值调节方面具有重要作用[2]。1994年,Garcia[3]首先克隆出了人的MCT基因,将其命名为MCT1,此后又有该家族的其它基因先后被克隆出来,分别命名为MCT2、MCT3等[4]。而MCT1几乎在肿瘤组织中均有表达;因此,为研究其在肿瘤细胞中的功能意义,本实验应用反义技术抑制该基因在肿瘤细胞的表达,进而鉴定肿瘤细胞MCT1基因表达对肿瘤细胞内乳酸转运、酸碱调节及细胞生长的影响。

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(1970—),女,江苏省丰县人,博士研究生,主要从事肿瘤基因诊断治疗方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-11-06;修回日期:2001-01-18

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺腺癌细胞株A549按常规方法进行[5]。

1.2 反义表达载体pLXSN-MCT1的扩增及提取

该重组载体由我所构建和保存[6],参照《分子克隆实验指南》[7]中的质粒大量提取章节进行。

1.3 重组质粒的靶细胞转染及阳性克隆的筛选

实验组转染pLXSN-MCT1,空载体对照组转染pLXSN,A549细胞作为空白对照。电穿孔法[8]进行基因转染,G418(500 μg/ml,GIBCO公司)进行抗性筛选。3~4周后见抗性细胞集落形成,挑选细胞阳性克隆,用含200 μg/ml G418的培养液继续扩大培养。

1.4 抗性细胞克隆的PCR鉴定

应用pLXSN引物进行PCR反应,鉴定转染pLXSN-MCT1重组载体是否整合到细胞基因组。pLXSN引物:

上游引物:5′-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3′

下游引物:5′-GAGCCTGGGGACTTTCCACACCC-3′

该上游引物在pLXSN的第1572~1594位点,下游引物在第1711~1689位点。预期扩增长度为779 bp(目的片段640 bp,pLXSN 139 bp)。引物由上海生物工程公司合成。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PCR 操作步骤: 提取细胞基因组 DNA, 取 1 μg DNA 进行 PCR 扩增。条件: 95℃预变性 3 min, 94℃变性 45 s, 59℃退火 55 s, 72℃延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 最后延伸 72℃, 10 min。反应完毕后, 取 PCR 产物 10 μl 电泳, 通过与 Marker(λDNA/ *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)进行比较, 判断 PCR 扩增片段的大小。

1.5　细胞内 pHi、乳酸的测定及生长曲线的制作

1.5.1　pHi 的测定　　参照文献[9]方法进行。

1.5.1.1　细胞传代　　将 A549、A549-MCT1 和 A549-pLXSN 细胞, 制成单细胞悬液, 密度 1× 10^5/ml。然后向装有 3 块大小相同的玻片的培养皿内加入 2 ml 细胞悬液, 5% CO_2, 37 ℃条件下培养。

1.5.1.2　建立细胞 pHi 与细胞内 BCECF 荧光强度关系的标准曲线及回归方程　　细胞单层长满玻片后, 取出含 A549 细胞的小培养皿 5 个(每个培养皿内有 3 块小玻片), 用 NaCl 缓冲液(pH 7.4)漂洗 3 次, 然后加入 2 ml NaCl 缓冲液, 及 pH 敏感的荧光染料 BCECF-AM(终浓度为 1.0 μg/ ml, Sigma 公司), 37 ℃避光温育 30 min。NaCl 缓冲液漂洗 3 次。然后向培养皿内依次加入 pH 为 6.6、6.8、7.0、7.2、7.4 的 KCl 缓冲液(含 Nigericin 1 μg/ml, Sigma 公司)2 ml, 37℃温育 10 min 后立即用 LS-50B 荧光分光光度计(美国 PE 公司)检测。分别测定激发光波长为 490 nm 和 440 nm, 发射波长为 530 nm 时的荧光强度。

由于 Nigericin 使细胞内外 pH 保持一致, 而荧光在激发光波长为 495 nm 时与 pHi 成线性关系, 在 440 nm 时与 pHi 无关。因此用直线回归能求出细胞 pHi 与荧光强度比值(Fluorescent intensity ratio, FIR= 495 nm/ 440 nm)的校正曲线及回归方程。以下实验 pHi 的计算均以该回归方程为依据。

1.5.1.3　细胞 pHi 的测定　　传代后 12 h 各取出 3 种细胞的小培养皿, NaCl 缓冲液漂洗 3 次, 然后同上加入 2 ml NaCl 缓冲液及 BCECF-AM, 37℃避光温育 30 min 后立即上机检测 495 nm/ 440 nm(FIR)比值(仪器条件同前)。24、48 h 后同样测定 495 nm/ 440 nm 比值, 带入回归方程, 求得相应的的 pHi 值。

1.5.2　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× 10^6/ml, 室温静置 1 h, 留上清。按操作说明加样, 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。

1.5.3　生长曲线制作　　按司徒镇强等[5]方法进行。

1.5.4　统计学处理　　所得资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　抗性克隆的鉴定

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。

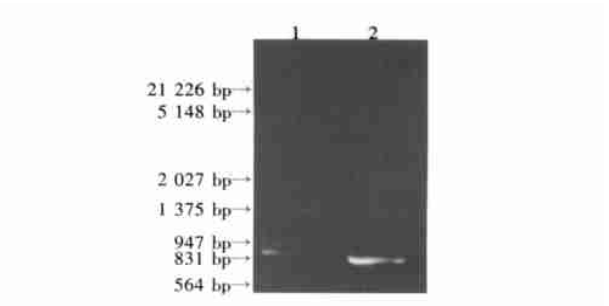


图 1　抗性克隆的鉴定

Fig 1　The identification of resistant clone

1: λDNA/ *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ Marker; 2: MCT1-pLXSN

2.2　细胞 pHi 回归方程及 pHi 测定结果

在不同的 pH 设定点下(pHi 6.6、6.8、7.0、7.2、7.4), 细胞内 490 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< 0.001)。pHi 测定结果见表 1, A549-MCT1 转染组细胞随着时间的增加, 胞内 FIR 减少, 即 pHi 降低。结果表明 A549-MCT1 转染组细胞 pHi 明显降低, 而 A549 与 A549-pLXSN 变化不显著。

表 1　A549、A549-pLXSN、A549-MCT1 细胞不同时相点的细胞 pHi

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

	A549			A549-pLXSN			A549-MCT1		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
FIR(n= 3)	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
pHi	7.12	7.11	7.10	7.10	7.04	6.95	7.05	6.89	6.76

2.3　乳酸测定结果

从 A549、A549-pLXSN、A549-MCT1 细胞乳酸测定结果可以看出, 随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 2。

2.4　重组体 pLXSN-MCT1 对肺癌细胞 A549 生长的影响

用细胞计数法测定转染细胞的生长曲线, 结果见表 3、图 2。结果提示, pLXSN-MCT1 转染的细胞比未转染及转染空载体的 A549 细胞生长明显受抑。

表 2　A549、A549-pLXSN、A549-MCT1 细胞的乳酸测定结果(C_B/ mmol·L^{-1}, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　The result of lactate determination in A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 cells(C_B/ mmol·L^{-1}, $\bar{x} \pm s$)

Cell	1st day	4th day	7th day	10th 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
A549-MCT1	0.4536±0.02 *	0.4878±0.03 *	0.5413±0.02 *	0.5726±0.04 *

*: P< 0.001 *vs* A549

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 转染细胞生长曲线的特性

Tab 3 The character of growth curve of transfected cells

	A549	A549-pLXSN	A549-MCT1
Doubling time(t/ d)	3.36	3.64	5.18
Maximal density time (t/ d)	6	6	6
Saturation density($\times 10^4$/ ml)	54.86±3.41	49.77±0.97	35.48±0.38
Maximal proliferation multiple	3.45	3.15	2.32

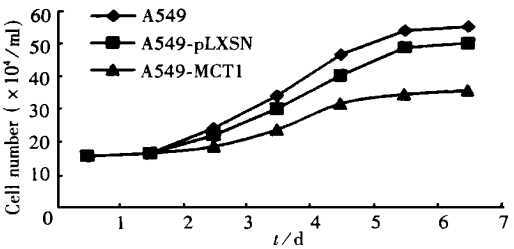


图 2 A549、A549-pLXSN、A549-MCT1 细胞的生长曲线

Fig 2 The growth curve of A549, A549-pLXSN, A549-MCT1 cells

3 讨论

MCT1 是一种跨膜蛋白, 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。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, 即当细胞内的乳酸增高时, 可携带等当量的 H^+ 向胞外转运, 从而消除糖酵解的终产物及 H^+。因此认为此转运蛋白在参与乳酸循环、能量代谢及细胞内 pH 调节方面起着重要作用。在本实验中, 我们测定了转染细胞 pHi 及其乳酸含量的变化, 发现 A549-MCT1 细胞内乳酸含量与 A549、A549-pLXSN 相比明显增加, 而 pHi 明显降低。而前两者之间变化无显著性。表明 MCT1 反义表达重组载体进入细胞抑制了 MCT1 基因的表达后, 引起 MCT1 转运功能逐渐减弱。而细胞生长曲线的研究发现, A549、A549-pLXSN 和 A549-MCT1 细胞的生长曲线呈"S"型, 从生长曲线看出 A549-MCT1 细胞的生长速率明显减弱, 倍增时间延长, 最大增殖倍数减少, 最大密度降低。这可能是由于转染细胞乳酸堆积, 细胞 pHi 降低导致细胞内环境紊乱, 能量代谢受乳酸反馈抑制而影响肿瘤细胞的生长性质。以往对 MCT1 的研究仅限于正常的组织细胞乳酸循环 (Cori 循环), 本实验首次研究了 MCT1 在肿瘤细胞中新的功能意义。结果提示, 单羧酸转运蛋白 MCT1 基因在肿瘤细胞 pHi 调节、乳酸转运及细胞的生长中起着重要的调节作用, 阻抑或封闭 MCT1 基因的表达可以抑制肿瘤细胞的恶性生长。

参考文献:

[1] Kraus M, Wolf B. Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis[J]. Tumour Biol, 1996, 17(3): 133—154.

[2] Pedersen S F, Kramhoft B, Jorgensen N K, *et al*. Shrinkage-induced activation of the Na^+/H^+ exchanger in Ehrlich ascites tumor cells: mechanisms involved in the activation and a role for the exchanger in cells volume regulation[J]. J Membr Biol, 1996, 149(2): 141—159.

[3] Garcia K G, Xu L, Luna J, *et al*. cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2—p12[J]. Genomics, 1994, 23(2): 500—503.

[4] Price N T, Jackson V N, Halestrap A P, *et al*. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past[J]. Biochem J, 1998, 329(Pt 2): 321—328.

[5] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社西安分公司, 1996. 127.

[6] 成党校, 黄桂君, 钱桂生. 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.

[7] 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M], 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992. 24.

[8] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 156.

[9] Boyer M J, Barnard D W, Tannock I F, *et al*. Regulation of intracellular pH in subpopulation of cells derived from spheroids and solid tumors[J]. Br J Cancer, 1993, 68(5): 890—700.

(编辑 潘式文)

(上接 127 页)

来针灸室就诊, 查: 面色㿠白, 神气怯弱, 少气、舌淡红、脉细弱、腹部膨隆, 腹围 85 cm, 子宫脐上 1 横指。采用针灸治疗 1 次后患者小便能自行解出, 腹围减少至 83.5 cm, 子宫降到脐下 1 横指, 患者自感腹胀减轻, 少气症状好转, 痊愈出院。

3 讨论

产后尿潴留的原因多由产后失血多, 产程长, 子宫压迫膀胱时间过久, 膀胱收缩功能受影响, 无力排空小便。尿潴留于膀胱过久, 充盈的膀胱又防碍子宫复位。尿潴留中医称为癃闭[3], 主要与肺、脾、肾三脏有关, 产后尿潴留气血均亏、肾阳虚惫、命门火衰, 可致膀胱气化不利, 水液内停而溺不得去。因此采用取脾经、任脉、膀胱经腧穴, 辅以足阳明胃经腧穴、针刺后用艾灸, 可达到补益气血、调理任脉、肾气充足而收通尿闭之功。

通过针灸治疗不仅可以治疗尿潴留, 对子宫恢复亦有好处, 使患者子宫尽快复位, 防止因子宫收缩差而大出血, 可以使患者不再导尿、防止尿路感染, 并可使患者腹部恢复健美。

关键词: 针灸; 产后尿潴留

中图法分类号: R694.550.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 骆 方. 针刺配合局部温灸治疗尿潴留 31 例疗效观察[J]. 中国针灸, 1996, 16(9): 23—24.

[2] 江 泓. 耳穴贴压配合针刺治疗子宫复旧不全 120 例[J]. 中国针灸, 1996, 16(7): 19—20.

[3] 陈 磊. 辩证施针治疗非阻塞性麻痹性产后尿潴留[J]. 中国针灸, 1999, 19(12): 740—741.

(编辑 潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net