DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.001
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0407-03

论著

人肺腺癌细胞单羧酸转运泵基因的克隆及基因序列分析

成党校,钱桂生,黄桂君 (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 克隆人肺腺癌细胞单羧酸转运泵基因编码序列并对此序列作同源性分析。方法 通过RT-PCR方法克隆人肺腺癌A549细胞单羧酸转运泵基因cDNA编码序列,应用PCR、四色荧光、双脱氧终止法测序;通过Genebank数据库应用分析软件对克隆基因序列进行同源性分析。结果 应用RT-PCR方法克隆出人肺癌细胞的单羧酸转运泵基因;肺癌细胞此基因编码序列与人心肌细胞单羧酸转运泵基因第一亚型的cDNA编码序列具有高度同源性。结论 单羟酸转运泵基因可能为一保守的基因序列。

关键词:单羧酸转运泵基因;RT-PCR;DNA测序;肺肿瘤
中图法分类号:R394—3;R734.2 文献标识码:A

Monocarboxylate transporter gene cloning and sequence analyzing in human pulmonary adenocarcinoma

CHENG Dang-xiao, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To clone the monocarboxylate transporter gene and analyze the homologous features of its sequence. Methods The code sequence of monocarboxylate transpoter cDNA of human adenocarcinoma A549 cells was cloned with RT-PCR and sequenced with PCR, 4 fluorescent color test and Sanger's method. The homologous features of the sequence was analyzed with the Genebank database. Results The monocarboxylate transporter gene of human pulmonary adenocarcinoma cells was cloned and the code sequence of the gene is highly homologous with the code region of human cardiac cells MCTI. Conclusion The monocarboxylate transporter gene might be a conservatioe sequence.

Key words: monocarboxylate transporter gene; RT-PCR; DNA sequencing; adenocarcinoma

90年代初,人们首先发现心肌细胞膜上存在有能够双向转运乳酸、丙酮酸等单羧酸根的离子通道,将其命名为单羧酸泵(Monocarboxylate transporter, MCT)。目前已克隆发现了MCT基因家族的7个亚型,并分别并命名为MCT_1~MCT_6及XPCT[1~3]。MCT的主要功能是介导乳酸及丙酮酸的跨膜转运,并携带等当量的H^+同向跨膜转运[4],对组织细胞的能量代谢及细胞内pH值调节具有重要作用。肿瘤细胞糖酵解的增强势必造成肿瘤细胞内乳酸大量堆积并引起细胞内酸化,从而抑制肿瘤细胞的增殖生长。然而,大量实验证明肿瘤细胞内pH值并未降低[5],推测单羧酸泵可能起了调节作用。因此,有必要对肿瘤细胞中此离子泵的基因结构与功能做进一步深入研究。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

A549肺癌细胞株为我所保存细胞株;1640培养基及小牛血清为Hyclone产品;RNA提取试剂Tripue为德国宝灵曼产品;RT及PCR试剂盒分别购自德国宝灵曼及美国Promega公司;琼脂糖由上海生物工程公司提供。

1.2 细胞培养及总RNA提取

A549细胞的培养按常规方法进行。取对数生长期A549细胞,用0.25%的胰蛋白酶消化5 min后吸管吹打瓶底使细胞悬

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900067)

作者简介:成党校(1965—),男,陕西省西安市人,博士,主治医师,讲师,曾经从事载药磁性微球对肿瘤靶向性治疗方面的研究。现主要从事单羧酸转运泵在肿瘤细胞pH及代谢中的作用方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320

收稿日期:1999-11-30;修回日期:2000-03-10

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

浮，1 000 r/min 离心 10 min 后，弃上清，细胞沉淀加入 1 ml Tripue 用吸管反复吹打使细胞溶解呈粘液状后移入灭 RNA 酶的 1.5 ml Ependof 管中。RNA 提取方法按照 Tripue 试剂盒说明书中的操作步骤进行。RNA 沉淀用 30 μl 灭 RNA 酶三蒸水稀释，紫外分光光度仪下测定光密度 D_{260}、D_{280} 值并进行 RNA 纯度及含量计算，根据所测 RNA 含量将 RNA 进一步用灭 RNA 酶三蒸水稀释至 2 μg/μl。

1.3 RT-PCR

逆转录步骤参照宝灵曼试剂盒说明书进行。取总 RNA 1 μl(2 μg/μl)、$Oligo(dT)_{15}$ 1 μl、RNA 酶抑制剂 20 u(0.5 μl)加灭 RNA 酶三蒸水至 10 μl 于 250 μl 的 PCR 管内。PCR 仪中 65°C、10 min 后，冰上冷却至 0°C，分别加入 5 x 缓冲液 4 μl、100 mmol/L DTT 2 μl、10 mmol/L dNTP 2 μl、Expand 酶(50 u/μl) 1 μl、最后用灭 RNA 酶三蒸水补足体积至 20 μl。PCR 仪中 42°C 1 h、65°C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳证明逆转录产物。PCR 引物根据 Genebank 中人心肌细胞 MCT1 cDNA 序列进行设计，应用我所引物设计软件设计的上下游引物分别如下：上游引物(518～540 bp)：5′TGGGTATCTTTGGATGGAGAGG 3′；下游引物(1 448～1 426 bp)：5′TGGTAACTTCATTTGGCTTTCCC 3′。PCR 操作步骤按照 Promga 试剂盒操作说明进行。PCR 反应条件如下：95°C 预变性 3 min；94°C、50 s，57°C、55 s，72°C、1.5 min，35 个循环；72°C、10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳并与 Marker(λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)比较判断 PCR 产物大小。

1.4 PCR 产物回收与测序

采用“V”型槽电泳仪纯化回收 PCR 产物。PCR 产物先于 1% 琼脂糖凝胶上电泳后，长波紫外灯下切下目的片段，将目的片段凝胶条置入“V”电泳槽的加样台上。“V”型电泳槽回收 DNA 的操作按照文献[6]的方法进行。回收纯化的 PCR 目的产物用灭菌三蒸水适当稀释，紫外分光光度仪测定 DNA 浓度后进行 DNA 测序。测序应用 PE 公司的 PCR377 全自动 DNA 测序仪(赛百盛)，应用 PCR 上下游引物分别从纯化的 PCR 产物两端进行；应用 PCR、四色荧光、双脱氧终止法进行测序，反应操作按仪器说明进行。上下游引物测序结果通过计算机软件分析，合并相同序列，即可得到目的片段基因的全序列。

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果

应用 10% 小牛血清 1640 培养基培养的 A549 人肺癌细胞株生长旺盛。应用 Tripue 核酸提取试剂一步法提取的 RNA D_{260}/D_{280} 比值为 1.95，RNA 纯度高。长满 100 ml 瓶底的两瓶细胞可提取的总 RNA 约为 60～100 μg。

2.2 RT-PCR 结果

应用宝灵曼的 Expand 逆转录酶及 Promega PCR 试剂盒完成的 RT-PCR，见图 1。扩增的目的产物与 Marker 比较位于 947 bp 至 831 bp 之间，与引物设计时设计的预扩增的目的片段 930 bp 相一致。

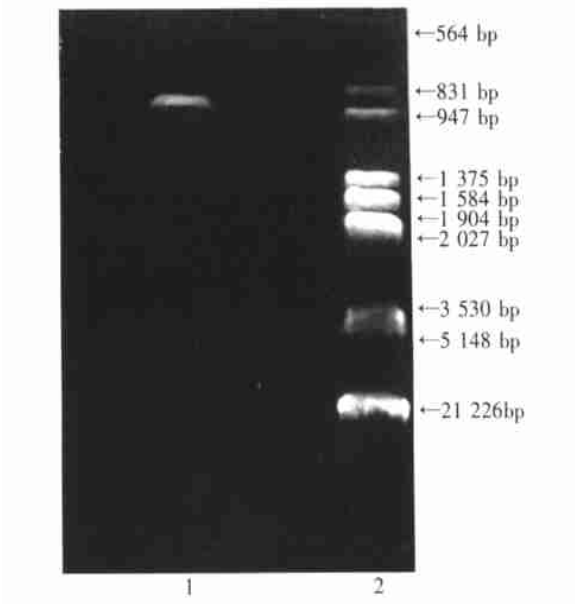


图 1 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 1 Result of PCR product in 1% gelose gel

Lane 1：PCR product；Lane 2：Maker(λ DNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ)

2.3 测序及同源性分析结果

克隆的基因测序结果如下：

tcggtatctttggatggagaggaactctctaattcttgggggcttgctactaaactgctgtgttgctggagccctcatgcgaccaatcgggcccaagccaaccaaggcagggaaagataagtctaaagcatccccttgagaaa
gctggaaaatctggtgtgaaaaaagatctgcatgatgcaaatacagatcttattggaagacacccctaaacaagagaaacgatcagtcttccaaacaattaatcagttcctggacttaaccctattcacccacagaggctttt
gctatacctctctggaaatgtgatcatgttttggactctttgcaccttggtgtttcttagtagtatgggaagagtcagcattattctagtgagaagtctgcctcctctttccattctggcttttgttgacatggtagccgaccatc
tatgggacttgtagccaacacacaaagccaataagacctcgaattcagtatttctttgcggctccgttgttgcaaatggagtgtgtcatatgctagcacctttatccactactatgttggattctgtgtctatgcgggattctttgga
tttgcctcgggtggctcagctccgtattgttgaaacattgatggacctgttggaccccagaggttctccagcgctgtgggattggtgaccattgtggaatgctgtcctgtcctcctggggccaccacttttaggtcggctcaatg
acatgtatggagactacaaatacacatactgggcatgtggcgtcgtcctaattattttcaggtatctatctcttcattggcatgggcatcaattatcgacttttggcaaaagaacagaaagcaaacgagcagaagaaaggaaag
taagaggaagagncccgggaagccaaatgaagttacca

通过网址：www.ncbi.nlm.nih.gov 进入 Genebank DNA 序列数据库，调取人心肌细胞 MCT1 cDNA 518～1 448 bp 间的碱基序列并与扩增片段 DNA 序列进行比较分析，其差异比较分析结果如下。

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

人心肌细胞 MCT1 cDNA 序列	540 bpAAGCTTTC… …1407 bp AGACCAGTATAGATGTTGCTGGG…
人肺腺癌细胞克隆基因序列	…AA CTCTC… …AGNCC GGG…

上述比较结果提示所扩增的人肺腺癌细胞单羧酸转运泵基因片段与人心肌细胞 MCT1 cDNA 序列 518 bp 至 1 448 bp 段 DNA 序列基本相同, 但在 MCT1 cDNA 序列的 543 bp、546 bp、1 413～1 428 bp 处出现碱基序列的不同, 1 410 bp 处对应的 n 为测序时的错误所致, 此处是否有碱基差异无法判断。初步说明所扩增的人肺腺癌细胞单羧酸转运泵基因与人心肌细胞 MCT1 基因具有高度同源性。

3　讨论

由于肿瘤细胞糖代谢酶谱的改变, 以及实体肿瘤组织的特点是肿瘤细胞生长速度远大于毛细血管的生长速度, 因此肿瘤细胞是在一种相对缺氧环境下生长的。显而易见, 无氧糖酵解成为肿瘤细胞获取能量的一种主要方式, 这种代谢方式导致了肿瘤细胞内乳酸等单羧酸产物大量产生, 并可能引起肿瘤细胞胞内酸化和凋零。目前已证明 Na^+/H^+ 离子交换泵(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)在肿瘤细胞胞内外的氢离子浓度的调节方面发挥有重要作用[7]。但此 Na^+/H^+ 泵并不能转运乳酸等无氧代谢产物。而乳酸等底物的蓄积将反馈抑制糖酵解。因此有理由相信 MCT 可能在肿瘤细胞的能量代谢及细胞内 pH 值调节方面发挥重要作用。通过研究肿瘤细胞 MCT 的基因结构及功能, 有助于我们洞悉肿瘤细胞抗酸化抗凋零的调节机制。本研究采用 RT-PCR 方法, 参照人心肌细胞 MCT1 的 cDNA 的基因编码序列设计引物, 克隆出人肺腺癌 A549 细胞中与此基因相关的基因编码序列, 通过测序及基因编码序列的同源性比较分析, 初步证明应用 RT-PCR 进行基因的克隆、测序, 方法简单, 操作方便且可行。所测的目的基因序列与人心肌细胞 MCT1 序列在靠近两侧测序引物处的比较出现碱基差异, 其可能原因是 PCR 扩增过程中 Taq 酶所引起的碱基错配; 亦可能是在肺癌细胞中发生突变。但本实验结果初步提示此基因可能在人肺癌细胞中为一保守的基因序列, 有关其结构及功能的研究正在进行中。

参考文献:

[1] Garcia K G, Xu I, 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.

[2] Lin R Y, Vera J A, S K Chaganti R, *et al*. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter [J]. J Biol Chem, 1998, 273(44): 28 959—28 965.

[3] 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.

[4] Broer S, Schneider H P, Broer A, *et al*. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in Xenopus laevis oocytes by changes in cytosolic pH[J]. Biochem J, 1998, 333(1): 167—174.

[5] 黄桂君, 钱桂生. pH 对细胞凋亡的调控及 pH 调节的肿瘤治疗研究[J]. 科学, 1997, 228(8): 51—52.

[6] 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. 128—129.

[7] 黄桂君, 钱桂生. NHE-1 基因表达在人肺癌细胞 pHi 调节及凋亡调控中的作用[J]. 科学, 1998, 242(10): 64—65.

(编辑　薛国文)

《医学科研方法学》——为您指明医学科研的方向　　书讯

由多位具有丰富实践经验的专家编撰的《医学科研方法学》即将由四川科学技术出版社出版(ISBN 7-5364-4134-7/R·915)。该书由医学科研方法概述、医学科研选题与课题申报、医学文献检索、常用医学统计方法、医学科研设计的基本原则与设计要点、常用实验设计方法、医学实验动物与动物实验、流行病学调查研究方法、新药研究与开发、医学科研论文撰写与评价、科技成果的鉴定、奖励和评价等共 15 章, 约 75 万字组成。该书内容丰富、资料翔实、实用性强, 是广大医务工作者, 特别是医学科研人员、研究生、大学生的常用参考书。该书在 2000 年 5 月面市, 第三军医大学学报编辑部接受邮购。该书定价 42.00 元, 凡在 2000 年 4 月 25 日前订购者, 免邮寄费。

联系人: 王　红　　电话: (023)68752189　　邮编: 400038

地　址: 重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部

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