

· 论 著 ·

MCT1 表达位置改变对胶质瘤细胞能量合成、细胞内 pH 值及凋亡的影响

王晓澍¹, 唐文渊¹, 游 潮²

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科 400016; 2. 四川大学华西医院神经外科, 成都 610041)

摘要:目的 研究体外培养 U251 细胞单羧酸转运蛋白-1(MCT1)被 CD147/HAb18G 基因工程单克隆抗体改变表达位置后其乳酸外流障碍对细胞能量合成、细胞内 pH 值(pHi)和凋亡的影响。方法 分别以低、高剂量的 CD147/HAb18G 单抗封闭体外培养 U251 细胞表面 CD147 分子,并设立对照组。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,生物发光法检测细胞内腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量,连续比色法检测细胞内磷酸果糖激酶(PFK)活性,2',7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄(BCECF-AM)荧光探针法检测各组 pHi,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。结果 CD147/HAb18G 单抗作用下,MCT1 表达位置由胞膜有效表达转为胞质无效表达且细胞内乳酸浓度增高;细胞内 ATP 含量下降[对照组(0.831±0.036)×10⁻⁸ mmol/L,低剂量组(0.592±0.047)×10⁻⁸ mmol/L,高剂量组(0.332±0.042)×10⁻⁸ mmol/L, $P<0.01$];细胞 PFK 活性下降[对照组(0.855±0.076)mmol·min⁻¹·L⁻¹,低剂量组(0.602±0.057)mmol·min⁻¹·L⁻¹,高剂量组(0.382±0.049)mmol·min⁻¹·L⁻¹, $P<0.01$];pHi 下降(对照组7.27±0.03,低剂量组 6.77±0.04,高剂量组 6.31±0.02, $P<0.01$);细胞凋亡率增加[对照组(8.45±1.26)%,低剂量组(16.87±3.26)%,高剂量组(28.92±3.01)%, $P<0.01$]。结论 通过改变 MCT1 的表达位置,可有效抑制细胞糖酵解乳酸清除、降低糖酵解能量合成,酸化细胞内环境,促进肿瘤凋亡。

关键词:单羧酸转运蛋白-1;糖酵解;细胞内 pH 值;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.10.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)10-0937-03

Effects of MCT1 expression translocation on energy synthesis, pHi, and apoptosis of human glioma cells in vitro

Wang Xiaoshu¹, Tang Wenyuan¹, You Chao²

(1. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Neurosurgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To explore the effects of disturbance of lactic acid efflux, occurred by monocarboxylate transporter-1 (MCT1) translocation on u251 cells in vitro induced by CD147/HAb18G genetic engineering monoclonal antibody, on energy synthesis, pHi and apoptosis of tumor cells. **Methods** Low and high dose of CD147/HAb18G monoclonal antibody were applied to U251 cell in vitro with control group set. The translocation of MCT1 expression was demonstrated by immunofluorescence staining. Intracellular lactate content was detected by spectrophotometer, and ATP content was measured by bioluminescence method. Phosphofruktokinase (PFK) activity was checked by continuous colorimetry. pHi was recorded by BCECF-AM fluorescence probe, and apoptosis rate was detected by flow cytometer. **Results** Interfered by monoclonal antibody, the expression of MCT1 was translocated from cell membrane to cytoplasm, intracellular lactate content significantly increased, and ATP content obviously decreased [control group: (0.831±0.036)×10⁻⁸ mmol/L, low dose group: (0.592±0.047)×10⁻⁸ mmol/L, high dose group: (0.332±0.042)×10⁻⁸ mmol/L, $P<0.01$]. PFK activity decreased [control group: (0.855±0.076)mmol·min⁻¹·L⁻¹, low dose group: (0.602±0.057)mmol·min⁻¹·L⁻¹, high dose group: (0.382±0.049)mmol·min⁻¹·L⁻¹, $P<0.01$]. The difference of pHi was significant among 3 groups [control group: (7.27±0.03), low dose group: (6.77±0.04), high dose group: (6.31±0.02), $P<0.01$]. Apoptosis rate increased [control group: (8.45±1.26)%, low dose group: (16.87±3.26)%, high dose group: (28.92±3.01)%, $P<0.01$]. **Conclusion** The translocation of MCT1 expression can effectively restrain the clearance of intracellular lactate generated by glycolysis, reduce ATP output, acidate cell microenvironment, and promote cell apoptosis.

Key words: monocarboxylate transporter-1; glycolysis; pHi; apoptosis

单羧酸转运蛋白-1(monocarboxylate transporter-1, MCT1)是细胞糖酵解乳酸代谢的关键细胞膜转运蛋白,它在细胞表面抗原 CD147 的引导结合下得以正确表达并行使转运功能。两者在多种肿瘤细胞均有高表达,在实验的前期研究中初步观察到 MCT1 表达位置改变可引起胶质瘤细胞生长曲线的变化^[1],本研究拟对上述变化的具体机制作进一步研究。

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由第四军医大学细胞工程中心惠赠,2',7'-二(羧乙基)-5(6)-羧基荧光黄(BCECF-AM)pH 荧光探针(AppliChem 公司),Annexin v/Pi

凋亡检测试剂盒(BD 公司),腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)检测试剂盒(Sigma 公司),磷酸果糖激酶活性定量检测试剂盒(GenMed 公司),MCT1 一抗(SANTA 公司),异硫氰酸荧光素(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 相差显微镜和尼康 CI-SI 荧光共聚焦显微镜, LB9507 弱光仪(Berthold 公司),FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U251 细胞分为对照组、低剂量组和高剂量组,每组 6 个 4 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 天取出爬片,收获细胞行下列检测。

1.2.2 免疫荧光染色 爬片以 MCT1 一抗(1:100)和 FITC 荧光二抗(1:100)行免疫荧光染色。30%甘油封片,荧光显微镜观察,400 倍镜下每张爬片随机计数 300 个细胞,记录其中呈相应表达位置的细胞个数,并计算出各组平均值行统计分析。

1.2.3 细胞内乳酸含量测定 收获细胞,离心,细胞沉淀加入低渗盐溶液,细胞浓度 1×10^6 /mL,室温静置 1 h,超声波振荡 5 min 进一步破膜,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行统计分析。乳酸标准方程 $Y = 0.025X + 0.058$ ($n = 8, r = 0.998, P < 0.05$)。

1.2.4 细胞内 ATP 含量测定 收获细胞,调整细胞浓度 1×10^8 /mL,加入 ATP 检测试剂盒内裂解液,室温震荡 5 min,离心取上清,加入 ATP 荧光素酶检测工作液,室温静置 5 min,弱光仪检测发光值,代入 ATP 标准方程得出各样本 ATP 浓度行统计学分析。ATP 标准方程 $Y = 7.025X + 0.726$ ($n = 8, r = 0.996, P < 0.05$)。

1.2.5 细胞内磷酸果糖激酶(PFK)活性测定 收获细胞,调整细胞浓度 1×10^8 /mL,加入试剂盒内裂解液,室温震荡 1 min,离心取上清,加入缓冲液,室温孵育 2 min,加入底色液和反应液,分光光度计检测 340 nm 处光密度值,参照背景对照计算酶活性行统计分析。

1.2.6 细胞内 pH 值(pHi)测定 收获细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入以二甲基亚砜(DMSO)为溶剂配制的 BCECF-AM 溶液(溶液终浓度 $3 \mu\text{mol/L}$,细胞终浓度 1×10^6 /mL), 37°C 孵育 40 min。荧光共聚焦显微镜下以荧光定量分析软件测定细胞标本在 440 nm 和 490 nm 处荧光强度比值(FIR),将 FIR 代入 pHi 标准方程得出各样本 pHi 行统计分析。pHi 标准方程 $Y = 1.008X + 0.857$ ($n = 10, r = 0.997, P < 0.05$)。

1.2.7 细胞凋亡率测定 收获细胞,离心,洗涤 2 次,孵育缓冲液重悬细胞(细胞终浓度 1×10^6 /mL),加入 Annexin-V-FITC 和 Pi 配制的标记溶液,室温下避光孵育 15 min。一次性流式管过滤,流式细胞仪上机检测。激发光波长 488 nm, FITC 检测波长 515 nm, Pi 检测波长 570 nm,染色情况呈 FITC+/Pi- 者为凋亡细胞,CellQuest 软件计算凋亡率行统计分析。

1.3 统计学处理 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 SPSS13.0。

2 结果

2.1 MCT1 表达位置变化 对照组中 MCT1 多见正常胞膜表达,高剂量组中多见胞质表达,低剂量组表达情况介于上述两组之间。两种表达形式细胞数在 3 组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1、封 2 图 1。

2.2 细胞内乳酸含量变化 3 组含量分别为对照组(0.218 ± 0.025)mmol/L,低剂量组(0.465 ± 0.018)mmol/L,高剂量组(0.721 ± 0.022)mmol/L。3 组细胞内乳酸浓度差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 细胞内 ATP 含量变化 低、高剂量组出现不同程度 ATP 降低。3 组含量分别为对照组(0.831 ± 0.036) $\times 10^{-8}$

mmol/L,低剂量组(0.592 ± 0.047) $\times 10^{-8}$ mmol/L,高剂量组(0.332 ± 0.042) $\times 10^{-8}$ mmol/L。3 组 ATP 含量差异有统计学意义($P < 0.01$)。

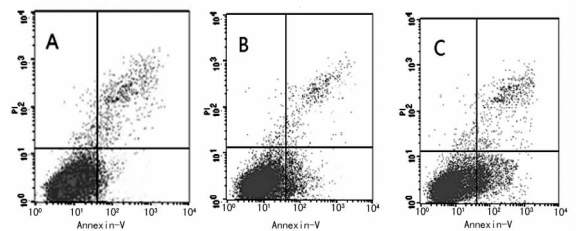
2.4 细胞内 PFK 活性变化 低、高剂量组 PFK 活性降低。3 组含量分别为对照组(0.855 ± 0.076)mmol \cdot min $^{-1}\cdot$ mL $^{-1}$,低剂量组(0.602 ± 0.057)mmol \cdot min $^{-1}\cdot$ mL $^{-1}$,高剂量组(0.382 ± 0.049)mmol \cdot min $^{-1}\cdot$ mL $^{-1}$ 。3 组 PFK 活性差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 3 组中 MCT1 的不同表达位置(随机计数 300 个细胞, $\bar{x} \pm s$)

组别	胞膜表达	胞质表达
对照组	197.55 \pm 9.72	19.88 \pm 4.30
低剂量组	94.75 \pm 8.45	70.56 \pm 6.73
高剂量组	28.25 \pm 6.80	171.28 \pm 6.58

2.5 细胞内 pH 值变化 随着细胞内乳酸浓度上升,低、高剂量组出现不同程度 pHi 降低。3 组含量分别为对照组(7.27 ± 0.03)mmol/L,低剂量组(6.77 ± 0.04)mmol/L,高剂量组(6.31 ± 0.02)mmol/L。3 组 pHi 差异有统计学意义($P < 0.01$)。pHi 与细胞内乳酸浓度呈负相关($r = -0.811, P < 0.05$)。

2.6 细胞凋亡率变化 低、高剂量组出现不同程度的细胞凋亡率增高。3 组凋亡率分别为对照组(8.45 ± 1.26)%,低剂量组(16.87 ± 3.26)%,高剂量组(28.92 ± 3.01)%。3 组凋亡率差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 高剂量组。

图 2 流式细胞仪检测细胞凋亡情况(右下象限示凋亡细胞群)

3 讨论

胶质瘤细胞存在明显 Warburg 效应,即使在有氧环境下,其主要供能仍依赖糖酵解,并在细胞内产生大量代谢终产物乳酸。单羧酸转运蛋白(MCT)是乳酸跨细胞膜转运的主要通道,帮助细胞及时清除细胞内过多乳酸。MCT1 已证实在多种肿瘤表达上调,其表达强度和状态直接反映细胞糖酵解代谢活性和恶性程度,影响肿瘤预后和耐药^[2-3],故本研究将其作为肿瘤代谢性治疗靶点进行研究。本研究干预目标是与 MCT1 表达和功能密切相关的细胞表面抗原 CD147。MCT1 必须与 CD147 结合形成复合体后方能在细胞膜正确表达,两者表达位置和强度有高度一致性^[4],单独的 MCT1 只能在胞质内无效表达而失去功能^[5]。CD147/HAb18G 单克隆抗体作用于 CD147 穿膜区样结构域阻止其与 MCT1 形成复合体^[6],在低、高剂量组中可见 MCT1 表达位置由胞膜表达转为胞质表达,证实该干预作用确切。

前期研究中,初步观察到随着 MCT1 有效表达的减少,胶质瘤细胞生长曲线低平,其生长速度和生长密度均有明显下降^[1],本研究从细胞能量合成、细胞内 pH 值、细胞凋亡方面对

其具体机制作了深入研究探讨。胶质瘤细胞内旺盛的糖酵解在迅速为细胞提供 ATP 的同时产生大量以乳酸为主的代谢终产物,为降低细胞内乳酸负荷,乳酸穿梭机制启动以恢复细胞内乳酸稳态,即:部分细胞内乳酸进入线粒体内作为氧化底物重新利用(细胞内穿梭),另一部分乳酸通过细胞膜排出至细胞外环境(细胞间穿梭),而 CD147-MCT1 复合体正是乳酸跨线粒体膜和跨细胞膜转运的最主要通道^[7-8],乳酸的再利用和外流均需依赖其得以实现。本研究中由于单抗已阻断 CD147-MCT1 复合体的形成,上述两种穿梭机制,尤其是细胞间穿梭机制失去调节机能,随着乳酸再利用和外流的减弱,低、高剂量组细胞内出现乳酸清除障碍。化学反应持续正向进行的必要条件是其产物的稳定清除,细胞内乳酸降低有利于细胞能量合成^[9],而乳酸增多则负反馈影响糖酵解效率,使糖酵解关键酶活性降低且反应动力学参数下降^[10]。糖酵解是肿瘤细胞 ATP 合成主要来源,本研究发现低、高剂量组细胞内 ATP 含量明显下降,相对对照组细胞,高剂量组 ATP 下降程度已达 60% 以上;磷酸果糖激酶是糖酵解最主要限速酶,其活性由乳酸、H⁺、ATP、ADP 等物质综合调节,本研究中细胞内 ATP 含量下降虽在一定程度上可提高 PFK 活性,但过多的乳酸堆积和细胞内酸化的抑制作用仍占了主导地位,故低、高剂量组 PFK 活性明显下降。以上结果证实干预组细胞内糖酵解活性明显减弱,能量合成严重受阻。

乳酸是细胞内主要有机酸,细胞内乳酸负荷增加的另一个直接后果是细胞内环境的酸化,而 pH_i 是反映这一变化的准确量化指标。每一种细胞在特定状态下均有其最适 pH_i 范围,该范围的维持是细胞内所有理化反应、离子稳态及细胞器超微结构维持的必要保证。pH_i 降低可增加核酸内切酶活性致核小体间 DNA 断裂、限制肿瘤细胞原癌基因的激活、增强肿瘤对多种理化因素和化疗药物的易感性等,从而增加细胞凋亡;而碱化细胞内环境可获得对细胞凋亡的拮抗作用^[11-12]。已有研究发现:处于典型生长外环境的肿瘤细胞在 pH_i 降低后 48 h 内即可出现生长活力下降^[13],当 pH_i 下降在 0.47~0.78 时,细胞内可出现活性氧增多和钙超负荷,导致细胞水肿^[14]。虽然 pH_i 降低时 MCT1 的表达和功能可适应性上调以增加乳酸清除^[15],但在本研究中,MCT1 有效表达已被阻断,上调的 MCT1 无法进入正确胞膜表达位点,故此调节机制失效。在低、高剂量组中 pH_i 明显降低且与细胞内乳酸堆积程度呈负相关,提示其下降确由乳酸负荷引起,而下降程度已达到甚至超过上述研究。在细胞能量合成障碍和酸碱平衡紊乱两方面因素共同作用下,低、高剂量组细胞凋亡率明显增加且具有单抗剂量依赖性,尤其高级别组凋亡率较对照组增加已达 3.4 倍,对肿瘤细胞具有较明显抑瘤作用。

综上所述,针对肿瘤代谢特点的治疗性研究是当前新的思路,MCT1 表达位置改变可增加胶质瘤细胞内乳酸负荷,从而在肿瘤糖酵解能量代谢、内环境维持、细胞凋亡等机制对体外培养胶质瘤细胞产生抑制作用,值得进一步深入探讨和应用。

参考文献:

- [1] 王晓澍,游潮,孙晓川. 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[J]. 第三军医大学学报,2010,32(20):2193-2196.
- [2] Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, et al. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma[J]. *Histopathology*,2010,56(7):860-867.
- [3] Hao J, Chen H, Madigan MC, et al. Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression[J]. *Br J Cancer*,2010,103(7):1008-1018.
- [4] Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, 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.
- [5] Kirk P, Wilson MC, 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.
- [6] 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.
- [7] Benton CR, Yoshida Y, Lally J, et al. PGC-1alpha increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4[J]. *Physiol Genomics*,2008,35(1):45-54.
- [8] Hashimoto T, Hussien R, Brooks GA. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2006,290(6):1237-1244.
- [9] 吴悦维,刘桥义,杨天德. 纳络酮对兔缺血再灌注心肌糖酵解产物和能荷的影响[J]. *重庆医学*,2003,32(8):979-980,983.
- [10] Leite TC, Coelho RG, Da Silva D, et al. Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice[J]. *FEBS Lett*,2011,585(1):92-98.
- [11] Zheng CL, Che XF, Akiyama S, et al. 2-Aminophenoxazine-3-one induces cellular apoptosis by causing rapid intracellular acidification and generating reactive Oxygen species in human lung adenocarcinoma cells[J]. *Int J Oncol*,2010,36(3):641-650.
- [12] Konstantinidis D, Koliakos G, Vafia K, et al. Inhibition of the Na⁺-H⁺ exchanger isoform-1 and the extracellular signal-regulated kinase induces apoptosis: a time course of events[J]. *Cell Physiol Biochem*,2006,18(4/5):211-222.
- [13] Fang J, Quinones QJ, Holman TL, et al. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma[J]. *Mol Pharmacol*,2006,70(6):2108-2115.
- [14] Wang QJ, Cai XB, Liu MH, et al. Apoptosis induced by emodin is associated with alterations of intracellular acidification and reactive Oxygen species in EC-109 cells[J]. *Biochem Cell Biol*,2010,88(4):767-774.
- [15] Uhernik AL, Tucker C, Smith JP. Control of MCT1 function in cerebrovascular endothelial cells by intracellular pH[J]. *Brain Res*,2011,1376:10-22.