

SLC44A5 对肺腺癌细胞迁移影响

王思, 曲玥阳, 肖桂山*

(大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 肺癌是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, SLC44A5 是一种胆碱转运蛋白, 其与肿瘤关系的相关报道较少. 有报道显示其与肝癌的发生发展有关, 然而其在肺癌中的作用尚未有相关报道. 为探讨 SLC44A5 的影响, 使用人肺腺癌细胞系 H1299 和 H1792 构建 SLC44A5 低表达细胞系, 利用 MTT 法证明敲低 SLC44A5 会抑制细胞增殖. 使用细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验证明敲低 SLC44A5 抑制细胞迁移. 结果表明 SLC44A5 可能参与了肺癌的转移, 具有成为肿瘤治疗分子靶点的潜力.

关键词: 肺腺癌; SLC44A5; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb202206003

0 引言

肿瘤的发病率和死亡率逐年升高. 2020 年全球癌症数据统计显示, 全球大约有肺癌新发病例 220 万, 发病率为 11.6%; 死亡病例 180 万, 远超其他癌症类型, 以 18% 的死亡率位居所有恶性肿瘤之首^[1]. 肺癌早期症状较为隐蔽, 临床上多数患者出现症状就诊时就已经属晚期. 随着病程的进展, 10%~15% 的患者会出现骨转移^[2], 25.4%~65.0% 的患者可发生脑转移, 生存时间超过 2 年的肺癌患者脑转移发生率高达 80%^[3], 致使晚期肺癌 5 年整体生存率较低. 因此, 研究肺癌转移分子机制, 探索新的治疗药物具有重要意义.

SLC44A5 是胆碱转运蛋白, 胆碱是乙酰胆碱和磷酸胆碱的前体^[4], 也是形成膜磷脂脂酰胆碱所必需的^[5], 胆碱还可以支持细胞膜的合成, 从而促进细胞增殖^[6]. SLC44A5 可通过降低细胞内胆碱水平诱导细胞凋亡来抑制细胞生长^[7], 从这个意义上说, 癌症中胆碱转运体的鉴定和表征可能为抗肿瘤策略的设计提供新的靶点. 因此, 在癌细胞中识别胆碱转运蛋白是非常重要的. 胆碱转运系统分为 3 类转运蛋白: 高亲和力胆碱转运蛋白 (CHT1/SLC5A7), 中等亲和力胆碱转运蛋白

样蛋白 (CTL/SLC44A1-5) 和低亲和力的多特异性有机阳离子转运蛋白 (OCTs/SLC22A1-2)^[8]. 已有文献报道 CTL/SLC44A1-5 广泛存在于不同人体组织中^[9]. 大鼠和人类中枢神经系统中 SLC44A1 的存在表明, 这种转运蛋白的功能失调可能对损伤后的神经系统发育和修复以及神经退行性疾病具有重要意义^[10]. SLC44A2 在心脏、结肠、肺、肾和肝脏中表达为两种亚型, 即 SLC44A2-P1 和 SLC44A2-P2, 这表明组织特异性差异可能会影响其在每个组织中的功能^[11]. SLC44A3 在肾脏、回肠和结肠中中度表达, SLC44A4 在胃和肾脏中高表达. 关于 SLC44A5 表达的研究可用数据少得多, 其在脊髓中的表达明显高于 SLC44A1^[12]. 虽然 CTL/SLC44A1-5 的分布已有相关文献报道, 然而, 对 SLC44A3-5 功能的相关研究较少. 在已有报道中, Sugimoto 等发现 SLC44A5 在进入肾脏途径前转运胆碱而不转运磷酸胆碱, 说明 SLC44A5 有助于维持细胞胆碱水平^[13]. Peng 等发现 SLC44A5 在肝癌中促进癌细胞凋亡抑制侵袭^[14], 然而其在肺腺癌发生发展过程中的功能尚待研究. 因此本研究将初步探讨下调 SLC44A5 对肺腺癌细胞系增殖能力和迁移能力的影响.

收稿日期: 2021-11-05; 修回日期: 2022-09-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81770846); 中国博士后科学基金资助项目 (2020M670760).

作者简介: 王思 (1992-), 女, 硕士生, E-mail: 501895506@qq.com; 肖桂山* (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: gxiao@dlut.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肺腺癌细胞系 H1299 和 H1792 均购自美国 ATCC 公司. MTT(M8181-1g)试剂、青链霉素混合液(100×)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020)、Tween 20 均购自北京索莱宝生物科技有限公司. 胎牛血清、1640 培养基、Trypsin-EDTA 胰酶购自 Gibco 公司. ECL 超敏发光液(P1010)、RIPA 裂解液购自北京普利莱公司. 蛋白免疫印迹实验相关化学试剂购自天津大茂化学试剂厂. 质粒小提中量试剂盒(DP106)、TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(DP424)购自天根生化科技(北京)有限公司. SLC44A5(APREST83577)抗体购自 Sigma 公司. 鼠二抗(A25012)和羊二抗(A25022)购自 Macklin 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞系 H1299、H1792、H1299 对照组及 H1792 对照组使用含 10% FBS 和 1% 双抗的 1640 培养基, H1299 shSLC44A5 和 H1792 shSLC44A5 使用含 10% FBS、1% 双抗和 2 $\mu\text{mol/L}$ DOX 的 1640 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱(Thermo Fisher Scientific)中培养.

1.2.2 RT-qPCR 分析 采用 TRNzol Universal 从 H1299 细胞中提取总 RNA, 用酶标仪测定其浓度与质量, 按照 PrimeScript[®] RT Reagent Kit 试剂盒说明将其反转录成 cDNA, 再经过扩增后, 上机检测. GAPDH 前引物: 5'-CTCCTCCAC-CTTTGACGCTG-3', 后引物: 5'-TCCTCTTGT-GCTCTTGCTGG-3'; SLC44A5 前引物: 5'-TCAAGTTTGCAGTGATTCAGGC-3', 后引物: 5'-TCCTTGATCACCAAAGTCCTC-3'.

1.2.3 转染 在 6 孔板中接种细胞, 待细胞融合度在 60%~80% 时将细胞培养基换成无血清培养基. 将 SiRNA 干粉于 12 000 r/min 下离心 2 min, 使用 depc 水溶解, 制备成最终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液. 按细胞种类, 每孔按 5~8 pmol 的用量, 使用 150 μL 无血清培养基稀释 SiRNA 储备液; 每孔按 5~8 μL Lipofectamine[™] 2000 用量, 使用 150 μL 无血清培养基稀释转染试剂. 室温孵育 5 min. 将稀释好的 SiRNA 工作液和转染试剂按 1:1 混合. 室温孵育 20 min. 将混合液加入 6 孔板中. 6 h 后换成完全培养基. 48 h 后提取 RNA 用于后续测定.

1.2.4 低表达细胞模型建立 设计 SLC44A5 SiRNA, 将筛选后的 SLC44A5 SiRNA 序列转换成 shRNA 序列, 整合到 pLKO-Tet-On 载体上, 将构建好的 shSLC44A5 质粒和 pLKO-Tet-On 质粒包装成慢病毒, 感染野生型 H1299 和 H1792 细胞, 使用 G418 筛选至少 3 代得到 SLC44A5 低表达细胞系.

1.2.5 Western Blot 检测 用胰蛋白酶消化待提取的目标细胞, 按说明书比例加入 RIPA 裂解液、PMSF、蛋白酶抑制剂, 置于冰上孵育 10 min, 12 000g 离心 15 min, 上清液即为所提取细胞蛋白. 使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 按比例加入 4×上样缓冲液后置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中煮 10 min, 然后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱. 每条泳道加入 20 μg 蛋白样品, 设置恒压 80 V 跑完浓缩胶后恒压调至 130 V 跑分离胶, 随后切取凝胶上目标蛋白条带转移至甲醇活化过的 PVDF 膜上, 300 mA 约 70 min 恒流转膜, 用快速封闭液封闭 0.5 h, 用 TBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 加入一抗(体积 1:1 000 稀释)置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜. 次日用 TBST 洗 3 次膜, 每次 10 min; 室温下二抗孵育 1 h, TBST 洗 3 次膜, 每次 10 min; 随后将 PVDF 膜用 ECL 超敏发光液避光孵育 1 min, 置于凝胶成像仪(Bio-Rad, 17001402, ChemiDOC MP Imaging System)中显影.

1.2.6 MTT 法检测 待细胞生长到对数生长期时, 使用胰蛋白酶消化细胞, 按照每孔 1 000 个细胞铺于 96 孔板, 每种细胞设置 7 组, 每组设置 6 个复孔, 置于培养箱中孵育, 分别对应检测 1、2、3、4、5、6、7 d 的细胞增殖情况. 每隔 24 h 孵育结束, 在每孔中加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 放入培养箱孵育 4 h 后, 吸去上清, 在每孔加入 150 μL DMSO, 置于 96 孔板摇床振荡 15 min, 用酶标仪(Tecan, Infinite 200 pro)检测 490 nm 波长处的吸光度.

1.2.7 细胞划痕实验 将细胞接种到 6 孔板中, 待其密度达到 80%~90% 时, 使用 200 μL 黄色吸头去除单层细胞, 并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次以去除细胞碎片, 倒置显微镜(Olympus 公司, U-RFL-T)拍照记录划痕距离. 培养箱中孵育 24 h 后拍照观察细胞迁移并测定距离. 在每个孔中随机选 3 个区域进行分析, 通过计算伤口愈合面积百分比来量化细胞迁移能力.

1.2.8 Transwell 细胞迁移实验 将细胞用不

含 FBS 的 1640 培养基培养 24 h 后,用胰蛋白酶消化,以 2.5×10^4 个/mL 的密度重悬于不含有 FBS 的 1640 培养基中,从中取 200 μL 置于 Transwell 小室(Corning Costar 公司)的上隔室且在下隔室中加入含有 10% FBS 的 1640 培养基 500 μL ,置于培养箱中孵育 24 h 后,用棉签擦去膜上表面的细胞,将下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min,随后用 0.5% 结晶紫溶液染色 15 min,PBS 清洗多余的结晶紫,置于倒置显微镜下拍照并计算迁移率。

1.2.9 统计学分析 使用软件 GraphPad Prism

8.0 及 Image J 对数据进行处理,结果以均值士标准差表示,两组间差异比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 SLC44A5 在人体内表达情况

通过 NCBI 公共数据库检索 SLC44A5 在全身各器官中的表达情况,结果如图 1 所示,可以观察到,虽然 SLC44A5 在其他组织中表达量较低或者不表达,但在胎盘、全脑中相对高表达。

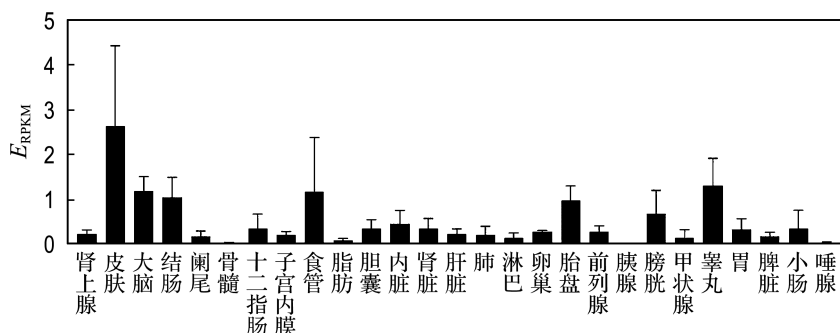


图 1 SLC44A5 在各器官中的表达

Fig. 1 Expression of SLC44A5 in various organs

2.2 SLC44A5 低表达细胞模型构建

为了验证 SLC44A5 与肺腺癌细胞生长能力和迁移能力之间的关系,本文按照载体构建的方法来构建 SLC44A5 低表达载体.首先设计了 3 组 SLC44A5 的 SiRNA,SiRNA 序列见表 1.为了

筛选 SiRNA,将 3 组 SiRNA 序列转染到野生型肺腺癌细胞 H1299 中.转染 48 h 后,利用 qPCR 考察 H1299 细胞中 SLC44A5 的敲降效率 R .结果如图 2(a)所示,Si1 序列敲降效率较高,为 77%,最终选取该序列为构建 shRNA 敲降载体的候选序列。

表 1 SLC44A5 SiRNA 序列

Tab. 1 SiRNA sequence of SLC44A5

序列	前引物(5'-3')	后引物(5'-3')
SLC44A5-Homo-1014(Si1)	CCAGCAGUACACCAAUUCUUTT	AAGAUUGGUGUACUGCUGGTT
SLC44A5-Homo-754(Si2)	GGAAAUGGAGGGACAAGAATT	UUCUUGUCCCUCCAUUUCCTT
SLC44A5-Homo-647(Si3)	GGAAAUGGAGGGACAAGAATT	UUCUUGUCCCUCCAUUUCCTT

随后分别用浓度为 31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000、8 000 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 作用于 H1299 细胞,通过 MTT 法得出 72 h 时 G418 对细胞的杀伤作用,结果如图 2(b)所示,浓度为 2 000、4 000、8 000 $\mu\text{g/mL}$ 的 G418 细胞存活率 V 均为 10%,组间无显著差异,因此最终选择 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 为合适的 G418 浓度。

根据 1.2.4 实验方法构建 SLC44A5 低表达

细胞模型,随后利用 Western Blot 检测 4 种细胞中 SLC44A5 蛋白的表达情况.结果如图 2(c)所示,与对照组相比,H1299 shSLC44A5 和 H1792 shSLC44A5 中 SLC44A5 蛋白表达量降低了.以上结果说明,SLC44A5 低表达细胞模型构建成功。

2.3 SLC44A5 低表达抑制肺腺癌细胞增殖能力

为了更直观地观察敲低 SLC44A5 对肺腺癌细胞的影响,本研究观察了 H1299 对照组、

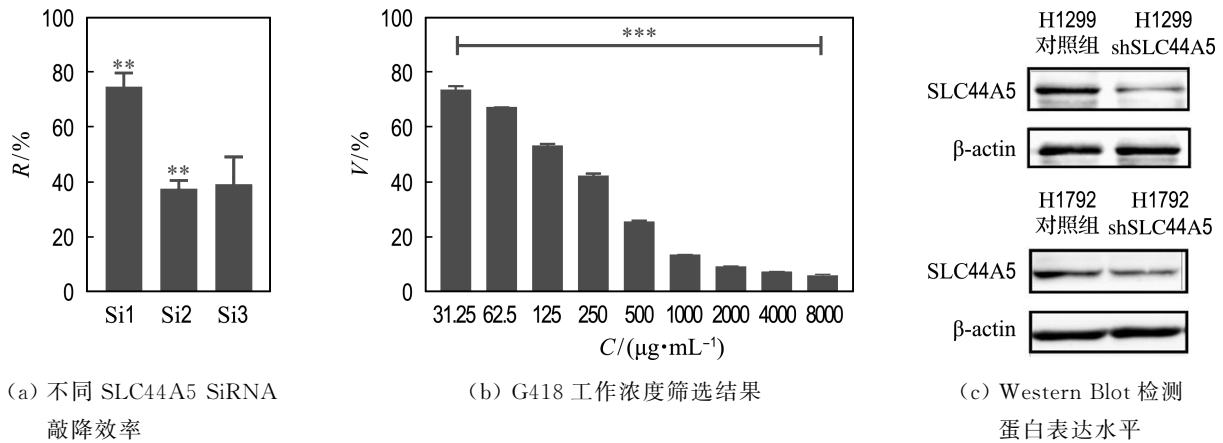


图2 SLC44A5 低表达细胞模型构建

Fig. 2 Model construction of SLC44A5 cells with low expression

H1299 shSLC44A5、H1792 对照组、H1792 shSLC44A5 的细胞形态变化. H1299 和 H1792 为上皮样细胞,呈多边形形状. 结果如图 3(a)所示,发现 SLC44A5 低表达,细胞形态并未发生明显变化,但生长更为分散.

又利用 MTT 法检测上述 4 种细胞生长 7 d 的细胞存活率来验证 SLC44A5 是否对肺腺癌细胞增殖能力产生影响. 结果如图 3(b)所示,与对照组相比,SLC44A5 低表达可以抑制肺腺癌细胞的生长.

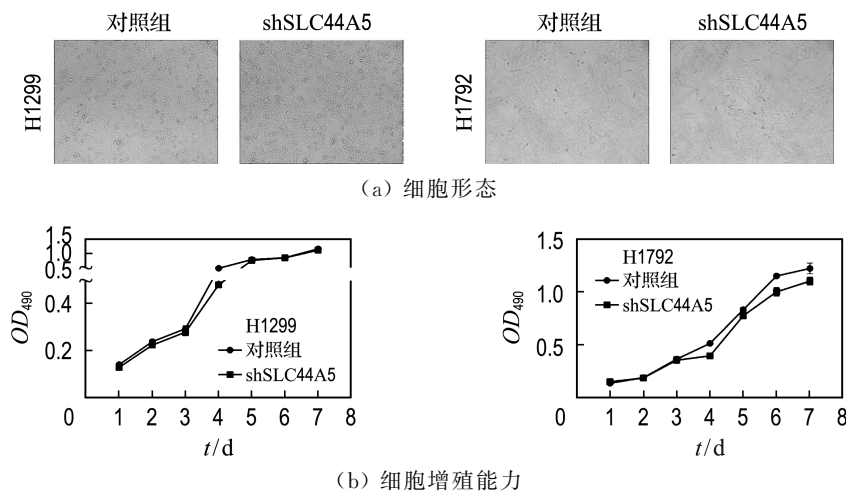


图3 SLC44A5 对肺腺癌细胞形态以及增殖能力的影响

Fig. 3 Effects of SLC44A5 on morphology and proliferation of lung adenocarcinoma cells

2.4 SLC44A5 低表达抑制肺腺癌细胞迁移能力

通过细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验来检测 SLC44A5 对肺腺癌细胞迁移能力的影响. 首先将 H1299 对照组、H1299 shSLC44A5、H1792 对照组、H1792 shSLC44A5 接种于 6 孔板,细胞贴壁后进行细胞划痕实验,培养 24 h 后进行拍照,比较 0 h 和 24 h 后的伤口面积. 结果如图 4(a)所示,SLC44A5 低表达,伤口愈合面积显著减少.

接着将上述 4 种细胞用无血清 1640 培养基培养 24 h,接种于小室中(5 000/孔)进行 Transwell 细胞迁移实验,24 h 后进行拍照对比,比较 0 h 和 24 h 后细胞穿过小室的数量. 结果如图 4(b)所示,H1299 和 H1792 在敲低 SLC44A5 的表达后,穿过小室的细胞数量有所减少.

上述两个实验现象都说明了降低 SLC44A5 的表达可以抑制肺腺癌细胞的迁移.

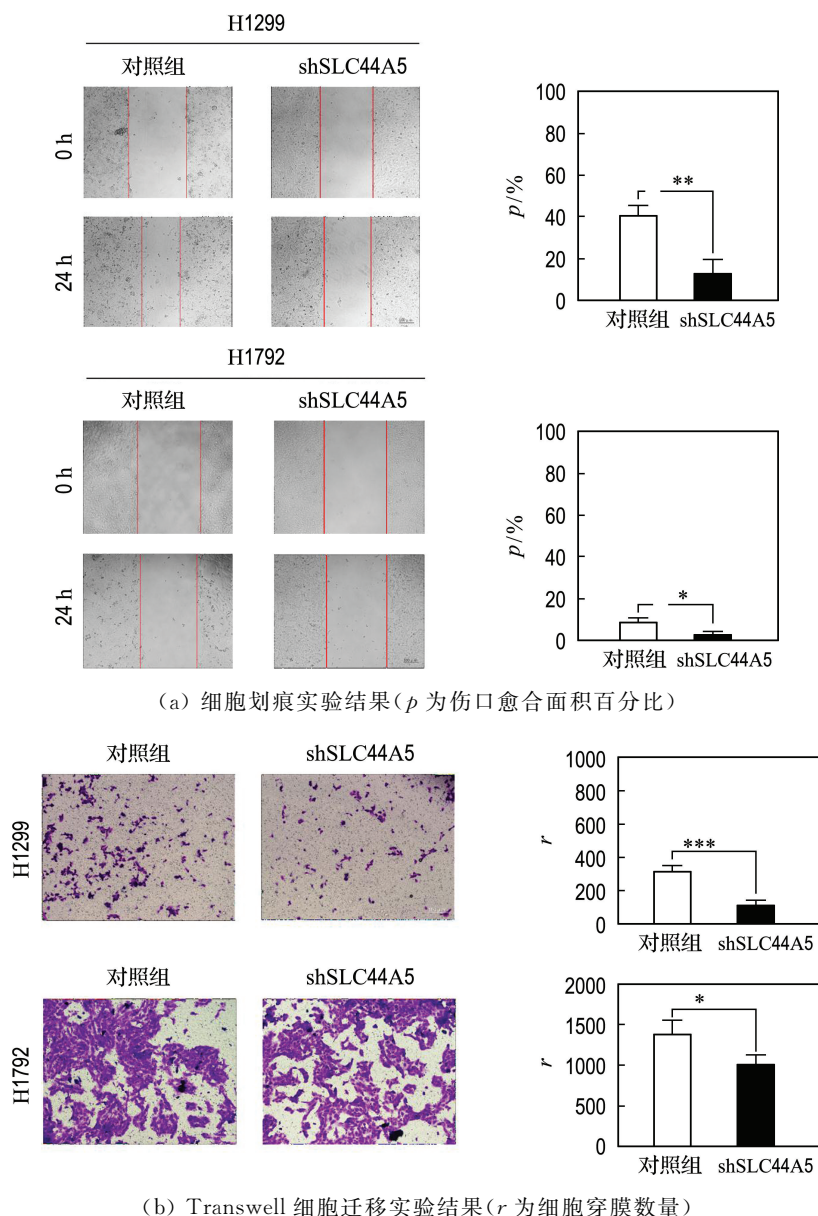


图 4 SLC44A5 对肺腺癌细胞迁移能力的影响

Fig. 4 Effect of SLC44A5 on migration of lung adenocarcinoma cells

3 结果讨论

肺癌的发生和发展是一个复杂的过程,涉及细胞生物学过程中多个重要基因的调控.已有的研究表明 SLC44A1-5 家族的独特胆碱转运体存在于各种人类癌细胞中^[15],但胆碱转运蛋白的表达模式因癌细胞类型而异,且 SLC44A5 敲低的细胞可通过降低细胞中凋亡标志物 caspase-3 和 caspase-9 的表达水平而表现出细胞凋亡,并抑制了侵袭,表明 SLC44A5 可能是癌症治疗的分子靶点^[14].基于此,通过 SLC44A5 低表达细胞系 H1299 shSLC44A5、H1792 shSLC44A5 进行一系列研究,结果发现降低 SLC44A5 的表达可抑

制肺腺癌细胞的生长和迁移能力.因为 SLC44A5 在肺部表达量少,如果通过抑制 SLC44A5 表达的方式影响肺腺癌细胞迁移,对正常肺器官造成的影响较小.因此,针对该靶点设计药物,在保证疗效的情况下副作用较低,有较好的成药性.

4 结 语

本文实验结果初步证明,SLC44A5 对肺腺癌细胞的生长和迁移发挥了重要作用,可能成为临床肺腺癌的治疗靶点.当然,SLC44A5 在肺腺癌中的作用机制研究仍然处于探索阶段,要想彻底解决肺腺癌的相关临床问题,还需要继续深入探索.

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. **CA-A Cancer Journal for Clinicians**, 2021, **71**(3): 209-249.
- [2] HERNANDEZ R K, WADE S W, REICH A, *et al.* Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: Analysis of oncology electronic medical records in the United States [J]. **BMC Cancer**, 2018, **18**(1): 44.
- [3] YOUSEFI M, BAHRAMI T, SALMANINEJAD A, *et al.* Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options [J]. **Cellular Oncology**, 2017, **40**(5): 419-441.
- [4] CURTIN N J, HUGHES A N. Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple targets [J]. **The Lancet Oncology**, 2001, **2**(5): 298-306.
- [5] ZEISEL S H. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults [J]. **Annual Review of Nutrition**, 2006, **26**: 229-250.
- [6] IORIO E, MEZZANZANICA D, ALBERTI P, *et al.* Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression [J]. **Cancer Research**, 2005, **65**(20): 9369-9376.
- [7] CRACIUNESCU C N, ALBRIGHT C D, MAR M H, *et al.* Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus [J]. **The Journal of Nutrition**, 2003, **133**(11): 3614-3618.
- [8] MICHEL V, YUAN Zongfei, RAMSUBIR S, *et al.* Choline transport for phospholipid synthesis [J]. **Experimental Biology and Medicine**, 2006, **231**(5): 490-504.
- [9] O'REGAN S, TRAIFFORT E, RUAT M, *et al.* An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, **97**(4): 1835-1840.
- [10] MACHOVÁ E, O'REGAN S, NEWCOMBE J, *et al.* Detection of choline transporter-like 1 protein CTL1 in neuroblastoma x glioma cells and in the CNS, and its role in choline uptake [J]. **Journal of Neurochemistry**, 2009, **110**(4): 1297-1309.
- [11] KOMMAREDDI P K, NAIR T S, THANG L V, *et al.* Isoforms, expression, glycosylation, and tissue distribution of CTL2/SLC44A2 [J]. **The Protein Journal**, 2010, **29**(6): 417-426.
- [12] TRAIFFORT E, RUAT M, O'REGAN S, *et al.* Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants [J]. **Journal of Neurochemistry**, 2005, **92**(5): 1116-1125.
- [13] SUGIMOTO M, WATANABE T, SUGIMOTO Y. The molecular effects of a polymorphism in the 5'UTR of solute carrier family 44, member 5 that is associated with birth weight in Holsteins [J]. **PLoS One**, 2012, **7**(7): e41267.
- [14] PENG Guizhu, YE Qifa, WANG Ren, *et al.* Knockdown by shRNA identifies SLC44A5 as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. **Molecular Medicine Reports**, 2016, **13**(6): 4845-4852.
- [15] INAZU M. Choline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy [J]. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, 2014, **35**(8): 431-449.

Effect of SLC44A5 on migration of lung adenocarcinoma cells

WANG Si, QU Yueyang, XIAO Guishan*

(School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Lung cancer is the malignant tumor with the highest morbidity and mortality. SLC44A5 is a choline transporter, and there are few reports about its relationship with tumors. There are reports showing that it is related to the occurrence and development of liver cancer, but its role in lung cancer has not yet been reported. To research the effect of SLC44A5, human lung adenocarcinoma cell lines H1299 and H1792 are used to construct shSLC44A5 cell line, and MTT method is used to prove that SLC44A5 knockdown could inhibit cell proliferation. Using cell scratch and Transwell cell migration experiments proves that knocking down SLC44A5 inhibits cell migration. These results suggest that SLC44A5 may be involved in the metastasis of lung cancer and has the potential to become a molecular target for tumor therapy.

Key words: lung adenocarcinoma; SLC44A5; cell proliferation; cell migration