

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00528

· 论 著 ·

MCT1、CD147、CD44 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达相关性及其意义

朱超男¹, 石云^{2*}, 王平¹, 周建宏¹, 彭浩¹, 刁建友²

1. 昆明医学院附属昆华医院, 云南省第一人民医院胸心外科, 昆明 650032

2. 解放军成都军区昆明总医院胸心外科, 昆明 650032

[摘要] **目的** 探讨单羧酸转运蛋白-1(MCT1)、CD147、CD44 mRNA 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及其在 NSCLC 发生、发展和预后中的意义。**方法** 取经病理确诊的 56 例 NSCLC 患者的癌及癌旁组织(距肿瘤边缘>5 cm)、20 例肺良性病变、7 例正常肺组织组织标本,采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 MCT1、CD147、CD44 mRNA 表达,并分析癌组织中三者表达的相关性及与临床病理特征的关系。**结果** (1)MCT1、CD147、CD44 mRNA 在肺癌组织中的表达量高于癌旁组织、正常肺组织和肺良性病变组织,差异均有统计学意义(P 均<0.05);(2)癌组织中 MCT1、CD147、CD44 mRNA 三者表达具有相关性(P <0.05);(3) MCT1、CD147、CD44 mRNA 的表达与 NSCLC 患者的性别、年龄、是否吸烟、肿瘤大小、pTNM 分期均无关,但与肿瘤的组织类型(P 均<0.05)、淋巴结转移(P 均<0.05)有关;MCT1、CD44 mRNA 的表达还与肿瘤分化程度有关(P 均<0.05)。**结论** 在 NSCLC 患者组织中 MCT1、CD147、CD44 mRNA 表达上调,它们可能参与肿瘤的发生、发展,有望成为 NSCLC 诊断和预后评价的指标。

[关键词] 非小细胞肺癌;单羧酸转运蛋白 1;CD147;CD44**[中图分类号]** R 734.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0528-04

Expression of monocarboxylate transporter 1, CD147 and CD44 mRNA in non-small cell lung cancer: correlation and significance

ZHU Chao-nan¹, SHI Yun^{2*}, WANG Ping¹, ZHOU Jian-hong¹, PENG Hao¹, DIAO Jian-you²

1. Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical College, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Kunming General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, Yunnan, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of monocarboxylate transporter 1(MCT1), CD147, and CD44 mRNA in non-small cell lung cancer(NSCLC), and its role in the development, progression and prognosis of NSCLC. **Methods** Fifty-six NSCLC specimens and the adjacent tissues (more than 5 cm from the tumors), 20 specimens of benign pulmonary diseases and 7 specimens of normal pulmonary tissues were included in the present study. The expression of MCT1, CD147, and CD44 mRNA was examined by real-time quantitative RT-PCR in the above specimens. The relationship of their expression with the clinical and pathological features of NSCLC patients was analyzed. **Results** (1)The expression rates of MCT1, CD147, and CD44 mRNA in NSCLC specimens were significantly higher than those in the adjacent tissues, normal pulmonary tissues, and benign pulmonary disease tissues (all P <0.05). (2) The expression of MCT1, CD147, and CD44 in NSCLC tissue was significantly correlated with each other(P <0.05). (3) The expression of MCT1, CD147, and CD44 mRNA in NSCLC tissue was not correlated with age, gender, smoking, site and dimension of lesion, or pTNM stage, and was correlated with the histological types (all P <0.05) and lymph node metastasis of NSCLC(all P <0.05). In addition, we also found that MCT1 and CD44 expression was correlated with the differentiation degree of NSCLC(all P <0.05). **Conclusion** The expression of MCT1, CD147, and CD44 mRNA is up-regulated in the NSCLC specimens. MCT1, CD147 and CD44 may participate in the development and progression of NSCLC, and they may also act as markers for diagnosis and prognosis of NSCLC.

[Key words] non-small cell lung cancer; monocarboxylate transporters one; CD147; CD44

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5):528-531]

[收稿日期] 2011-12-20**[接受日期]** 2012-04-10**[基金项目]** 云南省卫生厅科技计划项目(2011WS0005). Supported by Science and Technology Plan of Health Bureau of Yunnan Province (2011WS0005).**[作者简介]** 朱超男, 硕士生. E-mail: spring6952738@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0871-4774862, E-mail: shiyun2012@yahoo.com.cn

单羧酸转运蛋白-1(monocarboxylate transporter 1, MCT1)作为一种跨膜转运蛋白,存在于很多肿瘤细胞中,主要参与乳酸及其他单羧酸的跨膜转运,特别是对乳酸有较高的亲和力,对外排乳酸起着重要的作用^[1]。MCT1常需要辅助蛋白的表达以确保其正常功能,而细胞外基质金属蛋白酶诱导因子CD147作为公认的辅助蛋白能够确保MCT1在细胞膜的正确定位及功能的正常发挥^[2],透明质酸和CD44之间的相互作用也有助于调节MCT1的定位和功能^[3]。在结肠癌、乳腺癌、卵巢癌等实体肿瘤中MCT1、CD147、CD44的表达存在相关性,三者在肿瘤细胞适应酸性环境的过程中起着关键作用,促使肿瘤细胞由原位癌转变为侵袭性癌^[4]。对于MCT1、CD147、CD44在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中表达的相关性研究报道较少,因此,本研究采取实时荧光定量RT-PCR对56例NSCLC患者的癌及癌旁组织、20例肺良性病变组织和7例正常肺组织进行MCT1、CD147、CD44 mRNA检测,探讨它们在NSCLC中表达的相关性及临床意义,为寻找肺癌的靶向治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集2010年6月至2011年7月在云南省第一人民医院胸心外科接受治疗、资料完整、术前未接受任何放化疗、术后病理确诊为NSCLC的癌组织标本56例,其中男性39例,女性17例,年龄34~78岁,平均(57±11)岁,中位年龄56岁。对照组采用同一患者的癌旁组织(距肿瘤边缘>5 cm)、20例肺良性病变组织(结核8例、炎性假瘤7例、硬化性血管瘤2例、错构瘤2例、黏液囊肿1例,均为手术切除标本)和7例正常肺组织(均为肺外伤患者手术切除标本)。

1.2 实时荧光定量RT-PCR

1.2.1 试剂及引物设计 高纯总RNA提取试剂盒、TRIzol、氯仿均购自BioTek公司,qRT-PCR的M-MLV第一链合成系统购自Invitrogen公司,引物管家基因 β -actin、目的基因(MCT1、CD147、CD44)、SYBR Premix Ex TaqTM II购自TaKaRa公司。引物设计:MCT1, Forward 5'-GAA ACA TTG ATG GAC CTT G-3', Reverse 5'-GTC ATT GAG CCG ACC TAA-3',产物长度为117 bp;CD147, Forward 5'-GAC GAC CAG TGG GGA GAG TA-3', Reverse 5'-GCG AGG AAC TCA CGA AGA AC-3',产物长度为287 bp;CD44, Forward 5'-TCC AAC ACC TCC CAG TAT GAC A-3', Reverse 5'-GGC AGG TCT GTG ACT GAT GTA CA-3',产物

长度为83 bp; β -actin, Forward 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3', Reverse 5'-CAG GAA GGA AGG CTG GAA G-3',产物长度为181 bp。引物合成由TaKaRa公司完成。

1.2.2 实时荧光定量RT-PCR检测 取56例肺癌及癌旁组织、20例肺良性病变和7例正常肺组织新鲜组织标本200~300 mg,迅速置于液氮中速冻,并按照总RNA提取试剂盒说明书进行操作,提取标本的总RNA。对所提取的总RNA进行紫外分光光度测定,检测RNA的浓度及纯度。实验中抽提的总RNA的 D_{260}/D_{280} 值均在1.74~1.98之间,表明总RNA纯度好。1.2%琼脂糖凝胶电泳结果显示有3个条带(28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA),表明总RNA质量较高。用qRT-PCR的M-MLV第一链合成系统试剂盒反转录合成第一链体系,得到cDNA,于-20℃保存备用。以 β -actin作为内参照,应用RT-PCR进行相关基因检测。qRT-PCR(罗氏LightCycler 480实时荧光PCR系统)体系:2×qPCR Mix 5 μ l,上、下游引物各10 pmol(1 μ l),模板cDNA 2 μ l, dH₂O 1 μ l,共10 μ l。反应条件:95℃ 10 s,60℃ 40 s,共40个循环。通过2%琼脂糖凝胶电泳及熔解曲线鉴定qRT-PCR产物,并用公式(Δ Ct)进行定量分析。 Δ Ct=目的基因Ct-内参基因Ct。

1.3 统计学处理 应用SPSS 17.0统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数的比较采用 t 检验及单因素方差分析;相关性检验采用Pearson相关分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 MCT1、CD147、CD44 mRNA在肺癌及癌旁、肺良性病变、正常肺组织中的表达 实时荧光定量RT-PCR检测结果显示,NSCLC组织中MCT1、CD147、CD44 mRNA的 Δ Ct低于癌旁组织、肺良性病变和正常肺组织($P<0.05$,表1),说明三者在NSCLC组织中高表达。Pearson相关分析显示,癌组织中MCT1、CD147、CD44 mRNA三者表达具有相关性($P<0.05$)。

2.2 NSCLC组织中MCT1、CD147、CD44 mRNA表达与临床病理因素的关系 统计学分析结果(表2)显示,NSCLC组织中MCT1、CD147、CD44 mRNA的表达量与患者的性别、年龄、是否吸烟、肿瘤大小、pTNM分期均无关,但与肿瘤的组织类型(P 均 <0.05)、淋巴结转移(P 均 <0.05)有关;MCT1、CD44 mRNA的表达还与肿瘤分化程度有关(P 均 <0.05)。

表 1 肺癌及癌旁、肺良性病变、正常肺组织中 MCT1、CD147、CD44 mRNA 的表达 (ΔCt)

Tab 1 Expression of MCT1, CD147 and CD44 mRNA in NSCLC, peritumoral tissue, pulmonary benign disease and normal lung tissues (ΔCt)

Tissue	n	MCT1	CD147	CD44
NSCLC	56	6.67±2.49*	5.57±1.52*	3.10±0.99*
Peritumoral lung	56	7.34±1.77	6.57±2.20	3.56±2.64
Pulmonary benign diseases	20	6.85±1.85	6.12±1.23	4.51±1.90
Normal lung	7	7.05±1.15	6.55±1.13	4.85±1.85

NSCLC: Non-small cell lung cancer; MCT1: Monocarboxylate transporter 1. * P<0.05 vs other tissues

表 2 NSCLC 组织中 MCT1、CD147、CD44 mRNA 表达与患者临床病理特征的关系

Tab 2 Correlation of MCT1, CD147 and CD44 mRNA expression with clinical pathology characteristics of NSCLC patients

Characteristic	n	MCT1			CD147			CD44		
		ΔCt	t/F	P	ΔCt	t/F	P	ΔCt	t/F	P
Gender			t=0.209	0.654		t=0.475	0.637		t=0.435	0.714
Male	39	6.58±2.17			5.63±1.43			3.20±2.12		
Female	17	6.87±2.02			5.41±1.76			2.88±2.02		
Age (year)			t=0.796	0.430		t=-0.253	0.801		t=0.642	0.432
<60	31	6.91±2.52			5.52±1.66			3.06±1.42		
≥60	25	6.37±2.48			5.63±1.36			3.14±1.77		
Smoke			t=-0.546	0.587		t=-0.627	0.533		t=0.420	0.534
Yes	32	6.51±2.77			5.46±1.34			2.35±2.02		
No	24	6.88±2.11			5.72±1.75			4.10±2.03		
Tumor size d/cm			F=1.579	0.854		F=0.160	0.853		F=0.816	0.411
≤3	17	6.90±1.65			5.39±1.69			4.11±2.02		
3-5	22	7.18±2.49			5.66±1.39			2.47±2.12		
>5	17	5.78±3.04			5.64±1.57			2.90±1.54		
Histological type			t=2.214	0.031		t=2.242	0.021		t=2.126	0.027
Squamous carcinoma	26	6.21±2.33			5.12±1.06			2.67±2.10		
Adenocarcinoma	30	7.06±1.76			5.96±1.32			3.47±2.14		
Degree of differentiation ^a			t=2.450	0.017		t=-0.429	0.517		t=2.546	0.021
Moderate and poor	30	5.66±2.11			5.54±1.23			3.13±2.04		
High	16	8.56±2.02			5.62±1.96			3.04±1.13		
Lymph node metastasis			t=2.075	0.043		t=2.166	0.036		t=5.125	0.020
Yes	21	5.80±2.21			5.11±0.36			3.34±1.03		
No	35	7.18±2.48			5.84±1.43			2.95±1.63		
pTNM stage			F=3.552	0.127		F=0.384	0.683		F=3.221	0.213
I	24	7.18±1.65			5.39±1.62			4.22±1.22		
II	14	5.25±2.24			5.84±1.48			1.78±2.55		
III-IV	18	7.09±2.12			5.59±1.46			2.63±1.69		

^a: Differentiation analysis was not done in some case due to small size of the tumor specimens. NSCLC: Non-small cell lung cancer; MCT1: Monocarboxylate transporter 1

3 讨论

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率居恶性肿瘤的首位。在肺癌各类型中,NSCLC 所占比例高达 80%^[5]。肿瘤细胞常通过糖酵解产生 ATP,而糖酵解过程中必然产生乳酸,如果乳酸的外运和生成不能同步,乳酸则在细胞内堆积,引起细胞内的 pH 值下降,从而导致肿瘤细胞内酸化和出现凋亡。国外的相关研究报道,在不同的

实体肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、直肠癌等组织中, MCTs 尤其是 MCT1 存在着高表达,且表达于肿瘤细胞膜,它在转运乳酸过程中起着重要作用^[6]。肿瘤细胞通过 MCT 转运乳酸到癌旁组织来维持活性,从而调节细胞内 pH 值。在肿瘤微环境乳酸增加的情况下,瘤周细胞毒性 T 细胞的功能被阻断^[7],从而使未被抑制的肿瘤细胞生长。Sonveaux 等^[8]研究发现抑制 MCT1 活性可杀死肿瘤细胞。但是 MCT1 必须依靠细胞膜上 CD147 的引导才能

进入胞膜正确表达位点,保证 MCT1 乳酸通道跨过细胞膜以正确构建并行使转运功能^[9],可见 CD147 是 MCT1 进行乳酸转运和维持细胞内环境必不可少的伙伴和保证。同时 CD147 的表达同样取决于 MCT1 的表达^[10-11]。有研究报道 CD147 在恶性肿瘤细胞膜上有较强的表达,但在正常组织上几乎没有表达^[12]。CD44 作为一种黏附分子,与恶性肿瘤的发生、发展、浸润及转移密切相关,参与肿瘤的免疫逃逸^[13],研究发现其与 MCT1 均在肿瘤细胞膜有表达,且参与肿瘤细胞的乳酸胞外转运过程^[3]。

本研究通过实时荧光定量 RT-PCR 对 56 例 NSCLC 患者的癌及癌旁组织、20 例肺良性病变组织和 7 例正常肺组织的 MCT1、CD147、CD44 mRNA 表达进行检测并分析三者间的相关性,结果显示:在 NSCLC 组织中 MCT1、CD147、CD44 mRNA 的表达量较癌旁组织、肺良性病变和正常肺组织升高,且与肿瘤组织类型(P 均 <0.05)和淋巴结转移(P 均 <0.05)有关,但与性别、年龄、是否吸烟、肿瘤大小、pTNM 分期无关。同时 MCT1、CD44 mRNA 表达量还与肿瘤的分化程度有关(P 均 <0.05),分化程度越低其表达量越高。三者癌组织中的表达具有相关性($P<0.05$)。本研究结果提示随着恶性肿瘤细胞的恶性程度加深,其糖酵解代谢方式也逐步增强,为适应肿瘤细胞的能量代谢所需要的 MCT1 的表达量明显升高,以排除细胞内因为糖酵解增强而增加的乳酸代谢产物,保持细胞内外 pH 值的稳定。在食管鳞状细胞癌、乳腺癌和卵巢癌等肿瘤中 CD147、CD44 作为一种与恶性肿瘤侵袭力密切相关的因子,参与肿瘤的转移与浸润,并且与肿瘤的预后有关。随着肿瘤的恶性程度增加,CD147、CD44 表达量呈现增加趋势,使上调的 MCT1 维持正常功能^[4]。但本研究仅进行了组织中 mRNA 表达的定量检测,虽统计学分析表明三者之间的表达具有相关性,但尚不能完全确认这三者之间的相关性一定存在,仍需要进一步研究。

综上所述,本研究初步揭示了 MCT1、CD147、CD44 mRNA 在 NSCLC 患者癌组织中的表达相关性,为进一步研究三者间关系提供了理论支持。三者的结合可能使肿瘤细胞能够适应缺氧环境,有利于肿瘤细胞的增殖和分化,从原位癌转变为浸润癌,逃避机体对肿瘤细胞的免疫作用。如果能够阻断通过此通路进行的乳酸转运,就会使得肿瘤细胞因细胞内高 pH 环境而死亡,减少肿瘤细胞的转移,降低其恶性度,提高患者生存率。因此,MCT1、CD147、CD44 通路有望成为一个新的控制肿瘤生长及淋巴

转移的靶点,其可能成为检测 NSCLC 恶性程度和淋巴转移及评估预后的重要分子指标。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Halestrap A P, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond[J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447: 619-628.
- [2] Lacono K T, Brown A L, Greene M I, Saouaf S J. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology [J]. *Exp Mol Pathol*, 2007, 83: 283-295.
- [3] Slomiany M G, Grass G D, Robertson A D, Yang X Y, Maria B L, Beeson C, 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: 1293-1301.
- [4] Fliers E, Alkemade A, Wiersinga W M, Swaab D F. Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease[J]. *Prog Brain Res*, 2006, 153: 189-207.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006[J]. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56: 106-130.
- [6] Pinheiro C, Reis R M, Ricardo S, Longatto-Filho A, Schmitt F, Baltazar F. Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44 [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 427694-427700.
- [7] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells[J]. *Blood*, 2007, 109: 3812-3819.
- [8] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin M C, Verrax J, Rabbani Z N, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3930-3942.
- [9] Kirk P, Wilson M C, Heddle C, Brown M H, Barclay A N, Halestrap A P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 3896-3904.
- [10] Gallagher S M, Castorino J J, Wang D, Philp N J. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 4182-4189.
- [11] Deora A A, Philp N, Hu J, Bok D, Rodriguez-Boulan E. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16245-16250.
- [12] Baba M, Inoue M, Itoh K, Nishizawa Y. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 111-116.
- [13] Cichy J, Kulig P, Puré E. Regulation of the release and function of tumor cell-derived soluble CD44[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1745: 59-64.