

SNAT1 在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系*

350025 福州 南京军区福州总医院肿瘤科

房文铮, 洪峻峰¹, 吴淡森, 于娜英, 林少琴, 余宗阳, 欧阳学农²

【摘要】目的 探讨人钠耦合中性氨基酸转运蛋白 1 (SNAT1) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达及其临床意义。**方法** 构建含 98 例 NSCLC 组织芯片, 免疫组化检测 NSCLC 组织和癌旁正常组织中 SNAT1 蛋白的表达, 分析其表达与 NSCLC 临床病理特征及患者生存之间的关系。构建 sh-SNAT1 表达载体质粒转染肺癌 A549 细胞, 分别用 MTT 法和克隆形成实验检测敲除 SNAT1 表达后其增殖能力的变化。**结果** NSCLC 组织中 SNAT1 阳性表达率为 53.1% (52/98), 而癌旁正常组织中不表达。NSCLC 组织中 SNAT1 表达与淋巴结转移、分期和分化程度均呈正相关, 其中 SNAT1 蛋白阳性表达患者的中位总生存时间为 23.3 个月, 明显低于阴性表达者的 40.5 个月 ($P < 0.001$)。敲除 SNAT1 表达时 NSCLC 细胞的增殖能力显著减弱。**结论** SNAT1 在 NSCLC 发生发展过程中过度活化, 是评估 NSCLC 患者预后的重要指标之一。

【关键词】 非小细胞肺癌; SNAT1; 预后

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2014)02-0128-04

Expression of SNAT1 in non-small cell lung cancer and its relationship with prognosis

FANG Wenzheng, HONG Junfeng, WU Dansen, YU Naying, LIN Shaoqin, YU Zongyang, OUYANG Xuenong.
Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: OUYANG Xuenong E-mail: oyxn@public.fz.fj.cn

【Abstract】 Objective To detect SNAT1 protein expression and determine its clinical significance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Tissue microarray blocks containing 98 NSCLC tumor specimens were constructed. Expression of SNAT1 in NSCLC specimens and adjacent cancer tissues was analyzed using immunohistochemistry. A549 cells were transfected with plasmid vector which expressed sh-SNAT1. MTT assay and cloning formation assay were used to detect proliferation of A549 cells which were knocked down SNAT1 expression. **Results** The positive expression of SNAT1 was 53.1% in NSCLC, while SNAT1 wasn't expressed in adjacent cancer tissues. SNAT1 expression was significantly associated with lymph node metastasis, tumor stage and differentiation. Patients with SNAT1 positive expression had significantly shorter survival time than those with SNAT1 negative expression (23.3 vs. 40.5 months, $P < 0.001$). Downregulating expression of SNAT1 led to the inhibition of cell growth. **Conclusion** SNAT1 expression significantly increased with the progression of NSCLC, suggesting the importance of SNAT1 as a potential biomarker in predicting the outcome of patients with NSCLC.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer (NSCLC); SNAT1; Prognosis

肺癌是世界上最严重的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率呈增高趋势, 已成为癌症相关死亡的首要病因^[1]。深入研究非小细胞肺癌 (NSCLC) 的发病机制, 有助于提高 NSCLC 的诊疗效果和预后评估。人钠耦合中性氨基酸转运蛋白 1 (SNAT1) 在肿瘤的能量代谢中发挥了重要作用, 其在多种肿瘤中高表达, 且与疾病进展相关, 但在 NSCLC 中的研究鲜有报道。

本研究从蛋白水平检测 SNAT1 在 NSCLC 中的表达及其与临床病理特征和预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 组织标本 收集南京军区福州总医院 2006 年至 2008 年的 98 例 NSCLC 手术后的标本, 构建含有 NSCLC 原发灶和部分对应癌旁正常组织的组织芯

* 基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2010J01219)

2 通讯作者, E-mail: oyxn@public.fz.fj.cn

1 350025 南京军区福州总医院超声诊断科

片。其中男性 70 例,女性 28 例;≤60 岁 50 例,>60 岁 48 例,中位年龄 60 岁;腺癌 85 例,鳞癌 13 例。患者均未行术前放化疗,并签署知情同意书。病理诊断结果由两名以上病理医师确认。

1.2 试剂 兔抗 SNAT1 (ab59721) 抗体(稀释比例:1:100)购自 Abcam 公司。SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新公司。采用 SP 法免疫组化染色,PBS 替代一抗作阴性对照。

1.3 结果判定 SNAT1 阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色,定位于细胞浆或细胞膜。采用二级计分法,(1)阳性细胞计数:根据阳性细胞所占 5 个以上高倍镜视野比例,5%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分,>75%计 4 分。(2)染色强度分为:淡黄色计 1 分,黄或深黄色计 2 分,褐或棕褐色计 3 分。两者计分相乘得分≥2 定义为阳性。

1.4 细胞培养和转染

1.4.1 细胞培养 人肺癌 A549 细胞株购自上海中科院细胞所,采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。

1.4.2 sh-SNAT1 转染 A549 细胞 sh-SNAT1 表达载体由上海吉凯公司构建,按照 LipofectAmine 2000 说明书进行:生长良好的 A549 细胞于转染前 24h 接种于六孔板中,使其在转染时达到 85%~90%;无血清无抗生素 DMEM 分别稀释质粒和 LipofectAmine 2000;室温放置 5min 后将两者混匀,放置 20min;将混合物加入 A549 细胞中,37℃ 孵育 6h,更换完全 DMEM 培养基继续培养;24h 消化传代,部分用于蛋白提取,部分用于细胞增殖和克隆形成实验。

1.4.3 Western blotting 检测 从液氮中取出组织样本,研钵碾碎,加入蛋白裂解液,冰上裂解 10min 后,移入 1.5ml 移液管,4℃ 超速离心 30min,吸取上清,以 BCA 法行蛋白定量。10.5%SDS-PAGE 胶分离蛋白样品,250mA 电转移 2h 至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉封闭 1h;TBST 稀释 SNAT1 一抗(1:1000),4℃ 过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10min,TBST 稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5000)室温 1h,洗膜 3 次,ECL 显色。

1.4.4 MTT 检测 A549 细胞转染 sh-SNAT1 24h 后,胰酶消化计数,按每孔 1×10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板,设为转染组;将相同条件下未转染的 A549 细胞设为对照组。每组设 6 个平行孔,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。用 MTT 法分别检测 24、48、72h 转染 sh-SNAT1 的 A549 细胞的增殖情况。

MTT 法检测主要步骤:每孔加 5mg/ml MTT 10μl,继续培养 4h 弃去培养液,每孔加 150μl DMSO,振荡后用酶标仪 570nm 处测吸光值(A),取 6 孔平均数,以时间为横坐标,A 值为纵坐标绘图。

1.4.5 克隆形成实验 A549 细胞转染 sh-SNAT1 24h 后,胰酶消化计数,按每孔 2000 个细胞接种于 6 孔培养板,每组设 3 个平行孔,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。待肉眼可见克隆形成时终止培养,甲醇固定 15min,结晶紫染色 15min,流水冲洗后风干,显微镜下计算>50 个细胞为 1 个克隆。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行处理,计量资料行 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

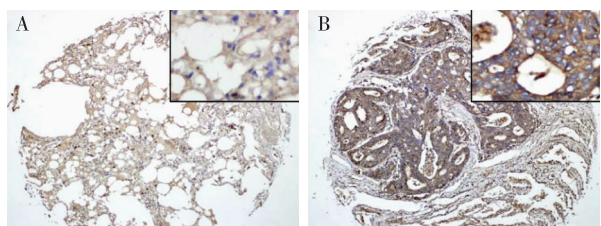
2 结果

2.1 SNAT1 在 NSCLC 和癌旁组织中的表达 成功构建两张组织芯片,共含有 98 例 NSCLC 组织和 50 例癌旁正常组织。SNAT1 呈淡黄至棕黄色,癌旁组织中不着色或呈微弱着色(图 1A),NSCLC 中呈弥漫、片状分布(图 1B),NSCLC 中 SNAT1 阳性表达率为 53.1%(52/98)。

2.2 SNAT1 与临床病理特征的关系 SNAT1 表达与性别、年龄无关,而与淋巴结转移、分期和分化程度有关(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 SNAT1 与 NSCLC 临床病理特征之间的关系 [例(%)]

| 临床病理参数 | <i>n</i> | SNAT1+ | χ^2 | <i>P</i> |
|--------|----------|----------|----------|----------|
| 年龄(岁) | | | 0.063 | 0.849 |
| ≤60 | 50 | 27(54.0) | | |
| >60 | 48 | 25(52.1) | | |
| 性别 | | | 3.446 | 0.063 |
| 男 | 70 | 33(47.1) | | |
| 女 | 28 | 19(67.9) | | |
| 淋巴结转移 | | | 4.666 | 0.031 |
| 无 | 30 | 11(30.6) | | |
| 有 | 68 | 41(60.3) | | |
| 组织学分型 | | | 1.573 | 0.21 |
| 腺癌 | 85 | 43(50.6) | | |
| 鳞癌 | 13 | 9(69.2) | | |
| 分化程度 | | | 6.142 | 0.013 |
| 高、中 | 74 | 34(45.9) | | |
| 低、未 | 24 | 18(75.0) | | |
| TNM 分期 | | | 6.562 | 0.01 |
| I/II | 14 | 3(21.4) | | |
| III/IV | 84 | 49(58.3) | | |



A: 癌旁组织阴性表达; B: 癌组织阳性表达

图 1 SNAT1 在 NSCLC 和癌旁组织中的表达 (SP ×40、×400)

2.3 生存分析 单因素分析显示, SNAT1 阳性表达患者的中位总生存时间为 23.3 个月, 阴性患者为 40.5 个月 ($P < 0.001$)。此外, 组织分化程度(高、中分化 vs. 低、未分化; 35 vs. 21 个月, $P = 0.01$)、淋巴结转移(有 vs. 无; 28.5 vs. 39.3 个月, $P = 0.041$)和 TNM 分期(I/II vs. III/IV; 52.4 vs. 28.2 个月, $P < 0.001$)也与 NSCLC 患者的预后相关。Cox 多因素分析显示, 分化程度和 TNM 分期是判断 NSCLC 患者预后的独立因素。见表 2、图 2。

2.4 SNAT1 表达下降对肺癌 A549 细胞增殖的影响 A549 细胞转染 sh-SNAT1 质粒后, 经 Western blotting 检测 SNAT1 表达下降。MTT 法检测 24、48 和

表 2 影响 NSCLC 预后的 Cox 多因素分析

| 因素 | B | RR (95.0%CI) | P |
|----------|-------|------------------|------|
| 淋巴结转移 | -0.23 | 0.80 (0.44~1.45) | 0.46 |
| 分化程度 | -0.60 | 0.55 (0.30~0.99) | 0.05 |
| TNM 分期 | -1.99 | 0.14 (0.03~0.58) | 0.01 |
| SNAT1 表达 | -0.45 | 0.64 (0.36~1.12) | 0.12 |

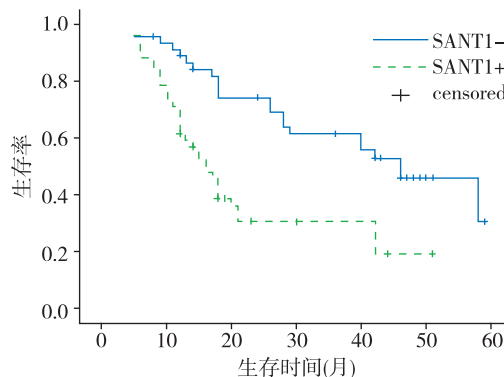
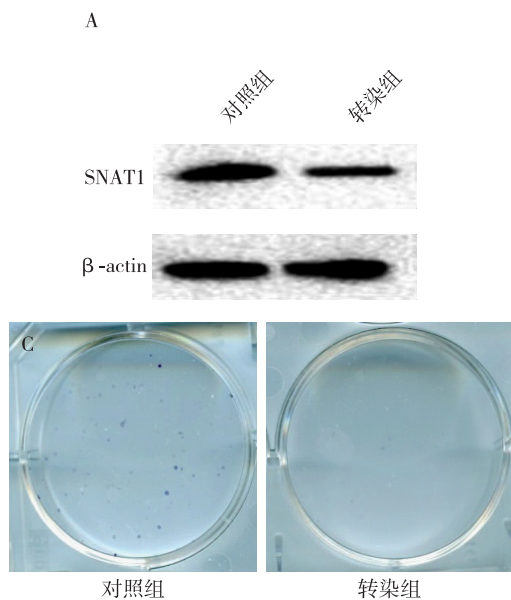


图 2 不同 SNAT1 表达患者的生存时间

72h 转染后 A549 细胞的增殖情况发现, SNAT1 能够明显抑制肺癌细胞的增殖。克隆形成实验显示, 转染 sh-SNAT1 的 A549 细胞的克隆形成能力较对照组下降约 40%。见图 3。



A: 转染组和对照组的 SNAT1 蛋白表达; B: 转染组和对照组的细胞增殖情况; C: 转染组和对照组的克隆形成率

图 3 下调 SNAT1 表达对肺癌 A549 细胞增殖及克隆能力的影响

3 讨论

近年来研究显示, 氨基酸转运子在许多生命活

动, 如能量代谢、解毒、神经递质传输和哺乳动物细胞恶性转化中发挥了重要作用。在恶性肿瘤研究中, 对 L 型氨基酸转运载体 (LAT) 的研究较为深入。

LAT 家族包括 LAT1、LAT2、LAT3 和 LAT4, 目前研究较多的是 L 型氨基酸转运载体 1 (LAT1)。LAT1 是 Na⁺ 非依赖型载体, 主要转运大分子中性氨基酸^[2]。其在大脑、肝脏、骨髓等组织和癌细胞中大量表达^[3]。研究表明, LAT1 对恶性肿瘤增殖具有重要的作用^[1,4]。LAT1 在多种实体瘤, 如卵巢癌、NSCLC 中高表达, 且与肿瘤恶性生物学行为和预后相关^[5]。系统 A 氨基酸转运子 (system A amino acid transporter) 在恶性肿瘤的研究较少, 但研究显示其在胶质瘤、肝癌和胆管癌中表达升高^[5-7]。

系统 A 氨基酸转运子有 3 个成员, 其中 SNAT1 (ATA1/SLC38A1) 与肿瘤更为密切, 本研究首次系统检测了 SNAT1 蛋白在国人 NSCLC 中表达情况, 并分析了其与预后关系。正常组织中 SNAT1 基本不表达或呈微弱表达, 而 NSCLC 组织中 SNAT1 蛋白表达显著升高, 阳性表达率为 53.1%。进一步分析发现, SNAT1 表达与肿瘤的恶性生物学行为密切相关。淋巴结转移和 TNM 分期反映了疾病的侵袭性和进展程度, 本研究显示伴淋巴结转移的 NSCLC 患者中 SNAT1 的阳性表达率为 71.2%, 显著高于无淋巴结转移患者的 53.1%。此外, 随病程进展, SNAT1 表达逐步升高, III 和 IV 期中 SNAT1 阳性表达率高达 58.3%, 而 I 和 II 期为 21.4%。结果与 Yu 等^[7]在胆管癌中的研究较为一致, 正常胆管上皮中 SNAT1 无表达, 而肿瘤组织中的表达率为 44.9%, 且其过表达与淋巴结转移相关。上述研究表明 SNAT1 的异常活化参与了 NSCLC 的发生和进展。

Yu 等^[7]研究显示, SNAT1 过表达的胆管癌患者更易复发, 预后差。本研究单因素生存分析显示 SNAT1 阳性表达的 NSCLC 患者的总生存期 < 2 年, 而阴性表达患者 > 3 年, 但 Cox 多因素分析显示 SNAT1 不是影响预后的独立因素。考虑许多因素影响肺癌患者的预后, 例如患者的机体状态、手术和病理等因素, 以及一些分子生物学标志物^[8-10], 因而, 判断 SNAT1 能否应用于临床还需要大样本前瞻性研究加以验证, 并结合其他影响肺癌患者预后的因素进行综合判断。

为了进一步验证 SNAT1 在肺癌发生过程中的重要性, 我们通过 sh-SNAT1 质粒转染肺癌 A549 细胞, 发现转染组 SNAT1 表达下降, 转染组 A549 细胞

的增殖能力明显下降, 同时克隆形成能力也受到了显著抑制, 提示 SNAT1 参与了肺癌细胞的增殖。这一结果与 Kondoh 等^[4]在肝癌中的研究类似, 下调 SNAT1 的表达能够部分抑制肝癌细胞的增殖。由此表明, SNAT1 很可能参与了 NSCLC 的发生和发展, 是肺癌潜在的治疗靶点。

综上所述, SNAT1 与 NSCLC 的淋巴结转移、疾病进展和预后显著相关, 并影响肺癌 A549 细胞的增殖能力, 提示 SNAT1 在 NSCLC 的发生和发展中起到了重要作用, 但具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1514(2): 291-302.
- [3] Asano S, Kameyama M, Oura A, et al. L-type amino acid transporter-1 expressed in human astrocytomas, U343MGa [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(3): 415-422.
- [4] Kondoh N, Imazeki N, Arai M, et al. Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues[J]. Int J Oncol, 2007, 31(1): 81-87.
- [5] Kaira K, Oriuchi N, Takahashi T, et al. LAT1 expression is closely associated with hypoxic markers and mTOR in resected non-small cell lung cancer[J]. Am J Transl Res, 2011, 3(5): 468-478.
- [6] Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, et al. Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas [J]. Neuroreport, 2004, 15(4): 575-578.
- [7] Yu WL, Cong WM, Zhang Y, et al. Overexpression of ATA1/SLC38A1 predicts future recurrence and death in Chinese patients with hilar cholangiocarcinoma [J]. J Surg Res, 2011, 171(2): 663-668.
- [8] Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, et al. Proteomic biomarkers in lung cancer [J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15: 671-682.
- [9] Zamani AG, Zamani A. MicroRNAs and lung cancer [J]. Tuberk Toraks, 2013, 61(1): 57-62.
- [10] Kwon MJ, Seo J, Kim YJ, et al. Prognostic significance of CD151 overexpression in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2013, 81(1): 109-116.

收稿日期: 2013-09-11; 修回日期: 2013-11-15