

SLC1A5 协同 TM4SF1 通过 mTOR 信号通路 调控食管鳞癌细胞迁移

胡效林^{1,2}, 郝鑫³, 李文倩^{1,2}, 赵恬恬^{1,2}, 侯思聪¹

(1. 扬州大学附属医院 消化内科, 江苏 扬州, 225001; 2. 扬州大学医学院 临床医学系, 江苏 扬州, 225001;
3. 江苏省宝应县人民医院 消化内科, 江苏 宝应, 225800)

摘要: **目的** 探讨氨基酸转运载体溶质载体家族 1 成员 5 (SLC1A5) 在食管鳞癌 (ESCC) 中的表达及其与临床病理特征的相关性, 以及 SLC1A5 对 ESCC 细胞迁移的影响及潜在分子机制。 **方法** 采用 TNM plot 在线数据库分析 SLC1A5 基因在 ESCC 组织和正常组织中的表达情况。通过实时定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测 ESCC 组织和癌旁组织中 SLC1A5 mRNA 表达情况; 采用免疫组化 (IHC) 法检测 SLC1A5 蛋白表达情况, 并分析其与患者临床病理资料的相关性。分别构建 SLC1A5 过表达 (SLC1A5-OE 组)、四跨膜蛋白超家族成员 1 过表达 (TM4SF1-OE 组)、SLC1A5 和 TM4SF1 共同过表达的 Eca109 细胞。采用细胞增殖试验、Transwell 实验检测 Eca109 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。通过免疫共沉淀 (IP) 实验证实 SLC1A5 和 TM4SF1 的相互作用; 采用蛋白质免疫印迹 (WB) 法检测哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路相关蛋白的表达水平。 **结果** TNM plot 数据库分析显示, ESCC 组织中 SLC1A5 基因表达水平高于正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ESCC 组织中 SLC1A5 mRNA 表达高于成对的癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。IHC 结果显示, SLC1A5 蛋白在癌组织中高表达, 并且与临床分期 ($P = 0.036$)、淋巴结转移 ($P = 0.029$) 显著相关。细胞增殖实验结果显示, SLC1A5-OE 组和对照细胞 (Con 组) 增殖能力比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Transwell 实验结果显示, 与 Con 组比较, SLC1A5-OE 组细胞迁移及侵袭能力增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。IP 结果表明, SLC1A5 与 TM4SF1 存在相互作用。WB 结果显示, 相对于 SLC1A5-OE 组或 TM4SF1-OE 组, p-mTOR、p-S6 蛋白表达水平在 SLC1A5 和 TM4SF1 共同过表达的细胞中最高。Transwell 实验证实, 共同过表达 SLC1A5 和 TM4SF1 的 ESCC 细胞迁移能力最强。 **结论** ESCC 中 SLC1A5 呈高表达, 且与患者临床分期、淋巴结转移显著相关, SLC1A5 可能通过与 TM4SF1 相互作用, 激活 mTOR 信号通路, 进而促进 ESCC 细胞迁移。

关键词: 氨基酸转运载体溶质载体家族 1 成员 5; 四跨膜蛋白超家族成员 1; 食管鳞癌; 转移; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路

中图分类号: R 735.1; R 446 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353 (2023) 14-033-07 DOI: 10.7619/jcmp.20230772

SLC1A5 combined with TM4SF1 regulates the migration of esophageal squamous cell through mTOR signaling pathway

HU Xiaolin^{1,2}, HAO Xin³, LI Wenqian^{1,2}, ZHAO Tiantian^{1,2}, HOU Sicong¹

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001;
2. Department of Clinical Medicine, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001;
3. Department of Gastroenterology, Baoying County People's Hospital of Jiangsu Province, Baoying, Jiangsu, 225800)

Abstract: **Objective** To explore the expression of amino acid transporters solute carrier family-1 member-5 (SLC1A5) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its correlation with clinicopathological features, and investigate the potential molecular mechanisms of SLC1A5 in ESCC metastasis. **Methods** The expression of SLC1A5 gene in ESCC and normal tissues was analyzed by TNM plot online database. The SLC1A5 mRNA expression in ESCC and paracancer tissues was examined by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR); the protein expression of SLC1A5 was detected by immunohistochemistry (IHC) and the correlations between SLC1A5 and clinic pathological characteristics in patients were analyzed; SLC1A5 overexpression (SLC1A5-OE group), transmembrane-4

L-six family member-1 overexpression (TM4SF1-OE group), SLC1A5 and TM4SF1 co-overexpression Eca109 cells were constructed respectively. Cell proliferation test and Transwell test were used to detect the proliferation, migration and invasion ability of Eca109 cells. The interaction between SLC1A5 and TM4SF1 was confirmed by immunoprecipitation (IP) assays; the expression level of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway-related protein was detected by Western blot (WB). **Results** TNM plot database analysis showed that the expression level of *SLC1A5* gene in the ESCC tissues was significantly higher than that in the normal tissues ($P < 0.05$). The expression of *SLC1A5* mRNA in ESCC tissues was significantly higher than that in paired para-cancerous tissues ($P < 0.01$). IHC results showed that SLC1A5 protein was highly expressed in cancer tissues, and was significantly correlated with clinical stage ($P = 0.036$) and lymph node metastasis ($P = 0.029$). The results of cell proliferation experiment showed that there was no significant difference in proliferation ability between the SLC1A5-OE group and control group (Con group) ($P > 0.05$). The results of Transwell experiment showed that compared with the Con group, the cell migration and invasion ability of the SLC1A5-OE group were significantly enhanced ($P < 0.01$). The IP results showed that SLC1A5 interacted with TM4SF1. WB results showed that the expression levels of p-mTOR and p-S6 proteins were the highest in the cells co-overexpressing SLC1A5 and TM4SF1, relative to the SLC1A5-OE group or TM4SF1-OE group. Transwell experiment confirmed that ESCC cells overexpressing SLC1A5 and TM4SF1 had the strongest migration ability. **Conclusion** SLC1A5 is highly expressed in ESCC, and is significantly correlated with clinical stage and lymph node metastasis of patients. SLC1A5 may activate mTOR signaling pathway through interaction with TM4SF1, thus promoting ESCC cell migration.

Key words: amino acid transporters solute carrier family-1 member-5; transmembrane-4 L-six family member-1; esophageal squamous cell carcinoma; metastasis; mammalian target of rapamycin signaling pathway

食管癌是全球主要恶性肿瘤之一,致死率在肿瘤性疾病中居第 6 位,中国是食管癌高发地区,主要的病理类型是鳞状细胞癌(ESCC),食管癌患者的 5 年生存率仅为 15% ~ 20%^[1]。因此,鉴定 ESCC 转移过程的关键分子并探索潜在机制,将为临床寻找新的干预靶点提供科学参考。氨基酸转运载体溶质载体家族 1 成员 5(SLC1A5)是一种以谷氨酰胺为底物、Na⁺ 依赖性的中性氨基酸转运蛋白^[2],可介导细胞对中性氨基酸的摄取,目前已被证明^[3-5]在肺癌、卵巢癌、结肠癌等多种上皮来源的恶性肿瘤中高表达。既往研究^[6]表明,SLC1A5 主要通过胞内转运谷氨酰胺及正向调控转录因子参与恶性肿瘤的侵袭、转移。此外,SLC1A5 还可以与衔接因子相关蛋白复合物 1γ1 亚基 (APIG1)、表皮生长因子受体 (EGFR) 形成异源三聚体复合物,通过增强癌细胞对谷氨酰胺的摄取,上调细胞内谷胱甘肽水平,促进细胞增殖。

本课题组前期质谱结果^[7]发现,SLC1A5 是

四跨膜蛋白超家族成员 1(TM4SF1)的潜在相互作用蛋白。TM4SF1 主要通过整合素、受体酪氨酸激酶(RTKs)等蛋白相互作用形成的富含四跨膜蛋白的微结构域(TEMs)介导肿瘤黏附、侵袭和迁移^[8]。因此,本课题推测 SLC1A5 可能通过与 TM4SF1 相互作用参与 ESCC 转移。本研究检测 SLC1A5 在 ESCC 中的表达情况,分析其与临床病理资料的相关性,旨在探索 SLC1A5 参与调控 ESCC 细胞转移的分子机制。

1 资料与方法

1.1 组织标本

收集扬州大学附属医院 2012 年 12 月—2015 年 12 月收治的 84 例 ESCC 术后标本,所有癌组织及癌旁正常组织石蜡切片均取自扬州大学附属医院病理科,组织病理已确诊,采用免疫组织化学(IHC)进行标本染色,所有患者具有完整临床资料,术前均未接受放化疗。收集 2019 年 12 月—2020 年 12 月接受手术患者的 18 对新鲜组

组织标本,包括 ESCC 组织和临近的非癌组织(距离癌组织 >5 cm),标本收集后,放于 -80 ℃ 冰箱保存用于后续研究。本研究通过扬州大学医学院伦理委员会审批。

1.2 细胞系和细胞培养

本研究所使用的 ESCC 细胞系(Eca-109)来自中国科学院细胞库。使用含有 10% 胎牛血清(FBS)(杭州天杭生物科技股份有限公司,中国)的 RMPI-1640 培养基培养。HEK293T 用无血清培养基 DMEM 培养。培养条件均为 37℃、5% CO₂ 恒温培养。

1.3 在线数据库分析

使用 TNM plot 在线数据库(<https://www.tnmplot.com/>)比较 161 个 ESCC 组织和 418 个正常组织中 SLC1A5 基因表达水平。

1.4 构建过表达质粒

TM4SF1 的相应过表达质粒来自实验室前期的构建^[7]。SLC1A5 的全长 cDNA 是以 Eca-109 细胞总 cDNA 为模板扩增得到,然后亚克隆到 pDONR201 载体中。随后通过 Gateway 技术将 SLC1A5 的 cDNA 从 pDONR201 载体中置换到 p Lenti-CMV-Puro DEST (w118-1) (Addgene, # 1 752) 或 pLenti-CMV-Hygro DEST (w117-1) (Addgene, #17454) 载体中,从而得到相关慢病毒表达载体。

1.5 构建病毒包装感染以及稳转细胞系

基于慢病毒的 TM4SF1 或 SLC1A5 过表达载体与 pCAG-HIVgp 和 pCMV-VSV-G-RSV-Rey 共同转染至 HEK293T 细胞。转染 48 h 后,收集慢病毒上清液。用所得病毒上清液感染相应细胞 72 h 后,通过潮霉素 B 或嘌呤霉素对细胞进行筛选,最终获得相应抗性的稳转细胞系。

1.6 IHC

取石蜡包埋的标本切片,将组织切片脱蜡和水化,进行高压抗原修复,SLC1A5 一抗(CST,美国,货号#8057,稀释比例 1:150)在 4 ℃ 冰箱孵育过夜,二抗工作液 37 ℃ 孵育 30 min,3,3-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)显色和苏木素复染,最后脱水、透明、封片。SLC1A5 染色结果判读方法如下:阳性细胞数的百分比分 5 个等级,即 0 分(0%)、1 分(>0%~25%)、2 分(>25%~50%)、3 分(>50%~75%)、4 分(>75%~100%);染色强度分 4 个等级,即 0 分(无色)、1 分(淡黄色)、2 分(棕黄色)、3 分(棕色或棕褐色);最终染色分

数=染色强度分数×阳性细胞百分比分数。0~3 分为低表达,4~12 分为高表达。

1.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen,美国)从组织中提取总 RNA,按照制造商说明,使用 iScript cDNA 合成试剂盒(Bio-Rad,美国)对分离的 RNA 进行逆转录,采用 iTaq Universal SYBR Green Kit (Bio-Rad,美国)进行 qRT-PCR。以 GAPDH 为内参基因进行分析。相关引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 相关的引物序列

基因		序列
SLC1A5	正向	5'-TCCTGGAGATGGAGGATGTC-3'
	反向	5'-GGAAGTGAAGAGGTCCCAA-3'
GAPDH	正向	5'-GGAGTCAACGGATTTGGT-3'
	反向	5'-GTGATGGGATTTCATTGAT-3'

1.8 蛋白质免疫印迹(WB)

从收获的细胞中提取总蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒(Pierce,美国)测定蛋白浓度,通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(伯乐系统,美国)分离并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)(Sigma,美国)膜上。在室温下封闭 1 h,一抗在 4 ℃ 下孵育过夜,二抗在室温下孵育 1 h。用 ECL 发光液(Pierce,美国)检测目标蛋白。所用一抗包括:TM4SF1(R&D,美国,货号 AF7514,稀释比例 0.5 μg/mL);SLC1A5, p-mTOR, mTOR, p-S6 和 S6(CST,美国;货号分别为#8057, #2971, #2972, #2211 和#2217;稀释比例均为 1:3 000)以及 β-actin(Santa Cruz Biotechnology,美国,货号#sc-47778,稀释比例 1:1 000)。

1.9 免疫共沉淀(IP)

收集 1 mg(约 1 000 μL)细胞裂解液中,吸取 1/10 上清液(约 100 μL),作为 Input,放入 -20 ℃ 冰箱备用,将剩余上清液加入 100 μL 预处理的 protein A/G 琼脂糖珠(Santa Cruz Biotechnology,美国)中,在 4 ℃ 轮转仪上轮转 30 min,离心后留取上清液,分别加入相应的抗 SLC1A5 抗体(CST,美国,货号#8057,稀释比例 1:75)及 IgG 抗体(Bio-Rad,美国,货号#PRABP01,稀释比例 1:50),4 ℃ 轮转过夜后,新的 100 μL 预处理 protein A/G 琼脂糖珠孵育结合,4 ℃ 轮转孵育 2 h,离心并进行样品处理,最后进行 WB 检测。

1.10 细胞增殖实验

将对应的细胞(3×10⁴ 个)接种到 60 mm 培养皿,培养箱中培养过夜后,更换无血清培养基培

养 24 h, 更换为完全培养基, 并通过显微镜拍照记录后, 计数该视野内的细胞数目。之后每 24 h 拍照记录相同视野的细胞并计数, 共 3 次。统计不同时间点、相同视野内细胞数目以记录细胞增殖情况, 绘制增殖曲线。

1.11 Tranwell 侵袭和迁移实验

使用 24 孔 Transwell 小室 (Corning, 美国) 评价食管癌细胞的侵袭能力。预冷的无血清培养基配制 Matrigel, 按每个小室 100 μL 铺胶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h。消化细胞, 在无菌上室中加入 20 μL 的细胞悬液 (3×10^4 个), 在下室中加入 50 μL 含有 10% FBS 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 12 h, 用镊子小心取出小室, 用甲醇室温固定 30 min, 结晶紫室温染色 15 ~ 30 min, 室温晾干后显微镜下拍照并选取 3 个随机视野计数, 统计结果。迁移实验无需铺胶, 在无菌上室中加入 20 μL 的细胞悬液 (2×10^4 个), 在下室中加入 50 μL 含有 10% FBS 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 8 h 后, 其余步骤参考侵袭实验。

1.12 统计学分析

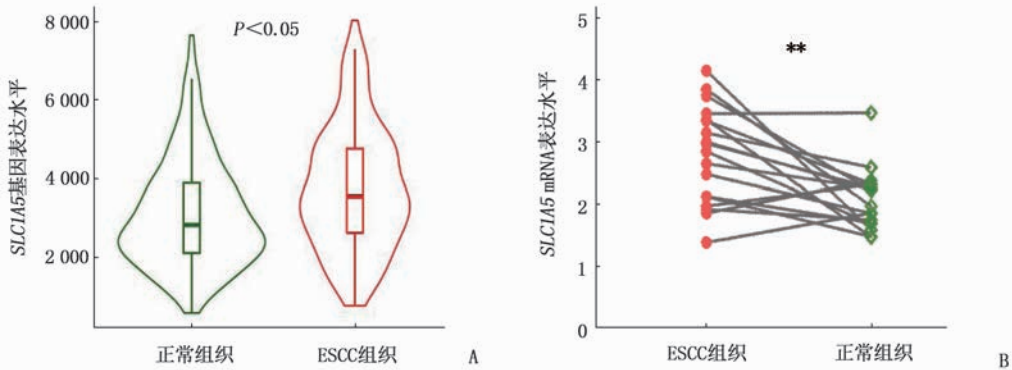
采用 GraphPad Prism5 和 SPSS 16.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 t 检验; 符合偏态分布的

计量资料采用中位数 (四分位间距) 表示, 2 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验; 计数资料结果以 [n (%)] 表示, 组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLC1A5 在 ESCC 组织中的表达情况

通过 TNM plot 在线数据库 (<https://www.tnmplot.com/>) 分析比较 SLC1A5 基因在 ESCC 组织和正常组织中的表达差异, 结果显示, ESCC 组织中的 SLC1A5 基因表达水平高于正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1A。为进一步验证此结果, 本研究提取了新鲜 ESCC 组织及癌旁正常组织中的总 RNA (18 对), 采用 qRT-PCR 对组织中 SLC1A5 表达水平进行分析, 结果显示, ESCC 组织中 SLC1A5 mRNA 水平高于正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1B。此外, 利用 IHC 分析了 84 例 ESCC 组织石蜡切片标本中 SLC1A5 蛋白的表达情况, 结果显示, SLC1A5 蛋白在癌旁组织 (图 2 E、2F、2G、2H) 中的表达水平低于癌组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2 A、2B、2C、2D)。以上结果提示, SLC1A5 在 ESCC 组织中高表达。



A: TNM plot 在线数据库分析比较食管癌组织及正常组织中 SLC1A5 基因表达差异;
B: ESCC 组织和正常组织中 SLC1A5 mRNA 表达差异。与正常组织比较, ** $P < 0.01$ 。

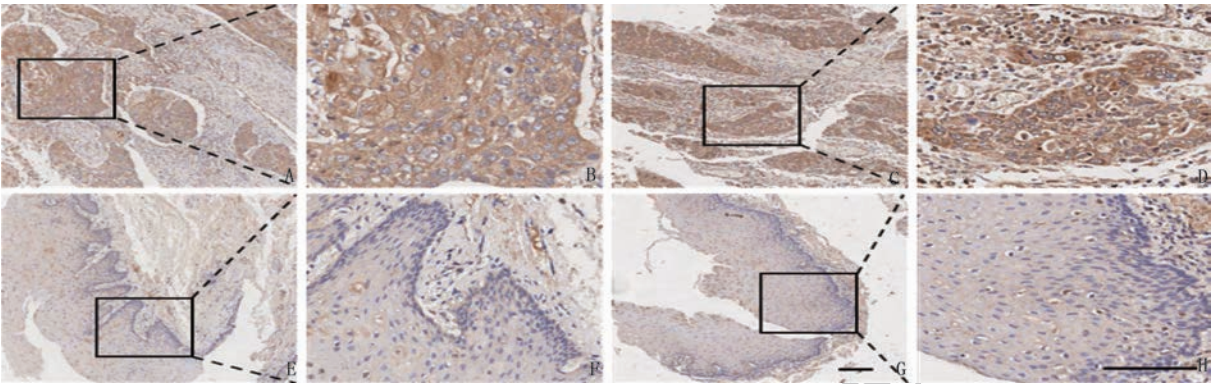
图 1 ESCC 组织中 SLC1A5 mRNA 表达水平

2.2 SLC1A5 表达与临床病理资料的关系

根据上述 IHC 结果中 SLC1A5 的表达情况, 将患者分为 2 组, 即高表达组 (> 3 分, $n = 60$) 和低表达组 (≤ 3 分, $n = 24$), 并分析其表达情况与临床病理资料的相关性, 结果显示, SLC1A5 的表达与患者的临床分期 ($P = 0.036$)、淋巴结转移 ($P = 0.029$) 呈正相关, 与年龄、性别、吸烟史、T 分型、分化程度、肿瘤直径无相关性 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 SLC1A5 表达对 ESCC 细胞增殖、迁移能力的影响

构建外源性 SLC1A5 稳定过表达的 Eca109 细胞 (SLC1A5-OE 组), 利用 WB 验证 SLC1A5 过表达效率, 确保稳转细胞构建成功, 结果显示, 与对照组细胞 (Con 组) 相比, SLC1A5-OE 组细胞 SLC1A5 蛋白表达水平升高, 见图 3A。为进一步研究 SLC1A5 是否与 ESCC 细胞增殖、迁移能力有关, 细胞增殖实验分析结果显示, SLC1A5-OE 组



A、B、C、D: SLC1A5 蛋白在癌组织标本中的 IHC 染色; E、F、G、H: SLC1A5 蛋白在癌旁组织标本中的 IHC 染色。
A、C、E、G 的原始放大倍数为 100 倍, B、D、F、H 的原始放大倍数为 200 倍, 比例尺为 100 μm。

图 2 SLC1A5 在 ESCC 组织标本和癌旁组织标本中 IHC 染色的代表性图片

和 Con 组细胞增殖能力比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 3B; Transwell 实验结果显示,与 Con 组相比, SLC1A5-OE 组细胞迁移和侵袭能力提高,差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 3C。

表 2 SLC1A5 表达和临床病理资料的相关性分析[$n(\%)$]

临床病理特征	分类	<i>n</i>	SLC1A5 表达		χ^2	<i>P</i>
			高表达	低表达		
标本	癌旁组织	84	39 (46.4)	45 (53.6)	10.846	0.001
	ESCC 组织	84	60 (71.4)	24 (28.6)		
年龄	≤ 60 岁	24	17 (70.8)	7 (29.2)	0.006	0.939
	>60 岁	60	43 (71.7)	17 (28.3)		
性别	女	13	9 (69.2)	4 (30.8)	0.036	0.849
	男	71	51 (71.8)	20 (28.2)		
吸烟史	无	31	23 (74.2)	8 (25.8)	0.184	0.668
	有	53	37 (69.8)	16 (30.2)		
临床分期	I ~ II 期	48	30 (62.5)	18 (37.5)	4.375	0.036
	III 期	36	30 (83.3)	6 (16.7)		
T 分型	T1 + T2	37	25 (67.6)	12 (32.4)	0.483	0.487
	T3 + T4	47	35 (74.5)	12 (25.5)		
淋巴结转移	否	51	32 (62.7)	19 (37.3)	4.796	0.029
	是	33	28 (84.8)	5 (15.2)		
分化程度	高分化	18	11 (61.1)	7 (38.9)	1.195	0.274
	中/低分化	66	49 (74.2)	17 (25.8)		
肿瘤直径	<4 cm	29	20 (69.0)	9 (31.0)	0.132	0.717
	≥4 cm	55	40 (72.7)	15 (27.3)		

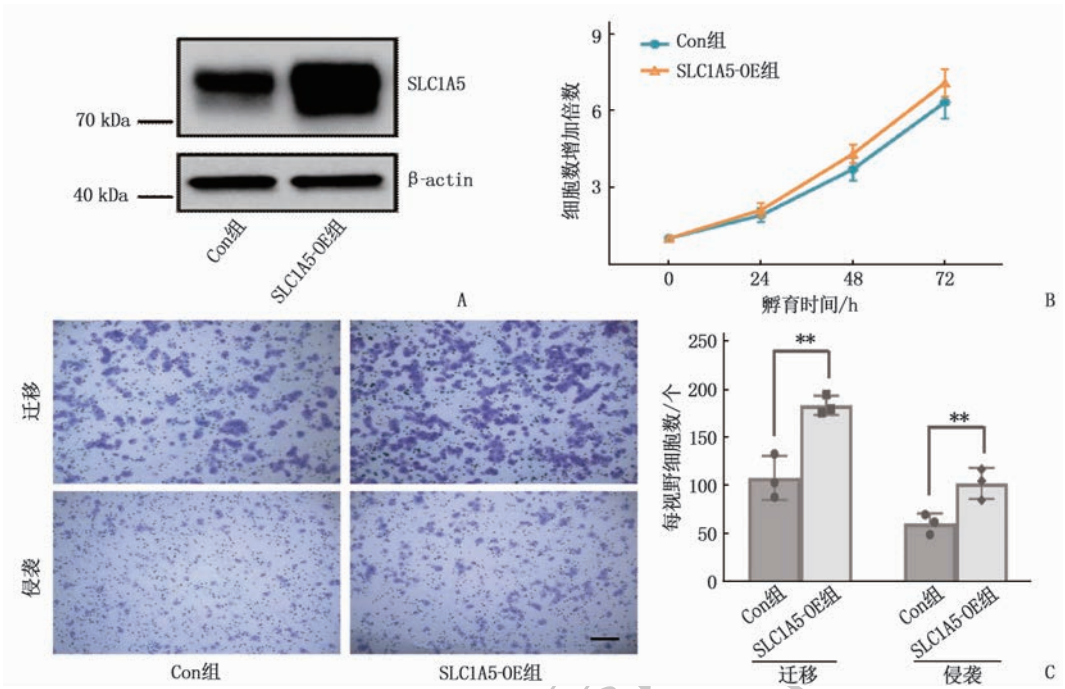
2.4 SLC1A5 与 TM4SF1 存在相互作用

本课题组在前期工作中的质谱分析发现 SLC1A5 是 TM4SF1 的潜在相互作用蛋白^[7], 故本研究首先在 SLC1A5 过表达的 Eca-109 细胞中,通过 IP 验证了其 与 TM4SF1 的相互作用,见图 4。

2.5 SLC1A5-TM4SF1 复合物促进下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路活化及 ESCC 细胞迁移

为进一步研究 SLC1A5-TM4SF1 复合物介导 ESCC 细胞迁移的分子机制,本研究在 Con 组或 SLC1A5-OE 组的 Eca-109 细胞中上调 TM4SF1 表

达,即 TM4SF1 过表达细胞 (TM4SF1-OE 组)、SLC1A5 和 TM4SF1 共表达细胞 (SLC1A5 + TM4SF1 组)。WB 结果显示,与 Con 组相比, TM4SF1-OE 组细胞中 p-mTOR、p-S6 蛋白表达水平升高,在 SLC1A5 + TM4SF1 组中进一步提高,见图 5。对应的 Transwell 实验比较了各组细胞迁移能力,结果显示,与 Con 组相比, TM4SF1-OE 组细胞迁移能力增强;分别与 SLC1A5-OE 组和 TM4SF1-OE 组比较, SLC1A5 + TM4SF1 组细胞迁移能力进一步增强,差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见图 6。



A: WB 验证 SLC1A5 在 Eca-109 细胞中的过表达效率; B: 细胞增殖实验检测 SLC1A5 过表达对 Eca-109 细胞增殖能力的影响; C: Transwell 实验检测 SLC1A5 过表达对 Eca-109 细胞迁移及侵袭能力的影响(比例尺为 50 μ m)。2 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 上调 SLC1A5 表达对 ESCC 细胞增殖、迁移能力的影响

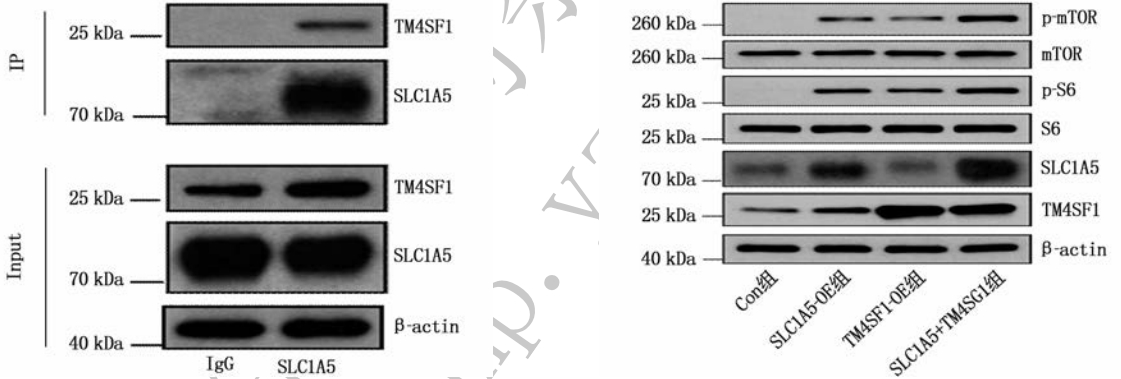
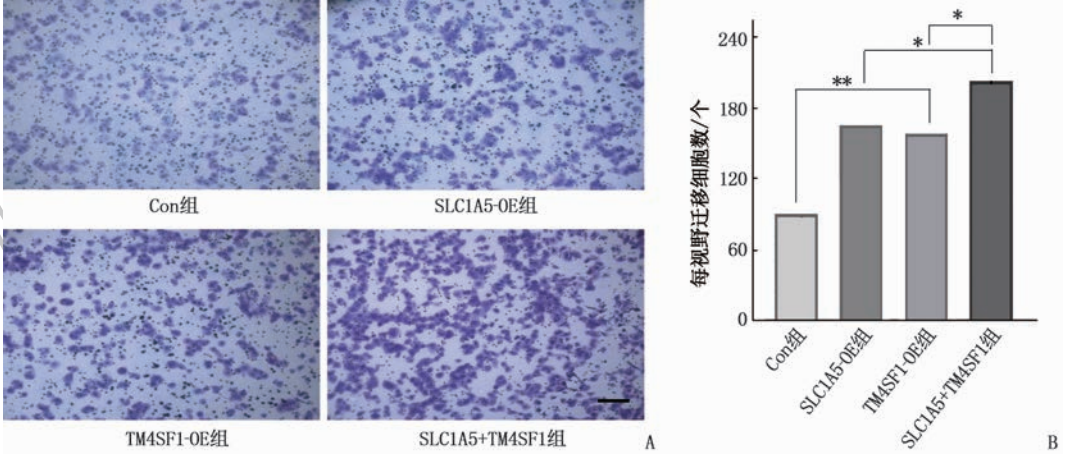


图 4 IP 检测 ESCC 细胞中与 SLC1A5 存在相互作用的膜蛋白

图 5 WB 检测 SLC1A5-TM4SF1 复合物下游关键信号通路转导分子的表达



A: Transwell 实验分别检测过表达 SLC1A5、TM4SF1 及 SLC1A5-TM4SF1 复合物对 Eca-109 细胞迁移能力的影响(比例尺为 50 μ m); B: 分别过表达 SLC1A5、TM4SF1 及 SLC1A5-TM4SF1 复合物对 Eca-109 迁移细胞数的影响。2 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 Transwell 实验检测 SLC1A5-TM4SF1 复合物介导的细胞迁移

3 讨论

随着手术、放疗、化疗、免疫治疗、靶向治疗等技术不断发展, ESCC 的病死率有所下降。但由于复发、转移和不可切除病灶的存在, ESCC 患者 5 年生存率整体较低。因此,探索 ESCC 转移、复发的相关机制,有助于筛选和发掘新的生物标志物及有效的干预靶点^[9]。

TNMplot 是主要基于 TCGA 数据的在线数据库,该数据库详细记录了临床肿瘤患者正常组织、肿瘤组织及转移组织的基因差异性表达。本研究通过 TNMplot 在线数据库分析发现, *SLC1A5* 基因在 ESCC 组织中的表达水平显著高于正常组织,并结合 18 对新鲜组织标本对该结果进行了进一步验证。既往研究^[10]发现, *SLC1A5* 表达的升高与多种上皮恶性肿瘤的发生发展密切相关。在肺癌中, *SLC1A5* 转录受到 MYC 的直接调控,吸入高氧通过抑制 MYC/*SLC1A5* 轴驱动细胞内代谢重编程,抑制谷氨酰胺摄取及肿瘤转移。在裸鼠动物模型^[5]中发现,敲除 *SLC1A5* 显著缩小了结肠腺癌和肺腺癌肿瘤的体积,表明 *SLC1A5* 是调控肿瘤生长的关键分子。此外, *SLC1A5* 可作为微小 RNA-122 (miRNA-122)、miRNA-199 的直接靶标,发挥促进卵巢癌、甲状腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用^[4, 11]。但 *SLC1A5* 在 ESCC 中的表达及临床意义尚不确定,其对 ESCC 细胞生物学功能及机制的研究报道较少。本研究首次通过数据库分析发现, *SLC1A5* 在 ESCC 组织中的表达高于正常组织,后续在配对的 ESCC 和癌旁组织中分别检测 *SLC1A5* mRNA 及其蛋白水平表达情况,证实其在癌组织中呈现高表达。经过对 84 例患者的术后标本分析,发现 *SLC1A5* 高表达与临床肿瘤分期、淋巴结转移呈显著正相关 ($P < 0.05$)。上述结果提示 *SLC1A5* 在 ESCC 中具有促癌作用,其具有作为预测食管癌转移的可靠生物标志物的潜力。

后续的研究发现,在 ESCC 细胞中过表达 *SLC1A5* 可以促进细胞迁移,同时对细胞增殖能力无显著影响。作为一项延续性研究,前期课题组的质谱结果显示, *SLC1A5* 可能是 TM4SF1 的相互作用蛋白,因此推测 *SLC1A5* 可能通过膜功能复合物的形式调控 ESCC 的转移。因此,本研究通过 IP 法验证了在 ESCC 细胞中 *SLC1A5* 与 TM4SF1 二者相互作用的存在,并证明了二者的协同调控在 ESCC 转移中具有重要作用。

SLC1A5 通过 AP1G1 与 EGFR 相互作用,形成 *SLC1A5*-AP1G1-EGFR 异源三聚体复合物,且该复合物在头颈部鳞状细胞癌中是西妥昔单抗的靶点。西妥昔单抗治疗后,以 AP1G1 依赖性方式诱导 *SLC1A5*-EGFR 复合物表达下调,降低癌细胞的谷氨酰胺摄取及细胞内谷胱甘肽水平,从而提高肿瘤细胞对药物的敏感性^[6]。但 TM4SF1 同样作为四跨膜蛋白,既往报道^[12]证实,其可以通过与不同的蛋白质相互作用,形成 TEMS,进而在调节细胞黏附、上皮-间质转化(EMT)、肿瘤血管生成、侵袭伪足生成中发挥重要作用。例如, TM4SF2 与整合素 $\beta 1$ 形成功能复合物,激活 FAK-Src-Ras-ERK1/2 信号通路,进而诱导 EMT,增强骨肉瘤细胞侵袭和转移能力^[13]。此外,本研究发现 TM4SF1 通过与整合素 $\alpha 6$ 相互作用,以层黏连蛋白依赖性方式激活 FAK/PI3K/AKT 信号通路,介导 ESCC 细胞迁移和侵袭^[7]。氨基酸转运蛋白也可以与四跨膜蛋白结合形成膜功能复合物,参与调控疾病的病理表型。研究^[14-15]发现, TM4SF5 可以结合胱氨酸/谷氨酸转运体(由 *SLC3A2* 和 *SLC7A11* 组成),介导肺纤维化期间细胞内谷胱甘肽和活性氧水平的调节。

mTOR 信号经常在肿瘤中被激活,通过控制不同代谢途径的营养摄取和流量、基于感知细胞内的营养状态来协调代谢重编程,支持肿瘤细胞生长与增殖。研究^[16]发现, *SLC1A5* 通过与盘状结构域受体 1 (DDR1) 相互作用,以溶酶体依赖性的方式稳定 *SLC1A5*,从而影响 mTOR1 信号通路,促进肝癌细胞增殖和细胞周期进展。相反,用 GPNA (*SLC1A5* 的选择性抑制剂)或 *SLC1A5* 小干扰 RNA (*SLC1A5* siRNA) 处理的膀胱癌细胞中, mTORC1 活性降低,且细胞的增殖和细胞活力受到显著抑制^[17]。本研究通过体外实验证实,在 *SLC1A5* 和 TM4SF1 共表达的 Eca-109 细胞中, mTOR 下游关键信号通路转导分子 S6 磷酸化增强,揭示 *SLC1A5* 与 TM4SF1 相互作用诱导了 mTOR 信号通路激活。然而, TM4SF1-*SLC1A5* 功能复合物如何调节 mTOR 信号通路转导仍需进一步研究。

综上所述,本研究证实了 *SLC1A5* 在 ESCC 中高表达,且与患者临床分期、淋巴结转移显著相关。从分子机制层面来说, *SLC1A5* 可能通过与 TM4SF1 形成膜功能复合物,激活下游的 mTOR 信号通路,从而促进 ESCC 细胞转移。这些发现

(下转第 45 面)

charide remodels tumoral microenvironment and synergizes with PD-L1 checkpoint blockade via TLR4/MyD88/AKT/NF- κ B pathway in pancreatic cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1033.

[20] ANDREUZZI E, FEJZA A, POLANO M, *et al*. Colorectal cancer development is affected by the ECM molecule EMILIN-2 hinging on macrophage polarization via the TLR-4/MyD88 pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 60.

[21] LARABI A, BARNICH N, NGUYEN H T T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD[J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 38–51.

[22] SURESH R, BARAKAT D J, BARBERI T, *et al*. NF- κ B p50-deficient immature myeloid cell (p50-IMC) adoptive transfer slows the growth of murine prostate and pancreatic ductal carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000244.

[23] CHANG S, YIM S, PARK H. The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/KDM5C, and UTX/KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(6): 1–17.

[24] XIAO K, HE W X, GUAN W, *et al*. Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF- κ B and Hedgehog pathways in LPS-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 863.

[25] PARK J W, YOON H J, KANG W Y, *et al*. G protein-coupled receptor 84 controls osteoclastogenesis through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1481–1489.

[26] ZHENG Y Q, FANG W L, FAN S N, *et al*. Neutrotropin inhibits neuroinflammation via suppressing NF- κ B and MAPKs signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(4): 242–248.

[27] PAN J X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 322–328.

[28] GALARDI S, MERCATELLI N, FARACE M G, *et al*. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(9): 3892–3902.

[29] GHISLAT G, CHEEMA A S, BAUDOIN E, *et al*. NF- κ B-dependent IRF₁ activation programs cDC1 dendritic cells to drive antitumor immunity[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(61): eabg3570.

(本文编辑: 梁琥 钱锋)

(上接第 39 面)

可以为 SLC1A5 作为预测 ESCC 转移的潜在标志物及有效干预靶点提供理论依据。

参考文献

[1] SHORT M W, BURGERS K G, FRY V T. Esophageal cancer[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(1): 22–28.

[2] LIU Y, ZHAO T L, LI Z Z, *et al*. The role of ASCT2 in cancer: a review[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837: 81–87.

[3] SCHULTE M L, FU A, ZHAO P, *et al*. Pharmacological blockade of ASCT2-dependent glutamine transport leads to antitumor efficacy in preclinical models[J]. *Nat Med*, 2018, 24(2): 194–202.

[4] HUANG X Q, LUO Y J, LI X J. Circ_0072995 promotes ovarian cancer progression through regulating miR-122-5p/SLC1A5 axis[J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(1): 153–172.

[5] CORMERAIS Y, MASSARD P A, VUCETIC M, *et al*. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5)[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(8): 2877–2887.

[6] TAO X A, LU Y, QIU S B, *et al*. AP1G1 is involved in cetuximab-mediated downregulation of ASCT2-EGFR complex and sensitization of human head and neck squamous cell carcinoma cells to ROS-induced apoptosis[J]. *Cancer Lett*, 2017, 408: 33–42.

[7] HOU S C, HAO X, LI J J, *et al*. TM4SF1 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis by interacting with integrin $\alpha 6$ [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 609.

[8] DETCHOKUL S, WILLIAMS E D, PARKER M W, *et al*. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(24): 5462–5490.

[9] 杨雄涛, 王鑫. 食管癌综合治疗新进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2023, 50(2): 98–103.

[10] LIU X C, QIN H, LI Z, *et al*. Inspiratory hyperoxia suppresses lung cancer metastasis through a MYC/SLC1A5-dependent metabolic pathway[J]. *Eur Respir J*, 2022, 60(6): 2200062.

[11] ZHUANG X, TONG H C, DING Y, *et al*. Long noncoding RNA ABHD11-AS1 functions as a competing endogenous RNA to regulate papillary thyroid cancer progression by miR-199a-5p/SLC1A5 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 620.

[12] FU F M, YANG X D, ZHENG M Y, *et al*. Role of transmembrane 4 L six family 1 in the development and progression of cancer[J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 202.

[13] SHAO S J, PIAO L H, GUO L W, *et al*. Tetraspanin 7 promotes osteosarcoma cell invasion and metastasis by inducing EMT and activating the FAK-Src-Ras-ERK1/2 signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 183.

[14] JUNG J W, KIM J E, KIM E, *et al*. Amino acid transporters as tetraspanin TM4SF5 binding partners[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(1): 7–14.

[15] KIM J E, KIM H J, JUNG J W, *et al*. TM4SF5-mediated CD44v8-10 splicing variant promotes survival of type II alveolar epithelial cells during idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 645.

[16] PAN Y L, HAN M Z, ZHANG X C, *et al*. Discoidin domain receptor 1 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulation of SLC1A5 and the mTORC1 signaling pathway[J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(1): 163–178.

[17] LI S H, ZHOU Q, LIU W J, *et al*. Targeting SLC1A5 blocks cell proliferation through inhibition of mTORC1 in arsenite-treated human uroepithelial cells[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 345: 1–11.

(本文编辑: 周娟 钱锋)