

单羧酸转运泵基因家族研究进展

张桂芝* 黄桂君 郭先健

(第三军医大学全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

摘要 单羧酸转运泵 (monocarboxylate transporter, MCT) 是哺乳动物细胞中的重要跨膜蛋白, 涉及细胞的多种功能, 包括胞内 pH 值调节及乳酸跨膜转运等。目前, 已克隆出至少 8 个 MCT 亚型的 cDNA, 构成了哺乳动物细胞离子转运泵的一个新基因家族。各亚型具有底物和抑制剂的特异性以及组织学分布的差异性。因此, 研究 MCT 的结构功能及调控机制, 将可能为肿瘤等疾病诊治提供新的手段。

关键词 单羧酸转运蛋白, 乳酸, 肿瘤

学科分类号 Q78

由于糖代谢酶谱的改变及其远大于毛细血管的生长速度, 因此肿瘤细胞生长于相对缺氧的环境中, 糖酵解是其获取能量的主要方式。而糖酵解产生大量乳酸、丙酮酸等酸性产物, 造成细胞内酸化, 抑制其生长。要获得较高的糖酵解率, 必须将乳酸等转出细胞。而实验证明肿瘤细胞内 pH 值反而高于胞外^[1]; 研究表明肿瘤细胞膜上除 Na^+ / H^+ 泵外, 跨膜单羧酸转运泵 (monocarboxylate transporter, MCT) 在细胞内外乳酸转运及 H^+ 调节方面也具有重要作用^[2]。MCT 介导的乳酸转运与 H^+ 相偶联, 以 1:1 方式联合转运 H^+ 和乳酸阴离子, 转运率受二者的底物梯度影响^[3]。至今, 已证明哺乳动物细胞中至少存在 8 种 MCT 相关序

列。各亚型均可促进 $\text{H}^+ /$ 乳酸的转运, 各自又具有底物和抑制剂的特异性及不同的组织学分布^[4]。目前虽证实了哺乳动物 MCT1-MCT4 质子偶联的乳酸和丙酮酸的转运, 但仅对 MCT1 和 MCT2 作了底物和抑制剂动力学的详细分析。而 MCT 各亚型在组织中的表达、调控及其生理作用是当前的研究热点。

1 MCT 基因的结构与功能

现已明确人类单羧酸转运泵家族的存在, 并知道它至少有 8 个成员。已鉴定的人类 MCT 家族成员的跨膜域排列见图 1。



Fig.1 Proposed membrane topology of the MCT family

图 1 推测的 MCT 家族局部拓扑学
该序列为人类 MCT1 序列。

* 通讯联系人。 Tel: 023-68755320, E-mail: Martinliuer@yahoo.com

收稿日期: 2000-03-24, 接受日期: 2000-06-07

1.1 MCT 家族基因的共同特征

拓扑学预测所有 MCT 家族成员有 12 个跨膜 (transmembrane TM) 螺旋, 包括胞内 C 端、N 端和 TM 片段 6~7 之间的一个大的细胞内环。N、C 端位于胞质 (图 1)。这已用蛋白质水解法和标记 MCT1 的研究证实。其他膜转运泵, 如葡萄糖家族也有 12 个跨膜环结构^[5]。与这些家族一样, MCT 家族成员在 TM 跨膜区和其间较短的环区显示了最大的序列保守性。而亲水区 (TM1 前的 N 端、TM6、TM7 之间的的大环区及 TM12 之后的 C 端) 保守性极低。实际上, TMs6 和 TMs7 之间的环区大小变化很大, 对 MCT5 和 MCT7, 有 105 和 93 个残基, 而 MCT1、MCT3、MCT2、MCT6 和 MCT8 分别为 67、66、49、47 和 40 个残基, MCT4 只有 29 个残基。这种歧异的亲水区是 TM12 转运泵家族的共同特征^[6]。在各成员间, 序列的恒定性在 TM 区最大, 间隔的亲水区最小。这些区域不可能直接涉及转运, 而可能有其他功能, 如底物特异性或转运活性的调控等。该分子的保守性 C 端一半 (TM 环 7~12) 比 N 端一半 (TM 环 1~6) 低, 这与大多数转运泵家族相同。事实上, 此分子的两部分有不同的功能: N 端区与能量 (如 H^+ / Na^+) 偶联、膜插入和/或维持正确的结构有关, 而 C 端区可能与底物特异性有关^[6]。

1.2 MCT 相关序列保守区域的重要意义

据推测, MCT 序列中高度保守的构象都存在于特定的区域, 包括各环及 TM 螺旋的起始端或终止端。这些保守残基绝大部分由甘氨酸组成, 具重要的构建作用, 如 TM 片段间旋转的形成、螺旋的充填和预备构造变化的柔韧性。同样, 保守的脯氨酸和疏水残基可能在构建中也有重要意义, 而保守的带电荷和亲水残基可能起催化作用^[6]。在 TMs1-6 中, 有 4 个残基在所有 17 个序列中是完全保守的, 在别的更多位置上仅有保守置换发生。有两个高度保守的序列尤为突出: 一个是 P [D/E] G [G/S] W [G/A] WV [V/I] V, 它横越首位进入 TM1; 另一个是 [Y/W] FXK [R/K] [R/L] XLAX [G/A/S] XAXAG 序列, 它引导 TM5 (括号外的黑体残基在序列中是恒定的, 括号内的残基是可变化的氨基酸, 正常状态的残基是共同氨基酸)。该分子的 C 端一半 (TMs7~12) 只有一个恒定残基, 显示了较低的保守性。TM11 和每一侧的环区是这个区域的最高保守区, 有一个 LXGPPXXGXLXD 的结构突出在 TM11 外表面边

缘。有证据表明 MCT1 的 C 端一半涉及底物的特异性。例如, 中国仓鼠 MCT1 的 TM10 由苯丙氨酸变成半胱氨酸, MCT1 则由一个乳酸/丙酮酸转运泵变成甲羟戊酸转运泵。而且, 4, 4'-双-异硫氰酸二苯乙烯-2, 2'-硫氰酸盐 (DIDS) 在 MCT1 中的结合位点 (结合在底物结合位点处或其附近), 就位于 C 端一半^[7]。

有一个能结合羧酸盐阴离子的正电荷集团是所有 MCTs 的一个特征。红细胞 MCT1 中的精氨酸可能发挥了此作用, 因精氨酸反应物苯乙二醛可抑制 MCT1 的乳酸转运^[4]。TM8 中的一个精氨酸残基 (人类 MCT1 的 Arg313) 在高等真核生物所公认的 MCTs (除 MCT5 以外) 和几乎所有的 *S. cerevisiae* 和 *C. elegans* 序列中是保守的, 研究证明该残基的点直接诱变极大地降低了 MCT 对乳酸的亲和力。序列中完全保守的另一精氨酸/赖氨酸残基, 位于 TMs4 和 TMs5 之间的保守区内。

2 哺乳动物 MCTs 的组织分布与生理作用

MCT 异构体的重要生理意义与其独特性质及调控有关。目前, RNA 印迹分析已确定 MCT 异构体的 mRNA 在人类很多组织中表达^[8]。Lin 等^[9]对 MCT1 和 MCT2 也作了类似研究。现已有大鼠、小鼠和仓鼠组织 MCT1 和 MCT2 的报道, 对 MCT3, 只有鸡组织的相关数据。各研究表明, 8 个 MCT 异构体 mRNA 的表达均有特定的组织依赖性。MCT1 几乎存在于所有组织, 尤其集中于心脏和红肌纤维, 表明与乳酸氧化有关。而 MCT2 只在少量组织与 MCT1 一起表达, 且二者在组织内的确切定位不同, 表明各有独特的功能; 并且其氨基酸序列和组织分布有物种差异^[10]。MCT2 的底物亲和力是 MCT1 和 MCT4 的 10 倍, 主要存在于底物浓度较低的细胞中, 如肾小管、神经细胞和精子尾部。MCT3 仅在鸡和大鼠的视网膜色素上皮细胞 (RPE) 中表达, 其蛋白质定位在 RPE 的基底膜, 而 MCT1 在 RPE 尖端表面。MCT4 常出现于高酵解的细胞中, 如白肌纤维、白细胞和肿瘤细胞, 可见其表达与乳酸外流有关。

多数异构体, 在一种或两种组织中均可显示较高的 mRNA 水平, 如 MCT2 在睾丸, MCT4 在骨骼肌, MCT5 在胎盘, MCT6 在肾脏和胎盘, MCT7 在胰腺和脑, MCT8 在肝脏、肾脏和心脏。用蛋白质印迹和免疫荧光显微镜及免疫金电子显微镜已得到 MCT1-MCT4 的蛋白质定位。

3 MCT 基因的表达调控

3.1 MCT 的基因调控

新生动物大脑中有大量 MCT1 表达, 同时伴有 mRNA 的升高, 提示有一个转录调控的过程. 研究表明, 有些 MCT 异构体可通过 5' 或 3' 非翻译区的选择性拼接进行表达调控. 对大鼠和人类的 MCT2 进行测序并对比后发现有两种 5' 非翻译区, 且两物种序列的差异在起始密码上游 30 nt 处, 表明不同的启动子有不同的主导外显子. 小鼠 MCT2 第一个编码的外显子上游存在另一序列, 预示有一个更长的或附加的外显子, 可见哺乳动物细胞 MCT2 是采用几个启动子和/或 5' 非翻译区的选择性拼接进行调控的, 其他转运泵也如此^[11]. 而且, 在研究 dbESTs 时也发现在 cDNA 克隆中存在不同的 3' 非翻译区序列, 可见存在 3' 非翻译区的选择性拼接. 另外, RNA 印迹分析还发现了很多不同大小 (2~14 kb)、含量较多、有组织依赖性的转录物, 其详细机理还需进一步研究. 在分析鸡的 MCT3 序列时发现了两种 5' 非翻译区选择性外显子 (1a 和 1b), 分别产生 2.45 kb 和 2.2 kb 两个转录本; 其中, 2.2 kb 型出现在胚胎发生过程, 在发育后期或成体中被 2.45 kb 型所替代. 说明发育过程中 MCT3 的表达调控是通过控制不同的启动子实现的. MCT1 的 3' 非翻译区很长 (1.6 kb), 它对翻译的调控可能通过反向成环和非翻译区的相互作用, 或通过结合调控因子/结合阻断 mRNA 翻译的蛋白质来实现. 翻译的调控还涉及一些特殊序列和 5' 非翻译区的次级结构, 通过与这些区域的起始因子和调控因子相互作用来加强或抑制翻译的进行^[12,13]. 在小鼠和人的 MCT5 中 5' 非翻译区包含了短链重迭开放阅读框, 该小顺反子也存在于人类 Na⁺/H⁺ 泵 NHE-1 的上游区, 对翻译有抑制作用. 可见, MCT5 倾向于翻译调控. 目前, 还未发现 MCTs 的编码区存在选择性拼接.

如前所述, MCT1 的 3' 非翻译区可进行翻译水平调控, 也可认为 MCT1 的 mRNA 库实际保存在线粒体的核糖核蛋白中, 当需要时可快速翻译, 但启动表达的信号还有待确定. β 肾上腺素对心肌和骨骼肌的刺激可能是这样一种信号, 因它提高 M 型乳酸脱氢酶的稳定性并参与蛋白激酶 A 介导的特定蛋白对 3' 非翻译区的 U 富含区的结合. 升高的乳酸浓度和缺氧是另一种信号, 缺氧通过参与调控其他糖酵解酶和 GLUT1 表达的几种转录因子与

反应元件, 如缺氧诱导因子 1、cAMP 反应元件和红细胞生成素缺氧增强子, 上调 M 型乳酸脱氢酶的表达. 因 MCT4 与 M 型乳酸脱氢酶的分布相似, 故缺氧也可由同样机制提高 MCT4 的表达.

3.2 OX-47 蛋白对 MCT 的调控

调控 MCT 表达或活性的另一途径是借助一种辅助蛋白质 OX-47. 当红细胞与 DIDS 一起培养时, MCT1 与一种 70 ku 的跨膜糖蛋白 (GP-70) 发生交联. GP-70 是免疫蛋白超家族中的一种细胞粘附分子. 该家族主要在胚胎组织中表达, 进行发育调控^[14], 但在多数成体组织中表达微弱, 而大鼠中一种与之密切相关的蛋白 OX-47 却表达强烈^[15]. OX-47 的跨膜区在种属间高度保守, 有一个带负电荷的谷氨酸残基, 可能与其他膜蛋白发生特定的相互作用^[16]. 所以它有可能象 GP-70 一样与 MCT1 和 MCT4 相互作用^[17], 通过影响转运泵本身的催化活性或调控其膜的易位, 对 MCT 活性进行调控. 而且 OX-47 糖基化状态随不同组织而变化, 其表达由细胞代谢活性增强, 糖酵解激活, 葡萄糖转运泵表达增高等刺激因子来上调. 可见, OX-47 在表达和糖基化中的变化可能是对单羧酸转运的一个平行刺激或调节.

4 MCT 家族的临床意义及应用前景

鉴于单羧酸在机体组织、细胞代谢交流中的重要性, MCTs 家族基因的发现和克隆便具有明确的现实意义. 用分子克隆技术研究细胞单羧酸转运泵, 将是今后研究的一个非常活跃的领域, 而且肿瘤细胞单羧酸转运泵的研究更具临床意义.

用 PCR 技术放大 MCT1 的 cDNA 序列已克隆并测序了埃利希腹水肿瘤细胞的乳酸转运泵, 该序列与中国仓鼠和人类的 MCT1 各有 93% 和 87% 的同源性. 该转运泵也有动力学饱和性, 能被 α -氰苯乙烯衍生物、有机汞试剂、生物类黄酮等所抑制, 导致肿瘤细胞乳酸积累, 细胞内酸化和糖酵解的降低^[18]. 这提示肿瘤细胞单羧酸转运泵异构体的选择性抑制剂对肿瘤的治疗有一定作用.

参 考 文 献

- 1 黄桂君, 钱桂生. NHE 基因家族研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (5): 425~429
Huang G J, Qian G S. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1998, 25 (5): 425~429
- 2 Broer S, Schneider H P, Broer A, et al. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes

- by changes in cytosolic pH. *Biochem J*, 1998, **333** (Pt 1): 167 ~ 174
- 3 Roth D A , Brooks G A . Lactate transport is mediated by a membrane bound carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Arch Biochim Biophys*, 1990, **279** (2): 377~ 385
 - 4 Poole R C , Halestrap A P . Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol*, 1993, **264** (Pt 1): 761~ 782
 - 5 Gould G W , Holman G D . The glucose transporter family : structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 1993, **295** (Pt 2): 329~ 341
 - 6 Saier M H . Computer - aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis and evolution. *Microbiology*, 1994, **58** (1): 71~ 93
 - 7 Poole R C , Sansom C E , Halestrap A P . Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H^+ /lactate cotransporters (MCT1). *Biochem J*, 1996, **320** (Pt 3): 817~ 824
 - 8 Price N T , Jackson V N , Halestrap A P . Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J*, 1998, **329** (Pt 2): 321~ 328
 - 9 Lin R Y , Vera J C , Chaganti R S K , *et al* . Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem*, 1998, **273** (44): 28959~ 28965
 - 10 Jackson V N , Price N T , Carpenter L , *et al* . Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J*, 1997, **324** (Pt 2): 447~ 453
 - 11 Borowsky B , Hoffman B J . Analysis of a gene encoding two glycine transporter variants reveals alternative promoter usage and a novel gene structure. *J Biol Chem*, 1998, **273** (44): 29077~ 29085
 - 12 Sachs A B , Sarnow P , Hentze M W . Starting at the beginning, middle and end: translation initiation in Eukaryotes. *Cell*, 1997, **89** (6): 831~ 838
 - 13 Proud C G , Denton R M . Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J*, 1997, **328** (Pt 2): 329~ 341
 - 14 Ozawa M , Huang R P , Furukawa T , *et al* . A teratocarcinoma glycoprotein carrying a developmentally regulated carbohydrate marker is a member of the immunoglobulin gene superfamily. *J Biol Chem*, 1988, **263** (7): 3059~ 3062
 - 15 Schuster V L , Lu R , Kanai N , *et al* . Cloning of the rabbit homologue of mouse 'basigin' and rat 'ox-47': kidney cell type-specific expression, and regulation in collecting duct cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1311** (1): 13~ 19
 - 16 Fossum S , Mallett S , Barclay A N . The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol*, 1991, **21** (27): 671 ~ 679
 - 17 Wilson M C , Heddle C , Kirk P , *et al* . Modulation of rat atrial G protein coupled K^+ channel function by phospholipids. *J Physiol (London)*, 1999, **517** (Pt 1): 59~ 66
 - 18 Williamson D H , Lund P , Krebs H A . The redox state of free nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J*, 1967, **103** (2): 514~ 527

Advances in the Study of the MCT Gene Family

ZHANG Gu-Zhi*, HUANG Gu-Jun, GUO Xian-Jian

(Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract monocarboxylate transporter (MCT) are vital transmembrane transporters involved in multiple cellular functions including the regulation of intracellular pH and lactate transport. At least eight isoforms of MCT have been cloned and characterized to date, they constitute a new gene family of mammal transporters. These isoforms have the differences in substrate and inhibitor specificities and tissue distribution. Thus it may provide a new way of diagnosis and treating for diseases such as cancer by investigating on the structure and function and regulational mechanism of MCT.

Key words monocarboxylate transporter, lactate, cancer

* Corresponding author. Tel: 86-23-68755320, E-mail: Martinliuer@yahoo.com

Received: March 24, 2000 Accepted: June 7, 2000