

氨基酸转运载体 LAT1 对小鼠胎盘早期建立的影响

马婧¹, 谭毅¹, 谭冬梅¹, 卢俊杰¹, 梁浩¹, 罗文萍^{2,3*}

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属口腔医院, 重庆 401147;
3. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】 目的 观察 L 型氨基酸转运载体 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) 在妊娠小鼠第 8 天 (D8) 子宫中的表达, 探讨 LAT1 在早期胎盘形成过程中的作用。方法 120 只 6~8 周龄 SPF 级 KM 雌鼠作为研究对象, 免疫组织化学检测 LAT1 在妊娠小鼠 D8 子宫中的表达情况, 原代分离 D8.5 的绒毛膜锥 (EPCs), 检测 LAT1 特异抑制剂 2-氨基双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸 (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid, BCH) 以及 LAT1 的作用底物亮氨酸 (L-leucine) 对 EPCs 黏附及外延生长能力的影响。结果 LAT1 高表达于 D8 子宫蜕膜区, 在 EPCs 中亦呈现阳性表达。LAT1 的特异性抑制剂 BCH 显著性抑制 EPCs 的外延生长, 而亮氨酸对 EPCs 的外延生长抑制作用差异无显著性。结论 LAT1 表达于小鼠早期胎盘形成期的子宫中, 从而推测 LAT1 可能促进滋养层对母体蜕膜组织的侵袭, 进而参与胎盘早期的建立。

【关键词】 小鼠; 胎盘; L 型氨基酸转运载体 1; 绒毛膜锥

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0256-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.007

Effect of LAT1 on early placenta formation in mice

MA Jing¹, TAN Yi¹, TAN Dong-mei¹, LU Jun-jie¹, LIANG Hao¹, LUO Wen-ping^{2,3**}

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147;
3. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression and role of LAT1 in mouse uterus on early placenta formation on day 8 of pregnancy (D8). **Methods** One hundred and twenty 6-8-week old SPF female Kunming mice were used in this study. Immunohistochemistry was applied to determine the localization of LAT1 protein in the mouse uterus on D8 of pregnancy. The ectoplacental cones (EPCs) were dissected out from D8.5 uterus, and then cultured in vitro with different concentrations of BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid, specific antagonist of LAT1) and L-leucine (substrate of LAT1) to determine the role of LAT1 during the EPC attachment and outgrowth. **Results** LAT1 protein was highly expressed in secondary decidual zone and also positively expressed in the mouse uterus on D8. As a specific antagonist of LAT1, BCH significantly suppressed the ectoplacental cone outgrowth, whereas L-leucine showed no significant effect on it. **Conclusions** LAT1 is expressed in the mouse uterus during early placenta formation and promotes ectoplacental cone outgrowth, suggesting that LAT1 may promote the trophoblast invasion into maternal decidual tissue, and participates in the early formation of placenta.

【Key words】 Mouse; Placenta formation; L-type amino acid transporter 1; Ectoplacental cones

在哺乳动物胚胎的植入过程中, 胚外滋养层对子宫蜕膜的适度侵袭是成功植入的重要事件。该过

程受到严格的时空调节, 侵袭时间的早晚、侵袭程度的强弱都可能影响早期胎盘形成, 甚至导致整个妊

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31301221)。

【作者简介】 马婧 (1988 -), 女, 硕士研究生, 专业: 动物学 E-mail: mj5658700@126.com

【通讯作者】 罗文萍 (1985 -), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 哺乳动物胚胎着床。E-mail: lwplucky@163.com Tel: 86-23-88602353

娠事件的成败。在 小鼠围植入期,靠近内细胞团(inner cell mass)的细胞增殖分化形成绒毛膜锥(ec-toplacental cone, EPCs),绒毛膜锥的外层细胞分化为具有侵袭性的次级滋养层细胞(trophoblast giant cells, TGCs),随后侵入母体蜕膜组织,形成胎盘。小鼠的滋养层细胞侵袭开始于 D8^[1,2]。小鼠作为研究人类滋养层细胞侵袭和胎盘早期发生的理想动物模型^[3],小鼠妊娠第 8 天时外胎盘锥中相关调节因子的表达规律及作用机制一直受到研究者的广泛关注,而 L 型氨基酸转运载体 1(L-type amino acid transporter 1, LAT1)在小鼠早期胎盘发生过程中的作用尚鲜有报道。

氨基酸是构成蛋白质的基本元件,而氨基酸转运载体除了可以将氨基酸转移进出细胞外,还可参与氨基酸对神经细胞兴奋、抑制等重要细胞功能的调节过程^[4]。L 型氨基酸转运载体系统是一个非 Na⁺ 依赖性的大中性氨基酸转运载体^[5],作为其中的一员,L 型氨基酸转运载体 1 主要负责转运一些 Na⁺ 非依赖性大中性氨基酸,其中包含亮氨酸、赖氨酸等必需氨基酸。亮氨酸作为 LAT1 的转运底物,在一定范围内其浓度升高时, LAT1 表达水平增加,从而促进转运速度。而 BCH 作为转运抑制剂能够抑制 LAT1 的活性,从而调控氨基酸的转运。亮氨酸和 BCH 的抑制作用均受浓度和时间的双重调控。研究者发现, LAT1 大量表达于小鼠胎盘组织^[6],推测其可能与胎儿发育过程中的氨基酸吸收和营养代谢相关^[7],比如胎儿从母体摄取重要氨基酸(如丝氨酸)^[8]、激素(如甲状腺激素)等过程可能都依赖于 LAT1 的参与。LAT1 功能的异常或可影响胎儿发育过程中氨基酸的正常吸收,甚至导致严重的代谢障碍性疾病。除此以外,鉴于在胎盘中 LAT1 主要表达在与侵袭表型相关的滋养层细胞^[9,10],我们推测 LAT1 或许也可参与滋养层侵袭行为的调节,进而影响胎盘发生过程。因此,我们检测了 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达,并通过体外检测 BCH 和亮氨酸对 EPCs 外延生长的影响,探讨 LAT1 在早期胎盘形成中的作用,促进我们对胎盘形成过程中分子调节机制的进一步认识。

1 材料和方法

1.1 材料

6-8 周龄 SPF 级 KM 雌鼠 120 只,体重 20~25 g,购自重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2012-0001】,饲养及实验动物操作均于重庆医科大学实验动物中心动物屏障系统环境内【SYXK(渝)

2012-0001】。KM 雄鼠与动情期雌鼠 1:2 合笼,第 2 天早晨观察到阴栓的记为妊娠第 1 天(D1)。D8 取材,收集子宫组织,将组织放入液氮中速冻,然后放在 -80℃ 低温冰箱内保存,用于制作冰冻切片。

兔源性 LAT1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔 SP 检测试剂盒(SP-9001)、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Matrigel Basement Membrane Matrix 基质胶购自美国 BD Biosciences 公司;BCH、亮氨酸均购自 Sigma 公司;Gibco 胎牛血清、Gibco F-12 培养基均购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

妊娠小鼠 D8 的子宫组织冰冻切片进行免疫组织化学染色:3% H₂O₂ 甲醇溶液孵育 20 min,山羊血清封闭 30 min,一抗(浓度为 1:800 的兔源性 LAT1 多克隆抗体;阴性对照组采取同种兔正常血清代替一抗)4℃ 孵育过夜,第 2 天滴加二抗山羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,然后滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液(S-A/HRP)室温孵育 30 min,用 DAB 试剂显色,并用苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度脱水,封片。显微镜下观察 LAT1 在妊娠小鼠 D8 子宫中的表达位置。

1.2.2 体外检测 BCH 以及亮氨酸对绒毛膜锥(EPCs)黏附能力及外延生长的影响

每次取 20 只孕鼠,每组 5 只。参考 Peng 等^[11]方法分离 D8.5 的 EPCs。断颈椎处死妊娠 D8.5 的小鼠,小心用剪刀和镊子打开子宫壁,取出鼓包,放入培养基中清洗,然后在显微镜下用眼科镊分离出 EPCs,每只获取 6~8 个结构完整的 EPCs,并随机将 EPCs 放到铺有 Matrigel 胶的 24 孔板中培养。2~4 h 后,加入完全培养基(F12 + 10% FBS)。BCH 及亮氨酸的处理浓度参考 Chrostowski^[9]文献报道,其中处理组分别加入 0.1、1、4 μmol/L BCH。对照组不做处理。亮氨酸处理实验取材和方法同 BCH 处理。处理组亮氨酸浓度分别为:20、200、800 μmol/L。

观察各组 EPCs 黏附及外延生长的情况。EPCs 的黏附情况及外延生长的测定参考 Peng 等方法。将培养至 24、48 h 的 EPCs 轻微晃动 20 s,观察,依然在 Matrigel 胶上不动的 EPCs 记为黏附成功,并在显微镜下拍照,测量 EPCs 距离。每组实验重复 3 次。

1.2.3 统计学方法

所有实验数据采用平均值 ± 标准差表示,使用 SPSS 17.0 对数据进行统计学分析,组间比较采用 *t*

检验或方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

免疫组织化学结果显示, LAT1 强表达于 D8 小鼠子宫蜕膜区域的细胞中, 并且 LAT1 在 EPCs 中呈现阳性表达 (图 1)。

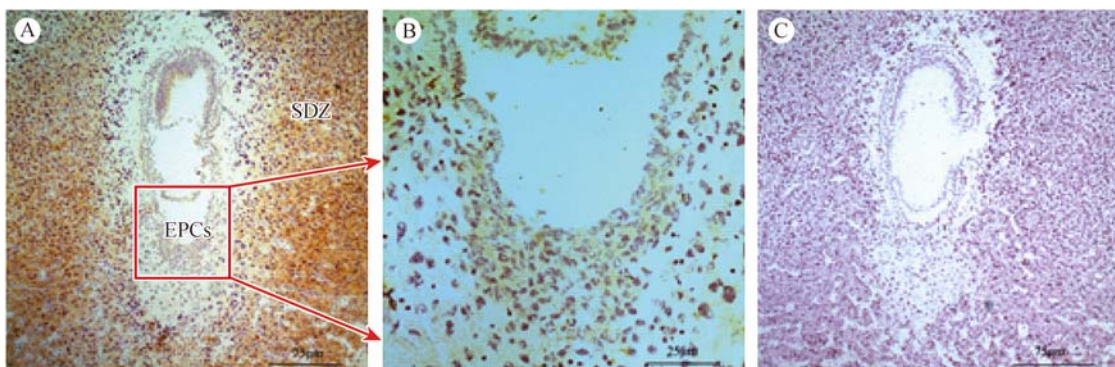
2.2 亮氨酸对绒毛膜锥黏附及外延生长能力的影响

为了探讨 LAT1 的作用底物亮氨酸对 EPCs 侵袭能力的影响, 我们检测了 20、200、800 $\mu\text{mol/L}$ 亮氨酸对 EPCs 黏附能力及对外延生长的影响。结果, 在培养至 24 h 及 48 h 时, 不同组的 EPCs 的黏附率均在 90% 以上, 各组之间差异无显著性。提示

亮氨酸对 EPCs 的黏附能力没有影响。用 ImageJ 软件对 EPCs 外延生长距离分析可知, 24 h 及 48 h 时, 不同浓度亮氨酸均对 EPCs 的外延生长无影响 (图 2)。

2.3 氨基酸转运抑制剂 BCH 对绒毛膜锥黏附及外延生长能力的影响

为了探讨氨基酸转运抑制剂 BCH 对 EPCs 侵袭能力的影响, 我们检测了 0.1、1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 对 EPCs 黏附能力及对外延生长的影响。结果, 在培养至 24 h 及 48 h 时, 不同组的 EPCs 黏附率均在 90% 以上, 各组之间差异无显著性。提示了 BCH 信号对 EPCs 的黏附能力没有影响。用过 ImageJ 软件对 EPCs 外延生长距离分析可知, 在 24 h 时, 1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 均可抑制 EPCs 的外延生长, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 在 48 h 时, 0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 可显著抑制 EPCs 的外延生长 ($P < 0.05$) (图 3)。

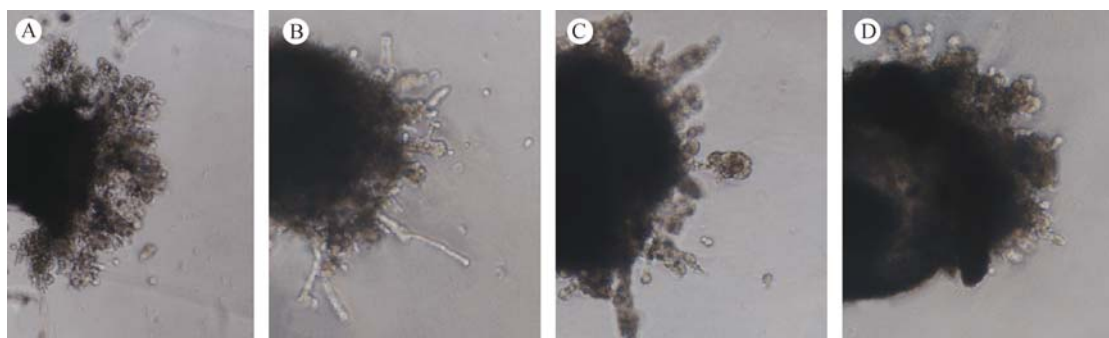


注: A: LAT1 在 D8 子宫中表达; B: 图 A 中 EPCs 放大; C: 阴性对照; SDZ: 次级蜕膜带; EPCs: 绒毛膜锥。

图 1 免疫组化检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

Note. A: LAT1 expression in the mouse uteri on day 8; B: A higher magnification of EPC in (A); C: negative control; SDZ: Secondary decidual zone; EPCs: Ectoplacental cone.

Fig. 1 Immunohistochemical staining of LAT1 in the mouse uteri on D8 of pregnancy.

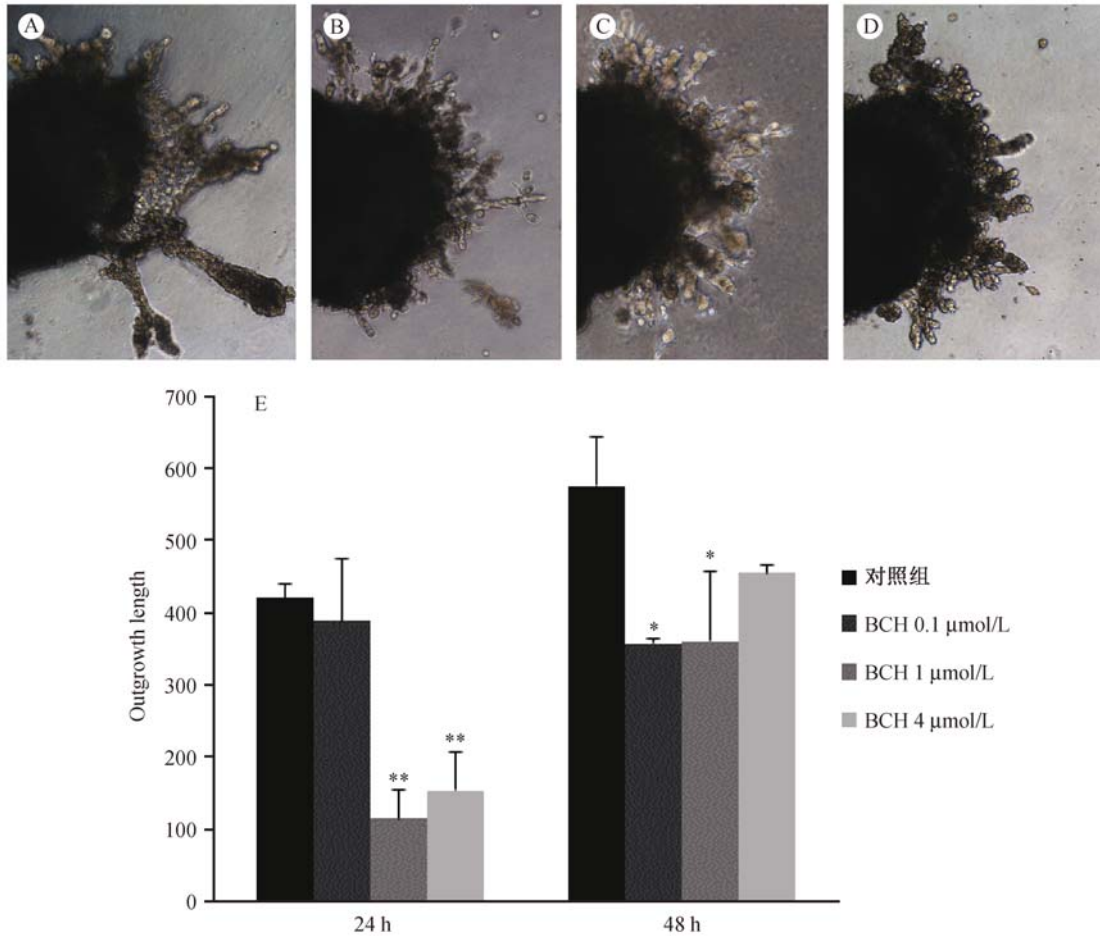


注: A-D: 对照组, 20、200、800 $\mu\text{mol/L}$ 亮氨酸。

图 2 48 h 时, 不同浓度亮氨酸对 EPCs 外延生长能力的影响

Note. A-D: Control, 20, 200, 800 $\mu\text{mol/L}$ L-leucine.

Fig. 2 Effects of different concentrations of L-leucine on EPCs outgrowth at 48 h



注:A-D:48 h 时,EPCs 外延生长图,分别为:对照组,0.1、1、4 μmol/L BCH;E:外延生长统计图;* $P < 0.05$,与对照组比;** $P < 0.01$,与对照组比。

图3 不同浓度 BCH 对 EPCs 外延生长能力的影响

Note. A-D: At 48 h, the outgrowth length of EPCs, Respectively, Control, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 4 μmol/L BCH; E: Statistics of the outgrowth length in different treatment groups; * $P < 0.05$, Compared with the control group; ** $P < 0.01$, Compared with the control group.

Fig.3 Effects of different concentrations of BCH on EPCs outgrowth

3 讨论

作为构成蛋白质的基本元件氨基酸参与了细胞内许多代谢途径,而氨基酸转运蛋白为氨基酸的摄取提供了载体通道。其中 LAT1 大量表达在胎儿脑、肝脏、骨髓、胎盘及生殖器等正常组织以及癌细胞中^[12],组织部位、细胞类型的不同导致表达水平不同^[13]。

滋养层细胞侵入母体子宫发生蜕膜化是胚胎植入的关键步骤,在这一过程中,侵袭性的滋养层细胞的侵袭能力和行为方式与肿瘤细胞相似,此过程均涉及基质金属蛋白酶、激素以及母体免疫、代谢及内分泌等活动的调节^[14,15]。因此,从某种意义上讲,滋养层细胞对母体蜕膜侵入的精确调控与肿瘤细胞侵袭的失控是同一种细胞行为的两种表型^[14]。有

研究报道,LAT1 在滋养层细胞株 Rs26 TS 细胞中高表达,采用基因沉默或者是 LAT1 的拮抗剂 BCH 干预细胞,均可降低小鼠滋养层细胞株 Rs26 TS 细胞侵袭^[16]。因此,LAT1 在小鼠胎盘组织中的高表达可能是通过参与调节滋养层细胞侵袭行为进而影响早期胎盘发生进程。

在本实验中,我们检测了 LAT1 在小鼠滋养层细胞对子宫内膜开始侵袭时(即妊娠第 8 天)妊娠子宫中的表达,结果证实,LAT1 强表达于次级蜕膜带的蜕膜细胞胞膜上以及侵袭性的 EPCs 中。在胎盘未形成之前,大核多核的蜕膜细胞可为胚胎的生长提供能量,因此 LAT1 在次级蜕膜带的强表达可能提示其在胚胎发育中的营养作用。为了进一步验证 LAT1 在 EPCs 侵袭过程中所扮演的角色,我们选

择体外分离培养的 D8.5 的 EPCs 作为研究小鼠胚胎植入及滋养层侵袭的体外模型,将 EPCs 种植于 Matrigel 胶上,并分别以不同浓度的 LAT1 的氨基酸作用底物亮氨酸及氨基酸转运抑制剂 BCH 进行干预。在小鼠滋养层细胞株 Rs26 TS 的完全培养基中含有 200 mg/L 亮氨酸,而研究发现在较低浓度 (40 $\mu\text{mol/L}$) 的亮氨酸培养基中,细胞 LAT1 mRNA 和蛋白表达水平均升高。因此,限制亮氨酸的浓度可以改变 LAT1 的表达水平。在 EPCs 培养的 F12 完全培养基中加入不同浓度的亮氨酸,直至将培养基中亮氨酸浓度额外增加至 800 $\mu\text{mol/L}$ (200 mg/L) 的浓度,依然没有发现 EPCs 的粘附及外延生长能力受到影响。分析原因,可能是因为在完全培养基中,氨基酸浓度 (包括亮氨酸) 非常高,因此再额外的添加亮氨酸,已经不能改变 LAT1 的表达水平,这也与本文中亮氨酸处理 EPCs 后外延生长情况无显著性差异的检测结果相吻合。如果要更进一步的研究 LAT1 的作用底物在 EPCs 的粘附及外延生长能力方面的影响,应该自制选择性培养基,去除 F12 完全培养基中的 LAT1 底物氨基酸,再给予定量添加。

BCH 为 LAT1 转运亮氨酸的竞争性抑制剂。在肿瘤细胞中,BCH 可能通过影响氨基酸的胞内转运,影响 mTOR 磷酸化及其下游信号,进而通过转录后修饰调节等方式改变 LAT1 的表达水平^[16]。我们采用不同浓度的氨基酸特异抑制剂 BCH 处理 EPCs,结果提示,在 24 h 时,1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 均可显著抑制 EPCs 的外延生长,而在 48h 时,0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 可表现出显著的抑制作用,4 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制作用差异不显著。在加入亮氨酸及 BCH 处理 EPCs 后,无法从 Matrigel 胶上分离出外延生长的滋养层细胞,因此无法检测该细胞中 LAT1 的表达水平是否发生变化。有文献报道在 Rs26 TS 细胞中,BCH 对 LAT1 的表达水平改变能力尚不如亮氨酸的作用。BCH 作用 48 h 时,LAT1 的蛋白表达水平无显著变化,但依然可以发现 Rs26 TS 细胞的侵袭能力产生了显著变化。

因此我们推测 LAT1 可能促进 EPCs 的外延生长从而参与胎盘的形成。但 LAT1 通过何种分子机制参与调节 EPCs 的侵袭行为,以及在体内以何种复杂方式参与早期胎盘的发生,仍需进一步实验研究。

参 考 文 献

[1] Erica DW, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta [J]. *Physiology*, 2005, 20: 180 - 193.
[2] Lagu MN, Detmar J, Paquet M, et al. Decidual PTEN expres-

sion is required for trophoblast invasion in the mouse [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): 936 - 946.
[3] Hu D, Cross JC. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2 - 3): 341 - 354.
[4] 魏宗友,徐柏林,郝志敏,等. 氨基酸转运载体的研究进展 [J]. *中国饲料*, 2010, (13): 19 - 23.
[5] Imai H, Kaira K, Oriuchi N, et al. L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer [J]. *Histopathology*, 2009, 54(7): 804 - 813.
[6] Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, et al. Human L-type amino acid transporter (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514(2): 291 - 302.
[7] Aiko Y, Askew DJ, Aramaki S, et al. Differential levels of amino acid transporters system L and ASCT2, and the mTOR protein in placenta of preeclampsia and IUGR [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014, 14:181.
[8] Lewis RM, Glazier J, Greenwood SL, et al. L-serine uptake by human placental microvillous membrane vesicles [J]. *Placenta*, 2007, 28(5 - 6): 445 - 452.
[9] Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, et al. LAT1 expression in pre and post implantation embryos and placenta [J]. *Placenta*. 2009, 30(3): 270 - 276.
[10] Jones H, Crombleholme T, Habli M. Regulation of amino acid transporters by adenoviral-mediated human insulin-like growth factor-1 in a mouse model of placental insufficiency in vivo and the human trophoblast line BeWo in vitro [J]. *Placenta*, 2014, 35(2): 132 - 138.
[11] Peng S, Li J, Miao C, et al. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation [J]. *Reproduction*, 2008, 135(3): 367 - 375.
[12] 吴信,褚武英,石常友,等. 氨基酸转运载体 LAT1 研究进展 [J]. *生命科学*. 2008, 20(2): 253 - 257.
[13] Kaira K, Oriuchi N, Imai H, et al. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(12): 2380 - 2386.
[14] Estellal C, Herrer I, Atkinson SP, et al. Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): 305 - 308.
[15] Godbole G, Suman P, Gupta SK, et al. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(4): 1278 - 1283.
[16] Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, et al. Role of the L-amino acid transporter-1 (LAT1) in mouse trophoblast cell invasion [J]. *Placenta*, 2010, 31(6): 528 - 534.
[17] Yamauchi K, Sakurai H, Toru Kimura T, et al. System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line [J]. *Cancer Lett*, 2009, 276(1): 95 - 101.

[收稿日期] 2005-01-07