

· 论 著 ·

溶质运载蛋白 16A 家族成员 10(SLC16A10)对胶质瘤干细胞增殖及自我更新能力的影响

李圆圆¹, 黄浩浩², 满江红¹

(1. 国家生物医学分析中心, 北京 100850; 2. 中国人民解放军中部战区总医院神经外科, 湖北 武汉 430070)

摘要: 目的 探索溶质运载蛋白 16A 家族成员 10(SLC16A10)在胶质瘤干细胞(GSC)中的功能,为针对 GSC 的脑胶质瘤治疗提供新的潜在靶点。方法 387GSC 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 7 d, 分化为 387 非干性肿瘤细胞(387NSTC), RT-qPCR 检测 387GSC 和 387NSTC 中 *SLC16A10*、性别决定区 Y 框蛋白 2(*SOX2*)、少突细胞谱系转录因子 2(*Olig2*)和神经胶质纤维酸性蛋白(*GFAP*) mRNA 水平。构建靶向 *SLC16A10* 基因的干涉质粒,并进行慢病毒包装。慢病毒感染 387GSC 48 h, 嘌呤霉素($2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)筛选 2 d, Western 印迹法检测 *SLC16A10* 蛋白表达水平,验证敲低效果。CellTiter-Glo 试剂盒检测敲低 *SLC16A10* 后 387GSC 相对细胞活力和肿瘤细胞球形成数目。免疫荧光法检测 387GSC 中 *SLC16A10* 蛋白的细胞定位。结果 与 387GSC 相比,387NSTC 中 *SLC16A10* mRNA 水平显著降低($P<0.01$),同时肿瘤干细胞标志物 *SOX2* 和 *Olig2* mRNA 水平表达显著降低($P<0.01$),非干细胞标志物 *GFAP* 表达显著升高($P<0.01$),表明 387GSC 已分化为 387NSTC。敲低 *SLC16A10* 后,387GSC 相对细胞活力显著下降($P<0.01$),肿瘤细胞球数目明显减少($P<0.01$)。免疫荧光法结果表明,387GSC 中 *SLC16A10* 未定位于细胞核。结论 *SLC16A10* 在 387GSC 中高表达,其敲低后 387GSC 增殖及肿瘤自我更新能力均被显著抑制,提示 *SLC16A10* 在脑胶质瘤发生发展中发挥重要作用。

关键词: 溶质运载蛋白 16A 家族成员 10(SLC16A10); 胶质瘤干细胞; 细胞增殖; 自我更新

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)01-0041-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.01.006

多形性胶质母细胞瘤是恶性程度最高的原发性脑胶质瘤,目前临床上常规治疗的方法为最大安全范围手术切除联合放疗及药物化疗综合治疗,但治疗效果仍不甚理想^[1-4],患者平均生存周期仅为 15~18 个月^[5-6]。胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSC)是肿瘤组织中具有自我更新、多种系分化和肿瘤形成能力的一小群肿瘤细胞。越来越多的研究表明, GSC 是脑胶质瘤发生发展和复发及放疗和化疗抵抗的重要原因^[7-8]。

溶质运载蛋白 16A 家族成员 10(solute carrier family 16 member 10, *SLC16A10*)属于 SLC16A 家族,该家族还包括其他 13 个成员,其中 *SLC16A1*, *SLC16A3*, *SLC16A7* 和 *SLC16A8* 编码单羧酸转运

体,催化乳酸、丙酮酸和酮体等单羧酸的转运; *SLC16A2* 编码高亲和性甲状腺激素转运体 8; 其他 8 个的底物和作用机制尚不清楚^[9]。*SLC16A10* 在体内分布广泛,包括小肠、肾、肝和骨骼等^[10-12],所编码的芳香族氨基酸转运蛋白能够以不依赖 Na^+ 的方式运输芳香氨基酸,如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,参与细胞的摄取和排出^[13-14]及细胞代谢^[4, 15-16],对肠道和肾等所产生的芳香族氨基酸转运有重要作用^[11]。然而,目前尚无关于 *SLC16A10* 芳香族氨基酸转运蛋白对 GSC 功能影响的研究报道,其作用机制亦不清楚。

本研究室前期通过对 387GSC, 4121GSC, H2S 和 456GSC 4 株 GSC 及其分化后的非干性肿瘤细胞(non-stem tumor cells, NSTC)表达的差异蛋白进行质谱鉴定,发现 *SLC16A10* 在 387GSC 中高表达。本研究通过检测 387GSC 细胞活力和肿瘤细胞球形成能力,观察 *SLC16A10* 对 387GSC 增殖及自我更新能力的影响。

基金项目: 国家自然科学基金(81872408)

作者简介: 李圆圆, 硕士研究生, 主要从事肿瘤干细胞调控与肿瘤发生发展研究, E-mail: yyli@xmail.ncba.ac.cn

通讯作者: 满江红, E-mail: jhman@ncba.ac.cn

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胚胎肾 293T 细胞购自中国科学院细胞库, 培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 完全培养基中, 置 37°C, 5% CO₂ 恒温培养箱培养; 人胶质母细胞瘤干细胞 387GSC, 获赠于美国克利夫兰医学中心 Cleveland Clinic, Jeremy Rich 实验室, 并经本研究室进行分离与功能鉴定^[1], 在干细胞完全培养基中于 37°C, 5% CO₂ 恒温培养箱培养; *E. coli*-DH5 α 感受态细胞 (BC102-02), 北京博迈德基因技术有限公司。FBS, 中国依赛科 (ExCell Bio) 生物科技有限公司; DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗混合液、胰蛋白酶、丙酮酸钠、谷氨酰胺和磷酸钙转染试剂盒 (MaxiCaP), 中科迈晨 (北京) 科技有限公司; Neurobasal 基础培养基和 B-27 血清替代物, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 碱性成纤维细胞生长因子和上皮生长因子, 美国 R&D Systems 公司; 5 \times 慢病毒浓缩液, 北京康润诚业生物科技有限公司 (Genstar); Prime Script RT Master Mix 逆转录试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; 实时荧光定量 PCR 预混液 (Power Up SYBR Green Master Mix) 试剂盒, 美国 Sigma 公司; 质粒提取试剂盒和细胞活力检测试剂盒 (CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay), 美国 Promega 公司; RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit), 德国 Qiagen 公司; 兔抗人 SLC16A10 多克隆抗体 (一抗), 英国 Abcam 公司; 小鼠抗人性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex-determining region Y-box 2, SOX2) 单抗隆抗体 (一抗), 美国 Cell Signaling Technology 公司; Alexa Fluor 488 (绿色荧光) 标记驴抗兔 IgG 抗体 (二抗)、Alexa Fluor 546 (红色荧光) 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体 (二抗) 和 Hoechst 33342 细胞核染料, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GAPDH 抗体, 实验室自制。低温高速离心机 (型号 5424R) 和常温

高速离心机 (型号 5424), 德国 Eppendorf 公司; Glomax 96 微孔板发光检测仪 (型号 9101-002), 美国 Promega 公司; 电泳仪 (Basicpower), 美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (型号 LC96), 美国 Roche 公司。

1.2 细胞培养和处理

DMEM 完全培养基配制: 于 DMEM 培养基 500 mL 中加 FBS 50 mL 和青霉素-链霉素双抗混合液 5.5 mL, 摇匀置冰箱 4°C 保存。

干细胞完全培养基配制: 向 500 mL Neurobasal 基础培养基中加青霉素-链霉素双抗混合液、丙酮酸钠和谷氨酰胺各 5.3 mL, 随后加 B-27 血清替代物 10 mL 以及终浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碱性成纤维细胞生长因子和上皮生长因子, 摇匀于冰箱 4°C 保存。

387NSTC 分化: 按血清诱导干细胞分化的方法^[1], 将消化处理后的 387GSC 进行细胞计数; 取 2 \times 10⁶ 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿, 加入 DMEM 完全培养基 10 mL 培养 7 d 后, 收取分化后的 387NSTC。

1.3 RT-qPCR 检测 387GSC 和 387NSTC 相关基因表达

用 RNA 提取试剂盒提取 387GSC 和 387NSTC 总 RNA, 使用 PrimeScript RT Master Mix 逆转录试剂盒合成 cDNA, 配制体系为 RNA 500 ng, 5 \times PrimeScript Mix 2 μL , DEPC 水补充至 10 μL ; 参照实时荧光定量 PCR 预混液使用说明进行荧光定量 PCR。RT-qPCR 所用引物均由 PrimerBank 网站设计, 引物序列见表 1, 由生工生物科技有限公司合成。反应结束后, 用 LightCycler[®]96sw1.1 软件分析扩增曲线和溶解曲线, 获得目的基因和对照基因 Ct 值, 用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 *SLC16A10*, *SOX2*, *Olig2* 和 *GFAP* 基因 mRNA 相对表达水平。

1.4 shSLC16A10 干涉质粒载体构建和慢病毒包装

载体质粒构建: 利用 Sigma 网站设计 *SLC16A10* 基因的小发夹 (small hairpin RNA, shRNA) 引物

Tab.1 Primer sequences for real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>SLC16A10</i>	5'-ATGCTGGAAACCTTCGGCTC-3'	5'-TGAAGACGCTGACTATTGGGC-3'
<i>SOX2</i>	5'-GCCGAGTGGAAACTTTTGTTCG-3'	5'-GCCGAGTGGAAACTTTTGTTCG-3'
<i>Olig2</i>	5'-CAAGAAGCAAATGACAGAGCCGGA-3'	5'-TGGTGAGCATGAGGATGTAGTTGC-3'
<i>GFAP</i>	5'-G AGCCTCAAGGACGAGATGG-3'	5'-CCAGGCTGGTTTCTCGAATCT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3'	5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

SLC16A10: solute carrier family 16A member 10; *SOX2*: sex determining region Y-box 2; *Olig2*: oligodendrocyte lineage transcription factor 2; *GFAP*: glial fibrillary acidic protein.

Tab.2 Primer sequences for small hairpin RNA (shRNA)

shRNA	Forward primer	Reverse primer
shSLC16A10#1	CCGGCCTGGTGTGAAGAAGGTTTATCTCG	AATTCAAAAACCTGGTGTGAAGAAGGTT
	AGATAAACCTTCTTCACACCAGGTTTTTG	TATCTCGAGTAAACCTTCTTCACACCAGG
shSLC16A10#2	CCGGGCGTCTTCACAGACCTATTTGCTCG	AATTCAAAAACGTCTTCACAGACCTATTT
	AGCAAATAGGTCTGTGAAGACGCTTTTTG	GCTCGAGCAAATAGGTCTGTGAAGACGC
shNT	CCGTTCTCCGAACGTGTCACGTCTCG	AATTCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACG
	AGACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTG	TCTCGAGACGTGACACGTTCCGGAGAA

shNT: sh-non-target.

序列,选择 2 对敲低效率最高的引物(分别命名为 shSLC16A10#1 和 shSLC16A10#2)分别由生工生物工程股份有限公司合成;非靶向发夹结构(sh-non-target, shNT)的序列咨询擎科生物科技有限公司获得并合成引物序列见表 2。将 shNT 和 2 对 shRNA 引物退火后分别连接于 pLKO.1 质粒载体,构建含 shNT, shSLC16A10#1 和 shSLC16A10#2 干涉序列载体的质粒。

慢病毒包装:将 293T 细胞消化处理为单个细胞并计数,取 3×10^6 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿,待细胞融合度约达 60%,用磷酸钙转染试剂盒并根据使用说明进行慢病毒包装。包装质粒 psPAX2 和 pCMV-VSVG 及目的质粒(shNT, shSLC16A10#1 或 shSLC16A10#2)各 5 μ g 加入 1 mL HBS(平衡盐溶液)混匀,静置 5 min;取 70 μ L CaCl_2 缓慢滴入混合液中,缓慢混匀,静置 15 min;将转染体系滴加到细胞培养皿中,转染 5 h 后更换新的 DMEM 完全培养基。细胞培养 72 h 后收集培养基上清, $600 \times g$ 离心 3 min,取上清用 0.45 μ m 过滤器过滤;过滤后的液体中加入适当体积 5 \times PEG 病毒浓缩液混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜;低温离心机 $7000 \times g$ 离心 15 min 后弃上清,将病毒沉淀用 1 mL 冰 PBS 重悬、分装,置 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.5 慢病毒感染细胞

取 1.5×10^6 387GSC 接种于 10 cm 培养皿中,分为 shNT 对照组、靶点 1 干涉(shSLC16A10#1)组和靶点 2 干涉(shSLC16A10#2)组,每皿加 PBS 病毒重悬液 250 μ L 感染,加入 10 mL DMEM 完全培养基,置培养箱中培养。培养 2 d 后加入嘌呤霉素(终浓度 2 mg \cdot L $^{-1}$)进行筛选,筛选 2 d 后收取慢病毒感染的细胞。

1.6 Western 印迹法检测 SLC16A10 敲低效果

将收取的慢病毒感染的细胞加入 M2 细胞裂解液(每 1×10^6 细胞,加 100 μ L), 100 μ L,重悬细胞,冰

上裂解 30 min 后 4 $^\circ\text{C}$, $15\ 000 \times g$ 离心 15 min,取上清,用 Bradford 法进行蛋白质定量。取 40 μ g 总蛋白在 5% 浓缩胶和 10% 分离胶中电泳后,转膜 2 h。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加一抗[抗 SLC16A10(1:1000),抗 GAPDH(1:5000)]4 $^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜;加二抗室温摇床孵育 1 h,用 ECL 化学发光检测试剂盒显色,在暗室进行曝光显影,用 Image J 软件进行积分吸光度(integrated absorbance, IA)分析,以 SLC16A10 蛋白和内参 GAPDH 蛋白条带 IA 比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.7 SLC16A10 敲低后 387GSC 相对细胞活力和肿瘤细胞球形成数目测定

分别将 shNT 慢病毒感染对照组 shSLC16A10#1 和 shSLC16A10#2 组 387GSC 消化处理为单个细胞,计数,接种于 96 孔板,每孔 2×10^3 细胞,每组 5 复孔,各接种 4 个 96 孔板。在接种至孔板后分别于培养第 0, 2, 4 和 6 天用 CellTiter-Glo 试剂盒检测 387GSC 相对细胞活力。

在培养第 4 天同时观察各组孔板中细胞生长形态,并用成像显微镜拍照,统计每组肿瘤细胞球数目。

1.8 细胞免疫荧光检测 SLC16A10 细胞定位

将免疫荧光专用小玻片(platinum line cover glass 玻片)置于 24 孔板内,并加入 Metrigel 胶 300 μ L 置 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱 30 min,每孔接种 1×10^5 387GSC,培养过夜。用预热的 4% 多聚甲醛固定 15 min,在含 0.3% Triton X-100 的 1 \times PBS 中打孔 1 h,加入 1% BSA 封闭液 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1 h,加一抗[抗 SLC16A10 和抗 SOX2(1:100)]4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,加二抗(1:400)室温孵育 1 h, Hoechst 33342(1:1000)溶于 PBS 中染核 8 min, PBS 清洗 3 次,封片剂封片。用激光共聚焦显微镜观察细胞染色,并采集图像,分析 SOX2 蛋白表达及 SLC16A10 和 SOX2 细胞定位。

1.9 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPad

Prism 7.0 和 Excel 软件作图并进行统计学分析。两组之间比较采用非配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SLC16A10 在 GSC 中高表达

如图 1 所示, 与 387GSC 相比, 387NSTC 中 *SLC16A10* mRNA 表达明显减弱 ($P < 0.01$), 表明 *SLC16A10* 在 387GSC 中高表达; 同时肿瘤干细胞标志物 *SOX2* 和 *Olig2* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), 非干细胞标志物 *GFAP* 表达显著升高 ($P < 0.01$), 表明 387GSC 分化为 387NSTC。

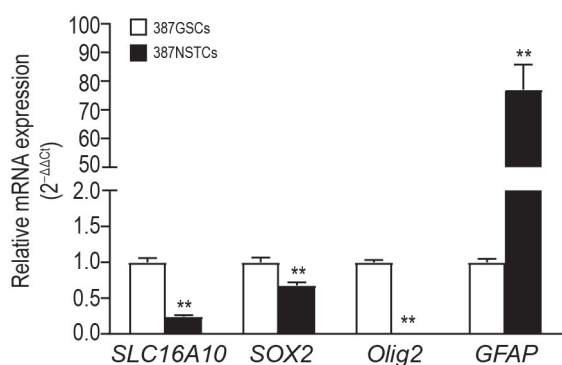


Fig.1 Expressions of *SLC16A10*, *SOX2*, *Olig2* and *GFAP* mRNA in 387 glioma stem cells (387GSCs) and 387 non-stem tumor cells (387NSTCs) detected by RT-qPCR. Differentiation of 387GSCs was induced by exposure to DMEM with 10% fetal bovine serum for 7 d. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with 387GSC group.

2.2 387GSC 中 SLC16A10 敲低效果

Western 印迹法结果 (图 2) 所示, 与 shNT 对照组相比, sh*SLC16A10*#1 和 sh*SLC16A10*#2 组 387GSC *SLC16A10* 表达均显著下降 ($P < 0.01$), 表明 2 个靶点干扰效果明显, 可用于功能实验。

2.3 敲低 SLC16A10 抑制 387GSC 增殖

如图 3 所示, shNT 对照组 387GSC 相对细胞活力随时间延长明显升高 ($P < 0.01$); 与 shNT 对照组比较, sh*SLC16A10*#1 和 sh*SLC16A10*#2 组 387GSC 相对细胞活力均下降 ($P < 0.01$), 表明敲低 *SLC16A10* 可明显抑制 387GSC 增殖。

2.4 敲低 SLC16A10 抑制 387GSC 自我更新

如图 4 所示, 387GSC 在体外培养时悬浮生长, 易形成肿瘤细胞球。敲低 *SLC16A10* 组肿瘤细胞球数量较 shNT 对照组明显减少 ($P < 0.01$), 表明敲

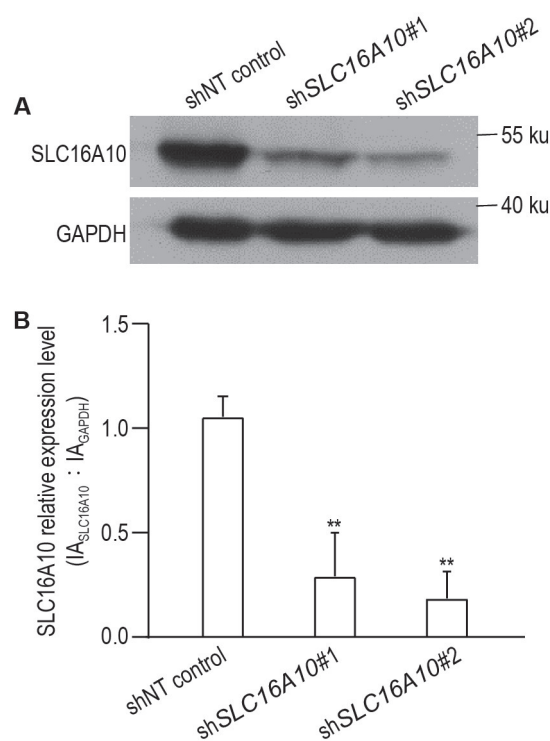


Fig.2 Efficiency of knock down SLC16A10 in 387GSCs by Western blotting. The 387GSCs were treated with PBS virus resuspension for 48 h and screening 48 h with puromycin $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. IA: integrated absorbance. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with shNT group.

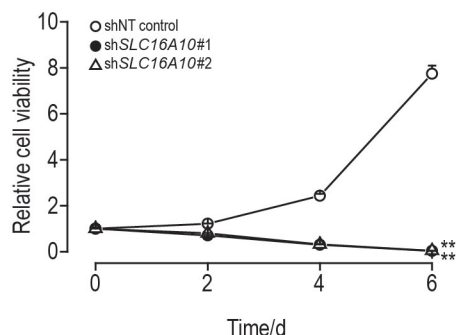


Fig.3 Effect of SLC16A10 knock down on cell viability of 387GSCs detected by CellTiter-Glo kit. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with shNT control group.

低 *SLC16A10* 后, 387GSC 肿瘤细胞球的形成能力显著降低。

2.5 SLC16A10 在 387GSC 中细胞定位

如图 5 所示, 红色荧光指示 *SOX2* 蛋白表达, 绿色荧光指示 *SLC16A10* 蛋白定位, 蓝色荧光指示细胞核。结果提示, *SOX2* 作为干细胞标志物在多数 387GSC 中表达, 且 *SOX2* 主要定位于细胞核, *SLC16A10* 蛋白不定位于 GSC 细胞核。

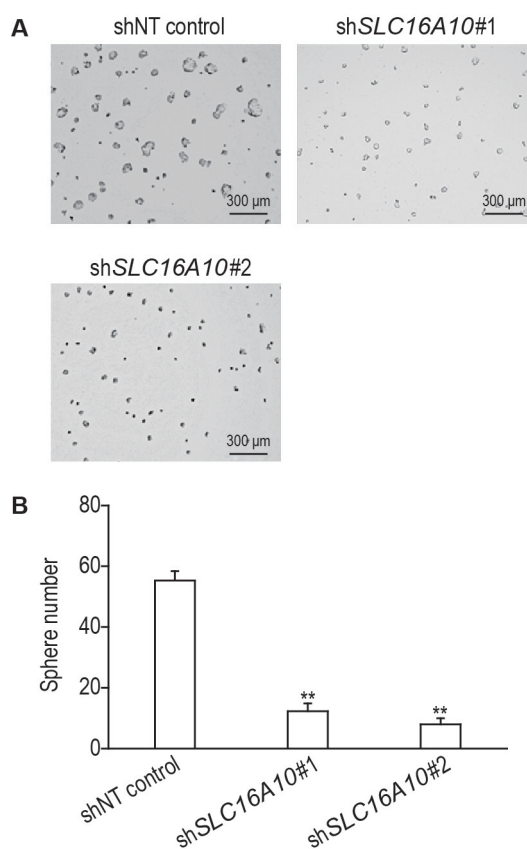


Fig.4 Effect of SLC16A10 knock down on cell self-renewal of 387GSCs. A was microscopic imaging result of sphere state of cells on the 4th day. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P < 0.01$, compared with shNT control group.

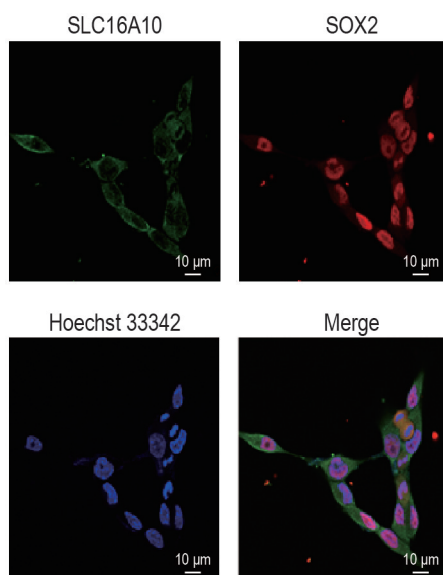


Fig.5 Cell localization of SLC16A10 in 387GSCs by immunofluorescence assay. Immunofluorescence images of 387GSCs with SLC16A10 antibody and SOX2 antibody. Nuclei were labelled with Hoechst 33342.

3 讨论

本研究结果表明, *SLC16A10* 在 387GSC 中的

表达水平显著高于 387NSTC, 提示 *SLC16A10* 在 GSC 中高表达, 在 GSC 生长、增殖、迁移、侵袭以及抵抗放化疗中可能发挥特殊功能。SOX2 和 Olig2 是肿瘤干细胞标志物, GFAP 是非干性肿瘤细胞标志物, 可共同指示 387GSC 分化为 387NSTC 后细胞干性丢失。研究结果表明, 分化 7 d 后, 387NSTC 内 SOX2 和 Olig2 mRNA 表达显著下降, GFAP mRNA 表达升高, 表明 387NSTC 已分化完成。

本研究通过慢病毒转染体系干涉 GSC 中 SLC16A10 的表达。结果表明, 靶向 SLC16A10 mRNA 的 2 个不同 shRNA 序列的慢病毒均可明显抑制 387GSC 中 SLC16A10 的表达。同时, 敲低 SLC16A10 的 387GSC 相对细胞活力和细胞球形成均受到显著抑制。细胞球形成数目反映 387GSC 自我更新能力。由此表明, SLC16A10 在 387GSC 增殖和自我更新过程中发挥重要功能, 是一种潜在胶质瘤的治疗靶点。

本研究通过免疫荧光实验检测 SLC16A10 蛋白在 387GSC 中的细胞定位, 实验结果初步排除了 SLC16A10 蛋白定位于细胞核的可能性。SLC16A10 蛋白的细胞膜或细胞质定位需进一步实验研究。

芳香族氨基酸的非正常代谢是多种疾病的致病因素^[17], 高含量的芳香族氨基酸也可作为诊断多种癌症的潜在的生物标志物^[18]。SLC16A10 作为一种重要的芳香族氨基酸转运体, 在 387GSC 中特异性高表达, 这是否与脑胶质瘤中芳香族氨基酸代谢有关, 尚有待进一步研究。

综上, 本研究结果表明, SLC16A10 是一种有潜力的胶质瘤治疗靶点或诊断标志物。关于敲低 SLC16A10 抑制 387GSC 增殖及自我更新能力的具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [2] Yuan X, Curtin J, Xiong Y, *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme[J]. *Oncogene*, 2004, 23(58): 9392-9400.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [4] Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(5):

- 319-331.
- [5] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, *et al*. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2683-2710.
- [6] Shah U, Morrison T. A review of the symptomatic management of malignant gliomas in adults[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2013, 11(4): 424-429.
- [7] Cheng L, Huang Z, Zhou W, *et al*. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth[J]. *Cell*, 2013, 153(1): 139-152.
- [8] Zhou W, Ke SQ, Huang Z, *et al*. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 170-182.
- [9] Halestrap AP. The *SLC16* gene family-structure, role and regulation in health and disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 337-349.
- [10] Visser WE, Friesema EC, Jansen J, *et al*. Thyroid hormone transport in and out of cells[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(2): 50-56.
- [11] Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, *et al*. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location[J]. *Genomics*, 2002, 79(1): 95-103.
- [12] Ramadan T, Camargo SM, Summa V, *et al*. Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (SLC16A10) functions as an efflux pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 206(3): 771-779.
- [13] Halestrap AP, Meredith D. The *SLC16* gene family from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond[J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447(5): 619-628.
- [14] van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters[J]. *J Mol Endocrinol*, 2010, 44(1): 1-11.
- [15] Heuer H, Visser TJ. Minireview: pathophysiological importance of thyroid hormone transporters[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(3): 1078-1083.
- [16] Meredith D, Christian HC. The SLC16 monocarboxylate transporter family[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(7-8): 1072-1106.
- [17] Contorno S, Darienzo RE, Tannenbaum R. Evaluation of aromatic amino acids as potential biomarkers in breast cancer by Raman spectroscopy analysis [J / OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1698 [2021-02-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33462309>. DOI: 10.1038/s41598-021-81296-3.
- [18] Deng K, Lin S, Zhou L, *et al*. Three aromatic amino acids in gastric juice as potential biomarkers for gastric malignancies[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 694(1-2): 100-107.

Effect of solute carrier family 16 member 10 (SLC16A10) on proliferation and self-renewal of glioma stem cells

LI Yuan-yuan¹, HUANG Hao-hao², MAN Jiang-hong¹

(1. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China; 2. Department of Neurosurgery, General Hospital of Central Theater Command of PLA, Wuhan 430070, China)

Abstract: OBJECTIVE To explore the function of solute carrier family 16 member 10 (SLC16A10) in glioma stem cells (GSCs), and to provide a new potential target for GSC therapy. **METHODS** 387GSCs were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum for 7 d and induced into 387 non-stem-tumor cells (387NSTCs). RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of *SLC16A10*, sex determining region Y-box 2 (*SOX2*), oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (*Olig2*) and Glial fibrillary acidic protein (*GFAP*) in 387GSCs and 387NSTCs. The interference plasmid targeting *SLC16A10* gene was constructed, and the virus was packaged. After 48 h of lentivirus infection, purinomycin (2 mg·L⁻¹) was screened for 2 d. The SLC16A10 protein level was detected by Western blotting to verify the knockdown efficiency. The cell viability of 387GSCs after SLC16A10 knockdown was detected by Celltiter-Glo kit, the formation of tumor cell spheres was observed, and the number of tumor cell spheres was counted. The cell localization of SLC16A10 protein in 387GSCs was detected by immuno-

fluorescence assay. **RESULTS** Compared with 387GSCs, the *SLC16A10* mRNA level in 387NSTCs was significantly decreased ($P<0.01$). At the same time, the mRNA expressions of tumor stem cell markers *SOX2* and *Olig2* were decreased ($P<0.01$), and the mRNA expression of non-stem-cell marker *GFAP* was increased ($P<0.01$). These results indicated that 387GSCs had differentiated into 387NSTCs. After *SLC16A10* was knocked down by two interference sequences in 387GSCs, the cell viability of 387GSCs was significantly decreased ($P<0.01$), and the number of tumor cell spheres of 387GSCs was significantly inhibited ($P<0.01$). Immunofluorescence results suggested that *SLC16A10* was localized outside the nuclei of 387GSCs. **CONCLUSION** *SLC16A10* is highly expressed in 387GSCs, and 387GSC viability and sphere formation ability are significantly inhibited when *SLC16A10* is knocked down, which suggests that *SLC16A10* may play an important role in the occurrence and development of glioma.

Key words: solute carrier family 16 member 10 (*SLC16A10*); glioma stem cells; cell proliferation; cell self-renewal

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81872408)

Corresponding author: MAN Jiang-hong, E-mail: jhman@ncba.ac.cn

(收稿日期: 2021-02-02 接受日期: 2021-04-29)

(本文编辑: 齐春会)

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国药理学与毒理学杂志》是由中国药理学会、中国毒理学会和军事医学科学院毒物药物研究所共同主办的高级学术性刊物, 1986 年创刊, 2016 年由双月刊改为月刊。被北大图书馆评为药学专业中文核心期刊(中文核心期刊要目总览), 同时还是中国核心科技期刊、中国学术核心期刊和中国生物医学核心期刊等。本刊被美国《化学文摘》(CA) 等十余家数据库收录。

《中国药理学与毒理学杂志》设有前沿论坛、论著、实验方法和综述栏目。读者对象主要为从事药理学、毒理学、药学、医学和生物基础科学研究的工作者。中英文稿件兼收, 更欢迎英文稿件。

遵照上级部门有关规定, 本刊目前暂停收稿件处理费和版面费。

本刊全年 12 期, 每期定价 20.00 元。国内外公开发行, 国内邮发代号: 82-140, 国外邮发代号: BM-1051。本刊主要通过邮局订阅, 也可以联系编辑部商谈杂志订阅事宜。

地址: 北京市海淀区太平路 27 号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部

邮编: 100850

电话: (010)66930636, (010)66931617

E-mail: cjpt518@163.com

网址: http://202.38.153.236:81/Jweb_cjpt