

乳酸脱氢酶 A 在人胆管癌组织及胆管癌细胞中的表达及意义

廖敏琪,傅 赞*,于亚平,韩 涛

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase-A, LDH-A)在胆管癌组织及人胆管癌细胞株中的表达情况。方法:应用免疫组织化学方法检测 32 例胆管癌组织、15 例癌旁组织中 LDH-A 的表达;采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、Western blot 法检测 LDH-A 在人胆管癌细胞株 HuCCT1 及人正常胆管上皮细胞株 HIBEpic 中的表达。结果:LDH-A 在胆管癌组织中呈高表达 18/32(56.3%, $P < 0.01$),在 HuCCT1 细胞中亦呈现高表达,而 HIBEpic 细胞则表现为低表达。结论:LDH-A 在胆管癌组织及人胆管癌细胞株 HuCCT1 中高表达,说明 LDH-A 与胆管癌的发生、发展可能具有关联性。

[关键词] 胆管癌;乳酸脱氢酶 A;有氧酵解

[中图分类号] Q786;R735.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-682-04

Expression and significance of lactate dehydrogenase-A in human cholangiocarcinoma tissues and cell lines

LIAO Min-qi, FU Zan*, YU Ya-ping, HAN Tao

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of lactate dehydrogenase-A (LDH-A) in cholangiocarcinoma tissues, human cholangiocarcinoma cell line HuCCT1 and human normal bile duct epithelium cell line HIBEpic. **Methods:** The expression of LDH-A in 32 cholangiocarcinoma and 15 adjacent non-cancerous tissues was analyzed by immunohistochemistry. RT-PCR and Western blotting assays were used to detect the expression of LDH-A in human cholangiocarcinoma cell line HuCCT1 and human normal bile duct epithelium cell line HIBEpic. **Results:** LDH-A was overexpressed in 56.3% (18/32) cholangiocarcinoma tissues ($P < 0.01$) and in HuCCT1 cells but not in HIBEpic cells. **Conclusion:** Cholangiocarcinoma tissues and human cholangiocarcinoma cell lines HuCCT1 overexpress LDH-A, indicating that LDH-A may play an important role in the initiation and progression of cholangiocarcinoma.

[Key words] cholangiocarcinoma; lactate dehydrogenase-A; aerobic glycolysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 682-685]

胆管癌是胆道系统的恶性肿瘤,其发病的病因不明、诊断困难、患者的预后较差,且近年来国内病例数出现增多的趋势,多是晚期发现、病死率高。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是糖酵解的关键酶之一,它是一种四聚体酶,具有由 M 亚基和 H 亚基不同比例组成 5 种同工酶(LDH-1~LDH-5),乳酸脱氢酶 A(LDH-A 即 LDH-5, M4 型)催化丙酮酸转化为乳酸。研究显示肿瘤的生长与 LDH 密切相关,患者血清 LDH 活性增高、肿瘤细胞中出现 LDH-A 表达量增多等现象^[1]。鉴于国内外在胆管癌此方

面研究甚少,本实验检测了 LDH-A 在胆管癌组织及细胞中的表达情况。

1 资料与方法

1.1 标本与试剂

32 例胆管癌组织石蜡块取自 2011 年 1 月~10 月于南京医科大学第一附属医院进行根治性手术切除且病理证实为肝内胆管癌之标本,其中男 15 例,女 17 例,平均年龄 56.2 岁(35~88 岁);14 例为中高分化,18 例为低分化;术前均未行放、化疗等抗肿瘤治疗。另取 15 例癌旁组织作为对照。人胆管癌细胞株 HuCCT1 和人正常胆管上皮细胞株 HIBEpic 购自中科院上海细胞库。

[基金项目] 江苏省兴卫工程重点人才专项基金(H201116)

*通讯作者, E-mail: fu_zan@qq.com

DMEM(高塘)培养基(Gibco 公司,美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),绵羊抗人 LDH-A 抗体(Abcam 公司,英国);辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗绵羊 IgG(Bioworld 公司,美国);SP 免疫组化试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);TRIzol 试剂盒、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 生物科技公司,日本); β -actin 抗体(北京博奥森生物技术公司);细胞蛋白裂解液(武汉碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测

石蜡切片进行脱蜡及水化。阻断内源性过氧化物酶、抗原修复。滴加 1:100 绵羊抗人 LDH-A 多克隆抗体 4℃过夜,复温、PBS 洗涤之后,滴加二抗室温静置后,滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶试剂 10 min,DAB 显色再由苏木素复染,最后脱水、封片、镜检。结果判断:LDH-A 蛋白阳性染色于细胞质,呈现不同程度的棕黄色,个别几例出现核染。阳性细胞比例由 2 位本院病理学专家判定,在 200 倍镜下选择 3 个视野,根据阳性细胞数的比例分为两个级别^[2],50%以上细胞的细胞质强染色为高表达,反之则为低表达。

1.2.2 细胞培养

人胆管癌细胞株 HuCCT1 和人正常胆管上皮细胞株 HIBEpic 皆用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中孵育。培养至对数生长期时,用 0.25%胰蛋白酶(含 0.02%EDTA)消化,按需要的细胞浓度接种于培养板中。

1.2.3 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

利用 Primer5.0 软件设计 PCR 引物,LDH-A 的上游引物为 5'-AGCCCGATTCCGTTACCT-3',下游引物为 5'-CACCAGCAACATTCATTCCA-3',扩增产物片段为 125 bp,由上海英俊公司合成。细胞用胰酶消化后,TRIzol 法提取细胞总 RNA,以 RNA 为模板合成 cDNA 进行反转录,反应条件为:37℃ 15 min,

85℃ 5 s。PCR 反应:预变性 95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s 共 29 个循环,末次延伸 72℃ 10 min。产物以 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,观察结果。

1.2.4 Western blot

将培养皿中的细胞用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液,用细胞刮勺刮下细胞,4℃ 14 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,将蛋白调整一致加入缓冲液 100℃煮沸 5 min。制备 10%的 SDS-PAGE 胶,蛋白电泳后电转移至 PVDF 膜,将膜置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 液中 1 h,加入一抗孵育 4℃过夜,二抗继续孵育 2~4 h 后观察结果。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计,免疫组化样本比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测胆管癌组织中 LDH-A 表达情况

32 例胆管癌组织中 18 例出现高表达,高表达率 56.3%,主要在肿瘤细胞的细胞质中表达(表 1,图 1),少数出现核染。癌旁组织均表现为低表达。胆管癌与癌旁组织中 LDH-A 表达差异具有显著的统计学意义($\chi^2 = 13.674, P < 0.001$)。

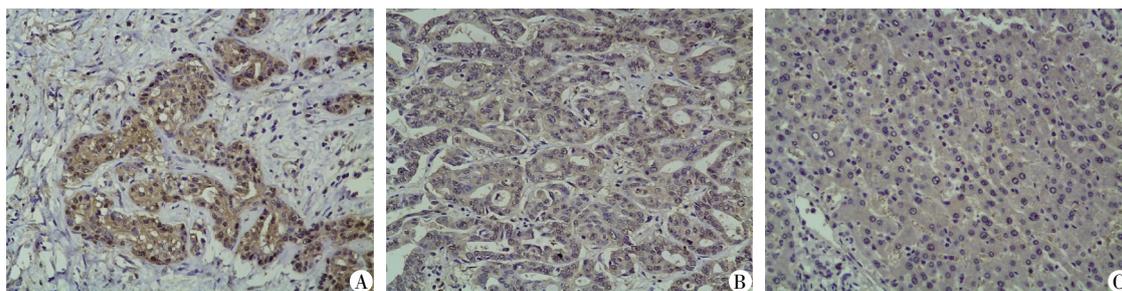
表 1 LDH-A 在胆管癌组织及癌旁组织的表达情况

Table 1 The expression of LDH-A in cholangiocarcinoma and adjacent non-cancerous tissues (n)

组织类型	n	LDH-A	
		高表达	低表达
胆管癌组织	32	18	14
癌旁组织	15	0	15

2.2 RT-PCR、Western blot 检测人胆管癌细胞株 HuCCT1 的 LDH-A 表达情况

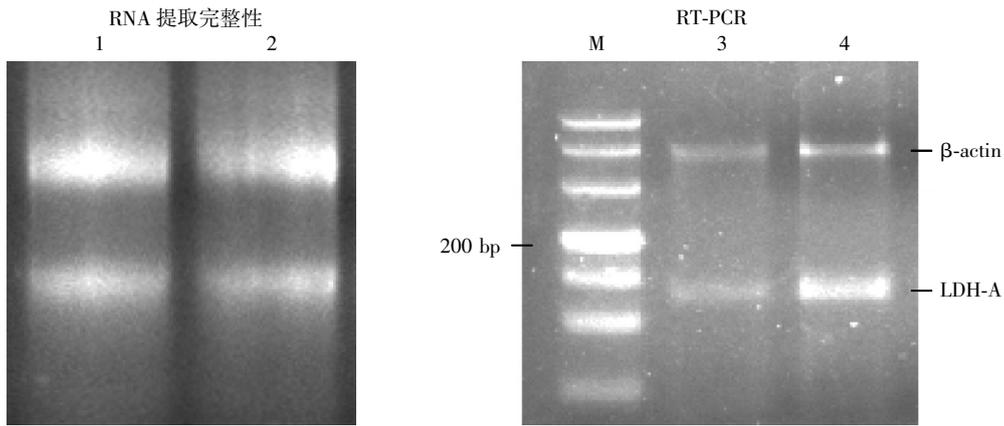
结果表明 HuCCT1 细胞 LDH-A 表达高于人正常胆管上皮细胞株 HIBEpic(图 2、3)。



A:胆管癌组织高表达;B:胆管癌组织低表达;C:癌旁组织低表达。

图 1 胆管癌组织和癌旁组织中 LDH-A 的表达情况(免疫组化,× 200)

Figure 1 The expression of LDH-A in cholangiocarcinoma tissues and adjacent noncancerous tissues (× 200)



1:HIBEpic 总 RNA;2:HuCCT1 总 RNA;M:DNA Marker;3:HIBEpic;4:HuCCT1。

图 2 RT-PCR 检测 LDH-A 在 HuCCT1 及 HIBEpic 细胞中的表达

Figure 2 The expression of LDH-A in HuCCT1 and HIBEpic cells by using RT-PCR

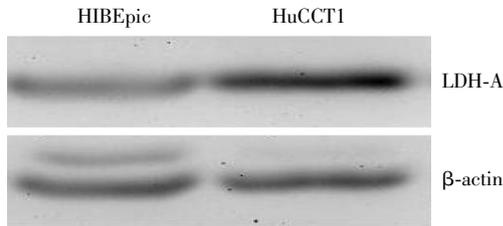


图 3 Western blot 检测 LDH-A 在 HuCCT1 及 HIBEpic 细胞中的表达

Figure 3 The expression of LDH-A in HuCCT1 and HIBEpic cells by using Western blot

3 讨论

细胞代谢需要能量,而提供能量是葡萄糖最主要的功能。正常氧分压情况下细胞糖代谢机制是由三羧酸循环代谢丙酮酸,低氧环境时才由 LDH 取代以得到能量。然而,20 世纪 20 年代有学者发现在氧分压正常时,肿瘤细胞亦倾向于利用糖酵解得到能量,而较少进入三羧酸循环(Warburg 效应)^[3],此后有氧糖酵解及糖酵解酶就成了研究的热点。但这个机制产生的原因目前没有定论,一般认为与肿瘤微环境、癌基因 K-ras、c-Myc 的激活及抑癌基因 P53 的失活等有关^[4]。

肿瘤细胞糖酵解作用增加后将造成 LDH 表达增多,其中主要催化丙酮酸的 LDH-A 便成了极其关键的角色。研究表明 LDH-A 在结直肠癌、子宫内膜癌、胃癌等出现高表达,并与患者较差的预后具有显著的相关性^[5-7]。本实验检测出 56.3%的胆管癌组织中出现 LDH-A 高表达的现象,而癌旁组织则皆为低表达;同样地,人胆管癌细胞株 HuCCT1 中 LDH-A 含量亦明显高于正常胆管上皮细胞株 HIBEpic,可

以认为胆管癌中 LDH 表达很活跃,癌细胞的有氧酵解作用增强。此结果与一些文献报道胆管癌患者癌组织较癌旁正常组织摄取 2-氟-2-脱氧-D-葡萄糖(¹⁸F-FDG)显著增加^[8-9]的结论相符,说明癌组织摄取葡萄糖多于正常组织,LDH-A 极可能参与胆管癌的发生、发展过程。

由于正常细胞主要利用氧化磷酸化获取能量,若通过抑制 LDH 表达理论上应不会对其代谢产生巨大的影响。部分研究显示,丙酮酸可以减少钙释放激活钙(calcium release-activated calcium, CRAC)通道失活导致细胞内钙离子增多^[10],若以草氨酸作用于癌细胞使之与丙酮酸竞争结合 LDH,结果可使丙酮酸含量增多最终癌细胞内出现钙离子浓度升高,引起线粒体钙超载而诱导细胞凋亡^[11]。Fiume 等^[12]在近期的研究中指出,阻断肝癌细胞有氧酵解使其 ATP 水平减少后,部分激酶抑制剂作用于肝癌细胞时的抗增殖能力可以增强;同时,阻断肝癌细胞有氧酵解后,草氨酸不会再使癌细胞中的 ATP 水平有所减少,说明不依赖有氧酵解合成 ATP 的正常组织在抑制 LDH 表达后不会损伤细胞的代谢作用。另有研究报道,通过抑制 LDH-A 的表达可阻断胰腺癌及乳腺癌等恶性肿瘤细胞的有氧酵解作用,抑制细胞增殖及诱导凋亡发生^[13-14]。这些报道皆提示 LDH 及当中最关键的亚型 LDH-A 在肿瘤的生物行为里具有重要的作用,可为肿瘤靶向治疗提供一个新的参考。

总之,本实验验证了胆管癌存在 Warburg 效应,胆管癌组织及人胆管癌 HuCCT1 细胞皆高表达 LDH-A,表明胆管癌能量代谢中可能出现有氧酵解作用增加,值得更进一步的实验,如通过 siRNA 或

药物干扰等研究达到抑制胆管癌细胞生长或加速其凋亡的目的,为胆管癌提供新的临床诊治方法。

[参考文献]

- [1] Koukourakis MI, Kontomanolis E, Giatromanolaki A, et al. Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases[J]. Gynecol Obstet Invest, 2009, 67(3): 162-168
- [2] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer; strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26): 4301-4308
- [3] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect; the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324(5930): 1029-1033
- [4] Tennant DA, Durán RV, Boulahbel H, et al. Metabolic transformation in cancer [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(8): 1269-1280
- [5] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, et al. Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer[J]. Clinical Exp Metastasis, 2005, 22(1): 25-30
- [6] Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2 (KDR) pathway and prognosis[J]. Gynecol Oncol, 2006, 103(3): 912-918
- [7] Kolev Y, Uetake H, Takaqi Y, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer; association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis [J]. Ann Sur Oncol, 2008, 15(8): 2336-2344
- [8] Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, et al. Clinicopathological presentation of varying 18F-FDG uptake and expression of glucose transporter 1 and hexokinase II in cases of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma[J]. Ann Nucl Med, 2008, 22(1): 83-86
- [9] Moon CM, Bang S, Chung JB, et al. Usefulness of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in differential diagnosis and staging of cholangiocarcinomas [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(5): 759-765
- [10] Bakowski D, Parekh AB. Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid [J]. Curr Biol, 2007, 17(12): 1076-1081
- [11] 张树华, 王春友, 熊炯圻. 草氨酸盐对人胰腺癌细胞内钙含量影响的研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 861-864
- [12] Fiume L, Vettraino M, Manerba M, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase as a way to increase the anti-proliferative effect of multi-targeted kinase inhibitors [J]. Pharmacol Res, 2011, 63(4): 328-334
- [13] Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance [J]. Cancer Cell, 2006, 9(6): 425-434
- [14] Le A, Cooper CR, Gouw AM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(5): 2037-2042

[收稿日期] 2012-01-08

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³, 30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)