

## RNA 干扰下调人胆管癌细胞系 Hucct-1 乳酸脱氢酶-A 表达的体外研究

于亚平<sup>1</sup>,傅 赞<sup>2\*</sup>,韩 涛<sup>2</sup>,廖敏琪<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院微创外科,<sup>2</sup>普外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:体外实验观察乳酸脱氢酶-A(lactate dehydrogenase-A, LDHA)短发夹 RNA 对胆管癌细胞系 Hucct1 LDHA 表达的抑制效果,筛选出针对 LDHA 基因有效的干扰靶点,并检测 LDHA 表达下调后,细胞增殖活力的改变情况。方法:设计合成干扰 LDHA 表达的寡核苷酸片段,经退火、连接等步骤克隆到线性化 pGPU6/GFP/Neo 真核表达载体,转化入 DH-5 $\alpha$  大肠杆菌中扩增,经质粒抽提纯化后测序鉴定。重组质粒用脂质体法转染胆管癌细胞系,荧光显微镜观察转染效率;并分别利用 RT-PCR 及 Western blot 技术检测 LDHA mRNA 及蛋白表达,验证短发夹 RNA 的干扰效果。将干扰效率最高的质粒转染 Hucct-1,MTT 法检测干扰组较对照组细胞增殖的变化。结果:成功构建了靶向 LDHA 基因的 3 个 shRNA 质粒表达载体,脂质体法平均转染效率为(80  $\pm$  5)%。荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 显示瞬时转染 si-LDHA-1、si-LDHA-3 的 Hucct1 细胞 LDHA mRNA 和蛋白表达均较阴性对照组有不同程度的下降,其中 si-LDHA-3 干扰效果尤为明显。MTT 法检测显示转染组 Hucct1 细胞较阴性对照组增殖减慢,转染后 96 h 两组差异具有统计学差异( $P < 0.05$ )。结论:重组质粒能有效干扰胆管癌细胞 Hucct1 中 LDHA 基因的表达,经瞬时转染筛选出了有效干扰靶点,下调 LDHA 的表达,明显抑制胆管癌细胞系 Hucct-1 的增殖活力。

**[关键词]** 胆管癌; RNA 干扰; 乳酸脱氢酶 A

**[中图分类号]** R730.231

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-913-05

## Knock-down expression of lactate dehydrogenase-A (LDHA) by RNA interference in cholangiocarcinoma cell line Hucct1 *in vitro*

YU Ya-ping<sup>1</sup>,FU Zan<sup>2\*</sup>,HAN Tao<sup>2</sup>,LIAO Min-qi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Minimally Invasive Surgery,<sup>2</sup>Department of General Surgery,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate inhibitory effect of lactate dehydrogenase-A (LDHA) short hairpin RNA (shRNA) on the expression of LDHA in human cholangiocarcinoma cell line Hucct-1 and observe the effect of LDHA down-expression on the proliferation of Hucct-1 cells. **Methods:** Three pairs of oligonucleotides targeting LDHA were cloned into linearized pGPU6/GFP/Neo eukaryotic expression vector after annealing. Hucct-1 cells were transfected with the recombinant plasmids that were identified by sequencing. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to evaluate the effect of RNA interference on the transcription of LDHA gene and the expression of LDHA protein respectively. **Results:** DNA sequencing confirmed that three recombinant plasmids were successfully constructed. The si-LDHA-1 and si-LDHA-3 showed higher interfering efficiency. Compared with that of negative control, the protein expression inhibition rates of si-LDHA-1 and si-LDHA-3 were (50  $\pm$  3)% ( $P < 0.05$ ) and (70  $\pm$  2)% ( $P < 0.05$ ). MTT assay showed that the proliferation of LDHA knocked-down Hucct1 cell (si-LDHA-3) was slower than negative control Hucct1 cell (si-NC), and there was significant difference in the absorbance value between transfected cells and negative control cells at 96 h after transfection ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The recombinant plasmid can effectively knockdown the expression of LDHA in Hucct1 cells, and two efficient interfering targets in LDHA gene are screened out. Inhibition of LDHA expression evidently results in inhibition of Hucct-1 proliferation.

**[Key words]** cholangiocarcinoma; RNA interference; lactate dehydrogenase-A

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 913-917]

**[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

胆管癌是起源于胆管上皮的恶性程度极高的肿瘤,近年来发病率不断升高<sup>[1]</sup>;目前尚无有效的治疗方式,进展期胆管癌患者中位生存时间不超过1年<sup>[2-3]</sup>。研究胆管癌发病机制,寻找新的胆管癌治疗方式是提高胆管癌患者预后较为可行的方式之一。

乳酸脱氢酶广泛存在于人体的各个组织中,主要催化糖酵解途径的终产物丙酮酸和乳酸之间的相互转化。乳酸脱氢酶按照组成亚基(M型、H型)的差异分为5种同工酶<sup>[4]</sup>。乳酸脱氢酶-A(lactate dehydrogenase-A, LDHA)属于乳酸脱氢酶家族同工酶之一,全部由M型亚基组成,正常情况下主要分布在肌肉组织中。LDHA主要功能是催化丙酮酸向乳酸转化,同时将NADH转化成NAD<sup>+</sup>。LDHA基因的突变在人体除可导致运动型肌红蛋白尿之外,对人体影响不大<sup>[5-6]</sup>。近年来研究发现LDHA在各种实体肿瘤组织中异常表达,且和肿瘤的分化及患者的预后具有重要的关系<sup>[7-8]</sup>。下调结肠癌、胰腺癌及乳腺癌LDHA表达的研究,表明LDHA在这些肿瘤的发生及进展中具有至关重要的作用,LDHA可能是一个有效的治疗靶点<sup>[8]</sup>。但是目前关于胆管癌LDHA表达对胆管癌生长的影响还不清楚。

为此,本研究通过构建针对LDHA mRNA的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)真核表达质粒,并转染人胆管癌细胞系Hucct-1,干扰LDHA的表达,经实时荧光定量PCR和Western blot分别在核酸和蛋白水平上验证干扰效率,筛选出针对LDHA mRNA的有效靶位,并进一步检测LDHA下调对胆管癌细胞增殖活力的影响,为研究LDHA在胆管癌发生、发展过程中的作用以及在肿瘤基因治疗中的应用打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胆管癌细胞系Hucct1购自中国医学科学院上海细胞库。pGPU6/GFP/Neo环形质粒载体购自上海吉玛制药公司,携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因并不干扰任何内源基因的短发夹状RNA载体,同时携有U6启动子及氨苄、卡那霉素及新霉素抗性。细胞培养液为含10%胎牛血清的DMEM培养液。胎牛血清、DMEM(美国Gibico公司),感受态大肠杆菌DH-5 $\alpha$ (北京天根公司)。限制性内切酶BamHI、HindIII和T4 DNA连接酶(日本TaKaRa公司),脂质体细胞转染试剂Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司),去内毒素质粒小提试剂

盒(美国Promega公司)。人LDHA单克隆抗体(美国CST公司产品),HRP标记羊抗鼠二抗、鼠抗人 $\beta$ -actin多克隆抗体(北京博奥森公司)。BCA蛋白定量试剂盒、化学发光试剂盒(南京凯基公司)。总RNA抽提用TRIzol、RNA逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司)。噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司)。倒置相差荧光显微镜(德国Carl Zeiss公司),ABI7300实时定量PCR(美国应用生物系统公司),蛋白电泳及转膜系统(美国BioRad公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 LDHA发夹状RNA质粒表达载体的构建、扩增与纯化

依据LDHA基因序列(NM\_001165416.1)设计合成3个LDHA-siRNA寡核苷酸片段,模板序列见表1。每对寡核苷酸两端分别带有BamHI和HindIII酶切位点,将各1  $\mu$ l的正向和反向siRNA寡核苷酸片段与48  $\mu$ l的退火缓冲液混合;混合物在90 $^{\circ}$ C温育4 min,70 $^{\circ}$ C温育10 min。缓慢冷却退火的寡核苷酸片段至10 $^{\circ}$ C,同时用HindIII和BamHI限制酶将1  $\mu$ l的pGPU6/GFP/Neo环形质粒载体线性化。将2  $\mu$ l退火后的siRNA寡核苷酸片段加到T4 DNA连接酶缓冲液中,接着再加1  $\mu$ l pGPU6/GFP/Neo载体、5  $\mu$ l DEPC水、1  $\mu$ l T4 DNA连接酶,室温下孵育过夜。构建成的质粒分别称为:si-LDHA-1, si-LDHA-2, si-LDHA-3;常规方法将重组质粒及pGPU6/GFP/Neo阴性对照载体(命名为si-NC,实验室保存)转化入感受态宿主细菌DH-5 $\alpha$ ,细菌在含氨苄、卡那霉素的LB平板37 $^{\circ}$ C培养过夜后挑单克隆,接种至含氨苄、卡那霉素的LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,次日将部分菌液用10%甘油贮存在-70 $^{\circ}$ C冰箱中。余则按说明书操作以试剂盒进行质粒纯化抽提,测浓度后保存于-20 $^{\circ}$ C备用。同时将部分质粒送上海生工公司测序。

#### 1.2.2 细胞培养及LDHA短发夹RNA质粒表达载体的瞬时转染

Hucct1细胞采用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞传代于6孔板,每孔细胞为3  $\times$  10<sup>5</sup>个,保证24 h后细胞铺满90%的培养皿底部;传代24 h后按照Lipofectamine 2000推荐的操作步骤转染;转染24 h后荧光显微镜计数表达GFP的细胞数(N),并在明场下计数同一视野下细胞总数(M),利用公式(N/M  $\times$  100%)估计转染效率。

#### 1.2.3 RNA水平检测各质粒干扰效率

表 1 短发夹质粒模板序列

Table 1 Template sequences of shRNA

序列名称	shRNA 模板序列(5'→3')
si-NC	CACCGACTACCGTTGTTATAGGTGTTCAAGAGAACACCTATAACAACGGTAGTTTTTTTG
si-LDHA-1	CACCGGAGAAAGCCGTCTTAATTTCAAGAGAATTAAGACTTCTTTCTCCTTTTTTG
si-LDHA-2	CACCGGCAAAGACTATAATGTAATTTCAAGAGATTACATTATAGTCTTTGCCTTTTTTG
si-LDHA-3	CACCGTAAGGGTCTTTACGGAATATTTCAAGAGATATTCGGTAAAGACCCTTATTTTTTG

si-NC:阴性对照质粒;si-LDHA1,2及3:设计的干扰序列。

在转染后 48 h TRIzol 法提取转染细胞的总 RNA, 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞的 LDHA mRNA 的表达( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法), 比较质粒的干扰效率。利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物, 交由上海英俊公司合成, LDHA 的上游引物为 5'-AGCCCGATTC-CGTTA CCT-3', 下游引物为 5'-CACCAGCAACA TTCATTCCA-3', 扩增产物片段为 125 bp; PCR 反应条件为 95°C 30 s; 95°C 5 s, 53°C 31 s, 共 40 个循环。

#### 1.2.4 蛋白质水平检测各质粒干扰效率

转染后 72 h 提取转染细胞总蛋白, SDS-PAGE 分离目的蛋白, 湿转移法将其转移至 PVDF 膜上, 用 TBST 洗涤 5 min, 5% 脱脂奶粉常温封闭 1 h; 用 5% 脱脂奶粉 1:1 000 稀释一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 二抗(1:2 000)稀释后 37°C 孵育 1 h; 再次 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 化学发光液(ECL)孵育 1 min, BIO-RAD 采集系统拍照。以  $\beta$ -actin 为内参照。蛋白条带以 BIO-RAD 软件进行灰度值分析, 以目的条带与内参照  $\beta$ -actin 条带灰度比值代表目的基因蛋白的表达水平。

#### 1.2.5 细胞增殖检测

选择干扰效果最好的 LDHA shRNA 质粒瞬时转染 Hucct1 细胞, 并用阴性对照质粒转染作对照。将转染细胞以每孔 1 000 个细胞接种到 96 孔板, 每组接种 6 复孔; 按照上述条件培养, 分别在转染后 24、48、72、96 h MTT 法检测各孔吸光度值, 比较低表达 LDHA 的 Hucct1 细胞增殖变化情况。

#### 1.3 统计学方法

所得数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析, LSD-*t* 法检验各组与对照组间差异,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

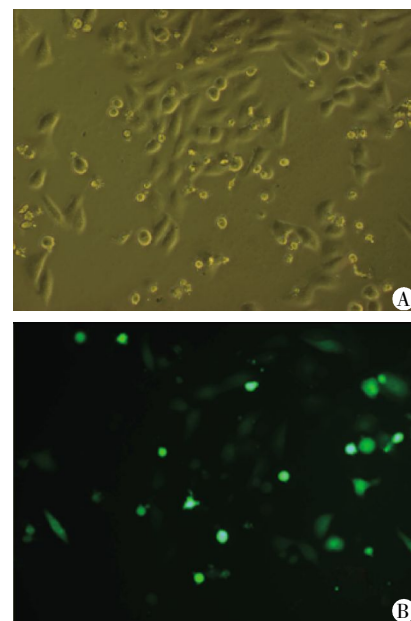
## 2 结果

### 2.1 pGPU6-LDHA 重组质粒

质粒抽提后测序结果证实与设计相符, 插入干扰序列完全一致。

### 2.2 质粒转染胆管癌细胞系 Hucct1 效率分析

利用脂质体法转染 shRNA 质粒至 Hucct1 细胞中, 按照上述方法检测干扰质粒的转染效率(图 1); 随机选取 5 个视野计算转染效率为  $(80 \pm 5)\%$ 。



转染带有 GFP 的质粒 48 h 后, 细胞在同一视野下的明场(A)及荧光(B)照片。

图 1 携带有 shRNA 的 pGPU6/GFP/Neo 质粒转染效率( $\times 200$ )

Figure 1 The transfection efficiency of pGPU6/GFP/Neo plasmid with shRNA targeting LDHA( $\times 200$ )

### 2.3 实时荧光定量 PCR 检测各干扰片段的干扰效果

如图 2 所示, si-LDHA-1, si-LDHA-2, si-LDHA-3 相对于阴性对照 si-NC 的 LDHA mRNA 表达量分别为  $(50 \pm 15)\%$ 、 $(85 \pm 11)\%$  及  $(36 \pm 11)\%$ ; 可见 1 和 3 序列干扰效果较明显( $P$  均  $< 0.05$ ), 而 2 序列干扰效果不明显, 差异无统计学意义。

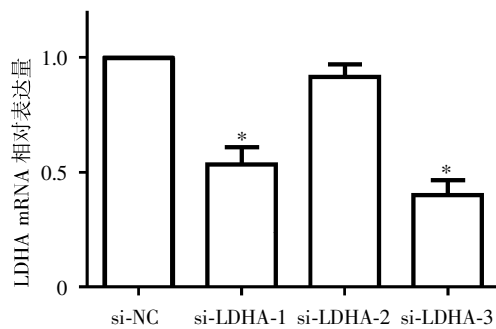
### 2.4 Western blot 在蛋白水平检测重组质粒的干扰效果

如图 3 表示各干扰质粒对 Hucct1 细胞中 LDHA 蛋白表达水平的影响, 灰度值以阴性对照组(si-NC)为 1, 各干扰组灰度值较之改变的倍数分别为:

0.49 ± 0.03 (si-LDHA-1)、0.97 ± 0.07(si-LDHA-2)、0.29 ± 0.02 (si-LDHA-3)。结果和定量 PCR 基本一致。这充分说明重组质粒载体 si-LDHA-1,si-LDHA-3 均可通过 RNA 干扰有效地抑制 LDHA 的表达。

### 2.5 LDHA 表达水平下调抑制胆管癌细胞 Hucct1 的增殖活力

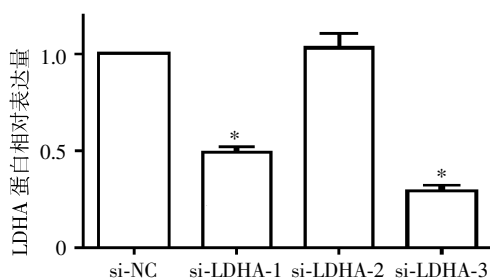
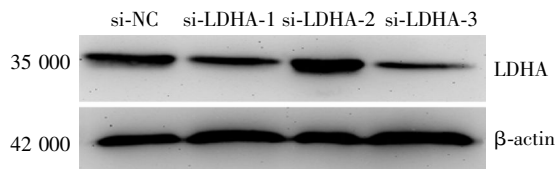
如图 4 所示,下调 LDHA 基因表达水平,随时间推移,与阴性对照 si-NC 组相比,干扰组的吸光度值增加逐渐减慢,转染后 96 h 两组吸光度值差异有统计学差异( $P < 0.05$ );这说明下调 LDHA 表达可以抑制胆管癌细胞 Hucct1 的增殖活性。



与阴性对照 si-NC 组相比, \* $P < 0.05$ ( $n = 3$ )。

图 2 实时荧光定量 PCR 检测 LDHA mRNA 的表达

Figure 2 Detection of the expression of LDHA mRNA by RT-PCR



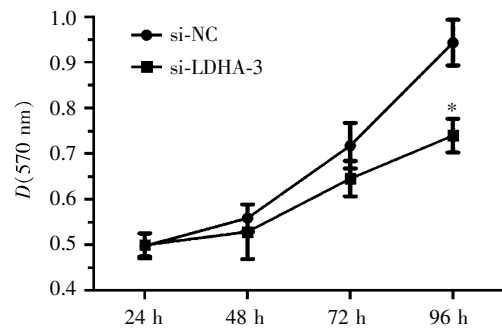
与阴性对照 si-NC 组相比, \* $P < 0.05$ ( $n = 3$ )。

图 3 Western blot 法检测 LDHA 表达

Figure 3 Detection of the expression of LDHA protein by Western blot

### 3 讨论

与正常组织细胞代谢不同,在正常氧分压的条件下恶性肿瘤细胞过量摄取葡萄糖,糖酵解活性显著增强,产生大量乳酸,氧化磷酸化反应受到抑制。肿瘤细胞的这一独特的代谢现象被称为有氧糖酵



与阴性对照 si-NC 组相比, \* $P < 0.05$ ( $n = 3$ )。

图 4 LDHA 表达下调对 Hucct-1 增殖的影响

Figure 4 The effect of down-expression of LDHA on the proliferation of Hucct-1

解<sup>[9]</sup>。糖酵解是一种不经济的能量利用方式,1 mol 葡萄糖仅可以产生 2 mol ATP, 而经氧化磷酸化却可以产生 38 mol 或 36 mol ATP。恶性肿瘤细胞倾向于采用糖酵解提供能量,从适者生存角度来看,必然是在肿瘤演进过程中对肿瘤生存微环境适应的结果。研究表明有氧糖酵解在促进肿瘤细胞增殖及逃避凋亡中具有至关重要的作用<sup>[10-11]</sup>。抑制多种恶性肿瘤细胞有氧糖酵解活性,均可以使肿瘤细胞增殖减慢,荷瘤小鼠瘤体增长缓慢、生存时间延长,达到抑制肿瘤生长的作用<sup>[12-15]</sup>。目前,通过抑制肿瘤糖酵解,从而杀伤肿瘤已经成为肿瘤治疗研究的热点<sup>[16]</sup>。

LDHA 是有氧糖酵解顺利进行必不可少的关键酶之一,通过抑制 LDHA 的表达可阻断恶性肿瘤细胞的有氧糖酵解<sup>[10]</sup>。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(2-fluorine-2-de oxidizing-D-glucose, <sup>18</sup>F-FDG)显著增加<sup>[17-18]</sup>,LDHA 基因表达水平显著升高,血浆中乳酸活性较正常人异常增强,都提示胆管癌细胞存在有氧糖酵解活性增强的现象;为了研究 LDHA 表达对胆管癌细胞 Hucct-1 生长的影响,本研究设计构建 3 对 LDHA-siRNA 寡核苷酸片段,其中 shLDHA-1,shLDHA-3 在胆管癌细胞 Hucct-1 中特异性地抑制了 LDHA 表达。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指将与目的基因 mRNA 序列互补的小的双链 RNA 导入靶细胞形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)最终降解目的 mRNA,由于 siRNA 仅能与目的片段按照碱基互补配对原则发生特异性结合,因此可特异性干扰目的基因的表达而不影响其他基因的表达。这保证了实验中观察到的细胞各种生物学行为的改变都是由于 LDHA 下调造成的,可有效避免偶然因素对实验结果的影响,为进一步研究 LDHA 对肿瘤细胞生长的影响,奠定了

基础。

转染干扰效率最高的质粒 si-LDHA-3 后,经 MTT 法检测可见下调 LDHA 表达后,胆管癌细胞增殖活力明显减慢。本研究结果和文献报道在胰腺癌及乳腺癌等下调 LDHA 表达抑制肿瘤增殖活力一致<sup>[11,23]</sup>。此外,LDHA 的表达和非小细胞肺癌的分化程度成正先关,越是低分化、恶性度高的肺癌患者,LDHA 表达水平越高,预后也越差,且对各种化疗药物也越不敏感<sup>[7]</sup>。在结肠癌患者,LDHA 高表达是预后差的一个独立的生物学标志物<sup>[19]</sup>。这些研究也从其他方面说明 LDHA 在恶性肿瘤增殖中扮演十分重要的角色。由于肿瘤细胞快速分裂增殖需要充足的能源及合成生物大分子所必需的前体如核酸、氨基酸、NADPH 及碳源,而糖酵解中间产物恰恰可以提供这些物质<sup>[14]</sup>,推测抑制 LDHA 表达导致糖酵解活性受到抑制,胆管癌细胞分裂增殖所需要的碳源及 ATP 等供应随之受限,可能是胆管癌细胞增殖抑制的原因之一。

综上所述,本研究成功地下调了胆管癌细胞系 Hucct-1 LDHA 表达水平,且发现下调 LDHA 表达可抑制胆管癌细胞的增殖活力,为深入研究 LDHA 在胆管癌及其他肿瘤发病、进展的机制和基因治疗奠定了基础。

#### [参考文献]

[1] Hsing AW, Gao YT, Devesa SS, et al. Rising incidence of biliary tract cancers in Shanghai, China[J]. *Int J Cancer*, 1998, 75(3): 368-370

[2] Valle J, Wasan H, Palmer DH, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(14): 1273-1281

[3] 吴新权, 傅赞, 冯湘君, 等. 抵抗素体外对胆管癌细胞侵袭和转移的影响及其机制[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(3): 347-350

[4] Augoff K, Grabowski K. Significance of lactate dehydrogenase measurements in diagnosis of malignancies [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2004, 17(102): 644-647

[5] Read JA, Winter VJ, Eszes CM, et al. Structural basis for altered activity of M-and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase[J]. *Proteins*, 2001, 43(2): 175-185

[6] Miyajima H, Takahashi Y, Suzuki M, et al. Molecular characterization of gene expression in human lactate dehydrogenase-A deficiency [J]. *Neurology*, 1993, 43(7): 1414-1419

[7] Le A, Cooper CR, Gouw AM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression[J]. *PNAS*, 2010, 107(5): 2037-2042

[8] Xie H, Valera VA, Merino MJ, et al. LDHA inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(3): 626-635

[9] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309-314

[10] Granchi C, Bertini S, Macchia M, et al. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(7): 672-697

[11] Vander HMG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033

[12] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(14): 4892-4900

[13] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 325-337

[14] Shahrzad S, Lacombe K, Adamec U, et al. Sodium dichloroacetate(DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia[J]. *Cancer Letters*, 2010, 297(1): 75-83

[15] Wong JY, Huggins GS, Debidia M, et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 109(3): 394-402

[16] Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, et al. Targeting glucose metabolism: an emerging concept for anticancer therapy [J]. *Am J Clin Oncol*, 2010, 34(6): 628-635

[17] Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, et al. Clinicopathological presentation of varying <sup>18</sup>F-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

[18] Moon CM, Bang S, Chung JB, et al. Usefulness of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in differential diagnosis and staging of cholangiocarcinomas[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(5): 759-765

[19] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(14): 4892-4900

[收稿日期] 2011-12-08