

·临床研究·

乳酸脱氢酶A在肾细胞癌中的表达及意义

邱文瀚¹, 廖定准², 盛义雨¹, 熊海云¹, 李 骏¹

(1. 中山大学附属七医院泌尿外科, 广东 深圳 518107; 2. 中山大学附属七医院病理诊断中心, 广东 深圳 518107)

摘要:【目的】分析乳酸脱氢酶A(LDHA)在肾细胞癌组织及细胞系中的表达情况并探讨其影响肾细胞癌细胞进展的方式。【方法】收集自2018年6月至2022年6月在我院通过手术方式获取的肾细胞癌组织标本52例及癌旁组织标本49例,免疫组织化学法比较LDHA的表达差异。通过qRT-PCR及Western blot实验检测LDHA在正常人近端肾小管上皮细胞系(HK-2)及肾细胞癌细胞系(A498, Caki-2, ACHN, 786-O)中的表达水平。构建LDHA-shRNA重组质粒,转染至786-O以敲低LDHA表达,利用CCK-8、克隆形成实验及EdU染色法检测敲低LDHA表达对癌细胞增殖活性的影响。利用细胞葡萄糖摄取试验及乳酸分泌试验检测细胞糖摄取水平和乳酸分泌水平的变化。利用糖酵解压力测试实验检测细胞糖酵解能力的变化。【结果】免疫组化结果可见LDHA在肾细胞癌组织中表达明显高于癌旁组织,并且临床TNM分期越高的肾癌组织,LDHA的表达水平越高($P<0.05$)。qRT-PCR和Western blot结果可见,LDHA在各肾细胞癌细胞系中的表达均较HK-2有明显升高($P<0.05$)。在786-O敲低LDHA表达后,细胞增殖活性及糖酵解能力均显著下调($P<0.05$)。【结论】LDHA在肾细胞癌组织及细胞中的表达均明显升高,肿瘤分期越晚期,LDHA的表达越高。抑制LDHA表达能显著抑制肾细胞癌细胞786-O的增殖活性及有氧糖酵解活性。

关键词:肾细胞癌;乳酸脱氢酶A;细胞增殖;瓦博格效应;基因表达调控;糖酵解;乳酸生成;糖代谢

中图分类号:R737.11

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)05-0816-07

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0513

Expression and Significance of Lactate Dehydrogenase A in Renal Cell Carcinoma

QIU Wen-han¹, LIAO Ding-zhun², SHENG Yi-yu¹, XIONG Hai-yun¹, LI Jun¹

(1. Department of Urology, The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;

2. Department of Pathology, The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China)

Correspondence to: LI Jun, E-mail: lijunsysu@163.com; XIONG Hai-yun, E-mail: jetxiongjet@163.com

Abstract:【Objective】To analyze the expression of Lactate dehydrogenase A (LDHA) in both renal cell carcinoma (RCC) tissue and RCC cell lines, and to investigate the impact of LDHA expression on the progression of RCC.【Methods】From June 2018 to June 2022, totally 52 cases of RCC tissue samples and 49 cases of para-cancerous tissue samples were collected through surgical procedures from our hospital. LDHA expression was detected using immunohistochemistry (IHC). The expression levels of LDHA in vitro were also detected in the normal human proximal tubule epithelial cell line HK-2 and renal cell carcinoma cell lines A498, Caki-2, ACHN, and 786-O by using qRT-PCR and Western blot. A recombinant plasmid carrying LDHA-shRNA was constructed and then transfected into 786-O cells to down-regulate the expression of LDHA. Tumor proliferative capacity was monitored using CCK-8 assay, clonal formation assay and EdU assessments. Additionally, cell glycolytic activity was assessed through glucose uptake assay, lactate secretion assay, and ECAR analysis.【Results】IHC analysis revealed significantly higher expression of LDHA in RCC tissue compared to adjacent tissues ($P<0.05$). Furthermore, RCC tissues with higher TNM stage exhibited greater expression of LDHA than those with lower TNM stage ($P<0.05$). The results of qRT-PCR and Western blot demonstrated that the expression of LDHA in each RCC

收稿日期:2023-03-29

基金项目:国家自然科学基金(82202609)

作者简介:邱文瀚,住院医师,研究方向:泌尿系肿瘤学,E-mail: qiuwhsysu@163.com;李骏,通信作者,主治医师,研究方向:泌尿系肿瘤学,E-mail: lijunsysu@163.com;熊海云,共同通信作者,副主任医师,研究方向:泌尿系肿瘤学,E-mail: jetxiongjet@163.com

cell line was significantly higher than that in HK-2 ($P<0.05$). After blocking the expression of *LDHA* in 786-O, there was a significant down-regulation of cell proliferation and glycolysis capacity ($P<0.05$).【Conclusions】 The expression of *LDHA* in RCC tissue and RCC cell lines is significantly overexpressed compared with normal one, particularly in those with higher TNM stage. Knockdown of the expression of *LDHA* significantly suppresses cell proliferation and aerobic glycolysis capacity in 786-O.

Key words: renal cell carcinoma; lactate dehydrogenase A; cell proliferation; warburg effect; gene expression regulation; glycolysis; lactate secretion; glucose metabolism

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(5): 816-822]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统常见的恶性肿瘤,发病率和死亡率仅次于前列腺癌和膀胱癌,并且有逐年增长的趋势^[1]。肾透明细胞癌(clear-cell RCC, ccRCC)占RCC中的70%-75%,是肾细胞癌中的主要类型^[2]。手术切除仍是国际上治疗RCC最主要的办法,然而早期肾癌多无临床症状,临床有症状的肾癌患者往往已进入中晚期,错失最佳的手术时机。尽管当前有针对RCC的靶向治疗药物及新型免疫治疗手段,然而其治疗效果有限,病人仍难免面临肿瘤复发^[3]。因此,我们需要更深入探讨RCC的发病机制,分析肿瘤增殖进展的特点,为临床治疗提供新的靶点。分段肿瘤代谢异常与多种肿瘤进展相关^[4-5]。RCC时常被称为“代谢性疾病”,因其常通过代谢重编程改变肿瘤细胞营养吸收和代谢的途径,包括激活有氧糖酵解(warburg效应)、脂肪酸代谢以及改变三羧酸循环等,从而满足肿瘤生物合成和能量代谢需求^[6]。参与RCC细胞糖原代谢和糖酵解代谢的基因,如*SLC2A1*、*PKM*以及*LDHA*均在RCC组织中表达上调,相反,与三羧酸循环、氧化磷酸化、 β 氧化等有氧糖代谢相关的基因如*ECHS1*、*ACAT1*的表达则被下调^[7]。这些基因的表达异常是否直接作用于RCC细胞的糖代谢通路进而影响肿瘤的进展仍需证实,如 α -烯醇化酶除了作为一种糖酵解关键酶外,它还是一种多功能癌蛋白,在细胞质中的表达可促进肿瘤的免疫逃逸,诱导纤溶促进肿瘤侵袭转移,在细胞核中的表达则作为*c-MYC*结合蛋白抑制细胞增殖,其糖酵解通路对肿瘤细胞进展的影响则需要进一步探索^[8]。因此,找寻影响RCC代谢重编程的关键生物标志物对于临床开发新的治疗靶点、判断预后等应用中显得尤为重要。本研究将分析细胞糖酵解代谢的关键酶乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, *LDHA*)在RCC进展过程中起到的作用,探索其成为新型肿瘤生物标志物的

可能。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

正常人近端肾小管上皮细胞系HK-2及RCC细胞系786-O, A498, ACHN, Caki-2均购自美国模式培养物保藏所(American type culture collection, ATCC)。*LDHA*-shRNA质粒构建于上海吉玛公司。RPMI 1640培养液, DMEM培养液, 10%胎牛血清, PBS缓冲液购自Gibco; TRIzol试剂盒, Lipofectamine 3000试剂盒购自Invitrogen公司; 蛋白提取试剂盒, CCK-8试剂盒购自凯基生物公司; EdU试剂盒购自锐博生物公司; 葡萄糖代谢研究试剂盒购自BioVision; 兔抗人*LDHA*单抗、兔抗人 β -tubulin单抗及羊抗兔IgG二抗均购自Abcam; Seahorse XF糖酵解压力测试试剂盒及相关试剂购自Agilent公司。

1.2 标本收集

RCC病理切片组织标本和癌旁组织标本(收集于距癌灶边缘4cm处)均取材于2018年6月至2022年6月在中山大学附属第七医院行根治性肾切除术或肾部分切除术的52位RCC患者,所有入组患者术前均没有行放化疗。根据2017年AJCC的TNM分期系统将RCC患者进行临床分期,其中T1期患者29例, T2期14例, T3期9例, 获取癌旁组织共49例, 入组患者均没有淋巴结转移或远处转移(TxN0M0)。所有样本采集已通过中山大学附属第七医院伦理审查, 患者均已签署知情同意书。

1.3 细胞培养和转染

RCC细胞系786-O, A498, ACHN, Caki-2和正常肾细胞系HK-2分别培养于RPMI 1640培养基和DMEM培养基, 均加入10%胎牛血清及1%青霉素/链霉素, 置于含体积分数5% CO₂, 37℃温箱中

培育。取对数生长期的786-O细胞用胰酶消化,在离心机中以离心力 $100\times g$ 进行离心5 min,弃去上清液,用适量培养基将沉淀的细胞吹打重悬,均匀接种于六孔板,参照Lipofectamine 3000说明书将LDHA-shRNA质粒(LDHA-shRNA,实验组)或空白质粒(NC,对照组)转染至786-O细胞并进行下一步实验。

1.4 免疫组化法检测

病理组织切片进行常规脱蜡、水化,浸泡于3% H_2O_2 溶液,修复抗原,封闭。滴加LDHA一抗,4 °C孵育过夜,PBS漂洗后二抗37 °C孵育20 min。PBS漂洗后,DAB显色,苏木素复染2 min,盐酸酒精分化,树胶封片。由2名高年资病理医师在高倍镜视野下阅片判断,每张玻片随机选取5个视野,细胞内出现棕黄色染色表示阳性表达,评分后对结果进行汇总。评分标准:每张玻片遵循双盲原则,按照染色程度评分:无阳性染色(0分),较弱棕色(1分),中度棕色(2分),较强棕色(3分);按阳性细胞百分比:阳性细胞数 $<5\%$ (0分), $5\% - 25\%$ (1分), $25\% - 50\%$ (2分), $>50\%$ (3分)。两项结果评分相乘得出免疫反应性评分(immunoreactivity score, IRS)^[9]。

1.5 qRT-PCR

使用TRIzol法提取细胞总RNA,利用紫外分光光度计检测RNA的纯度以及浓度。根据试剂盒说明将RNA逆转录成cDNA,再以cDNA为模板进行qRT-PCR以检测mRNA表达量。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。LDHA的正向引物序列:5'-GGATCTCCAACATGGCAGCCTT-3',反向引物序列:5'-AGACGGCTTTCTCCCTCTTGCT-3'; β -actin的正向引物序列:5'-AAGACCTGTACGCCAACACAGT-3',反向引物序列:5'-AGAAGCATTTCGCGGTGGACGAT-3'。每组设置3个复孔,实验重复3次。

1.6 Western Blot

常规提取目标细胞总蛋白样品,检测浓度。SDS-PAGE电泳,转移到PVDF膜,室温封闭2 h,加兔抗人LDHA单抗(1:5 000)4 °C孵育过夜,羊抗兔IgG二抗(1:2 000)室温孵育2 h,ECL显色成像后软件分析。

1.7 CCK-8实验

预处理后的细胞继续传代培养,取对数长期细胞,适当稀释后置于96孔板,在37 °C,体积分数5% CO_2 培养箱培养1 d,2 d,3 d,4 d。按说明书每孔加入10 μ L CCK-8试剂,培养箱继续培育3 h后酶

标仪检测450 nm波长处各孔的吸光度。实验重复3次,每组设置3个复孔。

1.8 克隆形成实验

取转染后对数长期细胞,适当稀释后接种于6孔板,均匀分散细胞。于37 °C,体积分数5% CO_2 培养箱培养约3周,当肉眼可见孔板出现细胞集落时终止。多聚甲醇固定,1%结晶紫染色,置于显微镜下观察,克隆形成率(%)=克隆形成数(含有大于50个细胞的集落数)/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色实验

转染后培育好的细胞种植于96孔板(约2 000细胞/孔),细胞贴壁后每孔加入100 μ L终浓度为20 μ mol/L的EdU(用1640培养基稀释)。孵育2 h后用3%BSA洗涤,用40 g/L多聚甲醛固定30 min,洗涤后每孔加入100 μ L 0.3% TritonX-100,孵育20 min。洗涤后每孔加入1 \times Hoechst 33342,孵育10 min进行细胞核染色。在荧光显微镜下观察,每组随机选择5个视野进行拍摄并计算增殖率(增殖细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.10 葡萄糖摄取和乳酸分泌实验

细胞转染后继续培养,待80%融合度时收集培养液,离心弃去细胞碎片,利用细胞葡萄糖检测试剂盒及乳酸检测试剂盒分别检测培养液中葡萄糖和乳酸的水平。同时以血球计数法计算细胞数目,每个细胞的糖消耗量/乳酸生成量=(培养液葡萄糖/乳酸含量-培养液本底值)/细胞计数,结果以对照组细胞为标准,按相对倍数来表示。

1.11 Seahorse XF细胞外酸化速率测试实验

将转染后的细胞以及对照组细胞分别按2 000个/孔的密度接种于96孔板上并孵育过夜。洗涤细胞后加入无葡萄糖,无碳酸氢钠等缓冲体系的RPMI 1640培养基在无 CO_2 的37 °C细胞培养箱继续培养1h。利用Seahorse细胞外通量分析仪(XF-96)测定细胞外酸化速率(extracellular acidification rate, ECAR),依次加入10 mmol/L葡萄糖、1mmol/L寡霉素和100 mL/L 2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-glucose, 2-DG),记录ECAR的变化。非糖酵解酸化定义为未加入葡萄糖时基线ECAR。糖酵解定义为添加葡萄糖后的ECAR,糖酵解能力定义为添加寡霉素抑制线粒体功能后的ECAR,糖酵解储备定义为糖酵解能力与糖酵解之间的差值。利用2-DG可阻断细胞糖酵解通路,由此引起的ECAR减少可证实测试中产生的ECAR升高源自细胞糖酵解反应。

1.12 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行统计分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两独立样本两两比较采用Student's *t*检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),采用bonferroni法作组间两两比较。计数资料以频率表示,计数资料比较采用卡方检验(chi-square test)。 $P < 0.05$ 可认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LDHA在肾细胞癌组织及癌旁组织中的表达及其与TNM分期的关系

RCC的LDHA免疫组化结果如下(图1A,图1B),相比癌旁组织,LDHA表达在RCC组织切片中有显著升高(图1C)。根据IRS评分的中位数(4分)将52例患者分为LDHA高表达组(31例)和LDHA低表达组(21例),分析患者的临床资料(表1)。结果发现,不同TNM分期的RCC组织标本LDHA的表达量也不同,3组间的差异具有统计学意义($F=19.13, P < 0.05$);两两比较发现LDHA在T2期肿瘤组织中的表达水平明显高于T1期($P < 0.05$),而在T3期肿瘤组织的表达水平明显高于T2期($P < 0.05$),可见TNM分期越高,LDHA的表达量也越高(图1D)。

2.2 LDHA mRNA和蛋白在HK-2及各RCC细胞系中的表达

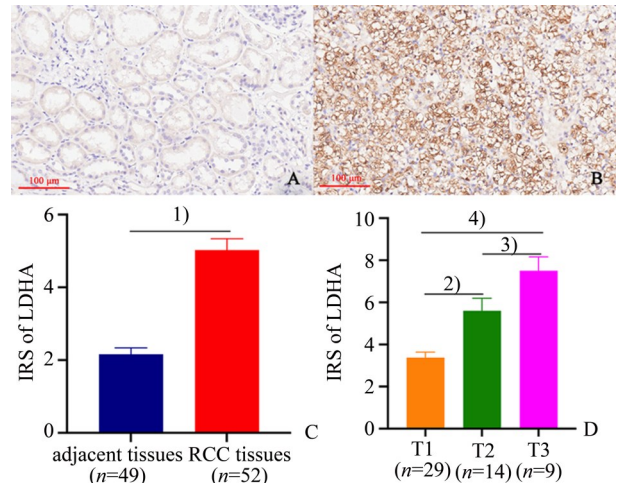
利用qRT-PCR及Western blot分别检测HK-2和各RCC细胞系(A498, Caki-2, ACHN, 786-O)中LDHA的mRNA及蛋白表达水平。结果提示无论mRNA水平还是蛋白水平,LDHA在各RCC细胞系中的表达均明显高于HK-2,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图2A,2B)。由于786-O的mRNA和蛋白表达丰度均最高,所以后续我们选用786-O去敲减LDHA,可以更好反应LDHA的生物学行为。

2.3 在786-O细胞系中敲低LDHA表达后LDHA mRNA及蛋白表达水平变化

786-O细胞转染质粒后,通过qRT-PCR及Western blot检测,可见敲低LDHA表达后细胞的mRNA及蛋白表达水平均较对照组有明显下降,差异具有统计学意义,证实转染有效($P < 0.05$;图3A,图3B)。

2.4 抑制LDHA表达后对786-O细胞增殖活性的影响

转染后的786-O细胞进行培养、实验,通过



A: Representative images of IHC staining of LDHA in adjacent tissues, $\times 100$; B: Representative images of IHC staining of LDHA in RCC tissues, $\times 100$; C: IRS of LDHA was significantly increased in cancer tissues. $F=3.324, P < 0.001$; D: IRS of LDHA was significantly elevated in RCC tissues with higher TNM scores. $F=19.13, P < 0.001$. LDHA: Lactate dehydrogenase A; IRS: Immunoreactivity score; RCC: Renal cell carcinoma; T1-T3: Classification of RCC tissues according to TNM stage. 1) $P < 0.001$ compared with adjacent tissues; 2) $P < 0.001$ comparing T1 and T2; 3) $P=0.044$ 2 comparing T2 and T3; 4) $P < 0.001$ comparing T1 and T3.

图1 LDHA在肾细胞癌组织及癌旁组织中的表达情况
Fig. 1 The expression of LDHA in renal cell carcinoma tissues and adjacent tissues

CCK-8实验可见敲低LDHA表达后,细胞增殖能力显著低于对照组,见图4A;克隆形成实验可见,敲低LDHA表达后786-O的克隆形成能力明显下降,见图4B;EdU染色法提示,转染LDHA-shRNA的细胞EdU阳性率较对照组显著降低,见图4C。以上结果表明,利用LDHA-shRNA敲低LDHA表达后,RCC细胞786-O的增殖活性、克隆形成能力及DNA复制活性均明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 LDHA表达对786-O细胞有氧糖酵解的影响

LDHA-shRNA敲低786-O细胞中LDHA表达后,通过葡萄糖摄取实验及乳酸生成实验检测肾癌细胞葡萄糖消耗及乳酸生成量的变化,并且通过实时检测细胞外酸化速率反映肾癌细胞糖酵解活性的变化,结果可见实验组的葡萄糖消耗量及乳酸生成量均较对照组减少,结果差异具有统计学意义($P < 0.05$,见图5A,5B)。细胞外酸化速率测试实验结果可见,转染LDHA-shRNA的786-O细胞在糖酵解、糖酵解能力和糖酵解储备均受到抑制,提示抑制LDHA表达可能降低细胞糖酵解的能力,结果差异有统计学意义($P < 0.05$;图5C,5D)。

表1 肾细胞癌患者的临床病理特征与癌组织LDHA表达情况的关系

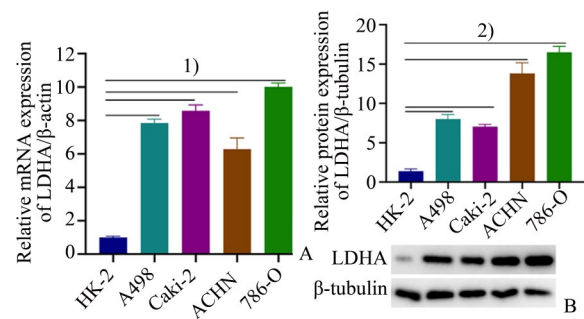
Table 1 Relationship between LDHA expression and clinicopathologic characteristics in renal cell carcinoma patients

Variable	all case no. (%)	LDHA expression (%)		P
		high no.	low no.	
Age/years				
≥60	29(55.8)	17(58.6)	12(41.4)	0.87
<60	23(44.2)	14(60.9)	9(39.1)	
Gender				
male	32(61.5)	19(59.4)	13(40.6)	0.964
female	20(38.5)	12(60.0)	8(40.0)	
Laterality				
left	27(51.9)	16(59.3)	11(40.7)	0.957
right	25(48.1)	15(60.0)	10(40.0)	
pT stage				
T1	29(55.8)	11(37.9)	18(62.1)	0.001 ¹⁾
T2	14(26.9)	11(78.6)	3(21.4)	
T3	9(17.3)	9(100.0)	0(0)	
ISUP rade				
I-II	35(67.3)	18(51.4)	17(48.6)	0.084
III-IV	17(32.7)	13(76.5)	4(23.5)	

LDHA expression was defined by median of Immunoreactivity score. LDHA: lactate dehydrogenase A. ¹⁾ Statistically significant.

3 讨论

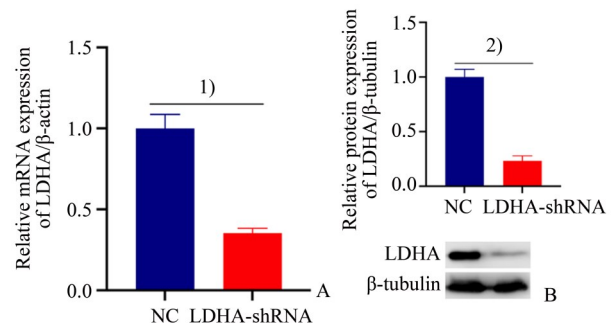
代谢重编程现象广泛存在于肿瘤的进展中,越来越多的研究表明,肿瘤细胞在代谢适应过程中会表现出代谢重编程现象,包括糖代谢、脂代谢和谷氨酰胺代谢^[10]。RCC的一大特征在于其代谢方面的异常,葡萄糖代谢和脂代谢异常在RCC的发生以及进展中显得尤为突出,也是当前的研究热点^[11]。作为恶性肿瘤糖代谢异常的经典表现,warburg效应促使恶性肿瘤采用有氧糖酵解模式代替氧化磷酸化反应,使其在有足够氧气存在的条件下仍然进行糖酵解反应,从而快速获得ATP供能以满足机体快速生长代谢需要^[12]。同时,肿瘤细胞通过warburg效应将大量乳酸分泌到细胞外,影响肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),导致酸



A: The qRT-PCR results indicate that the mRNA expression of LDHA was significantly increased in RCC cell lines. $F=86.41$, $P<0.001$. B: The Western blot results indicate that the protein expression of LDHA was significantly increased in RCC lines. $F=60.45$, $P<0.001$. LDHA: Lactate dehydrogenase A; RCC: Renal cell carcinoma. 1) $P<0.001$ for each RCC cell line compared with HK-2; 2) $P<0.001$ for each RCC cell line compared with HK-2.

图2 LDHA的mRNA和蛋白水平在不同细胞株中的表达差异

Fig. 2 Differential expression of LDHA mRNA and protein levels among different cell lines

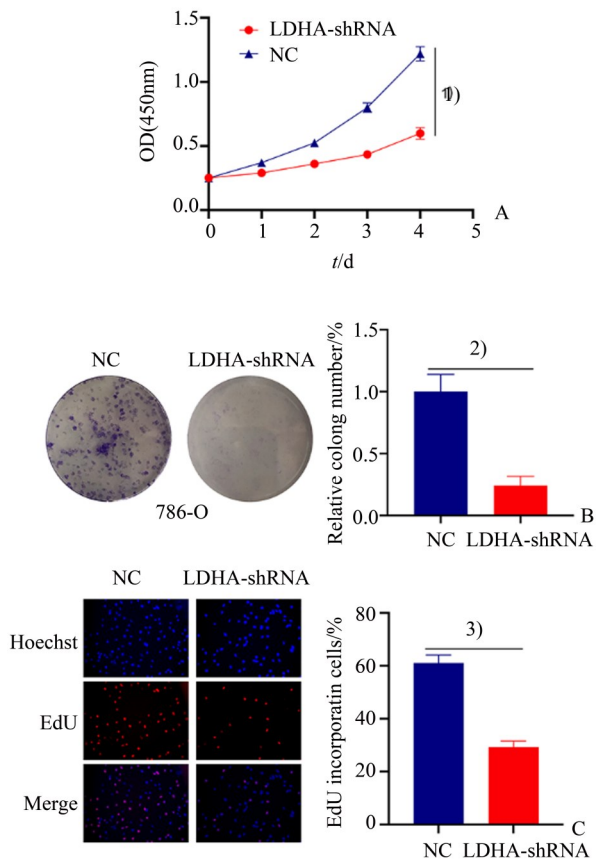


A: The qRT-PCR results indicate that the mRNA expression of LDHA was significantly decreased following transfection with LDHA-shRNA. $F=12.21$, $P<0.001$. B: The Western blot results indicate that the protein expression of LDHA was significantly decreased following transfection with LDHA-shRNA. $F=86.41$, $P<0.001$. LDHA: Lactate dehydrogenase A; NC: non-specific control. 1) $P<0.001$ compared with NC. 2) $P<0.001$ compared with NC.

图3 在786-O细胞系中利用qRT-PCR和WB验证LDHA敲除效率

Fig. 3 Verification of LDHA knockdown efficiency in 786-O cell line using qRT-PCR and Western blot analysis

中毒、血管生成,并通过这种营养过度消耗、代谢不利的微环境影响浸润免疫细胞活性,达到免疫抑制功能^[13]。LDHA作为丙酮酸转化为乳酸的关键酶,在恶性肿瘤的增殖、侵袭、血管生成及免疫逃逸方面扮演着重要角色^[14]。circVAMP3-LDHA的相互作用通过激活上游激酶成纤维细胞生长因子受体

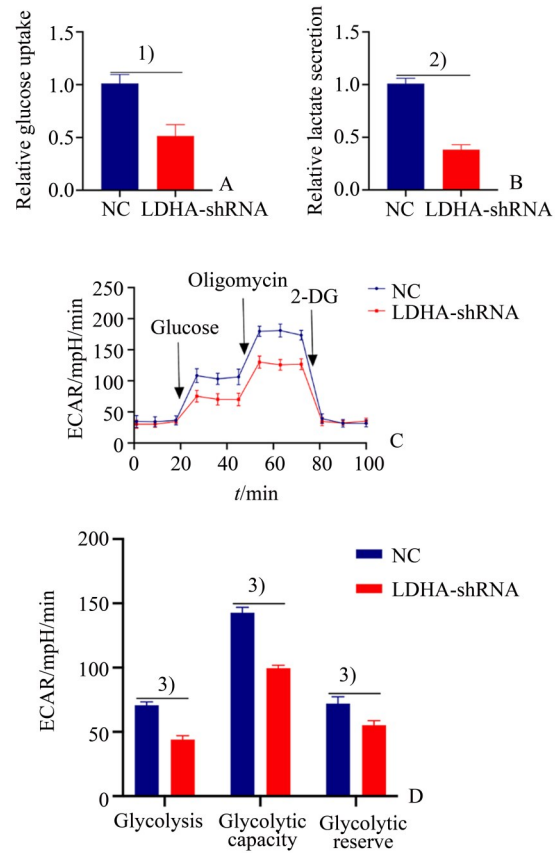


A: The cell viability of 786-O cells with LDHA knockdown was analyzed using CCK-8 assay. $n=3$, $F=1.509$, $P<0.001$. B: Typical micrographs (left panel) and relative colony number (right panel) were observed from clonal formation assay after LDHA-knockdown in 786-O. $n=3$, $F=3.478$, $P<0.001$. C: Typical micrographs of cells with Edu incorporation (left panel) and their quantification (right panel) were observed after LDHA-knockdown in 786-O. $F=1.575$, $P<0.001$. LDHA: Lactate dehydrogenase A; NC: non-specific control. Edu: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. 1) $P<0.001$ compared with NC. 2) $P<0.001$ compared with NC. 3) $P<0.001$ compared with NC.

图4 敲低LDHA表达显著抑制786-O细胞增殖能力

Fig. 4 Knockdown of LDHA expression significantly inhibits cell proliferation capacity in 786-O

1 (FGFR1)促进LDHA的磷酸化,从而促进RCC的糖酵解和细胞增殖活动^[15]。另有报道指出,LDHA可通过促进RCC上皮-间质化转移而促进肿瘤转移^[16]。临床研究亦发现,LDHA表达水平与肿瘤大小、临床分期和组织学分级之间存在显著正相关,与无病生存期和总生存期呈显著负相关,提示其作为潜在的肿瘤预后标志物的价值^[17]。然而LDHA促进RCC进展的具体原因尚不完全清楚,探讨LDHA与RCC进展之间的分子作用机制对日后开发LDHA作为新型预后标志物、新型抗肿瘤药物开



A: Relative glucose uptake were significantly decreased in 786-O with LDHA knockdown. $F=1.584$, $P<0.001$. B: Relative lactate secretion were significantly decreased in 786-O with LDHA knockdown. $F=1.275$, $P<0.001$. C: Glycolysis capacities were detected by ECAR analysis in 786-O with LDHA knockdown. D: Glycolysis capacities were further quantified and present in a column chart. $F=3.259$, $P<0.001$. LDHA: Lactate dehydrogenase A; NC: non-specific control. 1) $P<0.001$ compared with NC. 2) $P<0.001$ compared with NC. 3) Glycolysis, glycolytic capacity, glycolytic reserve, all $P<0.001$ compared with NC.

图5 抑制LDHA表达对786-O细胞有氧糖酵解的影响

Fig. 5 The effect of LDHA expression inhibition on aerobic glycolysis in 786-O cells

发等均具有重要研究价值。

本研究通过收集临床RCC患者的癌及癌旁病理组织学切片,免疫组化结果发现RCC组织和正常肾组织之间LDHA表达存在显著差异,并在细胞实验中亦证实LDHA在正常肾细胞系及RCC细胞系中存在表达差异,LDHA在肾细胞癌组织或细胞中表达显著升高。在肾细胞癌细胞786-O,利用LDHA-shRNA调控LDHA表达,进行CCK-8实验、克隆形成实验以及EdU,可发现敲低LDHA表达后肾细胞癌增殖活性显著下降;进一步行葡萄糖摄取实验、乳酸分泌实验以及细胞外酸化速率测试实

验,证实 $LDHA$ 表达下调后,786-O的葡萄糖利用率、乳酸分泌量和速率均有明显抑制,提示 $LDHA$ 表达是通过促进肾细胞癌有氧糖酵解、促进乳酸生成来上调肿瘤细胞的增殖活性,促进肿瘤生长。

本研究结果已在体外细胞实验水平下证实了 $LDHA$ 的促癌作用,对开发成为代谢相关肿瘤

标志物有重要的应用前景,然而其在体内实验中 $LDHA$ 对肿瘤侵袭迁移能力的改变、 $LDHA$ 促进肿瘤生长的分子生物学机制,以及探讨其作为肿瘤治疗新靶点的临床应用价值仍待进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, et al. European Association of Urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2022 update[J]. *Eur Urol*, 2022, 82(4): 399-410.
- [3] Lalani AA, McGregor BA, Albiges L, et al. Systemic treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma in 2018: current paradigms, use of immunotherapy, and future directions[J]. *Eur Urol*, 2019, 75(1): 100-110.
- [4] 李骏,张倩,马赫,等. PDK4异常表达对前列腺癌细胞糖酵解和生长的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(9): 1572-1578.
Li J, Zhang Q, Ma H, et al. Effect of abnormal expression of PDK4 on glycolysis and proliferation in prostate cancer cells[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2020, 36(9): 1572-1578.
- [5] 郑丹琴,刘志磊,朱松杰,等. 过氧化物还原酶3参与肾透明细胞癌发生与发展的分子机制[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2019, 40(2): 211-218.
Zheng DQ, Liu ZL, Zhu SJ, et al. Mechanism of PRDX3 involved in development and progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2019, 40(2): 211-218.
- [6] Chakraborty S, Balan M, Sabarwal A, et al. Metabolic reprogramming in renal cancer: Events of a metabolic disease[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188559.
- [7] Qu Y, Feng J, Wu X, et al. A proteogenomic analysis of clear cell renal cell carcinoma in a Chinese population[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2052.
- [8] Huang CK, Sun Y, Lv L, et al. ENO1 and cancer[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 288-298.
- [9] Radosa JC, Kasoha M, Schilz AC, et al. Effect of the 3q26-coding oncogene SEC62 as a potential prognostic marker in patients with ovarian neoplasia[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1054508.
- [10] Faubert B, Solmonson A, Deberardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression[J]. *Science*, 2020, 368(6487): eaaw5473.
- [11] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [12] Qi X, Li Q, Che X, et al. The uniqueness of clear cell renal cell carcinoma: summary of the process and abnormality of glucose metabolism and lipid metabolism in ccRCC[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 727778.
- [13] Certo M, Tsai CH, Pucino V, et al. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(3): 151-161.
- [14] Feng Y, Xiong Y, Qiao T, et al. Lactate dehydrogenase A: a key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(12): 6124-6136.
- [15] Li J, Zhang Q, Guan Y, et al. Circular RNA circVAMP3 promotes aerobic glycolysis and proliferation by regulating LDHA in renal cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 443.
- [16] Zhao J, Huang X, Xu Z, et al. LDHA promotes tumor metastasis by facilitating epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8335-8344.
- [17] Di Meo NA, Lasorsa F, Rutigliano M, et al. Renal cell carcinoma as a metabolic disease: an update on main pathways, potential biomarkers, and therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14360.

(编辑 孙慧兰)