

LDHB调控PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路促进 脑胶质瘤细胞生长的研究

韩秀 陈曦 唐宇 程洁 刘菲 许婧 彭琬昕 杜凤移 龚爱华*

(江苏大学医学院基础医学研究所, 镇江 212013)

摘要 该研究旨在探讨乳酸脱氢酶B(lactate dehydrogenase B, LDHB)基因对胶质瘤细胞生长的影响。用sh-LDHB或sh-EGFP质粒转染胶质瘤细胞, qRT-PCR和Western blot分别检测mRNA和蛋白质水平, CCK-8法和克隆形成实验分析细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况。结果表明, 转染sh-LDHB质粒后, 脑胶质瘤细胞中LDHB的mRNA和蛋白质水平显著降低。敲低LDHB基因后, 脑胶质瘤细胞的增殖能力明显降低, 出现细胞凋亡峰(sub-G₁), 细胞增殖相关基因*c-Myc*和*CylinD1*表达水平降低, 同时, PDK1、Akt和GSK3 β 的磷酸化水平降低。研究结果表明, LDHB基因可以通过激活PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路促进脑胶质瘤细胞的生长。

关键词 脑胶质瘤; 乳酸脱氢酶B; PDK1/Akt/GSK3 β ; 肿瘤代谢

LDHB Promotes the Growth of Glioma Cells via PDK1/Akt/GSK3 β Pathway

Han Xiu, Chen Xi, Tang Yu, Cheng Jie, Liu Fei, Xu Jing, Peng Wanxin, Du Fengyi, Gong Aihua*

(Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The aim of the study is to investigate the effects of LDHB on the growth of human glioma cells *in vivo*. After transfecting the sh-LDHB or sh-EGFP plasmids into glioma cells, qRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of indicated genes. CCK-8 assay and colony formation assay were conducted to examine the proliferation of glioma cells, flow cytometry was performed to invest the cycle and apoptosis. The results revealed that the protein and mRNA levels were decreased after transfecting sh-LDHB plasmid in glioma cells. LDHB knockdown reduced the proliferation of cells and resulted in sub-G₁ DNA content, as well as decreased the proliferation related genes *c-Myc* and *CylinD1* expression. Also, it inhibited the phosphorylation of PDK1, Akt and GSK3 β . Taken together, LDHB played an important role in the growth of glioma cells via the PDK1/Akt/GSK3 β signaling pathway.

Keywords glioma; LDHB; PDK1/Akt/GSK3 β ; cancer metabolism

细胞代谢的改变是肿瘤包括多形性神经母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)的重要特征之一, 其与肿瘤的发生、发展互为因果^[1-3]。肿瘤代谢的共同特征包括葡萄糖、谷氨酰胺和线粒体代谢中的变化。其中, 异常糖代谢途径导致即使在氧气充

足的情况下依然有大量乳酸产生, 造成肿瘤微环境pH值降低以及诱导肿瘤的转移和线粒体氧化磷酸化抑制等, 从而进一步促进了肿瘤的进程^[4-5]。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是肿瘤糖代谢途径中一个重要的催化酶, 参与丙酮酸和乳酸之间

收稿日期: 2017-10-27 接受日期: 2018-01-30

国家自然科学基金(批准号: 81372718、81772694)和江苏大学高层次人才启动基金(批准号: 13JDG108)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13775369530, E-mail: ahg5@mail.ujss.edu.cn

Received: October 27, 2017 Accepted: January 30, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372718, 81772694) and the Specialized Research Fund for Senior Personnel Program of Jiangsu University (Grant No.13JDG108)

*Corresponding author. Tel: +86-13775369530, E-mail: ahg5@mail.ujss.edu.cn

网络出版时间: 2018-04-16 17:35:26 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1735.030.html>

的相互转换。LDH是由LDHA和LDHB两种亚基组成的四聚体,其中已经证实LDHA在多种肿瘤中表达异常增高,在肿瘤转移复发、放化疗抵抗、病人预后方面扮演着重要角色^[6-7]。Lucie等^[8]研究证明,LDHB调控了依赖V-ATPase活性的溶酶体酸化过程,影响细胞自噬,维持肿瘤细胞的增殖;他们同时发现,LDHB抑制剂具有更强的靶向性,并有望替代溶酶体抑制剂氯喹作为靶向自噬的抗肿瘤药物。然而,LDHB基因在肿瘤中的作用机制还有待进一步研究。Akt通路是影响细胞存活的关键信号通路,参与许多重要生物学功能的调控,特别是在肿瘤发生、发展及转归中发挥关键作用^[9]。目前,关于LDHB在胶质瘤发生、发展中的生物学功能和分子调控机制还不完全清楚。因此,本研究旨在探讨LDHB对胶质瘤细胞生长的影响,为LDHB作为胶质瘤治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 实验用人脑胶质瘤细胞系U251MG和SW1783购自中国科学院上海细胞库。pLKO.1-puro载体由江苏大学医学院细胞生物学研究室保存。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清购自Gibco公司;DMEM培养基购自Wisent公司;转染试剂Lipofectamine[®] 2000购自Life Technologies公司;限制性内切核酸酶EcoR I和Age I购自NEB公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胶质瘤细胞U251MG和SW1783培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养至对数生长期,用于后续实验。

1.2.2 LDHB干扰质粒的构建 在Sigma公司官网搜索已在293T细胞中证实的sh-LDHB的序列。sh-LDHB上游引物序列:5'-CCG GCG TGA TTG GAA GTG GAT GTA ACT CGA GTT ACA TCC ACT TCC AAT CAC GTT TTT G-3',下游引物序列:5'-AAT TCA AAA ACG TGA TTG GAA GTG GAT GTA ACT CGA GTT ACA TCC ACT TCC AAT CAC G-3'。对照组sh-EGFP上游引物序列:5'-CCG GTA CAACAG CCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGTTGT GGC TGT TGT ATT TTT G-3',下游引物序列:5'-AAT

TCA AAA ATA CAA CAG CCA CAA CGT CTATCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT TGT A-3',引物退火形成带黏性末端的双链。EcoR I及Age I双酶切pLKO.1-puro载体并与双链DNA连接后转化感受态细胞,挑取单克隆做菌液PCR进行鉴定,所构建质粒经测序正确后用于细胞转染实验。

1.2.3 稳转细胞株构建 用pLKO.1-sh-EGFP和pLKO.1-sh-LDHB质粒包装病毒,并感染细胞,48 h后更换为浓度是1 μg/mL的嘌呤霉素筛选培养基,将同步培养但没有感染的U251MG和SW1783细胞作为阴性对照。3天后阴性对照组细胞全部死亡,而病毒感染过的细胞只有一部分死亡,存活下来的细胞即为感染成功的细胞。

1.2.4 定量实时荧光PCR(qRT-PCR) 细胞接种48 h后且达到约90%汇合时,用TRizol法提取转染细胞的总RNA并逆转录生成cDNA,定量实时荧光PCR检测LDHB的表达。LDHB的上游引物为:5'-CCA ACA TGG CAG CCT TTT CC-3',下游引物为:5'-TCA CGT TAC GCT GGA CCA AA -3';c-Myc的上游引物为:5'-GGT CTT CCC CTA CCC TCT CA-3',下游引物为:5'-CTC CAG CAG AAG GTG ATC CA-3';CyclinD1的上游引物为:5'-AAC ACG GCT ACA GCT TAC-3',下游引物为:5'-CCA GAC CCT CAG ACT TGC -3';GAPDH的上游引物为:5'-CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC-3',下游引物为:5'-GCG CCC AAT ACG ACC AAA TC-3'。

1.2.5 Western blot检测脑胶质瘤细胞中相关蛋白的水平 裂解细胞时加入2×蛋白质上样缓冲液,100℃加热5 min,12 000×g离心5 min。用10%SDS-PAGE分离样品,湿转法转至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗4℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗室温孵育1 h,ECL化学发光检测显影,在凝胶成像系统上拍照并分析。一抗:LDHB(Santa Cruze,sc-100775)、c-Myc(CST,sc-40)、CyclinD1(CST,2978L)、p-PDK1(CST,3438)、p-Akt(CST,4060)、p-GSK3β(CST,9323)、PDK1(CST,5662)、Akt(CST,4691)、GSK3β(CST,12456);二抗:羊抗兔二抗(Santa Cruz,sc-2004)、羊抗鼠二抗(Santa Cruz,sc-2005)。

1.2.6 CCK-8法检测细胞的增殖能力 0.25%胰蛋白酶消化细胞,10%FBS的培养基重悬细胞沉淀得到单细胞悬液并计数,以1 000个/孔接种于96孔板,同

时设空白对照组(不加细胞), 分别于1、2、3、4、5、6天加入10 μ L CCK-8试剂, 避光孵育2 h后, 在酶联免疫检测仪450 nm处读取各孔吸光度值。重复3次取平均值, 以时间为横轴、相对增殖率为纵轴绘制生长曲线。

1.2.7 克隆形成实验 按上述细胞传代的方法将细胞沉淀重悬为单细胞悬液后计数, 将细胞分别以500、1 000、2 000个/孔接种到6孔板中, 轻轻摇晃, 使细胞分布均匀, 常规培养。每3天更换一次培养基。约2周后, 肉眼即可看到细胞克隆时, 吸弃培养基, 用PBS溶液轻轻漂洗2次, 4%多聚甲醛固定30 min, 再用PBS溶液漂洗2次, 每孔加入1 mL 0.5%结晶紫染液染色20 min, 再用PBS洗去多余染液。计倒置显微镜下对大于50个细胞的克隆数进行计数。每组实验独立进行3次。

1.2.8 细胞周期实验 采用PI单染流式细胞术检测U251MG和SW1783细胞周期情况。在U251MG和SW1783细胞中下调LDHB的表达水平, 以sh-LDHB作为实验组, sh-EGFP作为对照组, 细胞种板48 h后用不含EDTA的胰酶消化细胞, PBS洗2次, 1 mL PBS制成单细胞悬液, 70%乙醇4 $^{\circ}$ C固定过夜。提前按说明书配置好PI染色液。离心弃上清, 计数取10万~100万个细胞, 加入400 μ L PI染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 $^{\circ}$ C避光温浴30 min, 轻轻混匀后转移至流式管, 待上机检测。

1.2.9 生物信息学分析 下载美国癌症基因组图谱计划(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和中国人脑胶质瘤基因组学数据库(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)中的病人临床相关数据, 分析LDHB在胶质瘤各级和各亚型中mRNA的水平。将病人按LDHB表达水平分为LDHB低表达和LDHB高表达组, 分析比较两组病人的生存期情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行方差分析, 实验数据用均数 \pm 标准差表示, 两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LDHB在胶质瘤中的表达及病例分析

对TCGA数据库分析的结果显示, LDHB在4种胶质母细胞亚型中表达存在差异, 并且预后最好的proneural型中LDHB表达水平最高, 而其他亚型中

LDHB表达水平较低(图1A)。病人生存预后分析结果显示, LDHB高表达组病人的总体生存期较长(图1B)。同时, CGGA数据库数据的分析结果显示相似的结果: LDHB的表达随胶质瘤病理等级的升高而下降(图1C), proneural型中LDHB表达水平最高(图1D)。数据库分析结果提示, 高表达的LDHB预示着胶质瘤良好的预后并有一定的诊断价值。

2.2 检测4种胶质瘤细胞中LDHA/LDHB水平和干扰LDHB的效率

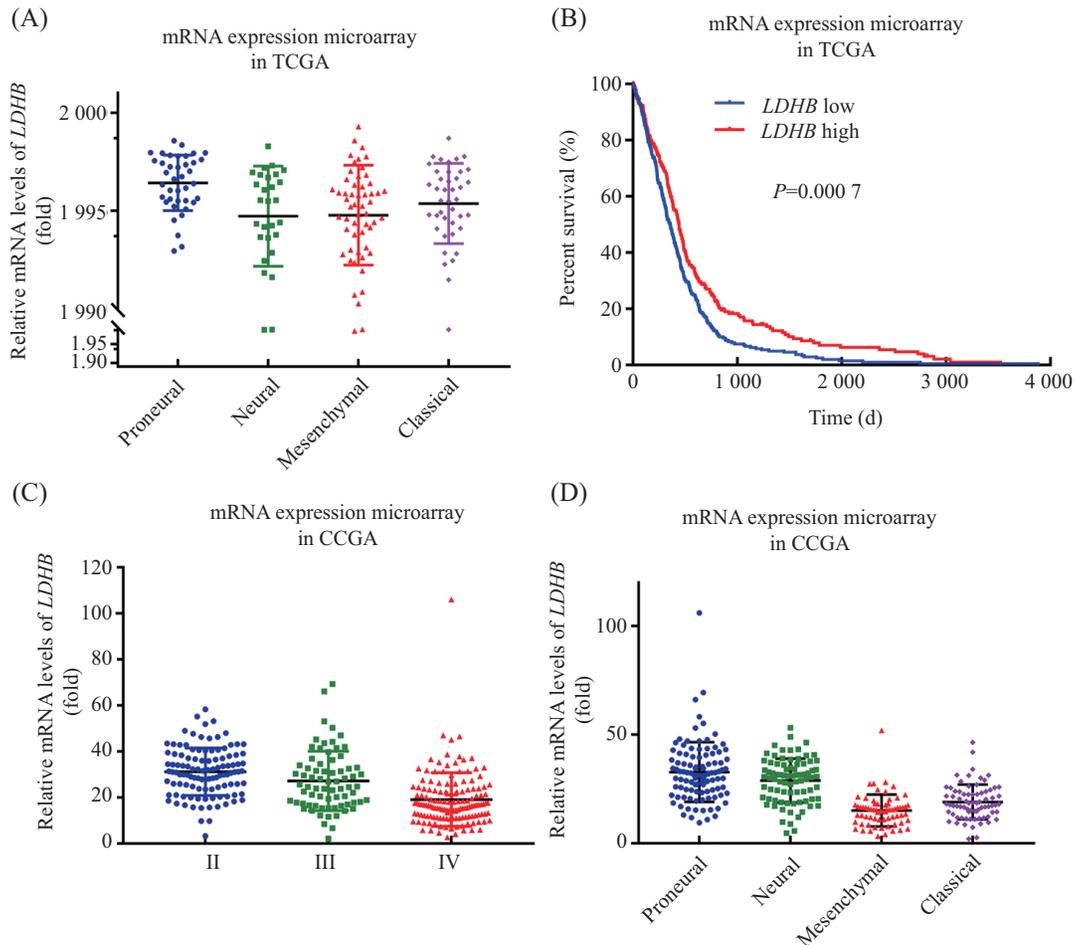
Western blot结果显示, LDHA/LDHB的表达模式在4种胶质瘤细胞中的表达模式存在差异, LDHA在U87MG和LN229细胞中表达量很高, 而在SW1783和U251MG细胞的表达量很低, 同时LDHB在4种胶质瘤细胞中表达量相当(图2A)。由于LDHA和LDHB以不同排列组合的形式组成了四聚体乳酸脱氢酶, 催化丙酮酸和乳酸之间的转换反应, 故而选取LDHA表达量低而LDHB表达量高的U251MG和SW1783脑胶质瘤细胞进行基因沉默实验。转染72 h后, 运用qRT-PCR和Western blot分别检测脑胶质瘤细胞系U251MG和SW1783中LDHB的mRNA和蛋白质水平。qRT-PCR结果表明, 与sh-EGFP对照组相比, sh-LDHB实验组中LDHB的水平明显降低, 且差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2B)。Western blot检测结果显示, 实验组中LDHB的蛋白质水平也明显降低(图2C), 灰度分析结果显示差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2D)。结果表明, 本研究所用的sh-LDHB能够有效地抑制胶质瘤U251MG和SW1783细胞中LDHB的表达水平。

2.3 干扰LDHB抑制胶质瘤细胞的增殖能力

为了分析下调LDHB表达水平对U251MG和SW1783细胞增殖能力的影响, 我们分别在细胞种板后的6个时间点(1、2、3、4、5、6天)检测96孔板中两组细胞的增殖情况。实验结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞的相对增殖速率降低, 并且差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图3A和图3B)。此外, 克隆形成实验结果显示, 2周后实验组克隆形成数明显少于对照组($P < 0.05$)(图3C)。上述实验结果说明, 下调LDHB表达可以抑制U251MG和SW1783细胞的增殖能力。

2.4 降低LDHB基因表达水平促进脑胶质瘤细胞发生凋亡

为了分析下调LDHB基因对胶质瘤细胞周期的影响, 在胶质瘤细胞中干扰LDHB后检测细胞周期



A: TCGA数据库分析LDHB基因在胶质瘤各亚型中的表达水平; B: TCGA数据库分析LDHB对胶质瘤病人生存期的影响; C: CGGA数据库分析LDHB在胶质瘤各级中的表达水平; D: CGGA数据库分析LDHB在胶质瘤各亚型中的表达量。

A: the mRNA levels of LDHB in 4 subtypes of glioblastoma by TCGA database; B: Kaplan-Meier curves comparing samples with high vs low levels of LDHB in glioma; C: the mRNA levels of LDHB in 3 stage of glioma by CGGA database; D: the mRNA levels of LDHB in 4 subtypes of glioblastoma by CGGA database.

图1 LDHB在胶质瘤中的表达及病例分析

Fig.1 The expression pattern and clinical significance of LDHB in glioma

变化情况。转染sh-*EFGP*、sh-*LDHB*质粒48 h后,收集上清中的贴壁细胞,PI单染流式细胞术检测细胞周期。结果发现,在U251MG和SW1783细胞中,与对照组相比,sh-*LDHB*组细胞sub-G₁比例明显调高,其中SW1783-sh-*LDHB*细胞中出现明显的sub-G₁峰(图4A和图4B),即细胞凋亡峰。

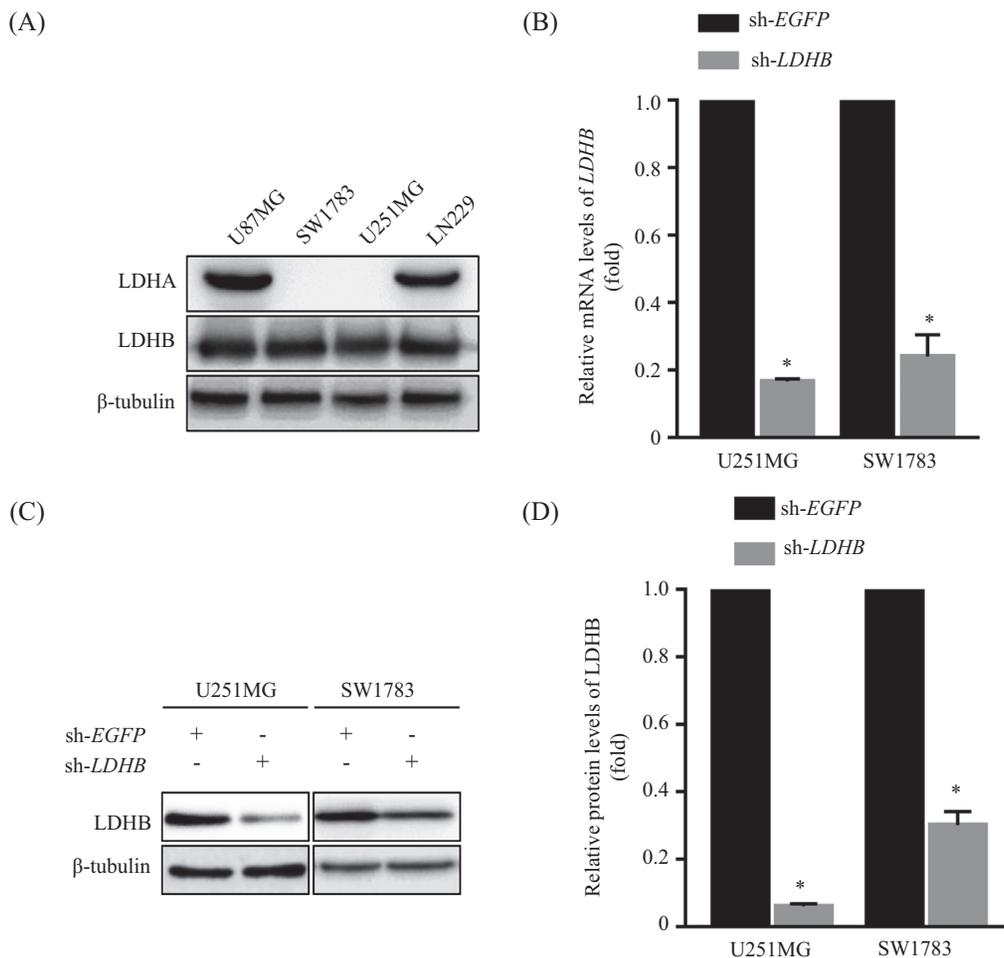
2.5 敲低LDHB抑制胶质瘤细胞中增殖相关蛋白质水平

为进一步研究下调LDHB对胶质瘤细胞生长情况的影响,在胶质瘤细胞中干扰LDHB后检测细胞中增殖相关蛋白质水平的变化情况。转染48 h后,qRT-PCR结果显示,降低LDHB基因表达量,胶质瘤细胞中增殖相关蛋白*c-Myc*和*CylinD1*的mRNA水平降低(图5A)。同时,Western blot结果也显示,降低

LDHB表达量,胶质瘤细胞中增殖相关蛋白*c-Myc*和*CylinD1*的蛋白质水平降低(图5B和图5C)。此结果说明,在脑胶质瘤细胞中敲低LDHB基因后,细胞的增殖能力受到抑制。

2.6 下调LDHB脑胶质瘤细胞中抑制PDK1/Akt/GSK3β信号通路的激活

为了研究下调LDHB基因对PDK1/Akt/GSK3β信号通路的影响,我们在U251MG和SW1783细胞中下调LDHB的表达量,接着检测PDK1/Akt/GSK3β信号通路相关蛋白质的水平变化。结果显示,LDHB蛋白质水平降低,PDK1、Akt和GSK3β总蛋白质水平不变,但是PDK1、Akt和GSK3β的磷酸化水平降低(图6),说明降低LDHB表达量抑制了PDK1/Akt/GSK3β信号通路的激活。



A: Western blot检测LDHA和LDHB在4种胶质瘤细胞中的作用; B: qRT-PCR检测LDHB的mRNA水平; C: Western blot检测LDHB蛋白质水平; D: 蛋白灰度相对分析。* $P < 0.05$, 与sh-EGFP组比较。

A: the levels of LDHA/LDHB in glioma cells detected by Western blot; B: the mRNA level of LDHB in glioma cells detected by qRT-PCR; C: the protein level of LDHB in glioma cells detected by Western blot; D: the relative protein levels of LDHB detected by densitometry. * $P < 0.05$ vs sh-EGFP groups.

图2 检测4种胶质瘤细胞中LDHA/LDHB水平和干扰LDHB的效率

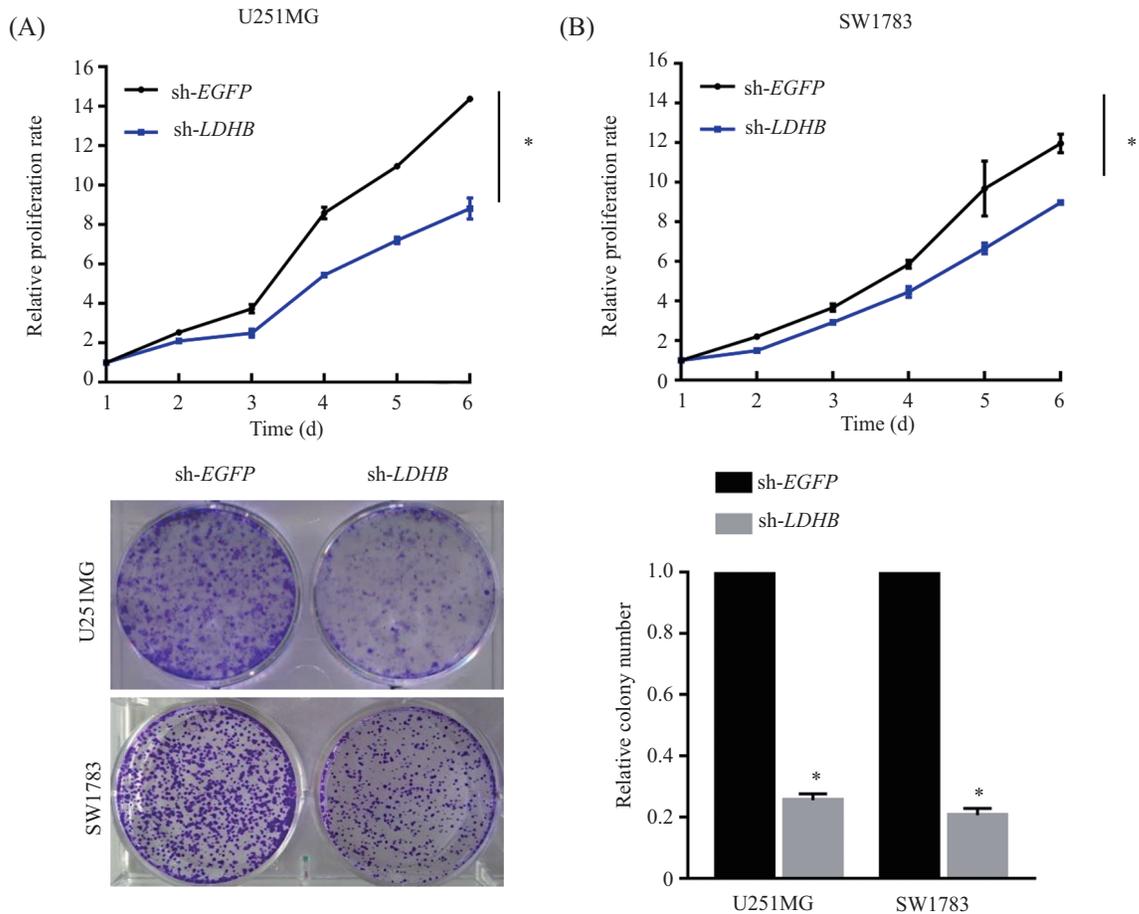
Fig.2 Verification the levels of LDHA/LDHB in glioma cells and the rate of LDHB knockdown

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性颅内恶性肿瘤^[11]。当前脑胶质瘤的主要治疗方案是手术治疗辅以放疗和替莫唑胺(TMZ)化疗的标准化方案,但目前胶质瘤的预后仍不理想^[9,11-14]。近年来,随着胶质瘤细胞增殖、迁移、放化疗抵抗等恶性细胞生物学行为研究的不断深入以及分子分型的研究和多种分子标志物的确定,针对明确位点设计的特异性靶向药物有望成为脑胶质瘤临床治疗的新突破点^[15-16]。

LDHB作为糖酵解途径中一个重要的催化亚基,在多种肿瘤发生、发展中扮演重要且复杂的作用。在肺腺癌细胞中, KRAS基因异常扩增时, LDHB以及糖酵解相关基因表达也异常增高,应用siRNA技术干扰KRAS突变的肺腺癌细胞中LDHB的表达后,肿

瘤细胞的生长受到显著抑制,因此, KRAS突变的肺腺癌细胞依赖LDHB维持细胞的增殖和生长^[17]。在肝癌细胞中,敲低LDHB的表达可以增强糖酵解效率和扰乱线粒体功能,从而促进侵袭相关蛋白质Cln-1的表达,最终诱导肝癌细胞侵袭能力增强。这些都提示, LDHB在肿瘤中扮演着双重作用,针对LDHB的靶向治疗手段需要考虑肿瘤来源、肿瘤分型、肿瘤遗传背景等方面。本研究首先通过生物信息学手段,对TCGA和CGGA两种国际和国内胶质瘤数据库进行分析,结果显示, LDHB是判断胶质瘤生物学行为的重要指标,其与胶质瘤的发生、发展密切相关, LDHB可能成为胶质瘤分型以及预示病人预后的一种分子指标。LDHB表达占优势的胶质瘤细胞更依赖于其生物学作用,提示在该类细胞中以LDHB为该



A、B: 抑制U251MG和SW1783细胞中LDHB基因的表达水平降低细胞的增殖速率; C、D: 抑制U251MG和SW1783细胞中LDHB基因的表达水平降低细胞的克隆形成能力。* $P < 0.05$, 与sh-EGFP组比较。

A,B: knockdown of LDHB inhibited the proliferative rates in U251MG and SW1783 cells; C,D: knockdown of LDHB inhibited the clonogenic capacity in U251MG and SW1783 cells. * $P < 0.05$ vs sh-EGFP groups.

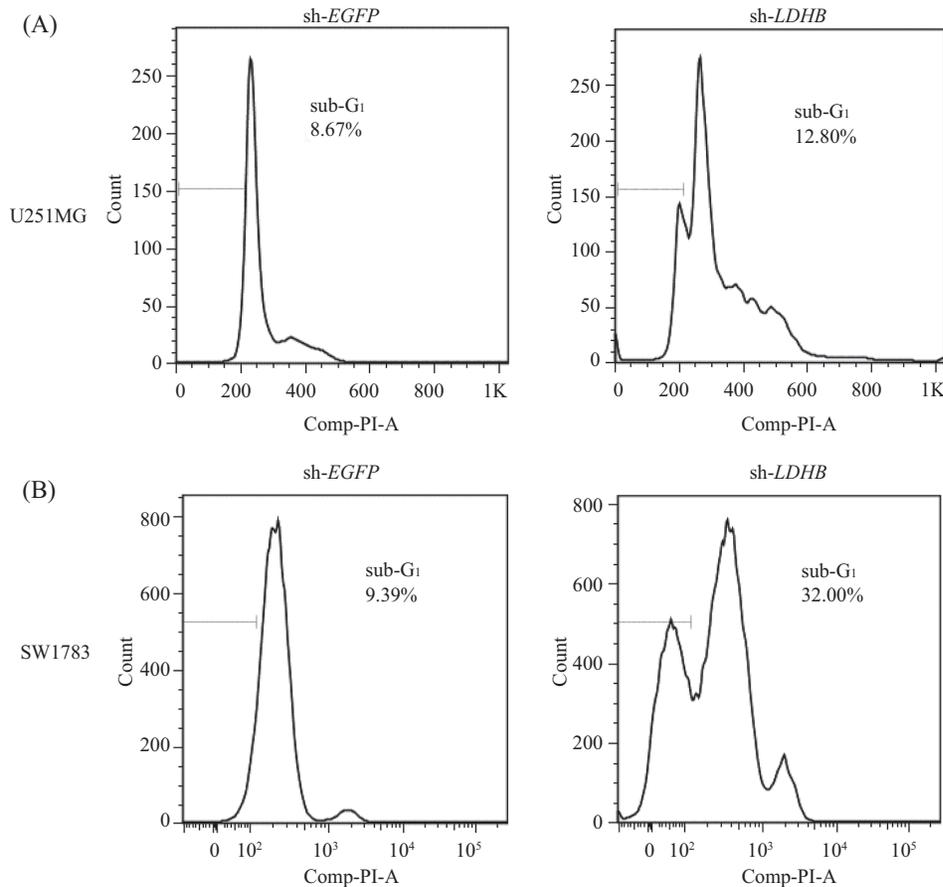
图3 降低LDHB表达水平抑制脑胶质瘤细胞的增殖能力

Fig.3 Knockdown of LDHB inhibits the proliferation of glioma cells

治疗靶点, 干扰LDHB表达, 从而影响细胞周期增殖, 达到治疗肿瘤的效果。此外, 研究证明, 尽管LDHB在广泛存在于各种组织中, 遗传性LDHB完全缺失的病人却没有表现出异常症状, 靶向LDHB的分子抑制剂有望成为治疗肿瘤的又一种药物^[19-20]。

PI3K/Akt通路中关键分子PDK1的激活, 能够使Akt第308位的苏氨酸发生磷酸化并活化, 从而调节细胞内多种增殖相关基因的表达, 如mTOR、c-Myc、P21^{cipl}和CREB等^[10,21]。c-Myc是一种细胞周期促进因子, 使细胞逃离G₀期, 引起肿瘤细胞增殖, Akt通过增加抑癌基因c-Myc的转录、上调该基因的表达而影响细胞周期。CyclinD1的含量高低对细胞周期G₁/S的转换至关重要, Akt通过直接磷酸化抑制GSK3 β 活性从而阻止CyclinD1的降解^[22]。已有研究证实, Akt通路在脑胶质瘤中处于激活状态, 并且活化程度与

胶质瘤的恶性程度密切相关, 被认为是预示脑胶质瘤患者预后的又一重要的生物学指标^[9]。Zha等^[23]的研究表明, LDHB作为糖酵解途径中重要的催化酶, 在RTK-PI3K-Akt-mTOR通路高度激活的MEF细胞中也异常高表达, 针对LDHB可以特异性地靶向该类肿瘤从而达到治疗目的。同时, 也有研究证明, miR-21通过PI3K/Akt/mTOR通路抑制糖酵解途径相关蛋白包括LDHB的表达, 影响代谢过程^[24]。LDHB参与的糖酵解过程受到HIF-1 α /PDK1的调控, 在乳腺癌的发生、发展中起重要作用^[25]。大量研究结果都预示LDHB能够调控Akt信号通路, 但是其间的相互作用的具体机制还不清楚。因此, 本研究在脑胶质瘤细胞中敲低LDHB后, 探索其是否影响PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路, 结果表明, LDHB确实能够影响能PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路的激活。



A、B: 抑制U251MG、SW1783细胞中LDHB基因的表达水平提高了胶质瘤细胞中sub-G₁比例。

A,B: knockdown of LDHB results in sub-G₁ DNA content of U251MG and SW1783 cells.

图4 降低LDHB基因表达水平促进脑胶质瘤细胞的凋亡

Fig.4 Knockdown LDHB promotes the apoptosis of glioma cells

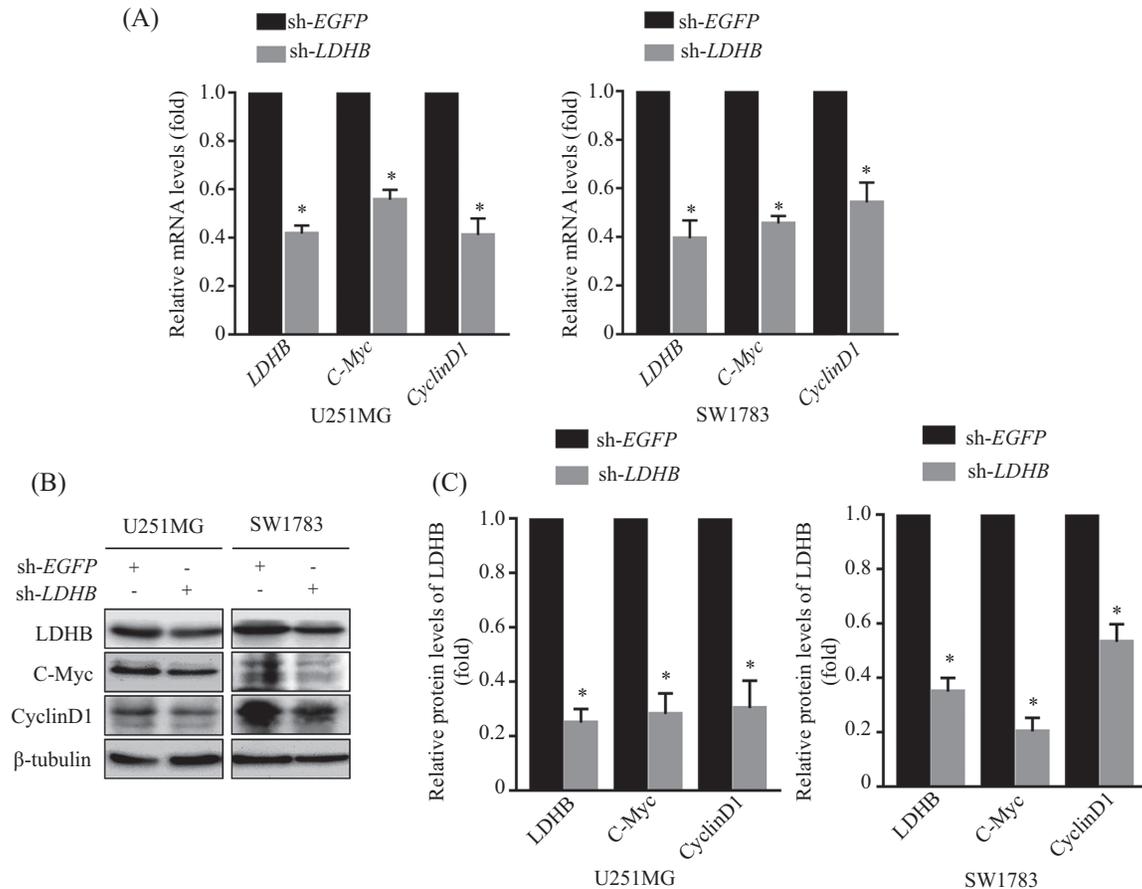
本研究通过构建LDHB干扰质粒转染细胞, 采用qRT-PCR、Western blot、CCK-8以及克隆形成实验验证了LDHB对人脑胶质瘤细胞增殖的作用, 并通过Western blot探索了LDHB对PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路中相关蛋白的影响。实验结果均表明, 在LDHB表达水平占优势的胶质瘤细胞中, LDHB通过调控PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路影响胶质瘤细胞的增殖, 对于指导治疗从而提高胶质瘤患者的生存率具有重要意义, 但尚需进一步的体内实验证实上述结果。此外, LDHA/LDHB表达模式在胶质瘤中起何种作用以及LDHB影响PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路的具体作用机制也需要进一步探讨。

参考文献 (References)

- 1 Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, Lev-Cohain N, Jin E, Kim J, *et al.* Metabolic heterogeneity in human lung tumors. *Cell* 2016; 164(4): 681-94.
- 2 Kathagen-Buhmann A, Schulte A, Weller J, Holz M, Herold-Mende C, Glass R, *et al.* Glycolysis and the pentose phosphate

pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol* 2016; 18(9): 1219-29.

- 3 Vander HM. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10(9): 671-84.
- 4 Leite TC, Coelho RG, Da SD, Coelho WS, Marinho-Carvalho MM, Sola-Penna M, *et al.* Lactate downregulates the glycolytic enzymes hexokinase and phosphofructokinase in diverse tissues from mice. *FEBS Lett* 2011; 585(1): 92-8.
- 5 Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 2011; 71(22): 6921-5.
- 6 Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, Alnajjar M, Stechishin OD, Chan JA, *et al.* Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol* 2014; 16(5): 686-95.
- 7 Allison SJ, Knight JR, Granchi C, Rani R, Minutolo F, Milner J, *et al.* Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* 2014; 3(5): e102.
- 8 Brisson L, Bański P, Sboarina M, Dethier C, Danhier P, Fontenille MJ, *et al.* Lactate dehydrogenase B controls lysosome activity and autophagy in cancer. *Cancer Cell* 2016; 30(3): 418-31.
- 9 Huang N, Cheng S, Mi X, Tian Q, Huang Q, Wang F, *et al.* Downregulation of nitrogen permease regulator like-2 activates



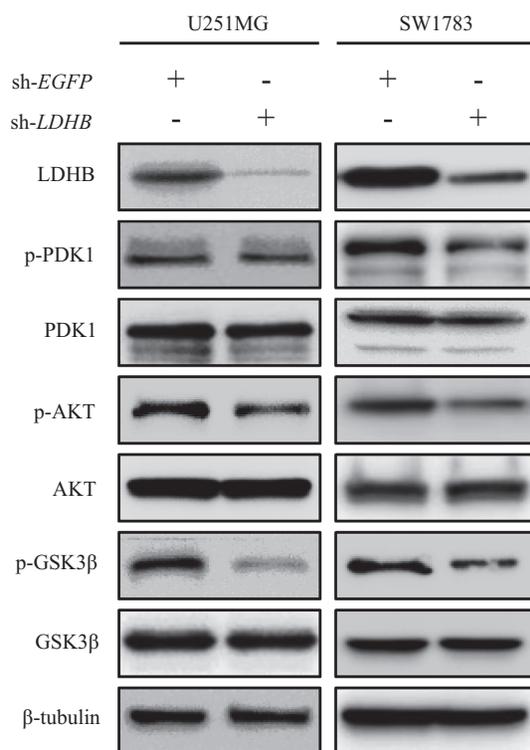
A: 抑制LDHB表达水平降低U251MG和SW1783脑胶质瘤细胞中增殖相关基因的mRNA水平; B: 抑制LDHB表达水平降低U251MG和SW1783脑胶质瘤细胞中增殖相关蛋白质的水平; C: 蛋白水平灰度分析。* $P < 0.05$, 与sh-EGFP组比较。

A: LDHB knockdown inhibited the proliferation related genes mRNA levels in U251MG and SW1783 cells; B: LDHB knockdown inhibited the proliferation related genes protein levels in U251MG and SW1783 cells; C: densitometry was performed to detect the relative protein levels of indicated proteins. * $P < 0.05$ vs sh-EGFP groups.

图5 下调LDHB抑制了脑胶质瘤细胞中增殖相关基因的表达水平

Fig.5 Knockdown of LDHB reduces the proliferation related genes expression in glioma cells

- PDK1-AKT1 and contributes to the malignant growth of glioma cells. *Mol Carcinog* 2016; 55(11): 1613-26.
- 10 Wang L, Cao XX, Chen Q, Zhu TF, Zhu HG, Zheng L. DIXDC1 targets p21 and cyclin D1 via PI3K pathway activation to promote colon cancer cell proliferation. *Cancer Sci* 2009; 100(10): 1801-8.
- 11 Binda E, Visioli A, Giani F, Trivieri N, Palumbo O, Restelli S, *et al.* Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res* 2017; 77(4): 996-1007.
- 12 Peng WX, Han X, Zhang CL, Ge L, Du FY, Jin J, *et al.* FoxM1-mediated RFC5 expression promotes temozolomide resistance. *Cell Biol Toxicol* 2017; 33(6): 527-37.
- 13 Xue J, Zhou A, Wu Y, Morris SA, Lin K, Amin S, *et al.* miR-182-5p induced by STAT3 activation promotes glioma tumorigenesis. *Cancer Res* 2016; 76(14): 4293-304.
- 14 Yang F, Liu X, Liu Y, Liu Y, Zhang C, Wang Z, *et al.* miR-181d/MALT1 regulatory axis attenuates mesenchymal phenotype through NF- κ B pathways in glioblastoma. *Cancer Lett* 2017; 396: 1-9.
- 15 Morokoff A, Ng W, Gogos A, Kaye AH. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clinical Neurosci* 2015; 22(8): 1219-26.
- 16 Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9(3): 157-73.
- 17 McClelland ML, Adler AS, Deming L, Cosino E, Lee L, Blackwood EM, *et al.* Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-Ddependent lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2013; 19(4): 773-84.
- 18 Kim JH, Kim EL, Lee YK, Park CB, Kim BW, Wang HJ, *et al.* Decreased lactate dehydrogenase B expression enhances claudin 1-mediated hepatoma cell invasiveness via mitochondrial defects. *Expl Cell Res* 2011; 317(8): 1108-18.
- 19 Okumura N, Terasawa F, Ueno I, Oki K, Yamauchi, K, Hidaka H, *et al.* Genetic analyses in homozygous and heterozygous variants of lactate dehydrogenase-B (H) subunit—LD-B matsumoto I and II (LD-B W323R). *Clin Chim Acta* 1999; 287(1/2): 163-71.
- 20 Sudo K, Maekawa M, Houki N, Okuda T, Akizuki S, Magara T, *et al.* A novel in-frame deletion mutation in a case of lactate dehydrogenase (LD) H subunit deficiency showing an atypical LD isoenzyme pattern in serum and erythrocytes. *Clin Biochem*



在U251MG和SW1783细胞中干扰LDHB后,检测LDHB及PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路相关蛋白质水平。

Western blot was performed to detect the PDK1/Akt/GSK3 β related proteins expression after knocking down the expression of LDHB in U251MG and U87MG cells.

图6 下调*LDHB*基因抑制PDK1/Akt/GSK3 β 信号通路的激活
Fig.6 Knockdown of *LDHB* inactivates the PDK1/Akt/GSK3 β pathway

- 1999; 32(2): 137-41.
- 21 Norton N, Williams HJ, Dwyer S, Carroll L, Peirce T, Moskvina V, *et al.* Association analysis of AKT1 and schizophrenia in a UK case control sample. *Schizophr Res* 2007; 93(1/2/3): 58-65.
- 22 Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 2004; 36(2): 131-7.
- 23 Zha X, Wang F, Wang Y, He S, Jing Y, Wu X, *et al.* Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis. *Cancer Res* 2011; 71(1): 13-8.
- 25 Yang X, Cheng Y, Li P, Tao J, Deng X, Zhang X, *et al.* A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis. *Tumour Biol* 2015; 36(1): 383-91.
- 26 Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, *et al.* PDK1-dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer. *Cell Metab* 2015; 22(4): 577-89.