

基于 LDHA 基因和 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨自噬在卵巢癌细胞侵袭和迁移及糖酵解中的作用

陈良凤^{1,2}, 吕小慧³, 王 建³, 马园园⁴

(1.安康市中心医院妇产科, 陕西 安康 725000; 2.安康市高新医院妇产科, 陕西 安康 725000;
3.空军军医大学第一附属医院妇产科, 陕西 西安 710032; 4.延安市人民医院妇产科, 陕西 延安 716000)

[摘要]目的 探讨自噬通过调控乳酸脱氢酶 A(LDHA)和 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路对卵巢癌细胞侵袭、迁移能力和糖酵解的影响。方法 2021 年 1 月至 2022 年 12 月在空军军医大学西京医院使用厄尔平衡盐溶液(EBSS)饥饿处理诱导人卵巢腺癌细胞系 SKOV3 细胞诱导自噬。细胞实验分组 1 为:Control 组、EBSS 组和 EBSS+3-MA 组;细胞实验分组 2 为:EBSS+NC-shRNA 组、EBSS+LDHA-shRNA1 组和 EBSS+LDHA-shRNA2 组;细胞实验分组 3 为:EBSS+NC-shRNA 组、EBSS+ β -catenin-shRNA1 组和 EBSS+ β -catenin-shRNA2 组。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法、Western blotting 法、Transwell 实验、细胞免疫荧光染色等检测并统计分析有关表达量的情况。结果 Control 组和 EBSS 组及 EBSS+3-MA 组间细胞的微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 表达量相对比值比较,差异有统计学意义($F=113.900, P<0.01$)。Control 组和 EBSS 组及 EBSS+3-MA 组间细胞的侵袭和迁移细胞数及基质金属蛋白酶(MMP)2 和 MMP9 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 2 448.000、1 405.000、111.000、132.200, $P<0.01$)。Control 组和 EBSS 组及 EBSS+3-MA 组间细胞的 LDHA mRNA、GLUT1 mRNA、LDHA 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 311.400、66.940、154.200, $P<0.01$)。NC-shRNA 组和 LDHA-shRNA1 组及 LDHA-shRNA2 组间细胞的 LDHA 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($F=123.200, P<0.01$)。Control 组和 EBSS 组及 EBSS+3-MA 组间细胞的 β -catenin、p- β -catenin 磷酸化相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 206.500、222.200, $P<0.01$)。NC-shRNA 组和 β -catenin-shRNA1 组及 β -catenin-shRNA2 组间细胞的 β -catenin 相对表达量比较,差异有统计学意义($F=127.000, P<0.01$)。结论 饥饿诱导的自噬激活可促进卵巢癌的侵袭、迁移能力及糖酵解活性,其机制可能与自噬激活 Wnt/ β -catenin 信号通路并上调 LDHA 表达有关。

[关键词]卵巢癌;自噬;乳酸脱氢酶 A;糖酵解; β -连环蛋白

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2025.02.006

[中图分类号]R173

[文献标识码]A

[文章编号]1673-5293(2025)02-0037-10

Role of autophagy in invasion and migration and glycolysis of ovarian cancer cells investigated based on LDHA gene and Wnt/ β -catenin signaling pathway

CHEN Liangfeng^{1,2}, LV Xiaohui³, WANG Jian³, MA Yuanyuan⁴

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, Ankang Central Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Ankang Gaoxin Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of the Air Force Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China; 4.Department of Obstetrics and Gynecology, Yan'an Central Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of autophagy on ovarian cancer cell invasion, migration and glycolysis by regulating lactate dehydrogenase A (LDHA) and Wnt/ β -catenin β in signaling pathways. **Methods** From January 2021 to December 2022, autophagy was induced by starvation treatment with Earl balanced salt solution (EBSS) in Xijing Hospital of Air Force Medical University, human ovarian adenocarcinoma cell line SKOV3 cells. Cell experiment group 1 was divided into control group, EBSS group and EBSS+3-MA group. Cell experimental group 2 was as follows: EBSS+NC-shRNA group, EBSS+LDHA-shRNA1 group and EBSS+LDHA-shRNA2 group. Group 3 of the cell experiment was EBSS+NC-shRNA group, EBSS+ β -catenin-shRNA1 group, and EBSS+ β -catenin-shRNA2 group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR), Western blotting, Transwell assay, and cell immunofluorescence staining were used to detect and statistically analyze the expression level. **Results** There was a

[收稿日期]2024-04-24

[基金项目]国家自然科学基金(81172458);陕西省自然科学基金研究计划重点项目(2024JC-ZDXM-52)

[作者简介]陈良凤(1981—),女,副主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤及子宫内膜异位症的基础研究。

[通讯作者]马园园,副主任医师。

significant difference in the relative ratio of LC3-II/LC3-I expression between control group, EBSS group and EBSS+3-MA group ($F=113.900, P<0.01$). There were significant differences in the number of invasive and migrating cells and the relative expression levels of MMP2 and MMP9 proteins between the Control group, the EBSS group and the EBSS+3-MA group (F values were 2 448.000, 1 405.000, 111.000 and 132.200, respectively, $P<0.01$). There were significant differences in the relative expressions of LDHA mRNA, GLUT1 mRNA and LDHA protein between the control group, the EBSS group and the EBSS+3-MA group (F values were 311.400, 66.940 and 154.200, $P<0.01$, respectively). There was a significant difference in the relative expression of LDHA protein between the NC-shRNA group, LDHA-shRNA1 group and LDHA-shRNA2 group ($F=123.200, P<0.01$). There were significant differences in the relative expressions of β -catenin and phosphorylated p- β -catenin between the control group, the EBSS group and the EBSS+3-MA group (F -values were 206.500 and 222.200, $P<0.01$, respectively). There was a significant difference in the relative expression of β -catenin between the NC-shRNA group, the β -catenin-shRNA1 group and the β -catenin-shRNA2 group ($F=127.000, P<0.01$). **Conclusion** Starvation-induced autophagy activation can promote the invasion, migration and glycolytic activity of ovarian cancer, which may be related to the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway and up-regulation of LDHA expression by autophagy.

[Key words] ovarian cancer; autophagy; lactate dehydrogenase A; glycolysis; β -catenin

卵巢癌是世界范围内最常见的妇科恶性肿瘤之一,因早期诊断准确率低,晚期广泛转移导致死亡率最高,预后差^[1-2]。虽然卵巢癌的治疗策略已经取得了很大的进展,包括手术、化疗和放疗,但卵巢癌患者的5年生存率仍然低于45%^[3]。因此,寻找更有效地治疗卵巢癌的方法迫在眉睫。

正常细胞在有氧条件下,首先通过糖酵解转化为丙酮酸,然后丙酮酸通过三羧酸循环进入线粒体进行氧化磷酸化,并产生大约38个三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)分子。当氧气不足时,丙酮酸转化为乳酸,通过厌氧糖酵解只产生2个ATP分子。而在肿瘤中存在另一种被称为“沃伯格效应”的现象,即使有足够的氧气,肿瘤细胞仍然使用效率较低的“有氧糖酵解”过程来更快地获得能量^[4]。由于氧化磷酸化的代谢损伤,ATP浓度降低。为了补偿减少的能量产出,肿瘤细胞大量摄取葡萄糖,厌氧糖酵解、戊糖磷酸途径等上调,生物合成增加。在肿瘤的中心区域通常是低氧、缺氧环境,肿瘤细胞会更多地进入“沃伯格效应”的能量代谢重编程,这将需要更高地合成代谢。细胞(巨)自噬(auto-phagy)是一种具有维持稳态和促进细胞生存功能的溶酶体分解代谢过程,自噬后的降解产物可作为底物被肿瘤细胞用于新的合成代谢途径^[5]。自噬是一把双刃剑,具有促癌和抑癌两种效应。自噬降解去除受损或功能失调的细胞器和损伤的DNA,可以抑制肿瘤的发展;也可以促进肿瘤细胞增殖,增强肿瘤细胞在缺氧恶劣环境中的存活并赋予其耐药性^[5-6]。

缺氧导致的ATP浓度降低可上调缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α),激活5'-腺苷磷酸依赖蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)途径,增强癌细胞存活率^[7-8]。但自噬如何调控葡萄糖代谢尚不明晰。

乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)是糖酵解过程中的关键酶。在卵巢癌中,LDHA表达显著增强,并赋予卵巢癌聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribos polymerase, PARP)抑制剂抗性^[9]。但是LDHA在糖酵解调节中的作用仍不清楚。本研究旨在探讨自噬、LDHA影响卵巢癌细胞侵袭和迁移及糖酵解能力的机制,为进一步研究自噬在卵巢癌疾病发展和治疗中的作用提供理论基础。

1 研究材料与方法

自2021年1月至2022年12月在空军军医大学西京医院妇产科,研究自噬通过调控LDHA和Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路对卵巢癌细胞侵袭、迁移能力及糖酵解的影响。

本研究已经通过空军军医大学第一附属医院医学伦理委员会审批(编号:20241183)。

1.1 主要试剂和仪器

人卵巢腺癌细胞系SKOV3细胞,中国科学院ATCC细胞库;RPMI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)厄尔平衡盐溶液(Earle's balanced salt solution, EBSS)、3-甲基腺嘌呤(3-methyl-3H-adenine, 3-MA),美国Gibco公司;乳

酸检测试剂盒、葡萄糖检测试剂盒,上海碧云天生物有限公司; NC-shRNA、LDHA-shRNA1、LDHA-shRNA2、 β -连环蛋白(β -catenin)-shRNA1、 β -catenin-shRNA2,BCA 蛋白测定试剂盒,赛默飞世尔科技公司(中国); LipofectamineTM 2000 试剂盒、TRIzol 试剂,美国 Invitrogen 公司; PrimeScript RT-PCR 试剂盒、SYBR Green 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2、MMP9、LDHA、 β -catenin 一抗,美国 Sigma 公司。实时荧光定量 PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR) 仪,美国 Applied Biosystems 公司; 多功能酶标仪,奥地利 TECAN 公司; 倒置普通光学显微镜,德国 Leica 公司。

1.2 方法

细胞实验分组 1 为: Control 组、EBSS 组和 EBSS+3-MA 组; 细胞实验分组 2 为: EBSS+NC-shRNA 组、EBSS+LDHA-shRNA1 组和 EBSS+LDHA-shRNA2 组; 细胞实验分组 3 为: EBSS+NC-shRNA 组、EBSS+ β -catenin-shRNA1 组和 EBSS+ β -catenin-shRNA2 组。

1.2.1 细胞培养与转染

将人卵巢腺癌细胞系 SKOV3 细胞在含 10% 胎牛血清、100IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱进行培养。使用 EBSS 或 10 μ mol/L 自噬抑制剂 3-MA 处理细胞 6h。收集对数期细胞,接种于 6 孔板,密度为 1 $\times$ 10⁶ 细胞/孔。进一步培养细胞至 50% 融合,使用 Lipofectamine 3000 并根据说明书将 NC-shRNA、LDHA-shRNA1、LDHA-shRNA2、 β -catenin-shRNA1 和 β -catenin-shRNA2 转染至细胞中。转染 48h 后,收集细胞用于后续实验。shRNAs 序列如下:

LDHA-shRNA1: 5'-GGATATACCAACTGGGCTA-3', LDHA-shRNA2: 5'-GTACAGTCCTGATGTCATC-3'; β -catenin-shRNA1: 5'-TTGGAATGAGACTGCTGAT-3', β -catenin-shRNA2: 5'-CATGGAAGAAATAGTTGAA-3'; NC-shRNA: 5'-TTCTCGAACGTGTCACGT-3'。

1.2.2 RT-qPCR 检测分析

按照说明书,使用 Trizol 试剂从细胞中提取总

RNA。然后,使用 PrimeScript 逆转录试剂盒,将总 RNA 逆转录为 cDNA。随后,采用 SYBR Green 进行 RT-qPCR 扩增分析。每个样本中基因的相对表达均采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法进行定量。GAPDH 作为基因的内参。

引物序列如下: GLUT1 F 5'-CCCCGTCCTGCTGCTATTG-3', R 5'-GCACCGTGAAGATGATGAAGAC-3'; LDHA F 5'-CCAACATGGCAGCCTTTTCCTTAGAACACC-3', R 5'-GACGTGCCCCAGCCGTGATAATGAC-3'; LDHB F 5'-GTGGAGTGGAGTGAATGTGG-3', R 5'-TGTCTGTTCCCATTCTGGA-3'; β -Actin F 5'-TGATGATATCGCCGCGCTCG-3', R 5'-AGGCCAGAGCAAGAGAGGC-3'。所有实验重复测定 6 次。

1.2.3 Western blotting 法

使用放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)从 SKOV3 细胞中提取总蛋白,用 BCA 检测试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品在 10% SDS-PAGE 上分离后,转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)上。5% 脱脂牛奶封闭后,用一抗 LDHA(1:1 000 稀释)、 β -catenin(1:1 000 稀释)和 β -Actin(1:1 000 稀释)4℃ 孵育过夜。然后用 TBST 冲洗膜 3 次,山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释)孵育 1h,再次冲洗,最后用 ECL 化学发光检测试剂观察蛋白条带,并使用 Image J 软件分析目标条带的灰度值。所有实验重复测定 6 次。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移

检测细胞侵袭实验时,将转染的 2 $\times$ 10⁵ 个 SKOV3 细胞接种在涂有 Matrigel 胶的 Transwell 小室上腔中,下腔加入 600 μ L 含 10% FBS 的完全培养基。置于细胞培养箱中常规培养 24h 后,将小室取出。用 PBS 洗涤细胞后,将细胞用 4% 多聚甲醛固定 30min,并用棉签小心地擦拭小室内侧底面的细胞,在室温下放置 5min 进行空气干燥。用 0.1% 结晶紫染色 30min,随后 PBS 洗涤 3 次,风干。在倒置显微镜下随机选择 5 个不同的视野进行观察拍照,使用 Image J 软件计数细胞数量。Transwell 迁移实验使用未涂有 Matrigel 胶的 Transwell 小室进行实验,其余实验步骤与侵袭实验一致。所有实验重复测定 6 次。

1.2.5 细胞免疫荧光染色

细胞爬片后,在培养板中用 PBS 洗涤细胞,随后用 4% 多聚甲醛固定 15min,0.2% Triton X-100 通透 10min,山羊血清封闭 30min,PBS 洗涤 3 次。用抗 LC3 的一抗(1:500 稀释)4℃ 孵育过夜。然后,将细胞与相应的异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的二抗(1:1000 稀释)室温下孵育 1h,并用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole,DAPI)标记细胞核。共聚焦荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.6 细胞能量代谢水平的检测

收集转染后的细胞培养基,分别使用葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒,根据说明书测定葡萄糖消耗和乳酸产量。结果按细胞总蛋白量归一化。所有实验重复测定 6 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用 t 检验分析两组之间的差异,使用单因素方差分析多组间差异。当 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

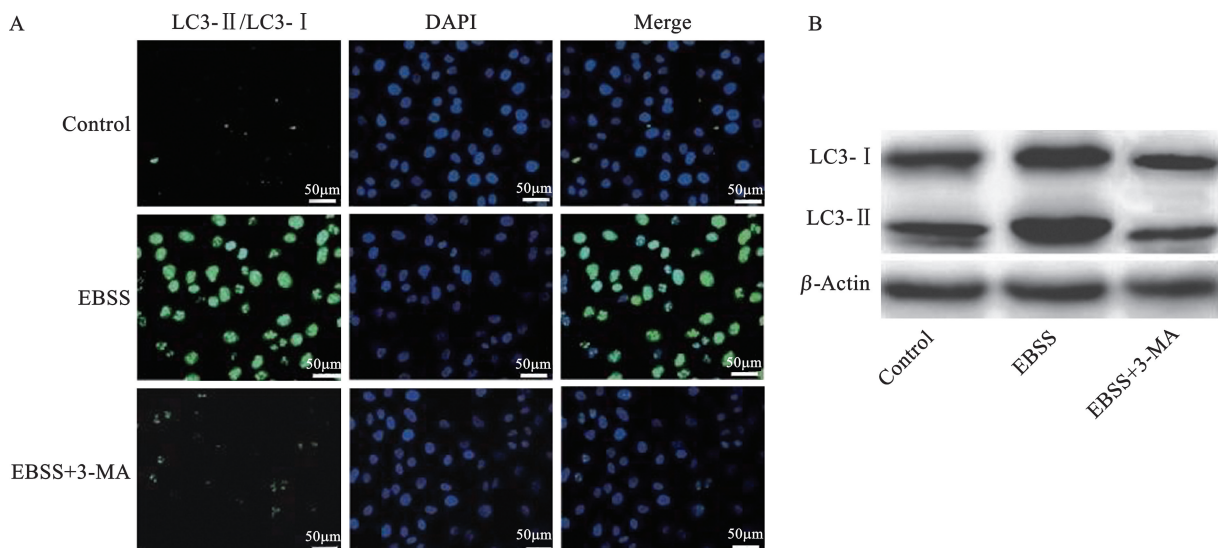
2.1 饥饿对卵巢癌细胞自噬的影响

采用 Western blotting 和免疫荧光染色法对相

应指标进行检测,结果显示,与 Control 组比较,EBSS 组 SKOV3 细胞自噬蛋白 LC3-II/LC3-I 表达量相对比值显著升高,荧光斑点聚集增多;与 EBSS 组比较,EBSS + 3-MA 组细胞自噬蛋白 LC3-II/LC3-I 表达量相对比值显著降低,荧光斑点减少;三组间细胞的 LC3-II/LC3-I 表达量相对比值比较,差异有统计学意义($F = 113.900, P < 0.01$),表明饥饿处理可以诱导卵巢癌细胞自噬,见图 1 和表 1。

2.2 饥饿及自噬对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响

Transwell 实验结果显示,与 Control 组比较,EBSS 组 SKOV3 细胞侵袭和迁移细胞数显著增加($P < 0.01$),MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$);与 EBSS 组比较,EBSS + 3-MA 组细胞侵袭和迁移细胞数显著减少($P < 0.01$),MMP2 和 MMP9 蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$);三组间细胞的侵袭和迁移细胞数及基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2,MMP2)和 MMP9 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 2 448.000、1 405.000、111.000、132.200, $P < 0.01$),表明饥饿可以促进卵巢癌细胞的侵袭和迁移能力,抑制自噬抑制饥饿对卵巢癌细胞侵袭和迁移能力的促进作用,见图 2 和表 2。



注:A 为细胞免疫荧光观察细胞 LC3 的表达;B 为 Western blotting 检测自噬蛋白 LC3 的表达。

图 1 饥饿对卵巢癌细胞自噬相关蛋白 LC3 表达水平的影响

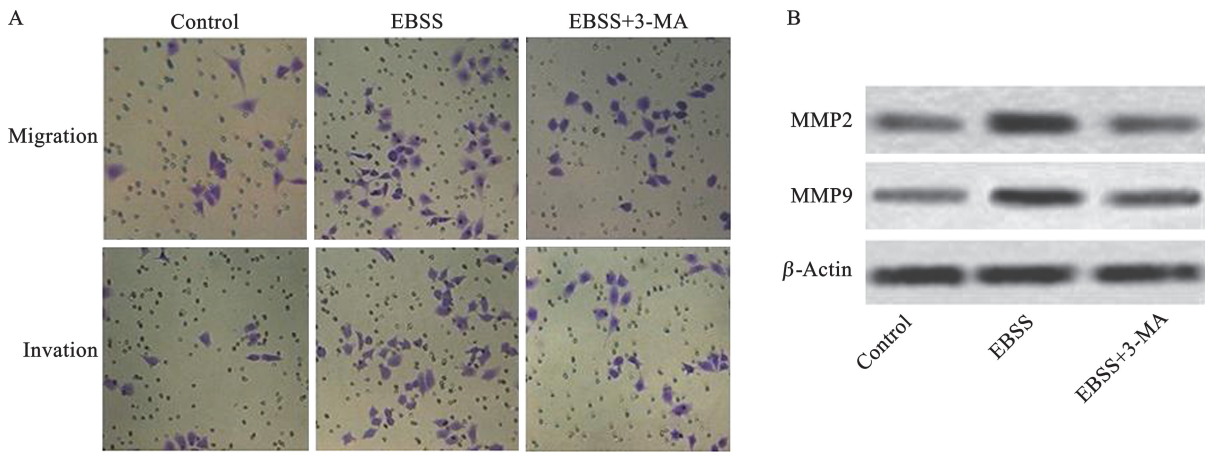
Fig.1 Effects of starvation on the expression levels of autophagy associated protein LC3 in ovarian cancer cells

表 1 饥饿对卵巢癌细胞自噬相关蛋白 LC3 表达水平的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of starvation on the expression levels of autophagy-related protein LC3 in ovarian cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LC3-II /LC3-I 表达量相对比值	组别	LC3-II /LC3-I 表达量相对比值
Control 组	1.00±0.12	t_1	21.350
EBSS 组	2.27±0.18	P_1	<0.001
EBSS+3-MA 组	1.64±0.13	t_2	10.760
F	113.900	P_2	<0.001
P	<0.001	t_3	10.590
		P_3	<0.001

注: F 、 P 为 Control 组 *vs.* EBSS 组 *vs.* EBSS+3-MA 组; t_1 、 P_1 为 EBSS 组 *vs.* Control 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* Control 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* EBSS 组。



注:A 为 Transwell 检测细胞侵袭和迁移能力;B 为 Western blotting 检测 MMP2 和 MMP9 的表达。

图 2 饥饿及自噬对卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响

Fig.2 Effects of starvation and autophagy on invasion and migration abilities of ovarian cancer cells

表 2 饥饿及自噬对卵巢癌细胞侵袭/迁移细胞数和 MMP2/9 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of the number of invaded/migrating cells and the relative expression of MMP2/9 protein in ovarian cancer cells by starvation and autophagy ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	侵袭细胞(数/视野)	迁移细胞(数/视野)	MMP2 蛋白相对表达量	MMP9 蛋白相对表达量
Control 组	24.10±1.10	35.30±1.70	1.00±0.12	1.00±0.08
EBSS 组	76.40±1.80	89.10±2.30	2.16±0.15	2.31±0.17
EBSS+3-MA 组	31.50±1.20	45.70±1.50	1.77±0.14	1.89±0.16
F	2 448.000	1 405.000	111.000	132.200
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
t_1	91.430	70.680	20.700	22.520
P_1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
t_2	12.940	13.660	13.740	15.300
P_2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
t_3	78.490	57.010	6.960	7.221
P_3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: F 、 P 为 Control 组 *vs.* EBSS 组 *vs.* EBSS+3-MA 组; t_1 、 P_1 为 EBSS 组 *vs.* Control 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* Control 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* EBSS 组。

2.3 饥饿及自噬对卵巢癌细胞糖酵解关键酶活性的影响

与 Control 组比较,EBSS 组 SKOV3 细胞的相对葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著升高($P<0.01$),与 EBSS 组比较,EBSS+3-MA 组细胞的相对葡萄糖消耗量和乳酸生成量显著降低($P<0.01$);三组间细胞的相对葡萄糖消耗量和乳酸生成量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 53.060、44.300, $P<0.01$),见表 3。

RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,与 Control 组比较,EBSS 组 SKOV3 细胞 LDHA mRNA、GLUT1 mRNA、LDHA 蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$),而 LDHB mRNA 相对表达量无显著性变化($P>0.05$);与 EBSS 组比较,EBSS+3-MA 组细胞 LDHA mRNA、GLUT1 mRNA、LDHA 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$),而 LDHB mRNA 相对表达量无显著性变化($P>0.05$);三组间细胞的

LDHA mRNA、GLUT1 mRNA、LDHA 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 311.400、66.940、154.200, $P<0.01$),表明饥饿上调了 LDHA 的表达,抑制自噬抑制饥饿对 LDHA 的上调表达,见图 3 和表 3。

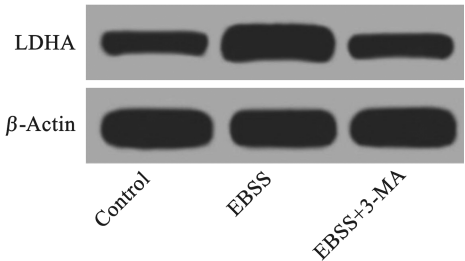


图 3 饥饿和自噬对卵巢癌细胞糖酵解关键酶 LDHA 表达水平的影响

Fig.3 Effects of starvation and autophagy on the expression levels of the key glycolytic enzyme LDHA in ovarian cancer cells

表 3 饥饿及自噬对卵巢癌细胞糖酵解关键酶活性的比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 3 Comparison of starvation and autophagy on the activities of key enzymes in glycolysis in ovarian cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	相对葡萄糖消耗量	乳酸生成量 (nmol/ 10^4 细胞)	LDHA mRNA 相对表达量	LDHB mRNA 相对表达量	GLUT1 mRNA 相对表达量	LDHA 蛋白 相对表达量
Control 组	1.00 $\pm$ 0.16	14.30 $\pm$ 1.20	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.10
EBSS 组	1.83 $\pm$ 0.18	23.70 $\pm$ 2.20	3.06 $\pm$ 0.22	1.17 $\pm$ 0.15	1.82 $\pm$ 0.14	2.48 $\pm$ 0.20
EBSS+3-MA 组	1.35 $\pm$ 0.11	17.80 $\pm$ 1.70	1.34 $\pm$ 0.10	1.14 $\pm$ 0.09	1.51 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.15
F	53.060	44.300	311.400	3.120	66.940	154.200
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.074	<0.001	<0.001
t_1	14.510	13.170	32.920	3.309	16.200	23.320
P_1	<0.001	<0.001	<0.001	0.081	<0.001	<0.001
t_2	6.119	4.904	5.433	2.725	10.080	4.254
P_2	0.002	0.009	0.004	0.165	<0.001	0.023
t_3	8.391	8.266	27.480	0.584	6.126	19.070
P_3	0.001	0.001	<0.001	0.911	0.002	<0.001

注: F 、 P 为 Control 组 *vs.* EBSS 组 *vs.* EBSS+3-MA 组; t_1 、 P_1 为 EBSS 组 *vs.* Control 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* Control 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+3-MA 组 *vs.* EBSS 组。

2.4 LDHA 和自噬对卵巢癌细胞糖酵解的影响

Western blotting 检测结果显示,与 NC-shRNA 组比较,LDHA-shRNA1 组和 LDHA-shRNA2 组 LDHA 蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$),三组间细胞的 LDHA 蛋白相对表达量比较,差异有统计

学意义($F=123.200$, $P<0.01$),见图 4、表 4。

进一步用 EBSS 对 SKOV3 细胞进行饥饿处理(诱导自噬)后结果显示,与 EBSS+NC-shRNA 组比较,EBSS+LDHA-shRNA1 和 EBSS+LDHA-shRNA2 组细胞的相对葡萄糖消耗量、乳酸生成量

显著降低($P<0.01$);三组间细胞的相对葡萄糖消耗量、乳酸生成量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 106.300、90.110, $P<0.01$),表明 LDHA 参与了饥饿及自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解,见表 5。

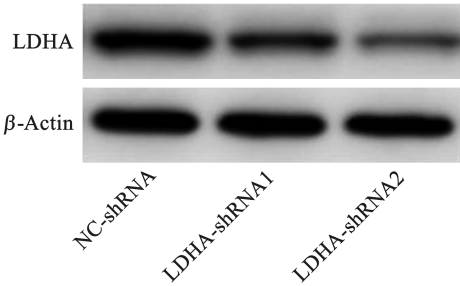


图 4 LDHA 和饥饿及自噬对卵巢癌细胞糖酵解的影响
Fig.4 Effects of LDHA,starvation and autophagyon glycolysis of ovarian cancer cells

表 4 LDHA 和饥饿及自噬对卵巢癌细胞糖酵解的 LDHA 蛋白相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 4 Comparison of LDHA and starvation and autophagy on the relative expression of LDHA protein in ovarian cancer cells under glycolysis ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	LDHA 蛋白相对表达量
NC-shRNA 组	1.00±0.13
LDHA-shRNA1 组	0.37±0.05
LDHA-shRNA2 组	0.34±0.03
F	123.200
P	<0.001
t_1	18.760
P_1	<0.001
t_2	19.650
P_2	<0.001
t_3	0.893
P_3	0.805

注: F 、 P 为 NC-shRNA 组 *vs.* LDHA-shRNA1 组 *vs.* LDHA-shRNA2 组; t_1 、 P_1 为 LDHA-shRNA1 组 *vs.* NC-shRNA 组; t_2 、 P_2 为 LDHA-shRNA2 组 *vs.* NC-shRNA 组; t_3 、 P_3 为 LDHA-shRNA2 组 *vs.* LDHA-shRNA1 组。

2.5 Wnt/ β -catenin 信号通路在卵巢癌细胞自噬中的作用

Western blotting 检测结果显示,与 Control 组比较,EBSS 组 SKOV3 细胞内 β -catenin、p- β -catenin 磷酸化相对表达量显著升高($P<0.01$);与 EBSS 组比较,EBSS+3-MA 组细胞 β -catenin、p- β -catenin

磷酸化相对表达量显著降低($P<0.01$);三组间细胞的 β -catenin、p- β -catenin 磷酸化相对表达量比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 206.500、222.200, $P<0.01$),表明饥饿诱导的自噬可以激活磷酸化的 β -catenin,抑制自噬可以抑制 β -catenin 的磷酸化,见图 5 和表 6。

表 5 LDHA 和饥饿及自噬对卵巢癌细胞糖酵解的相对葡萄糖消耗量、乳酸生成量的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 5 Comparison of LDHA and starvation and autophagy on the relative glucose consumption and lactate production of glycolysis in ovarian cancer cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	相对葡萄糖消耗量	乳酸生成量 (nmol/10 ⁴ 细胞)
EBSS+NC-shRNA 组	0.72±0.07	11.90±1.40
EBSS+LDHA-shRNA1 组	0.37±0.03	4.60±0.90
EBSS+LDHA-shRNA2 组	0.31±0.05	3.80±1.10
F	106.300	90.110
P	<0.001	<0.001
t_1	16.300	15.520
P_1	<0.001	<0.001
t_2	19.090	17.230
P_2	<0.001	<0.001
t_3	2.794	1.701
P_3	0.153	0.470

注: F 、 P 为 EBSS+NC-shRNA 组 *vs.* EBSS+LDHA-shRNA1 组 *vs.* EBSS+LDHA-shRNA2 组; t_1 、 P_1 为 EBSS+LDHA-shRNA1 组 *vs.* EBSS+NC-shRNA 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+LDHA-shRNA2 组 *vs.* EBSS+NC-shRNA 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+LDHA-shRNA2 组 *vs.* EBSS+LDHA-shRNA1 组。

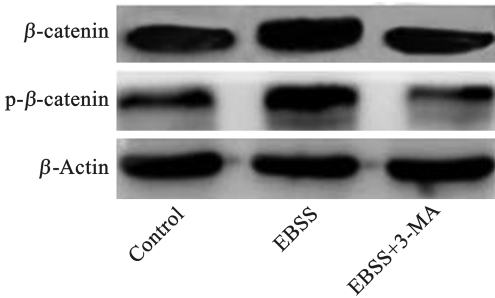


图 5 饥饿及自噬对卵巢癌细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Fig.5 Effects of starvation and autophagy on Wnt/ β -catenin signaling pathways in ovarian cancer cells

表 6 饥饿及自噬对卵巢癌细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路 β -catenin、p- β -catenin 磷酸化相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of starvation and autophagy on the phosphorylation of Wnt/ β -catenin signaling pathway β -catenin and p- β -catenin in ovarian cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	β -catenin 相对表达量	p- β -catenin 磷酸化 相对表达量
Control 组	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.11
EBSS 组	2.27 $\pm$ 0.18	1.94 $\pm$ 0.13
EBSS+3-MA 组	0.88 $\pm$ 0.07	0.76 $\pm$ 0.05
F	206.500	222.200
P	<0.001	<0.001
t_1	23.700	22.470
P_1	<0.001	<0.001
t_2	2.239	5.740
P_2	0.283	0.003
t_3	25.940	28.210
P_3	<0.001	<0.001

注: F 、 P 为 Control 组 vs. EBSS 组 vs. EBSS+3-MA 组; t_1 、 P_1 为 EBSS 组 vs. Control 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+3-MA 组 vs. Control 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+3-MA 组 vs. EBSS 组。

2.6 β -catenin 对饥饿和自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解的影响

Western blotting 检测结果显示,与 NC-shRNA 组比较, β -catenin-shRNA1 组和 β -catenin-shRNA2 组 SKOV3 细胞内 β -catenin 相对表达量显著降低 ($P<0.01$);三组间细胞的 β -catenin 相对表达量比较,差异有统计学意义 ($F=127.000, P<0.01$),见图 6、表 7。

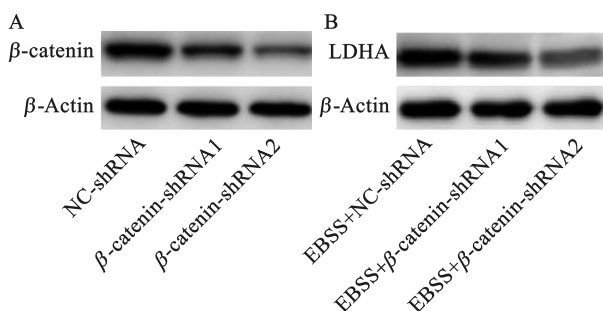


图 6 β -catenin 对饥饿和自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解的影响

Fig.6 Effects of β -catenin on glycolysis of ovarian cancer cells induced by starvation and autophagy

与 EBSS+NC-shRNA 组比较,EBSS+ β -catenin-shRNA1 组和 EBSS+ β -catenin-shRNA2 组 LDHA 蛋白相对表达量、相对葡萄糖消耗量及乳酸生成量均显著降低 ($P<0.01$),三组间细胞的 LDHA 蛋白

相对表达量、相对葡萄糖消耗量及乳酸生成量比较,差异均有统计学意义 (F 值分别为 153.600、128.300、50.530, $P<0.01$),表明 β -catenin 下调抑制饥饿及自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解,见图 6 和表 8。

表 7 β -catenin 对饥饿和自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解 β -catenin 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Comparison of the relative expression of β -catenin on starvation and autophagy-induced glycolysis β -catenin in ovarian cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	β -catenin 相对表达量
NC-shRNA 组	1.00 $\pm$ 0.13
β -catenin-shRNA1 组	0.53 $\pm$ 0.04
β -catenin-shRNA2 组	0.27 $\pm$ 0.03
F	127.000
P	<0.001
t_1	14.320
P_1	<0.001
t_2	22.240
P_2	<0.001
t_3	7.920
P_3	<0.001

注: F 、 P 为 NC-shRNA 组 vs. β -catenin-shRNA1 组 vs. β -catenin-shRNA2 组; t_1 、 P_1 为 β -catenin-shRNA1 组 vs. NC-shRNA 组; t_2 、 P_2 为 β -catenin-shRNA2 组 vs. NC-shRNA 组; t_3 、 P_3 为 β -catenin-shRNA2 组 vs. β -catenin-shRNA1 组。

表 8 β -catenin 对饥饿和自噬诱导的卵巢癌细胞糖酵解的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 8 Effects of β -catenin on glycolysis of ovarian cancer cells induced by starvation and autophagy ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LDHA 蛋白相对表达量	相对葡萄糖消耗量	乳酸生成量 (nmol/ 10^4 细胞)
EBSS+NC-shRNA 组	1.00 $\pm$ 0.11	0.61 $\pm$ 0.05	12.2 $\pm$ 1.8
EBSS+ β -catenin-shRNA1 组	0.42 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.03	6.4 $\pm$ 1.1
EBSS+ β -catenin-shRNA2 组	0.33 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.04	5.1 $\pm$ 0.8
F	153.600	128.300	50.530
P	<0.001	<0.001	<0.001
t_1	19.770	15.000	10.910
P_1	<0.001	<0.001	<0.001
t_2	22.830	22.200	13.350
P_2	<0.001	<0.001	<0.001
t_3	3.067	7.200	2.445
P_3	0.110	<0.001	0.227

注: F 、 P 为 EBSS+NC-shRNA 组 vs. EBSS+ β -catenin-shRNA1 组 vs. EBSS+ β -catenin-shRNA2 组; t_1 、 P_1 为 EBSS+ β -catenin-shRNA1 组 vs. EBSS+NC-shRNA 组; t_2 、 P_2 为 EBSS+ β -catenin-shRNA2 组 vs. EBSS+NC-shRNA 组; t_3 、 P_3 为 EBSS+ β -catenin-shRNA2 组 vs. EBSS+ β -catenin-shRNA1 组。

3 讨论

3.1 自噬对癌细胞行为的影响

由于过度的自我消耗可能对细胞有害,自噬由一系列称为 UNC-51 样激酶 1(UNC-51-like kinase 1,ULK1)和激酶 2(UNC-51-like kinase 2,ULK2)的蛋白因子控制,其与自噬相关基因 13(autophagy-related genes 13,ATG13)、自噬核心蛋白和 200kDa 家族相互作用蛋白形成复合物,在自噬起始中起关键作用。自噬主要受 AMPK 和雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin complex 1,mTORC1)信号通路的调控。当细胞处于营养剥夺或氧化应激状态时,AMPK 可激活自噬;相反,在营养丰富的条件下,mTORC1 通过降低 ULK1 的激活抑制自噬。高水平自噬可导致癌细胞死亡;因此诱导细胞高水平自噬是卵巢癌靶向治疗的潜在靶点^[10]。但另一方面,自噬对受损细胞器和 DNA 降解过程中的中间体可以为肿瘤细胞葡萄糖代谢、氨基酸代谢和脂质代谢提供底物,其能影响癌细胞的行为,包括在代谢恶劣环境条件下增强癌细胞生存、促进侵袭性生长、促进免疫逃逸和化疗耐药等。在卵巢癌中,癌细胞释放炎症因子激活肿瘤微环境中基质成纤维细胞、抑制免疫细胞对癌细胞的抗肿瘤杀伤活性;基质成纤维细胞和癌细胞释放自噬衍生的代谢物和底物,通过自分泌和旁分泌途径调节临近癌细胞的自噬水平和癌细胞行为^[11]。本研究显示,饥饿引起卵巢癌细胞上调自噬。

3.2 乳酸脱氢酶、癌细胞内糖酵解活性和癌细胞行为的相关性

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)是一种高活性糖酵解途径酶,属于 2-羟基酸氧化还原酶家族,其在氧化磷酸化向糖酵解的转换中起着关键作用。在丙酮酸转化为乳酸的过程中,要发生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(还原形式)(reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide,NADH)到烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(氧化形式)(oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide,NAD⁺)的再生,这对于正在进行的糖酵解是必不可少的,LDH 是这一再生过程的关键酶^[12]。LDH 是一种同源四聚体或异源四聚体分子,由两个 M 亚基(肌肉)和两个 H 亚基

(心脏)组成。ldha 基因编码 M 亚基,LDHA 基因编码 H 亚基。M 和 H 亚基组合形成 LDH1~LDH5 共五种同工酶^[13]。LDHA 在卵巢癌中表达上调并促进癌细胞增殖。下调 LDHA 抑制卵巢癌细胞增殖^[14]。LDHA 抑制剂可增敏卵巢癌细胞对 PARP 抑制剂的抗肿瘤活性^[15]。miR-383 通过靶向抑制 LDHA 的表达,抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭和有氧糖酵解^[16]。本研究显示,饥饿上调了 LDHA 的表达,并促进了卵巢癌细胞的侵袭和迁移能力。

MMP2 和 MMP9 是癌细胞侵袭、迁移和血管发生过程中的关键酶,负责降解基质成分,协助癌细胞从原位退出及进入新的微环境。与癌旁组织相比,人类恶性卵巢癌组织中转录调节剂巨核细胞性白血病因子 1(megakaryocytic leukemia 1,MKL1)的转录和表达水平升高,伴有 MMP2 表达水平也升高的现象。研究发现,MKL1 是 MMP2 的转录调节因子,在缺氧条件下负责促进 MMP2 及其活化相关因子的转录和表达,并赋予卵巢癌细胞侵袭和迁移能力^[17]。LncRNA TP73-AS1 通过上调 MMP2 和 MMP9,促进卵巢癌细胞增殖和恶性转移^[18]。Wnt/ β -catenin 信号通路在调节胚胎发育和生理过程中起重要作用。当该通路受到 Wnt 配体的刺激时, β -catenin 从其降解复合物中解离并易位到细胞核中,与 TCF/LEF 转录因子相互作用,激活下游靶基因的转录和表达。Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活,在子宫内膜样和黏液型上皮性卵巢癌中多有报道,并被证明在所有类型卵巢癌中促进癌症干细胞自我更新、转移及化疗耐药^[19]。Wnt/ β -catenin 是高级别浆液性低分化卵巢癌恶性转移的关键信号通路;性别决定区 Y-盒转录因子 9(SRY-box 9,SOX9)通过活化 Wnt/ β -catenin 信号通路进一步促进高级别浆液性卵巢癌的恶性转移^[20]。本研究显示,饥饿上调了磷酸化 β -catenin 的水平并激活 β -catenin。敲低 β -catenin 可下调 LDHA 的表达,并抑制乳酸生成。

总之,本研究发现饥饿激活卵巢癌细胞自噬,并促进其侵袭和迁移能力,增强糖酵解活性。与此同时,饥饿上调了 LDHA 的表达并磷酸化活化 β -catenin 信号,敲低 β -catenin 可下调 LDHA 的表达并抑制乳酸生成。本研究结果揭示了卵巢癌细胞自噬与糖代谢之间的联系,可能为卵巢癌治疗提供潜在的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Westrick A C, Bailey Z D, Schlumbrecht M. Residential segregation and overall survival of women with epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer*, 2020, 126(16): 3698-3707.
- [3] Ahmed N, Kadife E, Raza A, et al. Ovarian cancer, cancer stem cells and current treatment strategies: a potential role of magmas in the current treatment methods[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 719.
- [4] Schwartz L, Supuran C T, Alfarouk K O. The warburg effect and the hallmarks of cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(2): 164-170.
- [5] Miller D R, Thorburn A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 906-918.
- [6] Vallée A, Vallée J N, Lecarpentier Y. WNT/ β -catenin pathway: a possible link between hypertension and Alzheimer's disease[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2022, 24(10): 465-475.
- [7] Wu M Y, Wang E J, Feng D, et al. Pharmacological insights into autophagy modulation in autoimmune diseases[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021; 11(11): 3364-3378.
- [8] Wan W, Peng K, Li M, et al. Histone demethylase JMJD1A promotes urinary bladder cancer progression by enhancing glycolysis through coactivation of hypoxia inducible factor 1 α [J]. *Oncogene*, 2017; 36(27): 3868-3877.
- [9] Xiang J, Zhou L, He Y, et al. LDH-A inhibitors as remedies to enhance the anticancer effects of PARP inhibitors in ovarian cancer cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(24): 25920-25930.
- [10] Park M, Choe S, Shin M, et al. Potential therapeutic targets in ovarian cancer: autophagy and metabolism[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(3): 47.
- [11] Thuwajit C, Ferraresi A, Titone R, et al. The metabolic cross-talk between epithelial cancer cells and stromal fibroblasts in ovarian cancer progression: autophagy plays a role[J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(4): 1235-1254.
- [12] Koukourakis M I, Giatromanolaki A. Warburg effect, lactate dehydrogenase, and radio/chemo-therapy efficacy[J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(4): 408-426.
- [13] Laganá G, Barreca D, Calderaro A, et al. Lactate dehydrogenase inhibition: biochemical relevance and therapeutic potential[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(18): 3242-3252.
- [14] Qiu H, Jackson A L, Kilgore J E, et al. JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 6(9): 6915-6930.
- [15] Xiang J, Zhou L, He Y, et al. LDH-A inhibitors as remedies to enhance the anticancer effects of PARP inhibitors in ovarian cancer cells[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(24): 25920-25930.
- [16] Han R L, Wang F P, Zhang P A, et al. miR-383 inhibits ovarian cancer cell proliferation, invasion and aerobic glycolysis by targeting LDHA[J]. *Neoplasma*, 2017, 64(2): 244-252.
- [17] Xu W, Xu H, Fang M, et al. MKL1 links epigenetic activation of MMP2 to ovarian cancer cell migration and invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 487(3): 500-508.
- [18] Wang X, Yang B, She Y, et al. The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9): 7790-7799.
- [19] Nguyen V H L, Hough R, Bernaudo S, et al. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 122.
- [20] Niu H, Zhou W, Xu Y, et al. Silencing PPA1 inhibits human epithelial ovarian cancer metastasis by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017; 8(44): 76266-76278.

[专业责任编辑: 安瑞芳]

[中文编辑: 王 懿; 英文编辑: 李晓雪]