

# 谷氨酸脱氢酶在肝外胆管癌患者 肿瘤组织中的表达及其临床意义\*

侯建峰<sup>1a</sup>, 杨亚明<sup>2</sup>, 王莉<sup>2</sup>, 王莉<sup>1b</sup>

(1. 榆林市第一医院 a. 肝胆外科; b. 体检中心 B 超室, 陕西榆林 719000;

2. 宝鸡市第二中医医院内科, 陕西宝鸡 721300)

**摘要:**目的 探讨肝外胆管癌(ECC)患者肿瘤组织中谷氨酸脱氢酶(GLDH)的表达水平及其临床意义。方法 选取2005年1月~2015年12月于榆林市第一医院肝胆外科手术切除的160例ECC患者组织标本作为病例组,另选同期胆管正常组织标本30例作为对照组。采用免疫组织化学染色法检测GLDH表达情况,统计分析ECC患者肿瘤组织GLDH表达水平与临床病理特征及预后的相关性。结果 病例组GLDH低表达、中表达和高表达分别占28.1%(45/160),35.6%(57/160)和36.2%(58/160);对照组为73.3%(22/30),23.3%(7/30)和3.3%(1/30),两组比较差异具有统计学意义( $\chi^2=24.590$ ,  $P=0.000$ )。ECC患者肿瘤组织GLDH表达与患者年龄、CD34表达情况、细胞分化程度及有无神经浸润均密切相关( $\chi^2=12.145\sim158.075$ , 均 $P<0.05$ )。GLDH低表达、中表达、高表达ECC患者平均生存时间分别为44.3个月、26.0个月和11.6个月,3组生存曲线差异有统计学意义( $\chi^2=18.367$ ,  $P=0.001$ )。Cox多因素分析结果显示肿瘤组织GLDH高表达是ECC患者预后不良的独立危险因素( $HR=3.873$ , 95%CI 1.515~9.903,  $P=0.005$ )。结论 GLDH可能成为ECC患者预后的评价指标。

**关键词:**谷氨酸脱氢酶;肝外胆管癌;免疫组织化学;预后

**中图分类号:**R735.8;R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2018)06-013-05

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.004

## Expression and Clinical Significance of Glutamate Dehydrogenase in Tumor Tissues of Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma

HOU Jian-feng<sup>1a</sup>, YANG Ya-ming<sup>2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, WANG Li<sup>1b</sup> (1a. Department of

Hepatobiliary Surgery; 1b. B Ultrasonic Room of Health Inspection Center,

the First Hospital of Yulin City, Shaanxi Yulin 719000, China; 2. Department of Internal Medicine,

the Second Hospital of Traditional Chinese Medicine of Baoji City, Shaanxi Baoji 721300, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of glutamate dehydrogenase (GLDH) in tumor tissues in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma (ECC). **Methods** A total of 160 cases of ECC resections collected from January 2005 to December 2015 were recruited to participate in the study as the case group. Meanwhile, 30 samples of normal bile duct tissue were taken as the control. The expression of GLDH in 160 cases of ECC and 30 cases of normal bile duct tissue were detected by immunohistochemistry (IHC). Statistical analysis was used to analyze the correlation between GLDH and clinicopathological features and prognosis. **Results** Low, moderate and high expression rate of GLDH in case group were 28.1% (45/160), 35.6% (57/160) and 36.2% (58/160), respectively, and in control group, they were 73.3% (22/30), 23.3% (7/30) and 3.3% (1/30), respectively. The difference was statistically significant. GLDH expression level was correlated to patient age, CD34 expression, cellular differentiation and neural invasion in ECC tissues ( $\chi^2=12.145\sim158.075$ , all  $P<0.05$ ). Mean survival time of low, moderate and high GLDH expression in case group were 44.3 months, 26.0 months and 11.6 months, respectively. Log-rank test showed highly significant differences in overall survival between different GLDH expression ( $\chi^2=18.367$ ,  $P=0.001$ ). Cox multivariate analysis showed that high GLDH expression was independently associated with ECC poor prognosis ( $HR=3.873$ , 95%CI: 1.515~9.903,  $P=0.005$ ). **Conclusion** GLDH may be an important prognostic indicator of ECC.

**Keywords:** glutamate dehydrogenase; extrahepatic cholangiocarcinoma; immunohistochemistry; prognosis

肝外胆管癌(extrahepatic cholangiocarcinoma, ECC)是一种原发于肝外胆管上皮的恶性肿瘤,是常见的胆道梗阻性疾病之一,手术切除率低,

一般预后较差<sup>[1,2]</sup>。谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GLDH)主要分布于肝细胞,正常情况下GLDH表达水平很低,在肝脏疾病尤其涉及

\* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(2012JQ4016)。

作者简介:侯建峰(1976—),男,本科,副主任医师,研究方向:肝胆外科基础研究和临床治疗, E-mail: yulinhoujiefeng@163.com。

通讯作者:王莉,女,本科,主治医师,榆林市第一医院体检中心, E-mail: 916027091@qq.com。

肝细胞线粒体损害时其表达水平及活性显著升高<sup>[3]</sup>。目前研究认为 GLDH 在谷胱甘肽生成中起着关键作用,是维持细胞氧化还原平衡的重要分子,与肿瘤细胞的生长和增殖密切相关<sup>[4~6]</sup>。本研究观察 160 例 ECC 患者肿瘤组织 GLDH 表达情况,比较不同表达水平患者平均生存时间,旨在讨论 ECC 患者肿瘤组织 GLDH 表达与患者临床病理特征及预后的关系,为临床提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 经我院伦理委员会批准,收集 2005 年 1 月~2015 年 12 月于我科手术切除治疗的 160 例 ECC 患者纳入研究作为病例组,所有患者均在未进行化疗及放疗之前经病理切片确诊,其中男性 110 例,女性 50 例,年龄 37~69 岁,平均年龄 63 岁。其中肿瘤表达 CD34+ 患者 60 例,CD34- 表达 100 例;病理分级,高分化腺癌 60 例,中分化腺癌 52 例,低分化腺癌 48 例;肉眼及病理切片可见血管血栓 29 例,血管侵犯 131 例;淋巴结转移 51 例,无淋巴结转移 109 例,包膜及神经侵犯 55 例,无神经侵犯 105 例。选择同期胆管正常组织标本 30 例作为对照,均经病理确诊无癌细胞浸润。

1.2 试剂和仪器 罗氏 Bench Mark XT 免疫组化染色机(瑞士 Ventana 公司),普通光学显微镜(日本尼康),相关试剂及 GLDH 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruze 公司)。

## 1.3 方法

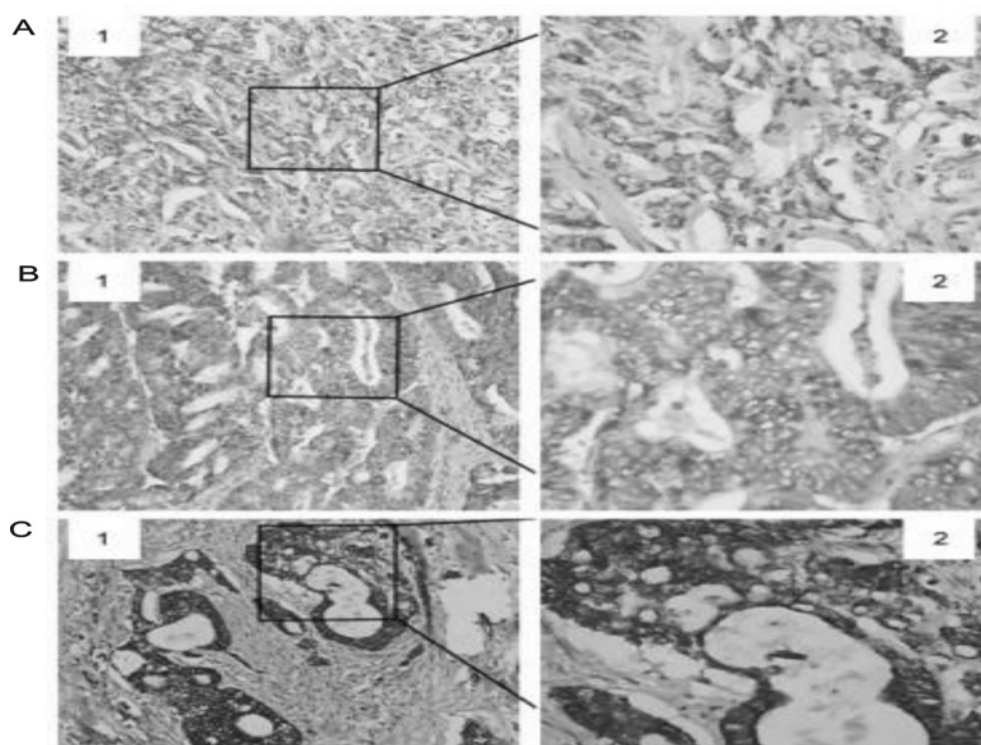
1.3.1 免疫组织化学检测 GLDH 表达水平:所有标本由 10 g/dl 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,5 mm 切片,采用免疫组织化学 EnVision 二步法检测 GLDH 表达情况。阳性细胞计数评分方法:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞<10%为 1 分,阳性细胞 10%~35%为 2 分,阳性细胞 35%~70%为 3 分,阳性细胞数>70%为 4 分。染色强度评分方法:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色或深黄色为 2 分,棕色或棕褐色为 3 分。将阳性细胞计数评分与染色强度评分相乘,0 分为阴性(-),≥1 分为阳性,其中 1~3 分为低表达(+),4~7 分为中表达,8~12 分为高表达。

1.3.2 随访:所有患者均接受规范化随访,后续检查包括腹部超声,X 线胸片,肝功能试验,血清 CA199 和 CEA 水平监测。手术后前两年每隔 2 月检查 1 次,之后每 3 个月检查 1 次。术后每 6 个月进行对比增强 CT 或 MRI 检查。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计软件对所有数据进行统计分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验;采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验评估对比分析存活概率。采用 Cox 比例风险模型进行单因素及多因素变量分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 GLDH 在 ECC 患者肿瘤组织中表达情况见图 1。



(1. 放大 200 倍;2. 放大 400 倍)A:GLDH 低表达;B:GLDH 中表达;C:GLDH 高表达

图 1 免疫组化染色 GLDH 在癌旁组织及癌组织中的表达

GLDH 表达主要位于细胞浆和细胞膜上,在 ECC 组织中 GLDH 染色呈斑片状或弥漫性分布,正常胆管组织中 GLDH 染色呈点状分布。本研究所有 ECC 组织标本及正常胆管组织标本未见阴性表达。160 例 ECC 患者肿瘤组织标本 GLDH 低表达、中表达和高表达分别有 45 例(28.1%),57 例(35.6%)和 58 例(36.3%);30 例对照胆管组织标本 GLDH 低表达、中表达和高表达分别有 22 例(73.3%),7 例(23.3%)和 1 例(3.3%),两组比较

差异具有统计学意义( $\chi^2=24.590, P=0.000$ )。

2.2 GLDH 表达与 ECC 患者临床病理特征的相关性 见表 1。肿瘤组织 GLDH 表达强度与 ECC 患者年龄、CD34 表达情况、细胞分化程度及有无神经浸润均密切相关( $\chi^2=12.145\sim158.075$ ,均  $P<0.05$ ),与患者性别、有无包膜侵犯、有无血管侵犯及有无淋巴转移无明确相关性( $\chi^2=0.832\sim2.319$ ,均  $P>0.05$ )。

表 1 GLDH 表达与 ECC 患者临床病理特征的相关性[n(%)]

项 目		n	GLDH 染色强度			$\chi^2$	P
			低表达(n=45)	中表达(n=57)	高表达(n=58)		
年龄(岁)	<50	20	9(45.0)	5(25.0)	6(30.0)	47.023	0.000
	50~59	41	24(58.5)	6(14.6)	11(26.8)		
	60~69	61	8(13.1)	35(57.4)	18(29.5)		
	>70	38	4(10.5)	11(28.9)	23(60.5)		
性别	男	110	33(30.0)	37(33.6)	40(36.4)	0.832	0.660
	女	50	12(24.0%)	20(40.0)	18(36.0)		
CD34	+	60	12(20.0)	16(26.7)	32(53.3)	12.145	0.002
	-	100	33(33.0)	41(41.0)	26(26.0)		
细胞分化	高度	60	41(68.3)	18(30.0)	1(1.7)	158.075	0.000
	中度	52	4(7.7)	37(71.2)	11(21.2)		
	低度	48	0(0.0)	2(4.2)	46(95.8)		
包膜侵犯	+	110	28(25.4)	39(35.4)	43(39.1)	1.679	0.432
	-	50	17(34.0)	18(36.0)	15(30.0)		
血管侵犯	+	29	6(20.7)	9(31.0)	14(48.3)	2.319	0.314
	-	131	39(29.8)	48(36.6)	44(33.6)		
淋巴转移	+	51	11(21.6)	20(39.2)	20(39.2)	1.597	0.450
	-	109	34(31.2)	37(33.9)	38(34.9)		
神经浸润	+	55	8(14.5)	17(30.9)	30(54.5)	13.757	0.001
	-	105	37(35.2)	40(38.1)	28(26.7)		

2.2 GLDH 表达与 ECC 患者预后的关系 见图 2。绘制各主要参数 Kaplan-Meier 曲线,肿瘤组织 GLDH 低表达、中表达、高表达患者的平均生存时间分别为 44.3 个月,26.0 个月和 11.6 个月,Log-rank 检验提示 3 组生存曲线差异存在统计学意义( $\chi^2=18.367, P=0.001$ )。另外,患者发病年龄、CD34 表达、细胞分化程度、包膜侵犯及神经浸润

等参数也同患者生存时间密切相关( $\chi^2=12.684\sim38.670$ ,均  $P<0.05$ )。进一步采用 Cox 比例风险模型对单因素分析  $P<0.05$  的参数进行多因素分析,结果显示肿瘤组织 GLDH 高表达、CD34 阳性、神经浸润和细胞分化程度低均是 ECC 患者预后不良的独立危险因素(HR=2.022~11.647,均  $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 多变量 Cox 比例风险模型分析结果

参 数	B	SE	Wald	P	HR(95%CI)
GLDH	1.354	0.479	7.991	0.005	3.873(1.515~9.903)
CD34	0.704	0.203	12.018	0.001	2.022(1.358~3.011)
神经浸润	0.936	0.244	14.724	0.000	2.551(1.581~4.117)
细胞分化	2.455	0.813	9.114	0.000	11.647(2.366~57.336)

3 讨论 越来越多研究证据表明, GLDH 作为谷氨酰胺代谢的关键酶, 在肿瘤生长和转移过程中发挥关键作用, GLDH 可将谷氨酰胺分解生成 ATP, 支持肿瘤细胞生长, 并通过合成谷胱甘肽减轻肿瘤

细胞的氧化应激反应<sup>[4~7]</sup>。还有研究发现多种致癌基因和肿瘤抑制剂, 包括 p53, 人乙酰化酶 4, 雷帕霉素靶蛋白复合体 1 等也通过参与谷氨酰胺代谢调控过程发挥作用<sup>[8~10]</sup>。

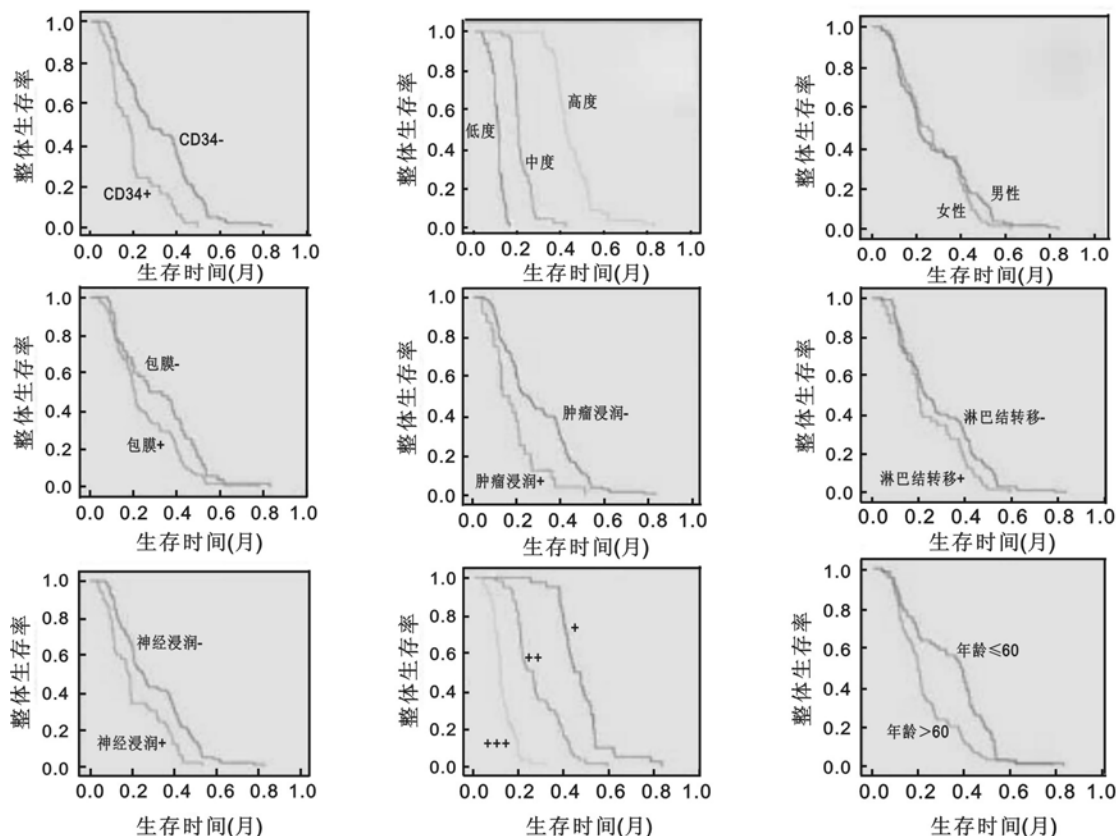


图2 各参数 Kaplan-Meier 曲线

目前, GLDH 已成为癌症治疗研究的热门作用靶点, 多项研究结果显示, GLDH 抑制剂可通过降低 GLDH 活性, 抑制癌细胞增殖和肿瘤的生长<sup>[11,12]</sup>。近年来, 相继有研究证实 GLDH 参与肝癌、胶质瘤、结直肠癌等多种肿瘤疾病发生发展的病理生理过程<sup>[13,14]</sup>。因此, 鉴于 GLDH 在肝胆组织中分布及活性远高于机体其他器官, 笔者认为有理由推测 ECC 患者肿瘤组织 GLDH 表达与疾病进展相关。

本研究采用免疫组织化学方法检测 160 例 ECC 肿瘤组织及 30 例胆管正常组织 GLDH 表达情况, 研究显示, 与正常胆管组织相比, GLDH 在 ECC 组织中呈明显高表达趋势。肿瘤组织 GLDH 表达强度与 ECC 患者年龄、CD34 表达情况、细胞分化程度及有无神经浸润均密切相关, 而与患者性别、有无包膜侵犯、有无血管侵犯及有无淋巴转移无明确相关性。同时, 本研究分析比较肿瘤组织 GLDH 不同表达水平患者术后预后情况, 结果显示 GLDH 低表达、中表达、高表达患者生存曲线差异存在统计学意义, GLDH 高表达患者平均生存

时间显著降低。进一步 Cox 多因素分析结果显示肿瘤组织 GLDH 高表达是 ECC 患者预后不良的独立危险因素。

综上所述, ECC 患者肿瘤组织 GLDH 表达显著增高, 可能是 ECC 手术患者的一个重要预后指标。GLDH 有望成为 ECC 治疗的新靶点, 期待更多研究进一步证实。

#### 参考文献:

- [1] Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, et al. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Cancer, 2016, 122(9): 1349-1369.
- [2] 肖小平, 郭玲, 张熊. 胆管癌组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达的临床应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 79-81.  
Xiao XP, Guo L, Zhang X. Clinical application of the expression of LOXL2 mRNA and tenascin-C mRNA in tissues of the bile duct cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 79-81.
- [3] 易婷婷, 罗光成, 胡帅, 等. 血浆谷氨酸脱氢酶活性测定在肝胆疾病中的临床应用评价 (下转 20 页)

- [J]. 川北医学院学报, 2016, 31(4): 532-534.
- Yi TT, Luo GC, Hu S, et al. The clinical significance of plasma GLDH activity in patients with liver disease [J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2016, 31(4): 532-534.
- [4] Jin L, Li D, Alesi GN, et al. Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth [J]. Cancer Cell, 2015, 27(2): 257-270.
- [5] Nissen JD, Pajicka K, Stridh MH, et al. Dysfunctional TCA-Cycle metabolism in glutamate dehydrogenase deficient astrocytes [J]. Glia, 2015, 63(12): 2313-2326.
- [6] McKenna MC, Stridh MH, McNair LF, et al. Glutamate oxidation in astrocytes: roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases [J]. J Neurosci Res, 2016, 94(12): 1561-1571.
- [7] Pajicka K, Nissen JD, Stridh MH, et al. Glucose replaces glutamate as energy substrate to fuel glutamate uptake in glutamate dehydrogenase-deficient astrocytes [J]. J Neurosci Res, 2015, 93(7): 1093-1100.
- [8] Csibi A, Lee G, Yoon SO, et al. The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc, translation [J]. Curr Biol, 2014, 24(19): 2274-2280.
- [9] Jeong SM, Xiao C, Finley LW, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism [J]. Cancer Cell, 2013, 23(4): 450-463.
- [10] Son J, Lyssiotis CA, Ying HQ, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway [J]. Nature, 2013, 496(7443): 101-105.
- [11] Khan N, Bharali DJ, Adhami VM, et al. Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 415-423.
- [12] Shukla R, Chanda N, Zambre A, et al. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (<sup>198</sup>AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(31): 12426-12431.
- [13] Yang LF, Moss T, Mangala LS, et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer [J]. Mol Syst Biol, 2014, 10(5): 728.
- [14] Chen R, Nishimura MC, Kharbanda S, et al. Humanoid-specific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(39): 14217-14222.