

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.12.1384

• 短篇论著 •

醛酮还原酶 1-A1 在肝门部胆管癌中的表达及临床意义

詹榆¹, 俞文隆², 于观贞³, 李文峰^{1*}

1. 温州医科大学附属第一医院放疗科, 温州 325000

2. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院肝胆二科, 上海 200438

3. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032

[摘要] **目的** 探讨醛酮还原酶 1-A1 (AKR1A1) 在肝门部胆管癌组织中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组织化学法检测手术切除的 49 例肝门部胆管癌及癌旁组织(距离癌组织边缘至少 2 cm)中的 AKR1A1 表达水平, 采用 χ^2 检验分析二者 AKR1A1 表达水平的相关性及与患者临床病理特征的关系。**结果** 肝门部胆管癌组织的 AKR1A1 高表达率为 59.2% (29/49), 高于癌旁组织 (25.0%, 3/12), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AKR1A1 在肝门部胆管癌组织中的表达与肿瘤大小和淋巴结转移有关 ($P = 0.028, 0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析显示, AKR1A1 高表达患者的总生存期中位数为 15 个月, 短于低表达者 (39 个月, $P = 0.012$); AKR1A1 高表达患者的无进展生存期中位数为 15 个月, 短于低表达者 (32 个月, $P = 0.022$)。多因素分析结果提示浸润深度是肝门部胆管癌患者总生存期和无进展生存期的独立预测因素 [比值比 (OR) 为 0.174, 95% 置信区间 (CI): 0.041~0.741, $P = 0.018$; OR 为 0.083, 95% CI: 0.011~0.618, $P = 0.015$]。**结论** AKR1A1 参与肝门部胆管癌的进展和转移, 有望成为预测胆管癌患者复发和预后的潜在生物学分子标志物。

[关键词] 醛酮还原酶 1-A1; 肝门部胆管癌; 免疫组织化学; 预后

[中图分类号] R 735.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)12-1384-05

Expression and clinical significance of aldo-keto reductase 1-A1 in hilar cholangiocarcinoma

ZHAN Yu¹, YU Wen-long², YU Guan-zhen³, LI Wen-feng^{1*}

1. Department of Radiotherapy and Chemotherapy, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

2. Department of Hepatobiliary (II), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

3. Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression and clinical significance of aldo-keto reductase 1-A1 (AKR1A1) in hilar cholangiocarcinoma tissues. **Methods** Immunohistochemical assay was used to detect the expression of AKR1A1 in 49 hilar cholangiocarcinoma and adjacent normal tissues (at least 2 cm from the edge of the tumor). The correlation between the AKR1A1 expression and clinical variables of hilar cholangiocarcinoma patients was analyzed by χ^2 test. **Results** The high-expression rate of AKR1A1 in cancer tissues was 59.2% (29/49), which was significantly higher than that in matched adjacent normal tissues (25.0% [3/12], $P < 0.05$). We also noticed that the high-expression of AKR1A1 in hilar cholangiocarcinoma patients tissues was associated with tumor size ($P = 0.028$) and lymph node metastasis ($P = 0.001$). Survival analysis showed that the overall survival (median 15 months vs 39 months, $P = 0.012$) and progression free survival (median 15 months vs 32 months, $P = 0.022$) of AKR1A1-high-expression patients were significantly shorter compared with the low-expression patients. Multivariate analysis showed that the depth of invasion was associated with overall survival (odds ratio [OR] 0.174, 95% confidence interval [CI] 0.041-0.741, $P = 0.018$) and progression free survival (OR 0.083, 95% CI 0.011-0.618, $P = 0.015$). **Conclusion** AKR1A1 is involved in the progression and metastasis of hilar cholangiocarcinoma, suggesting that it might be a potential biomarker for predicting tumor recurrence and prognosis of patients with hilar cholangiocarcinoma.

[Key words] aldo-keto reductase 1-A1; hilar cholangiocarcinoma; immunohistochemistry; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1384-1388]

[收稿日期] 2019-02-04 **[接受日期]** 2019-07-01

[基金项目] 国家自然科学基金(81572856). Supported by National Natural Science Foundation of China (81572856).

[作者简介] 詹榆, 硕士生. E-mail: 363622295@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0577-88069316, E-mail: lwf720325@foxmail.com

肝门部胆管癌是胆道系统常见的恶性肿瘤, 发生率逐年升高, 约占胆管癌的 2/3, 且多数患者确诊晚、预后差^[1], 因此一直是临床上疾病治疗的难题之一。尽管手术切除对肝门部胆管癌患者生存率有所改善, 但患者 5 年生存率仍不高, 中位生存期仅为 1~2 年^[1-2]。早期诊断有助于提高肝门部胆管癌患者的生存率。近年来, 随着对分子生物学研究及应用的不断深入, 不少生物学家已成为肿瘤诊断和预后的标志物^[3-4]。研究发现醛酮还原酶家族 (aldo-keto reductase, AKR) 成员醛酮还原酶 1-A1 (aldo-keto reductase 1-A1, AKR1A1) 参与了肺癌^[5]、乳腺癌^[6]和肝癌^[7]等的代谢过程, 与肿瘤发生、发展有关, 但其在肝门部胆管癌中的作用罕见报道。本研究拟探讨人肝门部胆管癌中 AKR1A1 的表达及其临床意义。

1 资料和方法

1.1 研究资料 收集 2003 年至 2013 年于温州医科大学附属第一医院和海军军医大学 (第二军医大学) 东方肝胆外科医院接受肝门部胆管癌手术切除治疗的 49 例患者的临床资料、肝门部胆管癌组织标本和相应的癌旁非肿瘤组织标本 (距离癌组织边缘至少 2 cm)。49 例患者中, 男 35 例、女 14 例, 中位年龄为 55 (31~79) 岁。根据美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 肝门部胆管癌 TNM 分期 (第 8 版) 分级标准^[8]行病理分期。所有患者均有完整的随访资料。

1.2 免疫组织化学染色 49 对癌组织和癌旁组织标本均用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 行 4 μm 厚连续切片。石蜡切片放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤 1 h 后, 转至室温下常规二甲苯 10 min \times 3 次脱蜡, 经无水乙醇 10 min、95% 乙醇 5 min、88% 乙醇 5 min、75% 乙醇 5 min、流水 5 min 梯度脱水。行柠檬酸盐缓冲液高压修复, 3% 过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶。山羊血清室温封闭 10 min 后用 1:200 比例稀释的一抗 (兔抗人 AKR1A1 单克隆抗体, 货号 sc374204, 美国 Santa Cruz 公司) 标记, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。磷酸盐缓冲液洗 3 min \times 3 次, 用生物素标记的二抗室温孵育 10 min, 再经磷酸盐缓冲液洗 3 min \times 3 次, 加链霉素抗生素-过氧化物酶溶液室温孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液洗脱后经二氨基联

苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色。流水 5 min 后浸苏木精中复染 1 min, 清水冲洗后磷酸盐缓冲液返蓝, 于显微镜下观察。

1.3 结果判定 AKR1A1 阳性着色呈现褐色或深棕色, 主要位于细胞核。评判采用二级计分法^[4]: 按照阳性细胞染色强度, 无着色记 0 分, 淡黄色记 1 分, 棕黄色记 2 分, 深褐色记 3 分; 按阳性细胞占总计数细胞的百分比, $\leq 5\%$ 记 0 分, 6%~25% 记 1 分, 26%~50% 记 2 分, 51%~75% 记 3 分, $\geq 76\%$ 记 4 分。每张切片的染色强度与阳性细胞占总计数细胞百分比得分的乘积 < 1 为低表达, ≥ 1 为高表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。肿瘤患者生存期分析采用 Kaplan-Meier 生存分析, 预后影响因素分析采用多因素回归分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 AKR1A1 在肝门部胆管癌和癌旁组织中的表达 AKR1A1 染色主要位于肝门部胆管癌细胞核内, 呈棕褐色。49 例肝门部胆管癌组织中, AKR1A1 高表达率为 59.2% (29/49), 癌旁组织中高表达率为 25.0% (3/12), 二者差异有统计学意义 ($P=0.044$)。见图 1。

2.2 AKR1A1 表达与肝门部胆管癌患者临床病理特征的关系 AKR1A1 在肝门部胆管癌组织中的表达与患者年龄、性别及肿瘤的神经侵犯、浸润深度、TNM 分期均无明显关联 (P 均 > 0.05), 而与肿瘤大小和淋巴结转移有关 ($P=0.028$ 、 $P=0.001$)。见表 1。

2.3 AKR1A1 表达与肝门部胆管癌患者预后的关系 Kaplan-Meier 生存分析显示, AKR1A1 高表达患者的总生存期中位数为 15 个月, 短于低表达者 (中位数 39 个月), 差异有统计学意义 ($P=0.012$), 且 AKR1A1 高表达患者的无进展生存期 (中位数 15 个月) 也短于低表达者 (中位数 32 个月), 差异有统计学意义 ($P=0.022$)。

2.4 预后影响因素的多因素分析 对肝门部胆管癌患者总生存期和无进展生存期的影响因素进行多因素分析, 结果显示肿瘤浸润深度是肝门部胆管癌患者总生存期和无进展生存期的独立预测因素 (P 均 < 0.05 , 表 2)。

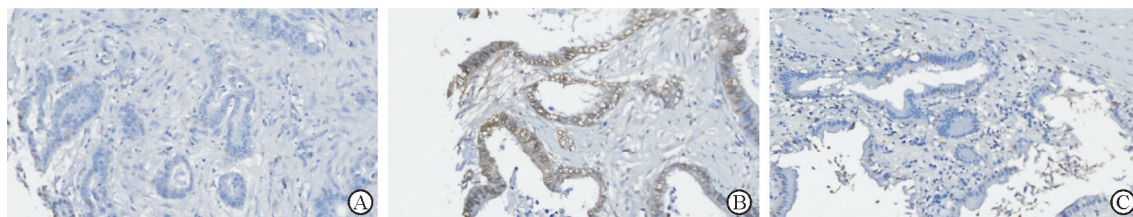


图1 AKR1A1在肝门部胆管癌和癌旁组织中的表达

A: AKR1A1在癌旁组织中的表达; B: AKR1A1在肝门部胆管癌组织中高表达; C: AKR1A1在肝门部胆管癌组织中低表达. AKR1A1: 醛酮还原酶 1-A1. 免疫组织化学染色. Original magnification: ×100

表1 AKR1A1表达与肝门部胆管癌患者临床病理特征的关系

临床病理参数	N	AKR1A1 低表达	AKR1A1 高表达	χ^2 值	<i>n</i> (%) P 值
年龄 (岁)				0.214	0.644
> 55	24	9 (37.5)	15 (62.5)		
≤ 55	25	11 (44.0)	14 (56.0)		
性别				0.033	0.854
男	35	14 (40.0)	21 (60.0)		
女	14	6 (42.9)	8 (57.1)		
肿瘤大小 <i>V</i> /cm ³				4.851	0.028
≤ 3	18	11 (61.1)	7 (38.9)		
> 3	31	9 (29.0)	22 (71.0)		
神经侵犯				1.934	0.721
无	26	13 (50.0)	13 (50.0)		
有	23	7 (30.0)	16 (70.0)		
浸润深度				0.901	0.342
浆膜层	7	4 (57.1)	3 (42.9)		
浆膜外	42	16 (38.1)	26 (61.9)		
淋巴结转移				11.49	0.001
无	16	12 (75.0)	4 (25.0)		
有	33	8 (24.2)	25 (75.8)		
TNM 分期				2.814	0.093
I ~ II	20	11 (55.0)	9 (45.0)		
III ~ IV	29	9 (31.0)	20 (69.0)		

AKR1A1: 醛酮还原酶 1-A1

表2 肝门部胆管癌患者总生存期和无进展生存期影响因素的多因素分析

变量	总生存期				无进展生存期			
	<i>B</i>	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	OR (95% CI)	<i>B</i>	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	OR (95% CI)
浸润深度(浆膜层 vs 浆膜外)	-1.748	5.596	0.018	0.174 (0.041, 0.741)	-2.493	5.903	0.015	0.083 (0.011, 0.618)
淋巴结转移(有转移 vs 无转移)	-0.739	2.405	0.121	0.477 (0.188, 1.215)	-0.676	1.967	0.509	0.509 (0.198, 1.308)
AKR1A1 (阳性 vs 阴性)	-0.299	0.441	0.507	0.742 (0.307, 1.792)	-0.558	1.307	0.572	0.572 (0.220, 1.490)

AKR1A1: 醛酮还原酶 1-A1; *B*: 回归系数; OR: 比值比; CI: 置信区间

3 讨论

AKR 主要通过以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 作为其辅酶参与氧化还原反应。作为 AKR 成员之一, AKR1A1 是醛还原酶, 定位于人类染色体 1p33→p32^[9], 参与催化体内醛类化合物代谢过程, 具有重要的生物学作用。研究证明 AKR1A1 参与不同肿瘤的生物代谢过程, 例如 AKR1A1 参与丙酮醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮解毒作用, 介导大鼠肝脏中糖基化反应过程二羰基化合物的产生^[9], 而体内醛水平增高与肿瘤发生有关; AKR1A1 是有效的突变诱变剂, 能激活多环芳香烃, 参与肺癌氧化还原循环中 G→T 颠换突变的发生^[5]; AKR1A1 在星形胶质细胞瘤中起到抗氧化应激作用^[10]。已有研究证明, AKR1A1 在多种肿瘤内稳定表达^[11], 但因不同肿瘤的发生机制不同其表达水平也有差异, 在肝癌、肺癌和乳腺癌中高表达, 但与脑胶质细胞瘤发生关联不大^[5-7,12-13]。在乳腺癌相关研究中发现, 治疗后肿瘤组织的 AKR1A1 表达水平高于正常组织, 推测 AKR1A1 可能在化学治疗中具有预后预测价值^[13]。以上证据均表明, AKR1A1 与肿瘤发生及预后存在一定关系, 但 AKR1A1 与肝门部胆管癌的研究少见。

本研究采用免疫组织化学染色法检测肝门部胆管癌及其癌旁组织中的 AKR1A1 表达情况, 结果显示 AKR1A1 在肝门部胆管癌中的表达率 (59.2%, 29/49) 远高于癌旁正常组织 (25.0%, 3/12), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 AKR1A1 表达与肿瘤大小和淋巴结转移有关, 肿瘤较大、有淋巴结转移提示肝门部胆管癌恶性程度较高, AKR1A 表达水平也较高。上述结果提示 AKR1A1 可能是肝门部胆管癌的促癌基因, 参与了肝门部胆管癌的进展和转移。本研究还发现, AKR1A1 高表达的肝门部胆管癌患者总生存期和无进展生存期均短于 AKR1A1 低表达者的生存期 (中位数 15 个月 vs 39 个月, 中位数 15 个月 vs 32 个月), 表明 AKR1A1 高表达的肝门部胆管癌患者预后较差。据此, 我们推测 AKR1A1 可能是肝门部胆管癌预后的一个分子标志物。单因素生存分析中, AKR1A1 表达与肝门部

胆管癌患者预后有关, 但多因素分析仅显示肿瘤浸润深度是肝门部胆管癌患者的独立预后因素, 可能与本研究样本量小有关, 后续研究将加大样本量进一步评估 AKR1A1 预测胆管癌复发和预后的价值。

目前, 手术治疗仍是肝门部胆管癌的主要治疗手段, 手术治疗的 5 年生存率为 45%, 排除晚期肿瘤 (ⅢB 期或更高) 后可升高至为 65%^[14-15], 因此早期发现、早期治疗对于提高肝门部胆管癌患者的生存率及改善预后均有重要意义。然而临床上肝门部胆管癌大多诊断难、发现晚, 尚缺乏有效的生物学分子标志物。本研究提示 AKR1A1 高表达的肝门部胆管癌患者预后较差。此外, 有研究证明肝门部胆管癌患者术后配合放射和 (或) 化学治疗能令患者临床获益^[16]。通过 AKR1A1 的临床应用及靶向治疗可能有助于肝门部胆管癌患者预后的有效评估和早期干预。

综上所述, AKR1A1 在肝门部胆管癌中的表达与肿瘤大小和淋巴结浸润有关, 且与肿瘤术后预后相关, 其可能在肝门部胆管癌发生、发展中具有重要作用, 并有望成为肝门部胆管癌患者复发和预后预测标志物。

[参考文献]

- [1] DARWISH MURAD S, KIM W R, THERNEAU T, GORES G J, ROSEN C B, MARTENSON J A, et al. Predictors of pretransplant dropout and posttransplant recurrence in patients with perihilar cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 56: 972-981.
- [2] HAMEED A, PANG T, CHIOU J, PLEASS H, LAM V, HOLLANDS M, et al. Percutaneous vs. endoscopic pre-operative biliary drainage in hilar cholangiocarcinoma—a systematic review and meta-analysis[J]. *HPB (Oxford)*, 2016, 18: 400-410.
- [3] 朱童, 胡学谦, 汪妍, 于观贞, 王杰军. Latexin 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 20: 1006-1009.
- [4] 吴成利, 王咏梅, 王革芳, 于观贞, 王杰军. 乙醛脱氢酶 1A1 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19: 992-995.
- [5] PENNING T M. Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 1901-1917.
- [6] HOFMAN J, SKARKA A, HAVRANKOVA J, WSOL V. Pharmacokinetic interactions of breast cancer

- chemotherapeutics with human doxorubicin reductases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96: 168-178.
- [7] ALZEER S, ELLIS E M. Metabolism of gamma hydroxybutyrate in human hepatoma HepG2 cells by the aldo-keto reductase AKR1A1[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92: 499-505.
- [8] 毛谅,陈骏,孙士全,王可欣,仇毓东. 美国癌症联合委员会肝门部胆管癌分期系统(第8版)更新解读[J]. *中国实用外科杂志*, 2017, 37: 510-513.
- [9] FUJII J, HAMAOKA R, MATSUMOTO A, FUJII T, YAMAGUCHI Y, EGASHIRA M, et al. The structural organization of the human aldehyde reductase gene, AKR1A1, and mapping to chromosome 1p33→p32[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 84(3/4): 230-232.
- [10] 李丹,张岐山,周立娜,刘融. 敲减 *AKR1A1* 基因对 H_2O_2 及 4-羟基壬烯醛诱导的 1321N1 脑星形细胞瘤细胞损伤的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29: 273-276.
- [11] ZHANG S, WEN B, ZHOU B, YANG L, CHA C, XU S, et al. Quantitative analysis of the human AKR family members in cancer cell lines using the mTRAQ/MRM approach[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12: 2022-2033.
- [12] ALZEER S, ELLIS E M. The role of aldehyde reductase AKR1A1 in the metabolism of γ -hydroxybutyrate in 1321N1 human astrocytoma cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 191(1/2/3): 303-307.
- [13] HLAVÁČ V, BRYNYCHOVÁ V, VÁCLAVÍKOVÁ R, EHRlichOVÁ M, VRÁNA D, PECHA V, et al. The role of cytochromes p450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93: e255. doi: 10.1097/MD.0000000000000255.
- [14] KOIZUMI N, NAKASE Y, KOBAYASHI H, TAKAGI T, FUKUMOTO K. [A case of peritoneal dissemination of hilar cholangiocarcinoma presenting with hematuria six years after radical surgery][J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2016, 43: 2407-2409.
- [15] MOLINA V, SAMPSON J, FERRER J, DÍAZ A, AYUSO J R, SÁNCHEZ-CABÚS S, et al. Surgical treatment of perihilar cholangiocarcinoma: early results of *en bloc* portal vein resection[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2017, 402: 95-104.
- [16] KIM Y S, OH S Y, GO S I, KANG J H, PARK I, SONG H N, et al. The role of adjuvant therapy after R0 resection for patients with intrahepatic and perihilar cholangiocarcinomas[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79: 99-106.

[本文编辑] 杨亚红