

## LDH5 在舌鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

袁春平<sup>1</sup>, 李中武<sup>1</sup>, 张 玮<sup>2</sup>, 王东苗<sup>1</sup>, 程 杰<sup>1\*</sup>, 杨建荣<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学口腔医学研究所, <sup>2</sup>南京医科大学附属口腔医院口腔病理科, 南京 江苏 210029)

**[摘要]** 目的:探讨 LDH5 蛋白在舌鳞状细胞癌组织中的表达特点,及其与临床病理和患者生存预后的关系。方法:应用免疫组织化学染色法检测 LDH5 蛋白在 63 例舌癌组织标本和 16 例正常舌黏膜组织标本中的表达。结合患者临床病理资料和随访资料,应用 SPSS17.0 软件分析 LDH5 的表达与相关临床病理参数(Fisher 精确概率法)以及患者总生存率之间的关系(Kaplan-Meier 法)。结果:LDH5 在部分舌鳞癌组织中呈高表达(33/63, 52.38%),与其在正常舌黏膜组织的表达水平相比有显著统计学差异( $P < 0.01$ )。LDH5 蛋白表达水平与肿瘤大小、颈淋巴结转移、临床分期具有相关性( $P < 0.05$ ),而与患者的性别、年龄、病理分级、局部浸润等无相关性( $P > 0.05$ )。Kaplan-Meier 法分析患者总体生存情况结果显示:LDH5 高表达组患者的总体生存率明显低于 LDH5 低表达组患者( $P = 0.006$ , Log-rank 检验)。结论:LDH5 在部分舌鳞状细胞癌组织中呈异常高表达,其表达水平与肿瘤的病理学特征及患者预后具有相关性。

**[关键词]** 舌鳞状细胞癌;LDH5 基因;有氧糖酵解;免疫组织化学染色

**[中图分类号]** R739.86

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)07-926-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140714

## The expression and clinical significance of LDH5 in tongue squamous cell carcinoma

Yuan Chunping<sup>1</sup>, Li Zhongwu<sup>1</sup>, Zhang Wei<sup>2</sup>, Wang Dongmiao<sup>1</sup>, Cheng Jie<sup>1\*</sup>, Yang Jianrong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Stomatology, <sup>2</sup>Department of Oral Pathology, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the characteristics of LDH5 expression in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and its relationship with clinicopathological parameters and survival. **Methods:** The LDH5 protein expression in 63 cases of TSCC and 16 cases of normal tongue mucosa were examined by immunohistochemistry. Based on these patients' information and their follow-up data, the correlation of LDH5 expression with patients' clinicopathological characteristics and overall survival were further evaluated by SPSS17.0 software using Fisher exact test and Kaplan-Meier method, respectively. **Results:** The LDH5 expression in TSCC (33/63, 52.38%) was much higher than that in normal tongue ( $P < 0.001$ ). LDH5 over-expression was found to be associated with tumor size, cervical lymph node metastasis and clinical stages ( $P < 0.05$ ), but not with gender, age, local invasion and pathological grades ( $P > 0.05$ ). The overall survival rate in patients with high LDH5 expression was significantly lower than that in patients with low expression as estimated by Kaplan-Meier and Log-rank test ( $P = 0.006$ ). **Conclusion:** LDH5 is aberrantly over-expressed in a significant fraction of TSCC patients. Its upregulation is associated with multiple clinicopathological features and patients' prognosis.

**[Key words]** tongue squamous cell carcinoma; LDH5; aerobic glycolysis; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):926-929]

舌鳞状细胞癌(以下简称舌癌)是最常见的口腔颌面部恶性肿瘤,具有浸润性强、颈淋巴结转移

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100737),江苏省自然科学基金(BK2011762),教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20113234120003)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: leonardo\_cheng@163.com; jrjskq@163.com

率高、预后差等特点,其平均5年生存率为50%~60%。局部侵袭和淋巴转移是导致患者死亡的主要因素<sup>[1]</sup>。异常的肿瘤细胞代谢,主要是有氧糖酵解反应,是包括舌癌在内的恶性实体肿瘤的共同特性之一<sup>[2]</sup>。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是在肿瘤细胞糖酵解过程中催化丙酮酸生成乳酸的关键酶<sup>[3]</sup>。既往有少量研究表明,LDH同工酶5(LDH5)

在多种恶性肿瘤组织中呈异常高表达,而且与肿瘤的多种恶性表征及患者的预后密切相关<sup>[4-6]</sup>。然而,目前对于 LDH5 在舌癌发生发展过程中的生物学作用研究较少。本研究旨在检测 LDH5 在临床舌癌组织中的表达,探讨其表达水平与患者的临床病理参数及预后的相关性。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选择 2000 年 1 月~2011 年 12 月就诊于南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科的 63 例舌鳞状细胞癌石蜡组织标本,其中男 37 例,女 26 例,平均年龄 54.7 岁(26~74 岁)。纳入标准:术前未接受放疗、化疗的原发舌癌患者,所有患者均采用原发病灶扩大切除术和颈淋巴清扫术(肩胛舌骨上颈淋巴清扫或全颈清扫),原发病灶经术后常规病理均证实为舌鳞状细胞癌。患者的临床分期、病理分级等根据 WHO TNM 分期标准和病理学分级标准确定。所有患者均接受术后常规随访,资料齐全,平均随访 46.8 个月(2~80 个月,从术后至最后一次随访时间点或患者死亡)。16 例正常舌黏膜组织标本取自舌部非肿瘤手术,术后经常规病理检查确认为正常黏膜。所有标本均经常规处理,置于中性 4%甲醛液中固定 12~24 h,逐级脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学染色

所有石蜡组织标本切片(5  $\mu\text{m}$ )后,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,经 3%过氧化氢封闭 10 min 灭活内源性过氧化物酶后,应用 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液行微波抗原修复(pH6.0, 15 min),经山羊血清封闭 20 min 后滴加一抗羊抗人 LDH5 多克隆抗体(1:400, ab9002, Abcam 公司,美国)4 $^{\circ}\text{C}$ ,过夜。次日分别滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)、SABC(武汉

博士德生物工程有限公司)室温 20 min, PBS 充分洗涤后 DAB(福州迈新生物技术开发有限公司)显色。苏木素复染后,脱水透明,封片镜检。用 PBS 缓冲液代替一抗做空白阴性对照。

#### 1.2.2 LDH5 阳性判定标准

免疫组化阳性信号以胞浆出现棕黄色染色为阳性细胞。每张染色切片均由口腔病理科医师进行评价。染色结果评价采用半定量积分法判断,即基于染色强度和阳性分布细胞比例判定<sup>[7]</sup>。染色强度定义为:0-阴性;1-弱阳性;2-阳性;3-强阳性。阳性染色的细胞比例(百分比)通过镜下随机选择 10 个高倍镜视野的 1 000 个肿瘤细胞,定义为 1:<10%;2:11%~50%;3:51%~80%;4:>80%。免疫染色积分按染色强度 $\times$ 阳性比例计算得出,0 分为阴性,1~4 分为弱阳性,>4 分为强阳性。

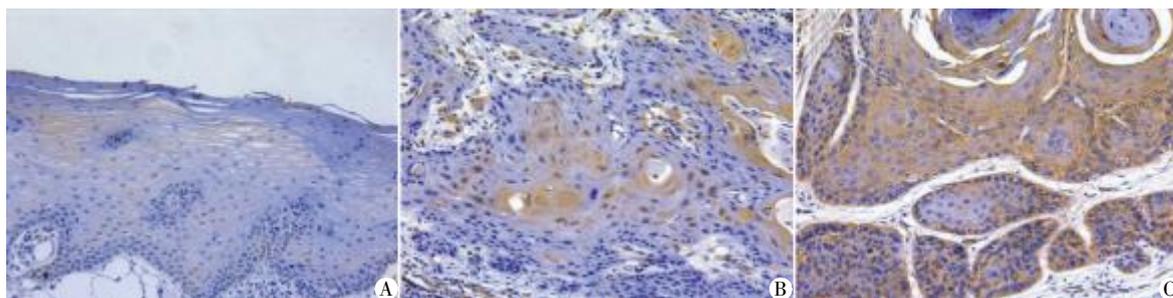
### 1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 进行数据的统计学分析,并采用卡方、Fisher 精确概率法检验对 LDH5 表达水平与患者的临床病理因素进行相关性分析,同时应用 Kaplan-Meier 法(Log-rank 检验)分析患者的生存情况。 $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LDH5 在正常舌黏膜和舌鳞癌组织中的表达

免疫组织化学染色显示 LDH5 蛋白主要表达于胞浆中,胞核染色罕见。舌癌组织标本中 LDH5 主要在鳞癌上皮中表达,癌周围组织表达很弱(图 1B、C);正常舌黏膜组织中 LDH5 大多在上皮层可见散在低表达或不表达(图 1A)。根据免疫组化染色评价标准,63 例鳞癌中有 33 例(52.38%)呈高表达,30 例(47.62%)呈低表达;在正常黏膜组织中 8 例(50.00%)呈低表达,5 例呈阴性,3 例呈高表达。因此,LDH5 在舌癌组织和正常舌黏膜组织的表达差异具有统计学意义( $P < 0.001$ )。



A: 正常舌黏膜上皮( $\times 100$ ); B: 舌鳞癌组织标本 LDH5 低表达、弱阳性( $\times 200$ ); C: 舌鳞癌组织标本 LDH5 高表达、强阳性( $\times 200$ )。

图 1 LDH5 在正常舌黏膜和舌鳞癌组织中的表达

Figure 1 LDH5 expression in normal tongue mucosa and TSCC

## 2.2 LDH5 表达水平与患者临床病理参数的相关性

在 63 例舌癌患者中结合临床病理资料发现, LDH5 表达与肿瘤大小、颈淋巴结转移和临床分期具有相关性, 而与患者的性别、年龄、局部浸润性和病理分级均无相关性(表 1)。

表 1 舌鳞癌组织中 LDH5 表达水平与临床病理参数的关系  
Table 1 Correlation between LDH5 expression and clinicopathological parameters in TSCC (n)

临床病理参数	例数	LDH5		P 值
		低表达	高表达	
性别				1.000
男	37	18	19	
女	26	12	14	
年龄(岁)				0.800
≤60	36	18	18	
>60	27	12	15	
肿瘤大小				0.009
T1~T2	47	27	20	
T3~T4	16	3	13	
病理分级				0.077
I	34	20	14	
II~III	29	10	19	
颈淋巴结转移				0.023
N(0)	35	22	15	
N(+)	28	8	20	
局部浸润				0.564
无	15	6	9	
有	48	24	24	
临床分期				0.002
I~II	29	20	9	
III~IV	34	10	24	

## 2.3 LDH5 表达与患者总体生存率的关系

结合临床随访资料,应用 Kaplan-Meier 法对患者的总体生存情况进行分析。LDH5 高表达组患者的总体生存率明显低于低表达组 ( $P = 0.003$ , Log-rank 检验,图 2)。

## 3 讨论

恶性肿瘤细胞在有氧条件下进行糖酵解反应,即 Warburg 效应,是癌细胞基本生物学特性之一<sup>[2]</sup>。癌细胞为满足生长增殖需要,在有氧环境中通过糖酵解以获得更多的营养和能量。在此过程中,葡萄糖经过系列生物化学反应生成丙酮酸,然后大多丙酮酸通过乳酸脱氢酶反应形成乳酸。因此,乳酸脱氢酶是癌细胞有氧糖酵解过程中的关键酶之一,在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[3,8]</sup>。既往研究表明,LDH5 在多种原发性恶性肿瘤包括大肠癌、肺

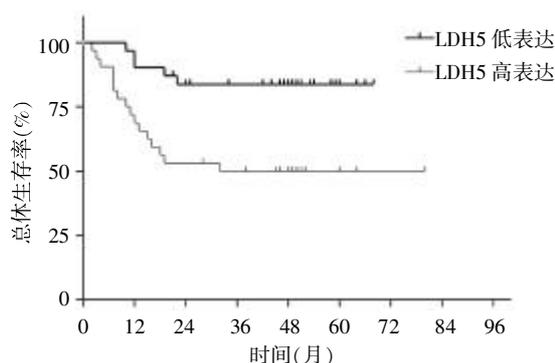


图 2 LDH5 的表达与患者总体生存率的关系 (Kaplan-Meier 分析)

Figure 2 The relationship between LDH5 expression and the overall survival in patients with TSCC (Kaplan-Meier method)

癌、头颈癌等组织中呈异常高表达<sup>[5-6,9-10]</sup>。本研究通过对正常舌黏膜和舌癌组织标本的免疫组织化学染色发现,与其他恶性实体肿瘤类似,LDH5 蛋白在多数舌癌组织中呈高表达,阳性表达率明显高于正常舌黏膜组织;LDH5 染色主要位于肿瘤细胞的胞浆中,而在胞核中罕见,这也与 LDH5 的生物学功能相符合。这提示 LDH5 可能参与了舌癌的发生发展过程。

研究已证实 LDH5 蛋白的异常高表达与肿瘤的多种临床病理参数具有相关性。Koukourakis 等<sup>[5]</sup>对 141 例头颈鳞癌标本进行 LDH5 免疫组织化学染色,结果发现 LDH5 在头颈癌中高表达,与肿瘤的大小、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )、局部复发和远处转移有关,并且提示 LDH5 可能是逆转放疗抵抗的潜在治疗靶点。在 191 例口腔鳞癌标本中对 LDH5 进行免疫组化监测,发现其高表达与颈淋巴结转移、肿瘤临床分期和局部复发相关<sup>[10]</sup>。对 128 例大肠腺癌手术标本中的 LDH5 表达进行免疫组织化学检测,结果发现 LDH5 的异常高表达与 HIF1 $\alpha$  的表达呈正相关,而且其高表达预示着患者的预后不良<sup>[4]</sup>。与此类似,本文结果也证实,在人舌癌组织中 LDH5 蛋白的表达水平与肿瘤大小、颈淋巴转移和临床分期呈显著相关。再结合组织标本中 LDH5 的表达和患者的生存预后情况,发现 LDH5 的表达与舌癌患者的总体生存率有关,即 LDH5 高表达患者总体生存率明显低于低表达患者。因此,我们认为 LDH5 在舌癌组织中的表达水平可是判断患者总体生存的重要指标之一。

综上所述,本研究发现 LDH5 蛋白的表达水平与肿瘤大小、颈淋巴转移、临床分期和患者的总体生存率显著相关,是舌癌潜在的分子标记物之一,

也提示 LDH5 可能是潜在的抗肿瘤生物治疗的靶点。然而,LDH5 在舌癌病变过程中的生物学机制及以 LDH5 为靶向的生物治疗新手段值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Bagan J,Sarrion G,Jimenez Y. Oral cancer:clinical features[J]. Oral Oncol,2010,46(6):414-417
- [2] Hanahan D,Weinberg RA. Hallmarks of cancer:the next generation[J]. Cell,2011,144(5):646-674
- [3] Bensinger SJ,Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology [J]. Semin Cell Dev Biol,2012,23(4):352-361
- [4] Koukourakis MI,Giatromanolaki A,Sivridis E,et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer:strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group [J]. J Clin Oncol,2006,24(26):4301-4308
- [5] Koukourakis MI,Giatromanolaki A,Winter S,et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy [J]. Oncology,2009,77(5):285-292
- [6] Arseneault R,Chien A,Newington JT,et al. Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration[J]. Cancer Lett,2013,338(2):255-266
- [7] Liu LK,Jiang XY,Zhou XX,et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas:correlation with the clinicopathological features and patient outcome[J]. Mod Pathol,2010,23(2):213-224
- [8] Hirschhaeuser F,Sattler UG,Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer [J]. Cancer Res,2011,71(22):6921-6925
- [9] Koukourakis MI,Giatromanolaki A,Simopoulos C,et al. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer[J]. Clin Exp Metastasis,2005,22(1):25-30
- [10] Grimm M,Alexander D,Munz A,et al. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma [J]. Clin Exp Metastasis,2013,30(4):529-540

[收稿日期] 2013-10-29

## 科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, $(2\sim 6)\times 10^3$  或  $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$ ,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)